

水稻愈伤组织超低温保存体系的建立

李天菲, 林田, 滕小英, 周丽, 韩静, 刘鸿艳, 罗利军
(上海市农业生物基因中心, 上海 201106)

摘要: 水稻种质资源的长期有效保存对于世界粮食安全至关重要, 而超低温保存是实现这一目标的最佳方式。本研究以水稻的胚性愈伤组织为材料, 利用冻存后恢复培养阶段的新生愈伤率和新生愈伤分化率来评价不同品种不同粒级大小的胚性愈伤组织、不同浓度蔗糖预培养, 以及高糖预培养和高糖预培-玻璃化处理 2 种预处理方式对水稻愈伤组织超低温保存效率的影响, 并选用自主开发的 15 对水稻 SSR 标记引物, 对超低温保存前后的愈伤组织分化的幼苗进行遗传多样性鉴定。研究表明, 粳稻日本晴和籼稻早恢 3 号粒径为 1.6~3.0 mm 和 >3.0 mm 的愈伤组织超低温保存后的新生愈伤率都显著高于本品种粒径 <1.6 mm 的愈伤组织; 早恢 3 号愈伤组织经 100 g/L 和 170 g/L 蔗糖预培养后的新生愈伤率极显著高于 240 g/L 蔗糖预培养。粳稻 WDR48、籼稻日本晴和籼稻早恢 3 号仅采用高糖预培处理的新生愈伤率都极显著高于本品种玻璃化处理的新生愈伤率。新生愈伤分化率在处理间与品种间都无显著差异。简单序列长度多态性 (SSLP, simple sequence length polymorphism) 鉴定表明超低温保存前后的愈伤组织生成的幼苗遗传性稳定。本研究表明利用愈伤组织高糖预培养-直接超低温冻存是一种易操作、高通量、稳定可靠的中长期保存水稻种质资源的方法。

关键词: 水稻; 愈伤组织; 超低温保存

Establishment of Rice Embryonic Callus Cryopreservation System

LI Tian-fei, LIN Tian, TENG Xiao-ying, ZHOU Li, HAN Jing, LIU Hong-yan, LUO Li-jun
(Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106)

Abstract: Effective long-term conservation of rice germplasm resources is crucial to world food security, and cryopreservation is the best way to achieve this goal. In this study, a method with rice embryogenic callus high sugar preculture and direct liquid nitrogen cryopreservation was established, and the callus proliferation rate and the differentiation rate of proliferative calli were used to evaluate the cryopreservation efficiency directly. The results showed that the callus proliferation rates of japonica rice Nipponbare and indica rice Hanhui 3 with sizes of 1.6-3.0 mm and >3.0 mm was significantly higher than those of <1.6 mm of the same cultivar after cryopreservation. The callus proliferation rates of Hanhui 3 after preculture with 100 g/L sucrose and 170 g/L sucrose were significantly higher than those after preculture with 240 g/L sucrose. The callus proliferation rates of japonica rice WDR48, japonica rice Nipponbare and indica rice Hanhui 3 treated only with high sugar preculture were significantly higher than those treated with vitrification. There was no significant difference in callus differentiation rate among treatments and cultivars. Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) identification indicated that seedlings regenerated from calli either with or without cryopreservation were genetically stable. The study indicated that callus preculture with high sucrose and direct cryopreservation is an easy, high-throughput, stable and reliable method for long-term preservation of rice germplasm resources.

Key words: rice; callus; cryopreservation

收稿日期: 2021-05-10 修回日期: 2021-05-10 网络出版日期: 2021-05-12

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210510002>

第一作者研究方向为植物种质资源收集保存与评价创新, E-mail: ltf@sagc.org.cn

通信作者: 刘鸿艳, 研究方向为种质资源评价创新与水稻抗逆, E-mail: lhy@sagc.org.cn

罗利军, 研究方向为作物种质资源与遗传育种, E-mail: lijun@sagc.org.cn

基金项目: 上海市农作物种质资源共享服务平台 (18DZ2293700); 国家农作物种质资源共享服务平台 (上海) (NICGR2021-21)

Foundation projects: Shared Platform of Crop Germplasm Resources in Shanghai (18DZ2293700), Platform for National Crop Germplasm Resources (Shanghai) (NICGR2021-21)

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是全球最重要的粮食作物之一, 世界上大约 40 亿人口以大米为主食 (CGIAR, <http://ricecrp.org/>)。但随着全球工业化背景下自然环境迅速地恶化, 以及现代人类急速扩张的经济活动, 水稻种植面积日益减少, 水稻种质资源的遗传多样性逐渐丧失, 自然资源中原有的优质抗逆基因 (如抗虫、抗病、耐旱、耐水淹等) 面临被彻底丢失的风险, 因此, 研究建立水稻种质资源的长期稳定保存技术至关重要^[1-2]。

目前, 世界上对水稻种质的长期保存方式以低温低湿 (温度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度 20%) 种子库保存为主。种子库建设投资大、技术要求高、运转费用较昂贵, 而且随着保存年限的延长种子生活力也会有不同程度的下降。卢新雄等^[1]对中国国家种子库内贮存 12 年的 23 种作物 1.8 万余份种子跟踪监测结果表明, 约 1.1% 的种子生活力明显下降, 发芽率降至 70% 以下。在针对水稻种子贮藏过程中生活力丧失特性的研究中发现, 在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 老化条件下, 水稻种子生活力存活曲线呈反 S 型, 贮藏初期 (0~360 d) 种子生活力下降较缓慢, 贮藏 360~450 d 后发芽率出现显著下降, 而种子根苗干重、发芽指数和活力指数都在贮藏 180~270 d 已出现极显著下降^[3]。

