

分类号\_\_\_\_\_

密 级\_\_\_\_\_

UDC \_\_\_\_\_

单位代码 10733

# 甘肃农业大学

# 硕士学位论文

## 马铃薯块茎光照变绿时 质体和线粒体 DNA 含量的变化

Plastid and mitochondrial DNA amount variation  
during potato tuber greening under light

张国栋

指导教师姓名 司怀军 教授( 甘肃农业大学生命科学技术学院 兰州 730070 )

学科专业名称 植 物 学 研 究 方 向 植物基因工程

论文答辩日期 2015 年 5 月 29 日 学位授予日期 2015 年 6 月

答辩委员会主席 冯虎元 教 授

评 阅 人 武国凡 副教授

杨天育 研究员

2015 年 6 月

## 目 录

|                                                |     |
|------------------------------------------------|-----|
| 缩略词表 .....                                     | III |
| Abbreviations .....                            | III |
| 摘 要 .....                                      | IV  |
| Abstract .....                                 | VI  |
| 第一章 文献综述 .....                                 | 1   |
| 1.1 从内共生到细胞器 .....                             | 1   |
| 1.2 动物利用获取的叶绿体进行光合作用 .....                     | 1   |
| 1.3 线粒体在真核生物中的普遍存在 .....                       | 2   |
| 1.4 叶绿体和线粒体基因向细胞核基因组的转移 .....                  | 2   |
| 1.5 叶绿体基因组的大小 .....                            | 3   |
| 1.6 线粒体基因组简介 .....                             | 3   |
| 1.7 体细胞中质体和线粒体基因组拷贝数的变化 .....                  | 4   |
| 1.8 植物体细胞中线粒体亚基因组 DNA 分子比例的变化和对植物生长发育的影响 ..... | 5   |
| 1.9 实验目的和内容 .....                              | 8   |
| 第二章 材料与方法 .....                                | 9   |
| 2.1 材料 .....                                   | 9   |
| 2.1.1 植物材料 .....                               | 9   |
| 2.1.2 酶与试剂 .....                               | 9   |
| 2.1.3 主要仪器设备 .....                             | 9   |
| 2.2 试验方法 .....                                 | 10  |
| 2.2.1 大田取样 .....                               | 10  |
| 2.2.2 块茎处理 .....                               | 11  |
| 2.2.3 对照试验设计 .....                             | 11  |
| 2.2.4 表皮取样及叶绿素提取 .....                         | 12  |
| 2.2.5 DNA 提取 .....                             | 13  |
| 2.2.6 长链 PCR 检测 .....                          | 14  |
| 2.2.6.1 夏波蒂块茎总 DNA 长链 PCR 检测 .....             | 15  |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 2.2.6.2 费乌瑞它块茎总 DNA 长链 PCR 检测 .....            | 15 |
| 2.2.7 实时定量 PCR .....                           | 16 |
| 第三章 结果与分析 .....                                | 19 |
| 3.1 不同处理块茎颜色差异 .....                           | 19 |
| 3.2 叶绿素提取 .....                                | 19 |
| 3.3 DNA 提取 .....                               | 20 |
| 3.4 Long PCR 检测 .....                          | 21 |
| 3.5 重量相似块茎的 real-time PCR 分析 .....             | 22 |
| 3.6 重量不同块茎的 real-time PCR 分析 .....             | 25 |
| 3.7 结果总结 .....                                 | 25 |
| 第四章 讨 论 .....                                  | 27 |
| 4.1 功能不同的组织之间线粒体拷贝数差异 .....                    | 27 |
| 4.2 农作物优良品种的 ptDNA/mtDNA 值 .....               | 27 |
| 4.3 块茎 mtDNA/nuDNA 值大于根 mtDNA/nuDNA 值的假设 ..... | 27 |
| 4.4 后续实验分析 .....                               | 28 |
| 附 录 .....                                      | 37 |
| 1. 试剂 .....                                    | 37 |
| 2. 耗材 .....                                    | 37 |
| 3. 引物合成 .....                                  | 38 |
| 4. 仪器 .....                                    | 38 |
| 致 谢 .....                                      | 39 |
| 个人简介 .....                                     | 40 |
| 导师简介 .....                                     | 41 |
| 原创性声明 .....                                    | 42 |

## 缩略词表

### Abbreviations

| 缩写简称<br>Abbreviations | 英文全称<br>English appellation                        | 中文意义<br>Chinese appellation |
|-----------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|
| Long PCR              | Long PCR                                           | 长链聚合酶链式反应                   |
| Real-time PCR         | Real-timequantitative<br>polymerase chain reaction | 实时定量聚合酶<br>链式反应             |
| DMF                   | N,N-Dimethylformamide                              | N,N-二甲基甲酰胺                  |
| mtDNA                 | Mitochondrion DNA                                  | 线粒体基因组脱氧核糖核酸                |
| ptDNA                 | Plastid DNA                                        | 质体基因组脱氧核糖核酸                 |
| nuDNA                 | Nucleus DNA                                        | 细胞核基因组脱氧核糖核酸                |
| accD                  | acetyl-CoA carboxylase<br>beta subunit             | 乙酰辅酶 A 羧化酶<br>$\beta$ 亚基基因  |
| ATPase 6              | ATP synthase F0 subunit<br>6                       | 腺苷三磷酸合成酶<br>F0 单位亚基 6 基因    |
| COX I                 | cytochrome c oxidase<br>subunit I                  | 细胞色素 C 氧化酶<br>亚基 I 基因       |

## 摘 要

细胞核基因组、质体基因组、线粒体基因组的协调表达是植物正常生长、发育的必要条件。此前有研究报道植物的质体基因组 DNA 和线粒体基因组 DNA 会因光照而降解。在叶绿体光合磷酸化产生的 ATP 是否会降低细胞对线粒体的需求这两个问题上也存在争论。大多数对变绿过程中叶绿体基因组的研究是以植物的叶片为材料,还缺乏对其他组织器官中的研究,因此我们还不确定植物不同组织器官的叶绿体基因组在稳定性等方面是否存在共性。

在本研究中,我们采用马铃薯品种“费乌瑞它”和“夏波蒂”的块茎为实验材料,每一品种的块茎分成两组,分别进行光照(变绿)处理和避光处理;费乌瑞它的光照实验包含两组重量不同的块茎,以研究不同重量块茎在变绿时 DNA 含量的变化。在经过光照(变绿)处理和避光处理后,光照组削取 1-2 mm 厚的块茎表层变绿组织以提取总 DNA,避光组则削取与光照组相同部位的组织。然后采用实时定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction; 简称 real-time PCR)和长链聚合酶链式反应(Long PCR)的方法来分

析块茎表皮组织的总 DNA。

1. Real-time PCR 实验中的参考引物对 B20B22 为核基因组(*Solanum tuberosum* cultivar DM 1-3 516 R44 unplaced genomic scaffold, SolTub\_3.0 scf00001, whole genome shotgun sequence)单拷贝区;叶绿体引物对 C5C6 扩增序列位于叶绿体基因组 *accD* 基因(乙酰辅酶 A 羧化酶 $\beta$  亚基基因 *acetyl-CoA carboxylase beta subunit*)的单拷贝区;线粒体引物对 C13C14、C15C16 扩增序列位于线粒体基因组的单拷贝区,C13C14 对应线粒体 *ATPase 6* 基因的片段,C15C16 对应线粒体 *COXI* 基因的片段,两个基因分别为线粒体呼吸功能关键酶 ATP 合成酶(ATPase)和细胞色素 C 氧化酶(COX)的蛋白亚基编码基因,以上引物对依据 Li 等(未发表)。通过 real-time PCR 数据分析表明:块茎重量相似时,光照处理组的块茎变绿组织总 DNA 与避光处理组的块茎表皮组织总 DNA 相比,其质体基因组 DNA 拷贝数有所降低,线粒体基因组 DNA 拷贝数也表现出明显地降低;这一结果在马铃薯品种“费乌瑞它”和“夏波蒂”的块茎中均有表现。这可能表明了在经过光照处理的两个马铃薯品种的块茎变绿组织中,细胞对质体总量的需求有所降低,以及细胞降低了对线粒体呼吸作用产生 ATP 的需

求。在块茎重量不同的情况下，较重块茎的细胞器基因组 DNA 拷贝数多于较轻的块茎。较重块茎变绿组织的叶绿体基因组 DNA 拷贝数较多；C13C14 所扩增的 *ATPase 6* 基因拷贝数增加显著 ( $P<0.05$ )，C15C16 扩增的 *COXI* 基因拷贝数增加极显著 ( $P<0.01$ )。

2. Long PCR 的实验中，我们选取马铃薯叶绿体基因组中一段长度为 8033bp (GenBank accession No. JF772171 基因组的 7261-15293 位置) 的序列设计引物。马铃薯品种“费乌瑞它”和“夏波蒂”的光照变绿组织的总 DNA 中均成功扩增出了长度约 8000 bp 的序列，结果表明质体基因组 DNA 基本稳定。

这些结果表明在两个品种的块茎变绿组织中质体基因组 DNA 拷贝数受光照影响而降低，随块茎质量增大而增加；变绿组织线粒体 DNA 的拷贝数受光照影响降低，随块茎重量增大而增加。

**关键词：**马铃薯;薯块变绿;叶绿体;线粒体;DNA 稳定性

## Abstract

The growth and development of plant require coordination of three DNA-containing compartments including nucleus, plastid and mitochondria. There are currently debates on whether in green tissues plastid DNA (ptDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) were damaged to fragments by light and whether the cellular energy ATP produced by chloroplast phosphorylation can partly reduce the demand of mitochondrial respiration. Most studies are on leaves. It's unclear whether it's similar in other organs about the stability of DNA.

In the present research, tubers of two potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars Favorita and Shepody were used as donors. To found out the difference of Organelle DNA content in tubers with different weight, there are two group of Favorita tubers (38 g and 102 g) in the greening experiment. Total DNA of tuber peels was analyzed using real-time quantitative polymerase-chain-reaction (real-time PCR) and long PCR in comparison between tubers in the dark and tubers under light in both cultivars.

1. The reference primers B20B22 nuclear DNA region was used as unique sequence reference control of the nuclear genome because the region was found to be unique single copy region (Dr. Xiu-Qing Li et al. will be published elsewhere). The ptDNA primers C5C6 (*accD* gene, acetyl-CoA carboxylase beta subunit) and the mtDNA primers C13C16 (*ATPase* 6) and C15C16 (*COX* I) were designed according to the *Solanum tuberosum* isolate RH89-039-16 reference chloroplast genome (JF772171) and the mitochondrial genome (version 3) of the same clone. The ratio between ptDNA and nuclear DNA (nuDNA) showed little decrease during greening when the weight of tubers are similar, but the mtDNA/nuDNA ratio significantly decreased during greening in both Cultivars. When the weight of tubers are different, the ptDNA/nuDNA ratio showed little increase, but the mtDNA/nuDNA ratio significantly increased in the weightier tubers. The result may suggest that the greening tubers reduce the demand of ATP which produced by mitochondrial respiration, and the weightier tubers increase the demand of ATP.

2. To test the stability of ptDNA of greening tubers, we designed a couple of primers based on the *Solanum tuberosum* isolate RH89-039-16 chloroplast complete

genome (JF772171.1) and the estimate amplification size is 8,033 bp (7261-15293). In the result, we amplified the target sequence successfully, and did not find evidence of DNA fragmentation.

These results of little reduction of ptDNA but significant reduction of mtDNA in greening tubers (compared with the tubers that were not exposed to light) suggests reduced requirement of mitochondrial respiration in greening tissues of these two cultivars. As the weight of tubers increase the Organelle DNA content increased. Two hypotheses, one for the ptDNA amount stability and one for the mtDNA changes, were postulated.

