

## 辣椒花药培养的初步研究

黄亚杰, 李素文, 肖 瑜, 高素燕, 张 斌\*

(天津科润蔬菜研究所, 天津 300384)

**摘要:** 以 20 个不同辣椒品种为材料, 采取固液双层培养体系及低温预处理方式, 探索基因型、基本培养基及激素组合、活性炭和低温预处理时间对花药培养的影响, 以期为建立高效辣椒花药培养体系奠定基础。结果表明, 获得了多种不同形态的胚状体及愈伤组织, 以及 4 个易出胚甜椒基因型材料, 分别为红英达、欧卡、巴顿和环球 201。MS+0.05 mg/L KT+0.005 mg/L 2,4-D 以及 NLN-H+0.5 mg/L ZT+0.5 mg/L IAA 培养基适合多个辣椒基因型成功出胚, 出胚率最高达 4.2%。4℃低温预处理 24 h 以及添加 0.5 g/L 活性炭均可以提高辣椒胚状体诱导率。

**关键词:** 辣椒; 基因型; 花药培养; 基本培养基; 激素; 活性炭; 低温预处理

**中图分类号:** S641.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0112-05

## Preliminary Studies on Anther Culture of Pepper(*Capsicum annuum* L.)

HUANG Ya-jie, LI Su-wen, XIAO Yu, GAO Su-yan, ZHANG Bin\*

(Tianjin Kernal Vegetable Research Institute, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** The effects of genotype, basal medium, hormones, activated charcoal and low temperature pretreatment time on androgenesis were investigated from 20 genotypes of *Capsicum* grown with liquid-solid double layer media, so as to lay the foundation for the establishment of effective technology for anther culture in pepper. The results showed that different forms of embryoids and callus tissues were obtained, and the embryos were easily induced from Hongyingda, Ouka, Badun and Huanqiu 201; the addition of 0.05 mg/L KT and 0.005 mg/L 2,4-D in MS culture medium and the addition of 0.5 mg/L ZT and 0.5 mg/L IAA in NLN-H culture medium were suitable for embryoid induction of many genotypes, the ratio of embryoid induction reached up to 4.2%. Meanwhile, pretreatment for 24 h at 4℃ and the addition of 0.5 g/L activated charcoal could promote embryoid induction of pepper.

**Key words:** pepper(*Capsicum annuum* L.); genotype; anther culture; basal medium; hormones; activated charcoal; low temperature pretreatment

辣椒(*Capsicum annuum* L.) ( $2n=2x=24$ ) 属茄科辣椒属, 原产于中美洲和南美洲的热带地区, 是世界上普遍栽培的一种重要蔬菜作物。由于辣椒是常异交植物, 自然纯合速度慢, 而常规育种受到物候期限制选育周期较长, 因此可以通过单倍体育种手段加速育种进程。单倍体育种主要是指通过花药培养或小孢子培养的方式获得单倍体植株, 然后经过自然或

人工加倍获得 DH(doubled haploid) 纯系, 将其用作育种中间材料或亲本的育种方式。花药培养已经应用于我国辣椒遗传育种工作中。陈肖师<sup>[1]</sup>利用花药培养方法选育出甜椒新品种塞花一号。李春玲等<sup>[2]</sup>利用花药培养技术选育出海花一号、海花三号等甜椒品种。Dolcet-Sanjuan 等<sup>[3]</sup>利用改良 NLN-H 培养基并辅以新的培养条件, 提高了辣椒单倍体诱导的出胚

收稿日期: 2014-02-10

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(11JCZDJC17500)

作者简介: 黄亚杰(1985-), 女, 河北沧州人, 研究实习员, 硕士, 主要从事蔬菜育种方面的研究。

E-mail: huanghongli@163.com

\* 通讯作者: 张 斌(1965-), 男, 辽宁庄河人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种方面的研究。E-mail: zhangbin65@126.com

