

# 黄瓜 cDNA-AFLP 分析体系的建立

孙涌栋<sup>1</sup>, 李贞霞<sup>1</sup>, 张兴国<sup>2</sup>, 陈碧华<sup>1</sup>, 李新峥<sup>1</sup>

(1. 河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715)

**摘要:**以黄瓜为研究材料, 研究了影响 cDNA-AFLP 反应体系的几个关键因素, 建立了适宜黄瓜的 cDNA-AFLP 分析体系, 并得到了较为清晰可辨的 cDNA-AFLP 指纹图谱。结果表明, 适用于黄瓜 dscDNA 的酶切组合为 *Taq* I 和 *Vsp* I, dscDNA 酶切用量为 300 ng, 用作预扩增模板的连接产物稀释倍数为 1 倍, 作为选择性扩增模板的预扩增反应产物的适宜稀释倍数为 30 倍。

**关键词:** 黄瓜; cDNA-AFLP; 分析体系

**中图分类号:** S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2007)04-0116-04

## Establishment of cDNA-AFLP Analysis System for Cucumber

SUN Yong-dong<sup>1</sup>, LI Zhen-xia<sup>1</sup>, ZHANG Xing-guo<sup>2</sup>, CHEN Bi-hua<sup>1</sup>, LI Xin-zheng<sup>1</sup>

(1. College of Landscape, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2. College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** After systematical studies on the factors affecting cDNA-AFLP analysis system of cucumber, an optimized system was established which showed a distinct electrophoretogram of cDNA-AFLP. The results indicated that the restriction enzyme combination was *Taq* I and *Vsp* I, the dosage of dscDNA was 300 ng, the ligation products using as template of pre-amplification were diluted to one time, and the pre-amplification products using as template of select-amplification were diluted to 30 times.

**Key words:** Cucumber; cDNA-AFLP; Analysis system

cDNA-AFLP(cDNA amplified fragment length polymorphism)技术是 Bachem 等<sup>[1]</sup>以 AFLP 为基础发明的用于 RNA 指纹分析的方法。该技术具有灵敏度高、检测的基因覆盖面广,且不需要预先知道序列信息等优点,已成为转录基因组学研究的重要工具和寻找差异表达基因的有效手段<sup>[2]</sup>。cDNA-AFLP 技术自创立以来,在植物发育、逆境胁迫反应以及植物生理调控等相关基因的分离方面得到了广泛应用。目前已从马铃薯<sup>[1]</sup>、牵牛花<sup>[3]</sup>、玉米<sup>[4]</sup>、棉花<sup>[5]</sup>、草菇<sup>[6]</sup>等植物中分离和克隆出多个有价值的基因。但是该技术操作要求高,步骤繁琐,长期以来,人们多是采用由中心试剂盒和引物试剂盒组成的商品化的试剂盒(AFLP 分析系统)进行分析,价格昂贵。而且对于其关键技术参数,如限制性内切酶组合的选择、dscDNA 酶切用量、用作预扩增模板的连接产物和作

为选择性扩增模板的预扩增产物的稀释倍数等,则因物种不同而有所差异。黄瓜是一种重要的蔬菜作物,对其基础理论和重要经济性状进行分子水平研究,具有重要意义。目前,利用 cDNA-AFLP 技术对黄瓜进行相关研究鲜见报道,且未曾见到对黄瓜 cDNA-AFLP 分析体系的研究。本研究拟以黄瓜为试材,建立适合黄瓜的廉价、高效 cDNA-AFLP 分析体系,为进一步分离、克隆及定位黄瓜差异表达基因奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

非单性结实的全雌黄瓜材料,以赤霉素诱导雄花。雄花和雌花均在开花前 1~2 d 束扎花冠进行隔离。开花当天 7:30~8:30 人工授粉。开花当天

收稿日期:2006-11-21

基金项目:教育部优秀青年教师资助计划项目[教育司(2003)355号];河南科技学院重点科研项目(6011)

