

爱知结球白菜组培再生株与实生株的性状比较

樊明琴, 朱月林^①, 朱丽华

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 对日本引进的爱知结球白菜 [*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'] 的组培再生株从染色体数目、形态特征及生化特性方面与实生株进行了比较。结果表明, 再生株染色体数目与实生株相同, 均为 $2n = 20$; 再生株在移栽初期长势不齐, 1 个月后, 生长趋于一致, 形态指标均显著高于相同条件下栽培的实生株; 两者叶片可溶性糖和可溶性蛋白质含量的变化趋势相似; 可溶性蛋白质含量在移栽初期高, 碳氮比 (C/N) 小, 代谢类型主要是氮素代谢; 随着生长发育的进行, 叶面积增加, 碳水化合物代谢加强, 其可溶性糖含量增加, C/N 比逐渐上升。说明爱知结球白菜的组培再生株在所测定的性状上保持了实生株的遗传稳定性。

关键词: 爱知结球白菜; 再生植株; 染色体数目; 遗传稳定性

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2005)01-0031-04

Comparison of some characters between *in vitro* regenerated plants and seedling plants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai' FAN Ming-qin, ZHU Yue-lin^①, ZHU Li-hua (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(1): 31-34

Abstract: *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai' was introduced from Japan. Comparison of chromosome number, some morphological and biochemical characters was made between *in vitro* regenerated plants and seedling plants of 'Aichi Hakusai'. The results indicated that the chromosome numbers of *in vitro* regenerated plants and seedling plants were the same ($2n = 20$). The growth of regenerated plants was not very uniform at the early stage after transplanting. One month after transplanting, the growth of regenerated plants became uniform, and their morphological indexes were significantly higher than those of seedling plants under the same cultivating conditions. The change trends of soluble sugar and soluble protein contents in leaves were similar between regenerated plants and seedling plants. At the early stage after transplanting, soluble protein content was increased, carbon-nitrogen ratio (C/N) was low, and metabolic type was mainly nitrogen metabolism. As growth and development of plants proceeded, carbohydrate metabolism was enhanced with the increase of leaf area, resulting in the increase of both soluble sugar contents and C/N ratios. The results show that regenerated plants of 'Aichi Hakusai' retain the genetic stability of the seedling plants in the characters.

Key words: *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'; regenerated plant; chromosome number; genetic stability

在遗传转化研究中, 采用体细胞器官直接发生的方式, 如直接出芽, 不但获得再生植株的周期短, 还可避免由于经过愈伤组织而引起的体细胞无性系变异^[1], 因此, 再生植株有利于保持原有品种的优良农艺性状。国内外一些学者的研究也表明不同材料的外植体在进行离体不定芽再生时, 组培再生株能保持原品种的遗传稳定性^[2-5]。

爱知结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai') 是引自日本的优质结球

白菜, 其离体不定芽再生频率较高。本文以爱知结球白菜为研究材料, 将其离体子叶上再生的不定芽经诱导生根后, 与相同苗龄的实生株在相同栽培条件下进行性状比较, 旨在探讨再生株的遗传稳定性。

收稿日期: 2004-07-01

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 ([2001] 498)

作者简介: 樊明琴 (1978-), 女, 安徽阜阳人, 硕士, 主要从事蔬菜生物技术和栽培生理研究。

^① 通讯作者 E-mail: ylzhu@njau.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

爱知结球白菜购自日本农林种苗公司。

1.2 方法

1.2.1 实生株和再生株培育 再生株的培育方法为:将苗龄为5 d的无菌苗子叶连同子叶柄切下后接种在MS + 0.5 mg · L⁻¹ NAA + 1 mg · L⁻¹ TDZ + 5 mg · L⁻¹ AgNO₃培养基上,诱导不定芽再生;不定芽产生后2周,将其切下,转移到MS + 1 mg · L⁻¹ IBA生根培养基上诱导生根,2周后形成小植株,转移到温室中进行驯化。具有4~6片真叶时,于2003年10月20日移栽于直径30 cm、高24 cm的塑料盆中,基质为苇末和菜园土,体积比为1:1,置于温室中生长。每4天浇Hoagland完全营养液1次,移栽后30 d期间,每盆浇300 mL,45 d至75 d期间每盆浇500 mL。再生株共移栽20株。

