

技术与方法

一种有效分离沙冬青线粒体基因组DNA的方法

于婷乔 崔洪玮 孙丽春 刘胜利 陈玉珍* 卢存福*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京林木分子设计育种高精尖创新中心, 林木育种国家工程中心, 北京 100083)

摘要 线粒体作为重要的细胞器,在植物进化适应过程中起着不可忽视的作用。抗旱耐寒常绿阔叶灌木沙冬青主要分布在我国西北荒漠地区,是第三纪孑遗植物,研究该植物线粒体基因组与长期进化适应的关系具有重要意义。然而,用常规的方法难以分离纯化获得沙冬青线粒体基因组DNA,限制了沙冬青线粒体功能基因组研究。该研究利用不连续蔗糖梯度密度离心和DNase I消化技术,成功获得了高纯度沙冬青线粒体DNA,该线粒体DNA的纯度和完整性满足建库的要求,为沙冬青线粒体基因组研究提供了技术支持,对其他植物线粒体基因组学研究也具有参考价值。

关键词 沙冬青; 线粒体DNA; 提取纯化; 质量检测

An Effective Method for *Ammopiptanthus mongolicus* Mitochondrial Genome Extraction

Yu Tingqiao, Cui Hongwei, Sun Lichun, Liu Shengli, Chen Yuzhen*, Lu Cunfu*

(Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Mitochondria is essential in the process of plant evolution. Xerophyte evergreen broadleaf shrub *Ammopiptanthus mongolicus* is a tertiary relic plant, which is mainly distributed in the desert region of northwest China. Analyses of the complete mitochondrial genome of *A. mongolicus* may provide valuable information for understanding the evolutionary adaptation of this xerophyte. However, it is difficult to isolate and purify the mitochondrial genome DNA of *A. mongolicus* using the conventional method. So, researches on *A. mongolicus* mitochondria function genome is restricted. In this study, we successfully obtained the high purity mitochondrial DNA by using the discontinuous sucrose density gradient centrifugation and DNase I digestion technology. The mitochondrial DNA purity and integrity met the requirements of building library for mitochondrial genome sequencing, supplying technological support for *A. mongolicus* functional mitochondria genome research.

Keywords *Ammopiptanthus mongolicus*; mitochondrial DNA; extraction and purification; quality detection

沙冬青隶属于豆科蝶形花亚科沙冬青属,为荒漠特有超旱生常绿灌木,是第三纪古热带气候地中

海子遗物种,国家三级濒危保护植物^[1]。沙冬青在我国主要分布于内蒙古阿拉善和鄂尔多斯西部,该

收稿日期: 2017-11-01 接受日期: 2017-12-11

国家自然科学基金(批准号: 31270737)、高等学校学科创新引智计划(批准号: B13007)、长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT13047)和北京市自然科学基金(批准号: 6112016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62336081, E-mail: chenyuzhen@bjfu.edu.cn; lucunfu@bjfu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31270737), 111 Project (Grant No.B13007), Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Grant No.IRT13047), and Program for Beijing Municipal Natural Science Foundation (Grant No.6112016)

Received: November 1, 2017 Accepted: December 11, 2017

*Corresponding authors. Tel: +86-10-62336081, E-mail: chenyuzhen@bjfu.edu.cn; lucunfu@bjfu.edu.cn

网络出版时间: 2018-03-09 15:25:05

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1524.006.html>

地区属大陆性气候, 春季干燥, 夏季炎热, 冬季寒冷, 年降水量50~200 mm, 且降水大都集中于夏季^[2]。沙冬青具有显著的耐寒耐旱形态及生理特性, 如叶片角质层厚、表皮毛浓密^[3]、根系发达、侧根多、有很强的固氮和吸水作用^[4]。在长期的适应性进化过程中, 沙冬青基因组可能发生了适应性变化, 特殊抗性基因表达产生的功能性蛋白质对耐寒耐旱性起着重要的作用。我们前期的研究表明, 沙冬青的脱水素基因(*Ammopiptanthus mongolicus* cold-induced protein, *AmCIP*)^[5]、胚胎成熟基因(*Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant, *AmLEA*)^[6]、钙调素基因(*Ammopiptanthus mongolicus* calmodulin, *AmCaM*)^[7]等都能有效地提高异源表达物种的抗寒或抗旱能力。

