

辣椒花药培养再生植株倍性鉴定方法的比较

程志芳, 李 丽, 史艳艳, 韩娅楠, 常晓轲, 姚秋菊

(河南省农业科学院蔬菜研究所 郑州 450002)

摘要:为探索出一种准确、高效、适用的辣椒花药培养再生植株的倍性鉴定方法,以来自 10 个基因型的 60 个辣椒花药培养再生株系为试材,采用植株育性检测法和 DNA 流式细胞仪检测法,并结合根尖细胞压片染色体计数法进行倍性鉴定,比较不同方法的优缺点。结果表明,DNA 流式细胞仪倍性鉴定准确率为 96.67%,该方法快速,便捷,但鉴定成本高,且易出现偏峰现象;花粉活力检测法在判断再生植株染色体奇偶倍性方面准确率为 100%,但不能甄别再生植株的具体染色体倍性。花粉活力检测法和 DNA 流式细胞仪检测法结合使用可明显降低鉴定成本,提高准确率和效率,即对已现蕾的株系,采用花粉活力检测法确定其染色体奇偶倍性,便于早期进行染色体加倍处理;对现蕾较晚的株系,宜在苗期采用 DNA 流式细胞仪检测法。

关键词:辣椒;倍性鉴定;流式细胞仪;花粉活力;染色体计数法

中图分类号:S641.3

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2025)08-077-06

Comparison of ploidy identification methods for regenerated plants from pepper anther culture

CHENG Zhifang, LI Li, SHI Yanyan, HAN Yanan, CHANG Xiaoke, YAO Qiuju

(Institute of Vegetable, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: In order to explore an accurate, efficient, and applicable ploidy identification method for regenerated plants from pepper anther culture, in this study, 60 regenerated plant lines from 10 genotypes of pepper anther culture were used as the test materials. The ploidy identification was conducted by adopting the plant fertility detection method and DNA flow cytometry, combined with the chromosome counting method of root tip cell squash. The advantages and disadvantages of different methods were compared. The results indicated that the accuracy rate of ploidy identification by DNA flow cytometry was 96.67%, this method was rapid and convenient, but it had high cost and was prone to peak bias. The pollen vitality detection method had an accuracy rate of 100% in determining the odd-even ploidy of regenerated plants' chromosomes, but it could not distinguish the specific ploidy of regenerated plants. The combination of pollen vitality detection method and DNA flow cytometry detection method could significantly reduce the identification cost, improve the accuracy rate and efficiency. That is, for the lines that have already flowered, the pollen vitality detection method could be used to determine the odd-even ploidy of chromosomes, which was convenient for early chromosome doubling treatment; for the lines that flowered later, the DNA flow cytometry detection method should be used in the seedling stage. If there were difficult-to-determine situations such as peak bias, the pollen vitality could be combined to determine the ploidy of regenerated plants.

Key words: Pepper; Ploidy identification; Flow cytometer; Pollen viability; Chromosome counting

辣椒(*Capsicum annuum* L., $2n=2x=24$), 是世界上广泛种植的蔬菜作物之一, 现有栽培品种多为一年生草本。传统育种方式育成新品种至少需要 5 a (年), 近年来随着花药培养技术逐渐应用于辣椒育种领域, 显著提高了育种效率。但由于植物在减数

分裂过程中可能存在染色体行为、减数分裂微管骨架、细胞质分裂等异常细胞学现象而形成倍性复杂的小孢子^[1], 进而导致花药培养再生植株中可能有单倍体、二倍体、多倍体、混倍体和非整倍体^[2-3], 而不同染色体倍性植株用途不同, 如单倍体株系可通

收稿日期: 2024-12-10; 修回日期: 2025-03-06

基金项目: 河南省重大科技专项(241100110200); 河南省现代农业产业技术体系项目(CAR-24-G-15); 河南省农业科学院自主创新项目(2024ZC036); 河南省科技攻关项目(252102110318)

