

# 辣椒单倍体离体诱导及育种应用

张正海, 毛胜利, 王立浩, 张宝玺\*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 概括介绍了辣椒单倍体诱导的重要进展, 对影响花药和小孢子培养的材料、预处理、培养基种类、离体雄核发育的细胞学标记及过程, 以及单倍体诱导技术在辣椒杂交育种中的应用进行了综述。

**关键词:** 辣椒; 离体雄核发育; 单倍体; 花药培养; 小孢子培养

**中图分类号:** S 641.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 09-1715-12

## *In vitro* Haploid Production and Application to Pepper Breeding

ZHANG Zheng-hai, MAO Sheng-li, WANG Li-hao, and ZHANG Bao-xi\*

(Institute of Vegetables & Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In this work, we summarize the brief history of *in vitro* androgenesis in pepper, with reviews of factors affecting haploid induction which containing growing conditions and donor plant genotype, microspore developmental stage, abiotic stresses and culture media and its supplements, cytological studies of *in vitro* androgenesis, practical application of haploid technique in *Capsicum* breeding. Finally, we outline the drawbacks of haploid technology for pepper breeding and potential solutions to overcome genotype dependency and high frequency of abnormal microspore-derived embryos in anther and microspore culture.

**Key words:** *Capsicum*; *in vitro* androgenesis; haploid; anther culture; microspore culture

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 花药培养始于 1973 年 (George & Narayanaswamy, 1973; 王玉英等, 1973; Novák, 1974)。目前较为成熟的培养技术主要有花药两步法培养直接成苗, 花药固液双层培养和游离小孢子培养, 并且中国 (李春玲和蒋钟仁, 1990; 张树根等, 2006)、匈牙利 (Pauk et al., 2010) 和西班牙 (Dolcet-Sanjuan et al., 1997) 等国家的研究者已成功将单倍体技术应用于辣椒新品种培育工作中。然而, 辣椒作为一种顽拗植物, 花药和小孢子培养仍然存在较强的基因型依赖 (Mitykó et al., 1995; Mitykó & Fári, 1997; Rodeva et al., 2004; Liljana et al., 2007; Nowaczyk et al., 2009a, 2009b), 以及因大量畸形胚的发生而导致成苗率低等问题 (Kristiansen & Andersen, 1993; Supena et al., 2006b; Kim et al., 2008; 李春玲等, 2008; Parra-Vega et al., 2010; Seguí-Simarro et al., 2011)。提高小孢子胚的诱导率、小孢子胚的成苗率等是辣椒单倍体诱导和利用的突破点。

## 1 辣椒单倍体诱导概述

1973 年, 中国和印度首次报道通过花药培养获得了辣椒单倍体植株 (George & Narayanaswamy,

收稿日期: 2012-01-16; 修回日期: 2012-04-05

基金项目: ‘十二五’农村领域国家科技计划课题 (2012AA100200)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangbx@mail.caas.net.cn)

1973; 郭仲琛 等, 1973; 王玉英 等, 1973)。随后, 波兰的 Novák (1974) 利用花药培养得到了愈伤组织。此后, 随着植物单倍体诱导技术的不断发展, 辣椒单倍体诱导也呈现花药培养和游离小孢子培养两大方式。其中诱导效率较高的代表性方法有 Dumas de Vaulx 等 (1981) 在 Sibi 等 (1979) 方法的基础上优化的花药直接培养成胚法、Supena 等 (2006b) 在 Dolcet-Sanjuan 等 (1997) 花药固液双层培养基础上改进的小孢子散出培养法和 Kim 等 (2008) 的游离小孢子培养法。

Sibi 等 (1979) 建立了辣椒花药经两步培养直接诱导成胚的方法, 其主要过程是将辣椒花蕾在 4 °C 下预处理 48 h, 然后接种到含有 2 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D, 2 mg · L<sup>-1</sup> 激动素和 0.03 mg · L<sup>-1</sup> 维生素 B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) 的 Cm 培养基上, 在 25 °C、12 h 光照下培养 12 d, 而后接种于含有 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 激动素的 Rm 培养基上培养至胚出现, 每 100 个花药获得了 1 ~ 3 株苗。而后, Dumas de Vaulx 等 (1981) 对此种方法进行改进, 将花药接种于 Cp 培养基上后, 于 35 °C 处理 8 d, 而后于 25 °C、12 h 光照下培养 12 d, 接种于含有 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 激动素的 R1 培养基上, 大约 40 d 后培养成胚, 如将 R1 培养基中的激动素含量提高到 2 mg · L<sup>-1</sup>, 则可大大提高胚的发生率, 每 100 个花药可获得 5 ~ 40 株再生植株。

Dolcet-Sanjuan 等 (1997) 建立了花药固液双层培养方法。此方法以 N 培养基 (Nitsch & Nitsch, 1969) 为基本培养基, 但含有较高的 EDTA (0.1 mmol · L<sup>-1</sup>) 和麦芽糖 (20 g · L<sup>-1</sup>), 而且固体培养基中还添加 0.5 g · L<sup>-1</sup> 的活性炭和 0.3 g · L<sup>-1</sup> 的 Gelrite (脱乙酰基兰糖胶), 花药在 7 °C 黑暗条件下培养 1 周后温度升至 28 °C 继续培养直到胚状体出现。Supena 等 (2006b) 以此对培养基进行优化, 通过向液相培养基中加入 2.5 μmol · L<sup>-1</sup> 的玉米素和 5 μmol · L<sup>-1</sup> 的 IAA, 诱导率最高的基因型每个花蕾可产生 4 ~ 7 株幼苗, 并将其称为小孢子散出 (shed-microspore culture) 培养法。