**Keywords:** Potatoes; Tuber greening; Chloroplasts; Mitochondria; DNA stability

## 第一章 文献综述

植物的细胞核之外有两种细胞器——质体和线粒体——含有自己的DNA基因组。质体因功能不同有多种类型，例如在绿色叶片中是以叶绿体为主马铃薯块茎中是以淀粉质体（amyloplast 淀粉体或造淀粉体）为主。同一植物的各种类型的质体还没发现在DNA基本序列方面有何不同，根据学术界多年来的习惯，本文将质体DNA统称为叶绿体基因组DNA。叶绿体的光合作用和线粒体的呼吸作用对植物的生长发育是必不可少的。叶绿体和线粒体产生一系列代谢产物而且还有一些未知的功能<sup>[1]</sup>。叶绿体基因组和线粒体基因组以及它们和细胞核基因组的合作在很大程度上决定了农林园艺等植物的产量和品质。细胞质和细胞核的某些基因有协同进化<sup>[2]</sup>。

### 1.1 从内共生到细胞器

叶绿体很可能起源于一种蓝藻菌（cyanobacteria）<sup>[3]</sup>。这种假说有光合作用中心蛋白的特点、蛋白质向细胞器的输入体系和DNA序列等方面的支持<sup>[4]</sup>。共生可能发生在14到17亿年之前<sup>[5]</sup>，发生在红藻、褐藻和绿藻三大藻类的共同祖先<sup>[6,7]</sup>。线粒体也被认为由一种古老的内共生细菌演变而来<sup>[8-10]</sup>。叶绿体基因组DNA序列分类学的证据显示早期的叶绿体可能通过水平转移途径扩展到了别的一些早期，所以植物直接通过改造共生体而演变成的叶绿体称为原始叶绿体或直系叶绿体，而通过水平转移而获得的叶绿体被称为次生叶绿体<sup>[11]</sup>。叶绿体在进化过程中已经与现在的蓝藻菌有很大差别，例如光合作用中心光吸收蛋白已经在绿藻的叶绿体和蓝藻菌之间有很大差别<sup>[12]</sup>。早期的植物可能得益于共生菌的分泌物，获得了利用早期质体所产生的碳水化合物的能力<sup>[13]</sup>。随着共生菌丢失了某些功能而不能独立生存而剩余的功能又对植物的生长发育有利，这些共生菌便逐渐演化成了现在所知的叶绿体（质体）和线粒体。

### 1.2 动物利用获取的叶绿体进行光合作用

通常境况下动物体细胞中不含有质体，但海天牛属（一类海生蛞蝓）可以经过消化吃进的海藻而获得叶绿体<sup>[14,15]</sup>。某些海生蛞蝓可以仅仅依靠这些叶绿体

进行光合作用而生存数月。尽管有报道一种由海藻的细胞核基因编码的叶绿体蛋白基因转移到了海天牛属动物体内<sup>[16]</sup>，但并没有证据可以证明此基因可以在动物体内表达。在高等植物中 *ftsH* 是在细胞核基因组上，所以高等植物的叶绿体不大可能离开植物细胞而独立生存。但在某些藻类的叶绿体上自己有这个 *ftsH* 基因；这可能解释了为什么有些藻类的叶绿体能在海蛞蝓中存活和进行光合作用很长时间<sup>[17]</sup>。我们还不知道叶绿体基因组在海天牛属动物体内的几个月里具体发生了什么变化，但是叶绿体基因组 DNA 的降解应该是一种可控的、程序性的过程。

### 1.3 线粒体在真核生物中的普遍存在

绝大多数真核生物都有线粒体。一类胞内寄生性原生生物（单细胞真核微生物）或许曾拥有线粒体，但已失去了典型的线粒体或者线粒体基因组，只拥有几个被称为纺锤剩体的类线粒体结构。这类线粒体缺失的寄生性原生生物包括兔脑炎原虫（*Encephalitozoon cuniculi*，一种能让艾滋病人感染痢疾的原生生物）、阿米巴虫（*Entamoeba histolytica*，一种在人身上引起阿米巴痢疾的原始生物）和兰氏贾第鞭毛虫（*Giardia intestinalis*）。这些可能失去了线粒体的单细胞原生生物主要进行简单的二分法分裂生殖<sup>[18]</sup>。很显然，以已经研究过的真核生物都有线粒体或很可能曾经有过线粒体；还没有发现没有线粒体的植物。

### 1.4 叶绿体和线粒体基因向细胞核基因组的转移

细胞器的基因组现在比起海藻和细菌的基因组要小得多，这表明细胞器在内共生后的演化过程中丢失了大多数的基因<sup>[19]</sup>。例如绿藻 *tufA* 基因<sup>[20]</sup> 和豆科植物 *rpl22* 基因<sup>[21]</sup>均由叶绿体转移到了细胞核中。在一项针对叶绿体基因组卡那霉素抗性基因的研究中，在体细胞与生殖细胞中都发现了从叶绿体基因转变为细胞核基因的现象，但换了细胞质的烟草配子发育过程中这种细胞质到细胞核基因组的 DNA 转移较为频繁<sup>[22]</sup>。在修复细胞核染色体双链断裂的过程中，轻度热刺激可提高叶绿体基因组 DNA 和线粒体基因组 DNA 在换了细胞质的烟草中转变为细胞核 DNA 的频率<sup>[19]</sup>。已发现拟南芥的线粒体基因组 DNA 是通过经非同源

重组的途径稳定地插入细胞核基因组<sup>[23]</sup>。通过对玉米染色体 B73-W23 之间一段长约 570 kb 的片段进行荧光原位杂交研究,发现线粒体基因组 DNA 转变为细胞核 DNA 的过程中产生了大量的插入位点<sup>[24]</sup>。相较于染色体的减数分裂重组,无论在体细胞中还是在生殖细胞中,DNA 从细胞器至细胞核的转移更是通过 DNA 插入来实现的,因此这种转移属于非孟德尔遗传的体细胞遗传途径。

某些物种的线粒体基因组包含来自于叶绿体的基因,比如葡萄属植物中接近 42.4 %的叶绿体基因组可能并入到了线粒体基因组<sup>[25]</sup>。叶绿体及其基因可以通过嫁接<sup>[26]</sup> 或者寄生物和宿主的相互作用<sup>[27]</sup>而在植株间转移。这些研究说明,植物的线粒体基因组会转移部分 DNA 序列给细胞核基因组,并且在某些特定的条件下可以从质体获得 DNA 序列。但由于叶绿体和线粒体是在同一个细胞中而且序列有些相似性,两种细胞器的 DNA 容易有混杂。有些技术可以分别提取叶绿体和线粒体基因组 DNA 以通过减少两种 DNA 的混杂而提高 DNA 序列分析的可靠性<sup>[28]</sup>。

## 1.5 叶绿体基因组的大小

叶绿体由于结构比线粒体简单,在烟草<sup>[29]</sup>和苔藓植物 (*Marchantia polymorpha*)<sup>[30]</sup>的叶绿体基因组测序之后,目前已有许多叶绿体基因组完成了测序和组装。叶绿体基因组一般都有一对大的反方向重复片段,例如在大豆中是 25.574 kb<sup>[31]</sup>。尽管叶绿体基因组都比较小,但在叶绿体基因组大小差别很大,例如二倍体马铃薯的叶绿体为 155492 kb (NCBI accession JF772170)。在 2015 年 4 月 21 日,李修庆(本研究合作者之一)在分析 NCBI 基因库中所有的叶绿体基因组全长 (complete chloroplast genome) 的序列时,发现最小的叶绿体基因组是 73345 kb (AJ294725.1, 来自腐生型眼虫 *Astasia longa*, 一种无色的非光合作用胞藻), 最大的是 165389 kb (来自 NC\_020372.1| *Trithuria inconspicua*, 一种单子叶独蕊草), 平均大小为 146189 kb, 比已知细菌的平均基因组 (2.61 Mb<sup>[32]</sup>) 要小很多 (李修庆 Li X.-Q.未发表)。

## 1.6 线粒体基因组简介

不同类型真核生物的线粒体大小不一，如节肢动物的线粒体基因组大小一般 14-19 kb<sup>[33]</sup>，鳄蜥（*Shinisaurus crocodilurus* Ahl. 有鳞目爬行动物）粒体基因组全长 16,585 bp<sup>[34]</sup>；高等植物的线粒体规模远大于其他生物类群，且不同高等植物的线粒体基因组大小差别巨大，可能是由于有很多重复片段间的重组<sup>[35,36]</sup>。比如最小的油菜（*Brassica napus* L.）为 221853 bp（NCBI accession: AP006444.1）。有些线粒体还含有 DNA 质粒，例如玉米 S 型雄性不育系中有一个 1.94 kb 的线粒体质粒<sup>[37]</sup>。植物线粒体基因组具有多态性，但是在目前已完成测序图谱的线粒体基因组中除玉米 S 型细胞质雄性不育系和粳稻的构型是线形分子外，其他线粒体基因组全为环状结构<sup>[37,38]</sup>。

## 1.7 体细胞中质体和线粒体基因组拷贝数的变化

不同组织中质体和线粒体含量不同。质体在植物中按功能不同而需要用多种形式存在，例如叶肉细胞中的叶绿体和淀粉储藏细胞中的造粉体等。尽管尚不很清楚质体基因组拷贝数对某些叶绿体基因表达的具体影响<sup>[39]</sup>，但由于基因组是质体和线粒体的根本而且质体和线粒体功能上必须互相配合，所以很有必要研究质体和线粒基因组在细胞中各自的含量和两者的最适比率。细胞器基因组拷贝数和相互比例可能影响对农作物的生长、产量和品质。

多种不同的方法被用于研究叶片中的叶绿体基因组拷贝数，如流式细胞分析法<sup>[40]</sup>，染色荧光显微法<sup>[41,42]</sup>，脉冲场凝胶电泳<sup>[42]</sup>，复性动力学<sup>[41]</sup>，实时定量 PCR<sup>[43]</sup>，以及斑点印迹杂交<sup>[43]</sup>。研究者在如何准确评估质体基因组拷贝数的问题上有争论<sup>[44]</sup>。虽然有人研究过玉米的几种线粒体基因拷贝数变化，但总体上对线粒体基因组拷贝数的研究较少<sup>[39]</sup>。

实时定量 PCR 技术广泛应用于研究细胞中叶绿体基因组 DNA 含量<sup>[43,45-47]</sup>和 DNA 动物和植物的线粒体基因组 DNA 含量<sup>[48,49]</sup>。但很多因素影响实时定量 PCR 的反应和估算结果，所以还需要认真遵守 Bustin 等<sup>[50]</sup>提出的实时定量 pCR 技术注意事项（MIQE guideline: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments）。有多篇论文指出了遵守 MIQE guideline 的重要性<sup>[50,51]</sup>。DNA 质量对实时定量 PCR 的结果有很大影响<sup>[52]</sup>。用实时定量 PCR 进行 DNA 样本间比较时需要测定 PCR 反应效率<sup>[53-62]</sup>。

在不同条件下生长的植物，其叶绿体基因组 DNA 含量差异很大。在枫树叶片的衰老变黄的过程中，叶绿体基因组的 *rbcL* 基因逐步降解<sup>[63]</sup>。由于某些植物染色体倍性有组织特异性变异<sup>[64]</sup>从而增加了计算细胞平均叶绿体或线粒体基因组拷贝数的难度。另外，Kumar 等<sup>[49]</sup>认为玉米绿叶中叶绿体基因组 DNA 和线粒体基因组 DNA 在光下降解成了没有功能的小片段，并从而认为定量 PCR 的扩增量在组织间的差异并不代表叶绿体和线粒体基因组拷贝数有差异；这是因为他们在比较玉米黄化苗叶片和光下绿叶时，绿叶的叶绿体和线粒体基因组 DNA 很难进行长片段 DNA 的 PCR 扩增但很容易进行短片段的定量 PCR 扩增<sup>[49]</sup>。

由于技术难度，大多数研究只能报道通过实时定量 PCR 检测到的叶绿体基因组 DNA 和细胞核 DNA 数量的比例<sup>[39,65]</sup>。最近李修庆实验室发现 Kumar 等使用的 Long PCR 配对温度过高，例如在进行叶绿体基因组 DNA Long PCR 时比所用 DNA 聚合酶产品建议的合适配对温度高了 11 °C。如果用 LongAmp Taq DNA 聚合酶产品建议的合适的温度，长片段 PCR 扩增的很正常，玉米苗根和叶不同组织的扩增量顺序和实时定量 PCR 的扩增量顺序基本相同。而通过实验观察和文献数据分析发现玉米叶片和根主要是二倍体，从而发现叶绿体和线粒体基因组 DNA 在光下绿叶中基本上是完整的并没有严重地断裂成小片段，而且可以用细胞器 DNA 和细胞核 DNA 的比例推算细胞器基因组的拷贝数<sup>[66]</sup>。发现玉米苗中叶绿体和线粒体基因组 DNA 的量以及它们的基因组拷贝数随着植物的生长发育而有规律的变化<sup>[66]</sup>。

由于许多叶绿体基因和线粒体基因已经转移到了细胞核基因组，细胞的许多功能需要质体、线粒体和细胞核紧密合作进行，所以不难理解为何叶绿体基因组和线粒体基因组的拷贝数和功能受细胞的明显调控。

## 1.8 植物体细胞中线粒体亚基因组 DNA 分子比例的变化和对植物生长发育的影响

尽管线粒体很可能起源于共生细菌，而且所有已知的细菌和绝大多数古生菌中基因组为单个染色体<sup>[32]</sup>，绝大多数植物和少数动物的线粒体基因组由很多个亚基因组分子组成。大多数动物的线粒体基因组与细菌基因组相类似，也由单个的环状染色体构成。人类的线粒体基因组长 16 kb，并携带 37 个基因。但不同

