

环境胁迫诱导的花生全长 cDNA 文库的构建及序列分析

姜宝杰 陈 华 张 冲 邓 焯 蔡铁城 石新国 庄伟建

(福建省作物分子与细胞生物学重点实验室,福建 福州 350002)

摘要:以花生新品种闽花6号为材料,用生物和非生物因素胁迫处理植株,采用 SMART 技术构建了花生受低温、干旱、各种激素、缺钙及黄曲霉等胁迫诱导的混合全长 cDNA 文库,原始文库滴度为 8.86×10^6 cfu,重组率达 97.6%,插入片段多在 1~2kb 之间,平均大小为 1300bp。该 cDNA 文库的构建可用于花生抗逆基因的发掘,为揭示花生抗逆分子机理及花生品种改良奠定基础。

关键词:花生;胁迫;SMART 技术;全长 cDNA 文库;抗逆基因

植物在长期进化过程中,逐渐形成了自身的防御机制以抵抗各种不利条件的胁迫。植物胁迫应答(Plant stress responses)涉及多层次、多途径、多基因产物^[1]。植物识别各式各样胁迫信号,进行加工和处理,激活相应的信号转导途径,最终诱导大量植物防卫反应相关基因的转录表达,从而使植物抗逆性得到表现^[2]。目前植物抗逆性研究工作主要集中在抗性基因的克隆方面^[3]。cDNA 文库的构建和筛选是基因克隆的重要方法之一,是目前发掘新基因和研究基因功能的基本工具^[4-5]。卜庆云等^[6]利用 PCR 等方法在二倍体马铃薯 IVP101cDNA 文库中获得马铃薯蛋白酶抑制剂 II 的 cDNA,牛洪斌等^[7]在水稻胚乳 cDNA 文库中获得 1 个新的水稻谷蛋白基因全长 cDNA,张军科等^[8]筛选 cDNA 文库获得 5 条东华葡萄受白菌粉接种诱导产生的基因。

花生是我国重要的油料和经济作物,也是世界四大油料作物之一,主要种植在热带和亚热带地区。

花生生长发育易受到各种环境因素诸如低温、干旱、湿涝和病虫等的影响,从而造成花生减产及品质下降。构建花生各种胁迫混合全长 cDNA 文库对筛选、分离和克隆花生耐受、抗病基因具有重要作用。

本试验运用 SMART 技术成功构建了高质量的花生各种胁迫混合全长 cDNA 文库,包括脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)、乙烯利、多效唑等激素胁迫,黄曲霉侵

染、缺钙处理以及低温、干旱等胁迫,并对文库质量进行初步鉴定。本文库的构建为大规模表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)测序,开展基因表达谱分析,克隆和鉴定一批花生功能基因,以及开展重要基因尤其是花生抗逆相关基因的功能研究奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及处理

以下各种处理及对照花生均以本实验室选育的优良花生品种闽花6号为材料。其中缺钙材料为大田种植材料,其他均为盆栽材料。

于花生5叶期喷湿不同激素(ABA、SA、乙烯利、多效唑),处理0、3、6、12、24h后取第1、2叶,经液氮速冻后保存于-70℃冰箱。ABA浓度为 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,SA浓度为 $3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,乙烯利浓度为 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,多效唑浓度为 $150\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对照喷湿蒸馏水。以上花生材料为同时种植,每处理组合设3个重复。

花生初花期进行干旱处理(停止浇水),处理0、3、6、9、12d后取花生第1、2叶及根,经液氮速冻后保存于-70℃冰箱。对照植株每天喷洒约100mL水保持湿润,与处理组同步取样。每处理组合设3个重复。

花生初花期开始进行低温(4℃)处理,处理0、3、6、12、24、48h后取第1、2叶及根,经液氮速冻后保存

收稿日期:2012-03-21 接受日期:2013-01-21

基金项目:科技部国际合作项目(2008DFA311150),福建省科技厅项目(2008I0002)

作者简介:姜宝杰(1984-),男,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为分子生物学。E-mail:baojiejiang@sohu.com

