

龙眼成花逆转花芽 α -tubulin 基因的克隆与原核表达

游向荣^{1a,1b,2}, 黄榕辉^{1b}, 王喜军^{1b}, 黄春梅^{1b}, 梁文裕^{1b}, 陈伟^{1a,1b*}

(1. 福建农林大学, a. 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室; b. 生命科学学院, 福州 350002; 2. 广西农业科学院农产品加工研究所, 南宁 530007)

摘要: 运用蛋白质组学方法比较龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)正常成花和成花逆转花芽的差异蛋白质组,并应用 RACE 方法克隆其中上调表达的 α -微管蛋白基因 α -tubulin, 获得一段长度为 1641 bp 的 cDNA, 其中包括 1 个 1350 bp 的开放阅读框[GenBank 登录号: FJ479617(GI:218202929)]. 将 α -tubulin 全长 cDNA 在大肠杆菌中表达, 获得 1 个约 49.6 kD 的外源蛋白, 经 Western blotting 验证为 α -微管蛋白. RT-PCR 和 Western blotting 分别检测了 α -tubulin 在转录和翻译水平上的表达, 结果表明, α -微管蛋白在成花逆转的龙眼花芽中上调表达, 可能是逆转花芽形态差异表现的原因之一。

关键词: 龙眼; 花芽; α -tubulin 基因; 克隆; 原核表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)01-0063-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.009

Cloning and Prokaryotic Expression of α -tubulin Gene in Longan Floral Reversion Buds

YOU Xiang-rong^{1a,1b,2}, HUANG Rong-hui^{1b}, WANG Xi-jun^{1b},
HUANG Chun-mei^{1b}, LIANG Wen-yu^{1b}, CHEN Wei^{1a,1b*}

(1a. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops;
1b. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of
Agro-food Science and Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: The differential proteins of floral reversion buds at different stages in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) were compared using proteomics method. The results showed that α -tubulin could up-regulate in floral reversion buds of longan, and its gene α -tubulin was cloned using RACE method. A full length of 1641 bp cDNA, with a 1350 bp open reading frame, was obtained (GenBank accession number: FJ479617). When α -tubulin gene was transformed into *E. coli* and expressed, a 49.6 kD heterologous protein verified as α -tubulin by Western blotting was obtained. Different expression of α -tubulin at transcription and translation levels using RT-PCR and Western blotting, respectively, showed that α -tubulin up-regulated in longan floral reversion buds. It was one of reasons that floral reversion buds were different from normal flowering buds.

Key words: Longan; Flower bud; α -tubulin gene; Clone, Prokaryotic expression

收稿日期: 2010-03-09 接受日期: 2010-07-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571293); 福建省自然科学基金项目(2007J0045); 教育部博士点基金(200803890009)资助

作者简介: 游向荣, 女, 博士, 2009年毕业于福建农林大学生命科学学院, 现就职于广西农业科学院, 主要研究方向为分子生物学, email: youxiangrong@gxaas.net

* 通讯作者 Corresponding author, email: weichen909@163.com

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)是我国南方重要果树,成花逆转是影响龙眼产量的主要因素之一。龙眼成花逆转指花穗在发育过程中受到内外条件的影响,长出枝叶,使花序发育终止,俗称“冲梢”。成花逆转作为植物成花阶段的特殊现象反映了植物发育的可塑性,这种可塑性是营养生长和生殖发育期相互重叠的结果^[1-2]。成花过程中某些基因或蛋白质的表达变化改变了植物营养生长和成花转变之间的平衡时最易发生逆转现象^[3]。

微管(microtubule)是真核细胞中普遍存在的蛋白结构, α -微管蛋白和 β -微管蛋白是组成微管的基本单位。微管在细胞形态、细胞分裂、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分化、细胞伸长及细胞极性的决定等方面起着重要的作用^[4]。不同异构体微管蛋白常在特定的发育阶段或特定的组织细胞中表达,是受发育过程调控的^[5]。本研究通过比较龙眼正常成花和成花逆转花芽蛋白质组的变化,观察到在成花逆转花芽的蛋白中 α -tubulin有上调表达,应用分子生物学方法克隆并原核表达了 α -tubulin差异蛋白的基因,为研究龙眼成花逆转的分子机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