虱子的线粒体基因组有 14 至 20 个微型环状染色体<sup>[67]</sup>。在玉米<sup>[68]</sup>和黄瓜<sup>[69]</sup>, 等植物中, 线粒体基因组不仅尺寸较大, 而且由若干个起源于非对称重组的大小不一的基因组 DNA 分子构成<sup>[69]</sup>。DNA 同源序列重组很可能是产生多个亚基因组分子的主要原因。因为线粒体基因组在绝大多数物种中是来源于母本亲本, 所以线粒体亚基因组分子的频率变化的主要途径是体细胞遗传途径, 而不是减数分裂染色体重组。尚不清楚这种多重亚基因组分子的特征是继承自内共生细菌还是共生后逐步演化而来。

线粒体亚基因组分子之间的比例相当稳定, 但这种稳定性会因受到组织培养等特殊条件的影响而改变<sup>[70]</sup>。体细胞的线粒体亚基因组分子在数量比例方面的变化能够影响植物雄性的育性、叶片形状以及植株生长速度<sup>[70]</sup>。李修庆在植物中第一次证明线粒体基因突变能引起细胞质雄性不育 (CMS) 的突变体便是通过林烟草 (*Nicotiana glauca*) 原生质体培养而诱导产生的<sup>[70]</sup>。细胞质雄性不育和线粒体基因组 DNA 量的变化之间的联系<sup>[70]</sup>现已经在许多别的植物上得到了验证如黑小麦<sup>[71]</sup>、菜豆<sup>[72]</sup>、狼尾草<sup>[73]</sup>以及芸苔属植物<sup>[74]</sup>。

李修庆还发现有些线粒体亚基因组 DNA 计量变化并不会引起明显的育性和植株形态的变化, 但可以改变株高<sup>[75]</sup>; 这种线粒体基因组突变可以在一定程度上解释育种方面经常观察到的细胞质效应, 尽管植物杂交育种中的细胞质效应往往不知道是由线粒体还是叶绿体决定的。引导体细胞线粒体基因组 DNA 的计量变化有可能成为一种植物遗传改良的有效途径, 尤其是对无性繁殖的植物。

大多数体细胞都有线粒体而且都需要从线粒体的呼吸作用获得 ATP, 但是这并不意味着所有细胞都表达相同的线粒体基因以及所有的线粒体基因在所有细胞中都需要表达。体细胞的线粒体基因表达有着相当高的差异性, 例如李修庆发现线粒体不同基因在玉米根分生组织不同区域的细胞之间的表达有着明显差异<sup>[1]</sup>。细胞质引起的雄性不育也常被认为与花器官细胞的线粒体 CMS 相关开放阅读框的表达提升有关, 比如芸苔属植物的 *pol CMS* 和 *nap CMS* 基因<sup>[76]</sup>。有些细胞质雄性不育基因和雄性育性恢复基因有一定的副作用, 这些基因在植物群体中的能够存在是由于杂种优势胜过了其副作用, 这可以解释为何雄性不育恢复基因和细胞质的雄性不育基因在芸薹属油菜物种中需要一起存在才不至于被淘汰<sup>[2]</sup>。不同生物的细胞核基因转录产物在 RNA 三末端加工位点附近有不同的加多

腺苷尾巴的信号序列<sup>[77,78]</sup>。但还不清楚线粒体 RNA 的三末端是否也有加多腺苷尾巴的信号。

由于线粒体基因组尺寸较小且携带的基因数较少,对线粒体转录产物的 RNA 编辑需借助细胞核基因。例如,已经发现细胞核染色体上有 *Mmt* 基因(线粒体 RNA 加工基因)负责加工油菜线粒体的 *orf224* 和 *orf222* 两个阅读框架<sup>[105]</sup>的 RNA。芸苔属植物基因 *pol CMS* 和 *nap CMS* 的雄性育性恢复基因被发现是同一个染色体 *Mmt* 位点上的不同的等位基因或类等位基因<sup>[2]</sup>。因为几乎所有细胞核基因的表达活性都会受到发育和环境调控,这些 *Mmt* 基因的表达以及产生的转录产物很可能也有严格的调控。这种细胞核基因的调控可以让我们在另一个层面上了解线粒体基因组在体细胞中是如何工作的。将 *pol CMS* 细胞质和它的恢复基因转到白菜型油菜中后,它们的细胞核基因产物仍能加工线粒体 CMS 基因的转录产物<sup>[79]</sup>。

上述研究说明可以通过线粒体突变或操作细胞核和细胞质的互作系统而创造雄性不育系或改变植物的形态和生长速度,创造遗传变异。

目前的知识说明叶绿体来自植物的内共生蓝藻菌,线粒体来自内共生细菌。叶绿体和线粒体的大部分基因已经转移到了细胞核基因组上。线粒体基因组有很多亚基因组分子,他们的比例变化直接影响到植物的生长速度形态和雄性育性。叶绿体和线粒体基因组 DNA 在与细胞核 DNA 比例,基因组拷贝数和基因表达方面随着植物的生长发育而有规律地变化。根据目前有限的研究,与黄嫩叶相比,叶片成熟变绿过程中叶绿体基因组 DNA 含量增大,而线粒体基因组 DNA 含量减少。需要研究是否有些物种或品种不如此变化;需要研究绿叶中叶绿体光下产生的三磷酸腺苷(ATP)是否在某种程度上减少了细胞对功能线粒体的依赖。需要研究植物的茎和起储藏淀粉作用的马铃薯块茎在光下变绿时叶绿体和线粒体基因组 DNA 如何变化,从而帮助揭示细胞核、质体和线粒体在基因组水平上是如何根据植物器官功能的不同而相互作用。研究叶绿体和线粒体时一般需要用细胞核基因组为对照,但细胞核基因组在细胞分化和植物生长发育过程中和不同环境条件下除了基因表达有变化外也有许多体细胞基因组变异<sup>[80]</sup>。这些生长发育或环境引起的细胞核基因组 DNA 序列和染色体倍性变异对质体和线粒体基因组有何影响尚待进一步研究。

## 1.9 实验目的和内容

Kumer<sup>[49]</sup>等报道称在光照的影响下,玉米幼苗叶片的质体基因组 DNA 降解为小片段。我们认为实验者所使用的退火温度相对于叶绿体基因组 DNA 的最适退火温度提高了 11 °C,所以无法扩增出产物序列。我们还不清楚在贮藏器官如马铃薯块茎的变绿过程中,质体基因组 DNA 是否也能保持完整。

此前的研究表明,由于质体中的光合磷酸化反应大量产生 ATP,有可能降低植物叶片对线粒体产生 ATP 的需求。相对于较薄且氧气供应充足的植物叶片,块茎之类的贮藏器官不仅体积较大而且氧气供应有限。块茎的主要功能并非光合成,与叶片相比有功能性的不同。所以尚不清楚在马铃薯块茎中是否也存在着同样的,由于光合作用产生 ATP 而降低线粒体呼吸作用的现象。

在研究中,我们以马铃薯品种“费乌瑞它”和“夏波蒂”的经过光照处理(光照组分为两组重量不同的块茎)与避光处理的块茎的表层变绿组织总 DNA 进行 Long PCR(检测 DNA 稳定性)和 real-time PCR(检测 DNA 拷贝数)检测,计算质体基因组 DNA 和线粒体基因组 DNA 的拷贝数。希望通过本实验来检测受光照变绿组织的叶绿体基因组 DNA 稳定性,以及不同光暗条件和不同块茎重量条件的细胞器基因组 DNA 拷贝数的变化。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 植物材料

马铃薯品种“费乌瑞它”（Favorita）块茎，由山东省日照市农业科学院提供。马铃薯品种“夏波蒂”（Shepody）块茎则取自加拿大新不伦瑞克省（纽宾士域省）弗雷瑞克登的农田，实验使用的是收获两周的马铃薯块茎。

#### 2.1.2 酶与试剂

|                                               |               |
|-----------------------------------------------|---------------|
| DNA 提取试剂盒：DNeasy Plant Mini Kit （50）          | Cat.No.69104  |
| 定量 PCR 试剂盒： SuperReal PreMix Plus（SYBR Green） | Cat.#FP205-02 |
| TAQ 酶： 2×Easy Taq SuperMix                    | Code#AS111-11 |
| Long TAQ 酶： 2×Long Taq PCR MasterMix          | Cat.#KT203-01 |
| DNA Ladder： Tran2K Plus DNA Marker            | Code#BM111    |
| 引物合成：生工生物工程（上海）股份有限公司                         |               |

#### 2.1.3 主要仪器设备

紫外成像仪：Gel Doc-IT 310 Imaging System 使用波段 302nm  
超微紫外分光光度计：Quawell UV-Vis Spectrophotometer Q5000  
常规 PCR 仪：BIO-RAD T100 Thermal Cycler  
室温离心机：5430 Eppendorf Centrifuge  
光照培养箱：珠江牌培养箱 泰宏医疗器械公司  
定量 PCR 仪：Stratagene MX3005p Real-Time real-time PCR System

## 2.2 试验方法

### 2.2.1 大田取样

本实验所用“费乌瑞他”(Favorita)马铃薯块茎取自山东省日照市农业科学院莒县研究所的试验田,海拔107.4米,东经118.50,北纬35.34。而“夏波蒂”(Shepody)则取自加拿大农业部马铃薯研究中心试验田(位于新不伦瑞克省的弗雷德里克顿市(Fredericton 45.957°N 66.648°W)),变绿实验采用收获后两周的马铃薯块茎。

因为本实验目的为检测光照条件下细胞器基因组 DNA 完整性,以及光照条件对块茎皮层细胞的线粒体基因组 DNA 和叶绿体基因组 DNA 拷贝数的影响,所以从大田取样时注意了以下几点:

1. 取样时选择地上部分仍然存活生长,并未出现干枯、病虫害等迹象的植株;
2. 开始采样前应先用打印好的字迹清晰粗大的纸片标明植株的品种以及采样时间地点等信息,拍照以便后期查验,拍照时纸片应放在视野的一侧以便于后期对图片的处理;
3. 取样时尽量避免强光直接照射;
4. 不用有虫咬和明显病斑等薯块;
5. 取样的块茎原则上应大小、重量、形状一致,取样前应了解采集品种的形态等形状;
6. 对于部分露出地面遭受自然光照射,或已经有变绿迹象的块茎必须舍弃;
7. 同一块大田中,从四周及中央分别取样已取得较好的代表性;
8. 出土的块茎及时放入标记好的纸袋中或箱中并用碎报纸覆盖,然后才用塑料袋包裹纸箱,避免光照的情况下保持块茎呼吸的顺畅;
9. 大田采集的块茎需要尽快带回实验室,以进行后续步骤,本实验采用的“费乌瑞它”块茎从采集到开始进行光照和避光对照实验间隔为3天。

### 2.2.2 块茎处理

大田取回的块茎带回实验室后，在避免阳光直射的情况下先用清水洗去泥土，清洗时动作轻柔避免损伤马铃薯块茎的表皮；用清水将泥土洗净后，喷洒 75% 的乙醇给马铃薯表面消毒；待乙醇挥发完全后，将所有的块茎用电子天平称重并记录；按块茎重量分组，然后在块茎的一面上用记号笔做标记或直接标明重量。需要解释一下的是，取样的块茎不光用于本次实验，所以块茎的大小并不均一。但本实验尽量选用大小比较一致的薯块。

从上述块茎中选取 12 个块茎进行本实验，其中重量为 32.2、37.0、37.2、37.4、37.4、38.2、41.4、41.6 (g) 的 8 个块茎编为两组进行对照处理；93.5、103.7、104.1、109.3 (g) 的 4 个块茎作为第二光照处理组以检测不同重量块茎的 DNA 含量变化。

### 2.2.3 对照试验设计

将上述较轻的 8 个块茎顺序打乱后，取 4 个作为光照组，另 4 个作为避光处理组。作为光照组的 4 个编号为 D3709、D3710、D3711、D3712，避光对照组编号为 D3713、D3714、D3715、D3716。另 4 个较重的块茎编号为 D3743、D3744、D3745、D3747。

实验室准备了同样型号的光照培养箱两台，一台用于光照组块茎实验，另一台用于对照组块茎实验，及若干不透光的纸张或者其他避光材料。

为验证块茎可能有的形状改变是因光照引起的，两台培养箱的同样位置（中层偏下）放置报纸以隔绝来自下面的光照（这样单纯光照组的块茎也会有不同的颜色变化，便于同对照组进行比较）；并设置同样的光照、温度、湿度等环境参数，培养箱尽量调成气流一致。本实验中设置的环境参数为光照强度  $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ （虽然许多文献中光照实验的光强都超过  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ ，但为维持稳定的环境而使用光照培养箱，故光强相对较弱，但结果证明足以引起颜色变化），光照时间为 16 小时每天，湿度为 13% RH，温度为 24 °C；避光处理培养箱关闭照明，且用牛皮纸将四周围住避免任何光照，湿度为 13%RH，温度 24 °C。

