

辣 (甜) 椒游离小孢子培养中的雄核发育和胚胎发生

李春玲^{*}, 佟曦然, 朱至清, 顾淑荣, 蒋钟仁, 张树根

(北京市海淀区植物组织技术实验室, 北京 100091)

摘要: 对灯笼椒、牛角椒、羊角椒、线形椒和朝天椒等辣 (甜) 椒游离小孢子的培养与观察表明: 在雄核发育过程中, 分离后仍膨大的小孢子能够继续发育, 皱缩的小孢子则死亡; 小孢子最初的细胞分裂有均等和不均等两种方式; 脱分化的小孢子可经历胚胎发生和器官发生两种发育途径, 二者之间可相互转换; 胚胎发生过程与合子胚发育过程极相似, 直到心形胚以前均可观察到胚柄的存在; 成熟的胚状体能够萌发, 但胚根端生长的能力远远比胚芽端强; 观察到胚状体发生不同步及多种畸形发育形式; 小孢子在分裂早期如果突破花粉壁会形成薄壁细胞团, 继续发育为愈伤组织, 进而转向器官发生途径; 小孢子愈伤组织易形成不定根, 可形成次生胚状体, 未观察到不定芽的发生。不同类型辣 (甜) 椒游离小孢子的雄核发育与胚胎发生程序相同。

关键词: 辣 (甜) 椒; 游离小孢子; 雄核发育; 胚胎发生; 细胞学观察

中图分类号: S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 11-1613-08

Androgenesis and Embryogenesis in Isolated Microspore Culture of *Capsicum annuum* L.

LI Chun-ling^{*}, TONG Xi-ran, ZHU Zhi-qing, GU Shu-rong, JIANG Zhong-ren, and ZHANG Shu-gen
(Laboratory of Plant Tissue Culture Technology of Haidian District, Beijing 100091, China)

Abstract: Androgenesis and embryogenesis were observed in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. Different fruit types of sweet and hot pepper were used as experimental materials. The results indicated that the microspores expanding in volume after pretreatment and isolation continue to develop while the shrivelled ones were dead and that the first sporophytic division was symmetric or asymmetric. It was also observed that the dedifferentiated microspores have two developmental pathways: embryogenesis and organogenesis, and the two pathways could change each other in developmental process. Embryogenesis course of microspores was similar to that occurred in zygotic embryogenesis. Suspensor-like structure was observed before and during heart embryo stage. Matured embryoid could germinate but the root tip growth more easily than shoot tip. Embryogenesis of microspores was strong asynchrony and there were many abnormality occurred in every stage of entirely process. When a divisional microspore broke the cell wall in early stage, it changed to thin-walled cell mass and then developed callus. It was showed that some of microspore-derived callus differentiated secondary embryoids but not adventitious buds although adventitious root differentiation was easily occurred from the callus. Androgenesis and embryogenesis of isolated microspores were similar in different types of *Capsicum annuum* L.

Key words: *Capsicum annuum*; isolated microspores; androgenesis; embryogenesis; cytological observation

收稿日期: 2008 - 04 - 17; 修回日期: 2008 - 10 - 08

基金项目: 北京市科委科技项目 (Z07080501570703)

^{*} E-mail: tongxiaodou@sohu.com

在辣(甜)椒花药培养中,由于花药壁等二倍体细胞始终存在并与单倍体的小孢子同时发育,因此后代植株中易出现供体植株二倍体的混杂(Novak, 1974; Mythili & Thomas, 1995)。游离小孢子培养技术可以排除二倍体细胞的混杂,获得可靠的小孢子来源的胚状体或愈伤组织,进而获得单倍体小植株,经自发或人工诱导加倍后形成双单倍体(DH)植株用于杂交育种。

