

梨 S 基因芯片的试制及分子杂交条件的优化

江南^{1,2}, 谭晓风^{1*}, 陈洪¹, 王秀丽², 张琳¹, 曾艳玲¹

(¹中南林业科技大学经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004; ²湖南工业大学绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室, 湖南株洲 412008)

摘要: 为研究寡核苷酸芯片在确定梨品种 S 基因型中的应用价值, 根据梨自交不亲和基因的结构特点设计了部分 S 基因的检测探针, 并制成寡核苷酸芯片; 采用引物 Cy3 荧光标记法标记检测样品的 PCR 产物并进行杂交, 以检测不同样品的 S 基因型。结果表明: 通过对不同杂交温度、杂交时间等的探索获得了较好的反应条件并用制备的芯片检测了已知 S 基因型的梨样品, 检测结果与各品种的已知基因型相符。证明寡核苷酸芯片检测梨品种的 S 基因型是一种切实可行的检测方法, 若对芯片进一步完善, 则在今后梨自交不亲和性状的机理研究及梨自交不亲和性状的利用等方面将有着广阔的应用前景。

关键词: 梨; 自交不亲和性; S-RNase 基因; 基因芯片; 分子杂交

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 04-0481-06

Preparation of Prototype S-RNase Microarray and Molecule Hybridization Condition

JIANGNan^{1,2}, TAN Xiao-feng^{1*}, CHEN Hong¹, WANG Xiu-li², ZHANG Lin¹, and ZENG Yan-ling¹

(¹Key Laboratory of Non-Wood Forest Product of State Forestry Administration, Central-South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; ²Key Laboratory of Green Packaging and Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou, Hunan 412008, China)

Abstract: To explore the application of oligonucleotide microarray in identification of pears S-genotype, some probes for S-RNase detection were designed according to the structure characteristic of self-incompatibility gene, and oligonucleotide microarray was prepared. The PCR products of S-RNase were amplified by Cy3-labeled primer and hybridized with the microarray in order to detect the S-genotype of pears. Optimized reaction conditions were gained by exploration of hybridization temperature and hybridization time. The microarray results of S-genotype of pear were similar with the RFLP and sequenced results. In conclusion, the oligonucleotide microarray was an effective method in detecting S-genotype of pear. With the future improvement, it could be widely used in the study of self-incompatibility of pear.

Key words: pear; self-incompatibility; S-RNase gene; gene chip; hybridization

植物自交不亲和性是显花植物生殖过程中一种常见现象, 根据花粉的自交不亲和和表型的遗传控制方式可将植物自交不亲和性分为配子体自交不亲和和孢子体自交不亲和两类 (薛勇彪和孟金陵, 1995)。梨是典型的配子体自交不亲和植物 (徐义流和张绍铃, 2003)。自交不亲和性是由单一基因位点的复等位基因 (S 基因) 控制, S 基因的产物具有 RNase 活性, 能分解来自相同基因的花粉 rRNA 和 mRNA (Kao, 1994), 导致不亲和现象的产生。因此, 雌蕊和花粉的 S 基因不同, 表现为亲和, 相同表现为不亲和。在梨栽培中, 必须配置 S 基因型不同的授粉品种, 才能保证正常的授粉受精

收稿日期: 2007 - 10 - 19; 修回日期: 2008 - 03 - 11

基金项目: 国家林业局重点科学技术研究计划林业新技术开发与储备专项 (2006-16); 湖南省教育厅科学研究项目 (07C229); 湖南省科技计划项目 (00JZY2155); 中南林业科技大学青年科学基金项目 (0700913)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: tanxiaofencn@yahoo.com.cn)

