

辣椒离体培养再生植株的研究

吴丽君, 胡开林, 吴智明

(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:以带叶柄子叶作为外植体,探讨了植物生长调节剂浓度及其组合、 AgNO_3 、椰乳(CM)和基因型对辣椒分化形成不定芽以及不定芽伸长的影响,结果表明,MB($\text{MS}_{\text{矿质元素}} + \text{B}_5\text{有机}$)培养基添加6-BA 5.0 mg/L和IAA 1.0 mg/L有利于辣椒子叶分化形成短缩不定芽,不定芽分化率达90.2%。将短缩不定芽转接到MB培养基添加6-BA 3.0 mg/L、IAA 1.0 mg/L、 GA_3 2.0 mg/L、 AgNO_3 10.0 mg/L和 $\varphi = 10.0\%$ 的CM培养基上,最高有40.0%的不定芽伸长。辣椒基因型不仅对不定芽的分化,而且对不定芽的伸长具有明显影响。伸长的不定芽培养在添加IAA 0.2 mg/L和NAA 0.1 mg/L MS培养基中,有85.0%的不定芽形成发达根系,移栽后全部正常开花结果。

关键词:辣椒; 子叶; 离体培养; 植株再生

中图分类号:Q813.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)01-0073-04

Plant Regeneration of *Capsicum annuum* Cultured *in vitro*

WU Li-jun, HU Kai-lin, WU Zhi-ming

(College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Effects of genotype, concentration of plant growth regulator, AgNO_3 and CM on adventitious bud induction of pepper were studied using cotyledon with petiole as explants. The results showed that the best differentiation medium for adventitious buds was MB($\text{MS}_{\text{mineral}} + \text{B}_5\text{Vitamin}$) + 6-BA 5.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L and its differentiation rate was 90.2%. The best elongation medium was MB + 6-BA 3.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L + GA_3 2.0 mg/L + AgNO_3 10.0 mg/L + CM 10.0% (φ) and its highest elongation rate was 40.0%. Rooting medium was MS + IAA 0.2 mg/L + NAA 0.1 mg/L, and its average rooting rate was 85%. All the plantlets flowered and set fruits normally in the field.

Key words: *Capsicum annuum*; cotyledon; *in vitro* culture; plant regeneration

辣椒 *Capsicum annuum* L. 是茄科辣椒属的一种营养丰富的蔬菜。据统计,辣椒在我国的栽培面积每年超过100万 hm^2 ,成为仅次于大白菜而位居第二的蔬菜作物^[1]。关于辣椒离体培养再生植株已有许多报道^[2-7],但是,辣椒不定芽难以伸长的的问题一直没有得到较好的解决。为了建立一个稳定高效的遗传转化体系,以便通过现代生物技术手段,更好地对辣椒进行遗传改良,本试验在借鉴前人研究的基础上,主要探讨了辣椒子叶外植体分化形成不定芽及其伸长的影响因素,以期开展辣椒转基因研究

奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的‘B145’和‘B162’等20个辣椒品种均由华南农业大学园艺学院蔬菜系提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗培养 将辣椒种子用 $\varphi = 70.0\%$ 的乙醇消毒30 s,再用 $\varphi = 15\%$ 的饱和次氯酸钠溶液灭菌20 min,然后用无菌水洗3~4次,播于1/2 MS固体培

收稿日期:2005-12-26

作者简介:吴丽君(1980—),女,硕士,现在湖南省长沙市中南林业科技大学资源与环境学院工作;通讯作者:胡开林(1963—),男,教授,E-mail:hukailin@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30370978);广东省科技计划项目(2004A20103001;2002A2070601)

培养基上(pH 5.8,以下相同).播种后先在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养室中暗培养至种子萌发,然后在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光强 2 000 lx、光照周期 14 h/d(以下培养条件相同)的培养室中培养获得无菌苗.

1.2.2 不定芽的分化 取 12 d 苗龄的无菌苗,剪去子叶上半部分,将带叶柄子叶接种于添加不同质量浓度的 IAA、6-BA 的 MB 分化培养基上,培养 30 d 后统计不定芽的分化率.

1.2.3 不定芽的伸长 将分化形成的不定芽丛分切转移到添加 IAA 1.0 mg/L、6-BA 3.0 mg/L 以及不同质量浓度的 GA_3 、 AgNO_3 和不同体积浓度 CM 的 MB 伸长培养基上.培养 30 d 后统计不定芽的伸长率.

1.2.4 不定芽的生根 待不定芽伸长至 1.5~2.0 cm 时,自基部切下,移至生根培养基.生根培养基为添加 IAA 0.2 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基.培养 20 d 后统计不定芽的生根率.

