

辣椒离体培养中不定芽的诱导和伸长研究进展

臧 顺, 刘晓欢, 王启军

(西南大学 园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘 要:综述了辣椒离体培养中影响不定芽诱导的基因型、外植体、植物生长调节剂、其它添加物和基础培养基、碳源、培养容器等因素和影响伸长的植物生长调节剂、基础培养基等的研究进展;讨论了辣椒离体培养中不定芽诱导和伸长存在的问题以及今后的研究方向。

关键词:辣椒;离体培养;不定芽;伸长

中图分类号:S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0214-03

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 属茄科辣椒属 (*Capsicum*) 植物, 起源于南美北部热带地区, 广泛种植于亚热带和温带地区。辣椒在中国的种植面积居蔬菜作物第2位, 有着重要的社会和经济意义^[1]。

辣椒的产量和品质受环境胁迫、病虫害等的影响较大。传统的育种方法周期较长, 而且辣椒的遗传背景相对狭窄, 一些性状在自然界中很难发现, 难以通过传统的育种方法获得具有较强适应性的辣椒新品种。利用遗传转化技术改良植物性状, 进行新品种培育, 可以跨越物种间的屏障, 整合目的基因, 针对性强, 具有较高的研究和应用价值。通过离体培养实现离体再生是遗传转化的先决条件。辣椒属于再生顽拗型植物, 同其它茄科植物相比, 其离体再生相对困难, 植株再生率低^[2]。在辣椒的离体培养植株再生一般分为不定芽的诱导、伸长、生根3个阶段, 多数情况下外植体诱导形成叶状体或丛状枝, 并且诱导出的不定芽伸长困难, 导致植株再生率低。现对前人在辣椒离体培养中不定芽的诱导和伸长的主要影响因素等研究进展进行了综述。

1 不定芽的诱导

1.1 基因型

基因型是辣椒离体培养中不定芽诱导的主要影响因素。一般辣味型比甜味品种更易诱导出芽, 且品种之间的离体再生率存在较显著差异。Sanatombi 等^[3]、Hu 等^[4]也证实了不同基因型辣椒不定芽发生能力不同。

1.2 外植体

大多报道认为子叶是最适外植体, 但是 Venkataiah 等^[5-6]认为在芽形态发生上, 真叶外植体优于子叶。曹

亚从等^[7]则认为由子叶诱导出的叶状体实际上是外植体组织的延伸, 所以并不能形成正常的芽。Valadez-Bustos 等^[8]报道, 以胚和下胚轴作为外植体, 形成了能够正常形态发生的不定芽而子叶外植体却形成不能伸长的叶状丛芽。外植体在植株或者幼苗的生长位置也影响器官发生。Fári 等^[9]报道下胚轴的上端节段能够进行芽再生, 中间和基部节段只能产生根和愈伤。外植体苗龄也影响不定芽的诱导。子叶为外植体时, 一般认为10~16 d为适宜苗龄。Ramírez-Malagón 等^[10]发现幼苗的弯曲期下胚轴的上部区段切伤后作为外植体, 最易形成芽和进行芽伸长。Hu 等^[4]也认为以下胚轴作为外植体时, 下胚轴卷曲期是取外植体的最佳时期。外植体的处理状况也是影响器官发生的一个因素。Pozueta-Romero 等^[11]、柳建军等^[12]发现, 带叶柄的子叶外植体不定芽发生率显著高于无柄子叶、子叶叶缘和子叶叶柄, 子叶的近中央部位不定芽的诱导频率高于末端部位;曹亚从等^[7]发现带有胚根和下胚轴的半粒种子再生速度快, 芽能正常伸长。