和丰产稳产。确定梨品种所包含的 *S* 基因 (*S*-RNase) 和 *S* 基因型便成了梨栽培、育种 (特别是杂交育种) 的重要环节。目前国内外主要运用分子生物学方法结合杂交授粉试验来确定 *S* 基因型, 常用的方法有 PCR-RFLP 技术、DNA 序列测定技术、cDNA 克隆及序列分析方法等。我国有近 2 000 个梨品种, 目前只有少数品种的 *S* 基因型被确定。由于国内梨品种的 *S* 复等位基因非常丰富, 利用现有的技术鉴别众多品种 *S* 基因型, 不仅工作量大, 花费时间长, 而且检测单个样本的 *S* 基因型成本较高, 自动化程度低。开发鉴定梨 *S* 基因型的新方法, 加快梨品种 *S* 基因型确定的步伐, 是当前梨自交不亲和研究的重要内容和梨生产实践急需解决的重大问题。

基因芯片 (genechips) 又称 DNA 芯片 (DNA chips) 或 DNA 微阵列 (DNA microarray), 基本原理是基于同源序列的配对。即根据目的基因设计相应的检测探针, 探针序列包含于目的扩增片段; 将探针有序地固定于芯片片基上, 在优化条件下, 将与已标记的待测样品中靶分子杂交, 并由样品和探针的互补序列形成稳定的双链结构, 通过检测杂交信号的强弱来获取样品的遗传信息 (Schena, 2004; 江南和谭晓风, 2007) 确定样品的基因类型。碱基互补配对原则的严谨性保证了杂交反应的特异性和检测的特异性。目前基因芯片已广泛应用于杂交测序、新基因发现、基因型的确定、突变检测和疾病诊断等诸多领域, 应用前景广阔。但国内外尚未见有梨或其他植物 *S*-RNase 基因芯片制作和应用的报道。本试验拟针对梨 *S*-RNase 基因的结构特点选择性地设计部分 *S*-RNase 特异的寡核苷酸探针, 试制梨自交不亲和性基因型检测寡核苷酸芯片, 并对运用芯片检测梨品种 *S* 基因型进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 植物材料与主要试剂及仪器

所用植物材料为梨树新鲜叶片, 从中国农业科学院郑州果树研究所和辽宁果树研究所采集, 共选用了 7 个品种, 分别为金梨、鲜黄、黄金、桂冠、黄花、大核白和青梨, 本实验室采用分子生物学技术已确定这些品种的 *S* 基因型分别为 $S_1 S_1$ 、 $S_3 S_5$ 、 $S_3 S_4$ 、 $S_2 S_{16}$ 、 $S_1 S_2$ (谭晓风等, 2005)、 $S_{16} S_{19}$ 、 $S_{19} S_{19}$ (乌云塔娜等, 2005)。

试剂: APTES (3-氨基丙基三乙氧基硅烷) 购自 Sigma 公司, 杂交液 购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 戊二醛购自 Amresco 公司, ExTaq 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司, PCR 产物纯化试剂盒购自安比奥试剂公司, 其他生化试剂和常用试剂均为分析纯。

主要仪器: PCR 扩增仪 (PCT-220), 恒温杂交仪 (SM-HP11), 扫描仪 (AXON-4100A), 凝胶成像仪 (GelDocEQ), 核酸、蛋白定量分光光度计 (Nanodrop ND-1000 V3.3.0)。

1.2 引物设计及合成

根据文献 (谭晓风等, 2005): *S* 基因 HV 区两端是保守序列, 根据 HV 区两端的保守序列分别设计正向引物 “FTQQYQ” (5'-TTTACGCAGCAA TATCAG-3') 和反向引物 “anti-WPNV” (5'-TTCG-GCCAAATAATT-3') (图 1)。正反向引物序列的 5 端合成时均修饰荧光物质 Cy3, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。



