

斑茅两个看家基因片段的克隆 及其在基因芯片中的应用

张积森^{1,2}, 李伟¹, 阙友雄¹, 阮妙鸿¹, 张木清^{1*}, 陈如凯¹

(1. 福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室, 福州 350002; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108)

摘要: 根据已发表的同源基因序列, 利用 RT-PCR 技术分离了斑茅(*Erianthus arundinaceus*)的 *GAPDH* 和 *APRT* 两个看家基因片段, 用它们作为 cDNA 芯片阳性参照, 以未经聚乙二醇(PEG)胁迫处理的斑茅叶片为对照, 和 PEG 胁迫的 4 组材料同 cDNA 芯片进行杂交分析。杂交结果显示, *GAPDH* 杂交的 Cy5 与 Cy3 平均信噪比(Signal/Noise, S/N)分别为 56.12 和 60.8, *APRT* 杂交的 Cy5 与 Cy3 平均信噪比分别为 51.06 和 47.25, 信噪比均很高; 同时两个看家基因的杂交都显示出极强的信号, 其中 *GAPDH* 的杂交信号值大于 10 000, *APRT* 也在 8 000 以上, 杂交结果可靠。分析了 PEG 胁迫 4 个时段 *BADH* 与两个看家基因的表达, *BADH* 的表达有明显变化, 而看家基因表达均较稳定。上述结果表明所克隆的两个看家基因在斑茅中表达量高, 且 PEG 胁迫下表达较为稳定, 是基因芯片理想的阳性参照。

关键词: 斑茅; 看家基因; 基因芯片; PEG

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)04-0277-07

Cloning of Two House-keeping Genes from *Erianthus arundinaceus* and the Application in cDNA Microarray

ZHANG Ji-sen^{1,2}, LI Wei¹, QUE You-xiong¹,

RUAN Miao-hong¹, ZHANG Mu-qing^{1*}, CHEN Ru-kai¹

(1. Key Laboratory of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: Positive controls were important for quality identification in microarray analysis of gene expression profiles. Two most important house-keeping genes *GAPDH* and *APRT* in plant often serve as positive standards. Here partial cDNAs of *GAPDH* (GenBank accession number: EF189713) and *APRT* (GenBank accession number: EF189712) were amplified from *Erianthus arundinaceus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using two pairs of primers designed according to the corresponding sequence of *Zea mays*. Four sets of *E. arundinaceus* under PEG-stress were applied to the cDNA microarray hybridization using the two genes as positive controls. Profiles showed that the average values of signal to noise (S: N) of Cy5 and Cy3 were 56.12 and 60.8 in *GAPDH*, respectively, while 51.06 and 47.25 in *APRT*, respectively. High signal was detected in all the hybridization, with the values of over 10 000 in *GAPDH* and 8 000 in *APRT*, indicating reliable hybridization. Both *GAPDH* and *APRT* expressed more stably than *BADH*. It is suggested that the two house-keeping genes from *E. arundinaceus* are suitable for positive controls in genechip application.

Key words: *Erianthus arundinaceus*; House-keeping genes; cDNA microarray; Polyethylene glycol

收稿日期: 2006-12-28 接受日期: 2007-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370901); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20040389009)资助

* 通讯作者 Corresponding author

看家基因又称持家基因(House-keeping genes),是指所有细胞中组成型表达的一类基因,其产物是维持细胞各种基本生命活动所必需的。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Adenine phosphoribosyl transferase, APRT)基因 *GAPDH* 和 *APRT* 是植物中两个重要的看家基因。甘油醛-3-磷酸脱氢酶广泛存在于各种生物的细胞中,是葡萄糖酵解和糖原异生代谢途径中必不可少的酶,它催化 D-甘油醛-3-磷酸(G-3P)可逆的氧化和磷酸化,生成 1,3-二磷酸甘油酸(DPGA),是维持生命活动最基本的酶之一,应用 *GAPDH* 作为荧光定量 PCR、Northern blot 或基因芯片的内参基因在动植物研究中已经被广泛的应用^[1-3]。而腺嘌呤磷酸核糖转移酶是植物腺嘌呤磷代谢过程中的一个关键酶,它催化 5-磷酸核糖焦磷酸(Phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)与腺嘌呤合成腺嘌呤-3-磷酸(Adenosine-3-phosphate, AMP)^[4-5]。李军等^[6]克隆了水稻 *APRT* 基因,并发现该基因在水稻的各个组织部位表达稳定,表达量高,说明 *APRT* 是一个可以利用的内参基因, *APRT* 作为内参基因在其它动植物研究中有报道。

