

甘薯近缘种 *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don 基因组 Fosmid 文库构建及 PCR 筛选体系建立

李 昂¹, 吴志明², 周志林¹, 赵冬兰¹, 张 安¹, 马代夫¹, 李亚栋², 唐 君¹, 曹清河¹

(1. 中国农业科学院 甘薯研究所, 江苏徐州甘薯研究中心, 农业部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131;

2. 河北省农林科学院 经济作物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要:为挖掘有价值的基因资源,对甘薯近缘种 *I. trifida* 的基因组文库进行了研究。通过流式细胞法测定 *I. trifida* (2x, 编号 DLP4597) 基因组大小为 531.699 Mb。以叶片为材料采用包埋法提取基因组 DNA,通过物理剪切进行基因组 DNA 片段化并进行末端平滑化和磷酸化处理,脉冲场电泳回收 33 ~ 48 kb 的 DNA 片段,然后连接到 Fosmid 载体 pCC1FOS(Epicentre)上,包装转化大肠杆菌 EPI300,构建了 *I. trifida* 的基因组 Fosmid 文库,该文库包含 101 952 个单克隆,保存于 1 062 个 96 孔培养板中,平均插入片段 35 kb,覆盖基因组约 6.7 倍,理论上任意片段筛出率达到 99.88%。以 20 个 96 孔板为一组构建三维 PCR 筛选体系,共分为 53 个组(第 53 组包含 22 个 96 孔板),每组包含 1 个超级池,20 个板池,12 个列池,8 个行池,理论上最多通过 93 个 PCR 反应即可筛选到 1 个阳性单克隆。随机选择来自 *I. trifida* 的 10 个基因进行文库克隆筛选,平均阳性克隆数为 8.2 个,最少阳性克隆数为 3 个,最多为 16 个。

关键词:甘薯近缘野生种;基因组;Fosmid 文库;文库筛选体系

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)02-0045-06

The Construction of Genomic Fosmid Library and Library PCR Screening System on *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don

LI Ang¹, WU Zhi-ming², ZHOU Zhi-lin¹, ZHAO Dong-lan¹,
ZHANG An¹, MA Dai-fu¹, LI Ya-dong², TANG Jun¹, CAO Qing-he¹

(1. Institute of Sweetpotato Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu Xuzhou Sweetpotato Research Center, Xuzhou 221131, China; 2. Institute of Commercial Crops Research, Hebei Academy of Agricultural Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don (2n = 2x = 30) and the cultivated sweetpotato are both belonged to group B in Batata section. This species has been used as model research and improve the sweetpotato with the characteristics of the lower ploidy level, chromosome number and elite resistance. In order to enhance the genomics study and explore excellent genes resource of *I. trifida*, it is very valued to construct a genomic library. This work identified *I. trifida* the genomic size as 531.699 Mb by carrying out flow cytometer analysis. The *I. trifida* genomic DNA was isolated by low melting agarose embedding method. Then Shear the DNA by physical method and end-repair the sheared DNA to blunt, 5'-phosphorylated ends. Recycle the fragment between 33 to 48 kb. Ligate the blunt-ended DNA to the Cloning-Ready CopyControl pCC1FOS vector (Epicentre). Package the ligated DNA and transfection EPI300-T1^R cells. The genomic Fosmid library containing 101 952 clones in 106 2 96-well plates was constructed. The average size of the inserted DNA in recombinant plasmids was 35 kb. The library coverage was at least a 6.7-fold genome equivalent and the probability of harboring any gene in the genome of the strain was 99.88%. With 20 plates as a group, we build the PCR screen system. Every group contained 1 super-pool, 20 plate-pools, 12 column-

收稿日期:2013-12-24

基金项目:国家自然科学基金项目(31371681;30800698);国家甘薯产业技术体系(CARS 11-B-02);农业部 948 项目(2011-G1-20);国家“863”项目(2012AA101204-1-8)

作者简介:李 昂(1990-),男,河南开封人,在读硕士,主要从事基因挖掘与功能验证研究。

通讯作者:曹清河(1975-),男,江苏徐州人,副研究员,主要从事甘薯种质创新和遗传改良研究。

唐 君(1960-),女,河南信阳人,研究员,主要从事甘薯种质资源研究。

pools and 8 row-pools. A positive clone would be found by at most 93 PCR reactions. 10 genes were used in this screen system to identify the efficiency of the system. The average positive clone number was 8.2, in which the lowest was 3 and the highest was 16.

