



创新设计前沿

# 百子莲离体细胞超低温保存技术

——单壁碳纳米管改善百子莲胚性愈伤组织超低温保存技术研究

张荻 任丽 著



张外信



上海交通大学出版社  
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

# 创新设计前沿

巍巍交大 百年书香

www.jiaodapress.com.cn

bookinfo@sjtu.edu.cn



丛书策划 提文静  
责任编辑 提文静 靳恒春  
封面设计 右序设计



扫描二维码  
关注上海交通大学出版社  
官方微信

ISBN 978-7-313-21567-3



9 787313 215673 >

定价: 69.00元

夏晓春

本书为... 作者... 内容... 特点...

夏晓春

# 百子莲离体细胞超低温保存技术

## ——单壁碳纳米管改善百子莲胚性愈伤组织超低温保存技术研究

张荻 任丽 著



上海交通大学出版社  
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

## 内容提要

本书通过热物性分析、亚细胞定位、抗性生理、基因定量分析揭示单壁碳纳米管(CNT)对植物细胞的潜在作用靶点、理化性质及生物过程的影响。在学科交叉的基础上系统地揭示CNT对改善植物胚性细胞冻后细胞活性的作用机制,为碳纳米材料在观赏植物种质资源保存领域的应用提供理论与实践依据。

本书适用于风景园林、观赏园艺、植物学等相关学科方向的研究人员、高校师生及从业人员。

## 图书在版编目(CIP)数据

百子莲离体细胞超低温保存技术 / 张荻,任丽著. —上海:上海交通大学出版社,2019

ISBN 978-7-313-21567-3

I. ①百… II. ①张…②任… III. ①石蒜科-细胞-超低温保存  
IV. ①Q949.71

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第141344号

## 百子莲离体细胞超低温保存技术

——单壁碳纳米管改善百子莲胚性愈伤组织超低温保存技术研究

著 者:张荻 任丽

出版发行:上海交通大学出版社

邮政编码:200030

印 刷:江苏凤凰数码印务有限公司

开 本:710mm×1000mm 1/16

字 数:103千字

版 次:2019年8月第1版

书 号:ISBN 978-7-313-21567-3/Q

定 价:69.00元

地 址:上海市番禺路951号

电 话:021-64071208

经 销:全国新华书店

印 张:7.5

印 次:2019年8月第1次印刷

版权所有 侵权必究

告 读 者:如发现本书有印装质量问题请与印刷厂质量科联系

联系电话:025-83657309

# 前 言

据统计,地球上记载的植物种类约有 55 万种,目前被人类栽培利用的植物种类约有 1 500 多种。随着人类生活和文明程度的提高,特别是近年来生物技术的迅速发展,人类对植物种质的开发、利用和依赖程度都达到了前所未有的高度。然而另一方面,我们又面临着物种灭绝,种质资源流失速度加快的局面。目前陆地生态系统面临较大威胁,全球 34 个生物多样性热点地区孕育着地球 50% 以上的植物物种,其占陆地面积从起初的 15.7% 已下降至 2.3%。在过去的 300 年中,物种灭绝速度被人为地提高了 1 000 多倍。超过 8 000 种的观赏植物正处于灭绝的边缘。提倡生态文明、维持生物多样性、保护重要遗传资源迫不及待。1973 年联合国粮农组织和国际生物计划联合召开的作物种质资源工作组会议上明确阐述了建立长期的植物种质资源保存的行动计划(包括建立种子作物、无性繁殖作物、木本植物等的搜集、离体保存及长期保存技术等)。我国“十三五”重点研发计划的六个试点专题中已将“林业资源培育及高效利用技术创新”,尤其是珍稀濒危种质资源保存列为重要研究内容。