通讯作者:庄伟建(1958-),男,福建惠安人,博士,教授,主要从事花生分子生物学及遗传育种研究。E-mail:weijianz1@163.com

于 -70°C 冰箱, 对照组置于 28°C , 与处理组同步取样。每处理组合设 3 个重复。

取沙土盆栽下针后 40d 花生, 轻轻剥离花生果仁周围沙土, 浇灌含黄曲霉孢子的浸液接种黄曲霉(同时停止浇水), 设置干旱、湿润 2 种平行对照, 取处理后 0、3、6、12d 4 个时期花生果皮、种仁为材料, 经液氮速冻后保存于 -70°C 冰箱。该处理设 2 种对照, 对照一每天每株浇水保持湿润, 对照二停止浇水但不接种黄曲霉。每处理组合设 3 个重复。

缺钙材料为福建省平潭县花生试验基地缺钙土壤花生, 花生种后 40d 开始结荚, 于结荚后 6、9、15d 取种仁做材料, 对照给以施钙 ($40\text{kg}\cdot 667\text{m}^{-2}$) 处理。材料经液氮速冻后保存于 -70°C 冰箱。

1.2 RNA 提取

称取相同质量的各种处理及对照材料混合放入液氮预冷的大研钵中, 充分研磨。采用 CTAB 法提取不同材料混合总 RNA, 经紫外分光光度计检测浓度及纯度, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3 cDNA 第一链和第二链合成

以 $3\mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, 以 SMART IV Oligonucleotide 与 3' PCR Primer 作为引物, 按照 SMART 文库构建试剂盒操作合成 cDNA 第一链。向 PCR 管中加入 $2\mu\text{L}$ 单链模板、 $2.5\mu\text{L}$ $10\times$ Ex Buffer、 $0.5\mu\text{L}$ $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、 $1.0\mu\text{L}$ 5' PCR 引物、 $0.25\mu\text{L}$ Ex Taq, 双蒸水补足至 $25\mu\text{L}$, 以 LD-PCR 法合成 cDNA 第二条链。取 $2\mu\text{L}$ 双链产物电泳检测。

cDNA 第一链及第二链合成所用引物序列见表 1。

表 1 cDNA 第一链及第二链合成所用引物序列

Table 1 Primers used in the synthesis of the first and second stand

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
3'PCR primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGACTGGCCGAGGCGCCGA-d (T) 30N-1N
SMART IV Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGACTGGCCATTACGGCCGGG
5'PCR primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT

1.4 cDNA 文库构建

取 $50\mu\text{L}$ 双链 cDNA 的 PCR 产物, 加入 $2\mu\text{L}$ 蛋白酶 K ($20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 45°C 温育 20min 灭活 DNA 聚合酶, 经抽提、沉淀后溶于 $79\mu\text{L}$ 去离子水。加入 $15\mu\text{L}$ *sfi* I 酶于 50°C 酶切 2h, 再以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳酶切双链, 回收 750bp 以上片段。回收产物经乙醇、醋酸钠、糖原 -20°C 共沉淀后, 以 $7\mu\text{L}$ 去离子水溶解, 保存于 -70°C 备用。

酶切产物在 T_4 DNA 连接酶作用下, 与质粒载体 pDNR-LIB(经 *sfi* I 酶处理过) 于 16°C 下连接, 连接体系为 $5\mu\text{L}$ 。连接产物经电击转化入 $45\mu\text{L}$ 感受态细胞(大肠杆菌 DH5a) 后迅速加入 $950\mu\text{L}$ LB 培养基, 于 37°C 震荡培养 1h, 即得原始文库。

1.5 文库的鉴定及扩增

吸取 $1\mu\text{L}$ 原始文库菌液均匀地涂在含 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯霉素的 LB 培养板上, 培养过夜。统计培养板上的单克隆数, 计算原始文库量, 原始文库量 = 生长单克隆数 $\times 10^3$ 。随机挑取 43 个单克隆做菌液 PCR, 鉴定文库重组率。扩增条件为 94°C 3min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 2min, 32 个循环; 72°C 10min。随机挑取 11 个单菌落摇菌提取质粒, *Sfi* I 酶切后在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳检测文库 cDNA 插入片段大小。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。

按 50 万单克隆/板将剩余原始文库菌液涂于含 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯霉素的 LB 培养板上, 37°C 过夜培养, 每板用 $10\mu\text{L}$ 液体 LB 培养基洗脱后混匀即为扩增文库, 扩增文库用终浓度为 25% 的甘油分装保存于 -80°C 。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取结果

