

三种食用百合种质资源限制生长保存及遗传稳定性研究

万珠珠, 牛来春, 谭秀梅, 刘 敏, 吴 亮, 董 草

(云南师范大学 文理学院, 云南 昆明 650222)

摘 要:以3种食用百合试管苗为试材,采用限制生长保存法,研究了不同浓度生长抑制剂对食用百合试管苗保存效果的影响,并对保存后的试管苗进行遗传稳定性检测,以期建立食用百合种质资源离体保存体系。结果表明:龙芽百合试管苗用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 防落素(PCPA)处理保存300 d后,试管苗生长缓慢,存活率达96.00%;川百合试管苗用 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青鲜素(MH)处理保存150 d后,试管苗的抑制生长效果明显,结鳞率和存活率高达100.00%;兰州百合试管苗用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 多效唑(PP₃₃₃)处理保存300 d后,试管苗抑制作用明显,结鳞率达100.00%,存活率达94.40%。比较限制生长保存后与未保存植株的可溶性蛋白和酯酶同工酶图谱,各处理和对照图谱带相似,初步证明了以上保存方法的可行性,较好的保持了遗传稳定性。

关键词:食用百合;限制生长保存;遗传稳定性

中图分类号:S 644.102.4 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)13-0089-04

食用百合是集食用、药用、观赏兼用的多年生草本植物,近年来市场需求日益增加。作为无性繁殖蔬菜,

传统的种质保存方法需每年进行种质更新,不仅耗费大量的人力、物力和财力,还容易受到病虫害和自然灾害的影响^[1]。为了克服传统保存方法所面临的问题,现以龙芽百合(*Lilium browerzii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker)、川百合(*Lilium davidii* Duchartre)和兰州百合(*Lilium davidii* Duch. var. *unicolor*(Hoog)Cotton)3种食

第一作者简介:万珠珠(1982-),女,硕士研究生,讲师,现主要从事观赏植物无性繁殖保存等研究工作。E-mail:42998072@qq.com.
收稿日期:2016-02-14

[21] GUPTA S K, BHATTACHARYYA T K, GHOSH T C. Synonymous codon usage in *Lactococcus lactis*; mutational bias versus translational selection[J]. *Biomol Struct Dyn*, 2004(21):1-9.
[22] DONALD S, HAGEN T, FABIAN G, et al. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome[J]. *Nature Biotechnology*, 2013(31):

1009-1014.

[23] HAGEN T, FABIAN G, DONALD S, et al. Defining a personal, allele-specific, and single molecule long-read transcriptome[J]. *PNAS*, 2014, 111: 9869-9874.

Analysis of Characteristic of Codon Usage of *Eucommia ulmoides* Transcriptome

LIU Huimin^{1,2}, WUYUN Tana^{1,2}, DU Hongyan^{1,2}

(1. Non-timber Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry Science, Zhengzhou, Henan 450003; 2. The *Eucommia* Engineering Research Center of State Forestry Administration, Zhengzhou, Henan 450003)

Abstract: *Eucommia ulmoides* was used as test materials, the correlation between codon composition and gene expression was analyzed based on the transcriptome data by using CodonW and SPSS software, in order to offer a theoretical foundation for transforming exogenous gene and *Eucommia* genetic engineering. The results showed that the gene expression had a significant and positive correlation to G3s, C3s, G+C and GC3s ($P < 0.01$) content and a negative correlation to A3s content, T3s content, gene coding sequence length and effective codon number (ENC) ($P < 0.01$) and Aro content ($P < 0.05$). These results indicated that genes with a high expression had a stronger codon usage bias and likely end with G/C. ENC had a significant positive correlation to A3s, T3s and Aro content ($P < 0.01$) and a significant negative correlation to C3s, G3s, G+C, and GC3s content ($P < 0.01$). Fifteen optimal codons were identified, namely, AAC, AAG, ACC, AGG, AUC, CAC, CAG, CCG, CUC, CUG, GCC, GGC, GUC, UAC, and UCC. Fruit and leaf special genes had difference on the codon usage of Leu, Ile, Ser, Pro, Thr, Asn, Glu and Cys.

