

doi:10.11937/bfyy.20170971

新疆加工型辣椒花药培养技术研究

赖黎丽^{1,2}, 张嘉园¹, 杨梅¹, 宋文胜², 朱华国¹

(1. 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆隆平高科红安种业有限责任公司, 新疆 石河子 832000)

摘要:以6个新疆加工型辣椒品种207、208、64、66、67、HT113为试材,以MSB培养基为基本培养基,附加不同植物激素浓度的NAA、2,4-D、TDZ、KT进行花药培养,研究不同植物激素处理对加工型辣椒花药愈伤组织和胚状体诱导的影响,以建立适应于新疆加工型辣椒的花药培养技术。结果表明:不同基因型辣椒的愈伤组织诱导率和出胚率均不同,愈伤组织诱导率为4.98%~29.65%,胚状体诱导率为0~6.88%。 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT分别是愈伤组织诱导和胚状体诱导最适宜的激素组合;在新疆特有的气候条件和种植模式下,7月中旬前的花药接种培养最为适宜;胚状体继续发育成熟后,通过练苗移栽获得了56株单倍体植株。

关键词:辣椒;花药培养;胚状体

中图分类号:S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)19-0006-05

加工型辣椒是新疆近年来发展速度非常快的经济作物,年种植面积逾3.3万 hm^2 ,干椒年产量15万~20万t,筛选适应新疆当地气候和生产环境的加工型辣椒品种,以满足加工和市场需求成为了新疆辣椒育种工作的重要目标。目前,同其它许多植物一样,辣椒育种同样存在优质种质资源缺乏,遗传背景狭窄等问题。花药培养能够分离获得一些具有特殊性状的育种材料,并通过加倍处理快速获取纯合的育种材料,是一种经济、快速、有效的育种手段。

辣椒花药培养早在1973年,王玉英等^[1]和GEORGE等^[2]报道获得了辣椒单倍体植株。目前,花药培养已成为一项比较成熟的技术,广泛应用于辣椒的育种工作中,并已选育出了很多辣椒

新品种,但同时辣椒花药培养受基因型和植物激素影响较大,仍然存在出胚率低、基因型限制等问题^[3]。该试验选用在新疆气候条件适应性强、早熟性好、丰产和抗病能力较强且加工性能较好的6个辣椒品种进行花药培养,通过设置不同的植物激素组合对不同时期花蕾进行花药培养,为建立新疆加工型辣椒花药培养技术奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为新疆隆平高科红安种业有限责任公司培育的代号为207、208、64、66、67、HT113的6个辣椒品种。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的选择与处理

供试材料于春季(4月)种植于大田中,待现蕾后,选取无病虫害植株的花蕾。取材时间一般在温度较低、日照较弱的08:00—10:00,以防失水过多影响试验结果。为防止温度过高,将取好的材料立即放于冰盒中,选择花瓣与花萼近等长或根据花药颜色以1/3为紫色的花蕾,放置于

第一作者简介:赖黎丽(1983-),女,硕士,农艺师,现主要从事园艺植物生理等研究工作。E-mail: 58859598@qq.com

责任作者:朱华国(1979-),男,博士,副教授,现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail: zhng_agr@shzu.edu.cn

基金项目:兵团人才发展博士后专项资助项目(CZ0014)。

收稿日期:2017-07-18

4 ℃冰箱预处理 1~9 d。

1. 2. 2 培养基的制备

以 MS 培养基为基本培养基,含 3%(W/V)蔗糖,0.9%(W/V)琼脂,附加不同浓度的 NAA、

2,4-D、TDZ、KT,详见表 1。采用高压蒸汽灭菌、灭菌压力为 1.2 kg·cm⁻²,温度为 121 ℃,灭菌时间为 15 min。

表 1
Table 1 Medium codes and its hormone concentrations

培养基编号 Medium code	2,4-D	KT	TDZ	NAA	继代培养基编号 The secondary culture medium code	2,4-D	KT	TDZ	NAA
1	0.10	0.1			①	0.05	0.1		
2	0.10	0.5			②	0.05	0.5		
3	0.50	0.1			③	0.20	0.1		
4	0.50	0.5			④	0.20	0.5		
5	0.50		0.1		⑤	0.20		0.1	
6	0.50		0.5		⑥	0.20		0.5	
7		0.1		0.5	⑦		0.1		0.2
8	0.05	0.1		0.3	⑧	0.05	0.1		0.1

1. 2. 3 接种

将处理好的材料在超净工作台无菌条件下,把花蕾放在 0.1%升汞溶液中表面消毒 10 min,内用无菌水冲洗 3 次,倾倒在无菌滤纸上,用 2 把尖头小镊子,一把夹住花蕾底部一把镊子将花瓣部分拔出,然后将花瓣剥离开取出花药,接种在已灭菌的培养基上,每皿放 30 个左右的花药即可,Parafilm 膜封口。

