

# 适合于胞质基因组扩增的红麻成熟叶片 DNA 提取改良方法

徐建堂<sup>1,2</sup>, 祁建民<sup>1,2</sup>, 陈 涛<sup>1,2</sup>, 陈美霞<sup>3</sup>, 方平平<sup>1,2</sup>, 陶爱芬<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 福建农林大学作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福州 350002; <sup>2</sup> 福建农林大学农业部东南

黄红麻科学观测站, 福州 350002; <sup>3</sup> 宁德师范学院, 宁德 352100)

**摘要:** 为了从成熟红麻叶片中提取高质量、高产量的基因组 DNA, 针对红麻成熟叶片中多糖、多酚含量较高的特性, 利用改良 CTAB 法及改良 SDS 法分别提取红麻品种福红 952 成熟叶基因组 DNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定进行 DNA 质量检测。结果表明: 改良 CTAB 法提取的基因组 DNA 电泳时点样孔干净, 条带整齐无拖带,  $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.9 左右, 产率可达 1.84  $\mu\text{g/g}$ , 其质量、产量都高于改良 SDS 法, 所提取的 DNA 可用于红麻 RAPD 分子标记、线粒体 DNA、叶绿体 DNA 通用引物 PCR 扩增。改良 CTAB 法是提取成熟红麻叶片 DNA 的有效方法, 并且可用于红麻分子标记及胞质基因组学研究。

**关键词:** 红麻; DNA 提取; CTAB 法; 线粒体 DNA; 叶绿体 DNA

## The Improvement Method of Extraction DNA in Mature Kenaf Leaves Suitable for Cytoplasmic Genome Amplifying

XU Jian-tang<sup>1,2</sup>, QI Jian-min<sup>1,2</sup>, CHEN Tao<sup>1,2</sup>, CHEN Mei-xia<sup>3</sup>,

FANG Ping-ping<sup>1,2</sup>, TAO Ai-fen<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops/Fujian

Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; <sup>2</sup> Ministry of Agriculture of Southeast Jute&Kenaf

Scientific Observation Experimental Station, Fuzhou 350002; <sup>3</sup> Ningde Normal University, Ningde 352100)

**Abstract:** The research aimed to extract the high quality and yield genomic DNA from mature kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves. According to the character of mature kenaf leaves containing more amylase and polyphenol than young leaves, the kenaf varieties Fuhong 952 mature leaves were extracted by improved CTAB and SDS methods, and they were identified by agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectrophotometer methods. The results showed that the sample hole was clean with no pulling,  $OD_{260}/OD_{280}$  was about 1.9, the yield rate was up to 1.84  $\mu\text{g/g}$ , and its quality and yield was higher than that extracted by improved SDS method. Genomic DNA extracted by improved CTAB also can be used in kenaf RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers, mitochondrial DNA, and chloroplast DNA universal primer PCR amplification. Therefore, the improved CTAB method was an effective method for extracting the high quality and yield genomic DNA from mature kenaf leaves, and it could be used for the kenaf molecular markers and cytoplasmic genomics research.

**Key words:** Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.); genomic DNA extraction; CTAB method; mitochondrial DNA; chloroplast DNA

收稿日期: 2012-04-19 修回日期: 2012-07-10 网络出版日期: 2012-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20121219.1724.001.html>

**基金项目:** 福建省科技厅南方黄/红麻种质资源创新平台(2010N2002); 农业部东南黄红麻科学观测站[农科教(2011)9号]; 福建省自然科学基金项目(2010J0546)

**作者简介:** 徐建堂, 博士, 研究方向: 植物生物化学与分子生物学研究。E-mail: cnfiber@126.com

通信作者: 祁建民, 教授, 博导, 研究方向: 作物遗传育种与综合利用。E-mail: qijm863@163.com

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 为锦葵科木槿属短日照 1 年生韧皮纤维作物,在麻纺、造纸、板材、动物饲料、可降解地膜、食用和药用等领域被广泛开发利用<sup>[1]</sup>。随着分子生物学的发展,通过提取植物 DNA 进行基因文库构建、基因克隆、遗传转化、分子标记等已在各种植物的研究中迅速展开<sup>[2-5]</sup>。在这些技术的操作过程中,提取高质量 DNA 样品是必要前提,能够有效提取高质量 DNA,一直是广大生物技术工作者关心的问题,特别是广西大学周瑞阳等<sup>[6]</sup>发现了红麻细胞质雄性不育系,开拓了红麻杂种优势利用研究新领域,红麻的分子生物学研究进入亚细胞水平,即研究线粒体 DNA 和叶绿体 DNA。