许多研究者都强调基因型对小孢子培养成功的影响很大(Novak, 1974; Yoon et al, 1991; Mak & Maheswary, 1994)。

就辣(甜)椒小孢子培养而言, Bal等(2003)用甘露醇饥饿, 10⁻⁵ 预处理, 无激素并添加17%蔗糖的 NLN培养基得到了小孢子愈伤组织; 王焯等(2004)报道了5种预处理对辣椒小孢子离体培养前期存活率的影响; Supena等(2006)用9⁻⁵ 低温, 含有2%麦芽糖的双层 Nitsch培养基培养辣椒花药并使散落的小孢子成功完成了胚胎发生和成苗的过程; 最近 Kim等(2008)用热激、蔗糖饥饿以及含有9%蔗糖的 NLNS培养基成功诱导出辣椒的胚状体, 同时证明蔗糖优于麦芽糖。不同作者的培养方法差异如此之大, 从一个角度证明了基因型差异的重要影响; 然而从另一角度看, 以往探索的培养因子很可能并不是培养成功的决定因素。

作者对多个品种和杂交种的辣(甜)椒在游离小孢子培养中的雄核发育和胚胎发生进行了系统的观察, 以期明确基因型差异是否导致游离小孢子发育过程的不同, 从而为调控其雄核发育和胚胎发生提供参考。

1 材料与方 法

2003—2007年, 每年选择市售、自选和自配的辣(甜)椒(*Capsicum annuum* L.)品种和杂交种5~8种, 包括灯笼椒(03-1009、04-1003、05-1008), 牛角椒及羊角椒(05-1006、06-1009、06-1010), 线形椒(06-1013)和朝天椒(05-1007)种植于北京试验基地。

夏季试验材料在大棚种植, 取材期5—9月; 冬季试验材料在温室种植, 取材期10月—次年4月, 重复4年。

取单核期的辣(甜)椒花蕾, 经75%酒精30 s, 0.1%升汞8 min, 无菌水冲洗3次后取花药接种于固体Cp培养基上。于35⁻² 暗培养5~12 d后, 用液体Cp(Sibi et al, 1979)培养基制备游离小孢子。经300目滤网过滤, 1 000 r·min⁻¹离心收集小孢子, 弃上清液, 重复3次, 最终悬浮于改良的液体R(蔗糖或麦芽糖3%或6%)(Sibi et al, 1979)培养基中。调整小孢子含量约1×10⁵个·mL⁻¹, 分装于直径30 mm培养皿中。每皿2 mL, 进行震荡培养。Leica DM L、OLYMPUS SZX12显微观察记录培养过程中小孢子的分裂和生长发育。

2 结果与分析

除朝天椒05-1007仅获得小孢子愈伤组织外, 其余品种均得到了小孢子愈伤组织和胚状体, 愈伤组织诱导率为0.031%, 胚状体诱导率为0.022%。小孢子愈伤组织分化尚不理想; 除畸形胚外, 正常胚状体可萌发为完整植株, 移栽成活率>95%。下面以灯笼椒05-1008为例, 说明甜(辣)椒游离小孢子培养中的雄核发育和胚胎发生过程。

2.1 辣(甜)椒游离小孢子培养中细胞分裂与多细胞团的形成

单核期花药在经过高温预培养后绝大多数小孢子仍处在单核期(图1, 1), 但有些小孢子膨大, 有些小孢子皱缩(图1, 2)。游离小孢子在液体培养基中培养数日(9~20 d)后, 膨大的小孢子开始启动生长发育, 皱缩的小孢子则死亡。

观察到单核小孢子最初的细胞分裂有均等(图 1, 3、4)和不均等分裂(图 1, 5、6)两种方式, 而且均等分裂略多于不均等分裂, 与 Kim等(2004)对花药培养中雄核发育的报道不一致。随后的分裂为四细胞(图 1, 7)。当继续分裂为多细胞时, 有的还没突破花粉壁(图 1, 8), 有的已经突破花粉壁。

2.2 辣(甜)椒游离小孢子培养中愈伤组织的形成

从空间结构角度看, 突破花粉壁始于萌发孔(图 1, 9), 是一个渐变的过程(图 1, 10~14)。从时间上看, 突破花粉壁始于小孢子还未分裂(图 1, 10)至分裂几次以前(图 1, 11~15)。突破花粉壁后便以薄壁细胞的形式继续非极性分裂生长(图 1, 15、16), 进而发育为细胞较大、细胞质较稀薄的多细胞团(图 1, 17), 直至形成愈伤组织(图 1, 18)。