传统的植物种质资源保存方法主要有原生境保存和异生境保存两种。原生境保存是在植物原来的生态环境下就地保存与繁殖,因此被看作植物的“天然基因库”。但是由于原生境保存受到了人力、物力资源的限制,只能保存相对有限的物种。并且由于较少的人为干预,它仍不能彻底摆脱濒危物种灭绝的问题。异生境保存是指在植物原产地以外的地方保存和繁殖植物,如以保存完整植物为主的植物园或种质资源圃和保存种子为主的种子库。但田间种质库保存植物种质资源需要大量的土地和人力资源,成本高,且易遭受各种自然灾害的侵袭。而种子库只能保存正常型种子,对于顽拗



型的种子和有性繁殖困难的植物则无能为力。

为了解决传统保存方法中遇到的问题,1975年 Henshaw 首次提出离体培养保存植物种质的策略,并受到国际植物界的高度重视。离体培养保存主要是利用组织培养技术获得特定培养材料进行种质保存的方法。然而由于在离体培养保存过程中长期频繁的继代培养不仅需要相当的人力和物力投入,而且存在着材料遗传性变异和由于人为的原因造成的材料损失的可能性。

为了解决这一问题,超低温保存应运而生,它是低温生物学和微型繁殖技术相结合的植物种质资源离体保存技术,是在液氮( $-196^{\circ}\text{C}$ )甚至更低温度下长期保存植物种质资源的方法。超低温保存生物材料的单篇报道可追溯到18世纪,但直到1973年才首次成功地在液氮中保存了胡萝卜悬浮细胞。40多年来植物种质超低温保存技术取得突破性进展,涉及保存的材料有原生质体、悬浮细胞、愈伤组织、体细胞胚、合子胚、花粉胚、花粉、茎尖(根尖)分生组织、芽、茎段、种子等。

超低温保存是植物种质资源中长期保存的最佳途径,提高超低温保存冻后细胞活性并揭示其作用机制是该领域的重要科学问题。本书从超低温保存体系优化的角度出发,采用碳纳米材料作为冷冻保护剂外源添加物质,在学科交叉的基础上系统地揭示单壁碳纳米管对改善百子莲胚性愈伤组织冻后细胞活性的作用机制,为碳纳米材料在超低温保存领域的应用提供理论依据,进一步丰富植物超低温保存理论。

本书受国家自然科学基金面上项目(31870686)和上海市农业科学院学科领域建设专项支持得以出版。书中存在的错漏不足之处,望广大读者批评指正。



(续)

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
$^1\text{O}_2$	singlet oxygen	单线态氧
ABA	Abscisic acid	脱落酸
AFP	Antifreeze protein	抗冻蛋白
APX	Ascorbate peroxidase	抗坏血酸过氧化物酶
AQP	Aquaporin	水通道蛋白
AsA	Ascorbic acid	抗坏血酸
CA	Cold acclimation	低温预培养
CAT	Catalase	过氧化氢酶
CNT	Carbon Nanotube	碳纳米管
EC	Embryogenic callus	胚性愈伤组织
EG	Ethylene glycol	乙二醇
GB	Glycine betaine	甘氨酸甜菜碱
Glu	Glucose	葡萄糖
Gly	Glycerol	丙三醇
GR	Glutathione reductase	谷胱甘肽还原酶
GSH	Reduced glutathione	还原型谷胱甘肽
HA		纳米微粒羟基磷灰石
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hydrogen peroxide	过氧化氢
IAA	Indole-3-acetic acid	生长素
KF7G	Kaempferol-7-O-glucoside	山奈酚 7 氧葡萄糖苷
LA	Lipoic acid	硫辛酸
LN	Liquid nitrogen	液氮
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	促分裂原活化蛋白激酶
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
$\text{Me}_2\text{SO}$	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷



(续表)

