

利用组织培养技术筛选辣椒 抗疫病变异体

齐 飞, 巩振辉, 黄 炜

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 选用“2001”, “2056”, “2031”3个辣椒品种作为试材, 以其子叶作为外植体诱导愈伤组织, 以辣椒疫病病原菌培养滤液制取粗毒素作为筛选剂, 筛选辣椒抗疫病细胞变异系。结果表明, 辣椒疫病病原菌粗毒素对辣椒子叶愈伤组织的诱导、生长及不定芽的分化具有显著的抑制作用, 抑制作用随着粗毒素浓度的增加而增加, 且不同辣椒品种愈伤组织对毒素的忍耐力不同。

[关键词] 辣椒; 辣椒疫病病原菌; 粗毒素; 变异系; 愈伤组织

[中图分类号] S641.303.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)02-0083-06

辣椒疫病是危害辣椒生产的主要病害之一, 在世界许多国家都有发生。该病害是由辣椒疫病病原菌(*Phytophthora capsici*)引起的一种毁灭性土传病害, 对苗期、成株期辣椒均有伤害, 茎、叶和果实均能发病, 且其传播速度极快, 常致使发病田绝产, 造成严重的经济损失。利用化学药剂对植株地上部进行喷施防治的传统方法, 不仅污染产品和环境, 而且防治效果较差。但是采用常规育种和杂交育种技术进行辣椒抗疫病育种工作, 也具有育种周期较长、难以在短时间内获得优质抗病品种的缺点。因此, 寻求一种新的, 效果好、周期短的抗病育种途径, 已成为辣椒高产优质抗病育种研究的重点。

近年来, 植物离体培养筛选细胞突变体技术迅速发展, 国内外已建立了较为完善的利用组织培养技术, 离体筛选抗逆种质的新方法, 并在植物抗病、抗除草剂、耐盐胁迫、抗金属离子、雄性不育和作物品质改良等方面取得了可喜成就, 获得了大量的突变体材料^[1]。如何诱导并成功筛选出辣椒的抗疫病体细胞变异无性系在国内外尚未见报道。基于此, 本试验建立和完善了辣椒抗疫病体细胞变异无性系诱导筛选体系, 并在此基础上获得了抗疫病的体细胞变异株系, 这对于加速辣椒抗疫病新品种的选育和推广, 及对农业可持续性发展具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材 料

选取“2001”, “2056”和“2031”3个辣椒品种(系)作为试材, 其中品种“2001”为市售种, 品系“2056”和“2031”由西北农林科技大学园艺学院辣椒种质资源与育种课题组提供。3个供试材料均为辣椒疫病感病品种(系)。

辣椒疫病病原菌为陕西杨凌本地分离菌株。辣椒愈伤组织诱导分化培养基(MS+质量分数3%蔗糖+质量分数0.6%琼脂+5.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA)用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调pH为5.8, 并在0.10~0.15 MPa压力和121~126℃高温下灭菌20 min, 用于愈伤组织的诱导及不定芽的分化。

1.2 方 法

1.2.1 辣椒无菌苗的获得 精选后的辣椒种子经55℃温水浸泡2 h, 体积分数70%酒精浸泡40 s, 质量分数2%次氯酸钠溶液消毒30 min, 无菌水漂洗3~4次, 接种到MS+质量分数3%蔗糖+质量分数0.6%琼脂培养基上(pH=5.8), 置于光照2 000 Lx(14 d), 白天26℃、晚上20℃条件下发芽并培育成苗。

1.2.2 辣椒疫病病原菌粗毒素的制备 辣椒疫病

[收稿日期] 2005-06-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571262); 西北农林科技大学遗传育种专项(05YZ024-1)

[作者简介] 齐 飞(1981—), 女, 陕西汉中, 硕士, 主要从事农业生物技术研究。

[通讯作者] 巩振辉(1957—), 男, 陕西礼泉人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜种植资源与生物技术研究。

