

## 以外种皮珠孔组织为外植体的胡椒体细胞胚再生研究

丁雅雯<sup>1,2</sup>, 代金福<sup>2</sup>, 岑怡<sup>2</sup>, 范睿<sup>2,3,4</sup>, 伍宝朵<sup>2,3,4</sup>, 郝朝运<sup>2,3,4</sup>, 胡丽松<sup>2,3,4\*</sup>

1. 海南大学林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 3. 农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571533; 4. 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 海南万宁 571533

**摘要:** 胡椒是世界知名香料作物, 素有“香料之王”的美誉。建立胡椒组培再生技术, 对于提升种苗繁育效率, 支撑产业快速发展具有重要的应用价值。本研究以我国胡椒主栽品种热引1号 (*Piper nigrum* c.v. Reyin-1) 为材料, 系统研究外植体灭菌、愈伤诱导、体细胞胚分化等关键环节对体细胞再生的影响, 并建立胡椒体细胞再生和组培苗繁育技术。结果表明: 以成熟的种子为材料, 首先用75%酒精表面灭菌45 s, 去除果皮后再用75%酒精对种子灭菌45 s后, 0.1%氯化汞浸泡灭菌6~10 min, 获得无菌种子。无菌的胡椒种子在黑暗条件下萌发2周后获得脱落的外种皮作为胡椒组培体系的外植体。在黑暗条件下, 以胡椒外种皮为外植体诱导愈伤及分化培养, 培养2个月后发现珠孔部位可诱导出愈伤组织, 培养基MS+1.5%蔗糖+0.80 mg/L 2,4-D+1.200 mg/L KT为最佳的愈伤组织诱导和胚性愈伤分化培养基, 愈伤组织诱导率为88.14%, 胚性愈伤分化率约为58.18%; 将愈伤组织接种在体胚诱导培养基上, 培养3个月后发现培养基MS+1.5%蔗糖+0.40 mg/L 2,4-D+0.600 mg/L KT为最佳的体胚诱导培养基, 体胚诱导率为13.33%; 将幼苗接种在生根培养基上, 培养基1/2MS+1.5%蔗糖+0.25%活性炭为最佳生根壮苗培养基, 培养2个月获得胡椒组培苗。综上所述, 本研究提出了利用酒精和氯化汞组合的外植体灭菌方法, 明确了胡椒的外种皮珠孔组织是高效适宜的组织培养外植体; 进一步分析了愈伤诱导、体胚分化、生根培养等体细胞胚胎发生关键过程中的培养基组合及培养条件。研究结果为胡椒高通量组培苗繁育和转基因育种技术研发奠定基础。

**关键词:** 胡椒; 外植体灭菌; 愈伤诱导; 体细胞胚胎发生

中图分类号: S573.9 文献标识码: A

## Somatic Embryogenesis of *Piper nigrum* L. Through Micropylar Tissues of Episperm

DING Yawen<sup>1,2</sup>, DAI Jinfu<sup>2</sup>, CEN Yi<sup>2</sup>, FAN Rui<sup>2,3,4</sup>, WU Baoduo<sup>2,3,4</sup>, HAO Chaoyun<sup>2,3,4</sup>, HU Lisong<sup>2,3,4\*</sup>

1. College of Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 3. Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture & Rural Affairs, Wanning, Hainan 571533, China; 4. Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning, Hainan 571533, China.

**Abstract:** Black pepper (*Piper nigrum* L.) is a world-famous spice crop, known as ‘the king of spice’. The establishment of tissue culture and regeneration technology of black pepper has important application value in improving the efficiency of seedling breeding and industrial development. Here, we investigated the effects of explant sterilization, callus induction, and embryo differentiation in somatic cell regeneration systematically in black pepper, and established the tissue culture technology using the elite cultivar ‘Reyin-1’ as the material. The results showed that episperm micropylar tissues could be employed as the explants. The ripe fruits were first sterilized with 75% alcohol for 45 s, and then peeled

