

辣椒花药培养再生株群体染色体倍性构成的多样性

陈 斌¹, 赵 泓¹, 耿三省¹, 张宝玺², 张月云¹, 刘 凡¹

(1. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要:采用流式细胞分析技术和染色体计数法对辣椒花药培养再生株群体的染色体倍性构成情况进行了鉴定。显示了花药培养再生株中染色体倍性构成的多样性。观察到染色体倍性在不同检测组织器官中的差异现象, 说明对同一材料不同器官进行倍性检测以确定植株倍性的必要性, 以及植株上部器官的染色体倍性对于结籽能力的决定性。观察到再生株中个别细胞染色体的丢失现象。对流式细胞检测技术和染色体计数法的相关性进行了研究, 得出2种检测技术下二者的吻合度为0.95, 并对流式检测技术中的偏峰现象进行了初步的分析。

关键词:辣椒; 花药培养; 倍性构成; 流式细胞仪; 染色体计数

中图分类号: Q343 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0123-06

Studies on Ploidy Composing in Regenerated Plants from Anther Culture of Pepper(*Capsicum annuum* L.)

CHEN Bin¹, ZHAO Hong¹, GENG San-sheng¹, ZHANG Bao-xi², ZHANG Yue-yun¹, LIU Fan¹

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

2 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Flow cytometric (FCM) analytical technique and chromosome counting were used for the detailed ploidy identification in population of anther culture derived pepper plants. Results revealed ploidy diversity in regenerated plants. The different ploidy in organs (eg. Leave and root tips) of the same plant was observed, and this phenomena showed the importance of determining ploidy level by different samples. Chromosome deletion was observed in some cells of haploid or double haploid plants. The coincidence between FCM and chromosome counting was high up to 0.95 in our experiment. We also discussed about the phenomenon of peak distortion in FCM analytical technique. These observations and results are significant for the haploid breeding, germplasm innovation and cytogenetic researches.

Key words: Pepper(*Capsicum annuum* L.); Anther culture; Ploidy composing; Flow cytometry; Chromosome counting

花药培养等单倍体育种技术不仅可以使杂合体快速稳定, 缩短育种年限, 而且可以获得新种质。该技术在十字花科、部分茄果类作物中已得到越来越广泛的应用^[1-4]。通常花药培养后代是染色体倍性水平不同的混合群体^[1,5,6-9]。一般的研究报道中多是主要针对某一种方法如: 气孔保卫细胞叶绿体计数法^[7]、形态观察法^[8]、流式细胞仪鉴定法^[9-12]以及根尖压片染色体计数法^[13]等进行再生株染色体的倍性鉴定, 并认为其结果就是再生株的倍性情况。但在我们的研究中发现有时不同的鉴定方法会出现结果偏差的现象, 特别在采用流式细胞仪鉴定中常会出现偏峰现象。再生株染色体倍性的

准确鉴定, 是关乎到单倍体育种技术的有效利用以及植物细胞遗传学研究、创新种质分析等的重要问题。因此对高效、准确的染色体倍性鉴定技术, 以及对花药培养再生株群体可能出现的染色体构成情况的研究具有其理论及实践意义。

辣椒(*Capsicum annuum* L.) 是我国种植面积第二大的蔬菜作物, 也是花药培养育种应用比较成功的作物之一^[3,4]。我们在辣椒上已建立了高效率的花药培养小孢子胚状体及植株诱导技术, 本研究拟结合流式细胞术及染色体计数, 对再生株群体的染色体倍性构成进行较详细的分析。一方面对这2种常用技术在染色体倍性分析上的异同及其吻合度、

收稿日期: 2006-03-07

基金项目: 国家“863”项目(2002AA244021, 2002AA207012-3); 北京市科委项目(H022020130130)

作者简介: 陈 斌(1975-), 男, 北京人, 在职硕士, 主要从事甜(辣)椒育种及花药培养的研究

通讯作者: 刘 凡(1965-), 女, 北京人, 博士, 研究员, 主要从事生物技术方面的研究工作。

注意事项等进行研究; 另一方面辣椒再生株群体倍性分析的结果, 不仅可以鉴定、筛选出一些有价值的材料, 而且它对于单倍体育种技术在其他作物上的利用具有指导意义。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试辣椒 2004 年春季在北京市农林科学院蔬菜研究中心大棚种植。自 5 月始, 分别取 10 个辣椒杂交品种的花蕾进行花药培养, 采用改良 NTH 培养基^[3]。2004 年 11 月获得 145 个再生株, 对其中的 110 个具有 4 片以上真叶的再生株利用流式细胞仪及染色体计数进行了倍性分析。选用常规二倍体杂种京甜 3 号作为对照材料。