率。Koleva-Gudeva 等<sup>[4]</sup>利用花药培养途径获得 32 个辣椒再生植株,出胚率达 17%。Ercan 等<sup>[5]</sup>利用 11 个不同基因型辣椒为试验材料,培养获得 12 个再生植株。Olszewska 等<sup>[6]</sup>利用花药培养的方法获得 115 个胚状体,其中 46 个成功发育为再生植株。尽管如此,与十字花科蔬菜作物相比,辣椒花药培养仍存在大量技术难题,限制了其应用发展。鉴于此,研究基因型、基本培养基、激素等对辣椒花药培养中胚状体诱导率的影响,以逐步建立辣椒 DH 纯系,以期为进一步杂交育种应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验时间为 2011—2013 年,供试花蕾采自天津科润蔬菜研究所,室内部分在天津科润蔬菜研究所实验室进行。搜集了来源于全国各地栽培的优良辣椒品种以及部分国外 F<sub>1</sub> 杂交种,分别为迪塔、博士王苏椒 5 号、湘研 806、红英达、巨元 116、海丰 23 号、海丰 65 号、海丰 69 号、海丰 70 号、富贵、长帅、欧卡、格美长椒、津椒 10 号、巴顿、206 甜椒、东岳、太空神剑、环球 201、宝禄共 20 个基因型。对试材进行分批次种植,幼苗定植后 30 d,采用常规田间管理。待植株进入花期,对果实和已经开放的花及时采摘,以保持植株旺盛的生长势。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料选择 取样时间为晴朗天气的 8:00—10:00,取花瓣约等长且花药尖端 10%~25% 呈淡紫色的健壮花蕾置于 4℃ 冰箱中冷藏 1 d,待用。

1.2.2 培养基的制备与接种 培养基采用固液双层培养体系,参照 Dolcet-Sanjuan<sup>[3]</sup>的试验方法。在超净工作台上,将已经融化好的固体培养基分装到 6 cm 的培养皿中,每皿约 8 mL。待固体培养基凝固后,加入 4℃ 预冷的液体培养基,每皿约 5 mL。

将花蕾放在 75% 乙醇中浸泡 30 s 后,用 2% 的次氯酸钠加入 1 滴土温消毒 10~12 min,再用无菌水冲洗 3 次,冲洗时间分别为 1、3、5 min。消毒完毕后,用小镊子从花蕾中剥取花药,彻底去除花丝,操作中尽量避免损伤花药。将花药接种到上述分装好固液培养基的培养皿中,每皿接种 20 个花药,用 Parafilm 封口。

### 1.2.3 试验设计

1.2.3.1 基因型 在固液双层 NLN-H 培养基中添加 0.5 mg/L ZT 和 0.5 mg/L IAA,相同条件下按照上述培养方法对参试的 20 个辣椒品种(系)进行花药培养,研究基因型对胚诱导率的影响。

1.2.3.2 基本培养基及激素组合 以红英达、欧卡、巴顿、环球 201 为试材,在 NLN-H 及 MS 固液基本培养基中添加不同质量浓度的激素(表 1),以不添加激素作为对照,研究基本培养基及激素组合对胚诱导率的影响。

表 1 不同激素组合及编号 mg/L

编号	KT	2,4-D	编号	ZT	IAA
P1	0.05	0.005	P5	0.5	0.5
P2	0.1	0.05	P6	2.0	1.0
P3	1.0	0.1			
P4	2.0	0.5			

1.2.3.3 活性炭 以红英达、巴顿、环球 201 为试材,利用 NLN-H 固液双层培养基培养,在下层固体培养基中添加 0.5 g/L 活性炭,以不添加活性炭为对照,研究活性炭对胚诱导率的影响。

