

研究报告

A Letter

辣椒叶片原生质体分离及愈伤组织形成

刁卫平[✉], 王述彬[✉], 刘金兵[✉], 潘宝贵[✉], 戈伟[✉]

江苏省农业科学院蔬菜研究所, 南京, 210014

✉ 通讯作者: wangsbpep@163.net; ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 2 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0002

收稿日期: 2011 年 12 月 31 日

接受日期: 2012 年 01 月 10 日

发表日期: 2011 年 01 月 18 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

刁卫平等, 2012, 辣椒叶片原生质体分离及愈伤组织形成, 分子植物育种(online) Vol.10 No.2 pp.1012-1016 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0002)

引用格式(英文):

Diao et al., 2011, Protoplast Isolation from Pepper Leaves (*Capsicum annuum* L.) and Callus Formation, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.2 pp.1012-1016 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0002)

摘要 本文以辣椒细胞质雄性不育系 21A 叶片为试验材料, 对原生质体分离过程中的若干因素, 如酶液组成、酶解时间、低温预处理、纯化时的离心转速及时间进行了比较分析, 以探讨辣椒叶片原生质体分离的最佳条件及其愈伤组织形成。研究结果表明, 辣椒叶片在 4℃ 低温预处理 12 h 后, 经酶液 CPW+9%甘露醇+0.1%MSE+0.2%PVP+1.0%纤维素酶+0.5%离析酶+0.2%果胶酶在 27℃, 转速为 50 r/min 的摇床上酶解 4 h 后可获得大量原生质体。纯化时, 适当提高离心转速的短时间离心有利于高产原生质体的获得, 以 800 r/min 离心 8 min 效果最好。纯化的原生质体稀释后培养在含 6-BA 的 KM8P 培养基上, 48 h 后可见第一次细胞分裂, 1 个月后可获得愈伤组织。

关键词 辣椒; 原生质体; 愈伤组织

Protoplast Isolation from Pepper Leaves (*Capsicum annuum* L.) and Callus Formation

Diao Weiping[✉], Wang Shubin[✉], Liu Jinbing[✉], Pan Baogui[✉], Ge Wei[✉]

Institute of Vegetable Crop, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, 210014

✉ Corresponding author, wangsbpep@163.net; ✉ Authors

Abstract In order to figure out the optimum conditions of protoplast isolation of pepper leaves and callus formation, we employed true leaves of pepper cytoplasm sterile line 21A as experimental materials to analyze some influencing factors on isolation of protoplasts and callus formation, such as enzymetic composition, enzymetic digesting time, low temperature pretreating, speed and time of centrifugation for protoplast purifying. The results showed that a great lots of protoplasts could be obtained by enzymic dissolved in the CPW with 9% Mannitol, 0.2% PVP, 0.1% MES, 1.0% Cellulase, 0.5% Macerzyme and 0.2% Pectolyase and incubated on constant temperature shaker with 50 r/min at 27°C for 4 h, prior to pre-treating for 12 h in 4°C. In the process of purification, increasing rotating speed for short-time centrifugation will facilitate to yield the protoplasts the best rotating speed and time would be 800 r/min for 8 min. The purified protoplasts cultured on KM8P medium containing 6-BA would come out with the first cell division after 48 h incubation and with visible micro callus after one month later.

Keywords Pepper (*Capsicum annuum* L.); Protoplast; Callus tissue

研究背景

辣椒(*Capsicum* spp.)是我国第二大蔬菜作物, 作为常异花授粉作物, 具有很强的杂种优势。利用细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility, CMS)系进行辣椒杂交种生产, 具有省去人工去雄、降低成本、提高种子纯度和保证种子质量等优点。然而, 当前我国辣椒生产上利用 CMS 进行杂种优势育种中主要存在的问题是缺乏优良的 CMS 系。由于

CMS 性状为母性遗传, 通过有性杂交再回交的方法转移该性状往往需要 6~10 年的时间, 这无疑限制了辣椒 CMS 系的选育进程。

原生质体培养为开展体细胞杂交提供了新的途径, 通过不同类型的原生质体融合可以在一定程度上克服传统育种方法的不足。而利用原生质体融合技术可以快速实现胞质基因的转移, 获得更多基因型的杂种, 缩短 CMS 性状转育时间。自 Zelcer

