

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.01.03

台东苏铁中叶绿体功能基因 RNA 编辑的分析

沈成才

(北京师范大学克拉玛依附属学校,新疆 克拉玛依 834000)

摘要:台东苏铁是一种古老的裸子植物,有关苏铁的 RNA 编辑的研究很少。为此,我们分析了台东苏铁的 RNA 编辑位点和分布,为探究 RNA 编辑的功能和机制以及高等植物的起源和进化提供依据。本次以台东苏铁(*Cycas taitungensis*)为材料,采用异硫氰酸胍法提取台东苏铁总 RNA。DNase I 处理过的 RNA 逆转得到的 cDNA 进行 PCR 扩增条带并测序。通过对测序结果分析比对,初步确定在台东苏铁中的 *ndhD₂*,*PetB*,*ndhB₂* 存在 C-U 的编辑。研究表明,*ndh* 基因有较高的编辑频率,而丝氨酸相比其他氨基酸有更高的编辑频率。结果显示,*ndhB₂* 中有 C-Y 的部分编辑现象,*ndhA₂* 存在沉默编辑现象。

关键词:台东苏铁;RNA 编辑;RNA 提取;异硫氰酸胍法

中图分类号:Q51 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2016)01-013-06

Analysis of RNA editing sites in the chloroplast genome of *Cycas taitungensis*

SHEN Chengcai

(Karamay School Attached To Beijing Normal University, Karamay Xinjiang Uygur Autonomous Region 834000, China)

Abstract: *Cycas taitungensis* is ancient gymnosperms, and the research of RNA editing in *Cycas* is limited. We analyzed the composition and distribution of RNA editing in *Cycas taitungensis*, which provided the useful information for exporing the function and mechanism of RNA editing, as well as for revealing the origin and evolution of higher plants. The thiocyanate method is appropriate for the RNA extraction of *Cycas taitungensis*. The cDNA was obtained by reverse transcribed the DNA-free RNA which treated with DNase. The RNA editing sites were found by RT-PCR, sequence and blast DNA and cDNA. Our results showed that the conversion of C-to-U and C-to-U editing events could be found in the *ndhD₂* and *PetB* transcripts of *Cycas taitungensis* as well as in *ndhB₂* transcript. We found that *ndh* genes have a higher rate of editing, while the serine codon was more frequently edited than the others. The results showed that there is a partially editing sites in *ndhB₂* transcrip, and silence editing sites also could be found in the *ndhA₂* transcript.

Keywords: *Cycas taitungensis*; RNA editing; RNA extraction; Guanidine thiocyanate.

RNA 编辑是指转录后 RNA 成熟过程中的碱基的插入、缺失和替换等修饰和加工的过程,使得 RNA 所携带的遗传信息发生改变,从而导致蛋白质序列的改变的过程^[1]。RNA 编辑广泛存在于动植物及微生物中,在叶绿体、线粒体和细胞核基因中均可发生,根据编辑效率的不同可分为沉默编辑、部分编辑和完全编辑三种^[2]。叶绿体的 RNA 编辑在高等植物中是广泛存在的,并在叶绿体基因的表达与调控方面起着重要的作用,是扩展原有遗传信息、增加基因表达调控途径的一种有效方式^[3]。RNA 编辑还能够通过提高氨基酸的保守性来影响蛋白

质的结构,进而影响其功能的发挥^[4]。叶绿体 RNA 编辑具有组织特异性和发育阶段特异性,并受外界环境影响。目前,已经测定叶绿体 RNA 编辑位点的高等植物有豌豆^[5]、烟草^[6]、拟南芥^[7]、番茄^[8]、角苔^[9]、铁线蕨^[10]、蝴蝶兰^[11]、黄瓜^[12]、棉花^[13]、小麦^[14]、菠菜^[15]、玉米、水稻、甘蔗、黑麦、大麦^[16]、粗山羊草等,研究发现高等植物叶绿体中的 RNA 编辑主要以胞嘧啶转换成尿嘧啶的形式存在,且主要发生在密码子的第一、二位碱基,往往造成亲水性氨基酸转变为疏水性氨基酸。目前,叶绿体 RNA 编辑位点的鉴定方法主要有生物信息学预测、高通量测序

收稿日期:2015-04-29;修回日期:2015-11-23.