实生苗的培育是将爱知结球白菜种子于2003年10月2日在温室中进行穴盘(72孔)育苗,生长到具有4~6片真叶时,于10月20日移栽于相同体积的塑料盆中(基质同上),置于温室中生长。管理方法同再生株。实生苗共移栽20株。

1.2.2 根尖染色体计数 将爱知结球白菜的种子10粒置于铺有湿滤纸的培养皿中,放入20℃培养箱中催芽。待根尖长约1 cm时切下,固定制片,镜检计数染色体数目。制片方法参照文献[6]进行。

将生根后的组培苗随机抽取20株,在无菌条件下切取长约1 cm的粗壮根尖,固定制片,镜检计数染色体数目。制片方法同上。

1.2.3 形态特征观测 移栽后每隔15 d选取长势一致的再生株和实生株各10株,观测记载株高、叶片数、最大叶的长度和宽度,直至第75天。

1.2.4 可溶性糖含量测定 移栽后于第15、30、45、60和75 d选取长势一致的再生株和实生株各10株,在其倒数第4片功能叶上,用直径1 cm打孔器取样300 mg,重复4次,用蒽酮比色法^[7]测定可溶性糖含量。

1.2.5 可溶性蛋白质含量测定 移栽后于第15、30、45、60和75 d选取长势一致的再生株和实生株各10株,在其倒数第4片功能叶上,用直径1 cm打孔器取样300 mg,重复4次,参照Bradford的考马斯

亮蓝G-250染色法^[8]测定蛋白质含量。

1.2.6 SDS-PAGE凝胶电泳分析 移栽后于第30、45、60和75 d选取长势一致的再生株和实生株各5株,在其倒数第4片功能叶上,用直径1 cm打孔器取样,每株取样100 mg,参照文献[9]的方法进行SDS-PAGE电泳分析。

用SAS软件对再生株和实生株各项指标进行差异显著性分析(*t*测验法)。

2 结果和分析

2.1 染色体数目的比较

爱知结球白菜再生株与实生株染色体数目见图1。再生株各株的染色体数目均为 $2n = 20$,与实生株相同,没有发现再生株染色体数目有增减和倍性的变化,植株再生过程中保持了染色体数的稳定。

2.2 形态特征的比较

爱知结球白菜再生株与实生株形态特征比较见表1。两者形态指标的变化趋势基本相同,只是组培苗移栽温室后的初期长势不齐,个体间在植株大小、叶片形态方面均有一定差异,形态指标低于实生株。移栽30 d后,观察到再生株叶脉更清晰,叶色加深,生长趋于稳定,长势比同条件下的实生株要快,各形态指标均高于实生株。由于再生株和实生株移栽温室时间较晚,生长后期气温降低,在不加温的温室中,植株后期生长缓慢,未能形成叶球。

2.3 可溶性糖含量的比较

爱知结球白菜再生株与实生株可溶性糖含量比较见图2。在移栽初期,再生株可溶性糖含量略有下降,30 d后迅速上升,表明生长期新形成的叶片不断进行光合作用,导致光合产物增加。实生植株从播种以后可溶性糖含量一直稳步上升,只在初期上升速度较慢,30 d后上升速度加快,但比再生株中的可溶性糖含量上升速度慢。统计分析表明,在测定的各个时期,再生株和实生株叶片中可溶性糖含量的差异不显著。

2.4 可溶性蛋白质含量的比较

爱知结球白菜再生株与实生株可溶性蛋白质含量的比较见图3。再生株可溶性蛋白质含量在移栽后早期呈上升趋势,蛋白质合成增加,30 d后逐步下降,说明此时生长加快,蛋白质合成速度慢于降解速度,代谢活动加强,叶片中的蛋白质向其他部位运