近些年的研究显示, 细胞质的起源在重组自交系群体对核等位基因分离有着重要的影响^[8]。细胞器基因组通常与植物的适应性相关^[9-10]。Tao等^[11]在水稻中证实, 细胞质和细胞核相互作用在产量、低温抗性等一些重要农艺性状方面起着重要作用。Moison等^[12]分析了拟南芥95个已注册物种的线粒体和质体基因组的多样性, 证实拟南芥的进化史与细胞核和细胞质相互作用有关。植物长期受自然环境变化的影响, 不同植物的抗逆强度随着地域和种类的不同而有所区别。韩善华等^[13]曾用透射电子显微镜观察到, 在严寒的冬季, 沙冬青线粒体数目增多, 多呈椭圆形, 被膜清晰完整, 膜间隙无肿胀现象, 而且主要分布在一些重要的细胞器附近, 如叶绿体、内质网等。对比叶绿体, 线粒体对低温环境表现更稳定, 在植物的能量代谢、细胞质遗传、细胞质雄性不育、基因组的维护、基因调节等方面也起着至关重要的作用^[14]。植物线粒体自身的DNA重组系统可以有效地修复基因突变, 导致大多数植物物种的线粒体基因序列的进化非常缓慢, 点突变十分罕见。随着生物学技术和测序技术的不断创新和发展, 越来越多的关注点集中于“细胞的能量工厂”——线粒体, 包括线粒体自身的遗传进化以及线粒体与细胞核和叶绿体之间的基因水平转移等^[15]。

当前线粒体基因组研究方法包括: (1)全基因组测序, 根据参考物种的线粒体图谱进行拼接组装; (2)提取线粒体, 获得线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA), 建库、测序、组装^[16]。第一种方法, 植物的全基因组测序信息量大, 成本过高, 完全依赖于测序、拼接和组装等生物信息学技术, 很难进行假基

因或基因顺序的验证。而植物物种和组织的多样性, 严重影响第二种方法mtDNA的提取效率。迄今为止, 共获得了70多种植物完整的线粒体基因组, 而其中多数为农作物或草本植物, 很少有木本线粒体基因组的报道, 尤其是极端生长环境下的抗逆植物更是罕见。基于此, 本研究主要通过利用不连续蔗糖梯度密度离心法和DNase I消化技术提取高纯度沙冬青的mtDNA, 旨在为后续沙冬青线粒体全基因组测序及功能基因组研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 材料 选取颗粒饱满、完整的蒙古沙冬青种子约30 g, 种子源于内蒙古阿拉善盟地区。种子经75%无水乙醇消毒1 min, 无菌水冲洗3次, 再经2% NaClO₃消毒6 min, 无菌水冲洗4次, 放无菌滤纸上约5 min。消毒后的种子种脐朝下置于含有WPM培养基的100 mL三角瓶中, 25±1 °C, 暗培养14天。

1.1.2 试剂 (1)研磨缓冲液: 1.25 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 0.5% (w/v) PVP-40, 0.5% (w/v) BSA, 15 mmol/L β-巯基乙醇, 0.3 mol/L蔗糖(PVP-40、BSA和β-巯基乙醇, 使用前加); (2)悬浮缓冲液: 0.3 mol/L蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L EDTA; (3)洗涤缓冲液: 0.35 mol/L蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA; (4)RQ1 RNase-Free DNase, RQ1 DNase Stop Solution (Promega, Cat. #M6101, 美国); (5)40%和23%蔗糖缓冲液; (6)裂解缓冲液[5% (w/v)肌氨酸钠、50 mmol/L Tris-HCl、25 mmol/L EDTA]; (7)2 mol/L乙酸钠; (8)75%无水乙醇, 95%无水乙醇; (9)TE: 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0; (10)Rh123缓冲液: 0.3 mol/L蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L NADH, pH7.4。

1.1.3 仪器 实验所用仪器有: 高速组织捣碎机(BILONJJ-2型)、冷冻高速离心机Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge (SW40 rotor, Beckman, Fullerton, CA, USA)、PCR仪、凝胶成像系统、电泳仪和激光共聚焦显微镜。

1.2 方法

1.2.1 线粒体的富集 (1)取生长14天鲜嫩的无菌沙冬青黄化苗整株共100 g, 加入200 mL研磨缓冲液, 置于4 °C冰箱内浸泡4 h, 以下所有实验步骤如未特

