

不同培养基及采花期对辣椒花药培养的影响

付文婷, 韩世玉, 邢 丹, 廖芳芳, 苏 丹, 张爱民, 蓬桂华, 何建文

(贵州省辣椒研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要: 以 5 种辣椒为试材, 研究不同培养基、采花期和基因型对辣椒花药培养的影响。结果表明: 辣椒花药培养中, MS 培养基中花药褐化率、污染率均最低, 膨大率最高, 分别为 33.2%、17.5% 和 39.4%; 花药在 3 种培养基中反应不同, 愈伤组织诱导率大小表现为 $B5=CP>MS$, 胚状体诱导率大小为 $MS>CP>B5$ 。以 MS 为基本培养基诱导 5 种辣椒材料的单倍体, 均能诱导出愈伤组织, 国塔 106 愈伤组织诱导率最高, 为 1.18%, 单身如意最低, 仅为 0.24%, 杂 6、8024 和辛香 8 号诱导率为 0.52%~1.03%。其中, 只有杂 6、8024 和辛香 8 号 3 种材料诱导出胚状体, 胚状体诱导率分别为 0.06%、1.25% 和 0.05%, 单身如意和国塔 106 均未诱导出胚状体。说明在相同的诱导条件下, 不同基因型辣椒的单倍体诱导率存在很大差异。在盛花期采样, 辣椒花药培养胚状体和愈伤组织诱导率最高, 分别为 1.482% 和 1.840%。

关键词: 辣椒; 花药培养; 胚状体; 愈伤组织; 培养基

中图分类号: S641.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)10-0083-05

Effect of Different Culture Medium and Florescence on Anther Culture of *Capsicum annuum* L.

FU Wen-ting, HAN Shi-yu, XING Dan, LIAO Fang-fang, SU Dan,

ZHANG Ai-min, PENG Gui-hua, HE Jian-wen

(Pepper Institute of Guizhou, Guiyang 550006, China)

Abstract: Effect of different medium, florescence and genotypes on anther culture of five *Capsicum annuum* L.. The results showed that the browning rates and contamination rate of anther were the lowest in MS medium with 33.2% and 39.4% respectively, the swell rate of anther was the highest in MS medium with 17.5%; the order of callus induction rate was $B5=CP>MS$, the order of embryo rate was $MS>CP>B5$. The callus of five pepper haploids were all induced in MS medium, the callus induction rate of Guota 106 was the highest with 1.18%, the callus induction rate of Danshenrui was the lowest with 0.24%, the callus induction rates of Za 6, 8024 and Xinxiang 8 were from 0.52% to 1.03%. Only embryoid of three genotypes (Za 6, 8024 and Xinxiang 8) were induced among the five genotypes, the induction rate were 0.06%, 1.25% and 0.05%, Guota 106 and Danshenrui did not give birth to embryoid, suggesting that the haploid induction rate was obvious different among different genotypes of *Capsicum annuum* L. under the same culture condition. The callus and embryoid induction rates were the highest in flourishing florescence, the average value was 1.482% and 1.840% respectively.

Key words: *Capsicum annuum* L.; anther culture; embryoid; callus; medium

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 黔科合院所创新([2012]4003); 黔农科合创新基金(2011004)

作者简介: 付文婷(1984-), 女, 青海海东人, 助理研究员, 硕士, 主要从事辣椒遗传育种研究。E-mail: fwt2010@126.com

贵州是全国辣椒产业的优势区域,是重要的出口辣椒制品及干辣椒加工用的鲜椒产地。为加快贵州辣椒的育种效率,丰富当地辣椒资源,通过花药培养可以加速纯合,缩短育种周期。在利用花药培养技术构建 DH 群体时,选择基因型的机会很少,培养基的改进对于提高花药培养的效率显得尤为重要。但关于培养基研究的结果很不一致^[1-3],不同基因型的最适培养基并不相同。另外,不同基因型辣椒的单倍体诱导率存在很大差异^[4-5],有的基因型产胚量低且稳定性差,这些因素都大大影响了辣椒花药培养的进度。为此,采用贵州地方主要辣椒栽培品种及贵州省辣椒研究所的辣椒材料,进行花药培养试验,比较不同培养基对辣椒胚状体和愈伤组织诱导的影响,旨在进一步探索适合辣椒花药培养的最佳培养基和提高不同基因型辣椒花药培养效率的方法,以提高辣椒单倍体诱导率。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料或品种均为杂交一代,分别是杂 6、8024、单身如意、国塔 106 和辛香 8 号 5 个辣椒品种(材料)。其中杂 6 和 8024 由贵州省辣椒研究所辣椒课题组提供,其余购于种子市场。