将 D3709、D3710、D3711、D3712 以及 D3743、D3744、D3745、D3747 作为光照组放入光照培养箱中，D3713、D3714、D3715、D3716 作为避光对照组放入避光处理培养箱。对照处理开始 9 天后，两组块茎的表皮已经有明显的颜色反差，准备进行后续实验。

#### 2.2.4 表皮取样及叶绿素提取

本阶段应准备至少 12 组实验工具，每组至少包括三片培养皿（事先按块茎编号给皿标记，并称量培养皿重量），一枚刀片，一套研钵研棒，5ml 冷冻管和 10ml 离心管各一个，一张滤纸以及一副手套；每个块茎使用不同的实验工具以免交叉污染；削皮切片人员用一次性手套，倒液氮和取试管架则需用较厚的手套。

对照处理 9 天后，将光照组和避光组取出培养箱，此时光照组接触光照的部分已明显变绿，而避光组的块茎表皮仍未黄色未有明显变化；从光照组块茎的朝上的接触光照最多的一侧取表皮样，取样时用刀片从向上侧的茎端朝芽端削皮，皮的厚度约为 2 mm 左右。避光组取样时，取样位置和大致的表皮重量基本相同。

将每一个块茎上削下的表皮放在干净的且事先按块茎编号标记的培养皿内，快速切成小片并且混均匀，然后分成三等份。

第一份用于提取基因组总 DNA（2.2.5）。表皮组织先用液氮冷冻，放置于 -80 °C 冰箱中保存备用。在冷冻样品时，应先将 5 ml 冷冻管浸入液氮中降温以避免样品粘管壁（切勿采用向管内倒入液氮的方法降温，管内残余液氮则内部气压较大，冷冻管易炸裂或者把样品冲出管外），再将样品夹入 5 ml 冷冻管中（镊子或者直接用刀取），倒入液氮，待液氮挥发完全后盖好盖子，再将 5 ml 冷冻管放入已倒入液氮的冰盒内的试管架上；待样品收集完毕后，将试管架取出然后放入 -80 °C 的冰箱中保存。

第二组用于提取表皮内的叶绿素。使用重量相似 D3709-D3716 号块茎进行叶绿素提取实验。通过提取叶绿素的方法进一步验证两组块茎颜色的明显差别来自于块茎表皮细胞内的质体或者叶绿素的累积。将切好的表皮组织放入研钵，加入少量石英砂，每个研钵加入 6 ml DMF（二甲基甲酰胺，对人体有害的氨气味有机溶剂），用研棒充分研磨，将研磨好的液体和残渣一起倒入 10 ml 离心管中；8 只离心管放在同一离心管架上至于遮光处静置三天。

第三组表皮样品用于测定干物质含量。单独称量或放在标明重量的培养皿中，计算出表皮样品的鲜重；60℃烘箱中加热 72 小时左右，每隔约 8 小时取三个样品称重，待重量没有变化时将样品全部取出称重，与鲜重比较得出表皮样品的干物质含量。

### 2.2.5 DNA 提取

提取 DNA 时使用的 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (50) 试剂盒，除试剂盒提供的耗材之外，准备了液氮、研钵研棒、移液器及枪头、1.5 ml 及 2 ml 离心管、60℃水浴锅、20000 g (12000 rpm) 常温离心机等，操作液氮时需带厚手套。实验前检查试剂盒的药剂，若出现沉淀，65℃水浴溶解。

将-80℃保存的含有表皮样品的离心管及管架取出，放入冰盒中，加入干冰或者液氮保持盒内低温。研钵研棒在研磨表皮样品前应在-20℃冰箱中低温备用，以避免样品粘粘。

提取过程及注意事项如下：

1. 用镊子从 10 ml 离心管中取出一部分表皮样品加入研钵；向研钵中加入液氮，在液氮挥发完之前充分研磨，若研磨不充分需重新加入液氮继续研磨；研磨的同时将 2 ml 离心管浸入液氮降温（避免样品粘粘在管壁上），再从研钵中刮取 $\leq 100$  mg 研磨充分的表皮样品粉末（提前练习以掌握 100 mg 的体积，用完的研钵研棒及时放入水中避免污染实验）。

2. 向上述 2 ml 离心管中先后移入 400  $\mu$ l Buffer AP1 和 4  $\mu$ l RNase A（两种试剂不可提前混合），混均匀并 65℃水浴 10 分钟，水浴期间颠倒 2-3 次促进充分裂解，水浴完毕后瞬时离心 2 秒。

3. 加入 130  $\mu$ l Buffer P3，使之混合并冰浴 5 分钟。

4. 将冰浴后的离心管 20000 g (12000 rpm) 离心 5 分钟。

5. 移液器将溶解液移入 QIAGEN 自带滤过柱（简称滤过柱，且置于 2 ml 收集管内），20000 g (12000 rpm) 离心 2 分钟。

6. 将滤过液（约 500  $\mu$ l）移入新的 2 ml 离心管中，移液时切勿吸入可能存在的颗粒；向 2 ml 离心管加入管内液体体积 1.5 倍的 Buffer AW1，然后用移液器使之混合均匀。

7. 从上一步的混合液中吸取 650  $\mu\text{l}$  加入到 QIAGEN 自带吸附柱（简称吸附柱，且置于 2 ml 收集管内），以  $\geq 6000\text{ g}$ （ $\geq 8000\text{ rpm}$ ）的转速离心 1 分钟，倒掉滤过液，剩余混合液重复此步骤。

8. 将吸附柱置于新的 2 ml 离心管内；加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，转速  $\geq 6000\text{ g}$ （ $\geq 8000\text{ rpm}$ ）离心 1 分钟后舍弃滤过液。

9. 重新加入 500  $\mu\text{l}$  AW2 Buffer，此时以 20000  $\text{g}$ （12000  $\text{rpm}$ ）离心 2 分钟；取吸附柱时切勿使之接触离心管内的滤过液。

10. 将上一步的 QIAGEN 吸附柱移入新的 1.5 ml 离心管里面。

11. 向 QIAGEN 吸附柱的吸附膜位置加 100  $\mu\text{l}$  的 Buffer AE 作为溶解液，室温（15-25  $^{\circ}\text{C}$ ）放置 5 分钟； $\geq 6000\text{ g}$ （ $\geq 8000\text{ rpm}$ ）进行 1 分钟的离心。

12. 重复上一步，并最终得到所需的 DNA（说明书建议重复上一步骤，但实际上 DNA 浓度提升的效果并不明显，且容易把吸附膜上的杂质洗入 DNA 溶解液中）。

提取的 DNA 溶液用超微紫外分光光度计检测 DNA 浓度以及  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  值，品种“费乌瑞它”的 DNA 采用 QUAWELL UV-VIS Spectrophotometer Q5000 系统检测浓度与纯度；而品种“夏波蒂”的 DNA 检测采用的是 NanoDrop 1000 spectrophotometer（Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA）系统，以及 Qubit fluorometer（Invitrogen, NY, USA）监测系统。将检测完毕 DNA 浓度和  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值的总 DNA 提取液放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

## 2.2.6 长链 PCR 检测

本实验的 Long PCR 尝试了两种 PCR 体系，A 组使用马铃薯品种“夏波蒂”的 DNA，Long Taq 酶为 NEB LongAmp Taq DNA polymerase；B 组使用马铃薯品种“费乌瑞它”的 DNA，Long Taq 酶为 TIANGEN 2 $\times$ Long Taq PCR MasterMix，两组的 PCR 程序以及引物序列相同。实验所用引物对是以马铃薯 JF772171.1 叶绿体基因组的 15293-15273 位置为模板设计的，为叶绿体基因组特异性引物，在细胞核基因组内无对应的序列；扩增产物预计长度为 8033 bp。

正向引物命名 LPCRStCtF，序列为“GTTGCCTTACCACTTGGCCACG”，对应序列为马铃薯叶绿体基因组（编号 JF772171）序列的 7261-7282；反向引物

命名 LPCRStCtR 序列为 “GCTTTGGCTTTACTCACATCC”。

#### 2.2.6.1 夏波蒂块茎总 DNA 长链 PCR 检测

Long PCR (A 组) 的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应的退火温度依据 Li 等(未发表), 设定为 54 °C 和 56 °C。

长链 PCR 的 A 组(NEB LongAmp Taq DNA polymerase)反应条件为: 总反应体系为 50  $\mu$ l, 其中包含 3 units 的 LongAmp Taq DNA polymerase (Cat. No. M0323S; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 1 $\times$ buffer (LongAmp Taq 自带, New England Biolabs), 200  $\mu$ M 4 种 dNTP 均 200  $\mu$ M, 正反向引物各 400  $\mu$ M, 以及 0.5 ng 的块茎变绿组织基因组总 DNA。

长链 PCR 所用程序为:

- ① 预变形阶段 95 °C 保持 30 秒;
- ② 25 个循环且每个循环包括变形阶段 95 °C 保持 30 秒, 叶绿体基因组扩增退火阶段 54 °C 保持 1 分钟, 延伸阶段 65 °C 保持 7.2 分钟;
- ③ 充分延伸阶段 65 °C 保持 10 分钟。

叶绿体引物对所使用的退火温度是利用 New England Biolabs NEB Tm Calculator (<http://tmcalculator.neb.com>) 计算得到的, 所用酶为 NEB LongAmp Taq DNA polymerase。

Long PCR 完成后进行 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 (60ml 的琼脂糖凝胶中加入 4.5  $\mu$ l 的 GelRed 染料), 每个点样孔上样使用 4  $\mu$ l 的 Long PCR 产物; 使用的硼酸钠电泳缓冲液中包含 10 mM 硼酸钠和 150 mM 氯化钠, PH 值为 8.2。

#### 2.2.6.2 费乌瑞它块茎总 DNA 长链 PCR 检测

长链 PCR 的 B 组 (TIANGEN 2 $\times$ Long Taq PCR MasterMix) 反应条件为: 总反应体系为 25  $\mu$ l, 其中包含 12.5  $\mu$ l 2 $\times$ Long Taq PCR MasterMix, 按产品要求稀释为 100  $\mu$ M 的正反向引物各 4  $\mu$ l (此处引物不需要长时间保存, 为了大量避免 TE 缓冲液对反应的影响, 使用 Mix 自带的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 溶解引物), 以及 1 ng/ $\mu$ l 的块茎变绿组织基因组总 DNA 1  $\mu$ l, 然后用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 补充

至 25  $\mu$ l。程序同 A 组。

Long PCR 完成后进行 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测（60 ml 的琼脂糖凝胶中加入 2.5  $\mu$ l 的 Golden View 染料），每个点样孔上样使用 5  $\mu$ l 的 Long PCR 产物；使用 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液进行电泳。

30 ml 1.5 % 琼脂糖凝胶制作方法：用称量纸在电子天平上称取 4.5 g 琼脂糖并导入三角瓶中。再用量筒取 1 $\times$ TAE Buffer 30 ml 导入同一三角瓶中，用一次性手套覆盖瓶口，放入微波炉加热 1 分钟后取出摇匀，再加热 30 秒然后摇匀，室温冷却 5 分钟后加入 GoodView Nucleic Acid Stain (GV - II)。摇匀后倒入胶板中冷却 30 分钟使用。1 % 胶制作方法相同，。

50 $\times$ TAE Buffer 配制方法：

- ① 称量 Tris 242 g,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.2 g 于 1 L 烧杯中；
- ② 向烧杯中加入约 800 ml 去离子水，充分搅拌均匀；
- ③ 加入 57.1 ml 的冰乙酸，充分溶解；
- ④ 加去离子水定容至 1 L 后，室温保存；
- ⑤ 用时取 20 ml 50 $\times$ 溶液用蒸馏水定容至 1 L 使用。

## 2.2.7 实时定量 PCR

实验中所使用的引物对包括内参引物对，编号为 B20 和 B22，叶绿体基因组 DNA 引物对 C5 和 C6 以及两个线粒体基因组 DNA 引物对 C13C 和 14C、15C 和 16（表 2.1）。

B20B22 引物对是按照马铃薯细胞核基因组（reference genome from the doubled monoploid *S. tuberosum* Group Phureja clone DM1-3）的单拷贝序列区设计并经过 BLAST 验证（Li 等，未发表）。叶绿体引物对 C5C6 的扩增序列位于叶绿体基因组的单拷贝区，为 *accD* 基因的片段（乙酰辅酶 A 羧化酶  $\beta$  亚基基因，acetyl-CoA carboxylase beta subunit）；线粒体引物对 C13C14、C15C16 扩增序列位于线粒体基因组的单拷贝区，C13C14 扩增线粒体 *ATPase 6* 基因的片段，C15C16 扩增线粒体 *COXI* 基因的片段。

