

# 辣椒花药培养中若干影响因素的研究

王立浩 张宝玺\* 郭家珍 杨桂梅 堵玫珍

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 以4个辣椒品种(组合)为试材, 通过正交试验, 按不同取蕾时期, 在培养基中添加不同浓度的硝酸银、维生素C、植物生长调节剂、氮源、碳源、核酸、活性炭等研究对辣椒花药培养中组织褐化、愈伤组织发生率、胚状体的发生率的影响。结果表明: 硝酸银、维生素C能有效地减轻组织褐化; 对于辣椒花药培养愈伤组织生成率影响较大的前4位依次是植物生长调节剂、活性炭、硝酸银、维生素C; 对于胚状体发生率影响较大的前4位依次是维生素C、取蕾时期、碳源、硝酸银。

**关键词:** 辣椒; 花药培养; 愈伤组织; 胚状体发生; 褐化; 培养基

**中图分类号:** S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0199-06

## Studies of Effects of Several Factors on Anther Culture of *Capsicum annuum* L.

Wang Lihao, Zhang Baoxi\*, Guo Jiazhen, Yang Guimei, and Du Meizhen

(Institute of Vegetables and Flowers of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Four genotypes of pepper were used to study the effects of  $\text{AgNO}_3$ , Vitamin C, carbon source, nitrogen source, harvest time, plant growth regulator on the anther culture of *Capsicum annuum* L. through orthogonal tests. As the results,  $\text{AgNO}_3$ , Vitamin C can reduce the browning of the tissues; Plant growth regulator, active carbon,  $\text{AgNO}_3$ , Vitamin C have a higher effect on calli yields; Vitamin C, harvest time, carbon source,  $\text{AgNO}_3$  have a higher effect on embryogenesis. A new modified culture medium was concluded.

**Key words:** *Capsicum annuum* L.; Anther culture; Embryogenesis; Callus; Browning; Medium

关于辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 花药培养, 早在 1973 年就有获得单倍体植株的报道<sup>[1-3]</sup>。而后, 培养基的组成及培养方法有了不断的改进: 王玉英等对不同的蔗糖浓度和激素浓度做了比较, 指出 6% 的蔗糖浓度和低浓度的 NAA、IAA 有利于胚状体的发生<sup>[4]</sup>; 张述祖等报道了耀县小辣椒的花药培养过程中在培养基中添加 C-GMP 能提高胚状体的发生率<sup>[5]</sup>; 李春玲等报道了对甜椒花药培养的一些影响因素<sup>[6]</sup>; 陈肖师等对花药后代的遗传表现进行了观察研究<sup>[7]</sup>; 1981 年 Dumas 等利用花药培养的技术成功获得了 3 个不同遗传来源的 DH 群体 (doubled-haploid progenies)<sup>[8]</sup>, 北京市海淀区组织培养研究室亦有海花系列的花药培养品种推广。但是, 辣椒花药培养中仍有普遍未解决的问题。一是组织褐化问题: 在花药培养的 10~20 d, 由于细胞表面氧化, 以及花药培养中产生的乙烯, 花药会出现严重的褐变现象, 褐化影响组织活力, 降低胚状体的发生率; 二是培养基组成与胚状体发生率的关系目前在激素、活性炭的作用上存在争论, 碳源、水解酪蛋白、单核苷酸、脯氨酸等因子对辣椒花药培养的作用和影响程度也不明确<sup>[9]</sup>。根据其它作物花药培养的研究报道, 硝酸银能有效减轻组织褐化, 促进胚状体的发生率<sup>[10,11]</sup>; 同时, 有学者认为作为碳源麦芽糖比蔗糖更有利于胚状体的发生<sup>[12-14]</sup>; 但在辣椒花药培养中, 上述因素的作用没有见到相关报道。作者通过正交试验, 针对目前辣椒花药培养中存在的问题, 就培养中部分因素对辣椒花药培养的组织褐化、愈伤组织诱导率、胚状体发生率的影响做了系统研究, 以期提高培养效率。

收稿日期: 2003-10-09; 修回日期: 2004-02-24

基金项目: 国家“863”重大专项资助项目 (2002AA207012-1)

\* 通讯作者 Corresponding author

## 1 材料与方法

以海花3号(花培得到的甜椒品种)、新丰5号(微辣型的杂种一代)、Perennial × 77013B (微辣型组合)、灯笼椒 × 83-58 (微辣组合) 为试材, 于2000年2月26日播种, 4月27日定植日光温室。