1.2 试验方法

1.2.1 供试材料 试验于 2012—2013 年在贵州省辣椒研究所综合实验室进行。试材取自贵州省辣椒研究所试验基地,于 2012 年和 2013 年 5 月开始分别取初花期、盛花期及末花期的花蕾(花期判定参照文献[6]),于每天 8:00—9:30 采集萼片与花瓣等长、大小 5~6 mm 的花蕾(小孢子处于单核靠边期),放入冰盒带回实验室。

1.2.2 试验方法 将花蕾用自来水冲洗 20~30 min,再经 75%乙醇浸泡 30 s 后放入 0.1%升汞消毒 8~10 min,无菌水冲洗 3~5 次。将花蕾放在无菌滤纸上吸干水分后,从花蕾中剥出花药,接种于培养基上。每皿接种 3~5 个花药,用 parafilm 膜封口。每个处理 3 皿,重复 3 次。将接种好的花药置入 35℃恒温培养箱中暗培养 8 d,然后转入 26℃下暗培养,20 d 后统计各处理出胚或愈伤组织数。

1.2.2.1 辣椒花药培养最佳培养基的筛选 辣椒花药培养的基本培养基设置为 3 种,分别是 MS、B5、CP 培养基,并添加 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂+3 g/L 活性炭,统计褐化率、膨大率及污染率。褐化率=花药褐化数/接种花药数×100%,膨大率=花药膨大数/接种花药数×

100%,污染率=花药污染数/接种花药数×100%。

1.2.2.2 不同基因型间花药培养效率的比较 供试材料分别为杂 6、8024、单身如意、国塔 106 和辛香 8 号 5 种不同的基因型辣椒,以辣椒花药培养最佳培养基为基本培养基,分别对上述 5 种辣椒进行花药培养,统计胚状体诱导率和愈伤组织诱导率。胚状体(愈伤组织)诱导率=出胚(愈伤组织)数/接种花药数×100%。

1.2.2.3 辣椒花药培养最佳采花期的筛选 以 8024、杂 6 和辛香 8 号为试材,分别在初花期、盛花期及末花期采样进行花药培养,比较不同采花期对胚状体诱导率和愈伤组织诱导率的影响。

1.3 数据处理

采用 Excel 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对辣椒花药培养的影响

2.1.1 不同培养基对辣椒花药褐化、膨大及污染程度的影响 从表 1 可以看出,MS 培养基中的花药膨大率最高,为 39.4%,CP 次之(33.2%),B5 最低(30.6%),但膨大率均在 30%以上;CP 培养基中的花药褐化率最高,为 37.2%,B5 次之(34.6%),MS 最低(33.2%)。B5 的花药污染率高达 25.1%,MS 的污染率最低。综合来看,在 MS 培养基上辣椒花药培养效果最佳,膨大率高、污染率和褐化程度低;CP 培养基培养效果次之,B5 培养基培养效果最差。污染情况可能是由环境和人为操作因素综合作用造成的,所以试验中只能尽量避免花药污染,这样可以大大提高单倍体诱导的成功率。

表 1 不同培养基对辣椒花药褐化率、污染率及膨大率的影响

培养基	接种花药数/个	膨大率/%	褐化率/%	污染率/%
MS	3 152	39.4	33.2	17.5
B5	1 806	30.6	34.6	25.1
CP	2 099	33.2	37.2	19.0