Key words: Wild sweetpotato relatives; Genomics; Fosmid library; PCR screening system

Ipomoea trifida (Kunth) G. Don ($2n = 2x = 30$) 属于旋花科甘薯属甘薯组 B 群^[1], 是与甘薯亲缘关系最近的二倍体野生种之一^[2-7], 甚至一些学者认为它是甘薯的祖先种之一^[5,7]。*I. trifida* 具有良好抗逆性^[1,8], 且与栽培甘薯杂交亲和, 可用于甘薯遗传改良^[9-11]。此外, 由于其倍性低、染色体数目少, 已经作为研究自交不亲和^[12-18]、遗传作图^[17]和全基因组测序(个人通讯)的模式物种。随着 *I. trifida* 基因组学、功能基因组学和分子细胞遗传学等研究的开展, 越发迫切需要构建其基因组文库。

近年来, Fosmid 文库以其稳定性好、插入片段大小适中、拷贝数可诱导和构建简单等优点得到广泛应用^[19-24]。本研究构建了 *I. trifida* 基因组 Fosmid 文库, 旨在为更深入开展 *I. trifida* 的功能基因组学、物理作图及其全基因组测序等的研究奠定基础。同时, 为了有效地从文库中筛选出单克隆, 我们建立了该文库的三维快速 PCR 筛选技术体系, 为缩短优良基因克隆以及基因的功能鉴定周期奠定基础。该文库的构建和筛选体系的建立, 为进一步利用 *I. trifida* 的基因资源改良栽培甘薯奠定了良好的物质基础, 具有极其重要的学术价值和应用价值。

1 材料和方法

1.1 试验材料

I. trifida (Kunth) G. Don (编号 DLP 4597, $2n = 2x = 30$) 于 2009 年引自国际马铃薯中心 (CIP)。2012 年春季室内催芽, 温室育苗, 在 3 叶 1 心时种植于江苏徐淮地区徐州农业科学研究所实验基地, 于成株期分 2 次(间隔 20 d)各取 3 株幼嫩叶片液氮速冻后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于基因组 DNA 提取。

1.2 试验方法

1.2.1 *I. trifida* 基因组大小测定 取 *I. trifida* 新鲜幼嫩叶片, 采用流式细胞法(美国 BD 公司 FACS-Calibur)以 CEN(chicken erythrocyte nuclei, DNA QC Particles, BECTON DICKINSON, Cat. No. 349523)为参照, 参考 Doležel^[25]的方法, 取 7 个 *I. trifida* 样品重复, 分别进行 CEN 样品测定和 *I. trifida* 样品测定, 根据测定结果将二者等细胞量混合, 获得二者峰

位置比, 计算其基因组大小。

1.2.2 基因组 Fosmid 文库的构建 包埋法提取叶片基因组 DNA, 注射器吸打切断 DNA 至 40 kb 左右, 根据 Epicenter 公司 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit 的使用说明对 DNA 片段进行末端补平, 然后进行琼脂糖脉冲电场电泳(120° , 2 s, 6 V/cm, 16 h), 切取 38 ~ 48 kb 之间的条带, 溶胶酶法回收 DNA, 连接, 包装, 转导入 EPI300 宿主细胞中, 涂到含 $12.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 LB 平板上, 克隆保存于 96 孔培养板。

