

留兰香茎尖超低温保存及遗传变异分析

郭强梨, 李忠爱, 邵 丽, 王子成*

(河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475004)

摘要: 为了长久保留留兰香种质资源, 以留兰香(*Menthae spicatae* L.) 茎尖为材料, 对其玻璃化超低温保存条件进行研究, 并运用扩增片段长度多态性(AFLP)和甲基敏感扩增多态性(MSAP)对玻璃化超低温保存再生材料(处理组)的遗传与表观遗传稳定性进行分析。结果表明: 留兰香试管苗于 4℃ 低温锻炼 28 d, 于添加 2 mol/L 甘油的 MS 培养基中预培养 4 d, 0℃ 下于 PVS₂ 中脱水 50 min, 液氮保存 1 h 或者更长时间, 成活率最高, 可达 60% 左右, 再生植株分化正常; 超低温处理后再生材料(处理组)与正常继代材料(对照组)之间未发现有 DNA 片段的差异; 与对照相比, 处理组的材料均发生了甲基化状态与水平的变化, 全基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平降低, 另外, 甲基化与去甲基化位点比率分别为 8.93% 和 12.3%, 说明超低温处理能够引起 DNA 甲基化的变化。由此推测, DNA 甲基化可能是植物适应超低温保存的机制之一。

关键词: 留兰香; 超低温保存; AFLP; MSAP; DNA 甲基化

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)06-0128-05

Cryopreservation of *Mentha spicata* L. Germplasm and Analysis of Genetic Variation

GUO Qiang-li, LI Zhong-ai, SHAO li, WANG Zi-cheng*

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: In order to conservation of spearmint (*Mentha spicata* L.) for a long time, the shoot-tips of spearmint were treated by vitification method of cryopreservation. The technologies of methyl-sensitive amplified polymorphism (MSAP) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) were used to analyze the genetic and epigenetic stability of regenerated plants. The results demonstrated that the shoot tips were cryoacclimatized at a low temperature (4℃) for 28 days, pre-cultured in the MS medium with addition of 2 mol/L glycerol after 4 days, dehydrated in PVS₂ at 0℃ for 50 min, and then liquid nitrogen preserved for 1 hours or longer, the survival rate was highest up to 60%. No variation band was found between the treatment and the control. The DNA methylation level was reduced in recycled materials treated by cryopreservation. Methylation and demethylation of DNA were 8.93% and 12.3%, respectively. It suggests that DNA methylation might be one of the mechanisms used by plants to combat cryopreservation.

Key words: *Mentha spicata* L.; cryopreservation; AFLP; MSAP; DNA methylation

留兰香(*Mentha spicata* L.) 又名绿薄荷、花香菜, 为唇形科薄荷属多年生草本植物, 在民间被广泛药用和食用^[1-3], 也可用作香皂之香精。另外, 留兰

香可用作地被植物, 在水土流失严重的坡地种植可有效减轻和控制水土流失, 起到良好的生态保护作用^[4-6]。我国关于留兰香种质资源保存的研究目前

收稿日期: 2011-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900973)

作者简介: 郭强梨(1987-), 女, 河南滑县人, 在读硕士研究生, 研究方向: 基因工程与细胞工程。E-mail: 578580087@qq.com

* 通讯作者: 王子成(1974-), 男, 河南邓州人, 副教授, 博士, 主要从事植物生物技术与表观遗传研究。E-mail: wzc@henu.edu.cn

尚鲜见报道。作为多年生草本植物,留兰香在长期种植过程中,易感染各种病害,造成病毒的积累,使产量下降。建立离体保存技术,对于种质保存和病毒脱除都具有重要的意义^[7-8]。鉴于此,采用玻璃化法对留兰香离体茎尖的超低温保存技术进行了初步研究,并对超低温保存后留兰香叶片 DNA 甲基化状态和水平进行了检测,以期为该物种种质的长期保存提供技术手段。

1 材料和方法

1.1 材料

以河南大学生命科学学院植物种质资源与遗传工程实验室所提供的留兰香幼苗为试验材料,选用继代培养基 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA 进行增殖培养,pH 值 5.8,培养温度(25±2)℃,光照时间 12 h/d。