花药培养: 摘取小孢子处于单核靠边期时的花蕾, 用自来水冲洗10~20 min, 70%乙醇浸20 s, 0.1%升汞浸20 min, 无菌水洗3~4次。培养方法参见文献[8]。

试验设计: 为了同时考察多因子、多水平的影响, 采用正交试验 L32 ( $4^5 \times 2^4$ ) 设计<sup>[15]</sup>, 在不同取蕾时期(因素之一)摘取花蕾, 将可能影响花药培养的硝酸银、维生素C、植物生长调节剂(2,4-D、KT、NAA)、水解酪蛋白、活性炭、碳源(蔗糖或麦芽糖)、核苷酸添加到CP培养基和R<sub>1</sub>培养基中, 用蔗糖为碳源不添加其它因素物质的为对照。正交表的表头设计以及各因子水平设计如表1所示。共32组试验, 每组试验做20个培养皿(40个花蕾)。

表1 正交表 L32 ( $4^5 \times 2^4$ ) 表头设计与各因子的水平设计

Table 1 Title of the orthogonal design table levels of supplemented components in the orthogonal design

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
水平 Levels	硝酸银 AgNO <sub>3</sub> (μmol/L)	维生素 C Vitamin C (μmol/L)	植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg/mL)	取蕾时期* Buds harvest time	水解酪蛋白 Proteolysis (mg/L)	碳源 Carbon (3%)	核苷酸 Nucleic acid (mg/L)	活性炭 Active carbon(%)	对照 Control
1	0	0	10 <sup>-8</sup> 2,4-D + 10 <sup>-8</sup> KT	第 1 周 First week	0	蔗糖 Sugar	0	0	0
2	10	10	5 × 10 <sup>-7</sup> 2,4-D + 10 <sup>-6</sup> KT	第 2 周 Second week	500	麦芽糖 Maltose	50	0.5	0
3	50	50	10 <sup>-8</sup> NAA + 10 <sup>-8</sup> KT	第 3 周 Third week					0
4	100	100	5 × 10 <sup>-7</sup> NAA + 10 <sup>-6</sup> KT	第 4 周 Forth week					0

\* 指摘取花蕾时距该品种始花期的时间。

\* The time from flowers beginning of the plants to huds harvesting.

数据统计: 自花药置床后的第30天开始, 每15 d调查1次褐化指数、愈伤组织发生数、胚状体发生数, 共调查4次。褐化等级如图版, 1所示(0级: 花药不变色, 或者微微变绿; 1级: 花药略变褐; 2级: 花药变褐色; 3级: 花药深褐色, 接近黑色), 褐化指数取平均数, 愈伤组织数、胚状体数取4次累计总数。愈伤组织诱导率等于每个处理花药总数除愈伤组织发生数, 胚状体诱导率为每个处理花药总数除胚发生数。

数据分析: 正交试验数据借助 excel 97 进行直观分析,  $r = |k_i - k_j|$ , 其中  $k_i$ ,  $k_j$  分别是该因子不同水平平均试验值中的最大值和最小值,  $r$  为直观分析法中的平均极差, 描述试验点分散幅度的量。 $r$  值的大小表征试验点分散幅度的大小。对各个因子对花药培养影响的试验结果做方差显著性分析。对同一因子对不同试材的影响的试验结果做方差比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 对花药褐化的影响

表2列出了4个供试材料在各因子不同水平处理下的褐化指数的极差和方差分析结果。其中对于海花3号的褐化指数, 影响因子从强到弱依次为硝酸银、维生素C、碳源、取蕾时期、活性炭、植物生长调节剂、水解酪蛋白、核苷酸。对于新丰5号, 依次为硝酸银、维生素C、碳源、植物生长调节剂、取蕾时期、水解酪蛋白、核苷酸、活性炭。对于 Perennial × 77013B, 依次为维生素C、碳源、植物生长调节剂、硝酸银、取蕾时期、活性炭、核苷酸。对于灯笼椒 × 83-58, 依次为硝酸银、植物生长调节剂、维生素C、取蕾时期、水解酪蛋白、核苷酸、活性炭。平均4个材料的试验结果, 对于褐化指数影响较大的因子依次是硝酸银、维生素C、碳源、植物生长调节剂、取蕾时期、碳源、活性炭、水解酪蛋白、核苷酸。硝酸银、维生素C的作用明显高于其它几个因子, 对于减轻褐化的浓度是50~100 μmol/L。活性炭、水解酪蛋白、核苷酸的影响较弱。经过方差分析, 硝酸银、维生素C在4

