

# 辣椒三系子叶愈伤组织诱导及植株再生

宋利娜<sup>1,2,3</sup>, 康德贤<sup>3</sup>, 王红梅<sup>1</sup>, 王益奎<sup>2,3</sup>, 李文嘉<sup>2</sup>, 曹振木<sup>4</sup>

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007;

3. 广西作物遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530007; 4. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

**摘要:**以辣椒雄性不育系、保持系、恢复系子叶为外植体, 研究了 6-BA、IAA 浓度组合及 AgNO<sub>3</sub> 对子叶离体再生培养的影响。结果表明: 三系之间在愈伤诱导和不定芽分化上均表现一定的差异, 不仅最适的愈伤诱导和不定芽分化培养基不同, 且分化出不定芽的数量也表现出较大差异, R-1 分化出的不定芽数目明显多于 A-1、B-1; AgNO<sub>3</sub> 对愈伤组织诱导没有明显的作用, 但 3 mg/L 的 AgNO<sub>3</sub> 可提高不定芽的分化率; 6-BA/IAA 比值为 10 时与比值为 4 时相比更有利于不定芽的分化; 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是辣椒三系最优的生根培养基配方。

**关键词:**植株再生; 愈伤诱导; 激素浓度; AgNO<sub>3</sub>

**中图分类号:**S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)09-0109-04

雄性不育辣椒的筛选可创造新的种质材料, 丰富辣椒属种质资源。建立辣椒雄性不育系、保持系和恢复系的高效再生体系是开展辣椒三系材料遗传转化的一个基本条件。关于辣椒愈伤组织培养及植株再生已有较多报道, 崔群香等<sup>[1]</sup>和吴纲<sup>[2]</sup>对彩椒的离体培养进行了研究, 建立了不同彩椒的再生繁殖体系。蒋向辉等<sup>[3]</sup>对观赏辣椒一步成苗的诱导条件进行了研究, 认为 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L 2,4-D 是最适的培养基配方。为更有效的建立辣椒离体培养再生体系, 余小林等<sup>[4]</sup>和黎定军等<sup>[5]</sup>对辣椒离体培养过程中添加不同的附加物进行了探讨。除了利用子叶作外植体, 杨建伟等<sup>[6]</sup>利用三樱椒种子作外植体, 研究了植物激素对愈伤组织根分化和植株再生的影响, 结果表明 NAA/6-BA 比值越大, 越有利于三樱椒根的分化。随后, 张余洋等<sup>[7]</sup>对影响辣椒不定芽伸长的因素(赤霉素、芽诱导时间、培养基有机成分、不同激素组合和品种)进行了探索。有关雄性不育辣椒再生的研究相对较少, 邓明华等<sup>[8]</sup>报道了影响胞质雄性不育系辣椒子叶培养再生的条件, 这些条件包括细胞分裂素、生长素、赤霉素和 AgNO<sub>3</sub>。但在诸多的报道中有关辣椒雄性不育系、保持系和恢复系三系同时离体培养的研究却尚未

见报道, 由于不同的辣椒品种离体培养条件不尽相同, 因此该试验在前人研究的基础上, 进一步对辣椒离体再生培养条件进行探讨, 旨在为辣椒雄性不育基因遗传转化和创造新的辣椒雄性不育种质奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料由中国热带农业科学院品资所馈赠, 选用辣椒雄性不育系(09SM11×09SM10, 编号:A-1)、保持系(09SM10, 编号:B-1)、恢复系(F21, 编号:R-1)3 个材料中饱满充实、色泽鲜亮、无病虫害的种子。

### 1.2 试验方法

1.2.1 实生苗的获得 将挑选的优良辣椒种子于自来水中浸种 12~15 h, 经 75% 酒精浸泡 30 s, 转入 0.1% HgCl<sub>2</sub> 中消毒 7~8 min, 然后用无菌水冲洗 3~5 次, 接种于 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L(pH 5.8)基本培养基上, 于光照强度 2 000 lx, 光照时间 16 h/d, 温度(25±1)℃条件下培养, 获得实生苗。

