

# 朝天椒子叶离体培养与植株再生体系的建立

李 伟<sup>1</sup>, 敖艳飞<sup>1</sup>, 何文超<sup>2</sup>, 杨增杰<sup>1</sup>, 赵利平<sup>1</sup>

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 玉屏县农牧科技局, 贵州 玉屏 554000)

**摘 要:**以贵州黎平朝天椒地方种为试材, 取其无菌苗子叶作外植体, 采用植物固体培养基组织培养法, 研究了培养基激素配比、无菌苗生理年龄、子叶部位等对朝天椒子叶的离体接种、诱导愈伤、不定芽分化、芽茎伸长、诱导生根、驯化移栽、成苗等离体培养及植株再生阶段的影响。结果表明:朝天椒子叶适宜芽诱导分化的培养基为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 芽分化率达 100%; 适宜芽伸长的培养基为 MS+KT 2 mg/L, 芽伸长率可达 50%; 适宜生根的培养基为 MS 无激素培养基, 生根率可达 44%。单个外植体平均分化含 15~18 个不定芽的芽丛(14~16 个芽茎), 出苗 6~7 株。从子叶外植体接种至再生苗出瓶需 50~55 d, 再生苗移栽成活率达 98%。该研究构建了贵州朝天椒的高效离体培养植株再生体系, 为朝天椒的组织快繁和遗传转化奠定了重要的基础。

**关键词:**朝天椒; 子叶; 激素配比; 离体培养; 植株再生

**中图分类号:**S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0091-07

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是一种重要的茄科蔬菜作物。我国辣椒播种面积约  $1.6 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>, 仅次于大白菜, 年总产量  $3.14 \times 10^7$  t, 经济总产值 1 000 亿元以上, 居蔬菜首位。辣椒已成为我国许多地区及省市县的重要经济支柱作物。辣椒产业的可持续、健康发展, 得益于辣椒脱毒快繁、杂种优势固定、种质保存利用及新品种选育等方面的重要保障, 而辣椒组织培养再生体系的建立, 有利于以上工作的开展<sup>[1]</sup>, 也有助于后期的遗传转化、基因转移工作, 进而通过细胞工程、基因工程等遗传改良技术培育辣椒新品种。目前, 关于辣椒离体培养与植株再生的研究报道已有不少, 但与马铃薯、番茄相比, 其芽诱导分化率与植株再生频率偏低, 遗传转化仍难以实现<sup>[2]</sup>。其中, 辣椒不定芽难以伸长的的问题较为突出<sup>[3-4]</sup>, 甚至仅停留在芽诱导阶段而不能进一步生长。同时, 还存在基因型依赖性强、再生周期长等问题。

国内外对辣椒组织培养的研究主要集中在品种基因型<sup>[5-9]</sup>、培养基配方<sup>[3,10-15]</sup>与外植体类型等方面。外植体类型主要有子叶<sup>[16-20]</sup>、带柄子叶<sup>[21-22]</sup>、茎尖<sup>[23-25]</sup>、叶片<sup>[3,26-27]</sup>、下胚轴<sup>[28-31]</sup>、腋芽<sup>[32]</sup>、组培苗茎段<sup>[33]</sup>、根段<sup>[34-35]</sup>、子叶原生质体<sup>[17]</sup>、半粒种子<sup>[8]</sup>等。

全国干椒栽培面积中朝天椒已跃居首位。随着国

外大量朝天椒品种的涌入与种植, 使得一些朝天椒地方种质正在加速流失、消亡。面对朝天椒品种退化严重的生产实际, 可通过组培快速挽救、保存、改良品种。目前, 关于朝天椒组培的报道极少, 李明军等<sup>[28]</sup>以朝天椒下胚轴为外植体, 进行组培获得再生苗。该研究以贵州朝天椒子叶为外植体, 通过选取不同苗龄子叶、子叶不同部位及不同培养基配方来筛选、建立朝天椒的离体高效再生体系, 以期种质保存利用等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以贵州黎平朝天椒地方种为试材, 种子采自 2012 年自交留种地。