作者简介: 程志芳, 女, 助理研究员, 主要从事茄果类蔬菜生物技术研究。E-mail: czhifang2021@163.com

通信作者: 姚秋菊, 女, 研究员, 主要从事茄果类蔬菜栽培与育种研究。E-mail: wgqdaisy@163.com

过人工加倍获得双单倍体(double haploid, 简称 DH);而通过自然加倍花粉再生出的二倍体株系即为 DH 系,可直接应用于育种实践,加快育种进程,亦可用于遗传分析和分子生物学等研究领域,还可快速高效筛选并创制优质抗病抗逆新种质^[4];而非整倍体和多倍体株系可用于细胞遗传学研究等领域。因此,花药培养再生植株的倍性鉴定是其充分利用的前提。

目前常用的植物染色体倍性鉴定方法有形态学鉴定^[5-7]、细胞学鉴定(即利用叶片气孔保卫细胞周长^[8-9]、气孔密度^[10-12]、保卫细胞叶绿体个数^[9-13]进行鉴定)、花粉形态^[14]或染色体计数^[6-7,10-12,15]判断植株的倍性,还有分子标记鉴定法^[16-17]及近些年广泛应用的 DNA 流式细胞仪鉴定法^[5-7,10,15,18]。纵观多种植物的倍性鉴定方法,可知多种方法兼用可提高鉴定效率和准确率。李春兰等^[15]利用染色体计数法与 DNA 流式细胞仪相结合检测棉梨的倍性水平,提高了鉴定的效率和准确率。而在辣椒花药培养再生植株倍性鉴定方面的研究较少。张菊平等^[19-20]研究了辣椒单倍体和二倍体植株叶片气孔保卫细胞周长及其叶绿体数的差异,结果表明,气孔保卫细胞叶绿体数可作为辣椒苗期快速确定植株倍性的指标且准确率可达 92.68%;而气孔保卫细胞周长(第 5 片叶)仅可作为鉴定辣椒植株倍性的辅助指标。付文婷等^[21]比较了染色体计数法、DNA 流式细胞仪、

形态鉴定及坐果情况在鉴定辣椒花药培养再生植株倍性方面的可靠性,发现 DNA 流式细胞仪检测法和染色体计数法吻合度达 93%。但前人的研究多侧重于单倍体与二倍体的区别,而鲜少涉及多倍体、混倍体和非整倍体现象。因此,探索出一种针对辣椒的成本低廉、快速准确的倍性鉴定方法势在必行。

因辣椒花粉活力与植株倍性紧密相关,在无逆境胁迫的情况下^[22],通常二倍体和四倍体等偶数倍体的花粉活力高,而单倍体和三倍体等奇数倍体由于减数分裂异常而导致花粉无活力或活力极低^[23],因此花粉活力可作为判断植株倍性的依据之一。鉴于此,笔者以 60 个辣椒花药培养再生株系为试材,主要利用植株育性检测法和 DNA 流式细胞仪检测法确定其倍性,当两种方法鉴定结果依然不能确定植株倍性时,再利用根尖细胞压片染色体计数法,最后分析不同方法的准确度及其优劣势,以期寻求一种适合辣椒的准确高效易普及的植株染色体倍性鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为河南省农业科学院蔬菜研究所通过 10 个辣椒品种花药培养获得的 60 个再生株系(表 1)。2023 年 9—10 月陆续将花药培养再生株

表 1 参试辣椒品种名称、来源、类型及再生株系数量
Table 1 Name, source, type and number of regenerated lines of the tested pepper varieties

果实类型 Fruit type	品种名称 Variety name	再生株系数量 Number of regenerated line	品种来源 Source of variety
羊角椒 Goat horn pepper	华之秀 2 号	24	河南豫艺种业科技发展有限公司 Henan Yuyi Seed Industry Technology Development Co., LTD.
	中顺 808	14	河南中顺农业科技有限公司 Henan Zhongshun Agricultural Science and Technology Co., LTD.
	丰抗二号	5	河南红绿辣椒研究所 Henan Red and Green Pepper Research Institute
	PC477	3	河南欧兰德种业有限公司 Henan Oulande Seed Industry Co., LTD.
	PC484	3	河南欧兰德种业有限公司 Henan Oulande Seed Industry Co., LTD.
	豫园大椒 F ₁	2	河南省豫园科技发展有限公司 Henan Yuyuan Technology Development Co., LTD.
牛角椒 Cow horn pepper	新时代	3	河南豫艺种业科技发展有限公司 Henan Yuyi Seed Industry Technology Development Co., LTD.
	无名线椒	1	河南省农业科学院蔬菜研究所 Institute of Vegetable, Henan Academy of Agricultural Sciences
线椒 String pepper	华之秀 128	1	河南豫艺种业科技发展有限公司 Henan Yuyi Seed Industry Technology Development Co., LTD.
	博辣艳丽	4	湖南兴蔬种业有限公司 Hunan Xingshu Seed Industry Co., LTD.
	Bolayanli		

