

文章编号:1007-2985(2012)01-0081-04

湘西辣椒花药离体培养及其再生植株 染色体数目的变异*

吴光辉¹, 黄丽芳^{1,2}, 蒋建雄²

(1. 湘西自治州农业科学研究所, 湖南 吉首 416000; 2. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:利用辣椒花药诱导单倍体研究表明:NTH, MS 培养基均能诱导产生愈伤组织和胚状体, 但 NTH 培养基比 MS 培养基培养效果好, 以 NTH+6-BA 0.2mg/L+NAA 0.5mg/L+KT 1.2mg/L+AgNO₃ 5.0 mg/L 为愈伤组织和胚状体诱导的适宜培养基。通过花药培养获得的辣椒植株中, 具有丰富的倍性变异, 经染色体计数鉴定, 单倍体($n=12$)约 14%, 二倍体($2n=24$)约 46%, 四倍体($4n=48$)约 4%, 各种混倍体约 36%。

关键词:辣椒; 花药培养; 染色体数目变异

中图分类号:Q243

文献标志码:A

DOI:10.3969/j.issn.1007-2985.2012.01.021

辣椒(*Capsicum annuum* L.)为常异交植物, 自然纯合速度慢^[1], 常规杂交育种一般要经过 6—7 个世代的连续自交才能得到相对稳定的后代。而花药培养只需将 F₁ 的花药进行培养, 经染色体加倍可得到纯合二倍体, 即从杂交到得到稳定的纯系。辣椒的花药培养技术开始于 20 世纪 70 年代。1973 年, 王玉英^[2]、George & Narayanswamy^[3]报道通过辣椒花药培养获得了单倍体植株, 以后各国学者在辣椒花药培养的方法和条件上均有新的进展^[4~19]。但花药培养影响因素多, 受试验材料基因型的影响显著, 诱导率偏低, 操作难度大等问题, 所以辣椒花药培养的研究仍然是一个有意义的课题。本文较系统地湘西辣椒花药培养过程中的愈伤组织诱导、再分化、胚状体的发生、植株再生以及染色体倍性变异等进行了研究, 为湘西地区辣椒新品种选育的高效花药培养体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试辣椒材料为湘西常规种杂交后代 F₁, 编号为湘辣 22 号, 该辣椒育种材料具有抗病性强、产量高、商品性好、适应性广等特点。供试材料的花蕾采自湘西州农科所蔬菜育种基地。

1.2 方法

1.2.1 花药离体培养 早上 8 时以前和下午 5 时以后, 选取花瓣和花萼等长的花蕾放置在 4 °C 的冰箱预处理 2 d。在超净作台无菌条件下, 将花蕾放在 75% 的酒精中浸泡 30 s, 用无菌水冲洗一次, 在 0.1% 升汞溶液中表面消毒 15 min, 然后用无菌水冲洗 5 次。最后倾倒在无菌纸上进行接种操作, 剥离出花药, 接种于 MS, NTH(均含 3% 蔗糖、5% 活性炭和 0.5% 琼脂粉)+不同激素配比的愈伤组织诱导培养基上。先在 34 °C 的恒温培养箱内暗培养 7 d, 然后将花药转入 24 °C 左右培养室中培养, 每日补充光照 10 h, 光照强

* 收稿日期:2011-11-28

作者简介:吴光辉(1973-), 男, 湖南凤凰人, 湘西自治州农业科学研究所助理研究员, 主要从事辣椒育种及蔬菜推广研究。

度 2 000 lx 左右, 培养 60 d 后, 统计各处理组合的出愈率和出胚率。

将诱导出的愈伤组织转入 MS+6-BA 0.2mg/L+GA₃ 0.5 mg/L+3%白糖+0.5%琼脂粉培养基上分化。待胚性愈伤组织直接分化出芽后, 将芽转入无激素 MS 培养基上生根, 4 cm 左右高时, 切成带节茎段, 转入 MS+6-BA 0.2mg/L+GA₃ 0.5 mg/L+3%白糖+0.5%琼脂粉培养基上增殖。

1.2.2 染色体计数分析 取试验中所获得的花粉再生植株的幼嫩新根, 洗净后置于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉+0.2%秋水仙素处理 3~4 h, 蒸馏水漂洗数次; 放入卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中固定 24 h, 蒸馏水漂洗数次; 用 1 mol/L 盐酸溶液酸解, 在 60 °C 水浴中解离 15 min, 再用蒸馏水漂洗数次。取根尖生长点部位, 用改良卡宝品红染色后压片, 在显微镜下观察染色体数目并照相。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织和胚状体的形态发生及分化成苗

