

辣椒离体培养及再生体系的研究

徐建中^{1,2}, 陈金芳^{1,2}, 杨玉芳², 宋伟光², 田洪²

(1. 河北省天然色素工程技术研究中心, 河北 邯郸 057250; 2. 晨光生物科技集团股份有限公司, 河北 邯郸 057250)

摘要:以“韩国甜椒”为试材, 研究外植体种类、苗龄、基本培养基种类、激素组合等多种因素对辣椒组织再生的影响。结果表明: 带柄子叶再生能力较子叶和下胚轴切段强, 14 d 苗龄幼苗的外植体芽分化率较高, 最佳芽分化培养基为 MB+4.5 mg/L BA+0.5 mg/L IAA+4 mg/L AgNO₃+200 mg/L Cef, 最佳芽伸长培养基为 MS+3 mg/L BA+0.3 mg/L IAA+2 mg/L GA₃+4 mg/L AgNO₃+200 mg/L Cef, 生根培养基先用 1/2MS+0.4 mg/L NAA+4 mg/L AgNO₃, 继代用 1/2MS+0.4 mg/L NAA+0.2% 活性炭。

关键词:辣椒; 植株再生体系; 离体培养; 带柄子叶

中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0100-04

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属双子叶植物纲茄科辣椒属植物, 原产于南美洲热带地区, 有辣味, 供食用, 是一种大众化蔬菜和调味料。辣椒中的辣椒素类物质还具有抗炎及抗氧化作用, 辣椒中维生素 C 的含量在蔬菜中居第一位。我国是辣椒种植大国, 但目前辣椒栽培的一大困扰在于现有品种大多易遭受真菌、细菌、病毒等侵染, 病虫害严重, 造成了重大的经济损失。常规育种手段如杂交育种需时较长, 随着转基因技术的不断突破, 人们可以将抗病虫害基因定向导入作物中, 使其稳定表达而达到改良物种的目的^[1-4]。

开展植物基因工程的前提是要建立一个稳定、高效的离体再生体系。辣椒再生的影响因素有很多, 其瓶颈在于基因型依赖现象严重、芽伸长困难、畸形芽比例较高^[5-9], 该研究从外植体类型、基本培养基的选择、激素配比组合、分化芽形态方面探讨了各因素对辣椒再生体系的影响, 旨在为进一步开展辣椒遗传转化奠定基础。

1 材料与方

1.1 试验材料

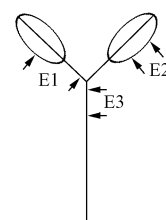
1.1.1 供试材料 “韩国甜椒”为常规种, 由晨光生物科技集团有限公司提供。

1.1.2 培养基 MS 培养基: 购自青岛海博, 含糖含琼脂, pH 5.8。MB 培养基: 购自北京西美杰, 另添加 3% 蔗糖+0.8% 琼脂, 调节 pH 5.8。1/2MS 培养基: 购自青岛海博, 另添加 1% 蔗糖+0.8% 琼脂, pH 5.9。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的制备 辣椒种子经 75% 酒精消毒 1 min, 无菌水清洗 3 遍, 再经 10% NaClO 消毒 10 min, 无菌水清洗 6 遍, 播种于 MS+30 g/L 蔗糖(pH 5.8)培养基上。置于 25℃, 2 000 lx 光强, 16 h/d 光照人工培养箱中长至幼苗。

1.2.2 不定芽的诱导和分化 取子叶平展, 真叶长 2~5 mm 的幼苗, 13~14 d 苗龄, 用手术刀切下相应部位的外植体(图 1)。子叶外植体取子叶中段; 带柄子叶去叶尖, 保留叶柄约 4~5 mm; 下胚轴切段取下胚轴上部 5~10 mm。将外植体接种于芽分化培养基(MB+4.5 mg/L BA+0.5 mg/L IAA+4 mg/L AgNO₃+200 mg/L Cef, 3 次重复, 20 d 后统计分化率并进行继代, 继代使用 MS 为基本培养基。



注: 箭头表示切割部位, E1 为带柄子叶, E2 为子叶, E3 为下胚轴。

Note: Arrow indicates cutting position, E1 indicates cotyledon with petiole, E2 indicates cotyledon, E3 indicates hypocotyl.