1.2.2 愈伤组织诱导和不定芽的分化 取生长 12~16 d 大小的无菌苗子叶, 去叶尖, 切成 0.5×0.5 cm 大小, 接种于添加有不同浓度 6-BA、IAA 及 AgNO<sub>3</sub> 的 MS 培养基上(表 1)培养, 待其长出不定芽。其中每个处理接种 7 瓶, 每瓶 5 块, 共 35 块。

1.2.3 不定芽的伸长 将不定芽转入伸长培养基(表 2)中培养。

1.2.4 生根与移栽 将长至 1.5~2 cm 的不定芽自基部切下, 接入生根培养基(处理 1:1/2MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L 和处理 2:1/2MS+NAA 1.0 mg/L)中培养。10 d 后长出新根。将长根的小苗开瓶练苗 2 d

**第一作者简介:**宋利娜(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为种质资源与遗传育种。E-mail: songln84@126.com。

**责任作者:**李文嘉(1962-), 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为种质资源与遗传育种。E-mail: lwj3386@163.com。

**基金项目:**中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金资助项目(PZS064); 广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFB018054)。

**收稿日期:**2012-02-16

后,移至基质中保湿培养 10~15 d,然后移栽大田,进行正常的栽培管理。

表 1 愈伤组织诱导及不定芽分化培养基

处理	6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	IAA/mg · L <sup>-1</sup>	AgNO <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>
1	4.0	0.5	0
2	4.0	0.8	3.0
3	4.0	1.0	6.0
4	5.0	0.5	3.0
5	5.0	0.8	6.0
6	5.0	1.0	0
7	6.0	0.5	6.0
8	6.0	0.8	0
9	6.0	0.5	3.0

表 2 不定芽伸长培养基

处理	6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	IAA/mg · L <sup>-1</sup>	GA <sub>3</sub> /mg · L <sup>-1</sup>
1	3.0	1.0	2.0
2	3.0	2.0	2.0
3	4.0	2.0	2.0
4	4.0	3.0	3.0

表 3 不同培养基处理愈伤诱导及不定芽分化情况

处理号	6-BA/IAA	接种总数	A-1			B-1			R-1		
			平均每瓶出愈数	平均每瓶分化数	平均每瓶污染数	平均每瓶出愈数	平均每瓶分化数	平均每瓶污染数	平均每瓶出愈数	平均每瓶分化数	平均每瓶污染数
1	8	35	5.00±0.0a	4.86±0.14a	0	4.71±0.18a	4.57±0.30ab	0.57	4.57±0.30ab	4.43±0.30abc	0.86
2	5	35	5.00±0.0a	5.00±0.0a	0	5.00±0.0a	4.14±0.34abc	0	5.00±0.0a	4.86±0.14ab	0
3	4	35	4.57±0.53ab	4.43±0.20a	0.86	5.00±0.0a	4.29±0.29abc	0	5.00±0.0a	4.14±0.26bc	0
4	10	35	5.00±0.0a	4.71±0.18a	0	5.00±0.0a	4.57±0.30ab	0	4.29±0.29b	4.29±0.30abc	0.14
5	6.3	35	5.00±0.0a	3.57±0.37b	0	5.00±0.0a	3.57±0.37c	0	5.00±0.0a	3.29±0.18d	0
6	5	35	5.00±0.0a	1.86±0.40c	0	5.00±0.0a	5.00±0.0a	0	5.00±0.0a	4.14±0.34bc	0
7	12	35	4.71±0.49b	1.57±0.37c	0.57	4.86±0.14a	3.71±0.29bc	0	5.00±0.0a	3.71±0.36cd	0
8	7.5	35	5.00±0.0a	3.29±0.42b	0	4.71±0.18a	4.57±0.30ab	0.57	4.57±0.20ab	4.57±0.20ab	0.86
9	12	35	5.00±0.0a	4.57±0.30a	0	5.00±0.0a	4.71±0.18a	0	5.00±0.0a	5.00±0.0a	0

