

细胞分裂素对辣椒子叶再生的影响

李英慧 李 艳 杭晓明 王 朋

(辽宁师范大学辽宁省植物生物工程重点实验室, 大连 116029)

摘 要: 对不同浓度的 BA、ZT、KT 等细胞分裂素对辣椒子叶再生频率的影响进行了分析。结果表明, BA、ZT 的最佳浓度分别为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 再生频率都达到了 100%, 平均每个叶片分化芽数分别为 9.7、9.4; BA 浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与其它各处理差异显著或极显著; KT 基本上不能诱导不定芽。

关键词: 辣椒; 子叶; 再生; 细胞分裂素

中图分类号: S 641.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 03-0270-03

1 目的、材料与方法

遗传转化是近年来兴起的一种改良植物遗传特性的新技术, 建立一个高频率的离体再生系统是基因转化的基础工作。关于辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 子叶再生, 国内外均有报道^[1~4], 但都没有详细涉及不同浓度的各种细胞分裂素对再生频率的影响及不同细胞分裂素作用的差异问题。本研究以引进以色列的优良辣椒品种‘太空’为试验材料, 建立了高频率的再生体系, 并通过方差分析及新复极差分析找出了最佳的 BA、ZT 浓度范围, 为导入外源基因奠定基础。

用无菌水浸泡辣椒种子 2 h 左右, 剥去种皮, 然后用 75% 的酒精处理 45 s, 再用 0.1% 的升汞灭菌 2 min, 最后用无菌水冲洗 5 次。播种于 MS 无激素固体培养基上, 培养条件为每天光照 12 h, 光照强度为 2 500 lx, 白天温度 25℃, 夜间温度 20℃。切下 15 日龄的幼苗子叶, 接种在不同激素种类及其不同浓度配比的 MS 固体培养基上, 30 d 后调查子叶分化芽情况。每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 BA 对辣椒子叶芽分化频率的影响

根据有关研究的经验及预备试验, 以 MS 附加 IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基础培养基, 再添加不同浓度的 BA (1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 、 5.0 、 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。剪去子叶叶尖及边缘后置于培养基上培养, 5 d 左右开始膨大, 10 d 左右边缘长出愈伤组织, 20 d 左右开始有不定芽生成, 30 d 后各培养基上皆有不同数量的外植体有不定芽生成。不定芽的生成部位多在子叶与培养基相接触的一面, 但外植体的再生频率因 BA 的浓度不同而变化, 其中以 BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最好, 达到 100%, 分化情况如表 1。

由表 1 可以看出, 在其它激素含量及基本培养基一致的情况下, BA 浓度的变化对子叶的再生频率有一定影响 ($37.5\% \sim 100\%$)。为找出影响子叶再生频率的最佳 BA 浓度, 对各处理间进行了方差分析及多重比较 (表 1), 结果表明 BA 浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时子叶分化芽最佳, 其再生频率显著高于其它 5 个处理; BA 浓度在 $3.0 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 是子叶

分化芽的最佳范围，而 BA 1.0~ 2.0 及 6.0 mg•L⁻¹时的分化芽频率与在 3.0~ 5.0 mg•L⁻¹时的频率差异显著或极显著，说明此浓度不适于辣椒子叶分化芽。

2.2 ZT 对辣椒子叶芽分化频率的影响

在 IAA、GA 浓度分别固定为 0.1、2.0 mg•L⁻¹的条件下，发现以 ZT 3.0 mg•L⁻¹时子叶外植体芽分化频率最好，达到 100%，ZT 2.0、4.0、1.0 mg•L⁻¹依次递减，分别为 90.9%、68.2%、50.0%。在 IAA、GA 浓度固定为 0.5、2.0 mg•L⁻¹的条件下，ZT 在 2.0、3.0 mg•L⁻¹时芽分化频率都达到了 100%；其次为 ZT 4.0 mg•L⁻¹，芽分化频率为 75%；最后是 ZT 1.0 mg•L⁻¹，芽分化频率为 69.6%（表 2）。

由此可见，ZT 的浓度对辣椒子叶再生频率有一定的影响，与 BA 相比，其再生频率稍好，而且使用 BA 时，子叶在培养过程中边缘易褐化，浓度越高越严重。同时，使用 BA 时，子叶切口处生成的褐化愈伤组织较多，大部分不能产生不定芽。

表 2 不同浓度 ZT 对辣椒子叶分化芽的影响

Table 2 Effect of ZT concentration on shoot organogenesis from cotyledon of pepper

ZT (mg•L ⁻¹)	IAA (mg•L ⁻¹)	GA (mg•L ⁻¹)	接种外植体数 No. of explants inoculated	分化芽外植体数 No. of explants with shoots	再生频率 Frequency of differentiation (%)	每外植体芽数 No. of shoots on each explant
1.0	0.1	2.0	20	10	50	3.2
2.0	0.1	2.0	22	20	90.9	8.6
3.0	0.1	2.0	24	24	100	9.4
4.0	0.1	2.0	22	15	68.2	5.6
1.0	0.5	2.0	23	16	69.6	3.0
2.0	0.5	2.0	20	20	100	7.4
3.0	0.5	2.0	25	25	100	9.2
4.0	0.5	2.0	20	15	75	4.7

