

辣椒农杆菌介导转化体系的建立及外源基因的转化

上官小霞¹, 吴霞¹, 张林水¹, 刘珍¹, 李波¹, 李燕娥¹, 朱祯²

(1. 山西省农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000; 2. 中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要: 辣椒农杆菌介导转化体系主要包括无菌苗制备、菌株培养、农杆菌介导转化、芽诱导、芽伸长、生根及移栽等6个步骤。芽诱导培养基以 MS+ 4.0~6.0 mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L NAA+ 2.0 mg/L AgNO₃ 较好, 诱芽分化率因品种不同而异, 高的可达70%以上, 子叶的分化率明显高于下胚轴; 诱芽伸长培养基以 MS+ 3.0 mg/L 6-BA+ 0.3 mg/L NAA+ 1.0 mg/L GA₃ 较好, 伸长率达40%; 生根培养基以 1/2 MS+ 0.3 mg/L NAA(或0.5 mg/L IAA) 较好, 平均生根率达65%。经过对3个品种的抗虫基因转化研究, 均获得了转抗虫基因再生株。

关键词: 农杆菌介导; 基因转化; 辣椒

中图分类号: S641.303.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)02-0005-04

Establishment of the Transfer System by *Agrobacterium*-mediated and Transformation of Foreign Genes for *Capsicum frutescens*

SHANGGUAN Xiao-xia¹, WU Xia¹, ZHANG Lin-shui¹, LIU Zhen¹, LI Bo¹, LI Yan-e¹,
ZHU Zhen²

(1. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China;

2. Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The transfer system by *Agrobacterium*-mediated for *Capsicum frutescens* included six steps: preparation of sterilize plant, culture of bacterial strain, transformation by *Agrobacterium*-mediated, shoot induction, shoot elongation, root induction and transplanting. A better shoot induction medium was MS+ 4~6 mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L NAA+ 2.0 mg/L AgNO₃, the frequency of shoot regeneration was different with various breeds, and the highest frequency reached more than 70%. The cotyledon's frequency of shoot regeneration was obviously higher than the hypocotyl's. A better shoot elongation medium was MS+ 3.0 mg/L 6-BA+ 0.3 mg/L NAA+ 1.0 mg/L GA₃ and the elongation ratio was 40%. The medium 1/2 MS+ 0.3 mg/L NAA(or 0.5 mg/L IAA) was much suitable for root induction and the average ratio may reach 65%. Plants with insect-resistant gene had been obtained through the study on three *Capsicum frutescens* breeds with the method of *Agrobacterium*-mediated.

Key words: *Agrobacterium*-mediated; Gene transformation; *Capsicum frutescens*

我国是世界上最大的辣椒生产、消费和出口国, 栽培面积达16万hm², 占亚洲种植面积的30.2%^[1]。在世界9个干制辣椒出口国中, 我国最适宜优质辣椒生产, 在国际市场竞争中具有很大的潜力^[1]。近年来, 随着科学技术的进步和栽培管理

制度的不断改革, 辣椒的产量和品质都在不断地提高。目前, 制约辣椒生产的最大和最难解决的问题还是病虫害问题。植物基因工程的迅速发展, 为防治植物病虫害开辟了一条新的途径^[2]。本试验通过一系列的研究, 建立了一套较为完善的辣椒农杆

收稿日期: 2002-07-15

作者简介: 上官小霞(1974-), 女, 山西阳城人, 助理研究员, 农学硕士, 主要从事农作物基因转化及选育研究工作。

菌介导转化体系,并获得了转抗虫基因再生株,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验所用辣椒品种为辣椒新组合 889(简称 L889)、22 号辣椒(简称 L22),天鹰椒(简称 L169);质粒为单价的 Bt 抗虫基因,此质粒携带抗卡那霉素的 NPTII 基因。

1.2 转化方法

农杆菌介导法。培养基由 MS 培养基附加不同浓度的细胞分裂素和生长素或无植物激素组成。

2 结果与分析

2.1 辣椒农杆菌介导转化体系的建立

2.1.1 无菌苗的制备 挑选新鲜饱满的辣椒种子在 70% 的酒精中消毒 3~ 5 min,然后用 15% 的 H₂O₂或 0.1% HgCl₂ 浸泡 15~ 20 min,无菌水冲洗 3~ 4 次,接种于 1/2 MS 培养基上,12~ 15 d 即可获得高 5~ 7 cm 带 2 片子叶的无菌苗,发芽率在 95% 以上。

2.1.2 菌株培养 在进行基因转化的前一天,挑取平板培养基上划线培养的单菌落,接种于 LB/YEB 液体培养基中,25~ 28 ℃振荡过夜暗培养约 20 h,达到对数生长期,用 MS 液体培养基稀释至 OD₆₀₀ = 0.3~ 0.4 待用。

