

葛根膨大相关基因 表达的 cDNA-AFLP 分析

刘冬梅, 吴才君* 范淑英

(江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045)

摘要: 为从本质上揭示葛块根膨大的分子机理, 将 cDNA-AFLP 技术运用于葛块根膨大的野生型和突变型发育过程的基因表达差异的分析, 筛选出 5 个特异表达片段, 其中野生型 Y_0 、 Y_1 和突变型 T_0 、 T_1 4 个成功测序, 结果显示: DNA 片段大小分别为 384、248、241 和 161 bp; BLAST 搜索结果表明: Y_0 与大豆假拟蛋白相关的未知 mRNA 同源性 99%; Y_1 与罗伊乳杆菌木糖异构酶基因序列同源性 95%; T_0 与豇豆小分子热休克蛋白 mRNA 序列同源性 87%; T_1 与番茄的类胡萝卜素异构酶基因同源性 98%; Y_0 翻译的蛋白质与拟南芥亚种赤霉素结合蛋白 β -2 亚基有一定同源性, Y_1 和 T_0 、 T_1 翻译的蛋白质在核酸蛋白数据库中均未搜索到同源序列。

关键词: 葛根膨大; cDNA-AFLP; 特异表达片段

中图分类号: S632.9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0369-06

cDNA-AFLP Analysis on Genes Associated with Tuberous Root Swelling in *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi

LIU Dong-mei, WU Cai-jun* , FAN Shu-ying

(College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: In order to essentially reveal the molecular mechanism of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi tuberous root swelling, this study adopts cDNA-AFLP to analyse the gene expression differences in the swollen wild type and mutant type of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi tuberous root in its developing process, and has selected five special clips, four DNA fragment sequences, including wild types Y_1 and Y_0 , mutation types T_0 and T_1 . The results show: the length of the DNA fragments are 384, 248, 241 and 161 bp respectively; and BLAST search results show that Y_0 is associated with unknown mRNA of hypothetical protein in soybean with identity of 99%; Y_1 is associated with Roy lactobacillus xylose isomerase gene sequences with identity of 95%; T_0 is associated with cowpea small heat shock protein mRNA sequence with identity of 87%; T_1 is associated with tomato carotenoids isomerase gene homology with identity of 98%; in nucleotide-Protein database, the protein of T_1 is associated with gibberellic acid binding proteins subunit β -2 in arabidopsis subspecies with some identity; but the significant homologous protein sequences translated by T_0 , Y_0 and Y_1 have not been found in the databases yet.

Key words: *Pueraria* tuber swelling; cDNA-AFLP; specific expression fragments

收稿日期: 2011-10-27 修回日期: 2011-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助(30560087)

作者简介: 刘冬梅(1985—), 女, 硕士生, 主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究, E-mail: ldmtryourbest@126.com;

* 通讯作者: 吴才君, 教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: wucj12@126.com.

野葛 [*Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi] 为葛属豆科蝶形花亚科, 多年生草本植物。目前国内外对葛根药用价值方面的研究日益深入, 随着葛根的药理、有效成分提取、分离和检测技术等方面研究的不断深入, 其保健作用和应用价值引起人们的高度重视。野葛根含有丰富的氨基酸, 尤其是人体不能合成的必需氨基酸, 既是传统的药用植物, 又是很好的保健食品^[1]。但由于葛块根复杂的遗传背景致使分子水平上的研究相对滞后, 葛根的膨大机制尚不清晰, 未见相关序列的报道。

