

研究论文

Research Article

高质量花生花序全长 cDNA 文库的构建和鉴定

陈华[✉], 姜宝杰[✉], 邓焯[✉], 曾建斌[✉], 张冲[✉], 庄伟建[✉]

福建省作物分子与细胞生物学重点实验室, 福州, 350002

✉ 通讯作者: weijianz1@163.com; ✉ 作者

豆科基因组学与遗传学, 2011 年, 第 2 卷, 第 2 篇 doi: 10.5376/lgg.cn.2011.02.0002

收稿日期: 2011 年 2 月 20 日

接受日期: 2011 年 3 月 01 日

发表日期: 2011 年 3 月 14 日

这是一篇采用《Creative Commons Attribution License》进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议的最佳引用格式:

Chen et al., 2011, Construction and evaluation of a High-quality peanut inflorescence full-length cDNA library, Douke Jiyinzuxue Yu Yichuanxue (online) (Legume Genomics and Genetics), Vol.2 No.2 pp.14-19 (doi: 10.5376/lgg.cn.2011.02.0002) (陈华等, 2011, 高质量花生花序全长 cDNA 文库的构建和鉴定, 豆科基因组学与遗传学(online), Vol.2 No.2 pp.14-19 (doi: 10.5376/lgg.cn.2011.02.0002))

摘要 为构建花生花序全长 cDNA 文库, 为花生花序功能基因的筛选与克隆, 花序发育分子调控网络研究奠定基础。本研究采用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术构建花生花序全长 cDNA 文库, 经涂平板测定文库的克隆数, PCR 测定重组率, 酶切反应快速鉴定插入片段的大小, 随机测序并进行生物信息学分析检测文库质量。结果表明, 原始文库库容为 1.2×10^6 cfu, 插入片段大小多在 1.0~2.0 kb 之间, 平均大小在 1.3 kb 左右, 重组率达 100%。生物信息学分析显示本文库信息丰富, 并包含了大量未知功能的新基因。所构建文库的代表性和重组片段的序列完整性达到了用于目的基因的分选筛选和克隆表达的建库要求。

关键词 花生; 花序; 全长 cDNA 文库; SMART 技术

Construction and evaluation of a High-quality peanut inflorescence full-length cDNA library

Hua Chen[✉], Baojie Jiang[✉], Ye Deng[✉], Jianbin Zeng[✉], Chong Zhang[✉], Weijian Zhuang[✉]

Fujian Key Lab of Crop Molecular and Cell Biology, Fuzhou, 350002

✉ Corresponding author, weijianz1@163.com; ✉ Authors

Abstract Flower is a key organ in peanut which was an active research area in model plants. Construction of a high inflorescence cDNA Library will provides foundations for screening and cloning inflorescence functional genes, which could do benefit to disclosing molecular regulation mechanism underneath inflorescence development in peanut (*Arachis hypogaea* L.). A cDNA library was constructed based on SMART system. The number of the clones was determined by plate coating, the recombination rate was determined by PCR, the size of inserted fragment was determined by digestion of enzyme, and the bioinformatics analysis was used to evaluate the quality of the library. The primary library capacity was 1.2×10^6 cfu, the average inserted fragment size was about 1300 bp and the percentage of recombination reached 100%. Judging from the analysis of bioinformatics, this library includes all kinds of informations, as well as some new genes. The library is of good quality for screening and cloning full-length genes.

Keywords Peanut (*Arachis hypogaea* L.); Inflorescence; Full-length cDNA library; SMART technology

研究背景

花序发育研究一直是植物学家研究的重点。近年来, 随着对拟南芥, 金鱼草等材料的研究, 克隆了不少调控花发育的同源异形基因, 参与花序分生组织诱导, 花分生组织转变和花器官形成的调控(Weigel and Meyerowitz, 1994)。其中大部分属于 *MADS-box* 基因(Schwarz et al 1990; Ma et al., 1991; Shore and