Kim 等 (2008) 从辣椒花药游离小孢子, 并将小孢子置于液体碳源饥饿培养基中 (Hoekstra et al., 1997), 31 °C 黑暗中预处理 3 d 后转移到添加 KI (0.83 mg · L<sup>-1</sup>) 并且不含生长调节剂的 NLN (Swanson, 1990) 培养基中, 25 °C 下黑暗培养, 4 周后获得了胚状体, 每 10 × 10<sup>4</sup> 个小孢子 (约一个花蕾) 可产生 5.5 个子叶胚, 成功建立了辣椒游离小孢子培养的技术体系。同年, 李春玲等 (2008) 将花药接种在固体 Cp 培养基 (Dumas de Vaulx et al., 1981) 上, 35 °C 暗培养 5 ~ 12 d 后游离小孢子, 然后悬浮于改良的液体 R 培养基 (含蔗糖或麦芽糖 3 g · L<sup>-1</sup> 或 6 g · L<sup>-1</sup>) (Sibi et al., 1979), 获得了小孢子胚, 胚状体诱导率为 0.022%。Lantos 等 (2009) 则是先将花药置于液体饥饿培养基 (0.3 mol · L<sup>-1</sup> 甘露醇) 中, 32 °C 暗处理 7 d, 然后分离小孢子, 游离于改良的 W14 (欧阳俊闻 等, 1989) 液体培养基上, 并与小麦或辣椒子房共培养, 成功诱导小孢子胚的发生, 每个培养皿 (4.5 × 10<sup>4</sup> 个小孢子) 产生 3.75 ~ 65.75 个胚。以上 3 种方法, 在辣椒材料、培养基种类以及小孢子的预处理等方面均有不同, 因而小孢子胚的诱导效率亦存在较大差别, 而且后两种方法要经过花药的预培养后再游离小孢子, 显然比 Kim 等 (2008) 的方法较为费时、费力些。

## 2 材料基因型及生长状态影响单倍体诱导

在相同的诱导条件下, 不同基因型辣椒的单倍体诱导率存在很大差异 (Mitykó et al., 1995; Rodeva et al., 2004; Liljana et al., 2007; Nowaczyk et al., 2009a, 2009b)。Mitykó 和 Fári (1997) 通过对 500 个不同基因型辣椒材料进行花药培养, 发现其单倍体诱导率介于 0 ~ 76% (再生苗数/100 花药); Ltifi 和 Wenzel (1994) 指出不同基因型的材料受植株生长环境温度和湿度的影响程度存在差别。有的基因型 (Beldi) 在低温条件下单倍体诱导率降低, 而有的基因型 (Marconi) 在低温条件下有利于单倍体诱导率的提高。Ercan 等 (2006) 通过对两个基因型在冬季、夏季单倍体诱导率的研究发

现, 一个在夏季高, 一个在冬季高。Buyukalaca 等 (2004) 对两个基因型的辣椒进行花药培养, 发现生长在温室中的材料比生长在露地的材料出胚率高。Kristiansen 和 Andersen (1993) 指出, 16 ~ 30 °C 生长的材料, 花药培养均能得到单倍体, 但 26.4 °C 最为适宜, 且随株龄增大, 诱导率明显下降。如 Ercan 等 (2006) 的研究表明, 植株 4 月龄时诱导率最高, 而后诱导率随株龄增大而下降。

由于植物在不同的生长季节或栽培条件下, 其生长状态不但受温度、光照的影响, 而且还与栽培或管理水平, 病虫害等因素有关。因此, 不同基因型辣椒材料的单倍体诱导率差异, 不仅是基因型的表现, 也是基因型和环境综合作用的结果, 环境胁迫对小孢子具有预处理的作用。

### 3 小孢子发育时期的选择对单倍体诱导至关重要

小孢子发育时期是单倍体诱导至关重要的内在因素, 小孢子对诱导最敏感的阶段是在小孢子第一次有丝分裂前后, 处于单核至双核早期的小孢子最适合胚的诱导 (Touraev et al., 2001)。在辣椒花药和小孢子培养中, 单核末期 (单核靠边期) 是诱导小孢子离体雄核发育的有效时期 (González-Melendi et al., 1995)。Supena 等 (2006b) 选择 50% 以上小孢子处于单核末期的花蕾, 成功建立了辣椒小孢子散出培养技术。Lantos 等 (2009) 发现利用含有 80% 单核小孢子和 20% 双核小孢子的花药进行辣椒游离小孢子培养效果最好。而 Kim 等 (2004) 认为含有 75% 双核早期小孢子的花药是诱导小孢子胚的理想材料。

辣椒花蕾的大小和形态可作为间接判断小孢子发育时期的指标 (Sibi et al., 1979)。Özkum 和 Tipirdamaz (2002)、Kim 等 (2004) 和 Lantos 等 (2009) 利用不同的辣椒材料, 对花蕾大小、花药颜色与小孢子发育时期的对应关系进行了较为详细的研究, 发现花药中大多数小孢子处于单核末期时, 花蕾的花萼和花瓣等长或者花瓣稍长于花萼, 并且花药末端约 1/4 呈现淡紫色, 这些特征可以间接判断小孢子发育时期。然而, 根据花药颜色判断小孢子的发育时期对于黄色花药的辣椒类型则无法应用; 另外, 不同的辣椒类型可能存在差异 (Rodeva et al., 2004), 针对不同类型的材料, 在进行花药或小孢子培养时, 应结合细胞学 and 花蕾、花药形态, 确定合适的取材时期。

### 4 预处理对引发小孢子胚的发生具有关键作用

对供体材料的预处理是引发小孢子从配子发育转向孢子体发育, 诱导小孢子胚发生的重要过程。预处理包括对整个植株、穗、花芽 (花蕾)、花药或游离小孢子的处理, 处理手段有冷、热, 碳源饥饿等物理和化学手段 (Shariatpanahi et al., 2006)。