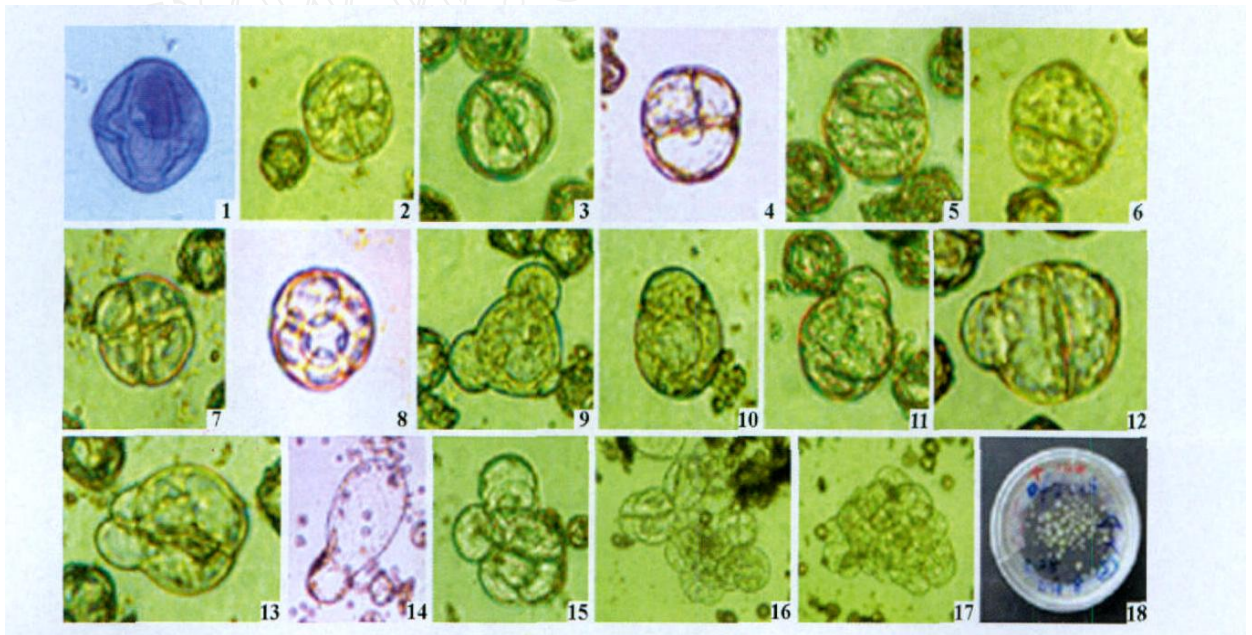


图 1 辣(甜)椒游离小孢子培养中的雄核发育

1. 单核小孢子; 2. 膨大小孢子和皱缩小孢子; 3. 均等分裂, 二细胞; 4. 均等分裂, 三细胞;
5. 不均等分裂, 二细胞; 6. 不均等分裂, 三细胞; 7. 分裂为四细胞;
8. 分裂初期不突破花粉壁; 9. 突破花粉壁始于萌发孔或花粉沟;
- 10~14. 突破花粉壁的渐变过程; 15、16. 突破花粉壁后成为薄壁细胞;
17. 多细胞团; 18. 愈伤组织。观察倍数: 单细胞, 600 \times ;
多细胞团, 300 \times

Fig 1 Androgenesis in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L.

1. Late-uninucleate microspore; 2. Expanded microspores will develop and the shrivelled ones will dead; 3. Symmetric division, 2 cells; 4. Symmetric division, 3 cells; 5. Asymmetric division, 2 cells; 6. Asymmetric division, 3 cells;
7. Division to 4 cells; 8. Division but not breaking the cell wall; 9. Breaking the cell wall from geminal aperture or pollen ditch; 10 - 14. Breaking the cell wall was a gradual process;
- 15, 16. Became to thin-walled cell after breaking the cell wall;
17. Multicellular mass; 18. Callus. Observational multiple:
Single cell, 600 \times ; Multicellular mass, 300 \times