Ssarrocks, 1995)。研究发现花序有许多重要生物学及医学功能。郑亚军等研究发现椰子花序汁液中的多糖具有抗氧化活性(郑亚军等, 2009)。梁淑红等发现金鸡菊提取物具有明显降血脂的作用(梁淑红等, 2010)。王晓等人发现加杨雄花序提取物具有抗氧化功能, 对 DNA 损伤具有保护功能(王晓等, 2005)。

花序的形成及发育对花生的产量具有重要的作用。目前对花生花序形态发育、物质结构已有详尽的研究。关于花生花序在分子生物学方面研究已有报道, 袁美等(2005)人在多序列比对的基础上设计兼并引物, 成功地从花生中克隆花生 MADS-box 片段。但是相对其他植物花序, 花生花序在分子方面研究尚属起步阶段, 关于花生花序生长发育及物质代谢相关基因研究报道甚少。为了探讨花生花序发育机制, 揭秘花生产量影响因素, 发现花生花序重要基因, 为基础生物学研究以及医学应用花生花序提供实验依据, 我们成功构建了一个高质量的花生花序全长 cDNA 文库。该文库的构建对分离、克隆和筛选花序特异基因以及功能基因组学研究具有重要作用。

1 结果与分析

1.1 花生花序总 RNA 的提取

琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。从电泳结果来看, 本实验所提取的 RNA 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 亮度比接近 2:1。RNA 经紫外分光光度计检测, 其紫外吸收值 OD_{260}/OD_{280} 为 2.05。结果表明获得的 RNA 纯度较高, 没有基因组 DNA 污染, 并且总 RNA 没有降解, 比较完整, 可用于 cDNA 文库的构建(图 1)。

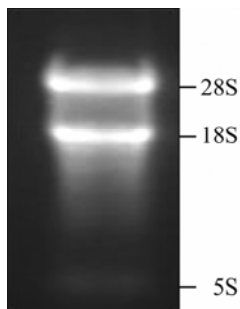


图 1 总 RNA 电泳图
Figure 1 Results of RNA Electrophoresis

1.2 双链 cDNA 的合成

取 3 μ g 总 RNA 进行反转录反应合成第一链 cDNA 后采用 LD-PCR 法合成双链 cDNA。取 2 μ L 合成产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 呈现从小到大均匀分布的弥散状条带, 片段分布在 0.2~3.0 kb 之间, 而且条带清晰、正常。结果表明合成的双链 cDNA 质量高, 可以满足全长 cDNA 文库构建的需要(图 2)。

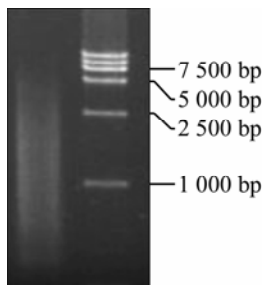


图 2 花生花序 dsDNA 电泳图
注: 1: 双链 DNA 电泳图; M: DL15000 marker
Figure 2 Results of dsDNA Electrophoresis
Note: 1: Results of dsDNA Electrophoresis; M: DL15000 marker

1.3 文库质量的检测

双链经酶切、连接载体、电击转化、涂板过夜培养后计数培养板克隆数, 计算获得原始文库含量。经计算, 原始文库得到 1.2×10^6 个重组子。扩增文库经滴度测定结果为 3.51×10^9 pfu/cm。

随机挑取的 15 个单菌落摇菌, 菌液 PCR 扩增后电泳, 结果显示其中含有一个双插入, 其它均为但插入重组率达 100% (图 3)。随机挑取 10 个单菌落摇菌提取质粒酶切后电泳(图 4)显示, 插入片段大小主要集中在 750~2 000 bp 之间, 其中 750~1 000 bp 之间有一个, 1000~2 000 bp 之间有 8 个, 有一个插入片段小于 750 bp。所构建文库插入片段平均长度约 1.3 kb。

