

花药培养技术在辣椒育种中的应用

张嘉园 辛 鑫 刘亚忠 李秋孝 邢泽农

(陕西省宝鸡市农业科学研究院辣椒油料研究所, 岐山 722400)

摘要:花药培养技术的广泛应用对于辣椒育种具有重要意义。对该技术相关研究进行了综述, 包含辣椒花药培养技术相关研究成果, 该技术在应用过程中的影响因素和培养条件探索等方面研究进展, 以及对该技术发展的展望。旨在为加快和促进辣椒高效育种提供参考。

关键词:辣椒育种; 生物技术; 花药培养; 胚状体诱导

辣椒在我国种植面积广泛, 因其含有丰富的辣椒素、维生素 C 等营养成分, 深受大众喜爱^[1]。辣椒 (*Capicum annuum* L.) 属于常异花授粉植物, 天然异交率较高^[2], 因而要较快获得优良性状研究材料难度较大。同时辣椒有很强的杂种优势, 在应用上主要侧重于杂种一代, 而目前常规育种获得杂交种所需年限较长、成本较高且稳定性差, 并非辣椒育种最佳途径^[3]。现今生物技术作为一类高效育种方式, 主要在组织器官培养、分子标记等方面有较显著的进展^[4], 其中在对辣椒等的应用中, 花药培养技术可以很大程度提高其育种效率^[5], 对于推进辣椒品种选育及在优良性状稳定性控制上起了较大作用。

辣椒染色体数目为 $2n=24$, 为二倍体植株^[6]。辣椒花药培养技术是通过在一定条件下培养适期辣椒花药, 得到单倍体植株, 随后采用人工或自然加倍获得双单倍体 (简称 DH 系), 从而直接获得纯化的辣椒品系^[7], 促进后期育种工作的顺利进行, 从而获得理想效果。

1 应用辣椒花药培养技术的研究成果

我国辣椒的主要育种目标包括: 优质、高产、抗性强以及早熟等几个方面^[7]。研究中采用辣椒花药培养技术, 2 年内即可获得纯合二倍体材料, 大大提高了育种效率^[8]。辣椒花药培养获得的单倍体材料, 对于引入优良基因、基因分析、形态形成、突变育种等研究上十分高效便捷。现今花药培养在烟草、水稻、油菜等许多作物上已获得了较大成功, 也培养了

大批优良性状的辣(甜)椒品种^[9]。

王玉英等^[10]最早利用花药培养获得跃县小辣椒花粉再生植株; 李春玲等^[11]选育出海花一号等甜椒品种; 张树根等^[12]育成海丰 14 号等。R.Dolcet-Sanjuan 等^[13]利用花药培养双单倍体培育出 8 个不同的辣椒杂交一代。2004–2013 年通过国家或地方品种审定委员会审定的、利用双单倍体技术选育的辣椒品种有海丰 16 号^[14]、豫 07-01^[15]等。

2 影响辣椒花药培养的主要因素

辣椒花药培养初期, 主要是胚状体的形成, 其受多种因素影响, 寻找最佳条件得到优质胚状体, 进而分化再生获得单倍体植株, 并通过加倍培养得到相应性状的纯合材料, 为进一步育种提供材料支撑。

2.1 基因型影响 辣椒供体的基因型很大程度上影响辣椒花药培养^[7], 不同类型辣椒胚状体诱导率大不相同, 即使同一种辣椒类型中, 不同基因型表现也在很大程度上影响胚状体诱导形成^[16]。

其中不同基因型辣椒花药培养胚状体诱导率有所差异, 表现为蜡质型胚状体诱导率较高、深绿型次之、再次分别为甜椒和朝天椒类型^[17]。另有试验表明, 大果基因型辣椒的胚状体诱导率明显比小果基因型的辣椒高, 袁丽^[18]的试验中大果型板椒的诱导率最高达到了 8.33%, 而小果型朝天椒仅为 0.17%。黄亚杰等^[19]的试验表明, 易出胚的几种辣椒均为大果类型。大多数研究表明: 不同基因型辣椒材料在相同培养条件下, 胚状体诱导频率表现出显著差异^[20]。李春玲等^[21]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也有很大差异。

2.2 培养时期选择 诱导辣椒花药产生胚状体的过程受植株生长环境及自身生长状况的影响^[17]。前人研究得出:露地栽培的辣椒花药培养效果比温室栽培的好^[22]。同时认为适宜温度也是诱导胚状体产生频率高的因素,即 25~26℃条件下诱导率较高,超过 30℃则诱导率下降^[23]。