将花药接种到诱导培养基上后, 一般 7~10 d 后花药膨大或开裂; 15 d 左右部分花药开始变褐, 逐渐萎缩, 其颜色由黄色转为黄褐色和褐色; 到 25 d 左右时, 部分花药变成黑褐色并且干瘪; 花药培养 30 d 左右, 在部分开裂的花药上, 肉眼可见白色或黄白色的愈伤组织小点突破药壁层。但也有从花药上长出愈伤组织。两者从外观上的区别在于: 起源于花粉的愈伤组织表面光滑, 半透明乳白色, 经光照不变绿(图 1a); 而起源于花药壁组织的愈伤组织表面不光滑, 边缘有突起, 光照后变绿(图 1b)。将获得的愈伤组织转入到 NTH+6-BA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 分化培养基上, 有的质地致密的愈伤组织表面成颗粒状突起, 都能够分化出丛生不定芽(图 1c); 但有的愈伤组织的质地逐渐由致密转变为疏松状, 颜色由绿色转变为浅绿色或乳白色, 继续培养就会分化出不定芽, 一般这样的愈伤组织分化率很低; 有的愈伤组织接触培养基的一面容易褐化, 并逐渐死亡; 有的愈伤组织由绿色致密状逐渐转变为白色水渍状, 这种形态的愈伤组织都没有分化能力, 慢慢死亡。

辣椒花药在上述 4 种培养基上培养 40 d 左右, 开始有胚状体的发生(图 1d), 本试验观察到的胚状体有棒形胚和子叶形胚。继续培养 20 d 左右, 胚状体在光照条件下慢慢转绿, 进一步发育成正常植株(图 1e, f)。随后转移到无激素 MS 培养基上生长, 可诱导出根; 当植株长至 4 cm 左右高时, 切成带节的茎段, 接种在 NTH+6-BA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 培养基上增殖, 20 d 左右能长成根叶俱全的试管苗用于移栽。

辣椒花药在上述 4 种培养基上培养, 不仅均有愈伤组织形成, 同时还能诱导胚状体产生, 但是在不同培养基上的愈伤组织和胚状体的诱导率存在差异。结果表明: NTH 基本培养基的培养效果明显优于 MS 基本培养基, 在 NTH 基本培养基中添加一定量的 AgNO₃ 能提高愈伤组织和胚状体的发生率(表 1)。本研究中, 筛选出的辣椒花药培养的适宜培养基为 NTH+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.2 mg/L+AgNO₃ 5.0 mg/L, 其愈伤诱导率达到 37.7%, 胚状体发生率达到 2.68%。

表 1 不同培养基对辣椒花药愈伤组织诱导率和胚状体诱导率的影响

编号	培养基	愈伤诱导率/%	胚状体诱导率/%
A1	NTH+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.2 mg/L	23.7	1.79
A2	NTH+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.2 mg/L+AgNO ₃ 5.0 mg/L	37.7	2.68
B1	MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.2 mg/L	15.8	0.53
B2	MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.2 mg/L+AgNO ₃ 5.0 mg/L	17.2	0.89

2.2 再生植株的体细胞染色体数目变异

辣椒愈伤组织绿芽点分化为小植株和胚状体苗的倍性变化, 从形态上观察和根尖压片观察 50 株试管苗。结果表明, 从形态上观察发现, 单倍体植株茎秆较弱, 茎秆和叶的颜色均为淡黄绿色(图 1g); 二倍体植株茎秆健壮, 茎秆和叶的颜色为绿色(图 1h); 四倍体茎秆粗壮, 叶片肥厚皱缩, 叶的颜色为浓绿(图 1i)。其

中有单倍体 7 株,占 14%,其染色体数目为 12 条(图 1j);二倍体 23 株,占 46%,染色体数为 24 条(图 1k);四倍体 2 株,占 4%,染色体数为 48 条(图 1l);各种混倍体 18 株,占 36%。因此,经花药培养产生的再生植株,其染色体的倍性比较复杂,需要进行仔细的筛选与鉴定。