结果表明本文库达到了文库质量的要求, 基本包含了花生花序全长功能基因, 文库质量较高。

1.4 文库随机测序和生物信息学分析结果

随机挑选文库 30 个单克隆进行双向测序, 利用 DNA 序列常规分析软件 BioXM 2.6 分析测序结果, 共有 25 个基因测通, 且均具有开放阅读框结构。网上 Blastn 比对分析, 其中有 19 个为全长序列, 全长率为 76%。Blastx 分析显示: 有 1 个序列未发现同源序列; 其余 24 个均与已知的植物氨基酸序列具有同源性, 其中 16 个为功能未知蛋白或假定蛋白序列, 占 66.7%。其中有 7 个序列与功能已知植物氨基酸序列具有同源性, 所占比例为 29%, 包括水通道蛋白、真核生物翻译抑制因子、受体类蛋白激酶、光系统 I 活性中心亚单位 XI、磷脂酶 Da2、发病机制诱导蛋白、乙烯利反应相关转录因子 12 及 40S 核糖体蛋白 S2 等, 具体结果见表 1。7 个基因编码序列与大豆已报道氨基酸序列同源性较高,

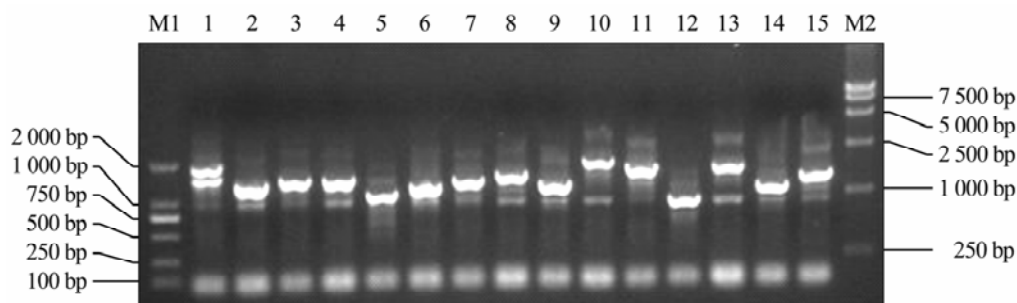


图3 菌液 PCR 电泳图

注: 1~15: 随机挑选单克隆; M1: DL2000 marker; M2: DL15000 marker

Figure 3 Identification of some recombinants by PCR

Note: 1~15: PCR detection of inserted size to single clone randomly chosen from cDNA library; M1: DL2000 marker; M2: DL15000 marker

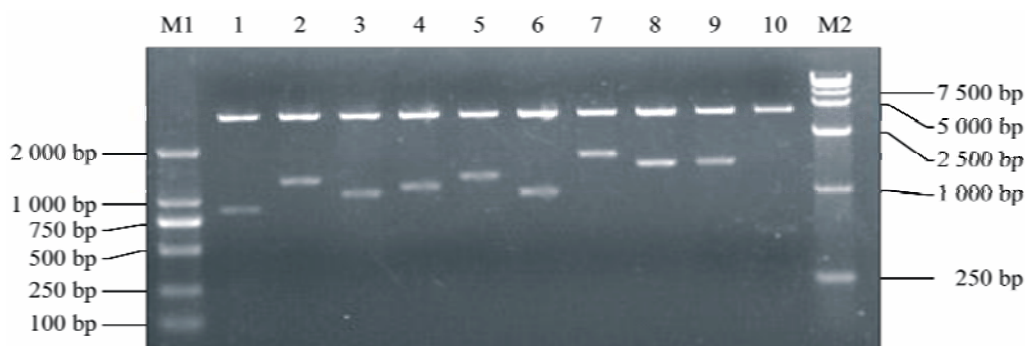


图4 质粒酶切电泳图

注: 1~20: 质粒 *Sfi*I 酶切电泳图; M1: DL2000 Marker; M2: DL15000 marker

Figure 4 Identification of the inserted fragments by enzyme digestion

Note: 1~20: Electrophoresis of plasmid restriction; M1: DL2000 marker; M2: DL15000 marker

表1 已知功能基因与 GeneBank Blastx 同源性比对结果

Table 1 Result of sequences homology comparison of function-known genes by Blastx on GeneBank