图 1 外植体取材部位示意图

Fig. 1 Schematic diagram of different explants

1.2.3 苗龄对不定芽分化的影响 选取苗龄为 12、14、16 d 的幼苗, 以带柄子叶为外植体, 接种至芽分化培养基 20 d 后统计不定芽分化率。

1.2.4 基本培养基对不定芽分化的影响 使用 MS、

第一作者简介:徐建中(1983-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail: xujianzhong1983@163.com.

收稿日期:2014-11-10

MB 为基本培养基,添加最适于芽分化的添加物 4.5 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA + AgNO₃ 4 mg/L + 200 mg/L Cef 来观察其对不定芽分化的影响。

1.2.5 不同激素配比对不定芽分化的影响 以 MB 为基本培养基,内含蔗糖 30 g/L,琼脂粉 8 g/L,添加不同质量浓度的细胞分裂素 6-BA(0.0~6.0 mg/L),AgNO₃ (0.0~6.0 mg/L)以及生长素 IAA(0.5~1.5 mg/L),采用均匀设计法,每个处理含 100 个带柄子叶外植体,重复 3 次,选用 U₅ (5² × 3) 均匀设计表考察不同外源生长因子交叉配对对诱导率的影响,因素和水平见表 1。

表 1 不定芽诱导 U₅ (5² × 3) 均匀设计

Table 1 U₅ (5² × 3) factors and levels of UD for shoot buds induction media

因素 Factor	1	2	3	4	5
IAA/(mg · L ⁻¹)	0.3	0.5	1.0		
6-BA/(mg · L ⁻¹)	0.0	1.5	3.0	4.5	6.0
AgNO ₃ /(mg · L ⁻¹)	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0

1.2.6 不定芽的伸长 将经过 2~3 次芽分化诱导培养后形成的带茎芽切下,转移到芽伸长培养基,芽伸长培养基中除含有诱导芽分化的植物激素外,还添加 1.0~4.0 mg/L 的 GA₃,观察芽伸长的状态。

1.2.7 生根诱导培养基的优化 切取茎已伸长且较粗壮的不定芽进行生根诱导培养,从基本培养基、生长素种类、是否添加 AgNO₃ 及是否添加活性炭几个方面对生根诱导培养基进行优化。

1.2.8 生根、练苗与移栽 待芽长高至 2 cm 左右、茎较长且粗壮后可转移至生根培养基,诱导生根 10~15 d 后可见芽基部长出白色细长的根,15 d 继代 1 次,待根较长后可开始练苗。先打开组培瓶的盖子,半开口,密切观察植株生长状态,若出现失水萎蔫现象,则立即减小开口面积,练苗 3~4 d 后移植于以一定比例混合的泥炭土、蛭石、珍珠岩的营养土中,表面覆盖保鲜膜进行保湿培养,后逐渐撤去保鲜膜,15 d 后转移至温室中正常栽培管理。

2 结果与分析

2.1 不同外植体种类对不定芽分化的影响

由表 2 可知,带柄子叶的平均分化率为 92.08%,子叶的平均分化率为 50.41%,下胚轴的平均分化率为 13.92%,带柄子叶的分化率最高,下胚轴的分化率最低,故选择带柄子叶作为下步研究用的外植体。

2.2 苗龄对不定芽分化的影响

由表 3 可知,14 d 苗龄的带柄子叶分化率达到最高,而 16 d 苗龄的带柄子叶分化率显著降低。

2.3 基本培养基对不定芽分化的影响

该试验结果表明,带柄子叶外植体在 MS/MB 培养基上分化率均较高,达 90% 以上,但在二者中的分化芽形态有极大差别。在 MS 培养基上,其分化芽多集中在

在子叶柄端,呈花型或叶型畸形芽,无生长点,极难伸长(图 2A 和 B)。而在 MB 培养基上,分化出带茎芽的频率较高(图 2C),将带茎芽切下转移至芽伸长培养基上其茎伸长得极快(图 2D)。