表 2.1 实验使用的引物

Tab.2.1 Primers used in the study

| Primera | Primer description | Sequence (5' — 3')        |
|---------|--------------------|---------------------------|
| B20     | 内参引物               | TACAAGGCCAAAGTTAAGAAAGCA  |
| B22     | 内参引物               | AGATTGAGGAAGAAACATCTCCCAT |
| C5      | 叶绿体基因组 DNA 引物      | TCCGACAACCTGGTGGAGTGACAG  |
| C6      | 叶绿体基因组 DNA 引物      | TGCTTGTGAACCTTCGGGTAC     |
| C13     | 线粒体基因组 DNA 引物      | TTGAGGACTTTCCAGGTCTTAACC  |
| C14     | 线粒体基因组 DNA 引物      | GCACTCTTGTTAGGCATCAACT    |
| C15     | 线粒体基因组 DNA 引物      | GGTCCGATGGCTGTTCTCCAC     |
| C16     | 线粒体基因组 DNA 引物      | CAGTACTGAGAAGCATGTGCCCAT  |

实时定量 PCR 所用模板浓度为 1 ng/ $\mu$ l, 举例: X 号 DNA 溶液测定浓度为 5 ng/ $\mu$ l, 为稀释成体积 50  $\mu$ l 的 1 ng/ $\mu$ l 溶液, 取 20  $\mu$ l 的 X 号 DNA 溶液加入到 80  $\mu$ l 的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 中, 用手指轻弹几下并用离心机进行瞬时离心使之浓度均匀; 稀释后的模板因为不需要长期保存, -4 °C 环境下保存, 原 X 号 DNA 放回 -20 °C 保存。

实时定量 PCR 使用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒, 其标准反应体系为 20  $\mu$ l 体系: 加入 10  $\mu$ l 的 2 $\times$ SuperReal Premix Plus, 10  $\mu$ M 的正反向引物各 0.6  $\mu$ l (终浓度 0.3  $\mu$ M), 基因组 DNA 或者 cDNA 模板使用量一般小于 100 ng, 50 $\times$ ROX Reference dye 的终浓度为每 50  $\mu$ l 反应体系包含 1  $\mu$ l ROX (不同 real-time PCR 仪器使用的 ROX dye 浓度不同), 然后用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ l。

实际的反应体系为 10  $\mu$ l, 2 $\times$ SuperReal Premix Plus 用量为 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M 的正反向引物各 0.3  $\mu$ l (终浓度 0.3  $\mu$ M), 1 ng/ $\mu$ l 的总 DNA 模板用量为 1  $\mu$ l, 50 $\times$ ROX Reference dye 用量为 0.2  $\mu$ l (1  $\mu$ l ROX / 50  $\mu$ l 反应体系), 3.2  $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补足至 10  $\mu$ l。

实时定量 PCR 的反应程序:

① 预变性阶段 95 °C 保持 5 分钟;

② 扩增阶段 40 个循环，每个循环包括变性 95 °C 保持 10 秒，复性 55 °C 保持 20 秒，延伸 72 °C 保持 32 秒；

③ 融解曲线阶段包括 95 °C 保持 15 秒，55 °C 保持 15 秒，95 °C 保持 30 秒（图 2.1）。

配制定量反应液时，SuperReal Premix Plus 试剂盒包含 Premix Plus、ROX dye 以及 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 三部分。配制定量反应液时，应估计每种溶液参加的分装次数，每分装一次应多加 10 % 的量以应对损耗。PCR 反应液配制时如果混合不均匀，则结果差别较大；在摇匀时可将封好口的 PCR 管倒立，用手指弹 PCR 管使之混合均匀，然后离心机 8000 rpm 瞬时离心将液体收集到管底。

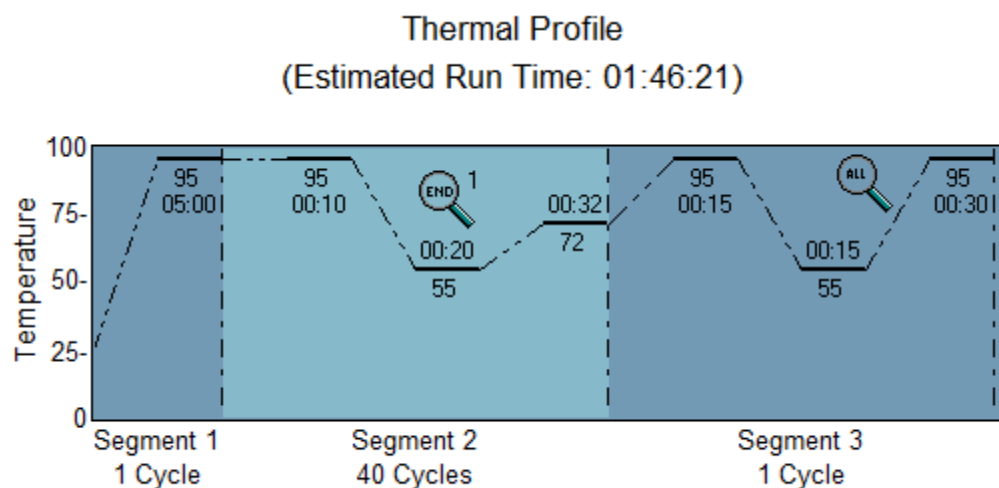


图 2.1 实时定量 PCR 程序

Fig.2.1 the program of real-time PCR

## 第三章 结果与分析

### 3.1 不同处理块茎颜色差异

经过 9 天（费乌瑞它）以及 25 天（夏波蒂）的对照处理，光照组块茎与避光组块茎在颜色上产生了明显区别（费乌瑞它块茎，图 3.1）。马铃薯品种“费乌瑞它”的实验结果表明每天照光 16 小时，光照强度  $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$  的条件足以引起块茎的变绿。实验前后的“费乌瑞它”块茎鲜重表现出明显地降低，这可能是因为在实验中用易吸水的报纸作为铺垫材料造成的；而在马铃薯品种“夏波蒂”的实验是在潮湿的盆栽环境中进行，所以实验前后几乎检测不到马铃薯块茎鲜重的变化。



图 3.1 费乌瑞它块茎光照与避光组颜色差异

**Fig.3.1 Potato tubers with difference in colour. Cultivar: Favorita.**

左侧为避光组块茎，右侧为光照组块茎

Left are tubers in the dark, right are tubers under light

### 3.2 叶绿素提取

以光照和避光处理的费乌瑞它块茎表皮为材料提取叶绿素。将切好的表皮组织放入研钵，加入少量石英砂，向研钵加入 6 ml DMF（二甲基甲酰胺），用研棒充分研磨，将研磨好的液体和残渣一起倒入 10 ml 离心管中；8 个 10 ml 离心管放在同一离心管架上至于遮光处静置三天，然后对比观察颜色（图 3.2）。由萃取液的颜色可以看出，光照处理过的块茎中明显含有大量的绿色色素。

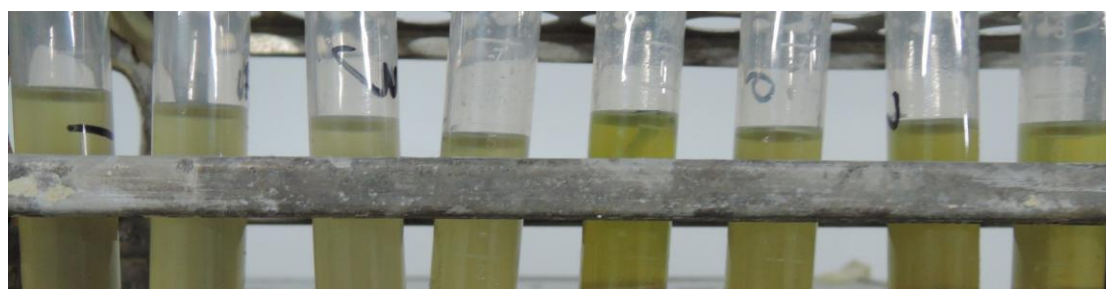


图 3.2 费乌瑞它叶绿素提取液颜色对比

**Fig. 3.2 Extract color comparison between control tubers and green tubers.**

**Cultivar: Favorita.**

左侧 4 个为避光组的提取液; 右侧 4 个为光照组的提取液.

Left are extractive of yellow tubers, right are extractive of greening tubers

### 3.3 DNA 提取

以光照和避光处理的 12 个马铃薯品种费乌瑞它的块茎表皮组织为材料提取总 DNA, 用 QUAWELL UV-VIS Spectrophotometer Q5000 紫外分光光度计检测 DNA 浓度以及  $OD_{260}/OD_{280}$  比值 (表 3.1)。4 个避光处理组块茎编号为 D3709、D3710、D3711、D3712, 4 个光照组的块茎则编号为 D3713、D3714、D3715、D3716, 较重 4 个块茎编号为 D3743、D3744、D3745、D3747。

表 3.1 总 DNA 浓度与  $OD_{260}/OD_{280}$  比值 (费乌瑞它)

**Table 3.1 The DNA content and optical density  $OD_{260}/OD_{280}$  ratio. Cultivar Favorita**

| 避光组   | 浓度          | $OD_{260}/$ | 光照组   | 浓度          | $OD_{260}/$ | 光照组   | 浓度          | $OD_{260}/$ |
|-------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|
| 编号    | ng/ $\mu$ l | $OD_{280}$  | 编号    | ng/ $\mu$ l | $OD_{280}$  | 编号    | ng/ $\mu$ l | $OD_{280}$  |
| D3709 | 4.36        | 1.51        | D3713 | 1.99        | 2.2         | D3743 | 5.05        | 1.81        |
| D3710 | 7.68        | 1.35        | D3714 | 2.28        | 1.27        | D3744 | 5.62        | 1.87        |
| D3711 | 3.23        | 1.14        | D3715 | 0.77        | 1.35        | D3745 | 3.72        | 1.92        |
| D3712 | 2.99        | 1.96        | D3716 | 2.19        | 1.35        | D3747 | 7.29        | 1.95        |

### 3.4 Long PCR 检测

根据模板来源不同，Long PCR 的检测分为两组，A 组以马铃薯品种“夏波蒂”的光照和避光处理组的总 DNA 为模板，B 组则以马铃薯品种“费乌瑞它”的光照和避光处理组总 DNA 为模板。

A 组进行 Long PCR 后，用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测（60 ml 的琼脂糖凝胶中加入 4.5  $\mu$ l 的 GelRed 染料），每个点样孔上样使用 4  $\mu$ l 的 Long PCR 产物，检测结果如图 3.3。图片上可以看到，两组块茎的总 DNA 都扩增出了长度略大于 8,000 bp 的产物序列；并且不同处理组块茎的 PCR 产物条带的亮度基本一致，没有明显差别。

B 组以费乌瑞它不同处理的块茎变绿组织总 DNA 为模板进行 Long PCR，然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测（60 ml 的琼脂糖凝胶中加入 2.5  $\mu$ l 的 Golden View 染料），每个点样孔上样使用 5  $\mu$ l 的 Long PCR 产物；使用 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液进行电泳，结果如图 3.4。

在图 3.4 中，编号 D3709 的条带为避光组的 PCR 产物条带，而 D3712 和 D3715 为光照组的 PCR 产物条带，所有的产物中都有明显大于 5000 bp 的条带。

Kumar 等<sup>[49]</sup>报道称玉米叶片叶绿体基因组 DNA 受光照影响而降解。在本实验中，以两个马铃薯品种的叶绿体基因组 DNA 进行 Long PCR，结果表明在光照变绿块茎表皮组织的叶绿体基因组 DNA 在光照下未严重降解。

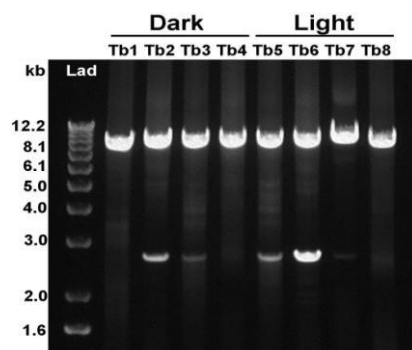


图 3.3 质体基因组 DNA（夏波蒂）长链 PCR 产物检测

Fig. 3.3 LongPCR for plastid DNA. Cultivar: Shepody.