收稿日期 2022-08-02; 修回日期 2022-11-04

基金项目 海南省院士创新平台科研专项 (No. YSPTZX202139)。

作者简介 丁雅雯 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 咖啡和胡椒组培体系在园林中的运用; \*通信作者 (Corresponding author): 胡丽松 (HU Lisong), E-mail: hulis\_catas@163.com。

seeds were sterilized for 45 s in 75% alcohol, followed by 6–10 min of soaking in 0.1% mercuric chloride. The epispem was removed from the plantlet after two weeks culture in darkness, which was used as the explant for somatic embryogenesis. The callus was induced from epispem micropylar tissues within two-month subculture. The optimal culture medium for callus induction and embryogenic callus differentiation was MS+1.5% sucrose+0.80 mg/L 2,4-D+1.200 mg/L KT, and the callus induction rate was 88.14 %, and differentiation rate of embryogenic callus was about 58.18%. The embryo callus were transplanted on somatic embryo induction medium. Somatic embryos were induced on the medium MS+1.5% sucrose+0.40 mg/L 2,4-D+0.600 mg/L KT, with a induction rate of 13.33%. After two months of rooted culture, tissue culture plantlets were obtained, and the optimal medium for rooting culture was 1/2MS+1.5% sucrose+0.25% activated carbon. In conclusion, the study provided a combine method of alcohol and mercuric chloride for explants sterilization, identified that micropylar tissues of the epispem was the best explants for somatic embryogenesis in black pepper. The medium and culture conditions of callus induction, embryo differentiation, rooting culture during somatic embryogenesis were further explored in black pepper. The results would lay a foundation for high-efficiency tissue culture seedling and transgenic breeding in black pepper.

**Keywords:** black pepper; sterilization of the explant; callus induction; somatic embryogenesis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.019

胡椒 (*Piper nigrum* L.) 是胡椒科 (Piperaceae) 胡椒属 (*Piper*) 多年生常绿藤本植物<sup>[1]</sup>, 原产于印度西高止山脉 (印度南部西海岸的马拉巴尔地区, 现属喀拉拉邦), 是世界重要的热带香辛料作物之一, 有“香料之王”的美誉。在医学工业中胡椒被用作健胃剂、解热剂和支气管粘膜刺激剂等。在食品工业被用作抗氧化剂、防腐剂和保鲜剂等<sup>[2-3]</sup>。据统计, 2019 年世界胡椒收获面积达 55.3 万  $\text{hm}^2$ , 总产量达 43.3 万 t。我国胡椒主要分布在海南、云南、广东等省, 种植面积超过 3 万  $\text{hm}^2$ , 年产量达 3.6 万 t, 面积和产量均位居世界第五。其中, 海南是我国的胡椒主产区, 种植面积和产量约占全国 80%<sup>[4-5]</sup>。近年来, 随着我国人民生活水平的不断提高和饮食结构的变化, 胡椒消费量还将大幅增加。市场需求的不断扩大给胡椒产业提供了广阔的发展前景。种苗繁育是产业推广的重要环节, 目前胡椒良种繁殖以传统的扦插为主, 该方法具有种苗优良性状稳定的优点, 但它对苗圃规划、母株选择、苗期培育等环节有着严格的要求, 成本较高, 且无法满足产业快速推进需求<sup>[6-7]</sup>。因此, 基于体细胞再生的高通量育苗技术是产业快速推进的迫切需求。

植物组织培养, 又称为植物离体再生, 一般的过程主要是离体的植物组织, 在适宜的培养条件下, 体细胞通过脱分化形成愈伤组织, 愈伤组织进一步分化成体细胞胚, 然后体细胞胚经历类似合子胚的发育过程, 最终再生成完整植株, 基于体细胞再生的种苗发育技术能够极大地保留种苗的优良性状。同时, 在室内人工环境下进行种

苗繁育, 可避免遭受天气因素的干扰, 生长状态相对一致, 利于集中管理, 降低成本。体细胞组培再生是种苗高通量、规模化、商业化生产应用最广泛的技术。例如, MATHEWS 等<sup>[8]</sup>报道, 以胡椒实生苗的各部位组织为外植体, 仅苗端可以从生芽方式增殖, 但其他部位组织只能产生愈伤组织, 而不能再生植株; BHAT 等<sup>[9]</sup>以同为胡椒属的萎叶 (*P. betle* L.) 和荜拔 (*P. longum* L.) 的各种外植体成功地培养出新植株, 但对胡椒则只能在节环组织上产生不定芽, 其他外植体只能诱导形成愈伤组织而无器官发生; 刘进平等<sup>[10]</sup>以印尼大叶种胡椒的茎尖、合子胚、胚轴片段和子叶片段等为外植体进行了系统的组培再生研究。结果发现尽管采取了 75% 酒精、1% 升汞和 20 g/L 次氯酸钠组合的灭菌手段, 仅成熟的种子可以建立无菌培养。在此基础上, 以无菌种子苗芽尖为外植体建立了胡椒丛生芽诱导技术, 由于后代变异、童期长、再生效率等问题该技术没有在产业上推广应用<sup>[11-13]</sup>。印度香料研究所用成熟的胡椒种子为外植体, 在改良型无生长素的 Schenk and Hildebrandt (SH) 培养基上暗培养, 诱导出愈伤组织, 进而分化出新的植株。尽管该研究提供了胡椒体细胞再生成功的技术方案, 但从研究结果来看, 并没有明确外植体是种子萌发出的胚状体, 还是外种皮珠孔组织<sup>[14]</sup>。前人的研究从外植体选择、灭菌方法及培养条件等方面为胡椒体细胞再生研究提供了重要的参考。本研究以热引 1 号胡椒为研究对象, 利用酒精梯度表面灭菌结合 0.1% 氯化汞对胡椒果实进行处理, 通过无菌种子萌发获得