1.2.3 Fosmid 文库特征评价 文库插入片段大小检测: 随机挑取 16 个单克隆, 提取质粒, *Not* I 酶切后脉冲电泳检测插入片段大小。

文库覆盖度及筛选效率计算: 根据基因组大小, 插入片段大小及文库单克隆数量计算文库覆盖度; 根据 Clark-Carbon 公式计算片段筛出率理论值。

1.2.4 PCR 筛选体系的建立及质量鉴定 以 20 个 96 孔板为一组, 把 20 板中所有单克隆混合在一起成为该组超级池, 12 列中相对应列混到一起成为 12 个列池, 8 行中对对应行混到一起成为 8 个行池, 20 板中各自的 96 孔混到一起成为 20 个板池。

从 *I. trifida* 转录组测序获得的相关基因序列(个人通讯)中, 随机选取一批基因序列用 Primer premier 6.0 软件设计引物, 所选基因名称及引物序列见表 1。以 *I. trifida* 的基因组 DNA 为模板作阳性对照, 通过 PCR 对三维 PCR 筛选体系进行筛选, 统计每个基因的筛选克隆数目, 验证文库的覆盖率以及筛选体系的筛选效率。

2 结果与分析

2.1 *I. trifida* 基因组大小测定

CEN 测定结果(图 1)和 *I. trifida* 测定结果(图 2)峰位置能区分相差又不是很大, 二者混一起测定(图 3)后统计 CEN 峰位置与 *I. trifida* 细胞峰位置的比值(表 2)。按照 CEN DNA 含量 $2.5\text{ pg}/2\text{C}$ 细胞^[26], $1\text{ pg DNA} = 0.978 \times 10^9\text{ bp}$ ^[27] 计算, *I. trifida* ($2 \times$)2C 细胞 DNA 含量为 1.0873 pg , 合 $1\,063.398\text{ Mb}$, 即其单倍体基因组大小为 531.699 Mb 。

表 1 *I. trifida* 基因及其引物序列信息

Tab.1 Gene sequence and primer information of <i>I. trifida</i>				
基因名称 Gene name	序列编号 Sequence number	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物 TM 值 Primer TM
WRKY	S1	P1-F	5'-ATGGCTGCTTCTTCAGGGAC-3'	67.9
		P1-R	5'-TCAAGCTAGCAATGTCTCCAGG-3'	63.4
CDPK	S2	P2-F	5'-GGAGAGTTGTTTGACCGCATT-3'	58.0
		P2-R	5'-TTTCAGCCCCAAAAAGGAGGTA-3'	56.1
ACO3	S3	P3-F	5'-AGGAAATGCTGGCTGCTAAGGG-3'	61.9
		P3-R	5'-CATCCTGTTGCCGTCTGTCTGA-3'	61.9
APX	S4	P4-F	5'-TGTTGGAGCCATTCAAGGAGCA-3'	60.1
		P4-R	5'-AAGGCATCTTCATCCGCAGCAT-3'	60.1
GPX	S5	P5-F	5'-CGCAGAATCAAGCAACCCCTCAG-3'	61.9
		P5-R	5'-GGAGATGTGGTGGGAGCATAGC-3'	63.8
UGP	S6	P6-F	5'-AGGCAATGCTGGAAAGGATGGA-3'	60.1
		P6-R	5'-ACTGGAAGGAAGCGAGATCGG-3'	61.9
PnFL-2	S7	P7-F	5'-ACGGCTCCTTCGGTGATCTCA-3'	61.9
		P7-R	5'-ACCTGCCTTGGGACTGCTCAT-3'	61.9
bZIP	S8	P8-F	5'-ATGAGGTGGAGAGCCTGTTGG-3'	61.9
		P8-R	5'-CTGAACGTGCAGCGGACTCT-3'	61.9
NPR1	S9	P9-F	5'-GCCAGAAAGCAACGGTTTCC-3'	61.9
		P9-R	5'-ACGCAGATCATCACCAGCCAT-3'	60.0
TPS	S10	P10-F	5'-TCGTGGTGGGAGGCGTATGT-3'	61.9
		P10-R	5'-CCTGCCACTTCGGATGCTGAA-3'	61.9

