

# 辣椒离体培养和植株再生体系建立<sup>\*</sup>

谢立波<sup>1</sup>, 郭亚华<sup>1</sup>, 李景富<sup>2</sup>, 王 雪<sup>1</sup>, 邓立平<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农科院园艺分院, 哈尔滨 150069; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 选 3 种不同基因型的辣椒(*Capsicum annuum* L.) 材料, 建立了辣椒高频离体再生体系, 试验结果表明: 芽分化的最适培养基为: MS+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L; 芽伸长的最适培养基为 MS+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA3 2 mg/L; 生根的最适培养基为 MS+NAA 0.1 mg/L, 当植株长到 10~12 片叶时, 进行移栽。

**关键词:** 辣椒; 离体培养; 植株再生

中图分类号: S 641.304.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2006)01-0048-05

## Establishment of in Vitro and Plant Regeneration System of Pepper

XIE Li bo<sup>1</sup>, GUO Ya hua<sup>1</sup>, LI Jing fu<sup>2</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, DENG Li ping<sup>1</sup>

(1. Horticultural Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069; 2. Northeast Agriculture University, Harbin 150086)

**Abstract:** Using the three different genotypes of the pepper as experimental materials. A rapid and efficient in vitro regeneration system of pepper was established. The results as follows: the optimum shoot inducing medium is MS+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L, the optimum shoot extension inducing medium is MS+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA3 2 mg/L, the optimum root inducing medium is MS+NAA 0.1 mg/L. When the plant height is 10-12cm, They can be transplanted.

**Key words:** pepper; tissue culture; regeneration system

自 George<sup>[1]</sup> 首次开展辣椒组织培养工作以来, 国内外相继有采用不同的辣椒外植体, 如子叶<sup>[2~5]</sup>、茎尖<sup>[6]</sup>、叶片<sup>[7]</sup>、下胚轴<sup>[3~5]</sup>、子叶柄<sup>[8]</sup>、花药<sup>[9,10]</sup> 及原生质体<sup>[11]</sup> 等组培成功的报道, 但由于选材以及其他原因的影响, 普遍存在分化率低, 培养周期长, 不定芽生长能力弱, 多数分化芽不伸长等问题, 尚不能满足基因工程育种所需大量分化苗的要求。本研究通过辣椒离体培养, 建立高效的植株再生体系, 为辣椒的基因转化、品种改良奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

由本分院生物技术室提供三种基因型辣椒自交

系, 代号分别为 1、2 和 3 号。

### 1.2 试验方法

1.2.1 辣椒无菌苗和外植体的获得 选子粒饱满的辣椒种子, 置 50℃热水中浸泡 20 min, 并轻轻摇动, 再浸于 30℃水中 16 h, 使其充分吸水。然后用 70% 乙醇消毒 60 s, 用 20% NaClO 浸泡 20 min, 最后用无菌水冲洗 4 次, 用无菌滤纸吸干水分, 均匀播种于 MS 培养基上, 28℃暗培养 3 d, 然后移至光下继续培养, 每天光照 16 h, 光照强度 1 600~1 800 lux, 培养温度为 26±1℃, 培养无菌苗。取 7~10 d 苗龄的无菌苗, 切取子叶、下胚轴和子叶节三种外植体。具体切法如下: 子叶: 子叶切去叶尖和叶柄, 剩

\* 收稿日期: 2005-04-03

基金项目: 黑龙江省“十五”科技攻关项目(GB02B101)

第一作者简介: 谢立波(1973-), 女, 黑龙江省绥化市人, 农学硕士, 助理研究员, 主要从事生物技术和空间诱变育种研究。Tel: 86674272; E-mail: guoyahua@sina.com

余部分切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的子叶块; 下胚轴: 下胚轴切去胚根与上部, 其余部分切成长度约为 0.5 cm 的切段; 子叶节: 将无菌苗从生长点基部切下, 然后切除生长点, 获得完整的两片带叶柄的子叶, 注意生长点一定要清除彻底。

