

# 辣椒染色体倍性水平的快速检测

张菊平<sup>1,2</sup>, 巩振辉<sup>1</sup>, 刘珂珂<sup>1</sup>, 黄 炜<sup>1</sup>, 李大伟<sup>1</sup>, 张兴志<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

**[摘 要]** 为了寻求简便、快速的辣椒染色体倍性鉴定方法,以辣椒纯系 B19、B23 花药培养产生的单倍体植株 ( $n = x = 12$ ) 及用其种子长成的二倍体植株为试材,对用气孔保卫细胞叶绿体计数法鉴定其倍数性进行了研究。结果表明,单倍体和二倍体辣椒植株气孔保卫细胞叶绿体数平均值的差异极显著,单倍体的叶绿体数在 13 以下,二倍体的叶绿体数等于或大于 13;气孔叶绿体数目随染色体倍数性的增加而增加,用气孔保卫细胞叶绿体数目预测植株倍性的准确率可达 92.68%。表明采用气孔保卫细胞叶绿体计数法可以在苗期快速、准确地确定植株的染色体倍性。

**[关键词]** 辣椒;染色体;气孔保卫细胞叶绿体计数法;倍性鉴定

**[中图分类号]** S641.301

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)08-0121-04

## Rapid determination of ploidy level of chromosome in pepper

ZHANG Ju-ping<sup>1,2</sup>, GONG Zhen-hui<sup>1</sup>, LIU Ke-ke<sup>1</sup>, HUANG Wei<sup>1</sup>,  
LI Da-wei<sup>1</sup>, ZHANG Xing-zhi<sup>2</sup>

(1 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

**Abstract :** In order to seek a simple and rapid method of determinating the ploidy level of chromosome in pepper, the haploid plant of anthers and diploid plant of seed derived from B19 and B23 of pepper (*Capsicum annuum* L.) were identified by counting the number of stoma chloroplast in guard cell. The results showed that the discrepancy of the average chloroplast number was extremely prominent. Chloroplast number of the haploid was below 13, and that of the diploid was equal to or more than 13. The number of stomatal chloroplasts increased with the increase of ploidy levels. The reliability of ploidy identification counted by stoma guard cell chloroplast number was higher, with the average accurate rate of 92.68%, showing that measurement of the number of stoma chloroplast in guard cell could be considered as a fast and accurate method to determine haploid and diploid of pepper in the seedling stage.

**Key words :** pepper (*Capsicum annuum* L.); chloroplast; counting the number of stoma chloroplast in guard cell; determination of ploidy Level

单倍体育种可大大缩短育种年限,加速育种进程,提高选育效率,在育种中具有极大的应用潜力。倍性鉴定是植物单倍体育种中不可或缺的重要环节,其鉴定速度和精度关系到单倍体育种的进程。

传统的倍性鉴定技术是采用根尖染色体直接计数法或通过观察开花结实情况进行判断,前者程序比较复杂,技术要求高,耗时多;后者鉴定时期太晚,且已完成整个生育期而无法再采取补救措施,浪费了许

†收稿日期] 2006-06-29

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A7);西北农林科技大学植物遗传育种专项(05 YZ024-1)

[作者简介] 张菊平(1968-),女,河南汝阳人,副教授,在读博士,主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。

[通讯作者] 巩振辉(1957-),男,陕西礼泉人,教授,博士生导师,主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究。

E-mail:gzhh168@yahoo.com.cn

多育种材料。因此,寻求一种简便、快速、有效的鉴定方法,对于加速育种进程具有十分重要的意义。单倍体的根、茎、叶、花、气孔等与二倍体相比有明显差异,具有特殊的农艺性状和细胞生物学特性。叶片上的气孔是植株与外界进行气体交换的通道。叶片中气孔保卫细胞叶绿体数目受染色体控制,能准确地反映出染色体的倍性<sup>[1-2]</sup>。将叶片气孔保卫细胞的大小及其叶绿体数目的测定,作为一种快速简便的染色体倍性鉴定技术,已在烟草、马铃薯、花生、苹果、梨、西瓜、枇杷等植物中得到成功应用<sup>[3-8]</sup>,但这一技术在辣椒中应用的报道尚不多见。本试验以辣椒为材料,研究了辣椒气孔保卫细胞中叶绿体数与染色体倍性间的相关关系,并试图用气孔保卫细胞叶绿体计数法预测花粉植株的单倍性和二倍体性,并对其准确性进行了验证,以期对辣椒染色体的倍性鉴定寻找一种既简便又快速的新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试材料为辣椒纯系 B19、B23 花药培养产生的单倍体植株( $n = x = 12$ )及用其种子长成的二倍体植株( $2n = 2x = 24$ )。

