

# 向日葵单染色体显微分离及特异文库的构建

孙瑞芬<sup>1</sup> 闫素丽<sup>1,2</sup> 安玉麟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古农牧业科学院生物技术研究中心, 呼和浩特 010031; <sup>2</sup>内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019)

**摘要** 采用玻璃针分离法, 通过显微操作系统成功地分离到内葵杂3号三交种和单交种的随体染色体, 经两轮LA-PCR扩增得到250~1 500 bp的DNA片段。用各自的基因组DNA标记成探针, 与随体染色体扩增产物进行Southern杂交, 显示杂交信号, 证明内葵杂3号三交种和单交种随体染色体DNA已被成功扩增。将第2轮PCR产物构建质粒文库, 得到三交种和单交种克隆数分别约为 $2.26 \times 10^5$ 和 $2.57 \times 10^5$ 。各随机挑取30个重组子进行分析, 发现插入片段大小分别为200~700 bp和200~500 bp, 平均插入片段大小分别为535 bp和480 bp。这是染色体微分离与微克隆技术首次在向日葵上的应用。

**关键词** 向日葵; 染色体; 显微分离; PCR扩增; 单染色体文库

## Microdissection of Single Chromosome and Construction of Its DNA Library in Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Sun Ruifen<sup>1</sup>, Yan Suli<sup>1,2</sup>, An Yulin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology Research Center, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China;

<sup>2</sup>Institute of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019, China)

**Abstract** The satellite chromosome of triple cross and single cross of “Inner Mongolia Hybrid oil sunflower 3” were isolated by glass needle method with the help of micromanipulator. After two rounds of LA-PCR amplification, the PCR products ranging from 250 to 1 500 bp were obtained. Southern blot with genomic DNA revealed hybridization signal, indicating that DNAs from the satellite chromosome had been successfully amplified. The second-round PCR products were microcloned into plasmid vector, and their DNA libraries were constructed. About  $2.26 \times 10^5$  and  $2.57 \times 10^5$  recombinant clones were obtained from triple cross and single cross of sunflower respectively. 30 clones were randomly selected for size evaluation. The results demonstrated that the size of the DNA fragments from triple hybrid sunflower varied approximately from 200 to 700 bp with an average of 535 bp, and the DNA fragments from single cross hybrid sunflower varied approximately from 200 to 500 bp with an average of 480 bp. The microdissection and microcloning technology has been applied for sunflower chromosome analysis.

**Key words** sunflower; chromosome; microdissection; PCR amplification; single chromosome library

染色体微分离、微克隆技术最早由Scaleghe等<sup>[1]</sup>提出, 是细胞遗传学和分子遗传学结合的桥梁。该技术主要用在构建具有特异识别特征的单染色体或

区域的特异性DNA文库<sup>[2]</sup>。目前, 已在小麦<sup>[3]</sup>、水稻<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>、水仙<sup>[6]</sup>等多种植物染色体研究中得到应用, 其中一些特异染色体文库已应用于染色体特异分子

收稿日期: 2013-07-05 接受日期: 2013-10-21

国家向日葵现代产业技术体系项目(批准号: CARS-16)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-5294388, E-mail: nkyanyulin@163.com

Received: July 5, 2013 Accepted: October 21, 2013

This work was supported by the National Modern Industry Technology System of Sunflower (Grant No.CARS-16)

\*Corresponding author. Tel: +86-471-5294388, E-mail: nkyanyulin@163.com

网络出版时间: 2013-12-23 11:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0210.html>