英文缩写	英文全称	中文全称
MEL	Melatonin	褪黑素
MS	Murashige and Skoog medium	MS 培养基
MWCNTs	Multi-wall carbon nanotubes	多壁碳纳米管
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxide anion	超氧阴离子自由基
OH·	Hydroxy radical	羟自由基
OXI1	Oxidative signal-inducible 1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
PCD	Programmed cell death	细胞程序性死亡
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PIC	Picloram	毒莠定
POD	Peroxidase	过氧化物酶
PVA	Polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
PVP	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
PVS	Plant vitrification solution	玻璃化溶液
RF	Rapid freezing	快速冷冻
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
SF	Slow freezing	慢速冷冻
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
Sor	Sorbitol	山梨醇
Suc	Sucrose	蔗糖
SWCNTs	Single-wall carbon nanotubes	单壁碳纳米管
Tg	Glass transition temperature	玻璃化转变温度
TS	Two-step freezing	二步法冷冻
TTC	Triphenyltetrazolium chloride	氯代三苯基四氮唑
VC	Vitamin C	维生素 C

# 目 录

## 第1章 绪论 / 1

- 1.1 植物种质资源的玻璃化法超低温保存 / 1
- 1.2 植物超低温保存过程中经受的逆境胁迫 / 9
- 1.3 外源添加物质对超低温保存植物细胞抗逆性的调控 / 12
- 1.4 百子莲属植物种质资源研究概况 / 14
- 1.5 纳米材料在低温生物学中的应用 / 18
- 1.6 碳纳米管在植物研究中的应用 / 19
- 1.7 ROS与细胞程序性死亡 / 22
- 1.8 植物水通道蛋白研究概述 / 23
- 1.9 主要研究内容及研究框架 / 24
- 1.10 研究目的及意义 / 25