E-mail: gzh168@yahoo.com.cn

病原菌(*Phytophthora capsici* Leonian)在进行液体培养前 7 d 接种至 PDA 固体培养基上进行繁殖和鉴定。挑取 5 块直径 8 mm 的单菌菌落接种于 100 mL 胡萝卜汁培养液中(CFB),置 27 °C 黑暗条件下,110~120 r/min 振荡培养 18 d。用双层灭菌滤纸滤去菌丝体,滤液经 4 000 r/min 离心 20 min,上清液煮沸过滤即为辣椒疫病原菌粗毒素。

1.2.3 辣椒疫病原菌粗毒素对辣椒子叶愈伤组织诱导的影响 分别选取 3 个辣椒品种 12 d 苗龄幼苗的子叶,接种在粗毒素体积分数分别为 0%,10%,20%,30%,40%,50%和 60%的筛选培养基上,每处理 50 个外植体。接种时外植体伤口与培养基表面充分接触。无菌苗的生长条件为:温度 20~25 °C,光照 2 000 Lx,14 h 光/10 h 暗。愈伤组织的诱导、继代与分化培养条件为:温度 20~25 °C,光照 2 000 Lx,14 h 光/10 h 暗。20 d 后分别统计各试验材料愈伤组织诱导率及发育状态。

1.2.4 辣椒疫病原菌粗毒素对辣椒愈伤组织增殖的影响 分别选取 3 个辣椒品种 12 d 苗龄幼苗的子叶接种在分化培养基上,每处理 100 个外植体。接种时外植体伤口与培养基表面充分接触,培养条件同 1.2.3。培养 20 d 后将愈伤组织从外植体伤口处切下,转接至粗毒素体积分数为 10%的筛选培养基上继代筛选培养,用精确度为 0.001 g 的天平称量不同处理各个材料愈伤组织鲜重。培养 20 d 后,选择 3 个品种未褐化且生长明显的愈伤组织,转接至粗毒素体积分数为 20%的筛选培养基上进一步继代筛选培养,用精确度为 0.001 g 的天平称量各个材料愈伤组织鲜重,20 d 为 1 个粗毒素浓度筛选周期,愈伤组织筛选的粗毒素体积分数最高为 60%。在每个粗毒素筛选周期,观察各个材料各个处理的愈伤组织的生长状态,并称量其愈伤组织鲜重,计算愈伤组织增殖率,计算公式如下:

愈伤组织增殖率/% = ((培养后愈伤组织量 - 转入愈伤组织量) / 转入愈伤组织量) × 100 %。

1.2.5 辣椒疫病原菌粗毒素对辣椒愈伤组织分化的影响 方法同 1.2.4,在每个粗毒素体积分数筛选周期,均统计不同材料各个处理的不定芽分化率、每个愈伤组织的存活率和不定芽生长状态。

1.2.6 抗性细胞系的筛选与稳定性鉴定 分别将 3 个品种在粗毒素体积分数为 60%筛选培养基上生长的愈伤组织,转接至无毒素胁迫的 MS 培养基上继代增殖 4 次,以淘汰对粗毒素嗜好的适应细胞。

再分别将“2001”、“2056”、“2031”抗性变异系及其对照系,转接至粗毒素体积分数为 60%的筛选培养基上进行培养,研究抗性无性系的抗毒素特性。并统计各处理的愈伤组织存活率及愈伤组织增殖率。

1.2.7 抗性细胞系的植株再生 将抗性愈伤组织分化的不定芽丛分割,转入芽伸长培养基上,培养条件同 1.2.3,14 d 继代 1 次。不定芽叶片开展,同时有茎间伸长。待不定芽长至 2~3 cm 时,将其从基部切下,插入生根培养基中诱导生根,待其长成发达根系后,移入盛有菜园土和蛭石(质量比为 1:1)的营养钵中保湿培养。