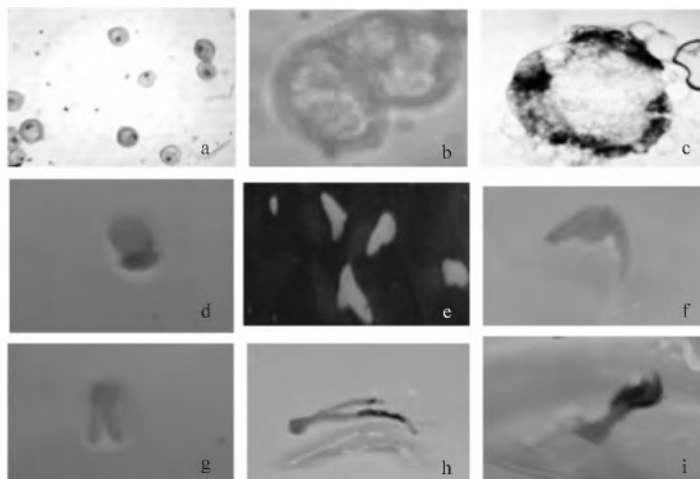
1.2.3.4 低温预处理时间 以红英达、欧卡、巴顿、环球 201 为试材,采摘适宜大小的花蕾,在 4℃ 冰箱内进行低温预处理,设 24 h、48 h、72 h 3 个处理,以未经低温处理的为对照,每个处理接种约 200 个花药,研究低温预处理时间对胚诱导率的影响。

1.2.4 培养与统计 接种后进行低温预处理,置于 9℃ 培养箱中低温暗培养 7 d。继续转至 25℃ 进行暗培养,2 周以后花粉会从花药中自然游离到固液双层培养基中。待幼胚露出即可转至 25℃、光强 2 500 lx 条件下培养,胚变绿后即可挑出转至 NLN-H 固体培养基中继续培养。接种 8 周后统计接种花药数、出胚数,并计算胚诱导率。胚诱导率=诱导胚状体总数/接种花药数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒花药培养小孢子发育情况

选取小孢子发育时期多数处于单核靠边期至单核晚期(图 1a)的花蕾,灭菌消毒,完整剥离花药后接种到固液双层培养基上。10 d 左右采用 FDA 染色观察,发现小孢子已经自然游离到培养基中,其中约 20% 的小孢子细胞具有活力,呈饱满的圆形,而 80% 的小孢子则失活未膨大。接种后约 3 周,可以观察到细胞核的均等分裂(图 1b)。随着培养时间的延长,各级胚状体逐渐形成,图 1c 为球形期胚,图 1e 为子叶期胚,图 1f 为子叶期胚胚根的发生情况。培养过程中出现了一些畸形胚(图 1g-h),畸形胚不能分化成苗,仅生长健壮子叶胚可以顺利分化(图 1i)。同一时期辣椒胚状体的发育程度表现出极不同步的特征,原因在于早期细胞分裂的不同步性。绝大多数材料均能培养产生大量愈伤组织(图 1d),但愈伤组织出芽很难。



a:单核靠边期的小孢子; b:小孢子培养3周后的细胞团; c:球形期胚; d:愈伤组织; e,f:子叶期胚; g,h:畸形胚; i:分化的心形胚

图 1 辣椒花药培养小孢子发育情况

## 2.2 基因型对辣椒胚诱导率的影响

从表 2 可以看出,胚诱导率在供体植株不同基因型间差异很大,诱导出胚的有 8 个基因型,一些基因型

难以诱导出胚,诱导成功率 40%。红英达诱导率最高,为 4.2%,其次为巴顿(3.0%)、欧卡(2.1%)、环球 201(1.4%),这 4 个基因型较适合做花药培养的材料。