于1978年成功地利用原生质体融合实现CMS性状的转移以来,通过该技术转移和改良作物CMS性状已在芸薹属、水稻、番茄、马铃薯、烟草、胡萝卜等作物上成功地应用(蔡小东,2007)。Yang等(1988)利用经⁶⁰Co照射的水稻雄性不育系A-58的原生质体与可育系‘Fujiminori’的原生质体电融合后,获得了7个雄性不育水稻新材料;Stephen等(1990)利用原生质体融合技术将油菜‘Polima’胞质雄性不育性成功转移到甘蓝中;Sakai等(1996)通过原生质体融合技术将萝卜恢复系中的一个基因成功转移到油菜不育系中;司家钢等(2002)以胡萝卜雄蕊瓣化型不育材料与可育材料的原生质体为材料电融合后,获得了4个雄性不育株系,并证实为胞质杂种;通过原生质体非对称融合技术,惠志明等(2005)获得了花椰菜与‘Ogura’CMS甘蓝型油菜种间杂种。

与其它茄科植物相比,辣椒原生质体培养研究尚没有取得明显进展,其原因主要在于辣椒原生质体培养和再生难度大,重复性差。目前,国内外仅有少量利用不同辣椒品种的子叶和下胚轴为材料进行原生质体分离、纯化,并获得再生植株的报道(Donato et al.,1989; Jeon et al., 2007; 何晓明等,1997),而利用辣椒细胞质雄性不育系为材料进行原生质体的研究国内外尚未见报道。本试验利用辣椒细胞质雄性不育系21A无菌苗的叶片分离原生质体,从诸多因素探讨其对原生质体分离产量的影响,并进行培养获得了愈伤组织,为今后通过辣椒原生质体植株再生和融合技术转移细胞质雄性不

育性状奠定基础。

1 结果与分析

1.1 酶液组成和浓度对原生质体产量的影响

在原生质体分离过程中,不同种类的酶、浓度及酶解时间对原生质体产量和活力都有较大影响(表1),在供试的6种酶组合中,随着酶解液浓度的降低,原生质体产量也逐步降低。不同酶组合,达到最大原生质体产量所需的酶解时间不一,总体随酶解液浓度降低所需酶解时间则适当延长。同时,添加果胶酶能明显提高原生质体产量和缩短酶解时间。达到最佳原生质体产量后,如继续延长酶解时间,由于酶解液中原生质体破裂加速,原生质体碎片明显增加,原生质体产量反而相对降低。

1.2 低温预处理对原生质体产量的影响

在最佳酶液条件(EC4)下,对无菌苗在分离制备原生质体前进行低温预处理,其原生质体产量呈显著变化(表2)。原生质体产量呈现先上升后下降的趋势,无菌苗在4℃下处理12h时产量最高可达为(7.04+0.33 a)×10⁶ cells/g FW,在而处理24h后原生质体产量最低,仅为(2.56+0.32 d)×10⁶ cells/g FW。处理过程中原生质体产量先上升后下降的原因可能是,处理前期,低温提高了细胞的耐受性,使其在酶解过程中不易破碎,进而提高了原生质体产量。而随着处理时间的延长,辣椒叶片却受到了低温冷害胁迫,导致细胞失水,进而使能分离完整原生质体的细胞明显降低。

表1 酶液组成和浓度对原生质体产量的影响

Table1 Influence of enzymic components and concentrations on the yield of protoplasts

酶液组成 Enzymic components	纤维素酶(%) Cellulase (%)	离析酶(%) Macerozyme (%)	果胶酶(%) Pectinase (%)	最佳酶解时间(h) Enzymic dissolving time (h)	原生质体产量(×10 ⁶ cells/gFW) Yield of protoplasts (×10 ⁶ cells/gFW)
EC1	1	0.5		4	6.19+0.02 b
EC2	0.5	0.25		6	5.43+0.03 c
EC3	0.25	0.1		8	3.28+0.12 e
EC4	1	0.5	0.2	3.5	6.42+0.20 a
EC5	0.5	0.25	0.1	5	5.87+0.10 bc
EC6	0.25	0.125	0.05	7	3.72+0.13 d

注: 同列数据的不同字母表示在5%水平上差异显著

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 5% level

表2 低温预处理(4℃)对原生质体产量的影响

Table 2 Influence of pre-treatment in 4℃ on yield of protoplast

预处理时间(h)	原生质体产量($\times 10^6$ cells/gFW)
Pre-treating time (h)	Yield of protoplast ($\times 10^6$ cells/gFW)
0	6.42+0.20 b
12	7.04+0.06 a
18	4.65+0.082c
24	2.56+0.06 d