辣椒单倍体诱导中主要有温度胁迫和碳源饥饿胁迫 (表 1)。当辣椒花蕾在 4 °C 下处理 24 h 至 1 周后进行花药培养, 均获得了小孢子胚 (Sibi et al., 1979; Özkum et al., 2001; Özkum & Tipirdamaz, 2002, 2011; Kim et al., 2005; Supena et al., 2006a, 2006b)。Dolcet-Sanjuan 等 (1997) 和 Supena 等 (2006a, 2006b) 于黑暗条件下将接种于 N 培养基上的辣椒花药分别在 7 °C 和 9 °C 下预处理 1 周后, 转到 28 °C 培养, 成功获得小孢子胚。然而, Özkum 和 Tipirdamaz (2002, 2007) 发现未经低温处理的花药产生了较多的胚, Koleva-Gudeva 等 (2007) 用 7 °C、25 °C 和 35 °C 处理花药后, 仅 35 °C 预处理得到了胚。

热激在辣椒单倍体诱导中的应用主要针对接种在培养基上的花药或游离的小孢子。Dumas de Vaulx 等 (1981) 报道花药在 35 °C 下处理 8 d 比 2 d 具有更高的诱导率。经高温处理的花药基本都能出胚并再生成苗 (Matsubara et al., 1998; Ercan et al., 2006; Gémes et al., 2009), 然而也有仅诱

导得到愈伤组织的报道 (Kim et al., 2004)。Lantos 等 (2009) 同时利用 32 ℃ 热激和 0.3 mol · L<sup>-1</sup> 甘露醇处理花药后, 分离小孢子在改良的 W14 (欧阳俊闻 等, 1989) 液体培养基上培养, 成功获得了单倍体植株。

表 1 辣椒小孢子胚诱导中的预处理方法  
Table 1 Pretreatments on microspore embryogenesis in *Capsicum*

预处理 Pretreatment	处理对象及流程 Pretreatment protocol	主要结果 Result	单倍体诱导方式 Culture method	参考文献 Reference
低温 Cold shock 4 ℃	花蕾/48 h	出胚、成苗	花药培养	Sibi et al., 1979
	Flower bud/48 h	Embryos, seedlings	Anther culture	
	花蕾/1 d 或 4 d	出胚	花药培养	Özkum et al., 2001
	Flower bud/1 d or 4 d	Embryos	Anther culture	
	花蕾/48 h 或 96 h	出胚、愈伤	花药培养	Özkum & Tipirdamaz, 2002, 2011
	Flower bud/48 h or 96 h	Embryos, callus	Anther culture	
	花蕾/1 d	出胚、成苗	花药/双相培养 Anther/	Supena et al., 2006a, 2006b
	Flower bud/1 d	Embryos, seedlings	Double-layer medium	
	花蕾/7 d	愈伤、成苗	花药培养	Kim et al., 2005
	Flower bud/7 d	Callus, seedlings	Anther culture	
	7 ℃ 花药/N 培养基/黑暗/7 d	出胚、成苗	花药/双相培养 Anther/	Dolcet-Sanjuan et al., 1997
	Anther/N medium/dark/7 d	Embryos, seedlings	Double-layer medium	
9 ℃	花药/N 培养基/黑暗/7 d	出胚、成苗	花药/双相培养 Anther/	Supena et al., 2006a, 2006b
	Anther/N medium/dark/7 d	Embryos, seedlings	Double-layer medium	
热激 Heat shock 31 ℃	花药/MS 培养基/3 d	愈伤	花药培养	Kim et al., 2004
	Anther/MS medium/3 d	Callus	Anther culture	
	35 ℃ 花药/C 培养基/黑暗/8 d	出胚、成苗	花药培养	Dumas de Vaulx et al., 1981
	Anther/C medium/dark/8 d	Embryos, seedlings	Anther culture	
	花药/MS 培养基/黑暗/1 d	愈伤、出胚、成苗	花药培养	Matsubara et al., 1998
	Anther/MS medium/dark/1 d	Callus, embryos, seedlings	Anther culture	
	花药/MS 培养基/黑暗/8 d	出胚、成苗	花药培养	Ercan et al., 2006
	Anther/MS medium/dark/8 d	Embryos, seedlings	Anther culture	
	花药/3%麦芽糖/7 d	出胚、成苗	花药培养	Gémes Juhász et al., 2009
	Anther/3% maltose/7 d	Embryos, seedlings	Anther culture	
饥饿和 10 ℃ 低温 Sucrose-starvation and 10 ℃ cold shock	花蕾/0.3 mol · L <sup>-1</sup> 甘露醇/7 d	愈伤	游离小孢子培养	Bal et al., 2003
	Flower bud/0.3 mol · L <sup>-1</sup> mannitol/7 d	Callus	Isolated microspore culture	
饥饿和 32 ℃ 热激 Sucrose-starvation and 32 ℃ heat shock	花药/0.3 mol · L <sup>-1</sup> 甘露醇/黑暗/7 d	出胚、成苗	游离小孢子培养	Lantos et al., 2009
	Anther/0.3 mol · L <sup>-1</sup> mannitol/dark/7 d	Embryos, seedlings	Isolated microspore culture	