作者简介:孙涌栋(1980-),男,河南安阳人,博士,主要从事蔬菜分子生物学方面的研究工作。

未经授粉子房作为授粉前的幼果样品,授粉后 6, 12, 24, 36, 48, 72 h 的幼果等质量混合后作为授粉后的幼果样品。

## 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成** 用上海生工的 UNIQ-10 柱式 TRIZOL 总 RNA 抽提试剂盒分别提取授粉前和授粉后幼果样品的总 RNA, 用 PolyAT-tract<sup>®</sup> mRNA Isolation System III (Promega, USA) 磁珠法纯化 Poly A<sup>+</sup> RNA。采用 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (Sangon, Shanghai) 合成单链 cDNA (sscDNA), 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和置换法合成 cDNA 第二链 (dscDNA)。dscDNA 用等体积的氯仿抽提, 取上清液, 加入 0.1 倍体积的乙酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积冷无水乙醇, -20℃ 沉淀后, 溶于无菌 ddH<sub>2</sub>O 中, 调整浓度至 500 ng/μL。

**1.2.2 dscDNA 酶切用量的选择** 分别取 100, 300 和 500 ng 的 dscDNA, 用 *Taq* I 和 *Vsp* I 两种限制性内切酶酶切。在 0.2 mL 的离心管中分别加入不同用量的 dscDNA, 10 × Y<sup>+</sup>/Tango<sup>™</sup> Buffer 4 μL, *Taq* I (10 U/μL) 1 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 40 μL, 充分混匀, 65℃ 保温 2 h。然后将离心管冰浴, 加入下列组分: 10 × Y<sup>+</sup>/Tango<sup>™</sup> Buffer 1 μL, *Vsp* I (10 U/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。37℃ 保温 2 h, 70℃ 加热 10 min 结束反应, 电泳检测结果, 确定合适的酶切用量。向选用的 dscDNA 用量的酶切反应液中加入以下组分: *Taq* I 双链接头 (表 1) (50 μmol/L) 1 μL, *Vsp* I 双链接头 (表 1) (50 μmol/L) 1 μL, 10 × T<sub>4</sub>DNA Ligase Buffer 6 μL, T<sub>4</sub>DNA Ligase (3 U/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 1 μL, 轻轻混匀后离心 3 ~ 5 s, 16℃ 连接 2 h。

**1.2.3 预扩增** 扩增反应分为 2 个步骤进行。首先利用无选择碱基引物进行预扩增, 然后利用具有 2 个选择碱基引物进行选择扩增 (预扩增及选择性扩增引物序列见表 1)。将连接产物进行 1 倍和 10 倍稀释后, 分别取 5 μL 作为预扩增反应的模板, 加入 *Taq* I 预扩增引物 (10 μmol/L) 1 μL, *Vsp* I 预扩增引物 (10 μmol/L) 1 μL, 10 × PCR Buffer (+ MgCl<sub>2</sub>) 2.5 μL, dNTP MiX (10 mmol/L) 0.5 μL, *Pfu* DNA Polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 14.8 μL, 混匀, 离心 3 ~ 5 s, 按下述 PCR 条件进行扩增: 94℃ 变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 15 个循环; 72℃ 延伸 7 min。确定用于预扩增反应的连接产物适宜稀释倍数。

**1.2.4 选择性扩增** 将预扩增反应产物 10, 30 和 50 倍稀释后, 作为选择性扩增的模板, 进行选择扩增。反应总体积为 25 μL, 包括模板 DNA 5 μL,

*Taq* I 选择性扩增引物 (10 μmol/L) 1 μL, *Vsp* I 选择性扩增引物 (10 μmol/L) 1 μL, 10 × PCR Buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP MiX (10 mmol/L) 0.5 μL, *Taq* DNA Polymerase (5 U/μL) 0.13 μL, ddH<sub>2</sub>O 13.37 μL, 依据下述反应条件进行 PCR 扩增: 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s (-0.7℃/每个循环), 72℃ 延伸 1 min, 共 13 个循环; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 29 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增结束后, 琼脂糖电泳检测结果, 确定选择性扩增模板的适宜稀释倍数。

