

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

曲先, 王子成*

河南大学生命科学学院农业生物技术研究所, 河南开封 475004

摘要: 研究马铃薯茎尖超低温保存技术的结果表明, 4 °C 低温下锻炼6 d, 在添加二甲基亚砜(DMSO)和乙酰胺的培养基中预培养5 d, 60% PVS₂于室温下装载30 min, 0 °C下PVS₂脱水40 min时, 茎尖成活率最高(71.6%), 再生植株生长分化正常。进一步对再生植株进行AFLP分析, 6对引物组合共扩增出385条带, 超低温保存前后的材料之间未见到明显差的异带, 但用MSAP技术分析超低温保存前后植株甲基化的结果显示: 超低温保存后的材料均有不同程度的甲基化。在扩增的624条带中, 处理与否之间完全一致的带型为584条; 有变化的带型为40条, 处理2(茎尖经过完整的超低温保存过程, 区别于处理1, 增加了冷冻、解冻和洗涤后恢复培养)有13个位点的甲基化增加, 21个位点去甲基化。

关键词: 马铃薯; 超低温保存; 遗传变异; 甲基化变化

Cryopreservation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Shoot-Tips and Preliminary Observations of Its Genetic Variation

QU Xian, WANG Zi-Cheng*

Institute of Agricultural Biotechnology, College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

Abstract: A technology of potato shoot-tip-cryopreservation was studied in this paper. The highest survival rate of shoot-tips could reach 71.6% after trained at 4 °C low temperature for 6 days, pre-cultured on the medium with DMSO and acetamide for 5 days, loaded with 60% PVS₂ for 30 min at room temperature, and dehydrated with PVS₂ for 40 min at 0 °C. The regeneration plants differentiated normally. 385 bands were amplified from the regeneration plants using 6 pairs of primers combination for AFLP analysis. Before and after cryopreservation the samples showed no obvious variation bands. It suggested that the plants maintained a good genetic stability at DNA level. But MSAP analysis on the plant methylation indicated that after cryopreservation the materials had different methylation changes. Among 624 bands, the control and the treated samples had 584 bands of identical type and 40 bands of changerable type. Treatment 2 (shoot-tips culture after the complete cryopreservation process, is different from Treatment 1 with an increase of freezing, thawing and washing recovery training) had 13 *de novo* methylation sites and 21 demethylation sites.

Key words: potato (*Solanum tuberosum*); cryopreservation; genetic variation; methylation alteration

超低温保存技术可以避免传统的种质离体保存过程中的染菌和遗传变异, 有保存时间长和稳定而方便的优势。自Nag和Street(1973)最早用超低温保存胡萝卜悬浮细胞系以来, 人们先后以此方法对200多种植物材料进行了保存, 认为是植物种质资源长期保存的可行方法。超低温保存过程一般包括预培养、脱水、冷冻和解冻等, 在保存过程中会涉及到一系列的胁迫, 包括渗透胁迫和低温胁迫等。研究表明, 这些胁迫可能作为一种选择压对不同基因型的植物材料产生选择效应(Dietrich等1986), 从而对植物的遗传信息产生一定的影响。从保存种质遗传完整性的角度出发, 对保存后的再生材料进行遗传稳定性检测是必要的。马铃薯

的超低温保存已有报道(Wang等2006)。但从分子水平上研究超低温保存后马铃薯的遗传变异, 特别是表观遗传的变化尚未见报道。本文对超低温保存前后的马铃薯进行了AFLP和MSAP分析, 以研究超低温保存对其遗传信息的影响。

材料与方法

材料为郑州市蔬菜研究所提供的马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)品种‘郑蔬5号’。继代培

收稿 2009-09-23 修定 2009-12-01

资助 河南省重点科技攻关项目(92102110160)和国家自然科学基金项目(30900973)。

* 通讯作者(E-mail: wzc@henu.edu.cn; Tel: 0378-2868833-3767)。

培养基: MS+0.2 mol·L⁻¹ 6-BA+0.03 mol·L⁻¹ IAA, 培养基的 pH 为 5.8, 培养室温度为(22±1) °C, 光照强度为 40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间为 12 h·d⁻¹。用于 AFLP 和 MSAP 分子检测的材料是经过超低温保存后成活和未进行超低温处理(对照)的材料, 超低温保存后成活的材料为: 4 °C 低温下锻炼 6 d 后, 在添加二甲基亚砜(DMSO)和乙酰胺的培养基中预培养 5 d, 60% PVS₂ (PVS₂ 成分为: 30% 甘油+15% 乙二醇+15% DMSO+0.4 mol·L⁻¹ 蔗糖)室温装载 30 min, 以 PVS₂ 0 °C 脱水 40 min, 液氮处理 12 h 后成活的材料, 也就是说用于分子检测的材料是经过超低温保存后成活率最高的条件下的材料。