除了低温种子库这一主要的长期保存方式, 超低温保存 (Cryopreservation) 也是近 10 年来广泛采用的长期保存植物资源的方法。该技术是将生物样品保存在液氮 ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) 或氮蒸汽 (约 -165 到 $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$) 中^[4], 在上述温度条件下, 细胞处于生理停滞状态, 新陈代谢和生长活动几乎完全停止, 不会发生遗传性状的改变或修饰, 同时细胞活力和形态发生的潜力仍然保留, 因而, 超低温保存在理论上可以无限期地保存生物样品^[5-7]。这种储存方式占用空间小, 建设维护成本低, 更便于种质交流, 是植物种质资源长期稳定保存的重要方法。目前, 已有超过 10000 份植物离体培养物以超低温保存的方式被长期安全保存, 其中 80% 以上属于马铃薯、木薯、香蕉、桑葚和大蒜等农作物或经济作物^[5]。

20 世纪 90 年代以来, 我国对水稻的超低温保存研究也取得了一系列进展。黄纯农等^[8]将水稻胚性悬浮细胞在含有山梨醇 (Sorbitol) 的培养基中 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预培养 3 d, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温培养 1 d, 再投入液氮冻存, 恢复培养的细胞用 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑 (TTC, 2, 3, 5-triphenyl terrazolium chloride) 染色法检测, 相对存活率 (样品细胞和对照细胞的活性百分比) 最高可达 57%。严庆丰等^[9]利用冷冻保护剂

和第二步程序降温法对粳稻悬浮细胞系进行超低温冻存, 解冻后 58% 的细胞系恢复生长, 并再生出幼苗。王君晖等^[10]通过优化的玻璃化方法冻存水稻胚性悬浮细胞, 获得再生可育植株。田永中等^[11]用冰冻保护剂处理光敏感核不育水稻农垦 58 的愈伤组织及悬浮细胞, 利用程序降温仪以 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度从 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降到 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 停留 5 min; 继续降温到 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 停留 15 min; 再降温到 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 停留 60 min, 最后投入液氮保存, 结果表明, 10% 二甲基亚砜 (DMSO, dimethyl sulfoxide) + 0.5 mol/L 山梨醇的冰冻保护剂处理的细胞, 经 TTC 染色相对存活率最高可达 85.9%, 并能脱分化出苗。殷晓辉等^[12]以 10% DMSO + 8% 葡萄糖为冰冻保护剂, 采用程序降温的方法成功对 7 种野生稻愈伤组织进行超低温冻存, TTC 法检测细胞存活率可达 87.9%。何光存等^[13]研究发现无分化能力的疣粒野生稻愈伤组织经过超低温保藏后分化能力得到了提高, 并从中获得了好的胚性细胞系。

虽然水稻的超低温保存研究已有不少成功例子, 但其并未被广泛实践应用。究其原因可能主要在 3 个方面: 一是稳定可靠的超低温保存技术获得困难, 研发周期长; 二是以梯度降温或玻璃化为基础的超低温保存技术操作较为繁琐, 不适宜对大量材料同时进行预处理或冻后洗脱等操作; 三是水稻超低温保存后再分化成苗的效率仍有待进一步提高。

本研究选取 3 个组培力较强的水稻品种日本晴、WDR48 和早恢 3 号, 以成熟胚诱导得到的胚性愈伤组织为材料, 探索建立更便捷高效的、易于高通量处理的水稻超低温保存技术体系, 并对愈伤组织超低温保存后的新生愈伤率及新生愈伤分化率进行评价, 以为水稻种质资源的长期稳定保存提供新的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验中使用的水稻材料包括水稻基因功能研究常用供体品种日本晴, 上海市农业生物基因中心培育的节水抗旱稻骨干品种 WDR48 和早恢 3 号。组织培养力是超低温保存成功的基础, 在课题组前期研究中, 以上 3 个品种在组织培养过程中, 愈伤组织增殖生长和分化成苗的能力均较强, 综合组培力相对较高, 因此作为试验材料。具体的材料信息见表 1。

表 1 供试水稻材料

Table 1 Rice materials in experiment

材料名称 Material	亚种类型 Type	说明 Note
日本晴 Nipponbare	粳稻	常规稻
WDR48	粳稻	节水抗旱稻
早恢 3 号 Hanhui 3	籼稻	节水抗旱稻

1.2 水稻胚性愈伤组织的获得

参照李天菲等^[14]方法,挑选成熟饱满无病斑的水稻种子,砻谷去壳后先用 70% 酒精表面消毒 1 min,再用 2.5% 次氯酸钠浸泡振荡灭菌 20 min,灭菌水清洗 4~5 次。消毒后的种子接种到含有 3 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid)的 N6 培养基(Chu's N6 medium)上,培养条件为 30 ℃,光照 12 h/d,光照强度 1000~1200 lux。诱导培养 30 d 左右获得初生愈伤组织,再转接到继代培养基进行增殖培养,继代培养基为含有 2 mg/L 2,4-D 的 N6 培养基,28 ℃ 下暗培养 20 d 左右可获得浅黄色、偏粒型、较致密的胚性愈伤组织(EC, embryonic callus),如图 1。

