

枳根cDNA全长文库的构建与分析

姚利晓, 王金萍, 何永睿, 雷天刚, 许兰珍, 彭爱红, 邹修平, 陈善春*

(西南大学柑桔研究所, 国家柑桔工程技术中心, 国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712)

摘要: 为了解柑橘优良砧木枳 (*Poncirus trifoliata*) 根部的基因表达信息, 利用 SMART 技术构建了枳的根组织全长 cDNA 文库。检测结果显示所建枳根原始文库的容量为 1.08×10^6 cfu · mL⁻¹, 扩增后文库容量为 1.30×10^9 cfu · mL⁻¹, 重组率为 95%。通过文库随机测序获得 182 个长度大于 100 bp 的 ESTs 序列 (GenBank 登录号为 JK316116 ~ JK316297), 序列拼接后得到 96 个 Unigenes, 包括 12 个 Contigs 和 84 个 singletons。其中, 68 个 Unigenes 可与 GenBank 中登录的基因相匹配, 56 个与已知的柑橘基因相匹配, 36 个为全长基因。对 24 个全长基因完成了功能注释, 并进一步开展了生物信息学分析, 发现有 6 个应激反应基因和 3 个根发育相关基因。

关键词: 枳; 根; 全长 cDNA 文库; 表达序列标签; 生物信息学分析

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 01-0149-08

Construction and Analysis of a Root Full-length cDNA Library of *Poncirus trifoliata*

YAO Li-xiao, WANG Jin-ping, HE Yong-rui, LEI Tian-gang, XU Lan-zhen, PENG Ai-hong, ZOU Xiu-ping, and CHEN Shan-chun*

(Citrus Research Institute, Southwest University; National Citrus Engineering Research Center; National Citrus Improvement Center, Chongqing 400712, China)

Abstract: For understanding the gene expression information in roots of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*), an excellent citrus rootstock, a full-length cDNA library was successfully constructed with the root material. According to the quality analysis results, the library reached 1.08×10^6 cfu · mL⁻¹ in capacity with a recombinant efficiency as high as 95%. One hundred and eighty-two expressed sequence tags (ESTs, GenBank No.: JK316116 - JK316297) were obtained from 200 clones that were randomly selected from the library, and then subjected to further assay. Among 96 unigenes obtained from those ESTs, which included 12 contigs and 84 singletons, 68 unigenes were homologous with the genes in GenBank database while 56 unigenes were homologous with the citrus genes published. These unigenes may have biology function such as binding, catalytic activity and so on, and may play important roles in biology process such as cellular process, metabolic process, response to stimulus and so forth. Twenty-four unigenes were annotated among the 36 genes with the open reading frame (ORF) and 9 genes might be related with stress responding or root developing.

收稿日期: 2014 - 10 - 28; **修回日期:** 2014 - 12 - 30

基金项目: 农村领域国家科技计划 ('863') 课题 (2011AA100205); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-27); 重庆市基础与前沿研究计划项目 (cstc2013jcyjA80009); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (XDJK2013C105, XDJK2014A018)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenshanchun@cric.cn)

Key words: *Poncirus trifoliata*; root; full-length cDNA library; expressed sequence tags; bioinformatic analysis

枳 (*Poncirus trifoliata*) 是具有优良抗性的柑橘砧木之一, 不仅耐寒, 耐旱而且抗脚腐病、衰退病、木质陷点病、溃疡病及柑橘线虫病等多种病害, 因而在柑橘产区得到了广泛应用。了解枳的功能基因, 尤其是根部功能基因的表达信息将有助于更好地利用其优良性状。

为了解柑橘根中基因的表达信息, 柑橘功能基因组项目 (Citrus Functional Genomics Project, CFGP) 以克利曼丁、甜橙、枳橙、酸橙、酸橘等为材料, 构建了 9 个根 cDNA 文库 (Forment et al., 2005), 其 EST 的平均长度在 510.5 ~ 698.9 bp, Unigenes 数为 141 ~ 1 595 个。其后, 柑橘在非生物胁迫下根中基因的表达情况受到关注, 试验材料包括甜橙、柠檬、酸柚、枳柚和枳橙 (Boscariol-Camargo et al., 2007; Yang et al., 2012; de Ollas et al., 2013; Martinez-Cuenca et al., 2013; Lu et al., 2014)。目前, 虽然从枳中获得一些优良的抗逆基因, 如 *PtCBF* 和耐寒相关的渗透压调节基因 *HOS1* (Champ et al., 2007; Wang et al., 2009; Liu et al., 2010; He et al., 2012)、耐旱相关的多胺合成酶基因 *PtADC*、蛋白激酶基因 *PtrMAPK* 等和一些耐旱相关转录因子基因 *PtsrMYB* 和 *PtrABF* 等 (Huang et al., 2010, 2011; Wang et al., 2011; Sun et al., 2014)。但这些抗逆基因均来自于枳的叶片组织, 而非根组织, 当枳作为砧木应用时这些基因的表达情况仍需要进一步研究。