预培养和预处理时选取继代培养 40 d 左右的植株上带顶芽的茎段(长 0.5~1.0 cm), 4 °C 下在预培养基培养, 预培养基为 MS+50 g·L⁻¹ DMSO+10 g·L⁻¹ 乙酰胺+0.4 mol·L⁻¹ 蔗糖+0.7% 琼脂。预培养后剥取茎段顶端 2~3 mm 长的茎尖, 置于 1.8 mL 冷冻管中, 每管 10 个茎尖。加入预处理液 60% PVS₂, 在室温下进行预处理(吴雪梅和汤浩茹 2005)。

加保护液之前用无菌枪头吸出预处理液, 加入保护液 PVS₂ 并置于 0 °C 冰水混合液中处理不同时间, 将冷冻管放入自制的纱布袋中, 迅速投入液氮中进行保存。

化冻与恢复培养采取快速化冻法, 即从液氮中迅速取出冷冻管, 以 40 °C 水浴化冻 1~2 min, 以除去保护液并用洗涤液将茎尖洗涤 3 次, 每次 10 min, 洗涤液成分为 MS+1.2 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液。取出茎尖置于无菌滤纸上以吸去残留在茎尖表面上的洗涤液, 然后接种到恢复培养基上, 为了减少再培养中的光抑制和利于离体材料恢复生长, 经过超低温保存后的材料应进行暗培养, 暗培养后再转移到正常光照条件下进行恢复培养。恢复培养基的成分为 MS+0.4 mol·L⁻¹ 6-BA+0.05 mol·L⁻¹ NAA+0.3 mol·L⁻¹ GA₃, 培养基 pH 为 5.8 (王子成和邓秀新 2001; 李明军等 2008)。

马铃薯茎尖设置 3 个处理: (1)对照(茎尖不进行任何处理, 直接在恢复培养基上继代培养); (2)处理 1 (茎尖经预培养、预处理和保护液处理后, 不放入液氮中冷冻, 直接洗涤并恢复培养); (3)处理 2 (茎尖经过完整的超低温保存过程, 区别于处理 1,

增加了冷冻、解冻和洗涤后恢复培养)。

DNA 的提取参照邱宏等(2006)文中的 CTAB 方法。

AFLP 分析参照 Hao 等(2002)文中的方法, 略有改动。酶切时在 20 μL 体系中加入 3 U *EcoRI*, 3 U *MseI*, 250 ng 基因组 DNA; 连接: *EcoRI* 接头, *MseI* 接头, T4 连接酶, 25 °C 连接 2.5 h; 预扩: 预扩引物为 E-A 和 M-C, Taq 酶, 扩增 2 h; 20 对引物组合用于 AFLP 选扩。选扩产物 94 °C 变性 5 min 后上样于 6% PAGE, 恒功率 55 W, 电泳 2.5 h, 结束后经固定、银染漂洗与显色后分析结果并拍照。

MSAP 分析参照 Cervera 等(2002)文中的方法略修改。与本文 AFLP 方法类似, 其中内切酶组合为 *EcoRI/HapII* 和 *EcoRI/MspI*, 接头为 *EcoRI* 接头和 H-M 接头, 预扩引物为 E-A 和 *HapII-MspI*, 选扩引物组合 13 对。分子标记检测所用的接头及引物来自上海生工公司(表 1)。

结果与讨论

1 超低温保存过程中不同处理对马铃薯茎尖成活率的影响

从图 1 中可以看出 4 °C 下预培养 5 d 的材料经超低温保存后的存活率最高达到 71.1% (图 1-a)。60% PVS₂ 处理 30 min 的成活率最高达到 71.6%, 40 min 的成活率为 70.4%, 处理 50 min 的成活率为 68.3% (图 1-b), 差别不明显。而用 PVS₂ 处理 10 min 存活率仅为 39.5%。这可能是 PVS₂ 没有完全达到缓冲作用的结果(薛建平等 2003)。而当处理时间大于 40 min, PVS₂ 对材料可能有毒害作用, 以致其存活率下降, PVS₂ 处理 60 min 的存活率仅为 38.7% (图 1-c)。另外, 暗培养时间对超低温保存后材料的恢复影响也很大。暗培养 9 d 内的材料的存活率随着处理时间的延长而增长(图 1-d), 说明暗培养对细胞的恢复是必需的, 但是暗培养时间超过 11 d, 存活率反而又下降, 这可能是暗培养时间过长, 光照不足, 细胞的分裂和分化受到抑制所致。另外, 液氮处理时间的长短对材料存活率几乎没有影响(图 1-e), 这可能是由于在超低温(-196 °C)的状态下细胞生理代谢水平几乎停滞所致。液氮处理时间的长短是否对 DNA 甲基化有影响, 尚需进一步研究。