个材料中的至少 3 个材料对褐化指数的影响达到显著或极显著差异水平, 植物生长调节剂、取蕾时期对灯笼椒 × 83-58 的影响也达到了显著差异水平。通过不同因子对不同材料作用影响的显著性方差分析, 得出硝酸银对不同材料的作用效果达到了显著差异水平。

表 2 多因子变化对褐化指数影响的正交试验结果的直观分析和方差分析  
Table 2 Direct review and variance analysis of the orthogonal test of facts on the browning

试材 Varieties	硝酸银 AgNO <sub>3</sub>	维生素 C Vitamin C	植物生长调节剂 Plant growth regulator	取蕾时期 Buds harvest time	水解酪蛋白 Proteolysis	碳源 Carbon (3%)	核苷酸 Nucleic acid	活性炭 Active carbon	对照 Control
海花 3 号 Haihua 3	1.5 **	0.88 **	0.25	0.38	0.19	0.56	0.06	0.31	0.13
新丰 5 号 Xinfeng 5	1.63 **	1.00 **	0.38	0.25	0.063	0.81	0.06	0.06	0.13
Prennial × 77013B	0.50	1.13 *	0.63	0.50	0.00	0.88	0.13	0.38	0.38
灯笼椒 × 83-58 Denglongjiao × 83-58	1.13 **	0.50 *	0.88 *	0.50 *	0.25	0.75	0.25	0.25	0.13
平均 Everage	1.19	0.88	0.53	0.41	0.13	0.75	0.13	0.25	0.19
标准方差 S	0.191	0.055	0.058	0.011	0.010	0.014	0.006	0.014	0.012
F	16.33 *	4.67	4.92	0.92	0.83	1.16	0.50	1.16	

\*  $\alpha = 0.05$ , \*\*  $\alpha = 0.01$

## 2.2 对愈伤组织的影响

如表 3 所示, 对于海花 3 号, 各影响因子从强到弱依次为植物生长调节剂、活性炭、硝酸银、维生素 C、取蕾时期、水解酪蛋白、核苷酸、碳源。对于新丰 5 号, 依次为植物生长调节剂、活性炭, 硝酸银、维生素 C、取蕾时期、核苷酸、水解酪蛋白、碳源。对于 Prennial × 77013B, 依次为植物生长调节剂、维生素 C、取蕾时期、活性炭、硝酸银、水解酪蛋白、碳源、核苷酸。对于灯笼椒 × 83-58, 依次为植物生长调节剂、活性炭、取蕾时期、硝酸银、核苷酸、水解酪蛋白、维生素 C、碳源。平均 4 个材料的试验结果, 影响较大的因子依次是植物生长调节剂、活性炭、硝酸银、维生素 C、取蕾时期, 而核苷酸、水解酪蛋白、碳源的影响较小。经过方差分析, 植物生长调节剂、取蕾时期、维生素 C、活性炭在部分材料中对愈伤组织生成率的影响达到 5% 显著或 1% 极显著差异水平。通过不同因子对不同材料作用影响的显著性方差分析表明, 各因子对不同材料愈伤组织生成率的影响差异不显著。图版 2、图版 3 显示了来源于花药体细胞和花药小孢子的愈伤组织形态。

表 3 在多因子变化对愈伤组织生成率影响的正交试验结果的直观分析和方差分析  
Table 3 Direct review and variance analysis of the orthogonal test of facts on the calli yields

试材 Varieties	硝酸银 AgNO <sub>3</sub>	维生素 C Vitamin C	植物生长调节剂 Plant growth regulator	取蕾时期 Buds harvest time	水解酪蛋白 Proteolysis	碳源 Carbon (3%)	核苷酸 Nucleic acid	活性炭 Active carbon	对照 Control
海花 3 号 Haihua 3	0.13	0.11	0.22	0.05	0.05	0.00	0.05	0.20	0.08
新丰 5 号 Xinfeng 5	0.08	0.07	0.12 *	0.04	0.01	0.00	0.03	0.10	0.02
Prennial × 77013B	0.03	0.05 *	0.07 **	0.05 *	0.01	0.01	0.00	0.04 *	0.01
灯笼椒 × 83-58 Denglongjiao × 83-58	0.09	0.02	0.18	0.1	0.02	0.01	0.03	0.18	0.08
平均 Everage	0.08	0.06	0.15	0.06	0.02	0.01	0.03	0.13	0.05
标准方差 S	0.001	0.001	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.004	0.001
F	1.24	1.04	3.18	0.54	0.26	0.03	0.31	3.99	

