

辣椒愈伤组织诱导的研究

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:为更好地利用辣椒愈伤组织分化再生植株及遗传转化,以2个辣椒品种的种子为试材,诱导无菌苗,取不同苗龄的胚轴作为外植体,比较它们之间愈伤组织诱导效果的差异,并探讨了不同浓度的 IAA 与 6-BA 组合对辣椒愈伤组织诱导的影响。结果表明:以辣椒苗龄为 16 d 的试管苗作为外植体诱导愈伤组织的效果最好;辣椒胚轴诱导愈伤组织的最佳培养基为 $MS+0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AgNO}_3$,但辣椒王诱导愈伤组织效果好于日本朝天椒,说明辣椒基因型对愈伤组织诱导有重要作用。

关键词:辣椒;愈伤组织;苗龄;激素;基因型

中图分类号:S641.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)11-0017-04

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是日常食物的调味品,具有重要的营养价值^[1]。辣椒愈伤组织的诱导受基因型、苗龄以及生长调节剂等多种因素影响^[2],有关辣椒植物愈伤组织培养的研究已有相关报道^[3-5],但是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所差异。为了进一步探讨影响辣椒愈伤组织诱导的因素,该试验以辣椒王及朝天椒种子为材料诱导无菌苗,通过研究不同基因型、不同苗龄及不同激素组合对

辣椒愈伤组织诱导的影响,为今后利用其愈伤组织分化再生植株及遗传转化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以四川产的辣椒王和郑州产的日本朝天椒为试材。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 将辣椒种子用滤纸包裹,先用 50~55℃的水浸泡 10~15 min,再流水冲洗 20 min,然后在超净工作台中进行消毒处理。首先将种子用 75% 的酒精消毒 60 s,再用 0.1% HgCl_2 分别消毒 2、4、6、8 和 10 min,然后用无菌水冲洗 4~5 次,最后将种子接到 MS 基本培养基中,每瓶接种 15 粒,每个品种接 20 瓶,3 次重复。在培养室培养 10 d 后,观察并统计萌发率和污染率。

收稿日期:2013-07-07

基金项目:福建农林大学本科教学改革资助项目(1114 12099)

第一作者简介:谢礼洋(1990-),女,福建省南平市人,在读学士,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。E-mail: 1215698900@qq.com。

[3] 刘鲜林,张博义.透射电镜超薄切片法与负染法探讨[J].贵阳医学院学报,1996,24(2):205-206.

[4] 施世明,洪霓.芋病毒病研究进展[J].长江蔬菜,2010(14):

3-5.

[5] 韦传宝,贾玉成,杜宇.芋花叶病毒检测试剂盒的研制[J].安徽农业大学学报:自然科学版,2009,33(4):85-89.

Optimization of Induction Conditions for Virus-free Lipu-taro

LI Jing-yun

(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract: In order to improve the quality and yield of Lipu-taro, the method of heat treatment with shoot-tip culture was used to study the best combination of induction conditions for Virus-free Lipu-taro(*Colocasia esculenta* L. Schott.). The results showed that when the root-free seedlings were put in incubator, the temperature was kept 38.7℃ for 15 days, 0.5~0.6 mm shoot-tips were inoculated into the MS medium with 3% sucrose, 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA and 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, *dasheen mosaic virus* could be removed effectively.