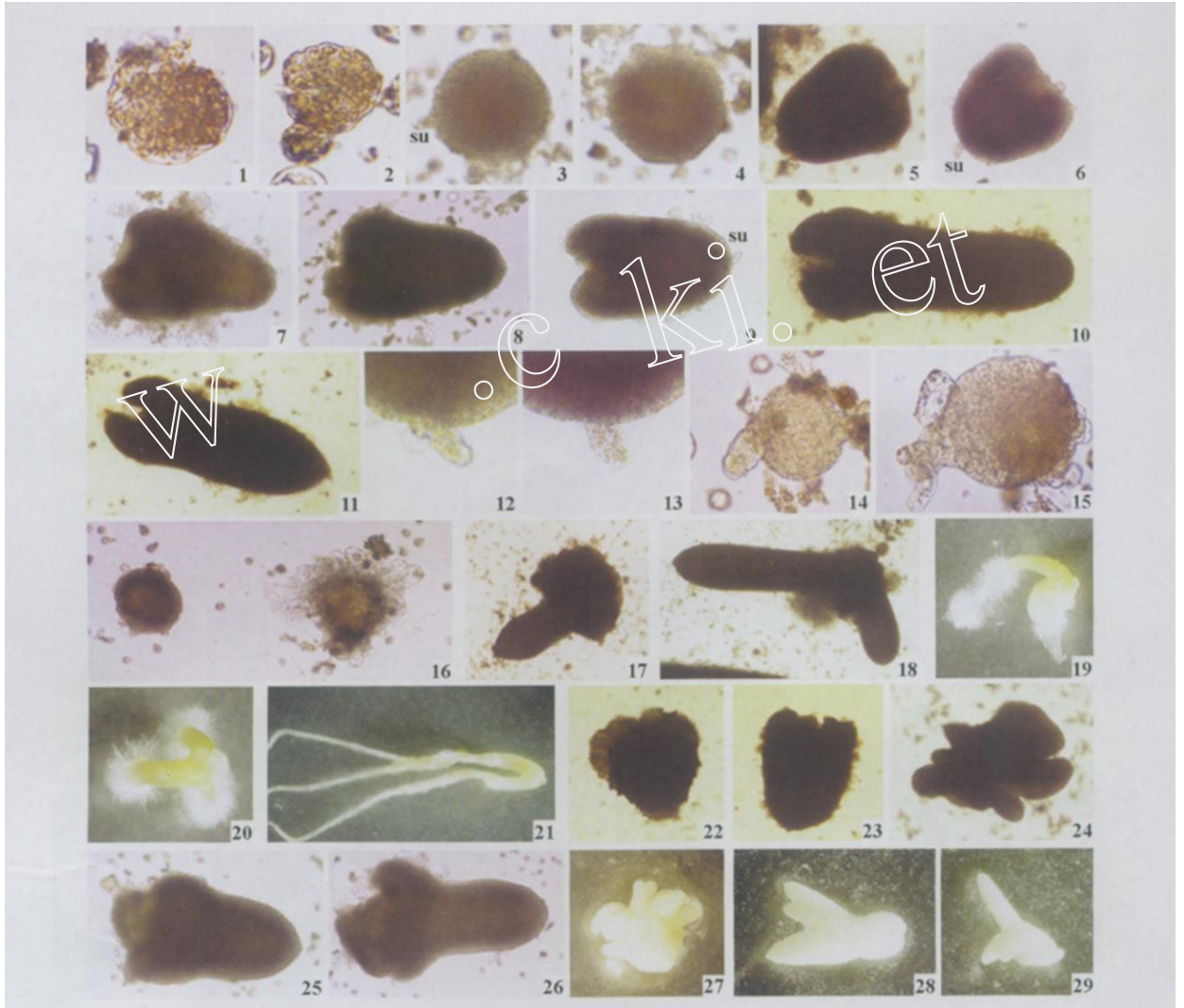


图 2 辣 (甜) 椒游离小孢子培养中的胚胎发生和胚状体畸形

1. 球形胚初期无胚柄; 2. 球形胚初期有胚柄; 3. 球形胚有胚柄 (su); 4. 球形胚无胚柄; 5~9. 心形胚发育过程, 6, 9. 有胚柄 (su); 10. 鱼雷形胚; 11. 子叶期胚; 12, 13. 单列或较少细胞构成的胚柄结构; 14. 多细胞柱状胚柄; 15. 混合型胚柄; 16. 胚状体和愈伤组织混合生长; 17. “话筒形”胚状体的发育; 18. “连头胚”的发育; 19~21. “连头胚”萌发根; 22, 23. “连根胚”; 24. “并连胚”; 25, 26. 多子叶胚状体; 27~29. 次生胚。
观察倍数: 1、2、14~16. 300 ×; 3~13. 150 ×; 17, 18, 22~26. 150 ×; 19~21. 70 ×; 27~29. 200 ×

Fig 2 Embryogenesis in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. and abnormal embryo id

1. Early stage of globular embryo has not suspensor-style like structure; 2. Early stage of globular embryo has suspensor-style; 3. Globular embryo has suspensor (su); 4. Globular embryo has not suspensor; 5 - 9. Development of heart shaped embryo; 6, 9. Heart shaped embryo has suspensor (su); 10. Topedo shaped embryo; 11. Embryo at cotyledon stage; 12, 13. Suspensor-style like structure with single line or few cells; 14. Multicellular and pillar-like suspensor structure; 15. Mixed type-like suspensor structure; 16. Mixed growth of embryo id and callus; 17. Development of “microphone” shaped