系驯化移栽到直径为 10 cm 的营养钵中,2023 年 11 月至 2024 年 3 月,将辣椒幼苗陆续定植到河南现代农业研究开发基地日光温室,株行距为 30 cm×50 cm。

1.2 方法

1.2.1 植株育性检测法 植株育性调查分为两个方面:一是花粉活力检测;二是结籽情况调查。花粉活力检测采用碘-碘化钾(I₂-KI)染色法。每个株系任取 3 个生长良好的即将开放的新鲜花蕾,将花药置于载玻片上,加 1~2 滴 I₂-KI 染色液,用镊子挤出花粉,去除破碎的花药壁,盖上盖玻片 10 min 后,采用 Olympus 显微镜在 10×镜下观察花粉染色情况并拍照,蓝色为可育花粉,黄褐色为发育不良或不育花粉,每个花蕾观察 5 个视野,3 次重复,统计其可育花粉的百分率,取平均值。2024 年 6—7 月调查其单株坐果和结籽情况。

1.2.2 流式细胞仪检测法 流式细胞仪检测采用 Sysmex 公司的 CYStain UV Precise P 试剂盒进行裂解和染色,采用 PARTEC 公司的 CyFlow® Cube8 流式细胞仪进行倍性鉴定。每株系取 1~2 片约 0.5 cm²的新鲜幼嫩叶片,加入 300 μL 细胞裂解液,用手术刀片切碎,然后加入 1200 μL 染色液,50 μm 筛子过滤后收集滤液,避光染色 5~10 min 后利用流式细胞仪检测该样品 DNA 含量分布图,读取峰值。用二倍体杂交种华之秀二号作对照调试电压,

使对照位于 200 道。每个样本测定 1 次,根据峰值曲线判断待测样品倍性。DNA 峰值处于 100 道、200 道、300 道和 400 道分别为单倍体、二倍体、三倍体和四倍体,其余为非整倍体。

1.2.3 根尖细胞压片染色体计数法 从土壤中挖取待测株系的幼根,清水冲洗干净,切取 1 cm 左右的幼嫩根尖,先用 0.002 mol·L⁻¹ 的 8-羟基喹啉于 28 ℃避光处理 5~7 h,后经卡诺固定液固定 4~24 h,再转到 70%乙醇中放 4 ℃冰箱备用。用清水冲洗 2~3 次后,用 1 mol·L⁻¹ 的 HCL 在 60 ℃水浴中解离 10~12 min,取出后再用清水冲洗 3~4 次,切取幼嫩根尖,滴入卡宝品红染色液染色制片,在 Olympus 显微镜下选取能数清染色体个数的分裂相在 100×油镜下观察、记数、拍照成像。每个待测株系观察 5 个根尖压片,每个根尖至少看到 3 个可数分裂相,确定染色体个数。

1.3 数据分析

采用 Excel 2019 对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 利用植株育性检测辣椒花药培养再生植株群体的染色体倍性构成