5 培养基种类及相关添加物影响胚的发生

在辣椒单倍体诱导中, 采用的培养基主要有 Cp (Dumas et al., 1981)、MS (Murashige & Skoog, 1962)、N (Nitsch & Nitsch, 1969)、NLN (Swanson, 1990)、W14 (欧阳俊闻 等, 1989)、NT (Bourgin & Nitsch, 1967) 和 LS (Linsmaier & Skoog, 1965)。Lantos 等 (2012) 采用 W14, B5, MS 和 NLN 培养基, 对 12 个甜椒杂种一代的小孢子进行培养, 发现 B5 和 W14 培养基最优。并进一步指出, 无机氮与有机氮以及硝态氮与氨态氮的比例对大麦小孢子胚的诱导率有重要影响, 大麦小孢子培养中最佳的硝态氮与氨态氮比例是 90 : 10, 无机氮与有机氮比例介于 (90 : 10) ~ (71 : 29) 之间 (Mordhorst & Lörz, 1993), B5 和 W14 培养基与此比值相近, 而 MS 和 NLN 相比则有较大差别。研究结果明确了培养基组分和比例, 尤其是氮元素对 B5 培养基诱导率的积极影响 (Lantos et al., 2012), 为揭示不同培养基其单倍体诱导率差异的内因提供了思路。

由 Dumas 等 (1981) 在 Sibi 等 (1979) 研究基础上进一步优化建立的以 Cp 为基本培养基的辣椒花药培养法最具代表性, 是较为高效的培养方法。利用此方法, 研究者对不同基因型的辣椒材料进行单倍体诱导, 平均出胚率和成苗率均较低。另外也有研究者以此方法为基础, 从外源激素配比、

添加物 (Qin & Rotino, 1995a; Nowaczyk & Kisiala, 2006; Nowaczyk et al., 2006; Iwona et al., 2007) 等方面进行优化, 但出胚率和成苗率未有实质性突破。

MS 是除 Cp 培养基外, 辣椒花药培养常用的培养基 (Matsubara et al., 1998; Kim et al., 2005)。Özkum 等 (2001) 在研究辣椒花药培养相关影响因素时, 利用添加  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 和  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA (6-benzyladenine) 的 MS 培养基, 获得了小孢子胚, 诱导率为 12.5% (胚/100 花药)。Ercan 等 (2006) 利用 MS 培养基研究季节和株龄对花药培养的影响时发现, 小孢子胚的发生率最高可达 8.75% (胚/100 花药)。Kim 等 (2004) 利用添加  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  激动素的 MS 培养基培养花药, 获得了愈伤组织和小孢子胚, 胚的诱导率为 57.8% (胚/100 花药)。有关植物生长调节剂对辣椒单倍体诱导率的影响, 详细可见 Irikova 等 (2011) 的综述。

活性炭对花药培养的影响表现在相互对立的两个方面: 吸收有害物质而促进胚的形成, 或因吸收激素等有益物质阻碍胚的形成。研究表明, 添加 0.25% 的活性炭有利于小孢子胚的诱导 (Özkum et al., 2001; Özkum & Tipirdamaz, 2002; Nowaczyk & Kisiala, 2006; Özkum & Tipirdamaz, 2007), 但 Ellialtıoğlu 等 (2001) 在不含活性炭的培养基上获得了较多的胚状体。同样, 硝酸银在辣椒花药培养诱导单倍体中也表现出正反两方面的作用。Irikova 和 Rodeva (2005) 及 Özkum 和 Tipirdamaz (2007) 分别在不添加硝酸银的 Cp、Cm 培养基和 MS 培养基上获得了较高的诱导率。Buyukalaca 等 (2004) 指出添加  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸银的 MS 培养基诱导率最高, 平均每 100 个花药产生 45.7 个胚。王立浩等 (2004) 指出, 硝酸银、抗坏血酸可有效降低花药培养时的褐化, 有助于提高胚的发生率。而 Irikova 和 Rodeva (2005) 的研究发现硝酸银添加在 MS 培养基上有效, 而添加在 Cp 培养基中则无效。秋水仙素处理对提高小孢子培养前期存活率的作用明显 (王烨 等, 2004), 并可极大促进双单倍体植株的发生 (Supena et al., 2006a)。抗生素的应用可有效降低单倍体诱导中花药的污染 (Supena et al., 2006a)。另外在辣椒小孢子培养中, 将小麦子房与辣椒游离小孢子共培养可促进胚状体的发生 (Gémes et al., 2009, 2010)。

## 6 辣椒离体雄核发育的细胞学过程及标记

植物雄核发育是小孢子脱离配子体而向孢子体发育的过程 (Shariatpanahi et al., 2006)。Kim 等 (2004) 发现在辣椒花药培养中, 离体雄核发育存在营养核分裂、生殖核和营养核的分裂以及均等分裂 3 种途径; 李春玲等 (2008) 进行辣椒游离小孢子培养时观察到, 辣椒单核小孢子最初的细胞分裂有均等分裂和不均等分裂两种方式; Bárány 等 (2005) 和刘凡等 (2007) 分别报道辣椒花药培养和小孢子培养过程中单核小孢子均等分裂最终形成小孢子胚。由此可知, 辣椒小孢子胚的发育可能有营养细胞分裂 (A 途径)、生殖细胞和营养细胞的分裂 (E 途径)、小孢子均等分裂 (B 和 D 途径) 等途径 (Seguí-Simarro & Nuez, 2008a, 2008b)。目前, Bárány 等 (2005) 对辣椒小孢子均等分裂形成小孢子胚的细胞学过程进行了详细研究, 发现辣椒小孢子均等分裂后形成具有独立细胞壁的两个细胞, 随着细胞增殖并形成多细胞结构, 胞外壁破裂, 释放出圆形的胚状体或原胚。接着原胚出现两层不同细胞形态的原始组织区, 内层是密集排列的具有小液泡的小细胞, 外层是具有大液泡的大细胞。原胚继续发育, 会出现类似球形胚的较大的圆形组织。此时, 不同的细胞类型变得更加明显, 而且发现内外两个明显不同类型的细胞区域结构。球形胚以后, 如同合子胚的发育过程一样, 外区出现线性排列的, 大小相同的整齐细胞层, 且大多数外围细胞层形态上类似表层细胞。鱼雷胚时期, 已经能辨别不同的组织、表皮和子叶原基。