1.2 再生株倍性构成的流式细胞仪分析

采用美国 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪 (Flow cytometric) 进行倍性检测, 并用 CellQuest (BD 公司) 软件获取数据, ModFit 软件 (Yerity Software House 公司) 分析结果。

1.2.1 测定程序 取植株 (包括对照和再生株) 上层新鲜叶片 1 g, 分别在 2 mL 细胞裂解液^[14] 中用锋利的刀片切碎、过滤、收集滤液, 经 800 r/min 离心 5 min 后, 用 PI (Propidium iodide 碘化丙啶, 50 $\mu\text{g/mL}$) 染液对细胞核 DNA 进行荧光标记, 置于暗处 30 min 后, 用流式细胞仪进行植株倍性鉴定。

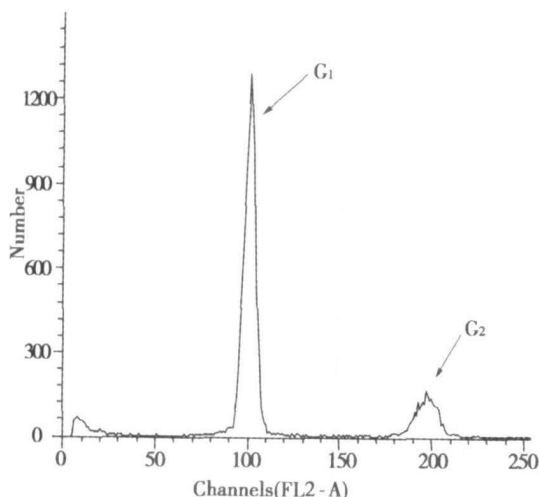


图 1 流式细胞仪测定的二倍体辣椒叶片 DNA 含量分布

Fig 1 Histograms of FCM analysis of nuclei DNA content of a known diploidy (2n) pepper (*Capsicum annuum* L.)

1.2.2 倍性确定 用已知二倍体辣椒作对照来调整流式细胞仪, 使对照的 G_1 期位于 100 道附近 (图 1)。 G_1 期的 DNA 峰值处在 50, 100, 150, 200 道附近的分别为单倍体、二倍体、三倍体、四倍体, 其余为非整倍体。

1.3 倍性构成的染色体计数与分析

采用根尖压片染色体计数法。取每个再生株根部刚发出的小于 1 cm 的根 5~6 条立刻放入饱和对氯二苯溶液中, 常温下放置 4 h 后, 转入卡诺 (Carnoy's) 固定液固定 24 h, 取出的根用蒸馏水冲洗两遍后转入 1 mol/L 盐酸溶液, 60℃ 水浴中解离 6~7 min, 然后在蒸馏水中浸泡 10 min 以上。用卡宝品红染色压片, 奥林巴斯显微镜 (BH-2) 400 倍下观察根尖细胞染色体并计数, 每个再生株观察 5 条根。荧光显微数码摄像系统 Kodak KAF 1401E SPOT2 即时拍照成像。

1.4 再生株坐果及结籽情况调查

2005 年 4 月, 110 株再生株移栽到塑料大棚, 正常田间管理。2005 年 7~8 月对单株进行采收, 记录单株正常结果数和单果平均种子数。

2 结果与分析

2.1 流式细胞仪检测再生株的倍性构成

用流式细胞仪检测的辣椒花药培养 110 个再生单株中, 单倍体 (图 2-A)、二倍体 (图 1)、三倍体 (图 2-C)、混倍体 (图 2-B) 和非整倍体 (图 2-E) 的比例分别为 70.91%, 25.45%, 0.91%, 2.73% 和 2.73%。其中混倍体是指同一叶片是由单倍体、二倍体这两种倍性的细胞组成的。由于 PI 染色下, 细胞核样本容易发生粘连 (图 2-D), 如果 2 个单倍性的 G_1 期细胞核粘连在一起时, 其测量到的 DNA 荧光强度 (FL2-A) 与 1 个二倍性细胞的 G_1 期或单倍性细胞的 G_2 期相等, 这样影响倍性的判断及细胞周期的分析。对于这种情况, 可以通过设“门” (Gate), 将双联体细胞排除, 而得到正确图像。

