



# 栽培草莓叶绿体分离与 cpDNA 的提取方法

程慧,陈宝玉,张燕,陈莹,乔玉山\*

(南京农业大学园艺学院,南京 210095)

**摘要:**以栽培草莓‘红颊’(*Fragaria × ananassa* Duch. ‘Benihoppe’)新鲜幼嫩叶片为材料,利用高盐-低 pH 的缓冲液结合 Percoll 密度梯度离心分离纯化叶绿体,再用 SDS-蛋白酶 K 法提取叶绿体 DNA(cpDNA)。经荧光显微镜、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增检测,结果表明:该方法分离的草莓叶绿体完整性高,叶绿体 DNA 质量好,纯度高,能够满足后续基因组测序等实验的基本要求,为草莓属及其他草本植物 cpDNA 的提取提供参考。

**关键词:**草莓;叶绿体分离;叶绿体 DNA 提取;高盐-低 pH;Percoll 密度梯度

中图分类号:Q813; Q503

文献标志码:A

## An Efficient Protocol for Intact Chloroplast Isolation and cpDNA Extraction in Cultivated Strawberry

CHENG Hui, CHEN Baoyu, ZHANG Yan, CHEN Ying, QIAO Yushan\*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Using the fresh young leaves collected from cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. ‘Benihoppe’) as material, we separated and purified the chloroplasts by high salt-low pH buffer followed by Percoll density gradient centrifugation. The chloroplast DNA (cpDNA) was extracted by SDS-Protein K method. The results of fluorescence microscope examination, agarose gel electrophoresis and PCR amplification showed that this method could obtain high integrity chloroplasts and high quality and purity cpDNA, which could meet the basic requirements of subsequent genome sequencing experiments. It could provide reference for extraction cpDNA of *Fragaria* and other herbaceous plants.

**Key words:** cultivated strawberry; chloroplast isolation; cpDNA extraction; high salt-low pH; Percoll density gradient

叶绿体是绿色植物细胞中进行光合作用的重要细胞器,其自身拥有相对独立的遗传物质,即叶绿体 DNA(cpDNA)。高等植物叶绿体 DNA 平均大小在 120~160 kb 之间<sup>[1]</sup>,多为典型的共价闭合 4 段式双链环状结构,包括大单拷贝区(large single copy, LSC)、小单拷贝区(small single copy, SSC)和 2 个反向重复区(inverted repeats, IRs)。叶绿体

DNA 序列高度保守,且多为母系遗传,近年来在揭示物种起源、进化及不同物种间亲缘关系等方面发挥了不可替代的作用<sup>[2]</sup>。同时,叶绿体转基因技术因具有定点整合、高效表达及无花粉逃逸等优势,成为植物基因工程研究的重点方向之一<sup>[3]</sup>,因而获得完整的叶绿体全基因组序列显得尤为重要。

传统的植物叶绿体 DNA 的提取方法主要有

收稿日期:2017-09-04;修改稿收到日期:2017-11-08

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金(CX(15)1029)