2.1.3 农杆菌介导转化 辣椒外植体采用带柄子叶和 0.6~ 0.8 cm 下胚轴切段两种,浸入稀释好的菌液 5 min 左右,取出,用滤纸吸干表面菌液,转入铺有无菌滤纸的共培养基(MS+ 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA)上,22~ 25 ℃条件下共培养 2 d。

2.1.4 诱芽分化 经共培养后的子叶与下胚轴,转入含 500 mg/L 羧苄青霉素和 50 mg/L 卡那霉素的诱芽分化培养基上进行诱芽。不同分化培养基中细胞分裂素 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和生长素萘乙酸(NAA)的浓度配比如表 1 所示。同时每种培养基中均加入 2.0 mg/L 的 AgNO₃,以促进芽的分化及生长。整个诱芽分化过程均在光强 2 500 lx,日光照 16 h,25~ 27 ℃条件下进行。表 1 为 L889(转抗虫 Bt 基因)在分化培养基中培养 40 d 后的观察统计情况。

表 1 不同激素浓度对 L889 外植体诱芽分化的影响

项 目	6-BA/NAA(mg/L)					
	1. 0/0. 5	2. 0/0. 5	3. 0/0. 5	4. 0/0. 5	5. 0/0. 5	6. 0/0. 5
接种子叶数	25	25	25	25	25	25
分化数	0	0	6	14	18	15
分化率(%)	0	0	24. 0	56. 0	72. 0	60. 0
出愈数	5	17	17	4	0	0
出愈率(%)	20. 0	68. 0	68. 0	16. 0	0	0
接种下胚轴数	40	40	40	40	40	40
分化数	0	0	10	13	12	16
分化率(%)	0	0	25. 0	32. 5	30. 0	40. 0
出愈数	7	11	12	13	16	18
出愈率(%)	17. 5	27. 5	30. 0	32. 5	40. 0	45. 0

表 1 结果表明,6-BA 浓度为 4. 0~ 6. 0 mg/L 时,外植体的诱芽分化率较高,子叶诱芽率平均达 62. 7%,下胚轴诱芽率平均达 34. 2%。子叶诱芽分化率明显高于下胚轴。6-BA 浓度小于 4. 0 mg/L 时,外植体出愈率较高而直接分化成芽的比率较小。6-BA 小于 2. 0 mg/L 时,外植体无论是子叶还是下胚轴均无分化现象。子叶出愈率在 6-BA 浓度为

2. 0~ 3. 0 mg/L 时较高,下胚轴出愈率随 6-BA 浓度的增大而增大。这些诱导出的抗性愈伤经过继代培养,虽有部分也可分化出芽,但一般要经过 4~ 6 个月的时间,这大大延长了转化周期。因而在进行辣椒基因转化过程中,一般选择 4~ 6 mg/L 的 6-BA 及 0. 5 mg/L 的 NAA 较为合适,且以子叶为外植体进行转化较为理想。

2.1.5 诱芽伸长 辣椒基因转化过程中,影响再生率的关键问题是芽的伸长。资料表明,在诱芽伸长时,降低细胞分裂素浓度及生长素浓度并添加一定浓度的赤霉素(GA₃)有利于芽的伸长^[2]。试验通过几种激素浓度配比进行了诱芽伸长培养基的筛选(表 2)。结果表明,3.0 mg/L 6-BA+ 0.3 mg/L

NAA+ 1.0 mg/L GA₃ 的激素配比较适合辣椒芽的伸长,1 个月左右,芽部分可伸长到 1.5~ 2.0 cm,伸长率达 40% 左右。同时在诱芽伸长过程中,还应继续加 500 mg/L 的羧苄青霉素和 50 mg/L 的卡那霉素,来进行抗性芽的进一步筛选。

表 2 不同激素浓度对 L889 诱芽伸长的影响

项 目	激素浓度(mg/L)			
	6-BA/NAA/GA ₃	6-BA/NAA/GA ₃	6-BA/NAA/GA ₃	6-BA/NAA/GA ₃
	5.0/0.5/1.0	5.0/0.5/2.0	3.0/0.3/1.0	3.0/0.3/2.0
接种芽数	10	10	10	10
芽伸长数	1	2	4	3
伸长率(%)	10.0	20.0	40.0	30.0

2.1.6 生根及移栽 从外植体上切下伸长的芽,放入生根培养基上进行诱根,试验生根培养基中激素浓度配比见表 3。结果表明,当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 或 IAA 浓度为 0.5 mg/L 时,诱根效果较好,生根率分别达 70% 和 60%,且根生长正常,平均根长 3.5 cm 左右,根数 4~ 5 条,移栽易成活。当生长素浓度较大时,根较粗短,平均长度 1.5 cm 左右,每株平均根数 8~ 10 条,且根较脆,易折断。在进行诱根的同时,应适当降低卡那霉素的浓度,同时用头孢霉素代替羧苄青霉素,以促进根的诱导及生长。由此,在辣椒基因转化过程中,最适的生根培养基为:1/2MS+ 0.3 mg/L NAA(或 0.5 mg/L IAA)+ 20 g/L 葡萄糖+ 500 mg/L 头孢霉素+ 25 mg/L 卡那霉素,pH 值为 5.8~ 6.0),平均生根率达 65%,诱根 25 d 左右即可移栽,成活率达 100%。移栽时,先打开瓶口,炼苗 1~ 2 d,洗去再生株根部培养基,栽入蛭石中,浇足营养液,放入温度 22~ 25 ℃,湿度 80%~ 90% 的人工培养箱中,7 d 左右即可移栽到土盆中。