在福建省莆田市农科所果树分所龙眼品种园,龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)“龙优”品种易发生成花逆转。选择 25 年生发育状态一致的植株 3 株,采集同一发育时期的正常成花花穗(对照)和成花逆转花穗(花序下方出现一期营养侧枝)上的花芽,装于液氮罐中带回实验室,立即贮于 -80°C 冰箱备用。

1.2 双向电泳及凝胶分析

龙眼花芽总蛋白提取、双向凝胶电泳、图像分析及差异蛋白含量的测定参考陈伟等^[6]的方法。

1.3 总 RNA 提取和 α -tubulin 克隆

龙眼花芽总 RNA 以 SDS 法提取,采用 Fermentas 公司 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis 试剂盒合成 cDNA 第一链,以反转录模板直接进行 PCR 反应。

以 MALDI-TOF-TOF/MS 分析鉴定的 α -tubulin 蛋白氨基酸序列为参照,运用 BLAST 程序对 GenBank 进行搜索,选取与龙眼亲缘关系较近植物的 α -tubulin 核酸序列进行比对分析并设计保守区

特异性引物,上游引物(P1)为:5'-GAACCC-ACTGTGATTGACGA-3',下游引物(P2)为:5'-CTGCCCTCTGAACTTTAGCC-3'。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环,然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳回收,连接到 pMD18-T 载体上,热激转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经 Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选取白色菌落进行液体培养,PCR 检测阳性克隆子,送上海英骏生物技术公司测序。

根据保守区扩增产物的测序结果,设计 3' RACE 特异性引物:5'-ATGCGGCTGTGGCTACT-ATCAAGACGAA-3'和 5' RACE 特异性引物:5'-TGTCCTCGGGCGAAGTTGTTGGCTGCGTCT-3',采用 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification 试剂盒进行 3'端和 5'端的 RACE 反应。将 3'端和 5'端的 RACE 反应产物分别回收,连接 pMD18-T 载体,转化测序。

1.4 α -tubulin 的表达

分别提取龙眼正常成花和成花逆转花芽中的总 RNA,分光光度法定量后转录合成 cDNA 第一链,设计龙眼 α -tubulin 特异性引物为 TP1:5'-ATGAGAGAGTGCATCAGCATCCA-3'; TP2:5'-AAGGTAAGGCAGGAGAAGCATCAAC-3',以龙眼 β -actin 基因作为内参,引物为 ACT1:5'-CTATG-AGTTGCCTGATGGAC-3',ACT2:5'-TGCTGAGG-GATGCTAAGATG-3',RT-PCR 检测 α -tubulin 的表达量,PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,先以 60 $^{\circ}\text{C}$ 进行 5 个循环,再以 55 $^{\circ}\text{C}$ 进行 28 个循环;然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.5 α -tubulin 全长 cDNA 克隆及原核表达

根据 5'RACE、3'RACE 及中间序列测序结果拼接而成的 α -tubulin cDNA 重新设计扩增全长基因 cDNA 的引物:AP1 为 5'-GCGGAATTCATGAG-AGAGTGCATCAGCATCCA-3'; AP2 为 5'-GCGCT-CGAGAAGGTAAGGCAGGAGAAGCATCAAC-3',进行 PCR 扩增。

纯化的 PCR 产物和 pET-28a 载体以 EcoR I 和 Xho I 双酶切,回收酶切产物,连接目的基因与载体片段,转化 DH5 α 感受态细胞,Kan 抗性筛选阳性克隆,提取质粒酶切鉴定,鉴定正确的质粒转化 BL21 感受态细胞,以终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG

诱导 α -tubulin 的表达。SDS-PAGE 电泳分析。

1.6 Western blotting 鉴定

SDS-PAGE 后,用半干转移仪将蛋白从凝胶转移到硝酸纤维素滤膜(NC膜)上,20 mL 5% 脱脂奶粉封闭。一抗为 1:200 兔抗拟南芥 α -tubulin 多克隆抗血清,二抗为 1:5000 HRP 标记的羊抗兔 IgG。用化学显色蛋白免疫印迹法进行 Western blotting 分析。

2 结果和分析

2.1 龙眼成花逆转蛋白质的双向电泳

采用窄范围 pH 4~7 的线性 IPG 干胶条对龙眼正常成花和成花逆转花芽蛋白质进行 IEF-SDS-PAGE 分离,并应用 MALDI-TOF-TOF/MS 分析和 Mascot 查询鉴定差异表达的蛋白,结果在成花逆转的花芽中 α -tubulin 蛋白有明显的上调表达(图 1)。

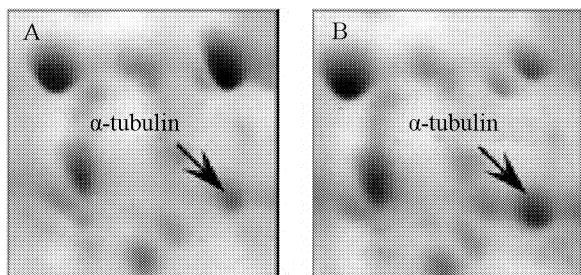


图 1 龙眼正常成花(A)与成花逆转(B)花芽 α -tubulin 蛋白的差异表达
Fig. 1 Differential expression of α -tubulin in longan normal flowering (A) and floral reversion (B) buds

2.2 α -tubulin 全长 cDNA 克隆

以逆转录合成的 cDNA 为模版,利用一对特异性引物 P1、P2 进行保守区 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳得到一条约 900 bp 的 DNA 条带(图 2),对该片段进行回收测序,得到一段 920 bp 的 cDNA 序列,经 DNAMAN 和 BLAST 比对分析,该序列为 α -tubulin cDNA 的同源片段。

以带有 UPM 接头的 cDNA 为模版,利用 3' RACE 特异性引物 AP1 和 UPM 引物进行 3' RACE 反应,获得一条约 600 bp 的 DNA 条带,对该片段进行回收测序,得到一段 651 bp 的 cDNA 序列,该片段包含一个多聚腺苷 (polyA) 尾,并有 176 bp 与保守区重叠。

以带有 UPM 接头的 cDNA 为模版,利用 5' RACE 特异性引物 AP2 和 UPM 引物进行 5' RACE 反应,获得一条约 400 bp 的 DNA 条带,对该

片段进行回收测序,得到一段 432 bp 的 cDNA 序列,该片段有 188 bp 与保守区重叠。

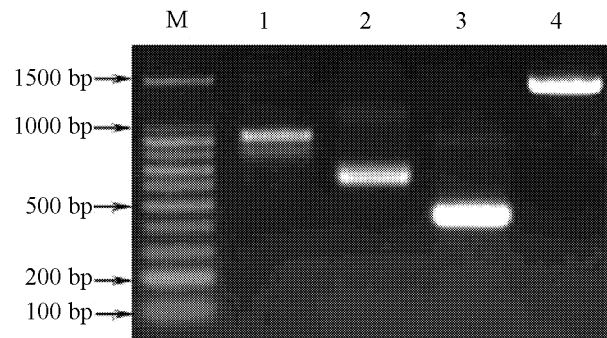


图 2 龙眼成花逆转花芽 α -tubulin 的 RT-PCR 扩增
Fig. 2 RT-PCR amplification of α -tubulin in longan floral reversion buds
M. 100 bp DNA marker; 1. 保守区 Conservative region;
2. 3' RACE; 3. 5' RACE; 4. 全长 cDNA Full length cDNA.

