

## 植物种质超低温保存遗传稳定性的研究进展

邵丽, 王子成\*

河南大学生命科学学院, 河南开封 475004

**摘要:**超低温保存被认为是种质长期保存最有效的方法, 其中生物材料低温保存的遗传稳定性是植物种质资源保存中最受关注的问题之一。本文对近年来超低温保存后植物材料的遗传稳定性及变异的研究情况进行了介绍, 涉及表型性状分析、基因组遗传稳定性、表观遗传变化及超低温保存的筛选效应等, 为进一步研究超低温保存的应用提供参考。

**关键词:**超低温保存; 遗传稳定性; 植物; 脱毒

## Review of Genetic Stability Research for Plant Germplasm Cryopreservation

SHAO Li, WANG Zi-Cheng\*

School of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

**Abstract:** Cryopreservation is considered as the most efficient method of long term plant germplasm conservation, and plant heredity stability of biological materials in low-temperature preservation has become one of the questions which are most worth considering in plant germplasm conservation. In the paper, we reviewed genetic stability and variation of plant materials after cryopreservation in recent years, and gave advice for further study on cryopreservation application, involving phenotypic traits analysis, genome genetic fidelity, epigenetic changes and the screening effect of cryopreservation, etc.

**Key words:** cryopreservation; genetic stability; plant; virus elimination

超低温保存(cryopreservation)是在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及其以下的低温条件下保存种质资源的一整套生物学技术。自1973年Nag等首次超低温保存胡萝卜悬浮细胞系获得成功以来, 国内外已对200多种材料进行了超低温保存(梁宏和王起华2005)。从理论上讲, 植物材料在超低温保存过程中, 活细胞内的物质代谢与生长活动近乎完全停止, 处于“生机停顿”(suspended animation)状态, 因而可使植物材料在该温度下不发生遗传性状的改变(肖洁凝和黄学林1999; 马千余等2007), 使保存材料具有良好的生物稳定性。但实际上, 超低温保存过程涉及到一系列的胁迫(Basu 2008), 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, 并产生一些生理及遗传的影响。近年来, 许多学者就超低温保存后再生材料的遗传稳定性问题做了大量的研究和对比分析。本文就目前超低温保存的再生材料遗传变异的研究进展情况进行分析, 为该领域的进一步研究提供参考。

近年来, 关于超低温保存材料的遗传稳定性研究主要集中在3个方面: (1)超低温保存再生材料的表型性状的比较; (2)超低温保存材料的基因组遗传

稳定性研究; (3)超低温保存再生材料的表观遗传变异情况分析。此外, 超低温保存过程本身具有一定的筛选效应, 使再生材料与未保存之前有一定的不同, 利用该原理发展起来的超低温保存脱除植物病毒也得以发展。

### 1 表型性状变异研究

大多数研究认为, 超低温保存再生植株的表型性状没有明显的变化。Moukadiri等(1999a)对水稻超低温保存后的愈伤组织研究表明, 超低温保存后的再生后代的表型性状没有发生变异; 章志宏和胡中立(2000)在研究水稻单倍体不定芽超低温保存的再生后代过程中也没有发现表型特征的变化; 对苦楝树和白桦超低温保存后再生材料的研究过程也有相同结果(Scocchi等2004; Rynnanen和Aronen2005); Sisunandar等(2010)对椰子胚经超低温保存后幼苗的形态学研究没有发现显著性变异。但最近也有部分研究认为超低温保存后材料的部分性状