### 1.2 试验方法

试验于 2012 年 8 月至 2013 年 10 月在贵州大学南校区农学院园艺系实验室进行, 再生苗驯化后种植在南校区蔬菜园实验场。

**1.2.1 无菌苗外植体的制备** 典型、饱满、色泽鲜亮、无霉、无病虫朝天椒种子, 投入 50~55℃ 热水中浸种 10~15 min, 不断搅动, 补充热水维持此水温, 之后自然摆放降至室温, 继续浸泡 8~10 h 后, 用清水洗净种皮上粘液。转入超净工作台, 以 70%~75% 酒精对种子消毒 30 s, 后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 表面灭菌 8 min, 再用无菌水冲洗 5~6 次。同步准备好容量 150 mL 三角瓶, 向其内倒入约 25 mL MS 培养基(附加 3% 蔗糖、0.75% 琼脂, pH 调至 5.8), 放入灭菌锅内 123℃ (0.12 MPa) 下消毒 20 min, 取出冷却, 室温下放置 3~4 d, 未长菌斑瓶即可

**第一作者简介:**李伟(1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为蔬菜学教研工作。E-mail:liw21@163.com.

**基金项目:**贵州大学人才基金资助项目(贵大人基合字(2007)021号);贵州省农业攻关资助项目(黔科合 NY[2013]3024 号)。

**收稿日期:**2014-07-14

备用。将上述处理好种子无菌操作接种到三角瓶内培养基上,每瓶接种 5 粒,瓶口用封口膜密封,最后置入光照培养箱内(光照强度 2 500 lx、光照时间 12 h/d、光培养温度(25±1)℃、暗培养温度(20±1)℃)进行培养。约 20 d 大部分已萌生,待无菌苗长至 5 cm(约 40 d)时,剪取其子叶作外植体。

**1.2.2 不定芽的诱导分化** 将无菌苗子叶切成 3 mm×(3~5) mm 小块,外植体切口应尽量平整,每个三角瓶接种 4 块,每个处理接种 4 瓶,4 次重复,接种于 10 种不同配比芽诱导分化培养基(表 1),培养条件同 1.2.1,期间进行 1 次愈伤组织的继代转接,诱导分化培养阶段,观察、记载接种外植体形成愈伤组织、发生不定芽等情况,计算愈伤组织诱导率、芽分化率,筛选出最适芽诱导分化培养基。

**1.2.3 不定芽的茎伸长** 将表 1 中最适芽诱导分化培养基所诱导分化出的丛生芽切成 3 mm×(3~5) mm 切块,每个切块约含 3~5 个芽片,无菌接种到 4 种芽伸长培养基(表 2)上继续培养,培养条件同 1.2.1,每 15 d 换瓶继代,生长 30 d 时进行统计。继代培养阶段,观察、记载不定芽茎伸长情况,计算不定芽茎伸长率,筛选最适不定芽伸长培养基。

**1.2.4 小苗的生根与移栽** 待表 2 中最适芽伸长培养基上芽茎伸长至 2~3 cm 时,将其自基部切下,移至 2 种生根培养基(表 4)上进行培养,培养条件同 1.2.1,每 15 d 换瓶继代,生根培养阶段,观察、记载长根情况,计算生根率。筛选利于根诱导的生根培养基。长根再生小苗开瓶练苗 2 d 后,假植于营养钵内,内装含水量 60%营养土(泥炭土:珍珠岩=3:1),盖塑料薄膜保湿 7 d 逐步放风揭膜,继续培养 15 d 后移栽大田,正常栽培管理直至开花结果。

**1.2.5 适宜苗龄及子叶部位外植体的筛选** 以苗龄分别为 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 无菌苗子叶为试材,选择、剪取子叶中部、子叶边缘、带柄子叶 3 种外植体,无菌接种于表 1 中最适芽诱导分化培养基上。培养条件同 1.2.1,诱导分化期 30 d,筛选出子叶外植体的最适苗龄及适宜子叶部位。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对不定芽诱导与分化的影响

从外部形态上看,1~4 号培养基的愈伤组织由致密小颗粒软愈伤组织构成,1、2、3 号愈伤组织为白色(图 1),4 号愈伤组织为淡黄色,质地疏松,外表比较匀质,中等大小,生长较慢,培养 15 d 后开始形成绿色芽点(图 2),培养 30 d 后分化形成短缩不定芽,但数量很少,平均每个外植体分化 2~3 个不定芽;7 号形成白色愈伤组织后,培养 10 d 开始形成绿色芽点,培养 20 d 后分化形成短缩不定芽,聚生呈芽丛状,分化率 100%,平均每

个能分化 15~18 个不定芽;5、6、10 号愈伤组织为淡黄色,8、9 号为浅绿色,愈伤组织较小,生长缓慢,培养 30 d 后分化形成短缩不定芽,平均每个愈伤组织分化 4~5 个不定芽(图 3)。

