

辣椒带柄子叶由叶状体实现离体再生

臧 顺, 蔡 霞

(西南大学 园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘 要:以“黔椒四号”辣椒带柄子叶为外植体, 采用正交实验设计研究了辣椒离体培养中带柄子叶外植体叶状体的发生以及进一步获得伸长芽进而获得再生植株的方法。结果表明:BA、IAA 和 AgNO_3 均显著影响带柄子叶的分化, 其影响作用大小依次为:BA> AgNO_3 >IAA, 最佳分化培养基为 MS+BA 6.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L+ AgNO_3 6.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, 分化率为 82%; 而叶状体在 MS/MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+ GA_3 (0、1、2、3 mg/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 培养基培养 4 周可得到伸长的芽; GA_3 是获得伸长芽不可缺少的添加物质, 其浓度(1、2、3 mg/L)显著影响平均伸长芽数, 对伸长率的影响达到了极显著水平;MB 和 MS 基础培养基对平均伸长芽数和伸长率无显著影响, 但 MB 基础培养基有利于获得更多健壮的伸长芽。MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+ GA_3 2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 最适宜获得伸长芽, 伸长率为 36%, 获得的伸长芽容易生根形成再生植株。

关键词:辣椒;带柄子叶;叶状体;伸长芽;正交实验

中图分类号:S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0122-05

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*)植物, 起源于南美北部热带地区, 广泛种植于亚热带和温带地区, 是一种重要的蔬菜作物。辣

椒果实富含维生素, 营养价值高, 果实中的辣椒素则具有很高的药用价值。辣椒在中国的种植面积居蔬菜作物第 2 位, 有着重要的社会和经济意义。

第一作者简介:臧顺(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜学。
E-mail:317067358@qq.com.
收稿日期:2013-09-06

辣椒的产量和品质受环境胁迫、病虫害等威胁严重。仅仅依靠传统的方法, 育种周期较长, 而且辣椒的遗传背景相对狭窄, 难以获得具有较强适应性和抗性的

SCAR Marker and Application of Resistant Gene Ty-3 of Tomato Yellowing Leaf Virus

DONG Pan-pan¹, ZHAO Mei-ai^{2,3,4}, GUAN Cong², WANG Fu¹, WANG Hui¹

(1. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 2. College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 3. Qingdao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, Qingdao, Shandong 266109; 4. Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Taking 49 tomatoes as materials, 5 resistant homozygous lines (Ty-3/Ty-3) and 5 homozygous susceptible lines (ty-3/ty-3) were amplified by specific primers. 25 generations self-lines and 14 F₁ hybrids were amplified using this marker, at the same time these lines were well validated in the field by nature infection. The results showed that the resistant homozygous lines produced about 630 bp PCR fragment, the susceptible genotypes could produce fragment about 320 bp. This marker could distinguish resistant and susceptible lines, and it was a co-dominant marker tightly linked to Ty-3 gene. Among 25 generations self-lines, the genotype of 4 generations self-lines were Ty-3/Ty-3, 7 were Ty-3/ty-3 and 14 were ty-3/ty-3. 14 F₁ hybrids were amplified by Ty-3 primer, the genotype of 4 F₁ hybrids were Ty-3/Ty-3, 5 were Ty-3/ty-3 and 5 F₁ hybrids didn't contain Ty-3 gene. These lines were well validated in the field by nature infection and the disease incidence was 78.6% coincident with the result of PCR method. In the TYLCV resistance breeding, PCR was a rapid screening method to improve breeding efficiency.

Key words: TYLCV; SCAR; Ty-3; seedling identification; field identification

辣椒新品种。而利用遗传转化技术改良植物性状,进行新品种培育,可以跨越物种间的障碍,整合基因的目的明确,针对性强,具有较高的研究和应用价值。通过离体培养实现植株再生是遗传转化的先决条件。辣椒属于再生顽拗型植物,同马铃薯、番茄、烟草、矮牵牛等其它茄科植物相比,其离体再生相对困难。辣椒离体培养中,外植体常常分化为叶状体难以获得适宜生根的伸长芽,不能形成完整植株,难以建成优良的离体再生体系,进而影响辣椒遗传转化的研究。