图 1 梨 *S*-RNase 基因结构及引物的位置

C: 保守区; HV: 高变区; RC: 相对保守区。

Fig. 1 The gene structure of pear *S*-RNase and its primer location

C: Conserved region; HV: Hyper variable region; RC: Relative conserved region

1.3 寡核苷酸探针设计及合成

根据 GenBank 及相关文献, 结合本实验室的研究成果, 获得 45 个 *S* 基因的 HV 区特异序列。HV 区是 *S*-RNase 特异识别花粉配体的专一区 (berger et al, 1991; Matton et al, 1997), 在不同 *S*-RNase 间变异较大, 是判断不同 *S* 基因的最重要依据。根据 HV 区特异序列设计特异寡核苷酸探针, 设计标准 (马文丽和郑文岭, 2002): 探针 T_m 值应接近整个基因组的平均 T_m 值, 上下波动 5 ;

探针分子内重复的单一碱基连续不超过 4 个; G+C 含量为 40% ~ 60%, 减少非特异性杂交并保证杂交的特异性; 探针分子内部稳定二级结构配对碱基长度少于 4 bp, 这样可以保证不会因探针内部稳定的二级结构而影响杂交效率; 经同源比较与其它序列的相似性小于 40%; 经比对与非探针备选序列的同源片段连续不超过 20 个碱基。最后选择性地设计出 6 个 *S* 基因 (*S*-RNase) 的寡核苷酸探针, 长度 32 bp。设计的探针合成时均 5 氨基修饰, 由上海基康生物技术有限公司合成。

1.4 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取采用本实验室改良的 CTAB 法 (谭晓风 等, 1999)。PCR 反应体系 50 μ L 包括 10 \times buffer 5 μ L, 25 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺ 4 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 4 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 5 Cy3 标记的正反向引物及 1.5 U ExTaq 聚合酶, 模板 DNA 25 ~ 30 ng, 补 SPW (超纯水) 至 50 μ L。PCR 反应双循环; 94 预变性 2 min; 94 变性 30 s, 48 退火 30 s, 70 延伸 2 min, 10 个循环; 94 变性 30 s, 48 退火 30 s, 70 延伸 1 min 30 s, 25 个循环; 70 延伸 7 min。PCR 反应结束后, 取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。用 PCR 产物纯化试剂盒对扩增理想的产物进行纯化。

1.5 芯片的制备与处理

寡核苷酸探针溶解于 pH 9.0 碳酸缓冲液中并稀释成终浓度 100 μ mol \cdot L⁻¹。按设计好的阵列将混合液手动点样至醛基化玻片 (普通载玻片经 APTES 和 5% 戊二醛处理) 上, 点样结束后 37 水化 2 h, 然后用 0.2% 硼氢化钠溶液处理 30 min, 再分别用 0.01% 磷酸缓冲液和双蒸水清洗芯片, 将芯片吹干备用。阵列设计见图 2。S₁、S₂、S₄、S₅、S₁₆ 和 S₁₉ 为 6 个 *S* 基因 PM 探针, S₁₆₋₁ 是 S₁₆ 的错配 (MM) 探针, 同等浓度的无关探针 (与 *S* 基因同源性很低的寡核苷酸序列) 作为阴性对照, 碳酸缓冲液作为空白对照。

S ₁	S ₁	S ₂	S ₂	S ₄	S ₄
S ₁	S ₁	S ₂	S ₂	S ₄	S ₄
S ₁₆	S ₁₆	S ₅	S ₅	S ₁₉	S ₁₉
S ₁₆	S ₁₆	S ₅	S ₅	S ₁₉	S ₁₉
S ₁₆₋₁	S ₁₆₋₁	无关探针 Uncorrelated probe	无关探针 Uncorrelated probe	碳酸缓冲液 Carbonate buffer	碳酸缓冲液 Carbonate buffer
S ₁₆₋₁	S ₁₆₋₁	无关探针 Uncorrelated probe	无关探针 Uncorrelated probe	碳酸缓冲液 Carbonate buffer	碳酸缓冲液 Carbonate buffer