\*  $\alpha = 0.05$ , \*\*  $\alpha = 0.01$

## 2.3 对胚状体发生率的影响

试材 Prennial × 77013B 在所有的培养条件下均没有胚状体产生 (表 4)。对于海花 3 号各因子, 影响从强到弱依次为取蕾时期、维生素 C、碳源、植物生长调节剂、硝酸银、水解酪蛋白、活性炭、

核苷酸。对于新丰 5 号, 依次为维生素 C、硝酸银、碳源、取蕾时期、水解酪蛋白、植物生长调节剂、活性炭、核苷酸。对于灯笼椒 × 83-58, 依次为维生素 C、取蕾时期、碳源、核苷酸、硝酸银、植物生长调节剂、活性炭。平均 3 个材料的试验结果, 影响较大的因子依次是维生素 C、取蕾时期、碳源、硝酸银、植物生长调节剂、水解酪蛋白、核苷酸、活性炭。可见, 在各个因子中: 维生素 C、取蕾时期、碳源、硝酸银等的影响较为关键。经过方差分析, 硝酸银、维生素 C 对 3 个材料的影响达到显著或极显著差异水平, 水解酪蛋白、取蕾时期、核苷酸等因子对灯笼椒 × 83-58 的影响也达到了显著或极显著差异水平。通过不同因子对不同材料作用影响的显著性方差分析, 得出硝酸银、维生素 C、植物生长调节剂、取蕾时期、碳源对不同材料的作用效果达到了显著或极显著差异水平, 说明在材料间的作用效果差异较大。图版 4、图版 5 显示了花药培养的子叶胚和成苗。

表 4 多因子变化对胚状体生成率影响的正交试验结果的直观分析和方差分析

Table 4 Direct review and variance analysis of the orthogonal test of facts on the embryos yields

试材 Varieties	硝酸银 AgNO <sub>3</sub>	维生素 C Vutamin C	植物生长调节剂 Plant growth regulator	取蕾时期 Buds harvest time	水解酪蛋白 Proteolysis	碳源 Carbon (3%)	核苷酸 Nucleic acid	活性炭 Active carbon	对照 Control
海花 3 号 Haihua 3	3.00	4.88	3.25	6.00	1.56	4.31	0.56	0.06	1.0
新丰 5 号 Xinfeng 5	2.25 *	2.75 *	1.25	1.63	1.38	1.88	0.25	0.63	0.63
Prennial × 77013B	—	—	—	—	—	—	—	—	—
灯笼椒 × 83-58 Denglongjiao × 83-58	1.00 *	2.75 *	1.00	2.50 *	1.63 *	1.88 *	1.13 *	0.63	0.75
平均 Everage	2.08	3.46	1.83	3.38	1.52	2.69	0.65	0.44	0.79
标准方差 S	0.681	1.008	1.014	3.567	0.011	1.312	0.133	0.072	0.024
F	28.00 *	41.48 **	41.71 **	146.76 **	0.46	53.99 **	5.47	2.97	

\*  $\alpha = 0.05$ , \*\*  $\alpha = 0.01$

### 3 结论与讨论

根据正交试验结果, 为提高胚状体的发生率, 除 Prennial × 77013B (各处理的花药培养胚的发生率是 0) 以外, 对于海花 3 号、新丰 5 号、灯笼椒 × 83-58 可以分别得到 3 种优化培养基配方; 同时, 也可以根据 3 种材料的试验结果推论较为普遍适用的一种培养基配方和培养条件: 用麦芽糖代替蔗糖, 加 50  $\mu\text{mol/L}$  维生素 C, 在始花期后的第一周内采取花蕾培养一般可以提高胚状体的发生率, 是否加入活性炭对于胚状体发生率影响不大, 但不加活性炭促进愈伤组织发生、加 0.5% 活性炭可以抑制愈伤组织发生。

以往有报道, 硝酸银和维生素 C 能够在部分作物的花药培养过程中减轻褐化<sup>[10,11]</sup>。本试验结果说明: 在辣椒的花药培养中, 硝酸银、维生素 C 同样能够有效地减轻褐化, 促进愈伤组织的生成, 提高胚状体的发生率。硝酸银 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  都是适合的, 维生素 C 最适浓度是 50  $\mu\text{mol/L}$ , 高于此浓度, 胚的诱导率反而有所下降。