收稿 2010-08-03 修定 2010-09-15

资助 国家自然科学基金项目(30900973)。

\* 通讯作者(E-mail: wzc@henu.edu.cn)。

会发生某些变化,如超低温保存后的水稻更耐低温,且更易进行基因枪法遗传转化(Moukadiri等1999b);原生质体培养不易再生的材料,超低温保存后,原生质体培养却获得了成功(何光存等1998);超低温保存过的胚性愈伤组织再生的白杉也发生了一定比例的变异(DeVerno等1999);超低温保存后的菊花叶绿素含量降低,而除虫菊酯合成提高(Martin和Gonzalez-Benito 2005)。近来,Medina等(2007)对两个草莓品种的超低温保存再生材料、常规繁殖材料与微繁材料的田间农艺性状进行了对比分析,结果发现,品种‘Andana’相对于常规繁殖材料,微繁材料和超低温处理材料产品产量比较高,果实相对较小;另一品种‘Camarosa’的超低温处理材料与另外两组相比在果实品质方面有一定的差异。表型性状是在基因型和环境共同作用下形成的,其中环境可以是外部的自然环境,也可能是植物体本身的内部环境,比如蛋白含量、物质积累、pH变化等。

## 2 基因组遗传稳定性研究

对于超低温保存再生材料的基因组遗传稳定性研究,目前主要采用细胞学方法和各种分子标记技术对再生材料与对照进行对比分析。研究表明,多数材料没有发生染色体数目和DNA序列的变异。Turner等(2001)检测经过超低温保存12个月后的袋鼠花(*Anigozanthos viridis*)的茎尖发现,遗传稳定性良好,再生植株基因组没有发生遗传变异。Hao等(2001)研究了苹果的一种基因型(*Malus pumila* cv. ‘M26’)超低温保存后再生的8个单芽系的遗传稳定性,与对照相比基因组没有发生变异。另外,在苦楝树、白桦、马铃薯和椰子的超低温保存过程中也没有发现基因组的变异(Scocchi等2004; Rynnanen和Aronen 2005; 曲先和王子成2010; Sisunandar等2010)。但也有少数报道认为超低温再生材料发生了极少位点的变异。如超低温保存后的冷杉用随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记检测出16.8%的变异条带(Aronen等1999);贯叶连翘经过超低温保存后染色体数量没有发生改变,但是非编码序列发生了微小的变化(Urbanova等2006);用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术检测,发现微藻超低温保存后发生了明显的变异条带(Muller等2007);

Harding等(2000)发现在超低温保存的种子再生材料中核小体与核糖体DNA结构发生了变化;Kaity等(2008, 2009)在超低温保存木瓜过程中发现再生材料基因组DNA发生了不同程度的改变,在超低温保存后的不同阶段存在1.5%~10.07%的基因组DNA变异。随着系统生物学的出现,人们还发现,环境的变化可以导致基因表观修饰的变化,进而引起基因突变。由此看来,基因不会代表一切,更不能决定一切。个体在发育和生长过程中获得的环境影响,能够被遗传给后代。

## 3 表观遗传变异研究

对超低温保存中的DNA甲基化变化进行检测和跟踪研究近年已引起该领域学者的重视,已有的研究表明,超低温处理后,材料的表观遗传信息确实也会发生变化,如DNA甲基化变化。Hao等(2001)应用甲基化敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)技术检测了超低温保存后苹果再生植株的DNA甲基化状态,发现保存后材料的DNA甲基化水平均有所降低。Kaity等(2008, 2009)在对超低温保存后木瓜的遗传和表观遗传研究中发现再生材料在不同阶段DNA甲基化发生了不同程度的改变,另外超低温技术中的快速冻融过程是影响植物存活率和基因组甲基化变化的主要原因。运用MSAP技术,Peredo等(2008)研究发现低温保存和超低温处理的蛇麻草(*Humulus lupulus*)与对照植株相比,36%的位点发生了甲基化。何艳霞和王子成(2009)对模式植物拟南芥所做的研究表明,超低温保存后材料发生了一定的DNA甲基化变化,并且这些变化的条带大部分可以通过有性生殖进行遗传传递。Johnston等(2009)研究发现虎耳草科酷栗属的植物不同基因型经过超低温保存后,抗寒性的基因型具有DNA甲基化增加现象,而对低温敏感的基因型则发生去甲基化,并且发现DNA甲基化是一个可逆的表观遗传学机制。陈芳等(2009)发现小麦经超低温保存后材料发生了不同程度的甲基化变化。曲先和王子成(2010)在对马铃薯茎尖超低温保存过程中发现有甲基化变异情况。DNA甲基化在高等生物的生命活动中具有维持基因组稳定及调节生长发育等重要功能,在植物发育和分化过程中,其水平不足或过高,都会导致生长发育的不正常和形态异常,如植株矮