1.2 方法

1.2.1 超低温保存过程 参照王子成等^[9]的方法,具体操作步骤如下。

①低温锻炼:将继代培养 20 d 的留兰香试管苗置于 4℃ 冰箱中进行低温锻炼,并设置时间梯度,分别为 0、7、14、21、28、35、42 d。

②预培养:取低温锻炼后的试管苗,在无菌条件下切取 1~2 mm 长的茎尖,置于固体预培养培养基中,分别预培养 1、2、3、4、5、6 d,然后转入加有液体预处理培养基的无菌冷冻管中,每管 10 个茎尖,20℃ 下处理 20 min。固体预培养培养基为 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 值 5.8;液体预处理培养基为 MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖,pH 值 5.8。

③玻璃化保护剂(PVS₂)处理:用无菌胶头滴管吸出液体预处理培养基,加入玻璃化溶液 PVS₂ 并置于 0℃ 冰水混合物中处理不同时间,分别为 20、30、40、50、60、70、80 min。PVS₂ 溶液为 MS+30% 甘油+15% 乙二醇+15% 二甲基亚砷+0.4 mol/L 蔗糖,pH 值 5.8。

④液氮保存:将冷冻管放入纱布袋,迅速投入液氮中保存,液氮保存时间设为 1、24、48、72、96 h 5 个梯度。将在液氮中保存不同时间的材料快速取出,40℃ 水浴中化冻 2~3 min,在超净工作台下吸去冷冻保护液,然后在 20℃ 下用添加有 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 洗涤液将茎尖洗涤 3 次,每次 10 min。将茎尖取出并置于无菌滤纸上吸去残留在其表面上的洗涤液成分后,接种到恢复培养基上。恢复培养基为 MS+1.0 mg/L GA₃+1.0 mg/L 6-BA+3% 蔗糖+

0.7% 琼脂,pH 值 5.8。暗培养 3 d 后转移到正常光照条件下进行恢复培养,7 d 后统计成活率。

成活率=超低温保存后成活的茎尖数/保存的总茎尖数×100%。

1.2.2 DNA 提取 取超低温保存处理组和对照组(正常继代)的留兰香叶片,使用 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 进行 DNA 提取。

1.2.3 DNA 检测 取 DNA 原液 8.0 μL,稀释至 3.0 mL,用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光值,计算 DNA 纯度和原液 DNA 质量浓度。DNA 纯度=OD₂₆₀/OD₂₈₀,DNA 质量浓度(ng/mL)=50×OD₂₆₀×稀释倍数。取 DNA 原液 2 μL,1% 琼脂糖凝胶上稳压(5 V/cm)电泳 30 min,检测 DNA 的质量,若主条带明亮,并且无拖尾现象,则 DNA 可用于后续试验。

1.2.4 AFLP 分析 AFLP 分析参照 Hao 等的方法^[10],略作改动:①选用 DNA 双酶切体系:20 μL 体系含 200 ng DNA、3 U *EcoR* I 和 3 U *Mse* I,37℃ 酶切 3 h,然后 65℃ 保温 2.5 h;②连接:*EcoR* I 接头,*Mse* I 接头,T4 连接酶,25℃ 连接 2.5 h;③预扩:引物为 E-A、M-C;④选扩。⑤选扩产物 94℃ 变性 5 min 后上样于 6% PAGE,恒功率 55 W 电泳 2.5 h,固定、银染漂洗与显色后拍照并分析结果。

1.2.5 MSAP 分析 基因组的 DNA 甲基化变化采用 MSAP 方法分析,参照 Cervera 等^[11]和李雪林等^[12]的方法,并略作改动。与上述 AFLP 方法类似,其中内切酶组合为 *EcoR* I/*Hap* II 和 *EcoR* I/*Msp* I。接头为 *EcoR* I 接头和 H-M 接头,预扩引物为 E-A 和 *Hap* II-Msp I。