表1 AFLP和MSAP分析的接头及引物序列

Table 1 Sequences of adaptes and primers for AFLP and MSAP

引物 / 接头	序列
接头	<i>EcoRI</i> -adapter I 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'
	<i>EcoRI</i> -adapter II 5' AATTGGTACGCAGTC 3'
	<i>MseI</i> -adapter I 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'
	<i>MseI</i> -adapter II 5' TACTCAGGACTCAT 3'
	<i>HapII-MspI</i> -adapter I 5' GATCATGAGTCCTGCT 3'
	<i>HapII-MspI</i> -adapter II 5' TCATGATCCTGCTCG 3'
预扩引物	E-A 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
	M-C 5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'
	<i>HapII-MspI</i> 5' ATCATGAGTCCTGCTCGG 3'
选扩引物	<i>EcoRI</i> -AAC 5' GACTGCGTACCAATTCAAC 3'
	<i>EcoRI</i> -ACT 5' GACTGCGTACCAATTCAC 3'
	<i>EcoRI</i> -AGG 5' GACTGCGTACCAATTCAGG 3'
	<i>EcoRI</i> -ACA 5' GACTGCGTACCAATTCACA 3'
	<i>EcoRI</i> -ACT 5' GACTGCGTACCAATTCAC 3'
	<i>EcoRI</i> -AGC 5' GACTGCGTACCAATTCAGC 3'
	<i>EcoRI</i> -ACC 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'
	<i>EcoRI</i> -AAG 5' GACTGCGTACCAATTCAAG 3'
	<i>MseI</i> -CAA 5' GATGAGTCCTGAGTAACAA 3'
	<i>MseI</i> -CTG 5' GATGAGTCCTGAGTAAGT 3'
	<i>MseI</i> -CTC 5' GATGAGTCCTGAGTAAGT 3'
	<i>MseI</i> -CTA 5' GATGAGTCCTGAGTAAGT 3'
	<i>MseI</i> -CAT 5' GATGAGTCCTGAGTAAGT 3'
	<i>HapII-MspI</i> -TCAA 5' ATCATGAGTCCTGCTCGGTCAA 3'
	<i>HapII-MspI</i> -TCCA 5' ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCA 3'

2 不同处理前后马铃薯茎尖变异的AFLP分析

用20对引物组合对超低温保存前后的马铃薯茎尖进行PCR扩增,从中筛选出谱带清晰并呈现多态性的有效引物共6对,对这6对引物PCR扩增的谱带进行分析的结果显示:6对引物组合共扩增出385条带,在超低温保存前后的马铃薯茎尖之间未见到明显的差异带(图2)。这表明处理与否在DNA水平上都保持较好的遗传稳定性,没有发生遗传变异。这和前人的研究结果(Wilkinson等2003)相一致。

3 基因组甲基化水平的MSAP分析

*HapII*和*MspI*是一组同裂酶,二者均识别并切割5' CCGG 3'序列,但*HapII*对胞嘧啶的甲基化极其敏感,它不能切割任何1个或2个均甲基化的序列,也即*HapII*对5' C^mCGG 3'、5' ^mCCGG 3'和5' ^mC^mCGG 3'都不能表现出活性,但若只在单链发生甲基化,就能够识别切割。一般认为*MspI*对内部胞嘧啶的甲基化不敏感,而对外部胞嘧啶的甲基

化则很敏感,也就是说*MspI*可以切割5' C^mCGG 3',但不能切割5' ^mCCGG 3'。本文将MSAP方法测出的限制带型分为a、b、c、d这4种(表2)。通常认为,MSAP不能检测到DNA外侧或内、外侧胞嘧啶完全甲基化的位点(^mCCGG/GGC^mC或^mC^mCGG/GG^mC^mC),即H、M在此种酶切位点处无带,而本文中超低温保存与否的马铃薯茎尖在此位点无带时作统计,如果未做超低温保存的有而超低温保存的材料无带或未做超低温保存的无带而超低温保存材料有带,则说明超低温保存的马铃薯茎尖在此位点上发生甲基化。