植物含有大量的酚类物质及其次生代谢物质,在 DNA 提取过程中通常会受到这些次生代谢物质的干扰,影响 DNA 的质量和产量,因此对这类不同植物进行 DNA 分离时,其提取缓冲液和分离步骤应有相应的变化并优化其技术体系<sup>[7-8]</sup>。红麻成熟叶片中含有多糖、多酚及其他次生代谢产物,这些次生物质在 DNA 提取过程中常与核酸形成复合物,形成粘稠的胶状物质,并产生不同程度的褐化,对酶切、PCR 扩增等操作产生不良影响,从而不能用于分子生物学研究<sup>[9-10]</sup>。然而,随着对红麻分子生物学研究的不断深入,需要对红麻的生长后期叶片(成熟叶片)进行 DNA 提取,对成熟、干燥叶片的 DNA 进行提取的研究虽也有报道<sup>[11-12]</sup>,但由于步骤操作复杂,严重影响了红麻基因组的提取效果。另外,由于红麻是常异交作物,在繁种过程中常出现自然杂交株,难以保持品种的特性和纯度,尤其是生育期或抗病性有时必须在后期才能鉴定<sup>[13]</sup>。为确保所提取的红麻品种基因组 DNA 纯度,必须选择红麻生长期内纯合的植株叶片为材料。针对红麻的特点,在幼嫩、鲜叶 DNA 提取成功的基础上,本研究分别应用 SDS 法和 CTAB 法,对成熟红麻叶片基因组总 DNA 的提取进行了深入研究,利用 RAPD 分子标记、叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 的通用引物对所提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增分析,旨在优化和提供一种高产量、高质量的红麻成熟叶片 DNA 提取方法,用于红麻成熟叶片的基因组 DNA、叶绿体 DNA、线粒体 DNA 的通用引物扩增。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以福建农林大学选育的红麻品种福红 952 现蕾开花期成熟叶片为试验材料。

RAPD 随机引物扩增与线粒体和叶绿体通用引物扩增所用到的 12 个品种均为福建农林大学保存的种质资源,分别是:福红 952,8 个福红航 952 突变体后代 P4-4、P4-18、P441、P442、P443、P410、P411、P412,福红 951,08CCV-76,塔什干。

### 1.2 主要仪器与设备

CF 16RX 日立多用途小型离心机, eppendorf 5415R 冷冻离心机, DYY-6C 型电泳仪, 复日科技 FR-200 紫外与可见分析装置, 电热恒温水浴锅, eppendorf 移液枪, 冰箱, 微波炉, 高压灭菌锅等。

### 1.3 主要试剂

CTAB、SDS、PVP-K30、EDTA、RNase A 均购于国药集团化学试剂有限公司, 溴酚蓝、氯化钠、抗坏血酸、 $\beta$ -巯基乙醇、Tris 平衡酚、无水乙醇、异戊醇等均为国产分析纯。CTAB 抽提缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), CTAB (m/M) 与  $\beta$ -巯基乙醇用量见 CTAB 法中的浓度组合。SDS 抽提缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0); SDS (m/M) 与  $\beta$ -巯基乙醇用量见 SDS 中的浓度组合。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 红麻成熟叶片基因组 DNA 提取方法步骤

改良 SDS 法 (1) 分别称取红麻成熟叶片各 1.0 g, 用液氮迅速研磨至粉末状后, 装入 10 mL 离心管中, 每管中加入 3 mL 65 °C 预热的 SDS 抽提缓冲液, 每管分别加入不同抗氧化剂及其组合, 8 个抗氧化剂及其组合如下。管 1: 1.0% SDS + 2%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 2: 1.0% SDS + 3%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 3: 1.5% SDS + 2%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 4: 1.5% SDS + 3%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 5: 2.0% SDS + 2%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 6: 2.0% SDS + 3%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 7: 2.5% SDS + 2%  $\beta$ -巯基乙醇; 管 8: 2.5% SDS + 3%  $\beta$ -巯基乙醇。(2) 冷却至室温后加入等体积氯仿/异戊醇 (24/1), 轻柔颠倒混匀 10 min。(3) 18 °C 以上、1200 rpm 离心 10 min。(4) 吸取上清液转入 10 mL 离心管中, 分别加入 1/3 体积的 3 mol/L NaAc 及等体积 -20 °C 预冷的无水乙醇, 混匀, 冰上沉淀 30 min。(5) 于 18 °C 以上、1200 r/min 离心 10 min。(6) 将沉淀移入 1.5 mL 离心管中, 用 75% 无水乙醇漂洗 3 min, 重复 1 次。(7) 将沉淀真空抽干或于室温下吹干。(8) 加入 100  $\mu$ L TE 溶解沉淀, 进行 DNA 纯化后放入 -20 °C 冰箱保存备用。