图 2 *S* 基因检测阵列设计

Fig 2 Design of microarray probe detecting *S*-genotype

1.6 杂交和洗涤

按 1:1:1 的比例将纯化后的荧光 PCR 产物、杂交液和灭菌水混合, 95 水浴变性 5 min 后, 迅速插入冰中冷却, 然后将混合液加在芯片的阵列中, 每个阵列加混合液 12 μ L, 盖玻片封片, 将芯片封入湿盒中于杂交箱中 47 杂交 4 h, 杂交完毕后分别依次用 1 \times SSC/0.1% SDS、0.5 \times SSC/0.1% SDS、0.5 \times SSC 行梯度洗涤, 每次 3 min, 最后双蒸水洗涤数次, 吹干以备信号检测。

1.7 检测与分析

用 AXON-4100A 芯片扫描仪使用 Cy3 光源扫描 (580 nm), 扫描结果用 GenePix 分析软件进行分析。在扣除背景值后, 信号强度以每条探针重复点的均值计算。

2 结果与分析

2.1 不同杂交温度对杂交信号的影响

回收纯化 PCR 产物, 分别获得梨 S_1 、 S_2 、 S_4 、 S_5 、 S_{16} 、 S_{19} rNase 基因片段, 各片段分别与对应的探针杂交, 杂交温度梯度为 43、44、45、46、47、48、50、52、55。从图 3 可见, 在相同杂交时间内, 低温下杂交信号不强, 随温度升高, 杂交信号增强, 但达到 48 后明显减弱。综合比较, 梨基因芯片杂交温度以 47 为宜。

不同的 S -rNase 基因片段与对应探针杂交, 结果差异不大。低温杂交时适当延长杂交时间可提高杂交信号。

2.2 不同杂交时间对杂交信号的影响

以桂冠 (S_2S_{16}) 为杂交对象, 探究不同时间的影响 (在本项阵列点样时 S_5 与 S_{16} 位置对换), 结果如图 4, 可见杂交时间低于 3 h, 杂交信号较弱, 随着时间的增加, 杂交信号逐渐增强, 但超过 4 h, 非特异性杂交增强, 检测效果很差。因此梨基因芯片杂交时间以 4 h 为宜。