注:表中不同小写字母表示差异显著(P=0.05)。

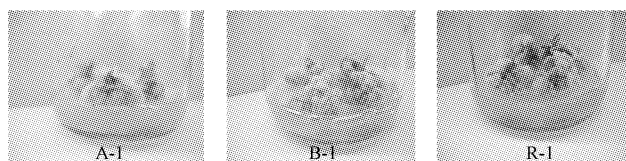


图 1 雄性不育系(A-1)、保持系(B-1)、恢复系(R-1)愈伤组织生长情况

## 2.2 AgNO<sub>3</sub>对愈伤诱导及不定芽分化的影响

由表 3 可看出,AgNO<sub>3</sub>对 3 个材料愈伤的诱导没有明显的促进或抑制作用,而在不定芽分化时则差异显著,如恢复系 R-1 处理 4 在 AgNO<sub>3</sub>为 3.0 mg/L 时每瓶平均分化数为 4.29±0.30,处理 5 AgNO<sub>3</sub>为 6.0 mg/L,每瓶平均分化数只有 3.29±0.18。因此,6.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>对不定芽的分化会产生一定程度的抑制作用,3.0 mg/L 对不定芽的分化起促进作用。试验中观察到在不定芽的分化数量上,添加 AgNO<sub>3</sub>的培养基比没有添加 AgNO<sub>3</sub>的培养基明显增多,培养过程中的褐化程度也低,但芽生长比不添加 AgNO<sub>3</sub>的培养基弱。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度激素组合对子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

从表 3 可看出,辣椒三系最适的愈伤诱导和芽分化培养基不同,且主要表现在芽分化上。统计结果表明,辣椒三系在不同的培养基上(除污染数外)出愈率没有达到显著差异(图 1)。在芽的分化上不同浓度的激素组合则表现出很大的差异,如 A-1 处理 2 和处理 7 分化数有显著差异,尽管处理 2 分化数最高,但其每块愈伤上分化出的不定芽数目和健壮程度却不及处理 3、4;雄性不育系 A-1 的分化数总体上比较要大于 B-1 和 R-1,但每个外植体上分化出的不定芽数要少于 R-1。综合考虑,A-1、B-1 和 R-1 最适宜的愈伤诱导和不定芽分化培养基分别为处理 4、6 和 9。在愈伤诱导及芽分化过程中 6-BA/IAA 比值的大小尤为重要,由表 3 可知,当 6-BA/IAA 比值为 10 时与比值为 4 时相比更有利于不定芽的分化,即处理 4 和 3,因此相对较高的 6-BA/IAA 比值有利于不定芽的分化。

### 2.3 不同激素配方对不定芽伸长的影响

由愈伤组织分化出的丛生芽,三系之间虽有一定的差异,但均表现出芽密且茎节较短的现象(图 2)。通过调节激素配方,将不定芽茎段拉长,试验结果表明,MS+4 mg/L 6-BA+2 mg/L IAA+2 mg/L GA<sub>3</sub> 配方最优,主要表现为茎伸长较快,增长率可高达 172.0%(表 4),且苗茁壮。三系辣椒在不定芽伸长培养中无明显的差异,最适的芽伸长培养基配方均为处理 3。

表 4 不定芽伸长情况统计

处理	统计总数/棵	接种时平均茎长/cm	20 d 后平均茎长/cm	增长率/%
1	60	0.47	1.14	142.6
2	60	0.43	0.72	67.4
3	60	0.50	1.36	172.0
4	60	0.56	0.98	73.2

注:增长率=(20 d 后平均茎长-接种时平均茎长)/接种时平均茎长×100%。

### 2.4 不同激素配方对幼苗生根情况的影响

由表 5 可知,生根培养 30 d 后,1/2 MS+NAA 1.0 mg/L 培养基可诱导出较短、较粗类似鸡爪样的根,

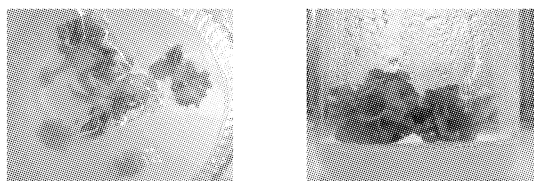


图2 辣椒丛生芽生长情况

平均每株生根数及平均根长均低于处理1,只有平均根粗大于处理1,在试验中观察到此配方培养基在生根前极易诱导愈伤,且愈伤易褐化,苗生长弱,易黄化,后期基本全部死亡;1/2 MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基诱导根系不仅多,且健壮、发达(图3)。说明不同种类的植物激素组合较单一激素对辣椒生根培养更有利。