注:WRKY. Transcription factor; CDPK. Calcium dependent protein kinase; ACO3. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 3; APX. Ascorbate peroxidase; GPX. Glutathione peroxidase; UGP. UDP-glucose pyrophosphorylase; NPR1. Nonexpressor of pathogenesis-related genes1; TPS. Trehalose-phosphate synthase.

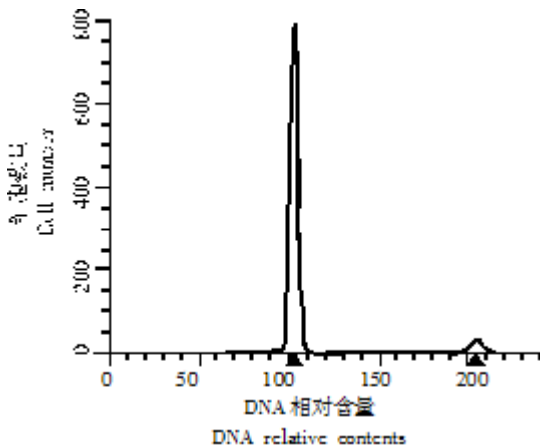


图 1 CEN 流式细胞仪测定结果

Fig.1 Test result of CEN sample using flow cytometry

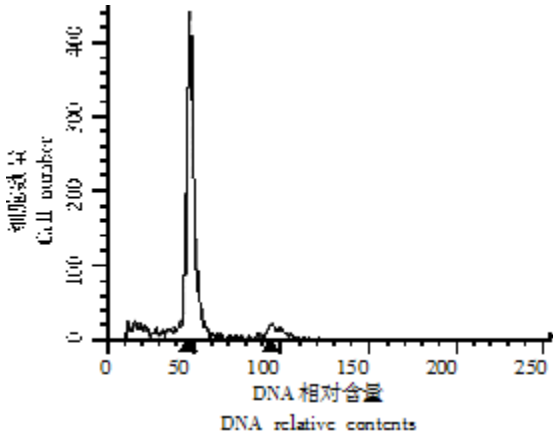
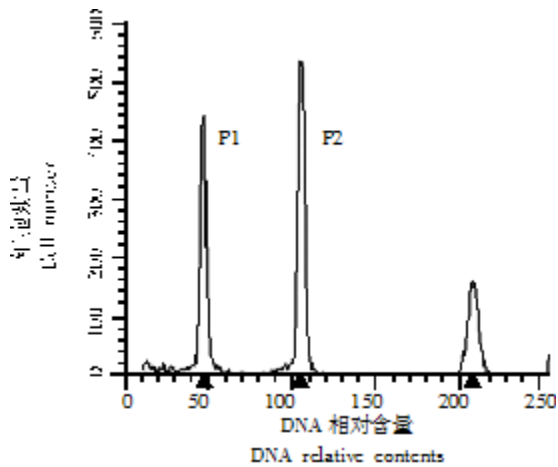


图 2 *I. trifida* 流式细胞仪测定结果

Fig.2 Test result of *I. trifida* sample using flow cytometry



P1. *I. trifida* 2C DNA 含量峰,峰值 46.53;
P2. CEN 2C DNA 含量峰,峰值 105.08。

P1. Peak of 2C DNA of *I. trifida*, peak value is 46.53;
P2. Peak of 2C DNA of CEN, peak value is 105.08.

