

陈山红心杉基因组 DNA 提取方法 的比较与分析

伍艳芳, 徐海宁, 肖复明*, 熊振宇, 江香梅

(江西省林业科学院, 江西省植物生物技术重点实验室, 江西 南昌 330032)

摘要: 采用尿素法、柠檬酸钠法、改良的 CTAB 法和 SDS 法 4 种方法提取陈山红心杉基因组 DNA, 并对提取效果进行比较和分析。结果表明, 改良的 CTAB 法较适合陈山红心杉基因组 DNA 提取, 其提取的 DNA 纯度高、质量好, 具有典型的天然 DNA 分子的标准紫外吸收光谱特点, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 左右, 且凝胶检测条带整齐清晰, 杂质少、无明显降解。而尿素法和柠檬酸钠法难以提取基因组 DNA, SDS 法因提取的 DNA 有蛋白质、多糖等杂质污染均不太适用陈山红心杉基因组 DNA 提取。酶切分析也证明, 改良的 CTAB 法提取的 DNA 适用于进行后续分子生物学分析。采用改良的 CTAB 法能够提取得到陈山红心杉幼叶、老叶、嫩芽和幼茎的基因组 DNA 产率不同, 分别为 158.4 $\mu\text{g/g}$ 、129.6 $\mu\text{g/g}$ 、177.6 $\mu\text{g/g}$ 和 98.40 $\mu\text{g/g}$ 。考虑到幼叶样品的采集要比嫩芽方便, 因此, 可以直接采用幼叶进行陈山红心杉基因组 DNA 提取。

关键词: 陈山红心杉; DNA 提取方法; 改良的 CTAB 法; SDS 法

中图分类号: S791.27 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2012)03-0517-05

Comparative Research on Isolation and Purification Method for Genomic DNA of *Cunninghamia lanceolata*

WU Yan-fang, XU Hai-ning, XIAO Fu-ming*,

XIONG Zhen-yu, JIANG Xiang-mei

(Jiangxi Provincial Bio-tech Key Lab. for Plant, Jiangxi Academy of Forestry Sciences, Nanchang 330032, China)

Abstract: The DNA samples of *Cunninghamia lanceolata* were prepared by Carbamide method, Sodium citrate method, the modified CTAB method and SDS method, respectively. The results showed that improved CTAB method was suitable for extracting the genomic DNA from *C. lanceolata*. DNA samples obtained by this method possessed the standard ultraviolet absorbance spectrum of pure natural DNA, whose A_{260}/A_{280} was 1.80 or so, degradation was light and impurity was little. However, Carbamide method and Sodium citrate method could not extract the genomic DNA and SDS method was difficult to get rid of polyhexose completely. Therefore, the three methods were not suitable for extracting the genomic DNA. When tested through the restriction enzyme analysis, the DNA samples prepared by the modified CTAB method could meet the next experiment requirement perfectly. The yield of DNA of young leaves, old leaves, young shoots and young stems obtained by the improved CTAB method were 158.4 $\mu\text{g/g}$, 129.6 $\mu\text{g/g}$, 177.6 $\mu\text{g/g}$ and 98.40 $\mu\text{g/g}$. Young leaves could directly use to extract the genomic DNA after taking the convenience of sample collecting into account.

Key words: *Cunninghamia lanceolata*; genomic DNA extraction; improved CTAB method; SDS method

收稿日期: 2011-10-04 修回日期: 2012-03-20

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项 (NO.201104058)

作者简介: 伍艳芳(1980—), 女, 博士, 主要从事林木遗传育种研究; *通讯作者: 肖复明, 博士, 研究员, 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: jxxiaofuming@163.com.