化、叶片变小株成丛状等,而且许多特征可以遗传给后代(Chan等2005;侯雷平和李梅兰2001)。一些生物和非生物逆境因素常可导致DNA甲基化的变化,从而产生表观遗传变异。

超低温保存过程中植物材料要经历脱水、冷冻等处理,本质上都是逆境处理,在此过程中,材料经历了一系列胁迫。我们将“cryostress”译为超低温逆境,用来特指超低温保存过程中植物所受到的胁迫。最近,有人对超低温保存后拟南芥的基因表达情况进行了分析,结果表明,超低温处理会诱导一些缺氧、干旱、盐胁迫和低温等逆境诱导的基因的表达(Basu 2008)。而近年的研究表明,逆境处理对植物的表观遗传信息会产生很大的影响,当植物暴露于各种逆境条件下,不但其表观遗传修饰会发生变化,而且会建立起新的基因表达模式,这种新的基因表达模式有时可以连续遗传很多代(Boyko和Kovalchuk 2008)。目前该领域已成为国际上植物表观遗传学研究的热点,引起人们对生物进化的更深层次的思考,并可能用于植物的改良。

#### 4 超低温保存的筛选效应

如前所述,超低温保存的处理过程本质上涉及一系列逆境处理,这些逆境处理具有一定的筛选效应,如果处理材料本身具有某种异质性,则会导致再生材料发生分化。有研究表明超低温保存导致了一些细胞系的次生代谢物合成能力以及胚性和恢复生长能力的变化(Moukaridi等1999; Hitmi等1997;何光存等1998),可能就是某种选择效应造成的。小麦愈伤组织在不添加任何冷冻保护剂的情况下,经过逐步降温法超低温保存后,有不超过15%的愈伤组织恢复了生长,而将这些经过一次超低温保存的愈伤组织再进行第二次相同程序的超低温保存过程,则有30%~40%的愈伤组织恢复了生长,将从这些恢复生长的愈伤组织中再生的植株进行研究,其抗冻性升高。经过分析发现在这些愈伤组织中多了7个79~149 kDa的特异可溶性蛋白(Kendall等1990),可见超低温保存过程可以导致对抗冻力较高的细胞的选择。另外,对于嵌合体材料,由于超低温保存后再生过程中并不是所有的细胞都能够再生,异质的细胞就有可能因再生过程而发生分离,超低温保存对不同材料的影响和材料的遗传稳定性是相互关联的,异质群体中的不同基因型对超低温