表 2 不同基因型对辣椒胚诱导率的影响

编号	基因型	接种花药数/枚	出胚数/个	胚诱导率/%	编号	基因型	接种花药数/枚	出胚数/个	胚诱导率/%
1	迪塔	480	0	0.0	11	长帅	480	0	0.0
2	博士王辣椒 5 号	720	6	0.8	12	欧卡	580	12	2.1
3	湘研 806	680	0	0.0	13	格美长椒	340	0	0.0
4	红英达	380	16	4.2	14	津椒 10 号	480	4	0.8
5	巨元 116	420	0	0.0	15	巴顿	440	13	3.0
6	海丰 23 号	720	0	0.0	16	206 甜椒	460	2	0.4
7	海丰 65 号	520	0	0.0	17	东岳	600	2	0.3
8	海丰 69 号	400	0	0.0	18	太空神剑	540	0	0.0
9	海丰 70 号	500	0	0.0	19	环球 201	740	10	1.4
10	富贵	420	0	0.0	20	宝禄	640	0	0.0

## 2.3 基本培养基及激素组合对辣椒胚诱导率的影响

从表 3 可以看出,红英达、欧卡、巴顿、环球 201 在 MS+P1(KT 0.05 mg/L+2,4-D 0.005 mg/L)和 NLN-H+P5(ZT 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L)培养基中均有胚状体发生。红英达在 NLN-H

+P5 中的诱胚率最高,为 4.2%,其次为欧卡(3.0%)。巴顿在 MS+P1 处理条件下胚诱导率最高,为 3.3%。当 KT 增加至 2.0 mg/L 时,4 个基因型均未诱导出胚,说明高质量浓度 KT 不利于辣椒花药培养胚状体发生。

表 3 基本培养基及激素组合对辣椒胚诱导率的影响

基因型	处理	接种花药数/枚	出胚数/个	胚诱导率/%	基因型	处理	接种花药数/枚	出胚数/个	胚诱导率/%
红英达	MS+P1	120	3	2.5	巴顿	MS+P1	120	4	3.3
	MS+P2	100	2	2.0		MS+P2	120	0	0
	MS+P3	120	2	1.7		MS+P3	120	1	0.8
	NLN-H+P4	120	0	0		NLN-H+P4	100	0	0
	NLN-H+P5	120	5	4.2		NLN-H+P5	120	2	1.7
	NLN-H+P6	120	0	0		NLN-H+P6	120	0	0
欧卡	MS+P1	120	1	0.8	环球 201	MS+P1	120	2	1.7
	MS+P2	120	1	0.8		MS+P2	120	0	0
	MS+P3	120	0	0		MS+P3	120	0	0
	NLN-H+P4	120	0	0		NLN-H+P4	120	0	0
	NLN-H+P5	100	3	3.0		NLN-H+P5	120	3	2.5
	NLN-H+P6	120	0	0		NLN-H+P6	120	0	0

## 2.4 活性炭对辣椒胚诱导率的影响

由表 4 可知,在固体培养基中加入 0.5 g/L 活性炭后,红英达胚诱导率比对照提高了近 1.5 倍,环球 201 胚诱导率比对照提高了近 1 倍。不添加活性炭,巴顿不能诱导出胚,添加活性炭后胚诱导率达 3.3%。活性炭不仅可以提高辣椒小孢子胚诱导率,对改善胚状体发育状况也具有促进作用,添加活性炭后子叶形胚所占胚状体总数比例由 25.00% 提高到 38.46%。

表 4 活性炭对辣椒胚诱导率的影响

活性炭/ (g/L)	红英达	巴顿	环球 201	子叶形 胚比例
0	1.7	0	1.7	25.00
0.5	4.2	3.3	3.3	38.46

## 2.5 低温预处理时间对辣椒胚诱导率的影响

由图 2 可见,进行适当的低温预处理可以提高辣椒胚状体诱导率,以 4℃ 处理 24 h 的胚诱导率最高,当处理时间超过 24 h 后胚诱导率开始下降,处理 72 h 后 4 个基因型均不能诱导出胚,说明低温预处理时间不宜过长。