参试的 60 个花药培养再生株系花粉活力差异明显(表 2),根据花粉活力将再生株系基本分为三类:一类为花粉完全无活力(0)的株系,共 15 株,均

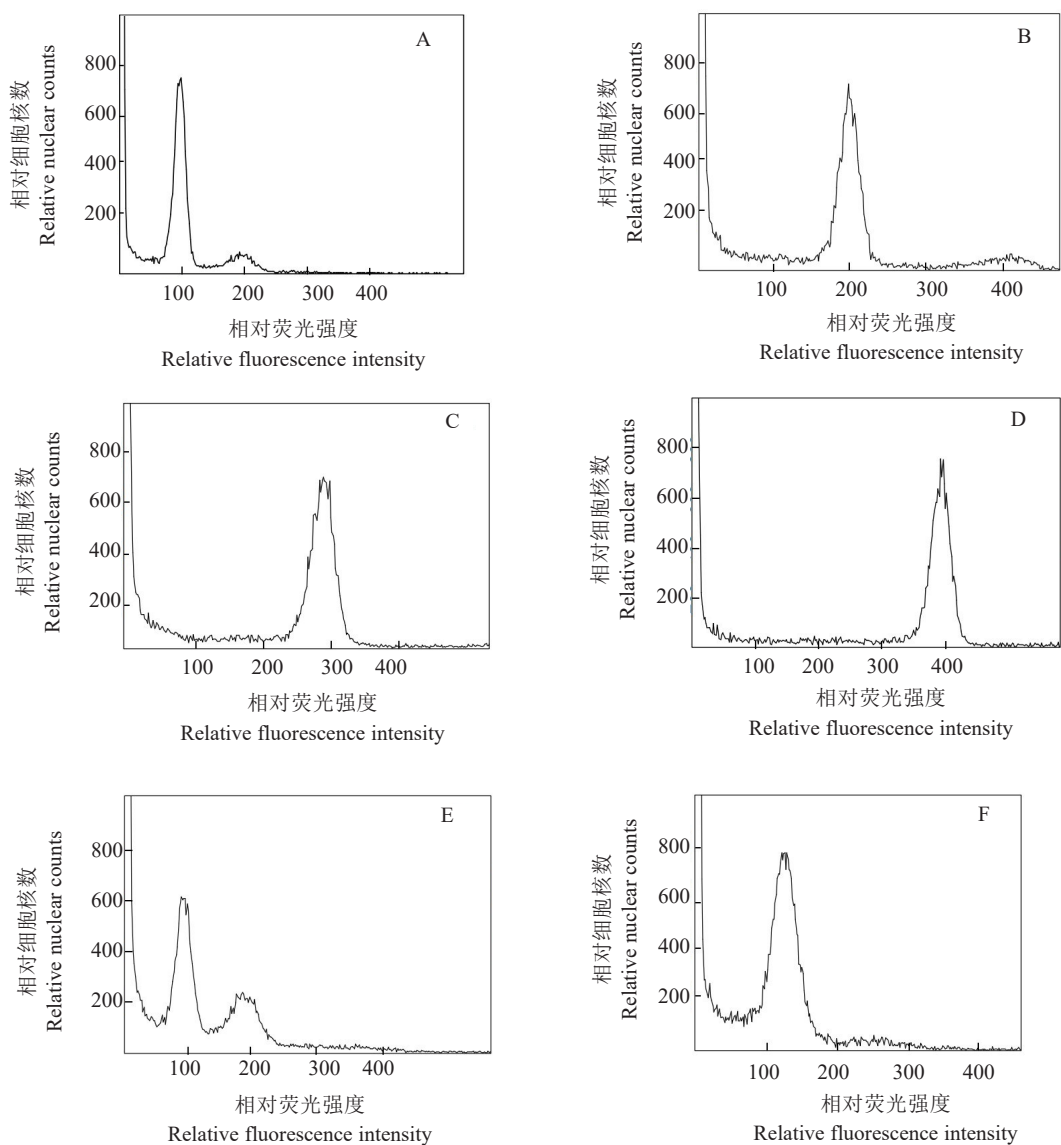
表 2 60 个辣椒再生株系的花粉活力分布、结籽情况及流式细胞仪检测结果
Table 2 The pollen vitality, seed-setting condition and the result of flow cytometer detection of 60 regenerated lines of pepper

株系数	花粉活力	流式细胞仪峰值	推测倍性	株系数	是否结籽
Number of regenerated lines	Pollen vitality	Peak of flow cytometer	Assumed ploidy	Number of regenerated lines	Seeds or not
15	0	100	单倍体 Haploid	13	否 No
		300	三倍体 Triploid	2	否 No
19	2.02%~31.63%	100	单倍体 Haploid	17	否 No
		150	非整倍体 Aneuploid	1	否 No
		150	非整倍体 Aneuploid	1	极少量 Thimbleful
26	81.18%~98.49%	200	二倍体 Diploid	23	是 Yes
		400	四倍体 Tetraploid	2	是 Yes
		100、200	混倍体 Polyploid	1	是 Yes