1.3 植物生长调节剂

培养基中添加的植物生长调节剂很大程度上影响辣椒不定芽的诱导。一般将细胞分裂素和生长素配合使用诱导不定芽的分化。辣椒离体培养中常用的细胞分裂素有6-BA、ZT、KT、TDZ, 常用的生长素有IAA、IBA、NAA。大多数研究者认为, 相对于其它分裂素类, 6-BA用量在3.0~6.0 mg/L时分化效果最好, ZT次之, KT基本不能诱导不定芽分化, 6-BA和IAA配合使用比单用6-BA效果更好, 且6-BA与IAA的组合比与其它生长素类的组合效果好, IAA用量一般小于1.0 mg/L。黎定军等^[13]研究表明, 6-BA/IAA(5/1~10/1)诱导辣椒不定芽分化效果最好。而Arous等^[14]报道, 6-BA 5.0 mg/L和NAA 1.0 mg/L是诱导辣椒合子胚产生不定芽的最佳激素组合。Venkataiah 等^[6]报道,

第一作者简介:臧顺(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜学。
E-mail: 317067358@qq.com.

收稿日期:2013-04-05

同样的外植体和基因型, TDZ 比 6-BA 和其它细胞分裂素诱导产生更多的不定芽。Ahmad 等^[15]也利用 TDZ 实现了带节外植体的高效再生。Song 等^[16]以真叶为外植体, 在添加 2.0 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上不定芽诱导效果最好, 且再生芽在不加任何激素的 MS 培养基上可伸长和生根。Khan 等^[17]也报道, 使用添加 TDZ 的 MS 培养基, 以茎尖和节间为外植体实现植株再生。王洪霞等^[18]报道, BA 和 IAA 组合加入 TDZ 后, 不定芽的形成时间缩短。

1.4 其它添加物质

添加 PJ(辣椒汁液提取物)、DJ、LC(主要为脲类植物细胞分裂素)可促进不定芽的分化, 这些成分的加入往往使不定芽旺盛率提高, 表现为芽点明显、长势好, 容易伸长^[13, 19-20]。而 AgNO₃ 能抑制培养物产生有害物质, 改变极性分化现象并促进芽分化。添加 AgNO₃ 有利于提高不定芽的分化率, 防止外植体褐变。AgNO₃ 用量一般在 0~4.0 mg/L, 达到 8.0 mg/L 时不定芽分化受抑制^[13, 20-22]。

1.5 基础培养基、碳源、培养容器等

辣椒离体培养中的器官发生, 多数研究者采用 MS 培养基。但也有研究者报道使用 MB(MS 无机盐+B₅ 有机成分)基础培养基优于 MS, B₅ 有机成分的加入使不定芽诱导率提高也能使其长势变好^[13, 20, 22]。不定芽发生和发育需要碳源支持, 蔗糖是常用的碳源, 且用量一般为 3%。Montero 等^[23]发现, 葡萄糖比其它糖更适合诱导愈伤组织产生, 但是诱导出来的愈伤组织芽分化能力低, 蔗糖和麦芽糖能较好地平衡愈伤组织产生和芽分化。但是麦芽糖作为碳源时, 诱导出的不定芽伸长困难。Mohamed 等^[24]指出培养容器通气与否显著影响不定芽发生。曹亚从等^[7]研究表明, 子叶外植体从培养皿转入锥形瓶后, 在原来绿色松散状态的愈伤组织上形成了白色较致密愈伤组织, 此种较致密状态的愈伤组织有利于再生芽的形成。

2 不定芽伸长

2.1 植物生长调节剂

BA、IAA、GA₃ 是促进再生芽伸长的最常用激素组合。其中, BA 用量一般为 3 mg/L, GA₃ 用量一般为 1.0~2.0 mg/L, 继代时可 将 GA₃ 含量降低至 0.5 mg/L^[2, 4, 22, 24-25]。张余洋等^[26]指出 ZT 与 GA₃ 组合较 BA、IAA、GA₃ 组合对不定芽的伸长效果好。而 Lee 等^[27]利用添加 2.0 mg/L ZT+0.01 mg/L NAA 或 IAA 的 MS 培养基诱导不定芽的伸长。

