

东亚砂藓取材部位对提取其总 RNA 及 DDRT-PCR 的影响

沙伟, 师帅

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 分别采用新鲜东亚砂藓植物体先端、基部及中部作为材料, 采用改良的 SDS 法, 提取及纯化三部分的总 RNA。比较 RNA 产率、纯度及分析电泳图谱来确定适于东亚砂藓 RNA 分离的最佳部位。并运用 mRNA 差异显示方法比较了东亚砂藓不同部位的差异。实验结果显示, 东亚砂藓植物体的先端适于其总 RNA 提取及 mRNA 差异显示的研究。

关键词: 东亚砂藓; RNA; mRNA 差异显示; 提取

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)03-0298-04

Effects of choosing different tissues of *Racomitrium japonicum* on total RNA isolation and DDRT-PCR

SHA Wei, SHI Shuai

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Total RNA was extracted from different tissues of *R. japonicum* by the method of SDS. We compared and analyzed the rate of yield, purity of the total RNA from three parts of *R. japonicum*. The mRNA differential display method (DDRT-PCR) was used to study the differential expression of the three parts of *R. japonicum*. The results showed that the top part of *R. japonicum* was better suitable for extracting total RNA and DDRT-PCR.

Key words: *R. japonicum*; RNA; mRNA differential display; isolation

基因表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制, 分析不同细胞或同类细胞在不同发育阶段、不同生理状态下基因的表达状况, 可为研究生命活动过程提供重要信息(马小军等, 2005)。Liang & Pardee(1992)创立了 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR), 它具备需要总 RNA 的量少, 不需要纯化的 mRNA, 操作简便、快速、灵敏、一次能分析多个样品等优点(Arnold 等, 2003), 因而成为分离新基因的首选方法, 应用于体内和体外差异表达基因的筛选, 研究基因功能(Robb 等, 2001)。除成功应用于动物及人类多种疾病与重要器官发生有关基因的鉴定克隆外(俞作仁等, 2003), 也成功应用于植物果实

发育、信号转导、植物抗逆与抗病性、胚胎发育、形态发生等有关基因的分离与克隆, 如水稻凝集素基因表达、番茄果实膨大、小麦春化、水稻胞质雄性不育及杂种优势相关基因等(秦庆明等, 2003; Brummell 等, 1999; 江树业等, 2001; 谢晓东等, 2003)。植物对非生物胁迫的适应性研究主要集中于分离对胁迫作出反应的相关基因, 作为理解适应过程背后隐藏的分子事件的手段(刘艳等, 2007)。

苔藓植物由于具有独特的抗旱能力, 成为研究植物抗旱机理和相关基因克隆的模式植物(欧阳浩森等, 2004)。紫萼藓科(Grimmiaceae)砂藓属(*Racomitrium*)的东亚砂藓(*R. japonicum*)为典型的小型旱生

收稿日期: 2007-04-26 修回日期: 2007-09-21

基金项目: 黑龙江省农业攻关项目(GC06J101); 黑龙江省海外学人合作项目(1151hz022); 国家自然科学基金(30470144)[Supported by the Key Agricultural Program of Science and Technology Department of Heilongjiang Province(GC06J101); the Abroad Cooperation Project Funds from Heilongjiang Education Department(1151hz022); the National Natural Science Foundation of China(30470144)]

作者简介: 沙伟(1963-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物遗传学, (E-mail)Shw1129@263.net.

藓类,植物体粗壮,密集或松散丛生,主要生长在裸露的岩石表面或岩石表面的薄土或砂土上。上无树木遮蔽,下无湿润的土壤,而且,单层细胞的叶片没有特殊的抗旱、抗寒及抗紫外线的结构(张晗等,2006)。本文改良了王玉成(2006)的 RNA 提取方法,找到了适合东亚砂藓的 RNA 提取方案,建立了比较完善的东亚砂藓 mRNA 差异显示技术体系,比较了不同取材部位对于东亚砂藓总 RNA 提取及 DDRT-PCR 的影响,为进一步深入开展东亚砂藓抗旱机理的研究奠定基础。同时,为其它旱生苔藓植物 RNA 提取及 mRNA 差异显示技术反应体系建立提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