作者简介:程慧(1993—),女,在读硕士研究生,主要从事草莓基因组学研究。E-mail:2015104021@njau.edu.cn

\* 通信作者:乔玉山,教授,博士生导师,主要从事果树生物技术研究。E-mail:qiaoyushan@njau.edu.cn

DNase I法<sup>[4]</sup>、高盐-低pH法<sup>[5]</sup>、蔗糖密度梯度离心法<sup>[6]</sup>和Percoll密度梯度离心法<sup>[7]</sup>。目前这些方法分别在枣<sup>[8]</sup>、香蕉<sup>[9]</sup>、葡萄<sup>[10]</sup>、甜橙<sup>[11]</sup>、枇杷<sup>[12]</sup>、柿子<sup>[13]</sup>等果树叶绿体DNA提取中得到了应用。栽培草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)属于蔷薇科(Rosaceae)委陵菜族(Potentilleae)草莓亚族(*Fragariinae*)草莓属(*Fragaria*)多年生草本<sup>[14]</sup>,其果实以色、香、味俱佳,营养价值高,生产周期短等优势在世界各地广为栽培,居小浆果类之首位。草莓叶绿体DNA的提取至今未见有效的方法,制约了草莓叶绿体基因组及叶绿体转基因等研究工作的开展,栽培草莓的叶绿体基因组全序列也未见报道<sup>[15]</sup>。本研究在Vieira等<sup>[16]</sup>提取松柏类植物叶绿体DNA方法的基础上,将高盐-低pH缓冲液结合Percoll密度梯度离心技术应用于草莓叶绿体分离及cpDNA提取,旨在建立一种获得草莓完整叶绿体及高质量cpDNA的方法体系,为草莓叶绿体基因组研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验材料为栽培草莓品种‘红颊’(*F. × ananassa* Duch. ‘Benihoppe’),2016年10月中旬在江苏省镇江市农业科学院(镇江句容)采集展叶不久的无病虫害的绿色幼嫩叶片(用剪刀剪下尽量长的叶柄),用纱布包裹置于冰盒内冷藏保鲜,带回实验室,用脱脂棉包裹住叶柄,蒸馏水浸润,放入黑色袋子中(不密封以保持通气),在4℃冰箱黑暗饥饿处理3 d。

### 1.2 试剂

匀浆缓冲液A(pH 3.6):1.25 mol/L NaCl,0.25 mol/L Vc,50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),7 mmol/L EDTA(pH 8.0),10 mmol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,0.0125 mol/L Borax,1% (w/v)PVP-40,0.1% (w/v)BSA。

悬浮缓冲液B(pH 8.0):1.25 mol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),25 mmol/L EDTA(pH 8.0),0.0125 mol/L Borax,1% (w/v)PVP-40,0.1% (w/v)BSA。

Percoll密度梯度分离液:以悬浮缓冲液B为溶剂,将Percoll细胞分离液加入其中,分别配置成30%(v/v)和70%(v/v)的密度梯度分离液。在6支12 mL离心管中依次缓慢添加30%和70%的密度梯度分离液各4.5 mL,置于4℃冰箱静置3 h备用。

缓冲液C:100 mmol/L NaCl,100 mmol/L

Tris-HCl(pH 8.0),50 mmol/L EDTA(pH 8.0),1 mmol/L DTT。

上述缓冲液中的Vc、BSA和DTT现加现用。

### 1.3 方法

**1.3.1 叶绿体分离与纯化** 参考Vieira等<sup>[16]</sup>的方法,并加以改进。叶绿体的分离纯化所有操作均需在4℃条件下进行,所用试剂、器皿均需提前预冷。具体操作如下。

将100 g经过黑暗饥饿处理的草莓叶片取出,用500 mL 5% (w/v)十二烷基肌氨酸钠溶液浸泡5 min,蒸馏水冲洗干净,滤纸上吸干水分,去叶柄和中脉,剪成1~3 cm<sup>2</sup>的碎片,置于预冷的料理机中,每25 g叶片加入100 mL匀浆缓冲液A进行匀浆。匀浆过程中应尽量避免发热,低速匀浆1次5 s,高速匀浆1次10 s,期间间隔10 s,低速/高速匀浆重复进行3~4次,以叶片匀浆成绿豆粒大小为准。用双层脱脂纱布过滤匀浆液至烧杯中,滤渣回收,加入100 mL预冷的匀浆缓冲液A,再次匀浆过滤。用双层400目尼龙网过滤,滤液等体积分装于2个250 mL离心管。采用差速离心粗提叶绿体,即600×g、4℃离心10 min,弃沉淀,上清液用双层300目尼龙网过滤转移至新离心管中,3 000×g、4℃离心20 min,弃上清,得到粗提叶绿体沉淀。