1.2.2 不定芽的诱导和分化 选不同苗龄的幼苗, 取其子叶(0.5 cm×0.5 cm)、下胚轴(0.5 cm)、子叶节(带柄切去尖端 1/3)作为外植体接种到分化培养基上, 其中将子叶切块和下胚轴平放, 子叶节将叶柄插到培养基上。基本培养基为 MS(同上), 添加不同浓度的激素(见表 1)。培养条件同上。

表 1 外植体分化诱导培养基

代号	培养基成分
A1	MS+2.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L IAA (单位下同)
A2	MS+2.0 6-BA + 0.5 IAA
A3	MS+2.0 6-BA + 1.0 IAA
A4	MS+5.0 6-BA + 0.2 IAA
A5	MS+5.0 6-BA + 0.5 IAA
A6	MS+5.0 6-BA + 1.0 IAA
B1	MS+3.0 6-BA+ 1.0 GA <sub>3</sub>
B2	MS+3.0 6-BA+ 2.0 GA <sub>3</sub>
B3	MS+3.0 6-BA+ 3.0 GA <sub>3</sub>
C1	MS
C2	MS+0.1 NAA
C3	MS+0.1 IAA

1.2.3 不定芽伸长 将不定芽接种到伸长培养基上, 基本培养基为 MS(同上), 添加不同浓度的激

表 3 外植体类型对辣椒再生频率的影响

外植体类型	接种外植体数			分化外植体数			分化率(%)		
	1 号	2 号	3 号	1 号	2 号	3 号	1 号	2 号	3 号
子叶节	60	60	60	60	60	55	100	100	9.09
子叶	60	60	60	60	60	55	100	100	8.83
下胚轴	60	60	60	34	33	32	56.7	55	53.3

由表 3 可以看出, 外植体类型不同, 分化率差异显著。同一基因型中子叶节、子叶的分化率最高, 下胚轴最低。但继代培养时发现, 子叶节上再生的芽继续伸长困难, 而且畸形芽较多, 这可能与每一子叶

素。培养条件同上(见表 1)。

1.2.4 幼苗生根及植株移栽 待幼芽长到 2~3 cm 时, 将其从母体切下, 转移到生根培养基(见表 1)上诱导生根。待幼苗基部长出白色壮根, 开瓶炼苗 3~5 d, 移栽到营养土中, 保湿 3~5 d。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导和分化

2.1.1 基因型的影响 不同基因型的子叶和下胚轴的不定芽分化率不同。供试品种 1, 2, 3 号再生频率存在差异, 且不同基因型的同一种外植体再生频率差异较大(见表 2)。

表 2 基因型对辣椒再生频率的影响

基因型	接种外植体数		分化外植体数		分化率(%)	
	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
1 号	60	60	60	34	100	56.7
2 号	60	60	60	33	100	55
3 号	60	60	53	32	88.3	53.3

由表 2 可见, 1 号子叶和下胚轴分化率分别为 100%和 56.7%; 2 号子叶和下胚轴分化率分别为 100%和 55%; 3 号子叶和下胚轴分化率分别为 88.3%和 53.3%。1、2 号子叶再生频率比 3 号相对要高。

2.1.2 外植体类型的影响 本试验采用三种不同的外植体类型进行不定芽诱导(见表 3)。

节上形成的芽数量较多有关; 而子叶和下胚轴上再生的芽伸长容易, 且芽生长正常, 又因下胚轴的分化率偏低, 因此在以后的遗传转化中, 主要选用子叶作为转化受体, 下胚轴次之。

表 4 不同培养基对辣椒子叶和下胚轴出芽率的影响

培养基	1 号品种出芽率(%)		2 号品种出芽率(%)		3 号品种出芽率(%)	
	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
A4	100	56.7	100	55	88.3	53.3
A1	95.6	50.6	94.1	50.7	84.0	50.3
A5	83.2	51.2	85.2	46.1	82.7	41.0
A2	85.2	50	84.1	45.7	80.2	40.2
A6	76	43.2	77	44.8	62.6	37.5
A3	75	42.2	76.2	43.6	60.3	35.6