标记筛选、重要基因定位和分离<sup>[7-10]</sup>等研究中。

向日葵(*Helianthus annuus* L.)是世界上重要的油料作物,也是内蒙古地区主要的经济作物。具有耐盐碱、抗干旱、耐贫瘠等优良特性,因此开展向日葵染色体研究,对加强向日葵优良基因的研究与利用具有重要的意义,同时为向日葵育种及分子生物学的研究奠定基础。目前,国内外有关向日葵染色体方面的研究主要集中在核型分析上,染色体微分离、微克隆方面的研究至今未见报道。由于向日葵染色体数目多( $2n=34$ ),染色体微小(2~5  $\mu\text{m}$ ),多数染色体之间非常相似,缺乏明显稳定的识别标记<sup>[11]</sup>,这给染色体的鉴别及特定染色体的分离带来很大的困难。而随体作为染色体最显著的特征,常被用作鉴别染色体的依据。向日葵的随体染色体数目因品种而异<sup>[12-14]</sup>,内葵杂3号三交种和单交种各有一对随体染色体<sup>[15]</sup>,因此本文以该随体染色体为目标染色体,进行了显微分离及接头介导的LA-PCR扩增和克隆,建立了一套向日葵单染色体微分离和微克隆技术,为筛选单条染色体特定区段的分子标记奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

内葵杂3号单交种和三交种种子由内蒙古农牧业科学院作物研究所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体标本制备** 染色体标本的制备参考文献<sup>[15-16]</sup>。供试种子25 °C条件下萌发至幼根长度约为1.5 cm时,于上午9:30~10:00切取根尖,用8-羟基喹啉(0.002 mol/L)溶液中预处理4 h,无菌ddH<sub>2</sub>O冲洗2~3次, Carnoy固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)于4 °C条件下固定2 h,转入70%乙醇中,冰箱(4 °C)保存备用。制片时,取70%乙醇保存的根尖,用ddH<sub>2</sub>O冲洗2~3次后切下其前端乳白色部分并去掉根冠,先在无菌ddH<sub>2</sub>O中前低渗30 min,无菌滤纸吸干水分,移入0.5%果胶酶和2%纤维素酶混合液的酶液(过滤除菌)中,37 °C消化50 min,洗去酶液后再在无菌ddH<sub>2</sub>O中后低渗5~10 min,苏木精染色制片。在显微镜下找到清晰且分散良好的目标染色体的中期分裂相,标记后于-70 °C冰箱中速冻30 min以上,迅速揭片并气干,用于显微分离。

**1.2.2 目标染色体的识别及显微分离** 选取分散

好的分裂相在倒置显微镜(OLYMPUS BH-2)10×40下辨认随体染色体,采用Nikon显微操作系统,用直径为1  $\mu\text{m}$ 的微细玻璃针,参照黄代青等<sup>[16]</sup>的黏取法进行目标染色体的分离。

**1.2.3 Sau3A I接头的制备** Sau3A I连接接头由23磷酸化碱基和19碱基的两条引物序列组成,碱基序列为:5'-GAT CCT GAG CTC GAA TTC GAC CC-3',5'-GGG TCG AAT TCG AGC TCA G-3'(上海生工生物技术有限公司合成)。Sau3A I连接接头的制备过程为分别取上述两条引物(100  $\mu\text{mol/L}$ )各1  $\mu\text{L}$ 于PCR管中,用无菌ddH<sub>2</sub>O(紫外线处理)补至25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:90 °C 2 min,55 °C 20 min。然后用1×T4 DNA连接酶Buffer将其稀释10倍,-20 °C保存备用。接头中包含Sau3A I、EcoR I、Sac I酶切位点,以便今后克隆。