cDNA-AFLP 是一种将 AFLP 技术应用于 mRNA 差异表达的 RNA 指纹技术, 结果假阳性低, 获得的转录衍生片段可最大限度地提供基因编码区的信息, 更适合对转录组进行全面的分析, 在差异表达基因分离与表达特异性分析研究领域得到广泛的应用^[2]。Donson^[3] 等以拟南芥的各种组织和不同处理为实验材料, 通过对获得的 cDNA-AFLP 片段进行系统测序, 建立了高容量的转录组表达数据库大大方便了差异表达基因的筛选。Mao^[4] 等利用 cDNA-AFLP 技术确定了水稻受铝调控的基因, 解释了铝中毒和铝拮抗的分子机理。吴才君等^[5] 采用 cDNA-AFLP 芸薹种蔬菜杂交种与亲本的基因差异表达类型。本研究以葛根野生型和突变型为材料, 采用 cDNA-AFLP 技术对不同时期的基因表达情况进行分析, 以期从分子水平上揭示葛块根膨大机理提供依据和参考, 为块根植物的遗传控制、分子育种研究及高产栽培奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为葛根的野生型和突变型, 引种自江西横峰。根部取样后依次用无菌水、75% 酒精擦洗消毒, 然后用灭菌的锡箔纸包裹后迅速放入液氮冷冻处理, 也可置于 -70 °C 冰箱长期备用。

1.2 葛根总 RNA 的提取及检测

目前已经报道的提取 RNA 的方法很多^[6-8], 但葛块根中的多糖、多酚物质含量较高, 本试验采用改良的 SDS 法结合 LiCl 沉淀来提取根部样品的总 RNA。取约 100 μg 葛根液氮下研磨, 加入 SDS 裂解液 0.5 μL, 然后再加入 5 μL β-巯基乙醇, 室温静置 5 min。加入 0.25 倍体积的无水乙醇和 0.11 倍体积的 5 mol/L 醋酸钾, 涡旋 1 min 混匀。再加入等体积的氯仿: 异戊醇 (49:1) 摇匀。4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min, 转移水相于新离心管, 加入等体积酚: 氯仿 (1:1)。4 °C, 13 000 r/min 15 min, 加入等体积氯仿: 异戊醇 (49:1) 摇匀。4 °C, 13 000 r/min, 15 min, 移出液相, 加入 10 mol/L 的 LiCl 至终浓度为 3 mol/L, -20 °C 过夜沉淀。4 °C, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, RNA 沉淀用 1 mL 3 mol/L LiCl 冲洗 2 次。DEPC 处理的灭菌水溶解 RNA, 加入 5 mol/L pH 4.8 醋酸钾至终浓度为 0.3 mol/L, 同时加入 2 倍体积的无水乙醇, -20 °C 过夜沉。4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 1 mL 预冷 75% 无水乙醇冲洗 2 次后, 用 RNase-free water 溶解 RNA。取 3 μL 上样量, 质量分数为 1.2% 的非变性琼脂糖凝胶电泳 160 V 恒压 10 min 后在紫外凝胶成像系统中观察 RNA 的完整性, 蛋白核酸分析仪检测 RNA 纯度。

1.3 葛根 RNA 的反转录和 dscDNA 的合成

1.3.1 反转录合成第一链 cDNA 0.5 μL 灭菌离心管中加入下列组分: 模板 RNA 约 3 μL, 3' PCR primer (10 mmol/L) 1 μL, SMART II OligodT (10 mmol/L) 1 μL, 混匀短暂离心后 72 °C 变性 3 min, 42 °C 2 min, 冰浴 2 min; 短暂离心后加入 buffer 2 μL, RNA inhibitor 1 μL, primescript™ reverse transcriptase 1 μL, dNTPS (10 mmol/L) 1 μL, 混匀后 42 °C 孵育 1 h, 70 °C 15 min 后置于冰上终止反应。反转录产物可立即用于第二链的合成, 也可于 -70 °C 保存备用。

1.3.2 dscDNA 合成的 LD-PCR 扩增 1st-strand cDNA 8 μL, Taq 酶 0.25 μL, LA-PCR buffer (mg²⁺) 5 μL, dNTPS (2.5 mmol/L) 8 μL, 5' PCR Primer (20 mmol/L) 1 μL, 3' PCR Primer (20 mmol/L) 1 μL 加水至 50 μL, 混匀并短暂离心后于 PCR 仪上 94 °C 预变性 3 min, 然后 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 5 min 进行 33 个循环, 产物置于 4 °C 保存备用。

