

枣叶绿体基因组 DNA 提取方法研究

杨晓婷, 黄建, 张春梅, 李新岗\*

(西北农林科技大学 林学院, 国家林业局枣工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**提取高质量的叶绿体基因组 DNA 是叶绿体基因组测序分析的重要环节。研究以冬枣、晋枣成熟叶片为材料, 采用高盐-低 pH 法和改良的高盐-低 pH 法比较研究枣叶绿体分离和叶绿体 DNA(cpDNA)提取。结果表明, 高盐-低 pH 法提取的 cpDNA, 其  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  值均为 1.28, 质量低, 不能满足后续测序要求; 改良高盐-低 pH 法提取的 cpDNA 产量明显得到提高, 且 cpDNA 结构完整、质量高、纯度好,  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  值介于 1.8~2.0, 无降解现象, RNA 消化完全, 能满足后续测序要求。

**关键词:**枣; 叶绿体基因组; cpDNA 提取; 改良高盐-低 pH 法

**中图分类号:**S665.1      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2015)02-0105-06

An Optimized Chloroplast DNA Extraction Protocol for Chinese Jujube

YANG Xiao-ting, HUANG Jian, ZHANG Chun-mei, LI Xin-gang\*

(College of Forestry, Centre of Jujube Engineering and Technology of State Forestry Administration, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:**Chloroplast genomes supply valuable genetic information for evolutionary and functional studies in plants; However, extraction of high quality chloroplast DNA (cpDNA) is a critical step before chloroplast genomes sequencing. Mature leaves collected from two cultivars (Dongzao and Jinzao) were used for chloroplast and cpDNA isolation in present study. High-salt low-pH method and a modified high-salt low-pH method were utilized for cpDNA isolation. The results showed: the value of  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  of cpDNA isolated by the original method was 1.28, therefore, it can't meet the requirements of subsequent chloroplast genomes sequencing. However, the yields of cpDNA extraction by the modified method were dramatically higher than that by the routine method, and the extracted cpDNA of mature leaves by this improved method was integral, high-quality and pure. In addition, the value of  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  was 1.8 to 2.0, degradation was nearly free, and the RNA was eliminated completely. Thus, the quality of cpDNA extracted by this modified high-salt low-pH method can meet the requirements of subsequent chloroplast genomes sequencing.

**Key words:***Ziziphus jujuba*; chloroplast genome; cpDNA extraction; modified high-salt low-pH method

枣(*Ziziphus jujuba*)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)植物,是原产于我国的特有果树<sup>[1]</sup>,具有很高的经济价值和药用价值。晋陕黄河河谷是枣的起源中心,有丰富的枣品种资源,也是枣树栽培最早的地区之一<sup>[2]</sup>。利用分子生物学技术,探究枣

品种间的遗传多样性和亲缘关系,对枣种质资源的保存、评价及科学利用具有重要意义。近年来,随着高通量测序技术的快速发展,越来越多的植物细胞器基因组,如叶绿体<sup>[3-5]</sup>、线粒体基因组<sup>[6]</sup>先后开展了测序,从而利用植物细胞器基因组信息研究遗传

收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-06-17  
基金项目:国家林业局公益性行业专项(201304110);陕西省自然科学基金(2013JQ3001)。  
作者简介:杨晓婷,女,在读硕士生,研究方向:枣树叶绿体基因组。E-mail: yangxiaoting@nwsuaf.edu.cn  
\* 通信作者:李新岗,男,教授,博士生导师,研究方向:红枣产业技术。E-mail: xingangle@nwsuaf.edu.cn