将 3 个片段进行拼接,获得 1641 bp 的 α -tubulin cDNA 全长序列(图 3),其包含一个 1350 bp 的完整开放阅读框,已登录 GenBank,登录号为 FJ479617。该开放阅读框编码一个有 450 个氨基酸残基的蛋白,推测其分子量为 49.6 kDa,与双向凝胶电泳和 Mascot 查询结果一致。在 3' 开放阅读框处包含 186 bp 的 UTR 结构。该开放阅读框包含 105 bp 的 5' 非编码区和 186 bp 的 3' 非编码区。

用 BLAST 在 GenBank 上进行搜索比对,结果表明,龙眼 α -tubulin 基因具有较高的保守性,与茶 (*Camellia sinensis*) 的同源性达 81.6%,与云杉 (*Picea wilsoni*)、杨树 (*Populus canescens*)、桦 (*Betula pendula*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、油菜 (*Brassica napus*)、大豆 (*Glycine max*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 的同源性分别达 77.9%、77.8%、76.5%、76.4%、76.3%、75.9%、75.6%、74.8% 和 71.7% (图 4)。

2.3 目的基因的 RT-PCR 分析

以龙眼正常成花和成花逆转花芽的总 RNA 为模版,以 β -actin 基因为内参,对 α -tubulin 进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明,虽然 α -tubulin 在成花逆转的花芽中上调表达, α -tubulin mRNA 的表达量在正常成花和成花逆转花芽中并无明显差异(图 5)。