2.1.3 芽分化培养基的影响 芽的诱导主要决定于培养基中细胞分裂素与生长素的比例。在参考前人研究的基础上, 试验将 IAA 浓度适当降低, 并设计 6 种诱导芽分化培养基。辣椒 1, 2, 3 号的子叶在 6 种培养基上分化情况见表 4。

辣椒子叶和下胚轴接种 10 d 后即有愈伤组织出现, 子叶边缘处和下胚轴两端切口处均可见绿色或浅黄色的芽点, 随着培养时间的推移, 部分芽点逐渐分化成芽。试验发现, 不同培养基上芽的诱导率差异明显。由表 4 可见, 在 A3 培养基上, 1 号的下胚轴出芽率仅为 42.2%, 子叶出芽率为 75%; 2 号的下胚轴出芽率仅为 43.6%, 子叶出芽率为 76.2%, 3 号子叶出芽率为 60.3%, 而在 A4 培养基上, 子叶和下胚轴の出芽率最高, 1 号的子叶和下胚轴出芽率分别为 100%和 56.7%; 2 号的子叶和下胚轴出芽率分别为 100%和 55%, 3 号的下胚轴出芽率为 53.3%。同时, 试验发现 A4 培养基上的芽生长状况良好, 无畸形芽, 继代培养形成再生植株容易。A1 培养基上, 子叶和下胚轴の出芽率也较高, 但芽生长状况不好, 不易形成再生植株。因此, 决定选用 A4 为分化培养基。

2.2 不定芽伸长培养基的影响

芽伸长除了决定于培养基中细胞分裂素与生长素的比例外, 主要决定于培养基中 GA3 的浓度。在参考前人研究的基础上, 试验在最佳芽诱导培养基基础上, 利用 GA3 浓度变化设计了 3 种诱导芽伸长培养基。辣椒 1, 2, 3 号的子叶在 3 种培养基上伸长情况见表 5。

表 5 不同培养基对辣椒子叶芽伸长率的影响

培养基	1 号品种芽 伸长率(%)	2 号品种芽 伸长率(%)	3 号品种芽 伸长率(%)
B1	17.5	19.4	0
B2	20.3	26.7	0
B3	21.4	27.8	4.2

辣椒带芽子叶接种 10 d 后芽开始伸长, 试验发现, 不同培养基上芽的伸长率差异明显。由表 5 可见, 在 B1 培养基上, 1, 2 号品种芽的伸长率分别为 17.5%和 19.4%, 在 B2 培养基上, 1, 2 号品种芽的伸长率分别为 20.3%和 26.7%; 在 B3 培养基上, 1, 2, 3 号品种芽的伸长率分别为 21.4%、27.8%和 4.2%。同时, 试验发现, B2 培养基上的芽生长状况良好, 无畸形芽, 继代培养形成再生植株容易, 而 B3 培养基上的芽生长状况一般, 并易畸形。因此, 决定

选用 B2 为芽伸长培养基。

2.3 生根及移栽成苗

将不定芽在超净工作台上切下, 分别移入 C1、C2、C3 三种不同的生根培养基中, 一周以后观察发现: 当芽大于 2~3 cm 时, 切下的不带愈伤组织的芽生根容易, 而如果芽太小, 则不能生根。因此生根培养时, 切下的芽一定要大于 2~3 cm。C1 培养基上长出的根特别纤细, 且生根时间比 C2 和 C3 培养基上的晚 1~2 d, 移栽时成活率较低; C2 和 C3 培养基上生根容易, 一般 3 d 后即长出新根, 说明生长素的加入能明显促进生根, 且在 C2 和 C3 培养基上形成的根与 C1 培养基上形成的根相比, 根相对粗壮并且数量多, 但加 NAA 的效果要比加 IAA 的效果更好些, C2 培养基上的根比 C3 培养基的根相对粗壮, 移栽成活率极高, 说明 NAA 比 IAA 更适合辣椒生根。因此, 选定 C2 培养基为再生植株的生根培养基。