当小孢子来源的植株长出 4~5 片真叶时,移植于无菌培养基质[V(珍珠岩) V(草炭) V(土壤) = 1 1 1]上,置于组培室中生长。培养条件为室温( $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ),每天光照 10~12 h,光照强度 3 000 lx。种子消毒后置 MS 培养基上培养无菌苗,当有 4~5 片真叶、根长为 1.5~2.0 cm 时移植于无菌培养基质[V(珍珠岩) V(草炭) V(土壤) = 1 1 1]上,置于组培室中,生长培养条件同前。

### 1.2 倍性鉴定方法

1.2.1 取样时期和部位 当植株移栽后具有 8 片真叶时开始观察。每一植株均取顶端向下第 5 片真

叶进行观察计数。

1.2.2 制片 用镊子从辣椒功能叶沿中脉两侧分叶片上、中、下撕取辣椒下表皮(约  $0.3 \sim 0.5 \text{ cm}^2$ )置于载玻片上,滴 1 滴蒸馏水,并将其展平,用滴管将水吸去,用 1~2 滴 1% 碘-碘化钾(I-KI)溶液染色 5~10 min,加盖玻片后观察计数。

1.2.3 显微镜观察 在 10×40 倍光学显微镜下观测叶绿体数目,每片叶随机选取 30 个气孔观察计数,对叶绿体重叠、粘连不易计数的气孔不予计数。2 个定型品种的单倍体和二倍体分别观察 5 株和 10 株。

1.2.4 验证试验 在开花期观察不同倍性辣椒的开花结实情况并验证叶绿体鉴定结果。对于小孢子来源的植株,在观测气孔保卫细胞的同时进行根尖染色体的平行检测,以确定其准确性。染色体制片方法参见文献[9]。

### 1.3 数据分析

数据采用 DPS 数据处理系统进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒气孔保卫细胞叶绿体数与染色体倍性的相关性

从表 1 可看出,单倍体和二倍体辣椒叶片气孔保卫细胞中叶绿体数的变异系数较大,平均分别达 14.33% 和 12.13%。差异显著性检验( $t$  检验)结果表明,不同染色体倍性间的气孔叶绿体数平均值差异达极显著水平,二者间  $t$  值为 14.42,而不同品种同一倍性内气孔保卫细胞叶绿体数平均值的差异不明显。从图 1 可清晰区分不同品种不同倍性辣椒气孔保卫细胞叶绿体数目的差异。辣椒气孔叶绿体数目与染色体倍数性存在着正相关关系。因此,用气孔保卫细胞叶绿体数平均值鉴定染色倍性,可以排除品种及不同取样部位的影响。辣椒植株气孔保卫细胞叶绿体数目平均值,可以作为染色体倍性的鉴定依据。

表 1 辣椒单倍体和二倍体植株气孔保卫细胞叶绿体数的比较

Table 1 Comparison of chloroplast number of stoma guard cell between haploids and diploid plants in pepper

辣椒品种 Hot pepper varieties	倍性 Ploidy levels	观察气孔数 No. of stoma	叶绿体数平均值 Mean value of chloroplast number	叶绿体数变异幅度 Variation range of chloroplast number	变异系数/ % Coefficient of variation
B19	单倍体 Haploid	150	9.50 $\pm$ 1.38	7~12	14.50
B23	单倍体 Haploid	150	8.69 $\pm$ 1.23	7~12	14.15
平均值 Average			9.10	7~12	14.33
B19	二倍体 Diploid	300	15.96 $\pm$ 1.79	13~20	11.22
B23	二倍体 Diploid	300	15.52 $\pm$ 2.02	13~19	13.04
平均值 Average			15.74	13~19.5	12.13

辣椒二倍体植株染色体  $2n = 24$ , 单倍体植株染色体  $n = 12$ , 二倍体与单倍体染色体数之比为 2 : 1;

辣椒二倍体气孔保卫细胞叶绿体数平均值为 15.74, 单倍体为 9.10(表 1), 二倍体和单倍体间叶绿体数

平均值之比为 1.73 : 1,略低于其染色体数之比。单倍体间气孔保卫细胞叶绿体数平均值之比<sup>2</sup> 适合性测验表明,  $P$  值大于 0.05,表明二倍体和 (1.73 : 1) 符合其染色体数目 2 : 1 的比例。