2.1.2 不同培养基对辣椒花药胚状体和愈伤组织诱导率的影响 不同培养基对辣椒花药的胚状体和愈伤组织诱导率的影响有很大差异(表 2)。在 3 种培养基中,MS 和 CP 培养基上花药均能诱导出胚,而 B5 培养基上没有诱导出胚。在 MS 培养基上胚诱导率最高,而在 B5 培养基上胚诱导率最低,两者差 0.34 个百分点。综合分析可知,MS 培养基是适合辣椒花药胚诱导的最佳培养基。

辣椒花药在 3 种培养基上均能诱导出愈伤组

组织,但不同培养基之间愈伤组织诱导率差异不大,B5 和 CP 培养基上诱导率均为 1.1%,在 MS 培养基上诱导率只有 0.5%,B5 和 CP 培养基上愈伤组织诱导率是 MS 培养基上的 2 倍。说明花药在 B5 和 CP 培养基上愈伤组织诱导效果较好。

表 2 不同培养基对辣椒胚状体和愈伤组织诱导率的影响

培养基	接种花药数/个	胚状体		愈伤组织	
		诱导数/个	诱导率/%	诱导数/个	诱导率/%
MS	2 599	12	0.46	13	0.5
B5	1 352	0	0	16	1.1
CP	1 701	2	0.12	19	1.1

2.2 不同基因型对辣椒花药培养的影响

从表 3 可以看出,在相同培养条件下,不同辣椒基因型间的胚状体诱导效果差异较大,在供试的 5 份材料中,有 3 份材料获得了胚状体,5 份材料均获得愈伤组织,基因型成功率分别为 60%和 100%。根据不同材料胚或愈伤组织诱导率的结果,可以将不同基因型辣椒划分为 3 种类型:第 1 类为易出胚或愈伤组织材料,诱导率在 1%以上,属于易出胚的基因型有 8024,易出愈伤组织的基因型有辛香 8 号和国塔 106,其中 8024 的胚诱导率能达到 1.25%,辛香 8 号和国塔 106 的愈伤组织诱导率分别为 1.03%和 1.18%;第 2 类是较易出胚或愈伤组织的材料,其诱导率在 0.1%~0.9%,属于较易出愈伤组织的基因型有杂 6、8024、单身如意;第 3 类是难出胚(愈伤组织)或不出胚(愈伤组织)的材料,其诱导率在 0.1%以下,难出胚的材料有杂 6 和香辛 8 号,不出胚材料为单身如意和国塔 106,没有难出愈伤组织材料。说明基因型是辣椒花药培养的重要影响因素之一。

表 3 不同基因型对辣椒花药胚状体和愈伤组织诱导率的影响

基因型	接种花药数/个	胚状体		愈伤组织	
		诱导数/个	诱导率/%	诱导数/个	诱导率/%
杂 6	3 051	2	0.06	18	0.59
8024	961	12	1.25	5	0.52
单身如意	1 657	0	0	4	0.24
辛香 8 号	3 681	2	0.05	38	1.03
国塔 106	1 183	0	0	14	1.18

2.3 不同采花期对辣椒花药培养的影响

2.3.1 不同采花期对辣椒花药胚诱导率的影响
不同采花期对花药胚诱导率影响很大(图 1),3 种辣椒材料花药胚状体诱导率均在盛花期达到最高,平均诱导率为 1.482%;其次是末花期,为 0.065%;最

差的是初花期,为 0.039%。3 种材料中只有辛香 8 号初花期胚诱导率高于末花期(0.116%>0);杂 6 除了盛花期出胚外,初花期和末花期均未出胚。造成这种现象的原因可能是气候不稳定导致花蕾中的小孢子同步性差,发育不一致。