不结籽。第二类为花粉活力较低的株系(2.02%~31.63%),共 19 株,除 1 个株系(华之秀 2 号-159,花粉活力为 31.63%)收到 5 粒种子外,其余均不结籽;由此认定以上两类株系为奇数倍体或非整倍体。第三类为花粉活力较高的株系(81.18%~98.49%),共 26 株,均可大量结籽,认定为偶数倍体或混倍体。

2.2 DNA 流式细胞仪检测辣椒花药培养再生植株群体的染色体倍性构成

参试 60 个花药培养再生株系经 DNA 流式细胞仪检测的结果如表 2、图 1 所示,单倍体(图 1-A)为 30 株,二倍体(图 1-B)为 23 株,三倍体(图 1-C)2 株,四倍体(图 1-D)2 株,混倍体(单倍体和二



注:A. 单倍体;B. 二倍体;C. 三倍体;D. 四倍体;E. 混倍体;F. 非整倍体。
Note: A. Haploid; B. Diploid; C. Triploid; D. Tetraploid; E. Polyploid; F. Aneuploid.

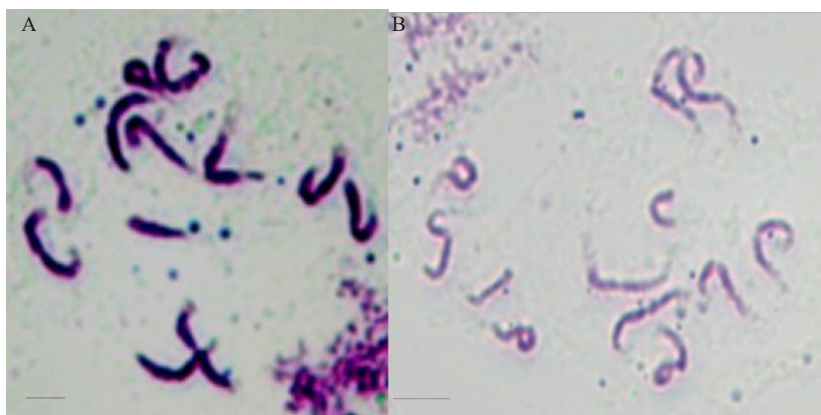
图1 流式细胞仪测定辣椒花药培养再生植株 DNA 含量分布
Fig. 1 Distribution of DNA content in regenerated plants obtained from pollen culture of pepper determined by flow cytometry

倍体组成,图 1-E)1 株,非整倍体(图 1-F)2 株,分别占再生植株的 50.00%、38.33%、3.33%、3.33%、1.67%和 3.33%。

2.3 花粉活力检测法和 DNA 流式细胞仪检测法鉴定结果的比较

对照以上两种鉴定方法的检测结果(表 2)可知,参试株系中 26 个花粉活力在 81.18%~98.49%的株系,均可大量结籽,流式细胞仪检测为二倍体、四倍体或混倍体;参试株系中 15 个花粉活力为 0 的株系,流式细胞仪检测为单倍体或三倍体,均不结籽;参试株系中 19 个花粉活力在 2.02%~31.63%

的株系,流式细胞仪检测为单倍体或非整倍体,除 1 株花粉活力为 31.63%的株系极少量结籽外,其余均不结籽;其中流式细胞仪检测为非整倍体的 2 个株系(华之秀 2 号-159 和华之秀 2 号-24)的花粉活力分别为 31.63%和 13.57%,前者收到 5 粒种子且可萌发,而后者不结籽。进一步利用根尖细胞压片染色体计数法确定 2 个非整倍体株系的染色体数,根尖染色体计数均为 12 条(图 2),即华之秀 2 号-159 和华之秀 2 号-24 均为单倍体再生株系。因此参试株系中花粉活力在 2.02%~31.63%的株系均为单倍体。



注:A. 华之秀 2 号-159($2n=x=12$); B. 华之秀 2 号-24($2n=x=12$)。

Note: A. Huazhixiu No. 2 - 159($2n=x=12$); B. Huazhixiu No. 2-24($2n=x=12$).