克隆编号 Clone No.	网上登录号 Accession no.	同源基因 Sequences producing significant alignments	一致性 Identity	E 值 E-value
PH1	NP_001105639.1	aquaporin PIP2-7 (<i>Zea mays</i>)	82%	e-135
PH5	ACJ76773.1	eukaryotic translation initiation factor 5A2 (<i>Glycine max</i>)	97%	2e-86
PH8	ACJ37411.1	receptor-like protein kinase (<i>Glycine max</i>)	88%	e-106
PH9	ABU39903.1	photosystem I reaction center subunit XI (<i>Olea europaea</i>)	66%	2e-29
PH15	BAE79735.1	phospholipase D alpha 2 (<i>Arachis hypogaea</i>)	95%	0.0
PH23	ACG76109.1	pathogenesis-induced protein (<i>Arachis hypogaea</i>)	76%	2e-69
PH29	ACM49843.1	ethylene responsive transcription factor 12 (<i>Prunus salicina</i>)	56%	8e-43
PH30	XP_002513493.1	40S ribosomal protein S2 (<i>Ricinus communis</i>)	92%	e-121

6 个与葡萄已报道氨基酸序列具有较高同源性, 与花生氨基酸序列具有较高同源性的仅有 3 个。这可能是由于花生与大豆、葡萄同属双子叶植物, 而大豆和葡萄在功能基因组学方面研究相对较深入。

生物信息学结果表明, 本实验所构建的花生花序文库包含了大量的信息, 同时还发现了许多未知基因, 说明本文库质量较高, 可用于目的基因的筛选和克隆。同时, 该结果也表明花生功能基因组学研

究相对薄弱, 亟待加强。

2 讨论

作为植物的精华花序不仅具有观赏价值, 而且还具有独特的美食、保健、药用作用(徐怀德, 2000)。花序是一个着生花的变态枝, 花生的花序为总状花序, 在花序轴每一节上着生1片苞叶, 其叶腋内着生一朵花。花生花器由苞叶、花萼、花冠、雄蕊和雌蕊组成。花生是喜温植物, 温度、水分及光照强度均可影响花生开花, 花生开花量直接影响花生产量。

全长 cDNA 文库是高效、大规模获得基因序列信息的一条有效途径, 尤其是对基因组庞大, 近期内尚不能进行全基因组测序的生物来说更是进行功能基因组研究的一条重要途径。目前, 许多作物如小麦(秘彩莉等, 2006)、大豆(王敏等, 2005; 董志敏等, 2006)、油菜(董海滨和管荣展, 2005)等均有以某一特定器官、特定时期或特定处理条件等为基础的全长 cDNA 文库构建, 本实验室蔡宁波等人以 SMART 方法构建了花生种子全长 cDNA 文库(蔡宁波等, 2007), 山东省花生研究所禹山林等构建了花生幼苗全长 cDNA 文库(禹山林等, 2010), 有关花生花序的文库未见报道。因此构建该文库对进一步克隆和研究相关基因, 研究花生花序发育的分子生物学机制有着重要的意义。

SMART 技术是近年发展起来的一项利用较少 mRNA 甚至总 RNA 建立 cDNA 文库的方法(Chenchik et al., 1996; Schuler, 1997; Wellen-reuther et al., 2004)。其主要原理是应用 5' SMART 引物得到全长 cDNA, 并利用 LD-PCR 法特异扩增全长 cDNA, 排除了不完整的 cDNA 片断, 并通过基因组内极其稀有的酶切位点 *Sfi* I 切割 cDNA, 得到接头并定向连接到载体中, 大大提高了效率。

为了达到一个合理的概率筛选出单拷贝的目的基因, 根据 Clarke-Carbon 的公式: $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$, N 代表所需克隆数, p 即代表要求的概率, f 为 $1/n$, n 为一种稀有的 mRNA 在总 mRNA 中所占有的相对比例(侯占铭, 2000)。一般情况下, cDNA 文库容量达到 1.0×10^6 , 就能够从库中筛选出低丰度的基因(王玉荣等, 2009), 本实验所获得的 cDNA 文库重组子数为 1.2×10^6 cfu, 可以满足构建 cDNA 文库所需