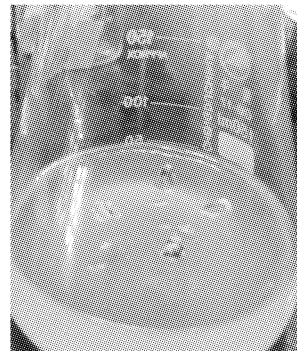


图 1 子叶块产生愈伤组织(接种后 7 d)

Fig. 1 Production of callus from cotyledon piece (7 days after inoculated)



图 2 愈伤组织分化出不定芽(接种后 15 d)

Fig. 2 Adventitious buds differentiated from callus (15 days after inoculated)



图 3 不定芽形成芽丛

Fig. 3 Production of clustered buds from adventitious bud

子叶外植体接种在不同培养基上,反应不同,芽诱导、分化效果存在明显差异。由表 1 可知,处理 1 芽分化率为 30.0%,处理 7 芽分化率最高达 100%,不定芽生长势最好。处理 2~6 芽分化率介于二者之间,不难发现,

从处理 1 到处理 7,随着 6-BA 浓度的增大与 NAA 浓度的减小,即随 6-BA/NAA 浓度比值的增大,子叶外植体经愈伤诱导分化出不定芽的频率呈增大趋势。而 IAA

与 6-BA 组合中,较高 IAA 浓度、添加  $\text{AgNO}_3$  的处理 9 芽分化率较处理 8 高出 18.3 百分点。MS 中仅配入 ZT 的处理 10 芽分化率为 50.0%。

表 1 不同培养基配比下子叶诱导愈伤、分化不定芽的差异

Table 1 Differences on callus induction and adventitious bud differentiation under different proportioning media

处理 Treatment	MS+生长调节剂组合 MS+Combinations of growth regulators/(mg·L <sup>-1</sup> )					子叶外植体数 Number of cotyledon explant/个	愈伤组织数 Number of callus/个	愈伤组织诱导率 Percent of callus induction/%	分化外植体数 Number of differentiated explant/个	不定芽丛分化率 Percent of adventitious buds differentiation/%
	NAA	IAA	6-BA	ZT	$\text{AgNO}_3$					
1	2.0	0	0.1	0	0	60	58	96.7	18	30.0
2	2.0	0	0.5	0	0	60	60	100	25	41.7
3	2.0	0	1.0	0	0	60	10	16.7	30	50.0
4	2.0	0	2.0	0	0	60	45	75.0	45	75.0
5	1.0	0	2.0	0	0	60	36	60.0	36	60.0
6	0.5	0	2.0	0	0	60	40	66.7	40	66.7
7	0.1	0	2.0	0	0	60	60	100	60	100
8	0	0.3	5.0	0	0	60	40	66.7	40	66.7
9	0	0.6	5.0	0	5.0	60	35	58.3	51	85.0
10	0	0	0	2.0	0	60	30	50.0	30	50.0

## 2.2 不同培养基对不定芽茎伸长的影响

由表 2 可知,伸长培养基中加入 1 种生长调节剂时,处理 2 丛生芽切块芽茎分化伸长率高于处理 1。处理 2 芽茎伸长率也高于处理 3、4。不难发现,处理 3、4 配方中也含有 KT,加入 NAA 后,表现出抑制芽茎分化伸长的趋势,而处理 4 中加入  $\text{PP}_{333}$  后抑制程度有所减轻。单个丛生芽切块伸长芽茎比率也反映出以上变化趋势。

结合表 2 分析表 3 可知,处理 2 所产生的不定芽茎伸长数最多达 55 个,伸长效果最明显,其高大于 1 cm 的芽茎占到 58%,而处理 3 的芽茎伸长数仅为 4 个(图 4)。

## 2.3 不同培养基对芽茎生根的影响

将伸长芽茎自基部剪断,转置生根培养基中培养(图 5),2 种生根培养基中芽茎的生根效果不同。由表 4

可以看出,处理 1 MS 培养基中的芽茎生根率高于处理 2 (MS+KT 2 mg/L+NAA 0.02 mg/L)。



图 4 丛生芽切块不定芽伸长分化

Fig. 4 Elongation and differentiation of adventitious bud from clustered buds piece

表 2 不同培养基配比下丛生芽切块不定芽伸长分化率的差异

Table 2 Differences on percentage of adventitious bud differentiation and elongation from clustered buds piece under different proportioning media