图2 流式细胞仪检测为非整倍体的再生株系根尖细胞压片染色体个数

Fig. 2 The number of chromosomes in root tip cells of the regenerated lines detected by flow cytometry as non-equal-sized sets (aneuploid) was stained by microscopic examination

综上,60个参试辣椒花药培养再生株系采用花粉活力检测法、DNA流式细胞仪检测法,结合根尖细胞压片染色体计数法和植株结籽性,确定32株为单倍体、23株二倍体、2株三倍体、2株四倍体和1株混倍体,分别占参试植株的53.33%、38.33%、3.33%、3.33%和1.67%。DNA流式细胞仪检测法倍性鉴定准确率为96.67%。

3 讨论与结论

参试株系中花粉活力高于81.18%时,经DNA流式细胞仪鉴定为偶数倍体和混倍体,均可大量结籽。参试株系中花粉活力低于31.63%时,经DNA流式细胞仪检测结合根尖细胞压片染色体计数鉴定均为奇数倍体,除1株极少量结籽外,其余均不结籽,这可能是由于单倍体株系在异常减数分裂过程中产生极少量 $2n$ 花粉^[23],进而有可能结籽或假性结籽,但结籽率极低,本研究中单倍体株系结籽率仅为3.13%,19株花粉活力为2.02%~31.63%的株系,13株出现假性结籽现象,而花粉活力为0的奇数倍体株系,无假性结籽现象。这说明不能仅凭是否结果来判断辣椒植株的染色体倍性,而花粉活力检测更可靠。另外,参试株系中单倍体占奇数倍体的94.12%,三倍体占奇数倍体的5.88%,综上所述,采用花粉活力检测法可以准确区分辣椒花药培养再生株系是奇数倍体或偶数倍体,且再生株系中单倍体在奇数倍体中占很大比例(94.12%),而只有单倍体再生株系需要进行人工染色体加倍处理,进而得到DH系应用于辣椒育种,因此,仅用花粉活力检测法足以完成辣椒花药培养再生植株倍性鉴定进

而满足创制DH系的育种需求。此方法简便、高效、准确度高、成本低廉,且对再生植株无伤害;但缺点是植株需现蕾,鉴定周期参差不齐,时效性略差,因此,适合现蕾较早株系的染色体倍性鉴定,不适合苗期长的草本植物和童期长的木本植物;另外,与DNA流式细胞仪或根尖细胞压片染色体计数法相比,不能甄别再生植株的具体染色体倍性。

笔者在本研究中仅采用DNA流式细胞仪检测法的倍性鉴定准确率为96.67%;而付文婷等^[21]和陈斌等^[24]的研究表明,DNA流式细胞仪鉴定准确率分别为93%和94.5%,与本研究相比略低,这可能是参试群体数量不同和协同鉴定方式不同所致。流式细胞仪检测法快速、便捷,可短时间进行大量群体检测,取材部位多样,不受取材部位、季节和细胞所处时期的限制;目前在许多蔬菜作物的研究中多采用此法^[25]。但缺点是该方法作为单倍体育种工作中的常规检测手段,价格昂贵、对样品准备要求高、易出现偏峰现象等^[26]。本研究中参试的60个再生株系29株存在偏峰现象,此现象在不结球白菜的研究中也有发生^[27]。因此DNA流式细胞仪检测与花粉活力检测结合使用可提高辣椒植株倍性鉴定的准确率,降低使用繁杂的染色体计数法的频率。

综上所述,笔者认为花粉活力检测法与DNA流式细胞仪检测法两者结合是适合辣椒的高效、准确、低廉的倍性鉴定方法,即对已现蕾的株系,采用花粉活力检测法确定其染色体奇偶倍性,便于早期进行染色体加倍处理;对现蕾较晚的株系,宜采用DNA流式细胞仪检测法。