的数量要求。同时该 cDNA 文库重组率达到 100%, 插入片段也较长, 主要集中于 750~2 000 bp 之间, 平均插入片段长约 1.3 kb, 可以满足全长基因筛选的要求, 对于研究花生花序发育基因、不同生物过程基因、抗耐胁迫基因、花序特异表达基因等具有重要作用。

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 实验材料

以福建农林大学油料作物所选育的优良花生品种闽花 6 号未开放花序为材料, -70°C 冰箱保存备用。

3.1.2 试剂

文库构建试剂盒 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司。Primer- Script Reverse Transcriptase、EX-Taq, dNTP, DL2000 及 DL15000 分子标准、电转化感受态细胞 DH5 α 均购自大连宝生物公司(TAKARA)。胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司(BIOER)。其它试剂采用国产分析纯。

所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成, 名称及序列如下: SMART IV Oligonucleotide: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'; 3' PCR Primer: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCAGAGCGGCCGA-d(T) 30VN-3' (N=A, G, C, or T; V=A, G, or C); 5' PCR Primer: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; M13 Forward Primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; M13 Reverse Primer: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。

3.2 方法

3.2.1 花生花序总 RNA 的提取

取 5 g 花序材料放入液氮预冷的研钵中, 充分研磨。采用本实验室改良的 CTAB 法提取总 RNA。总 RNA 经紫外分光光度计检测浓度及纯度, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

3.2.2 cDNA 单链和双链的合成

cDNA 第一链的合成: 在一个 DEPC 处理的 200 μL 离心管中加入以下试剂: 3 μg 总 RNA, 1 μL SMART IV Oligonucleotide, 1 μL 3' PCR Primer, 72°C 温浴 2 min

后冰浴 2 min。稍加离心后依次加入下列试剂: 1.0 μL RNase Inhibitor, 3.0 μL MMLV Buffer, 3 μL MgCl_2 , 1.0 μL dNTP Mix (10 mmol/L), 1.0 μL Primer Script Reverse Transcriptase, 1.0 μL SMART IV 42 $^\circ\text{C}$ 温浴 3 h 后置于冰上终止第一链合成。

cDNA 第二链的合成: 在反应管中加入下列试剂: 2.0 μL 的第一链 cDNA、2.5 μL 10 \times Ex Buffer、0.5 μL 10 mmol/L dNTP、1.0 μL 5' PCR Primer、0.25 μL ExTaq, 双蒸水补足至 25 μL , 混匀各组分, 稍加离心后放到已预热(95 $^\circ\text{C}$)的 PCR 仪中。按下面程序开始 PCR: 95 $^\circ\text{C}$ 2 min; 8 cycles: 95 $^\circ\text{C}$ 15s, 68 $^\circ\text{C}$ 30s, 72 $^\circ\text{C}$ 5 min; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。循环结束后取 2 μL 产物电泳检测。

3.2.3 蛋白酶 K 消化与 SfiI 限制性酶切

取 50 μL 双链 cDNA 的 PCR 产物, 加入 2 μL 蛋白酶 K (20 g/L), 45 $^\circ\text{C}$ 温育 20 min 灭活 DNA 聚合酶活性, 用酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提一次, 然后用 80%乙醇、醋酸钠、糖原室温沉淀。沉淀用 85%乙醇洗涤以后用 75 μL 去离子水重悬。

重悬后的产物中加入 15 μL SfiI 酶, 于 50 $^\circ\text{C}$ 酶切 2 h, 再以 1.5%琼脂糖凝胶电泳酶切产物, 回收 750 bp 以上片段。回收产物经乙醇、醋酸钠、糖原-20 $^\circ\text{C}$ 共沉淀后, 以 7 μL 去离子水重悬, 保存于-70 $^\circ\text{C}$ 备用。

3.2.4 双链与载体的链接和转化

酶切产物与质粒载体 pDNR-LIB (经 Sfi I 酶处理过) 在 16 $^\circ\text{C}$ 下连接后经电击转化入 45 μL 感受态细胞 (大肠杆菌 DH5a)。转化后迅速加入 950 μL LB 培养基, 置于 37 $^\circ\text{C}$, 225 r/min 振荡培养 1 h 即获得 1 mL 原始文库菌液。