处理 Treatment	MS+生长调节剂组合 MS+Combinations of growth regulators/(mg·L <sup>-1</sup> )				丛生芽切块外植体数 Number of clustered buds piece explant /个	分化外植体数 Number of differentiated explant/个	芽块伸长分化率 Percent of buds piece differentiation /%	不定芽茎伸长数 Number of adventitious bud elongation/个	单个丛生芽切块伸长芽茎比率 Percent of elongated single bud from one clustered buds piece/%
	KT	NAA	6-BA	$\text{PP}_{333}$					
1	0	0	2	0	60	15	25	18	120
2	2	0	0	0	60	30	50	55	183
3	2	0.02	0	0	60	6	10	4	66
4	2	0.02	0	0.1	60	18	30	22	122

表 3 不同培养基配比下丛生芽切块不定芽伸长度的差异

Table 3 Differences on length of elongated adventitious bud from clustered buds piece under different proportioning media

处理 Treatment	MS+生长调节剂组合 MS+Combinations of growth regulators/(mg·L <sup>-1</sup> )				不定芽茎伸长数 Number of adventitious bud elongation/个			芽茎高 Height of elongated bud/cm			
	KT	NAA	6-BA	$\text{PP}_{333}$	bud elongation/个	$h>3$ /个	%	$1<h\leq 3$ /个	%	$h\leq 1$ /个	%
1	0	0	2	0	18	3	17	7	39	8	44
2	2	0	0	0	55	8	14	24	44	23	42
3	2	0.02	0	0	4	1	25	2	50	1	25
4	2	0.02	0	0.1	22	4	18	9	41	9	41



表 4 不同培养基配比下芽茎生根率的差异

Table 4 Differences on percentage of root induction of elongated adventitious bud under different proportioning media

处理 Treatment	MS+生长调节剂组合 MS+Combinations of growth regulators/(mg·L <sup>-1</sup> )		芽茎外植体数 Number of elongated adventitious bud explant/个	生根外植体数 Number of rooted explant/个	生根率 Percent of root induction/%
	KT	NAA			
1	0	0	50	22	44
2	2	0.02	50	17	34



图 5 伸长芽茎诱导生根

Fig. 5 Root induction from elongated young stem with bud

2.4 练苗及移栽

试验表明,再生苗生长正常,无萎焉,无病虫害发生。移栽成活率约为 98%(图 6、7)。



图 6 形成完整再生苗

Fig. 6 Developed into regeneration seedling

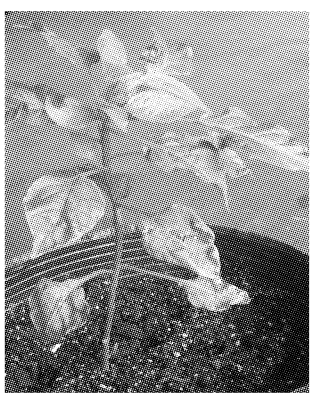


图 7 再生苗驯化后移栽

Fig. 7 Transplanted regeneration seedling after acclimatization

2.5 苗龄对子叶芽分化的影响

由表 5 可知,不同苗龄的朝天椒子叶外植体,其芽分化率差别较大,随着子叶外植体苗龄的增大,不定芽分化率呈先增大后减小的趋势。子叶诱导、分化能力以苗龄 14 d 最强,且能不经愈伤而直接诱导形成不定芽。

表 5 苗龄对子叶诱导、分化不定芽的影响

Table 5 Effect on cotyledon induction and adventitious bud differentiation and elongation by physiological ages of aseptic seedlings

苗龄 Physiological ages of aseptic seedlings/d	子叶外植体数 Number of cotyledon explant/个	分化外植体数 Number of differentiated explant/个	是否需经过愈伤阶段 Whether or not to be passed through the stage of callus induction	不定芽分化率 Percent of adventitious buds differentiation/%
4	30	0	是	0.0
6	30	2	是	6.7
8	30	6	是	20.0
10	30	9	是	30.0
12	30	23	否	76.7
14	30	24	否	80.0
16	30	22	否	73.3
18	30	16	是	53.3
20	30	10	是	33.3

2.6 子叶不同部位对芽分化的影响

从表 6 可以看出,子叶不同部位外植体的芽分化率存在差异。子叶中部的芽分化率最高,其次是带柄子叶,而子叶边缘最低。

表 6 子叶不同部位外植体的芽分化率差异

Table 6 Differences on percentage of adventitious bud differentiation and elongation by different parts of cotyledon

子叶部位(12 d 苗龄) Parts of cotyledon (12 days ages of aseptic seedlings)	子叶外植体数 Number of cotyledon explant/个	分化外植体数 Number of differentiated explant/个	不定芽分化率 Percent of adventitious buds differentiation/%
边缘	60	38	63.9
中部	60	47	77.6
带柄子叶	60	43	71.6

