

辣椒真叶离体培养及高效再生体系的建立

张先云, 袁秀云, 马 杰

(郑州师范高等专科学校 生物技术研究所 河南 郑州 450044)

摘 要:以 4 个辣椒品种为材料,探讨了不同基本培养基、不同激素组合、不同浓度的 AgNO_3 及苗龄对真叶再生的影响,筛选出高效芽分化培养基为 MB+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+ AgNO_3 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+8 g/L 琼脂,最适合接种的苗龄为 10 d 左右;高效芽伸长培养基为 MB+6-BA 3 mg/L+IAA 1 mg/L+GA₃ 2 mg/L+ AgNO_3 4 mg/L+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂;有利于生根的培养基为 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂。

关键词:辣椒;外植体;再生体系

中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)07-0050-03

辣椒(*Caqsicum annuum* L.)是一种重要的茄科蔬菜作物,在世界各地广为栽培。辣椒含有人体必需的碳水化合物、蛋白质以及各种维生素等,具有很高的营养价值。辣椒果实中的辣椒素能与人体内一类称作“细胞色素 P-45”的生物酶相互作用,抑制致癌物质的形成,因此具有很高的药用价值。中国是世界上最大的辣椒种植国,适宜生产优质辣椒,在国际市场竞争中具有很大潜力,建立良好的受体再生系统是开展辣椒遗传转化的基础,而再生系统的建立主要依赖于植物组织培养技术。在辣椒的离体培养中,国内外多数采用辣椒子叶培养再生技术,可重复操作性差,使得辣椒快速繁殖体系一直未能很好地建立,在国内用辣椒真叶作为外植体进行离体培养的报道不多见。该研究采用辣椒真叶为外植体进行离体培养技术进行快速繁殖,可为其它茄科植物的组织培养用野外真叶作为外植体进行快速繁殖的方法提供参考,试图突破辣椒组织培养对外植体苛刻要求和基因工程发展的限制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

辣椒品种种子白公主、黄太妃、紫贵人、世纪红购自河南省农业科学院。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将种子分别用自来水浸泡 24 h,去掉飘在面上的瘪粒,然后先用 75% 的酒精表面灭菌 30~60 s,再用 0.1% 氯化汞溶液进行表面灭菌 10 min,每次灭菌后用无菌水冲洗 5~6 次,接种在 1/2MS+蔗

糖 20 g/L+8 g/L 琼脂(pH 5.8)培养基上,然后先置于温度为 26℃ 恒温培养箱中进行暗培养,待种子萌发后置于光照培养箱中。

1.2.2 不定芽的诱导和分化 取再生苗的第 2~3 片真叶,去掉叶缘,切成 0.3~0.5 cm 的小块,接种于分化培养基上,14 d 继代 1 次。以筛选出高效芽分化培养基和不定芽进行芽伸长试验。基本培养基的筛选:以 1/2MS、MS、1/2MB、MB(MS 无机盐+B5 有机成分)为基本培养基,均添加 6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+ AgNO_3 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+8 g/L 琼脂。不同激素组合对不定芽的诱导和分化影响试验:MB 培养基中添加不同浓度的 6-BA、NAA 和 IAA,通过不同浓度的激素组合,筛选适宜的培养基。 AgNO_3 浓度对不定芽的诱导和分化影响试验:分化培养基 MB+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L 中分别加入 4.5、6 mg/L 的 AgNO_3 ,以不加为对照。苗龄对不定芽的诱导和分化影响试验:选 7~15 d 苗龄的真叶接种在分化培养基上,观察其诱导率。

1.2.3 不定芽的伸长 将分化出的芽丛分割转移到伸长培养基。培养基为 MB,蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L, pH 5.8 附加 6-BA 2~3 mg/L、IAA 0.1~0.5 mg/L 和 GA₃ 0.5~2 mg/L。14 d 继代 1 次。

1.2.4 生根与移栽 不定芽伸长至 1.5~2.0 cm 时自基部切下,移至生根培养基。培养基为 MS,蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、(pH 5.8),附加 NAA 0.1~0.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L。当瓶苗培养 60~90 d,长至 5 cm 左右时,转移至自然光下练苗 2~5 d,然后将其从玻璃瓶中取出,洗净根部粘连的培养基后,移入温棚蛭石和草炭为基质的营养钵中,适当遮荫。