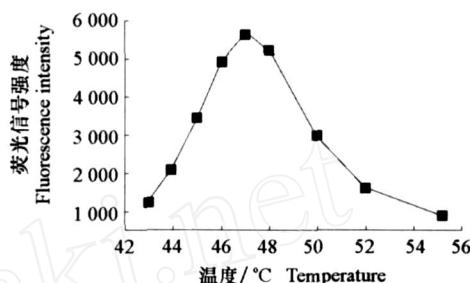


图 3 不同温度条件下杂交信号强度

Fig. 3 The fluorescence intensity at different temperature

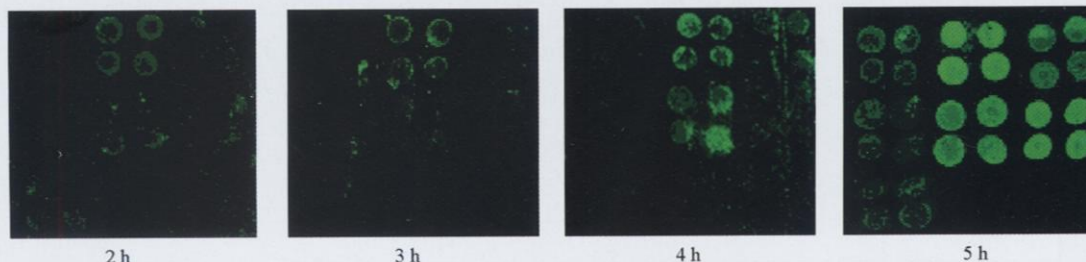


图 4 不同杂交时间杂交的信号强度

Fig. 4 The fluorescence intensity in different hybridization time

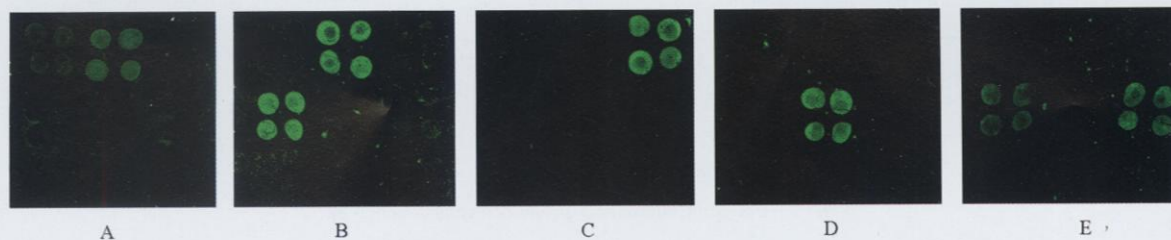


图 5 不同梨品种与芯片杂交的芯片信号扫描结果

A: 黄花 (含 S_1S_2); B: 桂冠 (含 S_2S_{16}); C: 黄金 (含 S_4); D: 鲜黄 (含 S_5); E: 大核白 (含 $S_{16}S_{19}$)。

Fig. 5 The scanning results of different pear cultivars hybridized with the microarray

A: Huanghua (contains S_1S_2); B: Guiguan (contains S_2S_{16}); C: Huangjin (contains S_4);

D: Xianhuang (contains S_5); E: Dahebai (contains $S_{16}S_{19}$).

2.3 不同 PCR 产物回收浓度对杂交信号的影响

以青梨 ($S_{19}S_{19}$) 为杂交对象, 回收纯化青梨 PCR 产物, 测定浓度, 选择 $OD_{260/280}$ 1.8 - 2.0 的扩增系列, 灭菌 SPW 将 PCR 产物稀释获得 20、40、60、80、100、120、140 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 等浓度梯度。试验证明浓度达到 80 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 时杂交信号较强, 且在 80 ~ 140 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 浓度范围内杂交信号强度变化不大, 所以确定芯片杂交时梨检测样品 PCR 产物浓度取折中值 100 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 。

2.4 梨品种自交不亲和基因型检测结果

采用上述适宜条件, 用寡核苷酸芯片检测黄花、桂冠、黄金、鲜黄、大核白 5 个已知自交不亲和基因型的梨品种, 结果如图 5。

根据所利用的杂交探针种类和杂交信号, 可以判别各品种所包含的 *S*-RNase 基因和 *S* 基因型分别是: 黄花 S_1S_2 、桂冠 S_2S_{16} 、黄金含 S_4 、鲜黄含 S_5 、大核白 $S_{16}S_{19}$ 。芯片检测的结果与我们过去用分子生物学技术检测的各品种的 *S* 基因型完全相符。重复杂交试验, 结果完全一致。

3 讨论

梨自交不亲和基因 (*S*-RNase) 寡核苷酸探针是根据梨 *S* 等位基因的 HV 区特异序列设计并合成的。梨 *S* 基因主要包括 5 个保守区 (conserved region, C 区)、一个高变区 (hyper variable region, HV 区) 和一个内含子区 (intron)。保守区中 C_1 、 RC_4 、 C_5 为疏水区, 与 *S*-RNase 的结构有关, C_2 、 C_3 为亲水区, 是 *S*-RNase 的活性部位, HV 区是 *S*-RNase 特异识别花粉配体的专一区 (Berger et al, 1991; Matton et al, 1997), 在不同 *S*-RNase 间变异较大, 是判断不同 *S* 基因的最重要依据。到目前为止, 在东方梨品种中已发现 45 个 *S* 复等位基因 (有文献支持的 *S* 复等位基因有 38 个即 $S_1 \sim S_{38}$), 但本试验中选择性地设计出 6 个 *S* 基因的寡核苷酸探针, 主要是考虑到不同 *S*-RNase 基因的 HV 区碱基序列差异存在着一个到数个氨基酸不等的差别 (乌云塔娜, 2003)。另外, 考虑到成本, 从不同差别区域内分别设计探针制成芯片, 以探究杂交的准确性和利用梨自交不亲和基因寡核苷酸芯片检测梨品种 *S* 基因型的可靠性, 为下一步实现梨自交不亲和基因寡核苷酸芯片高通量的研究打下基础。