embryo id; 18. Development of “head-linked” embryo id; 19 - 21. Germinated root tip in “head-linked” embryo id; 22, 23. “Root-linked” embryo id; 24. “Shunt-wound embryo id”; 25, 26. Embryo id with multi-cotyledon; 27 - 29. Regenerative embryo id

Observational multiple: 1, 2, 14 - 16. 300 ×; 3 - 13. 150 ×; 17, 18, 22 - 26. 150 ×; 19 - 21. 70 ×; 27 - 29. 200 ×

2.3 辣(甜)椒游离小孢子培养中的胚胎发生

2.3.1 小孢子胚状体发生

在多细胞进入球形胚初期这一阶段,观察到无胚柄(图2,1)和有胚柄(图2,2)两种发育状况。随后的发育在不同品种中均按照球形胚(图2,3、4)、心形胚(图2,5~9)、鱼雷形胚(图2,10)、子叶期胚(图2,11)的模式或程序发育。

值得注意的是,胚柄结构虽然形成于球形胚初期,但有些情况下可以经过球形胚期(图2,3-su)、心形胚期(图2,6-su)一直保留到晚心形胚期(图2,9-su)。而且胚柄结构有少量或单列细胞(图2,12、13)和多细胞柱状集合(图2,14)或两种形式的混合(图2,15)。经常观察到同一培养皿内有胚状体和愈伤组织同时生长发育(图2,16)。

游离小孢子在液体培养基中发育的启动时间极不一致,与Kim等(2004)对花药培养中雄核发育的报道一致。

培养4周时可观察到第1批子叶型胚状体,与此同时仍观察到不少存活单核小孢子,它们还会继续发育,在同一批培养物中可连续转出3~4批子叶型胚状体。

这一现象说明同样处在单核靠边期的小孢子其生理状况却差异极大,这对发育的调控提出了更高的要求。

观察中还发现游离小孢子的胚胎发生过程中有多种形式的畸形胚出现:

第一,胚状体胚根端分化发育正常,胚芽端不分化,形成小愈伤团,整体形状类似于“话筒”状(图2,17);

第二,不同胚状体胚芽端相连、胚根端游离形成“连头胚”,游离的胚根端可连续生长直至萌发(图2,18~21),连接部位可以是小愈伤组织团(图2,18),也可以是芽端(图2,19);

第三,不同胚状体胚根端相连,胚芽端游离形成“连根胚”(图2,22、23);

第四,不同胚状体彼此靠在一起形成“并连胚”(图2,24);

第五,观察到多子叶胚状体(图2,25、26);