在测量过程中, DNA 含量分布图有时会出现偏峰的问题, 例如 G_1 , G_2 的峰处在 100, 200 道的偏左或偏右的位置 (图 2-E), 通过重复测量, 偏峰现象有时会消失, Farnham 等^[5] 认为是因为样品准备时间太长所致。有些材料通过制备样品重复测量, 偏峰仍不变, 那么由 DNA 含量分布图来判断, 此株倍性应被认为是非整倍体。但是这些材料的根尖染色体计数显示, 其染色体为 24 条, 而且植株能正常坐果结实, 证明为二倍体 (表 4)。这种现象是由于植株不同器官的染色体数目构成不一致所致, 还是由于这几个花药再生株的染色体结构发生了一定变异导致细胞核总 DNA 的变化, 还值得进一步研究。利容千^[15] 在蔬菜核型研究中也指出: 不少蔬菜种类的不同品种中也有染色体类型组成不同的情况。

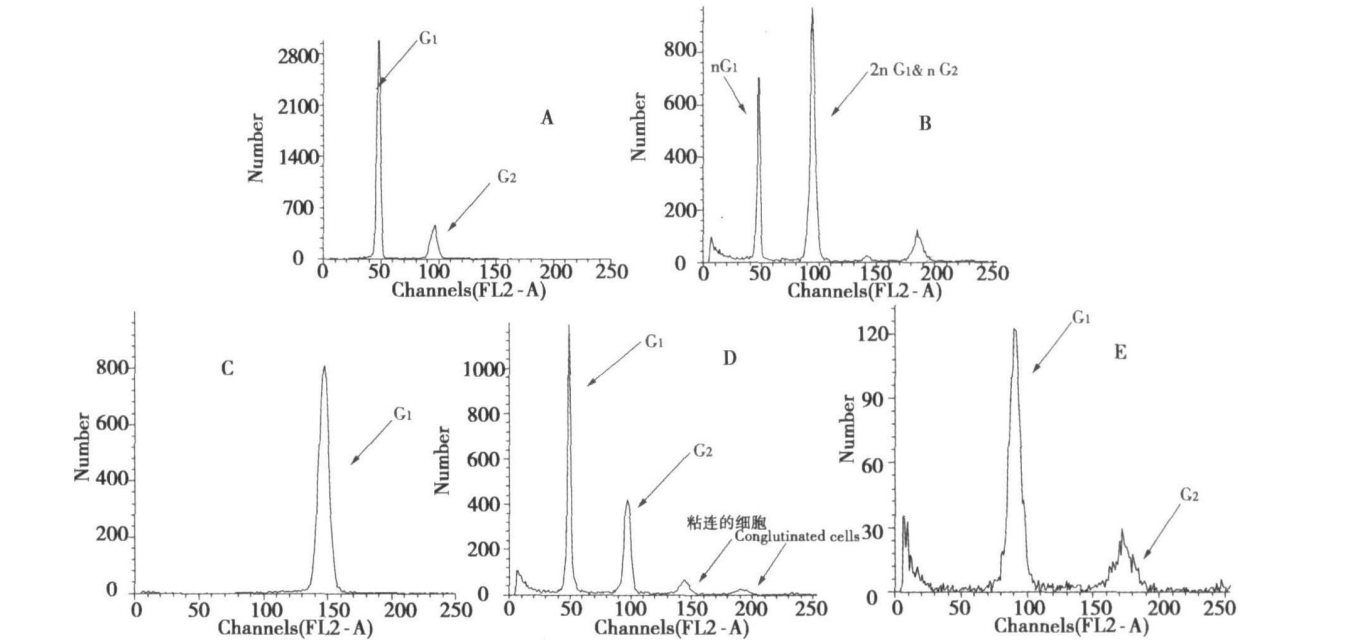


图 2 流式细胞仪测定的辣椒花药培养再生株 DNA 含量分布
A. 单倍体; B. 混倍体(单倍体+二倍体); C. 三倍体; D. 一个有粘连细胞的单倍体 DNA 含量分布图; E. 非整倍体
A. Haploidy; B. Chimera with haploid and diploid cells; C. Triploidy; D. Histogram of a haploidy with conglomerated cells; E. Aneuploid