表 2 外植体类型对不定芽分化的影响

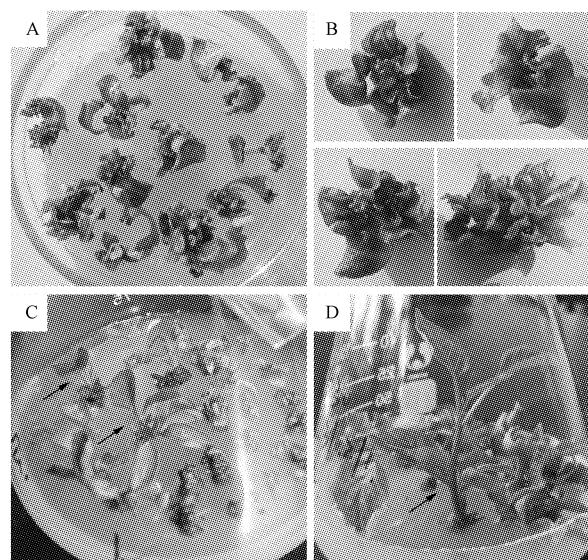
Table 2 Effect of different explants on the differentiation of adventitious buds

外植体类型 Type of explants	外植体数 Number of explants	分化外植体数 Number of differentiated explants	分化率 Rate of differentiation / %
带柄子叶 Cotyledon with petiole	69	66	95.65
子叶 Cotyledon	27	25	92.59
下胚轴切段 Hypocotyl	150	132	88.00
	54	35	64.81
	18	9	50.00
	129	47	36.43
	28	5	17.86
	11	1	9.09
	81	12	14.81

表 3 苗龄对不定芽分化的影响

Table 3 Effect of age of seedling on the differentiation of adventitious buds

苗龄 Age of seedling / d	外植体数 Number of explants	分化外植体数 Number of differentiated explants	分化率 Rate of differentiation / %
12	203	184	90.6
14	189	174	92.1
16	182	105	57.7



注:A、B 为带柄子叶在 MS 培养基上形成的分化芽;C、D 为带柄子叶在 MB 培养基上形成的分化芽。

Note: A and B were adventitious buds from cotyledon with petiole on MS medium; C and D were adventitious buds from cotyledon with petiole on MB medium.

图 2 基本培养基种类对分化芽形态的影响

Fig. 2 Effect of different basic mediums on the morphology of adventitious buds

2.4 不同激素配比对不定芽分化的影响

由表4可知,3种外源生长物质对辣椒不定芽的诱导都有影响,在6-BA为4.5 mg/L、IAA为0.5 mg/L、AgNO₃为4.0 mg/L时,带柄子叶不定芽分化频率最高,达到90.00%以上。IAA为0.5 mg/L时,6-BA由4.5 mg/L降至3.0 mg/L时,不定芽分化频率由93.45%明显降低至56.85%。而将IAA提高到1.0 mg/L时,

表4 不同激素配比对不定芽分化的影响

Table 4 Effect of different hormone combinations on the differentiation of adventitious buds

试验次数 Treatment times	因素 Factor IAA /(mg·L ⁻¹)	6-BA /(mg·L ⁻¹)	AgNO ₃ /(mg·L ⁻¹)	不定芽分化率 Differentiation rate of adventitious buds/%
1	1	1	3	1.25
2	1	2	5	3.65
3	1	3	1	2.68
4	1	4	4	28.68
5	1	5	2	12.65
6	2	1	1	2.89
7	2	2	2	24.25
8	2	3	4	56.85
9	2	4	3	93.45
10	2	5	5	63.48
11	3	1	4	2.48
12	3	2	2	18.45
13	3	3	5	40.45
14	3	4	1	26.54
15	3	5	3	59.85

表5

生根培养基对不定芽生根的影响

Table 5

Effect of different mediums on the rooting of adventitious buds

基本培养基 Basic medium	激素等添加物 Hormones and other additives				活性炭 Activated carbon/%	生根效果 Rooting effect
	NAA /(mg·L ⁻¹)	IAA /(mg·L ⁻¹)	IBA /(mg·L ⁻¹)	AgNO ₃ /(mg·L ⁻¹)		
MS	0.1	—	—	4	—	—
	0.2	—	—	4	—	—
	0.2	0.1	—	4	—	—
	0.1	—	—	4	—	—
MB	0.2	—	—	4	—	—
	0.2	0.1	—	4	—	—
	0.2	—	—	4	—	—
	0.2	0.1	—	4	—	—
1/2MS	0.1	—	1.0	—	0.04	—
	0.1	—	0.5	—	0.04	—
	0.4	—	—	—	0.2	++
	0.4	—	—	4	0.2	+