利用纯化后的 PCR 产物与芯片杂交有利于提高杂交的特异性和检测准确度。从杂交后扫描的结果看, 各芯片信号扫描结果与各品种的已知基因型完全相符, 表明探针的特异性较好, 芯片检测的准确性可靠。探针 S_{16} 是基因 S_{16} 的 MM 探针 (错配一个碱基的探针), 图 5, B (桂冠 S_2S_{16} 与芯片杂交后的信号扫描结果) 与图 5, E (大核白 $S_{16}S_{19}$ 与芯片杂交后的信号扫描结果) 表明 MM 探针杂交信号极弱, 和完全配对的探针 (探针 S_{16}) 的杂交信号有明显的区别。

为保证杂交的特异性和适当速率下杂交的稳定性, 杂交过程中必须探索合适的杂交条件。合适的温度是保证杂交有效而特异进行的重要条件, 不仅可以为杂交提供能量, 增加单链之间的结合机会, 而且可以提高杂交速率。本试验综合比较了多个杂交温度, 以 47 °C 条件下各探针杂交效果较好。

杂交时间的控制也是保证杂交准确顺利进行的重要条件。一般来说, 低温杂交时间较长, 容易产生非特异性杂交, 高温杂交时间较短, 特异性杂交强。为此, 结合实际杂交温度, 比较了多个时间段的杂交信号, 可以得出适宜的杂交时间。梨 *S* 基因芯片以杂交时间 4 h 效果最佳。

在保证合适杂交条件的情况下, 最佳 PCR 产物的回收浓度能保证得到最佳的杂交信号, 芯片反应动力学表明 (Schena, 2004), PCR 产物浓度越高芯片杂交信号越强, 所以在一般情况下, 尽可能使用较高的 PCR 产物浓度。但探针分子浓度过高, 对芯片反应质量会有不好的影响, 芯片反应信号强度会缓慢下降。本试验比较了 PCR 产物系列浓度梯度的杂交反应, 发现 PCR 产物浓度为 20 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 便可检测到较弱的杂交信号, 达到 80 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 可得到较强的杂交信号, 且在 80 ~ 140 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 浓度范围内, 杂交信号强度变化不大, 所以确定 PCR 产物浓度以 100 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 为宜。

通过试验, 较成功地检验了部分梨自交不亲和基因寡核苷酸探针的特异性, 同时也证明了梨品种

自交不亲和基因型检测寡核苷酸芯片检测梨品种所包含的 *S*-RNase 基因和基因型是一种切实可行的检测方法。如果进一步将所有 *S*-RNase 基因的特异性探针集中于芯片上的一个阵列, 就能发挥基因芯片大量、快速、准确检测梨品种 *S* 基因型的重要作用, 这是下一步工作的重点。