2 结果与分析

2.1 不同处理对超低温保存留兰香茎尖存活率的影响

2.1.1 低温锻炼时间 如图 1 所示,低温锻炼 28 d,留兰香茎尖存活率高达 59.2%,然后随着锻炼时间的延长,成活率出现下降趋势。且叶片逐渐枯黄、淡褐色的茎尖增多,低温锻炼 42 d 时存活率降到最低 4.0%。

2.1.2 预培养时间 将低温锻炼 28 d 的留兰香茎尖转入固体预培养培养基中,结果如图 2 所示,茎尖成活率随预培养时间的延长呈现先升高后降低的趋势,预培养 3 d 时,超低温保存效果最好,成活率达到 62.5%。

2.1.3 PVS₂ 处理时间 PVS₂ 处理是超低温保存过程中极为关键的一步。结果表明(图 3):PVS₂ 处

理 50 min 时的茎尖成活率最高,时间过短或更长都不利于茎尖的成活和再生。可能是由于时间过短导致玻璃化不完全,冻存过程中植物茎尖受到损伤;时间过长, PVS_2 的毒害作用导致茎尖存活率下降。

2.1.4 液氮保存时间 由图 4 可知,液氮保存时间对植物茎尖的成活率影响不大,可能是由于在超低温状态下细胞生理代谢水平几乎降为零,处于一种“生机停顿”状态,时间梯度对试验结果已经没有意义(图 4)。这也可以说明液氮保存可以作为植物种质资源长期保存的一种有效方法。

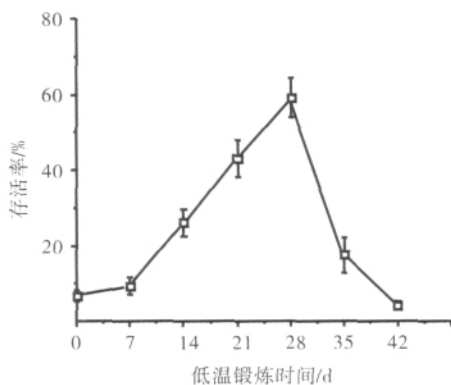


图 1 低温锻炼时间对超低温保存后留兰香茎尖存活率的影响

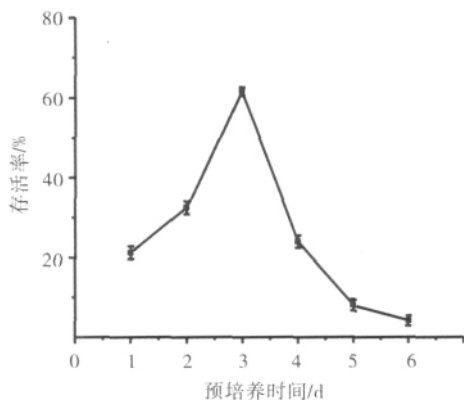


图 2 预培养时间对超低温保存后留兰香茎尖存活率的影响

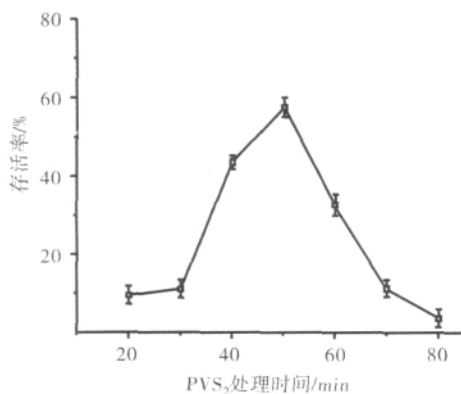


图 3 PVS_2 处理时间对超低温保存后留兰香茎尖存活率的影响

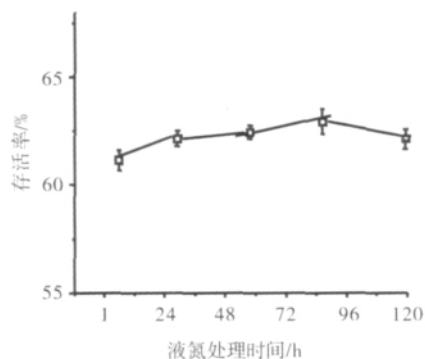


图 4 液氮处理时间对超低温保存后留兰香茎尖存活率的影响

2.2 应用 AFLP 分子标记检测留兰香基因组稳定性结果

应用 AFLP 技术对处理组和对照组的材料进行检测分析,6 对引物共扩增出可统计条带 365 条。如图 5 所示,2 组材料之间没有出现多态性位点。说明对照与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。