采用Percoll密度梯度离心纯化叶绿体,即在沉淀中加入12 mL悬浮缓冲液B,用无菌软毛笔轻悬。各取2 mL沉淀悬浮液小心铺在Percoll密度梯度分离液上,共6管。在水平转子离心机上4℃、5 000×g,离心30 min,逐一吸取30%与70%浓度界面上的绿色叶绿体,归并为1份。用3倍体积的悬浮缓冲液B稀释2次,3 000×g、4℃离心20 min,以完全去除Percoll分离液,获得纯净的叶绿体。

**1.3.2 叶绿体的裂解** 将纯化后的叶绿体沉淀用无菌软毛笔重新悬浮于8 mL缓冲液C中,加入30 μL Protein K(10 mg/mL),室温静置2 min后,缓慢加入1.5 mL 20% SDS,20 μL β-巯基乙醇,摇匀后在55℃条件下水浴4 h,期间每30 min轻微振荡1次,以使其充分裂解。

**1.3.3 叶绿体DNA提取与纯化** 裂解结束后,冰浴5 min,立刻加入1.5 mL 5 mol/L KAc(pH 5.2),轻轻混匀后继续冰浴30 min,促使蛋白、脂类及SDS络合物沉淀。10 000×g、4℃离心15 min,将上清液转移并分装至2 mL离心管中。加入与上清等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提2次,每次都需充分颠翻摇匀,10 000×g、4℃离心15

min。加入与上清等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提1次,10 000×g,4 ℃离心10 min。小心转移上层透明液相至新的1.5 mL离心管中。

加入1/10体积3 mol/L NaAc(pH 5.2)和0.8倍体积的异丙醇,轻摇混匀后,-20 ℃静置过夜。10 000×g,4 ℃离心20 min,回收DNA沉淀,用70%乙醇漂洗2次,无水乙醇漂洗1次去盐。室温风干沉淀,每管加30 μL ddH<sub>2</sub>O于4 ℃冰箱溶解1 h,轻缓混匀,得到cpDNA原液。加1 μL RNase A(10 mg/mL)降解RNA,37 ℃温育30 min,加入等体积氯仿,抽提2次,上清液加入1/10体积的3 mol/L NaAc(pH 5.2)和0.8倍体积的异丙醇,挑出叶绿体DNA,用70%乙醇漂洗2次,风干,每管加入25 μL ddH<sub>2</sub>O溶解得到纯化的cpDNA溶液,-20 ℃保存备用。

#### 1.4 叶绿体及cpDNA检测

**1.4.1 叶绿体显微镜镜检** 将10 μL已纯化的叶绿体沉淀用100 μL悬浮缓冲液B充分悬浮,制作临时装片,在激光扫描共聚焦荧光显微镜(德国Zeiss LSM710)40×下观察叶绿体的纯度及完整性。

**1.4.2 cpDNA质量检测** 取1 μL提取的cpDNA,利用分光光度计(美国Thermo公司,Nano-Drop2000),测定核酸含量,记录OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>、OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>及质量浓度。

**1.4.3 cpDNA凝胶电泳检测** 取2 μL、3 μL的cpDNA溶液在1% (w/v)琼脂糖凝胶中进行电泳检测,指示Marker(Trans2k plus DNA Marker和Trans15k plus DNA Marker)上样量为2 μL,电泳缓冲液为1×TAE,电压为100 V,电泳时间40 min,琼脂糖凝胶经EB染色,在紫外凝胶成像系统下检测并拍照。

**1.4.4 PCR扩增检测** 根据Taberlet等<sup>[17]</sup>3对叶绿体DNA特异性通用引物(表1)扩增草莓cpDNA3个非编码区片段。

PCR反应体系为25 μL:20 μmol/L上下游引物

各0.5 μL,1 μL模板DNA。PCR扩增程序:95 ℃预变性7 min;95 ℃变性1 min,55 ℃退火1 min,72 ℃延伸2 min,35个循环;最后72 ℃延伸5 min。

根据Sun等<sup>[18]</sup>3对核基因组特异性通用引物ITS1(F:5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3',R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、ITS2(F:5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3',R:5'-GCT-GCGTTCTTCATCGATGC-3')和ITS3(F:5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3',R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),扩增草莓3个核糖体基因转录间隔区片段,预期扩增片段大小分别是700、300和750 bp左右。