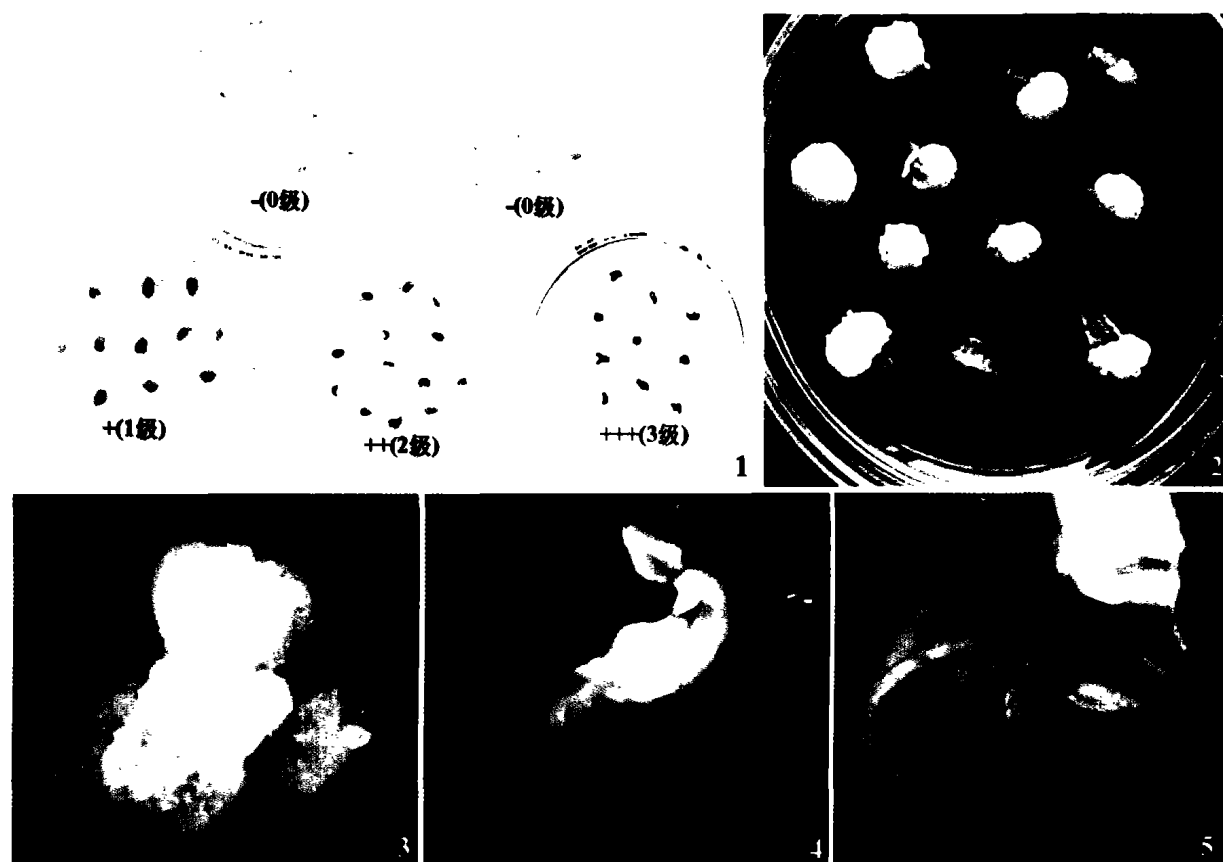
关于辣椒的花药培养, 前人对植物生长调节剂的种类、浓度和作用机理的研究结果有很大差异<sup>[4,16~18]</sup>。本试验证实: 植物生长调节剂对花药培养有较大影响, 特别是对于愈伤组织诱导率影响最大, 在同浓度 KT 的作用下, 2, 4-D  $5 \times 10^{-7}$  mg/mL 浓度的更能促进愈伤组织的发生; 但 2, 4-D  $10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7}$  mg/mL 对于胚状体诱导率的影响要低于对愈伤组织诱导率的影响。本试验各个因子对于愈伤组织和胚状体的诱导是不同的, 有利于愈伤组织生成的但不一定利于胚状体的生成。

