

辣椒子叶不定芽的诱导与伸长研究

谢礼洋, 匡华琴, 赖钟雄, 刘生财

(福建农林大学 园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 为了进一步研究辣椒子叶再生体系的影响因素, 以辣椒王种子为试材, 诱导无菌苗, 取子叶作为外植体, 探讨了不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响, 并进行了不同浓度 GA_3 与 6-BA 组合对不定芽伸长效果的研究。结果表明: 辣椒子叶在 $MB_5 + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ 培养基上诱导不定芽效果最好; $MB_5 + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3 + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ 培养基有利于不定芽的伸长。

关键词: 辣椒; 子叶; 不定芽诱导; 伸长

中图分类号: S641.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)10-0012-04

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 属于一年生或多年生的重要蔬菜作物, 现在是我国五大蔬菜作物之一, 具有重要的营养价值和药用价值^[1]。许多研究表明, 辣椒幼苗的子叶再生能力较强, 在组织培养过程中常作为外植体进行诱导分化的研究^[2-6]。关于辣椒子叶离体培养技术国内外也有研究报道^[7-10], 但是由于辣椒组织培养具有很强的基因型特异性, 从而导致研究结果有很大差异, 限制了辣椒快繁和基因转化工作。为了进一步研究辣椒子叶再生体系的影响因素, 以辣椒王种子为材料诱导无菌苗, 通过研究不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响, 进行了不同浓度 GA_3 与 6-BA 组合对不定芽伸长效果的研究, 为今后辣椒离体培养及遗传转化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为四川省产的辣椒品种辣椒王种子。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取饱满的辣椒种子用滤纸包裹, 先用 50~55℃ 的水浸泡 10~15 min, 再用流水冲洗 20 min, 然后在无菌条件下, 用 75% 的酒精消毒 60 s, 再用 0.1% 的 $HgCl_2$ 表面

消毒 6 min, 无菌水反复冲洗 5 次, 无菌滤纸吸干水分待用。

将已消毒的种子接种于附加 30 g·L⁻¹ 蔗糖和 6 g·L⁻¹ 琼脂的 MS 培养基 (pH 5.8) 中, 每瓶接 15 粒, 接 40 瓶, 进行无菌萌发, 获得长势一致的幼苗。

1.2.2 不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响 将苗龄 16 d 的子叶接种于诱导不定芽的培养基 $MB_5 + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + \text{AgNO}_3$ 4.0 mg·L⁻¹, 并附加不同浓度 6-BA (2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 mg·L⁻¹) 中进行诱导, 比较不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响。在培养 30 d 时观察统计不定芽诱导率及生长状况。每种处理接种 30 个外植体, 3 次重复。

1.2.3 不同浓度 GA_3 及 6-BA 对辣椒不定芽伸长的影响 以子叶诱导出的不定芽, 接种于伸长培养基 $MB_5 + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + \text{AgNO}_3$ 4.0 mg·L⁻¹, 并附加不同浓度的 GA_3 (2.0、3.0、4.0 mg·L⁻¹) 和 6-BA (5.0、8.0 mg·L⁻¹), 比较不同浓度 GA_3 和 6-BA 对辣椒不定芽伸长的影响。在培养 20 d 观察不定芽伸长状况。每种处理接种 30 个外植体, 3 次重复。

所有处理的培养基中均附加 30 g·L⁻¹ 蔗糖及 6 g·L⁻¹ 琼脂, pH 5.8。

1.2.4 培养条件 将培养材料放在光照强度为 1 500 lx, 光照时间 12 h·d⁻¹, 培养温度为 (25±1)℃ 的培养室中培养。

1.2.5 数据处理与分析 试验数据采用 Excel 和 DPS 等软件进行处理与分析。不定芽诱导率 (%) = 诱导出不定芽的子叶数 / 接种的子叶

收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 福建农林大学本科教学改革资助项目 (No. 1114 12099)

第一作者简介: 谢礼洋 (1990-), 女, 福建省南平市人, 学士, 从事园艺植物生物技术研究。E-mail: 2607215609@qq.com。

通讯作者: 刘生财 (1980-), 男, 黑龙江省密山市人, 博士, 讲师, 从事园艺植物生物技术与遗传资源研究。

数 $\times 100$;褐化率(%)=发生褐化的子叶数/接种的子叶数 $\times 100$;不定芽伸长率(%)=伸长的不定芽数/接种的不定芽数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响