PCR反应体系与上述相同。PCR扩增程序:95 ℃预变性3 min;95 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,30个循环;最后72 ℃延伸10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶绿体完整性检测

图1显示高盐-低pH缓冲液结合Percoll密度梯度离心分离草莓叶绿体的效果,其中A为脂质层,呈乳白色,B为破碎的叶绿体层,呈浅绿色,C为完整的叶绿体层,呈深绿色,D为杂质层,各成分之间分层明显,液体清晰透明。图2显示在激光扫描共聚焦荧光显微镜下,分离出的叶绿体自发火红色荧光,数量多,结构完整,基本无破碎,说明在30%~70% Percoll密度梯度下,能够将草莓完整的叶绿体分离出来,并得到较纯的叶绿体颗粒。

### 2.2 cpDNA质量检测

检测结果显示,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值为1.82,在1.8~2.0之间,OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>比值为2.06,大于2.0,说明提取的cpDNA纯度高,无蛋白质、多糖、碳水化合物等杂质污染。质量浓度虽只有14.4 ng/μL,但因总体积为153 μL,故总质量共有2.2 μg,达到基因组建库测序要求。琼脂糖凝胶电泳检测结果(图3)显示,点样孔中无杂质,电泳条带清晰整齐,无

表1 3对叶绿体DNA特异性通用引物

Table 1 Three universal specific primers for chloroplast DNA

片段 Fragment	非编码区 Non-coding region	引物 Primer sequence (5'→3')	期望产物长度 Expected product length/bp
cp1	trnT (UGU)-trnL (UAA) 5' exon	CATTACAAATGCGATGCTCT TCTACCGATTTCGCCATATC	944
cp2	trnL (UAA) 5' exon- trnL (UAA) 3' exon	CGAAATCGGTAGACGCTACG GGGGATAGAGGGACTTGAAC	420
cp3	trnL (UAA) 3' exon- trnF (GAA)	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC ATTGAACTGGTGACACGAG	416

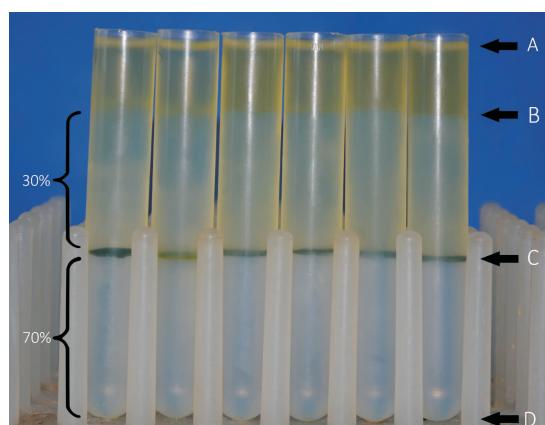


图1 Percoll密度梯度离心法分层结果

Fig. 1 The stratified results of Percoll density gradient centrifugation method

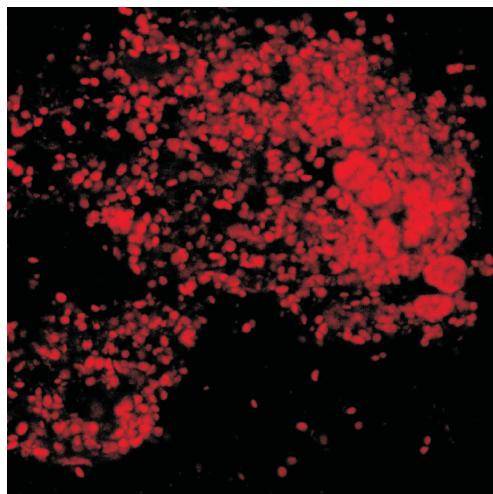
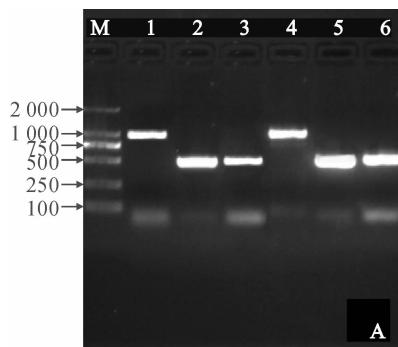