CTAB 法提取的各种处理及对照混合总 RNA, 紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值为 2.03, 表明获得的 RNA 纯度较高, 没有基因组 DNA、蛋白质及小分子污染。经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳显示(图 1), 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 亮度比接近 2:1, 说明 RNA 没有降解, 比较完整。

2.2 高质量 ds cDNA 的合成

参照 clontech 公司 SMART 文库构建试剂盒所示的逆转录体系合成第一条链, 采用 LD-PCR 技术合成 ds cDNA, 双链产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 呈现从小到大均匀分布的 Smear 条带, ds cDNA 片段大

小分布在 0.2~3.0kb 之间(图 2), 主要集中于 1000bp 以上, 基本代表了 mRNA 的特征。

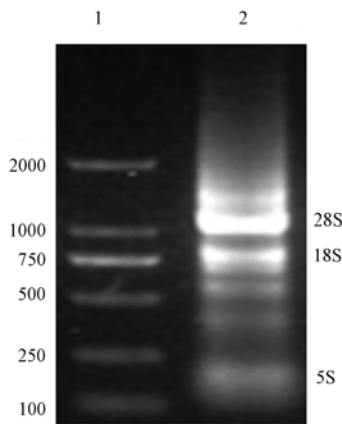


图 1 花生受环境胁迫诱导的混合总 RNA 电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA isolated from peanut tissues with different stresses

1: DL2000 Marker; 2: 总 RNA
1: DL2000 Marker; 2: total RNA

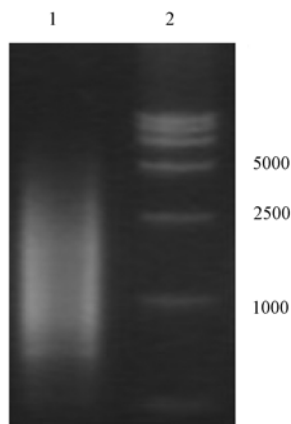


图 2 花生受环境胁迫诱导的混合 ds cDNA 电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of ds cDNA of peanut tissues with different stresses

1: dscDNA, 2: 15000 Marker
1: dscDNA, 2: 15000 Marker

2.3 文库质量检测结果

双链 cDNA 转化感受态大肠杆菌后涂板, 培养过

夜, 统计培养板上的克隆数, 经计算, 原始文库得到 8.86×10^6 个重组子。随机挑取 43 个单菌落扩增培养, 并进行菌液 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示 42 个克隆有插入片段, 重组率达 97.6% (图 3)。随机挑取 11 个单菌落扩增培养, 提取质粒后, 用 Sfi I 酶切后电泳(图 4)显示, 有 7 个插入片段高于 1000 bp, 比例为 63.6%, 平均长度约 1300 bp。重组率及插入片段大小说明该文库达到文库质量要求, 基本包含花生全长功能基因。

2.4 文库随机测序和生物信息学分析

2.4.1 序列 blast 结果及分析 从文库中随机挑选 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 进行拼接, 共有 23 个基因测序成功, 且均具有开放阅读框结构。去掉引物及载体序列后将测序结果进行 Blast 分析。

Blastn 分析结果显示, 23 个测通基因中有 11 个基因获得全长, 全长率为 47.8%。其中有 3 个基因与花生基因具有较高同源性, 15 个与大豆基因具有较高同源性, 各有 1 个与蒺藜苜蓿基因、水梨基因、蓖麻基因、毛果杨基因、珊瑚藻基因具有较高同源性。仅有 5 个基因功能已知: 2 个与核糖体 1, 5-二磷酸羧化酶基因具有较高同源性, 1 个为花生成熟酶亚单位相似基因, 1 个为微卫星序列基因, 1 个为 23S 核糖体 RNA 基因。结果表明花生大部分基因的功能尚未揭示, 有待进一步研究。

Blastx 分析结果显示, 所有克隆编码序列都与已知的植物氨基酸序列相似, 其中 3 个与花生、11 个与大豆氨基酸序列相似。但其中大部分只是与功能未知蛋白或假定蛋白序列同源性很高, 已知功能的氨基酸序列包括二磷酸核酮糖羧化酶、乙二醛酶 II、核糖体蛋白、氧化还原酶、ATP 合成酶、预测的抗病相关氨基酸序列等。有 4 个克隆与其他植物已知功能氨基酸序列具有较高相似性(大于 80%), 结果见表 2。