Keywords: *Eucommia ulmoides*; transcriptome; codon; bias

用百合为试验材料,探讨不同生长抑制剂对食用百合种质资源离体保存的影响,从蛋白水平测定离体保存后再生植株的遗传稳定性,以期为实现食用百合种质资源的中长期保存提供科学理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为龙芽百合、川百合、兰州百合 3 种食用百合。

1.2 试验方法

将龙芽百合试管苗、川百合试管苗、兰州百合试管苗的丛芽分切成单个芽,剪去叶片以保证单芽处理的高度一致,挑选大小接近的芽进行离体保存。保存容器为 200 mL 广口瓶,每瓶装培养基 120 mL。龙芽百合试管苗基本培养基为 MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA,添加 0、1、5、10 mg·L⁻¹ 防落素(PCPA)4 个处理进行保存;川百合试管苗基本培养基为 MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA,添加 0.0、1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹ 青鲜素(MH)4 个处理进行保存;兰州百合试管苗基本培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA,添加 0、5、10、15 mg·L⁻¹ 多效唑(PP₃₃₃)4 个处理进行保存。每处理接种 10 瓶,每瓶 3 株试管苗,3 次重复。保存期间,每隔 30 d 测量不同的处理试管苗的株高、鳞茎直径,均用直尺直接在广口瓶外测定;观察鳞茎基部是否生产新的小鳞茎,统计每个处理试管苗的存活率。

称取 3 种食用百合离体保存后各个处理的试管苗和未经保存的试管苗 1.0 g,可溶性蛋白质采用 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液提取;同工酶采用 10% 甘油提取,于冰水浴中研磨成匀浆,转移至离心管中 7 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 20 min,取上清液进行电泳。电泳采用垂直板不连续系统聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 3%。可溶性蛋白质采用常规的考马斯亮蓝染色方法染色,同工酶采用坚牢蓝 RR 盐方法染色^[2]。观察记录谱带变化情况。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的防落素(PCPA)对龙芽百合试管苗保存的影响

室温条件下保存龙芽百合试管苗 300 d 后其生长情况见表 1 和图 1,随着 PCPA 浓度的升高,10 mg·L⁻¹ PCPA 处理对抑制龙芽百合试管苗株高的效果最明显,与其它处理相比差异显著;处理间鳞茎直径变化很小,没有形成新的小鳞茎,试管苗的存活率在 96.00% 以上。

2.2 不同浓度的青鲜素(MH)对川百合试管苗保存的影响

室温条件下保存川百合试管苗 150 d 后其生长情况

见表 2 和图 2,随着 MH 浓度的不断提高,川百合试管苗与对照相比株高逐渐降低。2.0 mg·L⁻¹ MH 处理与对照和 1.0 mg·L⁻¹ 处理相比,株高差异显著。添加 MH 的培养基在抑制株高的同时,鳞茎直径也跟着增大,鳞茎直径变大的原因是试管苗诱导产生小鳞茎的结果。2.0 mg·L⁻¹ MH 处理限制川百合试管苗的生长效果明显,5 个月,株高不足 0.5 cm,结鳞率和存活率达 100.00%。

表 1 PCPA 对龙芽百合试管苗保存 300 d 后的影响

PCPA 浓度 /(mg·L ⁻¹)	株高 /cm	鳞茎直径 /cm	结鳞率 /%	存活率 /%
0(CK)	6.13±0.17a	1.15±0.08	0	94.40
1	5.81±0.13a	1.32±0.10	0	100.00
5	3.18±0.06b	1.28±0.06	0	98.00
10	1.84±0.12c	1.34±0.11	0	96.00