图2 Percoll密度梯度离心法分离所得叶绿体的荧光显微照片

Fig. 2 A fluorescence micrograph of chloroplasts isolated by Percoll density gradient centrifugation



M. DL2000; A 为叶绿体特异性通用引物扩增; 1~3. cpDNA 的 cp1、cp2 和 cp3 扩增片段; 4~6. 总 DNA 的 cp1、cp2 和 cp3 扩增片段; B 为核特异性通用引物扩增; 1~3. 总 DNA 的 ITS1、ITS2 和 ITS3 扩增片段; 4~6. cpDNA 的 ITS1、ITS2 和 ITS3 扩增片段

图4 核基因组及叶绿体基因组特异性通用引物对核DNA及cpDNA扩增结果

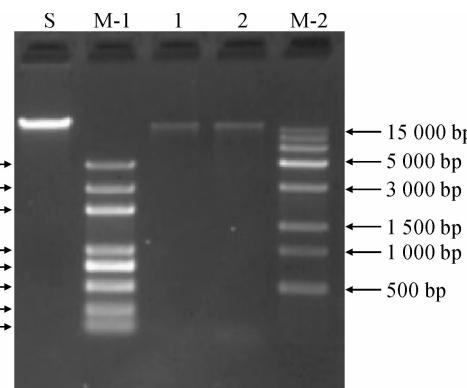
M. DL2000; A. Amplification of corresponding specific primers of chloroplast; 1~3. cp1, cp2 and cp3 amplified fragments of cpDNA; 4~6. cp1, cp2 and cp3 amplified fragments of total DNA; B. Amplification of corresponding specific primers of nuclear; 1~3. ITS1, ITS2 and ITS3 amplified fragments of total DNA; 4~6. ITS1, ITS2 and ITS3 amplified fragments of cpDNA

Fig. 4 Amplification results of nuclear and chloroplast genome DNA using corresponding specific primers

杂带,无拖尾现象。说明所提取的 cpDNA 完整,纯度较高,无蛋白质和 RNA 等污染。

### 2.3 PCR 扩增检测

以‘红颊’草莓嫩叶为材料,基因组 DNA 的提取参照植物基因组提取试剂盒 (Plant Genomic DNA Kit, TianGen) 上的方法进行。利用叶绿体和核 DNA 特异性通用引物,经过 PCR 扩增检验所提 DNA 是否为 cpDNA,有无核 DNA 的污染。利用 3 对叶绿体特异性通用引物,通过 PCR 扩增,可以从提取的 cpDNA 和总 DNA 中得到单一、特异性的产物、且与预期片段大小一致(图 4, A),说明该方法提取的 DNA 含有 cpDNA。利用 3 对核基因组特异性

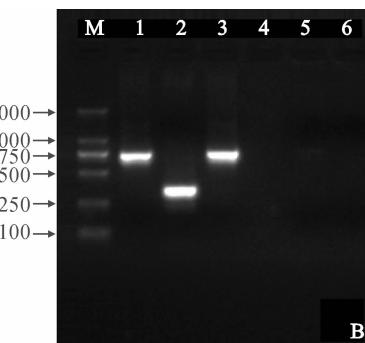


S. 标准品上样 5  $\mu$ L(10 ng/ $\mu$ L); M-1. Trans2k plus, 上样 2  $\mu$ L; 1. cpDNA 上样 3  $\mu$ L; 2. cpDNA 上样 2  $\mu$ L; M-2. Trans15k plus, 上样 2  $\mu$ L

图3 草莓 cpDNA 电泳检测

S. Standard sample, 5  $\mu$ L (10 ng/ $\mu$ L); M-1. Trans 2k plus, 2  $\mu$ L; 1. cpDNA 3  $\mu$ L; 2. cpDNA 2  $\mu$ L; M-2. Trans15k plus, 2  $\mu$ L