2 结果与分析

2.1 不定芽的分化

2.1.1 植物生长调节剂不同质量浓度组合对不定芽分化的影响 将辣椒品种‘B145’的带叶柄子叶外植体接种到添加 IAA、6-BA 不同质量浓度组合的 MB 分化培养基上,培养 7 d 后,在其切口边缘处开始形成愈伤组织,培养 10 d 后开始形成绿色芽点,培养 30 d 后分化形成短缩的不定芽.统计结果表明(表 1),在 IAA 为 0~1.0 mg/L 以及 6-BA 为 0.5~5.0 mg/L 范围内,辣椒不定芽分化率随着 6-BA 质量浓度的升高而提高,其中以 IAA 和 6-BA 质量浓度分别为 1.0 和 5.0 mg/L 时,不定芽分化率最高,达到 90.2%,平均每外植体分化不定芽数达到 11.6 个.当 IAA 和 6-BA 质量浓度分别大于 2.0 和 10.0 mg/L 时,不定芽分化率明显降低.

2.1.2 辣椒不同基因型在不定芽分化方面的差异 将 12 d 苗龄的 20 个供试辣椒品种的子叶外植体分别接种到添加 IAA 1.0 mg/L、6-BA 5.0 mg/L 的 MB 分化培养基上,培养 30 d 后的统计结果(表 2)表明,20 个品种的不定芽分化率的范围为 30.3%~90.0%,其中以‘B162’的不定芽分化率较高,达到 90.0%,平均每个外植体分化不定芽数达到 18.2 个,说明辣椒基因型在不定芽分化方面存有明显的差异.

2.2 不定芽的伸长

2.2.1 GA_3 、 AgNO_3 和 CM 对不定芽伸长的影响

将辣椒品种‘B162’在分化培养基中分化形成的不定

芽丛分切后转接到伸长培养基中,培养 15 d 后可以见到部分不定芽明显伸长,30 d 后统计不定芽伸长率的结果(表 3)表明,在 MB 培养基添加 IAA 1.0 mg/L、6-BA 3.0 mg/L 的基础上,再分别添加 GA_3 0.5~4.0 mg/L、 AgNO_3 5.0~10.0 mg/L 和 $\varphi = 10.0\%$ 的 CM 时,不定芽伸长率比对照明显提高,其中以添加 GA_3 2.0 mg/L 对不定芽伸长的促进效果较好,不定芽的伸长率达到 30%.并且在 MB 培养基添加 IAA 1.0 mg/L、6-BA 3.0 mg/L 的基础上,同时添加 GA_3 2.0 mg/L、 AgNO_3 10.0 mg/L 和 $\varphi = 10.0\%$ 的 CM 时,所获得的不定芽伸长率最高,达到 40.0%,相当于每个转接外植体平均伸长形成 7.2 个正常不定芽.

表 1 植物生长调节剂不同浓度组合对辣椒子叶分化不定芽的影响

Tab. 1 Effects of plant growth regulators on the adventitious buds differentiated from cotyledon of pepper

$\rho(\text{IAA})$ $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(6\text{-BA})$ $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	外植体数 no. of explants	不定芽分化率 rate of adventitious buds/%	平均每外植体 不定芽数 average number of adventitious buds per explant/个
0	0.5	42	20.0	2.6
0	1.0	42	25.3	3.8
0	2.5	42	80.4	9.2
0	5.0	42	80.8	10.2
0	10.0	42	60.5	8.4
0.5	0.5	42	0	0
0.5	1.0	42	0	0
0.5	2.5	42	86.6	11.0
0.5	5.0	42	88.2	11.2
0.5	10.0	42	40.3	4.6
1.0	0.5	42	0	0
1.0	1.0	42	0	0
1.0	2.5	42	46.8	4.8
1.0	5.0	42	90.2	11.6
1.0	10.0	42	88.4	11.2
2.0	0.5	42	0	0
2.0	1.0	42	0	0
2.0	2.5	42	25.4	3.8
2.0	5.0	42	24.8	3.6
2.0	10.0	42	26.2	3.4
5.0	0.5	42	0	0
5.0	1.0	42	0	0
5.0	2.5	42	0	0
5.0	5.0	42	0	0
5.0	10.0	42	28.8	2.2

表 2 20 个辣椒品种子叶外植体的不定芽分化率¹⁾

Tab. 2 The differentiation rate of the adventitious buds from cotyledon explants of 20 pepper varieties