2 结果与分析

2.1 辣椒疫病原菌粗毒素对辣椒子叶愈伤组织诱导的影响

由表 1 可以看出,辣椒愈伤组织诱导率随着辣椒疫病原菌粗毒素浓度的升高而降低。当辣椒疫病原菌粗毒素体积分数为 10%时,“2001”、“2056”和“2031”的愈伤组织诱导率分别为 90%,88%和 86%。当粗毒素体积分数为 60%时,“2001”、“2056”的愈伤组织诱导率分别为 4%和 2%,而“2031”在粗毒素体积分数为 50%时就已无愈伤组织产生,这说明辣椒疫病原菌粗毒素对辣椒愈伤组织有强烈的毒害作用。除了粗毒素体积分数为 0%处理外,在粗毒素体积分数相同的条件下,“2001”的愈伤组织诱导率明显高于“2031”,这说明不同辣椒品种愈伤组织对毒素有不同的忍耐力,“2001”对粗毒素的忍耐力最强,“2031”最弱。本试验还发现,生长在含有粗毒素培养基上的为 3 个辣椒品种,其愈伤组织均出现了不同程度的褐化,且粗毒素体积分数越高,褐化现象越严重。

2.2 辣椒疫病原菌粗毒素对辣椒愈伤组织增殖的影响

由表 2 可知,用辣椒疫病原菌粗毒素筛选辣椒愈伤组织时,随粗毒素体积分数的升高,愈伤组织受到抑制的程度增强。当粗毒素体积分数为 10%时,“2001”、“2056”和“2031”的愈伤组织生长状况良好,新鲜均匀疏松,淡绿色,愈伤组织的增殖率分别为 89.6%,88.9%和 86.2%。当粗毒素体积分数为 60%时,仅有个别愈伤组织存活,“2001”、“2056”和“2031”愈伤组织的增殖率分别为 16.7%,15.3%和 11.6%。

表 1 不同体积分数粗毒素对辣椒子叶愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of crude toxin on inducement of callus of pepper

粗毒素 体积分数/% Crude toxin concentrations	品种 Variety	接种 外植体数 No. of explants	愈伤 组织数 No. of callus	愈伤组织 诱导率/% Rate of callus induced	粗毒素 体积分数/% Crude toxin concentrations	品种 Variety	接种 外植体数 No. of explants	愈伤 组织数 No. of callus	愈伤组织 诱导率/% Rate of callus induced
0	2001	50	50	100	40	2001	50	11	22
	2056	50	49	98		2056	50	7	14
	2031	50	50	100		2031	50	5	10
10	2001	50	45	90	50	2001	50	5	10
	2056	50	44	88		2056	50	3	6
	2031	50	43	86		2031	50	1	0
20	2001	50	34	68	60	2001	50	2	4
	2056	50	30	60		2056	50	1	2
	2031	50	28	56		2031	50	0	0
30	2001	50	25	50					
	2056	50	20	40					
	2031	50	17	34					

表 2 辣椒疫病粗毒素对辣椒愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effect of crude toxin on growth of callus of pepper

粗毒素 体积分数/% Crude toxin concentrations	品种 Variety	愈伤组织 增殖率/% Rate of growth of callus	愈伤组织的 生长状态 Growth state	粗毒素 体积分数/% Crude toxin concentrations	品种 Variety	愈伤组织 增殖率/% Rate of growth of callus	愈伤组织的 生长状态 Growth state
0	2001	96.5	+++++	40	2001	34.5	+++
	2056	94.3	+++++		2056	32.6	+++
	2031	93.6	+++++		2031	30.8	++
10	2001	89.6	+++++	50	2001	20.9	++
	2056	88.9	+++++		2056	19.8	++
	2031	86.2	++++		2031	15.9	+
20	2001	69.6	++++	60	2001	16.7	+
	2056	68.1	++++		2056	15.3	+
	2031	63.4	+++		2031	11.6	+
30	2001	50.2	+++				
	2056	48.6	+++				
	2031	40.9	+++				

注:+++++.愈伤组织健康,新鲜均匀疏松,淡绿色;++++.愈伤组织质量较好,较新鲜疏松,黄绿色;+++./1/3 愈伤组织质量差,黄色;++.1/2 愈伤组织质量差,致密,黄褐色;+.大部分愈伤组织褐化死亡,只有个别存活。

Note:+++++. means callus grows well, light green;++++. means callus grows good, yellow-green;+++./ means 1/3 callus grows in bad condition, yellow;++. means 1/2 callus grows in bad condition, yellow-brown;+. means most of callus died.