H1, H2 为 $EcoR$ I / Mse I 酶切; H1、H2 泳道分别为对照组和处理组的 AFLP 带型

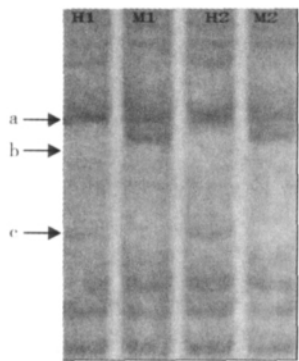
图 5 超低温处理与对照之间基因组的 AFLP 扩增结果

2.3 应用 MSAP 分子标记检测留兰香基因组 DNA 甲基化结果

2.3.1 甲基化水平 Hpa II 和 Msp I 是一组同裂酶,二者均识别并切割 5'CCGG3' 序列,但是对胞嘧啶的甲基化敏感性不同。 Hpa II 对胞嘧啶的甲基化极其敏感,能识别并切割非甲基化和半甲基化位点,而不能切割全甲基化位点。而 Msp I 能识别并切割非甲基化和全甲基化位点而不能切割半甲基化位点。

处理组和对照组的 DNA 经 Hpa II / $EcoR$ I (H) 和 Msp I / $EcoR$ I (M) 酶切后的产物有 4 种类型,但是,在聚丙烯酰胺凝胶电泳分析胶上只能检测出 3 种类型。其中,类型 I 表明 CCGG 位点没有发生甲基化变化(如图 6 中 a 所示),类型 II 表明 CCGG 位点发生了半甲基化(如图 6 中 b 所示),类

型Ⅲ表明 CCGG 位点发生了全甲基化(如图 6 中 c 所示)。由表 1 可知,经超低温处理后留兰香全基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平降低,并且全甲基化率高于半甲基化率。



H1,H2 为 *Hpa* II/*Eco*R I 酶切,M1,M2 为 *Msp* I/*Eco*R I 酶切;H1 和 M1 泳道为对照组的 MSAP 带型;H2 和 M2 泳道为处理组的 MSAP 带型

图 6 超低温处理与对照之间基因组的甲基化敏感性扩增结果

2.3.2 甲基化状态 利用 12 对不同引物组合对处理组和对照组的 DNA 双酶切产物进行扩增,共出现 12 种带型(表 2),甲基化带型主要有多态性和单态性 2 种。多态性即对照与处理组之间有不同的带型[甲基化(A 型)、去甲基化(B 型)和不定类型(C 型)],表明 CCGG 位点甲基化状态在超低温处理之后发生改变。单态性即对照组与处理组之间有相同的带型(D 型),表明低温处理后 CCGG 位点的甲基化状态没发生变化。

由表 3 可知,处理组的 DNA 甲基化(A 型)位点数为 45 个,占总甲基化多态性扩增位点数的 8.93%;去甲基化(B 型)位点数为 62 个,占 12.3%;总甲基化多态性为 23.02%;甲基化状态未发生变化(D 型)的比率为 76.98%。

由此,处理组与对照组相比,总甲基化比率降低;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 1 超低温保存对留兰香基因组 DNA 甲基化水平的影响

样本	未甲基化带数/个	完全甲基化带数/个	半甲基化带数/个	总扩增带数/个	总甲基化带数/个	总甲基化比率/%
对照组	263(54.45%)	189(39.13%)	31(6.42%)	483	220	45.55
处理组	304(63.87%)	144(30.25%)	28(5.88%)	476	172	36.10