**1.2.4 随体染色体的LA-PCR扩增** 将黏附染色体的针尖折断于含有20  $\mu\text{L}$ 反应Buffer的0.2 mL离心管中,10 000 r/min离心30 s。加入Proteinase K,37 °C下消化4~5 h,75 °C金属浴中20 min灭活酶。再加入0.01 U/ $\mu\text{L}$  Sau3A I 2  $\mu\text{L}$ ,37 °C反应4 h,70 °C金属浴中20 min灭活酶。取2  $\mu\text{L}$  Sau3A I连接接头加入到酶切后的目标染色体中,并加入0.5  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase,用无菌ddH<sub>2</sub>O补至25  $\mu\text{L}$ ,16 °C连接过夜。用19碱基寡核苷酸片段为引物对酶切、连接后的目标染色体进行两轮PCR扩增。第一轮反应在原管中进行,体系为紫外线处理过的无菌ddH<sub>2</sub>O 39.75  $\mu\text{L}$ ,10×Buffer(含Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu\text{L}$ ,19碱基引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,dNTP mixture(各2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ ,Tag DNA聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ ,混匀后,短暂离心。条件为:94 °C预变性5 min;94 °C变性1 min,50 °C退火1.5 min,72 °C延伸3 min,循环35次;最后72 °C保温10 min。第二轮反应是取5  $\mu\text{L}$ 第一轮扩增的产物做模板,其他成分不变。反应条件为:55 °C退火1.5 min,其他条件不变。同时设立阴性和阳性对照,其中阴性对照为不添加任何DNA模板,阳性对照为向日葵基因组DNA为扩增模板,基因组DNA提取采用植物DNA提取试剂盒(北京天为时代科技有限公司)。取10  $\mu\text{L}$  PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳并拍照。

**1.2.5 Southern杂交分析** 将扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳后,按照王关林等<sup>[17]</sup>的方法进行Southern转膜。将DNA转移至Hybond<sup>+</sup>尼龙膜上后,用DIG标记的向日葵基因组DNA为探针进行

Southern杂交, 阳性对照为*Sau*3A I酶切后的向日葵基因组DNA, 其中探针标记及杂交过程按照Roche的DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I的产品说明书进行。

1.2.6 目标染色体的微克隆与特异文库的构建 单染色体的第二轮PCR产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天为时代科技有限公司)回收纯化后, 溶于35  $\mu$ L TE中, 取3  $\mu$ L与1  $\mu$ L pGEM-T-Easy载体(Promega产品) 4  $^{\circ}$ C连接过夜, 用1/2连接物转化*E.coli* TOP10感受态细胞, 取50  $\mu$ L转化菌液涂在含有Amp(100 mg/L)、IPTG(125 mg/L)和X-gal(80 mg/L)的LB平板上, 37  $^{\circ}$ C培养过夜, 蓝、白斑筛选重组克隆, 推断文库容量。随机挑取30个白斑和一个蓝斑, 用Kisser<sup>[18]</sup>法提取质粒检测, 并用19碱基引物进行菌液PCR扩增, 进一步用质粒提取试剂盒提取质粒, 并用*Eco*R I消化质粒以估计插入片段大小。

## 2 结果

### 2.1 向日葵单染色体的显微分离

采用酶解与低渗相结合的制片方法, 获得了分散较好的中期染色体分裂相, 并在10 $\times$ 40倍倒置显微镜下分辨出随体染色体作为显微分离和单染色体文库构建的目标染色体(图1箭头所示)。分离过程中, 由于表面张力, 黏附在针尖上的染色体在移出液面时极易漂走, 故移出时通过显微镜确定目标染色体黏附在针尖上, 然后再将针尖折断于PCR管中。分离过程如图1。

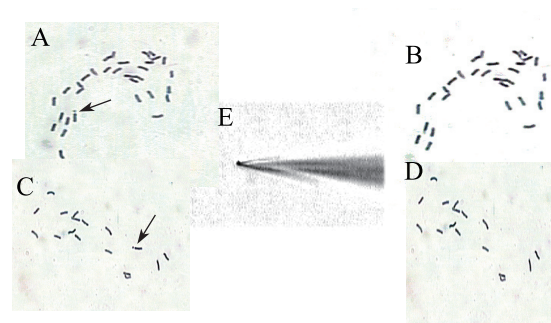
### 2.2 单染色体LA-PCR扩增

分离到的随体染色体经两轮PCR扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测发现三交种和单交种与阳性对照均出现一条均匀弥散的连续条带(图2和图3), 大小约为250~2 000 bp, 主要集中在300~1 500 bp, 而阴性对照未出现扩增条带, 说明没有外源DNA污染。