1.4 葛根 dscDNA 的酶切和接头连接

采用 Taq1, Ase1 (购自 NEB 公司) 双酶切葛根的双链 cDNA, 反应体系: cDNA 2 μL, Ase1 1 μL, buffer 4 μL, 加水至 40 μL, 37 °C 水浴 2 h; 再加入 Taq1 1 μL, buffer 4 μL, 加水至 50 μL, 65 °C 3 h; T₄DNA ligase 2 μL, buffer 6 μL, Taq1 接头 1 μL, Ase1 接头 1 μL, 水 1 μL, 混匀离心后 8 °C 过夜连接, 接头序列由上

海生工合成。Taq1 接头的两条寡核苷酸序列为: T₁: 5' - GACGATGAGTCCTGAC - 3' T₂: 5' - CGGTCAG-GACTCAT - 3'; Ase1 接头序列为: A₁: 5' - GCGTAGACTGCGTACC - 3' A₂: 5' - TAGGTACGCAGTC - 3'。

1.5 预扩模板的制备和 PCR 预扩增反应

连接产物稀释 30 倍即为 PCR 预扩增反应模板。预扩增体系: Taq 酶 0.30 μL, PCR buffer 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μL 模板 1.5 μL, 10 mmol/L 引物 A3 0.5 μL, 10 mmol/L 引物 T₃ 0.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPS 4 μL, 加水至 25 μL, 混匀短暂离心。PCR 条件: 94 °C 5 min; 循环参数: 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 80 s, 35 cycles, 72 °C 再延伸 10 min。预扩增 Ase1 引物序列为: A₃: 5' - CTCGTAGACTGCGTACC-TAAT - 3'; 预扩增 Taq1 引物序列为: T₃: 5' - GACGATGAGTCCTGACCGA - 3' 接头序列由上海生工合成。

1.6 选扩模板的制备及选择性 TD-PCR 反应

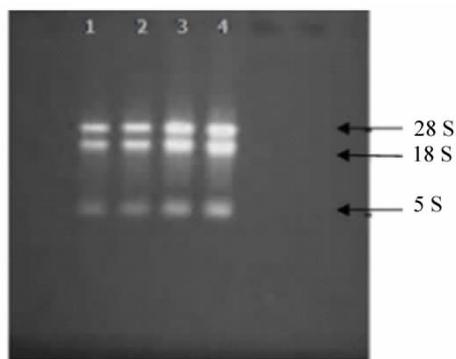
预扩增产物稀释 20 倍作为选择性扩增模板。选扩体系反应系与预扩增相同, 但扩增反应引物变为 Taq1 选择性引物 2 μL, Ase1 选择性引物 2 μL, PCR 采用 TD-PCR: 94 °C 120 s, 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 每循环 1 次复性温度下降 0.7 °C, 共 14 个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 共 28 个循环, 72 °C 延伸 10 min。Taq1 选择性引物序列为: 5' - GATGAGTCCAGACCGANN - 3', Ase1 选择性引物序列为: 5' - GACTGCGTACCTAATNN - 3' 其中 N 代表 ATCG 中任意一种, 各 16 种引物由上海生工合成。

1.7 测序胶电泳及差异条带回收重扩

采用质量分数为 6% 尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 100 V 电压下先电泳 30 min, 然后升高电压至 250 V 再电泳约 3 h, 可参照 BejaiR 等^[9] 的方法。电泳结束后结合弱碱性银染方法。用干净刀片割下典型的差异条带置于 1.5 mL 离心管, 加入 50 μL 无菌水捣碎室温静置 10 min, 封口膜裹好放入水浴锅煮沸约 30 min。12 000 r/min 室温离心 2 min 回收上清液, 加入 10 μL pH 5.2 NaAC (13 mol/L), 2 μL 糖原, 450 μL 无水乙醇, -70 °C 静置 30 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 沉淀用体积分数为 80% 的乙醇洗涤, 风干。加入约 10 μL 无菌水溶解 DNA, 取 4 μL 进行重扩, 扩增条件和所用引物与对应差异条带第 1 次扩增相同。扩增产物用质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳差别显示分析。