作者简介:沈成才,女,中教一级,研究方向:生物技术;E-mail:shence_1@sina.cn.

和 PCR 扩增等方法^[17]。

目前,有关叶绿体 RNA 编辑的模型以及相关进化问题取得了较大进展,但裸子植物中关于叶绿体 RNA 编辑的研究的报道仅见于黑松^[18]和银杏^[19]等少数植物。现代裸子植物约有 800 种,隶属 5 纲即苏铁纲、银杏纲、松柏纲、红豆杉纲和买麻藤纲。苏铁(*Cycas revoluta Thunb*),苏铁科苏铁属,又名凤尾蕉、避火蕉、金代、铁树等,苏铁科植物是世界上最古老的裸子植物,被地质学家誉为“植物活化石”^[20]。有关苏铁 RNA 编辑的研究不多,李璐等人在常规的 CTBA 法中,加入了硼砂和 β -巯基乙醇来消除多酚和多糖的干扰,从而得到了一个从苏铁叶片中有效提取 RNA 的方法^[21]。台湾生物中央研究所赵淑妙教授预测台东苏铁中 psbL 基因只有一个 RNA 编辑位点,其它基因中没有 RNA 编辑现象^[22]。江媛、陆萍等人认为,台东苏铁的叶绿体基因组中有 40 个蛋白编码基因有 RNA 编辑现象,在植物进化中, RNA 编辑正在逐渐消失且密码子的第一、三位消失的更快,台东苏铁的叶绿体基因组的 RNA 编辑位点比线粒体少三倍^[23]。

现阶段,对苏铁 RNA 编辑的研究较少,并且倾向与理论预测水平。计算机预测快速方便,但结果可能与真实情况存在偏差,也无法预测第三位的沉默编辑。从已有文献报道以及银杏编辑位点的分析,表明裸子植物中有较多 RNA 编辑现象。因此,本次通过实验手段并结合生物信息学的方法,对苏铁叶绿体 8 个功能基因进行 RNA 编辑位点的分析,确定苏铁中是否有 RNA 编辑现象,为进一步全面了解苏铁叶绿体中功能基因全部编辑位点及其特点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

台东苏铁(*Cycas taitungensis*),购买于西安三森花卉市场。

1.1.2 实验试剂

GT 溶液(4 mol/L 异硫氰酸胍,25 mmol/L 柠檬酸钠,0.5% 十二烷基肌氨酸钠);

10×TBE 电泳缓冲液(108 g Tris; 55 g 硼酸; 9.3 g EDTA2Na; 1 000 mL; PH8.0); 1% 琼脂糖凝胶(0.2 g 琼脂糖; 1×TBE 缓冲液 20 mL; 2 μ EB); 3 mol/L NaAc (pH5.8), 2 mol/L NaAc (pH4.8), 4 mol/L LiCl, 0.1% DEPC 水。无水乙醇、液氮、氯仿、水饱和酚、RT-PCR Kit、DNA 酶等。

1.1.3 实验仪器

DYY-12 型电泳仪; PB-10 型 PH 计; BS-124S 型电子天平; YDS-30 型液氮生物容器; DSX-280A 型不锈钢手提式压力蒸汽灭菌锅; JB-3 定时恒温磁力搅拌器; DYCP-31DN 电泳槽; ALS1296 型 PCR 仪; Centrifuge 5804R 型台式冷冻离心机; Centrifuge 5417C 型台式高速离心机; AGX-7601 型通风厨; 精密微量移液器; GDS-8000 型凝胶成像系统; UNICAM UV300 型紫外分光光度计; HH-2B 型数显恒温水浴锅; DW-86L368 型超低温冰箱; GZX-9140MBE 型数显鼓风干燥箱; PE 手套, 离心管, PCR 管, 枪头。

1.2 方法

1.2.1 异硫氰酸胍法提取植物叶片总 RNA

(1) 称取 0.1 g 新鲜植物叶片, 加入液氮研磨成粉末, 移入预冷的 1.5 mL Eppendorf 管中。

(2) 加入 300 μ L GT 溶液, 混匀; 加入 30 μ L 2 mol/L NaAc (pH 4.8), 反复振荡混匀; 加入 300 μ L 酚酸与 100 μ L 氯仿, 混匀。

