

## 不同培养基对辣椒花药培养的影响

赵激<sup>1,2</sup>, 邹学校<sup>2,3\*</sup>, 张竹青<sup>2</sup>, 杨博智<sup>2</sup>, 周书栋<sup>2</sup>

(1.中南大学研究生院 隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2.湖南省蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125; 3.湖南省农业科学院, 湖南 长沙 410125)

**摘 要:** 以灯笼椒、泡椒、线椒 3 种类型 21 个辣椒品种为试材, 研究 NTH、MS、B5 培养基和在 NTH、MS、B5 培养基中分别添加 3 g/L 活性炭 + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO<sub>3</sub> 的培养基 NTH<sub>1</sub>、MS<sub>1</sub>、B5<sub>1</sub> 对辣椒花药培养效果的影响。结果表明, 在供试品种中能诱导出胚状体的品种占 71.43%, 胚状体诱导率为 0.41% ~ 2.69%; 按类型统计, 分别有 83.33% 的灯笼椒、69.23% 的泡椒、50.00% 的线椒能诱导出胚状体; 愈伤组织诱导率和胚状体诱导率的平均值从大到小依次为 MS<sub>1</sub>、NTH<sub>1</sub>、B5<sub>1</sub>、MS、NTH、B5, 其中, MS<sub>1</sub> 和 NTH<sub>1</sub> 差异不显著, 两者极显著高于 B5<sub>1</sub>; NTH<sub>1</sub>、MS<sub>1</sub>、B5<sub>1</sub> 培养基处理对减轻褐化具有明显效果, 并能显著提高愈伤组织和胚状体诱导率; 愈伤组织诱导率和胚状体诱导率 MS 与 NTH 差异不显著, MS 和 NTH 与 B5 培养基差异均达极显著水平

**关 键 词:** 培养基; 辣椒; 花药培养; 褐化; 愈伤组织; 胚状体

中图分类号: S641.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)02-0181-04

## Effects of culture media on anther culture of chili pepper (*Capsicum annuum* L.)

ZHAO Ji<sup>1,2</sup>, ZHOU Xue-xiao<sup>2,3\*</sup>, ZHANG Zhu-qing<sup>2</sup>, YANG Bo-zhi<sup>2</sup>, ZHOU Shu-dong<sup>2</sup>

(1.Longping Branch, Graduate School of Central South University, Changsha 410125, China; 2.Vegetable Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 3.Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

**Abstract:** The effects on anther culture of six culture media including NTH, MS, B5 and NTH<sub>1</sub>, MS<sub>1</sub>, B5<sub>1</sub> (i.e. the modified NTH, MS or B5 supplemented with 3g/L activated charcoal, 0.5 mg/L NAA, 1.0 mg/L KT+ 0.1 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO<sub>3</sub>) were studied using 21 capsicum varieties belonging to the three fruit shape types (sent pepper, bell pepper and hot pepper) as the materials. The results showed that 71.43% of the varieties used produced embryoids with induction frequency of 0.41%~2.69%. Among the fruit shape types, 83.33% of the sent varieties, 69.23% of the bell varieties and 50.00% of the hot varieties produced embryoids. Addition of 5 mg/L AgNO<sub>3</sub> into the media have significantly reduced browning. The order of the mean values of both the induction percentage of calli and that of embryoids in anther culture by six media was MS<sub>1</sub>, NTH<sub>1</sub>, B5<sub>1</sub>, MS, NTH, B5. Although MS<sub>1</sub> and NTH<sub>1</sub> did not show the difference, they were significantly superior to B5. NTH<sub>1</sub>, MS<sub>1</sub> and B5<sub>1</sub> significantly reduced browning and improved percentage of induction of both calli and embryoid. Although there was not any significant difference in the percentage of induction between MS and NTH, the percentage of induction on MS or NTH was significantly higher than that on B5.