Key words: *Colocasia esculenta* L. Schott.; detoxification; heat treatment; *dasheen mosaic virus*; shoot-tip culture

所有处理的培养基均以 MS 为基本培养基, 附加 30 g·L⁻¹ 蔗糖、6 g·L⁻¹ 琼脂、4.0 mg·L⁻¹ Ag-NO₃, pH5.8。

1.2.2 不同苗龄对辣椒愈伤组织的影响 分别取辣椒种子萌发后 8、16、24、32 和 40 d 的无菌苗胚轴接种到辣椒愈伤组织诱导培养基 (MS + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.8 mg·L⁻¹ IAA + AgNO₃ 4.0 mg·L⁻¹) 中进行诱导, 比较不同苗龄对辣椒愈伤组织的影响。

1.2.3 不同激素对辣椒愈伤组织诱导的影响 以辣椒无菌苗的胚轴为外植体, 接种于辣椒愈伤组织诱导培养基中。诱导愈伤组织培养基以 MS 为基本培养基, 并附加不同浓度的 IAA (0、0.2、0.5、0.8、1.0 mg·L⁻¹) 和 6-BA (0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg·L⁻¹), 比较每种处理对辣椒愈伤组织诱导的影响。

1.2.4 培养条件 培养材料放在光照强度 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。培养 15 和 30 d 时观察并统计愈伤组织的诱导情况和诱导率, 每种处理接种 30 个外植体, 3 次重复。

1.2.5 数据处理与分析 种子萌发率 (%) = 萌发的种子数 / 接种的种子数 × 100; 种子污染率 (%) = 污染的瓶数 / 接种的瓶数 × 100; 愈伤组织诱导率 (%) = 诱导出愈伤组织外植体数 / 接种外植体数 × 100。

试验数据采用 Excel 和 DPS 等软件进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 HgCl₂ 消毒时间对辣椒种子萌发的影响

从表 1 可以看出, 辣椒王和日本朝天椒在 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 6 和 8 min 灭菌效果最好, 培养材料污染率低且萌发率比较高, 因此该试验无菌播种时 0.1% 升汞消毒时间设置为 6 min。

表 1 HgCl₂ 消毒时间对辣椒种子萌发的影响

Table 1 Effects of HgCl₂ disinfection time on seed germination of *Capsicum annuum*

消毒时间/min Disinfection time	辣椒王 Pepper king		日本朝天椒 Japanese pod pepper	
	萌发率/% Germination rate	污染率/% Contamination rate	萌发率/% Germination rate	污染率/% Contamination rate
2	61.34 c	45.32 a	60.35 c	30.06 a
4	87.46 a	30.49 b	85.87 a	24.53 b
6	85.32 ab	15.35 d	84.43 a	18.34 c
8	83.26 b	13.23 d	70.37 b	16.87 c
10	50.75 d	25.54 c	49.35 d	26.43 ab

注: 表中小写字母表示 0.05 水平差异显著性。下同。

Note: The lowercases indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

2.2 不同苗龄对辣椒愈伤组织的影响

由表 2 可知, 苗龄对辣椒愈伤组织诱导有一定影响。随着苗龄增加, 胚轴诱导愈伤组织的诱导率基本上呈先升高后降低趋势 (除日本朝天椒诱导 15 d 的诱导率外), 16 d 苗龄的胚轴诱导率

最高, 在 30 d 统计时, 辣椒王愈伤组织诱导率高达 95.3%, 日本朝天椒愈伤组织诱导率为 78.3%, 显著高于其它苗龄, 而且辣椒王愈伤组织诱导率明显高于日本朝天椒, 说明基因型对愈伤组织诱导有明显影响。

表 2 不同苗龄的胚轴对辣椒愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effect of the different seedling age on callus induction rate of *Capsicum annuum*

苗龄/d Seedling age	诱导率/% Induction rate			
	辣椒王 Pepper king		日本朝天椒 Japanese pod pepper	
	诱导 15 d Induction for 15 d	诱导 30 d Induction for 30 d	诱导 15 d Induction for 15 d	诱导 30 d Induction for 30 d
8	9.1 b	86.7 b	11.7 a	63.3 c
16	13.3 a	95.3 a	6.7 b	78.3 a
24	6.7 c	83.3 b	5.2 bc	70.2 b
32	5.2 cd	76.7 c	3.3 c	70.6 b
40	3.3 d	76.7 c	3.3 c	67.7 bc