2.4.2 序列 BLAST2GO 功能注释结果 将测序结果通过 BLAST2GO 进行注释和统计分析。结果显示, 本文库含有信息量较丰富, 基本包含了花生各种信息, 如参与各种生物过程、各种分子功能的基因等。

23 个序列涉及的分子功能中钙离子结合、ATP 结合、铁离子结合、核酮糖二磷酸化、单氧化酶活性等功能基因较多, 此外还含有镁离子结合、锌离子结合、催化活性、水解酶活性、电子载体活性、蛋白激酶活性、结构组成等 28 种功能的基因(图 5)。

参与氧化还原、糖代谢、光呼吸等生物过程基因较丰富, 此外还含有参与生物运输、蛋白代谢、生物合成、

蛋白修饰、电子转移、生物过程调控、细胞组织和生物发生、蛋白合成、转录、胁迫反应、DNA 代谢、器官组织与发生等生物过程的基因(图 6)。

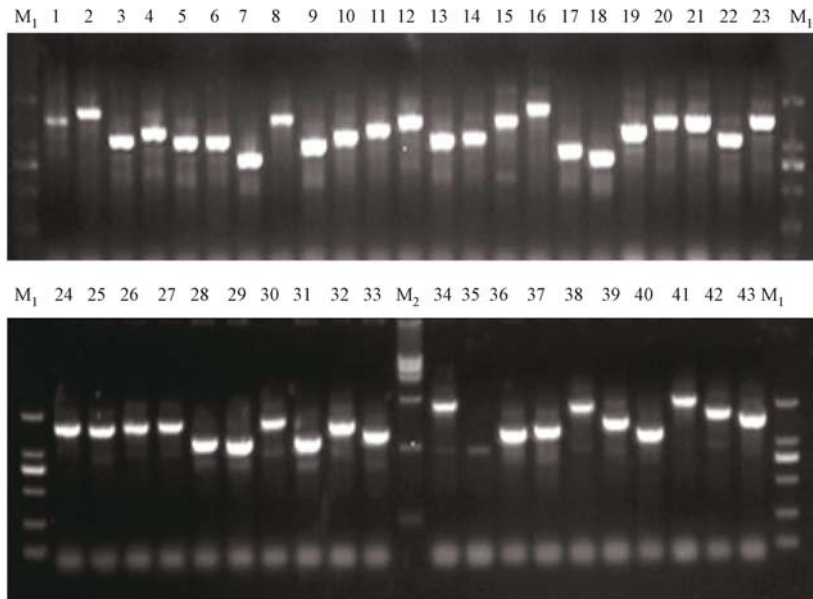


图 3 花生受环境胁迫诱导的混合全长 cDNA 文库菌液 PCR 电泳图
Fig.3 Gel electrophoresis of colonies by PCR method from full-length cDNA Library of peanut treated with different stresses

M₁:DNA marker 2 000;M₂:DNA marker 1 5000;1~43:cDNA 插入片段
M₁: DNA marker 2 000, M₂: DNA marker 1 5000, 1-43: inserted cDNA fragment

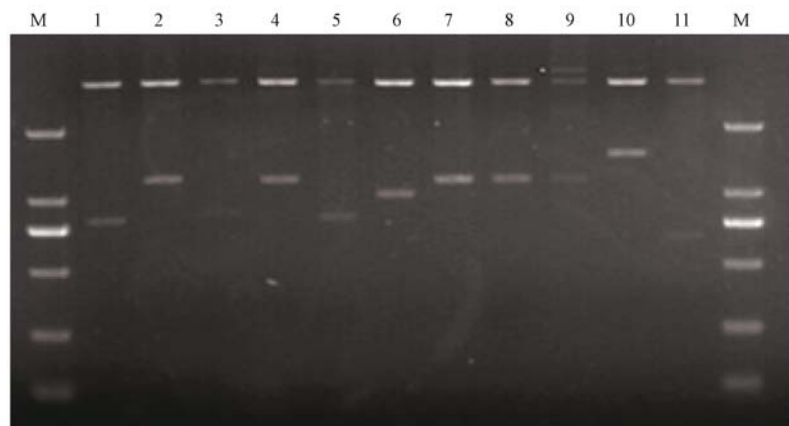


图 4 花生受环境胁迫诱导的混合全长 cDNA 文库单菌落质粒电泳图
Fig.4 Gel electrophoresis of digested plasmids from full-length cDNA Library of peanut treated with different stresses