指出, 均在4 °C低温下进行。(2)将样品放入高速组织捣碎机中, 高速捣碎, 每工作2 min暂停40 s。如此循环6~7次, 组织样品完全呈黄色浆状。浆液用无菌的4层纱布过滤, 该过程完全置于冰上进行。(3)滤液低温离心, 3 000 ×g, 10 min, 重复2次, 弃沉淀。(4)50 mL无菌离心管收集上清, 再次低温离心, 12 000 ×g, 15 min, 弃上清。收集沉淀, 此时的沉淀为粗线粒体。(5)用10 mL悬浮缓冲液轻轻地悬浮粗线粒体, 加入100 μL RQ1 RNase-Free DNase, DNA消化反应1 h (冰浴), 然后加入10 μL RQ1 DNase Stop Solution终止消化反应。(6)加入3倍体积的洗涤缓冲液, 4 °C下18 000 ×g离心20 min; 10 mL洗涤缓冲液悬浮。(7)向38 mL薄壁离心管依次滴入18 mL 40%、10 mL 23%的蔗糖溶液和上述10 mL的粗线粒体悬浮液, 置冷冻高速离心机, 4 °C下20 000 ×g离心20 min。(8)小心吸取上层和下层溶液, 洗涤缓冲液稀释3倍, 4 °C下20 000 ×g离心20 min, 得到纯线粒体。

1.2.2 线粒体DNA的提取 (1)上述所得的线粒体沉淀中加入1 mL洗涤缓冲液和1/5体积的裂解缓冲液, 悬浮沉淀。37 °C下裂解1 h。(2)将上述裂解产物分装于2个1.5 mL的离心管中, 加入600 μL的24:1的氯仿-异戊醇, 上下混匀, 12 000 ×g离心10 min, 抽提2次, 取上清。(3)加入0.1倍体积的2 mol/L乙酸钠和2倍体积的95%无水乙醇, -20 °C过夜。(4)13 000 ×g离心20 min, 弃上清。75%无水乙醇洗涤1次。空气中晾10 min, 加入30 μL TE溶液。

1.2.3 线粒体DNA的质量检测 (1)DNA完整性: (a)1%琼脂糖凝胶电泳胶浓度, 150 V, 40 min; (b)分离得到的40 μg线粒体沉淀, 加入200 μL 1 mmol/L Rh123缓冲液, 30 °C黑暗条件下孵育5 min^[17], 激光共聚焦显微镜(Nikon, A1 MP+/A1R MP+)下观察染色的线粒体。(2)DNA浓度: Qubit(Fluorometers, 美国)荧光定量仪。(3)mtDNA纯度: 利用线粒体和叶绿体以及核基因组的特异性引物进行PCR扩增。

2 结果

2.1 沙冬青线粒体的完整性

线粒体提取结果如图1A所示, 蔗糖梯度密度高速离心后, 线粒体提取液分为上下两层悬浊液, 上层为轻链线粒体, 富含胞嘧啶, 顺时针复制; 下层为重链线粒体, 富含鸟嘌呤, 逆时针方向复制^[18-19]。在本实验中, 合并两层线粒体, 混匀富集, 获得纯的线粒

体。该结果与Zhou等^[20]的结果相一致。从罗丹明123染料的染色结果来看, 粗线粒体中含有一定的细胞碎片等杂质(图1B和图1C白箭头所示), 经不连续蔗糖密度离心后, 线粒体明显得到纯化, 可以看到规则的圆形颗粒(图1D和图1E红箭头所示)。综上, 为了获得高质量的沙冬青线粒体, 蔗糖梯度密度离心方法是提取沙冬青mtDNA的有效方法。