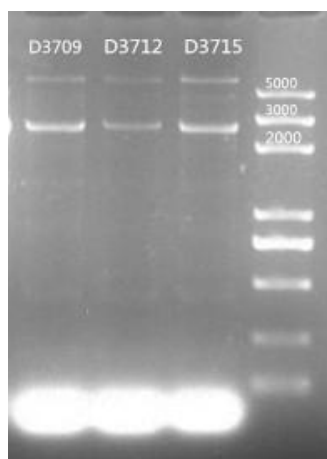


图 3.4 质体基因组 DNA（费乌瑞它）长链 PCR 产物检测

Fig.3.4 LongPCR for plastid DNA.Cultivar Favorita

### 3.5 重量相似块茎的 real-time PCR 分析

提取光照和避光处理组块茎组织的总 DNA，进行 real-time PCR 实验。在做实时定量前先用 real-time PCR 的程序做普通 PCR 并以 1.5 % 琼脂糖凝胶检测，结果表明各引物对可用（图 3.5）。在内参引物对 B20B22 以及质体引物对 C5C6 和线粒体引物对 C13C14、C15C16 的溶解曲线中只有单一的峰值，表明所有引物都具有良好的特异性见（图 3.6）。

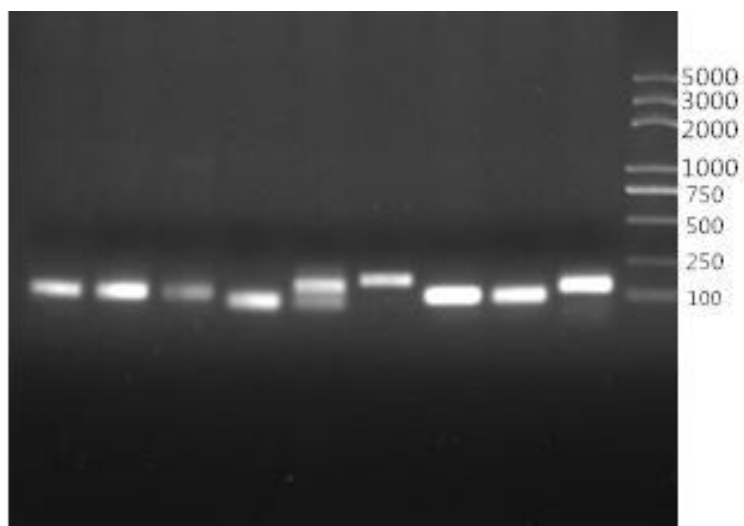


图 3.5 实时定量引物的 PCR 产物

Fig.3.5 PCR product of primers of real-time PCR

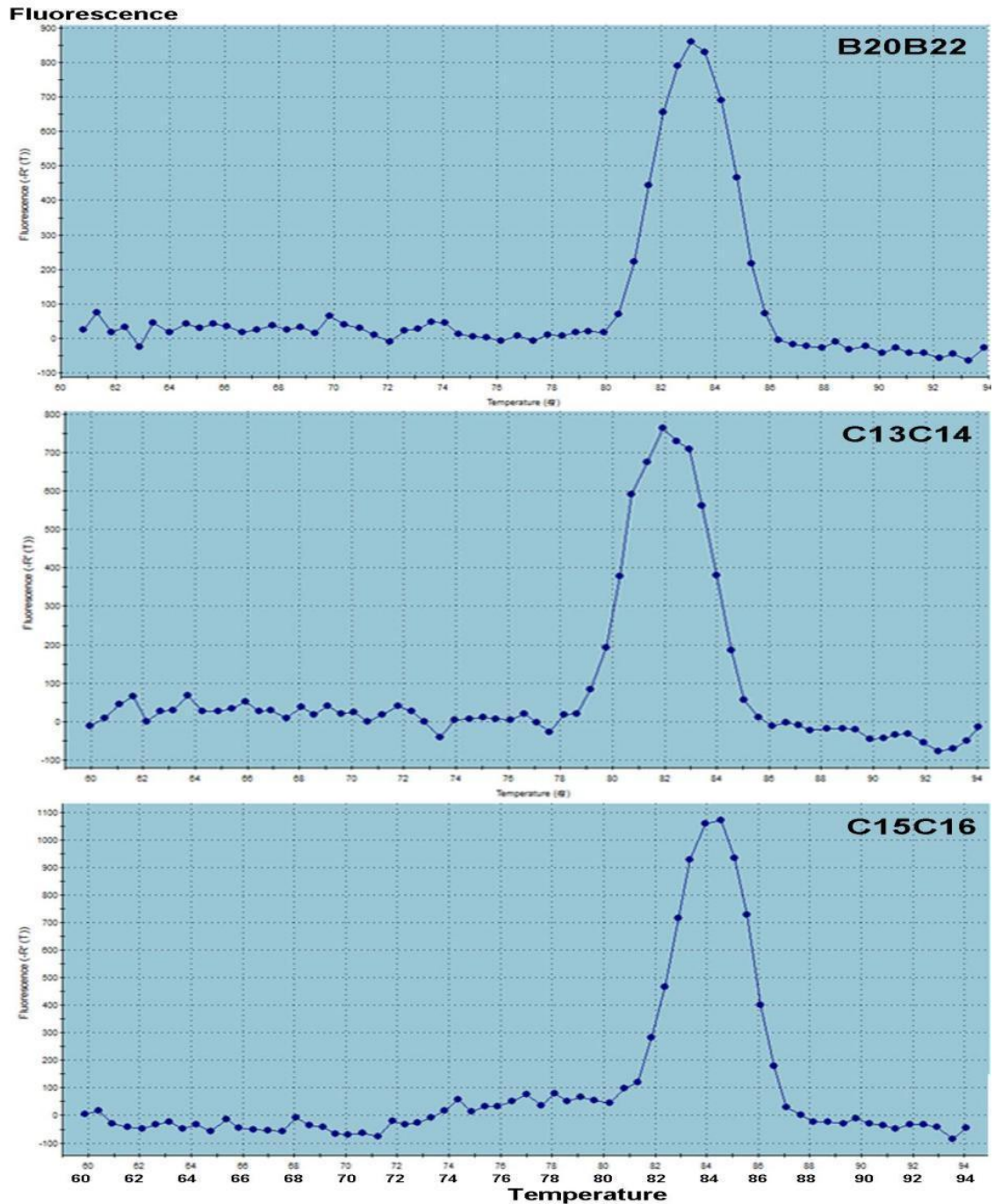


图 3.6 实时定量 PCR 产物的融解曲线

**Fig. 3.6 Dissociation curve of real-time PCR products**

B20B22, C13C14, C15C16 为引物对

B20B22, C13C14, C15C16 are primers

在块茎重量相似的前提下，费乌瑞它的避光组叶绿体基因组拷贝数（C5C6）为 499，光照组为 417；夏波蒂的避光组叶绿体基因组拷贝数（C5C6）为 1468，光照组为 1339。费乌瑞它避光组线粒体基因组拷贝数（C13C14）为 188，光照组为 144；夏波蒂的避光组线粒体基因组拷贝数（C13C14）为 112，光照组为 80。

费乌瑞它避光组线粒体基因组拷贝数 (C15C16) 为 232, 光照组为 177; 夏波蒂的避光组线粒体基因组拷贝数 (C15C16) 为 87, 光照组为 60。

通过对 real-time PCR 结果的分析, 在我们使用两个品种中得出了相似的结果, 即光照组的 ptDNA/nuDNA 比值要低于避光组比值; 与 ptDNA/nuDNA 比值相类似, 不同品种的光照组中也表现出了 mtDNA/nuDNA 比值降低 (图 3.7 A 为费乌瑞它, 图 3.7 B 为夏波蒂)。

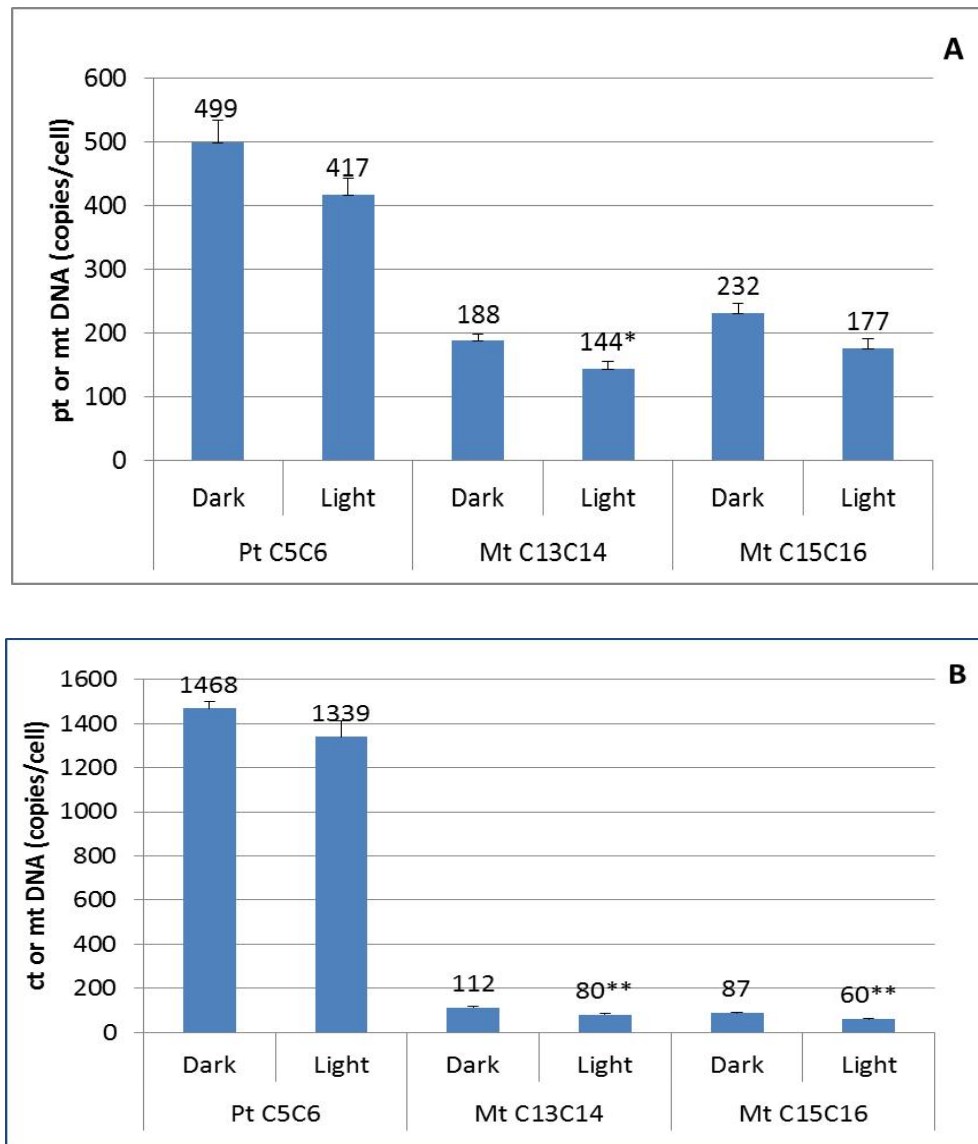


图 3.7 块茎重量相似时, 细胞核 DNA 为内参的定量结果分析

**Fig.3.7 Real-time quantitative PCR analysis of plastid and mitochondrial DNA using the nuclear DNA as reference control, when the weight of tubers are similar.**

A 图为费乌瑞它结果分析, B 为夏波蒂结果分析

**A. Cultivar: Favorita B. Cultivar: Shepody**

### 3.6 重量不同块茎的 real-time PCR 分析

不同重量的块茎存在以下差异：较轻块茎的质体基因组拷贝数为 417（C5C6），线粒体基因组拷贝数为 144（C13C14）和 177（C15C16）；在较重组块茎中质体基因组拷贝数为 438（C5C6），线粒体基因组拷贝数为 203（C13C14）和 230（C15C16），如图 3.8。较重块茎的细胞器 DNA 拷贝数高于较轻块茎的数值，且较重块茎中 C13C14 所扩增的 *ATPase 6* 基因拷贝数增加显著（ $P < 0.05$ ），C15C16 扩增的 *COXI* 基因拷贝数增加极显著（ $P < 0.01$ ）。

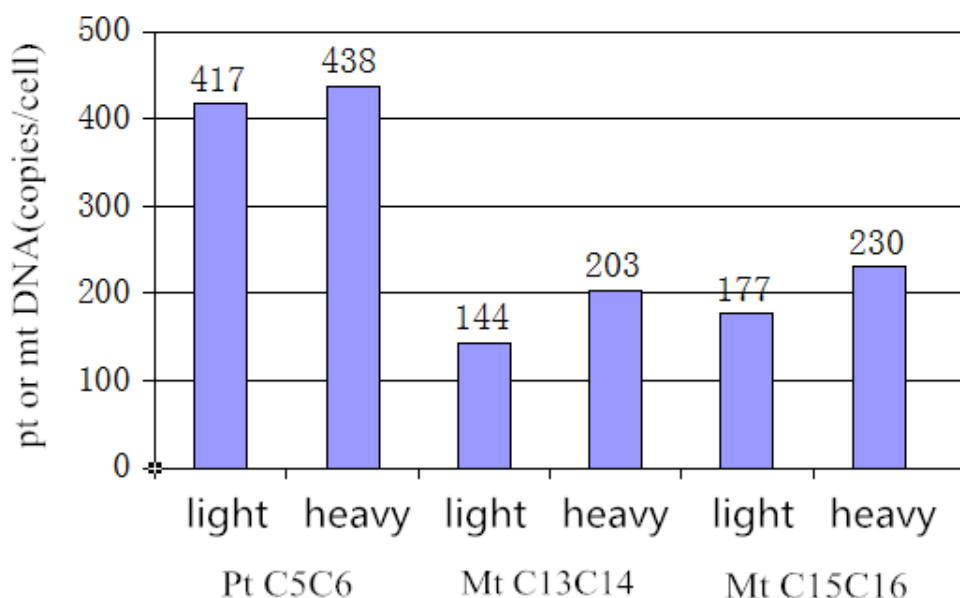


图 3.8 块茎重量不同时，细胞核 DNA（费乌瑞它）为内参的定量结果分析

**Fig.3.9 Real-time quantitative PCR analysis of plastid and mitochondrial DNA using the nuclear DNA as reference control, when the weight of tubers are significantly different .Cultivar: Favorita**