1.3 培养条件

所有培养基的 pH 值为 5.8~5.9, 120℃ 灭菌 25 min,所有的培养温度均为 (24±2)℃,光照 2 500~

第一作者简介:张先云(1957-),女,副教授,现主要从事植物资源及生物技术研究工作。E-mail: zxsxianyun@126.com。

基金项目:郑州市重点科技攻关资助项目(051SGDS17017)。

收稿日期:2009-02-15

3 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导和分化

2.1.1 基本培养基的影响 辣椒真叶的诱导和分化, 以 MB(表 1)基本培养基为最适宜, 培养 10 d 时外植体出现淡黄色愈伤组织(图 1), 15 d 左右可见绿色芽点, 20 d 后芽已分化(图 2), 25 d 后 4 个品种的芽分化率为 20%~66.6%, 以 1/2 MS 基本培养基诱导率最低。

表 1 不同成分的培养基对辣椒分化的影响

Tabel 1 Effect of different media on differentiation of <i>Capsicum annuum</i>				
处理号	培养基	接种数 Number	分化数 Number	分化率 Rate
No of treatment	Medium	of inoculating	of differentiation	of differentiation/ %
A1	1/2MS	30	6	20
A2	MS	30	11	36.6
A3	1/2MB	30	15	50
A4	MB	30	20	66.6

2.1.2 激素及其配比的影响 4 个辣椒品种的真叶外植体分别接种于附加不同激素及其配比的分化培养基进行芽诱导分化, 每处理 30 个外植体。20 d 后观察芽分化(表 2), 在 6-BA 为 5.0 mg/L, IAA 为 0.2 mg/L 时(表 2), 真叶不定芽分化率最高, 品种之间差异较大, 世纪红尖椒分化率最低, 紫贵人甜椒分化率最高, 长势均一般。

表 2 不同激素配比对辣椒真叶不定芽分化的影响

Tabel 2 Effect of different hormone ration on differentiation of adventive bud in euphylla of <i>Capsicum annuum</i>							
处理号	激素 Hormones			白公主	黄太妃	紫贵人	世纪红
No of treatment	/ mg · L ⁻¹			White princess	Huang taifei	Zi guiren	Shi jhong
	6-BA	NAA	IAA	分化率/ %	分化率/ %	分化率/ %	分化率/ %
A5	5	0.5	0	56	40.5	58	23.4
A6	5	1	0	52	35.6	59	30.1
A8	3	0.5	0	57	30	53.3	32.2
A9	3	1	0	58	42	64.6	35.6
A10	5	0	0.2	70	56.6	96.6	46.6
A11	5	0	0.5	66.6	53.2	86.6	36.7
A12	3	0	0.2	55.1	43.6	73.2	38
A13	3	0	0.5	46.5	37.5	68.1	29.1

注: 表中 A1~A8 的基本培养基均为 MB 分化频率 = 分化的外植体/ 总愈伤植株 × 100%。

2.1.3 AgNO₃ 浓度对不定芽的诱导和分化影响 在筛选出的有利于辣椒芽分化培养基(MB+6-BA 5 mg/L+IAA 0.5 mg/L)中添加 AgNO₃ 4、5、6 mg/L 后, 各辣椒品种外植体不定芽的分化频率平均提高了 15% 以上, 其中, 紫贵人甜椒品种的分化率高达 100%, 以 AgNO₃ 4 mg/L 为最高, 随着 AgNO₃ 浓度的增加, 分化率成降低趋势(表 3)。添加 AgNO₃ 有明显遏制外植体的褐化作用。

2.1.4 苗龄的影响 先后选苗龄为 7、10、15 d 的 4 种辣椒真叶, 剪取外植体接种于分化培养基 MB+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+8 g/L 琼脂上, 培养 25 d 后调查表明, 4 个辣椒

品种的真叶外植体的分化能力均以苗龄 10 d 的最强, 苗龄的递减或增加, 真叶分化不定芽能力下降。试验结果分析表明, 最优芽分化培养基为 MB+6-BA 5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+AgNO₃ 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+8 g/L 琼脂, 最适合接种的苗龄为 10 d 左右, 其中分化率最高的为紫贵人甜椒, 分化率最低的为世纪红尖椒, 4 个供试品种在该芽分化培养基上进行芽分化重复试验结果近似。