注: 数据后不同字母表示在 5% 水平上差异显著

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 5% level

1.3 纯化离心对原生质体产量的影响

细胞质雄性不育系 21A 的无菌苗叶片经酶解过滤后, 测得原生质体产量为 6.42×10^6 cells/g FW, 原生质体纯化时不同离心转速及离心时间对原生质体产量的影响表明(表 3), 当离心转速较低时(500 r/min), 在 6~10 min 之间, 原生质体产量随时间延长而增加, 原生质体不易聚集在离心管底部; 提高离心转速至 800 r/min, 在 6~10 min 之间, 原生质体产量随时间延长而减少, 但原生质体易在离心管底部聚集, 其中以离心 8 min 的效果最佳; 而当离心转速提高至 1 000 r/min 时, 原生质体产量随时间延长明显下降, 主要表现为原生质体破裂。

1.4 愈伤组织形成

辣椒无菌苗在 4℃ 下预处理 12 h, 叶片经 1% 纤维素酶+0.5% 离析酶+0.2% 果胶酶酶解、过滤和纯化

后可产生大量有活力原生质体(图 1A), 培养约 48 h, 发生第一次分裂(图 1B)。前 3 周进行暗培养, 每隔 1 周添加 1 mL 稀释培养基, 3 周后将培养物于漫射光下进行培养, 当出现肉眼可见的愈伤组织时(图 1C), 将其转移至扩增培养基弱射光下培养, 随后可获得。

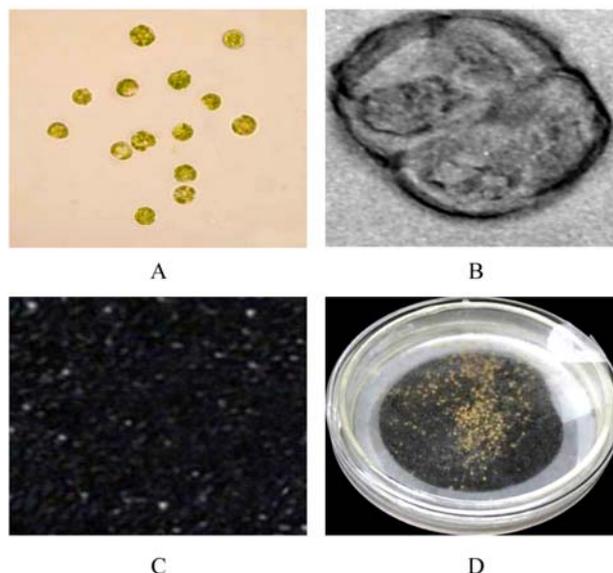


图 1 辣椒原生质体分离培养及愈伤组织形成
注: A: 纯化的原生质体; B: 第一次细胞分裂; C: 微愈伤组织; D: 愈伤组织

Figure 1 Isolation and culture of protoplasts true leaves of pepper (*Capsicum annuum* L) and callus formation.

Note: A: Purified protoplast; B: First cell division; C: Micro callus; D: Callus

表 3 离心转速及离心时间对原生质体产量的影响

Table 3 Effects of and time of centrifugation on the yield of protoplasts

离心转速(r/min)	离心时间(min)	原生质体产量($\times 10^6$ cells/gFW)
Speed of centrifugation (r/min)	Time of centrifugation (min)	Yield protoplast ($\times 10^6$ cells/gFW)
500	6	3.58+0.10 f
500	8	4.32+0.14 e
500	10	4.67+0.18 d
800	6	6.13+0.22 ab
800	8	6.28+0.18 a
800	10	5.94+0.10 b
1000	6	4.91+0.33 c
1000	8	3.74+0.17 f

注: 数据后不同字母表示在 5% 水平上差异显著

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 5% level

2 讨论

由于没有细胞壁,原生质体为作物遗传改良和植物学研究提供了极为便利的试验材料。目前,已被广泛应用于种质资源保存(马锋旺和李嘉瑞, 1998; 王子成和邓秀新, 2002)、原生质体融合(司家钢等, 2002; 惠志明等, 2005; 张丽等, 2008)、突变体筛选(Nyman et al., 1993; Wallin et al., 1993)及遗传转化(Jeon et al., 2007; 肖荣凤等, 2009)等基础理论研究。而获得大量有活力的原生质体是原生质体培养成功与否的前提之一,虽然已有很多植物原生质体分离获得成功,但并不是在任何情况下均能获得大量活力好、质量高的原生质体。原生质体分离受到较多因素的影响,包括植物的类型、基因型、外植体类型及生理状态和酶液类型及浓度等。至今,在辣椒上已有利用子叶、下胚轴为起始材料分离原生质体,并获得愈伤组织及再生植株的相关研究报道(Donato et al., 1989; Jeon et al., 2007; 何晓明等, 1997)。本研究利用辣椒叶片为试材,在分离原生质体前对其进行低温预处理,结合酶液组成、离心转速和时间筛选,获得了最佳辣椒叶片原生质体分离条件,并在此基础上得到了愈伤组织,其研究结果为辣椒原生质体培养再生植株的获得奠定了基础。