### 2.3 Southern杂交检测

将单交种和三交种的第二轮PCR产物电泳后转膜, 与标记好的基因组DNA进行Southern杂交, 杂交结果显示, 目标染色体扩增产物和阳性对照均出现明显的杂交信号(图4和图5), 而单交种阴性对照无杂交信号, 三交种阴性对照出现小片段杂交信号, 可能是由探针的非特异性结合造成的, 证明单染色体扩增产物确实来自于各自基因组DNA。

### 2.4 单染色体特异文库建立与初步分析

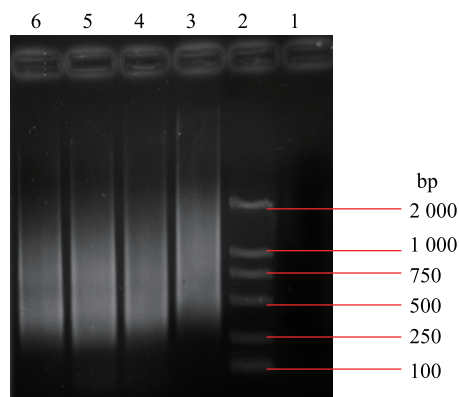


A: 单交种染色体分离前的根尖细胞中期分裂相; B: 单交种染色体分离后的中期分裂相; C: 三交种染色体分离前的根尖细胞中期分裂相; D: 三交种染色体分离之后的中期分裂相; E: 移出液面后沾有染色体的针尖。

A: single cross hybrid sunflower Mitotic metaphase chromosomes before chromosome isolation; B: single cross hybrid sunflower Mitotic metaphase chromosomes after isolation; C: triple hybrid sunflower Mitotic metaphase chromosomes before chromosome isolation; D: triple hybrid sunflower Mitotic metaphase chromosomes after chromosome isolation; E: an isolated mitotic metaphase chromosome was adhered to the glass needle out of water.

图1 向日葵随体染色体分离过程

Fig.1 The process of sunflower satellite chromosome isolation



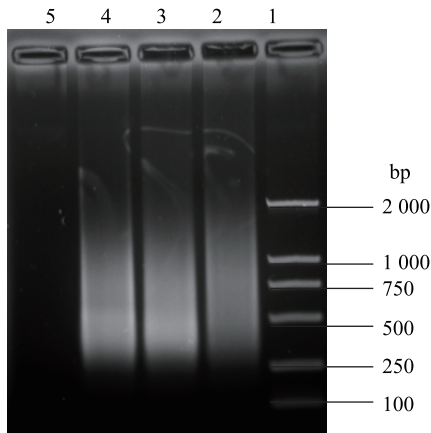
1: 阴性对照; 2: DL2000 marker; 3: 阳性对照; 4~6: 单交种单染色体扩增产物。

1: negative control; 2: DL2000 DNA marker; 3: positive control; 4~6: PCR products of single chromosome.

图2 单交种PCR扩增产物的凝胶电泳

Fig.2 The PCR amplification products of single cross hybrid sunflower gel electrophoresis

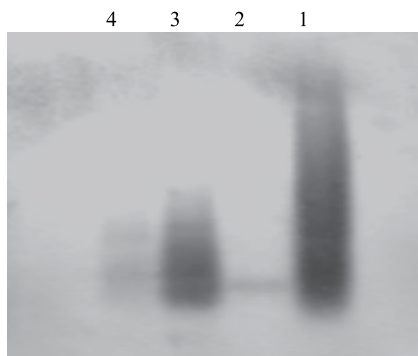
用单交种和三交种的第二轮PCR产物与载体连接, 转化*E.coli* TOP10感受态细胞后, 单交种重组率为98.75%, 三交种重组率为99.38%。由此推断, 染色体DNA文库含有的重组克隆数, 三交种大约 $2.26 \times 10^5$ 个, 单交种大约 $2.57 \times 10^5$ 个。分别随机挑取30个白色克隆, 用Kisser法提取质粒, 经琼脂糖凝胶电泳, 看出大多数质粒DNA滞后于蓝菌落质粒对照(图6), 说明有染色体DNA片段插入。用19mer引



1: DL2000 marker; 2: 阳性对照; 3~4: 三交种单染色体扩增产物; 5: 阴性对照。  
1: DL2000 DNA marker; 2: positive control; 3~4: PCR products of single chromosome; 5: negative control.