多样性与遗传进化。叶绿体是绿色植物光合作用的主要细胞器。作为半自主性细胞器,它的形成是叶绿体基因组和核基因组相互作用的结果<sup>[7]</sup>,也是植物细胞质遗传的重要单位,具有相对独立的遗传物质,即叶绿体 DNA(cpDNA),在植物系统发育中具有广泛的作用<sup>[8]</sup>。正是由于其特殊的优势,叶绿体基因组已在分子标记<sup>[9]</sup>、遗传结构分析<sup>[10]</sup>、起源演化<sup>[11]</sup>、核质互作和植物基因工程<sup>[12]</sup>等领域开展了广泛研究。众所周知,由于植物叶绿体 DNA 提取难度较大,已报道的文献中,草本(特别是禾本科)植物 cpDNA 提取的研究较多<sup>[13-16]</sup>,而多年生木本植物中只有枇杷<sup>[17]</sup>、厚朴<sup>[18]</sup>等几种植物成功提取了 cpDNA,其中,有关枣叶绿体基因组 DNA 的提取报道尚少。所以,依据现有植物 cpDNA 提取方法为基础<sup>[13,19]</sup>,建立适用于枣叶绿体基因组 DNA 的提取方法,并测试分析所得 cpDNA 质量,为枣叶绿体基因组测序提供高质量的 cpDNA。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品准备

供试材料为冬枣、晋枣 2 个品种,冬枣叶片采自陕西省大荔县下寨镇毕家村(34°42'258" N,109°45'359" E),晋枣叶片采自陕西省清涧县宽州镇牛家湾村西北农林科技大学红枣试验站(37°07'727" N,110°04'891" E)。2013 年 5—6 月取健康成熟叶片,于车载冰箱中带回实验室。采回的成熟枣叶经蒸馏水冲洗干净,在滤纸上吸干水分,每个样品称约 20 g 用纱布包裹,于 4℃ 冰箱黑暗处饥饿处理 48~72 h 后,放入保鲜袋内,置于-80℃ 的低温冰箱中保存备用。

### 1.2 主要试剂及仪器

SDS、BSA 和蛋白酶 K 均为美国 Amresco 公司产品,Tris 平衡酚(pH 8.0)为北京索莱宝科技有限公司产品,DTT 为德国 Merck 公司产品,RNase A 为 Takara 公司产品,氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、醋酸钾等其他常规试剂均为国产分析纯。所用植物组织破碎仪为瑞士 KINEMATICA AG-PT6100 型,离心机为日立高速冷冻离心机 CR22G III 型;电热恒温水浴锅为上海森信实验仪器有限公司 DK-S26 型;琼脂糖凝胶电泳仪为北京市六一仪器厂 DYY-12 型;凝胶成像分析仪为北京市六一仪器厂 WD-9413B 型,显微镜为日本奥林巴斯显微镜 BX43 型,核酸蛋白检测仪为美国 MAESTROGEN 超微量分光光度计 MaestroNano。

### 1.3 cpDNA 提取

1.3.1 高盐-低 pH 法 参照 SHI C<sup>[19]</sup> 等方法。

1.3.2 改良高盐-低 pH 法 参考 SHI C<sup>[19]</sup> 的方法,并进行改进。

1)匀浆:将饥饿处理的叶片去中脉,剪成 1 cm 长短,装入匀浆器缸中,迅速加入预冷的 Buffer A (1.25 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,0.25 mol·L<sup>-1</sup> Vc 即抗坏血酸,10 mmol·L<sup>-1</sup> 焦亚硫酸钠,0.012 5 mol·L<sup>-1</sup> 硼砂,pH 8.0 的 Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>,pH 8.0 的 EDTA 7 mmol·L<sup>-1</sup>,1% 的 PVP-K30 即聚乙烯吡咯烷酮( $w/v$ ),0.1% 的 BSA 即牛血清蛋白( $w/v$ ),1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 即二硫苏糖醇(BSA 和 DTT 现用现加),pH 3.8)400 mL,于植物组织破碎仪上破碎。破碎过程中尽量避免发热,先低速(3 000 r·min<sup>-1</sup>)匀浆 5 s,2 次;后高速(8 500 r·min<sup>-1</sup>)匀浆 10 s,3 次。如此重复 1 次,使得材料匀浆完全。

2)过滤:用单层 200 目尼龙网过滤匀浆液至 500 mL 离心瓶中,静置 2 min;4℃,1 220 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,取上清液;重复离心 1 次。