外种皮外植体；利用对不同的植物生长调节剂种类和浓度配比，筛选出适宜的愈伤诱导培养基、体胚发生和生根壮苗培养条件，为胡椒组培苗的离体快繁技术提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

试验材料为我国主栽品种热引 1 号(*P. nigrum* c.v. Reyin-1) 胡椒，材料种植于中国热带农业科学院香料饮料研究所内的农业农村部万宁胡椒种质资源圃。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体消毒灭菌与接种** 利用酒精和 0.1%氯化汞设置不同条件组合对胡椒果实进行灭菌处理。处理 1：0.1%氯化汞对外果皮直接灭菌 8~10 min，无菌水冲洗 3~5 次后去除果皮获得无菌种子；处理 2：75%酒精对外果皮灭菌 45 s，无菌水清洗 3~5 次，去除果皮后用 75%酒精对种子灭菌 45 s，无菌水清洗 3~5 次获得无菌种子；处理 3：75%酒精表面消毒 45 s，无菌水清洗 3~5 次，去除果皮后用 75%酒精对种子消毒灭菌 45 s，无菌水清洗 3~5 次，0.1%氯化汞浸泡消毒 6~10 min，无菌水清洗 3~5 次后获得无菌种子。灭菌后的种子，接种到萌发培养基上进行无菌培养，2 周后统计污染率。种子萌发培养基选用 MS 培养基为基本培养基，添加 1.5%蔗糖、0.25%活性炭和 0.25%植物凝胶（表 1）。种子材料接种时，每瓶培养基中接种 3~4 粒，29 ℃、黑暗条件下培养 20~30 d，可获得外种皮。

**1.2.2 愈伤组织及体细胞诱导** 将无菌外种皮接种在愈伤组织诱导培养基上，每瓶培养基接种 3~5 粒，每个组合接种 6~8 瓶，重复 3 次。每月继代转接 1 次，继代培养 2 次之后，统计愈伤组织诱导率，

愈伤诱导率=(愈伤组织总数-死亡愈伤组织种壳数)/接种外种皮总数×100%。挑选状态一致的愈伤组织转接在原培养基上，继续继代转接，2 代之后，统计胚性愈伤组织分化率。胚性愈伤组织分化率=分化出胚性愈伤组织的外植体总数/(愈伤组织总数-死亡愈伤组织总数)×100%。愈伤组织诱导和分化培养基均选用 MS 培养基为基本培养基，除添加 1.5%蔗糖和 0.25%植物凝胶外，还附加了 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D, 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60、3.20 mg/L)、3-吲哚丁酸(IBA, 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/L)和 6-糠基氨基嘌呤(KT, 0.075、0.150、0.300、0.600、1.200、2.400、4.800 mg/L) 3 种植物生长调节剂，具体培养基配方如表 1 所示，3 种植物生长调节剂组合出 12 种实验组，未添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基为对照组。胡椒愈伤组织诱导、增殖和分化培养所使用的培养基均未添加活性炭，诱导培养过程均在 27 ℃，黑暗条件下进行。

愈伤每月继代培养 1 次，继代 3 次后。统计出间接体细胞胚胎诱导率，间接体胚发生诱导率=(诱导出体细胞胚的愈伤组织团数)/胚性愈伤总数×100%。发现有体胚长出时，及时转移至光下培养。体细胞胚胎诱导培养基具体成分如表 1 所示。待胚性愈伤分化出球形胚后，转接至 MS 培养基上，每月继代转接 1 次，记录体胚状态变化，直至分化出子叶胚，将诱导出的子叶胚转接在体胚继代培养基上，进而使其分化成完整植株。胡椒体胚继代培养基的组成成分和种子萌发培养基相同（表 1），每瓶培养基中接种 4 粒子叶胚，接种 50 瓶。体细胞胚转接后排放于培养温度 27 ℃，光照周期 12 h/d，光照强度 2000 lx 的条件下进行培养。记录体胚状态变化，胚胎被认为在长出明显的主根和子叶后才叫发芽。