2.7 生根、练苗与移栽

待不定芽伸长至1.5~2.0 cm时,将其自基部切下,转移至生根培养基上,15 d后即有不定根生成,不定根诱导率达100%。生根及移土培养情况如图3所示。

3 讨论

关于辣椒离体再生和稳定遗传转化体系的研究非常多,普遍认为基因型依赖性较强、芽伸长困难是困扰辣椒植株再生的两大难题^[10-16]。该试验中先使用MS培养

不定芽分化频率也明显下降,并伴有生根现象。因此,较高的6-BA/IAA有利于不定芽的分化,该研究确定的最佳比例为9:1。

2.5 不定芽的伸长

添加GA₃后不定芽有不同程度的伸长,其中以添加2.0 mg/L GA₃促进芽伸长的效果最好。当GA₃水平达到4.0 mg/L时,芽伸长率反而降低,伸长的不定芽细长瘦弱不易生长为正常植株,可能是GA₃在体内累积过多引起的。最佳芽伸长培养基为MS+3 mg/L BA+0.3 mg/L IAA+2 mg/L GA₃+4 mg/L AgNO₃+200 mg/L Cef。

2.6 生根诱导培养基的优化

由表5可知,基本培养基为MS、MB时不定芽生长状况不佳,即使添加了AgNO₃,茎底部与培养基接触部分仍易褐化、变黑,无分化迹象,而以1/2MS为基本培养基时,不定芽生长较好,易分化生根。该试验中NAA为诱导生根的最佳生长素,单独添加0.4 mg/L时即可生出根来。不定芽在1/2MS+0.4 mg/L NAA+4 mg/L AgNO₃上生长15 d后茎基部愈伤膨大极明显,有生根迹象,再继续代至1/2MS+0.4 mg/L NAA+0.2%活性炭时快速生出根来,添加活性炭的培养基中根细长,但不添加活性炭的培养基中愈伤组织徒长、根数目较多、粗壮、但极难伸长。故最佳生根培养基为1/2MS+0.4 mg/L NAA上生长15 d后继代至1/2MS+0.4 mg/L NAA+0.2%活性炭上。

基作为基本培养基,结果BA添加浓度2、3、4、5、6 mg/L,同时IAA添加浓度为0.5、1.0 mg/L,添加AgNO₃ 4 mg/L,结果均是分化芽为花型或叶状畸形芽,无生长点,不会继续伸长。然后尝试了MB培养基,发现芽分化形态有了较大改变,初时分化出的组织呈深绿色、结构紧凑密集,14~16 d后继代至以MS为基本培养基的芽分化诱导培养基上,适应一段时间后会带茎芽长起。此时将带茎芽切下,转移至芽伸长培养基上,该分化芽会迅速

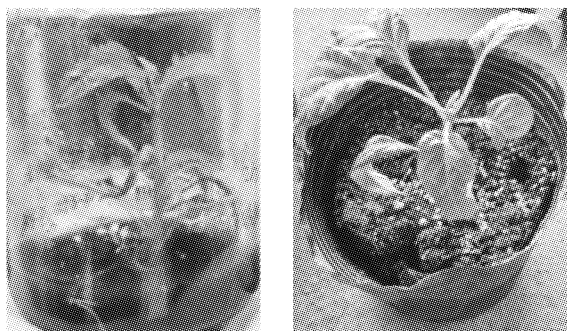


图3 再生苗生根及移土培养

Fig. 3 Rooting and shifting soil cultivation of regeneration plant
长高、变壮,芽伸长率极高。故认为,芽分化率、每外植体所分化的不定芽数量不是衡量芽分化质量的唯一指标,芽分化形态非常重要,只有芽分化完全才能够顺利进行茎伸长。