此外,原生质体培养是进行原生质体融合的前提。原生质体融合不同于有性杂交,在融合过程中不涉及性配子,在转移胞质基因,培育新的优良细胞质雄性不育系中发挥着重要作用。至今,在很多作物中已利用原生质体融合改良细胞质雄性不育系的报道(Yang et al., 1988; Xue et al., 1995; 蔡小东, 2007)。然而,由于辣椒原生质体培养一直没有取得明显突破,使得还未有利用原生质体融合技术来培育优良不育系的报道。本研究利用辣椒细胞质雄性不育系作为原生质体分离的供体材料,探索出了可以获得大量活力好、质量高辣椒原生质体的分离条件,研究结果也为利用原生质体融合创制辣椒优良胞质不育系奠定了一定的基础。

3 材料和方法

3.1 材料

供试材料为辣椒细胞质雄性不育系 21A 和相应的保持系 21B,由江苏省农业科学院蔬菜研究所辣椒课题组提供,于 2011 年春种植在江苏省农业科学院蔬菜实验基地,常规管理。

3.2 无菌苗体系的建立

利用保持系 21B 的花粉对不育系 21A 授粉,50 d 后采收自然成熟果实。在超净工作台上,用 75% 酒精对果实表面进行消毒,将果实剖开取成熟种子接种到 1/2 MS 固体培养基上,分别置于黑暗处及光照下萌芽和生长。培养温度(26±1)℃;光照强度 2 000~2 500 Lx,光照时间 16 h/d。

3.3 原生质体的分离和纯化

取苗龄 40 d 的无菌苗叶片约 1 g,用解剖刀将其切成 1 mm 宽的细条,置于盛有 10 mL 酶解液的 50 mL 离心管中,Parafilm 封口,在 27℃ 黑暗条件下放置回旋摇床上酶解(16 g/min)。2% (w/v)纤维素酶,1% 果胶酶和 1% 离析酶分别溶于 CPW9(含 9% 甘露醇)溶液中配制成基本酶液,Ph 5.8,过滤灭菌,4℃ 保存。CPW9 为(CaCl₂ · 2H₂O 10 mmol/L, KH₂PO₄ 0.2 mmol/L, KNO₃ 1.0 mmol/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 mmol/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.1 μmol/L, KI 10 μmol/L),添加 0.1% MES, 0.2% PVP。用时,根据需要添加不同比例的酶母液配制成各种浓度的工作液(表 1)。

将酶解后的混合物用 300 目无菌尼龙网过滤,将滤液在 50 mL 离心管中离心,去上清液,用 CPW9 溶液悬浮底部沉淀的原生质体,洗涤离心 2 次。再用原生质体培养液悬浮离心 1 次,然后在显微镜下检查其纯化情况,并稀释成密度约 10⁵ 个/mL 原生质体悬浮液备用。原生质体产量测定参照李浚明(1992)的方法,重复 3 次。

3.4 原生质体的培养及愈伤组织形成

将纯化好活性高的原生质体悬浮于添加含有 6-BA 的 KM₈P 培养基上,在(26±1)℃ 黑暗条件下采用液体浅层培养法进行培养。把 3 mL 悬浮于培养基的原生质体滴加到直径 60mm 的培养皿中,Parafilm 封口,在 28℃ 黑暗条件下培养,2 周后,添加无甘露醇的含有 6-BA 的 KM₈P 液体培养基于培养皿中,以稀释再生细胞团的密度和降低甘露醇浓度。

作者贡献

刁卫平是本研究的实验设计和实验研究的执行人;王述彬是项目的构思者,指导实验设计,论文修改;刘金兵和潘宝贵参与试验结果分析;戈伟提供试验材料。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家大宗蔬菜产业技术体系淮安综合试验站项目(CARS-25-G-14)、江苏省自然科学基金项目(BK2010464)和江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(10)103; CX(11)1004)共同资助。