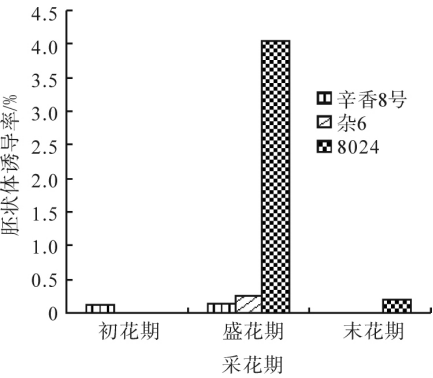


图 1 不同采花期对 3 种辣椒材料胚状体诱导率的影响

2.3.2 不同采花期对辣椒花药愈伤组织诱导率的影响
不同采花期对辣椒花药愈伤组织诱导率影响也较大(图 2),3 种辣椒材料愈伤组织诱导率在盛花期均达到最高,平均诱导率为 1.840%;其次是末花期,为 1.163%;初花期诱导率最低,为 0.039%,这与上述的胚诱导率的结果基本一致。说明辣椒花药愈伤组织诱导率随着花期的推进而提高,到盛花期达到最高,到末花期时,愈伤组织诱导率又降低,但末花期的愈伤组织诱导率高于初花期,可能是初花期正赶雨季,气温不稳定,此时花蕾中小孢子所处的时期大部分都在四分体或单核早期,不利于小孢子向愈伤组织发育,所以初花期的花药愈伤组织诱导率低于末花期。

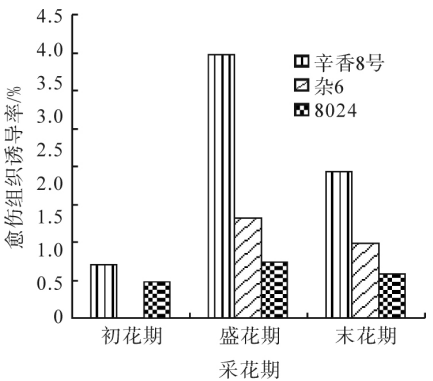


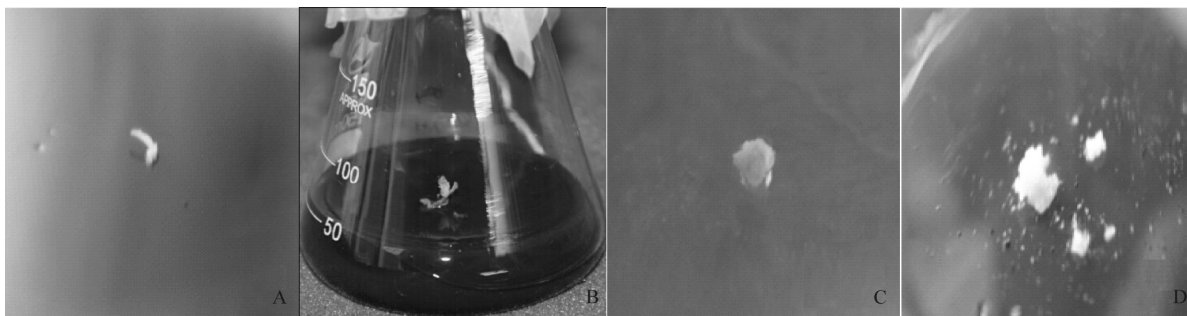
图 2 不同采花期对 3 种辣椒材料花药愈伤组织诱导率的影响

2.4 辣椒花药胚状体和愈伤组织的形态发生

花药接种 15 d 后就有愈伤组织产生,接种 30 d 后胚状体形成(图 3)。用解剖显微镜观察发现胚状体的发生是由裂开的花药中伸出,经过球形胚、鱼雷

胚直到成熟的子叶胚形成(图 3A),也会出现个别畸形胚。畸形胚放置在分化培养基上往往会停止发育,不能进一步分化成再生植株;而成熟的子叶形胚能分化出正常的再生植株(图 3B)。

观察发现,愈伤组织的发生是从开裂的花药周边形成不规则、结构紧致(图 3C)或疏松的(图 3D)乳白色的组织,将该愈伤组织转至分化培养基上往往很难分化出再生植株,再生能力差。