3)粗提:4℃,5 110 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,弃上清。

4)纯化:沉淀中加入 250 mL Buffer B(1.25 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,0.012 5 mol·L<sup>-1</sup> 硼砂,1% 的 PVP-K30( $w/v$ ),50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.0 的 Tris-HCl,25 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.0 的 EDTA,0.1% 的 BSA( $w/v$ ),1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT(BSA 和 DTT 现用现加),pH 8.0),用合适大小的无菌软毛笔轻轻洗刷沉淀,使之充分悬浮;4℃,5 110 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,弃上清。

5)再纯化:再次向沉淀中加入 250 mL Buffer B,用无菌软毛笔将沉淀轻轻悬浮;4℃、5 300 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,弃上清,所得沉淀即为纯化的叶绿体。用显微镜检测叶绿体的完整性。

6)裂解:向纯化的叶绿体沉淀中加入 8 mL Buffer C(100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl,100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.0 的 Tris-HCl,50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,1 mM DTT(DTT 现用现加)),1.5 mL 20% SDS、20  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇、30  $\mu$ L 蛋白酶 K(10 mg/mL),充分混匀,转至 50 mL 离心管中,55℃ 水浴锅中培养过夜,使得叶绿体充分裂解,释放出 cpDNA。

7)裂解结束后,将此裂解液冰浴 5 min,后加入 1.5 mL 5 M 的 KAc(pH 5.7),混匀后继续冰浴 30 min;4℃,6 690 r·min<sup>-1</sup>,离心 15 min,移液枪小心吸取上清液。

8)抽提:加入与上清等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,每次需充分摇晃混匀,4℃,6 690 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min。离心后,液体分 3

层,包括上层水相、中层变性蛋白相及下层有机溶剂相。

9)用截粗的 tip 头小心转移上层透明液相至新的 50 mL 离心管中,加入等体积预冷的异丙醇(约 7 mL),轻摇混匀后,−20℃ 沉淀叶绿体基因组 DNA 至少 1 h。

10)4℃,6 690 r · min<sup>−1</sup>,离心 20 min,弃上清,最终得到了叶绿体基因组 DNA 。用弯钩针头轻轻将沉淀挑出,置于 1.5 mL 离心管中。

11)用预冷的 70% 乙醇、无水乙醇清洗 cpDNA 沉淀。

12)自然风干沉淀,加 50 μL 1×TE Buffer(pH 8.0)于 4℃ 冰箱溶解过夜,轻缓混匀,得到 cpDNA 原液。

13)加 2 μL RNase A(去 Dnase,10 mg/mL)处理 cpDNA 原液,37℃ 温育 1 h,自然冷却后,得到 cpDNA 处理液,−20℃ 保存备用。

1.4 cpDNA 检测

1.4.1 cpDNA 质量检测 取 2 μL cpDNA 处理液,在核酸蛋白检测仪上测定核酸含量,用 1×TE

Buffer(pH 8.0)作空白对照校 0 点,记录 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 值、OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>230nm</sub> 值及质量浓度。

1.4.2 凝胶电泳检测 取 5 μL cpDNA 处理液,加 1 μL 上样缓冲液混匀,在 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶中电泳,指示 Marker(1 kb DNA Ladder Marker)上样量为 4 μL,电泳缓冲液为 1×TAE,电压为 110 V,电流为 120 mA,电泳大约 1.5 h 后,琼脂糖凝胶经 EB 染色,在紫外凝胶成像系统下检测其完整性及 RNA 去除情况,并拍照。

2 结果与分析

2.1 枣叶绿体完整性检测

采用高盐-低 pH 法(记为方法 I)和改良高盐-低 pH 法(记为方法 II),分离得到了枣叶绿体。图 1 显示,方法 II 所得沉淀较方法 I 多。由图 2 可以看出,2 种方法分离得到的叶绿体结构均比较完整,基本无破碎,无污染,背景清晰。对比发现,冬枣、晋枣经改良高盐-低 pH 法所得到的叶绿体含量更高、数量更多,可保证获得高质量的 cpDNA。