参考文献

- Cai X.D., 2007, The advance of transfer CMS trait using protoplast fusions in crop, *Changjian Daxue Xuebao (Journal of Yangtze University (Nat Sci Edit) Agri Sci V)*, 4(4): 86-90 (蔡小东, 2007, 利用原生质体融合技术转移作物 CMS 性状的研究进展, 长江大学学报(自科版)农学卷, 4(4): 86-90)
- Donato M.D., Perucco E., and Mozzetti C., 1989, Protoplasts culture and callus proliferation from cotyledons of *Capsicum annuum* L., *Adv Horti Sci*, 3: 17-20
- He X.M., Wang M., and Wang Z., 1997, Protoplast culture and plant regeneration from cotyledons of pepper, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 24(3): 298-300 (何晓明, 王鸣, 王之, 1997, 辣椒子叶原生质体培养和植株再生, 园艺学报, 24(3): 298-300)
- Hui Z.M., Liu F., Jian Y.C., Shen S.X., and Zhao H., 2005, Interspecific somatic hybrids between *Brassica oleracea* var. *botrytis* and *Ogura* type CMS *Brassica napus* via asymmetric protoplast fusion, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 38(11): 2372 (惠志明, 刘凡, 简元才, 申书兴, 赵泓, 2005, 原生质体非对称融合法获得花椰菜与 ogura CMS 甘蓝型油菜种间杂种, 中国农业科学, 38(11): 2372)
- Jeon J.M., Ahn N.Y., Son B.H., and Kim C.Y., 2007, Efficient transient expression and transformation of PEG-mediated gene uptake into mesophyll protoplasts of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 88: 225-232
- Li J.M., ed., 1992, *Plant tissue culture course*, Beijing Agricultural University Press, Beijing, China, pp.274-275 (李浚明, 主编, 1992, 植物组织培养教程, 北京农业大学出版社, 中国, 北京, pp.274-27)
- Ma F.W., and Li J.R., 1998, Cryopreservation of apricot protoplasts, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 25(4): 329-332 (马锋旺, 李嘉瑞, 1998, 杏原生质体的超低温保存, 园艺学报, 25(4): 329-332)
- Nyman M., and Wallin. A., 1993, Somaclonal variation in protoplast derived strawberry plants, *Acta Hort*, 348: 441
- Sakai T., Liu H J., Iwabuchi M., Kohno-Murase J., and Imamura J., 1996, Introduction of a gene from fertility restored radish into *Brassica napus* by fusion of X-irradiated protoplasts from a radish restorer line and iodacetoamide-treated protoplasts from a cytoplasmic male-sterile cybrid of *B.napus*, *Theor. Appl. Genet.*, 93: 373-379
- Si J.G., Zhu D.W., Du Y.C., and Zhao Z.Z., 2002, Intraspecific cybrids in carrot (*Daucus carota* L.) obtained from asymmetric protoplast fusion, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 29(2): 128-132 (司马钢, 朱德蔚, 杜永臣, 赵志伟, 2002, 原生质体非对称融合获得胡萝卜种内胞质杂种, 园艺学报, 29(2): 128-132)
- Stephen A.Y., Laurie A.B., Richard P.W., and Roger J.K., 1990, The transfer of 'Polima' cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion, *Plant Cell Reports*, 9: 185-188
- Wang Z.C., and Deng X.X., 2002, Cryopreservation of citrus protoplasts, *He'nan Daxue Xuebao (Journal of Henan University (Natural Science))*, 32(3): 38-40 (王子成, 邓秀新, 2002, 柑橘原生质体的超低温保存, 河南大学学报, 32(3): 38-40)
- Wallin A., Skjoldebrand H., and Nyman M., 1993, Protoplasts as tools in *Fragaria* breeding, *Acta Hort*, 348: 414-421
- Xiao R.F., Zhu Y.J., Li Y.D., Huang S.F., and Liu B., 2009, Green fluorescent protein gene transformation on *Fusarium oxysporum* f.sp.*niveum* strain, FOV-135, *Fujian Nongye Xuebao (Fujian Journal of Agricultural Sciences)*, 24(6): 521-524 (肖荣凤, 朱育菁, 李燕丹, 黄素芳, 刘波, 2009, 西瓜尖孢镰刀菌 FOV-135 的绿色荧光蛋白基因转化, 福建农业学报, 24(6): 521-524)
- Xue Q.Z., and Earle E.D., 1995, Plant regeneration from protoplasts of cytoplasmic male sterile lines of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell Reports*, 15: 76-81
- Yang Z.Q., Shikanai T., and Yamada Y., 1988, Asymmetric hybridization between cytoplasmic male-sterile (CMS) and fertile rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts, *Theor. Appl. Genet.*, 76: 801-808
- Zhang L., Zhao H., Chen B., and Liu F., 2008, Development and identification of interspecific somatic hybrids between cauliflower and black mustard, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 25(2): 176-184 (张丽, 赵泓, 陈斌, 刘凡, 2008, 花椰菜与黑芥种间体细胞杂种的获得和鉴定, 植物学通报, 25(2): 176-184)