辣椒小孢子胚发育过程中, 伴随细胞核的分裂、细胞的增殖和分化, 细胞内核小体和细胞壁组

分也发生量和分布的动态变化。热激处理后,细胞内的热激蛋白(HSP70)和 Ntf6-MAP 激酶(Ntf6-MAPK)升高,表明细胞在由配子体向孢子体转变过程中核的变化和细胞的增殖(Testillano et al., 2000; Bárány et al., 2001)。Seguí-Simarro 等(2006)利用免疫荧光和免疫金标记,对卡哈尔体(Cajal body)在辣椒配子发育和小孢子胚发育中的分布进行了研究,发现与小孢子和花粉发育相比较,卡哈尔体在小孢子胚发育早期(原胚发育早期)的细胞中增多,由于卡哈尔体参与 mRNA 和 pre-rRNA 的加工,从而表明卡哈尔体可能参与细胞活跃转录和增殖时期小孢子胚的发育,可看作是小孢子向胚胎发育的潜在标记。Bárány 等(2010a, 2010b)研究了辣椒花粉、小孢子胚、茎尖和合子胚发育中,细胞壁组分酯化果胶质(抗体 Jim7)、脱酯化果胶质(抗体 Jim5)、XG(xyloglucan, 木葡聚糖),RG II(rhamnogalacturonan II, 鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 II)和淀粉的积累或分配,结果表明分子复杂体的分配,酯化和脱酯化果胶质的比例在不同类型的细胞或不同组织的细胞层存在差别。脱酯化的果胶质、XG 和 RG II 在分化的胞壁细胞中大量存在,酯化的果胶质在增殖的细胞中存在。高度酯化的果胶质与细胞增殖相关,而且细胞壁组分在合子胚和小孢子胚中呈现相同的分配模式,从而表明细胞壁物质在细胞增殖和分化中的变化特征,可作为花粉发育和小孢子胚发育的标记。

## 7 辣椒单倍体和双单倍体的性状及应用

辣椒花药和小孢子培养后,可获得单倍体、双单倍体、四倍体和非整倍体,并表现出不同的生物学性状(Irikova et al., 2011)。除利用染色体计数法和流式细胞术进行倍性分析外,辣椒叶片气孔保卫细胞叶绿体数可作为间接判断花培植株倍性的方法(Qin & Rotino, 1995b)。Supena 等(2006a)报道单倍体辣椒叶片气孔保卫细胞的叶绿体较双单倍体和二倍体减少近 1 倍,可作为鉴别单倍体的简易方法。Shrestha 等(2010, 2011)对花药培养再生植株进行了细胞学和形态学研究,发现单倍体辣椒叶片的气孔较二倍体长,但气孔密度较二倍体的大,单倍体植株较二倍体植株叶片和叶柄小,长势弱,花蕾小,果小且大多没有种子。笔者发现用正常二倍体的花粉给单倍体授粉,可产生若干种子,且有的单倍体植株也能自然产生种子,这说明单倍体也具有一定的育性。

研究发现,辣椒同一材料来源的双单倍体株系间变异幅度很大,株系内个体间性状整齐一致,同一株系世代间遗传稳定(陈肖师, 1984; 蒋钟仁和李春玲, 1984),杂种后代表现出普遍而显著的杂种优势(陈肖师, 1985)。但应明确,双单倍体株系间的遗传多样性,与供体植株的杂合度有关。Gyulai 等(2000)对杂种材料 F<sub>1</sub> 和其 47 个花药培养的 DH-R<sub>2</sub> 株系进行了 PCR 分析,结果表明 DH 株系间存在高水平的遗传多样性,从而说明在辣椒新基因型的选择中,可以利用 PCR 的方法对重组进行鉴别和选择。Shrestha 等(2010, 2011)从上百个花药培养双单倍体植株中选择出了 10 个综合性状表现突出,具有潜在应用价值的双单倍体植株。

1979 年,北京市海淀区植物组织培养技术试验室通过对从国外引进的品种‘782031’进行花药培养,于 1982 年成功选育出辣椒花培品种‘海花三号’(李春玲和蒋钟仁, 1990);此后,又相继利用花培品系选育出海丰系列等多个辣椒品种(张树根 等, 2006)。1981 年,陈肖师从地方品种‘易县甜椒’的花药培养中获得了 6 个花培品系,其中 81-15-6 表现突出,1987 年通过河北省品种审定,命名为‘塞花一号’(陈肖师, 1988)。据来自欧洲 COST 851 计划(2001—2006)的报道,西班牙的 Dolcet-Sanjuan 等(1997)以双单倍体为亲本或亲本之一,培育出 8 个不同的辣椒杂交一代。匈牙利是研究辣椒单倍体技术较为深入的国家之一(Mitykó & Gémes Juhász, 2006),2010 年,匈牙利的 Pauk 等(2010)报道,利用双单倍体培育的辣椒杂交种‘Sláger’于 2008 获得注册,另外两个甜椒杂交种‘Bolero’和‘Délibáb’正在进行正式试验。

## 8 问题与展望

### 8.1 辣椒单倍体胚诱导效率仍徘徊在较低水平

从 1973 年到现在, 尽管通过花药和小孢子培养已成功诱导出辣椒单倍体或双单倍体, 而且诱导率最高可达每 100 个花蕾产生 3 561 个胚 (Dolcet-Sanjuan et al., 1997)。然而, 不同的基因型差异较大。如 Koleva-Gudeva 等 (2009) 利用 Dumas 等 (1981) 的方法, 对 21 个不同基因型的辣椒进行花药培养, 只有 12 个基因型诱导得到胚, 而且大多得率很低; Nowaczyk 等 (2009b) 利用 Dumas 等 (1981) 的方法, 对 *Capsicum frutescens* × *C. annuum* 和 *C. frutescens* × *C. chinense* 两个辣椒种间杂交种的 F<sub>2</sub> 代各 19 株辣椒进行花药培养, 只有 6 株得到胚, 1 株得到根状体, 而其它 31 株对诱导没有任何反应。因此看来, 目前找出一种比较普遍适用的、相对具有较高效率的辣椒单倍体诱导方法还存在困难。