(3) 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀, 取上清液移至另一 DEPC 水处理过的干净离心管中, 加入 2.5 倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 5~6 h。(-20 $^{\circ}$ C 可放置过夜)

(4) 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液。在沉淀中加入 100 μ L 4 mol/L LiCl, 使沉淀溶解。

(5) 12 500 r/min 离心 15 min, 弃上清液; 在沉淀中加入 100 μ L 灭菌后的 DEPC 水, 混匀后再加入 50 μ L 氯仿, 50 μ L 水饱和酚混匀。

(6) 12 500 r/min 离心 5 min, 吸上清液移至另一 DEPC 水处理过的 1.5 mL Eppendorf 管, 加入等体积氯仿。

(7) 12 500 r/min 离心 5 min。吸上清液移至另一 DEPC 水处理过的 1.5 mL Eppendorf 管, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.8) 和两倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置过夜。

(8) 12 500 r/min 离心 5 min, 小心吸去上清, RNA 沉淀在室温下稍干燥。

(9) 加入 20 μ L DEPC 处理过的灭菌水溶解, 取 5 μ L 样品经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(100v, 100 mA, 20 min) RNA 质量, 并取 2 μ L 样品加入 498 μ L DEPC 处理过的水, 用紫外分光光度计测定 RNA 浓度; 其余样品 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 待扩增基因引物设计

确定 RNA 编辑位点较多的 8 个基因, psbL、psbF、psbE、PetB、PetD、ndhB、ndhA、ndhD, 从 NCBI 上查出台东苏铁 *Cycas taitungensis* (序列号 [NC-

009618])全部叶绿体 DNA 序列和 cDNA 序列,选取编码框前后 100 bp 处的核苷酸序列,用相关软件设计并合成引物。

引物名称及序列见表 1。

设计引物所用到的软件有:

<http://www.sigmagenossys.com/calc/DNAcalc.asp>

http://www.bioinformatics.vg/bioinformatics_tools/reversecomplement.shtml

表 1 引物名称及序列

Table 1 Name and sequences of primers

序号	引物名称	序列
1	Cyta.psbLFEF	CCTAATCTCTATCTTTTATGGG
	Cyta.psbLFEF	ATCAGATCTCTCCGGATGAG
2	Cyta.PetBF1	CGGTAGTTTGATCGTGTAAAC
	Cyta.PetBR1	CTATCATTACTCAAAACAATATG
3	Cyta.PetDF1	GTTGAAATAGATTCTCAGACG
	Cyta.petDR1	AGGGAGAACTGTTTTGAAGC
4	Cyta.ndhBF1	GTTACTAATTCATGATCTGGC
	Cyta.ndhBR1	GCAGCTACTTTTGAAGTAAC
	Cyta.ndhBF2	TAGTCCCTTTTCATCAATGG
	Cyta.ndhBR2	CAAATCGACTAATTTCTCCG
5	Cyta.ndhD F1	GAGCATGGGTTTTTCTATAG
	Cyta.ndhD R1	GAATTAATCCATATCCCCCC
	Cyta.ndhD F2	CTTTACATACCTGGCTACCG
	Cyta.ndhD R2	GTATCCCATGACTATCTAGTTGAC
6	Cyta.ndhA F1	AAATTGGCCGATATCATGAC
	Cyta.ndhA R1	CATATCTAGACTGTGCTTCAAC
	Cyta.ndhA F2	GAAATCCCTCTAGCTTTATG
	Cyta.ndhA R2	CTACCAATTTCCGGATGTGTTAC

1.2.3 RT-PCR 扩增

用 RNase-free 的 DNaseI 去除混杂在总 RNA 中的基因组 DNA,采用逆转录试剂盒进行逆转录(具体操作按照试剂盒说明书进行),用 3 μ L 的 RNA 为模板,对逆转得到的 cDNA,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 2 μ L 台东苏铁的 cDNA, 12.5 μ L 2 \times Taq PCR Mix, 上、下游引物各 2 μ L,用水补足至 25 μ L。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 3 m; 95 $^{\circ}$ C 1 m, 55 $^{\circ}$ C 1 m, 72 $^{\circ}$ C 1 m, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 m。PCR 扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。取 2 μ L 样品经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(100 v, 100 mA, 20 min) PCR 扩增条带。