2.2 根尖压片染色体计数法检测再生株的倍性构成
根尖压片染色体计数法所观察的这 110 株的倍性中, 单倍体(图 3)、二倍体(图 4)、三倍体(图 5)和混倍体的比例分别为 68.18%, 25.45%, 0.91% 和 5.46%(表 1)。其中的 6 株混倍体包括两种情况: 一种情况是同一植株的一部分根的细胞全为单倍体, 另一部分根的细胞全为二倍体(图 6); 另一种情况是同一根是由单倍体、二倍体这两种倍性的细胞构成的(图 7)。

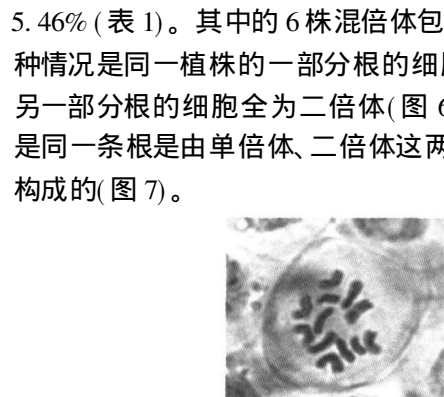


图 3 单倍体细胞的染色体($n=12$)
Fig 3 Chromosomes of haploid cell ($n=12$)

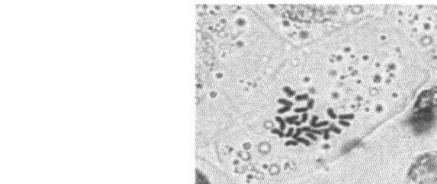


图 4 二倍体细胞的染色体($2n=24$)
Fig 4 Chromosomes of diploid cell ($2n=24$)

试验中, 还观察到在个别单倍体和二倍体植株根尖中有极个别细胞的染色体数目发生缺失现象(图 8)。而从这些植株的流式细胞仪鉴定结果来看, 没有出现偏峰现象, 仍然是单倍体植株或二倍体植株峰型, 说明这些细胞的数目极少或者也可能这

类细胞仅存在于根中。其中, 发生染色体数目缺失现象的二倍体植株能正常坐果结籽(表 4), 也说明这种在根尖中观察到的个别细胞的染色体缺失在植株的生长发育中可能不会产生影响。

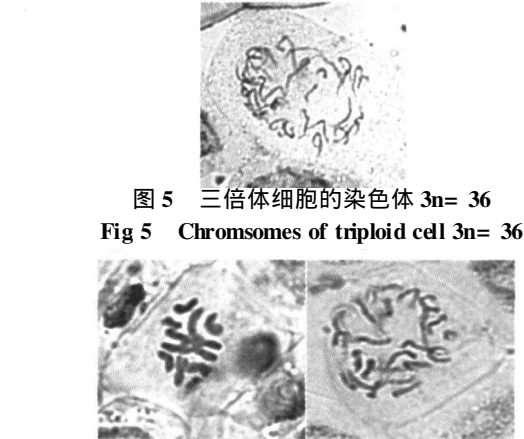


图 5 三倍体细胞的染色体 $3n=36$
Fig 5 Chromosomes of triploid cell $3n=36$

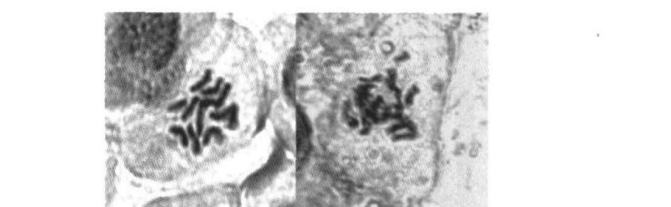


图 6 同一株中单倍体根的细胞染色体 $n=12$ (A1) 和二倍体根的细胞染色体 $2n=24$ (A2)
Fig 6 Chromosomes of haploid cell ($n=12$, A1) and Diploid cell ($2n=24$, A2) in one regeneration plant

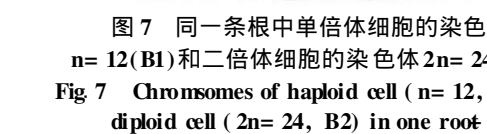


图 7 同一条根中单倍体细胞的染色体 $n=12$ (B1) 和二倍体细胞的染色体 $2n=24$ (B2)
Fig 7 Chromosomes of haploid cell ($n=12$, B1) and diploid cell ($2n=24$, B2) in one root tip