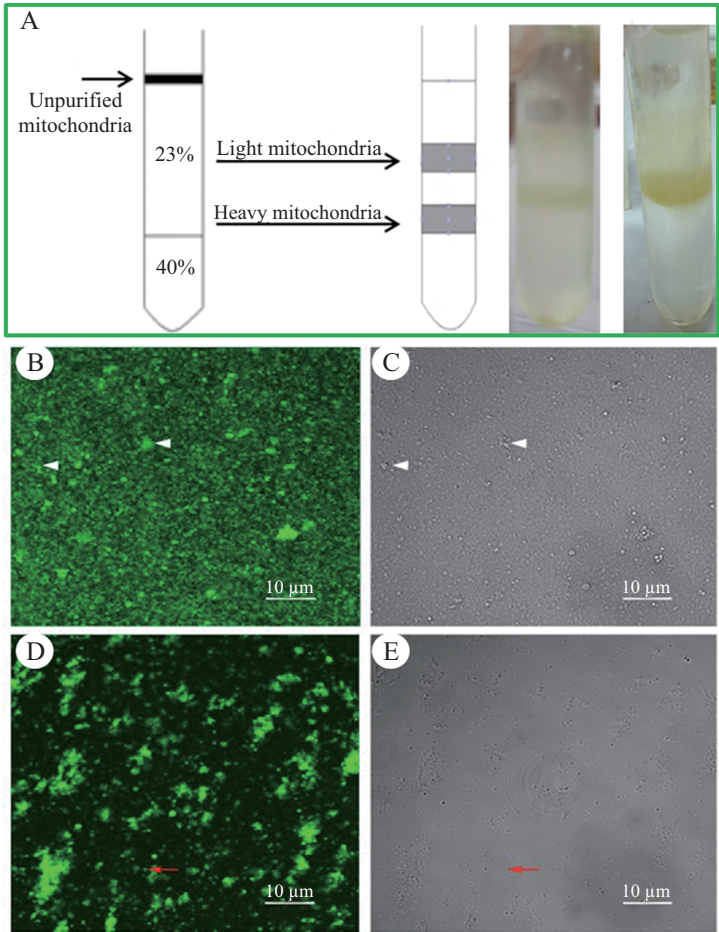
2.2 沙冬青线粒体DNA质量检测

从Qubit Fluorometer测定结果(表1)可见, 本方法提取的mtDNA纯度高, 其 D_{260}/D_{280} 平均值为1.92, 介于1.8~2.0, 表明样品中无蛋白质或酚类污染; D_{260}/D_{230} 平均为1.84, 表明样品中基本不含有机试剂等干扰; 样品平均浓度为2 370.95 ng/μL, 平均每克黄化苗可提取mtDNA 64.02 μg。

研究表明, 植物线粒体全基因组大小为200~2 000 Kb, 约是真菌和动物线粒体基因组的几十至几百倍^[21]。由于其分子质量较大, 且多数是环形分子, 因此要获得完整的mtDNA, 必须严格控制提取步骤, 过程必须规范且快速, 以防mtDNA降解或断裂。用本方法所提取的mtDNA经琼脂糖电泳检测, 凝胶图像分析系统成像显示, DNA片段没有降解, 无拖尾现象, 条带单一, 带型整齐, DNA完整性较好(图2A), 可进行后续的建库实验。根据李文强等^[22]的研究结果, 如果提取的mtDNA中有细胞核DNA的混入, 凝胶电泳检测时会有明显的拖尾现象。本结果的mtDNA条带清晰可见(图2A), 所以有效排除了细胞核DNA的干扰。

根据实验室前期构建的EST^[23]数据, 选取叶绿体基因 $ndhK$ 、线粒体基因 $rrn26S$ 和细胞核基因 $actin$, 设计特异性引物^[24], 分别以沙冬青黄化苗的cDNA和mtDNA为模板进行PCR扩增鉴定。图2B中的第1、2、3泳道扩增出了条带, 大小分别为164 bp、483 bp、375 bp, 和目的片段大小一致, 从而证明叶绿体基因 $ndhK$ 、线粒体基因 $rrn26S$ 、细胞核基因 $actin$ 在沙冬青的黄化苗中表达。而图2B的第4、5、6泳道扩增结果显示, 只有5泳道扩增出了线粒体基因 $rrn26S$ 的特异片段, 无杂带, 而叶绿体基因和细胞核基因都没有扩增产物。以上说明, 本实验方法得到的沙冬青的mtDNA纯度较高, 可以排除叶绿体基因和核基因的干扰, 可用于后续线粒体基因组测序及分子实验。

依据上述方法, 我们成功组装了沙冬青的线粒体基因组(GenBank: MK683210)。将线粒体 $rrn26S$



A: 不连续的蔗糖梯度密度离心提纯沙冬青线粒体; B~E: 沙冬青线粒体的激光共聚焦显微镜检测B(荧光素滤光片)、C(明场, 粗线粒体Rh123染色)、D(荧光素滤光片)、E(明场, 纯线粒体Rh123染色); 红色箭头表示线粒体, 白色箭头表示细胞碎片。

A: mitochondrial purification by discontinuous sucrose gradient density centrifugation; B-E: *Ammopiptanthus mongolicus* mitochondrial quality observed by confocal microscopy B (fluorescein filter), C (bright-field, primary mitochondria pellet stained with Rh123), D (fluorescein filter), E (bright-field): pure mitochondria stained with Rh123; The red arrows represent the pure mitochondria and the white arrows represent the cell debris.