改良 CTAB 法 (1) 分别称取红麻成熟叶片各 1.0 g, 用液氮迅速研磨至粉末状后装入 10 mL 离心

管中,每管中加入 3 mL 65 ℃ 预热的 CTAB 抽提缓冲液,每管分别加入不同抗氧化剂及其组合,8 个抗氧化剂及其组合如下。管 9:2% CTAB + 2% β-巯基乙醇;管 10:2% CTAB + 3% β-巯基乙醇;管 11:3% CTAB + 2% β-巯基乙醇;管 12:3% CTAB + 3% β-巯基乙醇;管 13:4% CTAB + 2% β-巯基乙醇;管 14:4% CTAB + 3% β-巯基乙醇;管 15:5% CTAB + 2% β-巯基乙醇;管 16:5% CTAB + 3% β-巯基乙醇。(2)冷却至室温后加入等体积氯仿/异戊醇(24/1),轻柔颠倒混匀 10 min。(3)18 ℃ 以上、1200 rpm 离心 10 min。(4)吸取上清液转入 10 mL 离心管中,分别加入 1/3 体积的 3 mol/L NaAc 及等体积 -20 ℃ 预冷的无水乙醇,混匀,冰上沉淀 30 min。(5)于 18 ℃ 以上、1200 rpm 离心 10 min。(6)将沉淀移入 1.5 mL 离心管中,用 75% 无水乙醇漂洗 3 min,重复 1 次。(7)将沉淀真空抽干或于室温下吹干。(8)加入 100 μL TE 溶解沉淀,进行 DNA 纯化或放入 -20 ℃ 冰箱保存备用。

**1.4.2 DNA 质量检测** 电泳检测 制备 0.6 % 的琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/mL),分别取 3 μL DNA 原液和 2 μL 上样缓冲液混合,加灭菌水将体积定至 10 μL,用 0.5 × TBE 缓冲液于 100 V 电泳 45 min,在凝胶成像系统上观察并拍照。

PCR 检测 RAPD 引物序列为:5'-GTGACG-TAGG-3'; cp3 引物序列为:5'-TGTCACCAAAAA-

CAGAGACT-3', 5'-TTCCATACTTCACAAGCAGC-3'; mt4 引物序列为:5'-TCAATCTTGTRAACATAATCG-3',5'-CYYCTCCACACCAATCACGA-3'。以 2 种方法所获得 3 个品种的总 DNA 为模板进行扩增,25 μL 的反应体系包括 2.5 μL 10 × PCR buffer, *Taq* DNA 聚合酶 1U,模板 DNA 20 ng,dNTPs 0.15 mmol/L,引物 0.25 μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L。

扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30s,57.9 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,进行 35 个循环,72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保存。扩增产物加入 4 μL 6 × Loading buffer,取 10 μL 产物于 1.6 % 的琼脂糖凝胶在 0.5 × TBE 中(含 0.5 μg/mL EB)用 100 V 电泳 90 min,在凝胶成像系统上检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外检测

从表 1 的紫外检测结果中可见,改良 CTAB 法所获得红麻基因组 DNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值均在 1.9 左右,而改良 SDS 法 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 大于 2.0,2 种方法所提取的 DNA 以改良的 CTAB 法略优于 SDS 法,并且条带整齐,对红麻 DNA 的损伤也小,因此改良 CTAB 法更适合于从红麻成熟叶片中提取 DNA。从产率来看,改良 CTAB 法的平均产率为 1.667 μg/g,且高于 SDS 改良法的 1.327 μg/g,说明改良 CTAB 法比 SDS 法的除杂能力强。