斑茅 (*Erianthus arundinaceus* L.) 是甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 的近缘属野生植物,具有高大粗壮、生长直立、抗旱耐瘠、抗病性强、宿根性好、分蘖多、生长快及适应性广等优良性状,近二十年来越来越受到国内外甘蔗育种界的重视^[7-10]。但对斑茅的研究主要集中于形态学^[11-12]、染色体变异^[13-14]和生理抗逆性等^[15-16]方面,为充分开发利用斑茅的优良抗逆基因资源,利用基因芯片技术研究抗逆基因网络、分离克隆重要功能基因并遗传转化甘蔗是提高甘蔗抗逆性的重要手段,然而目前斑茅分子生物学研究缺乏有效的内参基因信息。本研究拟利用 RT-PCR 方法,从斑茅上分离 *GAPDH* 和 *APRT* 两个基因片段,并将这两个看家基因克隆作为阳性内参的 cDNA 芯片同 4 组 PEG 胁迫的斑茅材料进行杂交,分析其芯片杂交结果,以充分阐释 *GAPDH* 和 *APRT* 两个基因在各种不同 PEG 胁迫下的表达强度及其稳定性,探讨斑茅 *GAPDH* 和 *APRT* 作为内参基因的可行性,同时也为甘蔗及其近缘植物看家基因的克隆与应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

将采集于福建农林大学校园内的野生斑茅 (*Erianthus arundinaceus* L.) 茎种植于高 50 cm、直径为 35 cm 的瓷盆沙子中,共 10 盆,每盆种植 3 株,平行进行浇水和施肥以保证生长一致,待株高长至 80 cm 时,于玻璃温室中进行水分胁迫处理,1 盆正常供水,其余去除沙子后,放入水中恢复 1 d 后,置于含 30% PEG 的水中胁迫处理。分别剪取正常供水和经 30% 的 PEG 胁迫 2 h、4 h、12 h、24 h 的斑茅叶片,立即投入液氮中,然后保存于 -85℃ 冰箱。

甘蔗福农 95-1702 种植于高 50 cm、直径为 35 cm 的瓷盆沙子中,长至 80 cm 高时,剪取叶片,立即投入液氮中,然后保存于 -85℃ 冰箱。

1.2 生化试剂

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0; 限制性内切酶 (TaKaRa); pMD18-T vector (TaKaRa); TRIZOL 试剂 (Intrivogen); Message Amp™ aRNA Kit (Ambion) Cy5 和 Cy3 (Amersham), 引物合成由上海生物生工工程有限公司完成;其它常规的分子生物学试剂购自上海生工、厦门泰京及大连宝生物公司等。

1.3 RNA 提取

叶片总 RNA 的提取按 Invitrogen 的 TRIZOL 试剂盒说明书操作,取 700 ng,用 1% 琼脂糖变性胶进行电泳检测。

1.4 RT-PCR 扩增

GAPDH 基因的引物参考玉米 (*Zea mays* L., NCBI 登录号为: X07156) *GAPDH* 基因的 cDNA 序列设计,引物序列为: P₁: 5'-ACACCGTCTTTGGC-ATCA-3'; P₂: 5'-AGGGTCCATCAACAGTCTTC-T-3'; *APRT* 基因的引物也参考玉米的 *APRT* 基因的 cDNA 序列(登录号为: AY485263)设计,引物序列为: P₃: 5'-GTGGAGTCCCGCAAATAG-3'; P₄: 5'-AAACTGAGCAGCAACATAAGA-3'。

每 10 μl 的反转录体系包括: 2 倍的 10×RT 缓冲液 (250 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1375 mmol/L KCl), 2 μl MgCl₂ (1.5 mmol/L), 1 μl 的 10 mmol/L dNTPs, 0.5 μl oligo dT-Adaptor Primer (10 pmol μl⁻¹),