辣椒离体培养通常在培养基中添加 BA 和 IAA 来促进不定芽的分化,且 BA 用量在 3.0~6.0 mg/L, IAA 用量小于 1.0 mg/L 时对分化辣椒不定芽的效果最好^[1-3],而 AgNO₃ 能抑制培养物产生有害物质,改变极性分化现象和促进芽分化,分化培养基中添加 AgNO₃ 有利于防止外植体褐变,提高不定芽的分化率,其用量一般在 0~10 mg/L^[4-5]。

该试验结合正交实验以及数据处理分析方法研究了辣椒离体培养中带柄子叶外植体叶状体的发生以及进一步获得伸长芽进而获得再生植株的方法,以期为建立良好的辣椒离体再生体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试辣椒“黔椒四号”由贵州省园艺研究所选育。

培养基:基本培养基:MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8; 分化培养基:MS+BA (4.0、5.0、6.0 mg/L)+IAA (0.5、0.8、1.0) mg/L+AgNO₃ (2.0、4.0、6.0 mg/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8; 伸长芽获得培养基:MS/MB+BA 6 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA₃ (0、1、2、3 mg/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8(MB:MS 培养基无机成分+B₅ 培养基有机成分);生根培养基:1/2MS+IAA 0.2 mg/L+IAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8。

培养室培养条件:温度 25℃,光周期 16 h/8h,光照强度 2 000 lx。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取颗粒饱满的种子在 75%酒精中浸泡 30~60 s,再用有效氯 1%的次氯酸钠溶液浸泡 20 min,然后用无菌水漂洗 3~4 次,播于 BM 培养基,置于培养室培养,12~16 d 后可获得无菌苗。

1.2.2 外植体的制备 播种 12~16 d 的无菌苗,选取充分展开颜色鲜绿的子叶(此时子叶柄长 0.5~0.8 cm),在近叶尖 1/3~1/2 处剪除叶尖,从叶柄处剪下留取 0.05~0.10 cm 的叶柄,即为带柄子叶外植体。

1.2.3 外植体分化诱导 对带柄子叶外植体在添加 BA (4.0、5.0、6.0 mg/L)、IAA (0.5、0.8、1.0 mg/L) 和

AgNO₃ (2.0、4.0、6.0 mg/L) 的培养基上分化诱导,选用 L₉ (3⁴) 正交表^[6],采用 3 因素 3 水平正交实验设计,试验处理见表 1,根据正交实验的数据处理分析方法,研究 3 种添加物对带柄子叶分化的影响并分析最佳添加物组合,若得出的最佳添加物质组合不在正交表设计的添加物质组合中,则以正交设计中分化率最高的添加物质组合与分析得出的最佳激素组合做验证试验。将带柄子叶外植体接种于分化培养基上。带柄子叶外植体正面朝上,平整贴在培养基表面,使切口尽可能接触培养基。每个处理设 3 次重复,每次重复接种 20 个外植体。接种后置于培养室培养,每周观察 1 次,培养 4 周后统计产生叶状体愈伤组织复合体(以下简称叶状体)的外植体数。

1.2.4 伸长芽的获得 将叶状体切下保留基部的部分愈伤组织,接种于伸长芽获得培养基上置于培养室培养。每周观察 1 次,培养 3 周后统计产生伸长芽的外植体数和伸长芽数。

1.2.5 生根培养 选取生长健壮,具有 2~3 个节的芽从基部切下保留部分愈伤组织接种于 RM 培养基上置于培养室培养,培养 3 周后观察生根情况。

1.3 数据分析

采用 DPS 专业版 9.05 对试验结果进行极差分析或方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对外植体分化的影响

带柄子叶在不同的分化培养基上 2 周的状况大体相同。培养 1 周左右,子叶纵向成拱桥状弓起,两端切口朝下,横向则以主脉为轴两边向上弓起呈槽状。中间切口处呈现黄绿色,子叶柄切口处有黄绿色突起,此时愈伤组织开始形成。培养 2 周左右,子叶中段切口和子叶柄切口处出现明显的黄绿色愈伤组织。而在培养 3 周左右,有外植体在子叶柄切口处分化出绿色的叶状体,子叶中段切口处愈伤进一步膨大。培养 4 周左右,子叶柄切口出叶状体更加明显(分化率最高可达 82%),子叶中段切口处大部分为愈伤(图 1),部分外植体子叶中段切口处也可分化为叶状体。