碳源的改变对于愈伤组织的形成影响并不大, 但用麦芽糖代替蔗糖却能显著提高胚状体的发生率。对于取蕾时期, 以往多数人认为取蕾时间偏早更有利于花药的培养, 试验也证实了早期花蕾更有利于胚状体的诱导。本试验得出: 活性炭的添加与否是影响愈伤组织诱导率的主要因素之一, 对胚状体发生率并不是主要因素。

基因型对辣椒花药培养影响也较大。本试验中可以看出, 同一因子在不同材料之间的作用有明显差异, 特别是对不同材料花药培养胚状体发生率影响差异有 5 个因子达到了极显著水平。

水解酪蛋白、核苷酸对于减轻褐化、愈伤组织生成率影响不大, 对胚状体生成率有促进作用, 影响程度较小。

影响辣椒花药培养的因素很多, 除本文所述, 供试材料的生长状况、培养过程的预处理等都极为关键, 阐明整个花药培养调控的机理和条件仍需进一步研究。



图版说明: 1. 辣椒花药培养的褐变指数 [ - (0 级), + (1 级), ++ (2 级), +++ (3 级)]; 2. 辣椒花药培养的体细胞愈伤组织; 3. 小孢子愈伤组织与心形胚; 4. 子叶胚; 5. 小苗。

**Explanation of plates:** 1. Standard of browning of the anthers during the anther culture of *Capsicum annuum* L.; 2. Calli during the anther culture of *Capsicum annuum* L.; 3. Calli from microspore; 4. Cotyledonary embryo; 5. Plantlets.

### 参考文献:

- 1 Wang Y Y, Sun C S, Wang C C, et al. The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sinica*, 1973, 16: 147 ~ 1512
- 2 Kuo J S, Wang Y Y, Chien N f, et al. Investigation on the anther culture in vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum* L. *Acta bot. Sin.*, 1973, 15 (1): 43 ~ 473
- 3 George L, Narayanswamy S. haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 1973, 78: 467 ~ 4704
- 4 王玉英, 李春玲, 蒋钟仁. 辣椒和甜椒花药培养的新进展. *园艺学报*, 1981, 8 (2): 41 ~ 45
- 5 张述祖, 周敬茹, 李春玲, 等. 在耀县辣椒花药培养过程中 C-GMP 对胚状体形成的生物学效应. *园艺学报*, 1983, 10 (3): 192
- 6 李春玲, 蒋钟仁. 对甜椒花药培养中一些影响因素的研究. *中国蔬菜*, 1987, (2): 357
- 7 陈肖师. 甜椒花粉株系主要性状的遗传表现. *园艺学报*, 1987, (2): 113 ~ 118
- 8 Dumas de Vaulx R, Chambonnet D, Pochard E. Culture in vitro d' antheres de piment (*Capsicum annuum* L. ): amelioration des taux d' obtention de plantes ches differents genotypes par des traitements a +35°C. *Agronomie*, 1981, 1: 859 ~ 864
- 9 Guha S, S C Maheshwari. Cell division and differentiation of embryos in pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature*, 1966, 212: 97 ~ 98
- 10 Bidington N L, Sutherland R N, Robinson H T. Silver nitrate increases embryo production in anther culture of Brussels sprouts. *Ann. Bot.*,

- 1988, (62): 181 ~ 185
- 11 Chu C C, Hill R D. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of embryoids in *Triticum aestivum* L. *Plant*, 1988, 58: 239 ~ 244
  - 12 Finnie S J, Powell W, Dyer A F. The effect of Carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*, 1989, 103: 110 ~ 118
  - 13 Karsai I, Bedo I, Hayes P M. Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell. Tissue and Org. Cult.*, 1994, 39: 49 ~ 53
  - 14 孙宗修, 斯华敏, 程式华, 等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究. *中国水稻科学*, 1993, 7 (4): 227 ~ 231
  - 15 王式安. 数理统计方法及应用模型. 北京: 北京科学技术出版社, 1992. 475
  - 16 Novák F J. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Z. Pflanzenzüchtg*, 1974, 72: 46 ~ 54
  - 17 Ramon D S, Elisabet C, Agustin H. Androgenesis in *Capsicum annum* L. Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1997, 122 (4): 468 ~ 475
  - 18 朱至清, 孙敬三, 王敬驹. 小麦 (*Triticum aestivum*) 雄核发育的细胞学研究. *植物学报*, 1978, 20: 6 ~ 12