AMV 反转录酶 200 U, 0.25 μl Rnase Inhibitor, 1 μl 总 RNA (300 ng) 作为模板, 用无 RNase 的 H_2O 补足 10 μl 。42 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 99 $^\circ\text{C}$ 5 min, 5 $^\circ\text{C}$ 保存 5 min。PCR 反应体系的总体积为 50 μl , 包括: 5 μl cDNA, 1 \times PCR buffer, 20 pmol 的扩增基因正、负链引物 94 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min 后, 加入 0.25 μl (3 U) *Taq* DNA 聚合酶, 用 ddH₂O 补足 50 μl 。循环反应条件: 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 55 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 最后一个循环结束后于 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min, 取 5 μl 用 1% 琼脂糖电泳检测结果。PCR 扩增获得的片段, 从琼脂糖凝胶上分离后连接于 pMD18-T 载体 (TakaRa)。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在 LB 平板上进行蓝白斑筛选阳性克隆。选取阳性克隆测序, 测序工作由上海生物工程技术有限公司完成。测序结果提交到 NCBI 核酸数据库并进行 Blast 比对分析。

1.5 cDNA 芯片与芯片的杂交与分析

cDNA 芯片的制作选取如下靶标: *GAPDH* 和 *APRT* 与含 3 858 个 SSH 文库克隆片段 (拟另文发表), 长度在 189–400 bp 之间。以 POLYA80 为阴性对照, *GAPDH* 和 *APRT* 作为阳性对照, 单纯 50% DMSO 点样溶液为空白对照。调整各靶基因浓度为 0.25 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ 。单个矩阵排布: 12 \times 16, SSH 文库克隆矩阵内重复 2 次, 共 48 个亚矩阵, *GAPDH* 和 *APRT* 的 PCR 片段在每个亚矩阵内一个, 整个芯片分别有 48 个重复, 所用点样仪为 GeneMachine 公司的 OmniGrid 100 (由上海生物芯片有限公司完成)。

cDNA 芯片进行线性放大 (线性放大具体方法参见试剂盒说明书 Ambion Message AmpTM aRNA Kit manual) 后, 用 Cy5 标记未经 PEG 处理的样品为对照, Cy3 分别标记 PEG 处理 2 h、4 h、12 h、24 h 的芯片, 取对照探针和试验组探针等量混合杂交芯片, 每个杂交重复两个芯片。杂交芯片使用 Gene pix4000B Scanner 获取信号数据和杂交结果。将图像导入图像分析软件 Gene pix4000B, 经过自动和人工定位排列, 确定杂交点的范围, 过滤背景噪音, 提取得到基因表达的荧光信号强度值, 最后以列表形式输出, 从而完成将扫描得到的图像定量转化为数值。将数值导入分析软件 Genespring, 用基于阴性参照的背景扣除法 (background subtraction based on negative controls) 和基于点信号强度与片信号的标准化 [per spot and per chip intensity dependent norma-

lization (non-linear or LOWESS normalization)] 方法标准化, 计算得到 ratio 值 (两种荧光 Cy3 与 Cy5 的比值), 并提取 *APRT* 和 *GAPDH* 两个克隆位点的 Cy3 和 Cy5 的信号值分别制作散点图。

2 结果和分析

2.1 RNA 的质量分析

总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长下测定 OD 值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值介于 1.8–2.0 之间。用 1% 琼脂糖变性胶进行电泳检测。电泳结果显示有清晰的 28S、18S 条带, 5S 条带不明显 (图 1)。说明所提取的 RNA 可以用于进一步的 RT-PCR 和芯片分析实验。

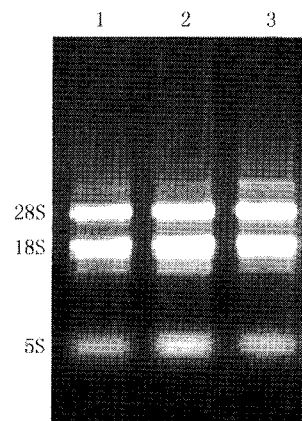


图 1 斑茅总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA in leaves of *Erianthus arundinaceus* by agarose-formaldehyde gel electrophoresis