M:DNA marker 2 000;1~11:单克隆质粒
M: DNA marker 2 000, 1-11: product of each digested plasmid

表 2 花生受环境胁迫诱导的混合全长 cDNA 文库中与其他植物已知功能蛋白氨基酸序列具有较高相似性(大于 80%)的克隆

Table 2 Clones with high similarity (more than 80%) to known protein sequences of other plants in full-length library of peanut with different stresses

克隆号 Clone No.	注册号 Accession No.	基因名称 Name	相似度 Identity	最佳匹配 Best match	E 值 E-value
PT4	gb AAL29690.1	pirofilin	57/66 (86%)	Solanum lycopersicum	3e-54
PT18	gb ADD60242.1	alpha-form rubisco activase	212/240 (88%)	Glycine max	0.0
PT21	sp Q42823.1	RBS_GLYTA RecName	94/114 (82%)	Glycine tabacina	2e-53
PT22	dbj BAG06678.1	protein kinase	84/97 (86%)	Phaseolus vulgaris	3e-38

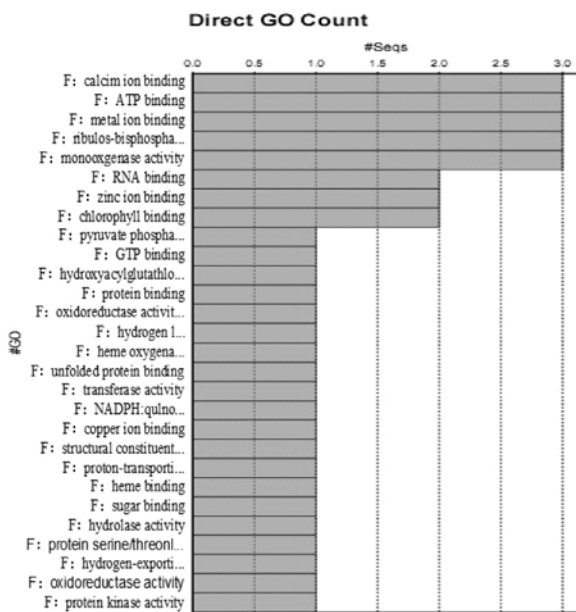


图 5 序列 GO 注释—分子功能注释结果

Fig. 5 GO annotation—molecular function

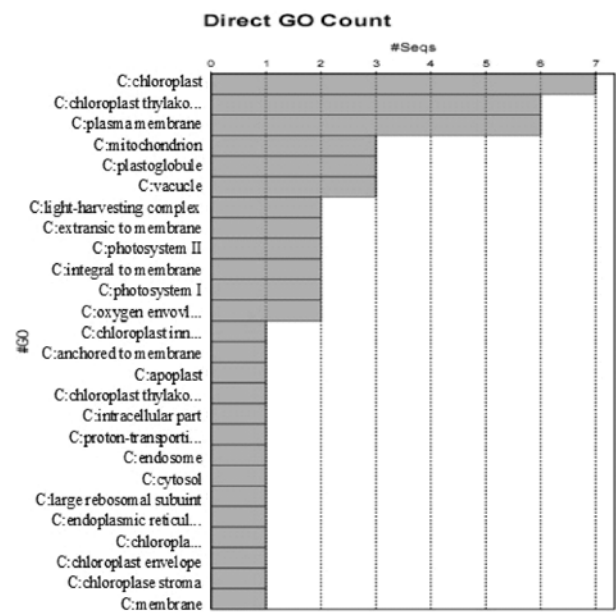


图 6 序列 GO 注释—生物过程注释结果

Fig. 6 GO annotation—biological process

3 讨论

3.1 逆境胁迫对植物的影响

干旱、低温等恶劣环境会降低细胞含水量、破坏细胞膜、抑制光合作用、使植物物质代谢紊乱,植物生长发育迟缓甚至死亡^[9]。逆境条件下,植物作出多种抗逆性反应^[10],产生新蛋白质从而引起大量生理和代谢上的变化^[11]。研究发现晚期胚胎发生富集蛋白(LEA蛋白)^[12-13]、水分通道蛋白(Aquaporin)^[14]、Rubisco 活化酶^[15]等蛋白基因表达量的增加可显著提高植物的抗脱水能力。目前已发现多种基因参与植物抗低温反应^[16],编码转录因子 CBF、DREB1^[17]的基因超量表达