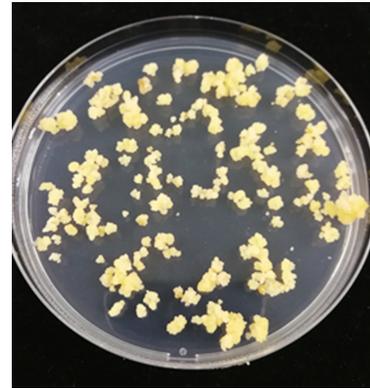


图 1 日本晴胚性愈伤组织
Fig.1 Embryonic calli of Nipponbare

1.3 愈伤组织的粒径大小筛选和高糖预培养

在水稻愈伤组织培养过程中,会生成大小不同的愈伤组织粒/块。为了检验愈伤组织大小是否会影响其超低温保存效率,本研究将增殖培养后的胚性愈伤组织先后用 8 目(孔径 3.0 mm)和 12 目(孔径 1.6 mm)的筛网进行筛选,分别获得 >3.0 mm, 1.6~3.0 mm 和 <1.6 mm 3 种粒径的愈伤组织颗粒。不同粒径的愈伤组织形态如图 2 所示。将筛选分类后的愈伤组织转接到添加 100 g/L 蔗糖和 2 mg/L 2,4-D 的 N6 培养基上进行高糖预培养,预培养条件为 28 ℃ 暗培养,培养时间为 7~9 d。

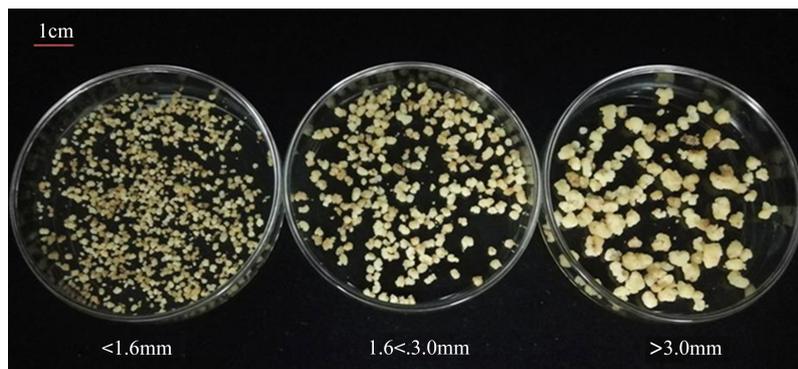


图 2 日本晴不同粒径大小的胚性愈伤组织
Fig.2 Different-sized embryonic calli of Nipponbare

1.4 愈伤组织的直接冻存和解冻

在超净工作台内将预培后的愈伤组织装入 5 mL 冻存管,每管装载量不超过 2/3 体积,然后迅速投入液氮中冻存 1 d 以上。解冻时从液氮中取出冻存管,立即放入 40 ℃ 水浴中,适度晃动冻存管,快速解冻 2~3 min。在超净台内将愈伤组织倒在滤纸上,自然干燥 20~30 min。

1.5 愈伤组织的玻璃化冻存和解冻

参照林田等^[15]的方法,在超净工作台内将高

糖预培后的胚性愈伤组织装入 2 mL 冻存管,每管装载量不超过 1/2 体积,加入装载液(LS, loading solution)至 1.8 mL,室温振荡 20 min,用移液枪移除 LS 液,再加入现配的玻璃化试剂(PVS2, plant vitrification solution 2),冰水中振荡 40 min,用移液枪吸干 PVS2,加入新鲜的 PVS2,没过愈伤即可,投入液氮冻存 1 d 以上。解冻时从液氮中取出冻存管,立即放入 40 ℃ 水浴中,适度晃动冻存管,快速解冻 2~3 min,用移液枪移除冻存管内的 PVS2,再加

入洗涤液 (US, unloading solution), 室温振荡清洗 2 次, 每次 10 min, 在超净台内将愈伤组织倒在滤纸上吸干 US 液。

1.6 解冻后愈伤组织的恢复培育及分化成苗

将解冻后的愈伤组织接种到含有 2 mg/L 2, 4-D 的 N6 培养基上进行恢复培养, 恢复培养条件为 28~30 °C 暗培养, 培养 14 d 后在原愈伤组织处可观察到愈伤生长膨大或增殖生成新愈伤组织块, 如图 3 所示。挑选新生长出的愈伤组织, 转入含有 2.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤 (6-BA, 6-benzylamino purine), 2.0 mg/L 激动素 (KT, kinetin), 0.2 mg/L 3-吲哚乙酸 (IAA, 3-indole acetic acid) 和 0.2 mg/L 萘乙酸 (NAA, α -naphthaleneacetic acid) 的 MS 培养基 (Murashige and Skoog medium) 上进行分化培养, 培养条件为 25 °C, 光照 12 h/d, 光照强度 4000~5000 lux, 培养 20~30 d 后可分化出绿苗, 如图 4 所示。

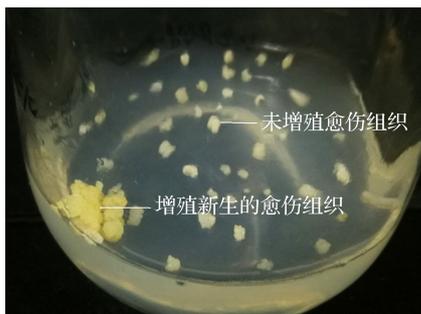


图 3 恢复培养中增殖新生的愈伤组织
Fig.3 Proliferative calli during recovery culture



图 4 新生愈伤组织分化培养长出绿苗
Fig.4 Green seedlings grown from proliferative calli by differentiation culture

1.7 SSLP 鉴定胚性愈伤组织超低温保存后再生苗的遗传稳定性

将未进行预培养的水稻愈伤组织、直接冻存后的新生愈伤组织, 以及玻璃化冻存后的新生愈伤组织进行分化培养获得水稻幼苗。利用全式金公司 TransDirect Plant Tissue PCR Kit, 提取绿苗 DNA。参照冯芳君等^[16]方法, 利用本中心实验室开发的 15 对水稻 SSR 标记, 对提取的 DNA 进行遗传多样性分析。SSR 标记名称及其在染色体上的分布如表 2 所示。