2.3 流式细胞仪与根尖压片染色体计数法测定再生株倍性的差异

从表 2 可以看出,在 110 个单株的测定中,两种检测方法对 75 株单倍体、25 株二倍体、1 株三倍体、3 株混倍体,共 104 株作出了一致的结论。其余 6 株中:有 3 株,流式细胞仪测定为单倍体,而染色体计

数法测定为由单倍体根和二倍体根构成的混倍体。有 3 株,流式细胞仪测定为非整倍体,而染色体计数法测定为二倍体。两种方法,总的吻合度(准确率)达 0.95。对这 6 株有争议植株不同部位的叶片使用流式细胞仪再次进行了倍性鉴定,结果仍然表明这 6 株的叶片测定结果不变。

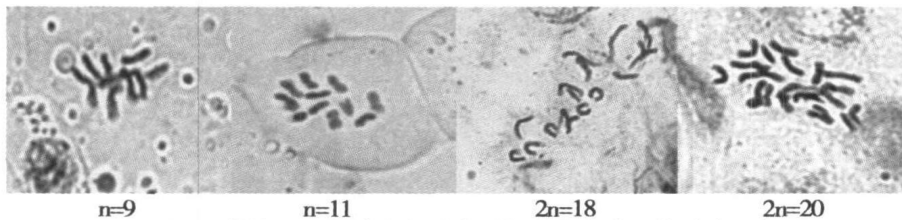


图 8 单倍体和二倍体中的极个别细胞发生染色体缺失现象

Fig 8 Chromosome absent in some of the haploid and diploid root tip cells

表 1 流式细胞仪与根尖压片染色体计数法测定辣椒花药培养再生株的倍性构成

Tab 1 Ploidy composing in regenerated plants of the anther culture derived from pepper (*Capsicum annuum* L.) revealed by Flow cytometry and Chromosome counting

| 测定方法/对象 Method/ Material | 测定植株数 Number of plants analyzed | 各种倍性的植株数及其比例 Number and ratio of different ploidy level in regenerated plants | | | | |
|--|------------------------------------|--|----------------|-----------------|-------------------------|-------------------|
| | | 单倍体 Haploid | 二倍体 Diploid | 三倍体 Triploid | 混倍体 Haploid+ Diploid | 非整倍体 Aneuploid |
| 流式细胞仪/ 叶片 FCM/ Leaves | 110 | 78(70.91) | 25(22.72) | 1(0.91) | 3(2.73) | 3(2.73) |
| 染色体计数/ 根尖 Chromosome counting/ Root tip | 110 | 75(68.18) | 28(25.45) | 1(0.91) | 6(5.46) | 0(0.00) |

注: 括号外的数字表示植株数, 括号内的数字表示百分比, 表 3 同

Note: Number of plants out of brackets, percentage in brackets, the same as Tab. 3

表 2 流式细胞仪与根尖压片染色体计数法测定辣椒花药培养再生株倍性的差异

Tab 2 Consistency of ploidy level analysis revealed by Flow cytometry and chromosome counting in regenerated plants from anther culture of pepper(*Capsicum annuum* L.)

| 测定的株数 Number of analyzed plants | 流式细胞仪测定的倍性 Ploidy level revealed by FCM | 染色体计数测定的倍性 Ploidy level by chromosome counting |
|------------------------------------|--|---|
| 75 | 单倍体 Haploid | 单倍体 Haploid |
| 25 | 二倍体 Diploid | 二倍体 Diploid |
| 1 | 三倍体 Triploid | 三倍体 Triploid |
| 3 | 单倍体+ 二倍体 Haploid+ Diploid | 单倍体+ 二倍体 Haploid+ Diploid |
| 3 | 单倍体 Haploid | 单倍体+ 二倍体 Haploid+ Diploid |
| 3 | 非整倍体 Aneuploid | 二倍体 Diploid |
| 110 | 合计 Total | 合计 Total |