1.8 差异条带重扩产物的回收纯化、测序、同源性搜索比对

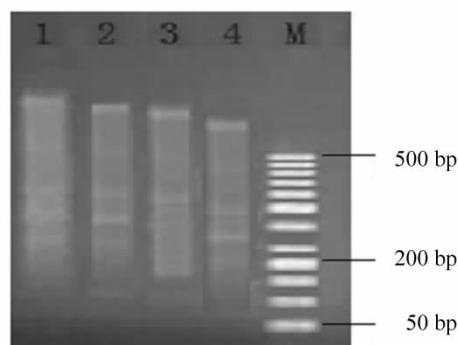
精确割下琼脂糖凝胶上的目的条带, 按照 QIAGEN 公司的 QIAquick Gel Extraction Kit 说明书进行纯化回收, 质量分数为 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测显示为单一条带则可以利用 PCR 产物直接送上海生工进行测序。利用 NCBI 的 BLAST 程序对 DNA 差异片段序列的同源性搜索与相似性进行比对分析。



1-2 葛根突变型; 3-4 葛根野生型
1-2 puerarin mutation type; 3-4 Puerarin wild type.

图 1 葛根总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 The results of Puerarin total RNA
agarose gel electrophoresis



1-2 葛根突变型; 3-4 葛根野生型; M: 50 bp marker
1-2 puerarin mutation type; 3-4 Puerarin wild type;

M: 50 bp marker.

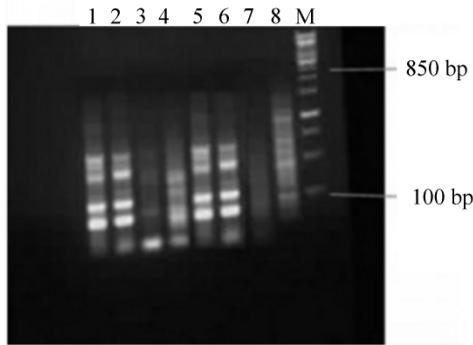
图 2 葛根双链 cDNA 检测结果

Fig. 2 Test results of Puerarin double-stranded cDNA

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 ds-cDNA 合成

从葛根总 RNA 的质量分数为 1% 琼脂糖凝胶检测结果(图 1)可以看出: 总 RNA 的 28 S 和 18 S 条



奇数泳道为葛根彭大型材料;
偶数泳道为突变型; M 为 200 bp marker。

The odd number strip for puerarin swollen type materials;
Even strip for puerarin mutation type; M is 200 bp marker.

图 3 不同生长期葛根野生型和
突变型 cDNA 预扩增结果

Fig. 3 Pre - amplification of cDNA from different growth
of the wild type and mutation type *Pueraria* tuber

带清晰,且 2 个条带的亮度接近
2:1,5 S 条带很弱,说明总 RNA
无 DNA 污染,且纯度很高完整性
很好,无明显的降解^[10]; dscDNA
合成结果见图 2,双链呈典型弥散
带,质量较好符合后续试验要求。

2.2 预扩增检测结果

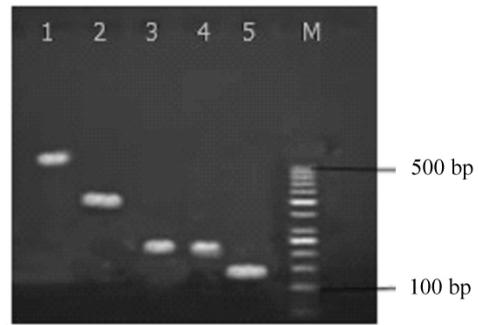
预扩增是检验酶切和连接效
果的必要手段,通过质量分数为
1% 琼脂糖电泳检测,结果显示预
扩增产物集中在 60 ~ 700 bp,弥
散中主条带清晰明亮,说明酶切用
量适宜,预扩增效果较好,为选择
性扩增提供了良好的模板(图 3)。

2.3 选择性扩增产物和 DNA 差
异条带显示

采用 256 对引物组合对
RNA 进行 cDNA-AFLP 分析,分
离出 5 个与膨大相关的 TDFs。
其中从野生型材料中分离出 3 个
从突变体中分离出 2 个(图 4
箭头所示)。