随着以 PCR 为基础的分子标记技术的迅速发展,采用基于基因组 DNA 分析的分子标记来进行育种是当前国际植物遗传育种研究的热点。基因组 DNA 的提取与纯化是限制性酶切、PCR 检测、分子标记等分子生物学研究工作的首要步骤,并且, DNA 质量的好坏将直接影响下一步的研究工作。目前,植物组织 DNA 的提取方法主要有 SDS 法^[1-2]、高盐低 pH 法^[2-3]、CTAB 法^[4-5]和氯化苄法^[6]等,但应用常规 DNA 提取方法,木本植物 DNA 常常会与酚类物质结合沉淀,提取出来的 DNA 限制性内切酶无法酶切。因此研究和探讨木本植物 DNA 提取方法,可为今后进行分子生物学研究提供基础。

杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook) 是我国南方重要造林树种,陈山红心杉是具有地方特色的优良杉木种源,天然分布于江西省罗霄山脉中段武功山区,安福、永新、莲花三县交界的陈山林区,因其近髓心的木质部相当大的比例成油亮的栗褐色而得名。早在前清时期,陈山红心杉就被誉为江西的“关土木”而成为朝廷的贡品,素有“闻名全国,甲于东南”的美称。因其典雅、美观的天然色彩和优良材质、材性已日益受到人们的青睐,愈来愈成为工艺建筑和室内装璜极为宝贵的天然材料^[7]。进行陈山红心杉分子生物学研究,对缩短育种周期、提高育种效率、加速育种进程等均有非常重要的意义,也将为陈山红心杉良种的生产、推广以及产业发展提供重要的技术支撑。现有的研究表明,杉木的 DNA 提取十分困难,因为杉木的针叶内含有较高的酚与萜类化合物,这些次生物质与核酸形成复合物 DNA 埋在这种粘稠的胶状物中难以溶解或产生不同的褐变,这种质量的 DNA 既不适合做限制性酶切,也不能用于 DNA 扩增^[8-9],并且没有系统的对各种方法进行比较,从而不能确定杉木提取的最佳方法。因此,本研究以陈山红心杉为材料,对其基因组 DNA 提取方法进行比较和分析,以期得到陈山红心杉基因组 DNA 提取的适宜方法,为今后陈山红心杉分子生物学及其辅助育种等研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以江西安福陈山红心杉为研究材料,于 2011 年 9 月采集陈山红心杉老叶、幼叶、嫩芽和幼茎,液氮速冻后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存备用。

1.2 主要试剂

CTAB 提取液: 2% CTAB, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 5% PVP, 2% β -巯基乙醇临时加入。

SDS 提取液: 2% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 5% PVP; 30 倍柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0): 4.5 mol/L NaCl, 0.45 mol/L 柠檬酸钠。

柠檬酸钠提取缓冲液 (pH 7.0): 30 倍柠檬酸钠缓冲液 20 mL + 0.2 mol/L EDTA 100 mL + 2 g SDS, 定容至 200 mL。

尿素缓冲液: 65 mL 水, 84.0 g 尿素, 17.5 mL 4 mol/L NaCl, 5 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 8 mL 0.5 mol/L EDTA, 5 mL 10% SDS 溶液, 10 mL 苯酚, 搅拌溶解, 加水定容至 200 mL, 用前加亚硫酸氢钠 0.4 g。

相关试剂、引物、dNTP、Taq-DNA 聚合酶和 β -巯基乙醇等均购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.3 DNA 提取方法

1.3.1 柠檬酸钠法 参照刘萍等^[10]的方法进行试验,略加修改,具体步骤如下:(1)在提取液中加入 0.2% 亚硫酸氢钠,搅拌到完全溶解并水浴保持 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$; (2)取提取液 600 μL 加入 1.5 mL 离心管, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热 10 min; (3)取新鲜组织 0.25 g 液氮研磨成粉末,立即放入预热的提取液中,迅速振荡混匀, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,每隔 5 min 轻轻摇匀 1 次; (4)加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1),充分混匀后, 10 000 r/min 离心 10 min,移出上清液; (5)向上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇和 1:10 体积的 3 mol/L NaAc,温和混匀后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h 以上,然后 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集沉淀; (6)所得沉淀用 500 μL 70% (V/V) 乙醇漂洗 2 次,再用无水乙醇漂洗 1 次,风干或用真空干燥仪真空干燥; (6)加入 40 μL TE 缓冲液溶解后, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 尿素法 参照刘学春等^[11]的方法进行试验,稍作修改,具体步骤:(1)取 600 μL 提取液于 1.5 mL 离心管,加 2% β -巯基乙醇 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴预热; (2)取新鲜组织 0.25 g 液氮研磨成粉末,立即放入预热的提取液中,缓慢摇匀, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,取出后加 150 μL 5 mol/L KAc,混匀后冰浴 5 min; (3)室温