3 讨论

3.1 不同培养基与植株再生

NAA、IAA 都为人工合成的具有较低浓度促进生长,较高浓度抑制生长的两重性。前者为生长素类似物,后者为外源生长素。6-BA 为人工合成的细胞分裂素。该研究子叶愈伤组织一般最先在外植体两端切口或一端切口处形成,这与赵天红等<sup>[34]</sup>研究结果相似。该试验发现 IAA 与 6-BA 相配合可协同促进不定芽分化,这与辣椒品系 120<sup>[3]</sup>、印度辣椒品种 Umorok<sup>[36]</sup>的研究结

果类似。试验中以 6-BA/IAA 为 20:1 时,芽诱导分化频率最高(100%),这与 6-BA/IAA 为 10:1 高比值配比下利于辣椒外植体分化再生的现象<sup>[37]</sup>类似。含较高浓度细胞分裂素 6-BA 芽分化培养基有利于子叶外植体芽的分化,这与彩色辣椒<sup>[12]</sup>、羊角椒<sup>[13]</sup>子叶外植体不同芽分化培养基的研究结果类似。过高浓度生长素会抑制不定芽的形成,可能与生长素使愈伤组织细胞液泡化,组织进而衰老有关<sup>[5]</sup>。同样,6-BA/NAA 比值越大,越有利于芽的分化,这与 6-BA/NAA 为 14:1 高比值下 5 个辣椒品种平均芽分化率最高(75%)的研究<sup>[11]</sup>结果相似。6-BA 对子叶外植体不定芽的产生具有强烈的诱导作用,其诱导效果好于 ZT、KT<sup>[38-39]</sup>。当 6-BA 浓度降低时,子叶外植体产生大量愈伤组织,虽然这种愈伤组织也可在以后的培养过程中再度出现芽的分化,但分化频率降低。

9 号培养基因添加 5 mg/L AgNO<sub>3</sub>,使其芽分化率高于 8 号,这与培养基中添加 4 mg/L AgNO<sub>3</sub> 使 8 个辣椒品种子叶平均芽分化率提高 41.3%<sup>[29]</sup>、同样浓度 AgNO<sub>3</sub> 使 9 个辣椒品种芽分化率平均提高 20%~30%<sup>[30]</sup> 研究结果类似。培养基中添加适量 AgNO<sub>3</sub> 可明显促进外植体的分化<sup>[40]</sup>,Batista 等<sup>[41]</sup>认为愈伤组织的分化受到乙烯阻碍。AgNO<sub>3</sub> 是一种乙烯抑制剂,加入后可提高多胺类合成,来间接消减乙烯,促进芽分化<sup>[42]</sup>。

辣椒组培过程中,短缩不定芽的伸长成为一项难题。该研究处理 2(MS+KT 2 mg/L)的丛生芽切块芽伸长率最高(50%),高于子叶外植体在 MS+6-BA 3 mg/L+GA<sub>3</sub> 3 mg/L 下最高不定芽伸长率(27.8%)<sup>[22]</sup>。辣椒不定芽难以诱导伸长,主要原因是由于其内源生长素水平较低,如离体培养时无外源生长素补充就会出现丛芽等,以致成苗率较低<sup>[43]</sup>。辣椒外植体不经愈伤组织而直接诱导成芽是目前辣椒离体再生的最好途径<sup>[44]</sup>。在之前有的研究中已得到证实,如辣椒子叶在培养基 MS+BA 8 mg/L+IAA 0.5 mg/L+3%蔗糖上培养 10~20 d 后,直接从子叶切口处出现许多绿色芽点,继而长成绿色小芽<sup>[25]</sup>。

### 3.2 不同外植体类型与诱导分化

多数辣(甜)椒组培试验表明,子叶作外植体时,可获得较高的芽诱导频率<sup>[9,45]</sup>,再经芽伸长、生根、驯化,移栽获得完整再生植株<sup>[6,12]</sup>。赵天红等<sup>[34]</sup>以“湘研 1 号”无菌苗子叶、茎尖、上胚轴和根段为外植体,研究不同培养基配方对组培的影响,结果表明 4 种外植体中,仅子叶、茎尖能经愈伤组织产生不定芽,并在 MS+BA 2 mg/L+IBA 1.5 mg/L 培养基配方下形成完整植株。瓦·古巴诺娃等<sup>[33]</sup>、周俊等<sup>[23]</sup>的研究也表明,以辣椒茎尖生长点为外植体进行组培,可获得脱毒再生苗。