表 1 引物及接头序列

Tab.1 Primer and adaptor sequences

接头和引物 Adaptors and primers	序列 Sequences
<i>Taq</i> I 双链接头	5'-GACGATGAGTCTCTGAC-3' 3'-TACTCAGGACTGCC-5'
<i>Vsp</i> I 双链接头	5'-CTCGTAGACTTCCTACC-3' 3'-CTGACGCATGGAT-5'
<i>Taq</i> I 预扩增引物	5'-GACGATGAGTCTCTGACCCGAC-3'
<i>Vsp</i> I 预扩增引物	5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAAT-3'
<i>Taq</i> I 选扩增引物	5'-GACGATGAGTCTCTGACCGACNN-3'
<i>Vsp</i> I 选扩增引物	5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAATNN-3'

**1.2.5 产物检测** 取扩增成功的选择性扩增产物 6.5 与 3.5 μL 变性液 (98% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.25% 溴酚蓝及二甲苯酚) 混匀, 94℃ 变性 5 min, 立即冰浴。将 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶恒功率 80 W 预电泳至温度 50℃, 加 6 μL 冰浴变性混合液上样, 恒功率 80 W 电泳至二甲苯酚距胶下缘 2/5 处停止。银染显色。在 X 光胶片观察灯下, 用目测法统计结果。

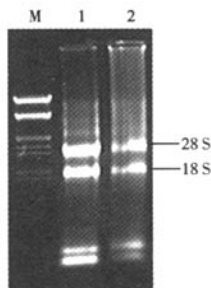
## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 和 mRNA 的质量

用 UNIQ-10 柱式 TRIZOL 总 RNA 抽提试剂盒提取授粉前和授粉后 2 个幼果样品的总 RNA。经紫外分光光度计测定, 2 个幼果样品总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值都在 1.6 ~ 1.7 之间, 取 2 μL RNA 进行琼脂糖凝胶电泳。电泳结果显示, 28 S rRNA 亮于 18 S rRNA, 且条带清晰 (图 1), 表明总 RNA 的纯度和完整性较高。

采用 Promega 公司的 PolyATtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System III 分离纯化的 mRNA, 经紫外分光光度计测定, 授粉前和授粉后 2 个幼果样品 mRNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值都在 2.2 ~ 2.5 之间, 说明 mRNA 样品的纯度较高, 基本未被其他物质污染。取 2 μL mRNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 从电泳图谱 (图 2) 可以看出, mRNA 从 300 bp 至 2 kb 的范围呈弥散分布, 表明 mRNA 比较完整, 基本没有被降解, 符合进一步试验的需要。合成的

dscDNA 经进一步的纯化后符合 AFLP 技术要求。



M. Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1. 授粉前的幼果样品;  
2. 授粉后的幼果样品(图 2 同)

M. Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1. Young fruit before  
pollination; 2. Young fruit after pollination

图 1 总 RNA 电泳图谱

Fig.1 Total RNA electrophoretogram

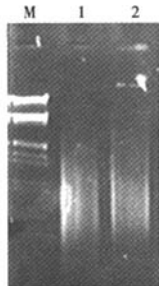


图 2 mRNA 电泳图谱

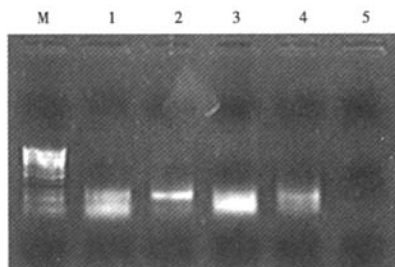
Fig.2 mRNA electrophoretogram

## 2.2 dscDNA 的酶切用量

dscDNA 的完全酶切是多态性得以检测的根本保证,而影响酶切完全的一个重要因素就是 dscDNA 酶切用量。dscDNA 量过多,容易导致酶切不完全,过少,则模板浓度太低。本研究比较了 100,300,500 ng dscDNA 的酶切效果,结果表明,500 ng 的 dscDNA,酶切电泳后得到的谱带少,且谱带多集中在测序胶的上部;100 ng 的 dscDNA,所得谱带浓度较低;300 ng 的 dscDNA,能够得到浓度合适、大小适宜的谱带。因此确定 50  $\mu$ L 酶切体系中以 300 ng dscDNA 为宜。