**Key words:** culture media; *Capsicum annuum* L.; anther culture; browning; callus; embryoids

花药培养作为诱导作物单倍体的一种主要手段, 是产生大量单倍体最有效的方法。花药培养、胚珠培养和体细胞融合等被认为是当今创造植物新型遗传材料的主要手段<sup>[1]</sup>。辣椒花药培养开始较

收稿日期: 2009-11-24

基金项目: 湖南省政府农村办公室农科教项目(湘财农字(2008)22 号)

作者简介: 赵激(1984—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, zhaoji998@126.com; \*通讯作者, zou\_xuexiao@163.com

早, 1973 年, 王玉英<sup>[2]</sup>和 George<sup>[3]</sup>获得了单倍体植株, 之后众多学者<sup>[4-6]</sup>对基本培养基进行了大量的尝试和创新, 由于试验条件、供试材料等不同, 培养基的诱导效果不尽相同。供体植株的基因型是影响花药培养的关键因素。花药培养效果因供试材料基因型不同而不同, 即使在同一种内, 采用相同的试验方法, 不同材料间也有很大差别, 有的材料对某些培养基无反应<sup>[7-9]</sup>。前人研究所选用的供试材料大多为甜椒品种或单一类型的品种。笔者研究不同培养基对不同基因型辣椒褐化、愈伤组织诱导率和胚状体诱导率的影响, 旨在进一步探索提高不同基因型辣椒花药培养效果的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试灯笼椒杂种一代有翼研 6 号、A11、A12、A13 和 A14, 常规品种有南京早(小灯笼椒); 泡椒杂种一代有江苏 1 号、苏椒 5 号、A1、A2、A4、A5、福湘二号、福湘四号、探春、迎春、元春、早帅和碧秀; 线椒杂种一代有博辣娇红, 常规品种有 SJ08-9。所有供试品种由湖南省蔬菜研究所辣椒研究室提供。

辣椒花药培养的培养基共 6 种: NTH、MS、B5 培养基和在 NTH、MS、B5 培养基中分别添加 3 g/L 活性炭 + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO<sub>3</sub> 的 NTH<sub>1</sub>、MS<sub>1</sub>、B5<sub>1</sub> 培养基。

### 1.2 方法

试验在湖南省蔬菜研究所试验基地早春大棚进行。2008 年 11 月 10 日播种, 2009 年 2 月 20 日定植。施肥管理与新品种区试相同。2009 年 5 月上旬于初花期开始, 对供试材料摘蕾, 每天 8:00 以前或 17:00 以后采集瓣萼比约为 1、长度为 2~3 mm 的花蕾, 抽样镜检花蕾中孢子的发育时期, 此大小花蕾中大部分小孢子处于单核靠边期-双核早期。每次取 30~50 株的花蕾混合, 放入自封口塑料袋内, 带回实验室置于 4 °C 冰箱中 1~7 d。

接种。将预处理的花药在超净工作台中进行花蕾表面灭菌。先将花蕾在 75% 酒精内浸 30 s, 然后

转到 0.2% 升汞溶液中浸 8 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 每次 2~3 min。用镊子剥出花药, 除去花丝, 接种于培养基上。每皿接 5 个花蕾, 约 30 个花药, 用 parafilm 膜封口。每处理接种 10 皿。3 次重复。

将接种了花药的培养皿放入 35 °C 的恒温培养箱中黑暗培养 8 d, 再转入光照培养箱中培养, 至接种后 60 d 止。培养条件: 白天(25±0.5) °C, 夜晚(23±0.5) °C, 光照 12 h/d, 光照度 1 500 lx。当花药上分化出白色幼小的胚状体时, 剥离该胚状体, 转接到无植物生长调节剂的相应培养基中进一步培养至分化成苗。

### 1.3 试验数据的统计分析

接种后 15 d 统计各处理花药褐化情况。接种后 30 d 开始, 每 15 d 调查 1 次褐化数、愈伤组织发生数、胚状体发生数, 连续调查 3 次。

褐化率 = (花药褐化数/处理花药总数) × 100%。

愈伤组织诱导率 = (愈伤组织发生数/处理花药总数) × 100%。

胚状体诱导率 = (胚发生数/处理花药总数) × 100%。

褐化率取 4 次的平均数, 以愈伤组织和胚状体数最多的 1 次计算愈伤组织诱导率和胚状体诱导率。用 DPS 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同供试材料的花药培养效果