图1 沙冬青线粒体提取纯化及检测结果

Fig.1 Mitochondria extraction, purification and detection from *Ammopiptanthus mongolicus*

表1 沙冬青线粒体DNA Qubit Fluorometer测定结果

Table 1 Quality determination of *Ammopiptanthus mongolicus* mtDNA by Qubit Fluorometer

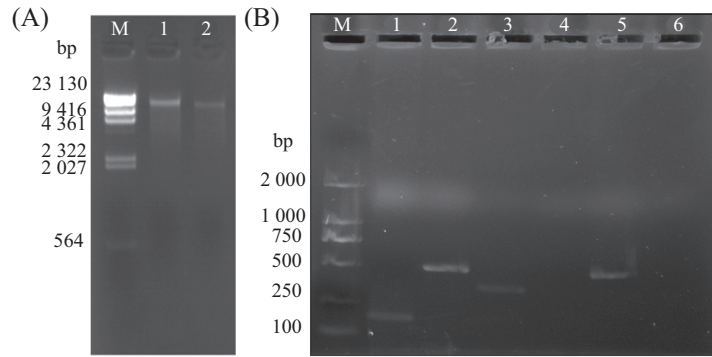
样品名称 Sample	浓度(ng/μL) Concentration (ng/μL)	总量(μg) Total (μg)	D_{260}/D_{280}	D_{260}/D_{230}
1	2 326.10	62.80	1.92	1.85
2	2 415.80	65.23	1.93	1.84

的PCR扩增序列和组装后测序的rrn26S基因完整序列进行比对, 共有序列的长度为483 bp, 符合PCR扩增的目的片段大小(图2B)且相似度为100%, 证实rrn26S可作为线粒体的特异性基因对提取的样品进行检测(图3B)。此外, 我们也成功得到了沙冬青的叶绿体基因组(GenBank: KC695666), 将叶绿体ndhK的PCR扩增序列和组装后测序的ndhK基因完整序列进行比对, 共有序列的长度为164 bp, 符合PCR扩增