可提高植物抗低温能力,许多下游蛋白,如水孔蛋白(AQPs)^[18],在植物抗低温功能中同样发挥重要作用。

钙是植物生长发育不可缺少的营养元素之一,缺钙引起花生胚败育直接影响花生生产量和品质形成。汪仁等^[19]证实在可溶性钙为 $90\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的土壤中施加钙 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 土和 $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 土时,花生分别增产 45% 和 52%。

ABA、水杨酸、乙烯利、多效唑等植物激素是植物胁迫相关信号传导途径中的重要组成部分^[20]。ABA 参与调控植物对逆境胁迫,如干旱、高盐、低温等产生的应答^[21],苍晶等^[22]研究表明,随着温度的降低,小麦叶片和根部的 ABA 含量逐渐增加。乙烯利是广泛应用的植物生长调节剂,对作物有促进果实成熟、改变

雌、雄花比例、促进种子发芽、提高产量等作用^[23]。水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内普遍存在的一种简单的小分子酚类化合物,SA在植物体内的生理作用广泛,调控植物生长、发育、成熟、衰老等生理过程,诱导抗盐、抗旱、抗低温、抗紫外线、抗重金属等抗逆反应过程,水杨酸还可诱导植物产生系统获得性抗性(SAR)^[24]。多效唑是一种高效低毒的植物生长延缓剂,能延缓植物地上部伸长、促进根生长、提高抗逆性^[25];可促进花生的下针结荚,提高产量。

花生在收获前后、贮运和加工过程中都易感染黄曲霉,受黄曲霉毒素污染的花生对人畜具有强致癌作用。初步研究发现,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶对黄曲霉侵染具有明显的抵御作用和协同抑制作用^[26]。梁炫强等^[27]研究发现花生抗病品种受侵染后能迅速产生足量的酚类化合物、木质素、类黄酮和植保素等抗菌物质,抵御黄曲霉菌的侵入和产生过敏性反应杀死黄曲霉菌,感病品种则反之。

目前关于花生的各种文库构建已多有报道,但多为单个器官或者单一逆境胁迫的文库,含不同逆境胁迫处理的花生文库尚未见报道。本试验通过对闽花6号花生施以不同的逆境胁迫处理并构建全长cDNA文库,为花生逆境胁迫相关基因研究奠定了基础。