2.4 DNA 差异片段的纯化回收及碱基序列

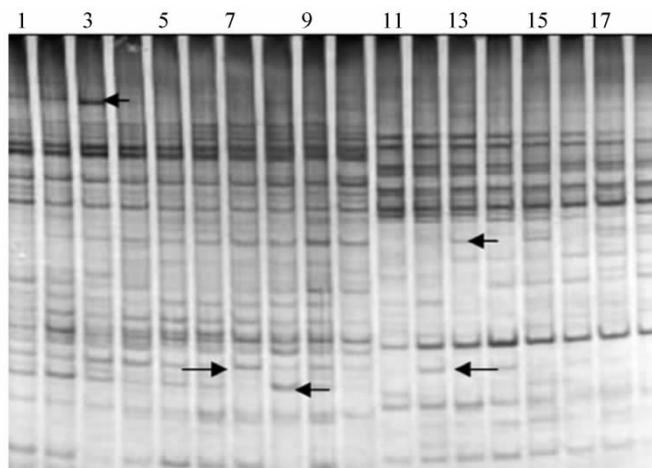
从变性聚丙烯酰胺凝胶上割下差异片段进行重扩,产物用 clean - up Gel extraction Nucleospin Ex-
tract II 试剂盒纯化回收,经质量分数为 1.6% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 5,5 个特异片段送上海
生工测序,4 个测序成功,1 个失败。测定结果见表 1,特异片段长度分别: Y₀: 384 bp、Y₁: 248 bp、T₀:
241 bp 和 T₁: 161 bp,GC 含量分别为 37.5%、34.7%、41.1% 和 36.6%。



M: 50 bp 的 mark; 1 泳道引物为 A₄T₈; 2 为 A₄T₁₃(Y₀);
3 为 A₄T₁₀(Y₁); 4 为 A₄T₁₂(T₀); 5 为 A₄T₁₀(T₁),
其中 1 2 3 为葛根野生型(Y) 4 5 为突变型(T)。
M is 50 bp mark; primer: 1 lane is A₄T₈ 2 is A₄T₁₃(Y₀);
3 is A₄T₁₀(Y₁); 4 is A₄T₁₂(T₀); 5 is A₄T₁₀(T₁).
1 2 3 is wild type(Y); 4 5 is mutations type(T)。

图 5 差异条带回收纯化产物电泳检测

Fig. 5 Differences strip recovery purification
product electrophoresis



奇数条带为葛根野生型材料; 偶数条带为葛根突变型材料; 引物组合: 1 2
泳道为 A₄T₇; 3 4 为 A₄T₈; 5 6 为 A₄T₉; 7 8 为 A₄T₁₀; 9 10 为 A₄T₁₁; 11 12
为 A₄T₁₂; 13 14 为 A₄T₁₃; 15 16 为 A₄T₁₄; 17 18 为 A₄T₁₅。

The odd number strips are puerarin wild type materials; Even strips are puerarin
mutation type materials; Primer combinations: 1 2 lanes are A₄T₇; 3 4 are A₄T₈;
5 6 are A₄T₉; 7 8 are A₄T₁₀; 9 10 are A₄T₁₁; 11 12 are A₄T₁₂; 13 14 are A₄
T₁₃; 15 16 are A₄T₁₄; 17 18 are A₄T₁₅.

图 4 葛块根野生型和突变型材料 cDNA-AFLP 分析

Fig. 4 cDNA - AFLP analysis of *Pueraria* tuber wild type
and mutation type materials

表 1 特异性片段的碱基序列及 GC 含量
Tab.1 Nucleotide sequellces and their GC content of DNA fragments