再生植株的移栽驯化也非常重要。当再生植株长到 10~12 cm 时, 即可打开封口膜在组培室进行驯化。3 d 后从三角瓶中取出小苗, 洗去根部残存培养基, 切记: 一定要洗净, 否则根部容易滋生细菌。此时如果将再生植株直接移栽到灭菌的田间土中, 再生植株的成活率较低。而移栽到灭菌的蛭石中炼苗一周, 期间用不含有机成分的 1/10MS 营养液浇灌, 然后再移栽到田间土中, 成活率提高。

3 讨论

作为植物转基因工作的基础, 再生系统的建立至关重要。高效的再生系统是外源目标基因导入植物的前提, 而芽的诱导是关键的第一步。迄今为止, 外源基因的转化率一直比较低, 因此, 必须保证培养的外植体诱导出足够的芽, 才有可能得到转基因幼苗。

外植体的选择是建立再生系统的第一环节。同一基因型不同种类的外植体再生能力差异也很大。王玉文<sup>[9]</sup>等曾详细地研究了辣椒幼苗外植体类型(子叶、真叶、茎尖、胚轴和根)对离体再生的影响, 结果发现以子叶、茎尖和胚轴为外植体, 均能再生植株, 其中又以子叶培养后, 再生能力最强。本试验发现子叶、子叶节的再生频率都很高, 但子叶节的畸形芽率较高, 故选用子叶为外植体。

不同种类的激素组合及配比对同一植物的组织培养有不同的效果, 选用合适的激素组合和适宜的浓度对辣椒的再生影响非常重要。目前经常使用的激素有 ZT、6-BA、IAA、NAA 和 KT。

王玉文<sup>[9]</sup>(1991)试验发现, 三种细胞分裂素 6-

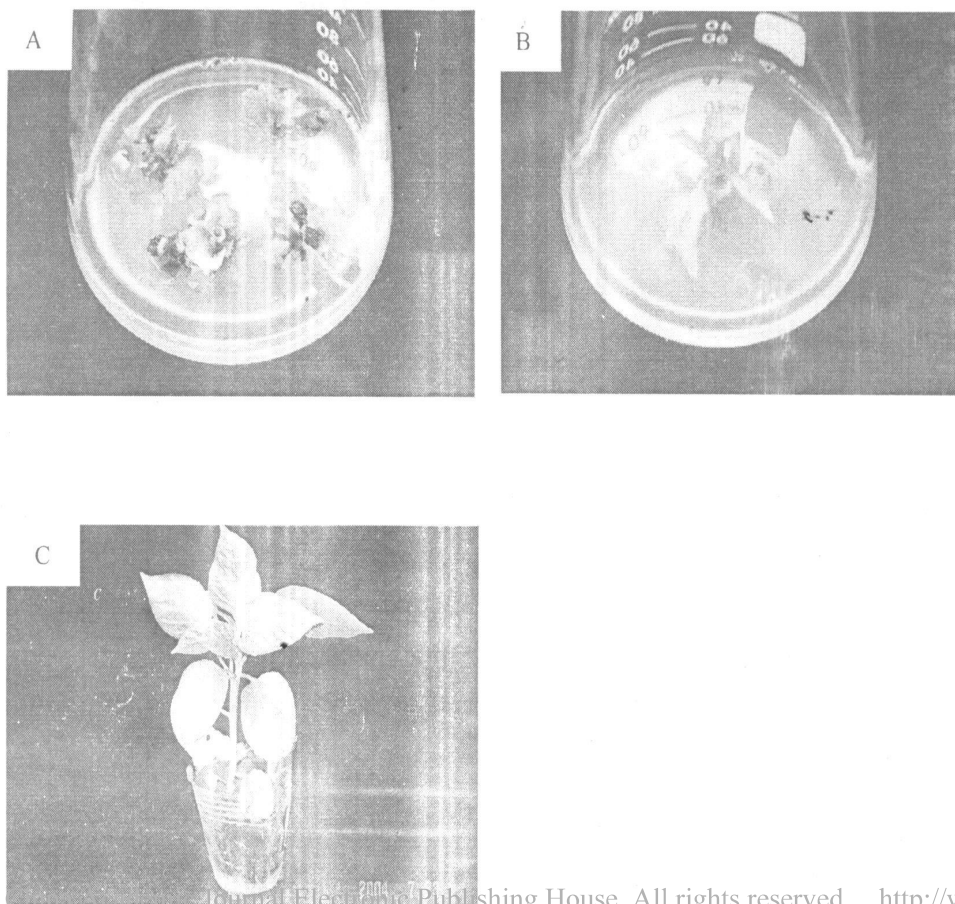
BA、ZT、KT 中, 6-BA 对子叶诱导能力最强, 最适浓度为 4~6 mg/L。ZT(玉米素)诱导能力次之, KT(激动素)诱导芽的能力最弱, 低浓度生长素有利于芽的分化和伸长。于小林<sup>[12]</sup>(2000)实验发现, 两种细胞分裂素(6-BA、ZT)及两种生长素(IAA、NAA)不同浓度配比中, 6-BA 为 5 mg/L, IAA 为 1 mg/L 的培养基中, 辣椒子叶的分化率最高, 不定芽生长势最好。而 ZT 与 IAA 或 NAA 配比, 以生长愈伤组织为主, 在同一 6-BA 浓度下, IAA 的分化效果明显优于 NAA。