2.3 不同激素对辣椒愈伤组织诱导的影响

2.3.1 不同浓度 IAA 对辣椒愈伤组织诱导的影响 从表 3 可以看出,在第 30 天对辣椒诱导率进行统计分析,当 6-BA 浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着 IAA 浓度增加,愈伤组织诱导率呈现先升高后降低变化趋势(除日本朝天椒诱导 15 d 的诱导率外);当 IAA 的浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,辣椒王和日本朝天椒的愈伤组织诱导率最高,分别为 83.3% 和 73.4%,显著高于其它浓度处理;辣椒王的诱导率明显高于日本朝天椒。

2.3.2 不同浓度 6-BA 对辣椒愈伤组织诱导的影响 6-BA 对辣椒愈伤组织诱导有重要作用。从表 4 可以看出,不同浓度 6-BA 对辣椒愈伤组织诱导有显著差异。在第 30 天对辣椒诱导率进行统计分析,当 IAA 浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,一定浓度范围内,随着 6-BA 浓度增加,愈伤组织诱导率呈现先升高后降低的变化趋势;当 IAA 的浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,6-BA 浓度 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,辣椒王和日本朝天椒的愈伤组织诱导率最高,分别为 83.6% 和 73.4%,显著高于其它浓度处理;辣椒王的诱导率略高于日本朝天椒。

表 3 不同浓度 IAA 对辣椒愈伤组织诱导率的影响

Table 3 Effect of different concentrations IAA on callus induction of *Capsicum annuum*

IAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	诱导率/% Induction rate			
		辣椒王 Pepper king		日本朝天椒 Japanese pod pepper	
		诱导 15 d Induction for 15 d	诱导 30 d Induction for 30 d	诱导 15 d Induction for 15 d	诱导 30 d Induction for 30 d
0	1.0	0 e	2.5 d	0 d	1.8 d
0.2	1.0	6.7 d	53.3 c	3.3 c	46.7 c
0.5	1.0	16.7 c	76.7 b	3.3 c	66.7 b
0.8	1.0	26.7 a	83.3 a	6.7 b	73.4 a
1.0	1.0	20.3 b	76.7 b	10.5 a	43.8 c

表 4 不同浓度 6-BA 对辣椒愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different concentrations 6-BA on callus induction of *Capsicum annuum*

IAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	诱导率/% Induction rate	
		辣椒王 Pepper king	日本朝天椒 Japanese pod pepper
0.8	0	76.4 b	66.1 b
0.8	1.0	83.6 a	73.4 a
0.8	2.0	62.3 c	46.3 c
0.8	3.0	36.5 d	23.6 d
0.8	4.0	16.7 e	12.4 e

3 结论与讨论

3.1 苗龄对辣椒愈伤组织诱导有重要作用

合适的苗龄对于有效的诱导植物愈伤组织是十分关键的。一般认为,随着苗龄的增大,不利于愈伤组织的诱导和芽的分化。李红^[7]等人对彩色辣椒子叶诱导愈伤组织进行研究,表明无菌苗子叶处于初展期时所诱导的愈伤组织诱导率最高。

柳建军^[8]等人对不同苗龄辣椒的愈伤组织诱导研究表明,3 d 的苗龄的带柄子叶的愈伤组织的诱导率很低,当苗龄达到 6~12 d 时,诱导率高,当苗龄大于 15 d 时,愈伤组织的诱导率明显降低,与该文研究结果相似,辣椒愈伤组织随着苗龄增加先升高后降低,在苗龄 16 d 时愈伤组织诱导率最高。