2.2 *GAPDH* 基因片段的克隆

以未经胁迫处理的斑茅和甘蔗福农 95-1702 的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 用引物 P₁、P₂ 进行 PCR 扩增, 获得一个特异的基因片段 (图 2), 同时对以斑茅为模板的 RT-PCR 产物经克隆、测序分析, 并进行同源性比对, 该片段长 354 bp (图 3, Genbank 登录号为: EF189713)。与其它植物中的 *GAPDH* 基因在氨基酸水平上具有较高的同源性, 与玉米 (*Zea mays* L., CAA51676.1) 的同源性为 98%, 与小麦 (*Triticum aestivum* L., AAQ55397.1) 的为 97%, 水稻 (*Oryza sativa* L., XP_479895.1) 的为 94%, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L., NP_187062.1) 的为 89%, 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L., ABB87128.1) 的为 88%, 黄豆 (*Glycine max* L., ABC75834.1) 的为 82%, 这说明所获得的基因片段属于 *GAPDH* 基因。

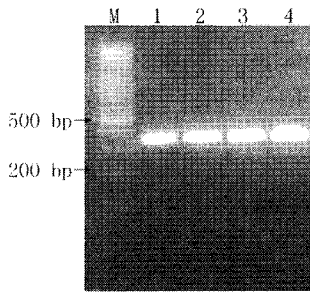


图 2 GAPDH 基因片段的 RT-PCR 电泳图

Fig. 2 RT-PCR amplification of partial cDNA of GAPDH

M: Molecular marker; 1,2: *Erianthus arundinaceus*;
3,4: *Saccharum officinarum*

ACACCGTCTTTGGCATCAGGAACCCCTGAGGAGATCCCG
TGGGTGAGGCTGGTGTGACTATGTCGTGGAGTCCACCGGTG
CTTACTGACAAGGAGAAGGCTGCGGCTCACTTGAAGGGTGGT
GCAAGAAGGTTGTTATCTCTGCCCAAGCAAAGATGCACCCA
TTTTGTTGTTGGTGTCAATGAGGACAAGTACACCTCGGATGTT
AACATTGTTTCCAATGCTAGCTGCACAACAACTGCCTTGCTC
CCCTTGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGGTATCATTGAGGG
TCTGATGACAACCTGTTTCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACT
GTTGATGGACCCT

图 3 斑茅 GAPDH 基因片段序列

Fig. 3 Partial sequence of GAPDH from *Erianthus arundinaceus*
下划线部分为引物。Primer sequences underlined.

2.3 APRT 基因片段的克隆

以未经胁迫处理的斑茅和甘蔗福农 95-1702 的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 用引物 P₃、P₄ 的 PCR 扩增目的基因, 获得一个特异的片段(图 4)。同时对以斑茅为模板的 RT-PCR 产物经克隆、测序分析, 该片段长 337 bp(图 5, Genbank 登录号为: EF189712)。与玉米(AY485263.1)APRT 基因的核酸序列比较, 同源率为 88%, 比对分析结果表明, 该序列为 APRT 基因编码框下游 3' 端序列。

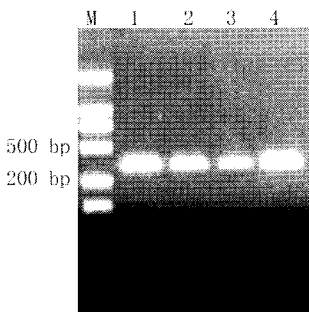


图 4 APRT 片段的 RT-PCR 电泳图

Fig. 4 RT-PCR amplification of partial cDNA of APRT

M: Molecular marker; 1,2: *Erianthus arundinaceus*;
3,4: *Saccharum officinarum*.

GTGGAGTCCCGCAAATAGGACGCAGTAAATGGTAAGAA
AAGCTTTCTATCTTCCCCTCCAAAGAAGCTCACAACCTCATT
ATTTGCACGCGCAACCAAGGTGGAATGGACTGAGAACTCT
GCAGTAATCTGTGTTGGGGCCAAGGCCAGATGTTATGTATCTT
CATGGAGAGTGTGAGATGGATTGGGTGAAACGTAGTCGCCCGT
ACTTTTGTAGCACGTCACGTCTAGTGTTTTTAGTAGCCATGGC
TGAAGAGAGTTGCTATTCCCAACTTCCTGCCAGGAACATCAGT
GTTAGCCAGAGAAGGAAAAGGATCTTATGTTGCTGCTCAGTTT

图 5 APRT 基因片段序列

Fig. 5 Partial sequence of APRT from *Erianthus arundinaceus*
下划线部分为引物。Primer sequences underlined.