按同一供试品种接种 6 种培养基的总和进行统计分析(表 1、表 2)。结果表明, 21 个供试品种都有愈伤组织生成, 愈伤组织诱导率为 1.05%~13.30%, 其中以早帅最高, SJ08-9 最低; 21 个供试品种中诱导出胚状体的有 15 个品种, 占供试品种的 71.43%, 胚状体诱导率为 0.42%~2.67%, 其中以早帅最高, A2 最低。按品种统计, 6 个灯笼椒品种有 5 个产生了胚状体, 占 83.33%; 13 个泡椒品种只有 9 个产生了胚状体, 占 69.23%; 2 个线椒品种有 1 个杂种一代产生了胚状体, 占 50.00%。

### 2.2 不同培养基对辣椒花药褐化的影响

将 21 个供试品种的褐化率按 NTH 与 NTH<sub>1</sub>、

表 1 各品种辣椒花药的培养效果

Table 1 Culturing effects of the varieties on anther culture

	愈伤组织诱导数/个	胚状体诱导数/个
翼研 6 号	73	7
A11	138	15
A12	75	11
A13	31	6
A14	46	6
苏椒 5 号	27	6
A1	67	7
A2	72	6
A5	99	8
碧秀	159	14
福湘 4 号	57	8
探春	63	9
元春	102	8
早帅	192	38
博辣娇红	123	17
江苏 1 号	20	0
A4	47	0
迎春	26	0
福湘 2 号	36	0
南京早	15	0
SJ08-9	9	0

MS 与 MS<sub>1</sub>、B5 与 B5<sub>1</sub> 不同培养基处理进行成对样本均值分析,结果表明 NTH 与 NTH<sub>1</sub>、MS 与 MS<sub>1</sub>、B5 与 B5<sub>1</sub> 之间均差异显著,说明在 NTH、MS 和 B5 培养基中分别添加 3 g/L 活性炭 + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO<sub>3</sub> 对减轻辣椒花药褐化具有明显效果. 根据添加成分的作用机理可知,减轻褐化主要是 AgNO<sub>3</sub> 的作用.

2.3 不同培养基对辣椒花药愈伤组织诱导率的影响

表 2 结果表明,供试品种间花药愈伤组织诱导率差异达显著或极显著水平. 由表 3 可见,各培养基的愈伤组织诱导率,MS<sub>1</sub> 与 NTH<sub>1</sub> 差异不显著,MS<sub>1</sub> 和 NTH<sub>1</sub> 与其他培养基均差异极显著;B5<sub>1</sub> 与 MS 差异显著,与 NTH 和 B5 差异均达极显著水平;MS 和 NTH 与 B5 均达极显著差异水平;MS<sub>1</sub> 与 MS、NTH<sub>1</sub> 与 NTH、B5<sub>1</sub> 与 B5 之间均差异极显著. 这说明在 MS、NTH 和 B5 培养基中添加相同量的活性炭、NAA、KT 和 6-BA 均能显著提高愈伤组织的诱导率;MS 与 NTH 差异不显著,表明这 2 种培养基对辣椒花药愈伤组织的诱导影响不显著.

表 2 各品种辣椒花药在不同培养基的愈伤组织诱导率和胚状体诱导率

Table 2 Induction percentages of calli and embryoids of the pepper varieties in various culture media

