

单位代码	10475
学号	104753101157
分类号	Q37

河南大學

硕士学位论文

五叶草莓和带病毒凤梨草莓的超低温
保存及其遗传稳定性分析

学科、专业：生物遗传学
研究方向：植物表观遗传学
申请学位类别：理学硕士
申请人：朱文涛
指导教师：王子成 教授

二〇一三年六月

Cryopreservation of *F.pentapylla*.and Virus
-Infected *F. ananassa* and Genetic Stability
Analysis

A Dissertation Submitted to
the GraduateSchool of HenanUniversity
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Scienc

By

ZhuWentao

Supervisor: Prof. WangZicheng

June, 2013

关于学位论文独创声明和学术诚信承诺

本人向河南大学提出硕士学位申请。本人郑重声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下独立完成的，对所研究的课题有新的见解。据我所知，除文中特别加以说明、标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包括其他人为获得任何教育、科研机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同事对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

在此本人郑重承诺：所呈交的学位论文不存在舞弊作伪行为，文责自负。

学位申请人（学位论文作者）签名：朱文涛

2013年5月15日

关于学位论文著作权使用授权书

本人经河南大学审核批准授予硕士学位。作为学位论文的作者，本人完全了解并同意河南大学有关保留、使用学位论文的要求，即河南大学有权向国家图书馆、科研信息机构、数据收集机构和本校图书馆等提供学位论文（纸质文本和电子文本）以供公众检索、查阅。本人授权河南大学出于宣扬、展览学校学术发展和进行学术交流等目的，可以采取影印、缩印、扫描和拷贝等复制手段保存、汇编学位论文（纸质文本和电子文本）。

（涉及保密内容的学位论文在解密后适用本授权书）

学位获得者（学位论文作者）签名：朱文涛

2013年5月15日

学位论文指导教师签名：王成

2013年5月15日

摘要

超低温保存技术不仅能作为野生植物种质资源长期保存的有效方式,也能成为一种高效的脱毒技术——低温疗法。本文以野生资源五叶草莓为材料,研究了其最佳的超低温保存条件,然后分析了超低温保存后五叶草莓基因组 DNA 序列的稳定性以及基因组 DNA 甲基化的变化水平;同时以携带草莓轻型黄边病毒的全明星草莓为材料,研究了玻璃化法的低温疗法脱毒的最佳条件,探讨了低温疗法脱除草莓轻型黄边病毒的效率,分析了低温疗法后全明星草莓基因组 DNA 序列的稳定性以及基因组 DNA 甲基化的变化水平。主要研究成果如下:

1.探索五叶草莓组织培养茎尖离体玻璃化法超低温保存的最佳条件,比较后发现:草莓组织培养材料在 4 条件下低温炼苗 3 周,切取 2~3mm 的离体茎尖,在固体预处理培养基(0.4mol·L⁻¹蔗糖+MS+7g·L⁻¹琼脂,pH=5.8)中 4 处理 3 天,液体预培养液(0.4mol·L⁻¹蔗糖+2mol·L⁻¹甘油+MS,pH=5.8) 25 培养 30min,玻璃化保护溶液 PVS₂(0.4 mol·L⁻¹蔗糖+15% (w/v) DMSO+15% (w/v) 乙二醇+30% (w/v) 甘油+MS,pH=5.8) 0 处理 1h 时,能达到最佳条件使成活率达到 79.7%,且草莓再生植株直接分化成草莓植株。

2.研究携带草莓轻型黄边病毒的全明星草莓玻璃化超低温保存最佳条件,与五叶草莓的玻璃化法超低温条件比较发现:全明星草莓离体茎尖在在 4 条件下低温炼苗 4 周,固体预处理培养基处理 3 天,液体预处理培养液培养 30min,玻璃化保护溶液 PVS₂ 处理 1h 时能达到最佳条件,然而成活率只有 64.3%,植物材料不同玻璃化超低温保存程序会发生改变。利用常规 RT-PCR 技术检测低温疗法后的植株病毒后,草莓轻型黄边病毒的脱除率达到了 95%。

3.采用扩增片段长度多态性(AFLP)技术分析了超低温前后的五叶草莓和全明星草莓的基因组 DNA 序列,没有发现多态性差异条带。说明经过超低温之后的再生五叶草莓和全明星草莓植株基因组 DNA 序列没有发生改变,基因组 DNA 序列的稳定。

4 运用甲基敏感扩增多态性(MSAP)标记技术对超低温或者低温疗法前后的五叶草莓和全明星草莓的基因组 DNA 甲基化水平进行了研究。统计和分析了聚丙烯酰胺变性

凝胶电泳的多态性条带之后，发现超低温过程促使五叶草莓基因组 DNA 甲基化水平降低了 6.73% 且去甲基化水平变化率和甲基化水平变化率分别为 12.43%和 5.70% 同样，经过低温疗法脱毒之后的全明星草莓基因组 DNA 甲基化水平也出现了降低的状况，仅为 3.83%，且去甲基化水平变化率和甲基化水平变化率分别为 12.44%和 8.61%。

关键词：五叶草莓；凤梨草莓；超低温保存；低温疗法；遗传稳定性

ABSTRACT

Cryopreservation is not only considered to be the most effective way to long-term preservation of wild plant germplasm resources, but also a highly efficient virus-free technology, "Cryotherapy". In this paper, we studied the procedure of *Fragaria pentaphylla* and "All-Star" strawberry shoot tips vitrification cryopreservation, and "All-Star" strawberry materials were infected with the Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), we detected virus-free rate after Cryotherapy. Then, we detected the genome sequences DNA and analyzed the variation of DNA methylation level of samples between the treatment and the control.

The main results below:

1. The procedure of *Fragaria pentaphylla* shoot tips vitrification cryopreservation was exploratory studied. The results showed that: the shoot tips were cryoacclimatized at a low temperature (4 °C) for 3 weeks; pre-cultured in the Pretreatment of solid culture medium (0.4 mol L⁻¹ sucrose + 7 g L⁻¹ agar + MS, pH = 5.8) after 3 days; treated with liquid pretreatment medium (0.4 mol L⁻¹ sucrose + 2 mol L⁻¹ glycerin + MS, pH = 5.8) for 30 mins at room temperature and treated in PVS₂ (0.4 mol L⁻¹ sucrose + 15% (w/v) DMSO + 15% (w/v) ethylene glycol + 30% (w/v) glycerin + MS, pH = 5.8) at 0 °C for 60 mins, the survival rate was highest up to 79.7%. Regenerations differentiated normally.

2. Distinction of the best vitrification cryopreservation procedure between "All-Star" strawberry and *Fragaria pentaphylla* were found that: the shoot tips of "All-Star" strawberry were cryoacclimatized at a low temperature (4 °C) for 4 weeks; pre-cultured in the Pretreatment of solid culture medium after 3 days; treated with liquid pretreatment medium for 30 mins at room temperature and treated in PVS₂ at 0 °C for 60 mins, the survival rate was highest up to 64.3%, different plant material have different cryopreservation procedure. Then, SMYEV were detected by RT-PCR technology, we found that virus-free rate was highest up to 95%.

3. The technique of amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to analyze the genome sequences DNA of the treatments and controls, no variation of bands was found, which indicated

that there were no changes in the genomic DNA sequences of *Fragaria pentaphylla* and “All-Star” strawberry after cryopreservation.

4. The methyl-sensitive amplified polymorphism (MSAP) markers technology was used to analyze the variation of DNA methylation level of samples between the treatment and the control. The results indicated that DNA methylation states of treatment materials reduced compared with controls, DNA methylation state of *Fragaria pentaphylla* and “All-Star” strawberry were reduced 6.73% and 3.83%. Methylation and demethylation of *Fragaria pentaphylla* DNA were 5.70% and 12.43%, but, Methylation and demethylation of “All-Star” strawberry DNA were 8.61% and 12.44%.

KEY WORDS : *Fragaria pentaphylla*, *Fragaria ananassa* Cryopreservation ,Cryotherapy,Virus-free , Genetic Stability

缩略词表 (Abbreviations)

缩略符号	英文全称	中文含义
AFLP	Amplified fragment length polymorphism	扩增片段长度多态性
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸胺
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
CTAB	Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide	十六烷基三甲基溴化胺
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
TBE	Tris-HBO ₃ -EDTA buffer	Tris 及硼酸电泳缓冲液
LN	Liquid nitrogen	液氮
MSAP	Methylation sensitive amplified polymorphism	甲基化敏感扩增多态性
MS	Murashige and Skoog medium	MS 基本培养基
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphates	脱氧(核糖)核苷三磷酸混合物
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA	随机扩增多态性
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	限制性酶切片断长度多态性
Tris	Tri(Hydroxymethyl) aminomethane	三羟基氨基甲烷
PVS ₂	Plant Vitrification Solution	植物玻璃化溶液
SMYEV	Strawberry mild yellow edge virus	草莓轻型黄边病毒
Gly	Glycerol	丙三醇 (甘油)
SNP	single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
bp	base pair	碱基对

目录

摘要.....	I
ABSTRACT	III
缩略词表 (Abbreviations)	V
1 前言.....	1
1.1 概述.....	1
1.1.1 草莓属植物简介.....	1
1.1.2 凤梨草莓.....	1
1.1.3 五叶草莓简介.....	2
1.2 野生植物种质资源保存的重要意义.....	3
1.3 草莓脱毒的重要性.....	3
1.4 超低温保存技术.....	5
1.4.1 植物超低温保存技术的基础理论.....	5
1.4.2 超低温保存方法.....	6
1.4.3 低温疗法的原理和优点.....	7
1.5 病毒的 RT-PCR 检测技术.....	9
1.5.1 常规 RT-PCR 检测技术.....	9
1.5.2 一步 RT-PCR 检测技术.....	9
1.6 植物超低温保存之后遗传稳定性研究.....	9
1.6.1 表观性状的稳定性研究.....	10
1.6.2 基因组 DNA 序列的稳定性研究.....	11
1.6.3 基因组 DNA 甲基化水平的变化.....	11
1.7 基因稳定性研究的技术简介.....	12
1.7.1 AFLP 技术简介.....	12
1.7.2 MSAP 技术简介.....	13
1.8 本研究的目的是和内容.....	13
2. 材料和方法.....	15
2.1 材料、仪器以及药品.....	15
2.1.1 供试材料.....	15
2.1.2 仪器设备.....	15
2.1.3 生化试剂.....	15
2.2 超低温实验方法.....	16
2.2.1 组织培养体系的建立.....	16
2.2.2 超低温保存程序的探索研究.....	16
2.3 病毒检测方法.....	17
2.3.1 RNA 的提取.....	17
2.3.2 反转录反应.....	18
2.3.3 PCR 扩增.....	18

2.3.4 检测方法	19
2.4 基因组 DNA 检测	19
2.4.1 DNA 提取	19
2.4.2 AFLP 分析	20
3 五叶草莓超低温保存及遗传稳定性结果与分析	25
3.1 超低温保存结果与分析	25
3.1.1 低温锻炼对超低温保存后茎尖成活率的影响	25
3.1.2 固体预培养对超低温保存成活率的影响	25
3.1.3 液体处理培养基对超低温保存成活率的影响	26
3.1.4 PVS ₂ 处理对超低温保存成活率的影响	26
3.1.5 超低温保存时间对超低温保存成活率的影响	27
3.2 超低温前后的 AFLP 分析结果	28
3.3 超低温前后的 MSAP 分析结果	28
4 低温疗法脱除草莓病毒实验结果与分析	33
4.1 低温疗法过程的结果与分析	33
4.1.1 低温锻炼对低温疗法过程中茎尖成活率的影响	33
4.1.2 固体预培养对超低温保存成活率的影响	33
4.1.3 液体处理培养基对超低温保存成活率的影响	34
4.1.4 PVS ₂ 处理对超低温保存成活率的影响	34
4.1.5 超低温保存时间对超低温保存成活率的影响	35
4.2 病毒检测结果与分析	35
4.2.1 RNA 提取结果	36
4.2.2 常规 RT-PCR 检测结果与分析	36
4.3 低温疗法前后的 AFLP 分析结果	37
4.4 低温疗法前后的 MSAP 分析结果	38
5 讨论	43
5.1 对五叶草莓超低温保存结果的讨论	43
5.2 对低温疗法脱除草莓病毒结果的讨论	43
5.3 对材料基因序列的结果进行讨论	43
5.4 对材料基因甲基化变化的讨论	44
6 结论	45
参考文献	47
致谢	55

1 前言

1.1 概述

1.1.1 草莓属植物简介

草莓是多年生、常绿、矮小、草本植物，株高一般 5~40cm，羽状复叶，一般为三小叶，有一小部分是羽状五小叶，有很短或无的叶柄，有鞘状，且与叶柄基部合生的膜质托叶^[1]。它属于蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)植物，它的染色体基数为： $x=7$ 。自然界中，草莓属的植物存在智利草莓(*chiliensis*(L)Duch.)、弗州草莓(*virginiana* Duch.)及栽培种凤梨草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)等八倍体植物的($2n=8x=56$)，有森林草莓、五叶草莓(*Fragaria . pentaphylla* Lozinsk.)等二倍体植物($2n=2x=14$)，还存在东方草莓四倍体植物($2n=4x=28$)和麝香草莓六倍体植物($2n=6x=42$)等不同倍性的种，按这些倍性的差别可以将草莓属的植物分为四类^[2]。草莓属植物的近缘植物包括委陵菜属(*Potentilla*)和蛇莓属(*Duchesnea*)，染色体的基数 $x=7$ ，在植株形态上有比较明显的差别^[1]。

经过研究和探讨，草莓属植物约有 20 个种的说法得到大部分科学工作者的认可。草莓属植物几乎分布在欧洲和北美每个地方，然而在亚洲和南美分布相对比较分散，主要分布在中国、日本、前苏联的西伯利亚、伊朗、阿富汗、黑海沿岸各国以及南美的太平洋沿岸^[3]。

1.1.2 凤梨草莓

凤梨草莓(*Fragaria ananassa*Duch.)具有适应性强，结果快、成熟早、易繁殖、周期短、病虫害少、管理方便等特点，凤梨草莓浆果具有鲜红艳丽、营养丰富、风味极佳、芳香多汁、营养价值高、适合加工利用，经济价值较高等优点，受到了消费者和生产者的喜爱，被视为果中珍品^[4]。它是一种经济价值较高的多年生草本植物，栽培面积和产量仅次于葡萄的第二大浆果，它是由智利草莓和弗州草莓在偶然的情况下杂交而来^[4, 5]。我国于 1915 年开始栽培凤梨草莓，至今已有将近 100 年的历史。

在栽培种凤梨草莓的育种方面，美国的科学家们利用野生草莓与栽培种草莓回交的方法将野生草莓材料的抗寒性、抗虫性、抗病性、耐受性和日中性等性状优良特性遗传给栽培种草莓，从而培育出很多优良的栽培种草莓^[2, 6]。中国在改革开放之后也加强了草莓在品种改良以及新品种培育方面的工作^[7]。

全明星草莓也是一种栽培种的凤梨草莓，它是美国农业部和马里兰州联合培育的早熟多抗性草莓品种，它具有植株生长势强，抗逆性好、产量高、果形大，色泽鲜艳，果实坚韧，耐贮性好，营养价值高等特点^[8]。我国在 1985 年将其引进到国内，得到了广泛的推广和栽培。

1.1.3 五叶草莓简介

五叶草莓 (*Fragaria . pentaphylla* Lozinsk .) 在陕西俗称泡儿、栽秧泡、瓢泡儿，分布于四川、陕西、河南、青海、甘肃等地海拔 700 ~ 2 300m 的山坡草地。五叶草莓植株高 5 ~ 15cm，较矮小，具有靠下的两片叶比靠上的三出叶小很多的羽状五小叶，且中心小叶有一个小且短的柄，其他小叶均无柄^[9]。五叶草莓的叶片质地厚，具有倒卵、长椭圆等多种圆形形状。在五叶草莓的花序梗、叶柄及匍匐茎上都长有直立的绒毛。五叶草莓匍匐茎上均形成匍匐茎苗但第一节除外。该种的叶面低于花序，花朵只有 2—3 朵，数量较少，它的花两性，不等长的雄蕊 20 枚，花期 4 ~ 5 月，果期 5 ~ 6 月 $2n=2x=14$ ^[10]。