辣椒属顽拗植物, 再生能力较差, 单倍体诱导相对困难 (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001; Kothari et al., 2010; Irikova et al., 2011; Seguí-Simarro et al., 2011)。Ochatt 等 (2009) 发现渗透处理结合电刺激法能促进某些顽拗豆类植物单倍体的诱导; Li 和 Devaux (2001) 将大麦子房和小孢子共培养, 将顽拗基因型的大麦小孢子胚诱导率提高了 2.1 倍; Prem 等 (2008) 报道向液体培养基中加入活性炭和硝酸银, 将油菜小孢子胚的诱导率提高了 4 倍; Wang 等 (2009) 将 NLN 培养基中的大量元素含量减半, 成功诱导红菜薹单倍体的发生; 而在大麦小孢子培养中, 在预处理培养基或胚诱导培养基中加入硫酸铜和硫酸锌, 可提高小孢子胚的得率, 并能降低再生苗的白化率 (Echavarri et al., 2008; Jacquard et al., 2009)。以上研究经验可为辣椒单倍体诱导方法的优化提供参考。

### 8.2 高比率的畸形胚限制了小孢子胚的成苗

辣椒花药和游离小孢子培养中畸形胚发生率较高 (Kristiansen & Andersen, 1993; Seguí-Simarro et al., 2011), 且存在球形胚发育停滞的现象 (Gyulai et al., 2000; Parra-Vega et al., 2010), 导致成苗率相对降低。Supena 等 (2006b) 报道, 辣椒小孢子散出培养法中正常胚占 20%, 其余 30% 的胚没有子叶和苗尖, 50% 的胚看似只有幼根; Kim 等 (2008) 在进行辣椒游离小孢子培养过程中发现存在不能成苗的球状胚和心形胚, 以及多子叶胚和联体胚; 李春玲等 (2008) 也发现多种连体畸形胚; Parra-Vega 等 (2010) 报道, 心形胚之后正常的发育途径被打乱, 出现无子叶或者无苗尖的畸形胚。作者在参照 Dumas 等 (1981) 和 Supena 等 (2006b) 的方法进行辣椒单倍体诱导时发现花药培养诱导率较低, 但可不经愈伤组织直接成胚, 而且胚完整, 成苗率高, 小孢子散出培养中, 虽然可获得较高的诱导率, 但畸形胚较多, 成苗率低。因此, 在辣椒单倍体诱导中, 高效的花药培养关键是直接成胚、成苗, 并在此基础上提高诱导率; 小孢子培养要在提高诱导率的同时, 减少畸形胚的发生, 从而提高再生苗率。

植物畸形小孢子胚的产生, 可能是由于小孢子胚发育过程不存在胚乳、胚珠等对胚发育起间接或直接作用的母体组织。Hays 等 (2001) 认为缺少种子其它组织对 IAA 合成的调控和对 ABA 的积累, 油菜小孢子胚中的 IAA 和 ABA 含量低于其在合子胚中的含量。由于 IAA 和 ABA 与胚的发育和形态建成相关, 从而提供相对正常的激素水平, 对提高小孢子胚的质量和成苗有重要作用。植物畸形小孢子胚难以成苗, 主要是胚子叶形态建成和苗尖分生组织的异常。Belmonte 等 (2010) 报道, 油菜素类固醇 (brassinosteroids) 能够抑制还原型谷胱甘肽 (GSH) 的合成, 有利于提高小孢子胚苗尖的质量。阿拉伯半乳糖 (arabinogalactans) 和阿拉伯半乳糖蛋白 (AGPs, arabinogalactan proteins)

在油菜离体雄核发育中对小孢子胚发育的起始和维持细胞的分化至关重要 (Tang et al., 2006), 能促进小麦 (Letarte et al., 2006)、玉米 (Borderies et al., 2004) 离体雄核发育。Supena 和 Custers (2011) 对 Supena 等 (2006b) 的方法进行了改进, 花药培养 3 周后再向液相培养基中添加玉米素 ( $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 IAA ( $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 同时培养温度从  $28^\circ\text{C}$  降低为  $21^\circ\text{C}$ , 将正常胚发生率从 20% 提高到 50% 以上。由此看来, 为提高辣椒小孢子胚的质量, 应综合研究辣椒合子胚和小孢子胚发育中的异同, 从多细胞到球形胚早期 (Supena & Custers, 2011), 以及球形胚形成后, 伴随组织分化而进行的胚的伸长和成熟过程 (Seguí-Simarro et al., 2011), 进一步了解小孢子胚发育中的营养需求。

### 8.3 辣椒双单倍体的育种应用研究还不够广泛和深入

单倍体技术已在植物遗传育种中及分子生物学等基础研究方面取得重要进展 (Forster et al., 2007; Jauhar et al., 2009; Dunwell, 2010; Seguí-Simarro, 2010; Ferrie & Caswell, 2011; Germaná, 2011)。但是相对于谷类作物和油菜等十字花科植物, 单倍体在辣椒杂交种育种中的应用还不够广泛, 除未公开报道的原因外, 可能还有以下两方面的原因。其一, 辣椒单倍体诱导率低下, 且胚畸形率较高, 从有限的再生苗中难以选出综合性状优良的可以应用的 DH 系; 其二, 辣椒可在保护地栽培, 一年可繁殖两代, 自交系选育周期相对较短。因此, 应以辣椒小孢子胚发育相关的生物学研究为基础, 从影响辣椒小孢子胚发生的相关重要因素入手, 设法提高辣椒单倍体的诱导效率, 以获取大量的优良 DH 系, 实现单倍体技术在辣椒优良自交系选育中的优越性, 从而促进辣椒杂交种发展。