本研究构建了枳根全长 cDNA 文库, 并从中获得了一些新的抗逆相关功能基因和根发育相关基因, 为枳根特异表达基因的克隆和鉴定奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料及根 RNA 的提取

试验于 2009—2010 年在国家柑桔品种改良中心进行。枣阳小叶枳的果实取自国家果树种质重庆柑桔圃, 将种子剥去种皮, 放在湿润的滤纸上 28 °C 催芽。萌发的种子移植于营养钵中, 室温下培养, 植株生长约 10 cm 时, 取枳的根尖 1 ~ 2 cm, 流水洗净后剪碎, 立即放于液氮中速冻保存。

按照植物总 RNA (小量) 抽提试剂盒说明书提取枳根组织总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测其纯度和浓度。

1.2 文库构建

取 1 μg 枳根总 RNA 作为模板, 参照试剂盒操作程序进行反转录及 LD-PCR, 分别在 LD-PCR 14、16、18、20、22、24、26、28、30 个循环结束后取 5 μL 反应产物进行电泳检测。取 50 μL LD-PCR 产物, 加入 2 μL 蛋白酶 K (20 g · L⁻¹), 于 42 °C 温育 20 min 去除 *Taq* 酶, 纯化回收 cDNA。用 *Sfi* I 酶于 50 °C 酶切 2 h 产生黏性末端, 加入 2 μL 1% 的二甲基苯腈蓝, 充分混匀。将酶切产物过 CHROMA SPIN-400 柱, 每管过柱收集物取 3 μL 电泳检测, 将含 500 bp 以上 cDNA 片段的各管合并, 重新进行沉淀后溶解。取 5 μL cDNA 与 1.0 μL pDNR-LIB 载体 16 °C 连接过夜, 热激转化感受态细胞 JM109, 所得菌液全部涂布于含氯霉素的 LB 平板。对构建好的枳根 cDNA 文库扩增后保存。

取 5 μL 原始文库依次做 10 倍梯度稀释, 按下列公式计算文库容量 (colony forming unit, CFU), 文库容量 (cfu · mL⁻¹) = 平板上的克隆数 × 稀释倍数 × 10³/稀释菌液的铺板体积。

随机挑取 20 个克隆进行菌液 PCR 鉴定, 所用引物为试剂盒所带的 M13 引物, 菌液 PCR 扩增

条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。阳性克隆个数与总克隆数的百分比即为文库重组率。

1.3 序列测定和分析

随机挑取 200 个克隆送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，去除测序结果中的载体序列和引物序列。所有序列用 DNASTAR 软件进行序列比对和拼接。将所得到的 Unigenes 用 BLAST2GO 软件进行生物学功能注释和分类。利用 ORFFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)、ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)、InterPro Scan (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)、ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) 等软件对全长基因进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 原始文库的获得

枳根总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果显示 28S 和 18S 条带清晰，其比例约为 2:1，表明所提取的 RNA 完整性较好。紫外分光光度计检测结果 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.96，显示 RNA 纯度较高，可用于全长文库的构建。

分别取 LD-PCR 反应 14、16、18、20、22、24、26、28、30 个循环的产物，经电泳检测，发现第 24 个循环结束时产物的泳带较亮。将 24 个循环结束时的 LD-PCR 产物用 *Sfi* I 酶切，过 CHROMA SPIN-400 柱去除小的片段，电泳结果表明第 5~8 管中含有大于 500 bp 的片段，将这 4 管的收集液合并，用乙醇进行沉淀。

cDNA 产物与载体 pDNR-LIB 连接后转化感受态 JM109 细胞，获得原始文库。

2.2 文库容量和重组率

经测定，所构建枳根 cDNA 原始文库容量为 $1.08 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，扩增后文库容量为 $1.30 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