东亚砂藓(*R. japonicum*)采自五大连池(位于黑龙江省的北部地区,地处高纬度)老黑山,装入干燥的封口袋带至实验室,室温培养,其上覆盖一层塑料膜,以保持水分。用镊子小心剥离出单个个体,用蒸馏水冲刷 3 次以去除沙粒及其他杂质。取材部位分三组:植物体先端、基部、中部,-80 °C 冷冻保存。主要试剂: TaqDNA 酶(BBI); dNTPs(BBI); 锚定引物: T13A(上海生工公司合成); 随机引物序列: AAGCT-TACGATGC(上海生工公司合成); RNase 抑制剂(BBI); DEPC(BBI); Tris 酚(购自上海生工公司); β -Mercaptoethanol (Biotech Grade, AMREDCO)。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取 (1) 每组取 0.5 g 实验材料,在液氮中研碎后放入 1.5 mL 离心管,加入 0.4 mL Tris 酚,混匀后 0.6 mL SDS 提取液(1.4% SDS(W/V), LiCl 0.09 mol · L⁻¹, EDTA 4.5 mol · L⁻¹, KCl 0.2 mol · L⁻¹, 蔗糖 0.3 mol · L⁻¹, Tris 0.18 mol · L⁻¹), 0.06 mL β -巯基乙醇。旋涡振荡器剧烈振荡 3 min; 加入 0.15 mL 无水乙醇,0.10 mL 3 mol · L⁻¹ KAc, 0.20 mL 氯仿,摇匀 10 min; (2) 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 转移上清至新离心管中,加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1), 摇匀 10 min, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min; (3) 取上清加入 1/3 体积 2 mol · L⁻¹ NaAc, 冰浴 30 min; (4) 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清加入 1/3 体积 4 mol · L⁻¹ LiCl, 混匀,-20 °C 沉淀过夜; (5) 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 70% 乙醇洗涤沉淀, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min; (6) 弃上清, 400 μ L DEPC 处理的超纯水溶解沉

淀, 1/10 体积 3 mol · L⁻¹ KAC, 400 μ L 酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1), 混匀 10 min, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min; (7) 取上清, 加 1/10 体积 2 mol · L⁻¹ NaAc, 2.5 倍体积无水乙醇,-70 °C 沉淀 1 h; (8) 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 70% 乙醇洗涤沉淀, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 30 μ L DEPC 处理的超纯水溶解沉淀,-20 °C 保存备用。

1.2.2 总 RNA 中污染 DNA 的去除 取 20 μ g 总 RNA, 加 20U 人胎盘 RNA 酶抑制剂、20U 无 RNA 酶的 DNaseI、10 μ L 0.1 mol · L⁻¹ Tris · Cl、10 μ L 0.1 mol · L⁻¹ Buffer、10 μ L 0.1 mol · L⁻¹ MgCl₂, 2 μ L 锚定引物 T13A, 混匀, 37 °C 孵育 30 min。加等体积酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1), 振荡, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。转移上清至新离心管中, 加 1/10 体积 2 mol · L⁻¹ NaAc, 2.5 倍体积无水乙醇,-70 °C 沉淀 1 h。4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 70% 乙醇洗涤沉淀, 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 20 μ L DEPC 处理的超纯水溶解沉淀,-20 °C 保存备用。

1.2.3 mRNA 差异显示 (1) cDNA 第一条链的合成: 反应体系: 4 μ L 5 × RT 缓冲液, 2 μ g 总 RNA, 2 μ L 0.1 mol/L DTT, 20U 人胎盘 RNA 酶抑制剂, 1 μ L 10 mmol/L dNTPs。65 °C 5 min, 37 °C 10 min, 加 1 μ L RT-反转录酶, 37 °C 反转录 50 min, 95 °C 处理 5 min 灭活反转录酶。(2) PCR 扩增及琼脂糖电泳检测: PCR 扩增反应体系 20 μ L, 反转录混合物 2 μ L, 10 × PCR 缓冲液 2 μ L, 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 1.2 μ L, 10 mmol · L⁻¹ dNTPs 1.0 μ L, 10 pmol 锚定引物 1.5 μ L, 10 pmol 随机引物 1.2 μ L, taq 酶 0.5 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 程序为: 94 °C 5 min, 40 °C 2 min, 72 °C 1.5 min 一个循环后, 94 °C 45 s, 42 °C 2 min, 72 °C 1.5 min 40 个循环后 72 °C 延伸 5 min。配制 2% 琼脂糖凝胶, 电泳检测。(3) 差异带的回收、重扩增、琼脂糖电泳检测: 从凝胶上切下差异条带后, 按 BBI 公司试剂盒说明书方法制备模板、对差异条带进行 PCR 再扩增, 反应体系和程序同前, 注意引物一致性。取重扩增后反应液, 用 2% 琼脂糖电泳检测, 小心切下琼脂糖单一条带的 DNA 回收, 留作阳性鉴定。