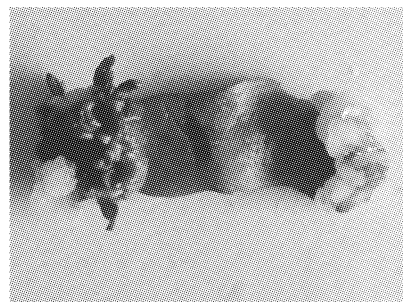


图 1 带柄子叶外植体分化出叶状体

Fig. 1 Rosette gained from cotyledon explants

由表 1 和表 2 可知,正交设计中分化率最高(60%)的添加物组合是 BA 5.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L + AgNO₃ 2.0 mg/L,根据正交实验数据极差分析,因素 BA、IAA、AgNO₃ 对分化率的影响极差 BA > AgNO₃ > IAA,并且 BA、AgNO₃、IAA 显著影响带柄子叶的分化率。最佳添加物质组合为 BA 6.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L + AgNO₃ 6.0 mg/L。由于最佳添加物质组合不在以正交表设计的添加物质组合中,验证试验得出 BA 6.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L + AgNO₃ 6.0 mg/L 添加物质组合时辣椒带柄子叶外植体的分化率为 82%,得出其为最佳添加物质组合^[6]。

表 1 带柄子叶外植体分化的正交实验结果

Table 1 Orthogonal experiment results of cotyledon explants differentiation

编号 No.	添加物 Additives/mg · L ⁻¹				分化率 Differentiation rates/%
	BA	IAA	AgNO ₃	空白 Null	
1	4.0	0.5	2.0	1	0.0
2	4.0	0.8	4.0	2	8.3
3	4.0	1.0	6.0	3	13.3
4	5.0	0.5	4.0	3	10.0
5	5.0	0.8	6.0	1	50.0
6	5.0	1.0	2.0	2	60.0
7	6.0	0.5	6.0	2	53.3
8	6.0	0.8	2.0	3	31.7
9	6.0	1.0	4.0	1	43.3
k1	21.7	63.3	92.0		
k2	120.0	90.0	61.7		
k3	128.3	116.7	116.7		
k1/3	7.2	21.1	30.7		
k2/3	40.0	30.0	20.6		
k3/3	42.8	38.9	38.9		
R	35.6	17.8	18.3		

2.2 伸长芽的获得

将在分化培养基上培养 4 周后产生的叶状体剪下作为外植体接种在伸长芽获得培养基上置于培养室培养。1 周左右叶状体膨大发展为叶丛,2 周左右开始出现叶、茎等器官,3 周后可得到伸长的芽(图 2)。

表 3

培养基对获得伸长芽的影响

Table 3

Influences of media on shoot elongation

编号 No.	培养基 Media	外植体数 Number of explants	有伸长芽的外植体数 Number of explants with elongated shoots	伸长芽数 Number of elongated shoots	伸长率 Elongation rates/%	平均伸长芽数 Average number of elongated shoots
1	MS+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L	44	0	0	0	0.00
2	MS+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA ₃ 1 mg/L	43	4	4	9	1.00
3	MS+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA ₃ 2 mg/L	48	19	26	40	1.37
4	MS+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA ₃ 3 mg/L	43	5	6	12	1.20
5	MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L	30	0	0	0	0.00
6	MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA ₃ 1 mg/L	35	6	7	17	1.17
7	MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA ₃ 2 mg/L	33	12	15	36	1.25
8	MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA ₃ 3 mg/L	33	4	4	12	1.00

注:伸长率=具有伸长芽的外植体数/接种外植体数×100%;平均伸长芽数=伸长的芽数/具有伸长芽的外植体数。

Note:Elongation rates=Number of explants with elongated shoots/Number of explants×100%;Average number of elongated shoots=Number of elongated shoots/Number of explants with elongated shoots.