从原始文库中随机挑取 20 个克隆进行菌液 PCR 检测，电泳检测结果（图 1）显示在随机挑取的 20 个克隆中 19 个有扩增条带，计算所构建枳根 cDNA 文库的重组率为 95%。

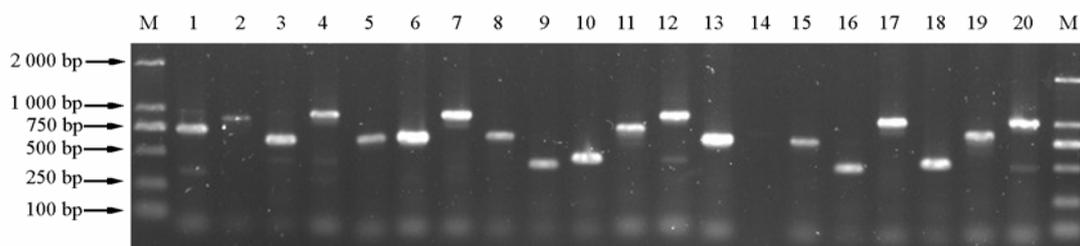


图 1 文库插入片段和重组率检测

M: DNA marker DL2000; 1~20: 随机克隆 PCR 产物。

Fig. 1 Detection of inserted fragments and recombination efficiency by PCR

M: DNA marker DL2000; 1 - 20: PCR products from random clones.

2.3 文库分析

随机从枳根 cDNA 文库挑取 200 个克隆进行测序, 得到 182 个长度大于 100 bp 的有效片段, 插入片段的平均长度为 560 bp。GenBank 登录号为 JK316116~JK316297。

经序列拼接后, 182 个 EST 组成 96 个 Unigenes, 其中 12 个 Contigs, 84 个 singletons。在这 96 个 Unigenes 中, 共有 68 个可与 GenBank 中登录的基因相匹配, 其中 56 个与已知的柑橘基因相匹配, 它们分别来源于克利曼丁 (*Citrus clementina*) (51 个)、甜橙 (*C. sinensis*) (2 个)、温州蜜柑 (*C. unshiu*) (2 个) 和酸橙 (*C. aurantium*) (1 个)。

GO 功能注释结果 (图 2) 显示, 这些基因具有结合功能、催化活性、转运活性和转录因子等生物学功能, 参与细胞过程、代谢过程、应激反应、发育等生物学过程。

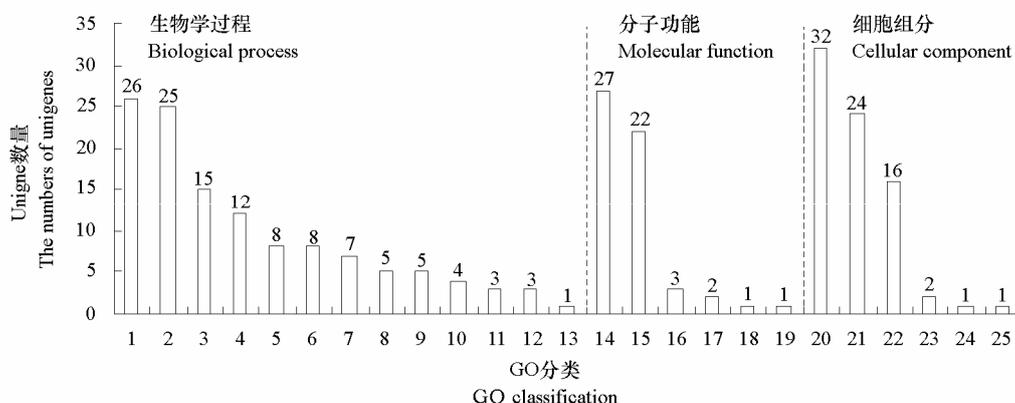


图 2 枳根全长文库部分 Unigenes GO 归类结果

- 1: 细胞过程; 2: 代谢过程; 3: 应激反应; 4: 单个有机体过程; 5: 发育过程; 6: 定位; 7: 多细胞有机体过程;
8: 生物学调节; 9: 繁殖过程; 10: 细胞成分构成; 11: 生长过程; 12: 信号传递; 13: 多个有机体过程;
14: 结合功能; 15: 催化活性; 16: 转运活性; 17: 结构分子; 18: 转录因子;
19: 分子修饰; 20: 细胞; 21: 细胞器; 22: 细胞膜;
23: 大分子复合体; 24: 细胞间隙; 25: 膜封闭腔。