2.4 cDNA 芯片杂交结果分析

以未经 PEG 胁迫处理为对照, 将 30% 的 PEG 胁迫处理 2 h、4 h、12 h、24 h 的斑茅叶片 RNA 分别进行芯片杂交。从图 6 和图 7 可以看出, 两个看家基因都表现出极强的杂交信号, 其中 GAPDH 基因的杂交信号大于 10 000, APRT 基因的杂交信号也在 8 000 以上。从 4 张芯片的杂交结果显示, GAPDH 基因片段杂交的 Cy5 与 Cy3 平均信噪比(Signal/Noise, S/N)分别为 56.12 和 60.8, APRT 基因片段杂交的 Cy5 与 Cy3 平均信噪比(Signal/Noise, S/N)分别为 51.06 和 47.25, 说明杂交结果可靠。研究表明, 甜菜碱脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)基因表达受水分胁迫诱导^[4], 选择点于 cDNA 芯片的甜菜碱脱氢酶基因的片段进行表达谱分析(图 8)。BADH 在 PEG 胁迫 2 h 的表达受明显抑制, 而后表达呈明显上调。这说明 4 个时段的 PEG 胁迫对斑茅的作用明显。

在 PEG 处理的 4 个时间梯度上(图 8), GAPDH 和 APRT 表达均无显著差异 (ratio ≥ 2 或 ratio ≤ 0.5), 说明 PEG 胁迫对两个看家基因的表达影响不大。但 GAPDH 随着 PEG 胁迫时间的延长, 表达有所上调, 而 APRT 的表达基本没有变化。说明两个看家基因片段符合芯片阳性参照的要求。

3 讨论

甘蔗与斑茅是近缘属植物, 根据玉米中的 GAPDH 和 APRT 基因设计两对引物, 从斑茅和甘蔗中均能扩增出目的片段。本项目组克隆的其它基因也说明, 甘蔗与斑茅在核酸水平上确实具有较高的同源性, 如 *samdc*、*OAT*、*ACO* 基因(蔡秋华、张积森, 私人通讯), 其 cDNA 序列同源性可达 95%—