表 1 培养基配方  
Tab. 1 Medium formula

培养基用途 Use of culture medium	基本培养基 Basic medium	活性炭 Activated carbon/(g·L <sup>-1</sup> )	2,4-D /(mg·L <sup>-1</sup> )	IBA /(mg·L <sup>-1</sup> )	KT /(mg·L <sup>-1</sup> )
种子萌发	MS	2.50			
愈伤诱导	MS		0.05~3.20	0.25~4.00	0.075~4.800
胚性愈伤	MS		0.05~3.20		0.075~4.800
体胚诱导	MS		0.05~0.80		0.075~1.200
体胚继代	MS	2.50			
壮苗	1/2 MS	2.50			

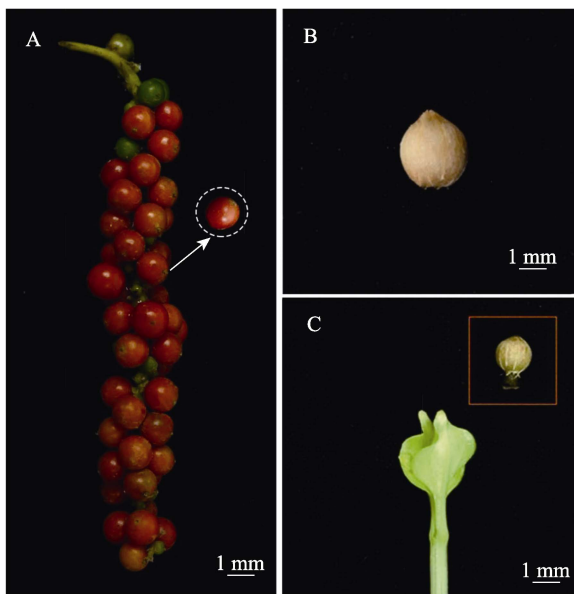
1.2.3 壮苗培养 将子叶胚继代在体胚继代培养基上,待幼苗长出 2 片以上新叶,苗高达 3 cm 以上,继代在壮苗培养基上进行生根壮苗。胡椒壮苗培养基选用 1/2MS 培养基为基本培养基,添加 1.5% 蔗糖、0.25% 活性炭和 0.25% 植物凝胶。每瓶培养基接种 1~2 株幼苗,接种 100 瓶。排放于培养温度 29 °C,光周期 12 h/d,光照强度 2000 lx 的条件下进行培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体灭菌

以充分成熟、红润、饱满、无病虫害的果实为试验材料(图 1),设置 3 种方式进行外植体灭菌处理,具体设置见材料方法。接种在不含植物生长调节剂的 MS 培养基中,放置于黑暗条件下培养 2 周统计污染率。污染率控制在 10% 以内。

在黑暗条件下培养约 3 周,种胚开始萌发,再经过 1 个月左右的培养,获得一棵含两片子叶和一粒种壳的胡椒实生幼苗。无菌实生幼苗再经过 10~30 d 的培养,外种皮从子叶上脱落,获得无菌外种皮作为植物组织培养的外植体材料(图 1C)。



A: 胡椒果穗, 胡椒成熟果实; B: 去除果肉和外果皮的种子; C: 从子叶上脱落的外种皮。标尺为 1 mm。  
A: Ear of black pepper, ripened fruit; B: Seed without exocarp; C: The episperm fall from cotyledons. Bar=1 mm.

图 1 胡椒组织培养外植体

Fig. 1 Explants of black pepper for tissue culture

### 2.2 愈伤组织诱导

以外种皮为外植体开展愈伤组织诱导研究,

以 MS 培养基为对照和基础培养基,设置 3 种植物生长调节剂浓度组合并记录愈伤诱导效果(表 2)。外种皮经诱导培养后在珠孔组织处可见愈伤,生长正常的愈伤形态如图 2A、图 2B 所示。统计结果发现,与 IBA 相比,2,4-D 更益于诱导胡椒愈伤组织,不同浓度的 2,4-D 与 KT 植物生长调节剂组合均能促进胚性愈伤组织的分化,随着浓度的升高,愈伤组织诱导率呈上升趋势,愈伤最高诱导率达 97.62% (表 2)。继代 1 个月后,试验发现不同浓度的 IBA 和 KT 植物生长调节剂组合培养的愈伤组织逐渐死亡,IBA 诱导活性不足,因此 IBA 不适宜作为胚性愈伤分化的植物生长调节剂。