A: 子叶形胚状态; B: 子叶形胚分化的再生植株; C: 结构紧致的愈伤组织; D: 结构疏松的愈伤组织

图 3 辣椒花药诱导出的胚状态和不同形态的愈伤组织

3 讨论

3.1 不同培养基的辣椒花药胚状体和愈伤组织诱导率

选择适合辣椒花药培养的培养基十分重要。本试验结果表明,3 种培养基均能诱导出愈伤组织,B5 和 CP 培养基的愈伤组织诱导率达 1.1%,MS 培养基愈伤组织诱导率最低,为 0.5%。在 MS 和 CP 培养基上均得到胚状体,诱导率分别为 0.46% 和 0.12%,而 B5 培养基上没有诱导出胚。在 3 种培养基上,花药膨大率、污染率和褐化率表现也不相同,MS 培养基上的膨大率最高、污染率和褐化率最低,分别为 39.4%、17.5% 和 33.2%。综上所述,MS 是辣椒花药培养的最佳培养基,这与前人的研究结果一致^[2]。

3.2 不同基因型的辣椒花药培养力

辣椒花药培养受供试植株的基因型影响显著,本试验以 5 种基因型辣椒作为试材进行花药培养,结果表明 5 种材料均获得愈伤组织,3 种材料获得胚状体,愈伤组织诱导率为 0.24%~1.18%,胚诱导率最高为 1.25%,部分材料没有出胚,这与前人的报道一致^[7]。由于供试植株受不同环境及生长季节或栽培条件的综合影响,所以也会导致胚状体和愈伤组织诱导率的差异,这些不仅仅是基因型单个因素影响的表现,也是基因型和其他多个因素共同影响的结果。基因型的差异给辣椒花药培养在育种上的应用带来一定困难,限制了材料的广泛应用。试验中还发现 8024 辣椒材料出胚能力非常强,每个花药的产胚量能达到 9 个,所以选择易出胚材料对辣椒花药培养的成功起关键性作用。

3.3 不同采花期的辣椒花药胚状体和愈伤组织诱导率

不同花期采样,花蕾内部的小孢子发育时期不同,选择小孢子大部分处于单核靠边期的花期能提高花药培养效率。不同花期取材,对花药胚状体和愈伤组织诱导率有一定的影响。本试验结果表明,盛花期取材辣椒花药的胚和愈伤组织的诱导率均达到最高。这可能是由于盛花期处于 6 月底,大田的环境条件和气候条件比较适合花蕾的正常发育,营养状况良好,提高了小孢子的活性及同步性,大部分小孢子都处于单核靠边期。但辛香 8 号在初花期胚诱导率高于末花期。造成此类现象的主要原因可能是同一花蕾内部小孢子发育的不同步,且前期雨水多,后期干旱,整个植株消耗养分也较多,花粉的活力降低,而且不同材料小孢子发育时期也不一致。这与前人的试验结果一致^[8]。

3.4 污染和褐化问题

组织培养过程中污染问题是关系试验成功与否的关键环节之一。辣椒的花期在每年 5—9 月中旬,其中盛花期在 6 月中旬,是花药接种的最佳时期。但 6 月中旬是高温高湿的季节,接种极易污染。花蕾用升汞灭菌时间从 5 min 增加到 10 min,但污染率仍在 15% 以上,因而大大影响试验效率。

另一个造成花药培养效率低的原因是普遍存在着褐化的问题,褐化影响花药组织活力,大大降低了胚状体的诱导率。活性炭对花药培养的影响表现在存在相互对立的两方面,吸收有害物质促进胚的发生,或者因吸收培养基中的有益物质阻碍胚形成。本试验发现添加活性炭效果不明显,虽然添加了 3 g/L 的活性炭,但花药褐化率 (下转第 94 页)

4 品种特征特性

圣达尔属中晚熟品种,全生育期 108 d,果实成熟天数为 33 d,第一雌花节位为第 6—7 节,雌花间隔 7 节。植株分枝性中等偏强,主蔓 350 cm,茎粗 1.0~1.1 cm,节间长 8~10 cm。雌雄同株异花,植株生长健壮,叶片肥大,易坐果,叶片肥大,轻抗枯萎病,兼抗炭疽病,少发生病毒病。果实椭圆形,果形指数 1.56,果皮黑色,果面光滑,皮厚 1.3 cm,果皮硬,较耐贮运,果肉红,肉质脆沙,无空心,最大单瓜质量 10.3 kg,平均单瓜质量 6.2 kg,平均产量 47 964.0 kg/hm²,果实中心可溶性固形物含量 11.8%、边部 9.8%。种子卵圆形,褐色,千粒重 94.7 g。