表 3 AgNO₃ 浓度对不定芽分化的影响

Tabel 3 Effect of concentration of AgNO ₃ on differentiation of adventive bud					
处理号	AgNO ₃ Concentration	分化率 Rate of differentiation/ %			
No of treatment	of AgNO ₃ / mg · L ⁻¹	白公主	黄太妃	紫贵人	世纪红
A14	CK	31.7	29.6	52.7	21.8
A15	4	72.3	65.5	100	54.7
A16	5	65.1	57.8	88.2	43.6
A17	6	46.8	44.6	76.4	35.1

注: 分化频率 = 分化的外植体/ 总愈伤植株 × 100%。

表 4 苗龄对外植体芽分化的影响

Table 4 Effect of seedling ages on differentiation of bud in explantation				
苗龄	分化率 Rate of differentiation/ %			
Seedling ages/ d	白公主	黄太妃	紫贵人	世纪红
5	59.7	49.7	70.5	35.4
10	71.2	67.4	100	43.6
15	67.8	56.8	63.4	23.8

注: 分化频率 = 分化的外植体/ 总愈伤植株 × 100%。

2.2 不定芽的伸长

在筛选出的芽分化培养基上分化出的芽生长极其缓慢, 很难伸长, 这说明有利于芽分化的 6-BA/IAA 激素组合不利于不定芽的伸长。因此, 设计了 6 种不同浓度激素配比的伸长培养基, 观察 4 个辣椒品种的外植体芽伸长情况(表 5)。在同样浓度的 IAA 和 GA₃ 条件下, 6-BA 浓度高低对真叶形成的外植体伸长有比较明显的影响。B2、B4 和 B6 的培养基中 IAA 和 GA₃ 条件相同, B1、B3 和 B5 的培养基中 IAA 和 GA₃ 条件相同, B4 培养基中外植体的伸长率高于 B2 和 B6; B3 培养基中外植体的伸长率高于 B1 和 B5, B4 培养基中外植体的伸长率又高于 B3, 因此, 比较有利于辣椒芽伸长生长的培养基为: MB+6-BA 3 mg/L+IAA 1 mg/L+GA₃ 2 mg/L+Ag-NO₃ 4 mg/L+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂(表 5)。

2.3 再生芽的生根和继代

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生根。生根培养基以 1/2 MS 为基本培养基, 附加 0.2 mg/L IAA 和 0.1 mg/L NAA, 15 d 后即有不定根生成(图 3), 不定根诱导率达 96% 以上。此外, 若以 MS 为基本培养基, 附 NAA(表 6), 亦可生出不定根, 只是所需时间较长, 有利于生根的培养基为 1/2 MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂。待小苗长到 8~10 cm 高时, 剪取具分枝的 3~4 cm 茎段, 移植到分化培养基上进行继代扩繁。

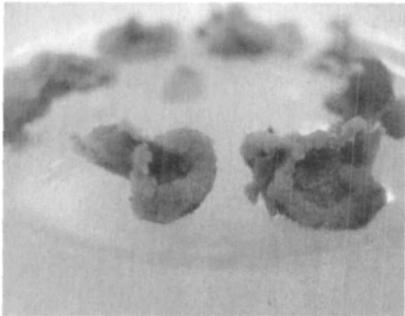


图 1 长出愈伤
Fig. 1 Differentiation



图 2 分化成苗
Fig. 2 Differentiation to seedling

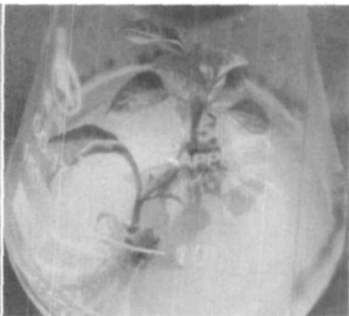


图 3 生根
Fig. 3 Seedling root

表 5 不同激素组合对辣椒不定芽伸长的影响

Table 5 Effect of different hormones on the elongation of adventive bud in *Capsicum annuum*