2.3 辣椒疫病病原菌粗毒素对辣椒愈伤组织分化的影响

由表 3 可知,辣椒疫病病原菌粗毒素能显著抑制辣椒子叶愈伤组织分化不定芽,且随着粗毒素体积分数的升高,愈伤组织存活率降低,不定芽的分化

率也显著降低。当粗毒素体积分数为 10% 时,“2001”、“2056”和“2031”愈伤组织不定芽的存活率分别为 88.5%, 85.6% 和 81.8%, 分化率分别为 84.2%, 82.3% 和 78.6%, 此时不定芽生长基本正常,长势较对照稍弱。当毒素体积分数为 60% 时,

“2001”、“2056”和“2031”愈伤组织不定芽的存活率分别为 15.8%, 14.5% 和 8.6%, 分化率分别为 10.2%, 8.1% 和 4.3%, 此时不定芽枯黄甚至死亡。粗毒素对“2031”不定芽的毒害作用强于其他 2

个品种, 说明粗毒素对不同辣椒品种不定芽具有不同的毒害作用。以上结果均表明, 辣椒疫病病原菌粗毒素对辣椒不定芽的分化和生长有强烈的毒害作用。

表 3 不同体积分数粗毒素对辣椒愈伤组织分化的影响

Table 3 Effect of crude toxin on differentiation of callus of pepper

粗毒素体积分数/% Crude toxin concentrations	品种 Variety	愈伤组织分化率/% Rate of differentiation of callus	愈伤组织不定芽存活率/% Rate of living callus	愈伤组织的生长状态 Growth state of callus
0	2001	95.1	100.0	分化 Strong differentiation
	2056	94.3	100.0	分化 Strong differentiation
	2031	90.5	98.0	分化 Strong differentiation
10	2001	84.2	88.5	分化弱 Weak differentiation
	2056	82.3	85.6	分化弱 Weak differentiation
	2031	78.6	81.8	分化弱 Weak differentiation
20	2001	75.6	78.4	停止分化 No differentiation
	2056	73.1	77.5	停止分化 No differentiation
	2031	65.8	72.2	停止分化 No differentiation
30	2001	60.4	63.8	基部出现褐化 Basilar tissue appeared bruising
	2056	59.3	61.2	基部出现褐化 Basilar tissue appeared bruising
	2031	53.9	52.6	基部褐化 Basilar tissue bruised totally
40	2001	38.8	33.7	基部褐化 Basilar tissue bruised totally
	2056	36.5	29.5	基部褐化 Basilar tissue bruised totally
	2031	29.7	23.9	芽尖褐化 Top of buds bruised totally
50	2001	19.6	23.6	芽尖褐化 Top of buds bruised totally
	2056	16.8	21.2	芽尖褐化 Top of buds bruised totally
	2031	11.4	15.4	枯黄、死亡 Perished and died
60	2001	10.2	15.8	枯黄、死亡 Perished and died
	2056	8.1	14.5	枯黄、死亡 Perished and died
	2031	4.3	8.6	枯黄、死亡 Perished and died

2.4 抗性细胞系稳定性分析

抗性细胞系稳定性分析结果见表 4。由表 4 可知, 辣椒抗疫病愈伤组织变异系与其对照系在含有相同体积分数粗毒素的培养基上培养时, 两者的存活率和增殖率存在明显差异。在体积分数为 60% 的粗毒素培养基中培养时, 抗性愈伤组织仍有一定的生长量, 而对照则受到很强的抑制, “2001”, “2056”和“2031”抗性愈伤组织的存活率分别为 85.3%,

83.8% 和 80.9%, 对照愈伤组织的存活率分别为 8.9%, 6.8% 和 3.8%。“2001”、“2056”和“2031”抗性愈伤组织的增殖率分别 32.8%, 30.3% 和 25.1%, 对照愈伤组织的增殖率分别为 5.3%, 4.8% 和 4.3%。以上结果均表明, 经粗毒素连续筛选得到的抗性细胞变异系对辣椒疫病病原菌粗毒素具有稳定的抗性。但这种抗性是否能够稳定遗传及抗性细胞系的再生植株能否抗病, 还需进一步研究