3.2 本文库构建的意义

本研究在花生受到多种生物及非生物胁迫,包括干旱、低温、缺钙、激素(ABA、SA、乙烯利、多效)处理以及黄曲霉侵染等条件下,构建了库容达 8.86×10^6 cfu的高质量花生全长cDNA文库。经随机挑选测序和生物信息学分析表明,文库包含有氧化还原、糖代谢、光呼吸等功能基因,参与生物运输、物质代谢和生物发生、蛋白合成、转录、胁迫反应、DNA代谢、器官组织与发生等生物过程的基因,但大多数为未知基因。这为克隆抗旱、寒相关基因和受早寒胁迫的功能基因以及分离克隆受钙、各种激素以及黄曲霉诱导的功能基因提供了有用的材料,也为揭示调控花生产量、品质形成的分子机制以及遗传改良花生品种奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘武,戴良英. 植物抗逆相关 ERF 转录因子研究综述[J]. 中国农学通报, 2007, 23(4): 78-81
- [2] Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Shinnozaki S K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinnozaki K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray[J]. Plant Cell, 2001, 13: 61-72
- [3] Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Shinozaki K Y, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. The Plant Journal, 2002, 31: 279-292
- [4] 朱利军,长孙东亭,罗素兰. 全长 cDNA 文库构建方法及应用研究[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2009, 27(2): 185-190
- [5] 董志敏,李英慧,张宝石,关荣霞,常汝镇,邱丽娟. 大豆叶片全长 cDNA 文库的构建与鉴定[J]. 作物杂志, 2006, (5): 1-4
- [6] 卜庆云,武亮,杨世湖,万建民. 二倍体马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的克隆、序列分析及表达载体的构建[J]. 遗传, 2005, 27(3): 417-422
- [7] 牛洪斌,覃怀德,王益华,翟虎渠,万建民. 水稻谷蛋白的一个新基因克隆及表达分析[J]. 作物学报, 2007, 33(3): 349-355
- [8] 张军科,杜敬,李爽,朱白果,王跃进. 白粉菌诱导的华东葡萄环化 cDNA 文库中抗病基因筛选[J]. 中国农业科学, 2010, 43(14): 2944-2952
- [9] Guo Z W, Li X L, Gao D S, Duan C G. Advance in the mechanism of biochemistry and molecular biology in response to cold stress of plant[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12: 54-57
- [10] Chaves M M, Oliveira M M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55: 2365-2384
- [11] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 247-273
- [12] Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 71-82
- [13] Goyal K, Walton J, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress [J]. Biochemical Journal, 2005, 388: 151-157
- [14] Sarda X, Tusch D, Fenare K, Legrand, E, Dupuis, J M, Casse-Delbart F, Lamaze T. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells[J]. The Plant Journal, 1997, 12: 1103-1111
- [15] Ali G M, Komastu S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress[J]. Proteome Research, 2006, 5: 396-403
- [16] Thomashow M F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! [J]. Plant Physiology, 2001, 125: 89-93
- [17] Pino M T, Skinner J S, Jeknic Z, Hayes P M, Soeldner A H, Thomashow M F, Chen T H H. Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato[J]. Plant Cell and Environment, 2008, 31(4): 393-406
- [18] Tanghe A, Patrick V D, Dumortier F, et al. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in Baker's yeast, and over expression improves freeze tolerance in industrial strains [J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5981-5989
- [19] 汪仁,安景文,张士义,邢月华,季相金. 施钙对花生产量、品质及钙素在植株体内分布的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 130(4): 437-439
- [20] Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E. Integration of abscisic acid signalling into plant responses[J]. Plant

- Biology (Stuttg.), 2006, 3:314 - 325
- [21] 刘慧丽, 李玲. 脱落酸(ABA)诱导基因表达的调控元件[J]. 植物学通报, 2001, 18(3):276 - 282
- [22] 苍晶, 于晶, 崔红, 王军虹, 张达, 刘丽杰, 李卓夫. 寒地冬小麦对低温逆境的生理适应[J]. 核农学报, 2011, 25(5):1017 - 1022
- [23] 葛建军, 张国良, 朱林, 殷玉宏, 朱凤飞, 姜晓明. 乙烯利对花生生长发育及产量的影响[J]. 农技服务, 2007, 24(3):48 - 52
- [24] 孟雪娇, 邸昆, 丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15):207 - 214
- [25] 房增国, 赵秀芬, 高祖明. 多效唑提高植物抗逆性的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2005, (4):9 - 12
- [26] Wu S, Kriz A L, Widboholm J M. Nucleotide sequence of a maize cDNA for a Class II, acidic β - 1, 3 - Glucanase [J]. Plant Physiology, 1994, 106: 1709 - 1710
- [27] 梁炫强, 周桂元, 潘瑞焱. 花生种子受黄曲霉菌侵染后若干生化成份的变化及其与抗性的关系[J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(2):26 - 30

Construction of Full-length cDNA Library of Peanut Tissues Treated with Different Stresses with SMART Method

JIANG Bao-jie CHEN Hua ZHANG Chong DENG Ye CAI Tie-cheng SHI Xin-guo
ZHUANG Wei-jian

(Fujian Key Lab of Plant Molecular and Cell Biology, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract: Minhua-6 peanut (*arachis hypogaea* L.) was treated with different biotic and abiotic stresses, including low temperature, drought, several hormones, lack of calcium and *Aspergillus flavus*. A full-length cDNA library was constructed with a mixed samples treated or not by the method of SMART technique. The results showed that the entry library constructed had a high titer of 8.86×10^6 cfu with 97.6% recombinant percentage. 63.6% of inserts were ranged from 1 to 2 kb with an average size of 1300bp. This library can be used to screen resistant genes and provide a platform for investigating molecular mechanism of resistance favorable to peanut resistance improvement.

Key words: Peanut; Stresses; SMART technique; cDNA library; Resistant genes