5 栽培要点

河南省地膜覆盖栽培一般于 3 月中旬育苗,4 月下旬定植,也可于 4 月上旬直播;圣达尔西瓜属大果型品种,应适当稀植,6 000~7 500 株/hm²,采用三蔓整枝,主蔓第三雌花留果,将多余幼瓜摘除;定植或直播前施足基肥,主要 N、P、K 配合施用;根据植株生长情况进行浇水,开花坐果期禁止浇水,幼果坐稳后保证充足水肥供应;病虫害以防为主,防治结

合;适时采收。

参考文献:

- [1] 刘君璞,许勇,孙小武,等.我国西瓜甜瓜产业“十一五”的展望及建议[J].中国瓜菜,2006(1):1-3.
- [2] 霍治邦,李相涛,张存松,等.西瓜新品种开杂 12 号的选育[J].河南农业科学,2003(9):60.
- [3] 张勇,张显,马建祥,等.西瓜新品种农科大 6 号的选育[J].北方园艺,2008(7):72-73.
- [4] 徐小利,常高正,荆艳彩,等.优质高产西瓜新品种凯旋的选育[J].中国蔬菜,2007(11):31-33.
- [5] 杜晓莉.西瓜新品种锦辉的特征特性及栽培技术[J].现代农业科技,2011(2):136-138.
- [6] 都娟,司艳红,田保明,等.少籽多抗西瓜新品种福祺早抗 3 号的选育[J].河南农业科学,2012,41(9):120-121.
- [7] 王果萍.双抗 8 号西瓜新品种的选育[J].山西农业科学,2002,30(3):49-51.
- [8] 王浩波,王凤辰,高秀武,等.丰乐黑优美西瓜新品种的选育和推广[J].中国瓜菜,2012,25(2):24-26.
- [9] 孙德玺,候洪淼,谭慧明,等.高产、优质西瓜新品种汴杂九号的选育[J].现代农业科技,2006(7):123-124.
- [10] 焦定量,段爱民,张艳宁,等.西瓜新品种选育——津抗黑顶峰[J].天津农业科学,2003,9(1):54-56.

(上接第 86 页)

都在 30% 以上,这与前人报道一致^[9]。但是同一处理或同一皿花药褐化和污染程度不同,这就需要采取合理的措施将污染率和褐化率降低,从而提高辣椒花药培养效率。

影响辣椒花药培养的因素很多,除本研究所所述的不同花期、基因型和培养基的影响因素外,如激素配比和浓度、供试材料的生长状况及预处理等都是影响花药培养的关键因素,阐明整个培养过程中的小孢子发育及调控机制和培养条件有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lantos C, Juhász A G, Vági P, et al. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Biotechnology Rep, 2012, 6:123-132.
- [2] Kim J Y, Kim Y S, Yi G, et al. Anther culture of transgenic pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Korean J Breed, 2005, 37:241-246.
- [3] Iwona J, Anna K, Dorota O. Haploid formation through androgenesis and polyembryony in cultivated and wild

genotypes of *Capsicum* genus [M] // Niemirowicz-szczytt K. Progress in research on *Capsicum* and eggplant. Warsaw, Poland: Warsaw university of life Science Press, 2007:377-384.

- [4] Nowaczyk P, Nowaczyk L, Olszewska D, et al. Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *C. chinense* Jacq. hybrids [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31:877-879.
- [5] Nowaczyk P, Olszewska D, Kisiala A. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures [J]. Euphytica, 2009, 168:225-233.
- [6] 申书兴,梁会芬,张成合,等.提高大白菜小孢子胚胎发生及植株获得率的几个因素研究[J].河北农业大学学报,1999,22(4):65-68.
- [7] Rodeva V N, Irikova T P, Todorova V J. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.); Comparative study on effect of the genotype [J]. Biotechnol Eq, 2004, 18:34-38.
- [8] 付文婷.大白菜游离小孢子胚诱导及植株再生技术研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [9] 王立浩,张宝玺,郭家珍,等.辣椒花药培养中若干影响因素的研究[J].园艺学报,2004,31(2):199-204.