3.2 不同激素对比对辣椒愈伤组织诱导有很大影响

不同激素对比对辣椒愈伤组织的诱导有很大的影响,细胞分裂素和生长素的配合使用可以调控外植体分化方向,当细胞分裂素低于一定的浓度时,辣椒胚轴可以分化为愈伤组织,当细胞分裂素高于一定的浓度,会促进芽的分化。李永文等人研究表明一定浓度 6-BA 对辣椒愈伤组织诱导有促进作用。还有研究表明,诱导辣椒愈伤组织时,6-BA 与 IAA 配合使用好于 KT 与 IAA 配合使用^[9]。徐健^[10]等人的研究表明,愈伤组织的最适培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA } 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IAA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该试验研究表明,在一定浓度下 6-BA 与 IAA 配合可

以有效地诱导出愈伤组织, IAA 的最适浓度为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 可能是因为基因型差异导致的。

3.3 基因型是影响辣椒愈伤组织形成的一个重要因素

基因型是影响辣椒愈伤组织诱导的一个重要因素, 不同基因型的愈伤诱导率有显著差异^[10-11]。宋利娜等^[12]研究可知, 以辣椒雄性不育、保持系及恢复系子叶为外植体, 在 6-BA 和 IAA 浓度组合中, 三系间在愈伤组织分化上表现出一定的差异。可见, 不同基因型诱导出来的愈伤组织有很大差异, 诱导率变化范围广。该试验以辣椒王和日本朝天椒 2 个品种进行愈伤组织的诱导, 发现不同品种间的愈伤组织在相同的时间内诱导率有较大的差异, 这正说明辣椒愈伤组织诱导与基因型密切相关。

基因型是影响辣椒愈伤组织诱导的一个重要因素, 不同的基因型的愈伤诱导率有显著差异^[6, 11]。因此, 关于基因型对愈伤诱导率的影响仍有待于进一步深入地研究。

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] 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, 2002(4):305-308.
- [3] 黄丽华, 洪亚辉, 戴雄泽, 等. 光质对辣椒离体愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2009(6):616-617.
- [4] 王旭英, 朱道玉. 彩色辣椒愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 河南农业科学, 2008(8):101-102.
- [5] 成善汉, 贺申魁. 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.
- [6] 宁卓, 刘清波. 辣椒愈伤组织再生体系研究进展[J]. 现代农业科技, 2011(18):114-116.
- [7] 李永文, 李红. 彩色辣椒子叶愈伤组织诱导影响的研究, 北方园艺, 2007(5):205-206.
- [8] 柳建军, 于洪欣, 周玉, 等. 辣椒的离体再生及抗虫基因转化的研究[J]. 山东师范大学学报, 2002, 17(4):74-76.
- [9] 王迅, 洪亚辉. 辣椒愈伤组织辐射诱变及离体培养的研究[J]. 湖南农业科学, 2010(15):11-13.
- [10] SADHANA A, CHANDRA N, KOTHARI S L. Plant regeneration in tissue cultures of prpper(*Capsicum annuum* L. cv. *mathania*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989(16):47-55.
- [11] 黄炜, 巩振辉. 辣椒离体再生体系研究[J]. 园林园艺科学, 2005, 21(12):268-279.
- [12] 宋利娜, 康德贤, 王红梅, 等. 辣椒子叶愈伤组织诱导及植株再生[J]. 北方园艺, 2012(9):109-112.

Study on Callus Induction from *in vitro* *Capsicum annuum* L.

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 use callus to regenerate plant and do genetic transformation, taking two varieties of *Capsicum annuum* L. seeds as materials which were used to induce *in vitro* plantlets (*Capsicum annuum* L.), and taking hypocotyls of different seedling age as explants, the differences between their induction effect were compared, and the induction effect of different concentrations combination of IAA and 6-BA on callus were discussed. The results showed that the best seedling age to induce callus was at 16 d as explant callus. The best medium for callus induction by hypocotyls was MS medium supplemented with $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 , and the effect of callus induction by Pepper king was better than Japanese pod pepper, it showed that genotype had highly significant impact on induction of callus from *in vitro* *Capsicum annuum* L..

Key words: *Capsicum annuum* L.; callus; seedling age; hormone; genotype

欢迎刊登广告