第六,观察到了胚状体上产生次生胚(图2,27~29)。

2.3.2 胚状体愈伤化和器官发生的潜能

在游离小孢子胚胎发生过程的各个阶段均观察到了再次脱分化形成愈伤组织的现象(图3,1~7),从而降低了产生正常胚状体的频率。

另外,当小孢子经多次分裂形成薄壁细胞团和愈伤组织时,多数情况下易产生不定根(图3,9-r),偶尔有胚状体产生但未见发育成熟(图3,8-e、9-e)。

目前还未观察到不定芽的产生。

以上结果说明甜(辣)椒游离小孢子愈伤组织具有一定的器官发生潜能。

2.4 胚状体萌发和小植株形成及移栽

成熟的胚状体转移至固体的R培养基上便可萌发为完整植株(图4,1~7),这一过程历时1~2周。小植株外形与供体植株接近,即甜椒叶形较宽(图4,4、5、9),辣椒叶形较窄(图4,6、7、10)。

研究中发现胚状体胚芽、子叶端发育及萌发的能力明显低于胚根端(图4,2),因而试管苗极易生根(图4,8)。正常小植株移栽成活率>90%(图4,9~11)。

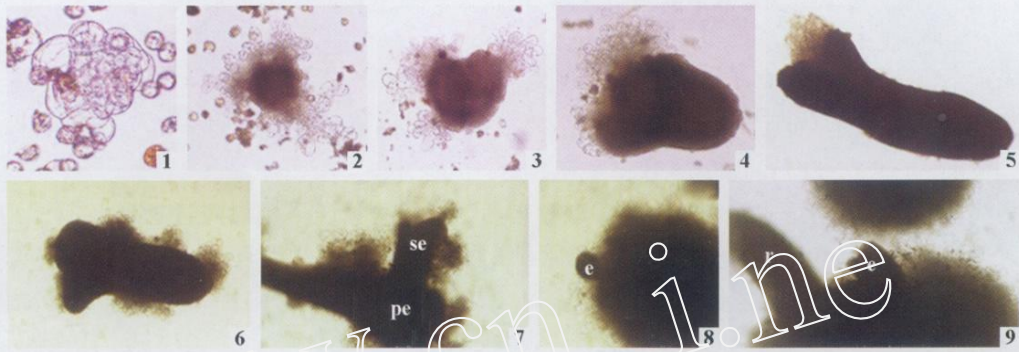


图3 胚状体愈伤化 (1~7) 和器官发生 (8, 9)

1. 胚性细胞团; 2. 球形胚; 3、4. 心形胚; 5. 鱼雷形胚; 6. 子叶期胚; 7. 初生胚 (pe) 和次生胚 (se);
8. 愈伤组织分化球形胚 (e); 9. 愈伤组织分化心形胚 (e) 和不定根 (r)。1~3: 300 ×; 4~9: 150 ×。

Fig. 3 Callus formation in embryogenesis and organogenesis

1. Callus formation from embryonic cells; 2. Callus formation in globular embryo; 3, 4. Callus formation in heart shaped embryo;
5. Callus formation in torpedo shaped embryo; 6. Callus formation in embryoid at cotyledon stage; 7. Callus formation in primary (pe) and regenerative (se) embryoid; 8. Globular embryo (e) differentiated from callus; 9. Heart shaped embryo (e) and adventitious root (r) differentiated from callus. 1-3: 300 ×; 4-9: 150 ×.



图4 胚状体萌发和小植株形成及移栽

- 1~3. 成熟胚状体萌发; 2. 根端萌发能力明显强; 4~7. 形成完整植株;
4、5、9. 甜椒叶形较宽; 6、7、10. 辣椒叶形较窄; 8. 生根; 9~11. 移栽。

Fig. 4 Embryoid germination to plantlet and transplanted to the field

- 1-3. Germination of matured embryoid; 2. Root tip germinated remarkably; 4-7. Plantlets;
4, 5, 9. Sweet pepper has wider leaves; 6, 7, 10. Hot pepper has more narrow leaves. 8. Rooting; 9-11. Transplant.