表 1 红麻成熟叶片改良 SDS 法与改良 CTAB 法总 DNA 提取紫外分光光度检测

Table 1 The result of ultraviolet spectrophotometer detection to the kenaf genome DNA extracted by modified CTAB and SDS method

SDS 编号 No.	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	DNA 浓度(μg/mL) DNA concentration	DNA 产率(μg/g) DNA yield	CTAB 编号 No.	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	DNA 浓度(μg/mL) DNA concentration	DNA 产率(μg/g) DNA yield
管 1	2.042	1621.98	0.811	管 9	1.942	2946.08	1.473
管 2	2.063	2628.56	1.314	管 10	1.939	3342.22	1.671
管 3	2.054	2537.10	1.269	管 11	1.936	2945.82	1.473
管 4	2.073	3140.88	1.570	管 12	1.934	3672.00	1.836
管 5	2.063	3109.98	1.555	管 13	1.932	3315.88	1.658
管 6	2.084	3041.94	1.521	管 14	1.938	3373.86	1.687
管 7	2.084	2864.42	1.432	管 15	1.937	3420.86	1.710
管 8	2.076	2293.98	1.147	管 16	1.919	3658.62	1.829

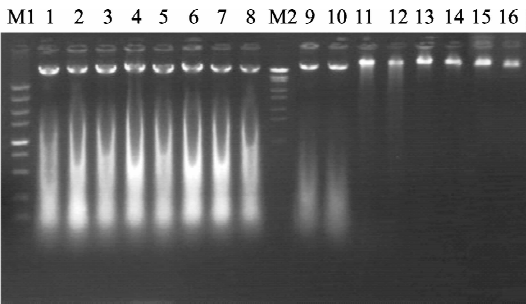
### 2.2 电泳检测

利用 SDS 法提取的红麻 DNA 都出现较严重的拖尾现象(图 1 中 1 ~ 8 泳道),即 RNA 降解引起的干扰现象,且每个泳道的 DNA 条带不整齐一

致,该结果表明利用 SDS 法提取的红麻成熟叶片 DNA 不适合用于 RAPD 或线粒体、叶绿体 DNA 扩增。而利用 CTAB 法提取的红麻成熟叶片 DNA 在 RNA 污染上明显好于 SDS 法,9 ~ 16 泳

道分别为 CTAB 法中管 9 ~ 管 16 的 CTAB 浓度和  $\beta$ -巯基乙醇组合提取的 DNA 电泳结果,从图 1 可以看出,泳道 9 ~ 12 都出现了不同程度拖尾现象,13、14、15、16 提取的效果最好,说明在 CTAB 浓度为 4% 或 5% 时,红麻成熟叶片 DNA 提取效果较好,而  $\beta$ -巯基乙醇为 2% ~ 3% 时,均可获得理想结果。

上述结果表明,由于采用改良 CTAB 法在提取过程中未出现多酚类物质的褐化,获得的沉淀物呈无色透明状,能迅速溶解于低盐 TE ,溶液清亮。而改良 SDS 法所获得的沉淀质量不一,有呈无色透明状的,也有呈淡褐色的。如图 1 所示,改良 CTAB 法获得的 DNA 电泳带型好,主带清晰,点样孔无残留,无拖尾现象,且 RNA 消化较为彻底,说明多糖等杂质去除较干净,DNA 质量好,活性强,无降解。而改良 SDS 法所获得的基因组 DNA 虽然在电泳中也表现出主带清晰、RNA 消化较好的特点,但点样孔均发亮,可能是杂质去除的不彻底所致。



1 ~ 8 泳道:不同浓度梯度组合 SDS 法获得的红麻品种福红 952 基因组 DNA;9 ~ 18 泳道:CTAB 法获得红麻品种福红 952 基因组 DNA

Lane 1-8: The genomic DNA of Kenaf by improved SDS method. Lane 9-18: The genomic DNA of Kenaf by improved CTAB method  
M1 and M2 are markers

图 1 2 种方法获得的红麻基因组 DNA 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 1.0% agarose gel electrophoresis of genomic DNA of Kenaf by two methods

2.3 RAPD 扩增

图 2 为改良 CTAB 法提取 12 个红麻品种成熟叶片 DNA 后,用 RAPD 随机引物进行 PCR 扩增,扩增出的谱带清晰,条带数量多,重复性好,说明此方法从红麻成熟叶片中提取的 DNA 适合于进行以 PCR 为基础的 DNA 多态性的研究。虽然 RAPD 反应对模板 DNA 的质量要求不高,但改良 CTAB 法所提取的红麻 DNA 更有利于 PCR 扩增。