在国内外草莓品种改良以及新品种培育等工作中，往往以野生草莓作为亲本，因为它具有广泛的适应性和多种优良特性，尤其是在抗性方面更具有独特之处，可用来提高栽培种凤梨草莓品种抗病、抗虫和抗不良环境胁迫的能力^[2]。五叶草莓属于我国特有的一种野生草莓资源，它具有果实香味浓、抗病性强、抗寒等优点，是进行栽培种凤梨草莓改良的理想亲本^[1, 9, 10]。

在民间有一种偏方就是将五叶草莓整株的研磨成粉状，然后装这些粉末可以用来治疗胃癌、食道癌、大肠癌、肝癌及前列腺癌等身体脏器疾病，五叶草莓全粉在缓解及改善全身症状、提高患者生活质量、缩小瘤体等方面起到了很多令西医无法预料的效果^[11]。近年来国内也探讨了五叶草莓提取液对肿瘤的抑制作用及机制，发现五叶草莓提取液能有效抑制肿瘤的生长^[11-13]。

五叶草莓是一种重要的野生种植资源应该得到重视，目前国内外的研究报道中没有

建立一种有效的五叶草莓种植资源保存体系。

1.2 野生植物种质资源保存的重要意义

野生植物种质资源是指决定野生植物遗传特性，并将这些野生植物的优良遗传特性一代一代地进行传递的遗传物质资源的总称^[14-16]。野生植物种质资源是重要的自然资源，同时也是经济社会长远发展及人类社会赖以生存的战略资源。野生植物种质资源是遗传学、物种进化研究以及进行植物育种工作的物质基础，它是一种可再生资源，对人类的可持续发展具有非常重要的作用。近年来世界人口持续增长，环境以及生态的破坏，造成了野生种质资源的严重破坏，已经有大量的野生种质资源的丧失^[15, 17]。野生种质资源一旦丢失，其优良基因的资源很可能将一去不复返。目前，世界各国已经开始加强野生种植资源的保护和保存工作，我也开展了野生种植资源保护和保存的工作^[17, 18]。

野生植物种质资源是对栽培种植物品种改良、新品种培育及遗传工程的物质基础。这些野生种植资源都是长期自然选择形成的，具有独特的优良性状和抵御自然灾害的特性^[15]。这些丰富的野生种质资源不仅能为常规育种、杂交育种、辐射育种提供种植资源，而且能为基于细胞和基因工程的现代育种方式提供优良的基因资源。野生种质资源的开发利用对作物品种改良和新品种的开发能起到推动作用^[19]。近年来，随着生物学领域新技术、新方法在作于育种工作中的广泛应用，越来越多的野生种植遗传资源被利用到，这使得野生种植资源的潜在价值不断的增高。总之，只有掌握丰富的野生植物种质资源才能在作物以及植物品种改良以及新品种培育中取得领先的优势^[2, 10]。由此可见，加强针对野生植物种质资源保护和保存，对我国作物以及植物的配种培育工作具有重要和深远的意义。

因此，研究五叶草莓野生种植资源保存，对于我国落后的草莓品种改良以及新品种的培育具有深远的意义^[10]。

1.3 草莓脱毒的重要性

病毒病是危害植物生长发育的重要病症之一，它给农业工作者带来了巨大的损失，危害社会经济的发展^[20]。当植物被病毒感染之后，植物细胞的生长代谢活动就会受到巨大的影响，进而引发植物一些列的病理现象，不仅能造成植物质量以及产量的降低，更

严重的是能导致植物直接死亡甚至灭绝^[21]。植物病毒具有种类多，繁殖快，分布广，传播途径多，以及防治困难等特点，因此植物病毒也被称作植物“癌症”^[20, 22]。同时，随着自然环境的变化以及病毒变异的增强，病毒种类呈现日趋扩增的状态，其危害也随之增强。据进来的统计可知，植物病毒的危害每年为全世界所造成约 400 亿美元的经济损失。我国现在仍然是一个依靠农业自给自足的大国，随着植物病毒病危害的加重，不仅仅给我国农业工作者带来严重的经济的损失，也对我国粮食安全带来了巨大的压力。因此，加强对植物病毒的研究，通过一些技术手段脱除植物所带病毒是当前和今后一个重点和难点。

草莓苗的繁殖一直以来都是以匍匐茎埋压或者分株等为主，这些方式都属于营养繁殖的方式，利用这种方式能保持草莓品种的的优良性状，可以保障草莓的品质和质量等^[23]。同时，这种繁殖方式也导致了草莓病毒在植株体内的积累和传播，给广大草莓果农带来了严重的经济损失，促使草莓病毒的危害越来越严重的情况。据调查，目前在全世界的草莓生产区内利用各种检测手段检测出的菌原体、病毒病和类病毒病等病害已经达到 25 种以上，其中有 6~7 种是分布相对比较广泛、且危害也相对严重的^[24]。我国近年来也加强了草莓病毒的调查和检测，经过分析总结发现：在我主要受 4 种草莓病毒的危害，它们分别是草莓轻型黄边病毒、草莓镶脉病毒、草莓斑驳病毒和草莓皱缩病毒；我国生产上的所用的草莓植株感染病毒率已经达到了 80.2%，主要包括单种病毒侵的感染率 41.6%和两种及两种以上的病毒复合感染率 38.6%^[25]。这些都表明了在我国进行草莓脱毒育苗的重要性。

草莓轻型黄边病毒(Strawberry mild yellow edge virus, SMYEV) 属于马铃薯 X 病毒属，20 世纪 20 年代最早在美国加州被发现^[26]。草莓健康植株被 SMYEV 病毒感染之后，草莓植株表现为叶缘褪绿、小叶凹陷、植株长势衰退。轻型黄边病毒在全世界的草莓种植区都普遍发生，对我国草莓种植区的危害也十分严重。根据不同的草莓品种，单独感染上草莓轻型黄边病毒之后变现也不近相同，多数危害不是很严重。然而在研究中发现草莓植株基本很少被这种病毒单独感染，草莓轻型黄边病毒经常和草莓皱缩、镶脉、斑驳等病毒复合感染，对草莓植株造成更为严重的危害，使草莓果实的产量和质量大大降低，当草莓病毒复合感染草莓时对草莓的危害程度增加 75%以上。

目前草莓生产上脱除病毒的方法主要是采用茎尖培养脱毒的技术^[27]，这些技术具有

很多应用上的限制。由于茎尖培养时需在解剖镜下进行显微操作，相对效率低且病毒脱除率低。而采用花药培养进行病毒脱除，由于存在基因重组与分离等问题，所以其应用受到限制。

1.4 超低温保存技术

Nag 等^[28]在 1973 年将胡萝卜悬浮细胞系成功进行超低温保存保存之后，植物组织真正意义上的超低温保存得到认可。自此之后，植物组织超低温保存技术得到了深入的研究和探索，有超过 200 多种植物组织材料进行了超低温保存的研究^[29, 30]。在超低温保存的过程中，植物材料在超低温的环境下，植物细胞内的生理生化反应是几乎处于停滞状态，也即植物细胞是处在“生机停顿(Suspended animation)”的稳定状态，这样能使植物材料达到接近永久保存的目的，同时在超低温度环境下植物材料的遗传物质也应处于不变的状态下，达到保存种植资源的遗传性状不变和和保存目的^[29-31]。珍贵的野生植物种质资源能利用超低方式得到有效、安全地“永久”保存。在经济上，成熟的超低温保存技术比其它传统的植物种植保存技术具有很多优点：首先，超低温保存方法只需要一个液氮管能节省很多空间；其次，超低温保存方法在保存期间基本不需要人员进行频繁的操作，能节省大量的人力劳动和管理；再次超低温保存技术不需要复杂的设备；总之，超低温保存技术在经济上具有很大的优势^[32-34]。

1.4.1 植物超低温保存技术的基础理论

水是植物细胞内的主要物质，这些水分为自由水和结合水，自由水的结晶点比较高，结合水的结晶点比较低，在降温过程中，如果细胞内有大量的自由水，就会导致细胞内的产生有害的冰晶，从而导致细胞内的物质损伤进而导致植物细胞死亡，如果自由水过度脱除也会促使植物细胞内发生一些改变，进而破坏细胞内的功能蛋白、膜结构等的完整性，还会导致植物细胞内的 pH 值发生改变，造成植物细胞内有害物质增加，促使蛋白分子结构因形成二硫键而造成改变，进而也造成细胞死亡^[35]。因此植物细胞的超低温保存就需要在降温的过程中添加冷冻保护剂，这样随着温度降到零下 10 之后，细胞内外就会形成细胞内外的蒸汽压力差，能促使脱水的连续性大于降温的速率，进而达到脱除植物细胞内的水分，浓缩植物细胞内原生质体，降低植物细胞内冰点的目的，这项就

能对植物细胞形成保护性脱水的机制。

往往在超低温过程中需要添加的玻璃化保护溶液，而这种溶液玻璃化由一定比例的非渗透性和渗透性保护剂配置成的有机溶液，这种溶液在植物细胞周围或者渗透到细胞内部能将植物细胞固化成玻璃态，将细胞的水分玻璃化，从而避免植物细胞内形成冰晶，减少因温度降低而对植物细胞产生的伤害，进而到保护植物细胞的目的，从而提高超低的成活率^[36]。植物超低温保存技术中的各种处理程序的设定也是以添加玻璃化冷冻保护剂促使植物细胞内外水分形成玻璃化进而减少细胞内形成冰晶、控制降温冰冻速度等为中心展开的。植物超低温技术中的所有程序能促使植物细胞内水分减少或者促使细胞内的水分玻璃化，从而达到在超低的温度下保存植物细胞或者组织的目的。

1.4.2 超低温保存方法

(1)慢冻法

慢冻法是利用降温设备将温度以 $0.5-1.0 \text{ } \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度降温，是细胞内外形成蒸汽压差，从而促使脱水的连续性大于降温的速率，进而达到脱除植物细胞内的水分，浓缩植物细胞内原生质体，降低植物细胞内冰点的目的，这项就能对植物细胞形成保护性脱水的机制。慢冻法一般是现将温度从 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 降到 $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，接着将植物材料迅速或者连续性的缓慢地降低到 $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。慢冻法过程相对比较复杂，需要降温设备的辅助，因此在实际超低温试验中应用的较少。

(2)快冻法

快冻法能是将材料以大于 $40 \text{ } \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度将从 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 或其他温度降低到超低的温度。如果直接将植物材料投入液氮或其他超低温度的液态气相中，植物材料能实现 $300-1000 \text{ } \cdot \text{min}^{-1}$ 的降温速度，这样能材料的温度快速降到可以直接将细胞内的水玻璃化，从而避免形成冰晶，减少了慢冻法降温过程中细胞内冰晶危害细胞结构或者细胞内物质的目的；快冻法不需要降温设备的辅助，操作相对比较简单，但是只有已经高度脱水或者含水量比较低的植物材料比较适合。

(3)玻璃化法

这种方法在植物超低温保存中应用的相对比较广泛，玻璃化法是加入高浓度的冷冻保护液对材料进行预处理，使冷冻保护溶液即玻璃化保护溶液在 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰浴或 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温条

件下渗透到植物细胞内部或者周围，对植物细胞形成保护机制之后，再投入液氮中，这样植物材料就能和冷冻保护溶液即玻璃化保护溶液同时玻璃化^[37, 38]。玻璃化法超低温能是植物材料的成活率达到一个比较高的水平，同时这种方法也不需要降温设备的辅助，操作简单，而且在重复性上比其他方法相对要好，大部分植物材料都能适合^[32, 39-41]。不过由于冷冻保护液中的小分子等成分具有较强的毒害作用，对植物材料有一定的损伤，因此需要调节和控制其处理的时间和温度，从而降低有害物质的损伤，提高超低温保存的成活率。

(4)包埋-脱水法

这种方法是将植株材料包埋在海藻酸盐中，形成一层保护壳，然后可以利用各种无菌的方式对材料进行脱水，降低植物细胞内的水分，然后再对材料进行降温保存^[42]。这种方法的操作程度简单，而且在处理植物材料的数量上也比玻璃化法要多，不过由于该方法的成率比较低，且被保存的植物材料恢复生长的周期比较长，以及脱水时间的漫长，采用方法进行植物材料超低温保存的较少。该方法比较适合对植物愈伤组织或者茎尖进行超低温保存^[35]。

(5)包埋-玻璃化法

这种方法是在借鉴了包埋-脱水法的基础上，将玻璃化法的优点结合进去建立起来的综合的超低温方法^[43]。这种方法首先被成功应用在康乃馨茎尖离体分生组织的超低温保存上，之后包埋-玻璃化法也被应用在了马铃薯、百合、芥菜等植物材料的超低温实验中^[34, 44, 45]。包埋-玻璃化法用玻璃化保护溶液脱水保护处理替代了包埋-脱水法中的干燥过程，使被海藻酸盐包埋的植物材料能和玻璃化溶液一起玻璃化，从而有效的提高了植物材料超低温保存后的成活率。另外，包埋-玻璃化法还具有能较大批量进行植物材料超低温、以及操作过程中简便易行等的优点。然而该方法不能完全摆脱包埋-干燥法中被保存植物材料恢复生长周期比较长的短板。

1.4.3 低温疗法的原理和优点

低温疗法(Cryotherapy)脱毒^[46]其实就是超低温技术的筛选效应，杀死带病毒细胞保存不含病毒，是对植物材料传统茎尖脱毒的创新，它具有操作相对简便、脱毒率高以及

不需要复杂设备等优势。近年来这种全新的植物脱毒技术已经被成功应用在了多种植物的病毒脱除试验中。

(1) 低温疗法的原理

低温疗法是基于超低温保存(Cryopreservation)对细胞的选择性破坏作用的原理,结合组织培养和病毒检测技术达到脱毒的目的。在植物病毒生理学中,我们知道由于植物分生组织细胞的快速分裂能力,病毒不能完全感染到分生组织细胞中,从而造成了植物分生组织的细胞中一般是不含有病毒的。而且当植物细胞感染病毒后,病毒遗传信息将被导入到植物正常细胞,从而造成植物正常细胞发生分化,进一步的促使植物细胞内的液泡含水量增多,这就间接的将感染了病毒的植物组织细胞分为两类,一类是具有大液泡感染了病毒的成熟细胞,另一类就是没有液泡也未感染病毒的分生组织细胞。根据超低温保存的理论我们知道如果植物细胞内含水量高则更容易形成冰晶从而破坏细胞结构导致细胞死亡,因此在超低温的过程中含有病毒的成熟细胞容易被冻死,分生组织细胞因其体内含水量的水平较低,在经过脱水等处理后不容易形成冰晶,因此经过超低温处理后更容易成活,经过超低温处理之后成活的植物材料往往是不含病毒的。利用分辨率较高的光学显微镜也能观察到低温环境中含较大液泡的植物细胞更容易死亡,没有液泡或者还有较小液泡的分生组织细胞则更耐低温。以上就是植物低温疗法脱毒的基本原理。

(2) 低温疗法的优点

首先运用低温疗法的时间是1997年,它被Brison M等人^[47]运用到了李属根状茎的组织培养材料上,并成功将其根状茎上的李痘病毒脱除,并且病毒的脱除率达到50%,是当时剥离茎尖分生组织的方法脱除病毒率20%的两倍多。紧随其后,低温疗法被Helliot B.等^[48]人运用到黄香蕉条斑病毒(BSV)脱毒实验和瓜花叶病毒(CMV)脱毒实验中,并获得了成功并且病毒脱除率分别达到了90%和30%。低温疗法也被Wang Q.等^[49]人运用到葡萄A病毒(GVA)的脱除实验研究中,他们采用了包埋-玻璃化法进行了低温疗法程序并获得了成功,脱毒率更是到达了97%,远远高于剥离分生组织培养脱毒法12%的脱毒率^[50]。