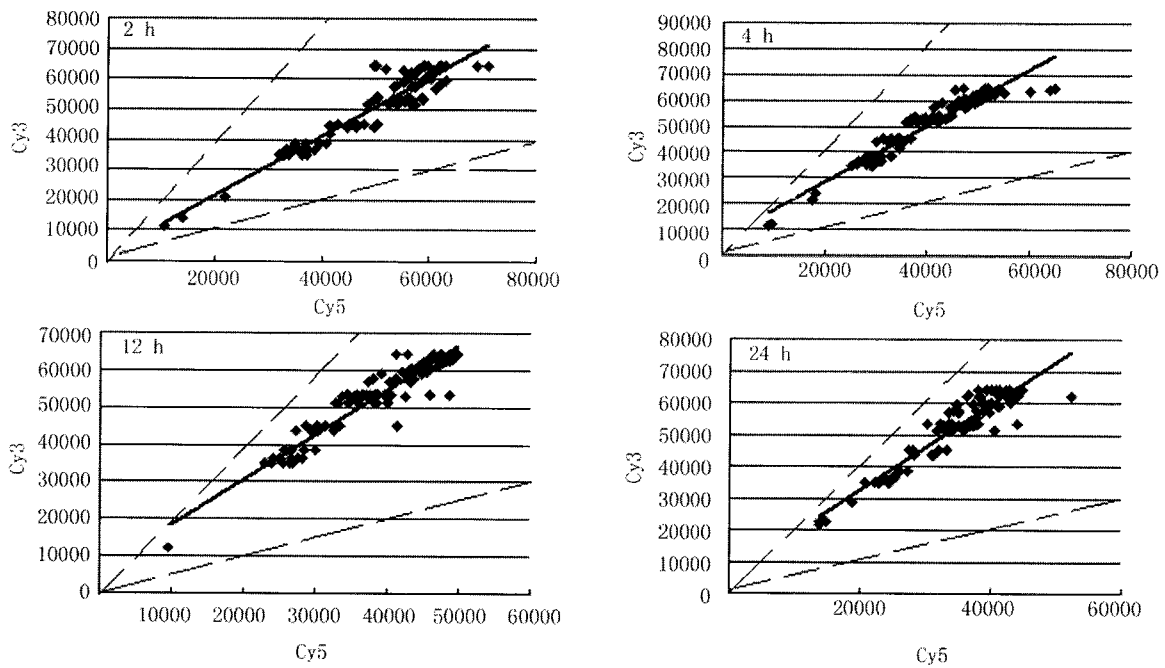


图 6 GAPDH 的杂交信号散点图
 Fig. 6 Scatter plot map of hybridization signals of GAPDH on gene chip

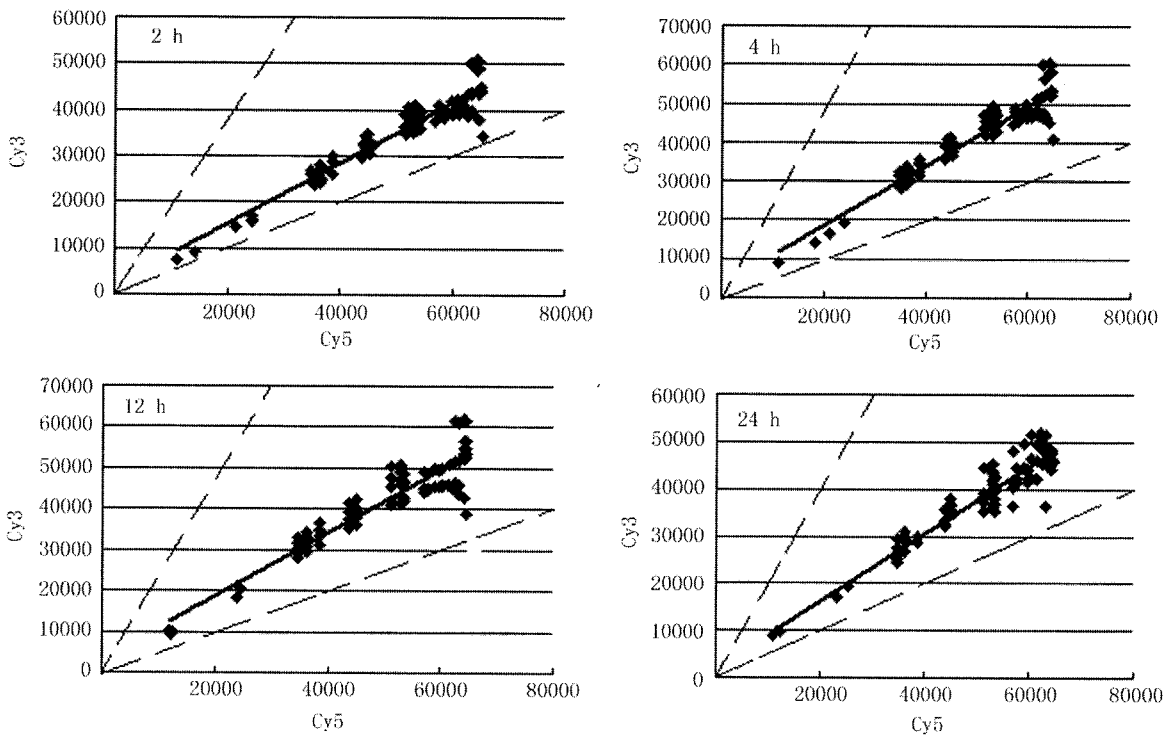


图 7 APRT 的杂交信号散点图
 Fig. 7 Scatter plot map of hybridization signals of APRT on gene chip