Fig. 2 Distribution of some Unigenes in the root library according to the GO consortium

- 1: Cellular process; 2: Metabolic process; 3: Response to stimulus; 4: Single-organism process; 5: Developmental process;
6: Localization; 7: Multicellular organismal process; 8: Biological regulation; 9: Reproduction;
10: Cellular component organization; 11: Growth; 12: Signaling; 13: Multi-organism process;
14: Binding; 15: Catalytic activity; 16: Transporter activity; 17: Structural molecule activity;
18: Nucleic acid binding transcription factor activity; 19: Molecular transducer activity;
20: Cell; 21: Organelle; 22: Membrane; 23: Macromolecular complex;
24: Extracellular region; 25: Membrane-enclosed lumen.

2.4 全长基因的生物信息学分析

在所构建枳根 cDNA 文库的 96 个 Unigenes 中, 发现全长基因 36 个, 占 37.5%。其中 24 个基因完成了功能注释, 并进一步开展了其生物信息学分析, 其蛋白名称、开放阅读框长度、相对分子量、理论等电点和参与的生物学过程见表 1。

表 1 24 个与已知功能基因同源的全长基因
Table 1 Twenty-four unigenes homologous with known-function genes

单一基因 编号 Unigenes No.	GenBank No.	蛋白名称 Protein name	基因长 度/bp Length	ORF/ aa	理 论 分 子 量/kD MW	理 论 等 电 点 pI	生物学过程 GO biological process	频次 Frequency
Contig 2	JK316196	MLP43	770	156	17.6	5.5	防御反应 Defense response, response to biotic stimulus	4
Contig 6	JK316290	Dormancy associated protein	1 278	152	17.2	9.1	果糖/葡萄糖/蔗糖应激反应 Response to fructose/glucose/sucrose stimulus	1
Contig 8	JK316286	Two-component response regular ARR9	1 033	242	27.4	5.0	信号传递, 转录调节 Signal transduction, regulation of transcription	1
Contig 9	JK316181	Defender against apoptotic death1	626	115	12.6	9.1	抗细胞凋亡 Anti-apoptosis	1
Contig 11	JK316173	O-methyltransferase	1 274	366	40.0	5.6	黄酮醇合成过程, 木质素合成过程 Flavonol biosynthetic process, lignin biosynthetic process	1
Contig 16	JK316154	Nucleic acid binding	1 129	251	27.8	10.5	转录调节 Regulation of transcription	4
Contig 18	JK316131	Metallothionein-like protein 1A	561	68	7.1	4.2	金属离子应激反应 Response to metal ion	3
Contig 21	JK316274	Coatomer delta subunit	1 963	533	58.4	5.7	高尔基体内颗粒传递 Intra-Golgi vesicle mediated transport	1
Contig 24	JK316220	DNA binding protein	440	49	5.4	3.8	DNA 复制, 根发育 DNA endoreduplication, root development	1
Contig 25	JK316258	DNA binding protein	436	51	5.6	4.1	DNA 复制, 根发育 DNA endoreduplication, root development	1
Contig 30	JK316287	DYL1	732	122	13.3	9.5	果糖/葡萄糖/蔗糖应激反应 Response to fructose/glucose/sucrose stimulus	1
Contig 42	JK316187	Peroxidase	1 384	335	37.8	8.5	氧压力反应 Response to oxidative stress	1
Contig 47	JK316236	Zinc finger protein	990	172	18.3	8.0	生物学过程 Biological process	1
Contig 53	JK316251	DNA polymerase epsilon P17 subunit	539	59	6.6	5.8	DNA 复制 DNA replication	1
Contig 60	JK316125	Cytochrome C oxidase subunit Vb	639	165	18.2	5.7	翻译 Translation	1
Contig 66	JK316278	PhyH family protein	1 199	282	31.8	5.2	脂肪酸代谢 Fatty acid metabolic process	1
Contig 72	JK316256	Ubiquitin-binding protein	689	159	18.0	4.7	复制后修复 Postreplication repair	1
Contig 73	JK316293	Nydroxyproline-rich glycoprotein family protein	743	131	14.5	8.7	植物细胞壁组成 Plant-type cell wall organization	1
Contig 74	JK316270	Chaperon protein DnaJ	1 524	216	24.0	4.9	低温反应 Response to very low light intensity stimulus	1
Contig 77	JK316117	Flavonol synthase	1 160	337	38.0	5.9	类黄酮合成过程 Flavonoid biosynthetic process	1
Contig 82	JK316273	60S acidic ribosomal protein	700	113	11.3	4.4	翻译 Translation	1
Contig 84	JK316172	Ubiquitin-like protein 5	521	77	9.0	7.8	蛋白修饰 Protein modification process	1
Contig 87	JK316179	Alcohol dehydrogenase	1 257	346	38.1	5.9	乙醇分解代谢过程 Alcohol catabolic process	1
Contig 88	JK316268	Profilin	825	131	14.1	5.0	肌动蛋白集结 Actin nucleation	1