3.2.5 文库质量的检测

吸取 1 μL 原始文库菌液均匀地涂在含 30 mg/L 氯霉素的 LB 培养板上, 过夜培养。计数过夜培养 LB 板单克隆数, 计算原始文库量, 原始文库量(cfu)=克隆数 $\times 10^3$ 。

随机挑取 22 个单克隆摇菌, 过夜后做菌液 PCR 鉴定文库重组率。PCR 引物为 M13 引物。随机挑取 10 个单菌落摇菌提取质粒经 Sfi I 酶切后电泳检测文库 cDNA 插入片段的大小。随机挑取 30 个

单菌落做穿刺 stock 并送上海国家人类基因组南方研究中心进行测序并对测序结果进行生物信息学分析。

作者贡献

陈华是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文的写作与修改; 姜宝杰参与实验设计、实验研究与试验结果分析; 邓焯、曾建斌、张冲参与实验研究; 庄伟建是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改, 是本文的责任作者(通信作者)。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究是在福建省科技厅项目基因工程改良花生油亚比(O/L)的研究(2008I0002)和科技部国际科技合作项目花生抗黄曲霉基因工程及育种研究(2008DFA31150)资助下完成。

参考文献

- Bei C.L., Guo G.Y., Qi Z.G., and Shen Y.Z., 2006, Construction and detection of a cDNA library of wheat seedling salt stressed for 72 hours, Hebei Shifandaxue Xuebao (Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)), 30(5): 585-588 (秘彩莉, 郭光艳, 齐志广, 沈银柱, 2006, 小麦苗期盐胁迫 72 h cDNA 文库的构建及质量检测, 河北师范大学学报(自然科学版), 30(5): 585-588)
- Cai N.B., Huang X.W., and Zhuang W.J., 2007, Construction and identification of a full-length cDNA library from peanut seeds, Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science), 36(2): 1-5 (蔡宁波, 黄湘文, 庄伟建, 2007, 花生种子全长 cDNA 文库的构建和鉴定, 花生学报, 36(2): 1-5)
- Chenchik A., Moqadam F., and Siebert P., ed, 1996, A new method for full-length cDNA cloning by PCR, Krieg P A.A. laboratory guide to RNA isolation, analysis and synthesis, Wiley-Liss, Inc, New York, 273-321
- Dong H.B., and Guan R.Z., 2005, Construction of seedling cDNA library of canola variety Huashuang 3 in *Brassica napus*, Nanjing Nongye Daxuexuebao (Journal of Nanjing Agricultural University), 28(3): 123-125 (董海滨, 管荣展, 2005, 双低油菜华双 3 号幼苗全长 cDNA 文库的构建, 南京农业大学学报, 28(3): 123-125)
- Dong Z.M., Li Y.H., Zhang B.S., Guan R.X., Chang R.Z., and Qiu L.J., 2006, Construction and identification of soybean (*Glycine max*) leaf, Zuowu Zazhi (Crops), (5): 1-4 (董志敏, 李英慧, 张宝石, 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 2006, 大豆叶片全长 cDNA 文库的构建与鉴定, 作物杂志, (5): 1-4)
- Hou Z.M., 2000, A Deduction for the Clarke-Carbon's Equation, Yichuan (Hereditas (Beijing)), 22(2): 101-102