表5 幼苗生根情况统计

处理	统计总数 /株	平均每株生 根数/条	平均根长 /cm	平均根粗 /mm	根生长状态
1	60	7	1.24	2.2	细长、健壮
2	60	5	0.79	3.2	短粗、鸡爪状

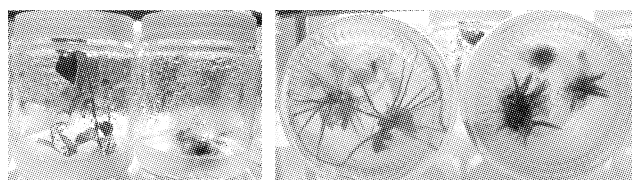


图3 不同激素配方辣椒再生植株生根情况

### 3 结论与讨论

辣椒的组织培养有很强的基因型特异性,不同的材料在愈伤诱导和不定芽分化上表现出很大的差异。该试验采用辣椒三系子叶作为外植体,除少数被污染外,其余均可诱导出愈伤组织,但在不定芽的分化上却表现出较大的差异,雄性不育系 A-1 处理 2 分化数最高达  $5.00 \pm 0.00$ ,而保持系 B-1 处理 2 分化数只达  $4.14 \pm 0.34$ 。由于辣椒外植体中不具有足够的内源激素,只有附加不同浓度的激素,才能促进辣椒外植体芽的分化和伸长<sup>[9]</sup>。在离体培养中,不定芽分化往往是多种激素相互平衡及协同作用的结果,激素的比例尤为重要,较高的 6-BA/IAA 比值有利于不定芽的分化<sup>[10]</sup>。张金文等<sup>[11]</sup>研究得出,6-BA/IAA 比值为 10 时所选用的 9 个品种的辣椒不定芽分化率最高,其所用的基本培养基为 MB。该试验在基本培养基为 MS 基础上也得出,6-BA/IAA 比值为 10 时比 4 时更有利于不定芽的分化。外源植株激素细胞分裂素与生长素之间的比值较高时更有利于不定芽的分化,且试验所用的基本培养基种类对激素比值的大小与影响不大。

许多研究表明,AgNO<sub>3</sub>能够抑制乙烯的产生,延缓外植体褐变,因此一定浓度范围内的 AgNO<sub>3</sub>能够促进单子叶及双子叶植物愈伤组织的诱导及分化<sup>[12]</sup>。张淑红

等<sup>[13]</sup>发现,添加 AgNO<sub>3</sub>可抑制马铃薯叶肉原生质体的褐变,从而提高细胞分裂频率。虽然一定浓度范围的 AgNO<sub>3</sub>对愈伤组织的诱导和分化有促进效应,但高浓度的 AgNO<sub>3</sub>对植物细胞的生理代谢却造成很大的毒害作用,并导致不定芽畸形<sup>[14]</sup>。邓明华等<sup>[8]</sup>的研究表明,5 mg/L AgNO<sub>3</sub>对不定芽的分化起促进作用,10 mg/L 时则抑制胞质雄性不育辣椒不定芽分化。姚明华等<sup>[15]</sup>也表示,AgNO<sub>3</sub>浓度过高对辣椒不定芽的分化具有一定的毒害作用,促进畸形芽的形成,4 mg/L AgNO<sub>3</sub>能明显提高芽的分化率。而黎定军等<sup>[5]</sup>研究认为,在培养基中添加 10 mg/L AgNO<sub>3</sub>可有效抑制辣椒外植体褐化,促进不定芽分化。该试验研究表明,AgNO<sub>3</sub> 6 mg/L 时对辣椒三系不定芽的分化产生抑制作用,而低浓度 3 mg/L AgNO<sub>3</sub>对不定芽的分化起促进作用。AgNO<sub>3</sub>的促进作用因植物种类、基因型的不同而反应不同,这可能是在 AgNO<sub>3</sub>和基因型之间存在较为强烈的互作效应以及各个研究采用的培养条件不同所致。综上所述,AgNO<sub>3</sub>的适宜作用范围可能在 3~5 mg/L。