2.4 α -tubulin 在 *E. coli* 中的表达

将 pET28a- α -tubulin 阳性质粒转化到 BL21 感

```

1      aggegtcttgataaaacgcgcctctacagaaattttctagatccaattagetctctttttattatcacatata
76      tttttgtttgtaatcaatcgatctaggaaaATGAGAGAGTGCATCAGCATCCACATTTGGTCAGCCGGTATCCAG
1      M R E C I S I H I G Q A G I Q
151     GTCCGAAAATGCATGCTGGGAACTTTACTGCCTTGAGCAATGGCACATCAGCCTGATGGCCAAATGCCGAGTGATAAG
16      V G N A C W E L Y C L E H G T Q P D G Q M P S D K
226     ACCGTCGGTGGAGGAGATGATGCCTTCAACACCTTTTTCAGCGAACTGGAGCTGGAAGACACGCTCCCTCGCGCT
41      T V G G G D D A F N T F F S E T G A G K H V P R A
301     GTATTTGGTGCATTTGAACCCACTGTGATTGACGAAGTCAGACGGGACTTACCCGCAATTTTCCACCTGAA
66      V F V D L E P T V I D E V R T G T Y P Q L F H P E
376     CAACTCATTAGTGGCAGGAAGACGCACCAACAACCTTCCCGGAGGACATTACACAATTTGGGAAAGAGATAGTG
91      Q L I S G K E D A A N N F A R G H Y T I G K E I V
451     GATCTGTGCTGGACAGGATTCGGAAGCTAGCTGATAACTGTACAGGGCTTCAAGGGTTTCTGTGTTCCACGC
116     D L C L D R I R K L A D N C T G L Q G F L V F P R
526     TGTGGTGGTACAGGATCCGGCTCGGATCTCTCCTCCTGGAGAGCCTCTCTGTGGACTATGGCAAGAAATCG
141     C G G G T G S G L G S L L L E R L S V D Y G K K S
601     AAACGGGGTTACAGATATATCCTTCTCCTCAGGTTTGCACCTCTGTGTGCGACCTTACACAGTGTTTGTCC
166     K L G F T V Y P S P Q V S T S V V E P Y N S V L S
676     ACTCACTCTCTCCGAGCACACTGATGTTGCTGTGTTGCTTGACAATGAAGCAATCTATGATATCTGCGAAGG
191     T H S L L E H T D V A V L L D N E A I Y D I C R R
751     TCTCTTGACATTGAGACCTACTTATACCAATCTCAATAGATTAGTTTCTCAGGTGATTTCTTCACTGACAGCT
216     S L D I E R P T Y T N L N R L V S Q V I S S L T A
826     TCTCTCGTTTGTATGGAGCCGAATGTTGATGTGACAGAGTTCAGACCAATTTAGTCCCGTACCCCTCGCATC
241     S L R F D G A P N V D V T E F Q T N L V P Y P R I
901     CATTTTCATGCTTTTCAICATATGCGCTGTCACTCAGCCGAGAAGGCCTACCACGAGCAACTCTCCGTGGCAGAA
266     H F M L S S Y A P V I S A E K A Y H E Q L S V A E
976     ATCAGAACAGTGCCTTTGAGCCGCTCTATGATGGCCAAATGCGACCCCGTCAATGGGAGTACATGGCCCTGC
291     I T N S A F E P S S M M A K C D P R H G K Y M A C
1051    TGTTTGATGTACAGAGGAGACGTGGTGCACAAAGGACGTGAATGCGGCTGTGGCTACTATCAAGACGAAGAGGACT
316     C L M Y R G D V V P K D V N A A V A T I K T K R T
1126    ATCCAATTTGTGGACTGGTGCACCACTGGGTTCAAGTGTGGAATCAACTACCAGCCACCGACTGTGGTGCCTGGT
341     I Q F V D W C P T G F K C G I N Y Q P P T V V P G
1201    GGGGACTTGGCTAAAGTTCAGAGGGCAGTGTGTAATGATTCCAATTCGACTAGTGTGGCTGAGGTGTTCTCAAGG