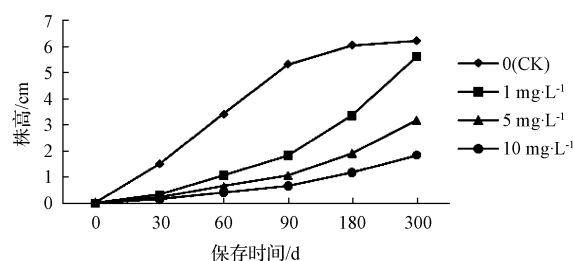


图 1 不同浓度 PCPA 对龙芽百合试管苗植株生长的影响

表 2 MH 对川百合试管苗保存 150 d 后的影响

MH 浓度 /(mg·L ⁻¹)	株高 /cm	鳞茎直径 /cm	结鳞率 /%	存活率 /%
0.0(CK)	4.23±0.18a	1.13±0.05c	33.82	100.00
1.0	3.15±0.09b	1.52±0.04b	82.67	100.00
1.5	0.43±0.04c	1.88±0.09a	97.88	100.00
2.0	0.31±0.10c	1.94±0.12a	100.00	100.00

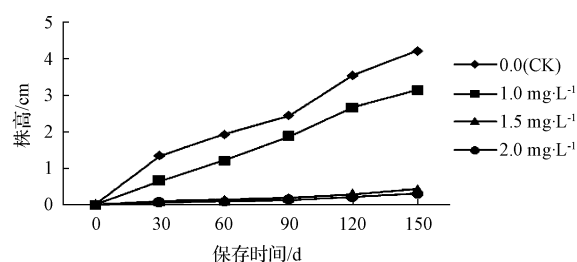


图 2 不同浓度 MH 对川百合试管苗植株生长的影响

2.3 不同浓度的多效唑(PP₃₃₃)对兰州百合试管苗保存的影响

室温条件下保存兰州百合试管苗 300 d 后统计其生长情况见表 3 和图 3,随着 PP₃₃₃ 浓度的升高,对叶片伸长起明显的抑制作用,浓度越高,株高迅速下降,15 mg·L⁻¹ PP₃₃₃ 已经部分抑制了试管苗小鳞茎的形成,结鳞率降到 65.00%,存活率也下降为 85.00%。

10 mg·L⁻¹ PP₃₃₃的试管苗的结鳞率达到 100.00%,存活率达 94.40%。

表 3 PP₃₃₃对兰州百合试管苗保存
300 d 后的影响

PP ₃₃₃ 浓度 /(mg·L ⁻¹)	株高 /cm	鳞茎直径 /cm	结鳞率 /%	存活率 /%
0(CK)	8.01±0.06a	1.04±0.08d	21.30	88.00
5	4.26±0.11b	1.33±0.09c	42.45	96.00
10	0.45±0.09c	2.45±0.06a	100.00	94.40
15	0.21±0.14d	1.52±0.11b	65.00	85.00

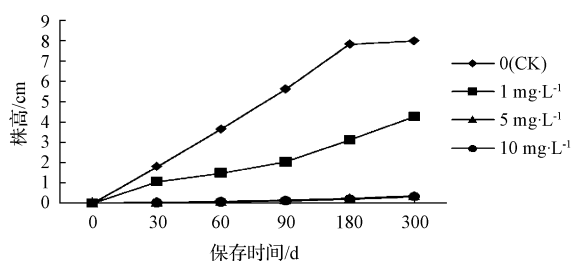


图 3 不同浓度 PP₃₃₃对兰州百合试管苗植株生长的影响

2.4 遗传稳定性检测

2.4.1 可溶性蛋白质检测 从离体保存后的再生试管苗和对照试管苗中提取的可溶性蛋白质进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳得到的图谱来看,龙芽百合试管苗经过 PCPA 处理后,其对照与各个处理材料经过可溶性蛋白质检测,均显现出了 6 条谱带,图谱中没有发现特异性条带(图 4);川百合试管苗经过 MH 处理后,其对照与各个处理材料经过可溶性蛋白质检测,均显现出了 9 条谱带,图谱中也没有发现特异性条带(图 5);兰州百合试管苗经过 PP₃₃₃处理后,对照与各个处理材料经过可溶性蛋白质检测,均显现出了 7 条谱带,图谱中没有特异性条带出现(图 6)。