本研究发现, 辣椒诱导芽分化比较容易, 不同种类、不同浓度的激素组合都能诱导出芽, 这可能与辣椒内源激素水平较高有关, 自身易于形成芽。而继代培养时, 芽伸长的诱导却存在差异, 不加入 GA<sub>3</sub>, 不定芽不易伸长, 且出现愈伤组织。加入 GA<sub>3</sub>, 浓度 1~2 mg/L 为最佳, 达到 3 mg/L 时, 伸长率虽较高, 但植株变细, 不易成长为正常植株。而试验发现 IAA(0.2 mg/L)与 6-BA(5 mg/L)组合诱芽效果最好。这一现象证明, 辣椒外植体诱芽的最佳激素组合有基因型依赖性, 在激素作用机理深入揭示之前, 这一问题还很难克服。

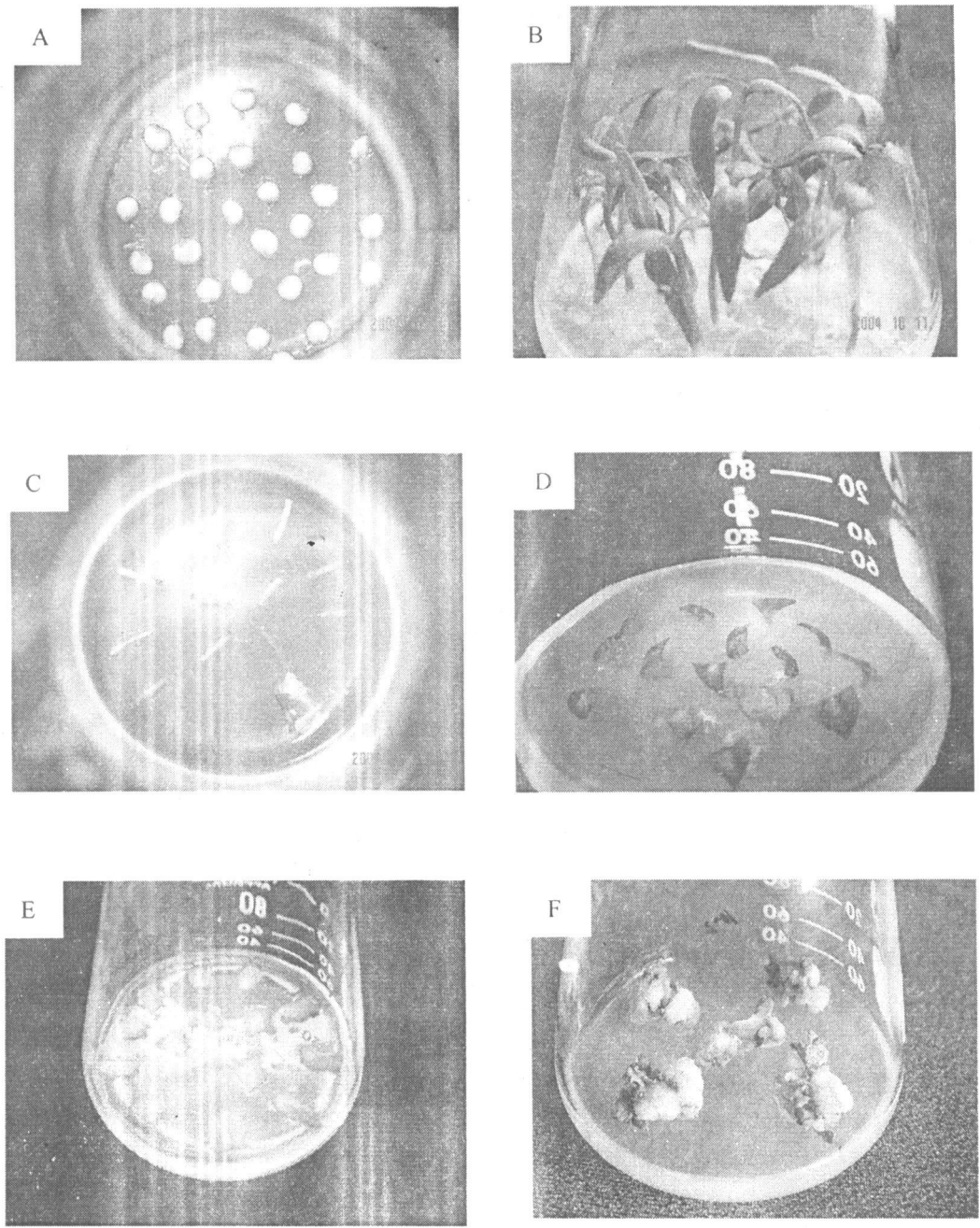
参考文献:

- [1] T saftaris. The development of herbicide - tolerant transgenic crops[ J] . Field Crops Research, 1996, 45: 115 123
- [2] 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
- [3] Gunay A L, Rao P S. In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explanted of red pepper ( capsicum) [ J] . plant Sci., 1978, ( 11): 365 372
- [4] Arroyo R, Angelus M A. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars[ J] . plant Cell Report, 1991, ( 10): 414 416