DNA 片段 DNA fragments	核酸序列 Nucleotide equence	长度/bp Length	GC 含量/% GC content
Y ₀	TTAGTGA CTGCGTACCTAATGGCTTGTGCTGTGCTTTATAAATGAAATCTG TGTCCAAATTTCTGTGACGGATT CGTTATTTAAGGCATCTTAAGAAATCGC CAATTGAATCTGTTTTGGCGACAATGTCAATATTATTTTTGAAGTTGAATCGC ATCTTCTGTCAAGTTTTAGCATGTCCGGTTCGCATTTGAAACCTCACTTAC GCGCGTCAACTTGAAGCTACAATTTGTAGCTTCTGCATCCTTTAAGTGTATA TATTTGACGCAATTTTGTGATAGCATGTTTGGAAACACACTGAGAATAGAAG AATCAGGATTGGGATGTAGAAGCTATAACTATTAGCTTCTGAAAGTCACATT CGGTCAGAACTCATCAAGTA	384	37.5
Y ₁	CAATGACAGCTGTTGCTTTGTAGTTACACTGATTTAGGTTTATATGTTTCTTG ATGCTGGTTTACTTCTTAAATATATGCTCATGATACTTGTCTGAAATGGACT TCTGCTGATATGATATCATTGCTTTTTATAGTCTGTATTTCTCTGACTTGGATA ATTCGGTCAGGACTCATCAA	248	34.7
T ₀	CTATTCTCCCAACTGTGCTCTCAATCAAAATTATGTGTCTTCATATCATAAGA AAAGTTAAATAAATGTATGTAGTTGAGTTTGAGATGTGTGTGATATTATCATGT ATGGACTCCGCTATTGCAATAGTGTGGTGATCGTGTGTATCGTGTTTTGA TTAGGTACGCAGCTCA	241	41.1
T ₁	GAGGGATGATGGAACAATCTACAACGACACATACACTGAAAGACAAATTTA TTTTTTATGTATGATAAACACTGCATAATAGTCCACAAGTAAAGGAAGTTTCTT TTTGTTTTGGGTCAGAAACCAGAGTATCTCCAATTTACTCGGTCTGGACTC ATCA	161	36.6

表 2 特异片段同源性比对
Tab.2 Allogenic comparison of specific segments

DNA 片段 DNA fragments	核酸数据库比对 Nucleotide database comparison	核酸 - 蛋白数据库比对 Nucleotide-Protein database comparison
Y ₀	BT089537.1 假拟蛋白(大豆)相关的未知 mRNA 同源性 99%	拟南芥亚种赤霉素结合蛋白 β-2 亚基相似性 35%
Y ₁	罗伊乳杆菌木糖异构酶基因 cds 同源性 95%	未找到同源序列
T ₀	豇豆小分子热休克蛋白 mRNA 序列同源性 87%	未找到同源性序列
T ₁	番茄类胡萝卜素异构酶基因同源性 98%	未找到同源性序列

2.5 DNA 特异序列同源性比对

利用 BLAST 程序进行 DNA 特异片段序列同源性搜索,结果列于表 2。核酸 - 蛋白数据库比对显示: T₁ 翻译的蛋白质与拟南芥亚种赤霉素结合蛋白的 β-2 亚基有一定同源性, Y₁ 和 T₀、T₁ 翻译的蛋白质在核酸蛋白数据库中均未搜索到同源序列。核酸数据库比对显示: Y₀ 与大豆假拟蛋白相关的未知 mRNA 同源性 99%; Y₁ 与罗伊乳杆菌木糖异构酶基因序列同源性 95%; T₀ 与豇豆热休克蛋白 mRNA 序列同源性 87%; T₁ 与番茄的类胡萝卜素异构酶基因同源性 98%。

3 结论和讨论

核酸 - 蛋白数据库搜索结果显示: 分离得到的特异 DNA 条带 Y₁ 和 T₀、T₁ 均未找到同源性的蛋白质序列, 预测可能为 mRNA 表达过程中产生的未知功能的蛋白。T₁ 翻译的蛋白质与拟南芥亚种的 GA-binding protein(赤霉素结合蛋白) β-2 亚基有一定同源性, Hartweck L M 等^[11] 研究表明 GA 可与光等环

境因子及其他植物激素相互作用,共同作用于高等植物的整个生命周期,促进光合作用和蒸腾作用,调节植物的生长发育。在无核白葡萄果实膨大率试验中也发现赤霉素对其果实膨大有促进作用^[12]。50年代初开始的植物激素受体研究认为:植物激素要发挥作用,须与受体相结合,在宋平等对水稻的赤霉素结合蛋白的相关研究中发现 GA-binding protein 就是存在于细胞膜上的 GA 受体^[13]。依此判断 T₁ 翻译的蛋白质可能是葛根细胞膜上赤霉素的受体即信号传导蛋白,在信号传导、生长发育和葛根的膨大有机物质的积累中起着重要作用。