(15℃)下 10 000 r/min 离心 10 min, 移出上清液; (4) 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 充分混匀后, 10 000 r/min 离心 10 min, 移出上清液; (5) 向上清液中加入等体积预冷的异丙醇, 温和混匀后于一20℃放置 2 h 以上, 然后 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀; (6) 乙醇漂洗及 TE 溶解步骤与柠檬酸钠法相同。

1.3.3 改良的 CTAB 法 参照杨春霞等^[5]的方法, 略加改动, 具体步骤如下: (1) 在 1.5 mL 离心管中加入含 2% β -巯基乙醇和 5% PVP-40 的 CTAB 提取液 600 μ L, 65℃预热 10 min; (2) 将经液氮冷冻的 0.25 g 叶片研磨成粉末, 放入预热的提取液中, 65℃保温 45 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 移出上清液; (3) 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 充分混匀后, 10 000 r/min 离心 10 min, 移出上清液; (4) 向上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇和 1:10 体积的 3 mol/L NaAc, 温和混匀后于-20℃放置 2 h 以上, 然后 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀; (5) 乙醇漂洗及 TE 溶解步骤与柠檬酸钠法相同。

1.3.4 SDS 法 参照巩振辉等^[12]的方法, 略加修改。(1) 取 0.25 g 植物叶片放入液氮中研磨成粉末, 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 600 μ L 的 SDS 提取液及 12 μ L β -巯基乙醇 (65℃预热), 充分混匀, 封口膜封口于 65℃水浴保温 30 min, 其间不时摇动; (2) 加入 30 μ L 的 5 mol/L KAc, 水浴锅中混匀后迅速放置在冰上 5 min; 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于新的 1.5 mL 离心管中; 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1, V/V), 充分混匀后, 10 000 r/min 离心 10 min; (3) 先加入 1/10 体积的 4 mol/L NaCl, 再加入 2 倍体积冰预冷的无水乙醇, 室温放置 30 min; (4) 视 DNA 量, 用 5 000 r/min, 离心 5 min (台式冷冻离心机) 或用枪头挑出 DNA 沉淀, 乙醇漂洗及 TE 溶解步骤与柠檬酸钠法相同。

1.4 DNA 纯度、浓度及得率的计算

DNA 纯度用 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} 的比值来表示, 当 A_{260}/A_{280} 比值接近 1.8, A_{260}/A_{230} 比值接近 2.0, DNA 纯度符合质量标准。取适量 DNA 稀释后, 以去离子水为对照, 用分光光度计测定其在 230 nm, 260 nm, 280 nm 波长处的光吸收值。

$$\text{DNA 浓度 } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL} \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

$$\text{DNA 得率 } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \text{DNA 量 } (\mu\text{g}) / \text{取材量 } (\text{g}) \quad (2)$$

1.5 DNA 的酶切分析

取少许 DNA (1 μ g 左右) 样品, 用 EcolR I (TaKaRa) 进行酶切。质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳酶切产物, 在紫外凝胶成像系统 (Bio-Rad) 下观察 DNA 电泳结果并照相。当酶切后的 DNA 呈弥散状时, 说明 DNA 纯度较高, 所含杂质少。