- [5] 王玉文, 杨美珠, 陈章良, 等. 甜椒的离体再生及基因转化[ J] . 园艺学报, 1991, 33( 10): 780 786.
- [6] 周俊, 肖英, 程秉铨, 等. 辣椒茎尖培养脱毒研究[ J] . 西北农业学报, 1996, 5( 3): 23 26
- [7] 何晓明, 王鸣, 王喆之, 等. 辣椒叶片离体培养与植株再生[ J] . 西北农业大学学报, 1996, 24( 1): 93 96
- [8] Dong C Z. Transgenic tomato and peper plants containing CM-VS<sub>at</sub> - RNA<sub>c</sub>DN<sub>A</sub>[ J] . Acta Horticulture, 1995, 402: 78 86
- [9] 郭仲琛. 烟草和辣椒花药离体培养的研究[ J] . 植物学报, 1973, 15( 1): 37 53
- [10] 王纪方, 金波, 高秀云, 等. 蔬菜组织培养[ M] . 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 245 254
- [11] 何晓明, 王鸣, 王喆之, 等. 辣椒子叶原生质体培养和植株再生[ J] . 园艺学报, 1997, 24( 3): 298 300
- [12] 于小林, 李乃坚, 黄自然. 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.

图版 I



图版 II



图版 I A: 子叶芽伸长; B: 诱导生根; C: 再生根

图版 II A: 种子播种方式; B: 7d 苗龄的无菌苗; C: 下胚轴的接种方式; D: 子叶节的接种方式; E: 子叶形成的接种方式; F: 子叶形成的愈伤组织和芽