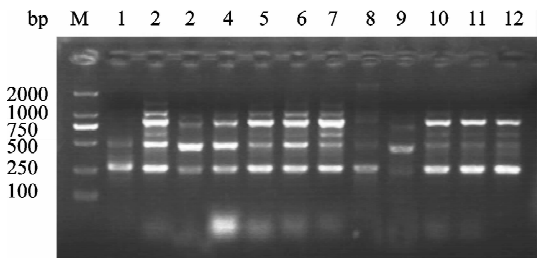


图 2 改良 CTAB 方法的红麻基因组 DNA RAPD 扩增结果 (M: DL 2000, 下同)

Fig. 2 Result of RAPD-PCR amplification by modified CTAB-method (M : DL 2000, the same as below)

2.4 红麻叶绿体 (cpDNA)、线粒体 (mtDNA) 通用引物扩增

图 3 和图 4 分别用叶绿体和线粒体的通用引物对 12 个红麻品种 DNA 扩增的结果,从图上可以看出,利用改良的 CTAB 法提取的红麻成熟叶片 DNA 同样能够扩增出理想的特异条带。说明利用改良的方法提取的红麻成熟叶片 DNA,能很好地用于红麻线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 的 PCR 扩增。

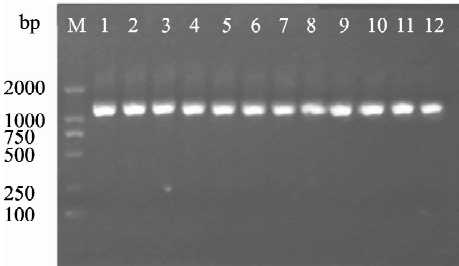


图 3 引物 cp3 扩增结果

Fig. 3 Amplified results of primer cp3



图 4 引物 mt4 扩增结果

Fig. 3 Amplified results of primer mt4

3 讨论

3.1 关于红麻成熟叶片 DNA 的提取效果分析  
红麻成熟叶片中含有丰富的酚类、多糖类物质,严重干扰 DNA 的提取效果。目前常用的防止酚类物质褐变的方法主要有 2 种,一是向提取液中加入

$\beta$ -巯基乙醇、VC 等抗氧化剂、可溶性 PVP 等酚类物质的结合剂或在研磨过程中加入不溶性 PVP 等;二是在裂解细胞核前先用可溶解酚的缓冲液或丙酮、乙醇等有机溶剂将酚溶解<sup>[14]</sup>。本文在综合前人研究的基础上,利用 SDS 法和 CTAB 法对红麻的提取液浓度及抗氧化剂组合( $\beta$ -巯基乙醇 + CTAB)浓度进行了优化,获得最佳组合为 2% ~ 3%  $\beta$ -巯基乙醇 + 4% ~ 5% CTAB。由于多糖类物质在高盐低温条件下呈不溶状态而沉淀,所以在本研究中最重要的一步便是在用无水乙醇沉淀 DNA 的同时加入了 1/3 体积的醋酸钠 (NaAc),经氯仿异戊醇抽提后可以除去 CTAB、粘多糖、蛋白质复合物等杂质<sup>[11]</sup>,可以更加彻底地去除溶液中的多糖,因此可得到纯净的 DNA。应注意的是,在 DNA 提取过程中,加入的植物材料不能太多,否则多糖类物质很难去除干净<sup>[10]</sup>。

有研究表明,采用 SDS 缓冲液或经过改进的 SDS 缓冲液提取植物基因组 DNA 的效果等同或更胜于 CTAB 的提取效果<sup>[15-16]</sup>。但在本研究中发现,改良后的 CTAB 法平均产率上要低于改良 SDS 法,从琼脂糖的电泳图中可发现,改良 SDS 法所获得的基因组 DNA 电泳后泳道上 RNA 含量较高,获得的红麻基因组 DNA 质量相对较差。因此改良 CTAB 法是一种适合于从红麻成熟叶片中提取高质量基因组 DNA 的有效方法。