97%，可以推测利用斑茅 cDNA 克隆对甘蔗进行基因芯片表达谱分析是可行的，因而在挖掘甘蔗基因资源，参考其近缘属植物的基因序列也同样具有重

要的意义。

cDNA 芯片技术应用中，阳性对照是进行基因表达谱杂交质量分析的重要参照物，也是评判基因

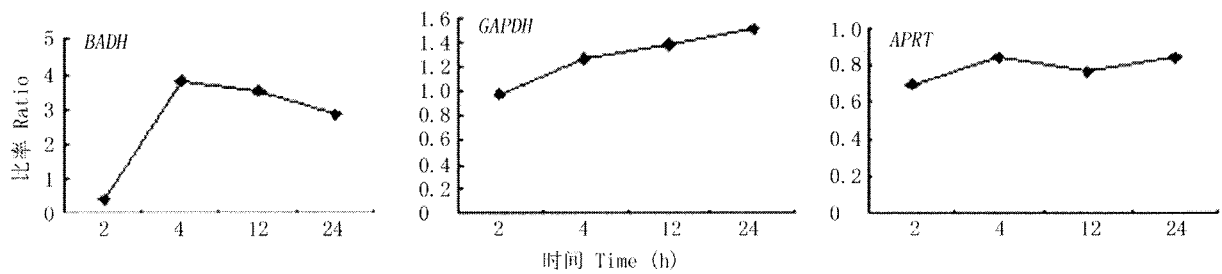


图 8 PEG 胁迫后 *BADH*、*GAPDH*、*APRT* 的芯片表达

Fig. 8 Expression profiles of *BADH*, *GAPDH* and *APRT* in *Erianthus arundinaceus* under PEG stress for 2, 4, 12 and 24 hours

芯片杂交效果的标准。对大型芯片,其对数据的标准化可以不依赖于阳性参照基因,不要求阳性参照表达的完全稳定,因而对阳性参照的要求是表达量高、能反映芯片的杂交质量,但允许一定程度的表达波动。因此在阳性参照选择上,由于制备芯片的物种的基因表达差异,阳性参照的选择有所不同。在杂交后对芯片质量的评判中,杂交信噪比是一个重要的标准。本研究中所选用的两个看家基因的芯片杂交信号散点图均显示出极强的信号值,这说明两个看家基因的表达量大。4 组杂交结果中,*GAPDH* 克隆片段杂交的 Cy5 与 Cy3 平均信噪比分别为 56.12 和 60.8,*APRT* 克隆片段杂交的 Cy5 与 Cy3 平均信噪比分别为 51.06 和 47.25,杂交结果可靠,说明本试验所克隆的两个基因作为芯片阳性参照是可行的。进一步分析还显示,采用的看家基因 *GAPDH* 在芯片表达上出现较小波动,随着 PEG 胁迫时间的延长,表达有上升的趋势。这种现象在动物研究中有较多的报道,在大鼠的肝、脾脏和脑^[18],癌细胞浸润和没有癌细胞浸润的人黑色素细胞^[19],出生不同天数的兔子巩膜^[20]中都已发现该基因表达不稳定。在植物中,Velasco 等^[21]的研究表明,毛叶垂头菊(*Cremanthodium puberulum* S. W. Liu)的 *GAPDH* 的 mRNA 和酶蛋白受 ABA 和水分胁迫诱导表达;Gallardo 等^[22]报道了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子的细胞质中 *GAPDH* 的表达与种子脱水程度有关;大麦的 *APRT* 基因被认为受铁离子缺乏诱导^[23],而水稻则受温度诱导^[6]。虽然 *APRT* 作为阳参基因较少用,但本研究结果表明在 PEG 胁迫下 *APRT* 表达较稳定,其表达与水分胁迫无明显相关,说明 *APRT* 基因也是一种理想的阳参基因。

参考文献

[1] Kim B R, Nam H Y, Kim S U, et al. Normalization of reverse

transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice [J]. *Biotechn Lett*, 2003, 25:1869-1872.