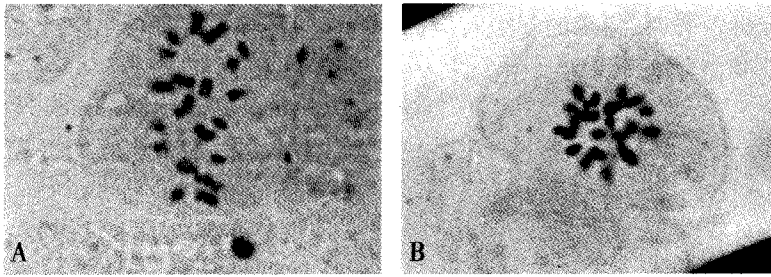


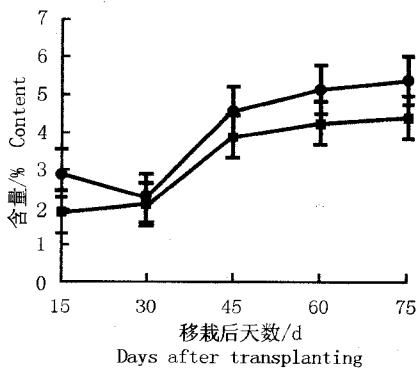
图1 爱知结球白菜实生株(A)和再生株(B)根尖细胞染色体数目的比较(2n=20)
Fig. 1 Comparison of chromosome number in root tip cells between seedling plant (A) and regenerated plant (B) of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai' (2n=20)

表1 爱知结球白菜再生株与实生株形态特征的比较¹⁾

Table 1 Comparison of some morphological characteristics between regenerated plant and seedling plant of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'¹⁾

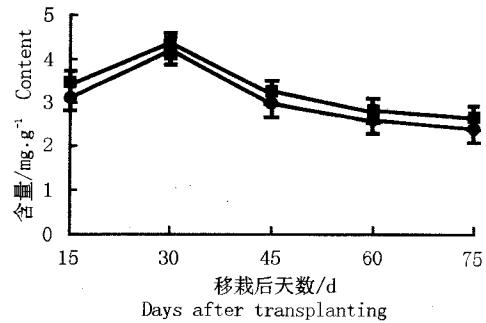
移栽后天数/d Days after transplanting	株高/cm Plant height		真叶数 True leaf number		最大叶的长度/cm Length of maximum leaf		最大叶的宽度/cm Width of maximum leaf	
	SP	RP	SP	RP	SP	RP	SP	RP
15	10.2	9.5	10.4	9.3	12.6	12.3	7.8	7.6
30	17.5	17.3	16.3	15.2	19.9	19.4	12.5	12.3
45	27.5	30.7*	23.5	25.3*	27.3	30.1*	19.4	22.7*
60	32.4	35.6*	26.4	28.7*	29.6	33.6*	21.2	24.4*
75	33.1	36.4*	27.5	29.4*	30.4	34.8*	22.8	25.9*

¹⁾ SP: 实生株 Seedling plant; RP: 再生株 Regenerated plant. *: 再生株与实生株的差异达5%显著水平 The difference between regenerated plant and seedling plant is significant at $\alpha = 0.05$.



—●— 再生株 Regenerated plant; —■— 实生株 Seedling plant

图2 爱知结球白菜再生株与实生株叶片中可溶性糖含量的比较
Fig. 2 Comparison of soluble sugar contents in leaves between regenerated plant and seedling plant of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'



—●— 再生株 Regenerated plant; —■— 实生株 Seedling plant

图3 爱知结球白菜再生株与实生株叶片中可溶性蛋白质含量的比较
Fig. 3 Comparison of soluble protein contents in leaves between regenerated plant and seedling plant of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'

输。实生株叶片中的蛋白质含量变化趋势与再生株相似。统计分析表明,在各个时期,再生株和实生株叶片中可溶性蛋白质含量的差异不显著。

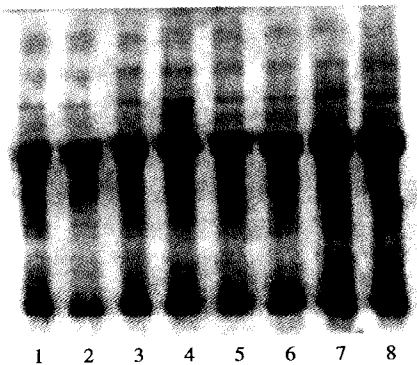
叶片中可溶性蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果见图4。除初期谱带较弱外,再生株和实生株两者谱带相似,没有特异蛋白带出现。表明两者之间

可溶性蛋白质组成没有明显差异,再生株叶片蛋白质组成保持了原种的特性。

2.5 可溶性糖与可溶性蛋白质含量比值的比较

爱知结球白菜再生株与实生株 C/N 比变化趋势见图5。可溶性糖与可溶性蛋白质含量的比值可以反映出 C/N 比的大小,在移栽初期 C/N 比小,代谢类型主要是氮素代谢。随着生长发育的进行,