辣椒品种	愈伤组织诱导率							胚状体诱导率							%
	NTH	NTH <sub>1</sub>	MS	MS <sub>1</sub>	B5	B5 <sub>1</sub>	均值	NTH	NTH <sub>1</sub>	MS	MS <sub>1</sub>	B5	B5 <sub>1</sub>	均值	
翼研 6 号	5.29	7.88	5.32	8.18	4.59	7.49	6.46efDE	0.53	0.61	0.60	0.90	0.51	0.53	0.61efgDEF	
A11	9.14	13.17	9.84	14.45	7.86	11.80	11.04bB	1.14	1.46	1.18	1.52	0.71	1.22	1.21cC	
A12	7.21	8.10	7.80	8.28	6.87	7.05	7.55dD	0.96	1.35	0.98	1.38	0.76	1.28	1.18cdC	
A13	2.79	3.18	3.28	3.70	1.95	2.99	2.98jkGH	0.56	0.64	0.55	0.62	0.49	0.60	0.58fghDEF	
A14	3.36	5.68	3.21	5.76	2.57	4.81	4.23hFG	0.48	0.57	0.53	0.72	0.52	0.48	0.55fghDEF	
苏椒 5 号	1.88	2.66	2.01	2.67	1.72	2.44	2.23kHI	0.47	0.53	0.50	0.53	0.43	0.49	0.49ghEF	
A1	5.99	7.10	5.76	6.99	5.32	6.77	6.32fDE	0.60	0.65	0.52	0.87	0.53	0.75	0.65efgDEF	
A2	4.30	5.83	4.60	6.22	4.21	5.17	5.06ghEF	0.39	0.49	0.42	0.48	0.35	0.40	0.42hF	
A5	7.27	10.53	8.57	11.17	6.82	9.46	8.97cC	0.61	0.88	0.57	0.97	0.57	0.68	0.71efDE	
碧秀	9.71	14.89	11.06	14.52	7.64	11.50	11.55bB	0.97	1.15	1.01	1.21	0.73	0.88	0.99dC	
福湘 4 号	5.34	5.69	5.08	6.76	4.29	5.39	5.43fgEF	0.76	0.95	0.85	0.97	0.48	0.60	0.77eD	
探春	4.19	5.94	4.06	6.05	3.41	5.30	4.83ghF	0.52	0.91	0.51	0.96	0.49	0.66	0.68efDE	
元春	7.25	8.47	7.41	8.77	5.46	7.29	7.44deD	0.51	0.68	0.53	0.70	0.55	0.52	0.58fghDEF	
早帅	11.64	16.54	11.66	16.86	9.43	13.67	13.30aA	2.59	2.94	2.45	3.14	2.36	2.52	2.67aA	
博辣娇红	9.20	12.81	10.63	14.84	7.58	12.10	11.19bB	1.23	1.97	1.25	2.20	1.01	1.58	1.54bB	
江苏 1 号	1.90	2.40	2.30	3.31	1.47	2.01	2.23kHI	0	0	0	0	0	0		
A4	3.11	3.59	3.23	4.62	2.14	3.83	3.42ijGH	0	0	0	0	0	0		
迎春	2.34	3.31	2.54	3.98	1.38	2.79	2.72jkH	0	0	0	0	0	0		
福湘 2 号	2.23	3.58	2.25	4.98	1.81	2.72	2.93jkGH	0	0	0	0	0	0		
南京早	1.52	2.63	1.89	2.34	1.65	2.16	2.03kIHI	0	0	0	0	0	0		
SJ08-9	0.58	1.10	0.78	1.69	0.68	1.46	1.05II	0	0	0	0	0	0		

表 3 不同培养基辣椒花药的愈伤组织诱导率和胚状体诱导率

Table 3 Induction percentages of pepper calli and embryoids treated by various culture media %

培养基	愈伤组织诱导率	胚状体诱导率
MS <sub>1</sub>	7.435 2aA	1.144 7aA
NTH <sub>1</sub>	6.908 6aA	1.052 0aA
B5 <sub>1</sub>	6.104 8bB	0.879 3bB
MS	5.394 3cBC	0.830 0bBC
NTH	5.059 1cC	0.821 3bBC
B5	4.231 0dD	0.699 3cC

#### 2.4 不同培养基对辣椒花药胚状体诱导率的影响

由表 2 可见, 供试品种间胚状体诱导率差异达显著或极显著水平。

由表 3 可见, 不同培养基上的辣椒花药胚状体诱导率从大到小依次为 MS<sub>1</sub>、NTH<sub>1</sub>、B5<sub>1</sub>、MS、NTH、B5, MS<sub>1</sub> 和 NTH<sub>1</sub> 差异不显著, 两者均极显著高于其他培养基, MS<sub>1</sub> 与 MS、NTH<sub>1</sub> 与 NTH、B5<sub>1</sub> 与 B5 的差异均达极显著水平, 表明在 MS、NTH 和 B5 培养基中添加相同量的活性炭、NAA、KT 和 6-BA 等均能显著提高胚状体诱导率, MS 和 NTH 与 B5 培养基的差异均达极显著水平, MS 和 NTH 培养基对胚状体诱导率的影响有一定差异, 但未达显著水平。