证实。

表 4 抗性细胞系稳定性分析

Table 4 Analysis of resistibility of cell mutant lines

品种 Variety	愈伤组织增殖率/% Rate of growth of callus		愈伤组织存活率/% Rate of living callus of pepper	
	变异系 Treatment	对照系 CK	变异系 Treatment	对照系 CK
2001	32.8	5.3	85.3	8.9
2056	30.3	4.8	83.8	6.8
2031	25.1	4.3	80.9	3.8

2.5 抗性细胞系植株的再生

本试验获得辣椒品种“2001”抗疫病再生植株 15 株,获得辣椒品种“2056”抗疫病再生植株 12 株,获得辣椒品种“2031”抗疫病再生植株 8 株,对辣椒抗疫病再生植株的抗病性鉴定还有待进一步研究。

3 讨 论

体细胞无性系变异几乎可以发生在植物所有的器官、组织、细胞及愈伤组织上。许多利用组织培养进行植物育种的研究发现,在组织培养过程中可以发生丰富的变异,特别是处于去分化状态的愈伤组织,本身就是体细胞无性系变异的主要原因。组织培养是一个新的、非常丰富的遗传变异源泉。因此,本试验在筛选方法上只是将愈伤组织接种于选择培养基上,而未对原始材料进行任何其他诱变处理。植物病原毒素是病原菌产生的毒性代谢产物,在寄主植物病害的发生、发展过程中起明显的致病作用。研究^[2-6]表明,毒素不仅对植物的组织、器官有毒害作用,还对植物离体培养细胞也有明显的毒害作用,可将毒素作为选择剂对愈伤组织进行抗性筛选,以获得抗性细胞变异系。赵晓明等^[7]将番茄愈伤组织转接于含番茄早疫病粗毒素的培养基上发现,随毒素浓度的增加,愈伤组织增殖率明显降低,褐化现象加重。刘进平等^[8]报道,辣椒疫霉培养滤液对胡椒茎尖和丛生芽的存活和生长均有抑制作用,且随滤液浓度的升高,茎尖和丛生芽的存活率和生长率均下降。马龙彪等^[9]报道,甜菜褐斑病培养滤液对愈伤组织的诱导率和再生苗率均有一定的抑制作用。本研究则发现,辣椒疫病病原菌粗毒素对辣椒愈伤组织的诱导及增殖有明显的抑制作用,且抑制作用随粗毒素体积分数的增加而增强。由此可见,病原菌粗毒素对离体细胞的确有毒害作用。

在抗病育种中,利用毒素进行抗性筛选时的关键问题是确定毒素使用的浓度与处理方法。如果毒素浓度过高,则材料死亡率大,选择时易导致一些抗性材料丢失;如果浓度过低,选择压力小,又不易选

出高抗材料。赵晓明等^[7]报道,用早疫病粗毒素筛选番茄抗早疫病突变体时,30 %毒素浓度为最佳筛选浓度。刘进平等^[8]在用辣椒疫霉培养滤液体外筛选胡椒抗瘟病无性系时,选择粗毒素浓度为 50 %作为选择剂压力上限,筛选出了抗瘟病胡椒再生植株。吴志凤等^[10]认为,在组织培养中选择存活率为 5 %时的毒素浓度较为合适。本试验以辣椒疫病粗毒素对愈伤组织的毒害作用为基础,结合辣椒疫病粗毒素生物活性测定,综合评定认为,粗毒素合适的筛选浓度为体积分数 60 %。

在筛选过程中,愈伤组织的存活率会随着筛选次数的增加和毒素浓度的增加而减少。为了在后期能获得较多的存活愈伤组织再生植株,本试验接种了大量外植体,这在一定程度上增加了试验成本。本试验中,在存活愈伤组织很少的情况下,为了进一步鉴定其抗病性,从存活的愈伤组织上切取部分愈伤组织扩大再繁殖,取得了良好的效果。