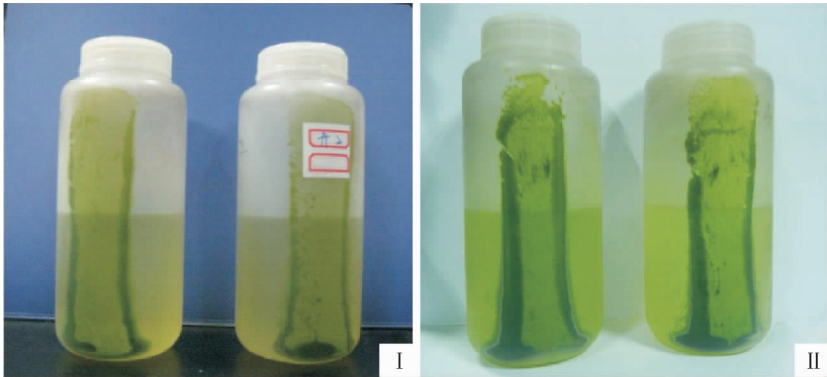


图 1 高盐-低 pH 法 (I) 和改良高盐-低 pH 法 (II) 分离得到的枣叶绿体沉淀比较

Fig. 1 Chloroplast precipitates of jujube seperated by high-salt low-pH (I) and modified high-salt low-pH (II) methods

2.2 枣 cpDNA 质量检测

由表 1 可以看出,方法 II 提取的枣 cpDNA 质量浓度显著高于方法 I。方法 I 提取的 2 个品种的叶绿体基因组 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 值均为 1.28,<1.8,说明样品中残存的蛋白质、酚类及多糖类杂质含量高,cpDNA 断裂严重,含有较多的碎片,纯度不高。方法 II 提取的叶绿体基因组 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 值均为 1.96,超过 1.8 而<2.0,表明所提取的 cpDNA 纯度高,污染少;冬枣、晋枣的叶绿体基因组 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>230nm</sub> 值分别为 2.04 和 2.08,均>2.0,说明基本不存在多糖、碳水化合物等的污染。上述可知,改良高盐法所提取的叶绿体满足测序要求,更适合枣叶绿体基因组 DNA 的提取。

表 1 2 种方法提取的 cpDNA 紫外分析结果

Table 1 UV scanning results of cpDNA extracted by two methods				
样品 编号	提取 方法	OD <sub>260nm</sub> / OD <sub>280nm</sub>	OD <sub>260nm</sub> / OD <sub>230nm</sub>	质量浓度 /(μg · μL <sup>−1</sup> )
A	I	1.28	1.30	1.713
B		1.28	1.40	1.591
A	II	1.96	2.04	2.908
B		1.96	2.08	2.791

注:A、B 分别代表冬枣和晋枣;I、II 分别对应高盐-低 pH 法和改良高盐-低 pH 法。

2.3 枣 cpDNA 电泳检测

琼脂糖凝胶电泳结果(图 3)可以看出:方法 I 提取的 cpDNA 带型不整齐,可能原因是由于多糖

去除不彻底,紧紧包裹住 cpDNA,且条带有明显的拖尾现象,说明 cpDNA 有降解;方法Ⅱ提取的 cpDNA 主带整齐、清晰,亮度均匀一致,无降解现象,且 RNA 消化完全,说明多糖、RNA 及其他次生物等杂

质去除的比较干净,纯度较高,完整性也较好。另外,根据色带的深浅可以大概估计 cpDNA 的产量。由图 3 可知,方法Ⅱ所得 cpDNA 产量高于方法Ⅰ,与核酸蛋白检测仪的定量分析结果一致。