References

- Jiang Nan, Tan Xiao-feng 2007. Identification technology for pear cultivar *S*-genotype based on genechip. Journal of Central-South University of Forestry & Technology, 27 (1): 104 - 108. (in Chinese)
- 江 南, 谭晓风. 2007. 基于基因芯片的梨品种 *S* 基因型鉴定的技术方法. 中南林业科技大学学报, 27 (1): 104 - 108.
- berger T R, Gohlke J R, Xu B, Kao T H. 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. Sex Plant Report, 4: 81 - 87.
- Kao T H. 1994. Gametophytic self-incompatibility a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. Plant Physiol, 105: 461 - 466.
- Ma Wen-li, Zheng Wen-ling 2002. Protocols and applications of DNA chip technology. Guangzhou: Guangdong Technology Press: 21 - 22. (in Chinese)
- 马文丽, 郑文岭. 2002. Protocols and applications of DNA chip technology. 广州: 广东科技出版社: 21 - 22.
- Matton D P, Maes D, Laublin G, Xike Q, Bertrand C, Morse D, Cappadocis M. 1997. Hyper variable domains of self-incompatibility RNase mediate allele-specific pollen recognition. Plant Cell, 9: 1757 - 1766.
- Schena M. 2004. Microarray analysis. Beijing: Technology Press: 86 - 227. (in Chinese)
- 谢纳 M. 2004. 生物芯片分析. 北京: 科学出版社: 86 - 227.
- Tan Xiao-feng, Qi Long-lin, Huang Xiao-guang, Gui Jun. 1999. DNA extraction from the leaves of camellia plants. Journal of Central-South Forestry University, 19 (4): 14 - 17. (in Chinese)
- 谭晓风, 漆龙霖, 黄晓光, 桂 君. 1999. 山茶植物叶片 DNA 提取, 中南林学院学报, 19 (4): 14 - 17.
- Tan Xiao-feng, Wuyun Ta-na, Nakanishi Tetsu, Li Xiu-gen. 2005. Identification and sequencing of seven new *S*-RNase genes from *Pyrus pyrifolia*. Journal of Central-South Forestry University, 25 (4): 1 - 6. (in Chinese)
- 谭晓风, 乌云塔娜, 中西 テツ, 李秀根. 2005. 中国沙梨 7 个自交不亲和基因的分离与测序. 中南林学院学报, 25 (4): 1 - 6.
- Tan Xiao-feng, Wuyun Ta-na, Nakanishi Tetsu, Li Xiu-gen, Cao Yu-fen, Yang Gu-liang. 2005. Isolation and identification of *S*₁₉-RNase gene of the *Pyrus bretschneideri* (Chinese pear). Journal of Central-South Forestry University, 25 (1): 1 - 3. (in Chinese)
- 谭晓风, 乌云塔娜, 中西 テツ, 李秀根, 曹玉芬, 杨谷良. 2005. 中国梨品种自交不亲和新基因的分离鉴定. 中南林学院学报, 25 (1): 1 - 3.
- Wuyun Ta-na. 2003. Isolation and identification of self-incompatible genes of Chinese *Pyrus bretschneideri* [Ph. D. Dissertation]. Changsha: Central-South University of Forestry & Technology. (in Chinese)
- 乌云塔娜. 2003. 中国梨自交不亲和基因的分离与鉴定 [博士论文]. 长沙: 中南林业科技大学.
- Wuyun Ta-na, Tan Xiao-feng, Bi Fang-cheng, Cao Yu-fen, Li Xiu-gen. 2005. Determination of 7 cultivars of the *S*-genotype and identification of two new allele of self-incompatibility of *Pyrus bretschneideri* (Chinese pear). Journal of Central-South Forestry University, 25 (4): 7 - 12. (in Chinese)
- 乌云塔娜, 谭晓风, 毕方铨, 曹玉芬, 李秀根. 2005. 中国白梨 *S* 基因研究 17 个品种 *S* 基因型的确定和 2 个新 *S* 基因的鉴定. 中南林学院学报, 25 (4): 7 - 12.
- Xue Yong-biao, Meng Jin-ling. 1995. Molecular biology of higher plant self-incompatibility. Progress in Biotechnology, 15 (1): 32 - 42. (in Chinese)
- 薛勇彪, 孟金陵. 1995. 高等植物自交不亲和性的分子生物学. 生物工程进展, 15 (1): 32 - 42.
- Xu Yi-liu, Zhang Shao-ling. 2003. Characterization and molecular mechanism of gametophytic self-incompatibility in pears. Journal of Fruit Science, 20 (1): 59 - 63. (in Chinese)
- 徐义流, 张绍铃. 2003. 梨配子体自交不亲和性及其分子机理. 果树学报, 20 (1): 59 - 63.