反应体系 (25 μ L) 如下: 0.5 μ L Phanta Max Super-Fidelity DNA polymerase, 1.0 μ L DNA, 1.0 μ L 上游引物, 1.0 μ L 下游引物, 8.5 μ L ddH₂O。在

表 2 15 对 SSR 标记引物序列及其在染色体上的分布

Table 2 SSR primer sequences and their distribution on rice chromosomes

标记 Marker	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer	染色体 Chromosome
RM 499	TACCAAACACCAACTGCG	ACCTGCAGTATCCAAGGTACG	1
RM 101	GTGAATGGTCAAGTGACTTAGGTGGC	ACACAACATGTTCCCTCCCATGC	2
RM 423	AGCACCCATGCCTTAIGTTG	CCTTTTCAGTAGCCCTCCC	2
RM 475	CCTCACGATTTTCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	2
RM 520	AGGAGCAAGAAAAGTTCCCC	GCCAATGTGTGACGCAATAG	3
RM 551	AGCCAGACTAGCATGATTG	GAAGGCGAGAAGGATCACAG	4
RM 480	GCTCAAGCATTCTGCAGTTG	GCGCTTCTGCTTATTGGAAG	5
RM 204	GTGACTGACTTGTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC	6
RM 234	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGAG	7
RM 264	GTTGCGTCTACTGCTACTTC	GATCCGTGTCGATGATTAGC	8
RM 339	GTAATCGATGCTGTGGGAAG	GAGTCATGTGATAGCCGATATG	8
RM 257	CAGTCCGAGCAAGAGTACTC	GGATCGGACGTGGCATATG	9
RM 591	CTAGCTAGCTGGCACCAGTG	TGGAGTCCGTGTTGTAGTCG	10
RM167	GATCCAGCGTGAGGAACACGT	AGTCCGACCACAAGGTGCGTTGTC	11
RM 235	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC	12

GeneAmp PCR System 9700 上扩增: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min; 10 °C。取 10.0 μL PCR 扩增产物于 BIO-RAD PAC 300 型电泳仪进行 3% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 25 min), BIO-RAD 凝胶成像系统中拍照记录。

1.8 数据统计分析

为了更准确更直接地评价水稻愈伤组织的超低温保存效率, 本研究引入新生愈伤率和新生愈伤分化率 2 个指标来评价愈伤组织的超低温保存效率。具体计算方法如下:

新生愈伤率 = 恢复培养中能够增殖长出愈伤组织的愈伤组织数量 (个) / 恢复培养的愈伤组织数量 (个) × 100%

新生愈伤分化率 = 分化培养中长出绿苗的新生愈伤组织数量 (个) / 分化培养的新生愈伤组织数量

(个) × 100%

愈伤组织超低温保存效率 = 新生愈伤率 × 新生愈伤分化率 × 100%

使用 Excel 2010 进行数据整理和作图, 使用 SPSS 21.0 进行数据处理和统计。

2 结果与分析

2.1 不同粒径水稻愈伤组织的超低温保存效率的差异

以粳稻日本晴和籼稻早恢 3 号为材料, 在无菌条件下用不同目数的筛网将愈伤组织分为粒径 >3.0 mm, 1.6~3.0 mm 和 <1.6 mm 3 种大小, 然后同时进行高糖预培养、直接冻存、恢复培养和分化培养。恢复培养 20 d 后统计新生愈伤率, 分化培养 30~40 d 后统计新生愈伤分化率, 具体结果见表 3。

表 3 不同粒径愈伤组织的超低温保存效率

Table 3 Cryopreservation rate of calli of different sizes

品种 Variety	愈伤组织粒径 (mm) Size of calli	恢复培养中的愈 伤组织数量 No. of calli in recovery culture	长出新愈伤的愈 伤组织数量 No. of proliferative calli	新生愈伤率 (%) Callus proliferation rate	新生愈伤分化率 (%) Differentiation rate of proliferative calli	愈伤组织超低温 保存效率 (%) Cryopreservation rate of calli
早恢 3 号 Hanhui 3	<1.6	722	160	22.64 ± 2.39 Bb	61.22 ± 7.45 a	13.86 ± 1.47 Bc
	1.6~3.0	382	144	38.04 ± 4.64 Aa	66.07 ± 4.63 a	25.13 ± 3.06 Aa
	>3.0	355	124	34.77 ± 2.90 Aa	54.29 ± 9.23 a	18.88 ± 1.57 Bb
日本晴 Nipponbare	<1.6	910	34	3.91 ± 0.37 Dd	55.56 ± 5.56 a	2.08 ± 0.21 De
	1.6~3.0	1320	145	10.98 ± 0.60 Cc	62.12 ± 5.55 a	6.82 ± 0.38 Cd
	>3.0	600	62	10.33 ± 1.11 CDc	56.06 ± 7.87 a	5.79 ± 0.62 Cd

后 3 列数据为平均值 ± 标准误; 同一列中不同大、小写字母表示经最小显著性差异法 (LSD) 检验后在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上的差异显著, 下同

The cast three colums are shown as mean ± standard error, the different capital and lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.05$ by LSD test, the same as below