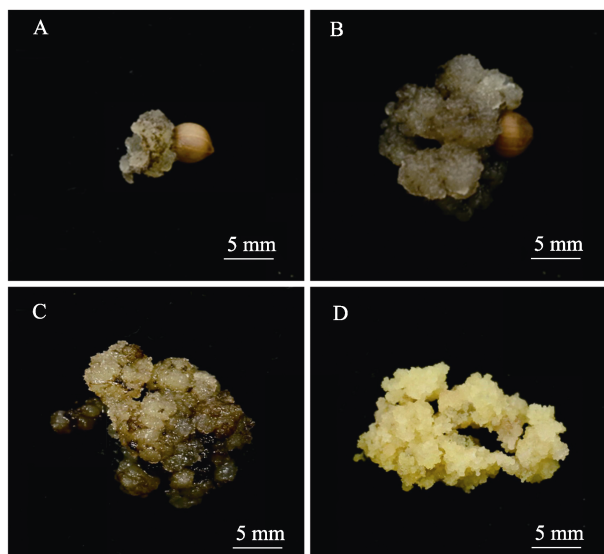
表 2 植物生长调节剂组合对愈伤诱导和胚性分化的影响

Tab. 2 Effects of different plant growth regulator combinations on callus induction and embryo differentiation

植物生长调节剂 Plant growth regulators/(mg·L <sup>-1</sup> )			愈伤诱导 Rate of callus induction/%	胚性愈伤分化率 Differentiation rate of embryogenic callus/%
2,4-D	IBA	KT		
0.05		0.075	15.24	25.00
0.10		0.150	38.47	24.52
0.20		0.300	77.71	34.60
0.40		0.600	78.71	44.82
0.80		1.200	88.14	58.18
1.60		2.400	97.62	15.20
3.20		4.800	96.30	10.60
	0.25	0.075	5.41	
	0.50	0.150	22.22	
	1.00	0.300	45.46	
	2.00	0.600	28.12	
	4.0	1.2	15.38	
0	0	0	1.85	

不同浓度 2,4-D 和 KT 植物生长调节剂组合培养的愈伤组织经过 2 个月的继代培养,2,4-D 浓度为 1.6 mg/L,KT 浓度为 2.4 mg/L 时,部分愈伤组织转化为增殖型愈伤(图 2),增殖生长量大,继代转接 2 周后,增大到 3 倍以上,1 个月后,便布满整个培养瓶,多呈乳白色,质地疏松,半透明状,表面附着白色粉状物或结晶体,却无法分化为胚性愈伤组织。

当 2,4-D 浓度为 0.8 mg/L,KT 浓度为 1.200 mg/L 时,出现灰白色或灰褐色,团粒结构,半透明状与浅黄色,颗粒状,松散的胚性愈伤组织(图 2C、图 2D)。胚性愈伤分化率可达 58.18% (表 2)。



A: 新诱导的愈伤组织; B: 灰白色正常愈伤; C: 褐色的胚性愈伤; D: 黄色的胚性愈伤。

A: New induced callus from epispERM; B: Off-white callus; C: Brownness embryogenic callus; D: Yellow embryogenic callus.