- [2] Mikiko S, Hiro-omi T. Identification and localization of two hydroxysteroid sulfotransferases in the human brain [J]. *J Health Sci*, 2002, 48(5):467-472.
- [3] Vasseur S, Malicet C, Calvo E L, et al. Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by ras^{v12} mutated protein and the E1A oncogene [J]. *Mol Cancer*, 2003, 2:19-28.
- [4] Ashihara H, Nobusawa E. Metabolic fate of [8-14C] adenine and [8-14C] hypoxanthine in higher plants [J]. *ZP Pflanzenphysiol*, 1981, 104:443-458.
- [5] Barankiewicz J, Paszkowski J. Purine metabolism in mesophyllprotoplasts of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves [J]. *Biochem J*, 1980, 186:343-350.
- [6] Li J, Liang C Y, Yang J L, et al. Cloning of the *APRT* gene from rice and analysis of its association with TGMS [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(11):1319-1328.
- [7] Shen W K (沈万宽). Dissuasion of the value of the cross of *Saccharum* and *Erianthus arundinaceus* [J]. *Sugarcane (甘蔗)*, 2002, 9(3):1-5.(in Chinese)
- [8] George P, Christopher M J, Carroll B J, et al. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus* [J]. *Genome/Génome*, 2000, 43(6):1033-1037.
- [9] D'Hont A, Rao P S, Feldmann P, et al. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridization [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91:320-326.
- [10] Zheng X F (郑雪芳), Zhang M Q (张木清), Li J W (李奇伟), et al. Utilization and characterisation of the genuine intergeneric hybrids from the cross of *Saccharum* and *E. arundinaceus* (2): Molecular identification of genuine hybrids from the cross of *Saccharum* and *E. arundinaceus* [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2004, 2(1): 35-42.(in Chinese)
- [11] Xiao F H (肖凤迥). Comparison between the *E. arundinaceus* and some species under *Saccharum* and *Erianthus* on the plant morphology and isozyme [J]. *Sugarcane (甘蔗)*, 1994, 1(1):22-27.(in Chinese)

- [12] Zhang M Q(张木清), Hong Y X(洪艺珣), Li Q W(李奇伟), et al. Molecular polymorphic analyses for the germplasms of *Erianthus arundinaceus* collected in China [J]. *J Plant Resour Environ*(植物资源与环境学报), 2004, 13(1):1-6.(in Chinese)
- [13] Wen J C(文建成), Cai Q(蔡青), Fan Y H(范源洪), et al. Studies on chromosome numbers of *Saccharum spontaneum* and related plants — *Sclerostachya*, *Narenga* in China [J]. *Sugarcane Canesugar* (甘蔗糖业), 2001, 3:12-15.(in Chinese)
- [14] Liu W R(刘文荣), Deng Z H(邓祖湖), Zhang M Q(张木清), et al. Use and characterization of the genuine intergeneric hybrids from the cross of *Saccharum* spp. and *E. arundinaceus* Retz. III. Cytogenetic analysis for the hybrid and backcross progeny of *Saccharum officinarum* L. and *Erianthus* sect. *Ripidium* [J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), 2004, 30(11):1093-1096.(in Chinese)
- [15] Guo Y(郭莺), Yu A L(余爱丽), Zhang M Q(张木清). Use and characterisation of the genuine intergeneric hybrids from the cross between *Saccharum officinarum* L. and *Erianthus arundinaceus* Retz (III)—Salinity tolerance in *Saccharum officinarum* and *Erianthus arundinaceus* [J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 2005, 26(2):88-93.(in Chinese)
- [16] Zhang M Q(张木清), Pan J(潘婕), Weng X Y(翁笑艳), et al. Analysis of the difference of drought tolerance in *Saccharum officinarum* and *Erianthus arundinaceus* Retz [J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 2004, 25(2):50-54.(in Chinese)
- [17] Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(7):2745-2749.
- [18] Slagboom P E, de Leeuw M H, Vijg J. Messenger RNA levels and methylation patterns of *GAPDH* and *beta-actin* genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging [J]. *Mech Ageing Dev*, 1990, 53:243-257.
- [19] Goidin D, Mamessier A, Staquet M J, et al. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and *beta actin* genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations [J]. *Anal Biochem*, 2001, 295(1):17-21.
- [20] Thu K, Ji Z, Amutha B, et al. Differential expression of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -*actin* and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) in postnatal rabbit sclera [J]. *Curr Eye Res*, 2001, 23(1):44-50.
- [21] Velasco R, Salamini F, Bartels D. Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterosigma plantagineum* [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26:541-546.
- [22] Gallardo K, Groot J S P C, Demo P H, et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126:835-848.
- [23] Itai R, Suzuki K, Yamaguchi H, et al. Induced activity of adenine phosphoribosyl-transferase (APRT) in iron-deficiency barley roots: a possible role for phytosiderophore production [J]. *J Exp Bot*, 2000, 51:1179-1188.