从表 3 中可以看出, 3 种粒径愈伤组织的新生愈伤率早恢 3 号为 22.64%~38.04%, 都极显著高于日本晴的 (3.91%~10.98%)。早恢 3 号 1.6~3.0 mm 粒径愈伤组织的新生愈伤率最高为 38.04%, 与 >3.0 mm 粒径的愈伤组织的新生愈伤率 34.77% 没有显著差异, 都极显著高于 <1.6 mm 粒径的愈伤组织新生愈伤率 22.64%。日本晴 1.6~3.0 mm 粒径愈伤组织的新生愈伤率最高为 10.98%, 与 >3.0 mm 粒径的愈伤组织的新生愈伤率 10.33% 没有显著差异, 都极显著高于 <1.6 mm 粒径的愈伤组织新生愈伤率 3.91%。新生愈伤分化率在早恢 3 号和日本晴 2 个品种间, 以及同一品种不同粒径愈伤

组织间都无显著差异, 分化率在 54.29%~66.07%。早恢 3 号的 3 种粒径愈伤组织的超低温保存效率在 13.86%~25.13%, 都极显著高于日本晴的 3 种粒径愈伤组织的超低温保存效率 (2.08%~6.82%)。这 2 个品种都是 1.6~3.0 mm 粒径的愈伤组织的超低温保存效率最高。

2.2 不同浓度蔗糖预培养对水稻愈伤组织超低温保存效率的影响

以早恢 3 号的 1.6~3.0 mm 粒径胚性愈伤组织为材料, 在分别添加 100 g/L (0.3 mol/L), 170 g/L (0.5 mol/L) 和 240 g/L (0.7 mol/L) 的蔗糖的 3 种预培养基中同时进行预培养, 然后直接冻存、恢复培养

和分化培养。恢复培养 20 d 后统计新生愈伤率,分化培养 30~40 d 后统计新生愈伤分化率,具体结果见表 4。

从表 4 中可以看出,早恢 3 号胚性愈伤组织经过 100 g/L 和 170 g/L 蔗糖预培养,超低温冻存后新生愈伤率分别为 40.17% 和 46.69%,两者无显著差异;经 240 g/L 蔗糖预培养后新生愈伤率最低,为

22.07%,且与前 2 个浓度蔗糖预培养后的新生愈伤率存在极显著差异。100 g/L, 170 g/L 和 240 g/L 蔗糖预培养后,超低温冻存的新生愈伤分化率三者之间无显著差异。100 g/L 和 170 g/L 蔗糖预培养后的愈伤组织超低温保存效率为 26.39% 和 24.77%,都极显著高于 240 g/L 蔗糖预培养后的愈伤组织超低温保存效率 16.12%。

表 4 愈伤组织在不同浓度蔗糖的预培养后的超低温保存效率

Table 4 Cryopreservation rate of calli after preculture with different concentrations of sucrose

预培中蔗糖浓度 (g/L) Concentration of sucrose in preculture	恢复培养中的愈伤组织数量 No. of calli for recovery culture	长出新愈伤的愈伤组织数量 No. of proliferative calli	新生愈伤率 (%) Callus proliferation rate	新生愈伤分化率 (%) Differentiation rate of proliferative calli	愈伤组织超低温保存效率 (%) Cryopreservation rate of calli
100	382	144	40.17 ± 4.55A	69.39 ± 3.73a	26.39 ± 3.22A
170	628	286	46.69 ± 3.49A	53.06 ± 12.36a	24.77 ± 1.85A
240	674	148	22.07 ± 1.54B	73.02 ± 5.02a	16.12 ± 1.12B

2.3 愈伤组织高糖 - 玻璃化处理与高糖处理的超低温保存效率的差异

以日本晴、WDR48 和早恢 3 号 3 个品种的 1.6~3.0 mm 的胚性愈伤组织为材料,进行高糖培养后,部分愈伤组织直接液氮冻存,另一部分愈伤组织进

行玻璃化处理后再投入液氮冻存。5 d 后同时取出解冻、恢复培养和分化培养。恢复培养 20 d 后统计新生愈伤率,分化培养 30~40 d 后统计新生愈伤分化率,具体结果见表 5。

从表 5 可以看出,日本晴、WDR48、早恢 3 号愈

表 5 不同预处理方法后的新生愈伤率和新生愈伤分化率

Table 5 Callus regeneration rate and differentiation rate of regenerated calli with different pretreatments

品种 Variety	预处理方式 Pretreatment	恢复培养中的愈伤组织数量 No. of calli in recovery culture	长出新愈伤的愈伤组织数量 No. of proliferative calli	新生愈伤率 (%) Callus proliferation rate	新生愈伤分化率 (%) Differentiation rate of proliferative calli	愈伤组织超低温保存效率 (%) Cryopreservation rate of calli
日本晴 Nipponbare	高糖	1313	249	18.85 ± 1.04C	67.86 ± 4.08a	12.79 ± 0.75 B
	高糖玻璃化	836	8	0.90 ± 0.29D	71.43 ± 4.76a	0.64 ± 0.20 C
WDR48	高糖	1024	242	23.33 ± 2.02B	60.26 ± 3.01a	14.06 ± 0.83 B
	高糖玻璃化	1103	10	0.81 ± 0.40D	58.33 ± 3.73a	0.47 ± 0.16 C
早恢 3 号 Hanhui 3	高糖	1009	333	33.25 ± 8.28A	66.67 ± 3.11a	22.17 ± 1.00 A
	高糖玻璃化	559	6	1.05 ± 4.99D	64.48 ± 3.64a	0.68 ± 0.32 C

伤组织只经高糖处理,冻存后的新生愈伤率分别为 18.85%、23.33% 和 33.25%,都极显著高于本品种经高糖玻璃化处理后再冻存的新生愈伤率 0.90%、0.81% 和 1.05%。只经高糖处理的新生愈伤率在品种间存在极显著差异;而经高糖玻璃化处理的新生愈伤率在品种间没有显著差异。新生愈伤分化率不论在品种间还是不同预处理条件下都不存在显著差异,分化率在 58.33%~71.43%。3 个品种愈伤组织只经高糖处理的超低温保存效率都极显著高于本品种经高糖玻璃化处理的超低温保存效率。