图 2 不同状态的愈伤组织

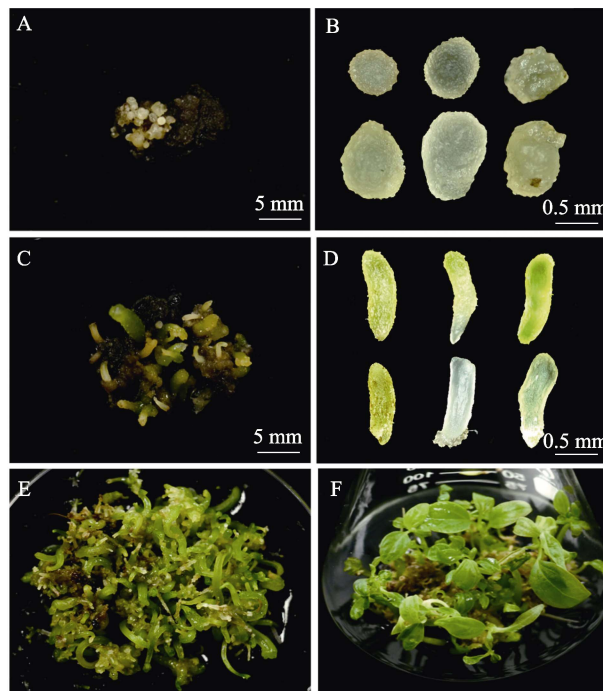
Fig. 2 Callus in different states

### 2.3 体细胞胚胎诱导及体细胞分化

胚性愈伤经过约 3 周的培养, 转化为白色, 结构松散, 颗粒状的体细胞胚, 出现大量球形胚, 少数为心形胚和鱼雷形胚 (图 3A)。试验结果表明, 在相对较低浓度的 2,4-D (0.05、0.10 mg/L) 和 KT (0.075、0.150 mg/L) 组合下, 胡椒愈伤无法诱导出胚状体, 当 2,4-D 浓度为 0.40 mg/L, KT 浓度为 0.600 mg/L 时, 体胚诱导率最高, 为 13.33% (表 3)。将诱导出的球形体细胞胚 (图 3A) 继代转接在含 0.40 mg/L 2,4-D 和 0.600 mg/L 的 KT MS 培养基上, 经过 1 周左右的时间, 转化为心形胚 (图 3B), 3 周后出现鱼雷形体胚和子叶胚 (图 3C、图 3D)。将子叶胚单独转接于体细胞胚继代培养基上, 继带培养约 1 个月, 待子叶胚生长至约 2 cm, 顶部分化出两片绿色小叶后 (图 3E、图 3F) 可进行后续生根诱导培养。

### 2.4 生根诱导与炼苗培养

待子叶完全长成后, 将幼苗转接在 1/2MS 培养基, 添加 1.5% 蔗糖, 0.25% 活性炭和 0.25% 植物凝胶进行生根诱导培养。培养 1 个月后, 叶片宽大, 绿色加深, 有新叶长出, 2 片对生新叶间长有芽点, 并可见新诱导的白色根系, 组培苗生长迅速, 可生长至 5~7 cm (图 4A、图 4B)。待组培苗叶片转为深绿色, 有光泽, 叶脉清晰, 主蔓出现茎节, 茎粗达 0.9 cm, 根系布满培养瓶底



A~B: 胚性愈伤分化培养后的球形胚; C~D: 球形胚分化培养后的胚状体; E~F: 子叶胚。

A~B: The Globular embryo differentiated from embryogenic callus; C~D: Somatic embryos differentiated from globular embryo; E~F: The cotyledon embryo.

图 3 体细胞胚分化的典型状态

Fig. 3 Typical state of somatic embryogenesis

表 3 体胚诱导率

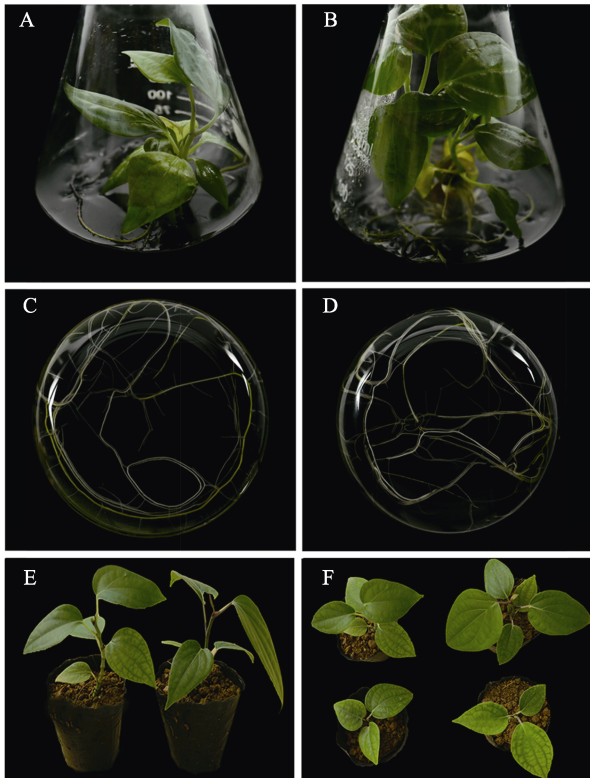
Tab. 3 Somatic embryo induction rate

植物生长调节剂组合 Plant growth regulator combination	体胚诱导率 Somatic embryo induction rate/%	培养材料状态 Materials cultured state
0.05 mg/L 2,4-D+0.075 mg/L KT	0.00	愈伤
0.1 mg/L 2,4-D+0.150 mg/L KT	0.00	愈伤
0.2 mg/L 2,4-D+0.300 mg/L KT	4.76	胚状体
0.4 mg/L 2,4-D+0.600 mg/L KT	13.33	胚状体
0.8 mg/L 2,4-D+1.200 mg/L KT	5.56	愈伤

部 (图 4C、图 4D) 后, 将组培苗移至室外培养基质中进行炼苗培养。培养基质采用草炭土、珍珠岩、蛭石混合物, 比例为 1:1:1, 温室中遮荫培养 2 周后获得组培苗 (图 4E、图 4F)。