2.3 KT 对辣椒子叶再生频率的影响

KT 设置了 5 种浓度（1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg•L⁻¹），在 IAA、GA 浓度分别固定为 0.5、2.0 mg•L⁻¹的条件下，试材在 10 d 左右才开始长出愈伤组织，以后逐渐变大，但愈伤组织疏松、透明，在 20 d 后开始变褐，40 d 左右调查，没有不定芽发生。

2.4 BA、ZT 对辣椒子叶分化芽数量及芽伸长成苗的影响

从每一外植体分化的不定芽数量上看，BA 的效果好于 ZT，在 BA 浓度 1.0~ 6.0 mg•L⁻¹范围内，平均一个外植体上分化的芽数为 4.8~ 9.7，而 ZT 浓度 1.0~ 4.0 mg•L⁻¹时，其平均芽数为 3.0~ 9.4，普遍少于 BA 的结果（表 1、表 2）。

目前辣椒子叶再生植株的一个关键是解决再生芽的伸长难及成苗率低的问题。试验中我们观察到 ZT 的效果稍好于 BA，伸长芽的比率（以 2 cm 为标准）分别为 54%、41%。

表 1 不同浓度 BA 对辣椒子叶分化芽的影响

Table 1 Effect of BA concentration on shoot organogenesis from cotyledon of pepper

BA (mg•L ⁻¹)	接种外植体数 No. of explants inoculated	分化芽外植体数 No. of explants with shoots	每外植体芽数 No. of shoots on each explant	再生频率 Frequency of differentiation (%)
4.0	24	24	9.7	100 d C
3.0	24	21	8.8	87.5 c BC
5.0	24	21	8.8	87.5 c BC
6.0	24	17	5.2	70.8 b B
2.0	24	15	5.0	62.5 b B
1.0	24	9	4.8	37.5 a A

F= 13.35> F_{0.01(5,12)} = 5.06 P> 0.01

成苗率分别为 48%、36%，ZT 组合易产生畸形植株，GA 与 IAA 的浓度对芽伸长几乎没有影响。

参考文献:

- 1 曹冬孙, 贾士荣. 青椒子叶培养及植株再生. 园艺学报, 1993, 20: 171~ 175
- 2 孙世孟. 青椒子叶的组织培养. 莱阳农学院学报, 1996, 13 (3): 206~ 207
- 3 周钟信. 辣椒子叶离体培养再生植株. 华北农学报, 1994, 9 (2): 59~ 63
- 4 Gunay A L, Rao P S. In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper. Plant Science Letters, 1978, 11: 365~ 372

Effects of Cytokinins on Shoot Organogenesis from Cotyledon of Pepper

Li Yinghui, Li Yan, Hang Xiaoming, and Wang Peng

(Key laboratory of Liaoning Province for Plant Biotechnology, Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract: Three cytokinins BA, ZT, and KT were tested individually in series of experiments to determine their role in inducing shoot bud formation. The result showed that BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ or ZT $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was most favourable to shoot bud formation, KT was proved in effective in inducing shoot bud formation.

Key words: *Capsicum annuum* L.; Cotyledon; Organogenesis; Cytokinin

新书推荐

《分子克隆实验指南》第三版 (英文原版)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3re ed.

该书于 2001 年 1 月由美国冷泉港实验室出版社出版, 三卷本, 大 16 开, 平装, 2100 页, 比 10 年前的第二版增加近 450 页, 内容经过了全面的改写与更新, 充分反映了国际上近年生物技术的飞速发展, 为国际通用的权威分子生物学实验手册, 是当今生命科学领域的重要工具书。该书编者是 Joe Sambrook (Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia) 和 David Russell (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas)。各卷目录为:

Volume 1: 1. Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning; 2. Bacteriophage lambda and Its Vectors; 3. Working with Bacteriophage M13 Vectors; 4. Working with High capacity Vectors; 5. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed field Agarose Gel Electrophoresis; 6. Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA; 7. Extraction, Purification, and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells

Volume 2: 8. In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction; 9. Preparation of Radiolabeled DNA and RNA Probes; 10. Working with Synthetic Oligonucleotide Probes; 11. Preparation of cDNA Libraries and Gene Identification; 12. DNA Sequencing; 13. Mutagenesis; 14. Screening Expression Libraries

Volume 3: 15. Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli*; 16. Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells; 17. Analysis of Gene Expression In Cultured Mammalian Cells; 18. Protein Interaction Technologies Appendices

定价: 人民币 1300 元 (含邮费) (原价: USD\$ 205), 购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。款到后发书, 因数量有限, 按汇款先后顺序, 售完为止。