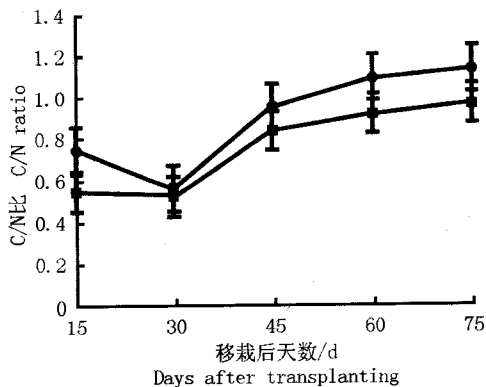
C/N 比逐渐上升,叶面积增加,光合作用加快,可溶性糖含量增加。统计分析表明,在测定的各个时期,再生株和实生株叶片中 C/N 比的差异不显著。



1,3,5,7: 分别为移栽 30、45、60 和 70 d 的再生株 Regenerated plant transplanted for 30, 45, 60 and 75 d respectively; 2,4,6,8: 分别为移栽 30、45、60 和 70 d 的实生株 Seedling plant transplanted for 30, 45, 60 and 75 d respectively.

图4 爱知结球白菜再生株与实生株叶片可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 电泳谱带

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoretogram of soluble protein in leaves of regenerated plant and seedling plant of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'



—●— 再生株 Regenerated plant; —■— 实生株 Seedling plant

图5 爱知结球白菜再生株和实生株叶片中碳氮 (C/N) 比的比较
Fig. 5 Comparison of carbon-nitrogen ratio (C/N) in leaves between regenerated plant and seedling plant of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* 'Aichi Hakusai'

3 讨 论

爱知结球白菜实生株和再生株从移栽至整个测定期,两者叶片可溶性糖和可溶性蛋白质含量变化趋势相似。

再生株各株的染色体数目均为 $2n = 20$,与实生株相同,说明在不定芽再生过程中,器官直接出芽方式使再生株保持了染色体数的稳定性。计巧灵

等^[10]发现在紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) 离体不定芽再生中产生的试管苗与种苗染色体数目相同的占 97.1%。黄丹枫等^[2]对魔芋 (*Amorphophallus rivieri* Durieu) 的再生株进行根尖染色体计数,发现 $2n = 26$ 的占 77.27%,说明再生株的遗传稳定性较好。

Richard 等^[11]报道了落叶松属 (*Larix* Mill.) 植物离体不定芽再生,大多数组培再生株中的酶谱与实生株的相同。本实验中的可溶性蛋白质电泳结果显示,两者的谱带相同,表明两者的蛋白质组成没有明显差异。以上结果说明,爱知结球白菜的再生株在所测定的性状上保持了原种的遗传稳定性。

参考文献:

- [1] Narasimhulu S B, Kirti P B, Mohapatra T, et al. Shoot regeneration in stem explants and its amenability to *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Brassica carinata* [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 359-362.
- [2] Huang D F, Wu A Z, Liu P Y, et al. Study on genetic stability of *Amorphophallus rivieri* tissue culture progenies [J]. Acta Horticulturae, 1995, 402: 214-221.
- [3] Vejsadova H, Pretova A. Cytological and histological study of morphogenesis in *Rhododendron* L. [J]. Advances in Horticultural Science, 2001, 14(2): 87-91.
- [4] Oh M H, Choi D W, Kwon Y M, et al. An assessment of cytological stability in protoplast cultures of tetraploid *Petunia hybrida* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 41(3): 243-248.
- [5] Kreuger M, Van D M, Postma E, et al. Genetically stable cell lines of cucumber for the large-scale production of diploid somatic embryos [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(2): 303-310.
- [6] 卢龙斗,常重杰. 遗传学实验技术 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996. 1-6.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 195-197.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [9] 何忠效,张树政. 电泳 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 41-46.
- [10] 计巧灵,王卫国. 新疆紫草的无性繁殖及其再生植株的遗传稳定性初探 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 499-502.
- [11] Richard S, Gauthier S, Laliberte S. Isozyme assessment of the genetic stability of micropropagated hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry) [J]. Canadian Journal of Forest Research, 1995, 25(7): 1103-1112.

(责任编辑:张垂胜)