图3 三交种PCR扩增产物的凝胶电泳

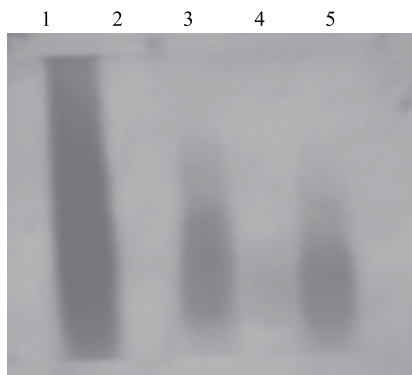
Fig.3 The PCR amplification products of triple hybrid sunflower gel electrophoresis



1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~4: 三交种单染色体扩增产物。  
1: positive control; 2: negative control; 3~4: PCR products of triple hybrid sunflower chromosome

图4 三交种杂交结果

Fig.4 Southern blot result of triple hybrid sunflower



1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~5: 单交种单染色体扩增产物。  
1: positive control; 2: negative control; 3~5: PCR products of single cross hybrid sunflower chromosome.

图5 单交种杂交结果

Fig.5 Southern blot result of single cross hybrid sunflower

物进行PCR扩增, 片段大小在200~700 bp之间(图7), 对照无扩增条带。对30个白色克隆的质粒DNA用 *EcoR* I 消化, 获得插入片段大小为200~700 bp, 其中三交种平均插入片段为535 bp, 单交种平均插入片段为480 bp(图8)。



1: DNA marker III; 2: 对照; 3~17: 单交种重组质粒; 18~31: 三交种重组质粒。

1: DNA marker III; 2: control; 3~17: recombinant plasmids of single cross hybrid sunflower; 18~31: recombinant plasmids of triple cross hybrid sunflower.

图6 部分重组质粒DNA电泳图

Fig.6 The gel electrophoresis of several recombinant plasmids



1: 100 bp DNA marker; 2: 对照; 3~17: 单交种重组克隆; 18~31: 三交种重组克隆。

1: 100 bp DNA marker; 2: control; 3~17: recombinant clones of single cross hybrid sunflower; 18~31: recombinant clones of triple cross hybrid sunflower.

图7 部分重组克隆插入片段扩增结果

Fig.7 Results of amplification of several recombinant clones insertion fragment



1: 100 bp DNA marker; 2~14: 单交种重组克隆; 15~26: 三交种重组克隆。

1: 100 bp DNA marker; 2~14: recombinant clones of single cross hybrid sunflower; 15~26: recombinant clones of triple cross hybrid sunflower.

图8 部分重组克隆的酶切鉴定

Fig.8 Restriction identification of several recombinant clones

### 3 讨论

目标染色体的识别和分离是决定玻璃针法分离单染色体成功与否的关键。内葵杂3号三交种和单交种各有一对随体染色体<sup>[15]</sup>, 参照胡赞民等<sup>[5]</sup>和黄代青等<sup>[16]</sup>的方法, 在10×40倒置显微镜下可将其

顺利分离。但在黏取时, 如果用针尖直接黏取染色体, 很容易将染色体周围的细胞质挑起, 且移出液面时染色体极易漂走。参照Hu等<sup>[19]</sup>的方法, 黏取染色体时, 在载玻片上滴一滴50%乙醇, 既能降低细胞质DNA污染, 又可避免染色体漂移。