本文用MSAP技术分析马铃薯茎尖超低温保存后DNA甲基化的遗传变异的结果(图3)显示:13对引物组合共扩出600条左右清晰条带,a型带355条,b型带121条,c型带108条。c型带比b型带略少。与不作超低温处理相比,超低温保存后的材料均有甲基化变异带,处理1和2的总变异带分别为26条和34条,变异率分别为4.41%和6.78%。

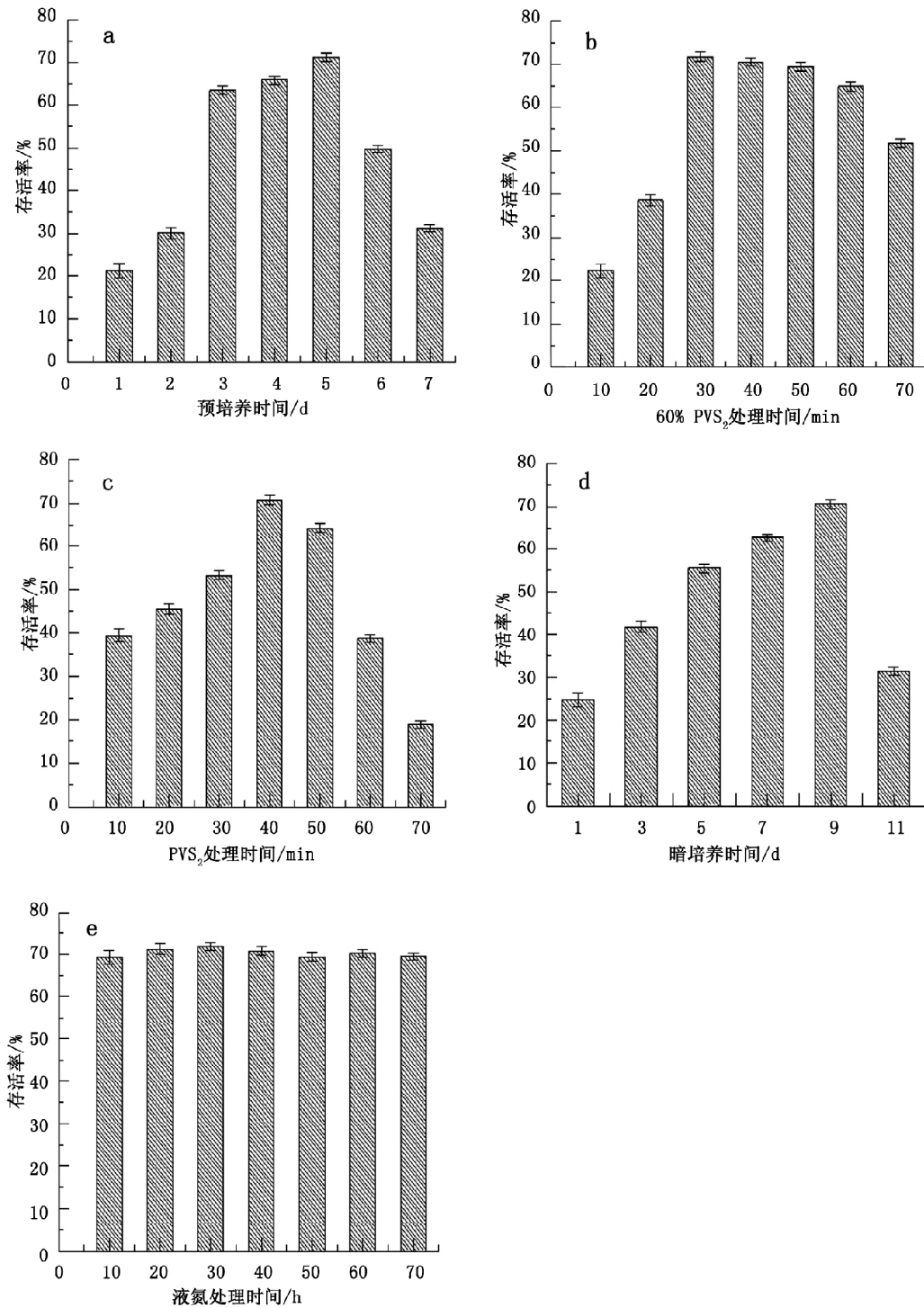


图1 超低温保存过程中不同处理对保存后的马铃薯茎尖成活率的影响

Fig.1 Cryopreservation process of different treatments on impact of the survival rate of potato shoot tips

说明超低温保存后茎尖DNA的甲基化发生变化。玻璃化法超低温保存的茎尖(处理2)比只用PVS₂处理的未经过超低温的茎尖(处理1)变异率大。变异

带增加的类型中, b → d型最多, 处理1达6条, 处理2达8条。另外, 处理1中, a → b型的1条、a → c型的4条; 甲基化减少的带型处理1和处理2的