## 2.3 连接产物稀释倍数对预扩增反应的影响

预扩增是为选择性扩增提供模板,并对模板起选择性纯化作用,因此预扩增引物一般只含有一个选择性碱基或不含,选择性能较差,因此大量的扩增产物在琼脂糖凝胶中往往形成连续的一片。本试验对影响预扩增反应的关键因子连接产物稀释倍数进行了优化,结果显示,连接产物稀释 1 倍后的预扩增产物较亮、较宽,且一致性较好(图 3),说明预扩增效果较好,为选择性扩增提供了良好的模板。



M. Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1,2. 授粉后的幼果样品;  
3,4. 授粉前的幼果样品; 5. 阴性对照; 1,3. 稀释 1 倍的连接产物;  
2,4. 稀释 10 倍的连接产物

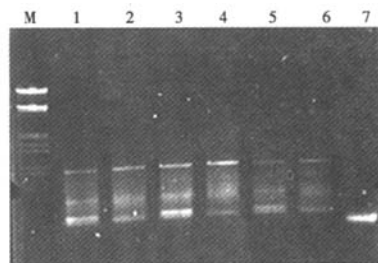
M. Gene Ruler 50 bp DNA Ladder; 1,2. Young fruit after pollination;  
3,4. Young fruit before pollination; 5. CK; 1,3. 1  $\times$  ligation products;  
2,4. 10  $\times$  ligation products

图 3 不同连接产物浓度的预扩增图谱

Fig.3 Pre-amplification pattern from differential  
concentration of ligation products

## 2.4 预扩增产物稀释倍数对选择性扩增的影响

影响选择性扩增结果的因素很多,其中预扩增产物稀释倍数对扩增结果的影响最大,稀释倍数太大,扩增条带减弱,稀释倍数太小,发生拖带,带型模糊难以辨别。因此,本试验对预扩增产物稀释倍数进行了 10,30 和 50 倍对比试验,发现稀释 30 倍后的选择性扩增效果最好(图 4)。



M. Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1,3,5. 授粉后的幼果样品;  
2,4,6. 授粉前的幼果样品; 7. 阴性对照; 1,2. 10 倍稀释产物;  
3,4. 30 倍稀释产物; 5,6. 50 倍稀释产物

M. Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1,3,5. Young fruit after  
pollination; 2,4,6. Young fruit before pollination; 7. CK;  
1,2. 10  $\times$  dilution; 3,4. 30  $\times$  dilution; 5,6. 50  $\times$  dilution

图 4 不同预扩增产物稀释倍数的选择性扩增图谱

Fig.4 Select-amplification pattern from differential  
dilute times of pre-amplification products

## 2.5 部分选择性扩增产物电泳及银染检测结果

通过对影响 cDNA-AFLP 反应体系关键技术参数的优化,建立了黄瓜的 cDNA-AFLP 分析体系,并对部分选择性扩增产物进行了电泳及银染检测,结果显示扩增条带清晰、扩增信号强度基本一致、扩增条带密度分布均匀,且主要分布于 100 ~ 300 bp 之间(图 5),说明以上优化和建立的黄瓜 cDNA-AFLP 分析体系可以应用于黄瓜的 cDNA-AFLP 分析。