以辣椒子叶为外植体,研究不同浓度的 6-BA 对子叶诱导不定芽的影响。在第 35 天统计分析,从表 1 和图 1 中可以看出,随着 6-BA 浓度的增加,不定芽诱导率呈先升高后降低趋势。当 6-BA

的浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,未见有不定芽的分化,只有紧密结构的愈伤组织产生;当 6-BA 的浓度为 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,部分子叶能够诱导出不定芽,诱导率为 55.4%;当 6-BA 为 6.0 和 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽诱导率分别为 70.2%和 76.4%,显著高于其它处理。

从表 1 中还可看出,随着 6-BA 浓度的提高,外植体的褐化率在逐渐增加,对子叶不定芽的诱导有较大的影响。结合褐化率和诱导率,试验发现 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 为辣椒子叶不定芽诱导的最佳浓度。

表 1 不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响

Table 1 Effect of different concentrations of 6-BA on the induction of adventitious buds			
6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	外植体数/个 Number of explant	褐化率/% Browning rate	诱导率/% Induction rate
2.0	90	0 d	0 d
4.0	90	0 d	55.4 b
6.0	90	17.1 c	70.2 a
8.0	90	22.2 c	76.4 a
10.0	90	32.3 b	53.1 b
12.0	90	41.2 a	33.8 c

注:表 1 中不同小写字母表示 0.05 水平差异显著性。
Note: The lowercases mean significant difference at 0.05 level.

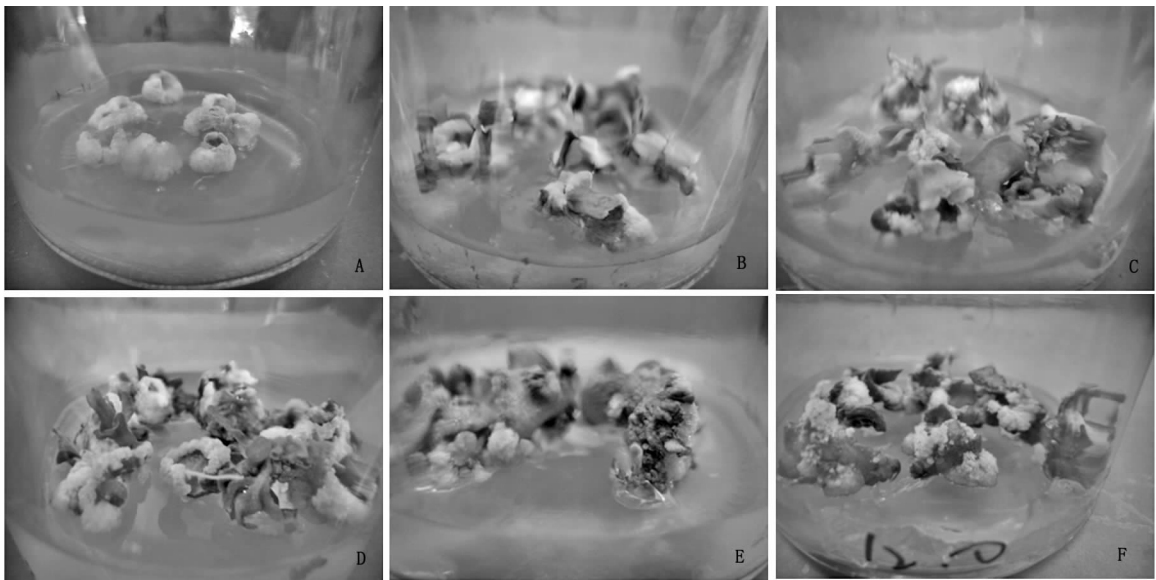


图 1 不同浓度 6-BA 对辣椒子叶诱导不定芽的影响

Fig. 1 Effect of different concentration of 6-BA on the induction of adventitious buds

A~F 分别表示 6-BA 浓度为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 及 $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理

A~F mean the concentrations of 6-BA for 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 and $12.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2 不同浓度 GA_3 和 6-BA 对辣椒不定芽伸长的影响