2 结果与分析

2.1 改良 SDS 提取东亚砂藓不同组织总 RNA 产量、纯度比较

使用改良的 SDS 法分别提取东亚砂藓植物体

先端、基部、中部的总 RNA, 结果见表 1, OD_{260}/OD_{280} 值均大于 1.8。这些数据均为典型的 RNA 紫外吸收值比值, 表明所获得 RNA 纯度已达要求。比较三部分 OD_{260}/OD_{280} 表明端部 RNA 纯度高于基部及中部。从总 RNA 的产率上看, 端部, 中部总 RNA 产率较基部高。

表 1 改良 SDS 提取东亚砂藓不同部位
总 RNA 产量、纯度比较

Table 1 Comparisons of RNA yield from different citrus parts of *R. japonicum* with modified SDS

样品组织 Part of sample	OD_{260}/OD_{280}	RNA 浓度 RNA concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
端部	2.000	17.79
基部	1.833	6.47
中部	1.988	16.07

2.2 改良 SDS 提取东亚砂藓不同组织总 RNA 完整性比较

对东亚砂藓不同部位的总 RNA 进行了 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 1 所示。28S 和 18S 的带型均清晰完整, 且 28S 的带大约是 18S 的两倍, 说明所提的总 RNA 完整性较好。从图中可明显看出东亚砂藓尖端部及中部比基部的总 RNA 条带亮且清晰, 提取结果较为理想。试验中所获取不同部位的总 RNA 样品在纯度和完整性方面均符合要求, 可以顺利进行后续的 DDRT-PCR 工作。

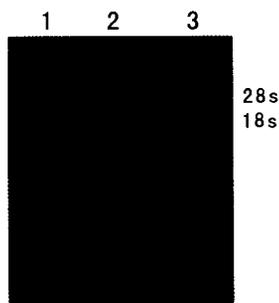


图 1 改良 SDS 提取东亚砂藓不同
部位所得 RNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of RNA from different parts of *R. japonicum* with modified SDS

泳道 1: 尖端总 RNA; 泳道 2: 基部总 RNA; 泳道 3: 中部总 RNA。
Lane 1: total RAN from the top part of plants; Lane 2:
total RAN from the base part of plants; Lane
3: total RAN from the middle of plants.

2.3 改良 SDS 提取东亚砂藓不同组织 DDRT-PCR 检测

据 Genespec 测定结果调整反转录获得的 cDNA 的最适浓度。并以此为模板选择差异锚定引物与随

机引物进行差异显示 PCR 扩增, 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2), 尖端部比中部及基部条带清晰, 差异条带明显。分子量标准分析表明, cDNA 条带长度主要集中在 500~2 000bp 之间, 且差异显示明显, cDNA 扩增带的丰度及长度均能满足 DDRT-PCR 技术的要求, 进一步证明, 东亚砂藓的尖端部是获取高质量总 RNA 及 DDRT-PCR 的理想材料。

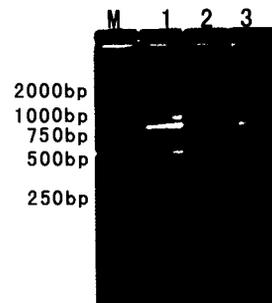


图 2 东亚砂藓不同组织总 RNA 的
DDRT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of DDRT-PCR product from different parts of *R. canescens*

M: 分子量标准物; 1: 模板: 东亚砂藓尖端; 锚定引物 T13A; 随机引物 AAGCTTACGATGC; 2: 模板: 东亚砂藓基部; 锚定引物 T13A; 随机引物 AAGCTTACGATGC; 3: 模板: 东亚砂藓中部; 锚定引物 T13A; 随机引物 AAGCTTACGATGC。