一般认为辣椒子叶、茎尖、下胚轴产生不定芽的能

力强于上胚轴、真叶、根段,子叶的出芽诱导分化率高于下胚轴<sup>[16,19,29-30,46]</sup>、带柄子叶<sup>[22]</sup>。郝峥嵘等<sup>[25]</sup>研究认为,新疆辣椒主栽品种“四平头”茎尖外植体分化能力最强,子叶、下胚轴次其二、三,而真叶只能形成愈伤组织而无分化能力。但何晓明等<sup>[3]</sup>以叶片为外植体,获得了低频再生植株。唐亮等<sup>[1]</sup>研究也认为,茎尖外植体培养再生能力优于子叶。崔群香等<sup>[9]</sup>研究发现,苗尖(去子叶带少许下胚轴)作外植体较带柄子叶、下胚轴更利于芽分化与成苗。但茎尖外植体不如子叶外植体那样易于界定、取样,难以确定剥离部位,剥离生长点的大小、带叶原基数对生长点的诱导、分化成活有密切关系<sup>[33]</sup>,茎尖长度与成活率成正比,而与脱毒效果成反比<sup>[23]</sup>,云南小米椒以 1~1.5 mm 长的茎尖成苗脱毒率达 96.3%、再生成活率达 85.4%为宜<sup>[24]</sup>。

### 3.3 不同苗龄、子叶部位等与诱导分化

苗龄是辣椒子叶外植体形成不定芽的一个很重要的因素。新疆辣椒主栽品种“四平头”以其 10~14 d 的苗龄子叶出芽率最高<sup>[25]</sup>。沈火林等<sup>[16]</sup>研究认为辣椒 10~12 d 的苗龄子叶分化效果最好。姚明华等<sup>[7]</sup>研究表明苗龄 12 d 的辣椒子叶芽分化率最高。龙凤等<sup>[30]</sup>研究发现,苗龄 12~16 d 的子叶外植体不定芽分化频率最高。该研究表明朝天椒以 12~16 d 的苗龄子叶分化率高,尤以 14 d 的为最高,也证实了前人的研究结论。

陈静娴等<sup>[5]</sup>的研究表明,子叶中部的再生频率高于子叶叶缘。该试验的研究结果与此相同。姚明华等<sup>[7]</sup>研究发现,子叶中部组织的芽分化率高于带柄子叶。该试验从子叶外植体接种至再生苗出瓶需 50~55 d,较保加利亚尖椒子叶离体培养体系<sup>[14]</sup>获得再生植株的天数还短 5~10 d。

### 参考文献

- [1] 唐亮,陈沁,邓志瑞,等.辣椒茎尖离体培养及植株再生[J].上海大学学报(自然科学版),2004,10(5):497-502.
- [2] 曾华,胡宗利,陈国平,等.辣椒离体再生及遗传转化研究进展[J].生命科学研究,2011,15(6):542-549.
- [3] 何晓明,王鸣,王喆之.辣椒子叶离体培养与植株再生[J].西北农业大学学报,1996,24(1):93-96.
- [4] Elwan M W M. *In vitro* shoot regeneration, elongation and rooting of pepper (*Capsicum annuum* L.) I: Shoot regeneration as affected by PGR and explant type[C]. 4<sup>th</sup> Conference on Recent Technologies in Agriculture, 2009: 564-576.
- [5] 陈静娴,聂凡.辣椒子叶培养及其植株再生的研究[J].安徽农业科学,1990,30(3):255-257.
- [6] 张子君,徐矿红,田云.辣椒子叶离体培养及植株再生[J].辽宁农业科学,2001,42(6):44-45.
- [7] 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.
- [8] 曹亚从,张正海,王立浩,等.辣椒不同外植体处理方法对组织培养再生的影响[J].中国蔬菜,2012,32(8):32-39.
- [9] 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]. 金陵科技学院学报, 2005, 21(1): 78-81.

[10] Gunay A L, Rao P S. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*capsicum*) [J]. Plant Science Letters, 1978, 11: 365-372.

[11] 周雪飞, 刘春松, 唐茂菊, 等. 辣椒子叶组织培养[J]. 长江蔬菜, 2001, 18(7): 32-33.

[12] 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.

[13] 杨梁, 崔德才, 樊治成. 辣椒子叶培养及植株再生[J]. 当代生态农业, 2005, 15(Z1): 102-104.

[14] 王倩芳. 保加利亚尖辣椒子叶离体组织培养与植株再生的研究[J]. 现代农业科技, 2009, 38(11): 23, 25.