1.2.4 测序结果分析比对

采用 Lesergene 中 seqman 软件对测序结果拼接和分析,并用 ClastW 软件比对台东苏铁 DNA 和 cDNA 序列,确定 RNA 编辑位点。

ClastW 软件来自于 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>

Translate Tool 软件 <http://ca.expasy.org/tools/dna.html>

2 结果和分析

2.1 RT-PCR 扩增

通过查阅国内外文献,确定了叶绿体中 8 个发生 RNA 编辑现象可能性比较大的基因,即: *psbL*、*psbF*、*psbE*、*PetB*、*PetD*、*ndhB*、*ndhD* 和 *ndhA*。并对这 8 个基因设计引物,进行 RT-PCR 扩增。结果 *psbL*、*psbF*、*psbE* 和 *ndhB*₁ 未扩增出条带,原因待查。图 1 显示其余基因均扩增结果良好,为单一条带。其中 *PetD* 虽然扩增出条带(图 1 泳道 2),但分子量大小与预期结果不符,可能不是想要扩增的条带,故舍去。*ndhD*₁ 和 *ndhA*₁ 在同等 PCR 扩增条件下得到的条带很淡(图 1 泳道 4 和 7),在加大 cDNA 的用量之后,得到了符合测序的条带,但测序结果显示 *ndhD*₁ 和 *ndhA*₁ 的测序信号中断,无结果。可能是由于送去测序的样品中所含杂质较多,或测序本身的问题所造成。上述 PCR 扩增结果表明扩增条带好坏与引物设计,模板用量以及 PCR 体系的优化均有密切关系,而测序结果则与样品浓度,公司测序反应有关。

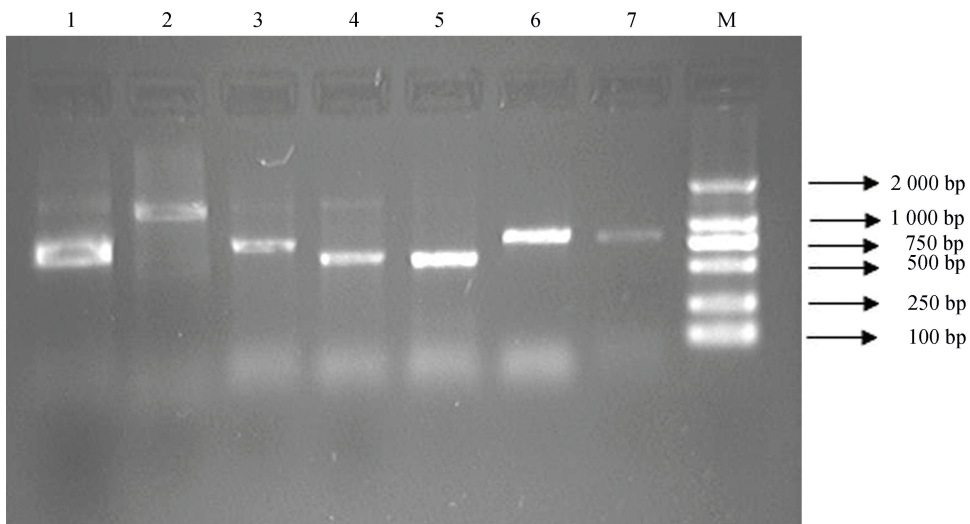


图1 PCR扩增条带的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of PCR amplification bands

2.2 测序结果分析

经 RT-PCR 扩增和测序最终得到了 *PetB*、*ndhB₂*、*ndhD₂* 和 *ndhA₂* 的 cDNA 测序结果。通过与 NCBI 所查到的台东苏铁 DNA 的序列分析比对,从表 2 可知在 *ndhD₂* 的五个位(34, 400, 469, 570, 706 bp)存在 C-U 的完全编辑现象,对应 Pro-Leu, Ser-Phe, Ser-Phe, His-Tyr, Thr-Ile 的氨基酸转变;在 *PetB* 的 634bp 位点存在 C-U 的完全编辑,造成 Pro 到 Ser 氨基酸转变;在 *ndhA* 第二外显子 350 bp 位点存在 U-Y 沉默编辑;在 *ndhB₂* 的 203 位点发生 C-Y 部分编辑,同时 404, 509, 533, 695 位点存在 C-U 的完全编辑,对应造成 Ser-X, Ser-Leu, Ser-Leu, Pro-Leu, Thr-Ile 氨基酸的转变。*ndhB₂* 位点 533 的完全编辑与 203 的部分编辑比较见图 2 和图 3。经过对苏铁叶绿体中的 *ndhD₂*、*PetB*、*ndhA* 和 *ndhB* 的编辑