3 讨论

正确选择材料是应用差异显示技术克隆基因的关键 (董海涛等, 2001)。本实验分别采用新鲜东亚砂藓植物体先端、基部、中部作为材料。采用改良的 SDS 法, 提取及纯化三部分的总 RNA 并进行比较, 应用 DDRT-PCR 方法对比了东亚砂藓植物体不同部位的差异。表明其尖端部适于其总 RNA 及 DDRT-PCR 的研究。

苔藓植物 RNA 提取的难点在于苔藓植物次生代谢产物较多, 如生物碱、黄酮、萜类、固醇类以及酚类化合物等 (欧阳浩森等, 2004)。这些物质造成 RNA 的化学降解、酶解或影响 RNA 的纯度。本文改良了王玉成 SDS 方法, 在操作方法上与其不同的是: (1) 向液氮磨碎的植物组织中先加 Tris 酚以释放出的内源 RNA 酶迅速变性, 再加入 RNA 提取缓冲液和 β 巯基乙醇, 而后剧烈振荡以增强变性效果。(2) 为避免剧烈振荡对大分子核糖体 RNA (rRNA) 的破坏, 我们采取了在提取缓冲液中加入蔗糖和氯化钾的办法, 以增加溶液的渗透压, 从而对 RNA 分

子起到很好的渗透保护作用。(3)考虑到材料中含有较多的次生代谢物质,加入较高浓度的 β 巯基乙醇和 PVP,可以防止酚类等次生化合物被氧化而与 RNA 结合,避免匀浆液变为褐色,影响 RNA 的分离纯化;而且 PVP 能与这些化合物稳定地结合并在以后的抽提步骤中被除去。 β -巯基乙醇具有抗氧化的作用,适当增加其浓度,可以防止氧化褐变(侯义龙等,2003),获得较好的 RNA 提取效果。(4)采用酸酚抽提,有效去除了蛋白质。另外,酸酚不但抑制 RNase 的活性,而且在酸性条件下,DNA 和蛋白质进入有机相,而 RNA 留在水相中,提高了纯度与产率。(5)抽提过程中加入低浓度的 KAc,能使植物多糖形成沉淀,一起离心除去。这样第一次离心上清液澄清,只需抽提一次就无蛋白层,减少 RNA 损失,提高 RNA 产量。本实验方法应用于紫萁藓、拟垂枝藓、绢藓等,也取得了较好的效果。

完整和均一是评价 RNA 质量的最关键标准(刘阁玲等,2006)。本试验提取的总 RNA 完整性好,无降解现象,三组总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.8~2.0 之间,表明样品纯度高,且端部及中部高于基部。为了检测所提取的 RNA 的完整性,通常采用甲醛变性电泳的方法,但是,RNA 变性电泳的步骤繁琐,费时费力。

本试验直接采用 1.2% 非变性普通琼脂糖电泳进行检测,电泳时所用电泳槽需用去污剂清洗,水冲洗,乙醇干燥,最后用 DEPC 水浸泡过夜,用水冲洗干净。该方法简单、方便,检测结果清晰。

实验选用总 RNA 作为反转录的模板,效果很好。总 RNA 或纯化的 mRNA 作模板的差异结果基本一致,用 Oligo(dT)法纯化的 mRNA 含有少量的 Oligo(dT)片段,反而增加了差异表达的背景(Zimmermann & Schultz,1994),因此在众多试验中均应用总 RNA 作为模板。本试验用 2% 琼脂糖凝胶电泳显示 DDRT-PCR 产物,将差异 cDNA 条带直接切下,回收纯化,进行二次 PCR。因为 2% 琼脂糖凝胶可以有效分离 100~3 000 bp 的 DNA,且分离后的 DNA 有足够高的产量用于亚克隆,避免了聚丙烯酰胺凝胶电泳只能分离 100~600 bp 大小的 DNA 片段。实验设备和操作均很简单,可准确容易地回收差异片段,省时成本低,无污染,一般实验室就可进行。

采用改良 SDS 法提取东亚砂藓总 RNA,经其 mRNA 差异显示体系扩增,于琼脂糖凝胶检测,可以应用于东亚砂藓的抗性相关基因的表达研究,经

进一步优化,也可以应用于苔藓其他重要性状的分子鉴定与功能基因的分离、克隆。

参考文献:

- Arnold A M Anderson G W McIver B, et al. 2003. A novel dynamin III isoform is up-regulated in the central nervous system in hypothyroidism[J]. *Int J Deve Neurosci*, **21**:267—275
- Brummell DA. 1999. Differential expression of expansion gene family members during growth and ripening of tomato fruit[J]. *Plant Mo Biol*, **39**:161—169
- Dong HT(董海涛), He ZH(何祖华), Wu YL(吴玉良), et al. 2001. mRNA different display of a pair of rice near isogenic lines to *Magnaporthe grisea*[J]. *J Agric Sin*, **34**(6):610—614
- Hou YL(侯义龙), Cao T(曹同), Cai LN(蔡丽娜), et al. 2003. Study on extraction methods of bryophytes genomic DNA(苔藓植物 DNA 提取方法研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **23**(5):425—428
- Jing SY(江树业), Lv B(吕蓓), Chen QF(陈启锋), et al. 2001. mRNA differential expression analysis between fertile and sterile young panicle of photoperiod sensitive genic male sterile indica rice (籼型光敏核不育水稻 Hs-1 可育和不育幼穗 mRNA 的差异表达分析)[J]. *J Agric Biotech*(农业生物技术学报), **9**(1):69—71
- Liang P, Pardee AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction[J]. *Science*, **257**(14):967—971
- Liu GL(刘阁玲), Zhang HQ(张慧琴), Li J(黎杰). 2006. Study on cloning of novel liver cancer associated genes using mRNA differential display method. (应用 mRNA 差异显示技术克隆甲状腺癌相关基因)[J]. *Chin J Exp Surg*(中华实验外科杂志), **33**(11):621—624
- Liu Y(刘艳), Cao T(曹同), Chen JW(陈静文). 2007. Advances on the study of the moss *Physcomitrella patens*, a potential model plant(有前景的模式植物小立碗藓的研究新进展)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(1):90—94
- Ma XJ(马小军), Wang LX(王立贤), Liu ZP(刘宗平). 2005. mRNA differential display technology and its application on of animals(mRNA 差异显示技术及其在动物科学研究中的应用)[J]. *Acta Veter et Zootech Sin*(畜牧与兽医), **4**(4):51—53
- Ouyang HM(欧阳浩森), Xia GX(夏桂先), Liu XL(刘祥林), et al. 2004. Dehydration rehydration treat in *Atrichum undulatum* and comparison with different methods on RNA extraction(仙鹤藓 RNA 提取不同方法比较)[J]. *J Capital Normal Univ Nat Sci Edi*(首都师范大学学报), **25**(2):57—60
- Qin QM(秦庆明), Zhang Q(张全), Zhao WS(赵文生), et al. 2003. Identification of a lectin gene induced in rice in response to *Magnaporthe grisea* infection(稻瘟菌侵染诱导水稻凝集素基因的表达)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **45**(1):76—81
- Robb C W, Orihuela C J, Ekkelenkamp M B, et al. 2001. Identification and characterization of an in vivo regulation D15/Oma87 homologue in *Shigella Flexneri* using differential display polymerase chain reaction[J]. *Gene*, **262**:169—177
- Wang YC(王玉成), Zhang GD(张国栋), Jiang J(姜静). 2006. A widely applied total RNA extraction method(一种适用广泛的总 RNA 提取方法)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), **26**(1):84—87

花率低,可能与较长时间的花前生长期和资源竞争有关;黄帚橐吾和箭叶橐吾的结实率虽然只有 13.2%和 12.4%,但因花序大、花数量多,因此,有性生殖在其种群扩散和物种的繁衍中仍起着重要作用;黄帚橐吾、箭叶橐吾的 P/O 比均明显低于多年生草本植物的平均值,即存在着突出的花多果少现象;三种橐吾的繁育系统以远交为主、部分自交亲和、虫媒、需要传粉者;传粉者缺乏和蝇类幼虫侵食是三种橐吾有性生殖过程中所经历的主要压力,是影响其有性生殖效率的重要因素;植物为了保证生殖成功所采取的适应对策有:大量开花,延长雌、雄配子体的功能期和传粉媒介泛化。