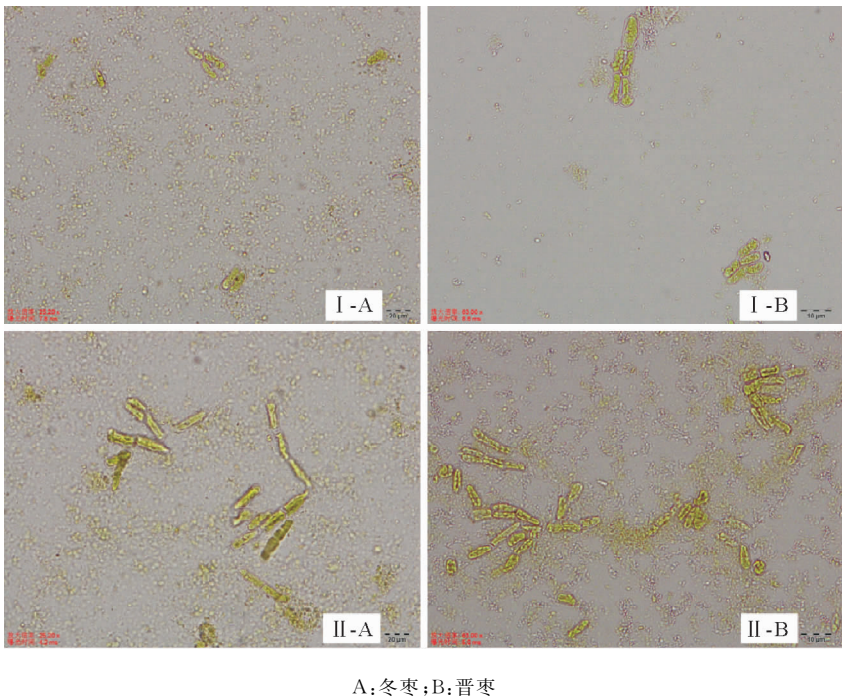


图 2 高盐-低 pH 法(Ⅰ)和改良高盐-低 pH 法(Ⅱ)分离的枣叶绿体显微图片

Fig. 2 Chloroplast micrographs of jujube separated by high-salt low-pH (Ⅰ) and modified high-salt low-pH (Ⅱ) methods

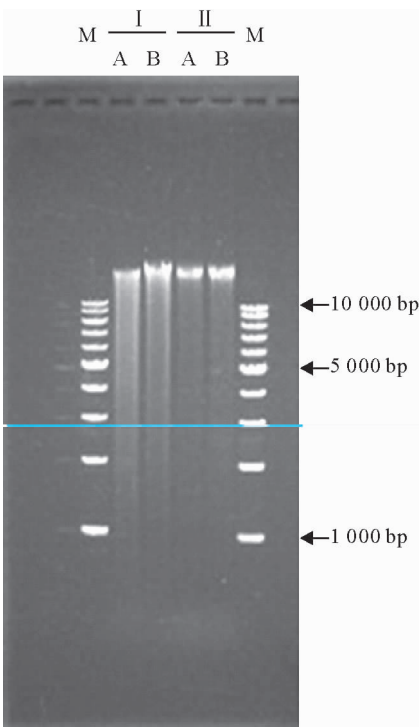


图 3 高盐-低 pH 法(Ⅰ)和改良高盐-低 pH 法(Ⅱ)提取的枣 cpDNA 电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of cpDNA of jujube extracted by high-salt low-pH (Ⅰ) and modified high-salt low-pH (Ⅱ) methods

3 讨论

高质量的 DNA 样品制备是基因组测序研究的首要步骤。相对于核基因组 DNA 的提取,叶绿体基因组 DNA 的提取困难更大,首先必须得到完整的叶绿体。叶绿体 DNA 分离过程中,可能存在核 DNA、线粒体 DNA 污染,以及叶绿体的完整性等问题,这些都是制约叶绿体 DNA 提取的关键因素。