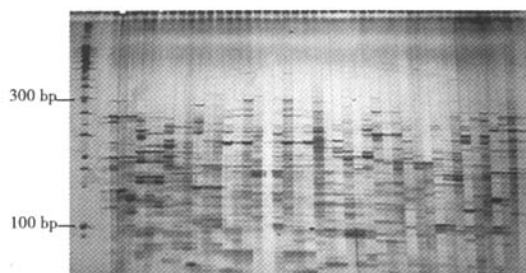


图 5 部分选择性扩增产物的银染结果

Fig.5 Silver staining results of several select-amplification products

### 3 讨论

cDNA-AFLP 程序多且复杂,任何一步的疏忽都会影响试验结果。在黄瓜的 cDNA-AFLP 分析过程中应注意以下几个问题。首先,总 RNA 和 mRNA 的纯度及完整性是 cDNA-AFLP 顺利完成的关键步骤。mRNA 的质量将直接影响到 cDNA 合成的效率以及所有的后续试验,用于 AFLP 分析的模板 ds-cDNA 只有完整无降解才能够真实地反映出细胞内的遗传信息。因此,从黄瓜组织分离完整无损、纯度高和无基因组 DNA 污染的 RNA 是试验成败的关键。其次,限制性核酸内切酶组合的选择也很重要。可用于 AFLP 分析的限制性核酸内切酶有多种,包括 *Eco*R I, *Hind* III, *Pst* I, *Bgl* II, *Xba*I, *Mse* I, *Taq* I 和 *Vsp* I 等。但是不同的物种,选择的限制性核酸内切酶组合也略有不同。为了使酶切片段大小分布均匀,一般采用 2 个限制性内切酶,一个 6 bp 的,一个 4 bp 的。*Taq* I 和 *Vsp* I 位点在 cDNA 中相对广泛存在<sup>[1]</sup>,是进行 cDNA-AFLP 分析的常用酶切组合。我们分析了目前在 GenBank 中登记的 402 条黄瓜全长和近全长 cDNA 序列,其中,19.7% (79/402) 的序列有 *Vsp* I 和 *Taq* I 酶切位点,56.7% (228/402) 至少有 2 个 *Taq* I 位点,推测 *Taq* I 和 *Vsp* I 酶切组合可能对黄瓜 76.4% (307/402) 的 cDNA 序列进行有效分析。因此,本研究选用 *Taq* I 和 *Vsp* I 酶切组合是合理可

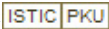
行的。另外,PCR 扩增反应分预扩增和选择性扩增,在整个试验中起着决定性的作用。预扩增不仅是检验酶切和连接效果的必要手段,而且也决定了选择性扩增的成败。只有预扩增片段范围较亮、较宽而且样品间一致性较好的 DNA 才能作为 AFLP 选择性扩增的模板。适宜稀释倍数的预扩增产物经选择性扩增后才能得到高质量的指纹图谱。应用本试验建立的黄瓜 cDNA-AFLP 体系,对部分选择性扩增产物进行了电泳及银染检测,得到了带纹清晰可辨、扩增信号强度基本一致、扩增条带密度分布均匀的指纹图谱,说明该体系可以用于黄瓜的 cDNA-AFLP 分析。

### 参考文献:

- [1] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, De Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development[J]. Plant J, 1996, 9(5): 745 - 753.
- [2] Yang L, Zheng B S, Mao C Z, et al. Analysis of gene expression during enhanced seminal root elongation of rice under up-land condition by cDNA-AFLP[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(1): 65 - 70.
- [3] Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, et al. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1997, 234: 516 - 521.
- [4] 薛春生, 肖淑芹, 王国英, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术分析玉米自交系黄早四甘蔗花叶病毒侵染后基因差异表达[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 229 - 234.
- [5] 肖月华, 罗明, 韦宇拓, 等. 棉花纤维起始基因表达的 cDNA-AFLP 分析[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(1): 20 - 24.
- [6] 郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 等. 应用 cDNA-AFLP 技术分离草菇冷诱导表达基因[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 54 - 59.