参考文献

- [1] 张平冬. 植物 $2n$ 配子发生机理研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2023, 45(7): 1-8.
- [2] 唐兵, 付文苑, 赵利芬, 等. 利用离体小孢子培养技术培育叶用芥菜耐抽薹新品系研究[J]. 河南农业科学, 2023, 52(6): 100-110.
- [3] 程志芳, 史艳艳, 李丽, 等. 辣椒花药培养影响因素研究及再生植株倍性鉴定[J]. 河南农业科学, 2023, 52(11): 124-132.
- [4] 白继鹏, 王洪洋, 李灿辉. 马铃薯双单倍体诱导及辅助育种研究进展[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(4): 1-7.
- [5] 周元昌, KENNEDY S. 孢子甘蓝花药苗倍性的快速鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(1): 55-58.
- [6] 刘倩. 6种苜蓿属植物多倍体诱导及倍性鉴定研究[D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2014.
- [7] 万正林, 周艳霞, 武鹏, 等. 同源四倍体黑皮冬瓜的诱导与倍性鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 31-38.
- [8] 魏卓, 张先昂, 张越, 等. 黄心中华猕猴桃多倍体诱导及鉴定[J]. 分子植物育种, 2020, 18(12): 4036-4040.
- [9] 鲁文英, 漆燕玲. 饲用甜菜染色体倍性与叶片气孔性状相关性研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(2): 70-73.
- [10] 韩国伟, 李旦, 赵月明, 等. 疑似多倍体小木漆的倍性鉴定[J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(3): 7-11.
- [11] 宋金亮, 朱磊, 贾圣风, 等. 西葫芦胚囊再生植株快速繁殖及倍性鉴定[J]. 河南农业科学, 2018, 47(1): 78-83.
- [12] 闵子扬, 刘泽发, 杨红波, 等. 南瓜胚囊再生植株倍性鉴定方法的比较[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(2): 162-165.
- [13] 袁素霞, 刘玉梅, 方智远, 等. 甘蓝类蔬菜小孢子再生植株染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数的相关性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 189-197.
- [14] 石荫坪, 束怀瑞. 利用苹果花粉粒形态进行倍性鉴定[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 133-138.
- [15] 李春兰, 牛莹莹, 吴玉霞, 等. 棉梨染色体倍性鉴定[J]. 山东农业科学, 2020, 52(5): 16-20.
- [16] 张有做, 楼程富, 周金妹, 等. 不同倍性桑品种基因组 DNA 多态性比较[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(1): 79-81.
- [17] SORRELLS M E. Development and application of RFLPs in polyploids [J]. Crop Science, 1992, 32(5): 1086-1091.
- [18] 王振宇. 油菜染色体加倍及倍性鉴定方法研究[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2015.
- [19] 张菊平, 巩振辉, 刘珂珂, 等. 辣椒染色体倍性水平的快速检测[J]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(8): 121-124.
- [20] 张菊平, 周快索, 巩振辉, 等. 用气孔保卫细胞周长鉴定辣椒植株的倍性[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 133-135.
- [21] 付文婷, 何建文, 杨红, 等. 辣椒花药培养再生植株的倍性鉴定[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(6): 18-21.
- [22] 张雪莲, 罗德旭, 刘欣, 等. 高温胁迫下不同辣椒耐热性鉴定及生理生化特性研究[J]. 江西农业学报, 2023, 35(1): 70-75.
- [23] 刘大钧. 细胞遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [24] 陈斌, 赵泓, 耿三省, 等. 辣椒花药培养再生株群体染色体倍性构成的多样性[J]. 华北农学报, 2007, 22(1): 123-128.
- [25] 成妍, 马蓉丽, 焦彦生, 等. 流式细胞术在蔬菜倍性鉴定中的应用[J]. 山西农业科学, 2011, 39(8): 911-913.
- [26] FARNHAM M, CANIGLIA E J, THOMAS C E. Efficient ploidy determination of anther derived broccoli[J]. Hortscience, 1998, 32(2): 323-327.
- [27] 黄天虹, 张娅, 梁超凡, 等. 不结球白菜游离小孢子培养及植株再生研究[J]. 核农学报, 2019, 33(2): 240-247.