目前,常用于植物叶绿体基因组 DNA 提取的方法有 DNase I 处理法<sup>[20]</sup>、蔗糖密度梯度离心法<sup>[21]</sup>、Perco II 梯度法<sup>[22]</sup>、无水法<sup>[23]</sup>和高盐-低 pH 法等。DNase I 处理法采用 DNase I 消化掉附着在叶绿体膜上的核 DNA,但由于经匀浆和多次离心后,大部分叶绿体膜很难保持完整,结果膜内的 cpDNA 也被消化掉,造成得率很低<sup>[19]</sup>。蔗糖密度梯度离心法虽可有效去除 cpDNA 提取过程中掺杂的核 DNA,但 SHI C<sup>[19]</sup>等发现,植物组织取样量为 20 g 时,蔗糖梯度离心法不利于叶绿体的分离,造成 cpDNA 得率很低,所以琼脂糖凝胶电泳条带很弱。高盐-低 pH 法可以克服上述缺点,同时得到高纯度的完整叶绿体,因为叶片在高速匀浆过程中产生大量静电,核 DNA 被组蛋白包裹带正电,紧紧地吸附在带负电的叶绿体膜上;这种静电作用在高盐介质

环境中电子屏蔽作用大大减弱,可通过 pH 值变化和反复洗涤去除吸附的核 DNA<sup>[24]</sup>。侯典云<sup>[13]</sup>等、龙兴<sup>[25]</sup>等、欧立军<sup>[15]</sup>等以高盐-低 pH 法为基础,分别针对小麦、香蕉、水稻等不同试材进行方法改良,成功提取了 cpDNA;李朋波<sup>[26]</sup>等利用高盐-低 pH 法提取的叶绿体基因组 DNA 首次构建了棉花叶绿体的 Fosmid 文库,并用于叶绿体基因组测序、基因功能分析和分离特定基因,为研究棉属进化和叶绿体基因功能提供了重要基础。

研究采用了优化的高盐-低 pH 法<sup>[19]</sup>,并加以改良,选取冬枣和晋枣成熟叶片提取 cpDNA。提取之前,把新鲜叶片黑暗饥饿 48~72 h,使叶片充分消化组织中的淀粉,以减少糖类物质对 DNA 分离纯化的干扰<sup>[13,15,27]</sup>。破碎过程中,先低速匀浆,后高速匀浆,避免发热,保证叶绿体的完整性,提高分离叶绿体的效率。SHI C<sup>[19]</sup>等的方法有效地提取了短花药野生稻、假稻、扁核木 3 个种的 cpDNA,但此方法不适于枣叶绿体基因组 DNA 提取,检测效果不佳。经核酸测定仪检测,该方法提取的 2 个枣品种的叶绿体基因组 DNA  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  值均 $<1.8$ ,纯度较低,可能含有较多的蛋白质或酚类物质; $OD_{260nm}/OD_{230nm}$  值均 $<2.0$ ,表明 DNA 样品中有残存的盐和小分子杂质。琼脂糖凝胶检测结果也发现电泳条带不整齐,且有严重的拖尾现象,说明 cpDNA 发生了降解。改良高盐-低 pH 法所提取的 DNA 质量浓度明显提高,且  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  值介于  $1.8\sim2.0$ ,说明所提取的 cpDNA 纯度较高,没有蛋白质的污染; $OD_{260nm}/OD_{230nm}$  值均 $>2.0$ ,说明多糖、碳水化合物等杂质去除的比较干净;琼脂糖凝胶电泳得到的条带整齐、清晰,亮度均匀一致,无降解现象,经检验可用于枣叶绿体基因组的测序分析。

## 4 结论

本研究比较了冬枣、晋枣成熟叶片叶绿体基因组 DNA 的 2 种提取方法,核酸蛋白检测仪和琼脂糖凝胶电泳检测结果都表明,改良高盐-低 pH 法提取的 cpDNA 结构完整、质量高、纯度好。所以,改良后的高盐-低 pH 法适于枣叶绿体 DNA 的制备,为枣叶绿体基因组测序研究奠定了基础。

## 参考文献:

[1] 曲泽洲,王永蕙. 中国果树志(枣卷)[M]. 北京:中国林业出版社,1993:1-5.

[2] 高京草,王长柱,曹导叶. 陕西省枣资源评价与开发利用建议[J]. 西北林学院学报,2005,20(4):96-100.

GAO J C, WANG C Z, CAO D Y. Evaluation on jujube germplasm and suggestion for utilization of Shaanxi province[J].

Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(4):96-100. (in Chinese)

[3] SUN Y X, MOORE M J, MENG A P, *et al.* Complete plastid genome sequencing of Trochodendraceae reveals a significant expansion of the inverted repeat and suggests a paleogene divergence between the two extant species [J]. Plos One, 2013, 8(4):e60429.

[4] LI R, MA P F, WEN J, *et al.* Complete sequencing of five Araliaceae chloroplast genomes and the phylogenetic implications [J]. Plos One, 2013, 8(10):e78568.

[5] MIDDLETON C P, SENERCHIA N, STEIN N, *et al.* Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe [J]. Plos One, 2014, 9(3):e85761.

[6] MA L, HUANG D W, CUOMO C A, *et al.* Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis* [J]. The Faseb Journal, 2013, 27(5):1962-1972.

[7] 刘良式. 植物分子遗传学[M]. 北京:科学出版社,2003.

[8] 刘志文,韩旭,李莉,等. 叶绿体和线粒体 DNA 在植物系统发育中的应用进展 [J]. 河南农业科学,2008(7):5-9.

[9] NISHIKA W T, VAUGHAN D A, KADOWAKI K. Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes [J]. Theor. Appl. Genet., 2005, 110:696-705.

[10] 陈涛,王小蓉,罗华,等. 9 个野生中国樱桃群体叶绿体 DNA *trnQ-rps16* 序列变异及其遗传结构分析 [J]. 遗传, 2012, 34(11):1475-1483.

CHEN T, WANG X R, LUO H, *et al.* Chloroplast DNA *trnQ-rps16* variation and genetic structure of nine wild Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) populations [J]. Hereditas (Beijing), 2012, 34(11):1475-1483. (in Chinese)

[11] XU D H, ABE J, GAI J Y, *et al.* Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild cultivated soybeans:evidence for multiple origins of cultivated soybean [J]. Theor. Appl. Genet., 2002, 105:645-653.

[12] LELIVELT C L, MCCABE M S, NEWELL C A, *et al.* Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(6):763-774.

[13] 侯典云,马占强,徐虹,等. 小麦叶绿体 DNA 提取方法研究 [J]. 河南农业科学,2011,40(10):38-40.

HOU D Y, MA Z Q, XU H, *et al.* Study on extraction method of wheat chloroplast DNA [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2011, 40(10):38-40. (in Chinese)

[14] 王化坤,乔玉山,娄晓鸣,等. 拟南芥叶绿体 DNA 全序列微卫星分布规律的分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(10):845-850.

WANG H K, QIAO Y S, LOU X M, *et al.* Distribution of microsatellite from complete sequence of *Arabidopsis thaliana* chloroplast DNA [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(10):845-850. (in Chinese)

[15] 欧立军,黄光文,王京京,等. 水稻叶绿体 DNA 提取和纯化方法优化 [J]. 湖南师范大学自然科学学报,2006,29(1):



92-94.

OU L J, HUANG G W, WANG J J, *et al.*, The improvement of a method to extract and purify rice chloroplast DNA [J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2006, 29(1):92-94. (in Chinese)

[16] 姚丹, 闫伟, 关淑艳, 等. 高盐低 pH 值法提取大豆不同组织 DNA 的效果 [J]. 河南农业科学, 2009(12):50-54.

YAO D, YAN W, GUAN S Y, *et al.* Extraction effect of genomic DNA from different tissues of soybean with high-salt low-pH methods [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2009(12):50-54. (in Chinese)

[17] 孙晓荣, 易鼎杰, 何 桥, 等. 三倍体枇杷叶绿体 DNA 提取方法的优化 [J]. 西南师范大学学报:自然科学版, 2012, 37(2):93-96.

SUN X R, YI D J, HE Q, *et al.* Optimization of the methods for extracting triploid locquat cpDNA [J]. Journal of Southwest China Normal University: Nat. Sci. Edi., 2012, 37(2): 93-96. (in Chinese)

[18] 李西文, 胡志刚, 林小涵, 等. 基于 454FLX 高通量技术的厚朴叶绿体全基因组测序及应用研究 [J]. 药学报, 2012, 47(1):124-130.