### 3.7 结果总结

以两个马铃薯品种“夏波蒂”和“费乌瑞它”的块茎光照变绿组织总 DNA 进行 Long PCR，结果表明光照变绿组织的叶绿体基因组 DNA 并未表现出如 Kumer 等所报道的由光照引起的严重降解。

通过 real-time PCR 分析可知:

① 两个马铃薯品种“夏波蒂”和“费乌瑞它”均表现出在马铃薯块茎重量相似时,光照变绿组织的叶绿体基因组 DNA 拷贝数受光照影响而降低,线粒体基因组各亚分子 DNA 拷贝数均受光照影响而降低;

② 两个马铃薯品种“夏波蒂”和“费乌瑞它”的不同重量马铃薯块茎的光照变绿组织中,较重块茎的叶绿体基因组 DNA 拷贝数多于较轻块茎的数值,线粒体基因组各亚分子 DNA 拷贝数同样也均随块茎重量增大而增加。

## 第四章 讨论

### 4.1 功能不同的组织之间线粒体拷贝数差异

线粒体的功能是把储存在生物大分子中的化学能转变为细胞可直接利用的能量。**Real-time PCR** 结果表明,光照变绿组织的线粒体基因组 DNA 拷贝数低于避光组块茎的数值。试验结果所表现出的差异很可能是随着块茎表层组织由储蓄组织到光合组织的功能转变,部分质体转变为叶绿体,而叶绿体通过光合磷酸化产生 ATP。叶绿体提供的新 ATP 来源很可能降低了变绿组织中的细胞对线粒体供能的需求。

### 4.2 农作物优良品种的 ptDNA/mtDNA 值

质体有多种不同的类型,每种类型都有自己特殊的功能。参与光合成的叶绿体是质体在绿色组织中主要存在形式。在不进行光合成的块茎细胞中,质体主要是以造粉体、白色体等形式存在,并承担合成以及储存淀粉等物质的功能。

优良品种植株中 ptDNA/mtDNA 值可能对作物品种的优良形状有重要影响,比如夏波蒂 ptDNA/mtDNA 值与费乌瑞它的值存在差异,这一差异可能影响块茎的淀粉积累。

### 4.3 块茎 mtDNA/nuDNA 值大于根 mtDNA/nuDNA 值的假设

1. 块茎内部氧气浓度偏低会对线粒体的氧化磷酸化产生抑制,而糖酵解产生的能量可能一定程度上降低了细胞对线粒体的依赖性;而块茎和根的表皮组织由于直接和外部接触,氧气浓度较高,线粒体通过氧化磷酸化提供 ATP 的作用更为显著。

2. 作为淀粉的储存器官,块茎不仅是有机物运输的目的地,而且必须具备较强的淀粉合成能力,而这种能力需要更多的能量供应;光照变绿组织的叶绿体光合磷酸化产生的 ATP 可能在一定程度上降低了细胞对线粒体氧化磷酸化产生 ATP 的需要。

#### 4.4 后续实验分析

1. 本研究选取了两个生产中常用马铃薯品种为材料, 但尚不能确定在其他品种中是否也有同样结果。比如“夏波蒂”与“费乌瑞它”的质体基因组 DNA 拷贝数以及质体基因组 DNA 拷贝数, 以及两种拷贝数的比值存在很大的数值差异。因此, 检测其他马铃薯品种(特别是具有不同表皮颜色的品种)的质体和线粒体基因组 DNA 拷贝数, 以及不同品种的拷贝数变化趋势是很有必要的实验项目。

2. 谢开云等报道称高淀粉含量马铃薯品种块茎淀粉含量随着块茎的增大而降低<sup>[81]</sup>, 但本实验结果表明变绿组织的质体基因组 DNA 拷贝数随块茎重量的增大而增加。本实验与前人研究成果之间的差异可能是由于实验材料均为受光照变绿组织的总 DNA, 但是块茎重量相同的情况下, 光照处理组材料的质体基因组 DNA 拷贝数略高于避光处理组的数值。但也有可能随着块茎重量增大其组织中的质体基因组 DNA 拷贝数上升, 但是质体的类型反正了分化, 只有部分用于合成并储存淀粉, 其他质体用于合成蛋白质等。另一个可能的原因是块茎不同部位的淀粉以及质体的含量或者拷贝数存在差异, 有可能表层组织中的质体拷贝数多于块茎内部组织的相关数值。

为了验证以上的几点猜想, 后续实验首先需要在块茎发育的全过程中并且不受其他因素影响的情况下, 检测质体和线粒体基因组 DNA 拷贝数的变化趋势。其次检测与淀粉合成相关的淀粉体酶或者蛋白相应基因转录量在不同阶段的差异。并且在每个阶段都要分析块茎不同部位的淀粉含量以及质体基因组 DNA 拷贝数。

3. 通过研究更多品种和薯块发育阶段有可能鉴定出是哪些细胞核基因可以调控质体和线粒体基因组 DNA 的拷贝数和相关功能基因的表达。下一步可以通过转基因方式来过表达或者干扰相关基因的表达, 以此方法来验证这些细胞核基因对细胞器基因组 DNA 拷贝数以及基因表达的调控功能。在确认了相关调控基因的功能后, 可以进一步探讨通过调控质体和线粒体基因组 DNA 拷贝数, 使植株不同组织器官内的质体和线粒体的含量更加适应各个组织器官的功能, 进而改良叶片的光合作用以及块茎等器官中淀粉的合成与储存。

## 参考文献:

- [1] Li X-Q, Zhang M, Brown G G. Cell-specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings. *Plant Cell*, 1996, 8 (11) : 1961-1975
- [2] Li X-Q, Jean M, Landry B S, Brown G G. Restorer genes for different forms of Brassica cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (17) : 10032-10037
- [3] Martin W, Kowallik K V. Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Eur J Phycol*, 1999, 34 (3) : 287-295
- [4] Kim E, Archibald J M. Diversity and evolution of plastids and their genomes. In: *The chloroplast-interactions with the environment*. Aronsson H, Sandelius AS, editors. Berlin, Springer. 2009, pp. 1-39
- [5] Parfrey L W, Lahr D J G, Knoll A H, Katz L A. Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (33) : 13624-13629
- [6] Reyes-Prieto A, Weber A P M, Bhattacharya D. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu Rev Genet*. 2007, pp. 147-168
- [7] Gould S B, Waller R F, McFadden G I. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol*. 2008, pp. 491-517
- [8] Germot A, Philippe H, Le Guyader H. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (25) : 14614-14617
- [9] Cavalier-Smith T. The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann N Y Acad Sci*, 1987, 503:55-71
- [10] Wallin I E. The mitochondria problem. *Am Nat*, 1923, 57:255-261
- [11] Archibald J M. Plastid origins. In: *Organelle Genetics*. Bullerwell CE, editor, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012, pp.
- [12] Durnford D G, Deane J A, Tan S, McFadden G I, Gantt E, et al. A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *J*

- Mol Evol, 1999, 48 (1) : 59-68
- [13] Baum D. The origin of primary plastids: A pas de deux or a ménage à trois? Plant Cell, 2013, 25 (1) : 4-6
- [14] Händeler K, Grzybowski Y P, Krug P J, Wägele H. Functional chloroplasts in metazoan cells - A unique evolutionary strategy in animal life. Frontiers in Zoology, 2009, 6 (1) :
- [15] de Vries J, Christa G, Gould S B. Plastid survival in the cytosol of animal cells. Trends Plant Sci, 2014, 19 (6) : 347-350
- [16] Schwartz J A, Curtis N E, Pierce S K. FISH labeling reveals a horizontally transferred algal (*Vaucheria litorea*) nuclear gene on a sea slug (*Elysia chlorotica*) chromosome. Biological Bulletin, 2014, 227 (3) : 300-312
- [17] De Vries J, Habicht J, Woehle C, Huang C, Christa G, et al. Is *ftsH* the key to plastid longevity in sacoglossan slugs? Genome Biology and Evolution, 2013, 5 (12) : 2540-2548
- [18] Selman M, Sak B, Kváč M, Farinelli L, Weiss L M, et al. Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. Eukaryot Cell, 2013, 12 (4) : 496-502
- [19] Wang D, Lloyd A H, Timmis J N. Environmental stress increases the entry of cytoplasmic organellar DNA into the nucleus in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (7) : 2444-2448
- [20] Baldauf S L, Palmer J D. Evolutionary transfer of the chloroplast *tufA* gene to the nucleus. Nature, 1990, 344 (6263) : 262-265
- [21] Stephen Gantt J, Baldauf S L, Calie P J, Weeden N F, Palmer J D. Transfer of *rpl22* to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. EMBO J, 1991, 10 (10) : 3073-3078
- [22] Sheppard A E, Ayliffe M A, Blatch L, Day A, Delaney S K, et al. Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevated during male gametogenesis in tobacco. Plant Physiol, 2008, 148 (1) : 328-336
- [23] Sun C W, Callis J. Recent stable insertion of mitochondrial DNA into an arabidopsis polyubiquitin gene by nonhomologous recombination. Plant Cell, 1993, 5 (1) : 97-107
- [24] Lough A N, Roark L M, Kato A, Ream T S, Lamb J C, et al. Mitochondrial DNA transfer to the nucleus generates extensive insertion site variation in maize. Genetics, 2008, 178 (1) :

47-55

- [25] Goremykin V V, Salamini F, Velasco R, Viola R. Mitochondrial DNA of *Vitis vinifera* and the issue of rampant horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol*, 2009, 26 (1) : 99-110
- [26] Stegemann S, Keuthe M, Greiner S, Bock R. Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109 (7) : 2434-2438
- [27] Mower J P, Stefanović S, Hao W, Gummow J S, Jain K, et al. Horizontal acquisition of multiple mitochondrial genes from a parasitic plant followed by gene conversion with host mitochondrial genes. *BMC Biol*, 2010, 8
- [28] Li X-Q. Laboratory methods for investigating nuclear and cytoplasmic genomes and transcriptome. In: *Somatic Genome Manipulation: Advances, Methods and Applications*. Li X-Q, Donnelly D, Jensen TG, editors, Springer. 2015, pp. 323-352
- [29] Shinozaki K. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J*, 1986, 5:2043-2049
- [30] Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, 1986, 322 (6079) : 572-574
- [31] Saski C, Lee S B, Daniell H, Wood T C, Tomkins J, et al. Complete chloroplast genome sequence of glycine max and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Mol Biol*, 2005, 59 (2) : 309-322
- [32] Li X-Q, Du D. Variation, evolution, and correlation analysis of C+G content and genome or chromosome size in different kingdoms and phyla. *PLoS ONE*, 2014, 9 (2) : e88339
- [33] 胡婧, 刘念, 黄原. 节肢动物线粒体基因组研究进展与基因顺序分析. *昆虫分类学报*, 2006, 28 (2) : 153-160
- [34] 覃屏生, 陶春荣, 余莹等. 鳄蜥线粒体基因组全序列及其结构分析. *湖北农业学报*, 2014, 53 (4) : 925-928
- [35] Gualberto J M, Milesina D, Wallet C, Niazi A K, Weber-Lotfi F, et al. The plant mitochondrial genome: Dynamics and maintenance. *Biochimie*, 2014, 100 (1) : 107-120
- [36] Backert S, Nielsen B L, Börner T. The mystery of the rings: Structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends Plant Sci*, 1997, 2 (12) : 477-483
- [37] Carlson J E, Kemble R J. Variable presence of the 1.94kb mitochondrial plasmid in maize S