图 3 CEN 与 *I. trifida* 混合样品流式细胞仪测定结果

Fig.3 Test result of CEN and *I. trifida* mixed samples using flow cytometry

2.2 *I. trifida* 基因组 Fosmid 文库构建

2.2.1 基因组 DNA 的提取 利用琼脂糖包埋法提取叶片基因组 DNA, DNA 完整性好, 机械切割后回收片段大小合适(图 4)。

2.2.2 Fosmid 文库构建 按照 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit 试剂盒说明书进行基因组 DNA 的包装和转染, 挑取转染成功的单菌落于 96 孔培养板中, 共得 101 952 个单克隆, 保存于 1 062 个

96 孔板中。

表 2 所有样品流式细胞仪测定结果

Tab.2 Test results of all samples using flow cytometry

样品编号 Sample number	<i>I. trifida</i> 峰位置 (A) Peak value of <i>I. trifida</i> (A)	CEN 峰位置 (B) Peak value of CEN (B)	A/B
1	42.12	103.39	0.407 389 496
2	44.26	105.10	0.421 122 740
3	45.45	103.53	0.439 003 187
4	46.94	104.79	0.447 943 506
5	46.53	105.07	0.442 847 625
6	46.29	103.70	0.446 383 799
7	45.99	104.57	0.439 801 090
平均值 Average	45.368 6	104.307 1	0.434 927 349

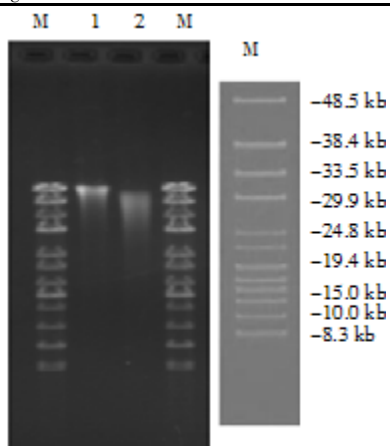


图 4 基因组 DNA 切割后回收产物脉冲场电泳分离图谱
Fig.4 The recycled product of genomic DNA

2.3 Fosmid 文库特征评价

2.3.1 插入片段大小检测 从随机挑取的 16 个单克隆的质粒酶切结果可以看出,文库平均插入片段大小约为 35 kb,克隆插入率达到 100% (图 5)。

2.3.2 文库覆盖度及筛选效率计算 *I. trifida* 基因组大小为 531.699 Mb,插入片段大小 35 kb,文库克隆数 101 952,得文库覆盖度为 $35 \times 101952 / (531.699 \times$

$1\ 000) \approx 6.7$ 。即文库覆盖基因组 6.7 倍。

按照 Clark-Carbon 公式 $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$,其中 N 为文库克隆数, P 为任意片段筛出概率, f 为插入片段长度与基因组总长度之比。所以,该文库任意片段筛出率

$$P = (1 - (1 - 35 / (531.699 \times 1000))^{101\ 952}) \times 100\% = 99.88\%。$$