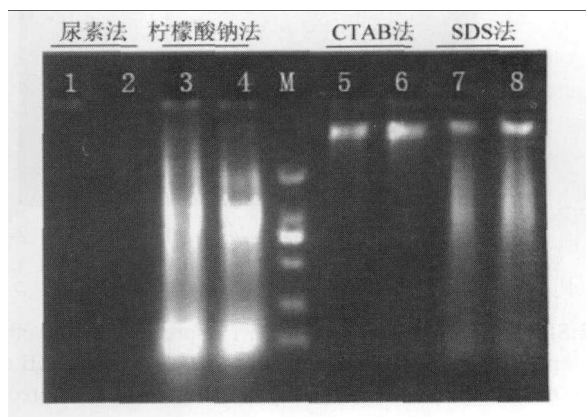
2 结果与分析

2.1 不同提取方法 DNA 凝胶电泳检测

取 4 μ L DNA 溶液在质量分数为 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, DL 2000TM DNA maker 作标准分子质量对照, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 改良的 CTAB 法和 SDS 法所提取的 DNA 明显优于柠檬酸钠法和尿素法, 两者都有清晰整齐的 DNA 泳带出现, 但 SDS 法提取的 DNA 泳带有明显的拖尾现象, 可能有 RNA 及蛋白等杂质存在; 用柠檬酸钠法提取的 DNA 蛋白质、多糖等污染严重且极易降解, 而用尿素法所提取的 DNA 检测不到明显的条带。由图 1 可以得出, 4 种提取方法中改良的 CTAB 法提取的 DNA 条带最好。

2.2 不同提取方法 DNA 纯度和得率

4 种方法所提取的 DNA 样品在 230 nm, 260 nm, 280 nm 波长处的紫外吸收值列于表 1。本研究所采用的 4 种方法中, 改良的 CTAB 法提取的 DNA 效果最好, 其 DNA 浓度和产率都



1,2: 尿素法; 3,4: 柠檬酸钠法; 5,6: 改良的 CTAB 法; 7,8: SDS 法。2 次重复, 成熟叶片提取。

1,2: Carbamide method; 3,4: Sodium citrate method; 5,6: The modified CTAB method; 7,8: SDS method. The duplicate of each, DNA extracted from leaves of *C. lanceolata*.

图 1 不同方法提取杉木 DNA 电泳检测 M: DL 2000TM DNA maker (TaKaRa)

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA samples extracted from *C. lanceolata* using different methods M: DL 2000TM DNA maker (TaKaRa).

较高,分别为 892.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 142.8 $\mu\text{g}/\text{g}$, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 左右,蛋白、酚类、多糖等杂质和 RNA 都去除较干净, DNA 纯度较高;传统的 SDS 法提取的 DNA 效果次之, OD_{260}/OD_{280} 比值平均为 1.702,可能有蛋白和多糖等杂质污染,影响了 DNA 纯度;尿素法提取得到的 DNA 产率很低,仅为 15.00 $\mu\text{g}/\text{g}$;柠檬酸钠法提取得到的 DNA,其 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.93,可能存在 RNA 污染且降解严重,蛋白质等大分子物质没有去除干净,纯度较差,说明尿素法和柠檬酸钠法不太适合用于陈山红心杉基因组 DNA 的提取。因此,就 4 种提取方法所得 DNA 的质量而言,改良的 CTAB 法最适于陈山红心杉基因组 DNA 的提取,这与凝胶电泳检测的结果也相一致。

表 1 不同方法提取植物 DNA 的纯度和得率

Tab.1 The purity and yield of DNA extracted from *C. lanceolata* with different methods

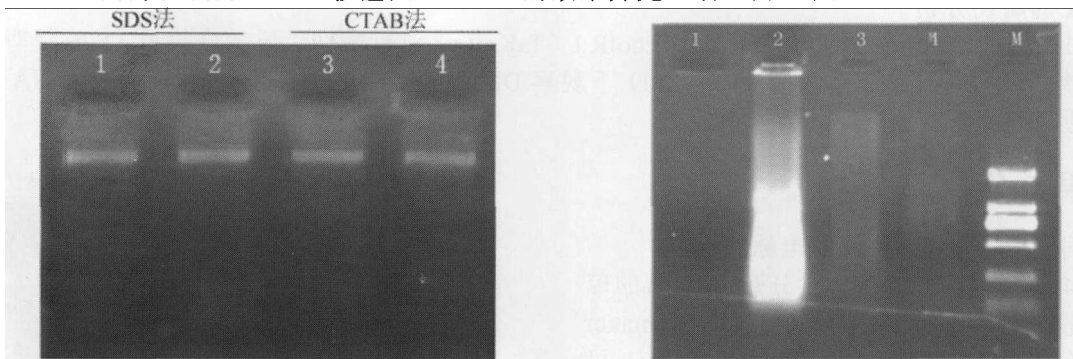
方法 Methods	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度 Con. ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	DNA 产率 Yield/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
尿素法 Carbamide method	0.013	0.010	1.229	93.75	15.00
CTAB 法 CTAB method	0.119	0.066	1.815	892.5	142.8
SDS 法 SDS method	0.109	0.064	1.702	817.5	130.8
柠檬酸钠法 Sodium citrate method	0.095	0.050	1.939	712.5	114.0