- cytoplasm and its relationship to cytoplasmic male sterility. *Plant Mol Biol*, 1985, 4 (2-3) : 117-123
- [38] 雷彬彬, 李双双, 刘国政等. 高等植物线粒体基因组进化分析. *分子植物育种*, 2012, 10 (4) : 490-500
- [39] Udy D B, Belcher S, Williams-Carrier R, Gualberto J M, Barkan A. Effects of reduced chloroplast gene copy number on chloroplast gene expression in maize. *Plant Physiol*, 2012, 160 (3) : 1420-1431
- [40] Zoschke R, Liere K, Börner T. From seedling to mature plant: Arabidopsis plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *Plant J*, 2007, 50 (4) : 710-722
- [41] Scott N S, Tymms M J, Possingham J V. Plastid-DNA levels in the different tissues of potato. *Planta*, 1984, 161 (1) : 12-19
- [42] Shaver J M, Oldenburg D J, Bendich A J. Changes in chloroplast DNA during development in tobacco, *Medicago truncatula*, pea, and maize. *Planta*, 2006, 224 (1) : 72-82
- [43] Oldenburg D J, Rowan B A, Zhao L, Walcher C L, Schleh M, et al. Loss or retention of chloroplast DNA in maize seedlings is affected by both light and genotype. *Planta*, 2006, 225 (1) : 41-55
- [44] Oldenburg D J, Rowan B A, Kumar R A, Bendich A J. On the fate of plastid DNA molecules during leaf development: Response to the Golczyk et al. commentary. *Plant Cell*, 2014, 26 (3) : 855-861
- [45] Golczyk H, Greiner S, Wanner G, Weihe A, Bock R, et al. Chloroplast DNA in mature and senescing leaves: A reappraisal. *Plant Cell*, 2014, 26 (3) : 847-854
- [46] Rowan B A, Bendich A J. Isolation, quantification, and analysis of chloroplast DNA. In: Jarvis RP, editor. *Methods in Molecular Biology*. 2011, pp. 151-170
- [47] Minnhagen S, Carvalho W F, Salomon P S, Janson S. Chloroplast DNA content in *Dinophysis* (Dinophyceae) from different cell cycle stages is consistent with kleptoplasty. *Environ Microbiol*, 2008, 10 (9) : 2411-2417
- [48] Ajaz S, Czajka A, Malik A. Accurate measurement of circulating mitochondrial DNA content from human blood samples using real-time quantitative PCR. *Methods in Molecular Biology*: Humana Press Inc. 2015, pp. 117-131

- [49] Kumar R A, Oldenburg D J, Bendich A J. Changes in DNA damage, molecular integrity, and copy number for plastid DNA and mitochondrial DNA during maize development. *J Exp Bot*, 2014, 65 (22) : 6425-6439
- [50] Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*, 2009, 55 (4) : 611-622
- [51] Abdel Nour A M, Azhar E, Damanhour G, Bustin S A. Five years MIQE guidelines: The case of the Arabian countries. *PLoS ONE*, 2014, 9 (2) :
- [52] Küchler E C, Tannure P N, Falagan-Lotsch P, Lopes T S, Granjeiro J M, et al. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, 2012, 20 (4) : 467-471
- [53] Belova O A, Burenkova L A, Karan L S, Kolyasnikova N M, Topychkanova N G, et al. The tick-borne encephalitis virus detection efficiency in the ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with elisa and real-time PCR. *Vopr Virusol*, 2014, 59 (5) : 38-43
- [54] Aguado A, Pastrana A M, De Los Santos B, Romero F, Sánchez M C, et al. Efficiency of natural products in the control of colletotrichum acutatum monitored by real-time PCR. In: Maas J, Zhang Y, editors. *Acta Horticulturae: International Society for Horticultural Science*. 2014, pp. 329-334
- [55] Pérez L M, Fittipaldi M, Adrados B, Morató J, Codony F. Error estimation in environmental DNA targets quantification due to PCR efficiencies differences between real samples and standards. *Folia Microbiol*, 2013, 58 (6) : 657-662
- [56] Huang Y, Yin X, Zhu C, Wang W, Grierson D, et al. Standard Addition Quantitative Real-Time PCR (SAReal-time PCR) : A Novel Approach for Determination of Transgene Copy Number Avoiding PCR Efficiency Estimation. *PLoS ONE*, 2013, 8 (1) :
- [57] Chu Y, Bhattacharya A, Wu C, Knoll J E, Ozias-Akins P. Improvement of peanut (Arachis hypogaea L.) transformation efficiency and determination of transgene copy number by relative quantitative real-time PCR. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 2013, 49 (3) : 266-275
- [58] Logar K, Kopinč R, Bandelj P, Starič J, Lapanje A, et al. Evaluation of combined

- p>high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of
- Mycobacterium avium*
- subsp.
- paratuberculosis*
- in subclinically infected dairy cattle: Comparison with faecal Culture, milk real-time PCR and milk ELISA.
- BMC Veterinary Research*
- , 2012, 8
- [59] Lievens A, Van Aelst S, Van Den Bulcke M, Goetghebeur E. Enhanced analysis of real-time PCR data by using a variable efficiency model: FPK-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40 (2):
- [60] Irwin P L, Nguyen L H T, Chen C Y, Uhlich G A, Paoli G C. A method for correcting standard-based real-time PCR DNA quantitation when the standard's polymerase reaction efficiency is significantly different from that of the unknown's. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402 (9) : 2713-2725
- [61] Chen Y, Arthur P F, Barchia I M, Quinn K, Parnell P F, et al. Using gene expression information obtained by quantitative real-time PCR to evaluate Angus bulls divergently selected for feed efficiency. *Animal Production Science*, 2012, 52 (11) : 1058-1067
- [62] Von Felten A, Défago G, Maurhofer M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *J Microbiol Methods*, 2010, 81 (2) : 108-115
- [63] Fulgosi H, Ježić M, Lepeduš H, Štefanić P P, Ćurković-Perica M, et al. Degradation of chloroplast DNA during natural senescence of maple leaves. *Tree Physiol*, 2012, 32 (3) : 346-354
- [64] Chen W H, Tang C Y, Lin T Y, Weng Y C, Kao Y L. Changes in the endopolyploidy pattern of different tissues in diploid and tetraploid *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* (Orchidaceae) . *Plant Sci*, 2011, 181 (1) : 31-38
- [65] Bowman M J, Simon P W. Quantification of the relative abundance of plastome to nuclear genome in leaf and root tissues of carrot (*Daucus carota* L.) using quantitative PCR. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31 (4) : 1040-1047
- [66] Ma J, Li X-Q. Organellar genome copy number variation and integrity during moderate maturation of roots and leaves of maize seedlings. *Curr Genet*, 2014, 10.1007/s00294-00015-00482-00291 published online first on March 00218, 02015.
- [67] Shao R, Kirkness E F, Barker S C. The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*.

- Genome Res, 2009, 19 (5) : 904-912
- [68] Lonsdale D M, Hodge T P, Fauron C R. The physical map and organisation of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. Nucleic Acids Res, 1984, 12(24): 9249-9261
- [69] Alverson A J, Rice D W, Dickinson S, Barry K, Palmer J D. Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber. Plant Cell, 2011, 23 (7) : 2499-2513
- [70] Li X-Q, Prat D, De Paepe R, Pernes J. Variability induced In *Nicotiana sylvestris* by two cycles of protoplast Culture. In: Genetic Manipulation in Crops. IRRI, editor. London, Cassel Plc. 1988, pp. 131-133
- [71] Schmidt M, Walz C, Hesemann C U. Somaclonal variation of the mitochondrial ATPase subunit 6 gene region in regenerated triticale shoots and full-grown plants. Theor Appl Genet, 1996, 93 (3) : 355-360
- [72] Arrieta-Montiel M, Lyznik A, Woloszynska M, Janska H, Tohme J, et al. Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean. Genetics, 2001, 158 (2) : 851-864
- [73] Feng X, Kaur A P, MacKenzie S A, Dweikat I M. Substoichiometric shifting in the fertility reversion of cytoplasmic male sterile pearl millet. Theor Appl Genet, 2009, 118 (7) : 1361-1370
- [74] Tanaka Y, Tsuda M, Yasumoto K, Terachi T, Yamagishi H. The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. Curr Genet, 2014,
- [75] Li X-Q. Variability after in vitro Culture: Genetic study after protoplast Culture in *Nicotiana sylvestris*; Description of regenerated plants in *Medicago lupulina*. Docteur d'Etat Thesis, Univ Paris-Sud. 1987, pp. 161 pages
- [76] L'Homme Y, Stahl R J, Li X Q, Hameed A, Brown G G. *Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS- associated orf224 gene. Curr Genet, 1997, 31 (4) : 325-335
- [77] Li X-Q. Bioinformatic approaches for analysis of gene direction, chromosome base composition, mRNA polyadenylation, and protein network. In: Somatic Genome

- Manipulation: Advances, Methods and Applications. Li X-Q, Donnelly D, Jensen TG, editors. New York, Springer. 2015, pp. 353-363
- [78]Li X-Q, Du D. Motif types, motif locations and base composition patterns around the RNA polyadenylation site in microorganisms, plants and animals. BMC Evol Biol, 2014, 14:162
- [79]Formanova N, Li X Q, Ferrie A M R, DePauw M, Keller W A, et al. Towards positional cloning in Brassica napus: Generation and analysis of doubled haploid B. rapa possessing the B. napus pol CMS and Rfp nuclear restorer gene. Plant Mol Biol, 2006, 61 (1-2) : 269-281
- [80]Li X-Q. Somatic Genome Variation. Wiley-Blackwell. 2015, New York
- [81]谢开云, 郭志乾, 王立英, 金黎平, 卞春松, 段绍光, 屈冬玉. 高淀粉马铃薯品种块茎大小与淀粉含量之间的关系. 中国马铃薯, 2003, 17 (5) : 280-283

## 附 录

### 1. 试剂

销售商：兰州华瑞德生物工程有限公司 Hoogon Biotech (Lanzhou) Co.,Ltd

生产商：QIAGEN

DNA 提取试剂盒：QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (50) Cat#69104

销售商：甘肃鹏程科技发展有限公司

生产商：天根生化科技(北京)有限公司 TIANGEN Biotech (Beijing) Co.,Ltd

定量 PCR 试剂盒：SuperReal Premix Plus (SYBR GREEN) Cat#FR205-02

水 (PCR 及引物)：DNase/RNase-Free Deionized Water Cat#RT121

销售商：兰州鑫祥生物工程有限公司

生产商：北京全式金生物技术有限公司 TransGen Biotech (Beijing) Co.,Ltd

TAQ 酶：EasyTaq SuperMix Code#AS111-11

DNA ladder: Trans2K Plus DNA Marker Code#BM111

100-250-500-750-1000-2000-3000-5000

销售商：兰州君域生物工程有限公司

生厂商：北京塞百盛基因技术有限公司 SBS Genetech Co.,Ltd

琼脂糖凝胶用染料：GoodView Nucleic Acid Stain (GV-II) Cat#HGVII

### 2. 耗材

销售商：甘肃鹏程科技发展有限公司

生厂商：Axygen 96 孔板：Axygen PCR MICROPLATE Cat#PCR-96M2-HS-C

生厂商：platemax 96 孔板用膜：PLATEMAX PCR-TS

销售商：兰州乾煜宏达生物技术有限公司

生厂商：Axygen

移液器枪头：Axygen T300 0.5-10  $\mu$ l clear

Axygen T200-Y 1-200  $\mu$ l yellow

### 3. 引物合成

生工生物工程（上海）股份有限公司 Sangon Biotech Co.,Ltd

### 4. 仪器

电泳仪：北京六一仪器厂 DYY-12C 电泳仪

电泳槽：北京六一仪器厂 DYCP-31DN 电泳槽

常规 PCR 仪：BIO-RAD T100 Thermal Cycler

常温离心机：Eppendorf Centrifuge 5430

移液器：Eppendorf Research 2-20  $\mu$ l

Eppendorf Research 0.5-10  $\mu$ l

Eppendorf Research Plus 200  $\mu$ l

Eppendorf Research Plus 10  $\mu$ l

定量 PCR 仪：Stratagene MX3005p Real-Time real-time PCR System

光照培养箱：韶关市泰宏医疗器械有限公司 珠江牌培养箱

水浴锅：国华电器有限公司 数显恒温水浴锅 HH-6

紫外成像仪：Gel Doc-IT 310 Imaging System 观察波长 302 nm

紫外分光光度计：QUAWELL UV-VIS Spectrophotomrter Q5000

## 致 谢

一转眼三年的研究生生活即将结束。在这三年中，我得到许许多多的关心和帮助，感谢大家！

首先，论文是在司怀军教授的指导下完成的，司老师在百忙之中从论文的选题到写作都给予了悉心地指导。在这三年中，司老师让我们懂得了在实验过程中不怕失败，明白什么是耐心和坚韧。在教导我实验技术、分析方法的的同时，在生活上也给予了很大地帮助和关心，感谢司老师三年来的照顾！

在此特别感谢加拿大农业部李修庆教授，本实验中与马铃薯品种夏波蒂相关的结果来自于李老师的实验室，而且李老师还在实验设计和数据分析方面给予了大量指导！本实验的田间部分由日照市农科院李修宝研究员完成，感谢李研究员为本实验及相关实验提供的实验材料！

同时感谢同门的刘伯林博士、杨江伟博士、周香艳博士在试验方法和技术上的指导，感谢米晓晓、王泽民、常璟以及晋昕等同学在学习和实验上给予的帮助！

感谢父母亲人的无私关怀，我所取得的任何一点进度都离不开他们的默默支持！

张国栋