在这 24 个全长基因中, 有 6 个与植物的应激反应相关, 它们是主要乳液蛋白基因 Contig 2、休眠相关蛋白基因 Contig 6、金属硫蛋白基因 Contig 18、DYL1 基因 Contig 30、过氧化物酶基因 Contig 42、DnaJ 编码基因 Contig 74; 3 个与根发育相关基因, 即 Profilin 编码基因 Contig 88 和 DNA 结合蛋白基因 Contig 24、Contig 25。

随后, 对编码蛋白质功能域进行了分析。Contig 2 编码 MLP43 (major latex proteins) 蛋白, 具有 Bet v 1 超家族蛋白的配体结合位点。Contig 6 编码休眠相关蛋白, 有两个植物生长素的结合位点, 分别位于 5 ~ 33aa 和 81 ~ 150aa 区间, 34 ~ 54aa 预测为跨膜区。Contig 8 编码蛋白具有反应调节结构域 (response regulatory domain) (51 ~ 187aa) 和一个磷酸化位点 (121aa)。Contig 11 编码甲基转移酶, N 端具有二聚化区和与 DNA 结合的区域。Contig 16 编码蛋白属于 Alba (acetylation lowers binding affinity) 族蛋白, 该蛋白可与 DNA 非特异性地紧密结合, 在染色体构建和维持中可能具有作用。Contig 21 编码蛋白的 285 ~ 533aa 为 MHD (Mu homology domain) 结构域, 是构成笼形蛋白适配器 (clathrin adaptors) 的 mu 亚基, 参与蛋白质的胞内运输过程。Contig 42 编码蛋白具有信号肽 (1 ~ 25aa)、4 对二硫键 (42aa/121aa、75aa/80aa、127aa/325aa 和 206aa/233aa)、4 个钙离子结合位点 (200aa、249aa、252aa 和 257aa)、1 个铁离子结合位点 (199aa) 和 1 个质子受体 (73aa), 是一种分泌型的过氧化物酶。Contig 47 编码蛋白具有两个锌指结构域 ZF_A20 (12 ~ 46aa) 和 ZF_AN1 (110 ~ 153aa), 参与泛素化途径。Contig 60 编码蛋白具有三个锌离子结合位点 (114aa、138aa 和 141aa) 和信号肽区域 (1 ~ 24aa)。Contig 66 编码 phytanoyl-CoA dioxygenase (PhyH), 具有 Neuraxin 和 MAP1B 蛋白的特征位点 (65 ~ 74aa), 催化植烷酸 α 氧化的第 1 个步骤。Contig 73 编码蛋白具有信号肽 (1 ~ 39aa) 和跨膜区 (22 ~ 42aa) 的结构。Contig 77 编码蛋白具有 3 个铁离子结合位点 (218aa、220aa 和 274aa) 和一个 2-氧戊二酸的结合位点 (284aa), 参与类黄酮的合成。

3 讨论

本研究中以枳为材料构建了其根部组织的全长 cDNA 文库, 在 24 个全长基因中发现的 9 个与植物抗逆或根组织发育相关的基因, 除金属硫蛋白基因 (Contig 18) 在柑橘中获得克隆 (Endo et al., 2007; Nishimura et al., 2013), 其它 8 个基因 Contig 2、Contig 6、Contig 24、Contig 25、Contig 30、Contig 42、Contig 74 和 Contig 88 在柑橘中尚无相关报道, 下一步打算利用定量 PCR、转基因等技术手段对其表达和功能进行深入研究。