品种 variety	外植体数 no. of explants	不定芽分化率 differentiation rate of the adventitious buds/%	每外植体平均 不定芽数 average number of adventitious buds per explant/个
B162	42	90.0	18.2
B161	42	70.2	12.4
B145	42	85.2	11.6
B144	42	73.3	13.6
B143	42	85.0	12.4
B120	42	75.8	16.8
B119	42	89.2	15.8
B117	42	58.5	15.2
B115	42	30.3	10.5
B113	42	45.6	10.8
B110	42	50.2	10.2
B104	42	58.3	13.6
B96	42	53.3	12.0
B93	42	33.3	11.4
B76	42	52.8	15.2
B43	42	83.3	11.0
B16	42	80.6	15.8
B05	42	78.2	16.6
B9701	42	50.4	10.0
B9702	42	48.6	9.2

1) 培养基为 MB + IAA 1.0 mg/L + 6-BA 5.0 mg/L

2.2.2 辣椒不同基因型在不定芽伸长方面的差异 将在分化培养基中分化形成的 20 个辣椒品种的不定芽分别转接于添加 IAA 1.0 mg/L、6-BA 3.0 mg/L 以及 GA₃ 2.0 mg/L、AgNO₃ 10.0 mg/L 和 $\varphi = 10.0\%$ 的 CM 的 MB 伸长培养基中, 培养 20 d 后统计不定芽伸长率。结果表明(表 4), 不同品种之间, 不定芽伸长率差异较大, 其中以‘B162’、‘B16’和‘B05’的不定芽伸长率较高, 分别为 40.0%、35.0% 和 35.0%, 分别相当于每个转接外植体平均伸长形成 7.2、5.5 和 5.9 个正常的不定芽。

另外, 表 3 和表 4 的结果还表明, 在供试的 20 个辣椒品种中, 不定芽分化率和不定芽伸长率存在一定的相关性, 一般来说, 不定芽分化率高的品种其不定芽伸长率也高, 不定芽分化率低的品种其不定芽伸长率也低。但也有例外的情况, 如品种‘B145’的不定芽分化率达 90.2% (表 1) 和 85.2% (表 2), 而其不定芽伸长率为 0 (表 4)。

表 3 GA₃、AgNO₃ 和 CM 对辣椒不定芽伸长的影响¹⁾Tab. 3 Effects of GA₃, AgNO₃ and CM on the elongation of adventitious buds of pepper

$\rho(\text{GA}_3)/$ (mg · L ⁻¹)	$\rho(\text{AgNO}_3)/$ (mg · L ⁻¹)	$\varphi(\text{CM})$ /%	外植体数 no. of explants	不定芽伸长率 elongation rate of adventitious buds/%
0	0	0	42	0
0.5	0	0	42	10.0
1.0	0	0	42	20.0
2.0	0	0	42	30.0
4.0	0	0	42	20.0
0	2.5	0	42	0
0	5.0	0	42	15.0
0	10.0	0	42	20.0
0	0	5.0	42	0
0	0	10.0	42	15.5
0	0	15.0	42	0
2.0	0	0	42	30.0
2.0	10.0	0	42	35.0
4.0	10.0	0	42	25.0
2.0	10.0	10.0	42	40.0
4.0	10.0	10.0	42	28.0

1) 培养基为 MB + IAA 1.0 mg/L + 6-BA 3.0 mg/L

表 4 20 个辣椒品种的不定芽伸长率¹⁾

Tab. 4 Elongation rate of adventitious buds of 20 pepper varieties

品种 variety	外植体数 no. of explants	不定芽伸长率 elongation rate of adventitious buds/%	品种 variety	外植体数 no. of explants	不定芽伸长率 elongation rate of adventitious buds/%
B162	36	40.0	B110	36	12.0
B161	36	25.0	B104	36	0
B145	36	0	B96	36	0
B144	36	0	B93	36	15.0
B143	36	15.0	B76	36	30.0
B120	36	28.0	B43	36	0
B119	36	25.0	B16	36	35.0
B117	36	30.0	B05	36	35.0
B115	36	0	B9701	36	0
B113	36	0	B9702	36	0

1) 培养基为 MB + IAA 1.0 mg/L + 6-BA 3.0 mg/L + GA₃ 2.0 mg/L + AgNO₃ 10.0 mg/L + CM 10.0% (φ)

2.3 不定芽的生根

将辣椒品种‘B162’、‘B120’、‘B117’、‘B76’、‘B16’和‘B05’伸长的不定芽从茎基部切断, 转接于添加 IAA 0.2 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的 MS 生根培养基中进行培养, 10 d 后可见不定根形成, 20 d 后形成发达根系, 平均生根率为 85.0% (表 5)。将带根试

管小植株移栽盆中,全部成活并正常开花结果.