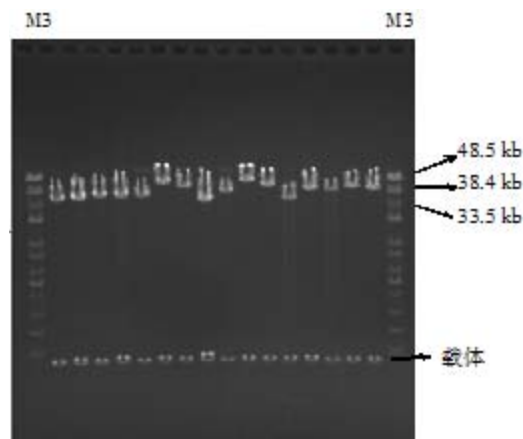


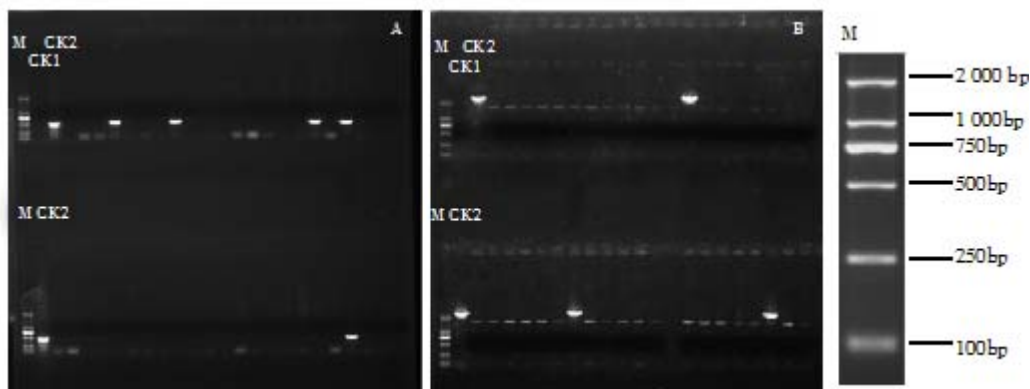
图 5 质粒 Not I 酶切结果

Fig.5 Plasmid digestion results by Not I

2.4 PCR 筛选体系的建立及质量鉴定

将 Fosmid 文库以 20 个 96 孔板为一组,构建三维 PCR 筛选体系,共分为 53 个组(第 53 组包含 22 个 96 孔板),每组包含 1 个超级池,20 个板池,12 个列池,8 个行池,保存于 1 个 96 孔板中。最多通过 93 个 PCR 反应即可筛选到 1 个阳性单克隆。

利用随机选择的 *WRKY*、*CDPK* 等 10 个基因设计特异引物,采用 PCR 筛选法分别进行文库单克隆筛选,结果表明,10 个基因筛选处的最少阳性克隆数为 3 个,最多为 16 个,平均阳性克隆数为 8.2 个(图 6、表 3)。



M. DL2000 DNA Marker; CK1. 阴性对照; CK2. 阳性对照。

A. 序列 S9 在前 45 个超级池筛选得到 5 个阳性单克隆; B. 序列 S1 在 20 个板池(第一行)、12 个列池(第二行前半部分)、8 个行池(第二行后半部分)筛选结果,可将单克隆定位到第 13 板第 7 列第 6 行。

M. DL2000 DNA Marker; CK1. Negative control; CK2. Positive control.

A. Super pool; B. Row, column and plate pool.

图 6 文库 PCR 筛选结果

Fig.6 Result of library PCR screen

表 3 序列阳性克隆数量
Tab. 3 Positive clone count of sequences

序列编号 Sequences number	阳性克隆数 Count of positive clone
S1	4
S2	9
S3	13
S4	16
S5	15
S6	4
S7	3
S8	6
S9	6
S10	6
平均阳性克隆数 Average count	8.2

3 讨论

普通栽培甘薯为六倍体,其基因组倍性高,遗传背景复杂等不便于进行基因组学研究,*I. trifida* 作为栽培甘薯的亲缘关系最近的野生种之一,以其倍性低、基因组小且研究相对便利,并具有抗逆等优异基因。因此,构建该文库为开展其基因组学研究和抗逆优异基因挖掘打下了良好的基础。在文库构建中,高质量基因组 DNA 的获得是文库构建的关键,本研究采用琼脂糖包埋法提取基因组 DNA 以保证基因组 DNA 的质量和完整性,孙晓华等^[28] 在构建半滑舌鳎基因组 Fosmid 文库时认为包埋法所得的基因组 DNA 片段过大,需用物理法注射器吸打,进一步机械切割成合适的大小才能用来建库,不如采用酚/仿法提取,片段可直接用于建库。然而 *I. trifida* 叶片次生代谢产物甚多,普通酚/仿法难以获得高质量基因组 DNA,我们采用物理切割和包埋法获得了高质量基因组 DNA,通过脉冲电泳选择 33 ~ 48 kb 的 DNA 纯化后用于包装,我们通过噬菌体对 DNA 插入片的选择性包装后获得基因组插入片段大小在 35 kb 左右,克隆插入率 100%,说明本研究已经获得了高质量的 *I. trifida* 文库,为今后文库的筛选和利用奠定了基础。