注:括号中数据为占扩增总数的比例。

表 2 处理组与对照组材料的甲基化带型

酶切方式				甲基化状态变化		变异位点 数/个	带型
H	M	H	M	处理前	处理后		
0	0	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	4	B3
0	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	7	B4
0	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	31	B1
1	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	20	B2
1	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	8	A2
1	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	9	A1
0	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC	18	A3
1	0	0	0	CCGG CCGG GGCC GGCC	CCGG GGCC	10	A4
0	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG CCGG GGCC GGCC	9	C
1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	246	D1
1	0	1	0	CCGG CCGG GGCC CCGG	CCGG CCGG GGCC GGCC	11	D2
0	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	131	D3

注:C 和 CC 表示甲基化的胞嘧啶;1:有带,0:无带。

表 3 超低温保存对留兰香基因组 DNA 甲基化状态的影响

样本	甲基化 带数/个	总甲基化多态性带型				单态性带型 (D 型)
		A 型	B 型	C 型	多态性	
处理组	504	45(8.93%)	62(12.3%)	9(1.8%)	116(23.02%)	388(76.98%)

注:甲基化带数=A+B+C+D;括号中数据为占甲基化带数的比率。

3 讨论

本研究对留兰香的超低温保存技术进行了初步研究,发现采用低温锻炼和预培养可以大大提高留兰香超低温保存成活率,而 PVS₂ 处理时间也对超低温保存成活有重要影响,这与其他植物超低温保存的结果相似^[9,13]。从形态以及分子方面对超低温保存后再生留兰香材料进行了遗传稳定性检测。就形态上,处理组与对照组相比没有明显的变化; AFLP 分析表明,处理组与对照组之间未发现差异条带,说明留兰香材料在 DNA 水平上没有发生遗传变异,这与 Kaity 等、Peredo 等在木果上的研究结果一致^[14-15];MSAP 分析表明,处理组的 DNA 胞嘧啶甲基化水平降低,并且全甲基化率高于半甲基化率,另外甲基化与去甲基化分别为 8.93% 和 12.3%,这说明了超低温处理能够引起 DNA 甲基化的变化。在经超低温处理的再生材料表现遗传变异方面有也有报道,如 Kaity 等^[14]、Peredo 等^[15]与何艳霞等^[16]的研究结果表明,经过超低温处理的材料与对照组相比均发生了甲基化变化。应该指出的是,超低温保存后再生的材料中留兰香油含量等与对照有无区别,还需要进行研究,另超低温保存后再生材料的病毒脱除情况也需要进一步分析。

参考文献:

- [1] 李新忠,顾斌. 留兰香高产栽培技术[J]. 农村科技, 2007(4):52-53.
- [2] 柴明良. 留兰香的试管繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1994(1):30.
- [3] Li X, Niu X M, Bressan R A. Efficient plant regeneration of native spearmint (*Mentha spicata* L.) [J]. Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1999, 35(4):333-338.
- [4] 韩卫丽,崔保安,张红英. 留兰香提取物体外抗菌作用初步研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1):1-4.
- [5] 王小敏,梁呈元,李维林. 留兰香组织培养及快速繁殖条件的优化[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4):38-42.
- [6] 何璞,康占国. 留兰香的生产应用[J]. 河南农业, 2004(8):21.
- [7] 覃灵华,刘华英. 罗汉果茎尖玻璃化法超低温保存初探[J]. 河南农业科学, 2008(10):102-105.
- [8] 吴永杰,赵艳华,周明德. 苹果休眠茎尖的超低温保存研究[J]. 华北农学报, 1999, 14(1):129-133.
- [9] 王子成,邓秀新. 玻璃化超低温保存柑桔茎尖级植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4):301-306.
- [10] Hao Y J, You C X, Deng X X. Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation[J]. Cryo-letters, 2002, 23(1):37-46.
- [11] Cervera M, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater J. Analysis of methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268:543-552.
- [12] 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):588-596.
- [13] 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 PoxPotyvirus[J]. Plant Sci, 1997, 123:189-196.
- [14] Kaity A, Ashmore S E, Drew R A. Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28:1421-1430.
- [15] Peredo E L, Arroyo-Garcia R, Reed B M, et al. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.) [J]. Cryobiology, 2008, 57:234-241.
- [16] 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):317-322.