表5 辣椒不定芽的生根率¹⁾

Tab. 5 Rooting rate of adventitious buds

品种	不定芽数	生根率	品种	不定芽数	生根率
variety	no. of adventitious buds	rooting rate/%	variety	no. of adventitious buds	rooting rate/%
B162	36	90.0	B76	36	80.0
B120	36	85.0	B16	36	85.0
B117	36	80.0	B05	36	90.0

1) 培养基为 MS + IAA 0.2 mg/L + NAA 0.1 mg/L

3 讨论

关于植物生长调节剂种类和浓度对辣椒离体培养再生植株的研究报道较多,曹冬孙等^[3]比较了在 MS 基本培养基中添加 6-BA、ZT、KT 和 GA₃ 对辣椒子叶分化不定芽的效果,结果表明,6-BA 对诱导分化不定芽的效果最好,ZT 次之.李英慧等^[4]的试验结果也表明,在添加 6-BA 和 ZT 的培养基上辣椒不定芽的分化率较高,而添加 KT 基本不能分化形成不定芽.本试验的结果,在添加 6-BA 5.0 mg/L 和 IAA 1.0 mg/L 的 MB 分化培养基上获得较高的不定芽分化率,也同样说明较高浓度的 6-BA 有利于辣椒子叶分化形成不定芽.

如何提高辣椒短缩不定芽的伸长率一直是辣椒组织培养面临的关键技术之一.黎定军等^[5]认为适当降低 6-BA 浓度以及添加 GA₃ 是不定芽伸长的两个不可或缺的条件.本试验的结果也表明,GA₃ 对促进辣椒不定芽的伸长具有明显效果,而在添加 GA₃ 2.0 mg/L 的基础上,同时添加 AgNO₃ 10.0 mg/L 和 $\varphi = 10.0\%$ 的 CM 对促进辣椒不定芽伸长的效果更好,在此培养基中,有的辣椒品种短缩不定芽的伸长率达到 35%~40%,相当于每个转接外植体平均伸长形成 5 个以上正常的不定芽,基本达到遗传转化的再生植株体系要求.

关于 AgNO₃ 在植物组织培养中的应用已有很多文献报道,前人的研究表明一定浓度的 AgNO₃ 对不定芽的分化起促进作用^[8-10].张鹏等^[11]认为 AgNO₃ 的作用机制为:Ag⁺ 作为乙烯活性抑制剂,竞争性作用于乙烯的相同部位而促进器官发生和体细胞胚胎发生.王玉文等^[2]发现在不定芽分化培养基中加入 2.0~5.0 mg/L 的 AgNO₃,会使不定芽分化所需时间缩短.在本试验中,通过探讨不同浓度的 AgNO₃ 对辣椒不定芽分化的促进作用,证实了 10.0 mg/L 的 AgNO₃ 对辣椒子叶不定芽分化有一定的促进作用,

这与黎定军等^[5]的研究结果是一致的.

辣椒基因型对离体培养再生植株具有显著的影响.Liu 等^[6]对 7 个辣椒品种或野生种进行培养的结果表明,不同品种或类型所形成愈伤组织的时间、不定芽分化时间以及不定芽分化率均有较大差异,其中以辣椒野生种的不定芽分化率最高.Szasz 等^[7]用 17 个辣椒品种诱导分化不定芽时也得到类似结果.本试验结果表明,辣椒基因型不仅影响辣椒不定芽的分化,而且也影响不定芽的伸长.因此,在选择辣椒材料进行离体培养或遗传转化时,应尽可能扩大基因型的范围,以便从中找到合适的基因型.

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 中国农业统计资料[M]. 北京:中国农业出版社,1999:225.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 李英慧,李艳,杭晓明,等. 细胞分裂素对辣椒子叶再生的影响[J]. 园艺学报,2001,28(3):270-272.
- [5] 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.
- [6] LIU W, PARROTT W A, HIDEBRAND D F, et al. Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9(7):360-364.
- [7] SZASZ A, NERVO G, FARI M. Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in red pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron [J]. Plant Cell Rep, 1995, 14(10):666-669.
- [8] 张松,温孚江. 利用乙烯抑制剂 AgNO₃ 建立大白菜高频植株再生体系[J]. 园艺学报,1997,24(1):94-96.
- [9] CHI G L, BARFIELD G D, SIM G E, et al. Effect of AgNO₃ and amino-ethoxyvinylalicyclotransferase on *in vitro* shoot organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9(4):195-198.
- [10] PALMER C E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(11):541-545.
- [11] 张鹏,傅爱根,王爱国. AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. 植物生理学通讯,1997,33(5):373-379.

【责任编辑 柴 焰】