LI X W, HU Z G, LIN X H, *et al.* High-throughput pyrosequencing of the complete chloroplast genome of *Magnolia officinalis* and its application in species identification [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(1):124-130. (in Chinese)

[19] SHI C, HU N, HUANG H, *et al.* An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing [J]. Plos One, 2012, 7(2):e31468.

[20] HERMANM R G. Methods in chloroplast molecular biology [M]. New York:Elsevier Amsterdam, 1982.

[21] HIRAI A, ISHIBASHI T, MORIKAMI A, *et al.* Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the 32 KD photosystem II reaction center protein [J]. Theor Appl Genet, 1985, 70(2):117-122.

[22] HEINHORST S, GANNON C G, GALUN E, *et al.* Clone bank and physical and genetic map of potato chloroplast DNA [J]. Theor Appl Genet, 1998, 75(2):244-251.

[23] WU N H, COTE J C, WU R. Structure of the chloroplast *psbA* gene encoding the QB protein from *Oryza sativa* L. [J]. Develop Genet, 1987, 8(5-6):339-350.

[24] 刘少林, 靖深蓉, 郭立平, 等. 用改进的高盐低 pH 法分离和纯化棉花叶绿体及叶绿体 DNA [J]. 棉花学报, 1997, 9(5): 239-241.

LIU S L, JING S R, GUO L P, *et al.* Purification of cotton chloroplast and chloroplast DNA using the improved method of high salt concentration and low pH [J]. Acta Gossypii Sinica, 1997, 9(5):239-241. (in Chinese)

[25] 龙兴, 曾继吾, 黄秉智, 等. 香蕉叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(3):534-537, 542.

LONG X, ZENG J W, HUANG B Z, *et al.* The method for isolation of banana chloroplast and cpDNA [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2008, 30(3): 534-537, 542. (in Chinese)

[26] 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(1):10-14.

LI P B, XUE L F, WANG Y X, *et al.* Construction of a Fosmid library of chloroplast genome in *Gossypium raimondii* [J]. Cotton Science, 2011, 23(1):10-14. (in Chinese)

[27] 赵卫国, 赵巧玲, 张志芳, 等. 桑树叶绿体基因组 DNA 的提取及部分序列分析 [J]. 蚕业科学, 2001, 27(4):303-305.

ZHAO W G, ZHAO Q L, ZHANG Z F, *et al.* A rapid cpDNA isolation of mulberry, *Morus* L. and analysis of part sequence [J]. Canye Kexue, 2001, 27(4):303-305. (in Chinese)

(上接第 99 页)

[9] 蔡晋翔, 徐守成, 党玉贵. 青海云杉强化育苗施肥对比试验[J]. 青海农林科技, 2011(1):55-56.

CAI J X, XU S C, DANG Y G. Compare test on fertilization on enhanced seedling of picea crassifolia[J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry, 2011(1):55-56. (in Chinese)

[10] JONSSON A, ERICSSON T, Eriksson G, *et al.* Interfamily variation in nitrogen productivity of *Pinus sylvestris* seedlings [J]. Scandinavian Journal of Forest Research, 1997, 12(1): 1-10

[11] LI BAILIAN, MCKEAND S E, ALLEN H L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings[J]. Forest Science, 1991, 37(2):613- 626.

[12] 张宏斌, 吕东, 赵明, 等. 青海云杉半同胞子代测定和优良家系选择研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(3):82-87.

ZHANG H B, LV D, ZHAO M, *et al.* Half-sib progeny test and superior families selection of *Picea crassifolia* [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(3): 82-87. (in Chinese)

[13] 雷军, 张宏斌, 范菊萍. 青海云杉无性系种子园开花习性[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(6):70-74.

LEI J, ZHANG H B, FAN J P. Blooming and fruiting characteristics in clonal seed orchard of *Picea crassifolia* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(6): 70-74. (in Chinese)