综上所述,我们可以清晰的认识到低温疗法是一种高效的脱毒技术,能使植物病毒的脱除率达到一个很高的水平^[51, 52]。同时,在进行低温疗法脱除植物病毒的试验中,我

们不需要非常的技术，不需要在显微镜或者解剖镜等设备下进行长时间的无菌操作，另外运用低温疗法脱除病毒还能有效的避免传统剥离茎尖组织培养脱毒时，茎尖因长时间暴露在空气中造成的黑化问题等^[51, 53]。总之，低温疗法是一种新型高效的脱毒技术，其简单的操作以及非常高的脱除率必将使其成为植物病毒防治领域的新星。

1.5 病毒的 RT-PCR 检测技术

1.5.1 常规 RT-PCR 检测技术

RT-PCR 全称为 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction，翻译为反转录-聚合酶链式反应，它是一种体外 DNA 扩增技术。在利用 RT-PCR 检测技术检测病毒的时候，我们需要查出某种病毒的保守性序列设计出针对该病毒的特异性引物^[26]。植物病毒大多数都是 RNA 病毒，所以在进行病毒检测前，我们需要先将病毒的遗传信息的载体 RNA 反转录成 cDNA，之后才能在 cDNA 的基础上，利用针对病毒特异性引物进行病毒目的基因的 PCR 扩增，利用常规的琼脂糖凝胶电泳技术检测 PCR 扩增产物是否存在目的片段，如果在电泳出病毒保守序列上的特异性基因片段大小的条带，则说明植物材料还有该病毒，没有出现对应大小的条带或者没有条带，都能说明该植物是健康的。

1.5.2 一步 RT-PCR 检测技术

一步 RT-PCR 检测技术也是以 PCR 和反转录为基础的，不过是将反转录反应和 PCR 反应放在一个 PCR 管中，由一步代替分步，这样一步法不仅仅比常规 PCR 缩短了反应时间，而且在操作上更为简捷，也能提高检测效率，同时节省一部分药品和避免多次操作所带来的交叉污染^[54]。

1.5.3 多重 RT-PCR 检测技术

多重 RT-PCR (multiple-RT-PCR, m-RT-PCR) 也是以常规 RT-PCR 为基础的，不同的地方是反转录反应后加入多对不同病毒的特异性引物，可同时扩增出多种病毒的大小不同的目的基因片段，根据基因片段的大小来确定病毒的种类，这样不仅能提高了检测效率，也能降低成本^[55, 56]。

1.6 植物超低温保存之后遗传稳定性研究

超低温技术不论作为种植资源保存技术，还是用作低温疗法脱除植物病毒技术，最终目的都是希望保存植物分生组织细胞遗传信息的稳定性。虽然超低温技术是将植物材料保存在-196℃，细胞处于生机停顿状态，但是在对植物材料进行超低温保存之前，需要材料进行一系列的预处理，使材料达到充分的脱水以及被玻璃化保护溶液填充的状态，这些处理会给植物材料带来低温、渗透压、毒害等逆境胁迫^[57]，这些胁迫就会造成逆境选择效应，可能会导致植物材料恢复生长后产生一些生理生化或者遗传物质上的改变，进而导致植物材料发生一些可遗传或者不可遗传的变异。在1982年，Withers就曾提出超低温过程中的逆境选择效应会因为材料的不同从而对材料产生的选择效应也不同，从而打破某些材料或者某个材料的遗传稳定性^[58]。

近年来的一些研究也表明，超低温保存过程中逆境筛选效应能够促使植物材料的遗传稳定性发生改变，这些遗传稳定的改变主要集中在三个方面：一、表观性状的变化；二、材料基因组DNA序列的变异；三、材料基因组DNA甲基化位点以及水平的变化^[59]。

1.6.1 表观性状的稳定性研究

对于超低温过程引起再生材料改变的研究在上世纪90年代开始陆续有报道。Hitmi A等^[60]人在1997年发现超低温保存除虫菊的再生材料细胞活性以及除虫菊酯的合成能力发生了变化；何光存等人1998年^[61]在研究疣粒野生稻超低温保存时，发现其极难培养，且培养出愈伤组织没有再生能力，然而愈伤组织经过超低温保存之后，没有再生能力的愈伤组织居然具有再分化的能力，成为胚性愈伤组织；Moukadiri O等人在1999年研究水稻的超低温实验时发现，超低温保存成活的水稻株系更耐低温，且更容易实现基因枪法对其细胞的遗传转化。近年来，随着对超低温保存材料表观性状稳定性的研究的深入，也陆续发现其他材料经过超低温保存后表观形状发生变异，然而更多的材料经过超低温后却没有发生变化，这些例子很多，比如：2000年，张志华等人对水稻单倍体进行超低温研究时，就没有发现表观性状的变化；2004年，Scocchi等人对苦楝树进行超低温研究时也没有出现表观性状的变化；2005年，Rynnanen等人对白桦树进行超低温研究时也未出现表观性状的变化；2010年，Sisunandar等人对椰子胚细胞进行超低温研究后也没有出现表观性状的变异等。因此，大部分学者都认为超低温之后只有少数的材料表观性状变异，大多数材料不能够引起表观性状的变化。

1.6.2 基因组 DNA 序列的稳定性研究

将超低温技术应用到植物种植资源保存之后,学术界对超低温是否能引起材料基因组 DNA 序列变异的问题最为关注,也有很多学者对超低温保存成活的植物再生材料进行了基因组 DNA 序列的稳定性进行了分析,大部分的研究验证了超低温没有引起植物材料基因组 DNA 序列的变异。例如:在 2001 年,Turner 等^[62]对袋鼠花(*Anigozanthosviridis*)的再生材料进行了基因组 DNA 序列的研究,没有出现遗传变异情况;郝玉金等^[63]在 2001 年也对超低温保存后再生苹果单芽系的基因组(*Malus pumila* cv. 'M26')进行了检测,也没有发现基因组突变的情况;刘云国等^[39]2002 年的研究也发现超低温保存再生的苹果没有发生基因组 DNA 序列的变化;在 2004 年,Jokipii 等人^[64]欧洲山杨超低温保存后进行了基因组 DNA 序列稳定性分析没有发现突变;在 2010 年曲先等^[65]对马铃薯超低温试验,以及 2010 年 Rival 等^[66]对椰子超低温实验都进行了基因组 DNA 序列进行了检测,也没有出现变异。但也有少数人在某些材料的超低温保存中发现了基因组 DNA 的突变,例如:Aronen 等^[67]人在 1999 年用 RAPD 标记检测了冷杉超温保存后的基因组 DNA,出现了 16.8%的多态性差异条带;Urbanova 等^[68]人在 2006 年检测了超低温后的贯叶连翘再生植株基因组 DNA 的非编码序列出现了变化;Muller 等^[69]人在 2007 年超低温保存微藻后用 AFLP 技术检测时发现了多态性变异条带;Kaity 等在 2008^[70]和 2009^[71]年对木瓜超低温保存后,发现材料再生后基因组 DNA 序列变异,且处理过程的不同阶段发生的变异比例也不同,变异率在 1.5%~10.07%之间变动。

1.6.3 基因组 DNA 甲基化水平的变化

在真核生物基因组中 DNA 甲基化(DNA Methylation)是一种常见的 DNA 共价修饰方式,可以调节基因在转录水平上的表达^[72, 73]。DNA 甲基化的形成原理是:真核生物细胞内的 DNA 甲基转移酶(methyltransferase)将 SAM(S-腺苷甲硫氨酸)上的一个甲基转移到 DNA 碱基胞嘧啶上,从而形成了 DNA 甲基化^[74]。由于 DNA 甲基化的存在造成该位点的所在基因序列的转录和表达,去甲基化后该基因就可以继续转率和表达,以此形成一种基因转率和表达的调控机制。该机制在真核生物细胞中具有调节生长发育、维持基因组稳定等作用^[75-80]。DNA 甲基化涉及到基因组的稳定、X 染色体的失活、基因沉

默以及基因组印迹等生物学相关的现象，具有突变效应(mutagenic effect)、表观遗传效应(epigenetic effect)等生物学机理^[74]。DNA 甲基化作为一种表观遗传修饰方法是现代表观遗传学研究的主要热点内容之一。对植物的 DNA 甲基化研究表明，DNA 能调控植物细胞的活性，调节植物细胞的分化和发育，对维持植物的遗传稳定性有着非常重要的作用^[78, 80-84]。

越来越多的研究证据表明，植物材料经过超低温保存后，再生材料的基因组 DNA 甲基化会发生明显的变化。超低温保存过程以及超低温过程中使用试剂都会对植物材料细胞造成危害，这些会改变都可能会造成植物再生材料的基因组 DNA 甲基化发生改变。郝玉金等^[63]发现超低温保存后苹果再生植株的 DNA 甲基化水平有所降低，Kaity 等^[70, 71]在对超低温保存后木瓜 DNA 甲基化发生了不同程度的改变，Peredo 等^[85]研究发现低温保存后蛇麻草(*Humulus lupulus*)DNA 甲基化水平有所升高，何艳霞等发现超低温保存后的拟南芥 DNA 甲基化水平也发生了变化，Johnston 等^[86]研究发现虎耳草科酷栗属的植物超低温后 DNA 甲基化水平有所增加，陈芳等^[87]发现超低温保存后小麦 DNA 甲基化水平发生变化，曲先等^[65]在马铃薯超低温保存后也发现了 DNA 甲基化的变化，郭强梨等^[88]在留兰香的超低温研究中发现了 DNA 甲基化水平降低。因此检测和分析超低温后五叶草莓和全明星草莓超低温 DNA 甲基化水平的变化情况十分重要。

1.7 基因稳定性研究的技术简介

1.7.1 AFLP 技术简介

在 1993 年，荷兰科学家 Vos 等^[89]将 RFLP 技术与 PCR 相结合发明了一种更有效的 DNA 多态性检测的新技术即 AFLP 技术。AFLP 技术的基本原理为：首先用不同的限制性内切酶将全基因组 DNA 酶切成具有粘性末端的 DNA 片段，然后利用 DNA 连接酶将不同大小的 DNA 片段与设计的特异性双链人工接头连接，连接双链人工接头后的 DNA 片段就能成为 PCR 扩增反应的模板，接着在人工接头的基础上设计 PCR 扩增反应的预扩增引物进行 PCR 预扩增，由于预扩增产物的条带比较多，不容易进行条带统计和分析，因此接下来再以预扩增引物为基础添加 1~3 个核苷酸设计成选择性扩增引物对预扩增产物再进行选择性的 PCR 扩增，这样选择性扩增出的条带就比较少，更容易用聚丙

烯酰胺凝胶电泳分离出来且容易统计和分析条带，最后根据需要分析扩增出的多态性条带^[90-92]。在对 AFLP 技术的限制性内切选择时，应选择一个内切位点较少的稀切酶和一个内切位点较多的高频酶，这样能使酶切后的片段比较均匀。AFLP 技术分效率高、稳定性好、重复率高等的优势，是一种相对比较理想和有效的基因组 DNA 序列多态性分析技术^[92]。在做 AFLP 实验分析时，我们需要提高 DNA 的质量和纯度，这样能更好、更精确地进行分析。

AFLP 技术已经被广泛应用到植物材料基因组 DNA 序列的分析中，也被应用在植物材料超低温保存后基因组 DNA 序列的稳定性中，Turner 等^[62]人在 2001 年 AFLP 技术检测超低温保存后袋鼠花(*Anigozanthos viridis*)再生材料的基因组 DNA 序列的稳定性，发现再生材料基因组 DNA 序列没有发生变异；Muller 等^[69]人在 2007 年也是用 AFLP 技术检测了微藻经超低温保存后再生材料的基因组 DNA 序列的稳定性，凝胶电泳后发现了变异条带说明超低温诱导微藻的基因组 DNA 序列发生了变异；另外本实验室陈芳等^[87]、曲先等^[65]、郭强梨等^[88]也利用 AFLP 技术分析了超低温保存后拟南芥、小麦、马铃薯、留兰香的基因组 DNA 序列的稳定性。本研究也将利用 AFLP 技术分析超低温保存后五叶草莓以及低温疗法后全明星草莓再生材料的基因组 DNA 序列的稳定性。

1.7.2 MSAP 技术简介

MSAP 技术称为甲基敏感扩增多态性，是将 AFLP 技术中的高频内切酶用内切酶 *Hap* 和 *Msp* 来替换，因为 *Hap* 和 *Msp* 能识别 5'-CCGG-3' 位点且改位点胞嘧啶甲基化状况不同酶切的效果就不同，所以 MSAP 技术能用来检测 DNA 甲基化水平的变化情况^[93-95]。*Hap* 酶和 *Msp* 酶是一组同裂酶，但是他们对胞嘧啶的甲基化敏感程度不同，*Hap* 酶不能切割 5'-CCGG-3' 中对应位置的一对或两对均甲基化的序列，能够识别并切割没有甲基化或者单链发生了甲基化的序列。然而 *Msp* 酶对 5'-CCGG-3' 内部胞嘧啶的甲基化不敏感，只对外部胞嘧啶甲基化反应敏感。MSAP 技术不仅能被用来油菜^[96]、棉花^[97]、玫瑰^[98]、大蒜^[99]和水稻^[100]等物种的基因组 DNA 甲基化水平，也能用来研究超低温保存后苹果^[101]、木瓜、蛇麻草(*Humulus lupulus*)、拟南芥、小麦、马铃薯、留兰香等再生植株基因组 DNA 甲基化水平的的变异情况。

1.8 本研究的目的是和内容

超低温保存技术不仅是一种有效进行野生植物种质资源长期保存的方法，还能利用其低温条件下的筛选效应来有效脱除植物病毒。至今为止，已经有超过 200 种以上植物完成了超低温保存程序的探索，作为草莓育种中重要资源的五叶草莓还未进行超低温保存技术的研究，我将运用玻璃化法对五叶草莓进行超低温保存的研究，并 AFLP 技术和 MSAP 技术研究五叶草莓经过超低温保存后再生材料基因组 DNA 序列的稳定性以及甲基化状态的变化。我们将运用玻璃化超低温技术低温疗法脱除全明星草莓携带的轻型黄边病毒，同时研究低温疗法脱除草莓病毒后全明星草莓再生材料基因的稳定性。

本研究的具体内容有：

- (1) 研究五叶草莓茎尖和携带轻型黄边病毒的全明星草莓茎尖的玻璃化法超低温保存技术；探索五叶草莓和携带轻型黄边病毒的全明星草莓玻璃化法超低温保存最佳程序；
- (2) 利用常规 RT-PCR 技术手段对经过低温疗法后携带轻型黄边病毒的全明星草莓进行检测，并分析低温疗法脱除全明星草莓轻型黄边病毒的结果；
- (3) 运用分子标记 AFLP 技术分析超低温处理后五叶草莓和全明星草莓基因组 DNA 序列的稳定性；
- (4) 运用 MSAP 技术分析超低温处理后五叶草莓和全明星草莓再生材料基因组 DNA 甲基化状态的稳定性以及变化情况。

2. 材料和方法

2.1 材料、仪器以及药品

2.1.1 供试材料

五叶草莓(*F.pentapylla*)材料由河南大学植物种质资源及遗传实验室提供,该五叶草莓采自秦岭地区。

带病毒草莓材料由本实验室利用 RT-PCR 技术检测、筛选、培养的携带轻型黄边病毒的全明星草莓。

用作分子检测的材料均是取自超低温保存材料以及对照组继代天数一致的组培苗叶片。

2.1.2 仪器设备

组织培养以及超低温保存所需的仪器设备:2mL 冷冻管,液氮罐,恒温控光培养室,超净工作台,空调以及常规组织培养所用器材;电子分析天平;0.2mL、1.5mL 离心管;各种规格枪头等设备。