的目的片段大小(图2B)且相似度为100%, 证实ndhK可作为叶绿体的特异性基因对样品进行检测(图3A)。

3 讨论

现有的植物mtDNA提取方法多具有组织特异性和物种特异性, 在进行沙冬青mtDNA提取的过程中, 我们运用了多种植物线粒体提取方法, 如Wilson

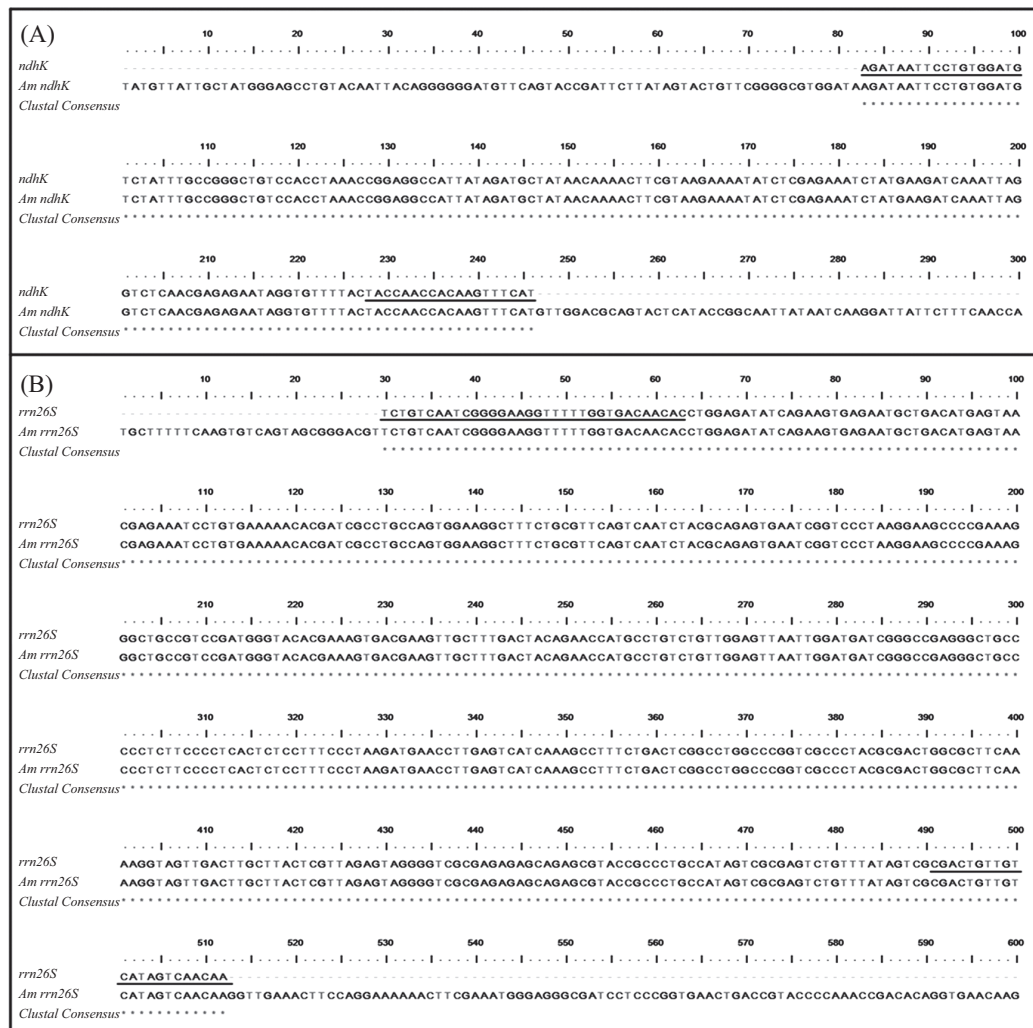


A: 沙冬青mtDNA检测; M: marker 23 130 bp; 1、2: 沙冬青mtDNA样本。B: 沙冬青mtDNA纯度检测; M: marker 2 000 bp; 1、4: *ndhK*叶绿体特异性引物; 2、5: *rrn26S*线粒体特异性引物; 3、6: 细胞核特异性引物*actin*。

A: detection of *Ammopiptanthus mongolicus* mtDNA; M: marker 23 130 bp; 1,2: *Ammopiptanthus mongolicus* mtDNA sample. B: quality detection of *Ammopiptanthus mongolicus* mtDNA; M: marker 2 000 bp; 1,4: PCR products using specific primers of Chloroplast *ndhK*; 2,5: PCR products using specific primers of mitochondrial *rrn26S*; 3,6: PCR products using primers of nucleus specific *actin*.

图2 沙冬青mtDNA电泳检测结果

Fig.2 Quality analysis of *Ammopiptanthus mongolicus* mtDNA by agarose gel electrophoresis



A: *ndhK*的PCR扩增序列和叶绿体*ndhK*序列比对; B: *rrn26S*的PCR扩增序列和线粒体*rrn26S*序列比对。

A: alignment of *ndhK* PCR amplification sequence and chloroplast *ndhK* gene sequence; B: alignment of *rrn26S* PCR amplification sequence and mitochondrial *rrn26S* gene sequence.

图3 叶绿体*ndhK*基因和线粒体*rrn26S*基因序列比对分析

Fig.3 Sequence alignment and analysis of *ndhK* from chloroplast and *rrn26S* from mitochondria

等^[25]、李俊英等^[26]、Zaheer等^[27]发表的方法, 但并没有得到理想的沙冬青mtDNA。原因可能有二: (1) 样品量过少, 4~5 g的样品无法富集线粒体, 所以实验提取失败; (2) 以上的方法都只尝试了烟草、玉米、燕麦、拟南芥、胡麻、黄芥末等草本材料, 而并未涉及到木本材料, 不同的物种或组织因其特有的生理代谢过程, 酚类等化合物可能损伤线粒体膜的完整性, 影响线粒体的提取^[27-28]。此外, 相比较动物而言, 植物线粒体的提取容易受到细胞核和叶绿体等的干扰, 影响线粒体的纯度。叶绿体DNA和细胞核DNA对mtDNA纯度有很大影响^[18], 提取的效果不好直接影响后续实验, 特别是高通量测序和分子遗传分析。

本研究采用不连续蔗糖密度梯度高速离心法^[29]和差速离心法^[30]相结合的方法, 利用DNase I有效分离纯化线粒体, 成功建立了沙冬青黄化苗mtDNA的提取体系。为了得到高质量的mtDNA, 本研究做了四点特殊处理: (1) 为排除叶绿体和微生物的干扰, 我们选取无菌黄化苗为实验材料, 暗培养14天, 又经提取缓冲液在4 °C冰箱浸泡8~10 h; (2) 为减少线粒体的损伤, 研磨缓冲液使用前加入BSA和β-巯基乙醇, 防止氧化损伤; (3) 为消除核基因DNA的污染, 线粒体裂解前用RQ1 RNase-Free Dnase消化处理, 降解细胞核DNA, 而后加入足量RQ1 DNase Stop Solution终止反应; (4) 为了保证线粒体的完整性, 控制研磨缓冲液和悬浮缓冲液的pH=8.0, 避免渗透压引起线粒体膜的破损, 影响线粒体的提取质量。尽量简化试验步骤, 本试验中未使用蛋白酶K^[31], 而是在后续试验利用裂解液和氯仿/异戊醇(24:1)反复抽提2~3次, 消除蛋白质、酚类、多糖的污染。

总之, 本研究建立了分离沙冬青mtDNA的方法, 在提取过程中确保对线粒体机械损伤程度最小的基础上, 有效的除去线粒体以外的核DNA以及酚类、多糖类物质, 降低污染率, 提高了mtDNA的纯度和质量。本文结果为沙冬青线粒体基因组研究提供了技术基础, 也可以为其他木本多糖多酚类植物的mtDNA提取纯化提供借鉴。