子叶在适合的不定芽诱导培养基中可以诱导出不定芽,然而,不定芽停留在叶状体,很难进一步使芽伸长为茎芽。一定浓度的 GA_3 能够使芽伸长,该研究将试验所得不定芽接种到附加有不同浓度的 GA_3 中,结果表明, GA_3 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对不定芽的伸长效果最好(见图

2),芽段有明显伸长(图 2G); GA_3 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 也可以促进不定芽伸长,但是效果低于 6-BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2H);当 6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 附加 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 或 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 培养基的不定芽均变为丛叶状,但不能使不定芽伸长(图 2I~J),说明低浓度的 6-BA 与 GA_3 组合有利于不定芽伸长。

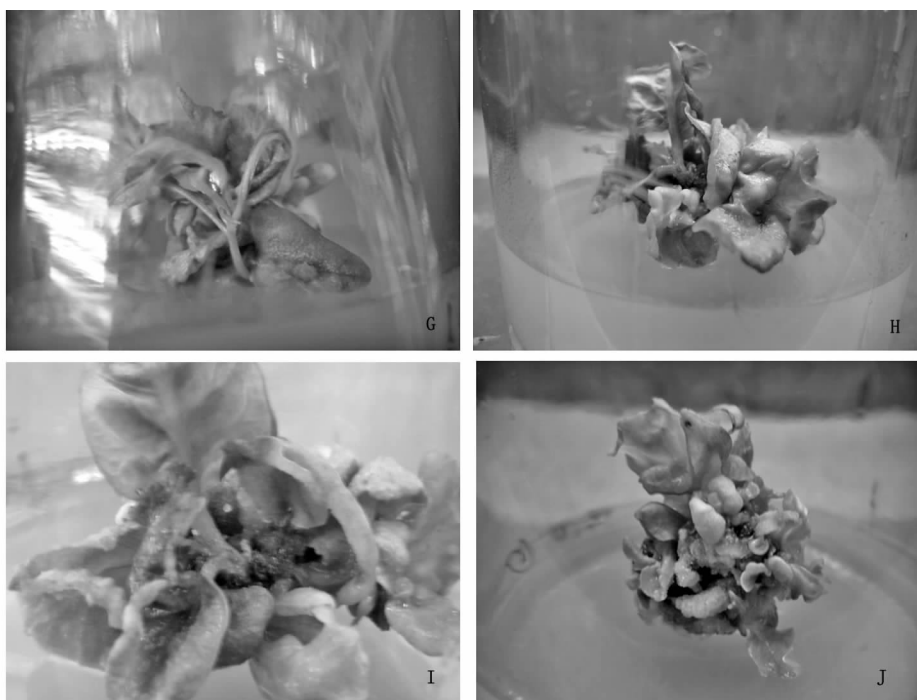


图 2 不同浓度 GA_3 和 6-BA 对辣椒不定芽伸长的影响

G~J 分别表示 6-BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理

Fig. 2 Effect of different concentration of GA_3 and 6-BA on the elongation of adventitious buds

G~J mean treatments of 6-BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA_3 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

3 结论与讨论

3.1 6-BA 浓度对辣椒不定芽诱导率影响显著

不同浓度的 6-BA 对辣椒子叶不定芽的诱导率有一定的影响。在一定的范围内,高浓度的 6-BA 能够提高子叶不定芽的诱导率,低浓度的 6-BA 不利于子叶不定芽的诱导。张金文^[11]等人研究表明,6-BA:IAA 为 10:1 的配比有利于辣椒不定芽的诱导,这与该研究的结果相一致。张子君^[12]等人的试验认为在 6-BA 为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基就已经能够诱导出不定芽,在该研究中,

$2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 只能诱导出愈伤组织而不能诱导出不定芽,这可能是由于基因型的不同而导致的。

随着 6-BA 浓度的逐渐升高,辣椒的外植体边缘发生褐化,而且浓度越高,褐化现象越严重。李英慧等人^[13]的研究也表明,使用 6-BA 会使外植体发生褐化,可通过添加一定浓度的 AgNO_3 、VC、活性炭来抑制褐变^[14]。但在该试验中,诱导培养基加入了 AgNO_3 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,在低浓度的 6-BA 中并未发现外植体的褐变,但是当 6-BA 浓

度在 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时开始出现了褐变,说明高浓度的 6-BA 是导致外植出现褐变的一个原因。