1. 2. 4 培养与统计

将接种了花药的培养皿放入 28 ℃的恒温培养箱中黑暗培养,4 周后继代于生长素减半的 MS 培养基上,(28±1)℃光照培养至分化成苗。4 周后统计出现愈伤组织的花药数目并计算出愈率;8 周后计数胚状体数目并统计出胚率。

1. 2. 5 植株再生、倍性鉴定及加倍

获得的胚状体转移至不含植物激素的 1/2MS 培养基中生根培养,待长出粗壮根系后水中练苗,取根系进行染色体鉴定。练苗完成后,将

鉴定为单倍体的植株移栽至营养钵中,待植株生长正常后,用 0.25%秋水仙素加倍处理 12 h,此后正常管理直至结果。

2 结果与分析

2. 1 基因型对愈伤组织和胚状体诱导的影响

接种培养 4 周后统计出愈率,从表 2 可以看出,6 个品种均能诱导出愈伤组织,207、208、64、66、67、TH113 的出愈率分别为 25.93%、27.68%、15.93%、29.65%、9.35%、4.98%;仅有 207、208、64、66 这 4 个品种诱导出胚状体,出胚率分别为 0.28%、2.63%、0.12%和 6.88%。产生胚状体的 4 个品种中出胚率差异显著,出胚率从高到低依次为 66>208>207>64。说明 66 和 208 品种对这 8 种激素的适应性更强。表明基因型很大程度上决定了辣椒花药培养出胚率的高低和对激素适应度的不同。

表 2
Table 2 Callus and embryo induction of different genotype anthers

品种代码 Varieties code	接种数总和 Sum of inoculated	出愈数总和 Sum of callus	出胚数总和 Sum of embryo	出愈率 Callus rate/%	出胚率 Embry rate/%
207	3 591	931	10	25.93	0.28
208	3 197	885	84	27.68	2.63
64	2 536	404	3	15.93	0.12
66	1 366	405	94	29.65	6.88
67	1 112	104	0	9.35	0
HT113	2 651	132	0	4.98	0

2.2 不同植物激素组合对愈伤组织和胚状体诱导率的影响

由表3可知,有胚状体产生的培养基主要是编号为1、2、7、8号不同激素配比的培养基,但是在7号培养基中,207、208、66不同基因型的品种均诱导出胚状体,表明NAA、KT 2种激素更广泛适合辣椒花药单倍体培养。由此推测,在做不同基因型辣椒花药单倍体培养时,可以将NAA和KT作为主要激素,调整其浓度或者添加其它

植物激素,以此来增加胚状体诱导成功的几率。

在相同培养条件下,对激素的需求也是不同的,即便是207、208、64和66产生胚状体,但是这4个品种对8种不同配比激素培养基的适宜程度不同。207在2号培养基中出胚率最高,64对1号培养基较适应,208和66却适宜7号、8号培养基。由此可见,不同基因型的辣椒进行花药培养时所需的激素配比是不同的。

表3 不同激素处理对愈伤和胚状体诱导的影响

Table 3 Effect of different hormone treatment on callus and embryo induction

培养基编号 Medium code	激素浓度 Hormone concentration/(mg·L ⁻¹)				愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	胚状体诱导率 Embryoid induction rate/%
	2,4-D	KT	TDZ	NAA		
1	0.1	0.1			10.53	2.53
2	0.1	0.5			14.92	0.76
3	0.5	0.1			14.84	0.22
4	0.5	0.5			16.87	0.00
5	0.5		0.1		42.31	0.00
6	0.5		0.5		24.95	0.00
7		0.1		0.5	23.18	4.39
8	0.05	0.1		0.3	20.83	1.93

2.3 接种时间对愈伤和胚状体诱导率的影响

试验接种的花蕾分3次采摘,均采自同一批植株,接种时间分别是7月1、14、23日。从表4可以看出,7月1日和7月14日接种的花药诱导出的胚状体比例较高,而7月23日接种的花药污

染严重,几乎无胚状体产生,原因可能是7月下旬病毒病较多,易产生二次污染,同时也可能是7月下旬的花药已经处于其花粉小孢子生育期的末期,活力衰退,因此胚状体的诱导率很低。

表4 不同接种时间对愈伤和胚状体诱导的影响

Table 4 Effect of different inoculate time on callus and embryo induction

接种日期 Inoculated date/(月-日)	接种数 Inoculated number/个	出愈数 Callus number/个	出苗数 Seedling number/个	出愈率 Callus rate/%	出胚率 Embryo rate/%
07-01	8 154	2 221	116	27.24	1.42
07-14	3 574	405	63	11.33	1.76
07-23	3 287	107	12	3.26	0.37