表 3 不同激素浓度对 L889 诱根的影响

激素浓度 (mg/L)	IAA			NAA		
	0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
接种芽数	10	10	10	10	10	10
生根数	1	6	2	7	3	4
生根率(%)	10.0	60.0	20.0	70.0	30.0	40.0

2.2 辣椒外源基因转化结果

2.2.1 不同辣椒品种的抗虫基因转化结果 在筛选出较适合培养基的基础上,以下胚轴和带柄子叶为外植体对 L889, L22, L169 3 个辣椒品种进行了抗虫基因(Bt) 转化研究,其分化情况列于表 4。由表 4 可知,不同品种、不同外植体诱芽分化率有一定的差异。方差分析表明,每个品种不同外植体之间即子叶与下胚轴之间诱芽分化率存在着显著差异(P< 0.01),子叶分化率明显高于下胚轴。不同品种相同外植体之间分化率差异不显著。这说明辣椒抗虫基因转化过程中,对品种的选择性不太明显。

表 4 不同辣椒品种转 Bt 基因的平均诱芽分化率 %

外植体	L889	L22	L169
下胚轴	45.0	40.5	40.2
子 叶	70.1	60.0	68.7

2.2.2 农杆菌介导法获得的辣椒再生株及其转化情况 对上述 3 个品种进行抗虫基因(Bt) 转化研究,均获得了一部分再生株,对其再生株进行 NPTII 基因检测,结果列于表 5。对部分 NPTII 检测的阳性株进行 PCR 检测(图 1),证明目的基因已转入了辣椒各品种中。

表 5 不同辣椒品种转化再生株及 NPTII 检测情况

品种	再生株	阳性株	转化率(%)
L889	35	13	37.1
L22	20	5	40.0
L169	3	1	33.3



1. 100 bp 分子量标记; 2. 阳性对照, 模板为 pBinΩSBCK; 3. 阴性对照, 模板为非转化植株 DNA; 4~ 12. 抗性植株

图 1 L889 转 Bt 基因再生株的 PCR 扩增

3 讨论

以辣椒带柄子叶为外植体进行基因转化, 选用合理的激素浓度配比, 不经过愈伤组织阶段而直接诱导出芽, 得到再生植株, 周期较短。一般从开始转化到成苗移栽 4 个月左右即可完成, 再生株转化频率平均可达 36.8%。

在培养基中添加适当浓度的 AgNO_3 , 可以提高植物诱导不定芽的频率^[2~5], 但若 AgNO_3 浓度过高, 会使芽的叶片肉质化, 形成畸形芽, 难以形成正常的再生植株^[3]。因而本试验诱芽分化培养基中加入 2.0 mg/L AgNO_3 , 以缩短芽诱导的时间, 促进芽的生长。

在辣椒农杆菌介导转化过程中, 加入羧苄青霉素和头孢霉素是为了抑制农杆菌的生长, 加入卡那霉素是为了进行抗性芽的筛选。但资料表明, 羧苄青霉素促进芽的分化, 但抑制根的生长, 而头孢霉素则不利于芽的分化^[3,4]。因而本试验中, 诱芽分化及诱芽伸长培养基中用羧苄青霉素, 而在生根培养基中则用头孢霉素代替羧苄青霉素。在进行根诱导

时, 降低卡那霉素的浓度是为了减轻其对子叶再生植株的抑制作用, 获得较健壮的转基因再生株。

辣椒农杆菌介导转化的频率较低, 重复性差, 且影响转化的因素很多, 如感染时间、菌液浓度、共培养条件以及不同的激素浓度及其配比等。下一步应对这些因素作较深入细致的研究, 以提高辣椒再生株的基因转化率。

参考文献:

- [1] 畅振民, 刘 森, 巫东堂, 等. 辣椒产业化及增值工程技术研究[J]. 华北农学报, 2000, 15(增): 219- 221.
- [2] 王玉文, 杨美珠, 潘乃 斌, 等. 甜椒的离体再生及基因转化[J]. 植物学报, 1991, 33(10): 780- 786.
- [3] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657- 663.
- [4] 蔡小宁, 余建明, 朱 祯, 等. 建立青菜 (*Brassica chinensis*) 农杆菌介导法转化体系[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(2): 110- 114.
- [5] 张智奇, 周 音, 张玉华, 等. 小白菜子叶诱导不定芽再生植株[J]. 上海农业学报, 1998, 14(2): 25- 28.