Fosmid 文库构建一般需要每次连接反应达到一定的滴度,每次连接反应产生 $10^3 \sim 10^6$ 个克隆,该文库产生了超过 10^5 个单克隆菌落,覆盖 *I. trifida* 基因组大小的 6.7 倍,理论上筛选基因组任意片段的概率达到 99.88%,能满足于随后筛选文库单克隆需求。另外,在筛选克隆时考虑到克隆的拷贝数,我们使用了 Epicentre 公司开发的 pCC1FOS 载体,该载体有 2 个复制起始位点,在单拷贝的大肠杆菌 F 因子复制子的基础上,加上诱导型高拷贝复制子

oriV。OriV 的启动需要 *trfA* 基因产物,*trfA* 基因存在于宿主菌 EPI300 基因组中,但其表达受诱导启动子严谨控制。加入诱导溶液后,*trfA* 基因被诱导表达,启动 oriV,质粒拷贝数可高达 50 ~ 200,便于 Fosmid 重组质粒的提取、酶切、测序以及随后的 PCR 三维技术体系筛选等下游操作。

本研究建立了 *I. trifida* 基因组 Fosmid 文库的三维 PCR 快速筛选体系,筛选体系构建中,超级池容量大小也是筛选的关键,容量太小增加构建的工作量和 PCR 筛选时的工作量,容量太大超级池代表性降低,假阴性可能性增多。考虑 Fosmid 质粒的诱导多拷贝的特性,本研究所构建的 PCR 筛选体系以 20 个板为一组构建超级池,通过构建三维行池和列池,理论上最多通过 93 个 PCR 反应即可筛选到 1 个阳性单克隆。通过随机筛选来自 *I. trifida* 的 10 个基因,证明了我们构建的筛选体系的快速和有效性,平均阳性数量略大于文库覆盖基因组倍数。下一步工作就是通过文库筛选有价值的基因资源,获得更多测序序列,利用生物信息学手段分析数据,同时为 *I. trifida* 全基因组测序提供验证和补充。

参考文献:

[1] 曹清河,张 安,李 鹏,等. 甘薯近缘野生种的抗病性鉴定与新型种间杂种的获得[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(02):224 - 229.

[2] Jarret R L, Austin D F. Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1994, 41 (3):165 - 173.

[3] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(7):1050 - 1060.

[4] Huang J, Corke H, Sun M. Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2002, 49(6):541 - 550.

[5] Rajapakse S, Nilmalgoda S D, Molnar M, et al. Phylogenetic relationships of the sweetpotato in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) based on nuclear β -amylase gene sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 30(3):623 - 632.