RNA 和 DNA 提取所需的仪器设备:研钵;水浴锅;高速冷冻离心机(德国 eppendorf 公司);PCR 仪(美国 MJ Research 公司生产);琼脂糖凝胶电泳系统;分光光度计;0.2mL、1.5mL 离心管;各种规格枪头等设备。

分子实验以及检测所需的仪器设备:PCR 仪(美国 MJ Research 公司生产);变性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统装置(Bio-Rad 公司);0.2mL、1.5mL 离心管;各种规格枪头等设备。

2.1.3 生化试剂

组织培养以及超低温所需的主要试剂:蔗糖;琼脂;甘油;乙二醇;二甲基亚砜(DMSO);液氮(LN);以及制备 MS 培养基所需试剂等。

DNA 提取所需的主要试剂:十六烷基三乙基溴化铵(CTAB);聚乙酸吡咯烷酮(PVP);

三羟基氨基甲烷(Tris)；乙二胺四乙酸(EDTA)；无水乙醇；氯仿等。

RNA 提取所需的主要试剂：异硫氰酸胍 (GT)；水饱和酚；氯仿等。

反转录所需的主要试剂：反转录酶；*Taq* 酶；随机引物以及特异性引物等。

AFLP 以及 MSAP 实验所需的试剂：引物和接头等。

琼脂糖凝胶所需的试剂：琼脂糖；溴化乙锭 (EB)；TAE 缓冲溶液等。

聚丙烯酰胺变形凝胶所需的试剂：聚丙烯酰胺；TMED；APS；TBE 缓冲溶液等。

2.2 超低温实验方法

2.2.1 组织培养体系的建立

自田间选取五叶草莓健壮的匍匐茎，取其顶端 1.5 ~ 3.0cm 长的顶芽，采用常规方法进行清洗和消毒，选用 MS+6-BA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为五叶草莓诱导培养基，MS+6-BA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为继代培养基，培养出大量的五叶草莓组培苗。

自田间选取带病毒草莓的匍匐茎和植株，匍匐茎取其顶端 1.5 ~ 3.0cm 长的顶芽，植株将叶片以及叶柄剪掉后去根，采用常规方法进行清洗和消毒，选用 MS+6-BA $1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为五叶草莓诱导培养基，MS+6-BA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为继代培养基，培养出大量的带病毒草莓组培苗。

2.2.2 超低温保存程序的探索研究

(1) 材料低温锻炼

将五叶草莓材料和带病毒草莓试管材料继代培养 25 d~30d 左右，然后整瓶的放入冰箱 4℃ 保鲜室内中进行低温锻炼，并低温锻炼的时间设置为 0、1、2、3、4 和 5 周，及时观察并记录五叶草莓材料和带病毒草莓试管材料生长以及变化情况。

(2) 材料预培养和预处理

将叶草莓材料和带病毒草莓材料低温锻炼后取出，在无菌操作台上用工具切取长 2~3 mm 的茎尖，将这些离体茎尖置于固体预培养培养基中 ($0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂+MS, pH=5.8)，室温培养为 0d、1d、2d、3d 和 4d；然后将低温预培养后的茎尖转入经过高温灭菌的冷冻管中，每管放入 20 个左右的材料茎尖，用无菌的 1mL 移液器加入液体预处理培养基 ($0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油+MS, pH=5.8)，在 20℃ 或者室

温条件下处理 0min、10min、20min、30min 和 40min。

(3)PVS₂ 装载

用无菌的 1mL 移液器吸出上述冷冻管中的液体预处理基,接着将 0℃ 预冷的玻璃化保护溶液 PVS₂ (0.4 mol·L⁻¹ 蔗糖+15% (w/v) DMSO+15% (w/v) 乙二醇+30% (w/v) 甘油+MS, pH=5.8) 加入冷冻管中,并将冷冻管置于 0℃ 冰水混合物中处理 0min、20min、40 min、60 min、100 min。在处理时间即将结束时,用移液器将冷冻管中的 PVS₂ 溶液吸出并迅速加满新鲜的 PVS₂ 保护液(注:必须加满,防止解冻时炸管),用纱布将冷冻管裹好系上棉绳(棉绳结应打在冷冻管的盖子上),然后迅速投入液氮中保存 1d、7d、14d。

(4) 化冻与恢复培养

将装有材料的冷冻管从液氮罐中迅速取出并投入温度为 40℃ 的水浴锅中,解冻 2-3 分钟,在无菌环境中将冷冻保护剂迅速吸出,迅速加入洗液(1.0 mol·L⁻¹ 蔗糖+MS, pH=5.8) 洗涤 3 次,累计 30min(第一次 5min,第二次 10min,第三次 15min)。用无菌的镊子将茎尖从冷冻管中取出放在无菌滤纸上,用镊子将滤纸折叠轻压吸去材料表面上的残液成分,然后将材料接种到恢复培养基上(1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1mg·L⁻¹ IBA+1.0 mg·L⁻¹ GA3+3% 蔗糖+0.7%琼脂+MS, pH=5.8),并将材料至于黑暗且温度为(24±1)℃ 的环境中,经黑暗处理 7d 后,方可转移到组培室(组培室光照为 12 h·d⁻¹,温度为(24±1)℃)恢复光照培养。观察材料变化情况并在 20 d 后统计材料超低温后的成活率。材料超低温保存成活率计算公式为:

$$\text{成活率} = \frac{\text{玻璃化超低温保存后成活的茎尖数}}{\text{超低温保存的总茎尖数}} \times 100\%$$

2.3 病毒检测方法

2.3.1 RNA 的提取

(1) 称取 0.05 ~ 0.1 g 新鲜草莓叶片材料,放入研钵,加入液氮反复研磨至颜色发白的粉末状。

(2) 将材料粉末移入灭菌的 1.5 mL 离心管,加入 0.6mL 异硫氰酸胍溶液,轻轻摇动离心管使混合均匀。

(3) 顺序加入 2 mol/L NaAc 0.05 mL、水饱和酚 0.3mL、氯仿 0.3mL,每次加入试

剂都需要将离心管盖紧，上下颠倒混匀，然后冰浴 15 min。

(4) 在 4℃ 的温度下，12000r/min 离心 15min，小心吸取上清（不要吸入中间层沉淀）将其转移到新的离心管中，加入等体积的异丙醇，混匀后置-20℃ 冰箱沉淀 1h。

(5) 在 4℃ 的温度下，12000r/min 离心 10min，弃上清，在沉淀中加入 0.6mL DEPC 水溶解。加入水饱和酚 0.3ml、氯仿 0.3mL，混匀，冰水混合物中静置 5~10min。

(6) 在 4℃ 的温度下，12000r/min 离心 10min，取上清，然后加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH=5.2) 和 2 倍体积冷藏的无水乙醇，-20℃ 放置 1h。

(7) 在 4℃ 的温度下，12000r/min 离心 10 min，弃上清，将沉淀 RNA 用预冷的用 DEPC 水配置的 75%乙醇洗涤 2 次。

(8) 将 RNA 沉淀在室温和无菌环境下干燥 2~5min。加 40 μL DEPC 水溶解，取 6μL 进行 RNA 电泳检测；其余 RNA 样品进行下一步反转录实验或者在-80℃ 条件下保存备用。

2.3.2 反转录反应

(1) 在冰浴的无 RNase 的离心管中加入如下反应成分：2ug 总 RNA、2μL 随机引物、补 RNase-free ddH₂O 至 14.5μL

(2) 70℃ 保温 5min 后迅速在冰上冷却 2min，简短离心收集反应液后加入以下各组分：4μL 5×M-MLV Buffer、1μL dNTPs、0.5μL RNasin、1μL M-MLV。

(3) 先将离心管置 25℃ 温浴 10min，再 42℃ 温浴 60min。

(4) 95℃ 加热 5min 终止反应，置冰上或者放入 4℃ 冰箱。

(5) 取 1μL 进行 PCR 反应。

2.3.3 PCR 扩增

在 PCR 反应中，向 20 μL 反应总体积中加入的模板可以为上述合成的 cDNA。利用轻型黄边病毒的特性序列设计的引物为：SMYEV-s:5'-GCCCTCGGCTCAACCTGT-3'、SMYEV-a:5'-GGCGGCGTGGACCTACTA-3'、Product length:490 bp。然后根据目的基因片段的大小及引物性质等特点，确定 PCR 反应体系中的各组分含量、退火温度、延伸时间等。优化后的反应体系和反应程序分别见表 2-1 和表 2-2 所示。

表 2-1 PCR 扩增反应体系
Table 2-1 Reaction system of amplification

反应试剂	反应体积 μL ()
Template	1
dNTP 混合物(各 5 mmol/L)	2
10 \times PCR Buffer	2
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
<i>Taq</i> 酶(5 U/ μL)	0.35
RNase-free dH ₂ O	12.65
总体积	20

表 2-2 PCR 扩增反应程序
Table 2-2 Reaction procedure of amplification

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
预变性	94	3 min	
变性	94	30 sec	
退火	55	30 sec	30
延伸	72	1 min	go to 2
延伸	72	10 min	

2.3.4 检测方法

配置 1.5%的琼脂糖凝胶,在恒压的条件下电泳 20min 后,观察电泳后的条带并分析检测结果.

2.4 基因组 DNA 检测

2.4.1 DNA 提取

使用 CTAB 法提取五叶草莓超低温前后和带病毒全明星草莓的叶片 DNA , 步骤如下:

- (1) 取 0.1g 左右的叶片放入研钵, 加入液氮预冷将其研磨至白色粉末, 将粉末转移到 1.5ml 离心管中, 加入 600 μL 已经添加 2%的巯基乙醇且 65 预热的 CTAB 溶液;
- (2) 将装有 CTAB 和样品的 EP 管放入 65 水浴, 约 1h;

(3) 冷却后, 加入 400 μ L 的氯仿/异戊醇 (24:1), 用力混匀或者震荡混匀 15min 以上, 10000r/min, 离心 15min;

(4) 吸上清, 尽量不要吸入中层的沉淀, 装入一新的 1.5mLEP 管, 加入 600 μ L 氯仿/异戊醇 (24:1), 充分混匀后就, 静置 2min;

(5) 10000/min 离心 15min, 吸上清, 转入新的离心管中, 如果仍有杂质可以重复步骤 4。在上清中加入 1/10 体积的 NaAc (3mol/L) 和 1mL 提前预冷的无水乙醇, 混匀后放在-20 中沉淀 1h 以上;

(6) 10000r/min 离心 10min 弃酒精留沉淀, 然后用 75%的乙醇洗涤 2-3 次, 倒置在吸水纸上晾干或者用仪器抽干;

(7) 加入 ddH₂O 或者 TAE 缓冲溶液 (50-100 μ L) 溶解;

(8) 取上述提取 DNA 原液 6 μ L 检测, 加入 EB 后点样在新配置的 1%琼脂糖凝胶上电泳 30 min (稳压 5 V/cm), 然后在紫外下观察主条带的亮度及性状, 主带明亮且无拖尾说明提取的 DNA 在纯度以及完整度上比较好 这样的 DNA 可用于后续实验或者-20 保存。

2.4.2 AFLP 分析

AFLP 实验的操作过程和方法在参照 Hao 等^[63]人和何艳霞等^[69]人的基础上, 改进之后实施的。

(1) 双酶切 对五叶草莓和全明星草莓的全基因组 DNA 用限制性内切酶 *EcoRI*/*MseI* 进行双酶切, 反应体系如表 2-3。然后将体系在 37 条件下温浴 4 h, 之后在 65 条件下保温 2.5 h 使内切酶失活。

表 2-3 AFLP 双酶切反应体系

Table 2-3 Components of double enzyme digestion system for AFLP

组分	体积(μ L)
10 倍反应缓冲液	2.0
<i>EcoR</i> (10 U/ μ L)	0.5
<i>Mse</i> (10 U/ μ L)	0.5
基因组 DNA(50ng/ μ L)	5.0
灭菌双蒸水	12.0

(2) 连接 将上一步酶切后的产物按照表 2-4 添加后, 在 25 的条件下温欲连接 2.5h 或者在室温条件下过夜连接。

表 2-4 AFLP 连接反应体系

Table 2-4 Components of ligation for AFLP

组分	体积 (μL)
连接缓冲液	4.0
<i>Mse</i> 接头(50 uMol/L)	1.0
<i>EcoR</i> 接头(5uMol/L)	1.0
灭菌双蒸水	13.6
T4 连接酶(3 U/μL)	0.4
总体积	20

(3) 预扩增反应：AFLP 预扩增反应程序为：94 30 s，56 1 min，72 1 min，共 20 个循环。然后将 PCR 扩增后的反应产物稀释 10 倍，用于选择性扩增。AFLP 预扩增的体系配置如表 2-5。

表 2-5 AFLP 预扩增反应体系

Table 2-5 Reaction system of pre-amplification

组分	体积 (μL)
连接模板 DNA	5.0
<i>Mse</i> (25 ng/μL)	2.0
<i>EcoR</i> (25 ng/μL)	2.0
MgCl ₂ (50 mmol/L)	0.6
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.08
dNTPs(2 mmol/L)	1.0
10 倍的反应缓冲液	2.0
灭菌双蒸水	7.32
总体积	20.0

(4) 选择性扩增：AFLP 选择性扩增反应选用表 2-8 中不同的引物组合来进行 PCR 反应。我们将采用“touch-down”策略进行选择扩增反应程序，具体设定程序为：94 30 s，65 1 min，72 1 min；从第 2 个循环开始至第 13 个循环之间，退火温度递减 0.7 / 循环；从第 14 个循环开始到第 36 个循环，退火温度为 56。选择性扩增的反应体系配置如表 2-6 所示。

表 2-6 AFLP 选择性扩增反应体系

Table 2-6 Reaction system of selection PCR amplification of AFLP

组分	体积 (μL)
稀释好的模板 DNA	2.0
<i>EcoR</i> 引物(10 ng/μL)	2.0
<i>Mse</i> 引物(50 ng/μL)	2.0
MgCl ₂ (50 mmol/L)	0.6
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.2
dNTPs (2 mmol/L)	2.0
10 倍的反应缓冲液	2.0
灭菌双蒸水	9.2
总体积	20

(5) 聚丙烯酰胺变性凝胶制备：

将用洗涤剂充分清洗干净带耳朵和不带耳朵的两块玻璃板，用纸巾蘸取 95%乙醇搽拭 2-3 次，充分晾干。

粘胶的玻璃板处理：在不带耳朵的玻璃板上加上 0.5%的亲合硅烷（5 μL 亲合硅烷，1 mL 95%乙醇，5 μL 冰醋酸）1 mL 用干净的纸巾涂布均匀，尽量先横向然后纵向交叉涂布均匀。

用胶带将两块玻璃板起来，灌入 65mL 聚丙烯酰胺变性凝胶(6%PAGE 母液、40 μL TEMED、400 μLAPS 溶液)。

在 25℃ 或者室温条件下凝固 3 h 以上后进行电泳。

(6)电泳

将上述制备的胶板揭掉胶带后，固定在电泳仪上，加入 1×TBE 缓冲液，在 80 W 恒功率条件下，预电泳 30 min 使凝胶预热。

加入 2/3 体积变性 buffer(0.005%二甲苯菁，98%的去离子甲酰胺和 0.005%溴酚蓝)在选择性扩增产物中，94℃ 变性 3 min，立即取出放在冰水混合中，冰浴 6 min 以上。

