

# 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16d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 mg·L<sup>-1</sup> IAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+4.0 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>,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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>,有关辣椒植物愈伤组织培养的研究已有相关报道<sup>[3-5]</sup>,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amp;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<sub>2</sub>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(111412099)

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,张博文.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 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 蔗糖、6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂、4.0 mg·L<sup>-1</sup> Ag-NO<sub>3</sub>, 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<sup>-1</sup> 6-BA + 0.8 mg·L<sup>-1</sup> IAA + AgNO<sub>3</sub> 4.0 mg·L<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>) 和 6-BA (0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg·L<sup>-1</sup>), 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<sup>-1</sup>, 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 HgCl<sub>2</sub> 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 HgCl<sub>2</sub> 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 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间对辣椒种子萌发的影响

Table 1 Effects of HgCl<sub>2</sub> disinfection time on seed germination of *Capsicum annuum*

| 消毒时间/min<br>Disinfection time | 辣椒王 Pepper king           |                             | 日本朝天椒 Japanese pod pepper |                             |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                               | 萌发率/%<br>Germination rate | 污染率/%<br>Contamination rate | 萌发率/%<br>Germination rate | 污染率/%<br>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<br>Seedling age | 诱导率/% Induction rate          |                               |                               |                               |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                      | 辣椒王 Pepper king               |                               | 日本朝天椒 Japanese pod pepper     |                               |
|                      | 诱导 15 d<br>Induction for 15 d | 诱导 30 d<br>Induction for 30 d | 诱导 15 d<br>Induction for 15 d | 诱导 30 d<br>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/<br>$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 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<br>Induction for 15 d | 诱导 30 d<br>Induction for 30 d | 诱导 15 d<br>Induction for 15 d | 诱导 30 d<br>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/<br>$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 6-BA/<br>$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 诱导率/% Induction rate |                              |
|---------------------------------------|--|----------------------|------------------------------|
|                                       |  | 辣椒王<br>Pepper king   | 日本朝天椒<br>Japanese pod pepper |
|                                       |  | 0.8                  | 0                            |
| 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<sup>[7]</sup>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<sup>[8]</sup>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<sup>[9]</sup>。徐健<sup>[10]</sup>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<sup>[10-11]</sup>。宋利娜等<sup>[12]</sup>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<sup>[6, 11]</sup>。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  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$ , 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