参考文献 (References)

- 1 马世威, 马玉明. 半荒漠的空间分布及景观生态总析. 干旱区研究(Ma Shiwei, Ma Yuming. Spatial distribution and landscape ecological analysis of semi desert. Arid Zone Research) 1998; 7(4): 58-63.
- 2 蒋志荣. 沙冬青抗旱机理的探讨. 中国沙漠(Jiang zhirong. Study on drought resistance mechanism of *Ammopiptanthus mongolicus*. Journal of Desert Research) 2000; 20(1): 71-4.
- 3 刘家琼, 丘明新. 我国荒漠特有的常绿植物——沙冬青的生态生理及解剖学特征. 植物生态学报(英文版)(Liu Jiaqiong, Qiu mingxin. Eco physiological and anatomical characteristics of a desert endemic evergreen plant *Ammopiptanthus mongolicus* in China. Acta Botanica Sinica) 1982; 24(6): 78-84.
- 4 周宜君, 刘春兰, 冯金朝, 贾晓红. 沙冬青抗旱、抗寒机理的研究进展. 中国沙漠(Zhou Yijun, Liu Chunlan, Feng Jinchao, Jia Xiaohong. Research progress on mechanism of drought resistance and cold resistance of *Ammopiptanthus mongolicus*. J Desert Res) 2001; 21(3): 312-6.
- 5 Shi J, Liu M, Chen Y, Wang J, Lu C. Heterologous expression of the dehydrin-like protein gene *AmCIP* from *Ammopiptanthus mongolicus* enhances viability of *Escherichia coli* and tobacco under cold stress. Plant Growth Regul 2016; 79(1): 71-80.
- 6 Liu R, Liu M, Jie L, Chen Y, Chen Y, Lu C. Heterologous expression of a *Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant protein gene (*AmLEA*) enhances *Escherichia coli*, viability under cold and heat stress. Plant Growth Regul 2010; 60(2): 163-8.
- 7 Yu TQ, Zhi GH, Shi JN, Chen YZ, Shen M, Lu CF. The calmodulin gene *AmCaM* from *Ammopiptanthus mongolicus* confers freezing and heat tolerance in *Escherichia coli*. Plant Growth Regul 2018; 84(1): 169-78.
- 8 Törjék O, Witucka-Wall H, Meyer RC, von Korff M, Kusterer B, Rautengarten C, et al. Segregation distortion in *Arabidopsis*, C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. Theor Appl Genet 2006; 113(8): 1551-61.
- 9 Kapralov, MV, Filatov DA. Molecular adaptation during adaptive radiation in the hawaiian endemic genus *schiedea*. PLoS One 2006; 1(1): e8.
- 10 Atkin OK, Macherel D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. Ann Bot 2009; 103(4): 581-97.
- 11 Tao D, Hu F, Yang J, Yang G, Yang Y, Peng X, et al. Cytoplasm and cytoplasm-nucleus interactions affect agronomic traits in japonica rice. Euphytica 2004; 135(1): 129-34.
- 12 Moison M, Roux F, Quadrado M, Duval R, Ekovich M, Lê DH, et al. Cytoplasmic phylogeny and evidence of cyto-nuclear co-adaptation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 2010; 63(5): 728-38.
- 13 韩善华, 王 双. 高度抗寒植物冬季线粒体的电镜观察. 西北植物学报(Han Shanhua, Wang Shuang. Electron microscopic observation on mitochondria of an especial cold-hardened plant in winter. Acta Bot Boreal-Occident Sin) 2000; 20(4): 539-43.
- 14 Chen Z, Zhao N, Li S, Grover CE, Nie H, Wendel JF, et al. Plant mitochondrial genome evolution and cytoplasmic male sterility. Crit Rev Plant Sci 2017; (3): 1-15.
- 15 Guo W, Grewe F, Fan W, Young GJ, Knoop V, Palmer JD, et al. Ginkgo and welwitschia mitogenomes reveal extreme contrasts in gymnosperm mitochondrial evolution. Mol Biol Evol 2016; 33(6): 1448.
- 16 杨 婧, 黄 原. 线粒体基因组的高通量测序策略. 生命科学(Yang Jing, Huang Yuan. Strategy of high-throughput sequencing technology in the mitochondrial genome sequencing. Chinese Bulletin of Life sciences) 2016; 28(1): 112-7.