预电泳结束后，先关闭电源，然后将上样孔吹洗干净，在上样控中加入 8 μL 的上述样品。

在 55 W 恒功率条件下，电泳 2-2.5 h 后，关闭电源，停止电泳，然后将 TBE 缓冲液导出。

(7)银染

固定：将电泳完毕的凝胶板从电泳仪上拆下，用恰当的方式将玻璃板撬开（注意不要将带耳朵玻璃板的耳朵翘掉），将不带耳朵的玻璃板放入固定液中，轻轻晃动 10 min 以上，至溴酚蓝颜色消失。

染色：固定结束后迅速将胶板转移到染色液银染 10 min，并轻轻晃动。

漂洗与显色：染色结束后将胶板转入盛有去离子水或者双蒸水的容器中漂洗 10s~20 s，并迅速取出控水，在迅速的将胶板转移到盛有显色液的容器中显色 15-30 min(注意：从水中捞出后不能在空气中暴露的时间超多 10s 要迅速转入显色液中)。显色结束后，用清水将凝胶板冲洗 5-10 min，然后竖立放置控水并干燥。

银染过程中所用溶液配方如下：

固定液：蒸馏水 1790 mL+冰醋酸 10 mL+无水乙醇 200 mL

染色液：蒸馏水 1790 mL+冰醋酸 10 mL+无水乙醇 200 mL+4 g 硝酸银

漂洗液：2000 mL 蒸馏水

显色液：2000 mL 蒸馏水+6 mL 甲醛+40 g 氢氧化钠

2.4.3 MSAP 分析

本实验中所用的 MSAP 操作步骤是以 Cervera 等^[82]与杜亚琼等^[99, 102]等基础上加以改进实施的。我们将分步单酶切改进为分步双酶切，具体体系如表，反应温度为 37 温浴，时间为 4h，第二步连接、第三步预扩增以及第四步选择性扩增同 AFLP 操作。聚丙烯酰胺变性凝胶检测的操作也跟 AFLP 相同。

表 2-7MSAP 双酶切反应体系

Table 2-7 Components of double enzyme digestion system for MSAP

组分	体积(μ L)
10 倍反应缓冲液	2.0
<i>EcoR</i> (10 U/ μ L)	0.5
<i>Hap</i> (H)/ <i>Msp</i> (M) (10 U/ μ L)	0.5
基因组 DNA(50ng/ μ L)	5.0
灭菌双蒸水	12.0

表 2-8 接头和引物序列

Table 2-8 Sequences of adapters and primers

引物和接头 Adapters and Primers	序列 Sequences
接头 (adapters)	
<i>MseI</i> -adapterI	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
<i>MseI</i> -adapterII	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
<i>EcoRI</i> -adapterI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoRI</i> -adapterII	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
<i>Hap</i> - <i>MspI</i> -adapterI	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
<i>Hap</i> - <i>MspI</i> -adapterII	5'-TCATGATCCTGCTCG-3'
预扩引物 Preselective primers	
E-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
M-C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
<i>Hap</i> - <i>MspI</i>	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3'
选扩引物 Selective primers	
<i>EcoR</i> -AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>EcoR</i> -AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>EcoR</i> -ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
<i>EcoR</i> -ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
<i>EcoR</i> -AGG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
<i>EcoR</i> -ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
<i>Mse</i> -CAA	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'
<i>Mse</i> -CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
<i>Mse</i> -CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
<i>Mse</i> -CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
<i>Mse</i> -CCA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA-3'
<i>Hap</i> - <i>MspI</i> -TCCA	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCA-3'
<i>Hap</i> - <i>MspI</i> -TCAA	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGTCAA-3'

AFLP 及 MSAP 分子标记所用的接头、引物均由上海生工公司合成。

3 五叶草莓超低温保存及遗传稳定性结果与分析

3.1 超低温保存结果与分析

3.1.1 低温锻炼对超低温保存后茎尖成活率的影响

对五叶草莓低温锻炼时间不同，其超低温保存后成活率也会受到不同程度的影响，低温锻炼能明显影响保存后茎尖存活率。如图（3-1）所示锻炼 21d 时存活率为最高值 51.9%，随着锻炼时间的延长，成活率出现下降趋势。在低温锻炼期间观察发现经过 28d 后试管苗叶片逐渐变成黄褐色，保存后再生材料存活率也有所下降。

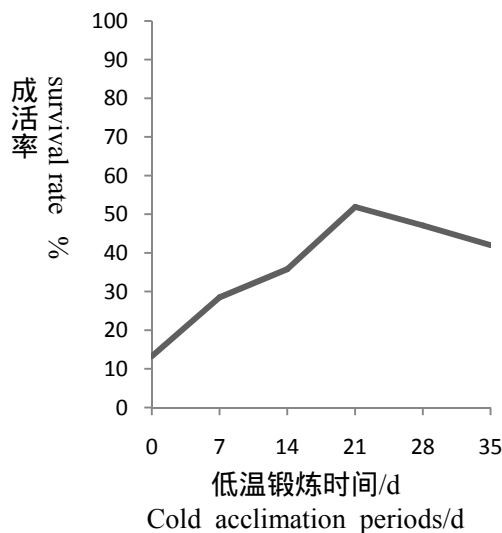


图 3-1 低温锻炼对超低温保存成活率的影响

Fig.3-1 The effect of cold acclimation periods on survival rate of cryopreserved

3.1.2 固体预培养对超低温保存成活率的影响

用固体预培养培养基对五叶草莓处理的时间不同，则超低温保存后成活率的影响也不同。固体预培养能明显影响保存后茎尖存活率，如图（3-2）所示固体预培养时间为 3d 时存活率为 61.5%。低温锻炼 3 周的苗在只改变固体预培养时间的条件下，其他条件限定在液体处理时间 20min，PVS₂ 处理时间 60min，超低温处理时间 1d，固体预培养为 3d。

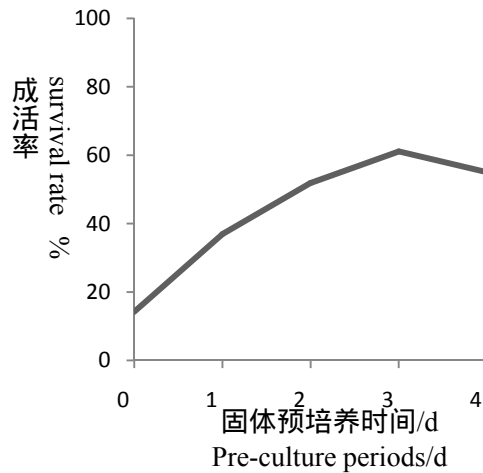


图 3-2 固体预培养对超低温保存成活率的影响

Fig.3-2 The effect of pre-culture periods on survival rate of cryopreserved

3.1.3 液体处理培养基对超低温保存成活率的影响

对五叶草莓液体进行不同时间的处理，则其超低温保存后成活率影响也不同，液体处理时间能明显影响保存后茎尖存活率。实验结果如图（3-3）所示：液体预处理随着时间的增加，成活率表现为先增加后减小的趋势，在处理 30min 时成活率最高，达到 79.7%。

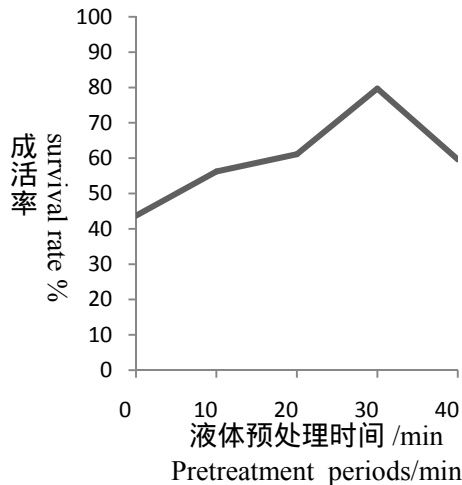


图 3-3 液体预处理对超低温保存成活率的影响

Fig.3-3 The effect of pretreatment periods on survival rate of cryopreserved

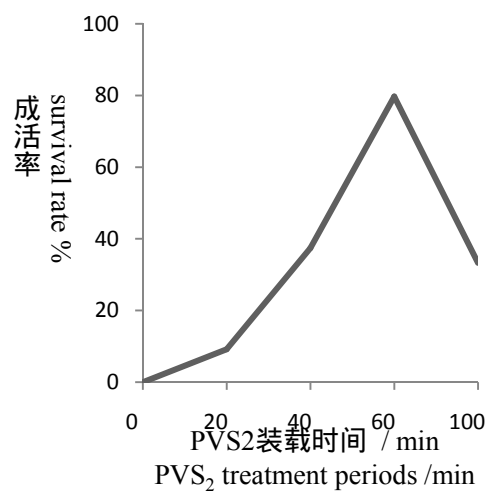
3.1.4 PVS₂ 处理对超低温保存成活率的影响

PVS₂ 处理对超低温保存五叶草莓的影响最大，只有充分的 PVS₂ 处理才能使五叶草莓在投入液氮后细胞玻璃化，减少冰晶对细胞的损害，从而提高成活率，然而由于 PVS₂

中有一些有害成分，如果处理时间过长也会对细胞造成损害，反而不利于提高成活率。对五叶草莓的超低温保存的实验(如图 3-4)也验证了这点：随着 PVS₂ 处理时间的长短的变化，五叶草莓成活率的变动幅度较大；在处理 60min 时五叶草莓成活率达到最高为 79.7%，这也验证了 PVS₂ 处理时间短超低温时不能完全玻璃化，造成五叶草莓分生组织受到损伤；随着 PVS₂ 处理时间继续增加，PVS₂ 对五叶草莓细胞的毒害作用增强，也导致了成活率的降低。

图 3-4 PVS₂ 处理对超低温保存成活率的影响

Fig.4 The effect of PVS₂ treatment periods on survival rate of cryopreserved



3.1.5 超低温保存时间对超低温保存成活率的影响

超低温保存时间对五叶草莓的成活率影响比较小，数据如图（3-5）所示：

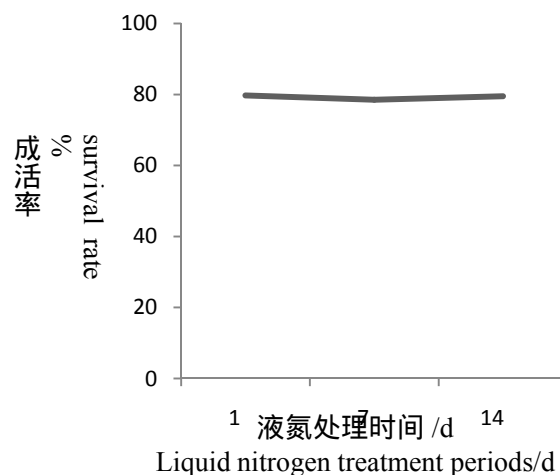


图 3-5 液氮处理对超低温保存成活率的影响

Fig.3-5 The effect of liquid nitrogen treatment periods on survival rate of cryopreserved

3.2 超低温前后的 AFLP 分析结果

应用 AFLP 技术对超低温保存前后的五叶草莓材料进行检测分析，如果样品遗传特性发生改变，则酶切片段的数目及长短将会发生变化，扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离就会显示其多态性，14 对引物共扩增出可统计条带 526 条，部分条带如图 3-6 所示，在超低温保存前后的五叶草莓材料之间没有出现多态性位点。说明对照与超低温处理样品之间基因组序列保持一致，没有发生该方法可以检测到的遗传变异。

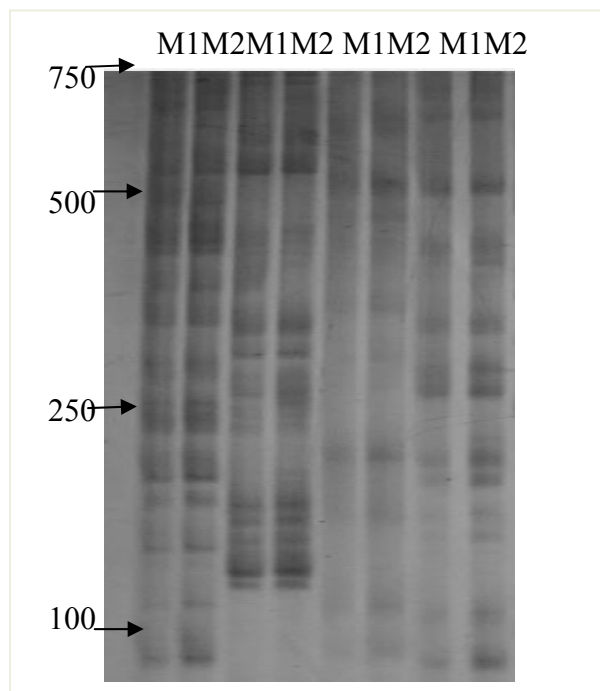


图 3-6 五叶草莓超低温前后基因组的 AFLP 扩增结果

Fig 3-6 Profiles of AFLP in *Fragaria pentaplylla* between control and cryopreservation treatment

注：M1 泳道为对照 AFLP 的带型，M2 泳道为处理后的 AFLP 带型

Note：Lane M1 is AFLP patterns of control, while Lane M2 is AFLP patterns of treatment.

3.3 超低温前后的 MSAP 分析结果

根据 MSAP 原理可知，均能识别并切割 5'-CCGG-3' 序列的 *Hap* 酶和 *Msp* 酶是一组同裂酶，但是他们对胞嘧啶的甲基化敏感程度不同，*Hap* 酶不能切割 5'-CCGG-3' 中对应位置的一对或两对均甲基化的序列，能够识别并切割没有甲基化或者单链发生了甲基化的序列。然而 *Msp* 酶对 5'-CCGG-3' 内部胞嘧啶的甲基化不敏感，只对外部胞嘧啶甲基化反应敏感。因此，五叶草莓材料超低温处理和后对照材料提取的 DNA 经 *Hap* /*EcoR* (H) 和 *Msp* /*EcoR* (M) 酶切之后形成的片段的甲基化类型就会有 4 种，其中

只有 3 种片段的甲基化类型能通过聚丙烯酰胺凝胶电泳被检测出来。其中，一种类型是 CCGG 位点没有出现甲基化(类型 I),另一种是 CCGG 位点的出现了半甲基化变化(类型 II)还有一种是 CCGG 位点出现了全甲基化变化(类型 III)。我们利用表 2-7 中 MSAP 的选扩引物组合对超低温保存成活的五叶草莓和对照材料的基因组进行 MSAP 分析 ,检测五叶草莓经过超低温和不经处理之间的基因组 DNA 甲基化差异。由表 3 -1 可知，经超低温处理后五叶草莓全基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平降低，且半甲基化率高于完全甲基化率。

表 3-1 超低温保存对五叶草莓基因组 DNA 甲基化水平的影响

Table 3-1 Effects of cryopreservation on the levels of genomic DNA methylation in *Fragaria pentaplylla*

对比 Comparison n	甲基化扩增类型 Types of amplified bands						总扩增 带数 Tatol amplified bands	总甲基化 带数 Tatol methylated bands	总甲基化 比率% Tatol methylated bands ratio %
	未甲基化的 CCGG 位点 The CCGG loci of non-methylated		甲基化的 CCGG 位点 The CCGG loci of methylated						
	类型 I Type I	比率% Ratio %	半甲基化位点 Half methylated loci		完全甲基化位 点 Fully methylated loci				
			类型 II TypeII I	比率% Ratio %	类型 III TypeIII I	比率% Ratio %			
CK Controls 处理 Treatments	232	62.27	108	29.03	32	8.60	372	140	37.63
	242	64.19	106	28.12	29	7.69	377	135	35.81

注：总扩增带数= I + II + III；总甲基化带数=II +III；完全甲基化比率=类型 III/总扩增带数；半甲基化比率=类型 II/总扩增带数；甲基化带比率=总甲基化带数/总扩增带数。

Note: Tatol amplified bands=I+II+III ; Tatol methylated bands=II+III;Fully methylated bands ratio=TypeIII/ Tatol amplified bands; Half methylated bands ratio=TypeII/ Tatol amplified bands; Tatol methylated bands ratio= Tatol methylated bands/ Tatol amplified bands.