2.4 辣椒基因型间以及辣椒与其他种类作物间单倍体(DH)群体倍性构成的差异

在 110 株再生株中, 供体 04-GF-1, 04-GF-18, 04-GF-21 所得到的再生株群体较大, 分别为 27, 51, 12 株。它们的倍性构成见表 3, 辣椒基因型间倍性构成存在差异, 总的趋势是单倍体占多数, 二倍体占少数。单倍体与二倍体的比例约为(2.2~ 3.0): 1。从辣椒与其他种作物倍性构成的比较可以看出: 不同种作物之间再生株倍性构成相差较大: 其中, 大白菜小孢子再生株的二倍体频率可以达到 94%, 而烟草中则低至 12%。辣椒再生株中的二倍体频率也较低(25%~ 29%), 说明本辣椒花药培养技术中小孢子的染色体自然加倍率较低。

2.5 再生株倍性与再生株结果情况的相互关系

由于再生株的生长势很弱, 移栽到塑料大棚后, 一部分植株陆续死亡, 最终成活 80 株, 其中有 20 株结出正常果实和种子, 其余 60 株没有正常的果实和种子, 部分株只有单性结实的畸形扁果。用这个结果去对照流式细胞仪和染色体计数的倍性鉴定结果, 表明: 没有正常果实和种子的再生株绝大部分是单倍体, 共有 55 株, 另外 1 株三倍体 210[#] 没有正常果实和种子, 1 株二倍体 117[#] 由于自身生理及环境因素造成没有正常果实和种子(这种现象在常规栽培中也普遍存在)。还有 3 株再生株, 流式细胞仪测叶片是单倍体, 染色体计数观察根尖是混倍体(单倍体+ 二倍体), 也没有正常果实和种子, 说明花粉母

细胞是单倍体细胞。有正常果实和种子的再生株绝大部分是二倍体, 共有 19 株。有 1 株混倍体(单倍体+ 二倍体) 133[#] 有正常果实和种子; 还有 1 株 68[#] 流式细胞仪测叶片是非整倍体, 染色体计数观察根尖是二倍体, 有正常果实和种子(表 4)。以上结果

说明: 流式细胞仪检测结果、染色体计数检测结果与植株的结籽能力相互间得到了很好的印证。而且说明: 由于再生株会出现植株上部和植株下部倍性不同的现象, 植株上部的倍性检测结果与坐果结籽情况的关系更密切。

表 3 辣椒与其他种作物 DH 群体倍性构成的比较

| Tab 3 Ploidy level composing in regenerated plants from DH population of culture in different crop | | | | | |
|--|--|---------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| 作物名称 Name of crop | 供体基因型 Genotype of Donor | 检测植株数 Number of analyzed plants | 单倍体数 Haploid | 二倍体数 Diploid | 其他 Others |
| 油菜 ^[6] Rape | 浙双 72 Zheshuang 72 | 87 | 50(57. 5) | 31(35. 6) | 6(6. 9) |
| | 浙双 72× 高油 605 Zheshuang 72× Gaoyou 605 | 31 | 17(54. 8) | 12(38. 7) | 2(6. 5) |
| | Topas | 60 | 33(55. 0) | 19(31. 7) | 8(13. 3) |
| | Hanna | 21 | 10(47. 6) | 8(38. 1) | 3(14. 3) |
| 大白菜 ^[17] Chinese Cabbage | 01C6 | 104 | 6(5. 8) | 98(94. 2) | 0(0) |
| | 01C18 | 83 | 7(8. 4) | 72(86. 7) | 4(4. 8) |
| | 01C21 | 118 | 3(2. 5) | 98(83. 1) | 17(20. 4) |
| 烟草 ^[18] Tobacco | G28× NC2326 | 418 | 206(49. 3) | 154(36. 8) | 58(13. 9) |
| | K326× Coker176 | 308 | 243(78. 9) | 38(12. 3) | 27(8. 8) |
| 辣椒 Pepper | 04-GF-1 辣椒 Hot pepper | 27 | 19(70. 4) | 7(25. 9) | 1(3. 7) |
| | 04-GF-18 甜椒 Sweet pepper | 51 | 33(64. 7) | 15(29. 4) | 3(5. 9) |
| | 04-GF-21 甜椒 Sweet pepper | 12 | 9(75. 0) | 3(25. 0) | 0(0) |
| 枣 ^[19] Chinese jujube | 金丝小枣 Jinsixiao zao | 45 | 5(11. 1) | 14(31. 1) | 26(57. 8) |