2.4 水稻愈伤组织超低温保存的遗传稳定性鉴定

以粳稻品种 WDR48 为材料,将未处理的胚性愈伤组织、仅高糖处理冻存后的新生愈伤组织、以及高糖玻璃化处理冻存后的新生愈伤组织同时进行分化培养,获得水稻幼苗,分别标记为 CK、T1、T2,提取绿苗 DNA。利用本中心开发的 15 对水稻 SSR 标记,进行简单序列长度多态性 (SSLP, simple sequence length polymorphism) 检测,鉴定以上 3 种来源的水稻幼苗的遗传稳定性 (图 5)。

根据电泳结果可以看到,未处理的胚性愈伤组

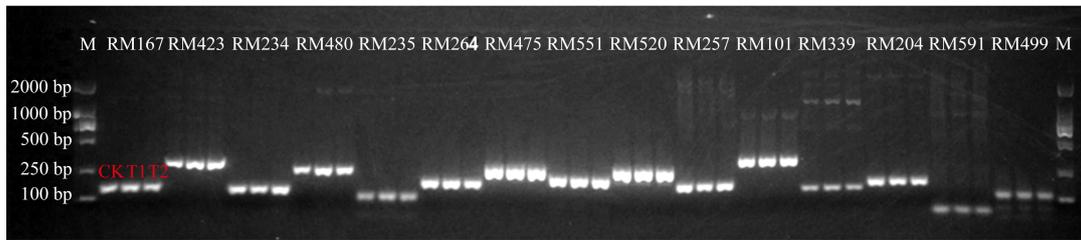


图 5 SSLP 检测不同超低温处理后获得的水稻幼苗的遗传稳定性

Fig.5 SSLP identification of the rice seedlings treated by different cryopreservation method

织 (CK)、高糖处理冻存后的新生愈伤组织 (T1)、以及高糖玻璃化处理冻存后的新生愈伤组织 (T2), 经分化培养后获得的水稻幼苗用分布在水稻 12 条染色体上的 15 对 SSR 标记检测, 均未扩增出差异常带, 说明无论高糖预处理还是高糖玻璃化预处理, 愈伤组织超低温冻存后分化获得的水稻幼苗, 与未经过超低温保存的愈伤组织分化获得的水稻幼苗在遗传上没有显著差异。

3 讨论

20 世纪 90 年代后相继建立了以玻璃化理论为基础的玻璃化法、包埋-玻璃化法、小液滴-玻璃化法等超低温冻存方法, 带动了植物超低温生物学的快速发展。目前玻璃化超低温保存方法已广泛应用到茎尖^[4, 17-18]、胚状体^[4, 19]、愈伤组织^[4, 20-21]等植物材料的超低温保存中。玻璃化法超低温保存 (Vitrification cryopreservation) 是利用高浓度的玻璃化保护剂 (VS, vitrification solution) 处理植物材料使其脱水, 材料浸入液氮时保护剂和细胞内的水分来不及形成冰晶, 一同进入玻璃化状态 (Glassy state)。在玻璃态下, 水分子没有发生重排, 不产生结构和体积的变化, 避免因机械损伤造成细胞或组织的伤害^[22-23]。在前期对水稻材料超低温保存的研究中也基本都采用了玻璃化方法^[8-13]。但在本研究中发现, 高糖-玻璃化预处理的水稻愈伤组织, 在超低温保存后的新生愈伤率极显著低于仅使用高糖预处理水稻愈伤组织。试验中使用的玻璃化试剂主要包括甘油和二甲亚砜, 这两种常用的渗透性试剂都是非离子型的小分子结构, 极易穿过细胞膜在细胞内扩散, 且具有不同程度的细胞毒性, 因而在解冻阶段需要充分洗脱, 以避免残留的玻璃化试剂造成细胞死亡。蔗糖则属于小分子的非渗透性超低温保护剂, 蔗糖分子不能穿透细胞膜, 而是吸附在细胞表面, 通过渗透作用使细胞内失水, 细胞质浓缩, 细胞收缩, 抑制细胞内冰晶的形成^[24-26]。通过本研究结

果可以看到, 玻璃化试剂对愈伤组织细胞的毒害作用远大于在超低温保存过程中对细胞的保护作用, 玻璃化试剂显著影响愈伤组织超低温保存后生活力的恢复。而仅用高浓度蔗糖预处理, 调节细胞渗透压, 提高细胞质浓度, 能够在超低温过程中有效保护细胞结构, 避免细胞毒害作用, 并且简化操作过程, 提高试验通量, 是值得推荐的一种超低温保存方法。