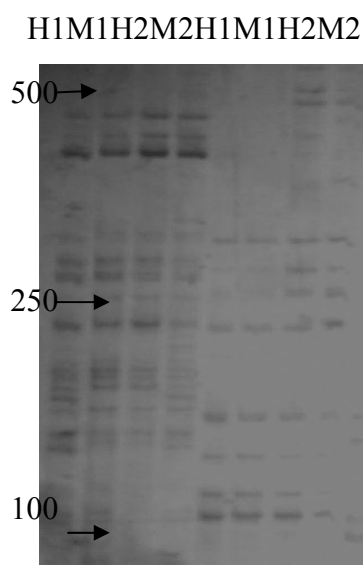


图 3-7 超低温处理与对照之间五叶草莓基因组的甲基化敏感性扩增结果

Fig 3-7. Profiles of MSAP in *Fragaria pentaplylla* between control and cryopreservation treatment

注：H 为 HpaII / EcoRI 酶切，M 为 MspI / EcoRI 酶切 H1 和 M1 泳道为对照材料 MSAP 带型，H2 和 M2 泳道为处理材料 MSAP 带型

Note :H represent digestion with HpaII / EcoRI , M represent digestion with MspI / EcoRI. Lanes H1 and M1 are MSAP patterns of control , while Lanes H2 and M2 are those of treatment

本实验一共利用 12 种不同引物组合对五叶草莓超低温保存前后的 DNA 双酶切产物进行选择性的扩增，参考李雪林等^[97]和杜亚琼等^[103, 104]的方法对扩增结果进行分析，发现扩增结果共出现 12 种带型(如表 3-2)，这些带型又分为多态性带和单态性带 2 种。多态性又有 3 种状态即甲基化(A 型带)、去甲基化(B 型带)以及不定类型(C 型带)，表明五叶草莓基因组 DNA 的 CCGG 位点甲基化状态在超低温处理之后发生不同的改变。A 型中的 A1 和 A2 为重新甲基化(对照 H 和 M 泳道均有带，而处理仅 H 或 M 泳道有带)，A3 和 A4 为超甲基化(对照仅 H 或 M 有一条带，而处理 H 和 M 泳道均无带)，所有的 A 型带都说明超低温保存之后五叶草莓基因组 DNA 的甲基化水平出现了增加；B1、B2、B3 和 B4 为 B 型带，它是 DNA 胞嘧啶去甲基化的表现，B 型带证明了五叶草莓基因组 DNA 经过超低温保存后出现了去甲基化的现象；出现的 C 型带无法确定五叶草莓基因组 DNA 在超低温后发生了甲基化还是去甲基化，因此被称为不定类型带；D 型带为单态性它是凝胶检测中两种酶切产物的相同带型，也是最多的带型，说明超低温后五叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点的甲基化状态没发生改变，在 D 型带中 D1 型带表示 CCGG 位点没有发生甲基化，D2 型带和 D3 带表示的是 CCGG 位点在超低温前后都是半甲基

化。五叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点甲基化带型具体情况，从表 3-2 中可以看出。

我们分析了超低温前后五叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点发生甲基化(A 型带)位点数为 11 ,占五叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点总数的 5.70% ,具体计算在表 3-3 中；超低温前后五叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点发生去甲基化(B 型)位点数为 24 ,占五叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点总数的 12.43% ,具体计算在表 3-3 中。超低温前后叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点的总甲基化多态性比例为 19.17% ,超低温前后叶草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点的甲基化状态未发生改变的比率即 D 型带的比例为 80.83% ,具体计算在表 3-3 中。

由此推测出，五叶草莓基因组 DNA 的甲基化水平在超低温保存前后发生了改变，甲基化水平出现了降低的状况。

表 3-2:超低温保存与对照的甲基化状态
Table 3-2: Patterns of DNA methylation in cryopreservation and controls

酶切				甲基化状态变化		对照与处理的差异 Diversity between the controls and the treatments	带型 Band pattern
Digestion		Changes of methylation status		处理前	处理后		
H	M	H	M	Before treatment	After treatment		
1	1	0	1	CCGG GGCC	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	2	A1
1	1	1	0	CCGG GGCC	<u>CCGGCCGG</u> <u>GGCCGGCC</u>	3	A2
0	1	0	0	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	5	A3
1	0	0	0	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> <u>GGCC</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	1	A4
0	1	1	1	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	CCGG GGCC	9	B1
1	0	1	1	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> <u>GGCC</u> <u>GGCC</u>	8	B2
0	0	0	1	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	2	B3
0	0	1	1	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	CCGG GGCC	5	B4
0	1	1	0	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> <u>GGCC</u> <u>GGCC</u>	2	C
1	1	1	1	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	CCGG GGCC	141	D1
1	0	1	0	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> <u>GGCC</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>CCGG</u> <u>GGCC</u> <u>GGCC</u>	6	D2
0	1	0	1	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	9	D3

注：H 代表 HpaII/EcoRI；M 代表 MspI/EcoRI 酶切；C 和 CC 表示甲基化的胞嘧啶；1:有带；0:无带。

Note: H represent digestion with HpaII / EcoRI; M represent digestion with MspI / EcoRI; C and CC represent methylated;

表 3-3 超低温保存对五叶草莓基因组 DNA 甲基化状态的影响

Table 3-3 Effects of cryopreservation on the Patterns of genomic DNA methylation in *Fragaria pentapylla*

对比 Compari- son	甲基化 带 Methyla- ted bands	总甲基化多态性带型 Tatol polymorphism bands								单态性带型 Monomorphi sm bands	
		A 型 Type A	比率 Ratio %	B 型 Type B	比率 Ratio %	C 型 Type C	比率 Ratio %	多态性带 Polymorp- hism bands	比率 Ratio %	D 型 Type D	比率 Ratio %
CK - 处 理 Controls and treatmen- ts	193	11	5.70	24	12.43	2	1.04	37	19.17	156	80.83

注：甲基化带数= A + B + C + D；多态性带数= A+B+C；多态性比率=A+B + C/甲基化带数；单态性比率=类型 D/甲基化带。

Note:Methylated bands= A + B + C + D; Polymorphism bands= A+B+C; Tatol polymorphism bands ratio= A+B + C/ Methylated Bands; Monomorphism bands ratio= TypeD/ Methylated Bands .

4 低温疗法脱除草莓病毒实验结果与分析

4.1 低温疗法过程的结果与分析

4.1.1 低温锻炼对低温疗法过程中茎尖成活率的影响

对带病毒的全明星草莓低温锻炼时间不同，其经过低温疗法过程保存后成活率也会受到不同程度的影响，低温锻炼能明显影响保存后茎尖存活率。如图 4-1 所示锻炼 28d 时存活率为最高值 47.1%，随着锻炼时间的延长，成活率出现下降趋势。在低温锻炼期间观察发现经过 35d 后试管苗叶片逐渐变成黄褐色，材料的活性下降将严重影响材料超低温保存后的成活率。

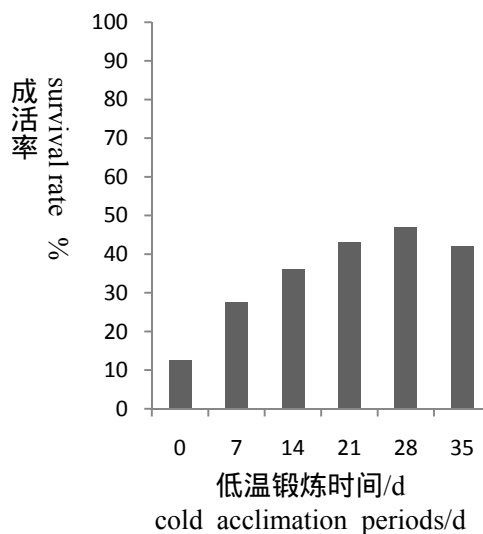


图 4-1 低温锻炼对低温疗法存活率的影响

Fig.4-1 The effect of cold acclimation periods on survival rate of Cryotherapy

4.1.2 固体预培养对超低温保存成活率的影响

用固体预培养培养基对带病毒的全明星草莓处理的时间不同，则超低温保存后成活率的影响也不同。固体预培养能明显影响保存后茎尖存活率，如图 4-2 所示固体预培养时间为 3d 时存活率为 51.1%。低温锻炼 3 周的苗在只改变固体预培养时间的条件下，其他条件限定在液体处理时间 20min，PVS₂ 处理时间 60min，超低温处理时间 1d，固体

预培养为 3d。

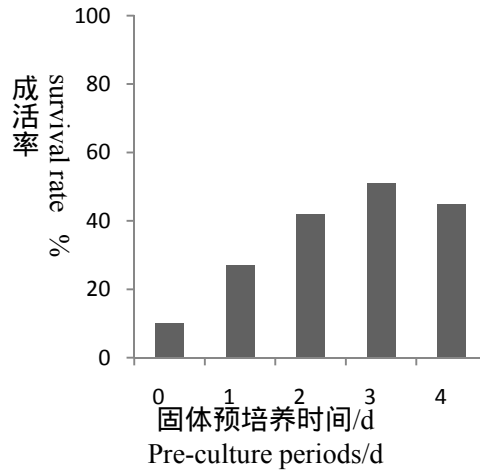


图 4-2 固体预培养对低温疗法成活率的影响

Fig.4-2 The effect of pre-culture periods on survival rate of Cryotherapy

4.1.3 液体处理培养基对超低温保存成活率的影响

液体预处理培养基对带病毒的全明星草莓进行不同时间的处理，则其超低温保存后成活率影响也不同，液体处理时间能明显影响保存后茎尖存活率。实验结果如图 4-3 所示：液体预处理随着时间的增加，成活率表现为先增加后减小的趋势，在处理 30 分钟时成活率最高，达到 64.3%。

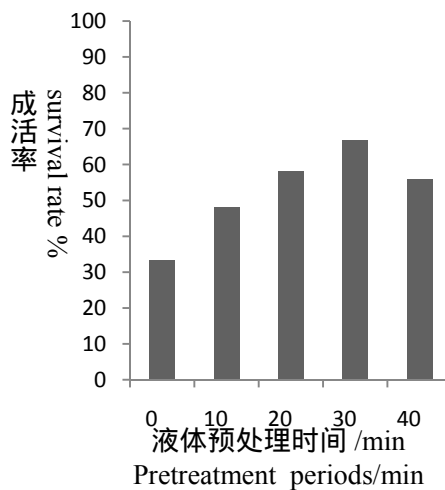


图 4-3. 液体预处理对低温疗法成活率的影响

Fig.4-3 The effect of pretreatment periods on survival rate of Cryotherapy

4.1.4 PVS₂ 处理对超低温保存成活率的影响

PVS₂ 处理时间的长短对全明星草莓的影响与 PVS₂ 对五叶草莓以及其他材料的影响

相似：处理时间太短，不能使 PVS₂ 充分保护细胞组织造成冰害，处理时间过长也会对细胞造成毒害。从实验结果(如图 4-4)可以看出：随着 PVS₂ 处理时间增长到 60min 时，全明星草莓成活率快速提高到最高 64.5%，超过 60min 后，成活率迅速下降。

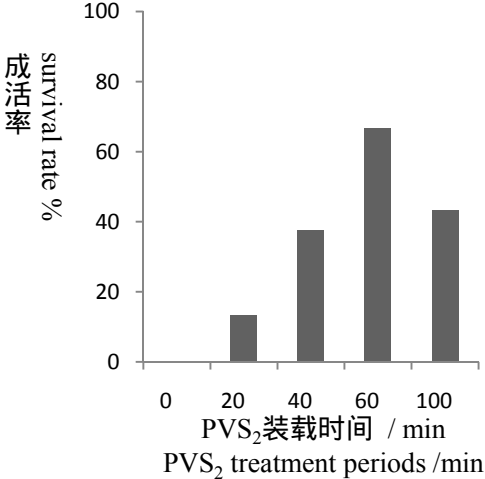


图 4-4 PVS₂ 处理对超低温保存成活率的影响

Fig.4-4 The effect of PVS₂ treatment periods on survival rate of Cryotherapy

4.1.5 超低温保存时间对超低温保存成活率的影响

根据理论以及对五叶草莓的超低温保存结果表明超低温保存时间对材料的成活率影响较小，在带病毒全明星草莓的超低温保存实验中也验证了这点，数据如图 4-5 所示：

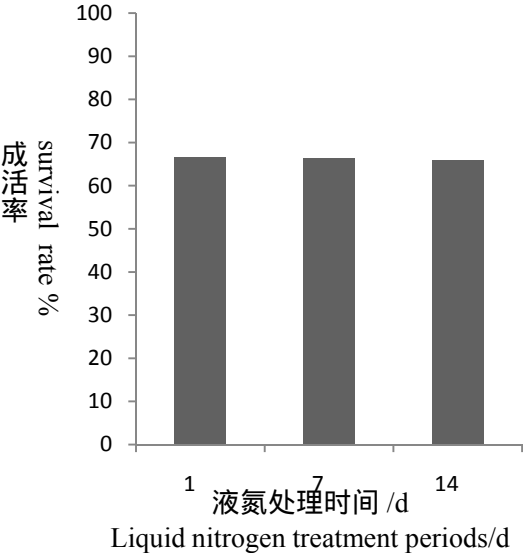


图 4-5 液氮处理对超低温保存成活率的影响

Fig.4-5 The effect of liquid nitrogen treatment periods on survival rate of Cryotherapy

4.2 病毒检测结果与分析

4.2.1 RNA 提取结果

通过异硫氰酸胍 RNA 提取方法提取带病毒全明星总 RNA，利用 1% 普通琼脂糖凝胶电泳对获得的总 RNA 的完整性进行检测，检测的部分材料 RNA 检测结果如图 4-6 所示，从电泳图中可以看出提取出的草莓总 RNA 的 28S、18S 和 5S 条带的条带齐全且比较清晰，说明异硫氰能有效的提取全明星草莓的总 RNA。

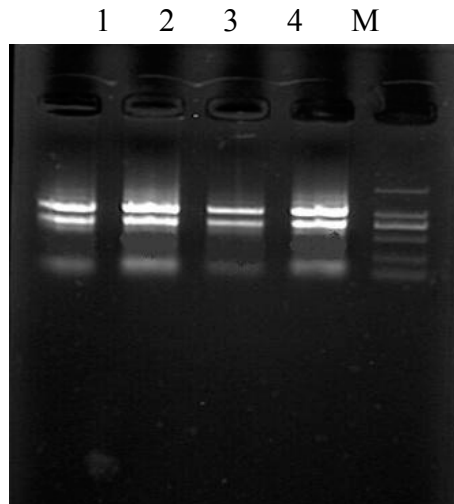


图 4-6 总 RNA 提取琼脂糖检测结果

Fig 4-6 Total RNA test results of "All-Star" strawberry

4.2.2 常规 RT-PCR 检测结果与分析

采用常规 RT-PCR 检测技术，对带病毒的全明星草莓组培材料和超低温保存成活的材料分别进行了轻型黄边病毒的检测，检测结果见图 4-7 和图 4-8。由图 4-7 可见，带毒的全明星草莓田间材料和组培材料分别扩增出了与预期病毒基因片段大小的靶带，而超低温之后的材料，大部分未扩增出目的基因片段如图 4-8 所示。实验表明，低温疗法能有效的脱除全明星草莓体内的轻型黄边病毒。检测再生全明星草莓的轻型黄边病毒时，发现个别再生植株仍含有病毒如图 4-8 所示，分析超低温过程后发现该株系进行超低温时切的茎尖比较大，说明茎尖大小对低温疗法脱毒也有影响。综合分析计算了低温疗法的病毒脱除率，达到了 95% 以上。