保存的反应不同,从而导致选择作用,使保存后成活的培养物不同于原始培养物。

1997年,Brison等(1997)首次报道超低温保存不但可以保存植物种质,而且还可以去除病毒。Helliot等(2002)也发现感染香蕉花叶病和条纹病的香蕉病株的分生组织经超低温保存后可以去除30%的花叶病毒和90%的条纹病毒。Wang等(2003, 2008)及Wang和Valkonen(2008)用包埋-玻璃化法成功地去除了葡萄A病毒(*grapevine virus A*, GVA),成功率高达97%;最近,他们对0.5~1.5 mm大小(含有2~4个叶原基)的甘薯茎尖进行了玻璃化法超低温保存处理,结果所有再生的材料均脱除了甘薯黄萎病毒(*sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV)和甘薯轻型斑点病毒(*sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV),他们还将热处理法与低温疗法相结合,对可以通过授粉进行传播的传统茎尖培养不能脱除的木莓病毒(*raspberry bushy dwarf virus*, RBDV)进行了脱除。我们课题组采用低温疗法也成功将马铃薯S病毒(*potato virus S*, PVS)和马铃薯Y病毒(*potato virus Y*, PVY)脱除(结果待发表)。植物茎尖作为种质保存最重要的材料,其细胞组成也是异质的,其中包括有分化的细胞和未分化的细胞。在超低温保存过程中,分化的成熟细胞由于液泡较大并且含水量较多,在超低温处理时不容易脱水,因而易被形成的冰晶破坏致死;而未分化的细胞由于液泡较小或不含液泡,所以含水量少、胞质浓,在超低温保存后易于成活。有研究表明,对于感染病毒的植物,其未分化的分生组织细胞一般不含病毒。因而超低温保存过程可以将含有病毒的细胞冻死,而保留不含病毒的细胞,再生材料即可脱除病毒(Wang和Valkonen 2009)。利用超低温保存技术进行植物病毒脱除的技术被称为低温疗法(*cryotherapy*)。

病毒感染是一种生物逆境,会引起植物表观遗传信息的变化,如烟草花叶病毒(*tobacco mosaic virus*, TMV)感染烟草,使其基因组整体上甲基化增加,从而应对这种逆境,但同时也使一些特异位点发生去甲基化,因而导致高频重组的发生(Boyko等2007)。如前所述,超低温保存过程也使材料发生DNA甲基化变化,而对带病毒材料进行超低温保存处理,再生材料表观遗传信息会发生什么样的变化,

目前尚无有关报道。超低温脱毒材料与采用传统茎尖脱毒技术脱毒的再生材料的表观遗传与发育相似性如何, 需要进行深入研究, 以便更好地为低温疗法脱毒的实际应用提供支撑。

综上所述, 超低温保存后再生材料的遗传稳定性到底如何, 目前还没有最终的定论, 可能与所用材料本身的遗传特性及研究方法等都有一定的相关性, 也可能受检测手段所限制。作为一项重要的生物技术, 超低温保存对植物材料遗传稳定性的影响, 应该给予进一步的关注。尤其是超低温保存对表观遗传信息的影响以及利用超低温保存的筛选效应进行病毒脱除等方面的应用, 更应引起重视, 这是超低温保存方面研究的较新领域, 需要用多种植物材料、多种层次及多种检测手段来深入探讨。