## 番茄 *E8* 启动子乙烯应答元件克隆及 DNA 序列分析

赵凌侠<sup>1,2</sup> 金丽鑫<sup>2</sup> 李柱刚<sup>1</sup> 曹又方<sup>1</sup> 邱承祥<sup>1</sup> 唐东芹<sup>1,2</sup> 钱虹妹<sup>1</sup> 唐克轩<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 上海交通大学复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海 200030; <sup>2</sup> 上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研发中心, 上海 200030)

### Cloning and DNA Sequence Analysis of Element Responsive to Ethylene in *E8* Promoter of the Tomato

Zhao Lingxia<sup>1,2</sup>, Jin Lixin<sup>2</sup>, Li Zhugang<sup>1</sup>, Cao Youfang<sup>1</sup>, Qiu Chengxiang<sup>1</sup>, Tang Dongqin<sup>1,2</sup>, Qian Hongmei<sup>1</sup>, and Tang Kexuan<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> Fudan-SJTU-Nottingham Plant Biotechnology R&D Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; <sup>2</sup> Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

关键词: 番茄; *E8* 启动子; DNA 序列

中图分类号: S 641 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 02-0204-01

*E8* 启动子是常用的番茄果实特异表达启动子之一, 是指番茄 *E8* 基因 5' 侧翼近 2.2 kb 的 DNA 序列。前人的研究表明, *E8* 基因 5' 侧翼 -2181 ~ -1088 区段的删除使 *E8* 基因表达量大幅度下降 (仅为完整 *E8* 启动子的 1/10), 同时该区段还是 *E8* 基因对乙烯应答的充分必要区域; 这说明了该区段是 *E8* 基因表达调控的重要元件。

为了探究不同遗传型栽培番茄 (*Lycopersicon esculentum*) *E8* 基因的 5' 侧翼 -2181 ~ -1088 区段 DNA 序列是否存在差异, 作者以 F1: 5'-cca agc ttg aat tca ttt ttg aca tc-3' 和 R1: 5'-cgc gga tcc cta gat atg ggt ctt tct ag-3' 为引物, 在 *pfu* DNA 聚合酶催化下以 3 份番茄 V06A0751、V06A1519 (由中国农科院蔬菜花卉所国家蔬菜种质资源中期库提供) 和 '澳洲明珠' (系本实验室保存) 的基因组 DNA 作模板进行了 PCR 扩增, 反应体系为 25  $\mu$ L: 其中 F1 和 R1 各 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), dNTPs 2  $\mu$ L (每种 5 mmol/L), 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, 模板 DNA 4  $\mu$ L (10 ng/ $\mu$ L), *pfu* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L (5U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 12.5  $\mu$ L, 混匀后上覆 25  $\mu$ L 矿物油; 在 Hybaid PCR 仪上扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min、56 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min, 1 个循环。回收 1.1 kb 目的片段并连入 T-easy vector (购自 Promega 公司), 测序结果依次命名为 p*E8*-4、p*E8*-7 和 p*E8*-10。利用软件 ClustalX 1.81 和 Ni and Li 的方法分别将测序结果与 p*E8* (*E8* 基因 5' 侧翼序列 -2181 ~ -1088 和 Zhou 等在 Gene-Bank 登录的 AF515784 进行多序列比较和计算序列间相似系数。

研究表明, 5 个不同遗传型栽培番茄 *E8* 启动子乙烯应答区域 (-2181 ~ -1088) 间的核苷酸虽然存在一定差异 (4 ~ 27 bp), 但相似系数均在 98% 以上, 说明栽培番茄 *E8* 启动子乙烯应答元件区域具有较高的保守性。现仅对 *E8* 启动子乙烯应答元件进行了初步的研究, 而 2.2 kb 的番茄 *E8* 启动子其他功能元件、番茄属种间 (如野生种) *E8* 启动子、番茄不同类型的果实特异表达启动子 [如 *E8*、PG (polygalacturonase)、2A11] 以及与番茄属亲缘关系更远的如苹果、香蕉、鳄梨果实特异表达启动子间的差异和功能的研究还有待进一步展开, 随着研究的不断深入, 有望获得功能更强的适于番茄果实特异表达的启动子。

收稿日期: 2003-09-10; 修回日期: 2004-02-12

基金项目: 国家“十五”计划项目 (2002AA206511); 上海科技攻关重大项目 (03DZ19310); 上海交通大学农科项目