作者: 孙涌栋, 李贞霞, 张兴国, 陈碧华, 李新峥, [SUN Yong-dong](#), [LI Zhen-xia](#),  
[ZHANG Xing-guo](#), [CHEN Bi-hua](#), [LI Xin-zheng](#)

作者单位: 孙涌栋, 李贞霞, 陈碧华, 李新峥, [SUN Yong-dong](#), [LI Zhen-xia](#), [CHEN Bi-hua](#), [LI Xin-zheng](#) (河南科技学院, 园林学院, 河南, 新乡, 453003), [张兴国](#), [ZHANG Xing-guo](#) (西南大学, 园艺园林学院, 重庆, 400715)

刊名: [华北农学报](#) 

英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA](#)

年, 卷(期): 2007, 22 (4)

被引用次数: 10次

## 参考文献(6条)

1. [Bachem C W B](#); [Van der Hoeven R S](#); [De Bruijn S M](#) [Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development](#) [外文期刊] 1996 (05)
2. [Yang L](#); [Zheng B S](#); [Mao C Z](#) [Analysis of gene expression during enhanced seminal root elongation of rice under upland condition by cDNA-AFLP](#) [期刊论文] - [植物生理与分子生物学学报](#) 2003 (01)
3. [Habu Y](#); [Fukada-Tanaka S](#); [Hisatomi Y](#) [Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence](#) [外文期刊] 1997 (2)
4. 薛春生; 肖淑芹; 王国英 [利用cDNA-AFLP技术分析玉米自交系黄早四甘蔗花叶病毒侵染后基因差异表达](#) [期刊论文] - [植物病理学报](#) 2005 (03)
5. 肖月华; 罗明; 韦宇拓 [棉花纤维起始基因表达的cDNA-AFLP分析](#) [期刊论文] - [农业生物技术学报](#) 2003 (01)
6. 郭丽琼; 林俊芳; 杨丽卿 [应用cDNA-AFLP技术分离草菇冷诱导表达基因](#) [期刊论文] - [园艺学报](#) 2005 (01)

## 本文读者也读过(10条)

1. [李开拓](#), [潘东明](#), [郭志雄](#), [钟凤林](#), [潘腾飞](#), [Li Kaituo](#), [Pan Dongming](#), [Guo Zhixiong](#), [Zhong Fenglin](#), [Pan Tengfei](#) [荔枝果皮cDNA-AFLP分析体系的建立](#) [期刊论文] - [热带作物学报](#) 2010, 31 (10)
2. [王志峰](#), [孙日飞](#), [孙小镭](#), [顾兴芳](#), [曹齐卫](#), [曲士松](#) [山东省黄瓜地方品种资源亲缘关系的AFLP分析](#) [期刊论文] - [园艺学报](#) 2004, 31 (1)
3. [桑燕](#), [汤青林](#), [王志敏](#), [宋明](#), [任雪松](#), [SANG Yan](#), [TANG Qing-lin](#), [WANG Zhi-min](#), [SONG Ming](#), [REN Xue-song](#) [芥菜cDNA-AFLP反应体系的优化](#) [期刊论文] - [西南大学学报 \(自然科学版\)](#) 2008, 30 (4)
4. [张阵阵](#), [汪家春](#), [储智勇](#), [ZHANG Zhen-Zhen](#), [WANG Jia-Chun](#), [CHU Zhi-Yong](#) [冬虫夏草cDNA-AFLP银染法显带研究](#) [期刊论文] - [解放军药学报](#) 2009, 25 (3)
5. [赵锦](#), [李庄](#), [宋蓓](#), [刘孟军](#), [ZHAO Jin](#), [LI Zhuang](#), [SONG Bei](#), [LIU Meng-jun](#) [枣cDNA-AFLP技术体系建立与优化](#) [期刊论文] - [河北农业大学学报](#) 2010, 33 (3)
6. [郭莹](#), [杨晓云](#), [张清霞](#), [司朝光](#), [张淑霞](#), [王媛](#), [Guo Ying](#), [Yang Xiaoyun](#), [Zhang Qingxia](#), [Si Chaoguang](#), [Zhang Shuxia](#), [Wang Yuan](#) [大白菜cDNA-AFLP分析体系的优化](#) [期刊论文] - [分子植物育种](#) 2010, 08 (5)
7. [李亚丽](#), [沈文涛](#), [言普](#), [熊建平](#), [周鹏](#), [Li Yali](#), [Shen Wentao](#), [Yan Pu](#), [xiong Jianping](#), [Zhou Peng](#) [建立番木瓜性别研究的cDNA-AFLP分析体系](#) [期刊论文] - [热带作物学报](#) 2009, 30 (4)
8. [陈瑞蕊](#), [林先贵](#), [施亚琴](#) [药用石斛及其组培技术研究概要](#) [期刊论文] - [江苏农业科学](#) 2002 (5)
9. [吴智明](#), [曾晶](#), [胡开林](#), [乔爱民](#), [Wu Zhiming](#), [Zeng Jing](#), [Hu Kailin](#), [Qiao Aimin](#) [辣椒cDNA-AFLP体系的优化与应用](#) [期刊论文] - [中国农学通报](#) 2010, 26 (12)
10. [黄河](#), [王顺利](#), [曹华雯](#), [戴思兰](#), [Huang He](#), [Wang Shunli](#), [Cao Huawen](#), [Dai Silan](#) [甘菊cDNA-AFLP反应体系的优化](#) [期刊论文] - [生物技术通报](#) 2009 (11)