2.5 辣（甜）椒游离小孢子培养中的发育模式

辣（甜）椒游离小孢子培养中的发育模式总结为图 5。

不同类型辣（甜）椒游离小孢子的雄核发育包括均等分裂与不均等分裂，分裂初期突破花粉壁与不突破花粉壁两个关键环节（图 5，雄核发育部分所示）；不同品种胚胎发生的程序相同，均有两个显著特点，即发育初期具有或不具有胚柄以及发育全程都有可能出现愈伤化（图 5，胚胎发生部分），因此，对胚胎发生的调控应着重避免胚胎发生过程中的愈伤化（红色箭头所示）；在小孢子愈伤组织的器官发生中，不定根容易分化，但不定芽和胚状体的分化为技术难点（图 5，器官发生部分，黄色虚箭头所示）。

另外，游离小孢子脱分化启动后的发育程序没有变，因此对脱分化启动前不同品种基因差异表达的研究与调控是提高启动生长效率的关键。

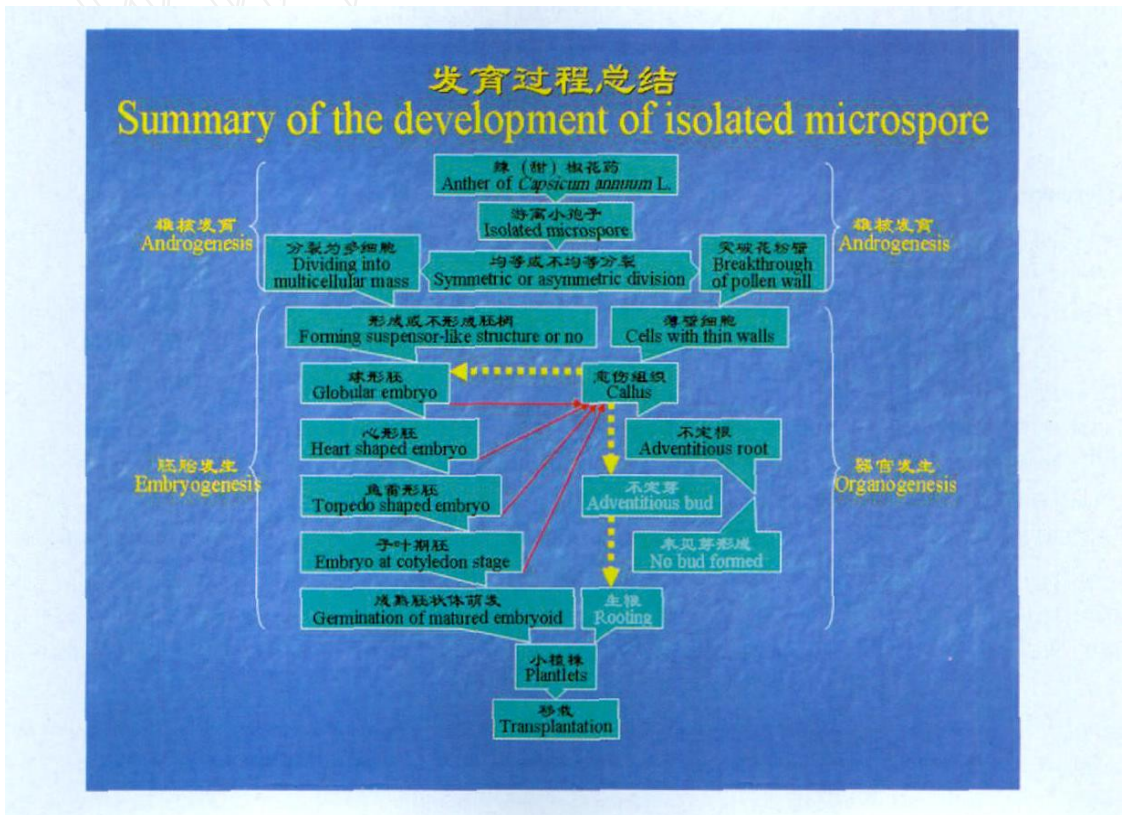


图 5 辣（甜）椒游离小孢子发育过程总结

Fig 5 Summarize the development of isolated microspore culture in *Capsicum annuum* L.