表 2 带柄子叶外植体分化正交实验结果方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal experiment results of cotyledon explants differentiation

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F-Value	P 值 P-Value
BA	2 525.5095	2	1 224.4895	3.3279	0.2510
IAA	482.4515	2	240.9871	0.6609	0.6483
AgNO ₃	517.6349	2	278.9025	0.6975	0.6323
空白 null	797.5852	2	386.2711		
误差 Error	766.4710	2	383.2355		
总和 Total	4 108.3761				

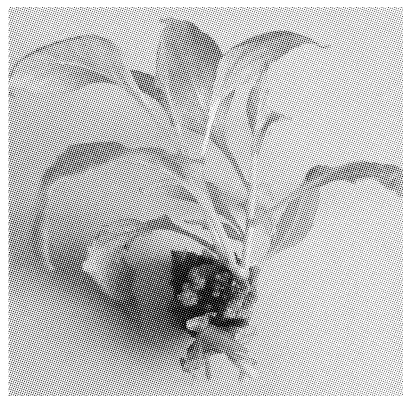


图 2 由叶状体获得的伸长芽

Fig. 2 Elongated shoots gained from rosettes

由表 3、4 可以看出,伸长培养基中添加 6 mg/L 的 BA 与 0.5 mg/L 的 IAA 时,基础培养基 MB 与 MS 在伸长率和平均伸长芽数上无显著差异。但试验中发现,MB 基础培养基上得到更多健壮的伸长芽。由表 5 可以看出,GA₃ 添加与否以及添加浓度对获得伸长芽至关重要。不添加 GA₃ 不能得到伸长的芽,添加 1 mg/L 和 3 mg/L 的 GA₃ 伸长率和平均伸长芽数无显著差异。添加 2 mg/L GA₃ 与其它处理比较,伸长率极显著提高(显著水平 1%)但平均伸长芽数无显著差异。伸长芽部分生长瘦弱,接种在基本培养基上,培养室中培养 10~15 d 也能使其生长健壮,适宜生根。

表 4 基础培养基和赤霉素对获得伸长芽的影响试验方差分析

Table 4 Variance analysis of the influences of basal media and GA₃ on shoot elongation

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F-Value	P-Value
基础培养基 Basal media	2.5918	1	2.5918	0.3255	0.6143
GA ₃ 浓度 Concentration of GA ₃ /mg · L ⁻¹	1 522.8815	3	489.2209	61.4575	0.0037
误差 Error	25.7738	3	8.5114		
总变异 Total	1 500.3884	7			

表 5 赤霉素浓度对获得伸长芽的影响差异显著性

Table 5 Difference significance of the influences of GA₃ concentration on shoot elongation

GA ₃ 浓度	伸长率	平均伸长芽数
Concentration of GA ₃	Elongation rates	Average number of
/mg · L ⁻¹	/ %	elongated shoots
0	0.0000C	0.0000b
1	12.9089B	1.1837a
2	39.8133A	1.4183a
3	12.7800B	1.2067a

2.3 生根培养

选取生长健壮的伸长芽接种在生根培养基上培养 3 周左右可以生根,获得再生植株(图 3)。

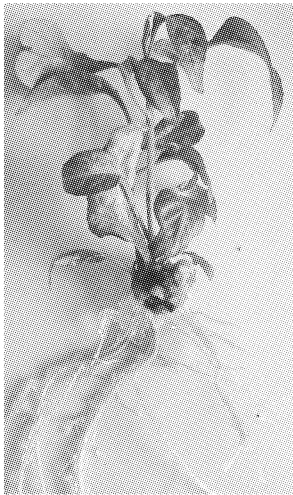


图 3 伸长的芽生根

Fig. 3 Roots gained from elongated shoot

3 讨论

一般认为 10~16 d 苗龄的子叶是较适宜器官发生的外植体,其分化率较下胚轴高^[7]。采用子叶外植体时,前人多将子叶块^[8-11]或者去叶尖子叶^[4]作为起始外植体。该试验采用带柄子叶为外植体,发现反面朝上放在培养基上时,子叶柄切口处容易产生愈伤和生根,而正面朝上放在培养基上时子叶柄切口处易分化为叶状体,并且比叶中段切口处易分化为叶状体,但是在分化率高的培养基上子叶中段切口也能分化为叶状体。外植体放置方法不同以及外植体切口位置不同导致分化能力不同,可能有 2 种原因,一是放置方法不同导致外植体切口与培养基接触面积不同;二是外植体切口处内