列出数据均为 2 次重复平均值。对照及样品稀释液使用 10 mmol/L Tris (pH 8.0), 检测 DNA 浓度时扩大 150 倍。

All the data illustrated are the mean value of two repeats. Dilutions of control and sample are used 10 mmol/L Tris (pH 8.0), concentration of the DNA is detected after 150 times dilution.

2.3 纯化后的 DNA 凝胶检测

将改良的 CTAB 法和 SDS 法提取的基因组 DNA 用 RNA 降解酶及氯仿/异戊醇进行纯化,并分别用乙醇和异丙醇沉淀,结果去除了 SDS 法提取 DNA 的拖尾现象,得到了高质量的 DNA,同时结果也表明,乙醇和异丙醇沉淀陈山红心杉基因组 DNA 的效果并无显著差异(图 2)。



1, 2: SDS 法, RNase I 处理, 1-乙醇沉淀, 2-异丙醇沉淀; 3, 4: 改良的 CTAB 法, RNase I 处理, 3-乙醇沉淀, 4-异丙醇沉淀。

1,2: SDS method, treated by RNase I, 1-precipitated by ethanol, 2-precipitated by isopropanol; 3,4: The modified CTAB method, treated by RNase I, 3-precipitated by ethanol, 4-precipitated by isopropanol.

图 2 纯化后杉木 DNA 电泳检测

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of total DNA samples extracted from *C. lanceolata* using SDS and the modified CTAB method

1: 尿素法; 2: 柠檬酸钠法; 3: 改良的 CTAB 法; 4: SDS 法; M: DL 2000™ DNA maker (TaKaRa)。成熟叶片提取。

1: Carbamide method; 2: Sodium citrate method; 3: The modified CTAB method; 4: SDS method; M: DL 2000™ DNA maker (TaKaRa). DNA extracted from leaves of *C. lanceolata*.

图 3 4 种方法提取的陈山红心杉 DNA 酶切结果

Fig.3 Restriction Enzyme Analysis of genomic DNA of *C. lanceolata* extracted by four methods

2.4 DNA 的酶切分析

将 4 种方法所提取的 DNA 样品用 RNA 降解酶处理, 然后进行 EcoRI 酶切, 由图 3 可见, 采用改良的 CTAB 法提取的陈山红心杉基因组 DNA 酶切后呈弥散状, 酶切效果较好, 证明这种方法所提取的 DNA 纯度较高, 其次是 SDS 法提取的 DNA; 尿素法提取的 DNA 得率太低, 酶切后检测失败; 柠檬酸钠法提取的 DNA 酶切后有明显的条带出现, 不适合用于酶切及后续分子生物学分析。

2.5 不同组织 DNA 纯度和得率

表 2 CTAB 法提取陈山红心杉不同组织 DNA 的纯度和得率

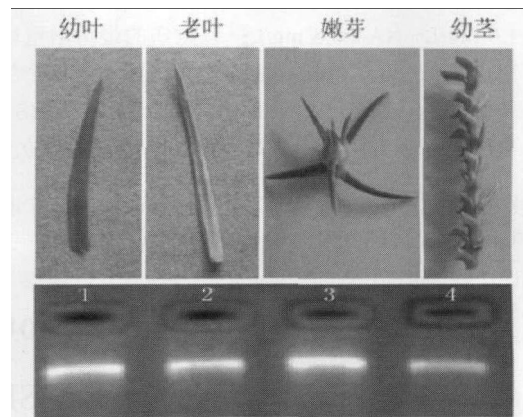
Tab.2 The purity and yield of DNA extracted from different tissues with CTAB method