## 第2章 碳纳米管低温保护剂的热物性分析 / 27

- 2.1 材料与方法 / 27
- 2.2 结果与分析 / 28
- 2.3 本章小结 / 29

## 第3章 碳纳米管的分布及细胞超微结构观察 / 30

- 3.1 材料与方法 / 30
- 3.2 结果与分析 / 32
- 3.3 本章小结 / 37



## 第4章 常规与 CNT-PVS2 超低温保存体系中百子莲 EC 氧化胁迫响应的研究 / 39

4.1 材料与方法 / 39

4.2 结果与分析 / 49

4.3 本章小结 / 59

## 第5章 常规与 CNT-PVS2 超低温保存体系百子莲 EC 线粒体电子传递链的研究 / 61

5.1 材料与方法 / 61

5.2 结果与分析 / 69

5.3 本章小结 / 77

## 第6章 常规与 CNT-PVS2 超低温保存体系中百子莲细胞程序性死亡的研究 / 78

6.1 材料与方法 / 78

6.2 结果与分析 / 79

6.3 本章小结 / 82

## 第7章 常规与 CNT-PVS2 超低温保存体系中百子莲 EC 水通道蛋白的研究 / 83

7.1 材料与方法 / 83

7.2 结果与分析 / 83

7.3 本章小结 / 84

## 第8章 结论与展望 / 86

8.1 结论 / 86

8.2 展望 / 87

## 附录 / 89

附录 1 氧化胁迫响应相关基因 qRT-PCR 引物列表 / 89

附录 2 线粒体电子传递链相关基因 qRT-PCR 引物列表 / 91

附录 3 水通道蛋白 qRT-PCR 引物列表 / 93

## 参考文献 / 94

## 索引 / 104



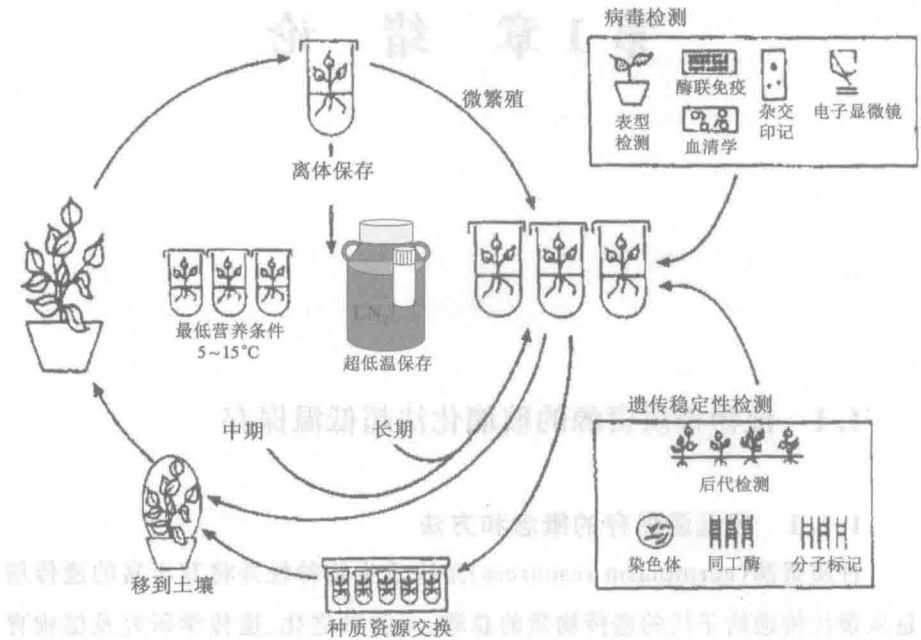


图 1-1 植物种质资源的低温保存及其应用

程度,已成为低温生物学(cryobiology)中一个重要的研究方向。

目前,植物超低温保存主要运用程序降温法(controlled rate cooling)、玻璃化法(vitrification)、包埋脱水法(encapsulation dehydration)和休眠芽直接保存(dormant bud preservation)超低温保存技术(Reed, 2001)。

### 1.1.2 玻璃化法超低温保存的原理、步骤和特点

玻璃化法(vitrification)超低温保存是将材料置于由一定比例渗透性和非渗透性保护剂组成的玻璃化溶液(plant vitrification solution, PVS)中,使细胞逐渐脱水并不断提高胞质黏度,在快速降温过程中细胞及其玻璃化溶液过冷至玻璃化转变温度(glass transition temperature,  $T_g$ ),从而被固化成玻璃态(非晶态),以减少冰晶形成对细胞质膜产生致命性伤害,并以这种玻璃态在超低温下保存。

玻璃化法超低温保存包括以下步骤:①预培养(preculture);②渗透保护(osmoprotection, 装载液处理);③玻璃化溶液脱水(dehydration with PVS);④投入液氮快速冷冻(rapid cooling);⑤保存后快速化冻(rapid

warming); ⑥ 洗涤 (dilution, 去装载和洗涤玻璃化溶液); ⑦ 恢复培养 (plating for re-growth) (Sakai et al., 2008) (见图 1-2)。

玻璃化法超低温保存是 1937 年首次提出的, 之后经过长期的探索, 于 20 世纪 80 年代发展起来。1968 年 Ralph 首次利用玻璃化法超低温保存亚麻 (*Linum usitatissimum*) 悬浮细胞, 1989 年 Langis 等和 Uragami 等相继保存了油菜 (*Brassica campestris*) 悬浮细胞和芦笋 (*Asparagus officinalis*) 体细胞胚, 进一步证实了玻璃化冻存植物材料的可行性。