## 3 讨论

现有的文献中有关胡椒体胚发生的研究较少, 基于体细胞再生组培苗繁育技术仍有很多细节需完善。前人研究表明, 胡椒体胚发生, 与基因型、外植体生理状态、培养基种类、植物生长调节剂种类、培养条件等诸多因素决定<sup>[15]</sup>。其中, 外植体灭菌是开展组培繁育的第一步。刘进平等<sup>[10]</sup>



A、B: 生根培养 1 个月的组培苗; C、D: 生根培养 1 个月的根 (培养瓶底部); E、F: 壮苗移栽 1 个月。  
A, B: Strong seedlings were cultured for 1 months, and bottle seedlings were cultured in tissue culture; C, D: After the strong seedlings are cultured for 1 months, the roots are covered with the culture medium (photo at the bottom of the culture bottle); E, F: Transplanting strong seedlings for 3 months.

图 4 生根培养与炼苗

Fig. 4 Rooting and hardening culture

用大田胡椒的芽、单节茎段、叶片、幼嫩花絮等材料进行外植体消毒灭菌, 污染率均为 100%, 发现仅有成熟的胡椒种子可以建立无菌培养, 但污染率仍然高达 30%~60%。陈雄庭等<sup>[16]</sup>以胡椒主蔓节间切断为外植体, 其污染率在 45% 以上。印度香料研究所的研究人员报道了以胡椒种子胚为外植体, 通过体细胞再生途径获得胡椒组培苗的方法<sup>[17]</sup>。但文章中并未明确外植体是种子萌发的胚状体还是外种皮珠孔组织。本研究以成熟胡椒种子的外种皮作为外植体, 通过酒精和升汞复合式灭菌处理, 有效地降低了胡椒外植体污染问题, 污染率控制在 10% 以内, 建立了胡椒外植体高效的灭菌方式。同时将种子萌发的胚状体和外种皮分离后培养, 明确了外种皮的珠孔组织是适宜胡椒组培再生外植体。

愈伤组织的诱导分化效率和减少褐变是影响胡椒组培成功的关键。刘进平<sup>[18]</sup>研究发现, 绝大

多数胡椒愈伤组织在后续继代培养中会逐渐褐化直至变黑死亡, 即使加入质量分数 10% PVP 或 0.3% 活性炭也未能阻止愈伤褐变发生。本研究探究了添加植物生长调节剂组合对体胚诱导的影响, 结果表明, 2,4-D 和 KT 组合是最佳的诱导植物生长调节剂组合, 在 2,4-D 浓度为 0.80 mg/L 和 KT 浓度为 1.200 mg/L 时能促进胚性愈伤的诱导。在 2,4-D 浓度为 0.40 mg/L, KT 浓度为 0.600 mg/L 时, 体胚分化率最高, 为 13.33%。同时发现体胚分化的过程中有次生胚发生, 从胚轴下部根茎交接部位发生一丛新的次级胚胎, 可实现体胚循环再生<sup>[18-20]</sup>。该次生体细胞胚胎起源于初生体细胞胚的根茎处, 或是原始体细胞胚附着的胚性愈伤组织, 组织发生增殖, 从而产生大量次生体细胞胚胚团。为实现胚胎发生, 也可以通过适当调节植物生长调节剂种类和浓度配比, 或培养基中其他的有效成分等方式来实现。本研究以建立胡椒组培苗繁育技术为目标, 系统研究了从外植体灭菌、愈伤诱导、体胚分化到室外炼苗过程中的关键技术, 并最终获得组培苗, 研究结果为胡椒高通量种苗繁育提供了全面的技术参考, 具有重要的应用价值。

## 参考文献

- [1] 刘进平, 郑成木. 国外胡椒繁殖方法研究综述[J]. 热带农业科学, 2001(5): 55-58.  
LIU J P, ZHENG C M. A review of studies on breeding methods of pepper abroad[J]. Tropical Agricultural Science, 2001(5): 55-58. (in Chinese)
- [2] 邢谷杨. 中国胡椒生产概况[J]. 世界农业, 2002(8): 19-20.  
XING G Y. Overview of pepper production in China[J]. World Agriculture, 2002(8): 19-20. (in Chinese)
- [3] 何雪莲, 夏秋瑜, 侯晓东, 李远颂, 李从发. 胡椒生产及应用概述[C]//中国热带作物学会. 热带作物产业带建设规划研讨会——其他热带经济作物产业发展论文集, 2006: 13-16.  
HE X L, XIA Q Y, HOU X D, LI Y S, LI C F. Overview of pepper production and application[C]//Chinese Society for Tropical Crops. Seminar on Construction Planning of Tropical Crop Industrial Belt - Collected Papers on the Development of other Tropical Economic Crop Industries, 2006: 13-16. (in Chinese)
- [4] 黄循精. 2002 年世界胡椒的产销综述[J]. 世界热带农业信息, 2003(6): 11-13.  
HUANG X J. Production and marketing of pepper in the world in 2002[J]. World Tropical Agriculture Information, 2003(6): 11-13.