组织 Tissues	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA浓度 Con. /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	DNA产率 Yield/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
幼叶 Young leaves	0.132	0.073	1.808	990.0	158.4
老叶 Old leaves	0.108	0.061	1.770	810.0	129.6
嫩芽 Young shoots	0.148	0.080	1.850	1 110	177.6
幼茎 Young stems	0.082	0.047	1.745	615.0	98.40

对照及样品稀释液使用 10 mmol/L Tris (pH 8.0), 检测 DNA 浓度时扩大 150 倍。

Dilutions of control and sample are used 10 mmol/L Tris (pH 8.0), concentration of the DNA is detected after 150 times dilution.

分别采集陈山红心杉老叶、幼叶、嫩芽和幼茎部位, 采用改良的 CTAB 法提取 DNA, 进行紫外分光光度计检测, 得到其纯度和得率值 (表 2)。结果表明, 陈山红心杉幼叶、老叶、嫩芽和幼茎的 DNA 产量分别为 158.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、129.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、177.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 98.40 $\mu\text{g}/\text{g}$, 嫩芽 DNA 的得率高于幼叶、老叶和幼茎, 幼茎部分得率最低。凝胶检测结果也与紫外分光光度计检测结果 (图 4) 一致。采用改良的 CTAB 法提取 DNA, 能有效去除陈山红心杉不同组织的蛋白、多糖和多酚等杂质, 且无明显降解。然而, 考虑到 DNA 提取程序的简洁性, 加上嫩芽样品采集没有幼叶方便, 因此, 陈山红心杉基因组 DNA 的提取可以采用幼叶。



1: 幼叶; 2: 老叶; 3: 嫩芽; 4: 幼茎。

1: young leaf; 2: old leaf; 3: young shoot; 4: young stem.

图 4 CTAB 法提取杉木不同组织 DNA 电泳检测
Fig.4 Different tissues of *C. fargesii* and agarose gel electrophoresis of DNA extracted from them by the modified CTAB method

3 结论与讨论

(1) 改良的 CTAB 法较适合陈山红心杉基因组 DNA 提取, 其提取的 DNA 纯度高、质量好, 具有典型的天然 DNA 分子的标准紫外吸收光谱特点, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 左右, 且凝胶检测条带整齐清晰, 杂质少且无明显降解, 适用于进行后续分子生物学分析。而尿素法和柠檬酸钠法难以提取基因组 DNA, SDS 法因提取的 DNA 有蛋白质、多糖类等杂质污染均不太适用陈山红心杉 DNA 提取。

与传统的 CTAB 法相比, 本实验在改良的 CTAB 提取液中添加了 PVP-40, PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 是酚的络合物, 能与多酚形成一种不溶的络合物, 有效去除多酚, 减少 DNA 中酚的污染; 同时它能与多糖结合, 通过离心有效去除多糖, 从而提高 DNA 的得率和纯度。SDS 法提取需要再次进行纯化才能得到较好质量的 DNA; 柠檬酸钠法提取的 DNA 不能有效去除蛋白等杂质; 而尿素法所提取的 DNA 得率太低, 可能是由于方法中亚硫酸氢钠和尿素都不能有效地去除次生物质和多糖等杂质。本研究用 RNA 降解酶及氯仿/异戊醇对 SDS 法和改良的 CTAB 法提取的 DNA 进行纯化处理, 并用乙醇和异丙醇分别沉淀, 结果表明对于陈山红心杉基因组 DNA 来说, 乙醇和异丙醇沉淀效果并无显著差异。

(2) 采用改良的 CTAB 法能够提取得到陈山红心杉幼叶、老叶、嫩芽和幼茎的基因组 DNA, 只是得率不同, 分别为 158.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、129.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、177.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和 98.40 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。考虑到幼叶样品的采集要比嫩芽方便, 因此, 可以直接采用幼叶进行陈山红心杉基因组 DNA 提取。