此外,对筛选出的抗性愈伤组织进行抗性稳定性鉴定也是非常必要的。一方面是由于在一定的选择压力下,有部分连续筛选多次的愈伤组织细胞仅仅是生理适应的细胞,而非遗传变异细胞,当其转入正常培养基并培养数代后,其抗性就会随之消失。另外愈伤组织通常从复杂的多细胞类型的外植体上诱导产生,因而其初始生理和遗传具有不一致性;愈伤组织内部的生理特性可使一些细胞为邻近细胞所缓冲,从而逃脱选择压;另一方面是由于内部的敏感细胞可能被抗性细胞所包围,在体外选择中存活下来,并产生不具抗性的植株,甚至有可能在敏感细胞和抗性细胞间通过胞间连丝传递某些具有抗性作用的化合物,这些表型隐蔽作用增加了体外选择的复杂性。虽然在一定程度上可通过连续转接克服这些缺点,但对愈伤组织进行抗性稳定性鉴定,则有助于进一步确定筛选得到的愈伤组织为抗性细胞系。本研究将筛选得到的抗辣椒疫病细胞变异系在无毒素培养基上继代 4 次后,转接到含有体积分数 60 %粗毒素的筛选培养基上发现,抗性愈伤组织仍有一定的

生长量,而对照的生长则完全受到抑制,这说明经粗毒素连续筛选得到的抗性细胞系对辣椒疫病病原菌粗毒素具有稳定的抗性。

总之,利用植物体细胞突变系进行抗性育种,缩短了育种年限,并可广泛获得具各种不同优良性状的突变系。目前在体细胞突变体筛选和利用方面,国

内外已经展开了广泛研究,并有一批具有优良性状的品种(系)应用于杂交育种和生产之中。随着细胞工程研究的深入,利用组织培养的方法诱发变异,筛选突变体,无论在理论和实践上都具有广阔的前景和深远的意义。

[参考文献]

- [1] 刘进平,郑成木. 体外选择与体细胞无性系变异在抗病育种中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 617-630.
- [2] Behnke M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants[J]. Theor Appl Genet, 1979, 55: 69-71.
- [3] Behnke M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*[J]. Theor Appl Genet, 1980, 56: 151-152.
- [4] Behnke M. Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate of *Fusarium oxysporum*[J]. Z Pflanzenzuecht, 1980, 85: 254-258.
- [5] Hartman C.L. Use of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell culture to produce plants resistant to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*[M]. Nevada, MS thesis Univ, 1983.
- [6] Hartman C.L., Mc Coy T.J., Knous T.R. Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*[J]. Plant Science Letters, 1984, 34: 183-194.
- [7] 赵晓明,李明山,宋秀英. 通过组织培养筛选番茄抗早疫病突变体[J]. 山西农业大学学报, 1996, 16(4): 350-353.
- [8] 刘进平,郑成木. 利用辣椒疫霉培养滤液体外筛选胡椒抗疫病无性系研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 528-532.
- [9] 马龙彪,张悦琴,吴则东. 抗甜菜褐斑病体细胞无性系变异的研究[J]. 中国糖料, 2001(1): 1-5.
- [10] 吴志凤,王裕中. 利用禾谷镰刀菌粗毒素筛选抗小麦赤霉病突变体[J]. 江苏农业研究, 1994, 15(1): 35-39.

Study on the selection of cell mutant lines resistant to *Phytophthora capsici* in pepper

QI Fei, GONG Zheng-hui, HUANG Wei

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this study we selected some cell mutant lines by using the cotyledons of three pepper cultivars "2001", "2056", "2031" as explants induced the callus and the filtrate of *Phytophthora capsici* (crude toxin) as the selective agent. The experimental results showed that the crude toxin of *Phytophthora capsici* inhibited the inducement, the growth of callus, and the differentiation frequency and the growth of buds. The inhibition increased with the increase of concentration of crude toxin. The experiment also found that different cultivars had different resistance to *Phytophthora capsici*.

Key words: pepper; *Phytophthora capsici*; crude toxin; cell mutant line; callus