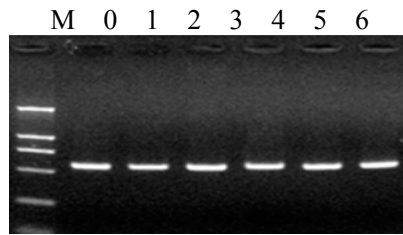


图 4-7 部分含 SMYEV 病毒全明星草莓 RT-PCR 检测结果

Fig 4-7 Virus detection results of segmental “All-Star” strawberry before Cryotherapy treatment

注：M 是 DL2000，1~6 是部分含有病毒材料的检测结果

Note: Lane M is the maker of DL2000, lane 1~6 is segmental Virus detection results

M 12 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

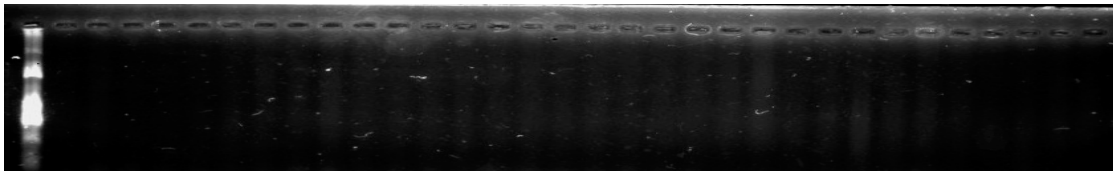


图 4-8:部分低温疗法处理后全明星 RT-PCR 检测结果

Fig 4-8 Virus detection results of segmental “All-Star” strawberry after Cryotherapy treatment

注：M 是 DL2000，条带 1~32 为经过低温疗法材料没有病毒，33 表示个别再生植株仍含有病毒

Note : Lane M is the maker of DL2000, Lane 1~32 prove material virus-free after Cryotherapy, Lane 33 prove material infected virus

4.3 低温疗法前后的 AFLP 分析结果

应用 AFLP 技术对低温疗法保存前后的带病毒全明星草莓材料进行检测分析，如果样品遗传特性发生改变，则酶切片段的数目及长短将会发生变化，扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离就会显示其多态性，8 对引物共扩增出可统计条带 384 条，部分条带如图 4-9 所示，经过低温疗法的全明星草莓与对照材料之间没有出现多态性差异条带。说明对照与低温疗法处理样品之间基因组序列保持一致，没有发生该方法可以检测到的遗传变异。

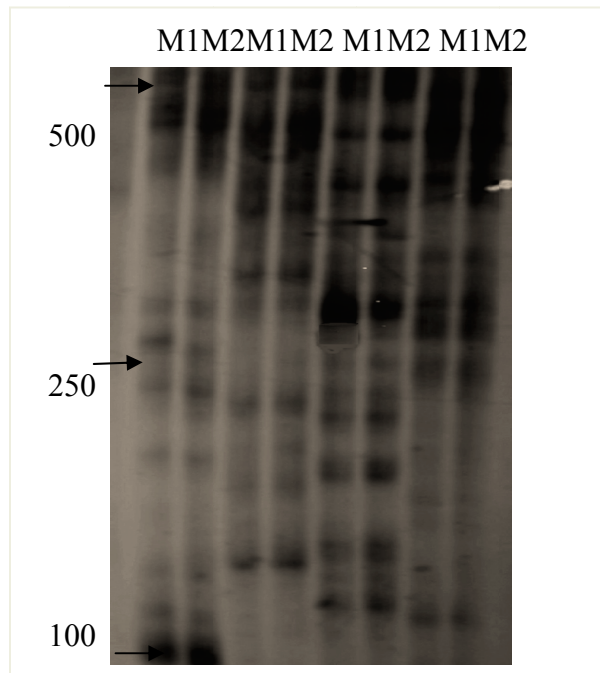


图 4-9 低温疗法处理前后基因组的 AFLP 扩增结果

Fig 4-9 Profiles of AFLP between control and Cryotherapy treatment

注：M1 泳道为对照 AFLP 的带型，M2 泳道为处理后的 AFLP 带型

Note: Lane M1 is AFLP patterns of control, while Lane M2 is AFLP patterns of treatment.

4.4 低温疗法前后的 MSAP 分析结果

利用 MSAP 技术中 *Hap* 酶和 *Msp* 酶对胞嘧啶甲基化的敏感程度不同，我们对低温疗法前后的全明星草莓材料的基因组 DNA 甲基化进行了分析。由表 4-1 可知，经低温疗法处理后带病毒全明星草莓材料全基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平降低，且全甲基化率高于半甲基化率。

表 4-1 低温疗法处理对全明星草莓基因组 DNA 甲基化水平的影响

Table 4-1 Effects of Cryotherapy on the levels of genomic DNA methylation in “All-star” Strawberry

对比 Comparison	甲基化扩增类型 Types of amplified bands						总扩增带 数 Tatol amplified bands	总甲基化带 数 Tatol methylated bands	总甲基化比 率% Tatol methylated bands ratio %
	未甲基化的 CCGG 位点 The CCGG loci of non-methylated		甲基化的 CCGG 位点 The CCGG loci of methylated						
	类型 I TypeI	比率% Ratio%	类型 II TypeII	比率% Ratio%	类型 III TypeIII	比率% Ratio%			
CK Controls	272	85.12	152	31.73	55	11.48	479	207	43.22
处理 Treatments	292	88.02	148	30.39	47	9.65	487	195	40.04

注：总扩增带数= I + II + III；总甲基化带数=II +III；完全甲基化比率=类型 III/总扩增带数；半甲基化比率=类型 II/总扩增带数；甲基化带比率=总甲基化带数/总扩增带数。

Note: Tatol amplified bands=I+II+III；Tatol methylated bands=II+III;Fully methylated bands ratio=TypeIII/ Tatol amplified bands; Half methylated bands ratio=TypeII/ Tatol amplified bands; Tatol methylated bands ratio= Tatol methylated bands/ Tatol amplified bands.

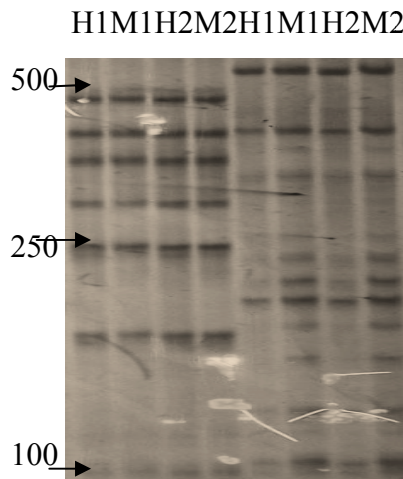


图 4-10 低温疗法处理与对照之间全明星基因组的甲基化敏感性扩增结果

Fig4-10. Profiles of MSAP in “All-star” Strawberry between control and Cryotherapy treatment

注：H 为 HpaII / EcoRI 酶切，M 为 MspI / EcoRI 酶切 H1 和 M1 泳道为对照材料 MSAP 带型，H2 和 M2 泳道为处理材料 MSAP 带型

Note: H represent digestion with HpaII / EcoRI, M represent digestion with MspI / EcoRI. Lanes H1 and M1 are MSAP patterns of control, while Lanes H2 and M2 are those of treatment

本实验一共利用 12 种不同引物组合对带病毒全明星草莓材料低温疗法前后的 DNA 双酶切产物进行选择扩增，同样参考李雪林等和杜亚琼等的方法对扩增结果进行分析，发现扩增结果共出现 12 种带型(如表 4-2)。处理与对照的甲基化模式带型 A、B、C 和 D 及相应的位点数见表 4-2。

表 4-2 低温疗法处理与对照的甲基化状态

Table 4-2 Patterns of DNA methylation in Cryotherapy and controls

酶切				甲基化状态变化		对照与处理的差异	带型
Digestion				Changes of methylation status			
H	M	H	M	处理前	处理后	Diversity between the controls and the treatments	Band pattern
				Before treatment	After treatment		
1	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	6	A1
1	1	1	0	CCGG GGCC	CCGGCCGG GGCCGGCC	2	A2
0	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC	8	A3
1	0	0	0	CCGG GGCC GGCC	CCGG GGCC	2	A4
0	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	10	B1
1	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	9	B2
0	0	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	3	B3
0	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	4	B4
0	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	3	C
1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	138	D1
1	0	1	0	CCGG GGCC GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	13	D2
0	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	11	D3

注：H 代表 *HpaII/EcoRI*；M 代表 *MspI/EcoRI* 酶切；C 和 CC 表示甲基化的胞嘧啶；1:有带；0:无带。

Note：H represent digestion with *HpaII / EcoRI*; M represent digestion with *MspI / EcoRI*; C and CC represent methylated;

我们分析了低温疗法前后全明星草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点发生甲基化(A 型带)位点数为 18 ,占全明星草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点总数的 8.61% ,具体计算在表 4-3 中可知；低温疗法前后全明星草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点发生去甲基化(B 型)位点数为 26 , 占全明星草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点总数的 12.44% , 具体计算在表 4-3 中可知。低温疗法前后全明星草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点的总甲基化多态性比例为 22.49% ,低温疗法前后全明星草莓基因组 DNA 中 CCGG 位点的甲基化状态未发生改变的比率即 D 型带的比例为 77.51% , 具体计算在表 4-3 中可知。

由此推测出，全明星草莓基因组 DNA 的甲基化水平在低温疗法前后发生了改变，

甲基化水平出现了降低的状况。在扩增的甲基化位点中，去甲基化的位点数高于发生甲基化的位点数，同时基因组 DNA 甲基化多态性也随之增加。

表 4-3 低温疗法对全明星草莓基因组 DNA 甲基化状态的影响

Table 3-6 Effects of Cryotherapy on the Patterns of genomic DNA methylation in “All-star” Strawberry

对比 Comparison	甲基化带 Methylated bands	总甲基化多态性带型 Total polymorphism bands								单态性带型 Monomorphism bands	
		A 型 Type A	比率 Ratio %	B 型 Type B	比率 Ratio %	C 型 Type C	比率 Ratio %	多态性带数 Polymorphism bands	比率 Ratio %	D 型 Type D	比率 Ratio %
		CK - 处理 Controls and treatments	209	18	8.61	26	12.44	3	1.44	47	22.49

注：甲基化带数= A + B + C + D；多态性带数= A+B+C；多态性比率=A+B + C/甲基化带数；单态性比率=类型 D/甲基化带。

Note: Methylated bands= A + B + C + D; Polymorphism bands= A+B+C; Total polymorphism bands ratio= A+B + C/ Methylated Bands; Monomorphism bands ratio= TypeD/ Methylated Bands .

5 讨论

5.1 对五叶草莓超低温保存结果的讨论

我们首次利用玻璃化法对五叶草莓材料进行了超低温保存试验，经过研究发现：低温锻炼 3 周，能明显提高五叶草莓茎尖超低温保存的存活率；固体预培养基中加入甘油对五叶草莓的成活率影响非常大，去除甘油后五叶草莓的成活率明显提高；液体预处理时间为 30min 时，对五叶草莓的超低温保存最为有利；PVS₂ 处理是超低温保存过程中的关键步骤，缺少或处理时间不当对保存后茎尖成活率存在显著影响。试验中发现，PVS₂ 处理时间并不是越长越好，当处理时间为 60min 时存活率达到最高。同时发现，液氮冻存时间对超低温保存五叶草莓的存活率并无显著影响，成活率并未产生太大变化，同薄涛等、钟兰等、李俊慧等的研究相符，说明超低温保存技术可以作为五叶草莓种质资源保存的可靠技术。

5.2 对低温疗法脱除草莓病毒结果的讨论

对带病毒全明星草莓进行了低温疗法脱毒的试验，虽然都是超低温保存的技术，然后由于材料的改变，超低温保存的过程出现了一些差别。首先，在低温锻炼时间上，全明星草莓需要 4 周，才能达到最好的结果；其次，表现在最高成活率上，五叶草莓的最高成活率达到 79.7%，然而全明星草莓的成活率只有 64.5%。其他程序对全明星草莓的成活率影响，在变化趋势上跟对五叶草莓的影响比较接近。

通过结果分析我们知道低温疗法能有效脱除全明星草莓茎尖中感染的 RNA 病毒——轻型黄边病毒，且脱毒率达到 95% 以上，比传统剥离茎尖组织培养法、高温脱毒法以及化学脱毒法在脱毒效果上更好，且比传统脱毒方法简便易行，且能大批量进行脱毒实验。

5.3 对材料基因序列的结果进行讨论

AFLP 技术是检测 DNA 多态性常用的技术，本实验采用 14 对引物对五叶草莓基因

组 DNA 进行分析，共扩增出可统计条带 526 条带，没有出现多态性位点；采用 8 对引物全明星草莓基因组 DNA 进行分析共扩增出 384 条带，也没有出现多态性位点。这些说明在对五叶草莓和全明星草莓的超低温试验中，对照与超低温处理样品之间基因组 DNA 序列保持一致，这与 Turner 等、Muller 等的研究结果相似，说明玻璃化法超低温保存技术可以作为五叶草莓种质资源保存的有效手段，也能成为低温疗法脱除全明星草莓轻型黄边病毒的有效方式。

5.4 对材料基因甲基化变化的讨论

MSAP 技术是分析基因组 DNA 甲基化多态性的一项常规技术，根据结果中五叶草莓基因组 NDA 中 CCGG 位点的甲基化水平可以推测出五叶草莓基因组 NDA 甲基化水平的整体变化趋势，超低温保存促使五叶草莓基因组 DNA 甲基化发生了变化，与对照五叶草莓相比，DNA 甲基化水平明显的降低了，且 DNA 甲基化变化的趋势大致为：大约 5.70%五叶草莓基因组 DNA 的胞嘧啶发生了甲基化；大约 12.43%五叶草莓基因组 DNA 的胞嘧啶发生了去甲基化；大约 1.04%五叶草莓基因组 DNA 的胞嘧啶发生的甲基化变化不明确。

同样，我们也利用 MSAP 技术分析了全明星草莓基因组 DNA 甲基化多态性，分析了全明星草莓基因组 NDA 中 CCGG 位点的甲基化水平同样推测了全明星草莓基因组 NDA 甲基化水平的整体变化趋势，低温疗法也促使全明星草莓基因组 DNA 甲基化水平明显出现了降低的状况，全明星草莓基因组 DNA 甲基化变化的趋势大致为：全明星草莓基因组 DNA 的胞嘧啶发生了甲基化的比例为 8.61%；大约有 12.44%的全明星草莓基因组 DNA 胞嘧啶发生了去甲基化；而大约有 1.44%全明星草莓基因组 DNA 胞嘧啶发生甲基化变化趋势不明确。

这些说明玻璃化法超低温保存成活的五叶草莓甲基化水平降低了，这与木瓜、蛇麻草(*Humulus lupulus*)、拟南芥等植物超低温保存后的甲基化变化趋势相类似。这种变化趋势可能是植物对超低温保存这种逆境处理的一种遗传适应，其内在机制目前未明，需要进一步的深入探讨。目前我们正在对超低温保存前后 DNA 甲基化转移酶基因表达水平进行分析，以探讨与超低温保存后植物甲基化水平降低的关系，研究结果将另文发表。

6 结论

玻璃化法超低温技术作为一种有效的植物种质资源超低温保存方法，可以用于五叶草莓种质资源的保存，在保存后的成活率达到了一个比较高的水平，且超低温保存前后的五叶草莓基因组 DNA 没有发生多态性变化。

同时，玻璃化法超低温保存技术也能用在带病毒草莓的低温疗法中进行病毒脱除，对草莓 RNA 病毒轻型黄边病毒的脱除率达到了 95% 以上，且气温疗法前后的全明星草莓基因组 DNA 没有发生多态性变化。

超低温保存技术使五叶草莓基因组 DNA 甲基化水平和全明星基因组甲基化水平发生降低的变化，我们需要后续实验和观察，深入研究甲基化水平的变化对五叶草莓和全明星草莓在生理生化方面带来的影响。