植物的不同部位和生长期会严重影响到 DNA 的纯度和浓度。老叶中多糖含量高, 提取物粘稠、不易溶解, 严重干扰了酶切反应, 并且电泳时由于多糖类物质形成的胶状不溶物与 DNA 结合使其不能进入凝胶中, 无法完成凝胶检测^[13]。对于陈山红心杉而言, 其针叶内纤维组织较多, 研磨裂解程度比嫩芽稍差。本研究用改良的 CTAB 法提取了不同部位 DNA, 结果显示各组织样品多糖等杂质去除的较干净, 但 DNA 得率相差较大, 这是否与研磨裂解程度及各组织部位的次生代谢物质含量不同还有待于进一步研究。

(下转第 527 页)

参考文献:

- [1] Sandra M King, Allen L Morehart. Effect of BA, NAA, and 2,4-D on red maple callus growth[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1987, 10: 57-63.
- [2] Eva Wilhelm. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1999, 57: 57-60.
- [3] Katayoun Mansouri, John E Preece. The influence of plant growth regulators on explant performance, bud break, and shoot growth from large stem segments of *Acer saccharinum* L[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2009, 99: 313-318.
- [4] Kerns H R, Meyer M M Jr. Tissue culture propagation of *Acer freemannii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation[J]. Hort Science, 1986, 21(5): 1209-1210.
- [5] 唐丽, 钟秋平, 刘显梅, 等. 景观树种红翅槭愈伤组织诱导培养[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(4): 97-100.
- [6] 谢从华, 柳俊. 植物细胞工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 24.
- [7] Huettman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant cell tissue culture[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1993, 33: 105-121.
- [8] 王小玲, 高柱, 樊军锋. 奥地利黑松不定芽增殖与伸长研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(2): 324-329.
- [9] John Calvin Thomas, Frank Reinald Katterman. Cytokinin activity induced by thidiazuron[J]. Plant Physiology, 1986, 81: 681-683.
- [10] 李艳菊, 陶加洪, 王兰珍, 等. 元宝枫组织培养研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(3): 104-107.
- [11] 范鸿雁, 何凡. TDZ 在番木瓜组织培养中的应用研究[J]. 中国南方果树, 2008, 37(2): 32-33.
- [12] 杨雪, 吴国盛, 范加勤. 红叶石楠组培苗玻璃化影响因子及其克服技术研究[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(5): 906-910.

(上接第 521 页)

参考文献:

- [1] 李发根, 杨华, 尹光天, 等. 棕榈藤基因组 DNA 提取及 RAPD 反应条件探索[J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 824-828.
- [2] 杨春霞, 叶金山, 温强, 等. 枳壳基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(19): 32-36.
- [3] 邹喻苹, 汪小全, 雷一丁, 等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-533.
- [4] 李登科, 黄丛林, 田建保, 等. 高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种, 2005(4): 579-583.
- [5] 翠红, 李杰, 朱延明, 等. 不同 DNA 提取方法对 4 种重要作物 DNA 提取效率的比较[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(3): 329-332.
- [6] 时向阳, 魏江春, 姜玉梅, 等. 提取地衣真菌总 DNA 的简便方法[J]. 北京林业大学学报, 1997, 19(4): 45-50.
- [7] 曾志光, 杨先锋, 肖复明, 等. 陈山红心杉材性变异及其基因资源利用的研究[J]. 江西林业科技, 2001(3): 1-7.
- [8] 叶冰莹. 杉木 DNA 提取方法的研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 1999, 15(3): 68-72.
- [9] 黄少甫, 赵志芬, 陆军, 等. 杉木 DNA 的快速提取[J]. 林业科学研究, 1995, 8(6): 692-693.
- [10] 刘萍, 代红军, 张立杰, 等. 提取方法与植物种类的效应比较[J]. 宁夏农林科技, 1998(1): 15-18.
- [11] 刘学春, 潘春欣, 宋云枝, 等. 一种单子叶植物总 DNA 提取方法的改进及应用[J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(4): 491-495.
- [12] 巩振辉, Cecchini E, Milner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(1): 45-48.
- [13] 孙鑫, 崔洪志, 胡宝忠, 等. SDS-CTAB 结合法提取棉花总 DNA[J]. 生物技术通报, 2004, 5: 45-47.