特定染色体微分离与微克隆的目的是要建立特异染色体DNA文库, 而染色体插入片段的大小是影响其质量的因素之一。插入的片段越大、越完整, 获得的信息量越大、越全面, 也越有利于后续RFLP探针的筛选及目的基因的分离。插入片段的大小又受多方面因素影响, 如PCR方式的选择、酶切时间等。单染色体扩增主要是采取LA-PCR和DOP-PCR两种方法<sup>[20]</sup>。LA-PCR使用的是特异性引物和较高的退火温度<sup>[10]</sup>, 因此可控制污染问题, 有利于DNA文库的构建。而DOP-PCR的退火温度较低而且使用随机引物, 易造成污染, 影响文库的构建<sup>[21]</sup>。崔丽华等<sup>[22]</sup>利用这两种方法扩增蚕豆大M染色体时, 发现LA-PCR扩增的染色体DNA片段较DOP-PCR扩增的长, 而且较稳定。基于以上原因, 本实验采用LA-PCR方法扩增分离的染色体, 获得了250~1 500 bp理想的DNA片段。此外, 酶切时间也是影响插入片段大小和完整性的因素之一, 应该根据不同的植物摸索合适的酶浓度和酶切时间<sup>[23]</sup>。本实验中, *Sau3A I*酶切向日葵染色体4 h, 得到了理想的酶切结果, 且染色体片段插入大小在200~700 bp之间, 其中单交种平均插入片段480 bp, 三交种平均插入片段535 bp。

### 参考文献 (References)

- Scalenghe F, Turco E, Edstrom JE, Pirrotta V, Melli M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *drasophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosome* 1981; 82(2): 205-16.
- 吕柳新, 黄代青. 植物染色体微分离微克隆技术研究进展与展望. 福建农业大学学报(Lu Liuxin, Huang Daiqing. Advances prospects in microdissection and microcloning of plant chromosomes. *Journal of Fujian Agricultural University*) 2001; 30(3): 340-6.
- 马有志, 徐琼芳, 辛志勇, 李连城, 何聪芬, 钱红, 等. 小麦染色体的显微激光分离. 遗传学报(Ma Youzhi, Xu Qiongfang, Xin Zhiyong, Li Lianchen, He Congfen, Qian Hong, et al. Isolation of wheat chromosome by argon-ion laser beam. *Acta Genetica Sinica*) 1999; 26(1): 43-8.
- 宋文芹, 李秀兰, 祁仲夏, 梁思远, 陈瑞阳. 水稻染色体的显微分离与克隆. 南开大学学报(自然科学)(Song Wenqin, Li Xiulan, Qi Zhongxia, Liang Siyuan, Chen Ruiyang. Microdissection and microcloning of rice chromosome. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*) 2000; 38(3): 83-8.
- 胡赞民, 党本元, 周奕华, 崔丽华, 王兰岚, 张铁汉, 等. 玉米单染色体的分离和体外扩增. 遗传学报(Hu Zanmin, Dang Benyuan, Zhou Yihua, Cui Lihua, Wang Lanlan, Zhang Tiehan, et al. Isolation of single chromosome and DNA amplification *in vitro* in *Zea mays*. *Acta Genetica Sinica*) 1998; 25(6): 545-50.
- 陈晓静, 李广莘, 申艳红. 漳州水仙随体染色体的分离及DNA文库的构建. 热带作物学报(Chen Xiaojing, Li Guangping, Shen Yanhong. Microdissection and microcloning of Zhangzhou narcissus satellite chromosome. *Chinese Journal of Tropical Crops*) 2012; 33(8): 1394-7.
- 王发明, 王平, 唐琦, 柳燕贞, 陈伟. 柚(*Citrus grandis* Osbeck)单染色体LA-PCR-AFLP分子标记体系的建立. 热带作物学报(Wang faming, Wang ping, Tang Qi, Liu Yanzhen, Chen Wei. Establishment single chromosome AFLP system in pomelo *Citrus grandis* Osbeck. *Chinese Journal of Tropical Crops*) 2010; 31(10): 1778-84.
- Schondelmaier J, Martin R, Jahoor A, Houben A, Graner A, Koop HU. Microdissection and microcloning of the barley(*Hordeum vulgare* L.) chromosome 1HS. *Theor Appl Genet* 1993; 86: 629-36.
- 李湘阳, 周坚, 邓传良, 李爱荣. 杉木种子随体染色体SCAR标记的建立. 热带亚热带植物学报(Li Xiangyang, Zhou Jian, Deng Chuanliang, Li Airong. Generation of SCAR markers for identification of satellite chromosome from *cunninghamia lanceolata* Seeds. *J Tropicaland Subtropical Botany*) 2007; 15(5): 415-20.
- Liu B, Segal G, Vega JM, Feldman M, Abbo S. Isolation and characterization of chromosome-specific DNA sequences from a chromosome arm genomic library of common wheat. *Plant J* 1997; 11(5): 959-65.
- Otto S, Richard A, Jorg F, Ingo S. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 1997; 5: 451-6.
- 张新玲, 张佩玲, 尹洁. 6个向日葵品种的核型分析. 八一农学院学报(Zhang Xinling, Zhang Peiling, Yin Jie. The karyotypes analysis of six sunflower varieties. *Journal of August 1st Agrl College*) 1995; 13(3): 100-3.
- Todokova JG. Studies on the chromosome of two *H. annuus* L. tetraploid species. *Karyologia* 1979; 32(3): 335-47.
- Suhaileh A. Karyotype Analysis of four varieties of *H. annuus* L. *Cytologia* 1979; 44: 319-23.
- 闫素丽, 安玉麟, 孙瑞芬. 内葵杂3号染色体核型分析. 植物遗传资源学报(Yan Sulì, An Yulin, Sun Ruifen. Chromosome karyotype analysis of sunflower. *Journal of Plant Genetic Resources*) 2010; 11(6): 784-8.
- 黄代青, 吕柳新, 周亦华. 柚(*Citrus grandis* Osbeck)第一染色体的显微分离. 农业生物技术学报(Huang Daiqing, Lu Liuxin, Zhou Yihua. Microdissection of the fist chromosome in pomelo (*Citrus grandis* Osbeck). *Journal of Agricultural Biotechnology* 2002; 10(1): 53-5.
- 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社(Wang Guanlin, Fang Hongjun. *Plant Gene Engineering Principle and Technology*. Beijing: Science Press) 1998; 398-403.
- Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; 12(1):