在株龄方面,由于老龄植株花中小孢子种类复杂,植株老龄化,畸形花粉数量增加,导致花药培养效果较差^[23]。从辣椒开花不同时期上来说,对相应时期花药进行培养,其胚状体诱导率也有明显差异,研究表明一般选择小孢子大部分处于单核靠边期的花药能提高培养效率^[24],与李春玲等^[25]的观点一致,认为正常季节,单核靠边期的花蕾长度一般为 0.40cm 左右,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。王玉英等^[26]也指出单核靠边期的小孢子对诱导较为敏感,经花药培养的胚诱导率最高。从应用上说,4~8 月都可进行花药培养,用以高效获得单倍体植株,提高工作效率^[8]。

综上所述,辣椒的生长环境、生理状况、不同发育时期的花药都可影响胚状体诱导率高低,可通过控制生长条件和花药发育时期,严格在培养前进行精确的细胞学研究,以确定进行花药培养的花蕾大小和形态,从而实现花药离体培养的高效进行。

2.3 辣椒花药培养条件

2.3.1 花药培养预处理 对辣椒花药进行适当预处理能够提高胚状体诱导率。保证花药接种前及过程中的无菌条件,可减少或避免花药培养过程中污染、褐化等情况出现。目前,试验中常采用升汞溶液、70% 的酒精等进行消毒处理^[16],随后进行花药培养。

对花药进行预处理的常用方式有低温、高温、离心等方式,其中通过温度预处理是较常用的方式。研究表明,低温预处理能延缓花药壁和花粉的退化,在花药壁中积累大量淀粉来促进花粉发育;高温预处理是通过中断配子体发育,促使其连续分裂,进而较快形成胚状体^[27]。低温一般选择 3~10℃,也可将花药在 4℃的低温下处理 2d,然后培养直接获得了花药胚状体;高温一般在 30~35℃之间效果较好,更有利于胚状体的诱导,且频率较高^[28]。也有学者将分离出的花药进行 35℃热激暗处理 8d,比相同温度下短期处理效果好。低温处理或高低温交替进行的变温处理效果比较明显,但不

如高温处理的效果好^[29],这也与付文婷等^[29]的研究结果一致。因而通过控制预处理温度等方式,能较好地控制胚状体的发育。

2.3.2 培养基研究进展 基本培养基对于花药胚状体的诱导至关重要,现在使用的培养基主要有 MS、NHT、N6、NH、C、R 等。众多研究者通过对部分培养基的成分进行调整,也获得了较好的培养效果。X.Qin 等^[30]以 MS 培养基添加激素,进行花药培养,获得了 200 余个辣椒花药培养的胚状体。陈肖师^[31]和王玉英等^[26]研究均表明 MS、NTH 培养基与激素组合的培养基上胚状体诱导率最高。李春玲等^[21]经过多年的摸索,配制出 SPD 培养基,适合辣椒花培胚状体的诱导。也有用两种或多种培养基联合培养的方式进行花药培养,许多研究者在 C 和 R 培养基中分别诱导胚状体产生,随后二者结合促进进一步发育。张子君等^[23]也是采用两种培养基共同培养的方式,在 10 个不同类型辣椒中成功地诱导出了胚状体。

培养基中加入激素、活性炭等能提高胚状体的诱导率。王玉英等^[26]研究表明:低浓度的 NAA、IAA 的加入,有利于胚状体的形成。此外不同基因型要求的激素类型及浓度不同,赖黎丽等^[32]在研究新疆加工型辣椒中,筛选出 MSB 培养基,分别附加 2,4-D+TDZ 和 NAA+KT 的诱导辣椒花药培养的高效培养基组合。活性炭对花药培养有促进作用,可以吸收培养过程中产生的抑制性物质。有研究认为,活性炭能够吸收抑制性物质 ABA,还可以吸附有益物质^[33]。王玉英等^[26]研究认为,培养基中添加 0.5% 的活性炭比较适合,有利于提高出胚率和成苗率。

2.3.3 辣椒花药培养外部条件 培养的温度、光照等对辣椒花药胚状体的诱导有较大影响。前人研究多在 24~30℃恒温培养,后来研究者也采用变温等多种方式进行培养,也有较好的效果,如王玉英等^[26]在辣椒花药培养中采用昼夜温差变动培养,温度范围在 18~26℃。也有学者试验表明在 35℃条件下高温培养 8d,然后在 25~28℃下继续培养^[16],其诱导效果明显。

辣椒花药愈伤组织诱导时,初期需要一定的黑暗条件,而进一步诱导胚状体和芽的分化则需要一定的光照条件。E.D.J Supena 等^[34]将辣椒花药在 9℃条件下培养 7d,然后放置 28℃条件下进行暗培

养,获得了胚状体。通常也在高温培养时采用暗培养,再放入 25~28℃的继续培养条件时,进行光照培养,光照强度为 1800lx 左右^[16]。其中光照对愈伤组织和胚状体诱导方面还未有系统研究,有待进一步研究。