### 参考文献

- 陈芳, 王子成, 何艳霞, 曲先(2009). 超低温保存小麦种子和幼苗的遗传变异. 核农学报, 23 (4): 548~554
- 何光存, 舒理慧, 廖兰杰, 殷晓辉, 盛腊红, 汪晓玲(1998). 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. 中国科学, 28 (5): 444~449
- 何艳霞, 王子成(2009). 拟南芥幼苗超低温保存后 DNA 甲基化的遗传变异. 植物学报, 44 (3): 317~322
- 侯雷平, 李梅兰(2001). DNA 甲基化与植物的生长发育. 植物生理学通讯, 37 (6): 584~588
- 梁宏, 王起华(2005). 植物种质的玻璃化超低温保存. 细胞生物学杂志, 27: 43~45
- 马千余, 徐立, 李志英, 李克烈(2007). 植物种质资源超低温保存技术研究进展. 热带作物学报, 28 (1): 105~110
- 曲先, 王子成(2010). 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. 植物生理学通讯, 46 (1): 11~16
- 肖洁凝, 黄学林(1999). 茎尖和芽的超低温保存. 生物工程进展, 19 (5): 46~51
- 章志宏, 胡中立(2000). 水稻单倍体不定芽超低温保存和植株再生及其遗传稳定性研究. 武汉植物学研究, 18 (3): 169~173
- Aronen TS, Krajinakova J, Haggman HM, Ryyanen LA (1999). Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. Plant Sci, 142: 163~172
- Basu C (2008). Gene amplification from cryopreserved *Arabidopsis thaliana* shoot tips. Curr Issues Mol Biol, 10: 55~60
- Boyko A, Kathiria P, Zemp FJ, Yao YL, Pogribny I, Kovalchuk I (2007). Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (virus-induced plant genome instability). Nucleic Acids Res, 35 (5): 1714~1725
- Boyko A, Kovalchuk I (2008). Epigenetic control of plant stress response. Environ Mol Mutage, 49: 61~72
- Brison M, De Boucaud MT, Pierronnet A, Dosba F (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus. Plant Sci, 123: 189~196
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE (2005). Gardening the genome DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nat Rev Genet, 6: 351~360
- DeVerno LL, Park YS, Bonga JM, Barrett JD (1999). Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.]. Plant Cell Rep, 18: 948~953
- Hao YJ, Liu QL, Deng XX (2001). Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal and molecular levels. Cryobiology, 43: 46~53
- Harding K, Marzalina M, Krishnapillay B, Nashatul Z, Normah MN, Benson EE (2000). Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved mahogany (*Swietenia macrophylla*) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal genes. J Trop For Sci, 12: 149~163
- Helliot B, Panis B, Poumay Y, Swennen R, Lepoivre P, Frison E (2002). Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). Plant Cell Rep, 20: 1117~1122
- Hitmi A, Sallanon H, Barthomeuf C (1997). Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability. Plant Cell Rep, 17: 60~64
- Johnston JW, Benson EE, Harding K (2009). Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm. Plant Physiol Biochem, 47: 123~131
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA (2009). Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones. Plant Cell Rep, 28: 1421~1430
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA, Dulloo ME (2008). Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. Plant Cell Rep, 27: 1529~1539
- Kendall EJ, Qureshi JA, Kartha KK, Leung N, Chevrier N, Caswell K, Chen THH (1990). Regeneration of freezing-tolerant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from cryoselected callus. Plant Physiol, 94: 1756~1762
- Martin C, Gonzalez-Benito ME (2005). Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. Cryobiology, 51: 281~289
- Medina JJ, Clavero-Ramirez I, Gonzalez-Benito ME, Galvez-

- Farfan J, Lopez-Aranda JM, Soria C (2007). Field performance characterization of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) plants derived from cryopreserved apices. *Sci Hort*, 113: 28~32
- Moukadiri O, Deming J, O'Connor JE, Carnejo MJ (1999a). Phenotypic characterization of the progenies of rice plants derived from cryopreserved calli. *Plant Cell Rep*, 18: 625~632
- Moukadiri O, Lopesb CR, Cornejo MJ (1999b). Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion storage in liquid nitrogen. *Physiol Plant*, 105: 442~449
- Muller J, Day JG, Harding K, Hepperle D, Lorenz M, Friedl T (2007). Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Am J Bot*, 94: 799~808
- Peredo EL, Arroyo-Garcia R, Reed BM, Revilla MA (2008). Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology*, 57: 234~241
- Rypnanen L, Aronen T (2005). Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 83: 21~32
- Scocchi A, Faloci M, Medina R, Olmos S, Mroginski L (2004). Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica*, 135: 29~38
- Sisunandar, Rival A, Turquay P, Samosir Y, Adkins SW (2010). Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. *Planta*, 232: 435~447
- Turner S, Krauss SL, Bunn E, Senaratna T, Dixon K, Tan B, Touchell D (2001). Genetic fidelity and viability of *Anigozonihos iridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. *Plant Sci*, 161: 1099~1106
- Urbanova M, Kosuth J, Cellarova E (2006). Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. *Plant Cell Rep*, 25: 140~147
- Wang QC, Mawassi M, Li P, Gafny R, Sela I, Tanne E (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci*, 165: 321~327
- Wang QC, Cuellar WJ, Rajamaki ML, Hirata Y, Valkonen JPT (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol Plant Pathol*, 9 (2): 237~250
- Wang QC, Valkonen JPT (2008). Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathol*, 57: 338~347
- Wang QC, Valkonen JPT (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends Plant Sci*, 14 (3): 119~122