- 17 Wang Y, Li Y, Xue H, Pritchard HW, Wang X. Reactive oxygen species (ros)-provoked mitochondria-dependent cell death during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. *Plant Mol Biol* 2015; 81(3): 438-52.
- 18 Dai LS, Kausar S, Abbas MN, Wang TT. Complete sequence and characterization of the ectropis oblique mitochondrial genome and its phylogenetic implications. *Int J Biol Macromol* 2018; 107(Pt A): 1142-50.
- 19 Jemt E, Örjan Persson, Shi Y, Mehmedovic M, Uhler JP, Freyer C, *et al.* Regulation of dna replication at the end of the mitochondrial d-loop involves the helicase twinkle and a conserved sequence element. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(19): 9262-75.
- 20 周望展, 黄 君, 况凌云, 周晓静, 郭能能, 吕建新, 等. 二次蔗糖梯度密度离心纯化线粒体. *中国细胞生物学学报*(Zhou Wangzhan, Huang Jun, Kuang Lingyun, Zhou Xiaojing, Guo Nengneng, Lü Jianxin, *et al.* Mitochondrial purification by two times sucrose density-gradient centrifugation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(4): 510-5.
- 21 张 晓, 张 锐, 侯思宇, 史 计, 郭三堆. 高等植物线粒体基因组研究进展. *中国农业科技导报*(Zhang xiao, Zhang rui, Hou Siyu, Shi ji, Guo Sandui. Research progress on mitochondrial genome of higher plant. *Journal of Agriculture Science and Technology*) 2011; 13(4): 23-31.
- 22 李文强, 张改生, 汪 奎, 牛 娜, 潘栋梁. 小麦mtDNA的高效提取方法. *遗传*(Li Wenqing, Zhang Gaisheng, Wang Kui, Niu Na, Pan Dongliang. An efficient method for isolation of mitochondrial DNA in wheat. *Hereditas*) 2007; 29(6): 771-5.
- 23 Liu MQ, Shi J, Lu CF. Identification of stress-responsive genes in *Ammopiptanthus mongolicus* using ESTs generated from cold- and drought-stressed seedlings. *BMC Plant Biol* 2013; 13: 1-14.
- 24 Shi J, Liu M, Shi J, Zheng G, Wang Y, Wang J, *et al.* Reference gene selection for qPCR in *Ammopiptanthus mongolicus* under abiotic stresses and expression analysis of seven ros-scavenging enzyme genes. *Plant Cell Rep* 2012; 31(7): 1245.
- 25 Wilson AJ, Chourey PS. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources. *Plant Cell Rep* 1984; 3(6): 237-9.
- 26 李俊英, 闻颖达, 蒋嫦英, 李 峰, 高才昌. 一种简便快捷的植物线粒体质粒DNA的提取方法. *南开大学学报(自然科学版)*(Li Junying, Wen Yingda, Jiang Changying, Li Feng, Gao Caichang. A simple and rapid method for plant mitochondrial DNA extraction. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*) 2000; 33(4): 49-52.
- 27 Richardson AO, Rice DW, Young GJ, Alverson AJ, Palmer JD. The “fossilized” mitochondrial genome of *Liriodendron tulipifera*: ancestral gene content and order, ancestral editing sites, and extraordinarily low mutation rate. *BMC Biol* 2013; 11(1): 29.
- 28 Zaheer A, Fu YB. An improved method with a wider applicability to isolate plant mitochondria for mtDNA extraction. *Plant Methods* 2015; 11(1): 56.
- 29 吴明朝, 张明慧, 杨丽丽, 石 磊, 陈虞超, 宋玉霞. 梭梭属2种植物线粒体基因组的提取. *中国农学通报*(Wu Mingzhao, Zhang Minghui, Yang Lili, Shi Lei, Chen Yuchao, Song Yuxia, The study on extracting mitochondrial DNA from two plants of haloxylon bunge. *Chinese Agriculture Science Bulletin*) 2013; 29(33): 319-22.
- 30 曾秀存, 孙万仓, 孟亚雄, 等. 十字花科植物线粒体DNA的提取和纯化. *西北植物学报*(Zeng Xiucun, Sun Wancang, Meng Yaxiong, *et al.* Extraction and purification of MtDNA in crucifer. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*) 2005; 25(6): 1137-42.
- 31 张 智, 王永勤, 关绚丽, 李梅兰, 侯雷平, 梁 毅. 胡萝卜叶片线粒体DNA的提取方法. *中国农学通报*(Zhang Zhi, Wang Yongqin, Guan Xuanli, Li Meilan, Hou leaping, Liang Yi. The study on the method for isolating mitochondrial DNA from the carrot leaf. *Chinese Agriculture Science Bulletin*) 2010; 26(13): 58-62.