处理号 No of treatment	激素浓度 Concentration of hormones/ mg · L ⁻¹				伸长率 Rate of elongation/ %			
	6-BA	IAA	GA ₃	AgNO ₃	白公主	黄太妃	紫贵人	世纪红
B1	2	0.5	3	4	31	22	38	24
B2	2	1	2	4	43	25	42	36
B3	3	0.5	3	4	62	34	46	51
B4	3	1	2	4	75	56	69	63
B5	5	0.5	3	4	55	42	51	49
B6	5	1	2	4	46	36	49	37

注 各成分浓度单位是 mg/ L, 伸长率= 平均伸长高度/ 原来平均高度× 100%。

表 6 不同激素组合对辣椒不定芽生根的影响

Tabel 6 Effect of different hormones on rooting of adventive bud in *Capsicum annuum*

处理号 No of treatment	基本培养基 Basic Medium	IAA / mg · L ⁻¹		NAA / mg · L ⁻¹		栽入棵数 Number of planting	生根棵数 Number of rooting	生根率 Rate of rooting/ %
C1	1/2 MS	0.5	—			30	24	80
C2	1/2 MS	0.2	0.1			30	29	96
C3	MS	—	0.5			30	23	77

3 讨论

在前人的有关报道中, 有关辣椒子叶和胚轴作为外

植体进行再生的报道比较多, 以真叶为外植体进行再生系统报道不多, 现采用辣椒真叶作为外植体创建辣椒的再生系统, 试图开拓辣椒外植体的来源。经过试验得知适合辣椒外植体分化的培养基为 MB+ 6-BA 5 mg/ L+ IAA 0. 2 mg/ L+ AgNO₃ 4 mg/ L+ 蔗糖 30 g/ L+ 8 g/ L 琼脂, 最适合接种的苗龄为 10 d 左右; 高效芽伸长培养基为 MB+ 6-BA 3 mg/ L+ IAA 1 mg/ L+ GA₃ 2 mg/ L+ AgNO₃ 4 mg/ L+ 30 g/ L 蔗糖+ 8 g/ L 琼脂; 有利于生根的培养基为 1/ 2MS + IAA 0. 2 mg/ L+ NAA 0. 1 mg/ L+ 30 g/ L 蔗糖+ 8 g/ L 琼脂。另外, 在无菌苗获得时, 起初用脱脂棉作为培养基, 获得的无菌苗细、弱, 后又改换 1/ 2MS+ 蔗糖 20 g/ L+ 8 g/ L 琼脂(pH5.8) 培养基, 效果较好。

参考文献

[1] 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.
[2] 崔群香, 朱士农, 刘卫东, 等. 彩色辣椒子叶离体再生培养基的筛选[J]. 江苏农业科学, 2005(2): 73-74.
[3] 唐亮, 陈沁, 邓志瑞, 等. 辣椒茎尖离体培养及植株再生[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2004 10(5): 497-502.
[4] 黄海波, 淡明. 黄灯笼辣椒子叶离体培养与植株再生[J]. 热带农业科学, 2006(6): 18-21.

Euphylla Explantation and Establishment of Regeneration System of *Capsicum annuum* in Higher Efficiency

ZHANG Xian-yun, YUAN Xiu-yun, MA Jie

(Institute of Biology Technology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou Henan 450044, China)

Abstract: The paper discussed the effects of four factor on euphylla regeneration such as different media, different hormones, different concentration AgNO₃ and different seedling age. The results showed MB+ 6-BA 5 mg/ L+ IAA 0. 2 mg/ L+ A gNO₃ 4 mg/ L+ 30 g/ L sucrose+ 8 g/ L agar was efficient differential medium, the optimum seeding age was 10 d; The medium of bub elongation efficiently was MB+ 6-BA 3 mg/ L+ IAA 1 mg/ L+ GA₃ 2 mg/ L+ AgNO₃ 4 mg/ L+ 30 g/ L sucrose+ 8 g/ L agar; 1/ 2MS+ IAA 0. 2 mg/ L+ NAA 0. 1 mg/ L+ 30 g/ L sucrose+ 8 g/ L agar was the optimum medium for growing root.

Key words: *Capsicum annuum*; Explant; Regeneration system