位点的分析,初步确定在台东苏铁中存在完全编辑、沉默编辑和部分编辑现象,且核苷酸的转换有 C-U 的转变方式。

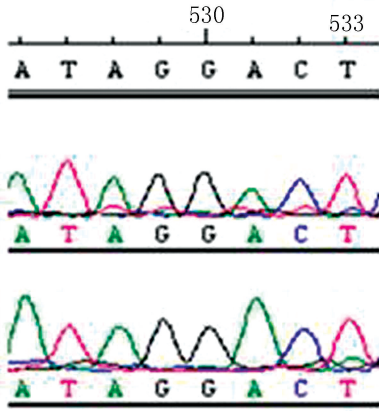
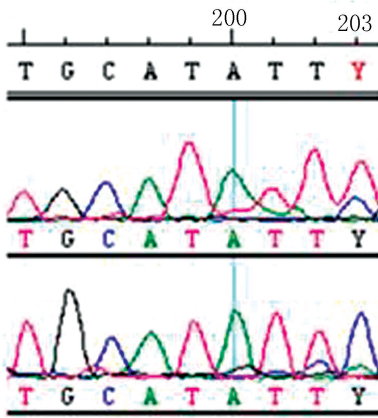
3 讨论与结论

本文采用异硫氰酸胍法获取台东苏铁的总 RNA,成本低且效果好。经 RT-PCR 扩增和测序比对,得知台东苏铁叶绿体功能基因中存在完全编辑、沉默编辑和部分编辑现象。其中 *ndhD₂* 的五个位点存在 C-U 的 RNA 完全编辑;在 *PetB* 的位点存在 1 个 C-U 的完全编辑;在 *ndhA* 第二外显子 350 bp 位点存在 U-Y 沉默编辑;在 *ndhB₂* 的 203 位点发生 C-Y 部分编辑,同时有 4 个位点存在 C-U 的完全编辑。

表 2 台东苏铁中四个叶绿体基因的编辑前后核苷酸和氨基酸变化的统计结果

Table 2 The statistical result of nucleotide and amino acid changes before and after RNA editing in the four chloroplast genes of *Cycas taitungensis*

基因名称	编辑位点	编辑前核苷酸	编辑后核苷酸	编辑前氨基酸	编辑后氨基酸	编辑数目
<i>petB</i>	634	CCA	UCA	Pro	Ser	1
<i>ndhA₂</i>	350	AGU	AGY	Ser	Ser/Ser	1(沉默编辑)
<i>ndhB₂</i>	203	TCG	UYG	Ser	Ser/Leu	5(1个部分编辑)
	404	TCG	UUG	Ser	Leu	
	509	TCA	UUA	Ser	Leu	
	533	CCC	CUC	Pro	Leu	
	695	ACA	AUA	Thr	Ile	
<i>ndhD₂</i>	34	CCA	CUA	Pro	Leu	5
	400	TCT	UUU	Ser	Phe	
	469	TCT	UUU	Ser	Phe	
	570	CAT	UAU	His	Tyr	
	706	ACT	AUU	Thr	Ile	

图 2 *ndhB₂* 完全编辑Fig 2 Completely editing sites in *ndhB₂*图 3 *ndhB₂* 部分编辑Fig 3 Partial editing sites in *ndhB₂*

这说明台东苏铁叶绿体功能基因存在 RNA 编辑现象,大部分编辑呈现 C-U 的转变,*ndh* 类基因中 RNA 编辑发生频率较高,并且丝氨酸相比其他氨基酸有更高的编辑频率。这一结论与江媛、陆萍等人的研究具有一致性,在 *petB* 的完全编辑和 *ndhD* 有 5 个完全编辑位点方面的研究结果也是具有一致性^[23]。测序结果显示 *ndhB* 有 4 个位点完全编辑与 1 个位点部分编辑,*ndhA* 有一个沉默编辑位点,这与陆萍等人的研究中提到 *ndhB* 仅有一个完全编辑位点且 *ndhA* 中未出现沉默编辑的结论不一致,这可能与材料的选择、不同发育阶段以及环境因素有关,有待进一步研究。