[15] Borychowski A, Niemirówicz-Szczytt K, Jędraszko M. Plant regeneration from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) hypocotyl explants[J]. Physiologiae Plantarum, 2002, 24(3): 257-264.

[16] 沈火林, 王志源, 蒋健箴, 等. 辣椒的组织培养与植株再生[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(2): 73.

[17] 何晓明, 王鸣, 王喆之. 辣椒子叶原生质体培养和植株再生[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 298-300.

[18] 文锦芬, 邓明华. 灌木辣椒——涮辣的组培[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 511.

[19] 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, 22(6): 4-7.

[20] Gogoi S, Acharjee S, Devi J. *In vitro* plantlet regeneration of *Capsicum chinense* Jacq. cv. 'Bhut jalakia': hottest chili of northeastern India [J]. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant, 2014, 50: 235-241.

[21] 柳建军, 于洪欣, 于彦丽. 辣椒离体培养及植株再生的研究[J]. 山东农业科学, 2001, 39(2): 25-26.

[22] 谢立波, 郭亚华, 李景富, 等. 辣椒离体培养和植株再生体系建立[J]. 黑龙江农业科学, 2006, 29(1): 48-52.

[23] 周俊, 肖英, 程秉铨, 等. 辣椒茎尖培养脱毒研究[J]. 西北农业学报, 1996, 5(3): 23-26.

[24] 文锦芬, 邓明华. 辣椒茎尖培养脱毒研究[J]. 中国辣椒, 2002(3): 17-19.

[25] 郝峥嵘, 戚家华, 王子霞, 等. 辣椒子叶的离体再生培养[J]. 新疆农业科学, 1993, 36(3): 121-122.

[26] 吴鹤鸣, 赵华命. 辣椒茎、叶离体培养中生长调节剂的作用[J]. 江苏农业学报, 1992, 8(4): 48.

[27] Agrawal S, Chandra N, Kothari S L. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *mathania*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 16: 47-55.

[28] 李明军, 焦滇, 刘颖, 等. 朝天椒的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(2): 134-135.

[29] 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, 9(2): 148-152.

[30] 龙凤, 张金文. 辣椒子叶和下胚轴的离体培养及高效再生体系的建立[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(1): 31-37.

[31] Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N. An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method [J]. Plant Cell Reports, 1996, 16: 226-231.

[32] 胡能兵, 隋益虎, 张子学, 等. 紫色辣椒腋芽增殖离体培养体系的建立[J]. 激光生物学报, 2008, 17(2): 251-255.

[33] 瓦·古巴诺娃, 蒋平, 李攻, 等. 辣椒的组织培养及其植株再生[J]. 新疆师范大学学报, 1990, 9(2): 65-70.

[34] 赵天红, 李海涛, 张继仁. 辣椒子叶、茎尖、上胚轴和根段外植体组织培养简报[J]. 湖南农业科学, 1989, 19(6): 28-30.

[35] Otroshy M, Moradi K, Nekouei M K, et al. Micropropagation of pepper (*Capsicum annuum* L.) through *in vitro* direct organogenesis [J]. Asian Journal of Biotechnology, 2011, 3(1): 38-45.

[36] Sanatombi K, Sharma G J. *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(3): 517-520.

[37] 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.

[38] 曹冬孙, 贾士荣. 青椒子叶培养及植株再生[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 171-175.

[39] 李英慧, 李艳, 杭晓明, 等. 细胞分裂素对辣椒子叶再生的影响[J]. 园艺学报, 2001, 28(3): 270-272.

[40] 黄真池, 李飞凤, 曾曦, 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.

[41] Batista D S, Dias L L C, Macedo A F, et al. Suppression of ethylene levels promotes morphogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant, 2013, 49: 759-764.

[42] Kumar V, Sharma A, Prasad B C N, et al. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity [J]. Physiologiae Plantarum, 2007, 29: 11-18.

[43] 黄海波, 淡明, 郭安平, 等. 黄灯笼辣椒子叶离体培养与植株再生[J]. 热带农业科学, 2006, 26(3): 18-21, 42.

[44] Aboshama H M S. Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. World Journal of Agricultural Sciences, 2011, 7(6): 755-762.

[45] Sanatombi K, Sharma G J. *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(1): 141-145.

[46] 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.