[6] Srisuwan S, Sihachakr D, Siljak-Yakovlev S. The origin

- and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches [J]. *Plant Sci*, 2006, 171 (3): 424–433.
- [7] Roullier C, Duputie A, Wennekes P, *et al.* Disentangling the origins of cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e62707.
- [8] Komiya A, Sano Z-i, Murata T, *et al.* Resistance to two races of meloidogyne incognita and resistance mechanism in diploid *Ipomoea trifida* [J]. *Breeding Science*, 2006, 56 (1): 81–83.
- [9] Iwanaga M, Freyre R, Orjeda G. Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don germ plasm for sweet potato improvement. 1. Development of synthetic hexaploids of *I. trifida* by ploidy-level manipulations [J]. *Genome*, 1991, 34 (2): 201–208.
- [10] Freyre R, Iwanaga M, Orjeda G. Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don germ plasm for sweet-potato improvement. 2. Fertility of synthetic hexaploids and triploids with 2n gametes of *I. trifida*, and their interspecific crossability with sweet potato [J]. *Genome*, 1991, 34 (2): 209–214.
- [11] Orjeda G, Freyre R, Iwanaga M. Use of *Ipomoea trifida* germ plasm for sweet potato improvement. 3. Development of 4x interspecific hybrids between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (2n=6x=90) and *I. trifida* (H. B. K) G. Don. (2n=2x=30) as storage-root initiators for wild species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, 83 (2): 159–163.
- [12] Kakeda K, Kowiyama Y. Sequences of *Ipomoea trifida* cDNAs related to the *Brassica* S-locus genes [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1996, 9 (5): 309–310.
- [13] Kowiyama Y, Kakeda K, Kondo K, *et al.* A putative receptor protein kinase gene in *Ipomoea trifida* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37 (5): 681–685.
- [14] Kakeda K, Tsukada H, Kowiyama Y. A self-compatible mutant S allele conferring a dominant negative effect on the functional S allele in *Ipomoea trifida* [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2000, 13 (3): 119–125.
- [15] Kowiyama Y, Tsuchiya T, Kakeda K. Sporophytic self-incompatibility in *Ipomoea trifida*, a close relative of sweet potato [J]. *Annals of Botany*, 2000, 85 (suppl 1): 191–196.
- [16] Suzuki G, Tanaka S, Yamamoto M, *et al.* Visualization of the S-locus region in *Ipomoea trifida*: toward positional cloning of self-incompatibility genes [J]. *Chromosome Res*, 2004, 12 (5): 475–481.
- [17] Tomita R, Fukami K, Takayama S, *et al.* Genetic mapping of AFLP/AMF-derived DNA markers in the vicinity of the self-incompatibility locus in *Ipomoea trifida* [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2004, 16 (6): 265–272.
- [18] Rahman M H, Tsuchiya T, Suwabe K, *et al.* Physical size of the S locus region defined by genetic recombination and genome sequencing in *Ipomoea trifida*, Convolvulaceae [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2007, 20 (2): 63–72.
- [19] Chen L, Ye J, Liu Y, *et al.* Construction, characterization, and chromosomal mapping of a fosmid library of the white-cheeked gibbon (*Nomascus leucogenys*) [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2007, 5 (3–4): 207–215.
- [20] Park T H, Park B S, Kim J A, *et al.* Construction of random sheared fosmid library from Chinese cabbage and its use for *Brassica rapa* genome sequencing project [J]. *J Genet Genomics*, 2011, 38 (1): 47–53.
- [21] 李冰, 闫守庆, 孙金海. 家猪 Fosmid 基因组文库的构建 [J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34 (10): 53–55.
- [22] 李会琴, 林伟铁, 蔡小龙, 等. 对虾养殖水环境宏基因组 Fosmid 文库的构建 [J]. *生物技术通报*, 2011, (6): 112–115, 126.
- [23] 李朋波, 薛龙飞, 王彦霞, 等. 雷蒙德氏棉叶绿体基因组 Fosmid 文库构建 [J]. *棉花学报*, 2011, 23 (01): 10–14.
- [24] 张玉, 茆振川, 陈国华, 等. 南方根结线虫伴生细菌宏基因组 Fosmid 文库构建及其特征分析 [J]. *植物保护学报*, 2009, 36 (6): 545–549.
- [25] Doležal J, Bartoš J A N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. *Annals of Botany*, 2005, 95 (1): 99–110.
- [26] 刘进, 张晓军, 苏琳, 等. 仿刺参基因组大小的测定 [J]. *水产学报*, 2012, 36 (5): 686–695.
- [27] 邓果特, 刘清波, 蒋建雄, 等. 五节芒基因组大小测定 [J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (2): 339–341, 346.
- [28] 孙晓华, 张全启, 王旭波, 等. 半滑舌鳎雌鱼基因组 Fosmid 文库构建及分析 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2010, 40 (08): 88–92.