366     G D L A K V Q R A V C M I S N S T S V A E V F S R
1276    ATTGATCATAAGTTTGATTTGATGTATGCAAGAGGGCGTTTGTGCATTTGGTATGTGGGTGAGGGGATGGAGGAA
391     I D H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E
1351    GGAGAGTTTTCCGAGCCGAGGAGGATTTGGCTGCTTTTGAGAAGGATTATGAGGAAGTTGGGCTGAGTCTGCT
416     G E F S E A R E D L A A L E K D Y E E V G A E S A
1426    GAAGGAGAAGCAGCAGAAAATGAAGAGTACTAAataatgtgatgetctctccttaccctttttccaatggac
441     E G E D D E N E E Y *
1501    teatgggtgtctagtagtgettcaaaactagttgtagaaagatgatgactttcactatgtctaggttgettttg
1576    ttctatgtgagttgctttgtgtccatcatggatggttcaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 3 龙眼成花逆转花芽 α -tubulin cDNA 的核苷酸序列(上行)及推导的氨基酸序列(下行)

Fig. 3 Nucleotide sequence (upper lines) and amino acid sequence (lower lines) of α -tubulin cDNA in logan floral reverse buds

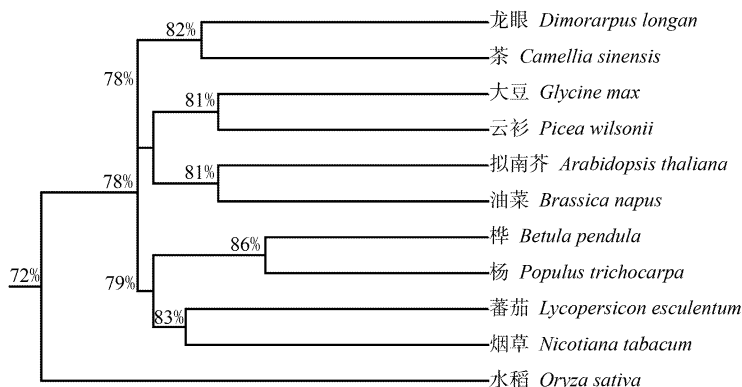


图 4 α -tubulin 核苷酸序列同源树

Fig. 4 Homology tree of nucleotide sequences of α -tubulin

受态细胞中,并以 IPTG 诱导 α -tubulin 蛋白表达,从 12.5% SDS-PAGE 电泳结果(图 5)可知,IPTG 诱导的阳性质粒转化子有大量外源蛋白表达,分子量约为 52 kD,与预测的 α -tubulin 蛋白分子量相同,经凝胶扫描测定,外源蛋白约占细菌蛋白总量的 19.4%。

2.5 Western blotting 鉴定

应用兔抗拟南芥 α -tubulin 多克隆蛋白抗体对

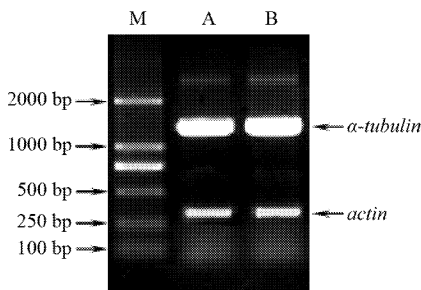


图 5 龙眼花芽中 α -tubulin 的 RT-PCR(左)和相对表达量(右)

Fig. 5 RT-PCR (left) and relative volume (right) of α -tubulin expressed in longan buds
M:DL 2000 DNA marker; A:正常成花 Normal flower; B:成花逆转 Floral reversion

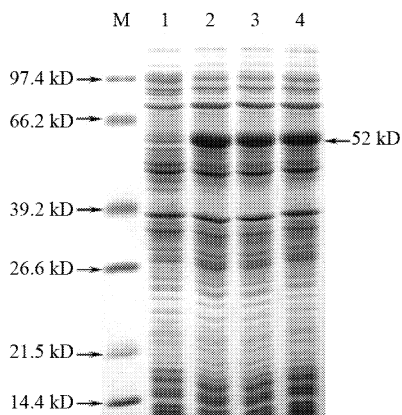
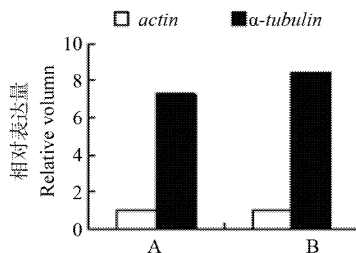


图 6 α -tubulin 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 6 SDS-PAGE of α -tubulin expressed in *E. coli*

M:标准分子量 Marker;1:空质粒 Negative plasmid;2~4:阳性质粒 pET28a- α -tubulin

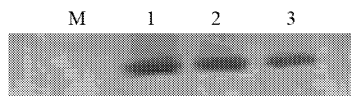


图 7 α -tubulin 蛋白的 Western blotting 杂交

Fig. 7 Western blotting of α -tubulin

M:空质粒 Negative plasmid; 1~3:阳性质粒 pET28a- α -tubulin

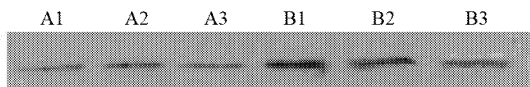


图 8 龙眼花芽 α -tubulin 蛋白的 Western blotting 杂交

Fig. 8 Western blotting of α -tubulin in longan buds

A1~A3:正常成花 Normal flower; B1~B3:成花逆转 Floral reversion

SDS-PAGE 结果进行验证,可见诱导后的细菌有预期大小的显色条带,而空载体对照无此条带(图 6),证明表达的外源蛋白确实为 α -tubulin 蛋白。

应用兔抗拟南芥 α -tubulin 多克隆蛋白抗体对龙眼正常成花(A1~A3)和成花逆转(B1~B3)花芽蛋白的 SDS-PAGE 结果进行检测,Western blotting 结果表明 α -tubulin 在龙眼正常成花和成花逆转花芽蛋白中的表达量差异在 2 倍以上。

3 讨论