## Establishment of Cotyledon *in vitro* Culture System and Plant Regeneration of Pod Pepper

LI Wei<sup>1</sup>, AO Yan-fei<sup>1</sup>, HE Wen-chao<sup>2</sup>, YANG Zeng-jie<sup>1</sup>, ZHAO Li-ping<sup>1</sup>

(1. Agricultural College, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Agriculture and Animal Husbandry Technology Bureau of Yuping County, Yuping, Guizhou 554000)

**Abstract:** Taking native species of pod pepper from Lipin county of Guizhou province as materials, cotyledons of germinated aseptic seedlings were cut as explants. Adopting the plant tissue culture method with solid medium, effects of



# 贡水白柚基因组 DNA 提取方法研究

石开明, 邓志军, 方响亮

(湖北民族学院 林学院园艺学院, 湖北 恩施 445000)

**摘要:**以“贡水白柚”为试材,采用盐乙醚处理法、苯酚氯仿处理法、基本 CTAB 处理法 3 种 DNA 提取方法来处理“贡水白柚”基因组 DNA,研究不同提取方法对 DNA 样品的产率、外观、酶切电泳等方面的影响。结果表明:用盐乙醚法所提 DNA 外观呈纯白色,冷冻沉淀为纤维状,效果最好;用苯酚氯仿法处理幼穗期柚叶片基因组提取 DNA 产率最高,DNA 浓度达 118 ng/ $\mu$ L;*Eco*RI 酶切图谱用 CTAB 处理法和盐乙醚处理法效果均较好,苯酚氯仿处理法则拖尾严重,效果差;RAPD 引物 PCR 扩增效果图表明,3 种方法均能扩增出清晰条带,均适合于有关“贡水白柚”基因组的相关研究。

**关键词:**贡水白柚;DNA;提取

**中图分类号:**S 602 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0097-04

柚(*Citrus grandis* (L.) Osbeck)是柑橘类果树的一个主要栽培种类,有着丰富的种质资源。柚果实色香味俱全,加上外形美观、营养丰富,而且耐贮藏,深受消费者的喜爱,经济价值高。现已成为我国柑橘类品种中相当重要的一个种类<sup>[1]</sup>。“贡水白柚”原产鄂西恩施土家族苗族自治州,属酸甜型中熟柚类良种,是湖北地方特色优良柚类品种,与同类品种相比,具有皮薄肉厚,易剥

皮,无苦涩口感等优势,深受大众喜爱。

随着国内柑橘产业结构的调整,近年来针对各种柚的研究也逐渐增多。目前有关柚种质资源的遗传多样性基础研究中,涉及到柚基因组 DNA 提取方面是个难题,特别是从柚成熟的老叶中提取高质量的基因组 DNA,一般方法难以实现。老叶中酚类化合物、色素、多糖和其它次生代谢物质含量较高,这给柚老叶基因组 DNA 提取带来了极大困难。而在研究柚基因组学时首先需要得到高纯度、结构完整的 DNA。同时为了便于研究的进行,还要保证 DNA 提取量充足,所以很有必要摸索一套适合提取柚基因组 DNA,特别是从老叶中快速有效提取 DNA 的方法,该方法应尽可能具备操作简便、省

**第一作者简介:**石开明(1980-),男,博士,讲师,现主要从事林学院园艺植物遗传育种等研究工作。E-mail:skm331@163.com.

**基金项目:**湖北省教育厅资助项目(Q20122902);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81303169)。

**收稿日期:**2014-05-19

different media of a basal nutrient medium supplemented with different auxins, cytokinins and auxin- cytokinin combinations, different physiological ages of aseptic seedlings and different parts of cotyledon on cotyledon *in vitro* culture system and plant regeneration, such as *in vitro* cotyledon inoculation, callus induction, adventitious bud differentiation, bud elongation, root induction, domestication, transplantation and growing adult plant were investigated. The results showed that the optimal medium for adventitious bud differentiation was MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L, with 100% bud differentiation percentage. The optimal medium for bud elongation was MS+KT 2 mg/L, with 50% bud elongation percentage. And the rooting medium was MS without other supplements, with 44% taking root percentage. The average of 15-18 adventitious clustered buds were differentiated by one explant. Among these adventitious buds differentiated per explant, 14-16 buds were elongated, and 6-7 seedlings were obtained at last. This period was 50-55 days from cotyledon explant inoculation to regeneration seedlings. The survival percentage of regeneration seedlings after transplanting was 98%. The efficient regeneration system by *in vitro* culture was preliminarily established on pod pepper of Guizhou province, which laid important foundation for tissue culture in rapid propagation and genetic transformation of pod pepper in this study.

**Keywords:** pod pepper; cotyledon; auxin-cytokinin combination; culture *in vitro*; plant regeneration