在本研究中还发现, 不同品种水稻愈伤组织经过超低温保存后的新生愈伤率存在显著差异。如籼稻早恢 3 号的超低温保存效率明显高于粳稻日本晴。从肉眼观察, 早恢 3 号相较日本晴, 愈伤组织多为圆粒状, 粒径普遍更小, 触感更致密紧实。检测愈伤组织含水量 (占鲜重百分数) (参照高俊凤^[27]的植物组织含水量测定方法) 发现, 在高糖预培养前早恢 3 号愈伤组织含水量为 84.60%, 日本晴愈伤组织含水量为 90.02%; 高糖预培养后早恢 3 号愈伤组织含水量降至 81.24%, 日本晴愈伤组织含水量降至 87.30%。即胚性愈伤组织含水量相对较低的品种在超低温保存中更耐受, 经冻存后的新生愈伤率更高。由此可见, 愈伤组织的含水量差异可能是造成水稻不同品种超低温保存效率差异的主要因素之一。同时本研究也发现, 并非愈伤组织的含水量越低, 其超低温保存效率就越高。如早恢 3 号愈伤组织在 100 mg/L 和 170 mg/L 蔗糖预培养后, 超低温保存的新生愈伤率没有显著差异, 但都显著高于 240 mg/L 蔗糖预培养的新生愈伤率。检测含水量发现, 100 g/L 蔗糖预培后愈伤组织含水量为 80.97%, 170 g/L 蔗糖预培后愈伤组织含水量为 75.58%, 240 g/L 蔗糖预培后愈伤组织含水量为 71.26%。说明在培养过程中随着蔗糖浓度的增加, 由于渗透压作用, 细胞失水更多, 造成细胞质高度浓缩, 或引起质壁分离, 破坏了细胞内离子平衡, 影响正常代谢反应, 降低细胞的生理活性, 从而导致细胞在超低温保存过程中恢复生长的能力变弱。因此, 探索同一类型愈伤组织 (结构形态、初始含水量水

平等相近)适宜超低温保存的含水量区间,建立相应的高效的预培养方案,才能更好地促进愈伤组织超低温保存的实践。

在目前超低温保存研究中,基本都沿用或改良 Towill 等^[28]的 TTC 染色法。该方法的原理是活细胞内的脱氢酶能直接还原氯化三苯基四氮唑(TTC)生成红色复合物(TTF),经有机溶剂萃取后,计算 485 nm 波长下超低温保存前后材料的吸光值的比值,反映细胞的相对活性;或者通过染成红色细胞与未染色细胞的比例反映细胞存活率。TTC 染色法是间接地体现生物材料在超低温冻存后的细胞活力,并不能真实反映冻存材料恢复生长或再生成苗的能力。在本研究中,用恢复生长后的新生愈伤率和新生愈伤分化率来综合评价愈伤组织冻存后的超低温保存效率,能够更真实直接地反映愈伤组织在超低温保存后再生成苗的能力。虽然在前人研究中,植物组织培养中的体细胞无性系变异是一种普遍现象^[29]。在本研究中,利用自主开发的 15 对水稻 SSR 标记对超低温保存前后的材料进行遗传稳定性鉴定,检测结果表明,经过超低温保存和未经超低温保存的愈伤组织在分化培养后获得的水稻幼苗没有遗传差异,鉴定结果可能与标记数量和检测样品量有关。今后还需进一步结合细胞学检测、表型性状考察等,从而能够更全面准确地对超低温保存材料的遗传稳定性作出评价。

以水稻胚性愈伤组织为材料的超低温保存技术体系,不仅操作方法简单便捷,而且能够显著增加材料处理的通量,提高超低温保存后的成苗效率。在本研究中,以水稻茎尖为材料,2 mL 冻存管保存 10~15 个茎尖,恢复培养后约 50% 茎尖成活,获得 6~7 株再生苗;而以愈伤组织为材料,可用 5 mL 冻存管保存 200 粒左右愈伤,恢复培养后新生愈伤率 30% 以上,绿苗分化率达 70% 左右,最终可获得 40 株再生苗。因此愈伤组织超低温保存是一种值得推广应用的水稻种质资源长期保存方法。在今后的研究中,还需加强对超低温保存过程中植物细胞超微结构变化的观察,以及相关转录组及代谢组等的研究,进一步探究植物超低温保存的细胞生理和分子机理,并有效监测超低温保存后的遗传稳定性,为植物种质资源的超低温保存提供理论支撑和技术指导。

参考文献

[1] 卢新雄,陈晓玲. 我国作物种质资源保存与研究进展. 中国

农业科学, 2003, 36(10): 1125-1132

Lu X X, Chen X L. Progress of conservation and research of crop germplasm resources in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(10): 1125-1132

- [2] 孔宪琴,张小惠,李春生,张克琴,胡光连. 水稻等重要作物种子的保存与管理体系统探究. *中国稻米*, 2018, 24(4): 91-95
Kong X Q, Zhang X H, Li C S, Zhang K Q, Hu G L. Conservation and management system of rice and other important crop seeds. *China Rice*, 2018, 24(4): 91-95
- [3] 卢新雄,陈晓玲. 水稻种子贮藏过程中生活力丧失特性及预警指标的研究. *中国农业科学*, 2002, 35(8): 975-979
Lu X X, Chen X L. Characteristics and warning indices of rice seeds viability loss during storage at 45 °C constant temperature. *Scientia Agriculture Sinica*, 2002, 35(8): 975-979
- [4] Wang M R, Lambardi M, Engelmann F, Pathirana R, Panis B, Volk G M, Wang Q C. Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2020, 144: 7-20
- [5] Panis B. Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. *Acta Horti*, 2019, 1234: 1-7
- [6] Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2011, 47: 5-16
- [7] Sakai A. Survival of the twigs of woody plants at -196 °C. *Nature*, 1960, 185: 392-394
- [8] 黄纯农,王君晖,严庆丰. 玻璃化法液氮冻存大麦和水稻的胚性悬浮培养细胞. *杭州大学学报:自然科学版*, 1994, 21(1): 114-115
Huang C N, Wang J H, Yan Q F. Preservation of barley and rice cell suspension cultures in liquid nitrogen by vitrification. *Journal of Hangzhou University: Natural Science Edition*, 1994, 21(1): 114-115
- [9] 严庆丰,王君晖,黄纯农. 水稻悬浮细胞的超低温保存研究. *实验生物学报*, 1994, 27(4): 399-409
Yan Q F, Wang J H, Huang C N. Studies on cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) suspension cultures. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 1994, 27(4): 399-409
- [10] 王君晖,郑泳,严庆丰,颜秋生,张雪琴,黄纯农. 水稻胚性悬浮细胞的玻璃化法超低温保存和可育植株再生. *科学通报*, 1996, 41(22): 2081-2084
Wang J H, Zheng Y, Yan Q F, Yan Q S, Zhang X Q, Huang C N. Vitrification cryopreservation and fertile plant regeneration of rice embryonic suspension cells. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41(22): 2081-2084
- [11] 田永中,舒理慧,郑从义. 光敏感核不育水稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成. *武汉大学学报:自然科学版*, 1994(4): 89-94
Tian Y Z, Shu L H, Zheng C Y. Cryopreservation and regeneration of callus of photoperiod sensitive genic mals sterile rice. *Journal of Wuhan University: Natural Science Edition*, 1994(4): 89-94
- [12] 殷晓辉,舒理慧,郑从义,廖兰杰. 野生稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成. *武汉植物学研究*, 1996, 14(3): 247-252
Yin X H, Shu L H, Zheng C Y, Liao L J. Cryopreservation and formation of regenerative plantlets of callus from wild rice.