α -微管蛋白作为细胞骨架的主要组成成分,受植物发育和外界信号响应调控,在细胞形态分化、细胞骨架排向和极性决定等方面起着重要的作用^[4]。Montoliu 等^[7]的研究表明,玉米 α -微管蛋白基因在根和分裂旺盛的组织中优势表达。Mede 等^[8]的研究表明,GA 处理的燕麦(*Avena sativa*)竹间切段,微管蛋白转录水平比未用 GA 处理的增加 5~6 倍;GA₃处理的燕麦切段长度与相对微管蛋白转录水平呈正相关。Duckett 等^[9]对豌豆(*Pisum sativum*)矮化突变体(*1e*)的研究表明,随着 α -微管蛋白同型体(isotype)的增加,微管结构从 L 型(0~30°)向 T 型(60°~90°)转变,豌豆茎秆伸长。邱金淡等^[10]对石硌龙眼花芽分化的研究表明,顶芽芽轴萌动时若发育成花序,芽轴伸长缓慢,基部的腋芽膨大,可判断已进入形态分化;若发生成花逆转,则芽轴快速伸长,羽状复叶的小叶展开。我们推测, α -微管蛋白在成花逆转的龙眼花芽中上调表达,可能与微管结构形态转化有关,并在一定程度上导致了逆转的花芽的芽轴伸长。另外,我们对正常成花和成花逆转花芽转录组的半定量 RT-PCR 表明, α -tubulin 在转录水平上并没有大的差异,而表达差异主要集中在翻译阶段,说明成花逆转花芽中 α -微管蛋白的表达调控是在龙眼接受开花信号后,由生

殖生长逆转回营养生长后启动的。另外我们在田间观察到,逆转的龙眼花穗中部分花芽也能开花结果,但结果枝条粗短帚状,果皮厚且坚硬。这是否和成花逆转过程中花芽细胞骨架微管蛋白的上调表达有关,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Bai S L(白素兰), Xie Z W(谢中稳), Liu Y S(刘永胜), et al. The reversion of plants flowering [J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 2000, 36(3): 252-257.(in Chinese)
- [2] Washburn C F, Thomas J F. Reversion of flowering in *Glycine max* (Fabaceae) [J]. *Amer J Bot*, 2000, 87(10): 1425-1438.
- [3] Tooke F, Ordidge M, Chiurugwi T. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(420): 2587-2599.
- [4] Louis C M, Donald E F. Higher plant tubulin identified by self-assembly into microtubules *in vitro* [J]. *Nature*, 1982, 297: 426-428.
- [5] Steven R L, David G O, Carolyn D S, et al. The α -tubulin gene of *Arabidopsis thaliana*: Primary structure and preferential expression in flowers [J]. *Plant Mol Biol*, 1988, 10: 311-321.
- [6] Chen W(陈伟), You X R(游向荣), Liang W Y(梁文裕), et al. Analysis of differential proteins of floral reversion buds in different period in longan [J]. *J Agri Biotechn*(农业生物技术学报), 2009, 17(4): 722-727.(in Chinese)
- [7] Montolin L, Puigdomenech P, Rigau J, et al. The *Tuba3* gene from *Zea mays*: Structure and expression in dividing plant tissues [J]. *Gene*, 1990, 94: 201-207.
- [8] Mede N, Sallow C D. Elevated levels of tubule transcripts accompany the GA₃-induced elongation of oat internodes segments [J]. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34(7): 973-983.
- [9] Duckett C M, Lloyd C W. Gibberellin acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an α -tubulin isotype [J]. *Plant J*, 1994, 5(3): 363-372.
- [10] Qiu J D(邱金淡), Wu D Y(吴定尧), Zhang H L(张海岚). A study on flower differentiation of 'Shixia' longan (*Dimocarpus longana* Lour. cv. Shixia). [J]. *J S China Agri Univ*(华南农业大学学报), 2001, 22(1): 27-30.(in Chinese)