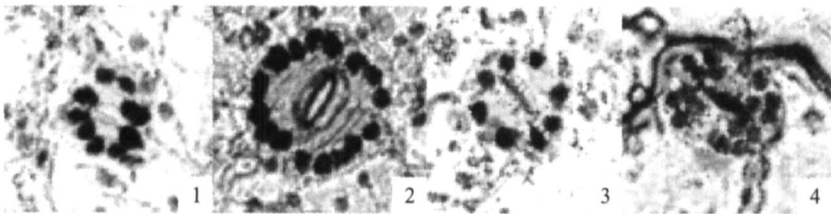


图 1 辣椒不同倍性气孔保卫细胞及其叶绿体的数目  
1. B19 小孢子来源的单倍体植株;2. B19 种子二倍体植株;3. B23 小孢子来源的单倍体植株;4. B23 种子二倍体植株  
Fig. 1 Stoma guard cells and their chloroplast at different ploidy levels in pepper  
1. Microspore-derived haploid plant of B19;2. Diploid plant derived from a seed of B19;3. Microspore-derived haploid plant of B23;  
4. Diploid plant derived from a seed of B23

2.2 用辣椒气孔保卫细胞叶绿体数鉴定染色体倍性准确性的验证

由图 2 可以看出,单倍体气孔保卫细胞叶绿体数为 7~12,二倍体为 13~20。辣椒单倍体和二倍体植株气孔保卫细胞叶绿体数分段结果见表 2,单倍体的叶绿体数 < 13,且叶绿体数在 10 以下的占 71.11%;二倍体的叶绿体数 ≥ 13,且叶绿体数在 15~16 个的占 36%,17~19 个的占 34%。因此,用叶绿体计数法鉴定辣椒单倍体植株和二倍体植株时,可以叶绿体数 13 为分界指标。在实际应用中,只需观察计数气孔保卫细胞的叶绿体数,即可鉴定植株染色体倍性。辣椒气孔叶绿体数目的多少,是遗传上一个相对恒定的指标。

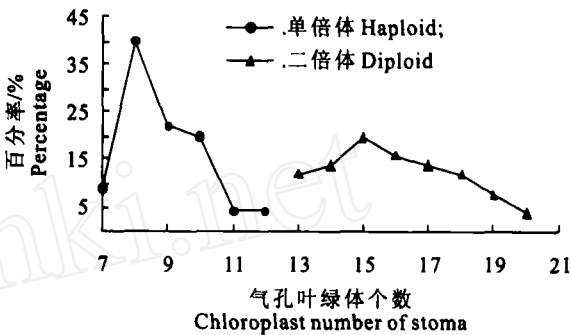


图 2 不同倍性气孔保卫细胞叶绿体数的分布  
Fig. 2 Distribution of chloroplast number of stoma guard cell of different ploidy

表 2 辣椒单倍体和二倍体植株气孔保卫细胞叶绿体数的分段结果

倍性 Ploidy level	叶绿体数 Stepping of chloroplast number					%
	< 10	10 ~ 12	13 ~ 14	15 ~ 16	17 ~ 19	
单倍体 Haploid	71.11	28.89	0	0	0	0
二倍体 Diploid	0	0	26	36	34	4

对 2 个材料的 37 株花粉植株染色体倍性,以叶绿体数分界指标的预测结果和以开花结实实际值的验证结果见表 3,其结果的准确率平均为 91.84%,表明用气孔保卫细胞叶绿体数鉴定辣椒花粉植株染色体倍性具有较高的准确率。

表 3 辣椒不同供试材料预测结果的准确率

辣椒品种 Hot pepper varieties	测定株数 No. of determination plant	叶绿体计数测定 Determination of chloroplast counting number		验证预测差错株数 Number of mistake plant	预测准确率/ % Accuracy rate of forecast
		单倍体 Haploid	二倍体 Diploid		
B19	25	20	5	2	92.00
B23	12	8	4	1	91.67
合计 Total	37	28	9	3	91.84

2.3 根尖染色体数目的检测  
在小孢子来源的植株中,对于气孔保卫细胞叶绿体数分布在 7~12 的 5 株植株进行了根尖染色体数目平行检测,均确定为单倍体植株。单倍体根尖

染色体见图 3, 染色体数目为  $n=12$ 。

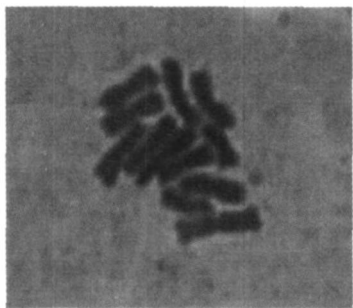


图 3 辣椒单倍体植株的染色体( $n=12$ ) ( $\times 1\ 000$ )

Fig. 3 Chromosomes of haploid in pepper  
( $n=12$ ) ( $\times 1\ 000$ )