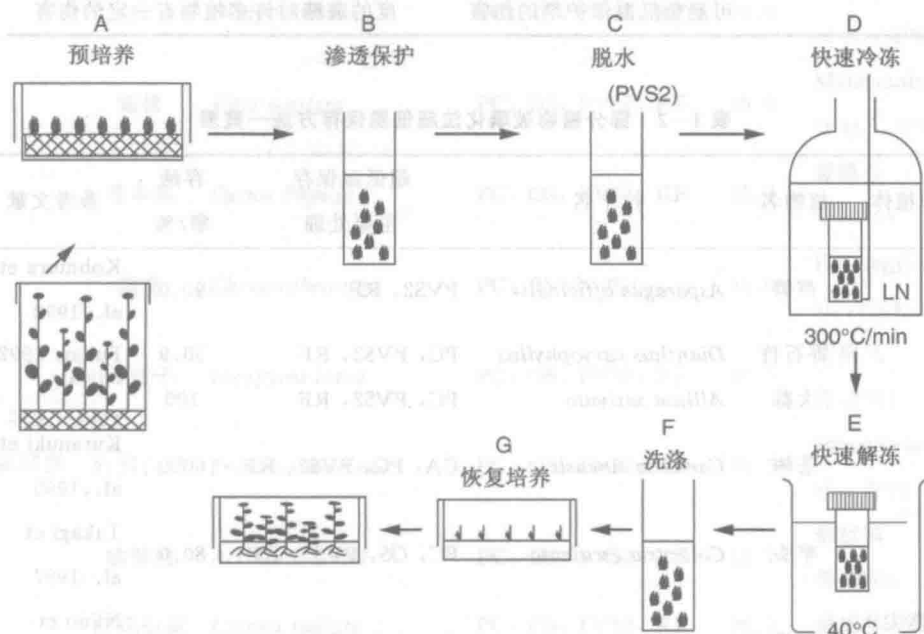


图 1-2 植物玻璃化法超低温保存技术流程 (Sakai, 2004)

与其他超低温保存方法相比, 玻璃化法以其设备简单、操作简便快捷、省时省力、适宜保存种类广泛、保存效果好和重复性强等优点倍受研究人员推崇, 是较为理想的植物种质资源保存方法 (Langis et al., 1990), 并且在复杂的组织和器官的超低温保存方面有较好的应用潜力, 是近十年来用于优良种质资源中长期保存的首选方法 (见表 1-1)。自 1968 年玻璃化法超低温保存亚麻悬浮细胞以来, 国内外已对 200 多种植物的茎尖分生组织、愈伤组织、悬浮细胞、花粉、种子、芽和幼苗等进行了超低温保存 (见表 1-2)。



表 1-1 常用植物超低温保存技术的优缺点对比一览表(Reed, 2001)

常用技术	优点	缺点
程序降温法	无需低温保护剂,可避免低温保护剂的伤害	需要特殊的设备(如程序降温仪),热带植物保存效果较差
玻璃化法	无需特殊设备,操作简单,恢复速度快	PVS对许多植物有一定的伤害,需要注意 PVS 的处理时间
包埋脱水法	无需特殊设备及低温保护剂,可避免低温保护剂的伤害	需要多次处理每个包埋材料,高浓度的蔗糖对许多植物有一定的伤害

表 1-2 部分植物玻璃化法超低温保存方法一览表

外植体	植物名	拉丁名	超低温保存 主要处理	存活 率/%	参考文献
	芦笋	<i>Asparagus officinalis</i>	PVS2, RF	90.0	Kohmura et al., 1992
	香石竹	<i>Dianthus caryophyllus</i>	PC, PVS2, RF	50.9	Fukai, 1992
	大蒜	<i>Allium sativum</i>	PC, PVS2, RF	100	Niwata, 1995
	茶树	<i>Camellia sinensis</i>	CA, PC, PVS2, RF	60.0	Kuranuki et al., 1995
	芋头	<i>Colocasia esculenta</i>	PC, OS, PVS2, RF	80.0	Takagi et al., 1997
茎尖	樱桃	<i>Cerasus pseudocerasus</i>	CA, PC, PVS2, RF	80.0	Niino et al., 1997
原球茎	苹果	<i>Malus domestica</i>	PC, PVS3, RF	60.0	吴永杰等, 1999
	菠萝	<i>Ananas comosus</i>	PC, OS, PVS2, RF	35.7	Thinh et al., 2000
	白杨	<i>Populus alba</i>	CA, PC, OS, PVS2, RF	60.0	Lambardi et al., 2000
	杏梅	<i>Prunus domestica</i>	PC, OS, PVS2, RF	57.0	De Carlo et al., 2000

(续表)