核酸数据库中搜索结果表明: Y₀ 与大豆假拟蛋白的未知 mRNA 具较高同源性; Y₁ 与罗伊乳杆菌木糖异构酶基因同源性高达 95%,木糖异构酶是催化木糖转化为木酮糖的一种异构酶,在植物光合作用的暗反应阶段参与糖代谢,所以 Y₁ 编码的应该是一种参与葛根光合作用的重要酶类; T₀ 与豇豆小分子热休克蛋白(sHSPs) mRNA 同源性 87%,热休克蛋白是一大类分子伴侣蛋白,sHSPs 是植物热激表达的主要产物,不仅有抑制细胞凋谢、促进细胞骨架形成等功能,还有保护电子传递链(线粒体 sHSPs)和光系统 II 的电子传递(叶绿体 sHSPs)等作用^[14],据此 T₀ 编码产物可能在野葛的抗逆性和葛根代谢中发挥相当重要的作用; T₁ 与番茄的类胡萝卜素异构酶基因同源性为 98%,CRTISO 基因是高等植物类胡萝卜素合成途径中的关键基因之一,类胡萝卜素有“维生素 A 源”之称,类胡萝卜素及其代谢产物有多种生物学功能,具有抗氧化、抗癌和调节免疫的作用,单一结构的类胡萝卜素的生物利用度较低,而天然植物中 β-胡萝卜素含有顺反式两种结构,对人体有很好的保健作用。CRTISO 基因有类似于 PDS 的功能,参与了类胡萝卜素脱氢的过程,催化顺式类胡萝卜素向反式类胡萝卜素的转换^[15],所以 T₁ 基因编码的可能是葛根中类胡萝卜素合成过程的重要酶类。

根据同源基因相关功能推测本研究获得的 4 个特异性序列普遍参与了信号传导、抗胁迫应答、电子传递、光合代谢等反应,说明野葛块根膨大机由多个功能不同的基因共同参与控制,并制涉多方面的生理生化反应,这些特异 DNA 片段的具体功能验证还有依赖进一步的蛋白分析技术和全长序列的获得。

参考文献:

- [1] 范淑英, 吴才君. 野葛主要营养和药用价值分析[J]. 江西农业大学学报, 1998, 20(4): 460-463.
- [2] Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, et al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies[J]. Mol Genomics, 2003, 269(212): 173-179.
- [3] Donson J, Fang Y, E spiritu Santo G, et al. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(432): 75-97.
- [4] Mao C Z, Yi M K, Yang L, et al. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice: aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(394): 137-143.
- [5] 吴才君, 曹家树. 芸薹种蔬菜杂交种及其亲本莲座期基因差异表达与杂种优势的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1654-1659.
- [6] Li J H, Tang C H, Song C Y, et al. A simple, rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes*[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(9): 1193-1197.
- [7] Salzman R A, Fujita T, Zhu Salzman K, et al. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates[J]. Plant Mol Biol Reporter, 1999, 17(321): 11-17.
- [8] 李玉英, 王转花. 从荞麦中提取总 RNA 的有效方法[J]. 生物技术, 2004, 14(3): 25-26.
- [9] Bejai R, Sarosh, Johan Meijer. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP reveals novel insights during methyl jasmonate wounding and insect attack in *Brassica napus*[J]. Plant Mol Bio, 2007, 64(512): 425-438.
- [10] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 105.
- [11] Hartweck L M. Gibberellin signaling[J]. Planta, 2008, 229(320): 1-13.
- [12] 张以和. 赤霉素、葡萄膨大灵在无核白葡萄上的应用效果[J]. 吐鲁番科技, 2001, 5(1): 18-19.
- [13] 宋平, 曹显祖. 赤霉素结合蛋白对水稻矮生性的调控[J]. 作物学报, 1996, 22(6): 652-656.
- [14] 邵玲, 陈向荣. 热激蛋白与植物的抗逆性[J]. 北方园艺, 2005, 52(3): 73-74.
- [15] Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, et al. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis[J]. Plant Cell, 2002, 14(461): 321-332.