Fig. 3 Electrophoretic detection of strawberry chloroplast DNA



通用引物,可以从总DNA中扩增出与预期片段大小一致的目标片段,而以cpDNA为模板未扩增出上述片段(图4,B),说明cpDNA不含核DNA的污染。

### 3 讨 论

提取叶绿体DNA进行基因组文库构建和高通量测序等实验的关键是获得无核DNA污染的高纯度完整叶绿体<sup>[19]</sup>。DNase I处理法虽能有效地去除吸附于叶绿体表面的核DNA,但在多次匀浆离心后,叶绿体膜很难保持完整,会将无完整叶绿体膜保护的cpDNA一同降解,造成产率很低<sup>[20]</sup>。蔗糖密度梯度离心法虽能获得完整叶绿体,但需要超速离心机,对仪器要求较高,且离心时间长,耗时<sup>[21]</sup>。Percoll细胞分离液,相比于其他常用的分离叶绿体的密度梯度离心介质(蔗糖、氯化铯等)而言,具有渗透性低、粘度低、不穿透细胞和无毒害的优点,是一种较理想的细胞器分离介质<sup>[22]</sup>,但分离出的叶绿体中会存在核DNA的污染。而高盐-低pH缓冲液的主要作用在于通过提供高浓度离子介质屏蔽叶片匀

浆时所产生的大量静电,从而阻止叶绿体膜吸附核DNA<sup>[5]</sup>。

本研究在Vieira等<sup>[16]</sup>方法的基础上,对离心转速和部分步骤进行了适当调整。对新鲜幼嫩叶片进行4℃黑暗饥饿处理3d,消耗叶绿体内的淀粉,减少糖类物质对叶绿体DNA分离纯化的影响<sup>[23-24]</sup>。在叶片匀浆过程中,采用料理机低速与高速间歇交替进行,既充分释放了叶绿体又避免了匀浆过程中的发热造成叶绿体膜的提前破碎<sup>[8]</sup>。初次匀浆后过滤,回收滤渣再次匀浆,能够提高叶绿体的得率<sup>[25]</sup>。利用差速离心,即在600×g离心10min,沉淀细胞碎片及细胞核,所得上清液3000×g离心20min得到粗提叶绿体沉淀<sup>[26]</sup>,再通过高盐-低pH的缓冲液结合Percoll密度梯度(30%、70%)离心,可以较好地去除细胞核DNA等杂质。在反复的实验探索中,上述改良措施发挥了很重要的作用,提高了叶绿体的完整性和cpDNA的纯度。利用此法首次成功分离出大量完整的草莓叶绿体,并提取出高纯度的cpDNA, cpDNA的测序工作正在顺利进行中。

### 参考文献:

- [1] PALMER J D. Comparative organization of chloroplast genomes[J]. *Genetics*, 1985, **19**(1): 325-354.
- [2] 张韵洁,李德铢.叶绿体系统发育基因组学的研究进展[J].植物分类与资源学报,2011,33(4): 365-375.
- [3] ZHANG Y J, LI D Z. Advances in phylogenomics based on complete chloroplast genomes[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2011, **33**(4): 365-375.
- [4] DANIELL H. Chloroplast genetic engineering: Recent advances and future perspectives[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, **24**(2): 83-107.
- [5] KOLODNER R, TEWARI K K. Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, **76**(1): 41-45.
- [6] BOOKJANS G, STUMMANN B M, HENNINGSEN K W. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, **141**(1): 244-247.
- [7] 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1985, **70**(2): 117-122.
- [8] HEINHORST S, GANNON G C, GALUN E, et al. Clone bank and physical and genetic map of potato chloroplast DNA [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, **75** (2): 244-251.
- [9] 杨晓婷,黄建,张春梅,等.枣叶绿体基因组DNA提取方法研究[J].西北林学院学报,2015,30(2): 105-110.
- [10] YANG X T, HUANG J, ZHANG C M, et al. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for Chinese jujube[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, **30** (2): 105-110.
- [11] SHETTY S M, SHAH M, ULFA M, et al. Complete chloroplast genome sequence of *Musa balbisiana* corroborates structural heterogeneity of inverted repeats in wild progenitors of cultivated bananas and plantains[J]. *The Plant Genome*, 2016, **9**(2): 1-14.
- [12] 谢海坤,焦健,樊秀彩,等.中国野生葡萄叶绿体分离及叶绿体DNA提取的研究[J].西北植物学报,2016,36(7): 1464-1469.
- [13] XIE H K, JIAO J, FAN X C, et al. An optimized chloroplast isolation and chloroplast DNA extraction protocol for Chinese wild grapes[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2016, **36**(7): 1464-1469.
- [14] BAUSHER M G, SINGH N D, LEE S B, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms[J]. *BMC Plant Biology*,