## 引证文献(11条)

1. 蔡丽艳, 石凤翎, 李志勇, 高翠萍, 高飞翔. 苜蓿cDNA-AFLP反应体系的建立和优化[期刊论文]-种子 2011(8)
2. 赵明晓, 冯志敏, 胡湛, 赵振利, 范国强. 蜡梅AFLP反应体系优化及引物筛选[期刊论文]-河南农业大学学报 2011(5)
3. 赵雪梅. 高粱四杂29号cDNA-AFLP试验体系的建立与优化[期刊论文]-安徽农业科学 2010(22)
4. 单丽丽, 肖敏, 陆瑞菊, 王亦菲, 陆惠丽, 黄剑华, 褚云霞, 刘忠, 张慧. 古腊梅AFLP分子标记体系的建立及应用[期刊论文]-上海农业学报 2008(3)
5. 王文跃, 李国瑞, 黄凤兰, 尚雨丝, 王超, 罗蕊, 邱靖, 王丹, 张智勇, 陈永胜. 蓖麻茎秆 cDNA-AFLP 反应体系的建立[期刊论文]-华北农学报 2013(2)
6. 蔡丽艳, 石凤翎, 李志勇, 高翠萍, 高飞翔. 苜蓿cDNA-AFLP反应体系的建立和优化[期刊论文]-种子 2011(8)
7. 李志红, 唐美玲, 刘佳, 王忆, 李天忠, 韩振海, 许雪峰, 孔瑾. 珠眉海棠cDNA-AFLP分析体系的建立[期刊论文]-核农学报 2008(5)
8. 黄河, 王顺利, 曹华雯, 戴思兰. 甘菊cDNA-AFLP反应体系的优化[期刊论文]-生物技术通报 2009(11)
9. 郭静, 林荣华, 胡薇, 陈由强, 陈如凯. 甘蔗双低频酶cDNA-AFLP体系的优化[期刊论文]-生物技术 2010(4)
10. 郭磊, 王晨, 曹雪, 杨光, 慕茜, 房经贵. 葡萄夏芽成花过程中相关基因的cDNA-RAPD分析[期刊论文]-华北农学报 2011(2)
11. 张圣平, 顾兴芳, 王烨, 苗晗. “十一五”我国黄瓜遗传育种研究进展[期刊论文]-中国蔬菜 2010(22)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_hbnxb200704027.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_hbnxb200704027.aspx)