主要乳液蛋白参与植物对生物或非生物逆境的防御反应, 在高盐、低温、干旱等非生物逆境下, 其表达量在短期内迅速提高 (Chen & Dai, 2010; Sun et al., 2010); 在病原物诱导下主要乳液蛋白基因的表达增强, 与植物的抗病性相关 (Chen & Dai, 2010)。分析显示所获得的 Contig 2 为主要乳液蛋白基因, 可能与枳抗逆性相关。

过氧化物酶是一类广泛存在于动物、植物和微生物中的活性物质, 研究发现柑橘过氧化物酶基因受转录因子 PtrbHLHc 的调控, 与植物的低温抗性相关 (Huang et al., 2013); 并且, 在病毒侵染后, 柑橘过氧化物酶基因的表达上调 (Rizza et al., 2012)。DnaJ 是热激蛋白 hsp40 家族 (也称为 J 蛋白家族) 的成员, 该家族的成员对 hsp70 家族成员的活性具有调节作用, 通过促进部分变性的蛋白复性 (重新折叠) 来保护胁迫损害的细胞并使其恢复正常功能, 在应对热激胁迫、盐胁迫、重金属胁迫等方面具有作用。从枳根全长 cDNA 文库所获得的过氧化物酶基因 Contig 42 和 DnaJ 基因可能属于广谱的应激反应基因。

休眠是多年生植物应对环境逆境的一种生理现象, 果树的休眠突变体中, 休眠相关蛋白基因的表达降低, 但这种下调似乎不能被顺式调节、启动子甲基化和内含子插入所解释 (Saito et al., 2013)。前期的研究发现, 虽然梨 *PsDRM1* 在休眠的腋芽中表达量高, 但在其它非生长组织中表达也增强, 如在根中的表达量远大于根尖 (Saito et al., 2013), 这也能够解释为何能从枳根全长文库测序获得两个休眠相关基因 Contig 6 和 Contig 30。

Profilin 是一种单体肌动蛋白结合蛋白, 也是一个多基因家族, 在不同组织和发育时期特异表达, 其生物学功能复杂且呈多样性, 在调控肌动蛋白纤维聚合和解聚中具有双重作用 (Sun et al., 2013)。在十字花科植物和拟南芥的根毛中, Profilin 和肌动蛋白在顶端和凸起部分形成一个顶冠, 当根毛生长终止时 Profilin 和肌动蛋白顶冠消失 (Braun et al., 1999)。最近研究发现拟南芥 PRF3 是一个组成型表达的 profilin 基因, 是根、下胚轴和根毛生长的重要负调节因子 (Fan et al., 2013)。本研究获得的 Contig 88 编码 profilin 蛋白, 也可能参与枳根的发育过程。另外, Contig 24 和 Contig 25 属于 DNA 结合蛋白基因, GO 功能分类显示可能是与枳根发育相关的两个新基因。

References

- Boscariol-Camargo R L, Berger I J, Souza A A, do Amaral A M, Carlos E F, Freitas-Astua J, Takita M A, Targon M L P N, Medina C L, Reis M S, Machado M A. 2007. In silico analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) under water stress. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 906 - 916.
- Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzel D. 1999. Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta*, 209: 435 - 443.
- Champ K I, Febres V J, Moore G A. 2007. The role of CBF transcriptional activators in two *Citrus* species (*Poncirus* and *Citrus*) with contrasting levels of freezing tolerance. *Physiologia Plantarum*, 129: 529 - 541.
- Chen J Y, Dai X F. 2010. Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 231: 861 - 873.
- de Ollas C, Hernando B, Arbona V, Gomez-Cadenas A. 2013. Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 147: 296 - 306.
- Endo T, Shimada T, Fujii H, Moriguchi T, Omura M. 2007. Promoter analysis of a type 3 metallothionein-like gene abundant in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 112 (2): 207 - 214.
- Fan T, Zhai H, Shi W, Wang J, Jia H, Xiang Y, An L. 2013. Overexpression of profilin 3 affects cell elongation and F-actin organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 32: 149 - 160.
- Forment J, Gadea J, Huerta L, Abizanda L, Agusti J, Alamar S, Alos E, Andres F, Arribas R, Beltran J P, Berbel A, Blazquez M A, Brumos J, Canas L A, Cercos M, Colmenero-Flores J M, Conesa A, Estables B, Gandia M, Garcia-Martinez J L, Gimeno J, Gisbert A, Gomez G, Gonzalez-Candelas L, Granell A, Guerri J, Lafuente M T, Madueno F, Marcos J F, Marques M C, Martinez F, Martinez-Godoy M A, Miralles S, Moreno P, Navarro L, Pallas V, Perez-Amador M A, Perez-Valle J, Pons C, Rodrigo I, Rodriguez P L, Royo C, Serrano R, Soler G, Tadeo F, Talon M, Terol J, Trenor M, Vaello L, Vicente O, Vidal C, Zacarias L, Conejero V. 2005. Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology*, 57: 375 - 391.
- He L G, Wang H L, Liu D C, Zhao Y J, Xu M, Zhu M, Wei G Q, Sun Z H. 2012. Isolation and expression of a cold-responsive gene *PtCBF* in *Poncirus trifoliata* and isolation of citrus *CBF* promoters. *Biologia Plantarum*, 56: 484 - 492.
- Huang X S, Liu J H, Chen X J. 2010. Overexpression of *PtRABF* gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 10: 72. Doi: 10.1186/1471-2229-10-230
- Huang X S, Luo T, Fu X Z, Fan Q J, Liu J H. 2011. Cloning and molecular characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from *Poncirus trifoliata* whose ectopic expression confers dehydration/drought tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 62: 5191 -