3.2 一定浓度 GA_3 与 6-BA 配比对不定芽伸长有促进作用

芽的伸长一般采用分化培养基,但有时芽却不能在分化培养基中良好生长,在培养基中添加一定浓度的 GA_3 能够使芽伸长,过高的浓度抑制不定芽的分化,芽的伸长率效果不显著。张金文等^[15]研究表明, GA_3 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于辣椒芽的伸长,这与该研究结果相似,但是有关 GA_3 最佳浓度还有待于进一步确认。

在使用一定浓度的 GA_3 中,添加不同浓度的 6-BA 对不定芽的伸长产生较大影响,张金文等人研究表明,在一定浓度范围内,低浓度的 6-BA 与 GA_3 配合使用有利于芽的伸长,这与该文研究结果相似,伸长培养基中 6-BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不定芽伸长效果要好于 6-BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,为了能够显著促进不定芽的伸长,在芽伸长培养基中,要使用低浓度 6-BA,并进一步研究其最佳浓度。

参考文献:

- [1] 倪水员. 辣椒营养价值及高产高效栽培技术[J]. 现代农业科技, 2011(17):19.
- [2] 成善汉, 贺申魁, 王红梅, 等. 辣椒子叶和下胚轴的离体培养及高效再生体系的建立[J]. 南方园艺, 2009, 20(3):3-6.
- [3] 董兆龙, 陈沁, 刘文轩, 等. 辣椒子叶和下胚轴离体培养再生[J]. 上海大学学报:自然科学版, 2003(2):149-152.
- [4] 龙凤, 张金文. 辣椒子叶和下胚轴的离本培养及高效再生体系的建立[J]. 甘肃农业学报, 2005(2):31-37.
- [5] 张茹, 王兰兰, 陈灵芝, 等. 辣椒组培外植体及不定芽诱导培养基的筛选[J]. 甘肃农业科技, 2012(1):11-13.
- [6] 张春芬, 孟玉平, 曹秋芬, 等. 辣椒的离体培养及再生体系研究[J]. 山西农业科学, 2008(11):34-37.
- [7] 姚明华, 王飞, 陆秀英, 等. 辣椒子叶离体培养及植株再生体系建立[J]. 华中学业大学学报, 2007(6):850-853.
- [8] Deng Minghua, Wen Jinfen, Zou Xuexiao. *In vitro* plant regeneration of pepper cytoplasmic male sterility(CMS) lines using cotyledon culture[J]. Agricultural Science and Technology, 2009, 10(1):39-42.
- [9] 刘卫东, 崔群香, 夏维东, 等. 彩色辣椒子叶离体培养技术的研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版, 2003, 24(1):63-66.
- [10] 宋利娜, 康德贤, 王红梅, 等. 辣椒三系子叶愈伤组织诱导及植株再生[J]. 北方园艺, 2012(9):109-112.
- [11] 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.
- [12] 张子君, 徐矿红. 辣椒子叶离体培养及植株再生[J]. 辽宁农业科学, 2001(6):44-45.
- [13] 李英慧, 李艳, 杭晓明, 等. 细胞分裂素对辣椒子叶再生的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(3):270-272.
- [14] 邱萃, 何水林. 辣椒组织培养再生体系的建立与应用[J]. 亚热带农业研究, 2006, 2(4):304-308.
- [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.

Study on Adventitious Buds Induction and Elongation of *Capsicum annuum* L. Cotyledon

XIE Li-yang, KUANG Hua-qin, LAI Zhong-xiong, LIU Sheng-cai

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract: In order to further study the influence factors of cotyledon regeneration system of *in vitro* *Capsicum annuum* L., 'Lajiaowang' seeds were used to induce *in vitro* plantlets(*Capsicum annuum* L.). The differences of adventitious buds induction were compared among the different concentrations of 6-BA. In the meanwhile, the effects of the different concentrations of GA_3 and 6-BA combinations on elongation were analyzed. The results showed that the best medium for adventitious buds induction by hypocotyls was $\text{MB}_5 + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AgNO}_3$. The suitable medium for the adventitious buds elongation was $\text{MB}_5 + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA} + 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3 + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AgNO}_3$.

Key words: *Capsicum annuum* L.; cotyledon; adventitious buds induction; elongation