参考文献

- [1]. 邓明琴, 雷家军. 中国果树志: 草莓卷 [M]. 中国林业出版社, 2005.
- [2]. 马鸿翔, 陈佩度. 草莓属低倍性野生资源在育种中利用的研究进展 [J]. 果树学报, 2003, 20(4): 305-9.
- [3]. 赵密珍, 王静, 王壮伟, 等. 世界草莓生产和贸易 [J]. 果农之友, 2012, 6): 38-.
- [4]. 张运涛, 董静, 王丽娜, 等. 甜草莓——凤梨草莓的来源和育种 [J]. 草莓研究进展 (三), 2009,
- [5]. 徐东生. 我国草莓脱毒研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2002, 3(024).
- [6]. [金晓磊, 沈元月, 胡新玲, 等. 草莓基因工程研究进展 [J]. 果树学报, 2007, 24(4): 506-12.
- [7]. 王桂霞, 张运涛, 董静, 等. 中国草莓育种的回顾和展望 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 272-6.
- [8]. 张英杰. 草莓新品种 全明星 [J]. 新农业, 1995, 5
- [9]. 雷家军, 代汉萍, 谭昌华, 等. 中国草莓属 (*Fragaria*) 植物的分类研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 1-5.
- [10]. 雷家军, 杨高. 我国的草莓野生种质资源 [J]. 果树科学, 1997, 14(3): 198-200.
- [11]. 李巧兰, 李斌, 何瑾瑜, 等. 五叶草莓煎液对荷瘤小鼠免疫功能及抑瘤率的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(1): 85-7.
- [12]. 李巧兰, 何瑾瑜, 胡锡琴, 等. 单味五叶草莓煎液对小鼠胃溃疡影响的实验研究 [J]. 陕西中医, 2006, 27(6): 761-2.
- [13]. 李巧兰, 陈莉. 五叶草莓醇提物对 S180 荷瘤小鼠 VEGF, bFGF 影响及形态学观察的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 3(037).
- [14]. 卢新雄, 曹永生. 作物种质资源保存现状与展望 [J]. 中国农业科技导报, 2001, 3(3): 43-7.
- [15]. Sprague G. Germplasm resources of plants: Their preservation and use [J]. Annual Review of Phytopathology, 1980, 18(1): 147-65.
- [16]. Wilkes G. Germplasm preservation: objectives and needs [M]. Biotic diversity and germplasm preservation, global imperatives. Springer. 1989: 13-41.
- [17]. Shands H L, Fitzgerald P J, Eberhart S A. Program for plant germplasm preservation in the United

- States: the US National Plant Germplasm System [M]. Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives. Springer. 1989: 97-115.
- [18]. 曹永生, 张贤珍, 白建军, 等. 中国主要粮食作物野生种质资源地理分布 [J]. 作物学报, 1999, 25(04): 424-32.
- [19]. 贾继增, 黎裕. 植物基因组学与种质资源新基因发掘 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1585-92.
- [20]. 熊克娟, 陈绳亮, 范兆军, 等. 植物病毒及其危害 [J]. 生物学通报, 2003, 38(4): 12-3.
- [21]. 鲁瑞芳, 李为民, 彭学贤. 植物病毒协生作用及其分子机理 [J]. 中国病毒学, 2001, 16(3): 195-201.
- [22]. 江山, 韩熹莱. 植物病毒病化学防治的研究进展 [J]. 中国病毒学, 1995, 10(1): 1-7.
- [23]. 金建良. 草莓丰产栽培技术 [J]. 浙江林业, 2012,(7): 29-.
- [24]. 周厚成, 何水涛. 草莓病毒病研究进展 [J]. 果树学报, 2003, 20(5): 421-6.
- [25]. 王国平, 刘福昌, 国际翔. 我国草莓主栽区病毒种类的鉴定 [J]. 植物病理学报, 1991, 21(1): 9-14.
- [26]. 杨洪一, 张志宏, 高秀岩, 等. 草莓轻型黄边病毒的 RT-PCR 检测及其 3' 端序列分析 [J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 403-7.
- [27]. 薛光荣. 草莓病毒种类鉴定及培育无病毒种苗的技术研究 [J]. 中国农业科学, 1990, 23(4): 43-9.
- [28]. Nag K, Street H. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells [J]. 1973,
- [29]. 刘月学, 王家福, 林顺权. 超低温保存技术在果树种质资源保存中的应用 [J]. 福建果树, 2001, 3(25-7).
- [30]. 刘燕, 周慧, 方标. 园林花卉种子超低温保存研究 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 39-44.
- [31]. 徐定华, 项俊, 徐霞玲, 等. 超低温保存技术在植物种质资源研究中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(2): 321-3.
- [32]. Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, et al. Cryopreservation by vitrification of coated shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured in vitro [J]. Comptes Rendus de l'Acad des Sci, 1991, 633-8.
- [33]. Braun A. Cryopreservation of sugarbeet germplasm [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1988, 14(3): 161-8.
- [34]. Marassi M A, Scocchi A, Gonzalez A M. Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/dehydration technique [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2006,

- 42(1): 31-6.
- [35]. 马千全, 徐立, 李志英, 等. 植物种质资源超低温保存技术研究进展 [J]. 热带作物学报, 2007, 28(1): 105-10.
- [36]. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures [J]. Nature, 1949, 164(4172): 666.
- [37]. Fahy G, Mac Farlane D, Angell C, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation [J]. Cryobiology, 1984, 21(4): 407-26.
- [38]. Fahy G M. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation [J]. Progress in clinical and biological research, 1986, 224(305).
- [39]. Liu Y, Wang X, Liu L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification [J]. Plant science, 2004, 166(3): 677-85.
- [40]. Matsumoto T, Sakai A, Yamada K. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(8): 442-6.
- [41]. Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification [J]. Plant cell reports, 1999, 19(2): 150-5.
- [42]. Fabre J, Dereuddre J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips [J]. CryoLetters, 1990, 11(4)13-26.
- [43]. Sakai A, Engelmann F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review [J]. CryoLetters, 2007, 28(3): 151-72.
- [44]. Halmagyi A, Deliu C. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification [J]. Scientia horticulturae, 2007, 113(3): 300-6.
- [45]. Scottez C, Chevreau E, Godard N, et al. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration [J]. Cryobiology, 1992, 29(6): 691-700.
- [46]. 陈芳, 王子成. 植物脱毒新技术——低温疗法 [J]. 河南农业科学, 2006, 12(1)1-3.
- [47]. Brison M, De Boucaud M-T, Pierronnet A, et al. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus [J]. Plant Science, 1997, 123(1): 189-96.
- [48]. Helliot B, Panis B, Poumay Y, et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and

- banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20(12): 1117-22.
- [49]. Wang Q, Mawassi M, Li P, et al. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L [J]. *Plant Science*, 2003, 165(2): 321-7.
- [50]. Wang Q, Liu Y, Xie Y, et al. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) [J]. *Potato Research*, 2006, 49(2): 119-29.
- [51]. Shatnawi M, Anfoka G, Shibli R, et al. Clonal propagation and cryogenic storage of virus free grapevine (*Vitis Vinifera* L.) via meristem culture [J]. *Turk J Agric For*, 2011, 35(1)73-84.
- [52]. Bayati S, Shams-Bakhsh M, Moieni A. Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy [J]. *Journal of Agriculture, Science and Technology*, 2011, 13(4)43-50.
- [53]. Wang Q, Valkonen J. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method [J]. *Trends in plant science*, 2009, 14(3): 119-22.
- [54]. 周厚成, 李思源, 何水涛, 等. 草莓镶脉病毒的 PCR 检测及特异片段的序列分析 [J]. *果树学报*, 2005, 22(3): 286-8.
- [55]. 张志宏, 杨洪一, 代红艳, 等. 应用多重 RT-PCR 检测草莓斑驳病毒和草莓轻型黄边病毒 [J]. *园艺学报*, 2006, 33(3): 507-10.
- [56]. 孙琦, 张春庆. 植物脱毒与检测研究进展 [J]. *山东农业大学学报 (自然科学版)*, 2003, 34(2): 307-10.
- [57]. Basu C. Gene amplification from cryopreserved *Arabidopsis thaliana* shoot tips [J]. *Current issues in molecular biology*, 2008, 10(1/2): 55.
- [58]. Withers L A, Langhe E D. Institutes working on tissue culture for genetic conservation. A revised list [J]. 1982,
- [59]. 邵丽, 王子成. 植物种质超低温保存遗传稳定性的研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2010, (11): 1109-13.
- [60]. Hitmi A, Sallanon H, Barthomeuf C. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 17(1): 60-4.
- [61]. 何光存, 舒理慧, 廖兰杰, 等. 疣粒野生稻体细胞超低温保藏与原生质体培养体系的确立 [J]. *中国科学 (C 辑)*, 1998, 28(5): 449.
- [62]. Turner S, Krauss S L, Bunn E, et al. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation [J]. *Plant Science*, 2001, 161(6): 1099-106.

- [63]. Hao Y-J, Liu Q-L, Deng X-X. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels [J]. *Cryobiology*, 2001, 43(1): 46-53.
- [64]. Jokipii S, Ryyen Nen L, Kallio P T, et al. A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx [J]. *Plant Science*, 2004, 166(3): 799-806.
- [65]. 曲先, 王子成. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 茎尖的超低温保存及其遗传变异的初步观察 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, (1): 11-6.
- [66]. Rival A, Turquay P, Samosir Y, et al. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings [J]. *Planta*, 2010, 232(2): 435-47.
- [67]. Aronen T S, Krajnakova J, H Ggman H M, et al. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica* [J]. *Plant science*, 1999, 142(2): 163-72.
- [68]. Urbanov M, Košuth J, Čell Rov E. Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation [J]. *Plant cell reports*, 2006, 25(2): 140-7.
- [69]. M Ller J, Day J G, Harding K, et al. Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP) [J]. *American Journal of Botany*, 2007, 94(5): 799-808.
- [70]. Kaity A, Ashmore S, Drew R A, et al. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in *papaya* [J]. *Plant cell reports*, 2008, 27(9): 1529-39.
- [71]. Kaity A, Ashmore S, Drew R A. Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones [J]. *Plant cell reports*, 2009, 28(9): 1421-30.
- [72]. Meyer P, Heidmann I, Niedenhof I. Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia [J]. *The Plant Journal*, 1993, 4(1): 89-100.
- [73]. Hurwitz J, Gold M, Anders M. The Enzymatic Methylation of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid IV. THE PROPERTIES OF THE SOLUBLE RIBONUCLEIC ACID-METHYLATING ENZYMES [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239(10): 3474-82.
- [74]. 王劲. DNA 甲基化 [J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 2002, 23(004): 206-7.
- [75]. Martienssen R A, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1070-4.

- [76]. Bender J. DNA methylation and epigenetics [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004,(55)41-68.
- [77]. Feinberg A P, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms; proceedings of the Seminars in cancer biology, F, 2002 [C]. Elsevier.
- [78]. Paulsen M, Ferguson Smith A C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease [J]. *The Journal of pathology*, 2001, 195(1): 97-110.
- [79]. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. *Genes & development*, 2002, 16(1): 6-21.
- [80]. Bar Nek M, Křižan B, Ondruš Kov E, et al. DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2010, 101(1): 11-22.
- [81]. Salmon A, Clotault J, Jenczewski E, et al. Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism [J]. *Plant Science*, 2008, 174(1): 61-70.
- [82]. Cervera M-T, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(4): 543-52.
- [83]. Chan S W-L, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(5): 351-60.
- [84]. Zhang X, Bernatavichute Y V, Cokus S, et al. Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genome Biol*, 2009, 10(6): R62.
- [85]. [85] Peredo E L, Arroyo-Garc A R, Reed B M, et al. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. *Cryobiology*, 2008, 57(3): 234-41.
- [86]. Johnston J W, Benson E E, Harding K. Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(2): 123-31.
- [87]. 陈芳, 王子成, 何艳霞, 等. 超低温保存小麦种子和幼苗的遗传变异分析 [J]. *核农学报*, 2009, 23(4): 548-54.
- [88]. 郭强梨, 李忠爱, 邵丽, 等. 留兰香茎尖超低温保存及遗传变异分析 [J]. *河南农业科学*, 2012, 6(032).
- [89]. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic acids*

- research, 1995, 23(21): 4407-14.
- [90].王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及其应用 [J]. 杂交水稻, 1996, 5): 27-30.
- [91].Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1999, 14(10): 389-94.
- [92].李珊, 赵桂仿. AFLP 分子标记及其应用 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(5): 830-6.
- [93].Noyer J, Causse S, Tomekpe K, et al. A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers [J]. Genetica, 2005, 124(1): 61-9.
- [94].Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia V A, Kay A-J. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. Plant Science, 2001, 161(2): 359-67.
- [95].Sha A, Lin X, Huang J, et al. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2005, 273(6): 484-90.
- [96].陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 等. 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 科学通报, 2005, 50(24): 2750-6.
- [97].李雪林, 林忠旭, 聂以春, 等. 盐胁迫下棉花基因组 DNA 表观遗传变化的 MSAP 分析 [J]. 作物学报, 2009, 35(4): 588-96.
- [98].Xu M, Li X, Korban S S. DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(5): 899-910.
- [99].何艳霞, 王子成, 曹红平, 等. 光暗条件下大蒜 DNA 甲基化差异的初步研究 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 85-7.
- [100].Wang W-S, Pan Y-J, Zhao X-Q, et al. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of experimental botany, 2011, 62(6): 1951-60.
- [101].Young W, Schupp J, Keim P. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome [J]. Theoretical and applied genetics, 1999, 99(5): 785-92.
- [102].何艳霞, 王子成. 拟南芥幼苗超低温保存后 DNA 甲基化的遗传变异 [J]. 植物学报, 2009, 44(3): 317-22.
- [103].杜亚琼, 王子成, 李霞. 土霉素胁迫下拟南芥基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 生态学报, 2011, 31(10): 2846-53.
- [104].杜亚琼, 王子成. 甘露醇对拟南芥基因组 DNA 甲基化的影响 [J]. 植物学报, 2011, 46(3):

285-92.

致谢

弹指间，在河南大学的硕士生活已接近尾声，这里勤奋踏实的老师，热心真诚的同窗，和睦相处的室友，是他们的帮助与支持，鼓励与信任，让我不断的成长，不断的进步，不断的成熟。在河南大学生命科学学院植物种质资源与遗传工程实验室进行学习和实验的三年时光里，我感受到了这个集体浓厚的学术氛围，积极向上、勤奋踏实的科研素质使我收获颇多。

在此真诚地感谢我的导师王子成教授，他对科研的激情和执着追求、对生命科学深邃的洞察力和敏锐的思维一直使我仰望和追求。感谢他对我课题的悉心指导：从论文的选题、实验设计、实验思路到论文的撰写，都占用了他很多宝贵的时间，给我提出了宝贵的建议和意见。我的每一次进步都凝结着恩师的心血和汗水！

衷心感谢尚富德院长和李锁平副院长我学习的关心，感谢李国申、李玉阁、何艳霞、韩远记、董美芳、张大乐、苏亚蕊、黄世全等各位老师给予我的热心帮助和指导。特别感谢李忠爱老师对我的关爱和照顾。感谢生命科学学院领导及马云峰老师对我们的关怀和照顾。生命科学学院里的许多老师给予了我莫大的关心和帮助，在此一并表示感谢！

感谢课题组同学：王彦杰、施冬青、朱芹芹、赵文琪、马焕新等的热情帮助！感谢实验室所有帮助过我的人！

感谢同窗好友刘路贤、张文超、马建军、张从顺等在生活和实验中给我的帮助和支持！

感谢我的家人，特别是我的父母，他们无私的爱，默默无闻的奉献和全力的支持与理解，是我顺利完成学业的动力。

民善
新至
德於
明止