在辣椒的组织培养方面,目前主要的障碍就是不定芽的伸长困难,丛生芽虽多,但易形成叶状体或玫瑰形的畸形芽,且在愈伤的任何部位均可分化出不定芽,所以在试验过程中很难真实的反应出每个外植体上分化不定芽的数量,只能在总体上比较出某个品种不定芽数量的多少。该研究表明,雄性不育系 A-1 的分化率总体上要大于 B-1 和 R-1,但每个外植体上分化出的不定芽数要少于 R-1。由此也可知,在试验中真正能用于伸长培养的不定芽数却较少,因此开展丛生芽伸长诱导就非常有必要。张金文等<sup>[11]</sup>研究指出降低 6-BA/IAA 比值(3:1),并添加 GA<sub>3</sub>可促进继代再生芽的伸长。通过实践证明,MS+4 mg/L 6-BA+2 mg/L IAA+2 mg/L GA<sub>3</sub>是最适的辣椒三系伸长培养基。对于生根培养,不同激素组合明显优于单因素的激素。王旭英等<sup>[16]</sup>认为 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L 配方培养基可诱导辣椒根系生长,但该研究结果发现,高浓度 NAA 虽能诱导少量根的产生,同时也诱导出了大量的愈伤,诱导出的根系不仅短且畸形、导致苗易黄化,而激素组合配方的培养基 1/2 MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L 诱导的根系多,且发达,是辣椒三系最适的生根诱导培养基。

### 参考文献

- [1] 崔群香,朱士农,刘卫东. 彩色辣椒离体培养外植体及诱导培养基的筛选[J]. 金陵技术学院学报,2005,21(1):78-81.
- [2] 吴纲. 彩色辣椒子叶离体培养研究初报[J]. 江苏林业科技,2002(8):31-32.
- [3] 蒋向辉,余朝文,谷合勇,等. 观赏辣椒一步成苗诱导条件的筛选[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):705-707.
- [4] 余小林,李乃坚,黄自然,等. 辣椒子叶离体培养和植株再生体系的建[J]. 园艺学报,2000,27(1):42-46.



- [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] 杨建伟,阎光兰. 植物激素对三樱椒愈伤组织根的分化及植株再生的影响[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(3):24-26.
- [7] 张余洋,汤银珠,叶志彪,等. 影响辣椒离体再生芽伸长因素研究[J]. 武汉植物学研究,2007,25(2):185-191.
- [8] 邓明华,文锦芬,邹学校. 辣椒胞质雄性不育系(CMS)子叶培养植株再生[J]. 农业科学技术,2009,10(1):40-42.
- [9] Scripcitt P. *In vitro* shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper(*Capsicum annuum* L. cv. Yastufusa) [J]. Breed,1987,37:133-142.
- [10] 贺晓庆,巩振辉. 不同辣椒材料离体再生及影响因素的研究[J]. 西北植物学报,2007,27(7):1329-1334.
- [11] 张金文,范兴中,王莹,等. 辣椒离体培养再生体系的研究[J]. 西北植物学报,2006,26(9):1893-1899.
- [12] 张鹏,傅爱根,王爱国. AgNO<sub>3</sub>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):376-379.
- [13] 张淑红,王蒂,王清. 影响马铃薯叶肉原生质体褐化的因素及 AgNO<sub>3</sub>对其褐化和分裂的作用[J]. 中国马铃薯,2004,18(2):77-81.
- [14] 赵巧阳,赖钟雄. 硝酸银在离体培养和转化中的作用及其机理[J]. 亚热带农业研究,2008,4(1):62-66.
- [15] 姚明华,王飞,陆秀英. 辣椒子叶离体培养及植株再生体系建立[J]. 华中农业大学学报,2007,26(6):850-853.
- [16] 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,2006(8):101-103.