源分裂素和生长素的含量和比例不同导致分化能力不同^[12-13]。张宗江等^[13]指出叶状体是子叶组织的延伸不能形成正常的芽,但该试验中带柄子叶外植体产生的叶状体在伸长培养基上能获得伸长的正常芽,即便产生瘦弱的伸长芽,经过加入蔗糖的 MS 培养基培养后也能使其健壮为适宜生根的芽,该试验也发现, B₅ 培养基的有机成分替换 MS 培养基的有机成分不能显著提高伸长率和平均伸长芽数,但有利于获得更多健壮伸长芽,与黎定军等^[4]的研究结果一致。由此得出添加物种类和浓度适宜时,叶状体具备产生伸长芽的能力,而伸长芽的生长状况除跟添加物有关,还可能与培养基的有机营养有关。

辣椒离体培养中 BA、IAA、TDZ 等生长调节剂以及其它附加物 AgNO₃、PJ(辣椒汁液提取物)、DJ、LC(主要为豚类植物细胞分裂素)等都能影响外植体的分化^[4,8,14-16],培养基优化筛选时若对不同添加物种类和浓度组合根据排列组合原理做全面试验则试验次数多,不经济。根据正交实验原理及正交表对培养基不同添加物种类和浓度进行正交实验,不仅能减少试验量、方便试验结果处理,还能有利于掌握试验对象之间的内在关系。前人已经利用正交实验优化辣椒幼叶愈伤组织分化、花药愈伤组织和胚状体的诱导生长调节物质组合^[17-18]。该试验采用正交实验研究培养基中不同添加物质对带柄子叶外植体分化的影响,通过对正交实验结果的分析验证试验,找出了最适合带柄子叶外植体分化的添加物质组合,并且 BA 对分化率的影响作用最大,AgNO₃ 次之,IAA 对外植体分化影响最小,并且 3 种添加物对外植体分化都有显著影响。余小林等^[19]指出 BA 是诱导辣椒子叶不定芽分化的主要因素,不少研究者也指出 AgNO₃ 在一定程度上促进不定芽的分化,该试验与其研究结果基本一致^[1,19-20]。

在获得伸长芽的试验中发现,IAA 的浓度为 1 mg/L 时得到的伸长芽畸形,茎生长快、叶卷曲甚至成枝状,推测是 IAA 浓度过高致使叶状体生长素积累所致。前人研究中芽伸长时 BA 浓度降低为 3 mg/L 为宜^[4,19],而该试验 BA 的浓度为 3 mg/L 时得到的伸长芽深绿有并蒂现象,BA 用 6 mg/L 得到的伸长芽鲜绿、健壮,这与前人的研究结果不一致,可能是因为试验材料基因型不同以及其它添加物不同与 BA 相互作用不同。GA₃ 在芽伸

长中不可或缺^[4],且浓度过低伸长效果不明显,浓度过高伸长率也下降,使叶状体发展为叶丛。该试验发现 B₅ 培养基有机成分对伸长率和平均伸长芽数无明显的促进作用,但却有利于获得更多健壮的伸长芽,与前人的研究结果类似。试验也发现及时切割分离叶丛或者膨大的叶状体也有利于获得更多的伸长芽,这可能与叶丛的通气、光照状况有关^[21]。