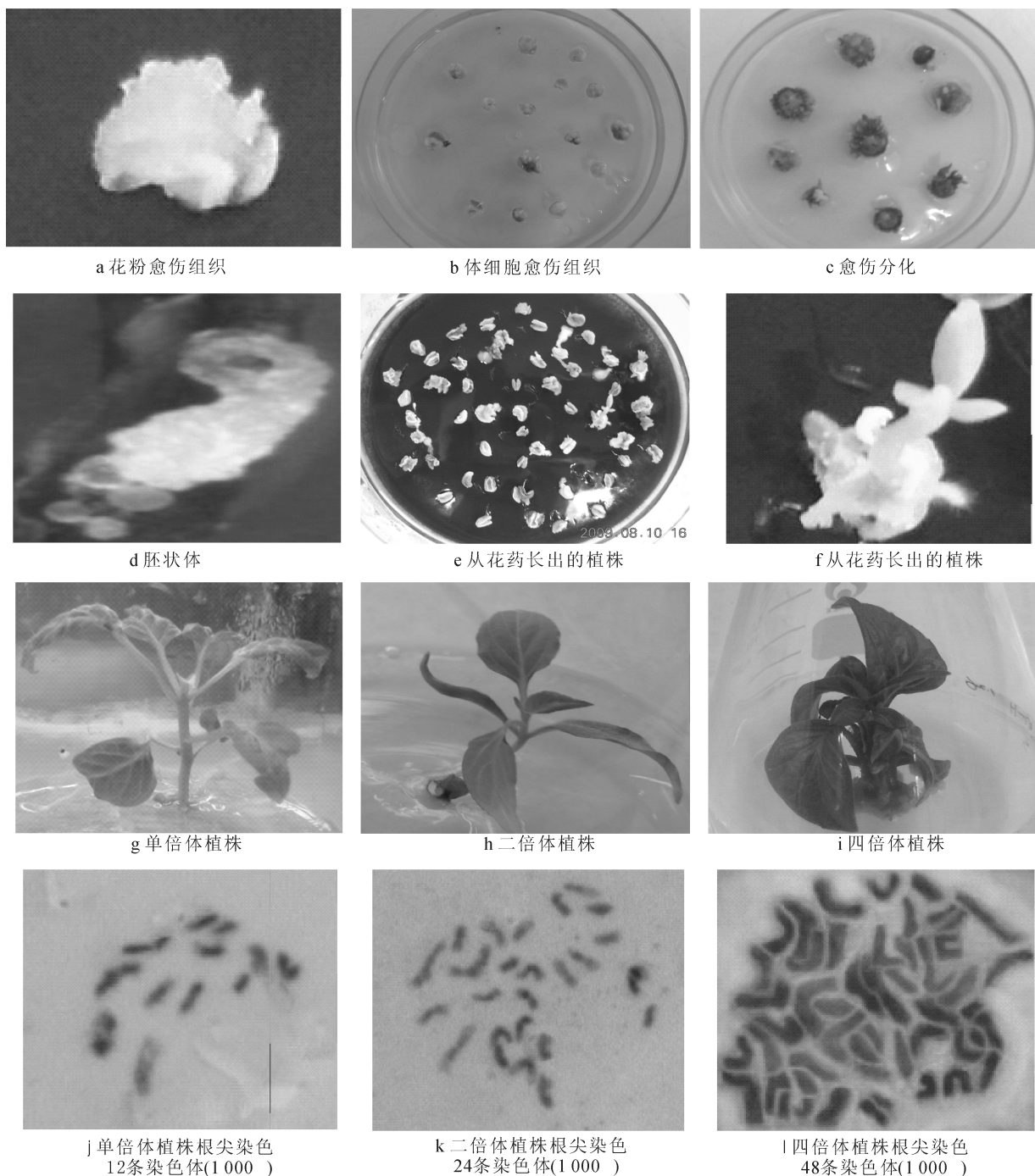


图 1 培养结果及再生植株染色体数目变异

3 讨论

在辣椒花药培养中,基本培养基对诱导愈伤组织、胚状体的发生起十分重要的作用。前人^[4-5,14]主要比较了 NTH,MS,N6,B5,Nitch,NH,NLN,C,R,RO,发现 NTH 和 MS 这 2 种培养基效果较好。因此,本试验选择 NTH 和 MS 为基本培养基,结果在 2 种基本培养基上均获得了愈伤组织和胚状体,NTH 基本培养基效果更好。