2.4 植株再生及加倍

将接种了花药的培养皿放入28℃的恒温培养箱中黑暗培养,4周后继代培养至生长素减半的培养基中,直至有胚状体长出(图1A、1B)。当胚状体继续生长至成熟植株时进行水培练苗生根(图1C),待长出粗壮根系后移栽土钵中(图1D),生长正常后脱脂棉蘸用0.25%秋水仙素加倍处理12h(图1E)。

3 讨论

试验研究了不同基因型、植物激素类型与浓度、接种时间对愈伤组织诱导和胚状体萌发的影响,为新疆加工辣椒花药培养奠定了一定基础,以下将从3个方面进行讨论。

3.1 不同基因型对辣椒花药培养的影响

不同基因型对辣椒花药培养中胚状体的诱导

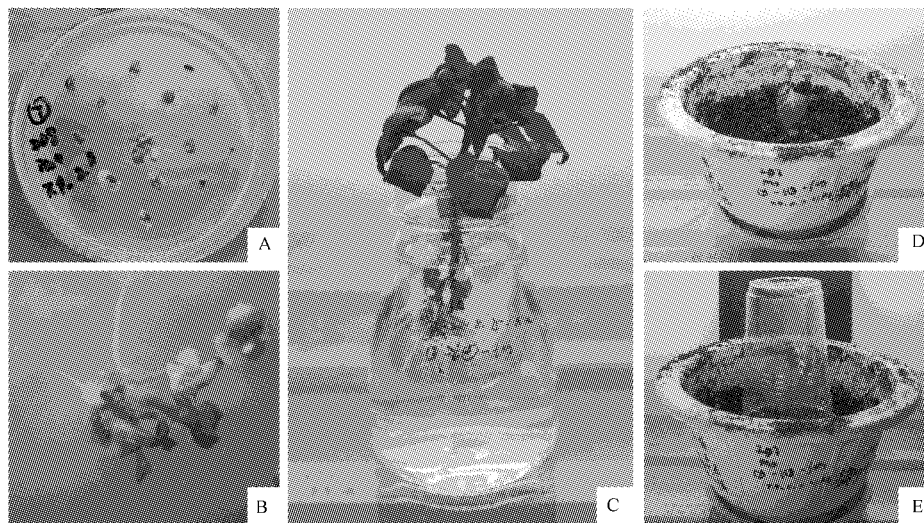


图 1 辣椒花药培养及加倍处理

Fig. 1 Anther culture and reduplication treatment in pepper

频率有显著影响,即使在选择相同的预处理方式、培养基激素配比和培养条件,不同的材料间也有着显著的差异。与李春玲等^[4]、KRISTIANSEN 等^[5]对不同基因型材料在采用相同的培养条件下,胚状体的诱导频率变化差异很大^[6]的观点相一致。在同一类型辣椒中,不同品种的杂交种出胚率差异也很大,MITYKO 等^[7]、DUMAS 等^[8]研究辣椒不同基因型诱导率时,大部分的研究结果表明,大果基因型材料比小果基因型材料的诱导率高。如果将诱导率高的大果基因型与诱导率低的小果基因型杂交,其后代的诱导率介于父母本之间^[9]。此观点也印证了在利用杂交种作接种材料时,双亲之中有诱导频率较高的品种,其杂交种的诱导频率也高^[10]。

3.2 植物激素种类与浓度对辣椒花药培养的影响

辣椒花药出胚率的高低除了花药自身的因素外,还有一个重要原因就是激素的种类和配比,不同的激素和浓度对比对花药胚状体的诱导影响很大^[11-12]。目前运用较为广泛的激素有 NAA、BA、KT、2,4-D 等,根据不同试验材料所选用的具有能诱导出胚状体的激素配比没有固定的模式,需要经过多次配比试验才能最终得出相对适宜的激素搭配和激素配比浓度。该试验中所选用的 4 种激素中有一种新型激素 TDZ(隆重氮苯基脲),TDZ 是由西安近代化学研究所最新研制而成的

新型激素,其细胞活性大大超过其它激素,在辣椒花药单倍体培养中未曾使用过,经试验发现该激素对愈伤组织的诱导有着很显著的作用,可以在此后的试验中进一步研究和探索。该试验中同样是不同激素配比和浓度诱导出的愈伤和胚状体数量差异很大,出胚数最多的激素搭配是 NAA 和 KT 的使用,用量在 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。