参考文献

- [1] Grozeva S, Rodeva V, Todorova V. *In vitro* shoot organogenesis in bulgarian sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties[J]. Electronic Journal of Biology, 2012, 8(3): 39-44.
- [2] Vinod K B, Sumita K, Kothari S L. Phloroglucinol mediated shoot bud elongation in *Capsicum annuum* L[J]. Natl Acad Sci Lett, 2012, 35(4): 331-335.
- [3] 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.
- [4] 黎定军, 赵开军. 辣椒子叶高效植株再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2002(1): 25-29.
- [5] 张先云, 袁秀云, 马杰. 辣椒真叶离体培养及高效再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2009(7): 50-52.
- [6] 徐仲安, 王天保, 李常英, 等. 正交实验设计法简介[J]. 科技情报开发与经济, 2002, 12(5): 148-150.
- [7] Kothari S L, Joshi A, Kachhwaha S, et al. Chilli peppers-A review on tissue culture and transgenesis[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(1): 35-48.
- [8] 王洪霞, 郭尚敬. TDZ 对甜椒不定芽分化的影响[J]. 北方园艺, 2012(3): 104-106.
- [9] 王达新, 王健华, 刘志昕. 黄灯笼辣椒组织培养研究[J]. 广西热带农业, 2009(6): 4-7.
- [10] 徐健, 刘清波, 宋卓, 等. 长辣七号辣椒愈伤组织诱导影响因素研究[J]. 现代农业科技, 2012(4): 77-79.
- [11] 王海秀, 李敏, 贾立新, 等. 辣椒高效再生体系研究[J]. 中国园艺文摘, 2011(9): 15-16.
- [12] Zhang Y F, Zhou J H, Wu T, et al. Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 93: 323-331.
- [13] 张宗江, 江倩云. 黄瓜花叶病毒壳蛋白基因转化辣椒及其在转基因植株后代的表达[J]. 华北农学报, 1994, 9(3): 67-71.
- [14] 李长福, 张守鸿, 葛正龙, 等. 转基因辣椒离体子叶再生研究[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(5): 8-11.
- [15] 黄真池, 李飞凤, 曾骥, 等. 辣椒子叶高效再生体系的建立[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2007, 20(1): 13-18.
- [16] Khan H, Siddique I, Anis M, et al. *In vitro* organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annuum* L[J]. Plant Biochem Biotechnol, 2011, 20(1): 84-89.
- [17] 尚宏芹. 正交设计优化彩色辣椒离体再生条件的研究[J]. 生物技术, 2010(4): 48-50.
- [18] Zhao J, Ou X X, Zhang Z Q, et al. Influences of carbon sources and plant growth regulators on anther culture efficiency of pepper[J]. Agriculture Science and Technology, 2010, 11(4): 102-105.
- [19] 余小林, 李乃坚. 辣椒子叶离体培养和植株再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2000, 27(1): 42-46.
- [20] Hu T Z, Hua Z, Chen Z G, et al. The optimization of regeneration tissue culture system of three chilli peppers cultivars based on the uniform design and the mathematical model equation[J]. Acta Biologica Hungarica, 2012, 63(3): 372-388.
- [21] Mohamed M H, Alsadon A A. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*[J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(2): 370-374.

In vitro Regeneration of Pepper via Rosettes from Cotyledons with Petioles

ZANG Shun, CAI Xia

(Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Key Laboratory of Olericulture, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract: Cotyledons with petioles of 'Qianjiao No. 4' pepper (*Capsicum annuum*) were used as explants which differentiated into rosettes. The influences of BA, IAA and AgNO₃ on cotyledon explants differentiation were tested according orthogonal experiment design. The results showed that the influences of BA, IAA and AgNO₃ on explants differentiation were significant at 5% level and ranked as BA > AgNO₃ > IAA. MS+BA 6.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L+AgNO₃ 6.0 mg/L+sugar 30 g/L+agar 7 g/L was chosen as the best medium for cotyledon explants differentiation with differentiation rate as 82%. After four weeks culture on MS/MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA₃ (0, 1, 2, 3 mg/L)+sugar 30 g/L+agar 7 g/L, the elongated shoots from rosettes were obtained on elongation media. GA₃ was indispensable for obtainment of elongated shoots, and its concentration (1, 2, 3 mg/L) affected the elongation rates at 1% level and affected the average number of elongated shoots at 5% level. The MB basal medium was not better than MS basal medium at the elongation rate and the average number of elongated shoots. But the MB basal medium gave more well-grown shoots than the MS basal medium. MB+BA 6.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA₃ 2 mg/L+sugar 30 g/L+agar 7 g/L was chosen as the best elongation medium with elongation rate as 36%. On rooting medium, the elongated shoots rooted well and developed into plants.

Key words: pepper; cotyledons with petioles; rosettes; elongated shoots; orthogonal experiment