### 3 结论与讨论

a. 供体植株基因型是影响花药培养的关键因素。陈晓等<sup>[9]</sup>研究 43 个基因型辣椒供体的胚状体诱导率为 0~18%; 陈肖师<sup>[10]</sup>对 17 个甜椒品种进行花药培养, 胚状体诱导率为 0.3%~6.8%; 杨博智等<sup>[11]</sup>研究的 8 个供试品种中产胚率最高的为 2.5%。本研究 21 个供试品种中, 胚状体诱导率为零的品种占供试品种的 28.57%, 产生胚状体的品种占供试品种的 71.43%, 其胚状体诱导率为 0.41%~2.69%, 最高值比陈晓和陈肖师等报道的低得多, 与杨博智等的试验结果相当。笔者认为, 这种差异可能主要与供体植株生长的气候条件有关。本研究中有 83.33% 的灯笼椒、69.23% 的泡椒、50.00% 的线椒能诱导出胚状体, 可见大果型品种胚状体的诱导率比小果型品种相对较高。这与 Dumas 等<sup>[6]</sup>和 Mitykó 等<sup>[7]</sup>报道

的一致。

b. 在花药培养的 10~20 d, 细胞表面氧化和花药培养中产生的乙烯逐渐积累, 会使花药出现严重的褐变现象。褐化影响组织活力, 最终导致胚状体的发生率降低。本研究结果表明, 在 MS、NTH 和 B5 培养基中分别添加 5 mg/L AgNO<sub>3</sub> 均对减轻褐化具有明显效果。这与王立浩<sup>[12]</sup>、张恩让等<sup>[13]</sup>和淡明等<sup>[14]</sup>的试验结果一致, 但是, 5 mg/L 是否为不同培养基中添加 AgNO<sub>3</sub> 的最佳浓度还有待研究。

c. 基本培养基是花药培养中影响花粉启动和再分化的重要条件, 因此, 辣椒花药培养选择适宜的培养基至关重要。关于辣椒花药培养的培养基, 各研究结果的差异较大, MS、B5、NH 和 RO 培养基中诱导胚状体的效果以 B5 培养基最好, MS 培养基最差<sup>[15]</sup>; 在 MS、N6、NTH 等培养基中, 在 N6 上只形成愈伤组织, 而没有胚状体, 在 MS、NTH 上都形成愈伤组织和胚状体, 但在 NTH 培养基上形成胚状体的频率稍高<sup>[5]</sup>; 在 MS、H、B5、Nitsch 和 NTH 培养基中, MS 和 NTH 培养基的诱导效果最好<sup>[10]</sup>; 在 MS、NTH、B5 和 N6 培养基中, 愈伤组织与胚状体的诱导率均以 NTH 最高, MS 较高, B5 和 N6 培养基相对较低<sup>[11]</sup>。本研究中, 在 MS<sub>1</sub>、NTH<sub>1</sub>、B5<sub>1</sub>、MS、NTH 和 B5 培养基上都产生了愈伤组织和胚状体, 其诱导率以 MS<sub>1</sub> 最高, NTH<sub>1</sub> 第二, 但两者差异不显著, MS<sub>1</sub> 和 NTH<sub>1</sub> 与其他培养基均达极显著差异水平; 胚状体和愈伤组织诱导率的平均值, MS 与 NTH 差异不显著, MS 和 NTH 与 B5 培养基均差异极显著, 说明 MS 和 NTH 明显优于 B5 培养基。这个结果与陈肖师等<sup>[10]</sup>的试验结果一致, 与杨博智等<sup>[11]</sup>的报道基本一致, 但与 Mythili 的试验结果完全相反。本研究结果, 在 MS、NTH 和 B5 培养基中分别添加 3 g/L 活性炭、0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L KT、0.1 mg/L 6-BA、5 mg/L AgNO<sub>3</sub> 的 MS<sub>1</sub>、NTH<sub>1</sub> 和 B5<sub>1</sub> 培养基, 其愈伤组织诱导率和胚状体诱导率均极显著提高, 表明在这 3 种培养基中添加植物生长调节剂等可显著提高辣椒花药培养效果, 但不同培养基可能对植物生长调节剂的浓度要求不同, 因此, 就某种培养基而言, 添加植物生长调节剂的最佳浓度还有待研究。

(下转第 187 页)