- 2003(6): 11-13. (in Chinese)
- [5] 杨建峰, 邬华松, 孙燕, 鱼欢, 郑维全, 谭乐和. 我国胡椒产业现状及发展对策[J]. 热带农业科学, 2010, 30(3): 52-55.
- YANG J F, WU H S, SUN Y, YU H, ZHENG W Q, TAN L H. Current situation and development countermeasures of pepper industry in China[J]. Tropical Agricultural Sciences, 2010, 30(3): 52-55. (in Chinese)
- [6] 邢谷杨, 邬华松, 谭乐和, 郑维全, 罗邻球. 海南胡椒生产现状、问题及发展战略和对策[J]. 热带农业科学, 1998, 18(5): 54-58.
- XING G Y, WU H S, TAN L H, ZHENG W Q, LUO L Q. Current situation, problems, development strategy and countermeasures of pepper production in Hainan[J]. Tropical Agricultural Sciences, 1998, 18(5): 54-58. (in Chinese)
- [7] GAMBORG O L, PHILLIPS G C. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods[J]. Plant Science, 1995, 114(2): 244-245.
- [8] MATHEWS V E, RAO P S. *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum*) [J]. Current Science, 1984, 53(4): 183-186.
- [9] BHAT S R, CHANDEL K P, MALIK S K. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species[J]. Plant Cell Reports, 1995, 14(6): 398-402.
- [10] 刘进平, 郑成木. 胡椒组织培养研究[J]. 热带农业科学, 2002, 22(3): 18-22.
- LIU J P, ZHENG C M. Study on tissue culture of pepper[J]. Tropical Agricultural Sciences, 2002, 22(3): 18-22. (in Chinese)
- [11] PHILIP V J, JOSEPH D, TRIGGS G S, DICKINSON N M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* L.) through shoot tip cultures[J]. Plant Cell Reports, 1992, 12(1): 41-44.
- [12] 莫玲华, 朱靖杰. 海南重要香料植物组织培养研究进展[J]. 热带农业科学, 2005, 25(1): 44-53.
- MO L H, ZHU J J. Research progress on tissue culture of important spice plants in Hainan[J]. Tropical Agricultural Sciences, 2005, 25(1): 44-53. (in Chinese)
- [13] 刘进平. 胡椒组织培养中污染问题的研究[J]. 热带农业科学, 2003, 23(6): 6-10.
- LIU J P. Study on pollution in pepper tissue culture[J]. Tropical Agricultural Sciences, 2003, 23(6): 6-10. (in Chinese)
- [14] NAIR R, GUPTA S. High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2006, 24(12): 699-707.
- [15] SASI S, BHAT A I. Optimization of cyclic somatic embryogenesis and assessing genetic fidelity in six varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. Journal of Medicinal Plants Studies, 2016, 4(4): 109-115.
- [16] 陈雄庭, 张秀娟, 吴坤鑫. 影响成龄胡椒节间离体培养再生植株的几种因素[J]. 热带作物学报, 2003, 24(4): 14-17.
- CHEN X T, ZHANG X J, WU K X. Several factors affecting the regeneration of pepper internodes *in vitro* [J]. Journal of Tropical Crops, 2003, 24(4): 14-17. (in Chinese)
- [17] RAMAKRISHNAN N R, DUTTA G S. Effect of explants and genotypes on primary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. Cytologia, 2005, 70(2): 195-202.
- [18] 刘进平. 胡椒离体培养和抗疫病无性系选育[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2003.
- LIU J P. Pepper *in vitro* culture and breeding of blast resistant clones[D]. Danzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2003. (in Chinese)
- [19] SASI S, BHAT A I. *In vitro* elimination of *Piper* yellow mottle virus from infected black pepper through somatic embryogenesis and meristem-tip culture[J]. Crop Protection, 2017, 103: 39-45.
- [20] 吉训志, 胡丽松, 秦晓威, 杨艺秋, 范睿, 郝朝运. 胡椒不同时期体细胞胚中糖含量及相关酶活变化[J]. 分子植物育种, 2020, 18(24): 8288-8293.
- JI X Z, HU L S, QIN X W, YANG Y Q, FAN R, HAO C Y. Changes of sugar content and related enzyme activities in somatic embryos of pepper at different stages[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(24): 8288-8293. (in Chinese)