- (侯占铭, 2000, Clarke-Carbon 公式的推导, 遗传, 22(2): 101-102)
- Liang S.H., Pang S.B., Liu X.Y., Xu L., Ha M.L.T., and Su Y.H., 2010, The coreopsis extraction's hypolipidemic effect research, *Zhongguo Shiyangfangji Zazhi (Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae)*, 16(8): 234-235 (梁淑红, 庞市宾, 刘晓燕, 徐磊, 哈木拉提, 孙玉华, 2010, 金鸡菊提取物降血脂作用的研究, 中国实验方剂学杂志, 16(8): 234-235)
- Ma H., Yanofsky M.F., and Meyerowitz E.M., 1991, AGL1~AGL6, an Arabidopsis gene family with similarity of floral homeotic and transcription factor genes, *Genes Dev.*, 5: 484-495 doi:10.1101/gad.5.3.484
- Schwar Z.S., Huijser P., Nacken W., Saedler H., and Sommer H., 1990, Genetic control of flower development: homeotic genes in *Antirrhinum majus*, *Science*, 250: 931-936 doi:10.1126/science.250.4983.931 PMID:17746916
- Sehuler G.D., 1997, Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes, *J. Mol. Med.*, 75: 694-698 doi:10.1007/s001090050155 PMID:9382993
- Shore P., and Ssarrocks A.D., 1995, The MADS-box family of transcription factors, *Eur. J. Bio. Chem.*, 229: 1-13 doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x PMID:7744019
- Wang M., Liu P., Shi M.W., and Wang Q.L., Construction and characterization of cDNA library from seeds of wild soybean (*Glycine soja*), *Shengwujishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 16(5): 509-511 (王敏, 刘萍, 石明旺, 王清连, 2005, 野生大豆种子 cDNA 文库的构建与分析, 生物技术通讯, 16(5): 509-511)
- Wang X., Zhang H.X., Deng Y.G., Shi X.G., and Liu J.H., 2005, Effects of the extract of populus canadensis moench. male anthotaxy on antioxidation and prevention of DNA damage caused by hydroxyl radical *in vitro*, *Shipin Kexue (Food Science)*, 26(4): 216-219 (王晓, 张红侠, 邓煜光, 时新刚, 刘建华, 2005, 加杨雄花序提取物体外抗氧化及对 DNA 损伤的保护作用研究, 食品科学, 26(4): 216-219)
- Wang Y.R., Zhang X.Y., Liu C.L., Chen Y.J., Li F.G., 2009, Construction and characterization of normalized full-length cDNA library of Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.) in the whole-life cycle, *Zhongguo Nongye Kexue Zazhi (Scientia Agricultura Sinica)*, 42(4): 1158-1164 (王玉荣, 张雪妍, 刘传亮, 陈亚娟, 李付广, 2009, 亚洲棉(*Gossypium arboreum* L.)全生育期均一化全长 cDNA 文库的构建和鉴定, 中国农业科学, 42(4): 1158-1164)
- Weigel D., and Meyerowits E.M., 1994, The ABCs of floral homeotic genes, *Cell*, 78: 203-209 doi:10.1016/0092-8674(94)90291-7
- Wellenreuther R., Schupp I., Poustka A., Wiemann S., German cDNA Consortium., 2004, SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large fulllength clone, *BMC Genomics*, 36(5):1-8
- Xu H.D., ed, 2000, *Flowers foods*, China Light Industry Press, Beijing, China, pp.116-228 (徐怀德, 主编, 2000, 花卉食品, 中国轻工业出版社, 中国, 北京, pp.116-228)
- Yu S.L., Chi X.Y., Yang Q.L., Pan L.J., He Y.N., Chen M.N., and Yang Z., 2010, Construction of a full-length cDNA library from peanut seedlings, *Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science)*, 39(2): 11-15 (禹山林, 迟晓元, 杨庆利, 潘丽娟, 和亚男, 陈明娜, 杨珍, 2010, 花生幼苗全长 cDNA 文库的构建, 花生学报, 39(2): 11-15)
- Yuan M., Sharma K.K., Li S.L., Tao H.T., Ren Y., and Yu S.L., 2005, Cloning of a partial MADS-box gene in groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science)*, 34(4): 25-27 (袁美, Sharma K.K., 李双铃, 陶海腾, 任艳, 禹山林, 2005, 花生 MADS-box 基因片段的克隆, 花生学报, 34(4): 25-27)
- Zheng Y.J., Chen W.J., and Xin B., 2009, Antioxidant activities of polysaccharides from coconut inflorescence sap, *Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 30(3): 392-395 (郑亚军, 陈卫军, 辛波, 2009, 椰子花序汁液中多糖的抗氧化活性, 热带作物学报, 30(3): 392-395)



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>