- Journal of Wuhan Botanical Research, 1996, 14(3): 247-252
- [13] 何光存, 舒理慧, 廖兰杰, 殷晓辉, 盛腊红, 汪晓玲. 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: C 辑, 1998, 28(5): 444-449
He G C, Shu L H, Liao L J, Yin X H, Sheng L H, Wang X L. Cryopreservation of somatic cells and establishment of protoplast culture system of wild rice (*Oryza sativa* L.). Science in China: Series C, 1998, 28(5): 444-449
- [14] 李天菲, 林田, 韩静, 滕小英, 周丽, 刘鸿艳. 水稻成熟胚愈伤组织染色体加倍的探究. 分子植物育种, 2018, 16(20): 6777-6784
Li T F, Lin T, Han J, Teng X Y, Zhou L, Liu H Y. Study on chromosome doubling of rice mature embryo callus. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(20): 6777-6784
- [15] 林田, 刘灶长, 杨华, 李天菲, 罗利军. 石蒜超低温玻璃化法保存技术. 中国花卉园艺, 2010(18): 24-25
Lin T, Liu Z C, Yang H, Li T F, Luo L J. Lycoris cryopreservation by vitrification. China Flowers & Horticulture, 2010(18): 24-25
- [16] 冯芳君, 罗利军, 李荧, 周立国, 徐小艳, 吴金红, 陈宏伟, 陈亮, 梅捍卫. 水稻 InDel 和 SSR 标记多态性的比较分析. 分子植物育种, 2005, 3(5): 725-730
Feng F J, Luo L J, Li Y, Zhou L G, Xu X Y, Wu J H, Chen H W, Chen L, Mei H W. Comparative analysis of polymorphism of InDel and SSR markers in rice. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(5): 725-730
- [17] 张玉进, 张兴国, 刘佩瑛, 陈金香. 植物茎尖的玻璃化冻存研究. 武汉植物学研究, 1999, 17(S): 78-82
Zhang Y J, Zhang X G, Liu P Y, Chen J X. Cryopreservation of plant shoot-tips by vitrification. Journal of Wuhan Botanical Research, 1999, 17(S): 78-82
- [18] Wang Q C, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen J P T. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell Reports, 2005, 24: 280-288
- [19] Ishikawa K, Harata K, Mii M, Sakai A, Yoshimatsu K, Shimomura K. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Reports, 1997, 16: 754-757
- [20] 陈冠群, 李晓丹, 申晓辉. 百子莲胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存体系建立及遗传稳定性分析. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2014, 32(5): 76-94
Chen G Q, Li X D, Shen X H. Vitrification-based cryopreservation of embryogenic callus of *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* and analysis of genetic stability by AFLP. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition, 2014, 32(5): 76-94
- [21] 卞福花, 龚雪琴, 由翠荣, 郑彩霞, 曲复宁. 仙客来愈伤组织的超低温保存. 生物工程学报, 2008, 24(3): 504-508
Bian F H, Gong X Q, You C R, Zheng C X, Qu F N. Cryopreservation of *cyclamen persicum* mill. Callus. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(3): 504-508
- [22] Volk G M, Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. Cryobiology, 2006, 52: 48-61
- [23] 苗琦, 谷运红, 王卫东, 秦广雍. 植物组织培养物的超低温保存. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 350-354
Miao Q, Gu Y H, Wang W D, Qin G Y. The cryopreservation of plant tissue culture materials. Plant Physiology Communications, 2005, 41(3): 350-354
- [24] Raju R, Bryanta S J, Wilkinson B L, Bryanta G. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2021, 1865(1): 129749
- [25] Meryman H T. Cryoprotective agents. Cryobiology, 1971, 8(2): 173-183
- [26] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology, 2003, 46(3): 205-229
- [27] 高俊凤. 植物生理学实验指导: 1 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 15
Gao J F. Guidance of plant physiology experiments: 1st edition. Beijing: Higher Education Press, 2006: 15
- [28] Towill L E, Mazur P. Studies on the reduction of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Canadian Journal of Botany, 1975, 53(7): 1093-1102
- [29] 丰先红, 李健, 罗孝贵. 植物组织培养中体细胞无性系变异研究. 中国农学通报, 2010, 26(14): 70-73
Feng X H, Li J, Luo X G. Progress in plant tissue culture somaclonal variation. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(14): 70-73