激素是影响花药培养的重要因素,目前广泛应用于花药培养中的激素有 BA,KT,NAA 和 2,4-D 等。

生长素对细胞分化形成愈伤组织及其生长有决定作用,但如果浓度过高往往会抑制花粉发育,促进二倍体体细胞的生长,而低浓度生长素则更适于诱导花粉产生愈伤组织或直接产生胚状体^[19],李春玲等^[8]采用 0.25~0.50 mg/L NAA+1 mg/L KT 附加 50 mg/L 单核苷酸,胚状体的诱导和分化达到了较好的效果.王玉英^[4]等研究表明高浓度的 2,4-D,NAA 可以促进愈伤组织的形成但会降低胚状体的形成;不同类型的生长素中,低浓度的 2,4-D 效果不佳,而只有低浓度 NAA 和 IAA 的条件下才有利于胚状体的形成.中国学者曾比较 IAA 同 NAA 的差别,指出采用较高浓度 NAA(0.5 mg/L)的效果比较理想,而国外在辣椒花药培养研究中采用的生长素多是为 2,4-D.本研究中,筛选出的辣椒花药愈伤组织和胚状体诱导的适宜培养基为 NTH+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.2 mg/L+AgNO₃ 5.0 mg/L,其愈伤诱导率为 37.7%,胚状体发生率为 2.68%.诱导率还是偏低,操作难度大,与前人的研究结果一致,还需进一步提高其诱导率.

AgNO₃ 和核酸类物质可以减轻组织培养中材料的褐化程度,促进胚状体的发生.本试验结果与蔡连华等^[15]的研究结果基本一致,硝酸银是影响胚状体诱导率的最主要因素,在不添加 AgNO₃ 的对照中,辣椒花药培养 10d 后开始褐化,20 d 后大部分全部褐化死亡;而愈伤组织和胚状体诱导率明显要低,所以 AgNO₃ 在辣椒花药培养中有至关重要的作用.

参考文献:

- [1] 张子君,徐矿红,田云,等.辣椒花药培养诱导胚状体成苗[J].辽宁农业科学,2000(4):43-45.
- [2] 王玉英,孙敬三,王敬驹,等.小黑麦(*Triticale*)和辣椒(*Capsicum annuum*)花粉植株的诱导[J].中国科学,1973(1):104-107.
- [3] GEORGE L, NARAYANSWAMY S. Haploid Capsicum Through Experimental Androgenesis[J]. Protoplasma, 1973, 78:467-470.
- [4] 王玉英,郭仲深,李春玲,等.甜椒花药培养的初步研究[J].园艺学报,1980(1):33-38.
- [5] 陈肖师.甜椒花药培养及‘塞花一号’的育成[J].园艺学报,1986,8(2):5-7.
- [6] 张迷祖,周敬茹,李春玲,等.在跃县辣椒花药培养过程中 C-GMP 对胚状体形成的生物学效应[J].园艺学报,1983,10(3):198.
- [7] 王立浩.辣椒花药培养的研究[D].北京:中国农业科学院研究生院,2001:13-14.
- [8] 李春玲,蒋钟仁.甜椒花培新品种‘海花二号’的育成[J].园艺学报,1990,17(1):39-43
- [9] 胡道芬.甜椒花药培养中雄核发育和花粉胚的形态发生.《植物花药培养育种进展》[M].中国农业科技出版社,1996,27-290.
- [10] 庄军平,巩振辉,苏菁.温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响[J].西北农业学报,2001,10(2):49-51.
- [11] 张晓芬,耿三省,陈斌,等.甜(辣)椒单倍体培养研究进展[J].生物技术通报,2005(4):12-17
- [12] 杨博智,周书栋,张竹青,等.不同培养基和激素对辣椒花药培养的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(1):61-64.
- [13] KRISTIENSEN K, ANDERSEN S B. Effects of Donor Plants Temperature, Photoperiod and Age on Anther Culture Response of *Capsicum Annuum* L [J]. Euphytica, 1993(67):105-109.
- [14] 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(2):126-130.
- [15] 蔡连华,雷建军,陈国菊,等.彩色甜椒花药培养若干影响因子的研究[J].中国瓜菜,2005(4):16-19.
- [16] 张芳,李海涛,张馨宇.碳源组分及浓度对辣椒花药培养的影响[J].西北植物学报,2009,18(5):341-345.
- [17] 刘广霞,张晓伟,蒋武生,等.温度及培养基中添加物对辣椒花药培养胚状体诱导的影响[J].河南农业科学,2009(5):97-100.
- [18] 赵激,邹学校,张竹青,等.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,2010,36(2):181-184.
- [19] ZHAO Ji, ZOU Xue-xiao, ZHANG Zhu-qing, et al. Influences of Carbon Sources and Plant Growth Regulators on Anther Culture Efficiency of Pepper [J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(4):102-105.