### 3 结论与讨论

本试验通过对用辣椒自交系 B19 和 B23 花药培养产生的单倍体植株( $n=x=12$ ), 及用其种子长成的二倍体植株( $2n=2x=24$ ) 气孔保卫细胞的叶绿体进行计数, 结果发现, 气孔保卫细胞叶绿体数受染色体倍性控制, 倍性间存在明显的遗传差异。而同一倍性内, 遗传性是相似的; 气孔保卫细胞叶绿体数能反应染色体倍性, 可利用叶绿体计数法鉴定植株染色体的倍性。当叶绿体数在 13 以下时为单倍体植株; 大于或等于 13 时为二倍体植株。

Qin 等<sup>[10]</sup>研究表明, 辣椒单倍体植株的叶绿体数为 9.3, 二倍体植株的叶绿体数为 18.4。本试验结果与 Qin 等<sup>[10]</sup>的结论基本一致, 即辣椒单倍体植株较二倍体植株的叶绿体数目少。

杨艳琼等<sup>[11]</sup>认为, 烟草不同叶位间气孔保卫细胞叶绿体数的变化差异不明显, 以第 5 叶及以上叶片作材料时的鉴定准确率较高, 同时具有早期、简便的特性。而朱惠琴等<sup>[12]</sup>则认为, 采用气孔保卫细胞叶绿体计数法可以在苗期快速、准确地确定烟草植株的染色体倍性。本试验在辣椒上获得了与前者相同的结果, 在第 5 叶及以上较大的叶片上均能清晰地分辨气孔叶绿体, 并能计数; 但对于苗期或成株上幼嫩的叶片则难以观察计数。这可能与烟草与辣椒叶片的大小、细胞结构的差异有关。

流式细胞分析仪(Flow cytometry)是目前识别染色体倍性快速、有效的方法之一<sup>[13]</sup>, 但需要昂贵的仪器设备且费用较高, 使其应用范围受到一定限

制; 常规根尖压片法精确、可靠, 但繁琐、耗时<sup>[9]</sup>; 而利用气孔大小和保卫细胞叶绿体数目则较为简单、省力<sup>[14]</sup>, 但以气孔长度进行倍性分类时的误判率较高<sup>[15]</sup>。本研究提出的利用辣椒保卫细胞叶绿体数为基础的倍性鉴定方法, 既快速、简便, 准确率也较高, 实际应用效果好, 且对其他植物倍性鉴定研究具有重要的借鉴意义。

### 【参考文献】

- [1] 石茵坪, 李雅志, 王强生. 果树突变育种[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 谢兆辉, 牟春红, 王 彬, 等. 植物多倍化及在育种上的应用[J]. 中国农学通报, 2002, 18(3): 70-76.
- [3] 刘仁祥, 黄 莺. 烟草花粉植株染色体倍性的早期快速鉴定[J]. 贵州农业科学, 1998, 26(6): 4-7.
- [4] Singsit C, Veilleux R E. Chloroplast density in guard cells of leaves of anther-derived potato plants grown *in vitro* and *in vivo* [J]. Hort Science, 1991, 26(5): 592-594.
- [5] Singsit C, Ozias-Akins P. Rapid estimation of ploidy levels in *in vitro*-regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids [J]. Euphytica, 1992, 64(3): 183-188.
- [6] 李 赟, 石茵坪, 束怀瑞, 等. 应用气孔性状对苹果与梨的倍性判别分析[J]. 果树科学, 1999, 16(1): 9-13.
- [7] 王美雪. 西瓜染色体倍数性的简易测定法[J]. 贵州农业科学, 1980(3): 36-37.
- [8] 张凌媛, 郭启高, 李晓林, 等. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 229-233.
- [9] 李懋学, 张敦方. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991.
- [10] 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(2): 145-149.
- [11] 杨艳琼, 何丽萍, 和风美, 等. 用气孔保卫细胞叶绿体计数法鉴定烟草染色体倍性方法初探[J]. 种子, 2002(3): 24-25.
- [12] 朱惠琴, 张宪银, 薛庆中. 烟草染色体倍性快速鉴定方法[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(2): 255-258.
- [13] De Laat A M M, Gohde W, Vogelzang M J D C. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry [J]. Plant Breeding, 1987, 99(4): 303-307.
- [14] Chandler C K, Lyrene P M. Relationship between guard cell length and ploidy in *Vaccinium* [J]. HortScience, 1982, 17(1): 53-54.
- [15] Ho I, Wan Y, Widholm J M, et al. The use of stomatal chloroplast number for rapid determination of ploidy level in maize [J]. Plant Breeding, 1990, 105(3): 203-210.