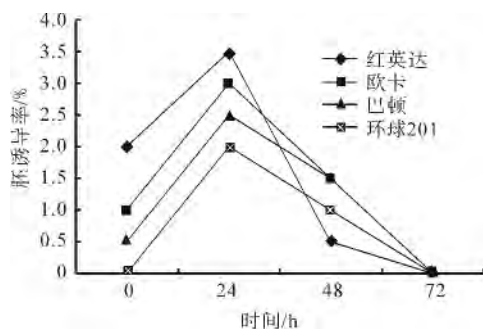


图 2 低温预处理时间对辣椒胚诱导率的影响

## 3 结论与讨论

基因型对辣椒花药培养的效果具有显著影响,不同基因型间出胚率差别很大,部分基因型难以诱导出胚。前人研究认为,辣椒大果基因型胚状体诱导率显著高于小果基因型<sup>[7]</sup>。本试验中,获得 4 个相对易出胚的基因型,分别为红英达、欧卡、巴顿、环球 201,均为大果基因型甜椒。针对这种现象,一些学者采取用诱导率较低的小果基因型与诱导率较高的大果基因型杂交的方法,来提高小果难诱导基因型的单倍体诱导率。基因型之所以对出胚率存在显著影响,原因可能在于植物染色体上存在调控小孢子发育方向的基因。

激素的种类和浓度对调控细胞的分裂、生长和分化起着重要作用。Mythili 等<sup>[8]</sup>研究发现,高浓度

的 2,4-D 和 NAA 可以促进愈伤组织的生成,降低胚状体的生成。本研究也验证了这一观点,2,4-D 质量浓度较高(0.5 mg/L)时,参试基因型培养获得大量愈伤组织,但没有胚状体生成。研究结果表明,高质量浓度 KT(0.3 mg/L)有利于胚状体形成,0.1 mg/L KT 有利于植株再生<sup>[6]</sup>。本研究则发现,低质量浓度 KT(0.05 mg/L)有利于胚状体形成,高质量浓度 KT(>1 mg/L)有利于愈伤组织形成。银婷<sup>[9]</sup>认为,ZT 与 IAA 浓度配比为 1:2 时出胚率较高,本研究结果则表明,辣椒花药培养添加 ZT 和 IAA 浓度配比为 1:1 时胚诱导率最高。这说明不同辣椒供体材料对相同激素处理的反应存在差异。

预处理对于刺激小孢子胚发生非常重要,不经预处理直接接种培养很难获得胚状体和愈伤组织。在辣椒上,低温处理一般采用 4~7℃ 处理 0.5~10 d<sup>[9]</sup>。本试验结果表明,4℃ 处理 24 h 最有利于辣椒花药培养出胚。

活性炭可以吸收植物组织在培养过程中释放的一些有毒代谢物,同时活性炭还可以通过其杂质中的  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  等增加培养基中微量元素的含量,进而促进胚状体的形成和发育。Dolcet-Sanjuan 等<sup>[3]</sup>和 Supena 等<sup>[10]</sup>认为,添加 0.5% 活性炭有利于胚状体诱导率显著提高。本试验也得到相似结论,认为添加 0.5 g/L 活性炭可以提高辣椒小孢子胚诱导率,同时还能够改善胚状体发育状况。

本试验中绝大多数基因型均能培养产生大量愈伤组织,但愈伤组织出芽很难。花药接种 45 d 以后,可见到培养皿中有游离于花药外的胚状体。胚状体诱导成功后,出现一些畸形胚和畸形苗,观察到有如下 4 种不正常的发育现象:不能分化出正常的根和子叶,最后褐化死亡;只分生出 1 片正常子叶,在后续培养中长时间的停滞并死亡;分生出 2 片正常子叶,但叶间没有生长点;子叶玻璃化,无法进一步发育。因此需要进一步优化分化培养基,以获得较高的成苗率。

### 参考文献:

- [1] 陈肖师. 甜椒花药培养及“塞花一号”的育成[J]. 中国蔬菜, 1988(3): 5-7.
- [2] 李春玲, 蒋仲仁. 甜椒花培新品种“海花三号”的育成[J]. 园艺学报, 1990, 17(1): 39-44.
- [3] Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Huerta A. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. — Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1997, 122: 468-475.