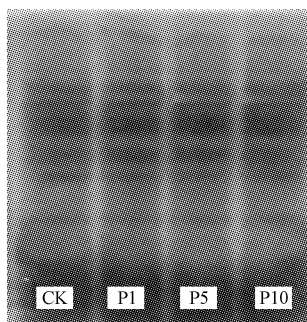


图 4 龙芽百合可溶性蛋白质图谱

2.4.2 酯酶同工酶检测 同工酶同蛋白质一样也是基因表达的产物,也可以反映出保存材料的遗传稳定性。对离体保存后的再生试管苗和对照试管苗中提取的酯酶同工酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,从图谱来看 3 种食用百合离体保存后的试管苗与对照之间酯酶同工酶谱

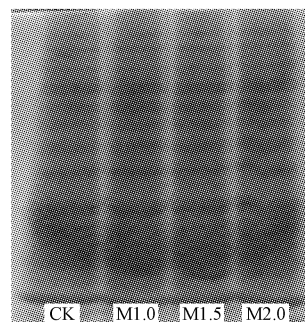


图 5 川百合可溶性蛋白质图谱

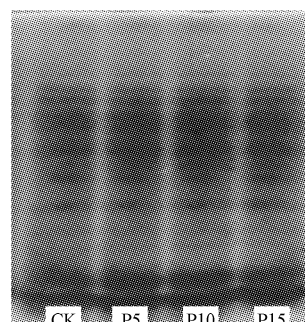


图 6 兰州百合可溶性蛋白质图谱

带数目、位点、强度相近,没有出现特异性条带,这一试验结果与上述可溶性蛋白质的试验结果相一致(图 7~9)。以上结果表明,限制生长法保存的百合种质在蛋白质水平上保持了良好的遗传稳定性。

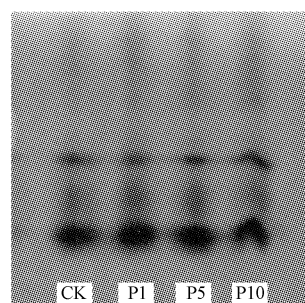


图 7 龙芽百合同工酶图谱

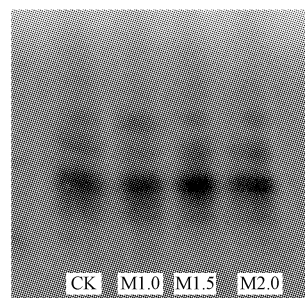


图 8 川百合同工酶图谱

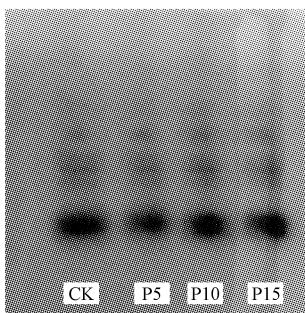


图9 兰州百合同工酶图谱

3 结论与讨论

3.1 生长抑制剂的抑制效应

添加生长抑制剂 PCPA $5\sim 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 保存 300 d 后的龙芽百合试管苗生长缓慢,存活率均在 96.00% 以上,保存过程中植株在可溶性蛋白质和同工酶检测中遗传性较稳定。目前 PCPA 用于离体保存的报道较少,针对它用量少、毒性小的优点,应该是可以考虑在蔬菜、水果、粮食作物的离体种质资源保存上探索应用。

添加生长抑制剂 MH $1.5\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 保存 150 d 后的川百合,植株的生长速度非常慢,抑制作用明显,保存 150 d 以上的试管苗存活率和结鳞率高达 100.00%,保存后试管苗经过可溶性蛋白质和酯酶同工酶检测也没有发现变异。MH 是一种生长抑制剂和选择性除草剂,主要用于防止马铃薯、洋葱、萝卜等在贮藏期间抽芽。