3.3 接种时间对辣椒花药培养的影响

不同时期的花蕾,其花药的活性有一定差异,王玉英等^[9]学者在花药培养时对比了单核早期、单核靠边期、双核期,并指出单核靠边期的小孢子经花药培养的胚诱导率是最高。此外,李春玲等^[4]指出小孢子的发育与花蕾的外部形态有一定的相关性。在正常季节,单核靠边期的花蕾长度一般为 $0.40 \sim 0.45 \text{ cm}$,花瓣与花萼等长,剥掉花瓣所见花药颜色为黄绿色或略带紫色。KRISTIANSEN 等^[5]研究表明,早期花蕾作为花药培养材料是合适的,一般采用从开始开花到 1~4 周的花药培养效果较好。此时期空气湿度小、光照充足、花粉发育正常,适合小孢子胚发育。张树根等^[6]和付文婷等^[13]研究表明,即使在可以控制温、湿度的温室中种植接种植株,不同的接种季节对胚状体的诱导也有较大的影响,春季随着光照强度和光照时间的增加,胚状体的诱导频率随着增加,进入夏季,其频率则随之下降。另外,此时

期大田病害较少,大大降低了花蕾携带病菌及污染的风险。该试验也是根据前人的试验经验进行操作,但由于新疆特有的天气情况和种植习惯,接种时间安排在7月中旬前较为适宜,具体还要依据品种的现蕾情况决定。

4 结论

MSB培养基附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 分别是愈伤组织和胚状体诱导最适宜的激素组合,愈伤组织和胚状体诱导率最高分别可达 29.65% 和 6.88%;在新疆特有的气候条件和种植模式下,对7月中旬前的花药接种培养效果最好。该研究中胚状体继续发育成熟后,通过练苗移栽获得了56株单倍体植株。

参考文献

- [1] 王玉英,孙敬三,王敬驹,等. 小黑麦和辣椒花粉植株的诱导率[J]. 中国科学,1973(1):104-107.
- [2] GEORGE L, NARAYANASWAMY S. Haploid capsicum through experimental androgenesis[J]. Protoplast, 1973, 78: 467-470.
- [3] 张馨宇,王永成,刘爱群,等. 辣椒花药培养研究新进展[J].

中国农学通报,2007(8):331-334.

- [4] 李春玲,蒋钟仁. 甜辣椒花药培养单倍体育种技术[C]//邹学校. 中国辣椒. 北京:中国农业出版社,2000:191-205.
- [5] KRISTIANSEN K, ANDERSON S B. Effects of donor plant temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. [J]. Euphytica, 1993, 67: 105-109.
- [6] 张树根,沈火林. 辣椒花药培养单倍体育种技术研究进展[J]. 辣椒杂志,2006(3):1-5.
- [7] MITYKO J, ANDRASZALVY A, CSILLERY G, et al. Anther-culture response in different genotypes and F_1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Breeding, 1995, 114: 78-80.
- [8] DUMAS der V R, CHAMBONNET D, POCHARD E. Culture *in vitro* d'antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): Amelioration destauxd' obtention de plantes ches differents genotypes par des traitements a $+35^\circ\text{C}$ [J]. Agronomie, 1981(1): 859-864.
- [9] 王玉英,李春玲,蒋钟仁. 辣椒和甜椒花药培养的新进展[J]. 园艺学报,1981,8(2):41-45.
- [10] 张恩让,须海丽. 贵州地方辣椒花药培养体系的初步研究[J]. 辣椒杂志,2005(4):24-27.
- [11] 赵激,邹学校. 不同培养基对辣椒花药培养的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2010(4):181-187.
- [12] 王仲慧,刘金兵,刁卫平,等. 辣椒花药培养胚状体发生途径影响因子研究[J]. 核农学报,2015(8):1471-1478.
- [13] 付文婷,廖芳芳,何建文,等. 不同温度和外源添加物对辣椒花药的培养效果[J]. 南方农业学报,2015(4):635-640.

Technological Study of Processing Pepper Anther Culture in Xinjiang

LAI Lili^{1,2}, ZHANG Jiayuan¹, YANG Mei¹, SONG Wensheng², ZHU Huaguo¹

(1. College of Agronomy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000; 2. Xinjiang Longping High-Tech Hongan Seeds Co. Ltd., Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: Six processing pepper varieties 207, 208, 64, 66, 67 and TH113 in Xinjiang were used for anther culture. The anthers in different stages were induced in basic MSB medium supplemented with NAA, 2, 4-D, TDZ and KT in various concentrations. Effects of different hormone treatment on processing pepper anther culture were studied, and established a suitable anther culture method for processing pepper in Xinjiang. The results showed that different ratio of callus induction and embryo induction emerged in different genotype peppers, the ratio of callus induction were 4.98%—29.65% and the ratio of embryo induction were 0—6.88%. $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT were the suitable hormone combination for callus induction and embryo induction, respectively. Anther culture conducted before middle of July in Xinjiang was effective. In this study, 56 haploid plants were achieved by acclimatization and transplant followed embryo development.

Keywords: pepper; anther culture; embryo