表 4 再生株倍性与再生株的坐果情况

| Tab 4 Ploidy level and fructification in regenerated plants | | | | |
|---|---------------------------|--|---|---|
| 倍性鉴定方法 Method of ploidy analysis | 倍性 ploidy level | 参试株数 Number of regenerated plants | 能正常坐果株数 Number of regenerated plants can fructification | 不能正常坐果株数 Number of regenerated plants can not fructification |
| 流式细胞分析术 FCM analytical technique | 单倍体 Haploid | 58 | 0 | 58 |
| | 二倍体 Diploid | 19 | 18 | 1 |
| | 三倍体 Triploid | 1 | 0 | 1 |
| | 单倍体+ 二倍体 Haploid+ Diploid | 1 | 1 | 0 |
| | 非整倍体 Aneuploid | 1 | 1 | 0 |
| | 合计 Total | 80 | 20 | 60 |
| 染色体计数 Chromosome counting | 单倍体 Haploid | 55 | 0 | 55 [*] |
| | 二倍体 Diploid | 20 ^{**} | 19 [*] | 1 |
| | 三倍体 Triploid | 1 | 0 | 1 |
| | 单倍体+ 二倍体 Haploid+ Diploid | 4 | 1 | 3 |
| | 合计 Total | 80 | 20 | 60 |

注: * 含有极个别细胞的染色体数目发生缺失现象的再生株; ** 含有流式细胞仪检测为非整倍体的再生株
Notes: * Include few cells lack chromosomes in some of regenerated plants; ** Include Aneuploid regenerated plant decided by FCM

3 讨论

3.1 几种混倍体类型产生的原因分析

一般认为单倍体的自然加倍发生在胚发育早期^[20]。目前已发现了雄核发育(Androgenesis) 或称为花粉胚胎发生(Pollen embryogenesis) 的多种途径, 并观察到雄核发育过程中有时出现一些异常的核行为, 如核融合, 核内有丝分裂等等。这种细胞学上的变异可能是花药培养中倍体或混倍体植株形成的原因^[20]。辣椒小孢子发育的主要途径是 B 途径^[20, 21] 即由生殖细胞持续分裂, 形成胚状体, 而营养细胞可能不分裂或只分裂数次形成一个胚柄状的结构附着在胚状体上。

若在 B 途径中单核小孢子进行一次均等分裂, 形成 2 个等同的子细胞, 它们都参与孢子体的形成。子细胞继续进行有丝分裂形成新的子细胞, 期间个别子细胞发生核融合形成了二倍体细胞, 二倍体细胞继续进行有丝分裂形成新的二倍体子细胞, 这样最终就形成了单倍体、二倍体嵌合在一起的混倍体植株。若是不同的根由单倍体细胞或二倍体细胞单独分裂形成, 就会同时产生单倍体根和二倍体根组成的根系。若 1 条根是由单倍体细胞和二倍体细胞同时分裂形成, 就会产生单倍体和二倍体细胞嵌合在一起的混倍体根。若是要发育成叶片的细胞彼此间没有发生核融合, 而将来要发育成根的部分细胞彼此间发生了核融合形成二倍体细胞, 则最终形成

的再生株的不同组织器官将具有不同的倍性。

3.2 流式细胞仪检测方法与染色体计数检测方法的比较

本研究结果表明:流式细胞仪检测和根尖染色体计数检测有很高的吻合度。采用 DNA 流式细胞仪分析技术取样容易且不受取材的时间季节限制,可以对大量的花药培养再生植株在移栽到大田之前进行倍性鉴定,因而可以节约大量的时间。但该方法的不足是:如果要将流式细胞倍性分析作为单倍体育种工作中的一种常规检测手段,则流式细胞仪价格昂贵,其使用费也偏高。此外进行 DNA 流式细胞仪测定时,样品准备时间不宜过长,否则会影响结果。因为样品准备时间太长,测定时 DNA 峰值的位置会发生偏移,虽然 Farnham 等认为,准备好的样品于 4℃保存 2 d 不会影响测定结果^[5],但在室温条件下,样品准备时间不宜超过 20 min^[9]。

对群体不大的再生株进行倍性鉴定时,根尖压片染色体计数法仍是一种比较准确可行的方法,它能具体反映出染色体的数目。而且这种方法所需的条件简易,一般的实验室都可以进行。但该方法对材料和技术的要求较高。本试验结果还提示,对于花药培养再生植株的染色体计数检查,样本应有一定的大小,不能仅以观察到的一两个染色体数目清晰的细胞而决定其植株的倍性。