添加生长抑制剂 PP_{333} $5\sim 15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 保存 300 d 后的兰州百合,试管苗的生长抑制效果明显,又可以提高试管苗的结鳞率,保存后试管苗经过可溶性蛋白质和酯酶同工酶检测也没有出现变异。试管苗植株的抑制作用随着 PP_{333} 浓度的增加而加强,当 PP_{333} 浓度为 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, PP_{333} 的作用已经部分抑制了试管苗小鳞

茎的形成,这与王爱勤等^[3]对百合试管结鳞茎的研究报道一致,与马国华等^[4]所得结果也类似。

3.2 限制生长保存提高百合试管苗结鳞率

在添加了适宜的 MH 和 PP_{333} 的培养基中,MH 和 PP_{333} 对叶片、根的分化、伸长起明显的抑制作用,但对结鳞茎有促进作用,并随浓度增加,结鳞茎率迅速提高,鳞茎直径明显增粗。试管苗结鳞率的提高对离体保存也是一种有利的现象,也就是在保存的基础上达到扩繁。

3.3 遗传变异研究

植物种质保存遗传稳定性的检测由常规的形态学和细胞显微结构观察深入到可溶性蛋白质和同工酶检测、色谱分析、生化分析和分子标记等水平。可溶性蛋白质和同工酶是基因表达的直接产物,但是易受保存材料生理状态、保存时间、外界环境条件的影响,稳定性欠佳^[5]。如果结合多种不同的检测方法,并对离体保存材料的机理进行深入研究,将更充分说明食用百合种质在离体保存过程中的遗传稳定性。但是对于种质资源保存和最终应用而言,能够保持种质资源的遗传多样性和期望性状的稳定性,是最为重要的评判标准^[6]。

参考文献

- [1] 徐刚标. 植物种质资源离体保存研究进展[J]. 中南林学院学报, 2000, 20(4): 81-87.
- [2] 周厚高, 张西丽, 王中仁, 等. 几个百合品种遗传亲缘关系的等位酶分析[J]. 西南农业学报, 1999, 12(4): 92-95.
- [3] 王爱勤, 周歧伟, 何龙飞, 等. 百合试管结鳞茎的研究[J]. 广西大学学报(农业和生命科学版), 1998, 17(1): 71-75.
- [4] 马国华, 张启明. 多效唑在唐菖蒲组织培养中的作用[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 288-292.
- [5] 郝玉金. 柑橘和苹果等果树种质资源的离体保存及其遗传变异[D]. 武汉: 华中农业大学, 2000.
- [6] ASHMORE S E. Status report on the development and application of *in vitro* technique for the conservation and use of plant genetic resources[M]. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997.

Study on *in vitro* Limited Growth Conservation and Genetic Stability of Three Edible Lily

WAN Zhuzhu, NIU Laichun, TAN Xiumei, LIU Min, WU Liang, DONG Cao

(College of Arts and Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650222)

Abstract: Taking three kinds of edible lily plantlets as materials, by method of limited growth conservation, the effects of three different growth inhibitors on the preservation of edible lily plantlets were studied, and the genetic stability of stored plantlets was detected. The results showed that the plantlets of *Lilium browerzii* var. *viridulum* added $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PCPA for 300 days grew slowly, and the survival rate was 96.00%; the plantlets of *Lilium davidii* added $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MH for 150 days were limited obvious, and the scaling rate and survival rate were as high as 100.00%; the plantlets of *Lilium davidii* var. *unicolor* added $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PP_{333} for 150 days were limited obvious, and the scaling rate was 100.00%, the survival rate 94.40%. Compared with the limited growth conservation of soluble protein and esterase isozyme, the bands were similar between treatments and control, initially proved the feasibility of above methods of preservation, better maintained genetic stability.

Keywords: edible lily; inhibiting conservation; genetic stability