- 2006,6(1): 21.
- [12] 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 method for extracting chloroplast DNA in triploid loquat[J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2012,37(2): 93-96.
- [13] 傅建敏,梁玉琴,孙鹏,等.柿属植物叶绿体DNA提取方法优化[J].中南林业科技大学学报,2015,35(12): 25-28.
- FU J M, LIANG Y Q, SUN P, et al. Optimization of method for extracting chloroplast DNA in *Diospyros*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2015,35(2): 25-28.
- [14] POTTER D, ERIKSSON T, EVANS R C, et al. Phylogeny and classification of Rosaceae[J]. *Plant Systematics & Evolution*, 2007,266(1-2): 5-43.
- [15] 程慧,葛春峰,张红,等.果树叶绿体基因组测序及系统发育研究进展[J].核农学报,2018,32(1):58-69.
- CHENG H, GE C F, ZHANG H, et al. Advances on chloroplast genome sequencing and phylogenetic analysis in fruit trees[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(1):58-69.
- [16] VIEIRA L D N, FAORO H, FRAGA H P D F, et al. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers[J]. *PLoS One*, 2014,9(1): e84792.
- [17] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991,17(5): 1 105-1 109.
- [18] SUN Y, SKINNER D Z, LIANG G H, et al. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994,89(1): 26-32.
- [19] 金燕,王春晖,陈天带,等.高盐低pH法提取尾叶桉叶绿体DNA方法建立及质量分析[J].分子植物育种,2017,15(3): 890-894.
- JIN Y, WANG C H, CHEN T D, et al. Establishment and quality analysis of chloroplast DNA extraction from *Eucalyptus urophylla* with high salt and low pH method[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017,15(3): 890-894.
- [20] 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.
- [21] 陈春梅,陈亮.茶树叶绿体DNA提取方法研究[J].分子植物育种,2014,12(3): 562-566.
- CHEN C M, CHEN L. Extraction method of chloroplast DNA of tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2014,12(3): 562-566.
- [22] 许夏冰,谭德冠,孙雪飘,等.一种高效提取普通小球藻叶绿体DNA的新方法[J].植物生理学报,2014,50(6): 880-884.
- XU X B, TAN D G, SUN X P, et al. A new method for efficient extraction of *Chlorella vulgaris* chloroplast DNA[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014,50(6): 880-884.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 肖龙,张彩霞,张利义,等.苹果叶片叶绿体分离及其蛋白提取、双向电泳方法的优化[J].果树学报,2016,33(6): 752-761.
- XIAO L, ZHANG C X, ZHANG L Y, et al. The research on isolation of chloroplast from apple leaves and extraction, 2-DE of the chloroplast protein[J]. *Journal of Fruit Science*, 2016,33(6): 752-761.
- [26] 吴好,禹文雅,李奕松.缺铁胁迫对草莓幼苗光合特性及细胞器铁含量的影响[J].植物营养与肥料学报,2013,19(4): 918-925.
- WU Y, YU W Y, LI Y S. Effects of iron deficiency stress on photosynthetic characteristics and organelle iron content of strawberry seedlings[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2013,19(4): 918-925.

(编辑:宋亚珍)