2.2 其它添加物

Joshi 等^[28]强调 CuSO₄ 浓度达到 MS 培养基中 CuSO₄ 浓度的 30 倍时对不定芽的伸长有明显的促进作用。

张余洋等^[26]、李长福等^[19]、Grozeva 等^[29]也报道了 AgNO₃ 对不定芽伸长的促进作用。曹亚从等^[7]却指出 AgNO₃ 对减少外植体玻璃化有一定作用, 但对外植体的再生无明显的促进作用。EBR(一种类固醇内酯)、PAA(苯乙酸)、PG(间苯三酚)、2ip(异戊烯腺嘌呤)、Humates(腐殖酸酯)的使用也能促进辣椒芽的伸长^[24, 29-31]。另外, 添加 VB₅、水解酪蛋白和 LY(氨基酸混合物)、Zh、DJ、Spm(一种多胺)添加物也能提高辣椒不定芽的伸长率^[19, 25, 32]。黄真池等^[20]在培养基中同时添加 ABA(脱落酸)、Spd(亚精胺)和 PJ(辣椒汁液提取物), 也解决了不定芽伸长的难题。

2.3 基础培养基

国内不少研究者研究促进不定芽伸长时多采用 MB 基础培养基, B₅ 有机成分可与 GA₃ 协同作用, 使用 MB 培养基时, GA₃ 用量要比 MS 培养基时 GA₃ 用量低些^[13, 20, 25-26]。但是 Song 等^[16]、Kehie 等^[33]采用 MS 培养基诱导不定芽的伸长。

3 问题与展望

辣椒不定芽的诱导主要存在着以下问题: 一是不定芽发生困难、产生叶状丛芽、畸形芽, 并且不定芽难以伸长; 二是不定芽诱导的适宜外植体类型以及适宜外植体供体苗龄研究结果差异较大; 三是对诱导阶段不定芽的状态对之后不定芽伸长的影响研究较少。以后研究中筛选外植体供体时, 考虑外界环境对供体生长的影响, 选择适宜的外植体供体生长状态, 不再单一用供体生长天数来衡量。筛选适宜外植体时, 可以从组织学和细胞学上研究外植体的生理状态对不定芽诱导的影响。以此为基础综合考量培养基、添加物质和培养环境对不定芽诱导和以及诱导的不定芽的生理状态对伸长的影响。

参考文献

- [1] 马艳青. 我国辣椒产业形势分析[J]. 辣椒杂志, 2011(1): 1-5.
- [2] Kothari S L, Joshi A, Kachhwaha S, et al. Chilli peppers-A review on tissue culture and transgenesis[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(1): 35-48.
- [3] Sanatombi K, Sharma G J. *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(1): 141-145.
- [4] Hu T Z, Hua Z, Chen Z G, et al. The optimization of regeneration tissue culture system of three chilli peppers cultivars based on the uniform design and the methemical model equation[J]. ACTA Biologica Hungarica, 2012, 63(3): 372-388.
- [5] Venkataiah P, Christopher T, Subhash K. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L[J]. Plant Biotechnol, 2003(5): 245-250.
- [6] Venkataiah P, Subhash K. Genotype-explant and medium effects on adventitious shoot bud formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L[J]. Journal of Genetics and Breeding, 2001, 55(2): 143-149.
- [7] 曹亚从, 张正海, 王立浩, 等. 辣椒不同外植体处理方法对组织培养再生的影响[J]. 中国蔬菜, 2012(8): 32-39.