2.4 单倍体植株加倍 花药诱导培养的植株有 1/3 左右的概率能够进行自然加倍^[23]。而通常人工采用一定浓度秋水仙碱诱导单倍体植株加倍,在单倍体植株生长初期,可用秋水仙碱处理幼嫩茎尖或芽,可使单倍体植株加倍,研究表明处理幼苗率加倍效率能达 70% 及以上。赖黎丽等^[32]在幼苗生长正常后,用 0.25% 秋水仙碱加倍处理,约 12h 左右,达到染色体加倍的目的,试验效果显著。

加倍处理的辣椒植株经过鉴定可以了解其染色体状况,通常用细胞压片或 DNA 流式细胞仪进行倍性鉴定^[29],鉴定获得加倍后的正常纯合辣椒植株,并进一步应用到新品种培育当中。

3 结论

辣椒花药培养作为生物技术的一种关键技术,现如今已被广泛应用,前人对此研究涉及育种的多个层面,包括种质资源的创新、抗性相关研究及构建目标性状遗传图谱等方面。可以加快优质辣椒材料纯化速度,提高育种效率。因而针对辣椒花药最适培养条件的持续探索,辣椒不同品种的优良植株再生体系的不断建立^[35],有利于辣椒花药培养技术的成熟应用,进而提高辣椒育种效率。

在育种工作中,利用此项技术通过分子标记辅助选择与花药培养相结合的方法,也可以高效地创制新的加工型辣椒恢复系材料^[36],由此可知辣椒花药培养技术可以单独应用到辣椒育种中,也可以与其他育种方式相结合以更好达到育种目的,从而进一步加快辣椒遗传改良的进程,更好满足对不同辣椒品种日益增长的多样化需求。

参考文献

- [1] 聂楚楚,王秀峰,张悦,等. 我国辣椒育种研究现状[J]. 吉林蔬菜, 2016 (S1): 35-37
- [2] 刘玲. 利用不育系选育辣椒杂交组合研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012
- [3] 靳艳革,岳振平,顾桂兰. 辣椒常用育种方法研究进展初探[J]. 农业科技通讯,2013 (1): 132-134
- [4] 谭净,宋莉英,高峰. 生物技术在辣椒育种研究上的应用[J]. 生物技术,2004,14 (2): 74-76
- [5] 张天翔,林宗铿,曹明华,等. 我国甜椒育种的研究进展[J]. 江西农业学报,2013,25 (7): 44-46
- [6] 刘娜. 辣椒花药培养技术体系建立及种间杂交花粉母细胞减数分裂行为研究[D]. 南京:南京农业大学,2015
- [7] 李怡斐,黄启中,张世才,等. 辣椒花药培养及其在遗传育种上的应用[J]. 辽宁农业科学,2014 (5): 30-37
- [8] 陈晓,詹玉丝,徐小利,等. 花药培养建立辣椒 DH 纯系的初步研究[J]. 河南农业科学,2003,33 (9): 52-55
- [9] 张菊平. 辣椒花药小孢子培养及其胚状体发生机理研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007
- [10] 王玉英,孙敬三,王敬驹,等. 小黑麦和辣椒花粉植株的诱导[J]. 中国科学,1973 (1): 104-107
- [11] 李春玲,蒋钟仁. 甜椒花培新品种‘海花三号’的育成[J]. 园艺学报,1990 (1): 39-44,82
- [12] 张树根,邢永萍,李春林,等. 辣椒新品种海丰 14 号的选育[J]. 辣椒杂志,2003 (2): 33-35
- [13] Dolcet-Sanjuan R,Claveira E,Huerta A. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment[J]. J Am Soc Hortic Sci. 1997,122 (4): 468-475
- [14] 邢永萍,张树根,李春林,等. 甜椒新品种海丰 16 号的选育[J]. 中国蔬菜,2014 (6): 49-51
- [15] 张晓伟,姚秋菊,蒋武生,等. 辣椒新品种豫 07-01 的选育[J]. 中国蔬菜,2013 (4): 104-106
- [16] 张树根,沈火林,蒋钟仁,等. 辣椒花药培养单倍体育种技术研究进展[J]. 辣椒杂志,2006 (3): 1-5,8
- [17] 李素文,黄亚杰,肖瑜,等. 辣椒花药离体培养的评述[J]. 中国蔬菜,2012 (20): 1-6
- [18] 袁丽. 不同基因型和培养条件对辣椒花药培养的影响[J]. 现代农业科技,2011 (9): 133,141
- [19] 黄亚杰,李素文,肖瑜,等. 辣椒花药培养的初步研究[J]. 河南农业科学,2014,43 (7): 112-115,125
- [20] 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 Biotech Eq,2004,18 (3): 34-38
- [21] 李春玲,蒋钟仁. 甜辣椒花药培养单倍体育种技术[M]// 邹学校. 中国辣椒,北京:中国农业出版社,2000: 191-205
- [22] 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,2007,23 (8): 331-334
- [23] 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
- [24] 付文婷,韩世玉,邢丹,等. 不同培养基及采花期对辣椒花药培养的影响[J]. 河南农业科学,2014,43 (10): 83-86,94
- [25] 李春玲,蒋钟仁. 对甜椒花药培养中一些影响因素的研究[J]. 中国蔬菜,1983 (12): 35-37
- [26] 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
- [27] 静一,黄启中,罗安才,等. 加工型辣椒花药培养技术研究[J]. 中国农学通报,2012,28 (22): 144-150