小孢子再生植株能直接反映性细胞在减数分裂中发生的染色体重组等变异情况,这种变异在一定程度上可以反映出物种的进化规律,流式细胞仪检测技术可以方便地筛选出基因组 C 值发生了变异的单株。虽然在受试的 110 个单株中,3 个流式细胞仪检测显示的非整倍体材料,其根尖染色体计数均为二倍体,但由于样本量较少,对流式细胞仪检测中偏峰样本的指代意义以及能反映多大程度上染色体组成变化等都有待于进一步在大群体上进行研究。

由试验结果可见:染色体计数可以观察到群体中染色体发生异常的个别细胞,而流式细胞仪反映的是群体细胞的倍性组成,难以检测出个别异常的细胞。但是由于个别异常倍性的细胞对于整个植株的倍性组成没有明显影响,若只是要反映与植株结实能力密切相关的倍性问题,流式细胞仪的检测结果还是很准确可靠的。对于再生株的鉴定而言,叶片是流式细胞仪的最佳试材,根尖是染色体计数的最佳试材。由于辣椒花药培养再生株群体中单倍体占很大比例,因此再生株早期的高效染色体倍性鉴定技术就显得尤为重要了。

参考文献:

- [1] Ockendon D J. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis) [J]. *Annals of Applied Biology*, 1988, 113: 319–325.
- [2] Chiang M S, Frechette S, Kuo C G, et al. Embryogenesis and haploid plant production from anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata L.) [J]. *Can J Plant Sci*, 1985, 65: 1033–1037.
- [3] 李春铃, 蒋钟仁. 甜椒花培新品种“海花三号”的育成[J]. *园艺学报*, 1990, 17(1): 39–44.
- [4] 王玉英, 郭仲琛, 李春玲, 等. 甜椒花药培养的初步研究[J]. *园艺学报*, 1980, 7(1): 34–38.
- [5] Farnham M W, Caniglia E J, Thomas C E. Efficient ploidy determination of anther derived broccoli [J]. *Hortscience*, 1998, 32(2): 323–327.
- [6] 申书兴, 赵前程, 刘世雄, 等. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定[J]. *园艺学报*, 1999, 26(4): 232–237.
- [7] Qin X, Rotino G L. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro*-grown androgenic pepper plantlets [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 41: 145–149.
- [8] 周伟军, 毛碧增, 唐桂香, 等. 甘蓝型油菜小孢子再生植株染色体倍数检测研究[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(6): 724–727.
- [9] 周元昌, S KENNEDY. 孢子甘蓝花培苗倍性的快速鉴定[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2002, 31(1): 55–58.
- [10] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry [J]. *Plant Mol Biol Report*, 1991, 9: 229–241.
- [11] Mityk J, Andr Slafalvy A, Csill Ry G, et al. Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Plant Breeding*, 1995, 114: 78–80.
- [12] Ramon Ds, Elisabet C, Agustin H. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. effect of carbohydrate and carbon dioxide enrichment [J]. *Hort Sci*, 1997, 122(4): 468–475.
- [13] Gyulai G, Gemesne J A, Sagi Zs, et al. Double Haploid Development and PCR-analysis of F₁ Hybrid Derived DH-R₂ Paprika (*Capsicum annuum* L.) Line [J]. *Plant Physiol*, 2000, 156: 168–174.
- [14] Dolezel J, Binarova P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in Plant cells by flow cytometry [J]. *Biol Plant*, 1989, 31: 113–120.
- [15] 利容千. 中国蔬菜植物核型研究[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1989.
- [16] 张冬青, 顾宏辉, 张尧峰, 等. 双低油菜双 72 的小孢子培养与植株再生研究[J]. *浙江农业学报*, 2003, 15(4): 219–222.
- [17] 赵岫云. 大白菜游离小孢子培养技术及育种应用研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2003.
- [18] 朱慧琴. 烟草 DH 群体构建及其农艺性状遗传参数估算[D]. 浙江: 浙江大学, 2003.
- [19] 王震星, 张 磊. 枣花药培养再生植株及其染色体倍性研究[J]. *北方果树*, 1998(2): 5–6.
- [20] 刘国民. 花药离体培养中若干问题的研究进展[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 1994, 12(3): 253–259.
- [21] 李俊明编译. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.