3 讨论

类似胚柄结构的存在意味着细胞或组织在发育初期出现极性分化，很可能与小孢子的不均等分裂相关，但本文还未能明确这种联系。胚柄结构的有无和其形态多样性引出的问题是：与胚状体发生相关的极性分化是出现在小孢子分裂前、分裂中，还是已经分裂为多细胞但仍未突破花粉壁的时候。在有些情况下小孢子突破花粉壁后即形成薄壁细胞，经历一定时段的非极性分裂与生长发育形成愈伤组织，可见非极性的分裂发育是阻碍胚状体形成的一个重要原因。显然，如何调控小孢子分裂的极性以及正常的胚胎发育进程是进一步研究中的重要课题。另外，游离小孢子的胚胎发生是否与不均等分裂有关而与均等分裂无关，分裂如果发生在单核中期或极晚期，或发生在双核早期的营养核或生殖细胞

时是否会导致不同的发育结果, 这些细节是否与最终收获胚状体的数量和质量有关, 都还需要进一步研究。

辣(甜)椒游离小孢子培养中的胚胎发生过程与花药培养以及合子胚的胚胎发生过程极其相似。然而由于完全脱离母体组织的滋养, 游离小孢子来源的胚状体畸形频率比花药培养的要高, 比合子胚发育结果更高, 表明游离小孢子培养基中的营养和激素组成还有待进一步改进。

辣(甜)椒游离小孢子培养中胚胎发生与器官发生可经由脱分化的愈伤组织相互转化。相同基因型的小孢子在条件相同的同一培养皿内有胚状体和愈伤组织同时生长发育(图2, 16), 说明在基因型和培养条件相同的条件下细胞所处的生理状况可以影响甚至决定发育, 从而增加了调控的细微程度和复杂性。研究中发现愈伤组织形成很容易, 由愈伤组织分化不定根容易, 由愈伤组织分化胚状体很难, 分化不定芽更难, 这构成了辣(甜)椒游离小孢子培养技术环节中的重要难点, 即营养芽生长点分化难。这可能与本试验观察到的小孢子胚状体胚芽、子叶端正常发育能力较弱而胚根端正常发育能力较强有相同归因, 推测可能与辣(甜)椒微繁殖中不定芽分化难、栽培中育苗期较长或者生殖生长状态下的假二叉分枝等生物学特性具有相同、相近或相关的生物学机制。

References

- Bal U, Abak K, Büyükalaca S, Comlekcioglu N. 2003. Development of callus colonies the isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17 (2): 38 - 43.
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi D I, Lee KM. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 77 (1): 63 - 72.
- Kim M, Jang IC, Kim J A, Park E J, Yoon M, Lee Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27 (3): 425 - 434.
- Mak C, Maheswary V. 1994. In vitro response of different chilli pepper varieties (*Capsicum annuum* L.) in anther culture. *Special Publication Taichung District Agricultural Improvement Station*, 35: 541 - 546.
- Mythili J B, Thomas P. 1995. Some factors influencing the in vitro establishment and callusing of anthers in capsicum (*Capsicum annuum* L. var *grossum* Sendt). *Indian Journal of Plant Physiology*, 38 (2): 126 - 130.
- Novak F J. 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 72 (1): 46 - 54.
- Sibi M, Dumas D E, Vaulx R, Chambonnet D. 1979. Obtention de plantes haploïdes par androgénèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amélior Plantes*, 29: 583 - 606.
- Supena E D J, Suharsono S, Jacobsen E J, Custers B M. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, (25) 1: 1 - 10.
- Vagera J. 1984. Androgenesis and somatic embryogenesis induced from pollen embryoids in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) on charcoal media. Novak F J, Havel L, Dolezel J. *Plant tissue and cell culture application to crop improvement*. Prague, Czechoslovakia, Czechoslovak Academy of Sciences: 243 - 244.
- Wang Ye, Zhang Bao-xi, Lian Yong, Wang Li-hao. 2004. Influence of pretreatment to alive frequency of isolated microspore in *Capsicum annuum* L. *China Vegetables*, (4): 4 - 6. (in Chinese)
- 王 烨, 张宝玺, 连 勇, 王立浩. 2004. 不同预处理对辣椒小孢子存活率的影响. *中国蔬菜*, (4): 4 - 6.
- Yoon Y J, Lee K S, Chang S K. 1991. Plant induction by anther culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 32 (1): 8 - 16.