### 3.2 关于基因组 DNA 质量对线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 扩增效果的影响

自红麻细胞质雄性不育系及红麻光钝感雄性不育系转育成功以来,广西大学和福建农林大学先后育成了系列杂交红麻优良组合,研究人员对红麻的基因组 DNA 和胞质基因组 DNA 进行了深入研究,特别是成熟叶片的 DNA、叶绿体 DNA 及线粒体 DNA 提取研究成为技术关键。据研究,烟草线粒体 DNA 的提取与纯化所需材料多达 100 g 以上,方法复杂、步骤多,还需要大型离心机,而最后得率又低,因此改为提取烟草总 DNA,只要通过设计特异引物即可进行线粒体 DNA 扩增<sup>[17]</sup>。因此,本研究在综合前人研究基础上,对红麻成熟叶片 DNA 进行了技术体系优化,利用改良 CTAB 法对提取的红麻成熟叶片总 DNA 进行 RAPD 随机引物、植物线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 通用引物 PCR 扩增,扩增条带

清晰,多态性丰富。本研究结果与崔彬彬等<sup>[18]</sup>、D. C. Hu 等<sup>[19-20]</sup>一致,说明可以通过改良 CTAB 法提取红麻总 DNA,同时设计特异引物或利用已开发的植物通用引物,为进一步开展红麻基因组学和胞质基因组学研究提供了一种改良的技术环节。

### 参考文献

- [1] 祁建民, 刘国忠, 徐建堂. 黄麻红麻品种与高效配套技术 [M]. 北京: 台海出版社, 2007: 7
- [2] 赵卫国, 王灏, 李殿荣, 等. 甘蓝型高含油量油菜种质资源及其主栽品种的指纹图谱构建 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 904-909
- [3] 张立荣, 杨文香, 刘大群. 小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源 cDNA 序列的分离与鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 431-436
- [4] 凌英华, 赵芳明, 杨正林, 等. 携带空心莲子草 DNA 片段的水稻导入系耐旱生理评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 314-320
- [5] 盖树鹏, 盖伟玲, 黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 468-472
- [6] 周瑞阳, 张新, 张加强, 等. 红麻细胞质雄性不育系的选育及杂种优势利用取得突破 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 314
- [7] 王珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288
- [8] 郭安平, 黄明, 郑学勤, 等. 几种麻类作物及其近缘植物总 DNA 的提取与鉴定 [J]. 中国麻作, 1997, 19(4): 4-10
- [9] 周东新, 祁建民, 吴为人, 等. 黄麻 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立 [J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(3): 331-339
- [10] 徐建堂, 祁建民, 方平平, 等. CTAB 法提取红麻总 DNA 技术优化与 ISSR 和 SRAP 扩增效果 [J]. 中国麻业科学, 2007, 29(4): 179-183
- [11] 曹德菊, 程备久, 李培金, 等. 红麻基因组提纯方法研究 [J]. 中国麻作, 1999, 21(1): 9-12
- [12] 白凤虎, 谢晓美, 李德芳, 等. 改良 CTAB 法用于提取红麻成熟叶片高质量 DNA 的研究 [J]. 中国麻业科学, 2007, 29(3): 158-165
- [13] 何凡. 红麻自然异交率的测定及繁种隔离 [J]. 中国麻作, 1989, 11(4): 10-11
- [14] 那冬晨, 邓俊敏. 常春藤总 DNA 提取方法的改进 [J]. 北方园艺, 2008(9): 162-163
- [15] 陈晓玲, 谢振文, 罗苑岚, 等. 广东猕猴桃基因组 DNA 提取方法比较 [J]. 种子, 2007, 26(5): 62-65
- [16] 贾兵, 朱立武, 潘海发. 水蜜桃茎尖基因组 DNA 不同提取方法研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(6): 1607-1608
- [17] 赵婷, 朱腾义, 刘齐元, 等. 烟草线粒体基因 *atp6* 的 SNP 及其与 CMS 的相关性 [J]. 作物学报, 2009, 35(9): 1655-1661
- [18] 崔彬彬, 李云, 金晓洁, 等. 白杨叶绿体和线粒体 DNA 的多态性及遗传性分析 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(6): 9-14
- [19] Hu D C, Luo Z G. Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp [J]. Sci Horticulture-Amsterdam, 2006, 109: 275-281
- [20] Hu D C, Zhang Q L, Luo Z G. Phylogenetic analysis in some *Diospyros* spp. (Ebenaceae) and Japanese persimmon using chloroplast DNA PCR-RFLP markers [J]. Sci Horticulture-Amsterdam, 2008, 117: 32-38