- 5206.
- Huang X S, Wang W, Zhang Q, Liu J H. 2013. A basic helix-loop-helix transcription factor, *PtrbHLH*, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide. *Plant Physiology*, 162: 1178 - 1194.
- Liu D C, He L G, Wang H L, Xu M, Sun Z H. 2010. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *PtrHOS1*, a novel gene of cold responses from trifoliata orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 271 - 279.
- Lu Y B, Yang L T, Qi Y P, Li Y, Li Z, Chen Y B, Huang Z R, Chen L S. 2014. Identification of boron-deficiency-responsive microRNAs in *Citrus sinensis* roots by Illumina sequencing. *BMC Plant Biology*, 14: 123.
- Martinez-Cuenca M R, Iglesias D J, Talon M, Abadia J, Lopez-Millan A F, Primo-Millo E, Legaz F. 2013. Metabolic responses to iron deficiency in roots of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. *Tree Physiology*, 33: 320 - 329.
- Nishimura S, Tatano S, Miyamoto Y, Ohtani K, Fukumoto T, Gomi K, Tada Y, Ichimura K, Akimitsu K. 2013. A zinc-binding citrus protein metallothionein can act as a plant defense factor by controlling host-selective ACR-toxin production. *Plant Molecular Biology*, 81 (1 - 2): 1 - 11.
- Rizza S, Conesa A, Juarez J, Catara A, Navarro L, Duran-Vila N, Ancillo G. 2012. Microarray analysis of Etrog citron (*Citrus medica* L.) reveals changes in chloroplast, cell wall, peroxidase and symporter activities in response to viroid infection. *Molecular Plant Pathology*, 13: 852 - 864.
- Saito T, Bai S, Ito A, Sakamoto D, Saito T, Ubi B E, Imai T, Moriguchi T. 2013. Expression and genomic structure of the *dormancy-associated MADS box* genes *MADS13* in Japanese pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) that differ in their chilling requirement for endodormancy release. *Tree Physiology*, 33: 654 - 667.
- Sun H, Kim M K, Pulla R K, Kim Y J, Yang D C. 2010. Isolation and expression analysis of a novel major latex-like protein (*MLP151*) gene from *Panax ginseng*. *Molecular Biology Reports*, 37: 2215 - 2222.
- Sun P, Zhu X, Huang X, Liu J H. 2014. Overexpression of a stress-responsive MYB transcription factor of *Poncirus trifoliata* confers enhanced dehydration tolerance and increases polyamine biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78: 71 - 79.
- Sun T, Li S, Ren H. 2013. Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4: 512.
- Wang H L, Tao J J, He L G, Zhao Y J, Xu M, Liu D C, Sun Z H. 2009. cDNA cloning and expression analysis of a *Poncirus trifoliata* *CBF* gene. *Biologia Plantarum*, 53: 625 - 630.
- Wang J, Sun P P, Chen C L, Wang Y, Fu X Z, Liu J H. 2011. An arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2899 - 2914.
- Yang L T, Jiang H X, Qi Y P, Chen L S. 2012. Differential expression of genes involved in alternative glycolytic pathways, phosphorus scavenging and recycling in response to aluminum and phosphorus interactions in *Citrus* roots. *Molecular Biology Reports*, 39: 6353 - 6366.