做大做强高原特色马铃薯种业

——基于大理州脱毒马铃薯种薯产业化发展优势的若干思考

李江 赵宗福 杨曙辉 赵彪 严绍萍

(云南省大理白族自治州农业科学推广研究院,大理 671005)

摘要:大理州脱毒马铃薯种业发展起步较晚,但已取得重要进展,且具备诸多做大做强的后发优势或基础条件。在简述大理州马铃薯种薯产业发展主要成就的基础上,从自然资源、生态环境、科学技术、地理区位、发展机遇和市场前景等层面分析了区域马铃薯脱毒种薯专业化生产、产业化发展之优势条件;进一步分析指出,良种匮乏、生产成本低、良繁与质监体系不完善、规模经营主体弱势等是制约产业发展的最主要因素。并提出:强化政策支撑、推动科技创新、完善良繁体系、健全质监体系和扶强规模经营主体等若干对策建议,做大、做优、做强区域脱毒马铃薯种业。

关键词:马铃薯;脱毒种薯;产业化;成效;优势;制约因素;着力点;大理州

马铃薯是中国,也是云南省和大理州继玉米、水稻和麦类之后的第四大粮食作物,在农业农村经济中占有越来越重要的战略地位。2015年1月6日,农业部副部长余欣荣在马铃薯主粮化发展战略研讨会上指出,马铃薯主粮化开发是深入贯彻中央关于促进农业调结构、转方式、可持续发展的重要举措,是新形势下保障国家粮食安全,促进农民持续增收的积极探索。近年来,伴随着马铃薯“主粮化”战略的深入推进,中国马铃薯产业发展迅速,2016年种植面积已达568.4万 hm^2 ,年产量9000万余t,成为全球马铃薯种植面积第一、总产量最大的国家。农业部《关于加快马铃薯产业发展意见》指出,未来我国马铃薯种植面积将扩大到666.67万 hm^2 ,脱毒种薯普及率将达到50%以上^[1]。

种薯是马铃薯产业链条中最重要环节,是产业之根本;种薯质量是关乎马铃薯产量与品质的首要因素,同时也是马铃薯国际贸易中的关键和市场竞争力的核心。然而,相对于荷兰、加拿大、英国等马铃薯生产最为先进的国家,我国云南省尤其是滇西片区和大理州,种薯产业发展显著滞后或尚处初始阶段,专业化、规模化和标准化生产水平极低;脱毒马铃薯种薯应用普及率仅为25%~30%,略高于20%~25%的全国平均水平,显著低于50%的中国西部平均水平和90%的发达国家水平;种薯质量整体偏低或参差不齐,合格种薯比率更低等,进而深刻影响或严重阻碍区域马铃薯产业持续绿色发展。大理州地处中国西南的滇西低纬高原地区,既是马铃薯的优势产区,更是优质特色种薯的优势产区,推动

- [28] 龙洪进. 国内外辣椒(*C. annuum* L.)单倍体育种技术研究进展[J]. 西南农业学报, 2004(51): 439-443
- [29] 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, 46(4): 635-640
- [30] Qin X, Rotino G L. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes[J]. Capsicum Eggplant Newsl. 1993, 12: 59-62
- [31] 陈肖师. 甜椒花药培养及“塞花一号”的育成[J]. 中国蔬菜, 1988(3): 5-7
- [32] 赖黎丽, 张嘉园, 杨梅, 等. 新疆加工型辣椒花药培养技术研究[J]. 北方园艺, 2017(19): 6-10
- [33] 刘广霞. 影响辣椒花药培养胚状体诱导效率的因素研究[D]. 郑

州:河南农业大学, 2009

- [34] Supena E D J, Suharsono S, Jacobsen E, et al. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant cell reports, 2006, 25(1): 1-10
- [35] 谭净, 宋莉英, 高峰. 生物技术在辣椒育种研究上的应用[J]. 生物技术, 2004, 14(2): 74-76
- [36] 李怡斐, 张世才, 蒋晓英, 等. 利用花药培养技术创制加工型辣椒胞质雄性不育恢复系[J]. 分子植物育种, 2017, 15(6): 2317-2321

(收稿日期: 2018-03-30)