表2 *HapII* 和 *MspI* 的甲基化敏感性、限制性带型和带型分类

Table 2 The methylation-sensitive and restriction bands of *HapII* and *MspI* and the classify of the bands pattern

甲基化状态	内切酶活性		限制性带型		带型统计类型
	<i>HapII</i>	<i>MspI</i>	H	M	
CCGG/GGCC	有	有	+	+	a
^m CCGG/GGCC	有	无	+	-	b
C ^m CCGG/GG ^m CC	无	有	-	+	c
^m C ^m CCGG/GG ^m C ^m C	无	无	-	-	d
^m CCGG/GGC ^m C	无	无	-	-	d

a 表示 H、M 都有带(+、+); b 表示 H 有带、M 没带(+、-); c 表示 H 没带、M 有带(-、+); d 表示 H、M 都没带(-、-)。

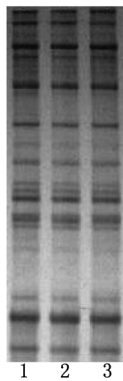


图2 不同处理样品基因组 DNA 的 AFLP 分析电泳图谱

Fig.2 DNA-AFLP finger-printing map of the different treatment samples

1: 对照; 2: 处理 1; 3: 处理 2。

表3 不同处理样品的 MSAP 带型数

Table 3 MSAP-banding patterns of the different treatment samples

处理	甲基化变化			
	增加条数	减少条数		
处理 1	a → b	1	b → a	7
	a → c	4	c → a	2
	a → d	0	c → b	3
	b → c	0	d → a	1
	b → d	6	d → b	2
	总数	11	总数	15
	处理 2	a → b	1	b → a
a → c	1	c → a	3	
a → d	2	c → b	5	
b → c	1	d → a	2	
b → d	8	d → b	3	
总数	13	总数	21	

甲基化增加的带型为: a → b、a → c、a → d、b → c、b → d;
甲基化减少的带型为: d → b、d → a、c → b、c → a、b → a。

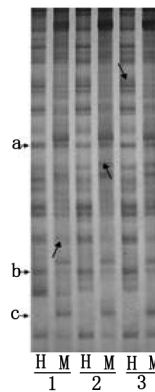


图3 不同处理样品的基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析电泳图谱

Fig.3 DNA methylation MSAP finger-printing map of the different treatment samples

1: 对照; 2: 处理 1; 3: 处理 2。

基本上都有, 其中 b → a 最多, 说明去甲基化的带型变化较一致。处理 1 和处理 2 的甲基化减少条带数分别为 15 和 21 条; 这表明超低温保存后, 无论是液氮冷冻还是冷冻外的处理都对茎尖的甲基化状态有一定程度的影响。既有甲基化增加, 又有脱甲基化变化, 总的来看, 去甲基化变化是主要趋势(表 3)。

总之, 超低温保存影响植物的甲基化变化后是否会引引起可遗传的变异, 以及哪些基因表达有变化, 尚需深入研究。

参考文献

邸宏, 陈伊里, 金黎平(2006). RAPD 和 AFLP 标记分析中国马铃薯主要品种的遗传多样性. 作物学报, 32: 899~904
李明军, 周娜, 刘杰, 张晓丽, 李萍, 张楠(2008). 怀地黄玻璃化和包埋玻璃化法超低温保存. 园艺学报, 35: 607~610
王子成, 邓秀新(2001). 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生. 园艺学报, 28: 304~306
吴雪梅, 汤浩茹(2005). 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研

- 究进展. 植物学通报, 22: 238~245
- 薛建平, 张爱民, 柳俊, 石乐义(2003). 玻璃化法超低温保存地黄茎尖. 农业生物技术学报, 11: 430~431
- Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J (2002). Analysis of methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP marker. Mol Genet Gen, 268: 543~552
- Dietrich B, Haack U, Luckner M (1986). Cryopreservation of *Digitalis lanata* cells grown *in vitro*. Precultivation and recultivation. Plant Physiol, 126: 63~73
- Hao Y, You C, Deng X (2002). Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation. Cryoletters, 23: 37~46
- Nag KK, Street HE (1973). Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature, 245: 270~272
- Wang Q, Liu Y, Xie Y, You M (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *potato leafroll virus* (PLRV) and *potato virus Y* (PVY). Potato Res, 49: 119~129
- Wilkinson T, Wetten A, Prychid C, Fay MF (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. Ann Bot, 91: 65~74