箭叶橐吾和黄帚橐吾,作为草原危害严重毒杂草,在自然条件下,克隆生长的根状茎受到了草场其它生物的竞争,其繁殖方式以有性生殖为主。提示我们在保护青藏高原东缘的高寒草甸时,应该针对植物有性生殖的器官,如抽出的花梗,开放的花序以及形成的种子等,抑制其后代的散布和种群的扩大,还要注意退化草场的生态恢复和物种保护,避免土地沙化,使橐吾的克隆生长始终受到抑制,以防止其在缺乏竞争环境中克隆繁殖得以释放,占据更为广泛的生境。这些都启发我们,在未来的草场生态治理工作中,需要考虑多重因素,采用综合办法,具有针对性的采取科学合理的防治措施。

参考文献:

Cruden R W. 1997. Pollen-ovule ratio: a conservative indicator of

- breeding system in flowering plants[J]. *Evolution*, 31:32-46
- Dafni A. 1992. *Pollination Ecology*[M]. New York: Oxford Univ Press;1-57
- Hu SY(胡适宜). 1993. Experimental methods in plant embryology (1)determination of pollen viability(植物学实验方法(1)花粉生活力的测定)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 10(2):60-62
- Liu ZJ(刘左军), Du GZ(杜国桢), Chen JK(陈家宽). 2002. Size-dependent reproductive allocation of *Ligularia virgaurea* in different habitats(不同生境下黄帚橐吾个体大小依赖的繁殖分配)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), 26(1):44-50
- Liu ZJ(刘左军), Du GZ(杜国桢), Chen JK(陈家宽). 2003. Relationship between habitats and resource allocation of inflorescence structure in *Ligularia virgaurea*(黄帚橐吾花序结构的资源配置与环境的关 系)[J]. *Acta Phytoecol Sin*, 27(3):344-351
- Ma RJ(马瑞君), Du GZ(杜国桢), Liu ZJ(刘左军), et al. 2002. Regenerative strategies of three species of *Ligularia* (Asteraceae) in eastern of Qinghai-Xizang Plateau of China: From flowering to germination(青藏高原东部三种橐吾属植物更新对策的研究)[J]. *Acta Prat Sci*(草业学报), 11(2):25-32
- Shan BQ(单保庆), Du GZ(杜国桢), Liu ZH(刘振恒). 2000. Clonal growth of *Ligularia virgaurea*: Morphological response to nutritiunal variation(不同养分条件下和不同生境类型中根茎草本黄帚橐吾的克隆生长)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), 24(1):46-51
- Wang XF(汪小凡), Chen JK(陈家宽). 1998. Studies on mating system of *Ranalisma rostratum* (Alismataceae)(长喙毛茛泽泻(泽泻科)的交配系统研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 20(3):315-320
- Yu XY(于晓英), Lu XY(卢向阳), Gong MF(龚明福). 2005. Pollen viability of *Senecio hybridus*(瓜叶菊花粉生活力研究)[J]. *J Hunan Agric Univ(Nat Sci)*(湖南农业大学学报·自然科学版), 31(1):42-46

(上接第 301 页 Continue from page 301)

- Xie XD(谢晓东), Ni ZF(倪中福), Meng FR(孟凡荣), et al. 2003. Relationship between differences of gene expression in early developing seeds of hybrid versus parents and heterosis in Wheat(小麦杂交种与亲本发育早期种子的基因表达差异及其与杂种优势关系的初步研究)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 30(3):260-266
- Yu ZR(俞作仁), Guo R(郭睿), Ge YH(葛晔华), et al. 2003. Cloning of ESTs of spermatogenesis-related genes from early stage spermatogenic cells of mice using a modified DDRT-PCR method(用 DDRT-PCR 方法克隆小鼠精子发生早期相关基因的 EST)[J]. *Acta Biochim ET Biophys Sin*(生物化学与生物物理学报), 35(1):92-96

- Zhang H(张晗), Gao YC(高永超), Sha W(沙伟), et al. 2006. Study of DNA extraction and genetic diversity in grimmiaceae(紫萼藓科植物 DNA 提取及遗传多样性的分析)[J]. *Shandong Agric Sci*(山东农业科学), 1:7-9
- Zimmermann J W, Schultz R M. 1994. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:16-19