## Plant Regeneration and Callus Induction of Three Lines of Peppers via Cotyledon Culture

SONG Li-na<sup>1,2,3</sup>, KANG De-xian<sup>3</sup>, WANG Hong-mei<sup>1</sup>, WANG Yi-kui<sup>2,3</sup>, LI Wen-jia<sup>2</sup>, CAO Zhen-mu<sup>4</sup>

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. Institute of Vegetable Research, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 3. Key Laboratory of Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Nanning, Guangxi 530007; 4. Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract:** Taking male sterile line, maintainer line and restorer line of peppers cotyledon as explant, the factors effect of 6-BA, IAA concentration and AgNO<sub>3</sub> on the *in vitro* regeneration culture of pepper cotyledon. The results showed that three lines of peppers had differences on callus and adventitious bud induction not merely the best medium of callus and adventitious bud induction but also the number of bud. The bud of R-1 easily outnumber A-1 and B-1; AgNO<sub>3</sub> didn't had an obvious effect on callus induction, but 3 mg/L AgNO<sub>3</sub> could enhance the rate of adventitious bud differentiation; The higher 6-BA/IAA ratio of ten was conducive to the differentiation of the explants of cotyledons than it was four; 1/2MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L was the optimal medium of rooting by regenerated shoots.

**Key words:** plant regeneration; callus induction; concentration of hormone; AgNO<sub>3</sub>

## 中国科学家揭秘长豇豆育种驯化史

我国老百姓饭桌上常见的长豇豆可具有长达1 m的长荚。然而在非洲,长豇豆的洋兄弟—普通豇豆的豆荚却只有人的手指般长短。是什么原因导致这种“两兄弟,大不同”的现象出现呢?近日,英国《自然》出版集团旗下著名遗传学期刊《Heredity》(遗传)发表了我国科学家对长豇豆育种驯化的最新研究成果,认为亚洲人对豇豆3条特定染色体的持续人工选择是导致长豇豆超长豆荚形成的遗传主因。

浙江省农业科学院蔬菜所李国景研究员率领的团队在国家、浙江省自然科学基金和中美合作项目的资助下,利用1 127个单核苷酸多态性(一种DNA变异)标记分析了我国95份长豇豆资源以及4份来自美国和非洲的普通豇豆DNA。通过以“全基因组连锁不平衡(LD)分析”为主的遗传学方法结合日本学者提出的“LD变异组分分解”,研究人员确定长豇豆和普通豇豆“本是同根生”,并推测出其兄弟当年“分道扬镳”的可能图景:最初豇豆的老祖宗生活在非洲,并且将种子供给当地人民作为蛋白质的主要来源。后来一小部分豇豆随人口流动迁移到了亚洲,但亚洲人并不喜欢吃它的豆子,却喜欢食用其嫩荚。于是人们一代代地选留那些荚长最长的豇豆种子进行繁殖,并且让它们彼此杂交并继续选择。千百年来,人们在不知不觉中对豇豆第5,7和11号染色体进行了高强度的定向选择,而控制豇豆荚长的基因正位于这些染色体上。最终,在亚洲形成了拥有可长达1 m超级豆荚的豇豆新亚种—长豇豆亚种。该研究还首次提出在遗传上将长豇豆划分为“典型菜用型”和“非典型菜用型”两大类群,因为“它们存在着明显的遗传‘群体结构’”,论文第一作者徐沛副研究员解释说。

“可以说,双重‘建立者效应’(Founder effect)+对特定染色体的高强度持续选择是长豇豆育种驯化过程中最显著的特点。这一过程反映的并不是‘进化’,而是强调了外部力量(人为选择)对生物多样性的影响”,徐沛博士最后总结说。

(来源:中国网)