- [8] Valadez-Bustos G M, Aguado-Santacruz A G, Carrillo-Castañeda A G, et al. *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2009, 45(6): 650-658.
- [9] Fári M, Czákó M. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured *in vitro* [J]. *Scientia Horticulturae*, 1981, 15(3): 207-213.
- [10] Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N. An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 16(3-4): 226-231.
- [11] Pozueta-Romero J, Houlne G, Canas L, et al. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for Agrobacterium-mediated transformation [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2001, 67: 170-180.
- [12] 柳建军, 于洪欣, 于彦丽. 辣椒离体培养及植株再生的研究 [J]. *山东农业科学*, 2001(2): 25-26.
- [13] 黎定军, 赵开军. 辣椒子叶高效植株再生体系的建立 [J]. *园艺学报*, 2002(1): 25-29.
- [14] Arou S, Boussaid M, Marrakchi M. Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Appl Hortic*, 2001(3): 17-22.
- [15] Ahmad N, Siddique I, Anis M. Improved plant regeneration in *Capsicum annuum* L. from nodal segments [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(4): 701-704.
- [16] Song J Y, Sivanesan I, An C G, et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of miniature paprika (*Capsicum annuum*) 'Hivita Red' and 'Hivita Yellow' [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 19(9): 2768-2773.
- [17] Khan H, Siddique I, Anis M, et al. In vitro organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annuum* L [J]. *Plant Biochem Biotechnol*, 2011, 20(1): 84-89.
- [18] 王洪霞, 郭尚敬. TDZ 对甜椒不定芽分化的影响 [J]. *北方园艺*, 2012(3): 104-106.
- [19] 李长福, 张守鸿, 葛正龙, 等. 转基因辣椒离体子叶再生研究 [J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(5): 8-11.
- [20] 黄真池, 李飞凤, 曾骥, 等. 辣椒子叶高效再生体系的建立 [J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2007, 20(1): 13-18.
- [21] 宋卓, 刘清波, 徐健, 等. 辣椒愈伤组织再生体系研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2011(18): 114-115.
- [22] 张先云, 袁秀云, 马杰. 辣椒真叶离体培养及高效再生体系的建立 [J]. *北方园艺*, 2009(7): 50-52.
- [23] Montero L V, Phillips G C. Long-lasting *Capsicum baccatum* Organogenic callus' formation [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2005, 41(4): 470-476.
- [24] Mohamed M H, Alsadon A A. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum* [J]. *Biologia Plantarum*, 2011, 55(2): 370-374.
- [25] 余小林, 李乃坚. 辣椒子叶离体培养和植株再生体系的建立 [J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 42-46.
- [26] 张余洋, 汤银珠, 叶志, 等. 影响辣椒离体再生芽伸长因素研究 [J]. *武汉植物学研究*, 2007, 25(2): 185-191.
- [27] Lee Y H, Kim H S, Kim J Y, et al. A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 23(1-2): 50-58.
- [28] Joshi A, Kothari S L. High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, 88(2): 127-133.
- [29] Grozeva S, Rodeva V, Todorova V. *In vitro* shoot organogenesis in Bulgarian sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties [J]. *Electronic Journal of Biology*, 2012, 8(3): 39-44.
- [30] Husain S, Jain A, Kothari S L. Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 19(1): 64-68.
- [31] Vinod K B, Sumita K, Kothari S L. Phloroglucinol mediated shoot bud elongation in *Capsicum annuum* L [J]. *Natl Acad Sci Lett*, 2012, 35(4): 331-335.
- [32] 黄炜, 巩振辉. 辣椒离体再生体系研究 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(12): 268-271.
- [33] Kehie M, Suman K, Tandon P. *In vitro* plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili [J]. *Biotech*, 2012(2): 31-35.

Research Progress on Adventitious Bud Induction and Elongation in the Process of *in vitro* Culture of Pepper

ZANG Shun, LIU Xiao-huan, WANG Qi-jun

(Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Key Laboratory of Vegetable Sciences of Chongqing, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract: The research progress on factors affecting adventitious bud induction (genotype, explants, plant growth regulators and other supplements, basic mediums, carbon sources and culture vessel types) and elongation (plant growth regulators and basic medium) in the process of *in vitro* culture of pepper were summarized. Moreover, the problems and the future research direction on adventitious bud induction and elongation in the process of *in vitro* culture of pepper were discussed.

Key words: pepper; *in vitro* culture; adventitious buds induction; elongation