- 19-36.
- 19 Hu ZM, Wang H, Chen YH, Shi R. Studies on contamination of cytoplasm DNA and its control in plant chromosome microdissection. *Acta Botanica Sinica* 2003; 45(2): 131-5.
- 20 申艳红, 陈晓静. 植物染色体微分离、微切割与微克隆技术的研究进展. *亚热带农业研究*(Shen Yanhong, Chen Xiaojing. *Advances in plant chromosome microisolation, microdissection and microcloning. Subtropica Agriculture Research*) 2007; 3(3): 235-40.
- 21 党本元, 胡赞民, 周弈华, 崔丽华, 王兰岚, 李良材, 等. 王百合单染色体DNA文库的构建. *科学通报*(Dang Benyuan, Hu Zanmin, Zhou Yihua, Cui Lihua, Wang Lanlan, Li Liangcai, *et al.* Construction of single chromosomal DNA library of *Lilium regale*. *Chinese Science Bulletin*) 1998; 43(2): 194-9.
- 22 崔丽华, 陈正华. 2种PCR技术扩增微分离的蚕豆染色体. *北京师范大学学报(自然科学版)*[Cui Lihua, Chen Zhenghua. Amplification of microdissected chromosomes from vicia faba by two PCR techniques. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*] 2004; 40(2): 243-8.
- 23 谢小芳, 黄代青, 吴为人. 长果种黄麻单染色体微克隆DNA文库的构建. *作物学报*(Xie Xiaofang, Huang Daiqing, Wu weiren. Construction of uncloned single chromosomal DNA Libraries in Jute (*Corchorus olitorius* L. *Acta Agronomica Sinica*) 2006; 32(8): 1184-7.