外植体	植物名	拉丁名	超低温保存 主要处理	存活 率/%	参考文献
	茄子	<i>Solanum melongena</i>	PC, EG+Sor+ BSA, RF	60.0	Golmirzaic et al., 2000
	甜菜	<i>Beta vulgaris</i>	PC, OS, PVS2, RF	100	Vandenbusscheet al., 2000
	柿	<i>Diospyros kaki</i>	PC, OS, PVS2, RF	89.0	Matsumoto et al., 2001
	葡萄	<i>Vitis vinifera</i>	PC, OS, PVS2, RF	80.0	Matsumoto et al., 2003
	番木瓜	<i>Carica Papaya</i>	PC, OS, PVS2, RF	53.7	曾继吾 等, 2004
	菊花	<i>Chrysanthemum</i>	PC, PVS2, RF	60.0	Halmagyi et al., 2004
	君迁子	<i>Diospyros lotus</i>	PC, OS, PVS2, RF	30.0	艾鹏飞 等, 2004
茎尖	欧洲白蜡	<i>Fraxinus excelsior</i>	PC, OS, PVS2, RF	73.0	Schoenweisset al., 2005
原球茎	猕猴桃	<i>Actinidia Lindl</i>	PC, OS, PVS2, RF	56.7	蔡祖国 等, 2006
	红花石蒜	<i>Lycoris radiata</i>	PC, OS, PVS2, RF	90.0	林田等, 2006
	香蕉	<i>Musa nana</i>	PC, OS, PVS2, RF	75.9	吴黎明 等, 2006
	桔梗	<i>Platycodon grandiflorus</i>	PC, OS, PVS2, RF	80.0	艾鹏飞 等, 2006
	月季	<i>Rosa chinensis</i>	PC, PVS2, RF	67.7	Halmagyi et al., 2006
	石楠	<i>Photinia serrulata</i>	OS, PVS2, RF	93.3	王越等, 2006
	扶芳藤	<i>Euonymus fortunei</i>	OS, PVS2, RF	74.3	王贞等, 2007
	百合	<i>Lilium brownii</i>	CA, PC, OS, PVS2, RF	93.0	林田等, 2008



(续表)

外植体	植物名	拉丁名	超低温保存 主要处理	存活 率/%	参考文献
茎尖	大花蕙兰	<i>Cymbidium hybridum</i>	PC, OS, PVS2, RF	37.9	刘佩佩, 2008
	大苞鞘	<i>Dendrobium</i>	CA, PC, OS,	46.6	吴元玲, 2011
原球茎	石斛	<i>wardianum</i>	PVS2, RF		
愈伤 组织	唐菖蒲	<i>Gladiolus hybridus</i>	PC, Me <sub>2</sub> SO+ Gly, TS	72.0	李全顺 等, 1989
	芦笋	<i>Asparagus officinalis</i>	OS, PVS3, RF	90.0	Nishizawa et al., 1993
	水稻	<i>Oryza sativa</i>	PC, OS, PVS2, RF	45.0	Huang et al., 1995
	香雪兰	<i>Freesia refracta</i>	Me <sub>2</sub> SO+Gly, RF	69.5	杨文等, 1999 Wuet
	芒果	<i>Mangifera indica</i>	PC, PVS3, RF	94.3	al., 2003
	欧洲栎	<i>Quercus robur</i>	PC, PVS2, RF	70.0	Martinez et al., 2003
	栓皮栎	<i>Quercus suber</i>	PC, PVS2, RF	93.0	Valladares et al., 2004
	银杏	<i>Ginkgo biloba</i>	PC, Me <sub>2</sub> SO+ Sor, TS	60.0	徐刚标 等, 2004
	龙眼	<i>Dimocarpus longan</i>	OS, PVS2, RF	58.8	郭玉琼, 2007
	荔枝	<i>Litchi chinensis</i>	CA, PC, OS, PVS2, RF	78.6	郭玉琼, 2007
	仙客来	<i>Cyclamen persicum</i>	PC, Me <sub>2</sub> SO+Sor+ Suc, RF	90.0	卞福花 等, 2008
	红松	<i>Pinus koraiensis</i>	PC, Me <sub>2</sub> SO+ Sor, TS	71.4	王高等, 2009
	红豆杉	<i>Taxus chinensis</i>	PC, Me <sub>2</sub> SO+ Sor, SF	52.3	叶芳等, 2001
	杏	<i>Armeniaca vulgaris</i>	CA, Me <sub>2</sub> SO+Sor+ Glu, RF	74.8	杨宇等, 2011