在 MS/MB+4.5 mg/L BA+0.5 mg/L IAA 上外植体虽然不褐化,但分化率较低,仅添加 4 mg/L 的 AgNO_3 ,会使得外植体与培养基接触部分发黑,抑制其分化,这可能是因为 Ag^+ 为重金属离子,对植物细胞的生理、代谢有一定的毒害作用,而同时添加 AgNO_3 和 Cef 则芽分化率大大提高。该试验建立的辣椒带柄子叶离体培养及再生体系为下一步的辣椒遗传转化奠定了基础。

参考文献

- [1] 王玉文,杨美珠,潘乃遂,等.甜椒的离体再生及基因转化[J].植物学报,1991,33(10):780-786.
- [2] 黎定军,谢丙炎,张宝玺,等.辣椒抗病基因工程研究中的主要问题与对策[J].园艺学报,2000,27(增刊):509-514.

- [3] 董春枝,姜春晓,冯兰香,等.甜(辣)椒导入 CMV 卫星 RNA 互补 DNA 的植株再生[J].园艺学报,1992,19(2):184-186.
- [4] 毕玉平,单雷,王兴军,等.双抗 TMV+CMV 辣椒转基因工程植株的再生及抗病毒鉴定[J].天津农学院学报,1998,5(1):1-7.
- [5] 周钟信,张宗江,刘艳军,等.辣椒子叶离体培养再生植株[J].华北农学报,1994,9(2):59-63.
- [6] 曹冬孙,贾士荣.青椒子叶培养及植株再生[J].园艺学报,1993,20(2):171-175.
- [7] 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):267-271,279.
- [8] 张金文,范兴中,王莹,等.辣椒离体培养及再生体系的研究[J].西北植物学报,2006,26(9):1893-1899.
- [9] 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,2002,27(1):42-46.
- [10] Manoharan M, Vidya C S S, Sita G L. Agrobacterium-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. *Pusa jwala*) [J]. Plant Science, 1998, 131: 77-83.
- [11] Ahmad N, Siddique I, Anis. Improved plant regeneration in *Capsicum* L. from nodal segments[J]. Blollgia Plantarum, 2006, 50(4): 701-704.
- [12] Dabauza M, Pena L. High efficiency organogenesis in sweetpepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from different seedinexplants[J]. Plant Growth Regulation, 2001, 33: 221-229.
- [13] Martine F D, Wang Y W, Sofia B, et al. *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 53: 79-84.
- [14] 邓明华,邹学校,周群初,等.辣椒子叶离体培养植株再生研究[J].长江蔬菜,2003(6):36-39.
- [15] 黎定军,张宝玺,赵开军,等.辣椒子叶高效植株再生体系的建立[J].园艺学报,2002,29(1):25-29.
- [16] 汤银珠.辣椒再生体系的建立及 Bt 与 Ca-Eif4E 基因转化辣椒[D].武汉:华中农业大学,2005.

Study on *in vitro* Culture and Regeneration System of Pepper (*Capsicum annuum* L.)

XU Jian-zhong^{1,2}, CHEN Jin-fang^{1,2}, YANG Yu-fang², SONG Wei-guang², TIAN Hong²

(1. Engineering Research Center of Natural Pigment in Hebei Province, Handan, Hebei 057250; 2. Chenguang Biotech Group Co. Ltd., Handan, Hebei 057250)

Abstract: The effect of different explants, age of seedling, different basic mediums and combinations of hormones on plant regeneration were investigated by using the variety of pepper (*Capsicum annuum* L.) 'South Korea pepper' as experiment material. The results showed that cotyledon with petiole taken from 14-day-old seedlings was much easier to induce regeneration than cotyledon and hypocotyl. The optimal medium for the differentiation of pepper buds was MB+4.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+4 mg/L AgNO_3 +200 mg/L Cef, the medium for the bud elongation was MS+3 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+2 mg/L GA_3 +4 mg/L AgNO_3 +200 mg/L Cef and the medium for rooting culture was 1/2MS+0.4 mg/L NAA+4 mg/L AgNO_3 and 1/2MS+0.4 mg/L NAA+0.2% activated carbon as subculture medium.

Keywords: pepper; plant regeneration; *in vitro* culture; cotyledon with petiole