RNA 编辑是高等植物叶绿体转录本成熟过程中的一种重要修饰和加工方式。RNA 编辑使人们对生物的长期进化中所形成的遗传信息表达和调控机制有了一定的认识,也加深了对复杂的生命现象的认识。已有研究表明, RNA 编辑位点在进化过程中呈减少趋势,但一些重要的位点会继续保留^[24]。台冬

苏铁中的 *ndhB* 的部分编辑位点是调控基因表达的一种方式,还是进化过程中会消失的位点,有待进一步的研究。*ndhA* 中存在沉默编辑位点,而近年来对于沉默编辑功能的认识也存在争议。Hirose 等人认为沉默编辑与叶绿体的照光程度和发展阶段相关^[25]; Nakamura 和 Sugiura 的研究表明,叶绿体基因组存在密码子的偏好性,沉默编辑会影响蛋白质翻译的效率^[26];也有学者认为沉默编辑似乎是多余的,在今后的进化过程中会消除^[27]。

总之, RNA 编辑不但使编码基因组的遗传信息得到了扩增,同时对基因的表达产物有所影响。目前对 RNA 编辑的机制还不完全清楚,尤其是台东苏铁属于较古老的裸子植物,对其叶绿体 RNA 编辑的研究具有一定的生物学意义。为进一步全面了解苏铁叶绿体中功能基因全部编辑位点的特点和功能奠定了基础,也为研究生物进化方面提供一定的参考价值。

参考文献

- [1]程水源,陈昆松,杜何为,等.银杏 RNA 的提取[J].果树学报,2005,22(4):428-429.
CHENG Shuiyuan, CHEN Kunsong, DU Hewei, et al. Total RNA extraction of Ginkgo biloba leaves[J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(4): 428-429.
- [2]MA Yanli, YU Jianing. The progress of RNA editing in higher plant chloroplast[J]. Chinese Bulletin of Life Science, 2009, 21(3): 438-443.
- [3]马红战,张保军,樊虎玲.大麦叶绿体基因 RNA 编辑位点的预测与鉴定[J].麦类作物学报,2013,33(6):1071-1077.
MA Hongzhan, ZHANG Baojun, FAN Huling. Prediction and identification of RNA editing sites in the Chloroplast genome of barley[J]. Journal of Triticeae Crops, 2013, 33(6): 1071-1077.
- [4]石文清,邓平川,李变丽,等.二穗短柄草叶绿体 RNA 编辑位点的预测及其鉴定[J].麦类作物学报,2012,32(1):28-35.
SHI Wenqing, DENG Pingchuan, LI Bianli, et al. Prediction and identification of RNA editing sites in Chloroplast transcripts of brachypodium distachyon[J]. Journal of Triticeae Crops, 2012, 32(1): 28-35.
- [5]INADA M, SASAKI T, YUKAWA M, et al. A systematic search for RNA editing sites in peachloroplasts: an editing event causes diversification from the evolutionarily conserved amino acid sequence[J]. Plant & Cell Physiology, 2004, 45(11):1615-1622.
- [6]HIROSE T, KUSUMEGI T, TSUDZUKI T, et al. RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible

- regulator of chloroplast RNA polymerase activity[J]. *Molecular General Genetics*, 1999, 262(3): 462-467.
- [7] TSUDZUKI T, WAKASUGI T, SUGIURA M. Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2001, 53(4): 327-332.
- [8] KAHLAU S, ASPINALL S, GRAY J C, et al. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, 63: 194-207.
- [9] KUGITA M, YAMAMOTO Y, FUJIKAWA T, et al. RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(9): 2417-2423.
- [10] WOLF P G, ROWE C A, HASEBE M. High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris* [J]. *Gene*, 2004, 339: 89-97.
- [11] ZENG W H, LIAO S C, CHANG C C. Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts of *Phalaenopsis aphrodite* and comparative analysis with those of other seed plants [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2007, 48(2): 362-368.
- [12] GUZOWSKA-NOWOWIEJSKA M, FIEDOROWICZ E, PLADER W. Cucumber, melon, pumpkin, and squash: are rules of editing in flowering plants chloroplast genes so well known indeed[J]. *Gene*, 2009, 434(1-2): 1-8.
- [13] 江媛, 范术丽, 宋美珍, 等. 棉花叶绿体基因 RNA 编辑位点的测定及分析[J]. *植物学报*, 2011, 46(4): 386-395.
JIANG Yuan, FAN Shuli, SONG Meizhen, et al. Identification and analysis of RNA editing sites in Chloroplast transcripts of *Gossypium hirsutum*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2011, 46(4): 386-395.
- [14] 邓李坤, 李妍, 俞嘉宁. 小麦叶绿体蛋白质编码基因 RNA 编辑位点的测定及与返白现象的关系[J]. *植物学报*, 2012, 47(6): 581-593.
DENG Likun, LI Yan, YU Jianing. RNA editing sites in Chloroplast protein-coding genes in leaf white mutant of *triticum aestivum*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(6): 581-593.
- [15] BOCK R, HAGEMANN R, KÜSSEL H, et al. Tissue- and stage specific modulation of RNA editing of the psbF and psbL transcripts from spinach plastids—a new regulatory mechanism[J]. *Molecular & Genetic General*, 1993, 240(2): 238-244.
- [16] DIEKMANN K, HODKINSON T R, WOLFE K H, et al. Complete Chloroplast genome sequence of a major allogamous forage species, perennial ryegrass[J]. *DNA Research*, 2009, 16(3): 166-176.
- [17] 王梦醒, 詹豪爽, 吕萌荔, 等. 粗山羊草叶绿体基因 RNA 编辑位点的鉴定与分析[J]. *麦类作物学报*, 2014, 34(10): 1341-1349.
WANG Mengxing, ZHAN Haoshuang, LU Mengli, et al. Identification and analysis of RNA editing sites in Chloroplast transcripts of *aegilops tauschii*[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2014, 34(10): 1341-1349.
- [18] EVI K, WERNER H, DIETER E. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18(1): 33-39.
- [19] 马艳莉, 陈海燕, 王继刚, 等. 银杏叶绿体 ndhF RNA 编辑现象分析及 C290 位编辑对胁迫处理的响应[J]. *植物学报*, 2011, 46(1): 1-10.
MA Yanli, CHEN Haiyan, WANG Jigang, et al. Analysis of editing sites for Chloroplast *ndhF* in *Ginkgo biloba* and the editing efficiency at C290 in response to different stresses [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2011, 46(1): 1-10.
- [20] TAKAHIKO T, TATSUYA W, MASAHIRO S. Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant Chloroplasts [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2001, 53(4-5): 327-332.
- [21] 李璐, 付乾堂, 余迪求. 一种从苏铁叶片中有效提取 RNA 的方法[J]. *云南植物研究*, 2008, 30(5): 593-596.
LI Lu, FU Qiantang, YU Diqiu. An effective protocol for the isolation of RNA from *Cycad* leaves [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2008, 30(5): 593-596.
- [22] WU C S, WANG Yanan, LIU Shumei, et al. Chloroplast genome (cpDNA) of *Cycas taitungensis* and 56 cp protein-coding genes of *Gnetum parvifolium*: Insights into cpDNA evolution and phylogeny of extant seed plants[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(6): 1336-1379.
- [23] CHEN Haiyan, DENG Likun, JIANG Yuan, et al. RNA editing sites exist in protein-coding genes in the Chloroplast genome of *Cycas taitungensis* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(12): 961-970.
- [24] FIEBIG A, STEGEMANN S, BOCK R. Rapid evolution of RNA editing sites in a small non-essential plastid gene[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(12): 3615-3622.
- [25] HIROSE T, FAN H, SUZUKI J Y, et al. Occurrence of silent RNA editing in chloroplasts: its species specificity and the influence of environmental and developmental conditions [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(3): 667-672.
- [26] NAKAMURA M, SUGIURA M. Translation efficiencies of synonymous codons are not always correlated with codon usage in tobacco chloroplasts[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(1): 128-134.