(下转第 125 页)

萜烯、酮、脂肪烃、酯类物质组成。百里香香气成分及释放量明显多于猫薄荷、牛至和蓝花鼠尾草,常用于造景的蓝花鼠尾草香气释放量最少,只达到百里香的 1/8。经鉴定,4 种植物主要香气物质为醇类物质,2-乙基-1-己醇在 4 种植物中的释放量均较高,尤其在牛至中占到香气总释放量的 52.90%。百里香中主要挥发物质为 2-乙基-1-己醇、5-甲基-3-庚酮、3-己烯-1-醇、 $\alpha$ -蒎烯和 5-乙基-2(5H)-呋喃酮,猫薄荷主要挥发物质除 2-乙基-1-己醇外还有  $\alpha$ -柠檬烯、2-乙基-二氢[2,1,1]-2-己烯和乙醛。牛至主要香气成分为 2-乙基-1-己醇、 $\alpha$ -罗勒烯、7-甲基十三烷和苯甲醛。蓝花鼠尾草主要香气成分为 2-乙基-1-己醇、戊醛和乙醛。

#### 参考文献:

- [1] 罗吉,黄妙玲,冀红斌,等. 分子蒸馏用于精油精制及在芳香疗法中的应用[J]. 香料香精化妆品,2008(6):40-43.
  - [2] 翟秀丽,俞益武,吴媛媛,等. 芳香疗法研究进展[J]. 香料香精化妆品,2011(6):45-50.
  - [3] 刘志强. 芳香疗法在园林中的应用研究[J]. 林业调查规划,2005,30(6):91-93.
  - [4] 张海涛,娜日苏,熊凤梅,等. 22 种唇形科植物的抗氧化活性研究[J]. 包头医学院学报,2010,26(3):18-20.
  - [5] 冯时. 唇形科香草植物资源及其应用[J]. 安徽农业科学,2012,40(19):10024-10026.
  - [6] 钟瑞敏,王羽梅,曾庆孝,等. 芳香精油在食品保藏中的应用性研究进展[J]. 食品与发酵工业,2005,31(3):93-98.
  - [7] 贺莉娟,梁逸曾,赵晨曦. 唇形科植物挥发油化学成分的 GC/MS 研究[J]. 化学学报,2007,65(3):227-232.
  - [8] 杨敏丽,郝凤霞,韩军. 宁夏固原百里香挥发油化学成分的 GC-MS 研究[J]. 宁夏大学学报:自然科学版,2004,25(4):353-355.
  - [9] 邓雪华,王光忠,孙丽娟,等. 牛至挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 中药材,2007,30(5):555-557.
  - [10] Raguso R A, Pichersky E. Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): Recent evolution of floral scent and moth pollination[J]. Plant Syst Evol, 1995, 194: 55-67.
- 
- (上接第 115 页)
- [4] Koleva-Gudeva L, Trajkova F. Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Acta Hort, 2009, 830: 183-186.
  - [5] Ercan N, Ayar Sensoy F. Androgenic responses of different pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars [J]. Biyoloji Bilimleri Arastirma Dergisi, 2011, 4: 59-61.
  - [6] Olszewska D, Kisiala A, Niklas-Nowak A, et al. Study of *in vitro* anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum* [J]. Turkish Journal of Biology, 2013, 37: 1-7.
  - [7] Mitykó J, Andrásfalvy A, Csilléry G, et al. Anther culture response in different genotypes and F<sub>1</sub> hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Breeding, 1995, 114: 78-80.
  - [8] Mythili J B, Thomas P. Some factors influencing the *in vitro* establishment and callusing of anthers in *Capsicum* (*Capsicum annuum* L. var. *Grossum* Sendt) [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 1995, 38: 126-130.
  - [9] 银婷. 提高辣椒小孢子胚状体诱导率的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
  - [10] Supena E D J, Suharsono S, Jacobsen E J, et al. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(1): 1-10.