## References

- Bal U, Abak K, Buyukalaca S, Comlekcioglu N. 2003. Development of callus colonies from the isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 17 (2): 38 - 43.
- Bárány I, Fadón B, Risueño M C, Testillano P S. 2010a. Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *J Exp Bot*, 64: 1159 - 1175.
- Bárány I, Fadón B, Risueño M C, Testillano P S. 2010b. Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events. *Plant Signal Behav*, 5 (4): 341 - 345.
- Bárány I, González-Melendi P, Fadón B, Mitykó J, Risueño M C. 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): Subcellular rearrangements through development. *Biol Cell*, 97: 709 - 722.
- Bárány I, Testillano P S, Mitykó J, Risueño M C. 2001. The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int J Dev Biol*, 45 (S1): S39 - S40.
- Belmonte M, Elhiti M, Waldner B, Stasolla C. 2010. Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos. *J Exp Bot*, 61: 2779 - 2794.
- Borderies G, Bechec M, Rossignol M, Lafitte C, Le Deunff E, Beckert M, Dumas C, Matthys-Rochon E. 2004. Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: Arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *Eur J Cell Biol*, 83: 205 - 212.
- Bourgin J P, Nitsch J. 1967. Obtention de nicotiana haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann Physiol Végét*, 9: 377 - 382.
- Buyukalaca S, Comlekcioglu N, Abak K, Ekbic E, Kilic N. 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *Eur J Hort Sci*, 69: 206 - 209.
- Chen Xiao-shi. 1984. Study on the genetic behavior of the main characteristics of pollen stock in sweet pepper. *Acta Horticulturae Sinica*, 11 (3): 113 - 118. (in Chinese)
- 陈肖师. 1984. 甜椒花粉株系主要性状的遗传表现. *园艺学报*, 11 (3): 113 - 118.
- Chen Xiao-shi. 1985. Determination of combining ability and analysis of heterosis on pollen line of *Capsicum annuum* var. *grossum* Sendt. *Acta Horticulturae Sinica*, 12 (4): 267 - 272. (in Chinese)



- 陈肖师. 1985. 甜椒花粉株系配合力测定及杂种优势分析. 园艺学报, 12 (4): 267 - 272.
- Chen Xiao-shi. 1988. Anther culture of sweet pepper and breeding of 'Saihua No. 1'. Chinese Vegetables, (3): 5 - 7. (in Chinese)
- 陈肖师. 1988. 甜椒花药培养及 '塞花一号' 的育成. 中国蔬菜, (3): 5 - 7.
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Huerta A. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L.—Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. J Amer Soc Hort Sci, 122 (4): 468 - 475.
- Dumas de Vaulx R, Chambonnet D, Pochard E. 1981. Culture *in vitro* d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): Amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35 °C. Agronomie, 1 (10): 859 - 864.
- Dunwell J M. 2010. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. Plant Biotechnol J, 8: 377 - 424.
- Echavarri B A, Soriano M, Cistué L, Vallés M, Castillo A. 2008. Zinc sulphate improved microspore embryogenesis in barley. Plant Cell Tiss Organ Cult, 93: 295 - 301.
- Ellialtınoğlu Ş, Kaplan F, Abak K. 2001. The effect of carrot extract and activated charcoal on the androgenesis of pepper//Proceedings of the XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant. Antalya: 142 - 145.
- Ercan N, Sensoy F A, Sensoy S. 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). Sci Hort, 110: 16 - 20.
- Ferrie A M R, Caswell K L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss Organ Cult, 104: 301 - 309.
- Forster B P, Herberle-Bors E, Kasha K J, Touraev A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci, 12 (8): 368 - 375.
- Gémes Juhász A, Kristóf Z, Vági P, Lantos C, Pauk J. 2009. *In vitro* anther and isolated microspore culture as tools in sweet and spice pepper breeding. Acta Hort, 829: 61 - 64.
- Gémes Juhász A, Lantos Cs, Pauk J. 2010. New perspective: Microspore culture as new tool in paprika breeding//Prohens J, Rodríguez-Burruezo A. Advances in genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant: Proceedings of the XIVth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant. Valencia, Spain: Editorial Universidad Politécnica de Valencia: 377 - 381.
- George L, Narayanaswamy S. 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma, 78: 467 - 470.
- Germaná M A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tiss Organ Cult, 104: 283 - 300.
- González-Melendi P, Testillano P S, Ahmadian P, Fadón B, Vicente O, Risueño M C. 1995. In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. Protoplasma, 87: 60 - 71.
- Guo Zhong-chen, Wang Yu-ying, Qian Nan-fen, Gu Shu-rong, Gong Ming-liang, Xu Hui-jun. 1973. Investigation on the anther culture *in vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Bot Sin, 15: 43 - 47. (in Chinese)
- 郭仲琛, 王玉英, 钱南芬, 顾淑荣, 龚明良, 徐惠君. 1973. 菸草 (*Nicotiana tabacum*) 和辣椒 (*Capsicum annuum*) 花药离体培养的研究. 植物学报, 15: 37 - 47.
- Gyulai G, Gémesné J A, Sági Zs, Venczel G, Pintér P, Kristóf Z, Törjék O, Heszy L, Bottka S, Kiss J, Zatykó L. 2000. Doubled haploid development and PCR-analysis of F<sub>1</sub> hybrid derived DH-R<sub>2</sub> paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. J Plant Physiol, 156: 168 - 174.
- Hays D B, Mandel R M, Pharis R P. 2001. Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. Plant Growth Regul, 35: 47 - 58.
- Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven I R, Schilperoort R A, Wang M. 1997. Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. Plant Sci, 126: 211 - 218.
- Irikova T, Grozeva S, Rodeva V. 2011. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. Acta Physiol Plant, 33: 1559 - 1570.
- Irikova T, Rodeva V. 2005. The effect of silver nitrate on *in vitro* embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture. Genetics and Breeding, 34 (1 - 2): 33 - 38.
- Iwona J, Anna K, Dorota O, Pawet N. 2007. Haploid formation through androgenesis and polyembryony in cultivated and wild genotypes of *Capsicum* genus//Niemirowicz-szczytt K. Progress in research on *Capsicum* and eggplant. Warsaw, Poland: Warsaw University of Life Science Press: 377 - 384.
- Jacquard C, Nolin F, Hecart C, Grauda D, Rashal I, Dhondt-Cordelier S, Sangwan R S, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clément C. 2009. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: Effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. Plant Cell Rep, 28:

- 1329 – 1339.
- Jauhar P P, Xu S S, Baenziger P S. 2009. Haploidy in cultivated wheats: Induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci*, 49: 737 – 755.
- Jiang Zhong-ren, Li Chun-ling. 1984. The observation and experiment on the filial generation of the anther culture of sweet pepper and hot pepper. *Acta Horticulturae Sinica*, 11: 191 – 194. (in Chinese)
- 蒋钟仁, 李春玲. 1984. 对甜(辣)椒花培后代的观察与试验. *园艺学报*, 11: 191 – 194.
- Kim J Y, Kim Y S, Yi G, Kim K M. 2005. Anther culture of transgenic pepper (*Capsicum annuum* L.). *Korean J Breed*, 37: 241 – 246.
- Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M, Lee Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep*, 27: 425 – 434.
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi D-I, Lee K-M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 77: 63 – 72.
- Koleva-Gudeva L, Trajkova F, Dimeska G, Spasenoski M. 2009. Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Hort*, 830: 183 – 190.
- Koleva-Gudeva L R, Spasenoski M, Trajkova F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Sci Hortic*, 111: 114 – 119.
- Kothari S L, Joshi A, Kachhwaha S, Ochoa-Alejo N. 2010. Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnol Adv*, 28: 35 – 48.
- Kristiansen K, Andersen S B. 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67: 105 – 109.
- Lantos C, Juhász A G, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 97: 285 – 293.
- Lantos C, Juhász A G, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Pauk J. 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnol Rep*, 6: 123 – 132.
- Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha K J. 2006. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep*, 24: 691 – 698.
- Li Chun-ling, Jiang Zhong-ren. 1990. The breed successful of ‘Hai-hua No. 3’ sweet pepper new variety by anther culture. *Acta Horticulturae Sinica*, 17: 39 – 44. (in Chinese)
- 李春玲, 蒋钟仁. 1990. 甜椒花培新品种‘海花三号’的育成. *园艺学报*, 17: 39 – 44.
- Li Chun-ling, Tong Xi-ran, Zhu Zhi-qing, Gu Shu-rong, Jiang Zhong-ren, Zhang Shu-gen. 2008. Androgenesis and embryogenesis in isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (11): 1613 – 1620. (in Chinese)
- 李春玲, 佟曦然, 朱至清, 顾淑荣, 蒋钟仁, 张树根. 2008. 辣(甜)椒游离小孢子培养中的雄核发育和胚胎发生. *园艺学报*, 35 (11): 1613 – 1620.
- Li H, Devaux P. 2001. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep*, 20: 475 – 481.
- Liljana K-G, Fidanka T, Mirko S. 2007. Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) // Niemirowicz-szczytt K. Progress in research on *Capsicum* and eggplant. Warsaw, Poland: Warsaw University of Life Science Press: 385 – 392.
- Linsmaier E M, Skoog F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Plant Phys*, 18: 100 – 127.
- Liu Fan, Zhao Hong, Chen Bin, Zhang Yue-yun. 2007. Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annuum* L. *Journal of Molecular Cell Biology*, 40: 371 – 379. (in Chinese)
- 刘 凡, 赵 泓, 陈 斌, 张月云. 2007. 辣椒游离小孢子细胞团培养的胚状体形成. *分子细胞生物学报*, 40: 371 – 379.
- Ltifi A, Wenzel G. 1994. Anther culture of hot and sweet pepper (*Capsicum annuum* L.): Influence of genotype and plant growth temperature. *Capsicum Eggplant Nwsl*, 13: 74 – 77.
- Matsubara S, Yamamoto M, Man Hyun J, Murakamy K, Man H J. 1998. Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Rep Fac Agric Okayama Univ*, 87: 117 – 122.
- Mitykó J, Andrasfalvy A, Csillery G, Fari M. 1995. Anther-culture response in different genotypes and F<sub>1</sub> hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114: 78 – 80.

- Mitykó J, Fári M. 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther- and microspore culture. *Acta Hort*, 447: 281 – 288.
- Mitykó J, Gémes Juhász A. 2006. Improvement in the haploid technique routinely used for breeding sweet and spice peppers in Hungary. *ACTA Agron Hung*, 54: 203 – 219.
- Mordhorst A P, Lörz H. 1993. Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount of nitrogen sources in culture media. *J Plant Physiol*, 142: 485 – 492.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473 – 497.
- Nitsch J P, Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85 – 87.
- Novák F J. 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Z Pflanzenzucht*, 72: 46 – 54.
- Nowaczyk P, Kisiala A, Olszewska D. 2006. Induced androgenesis of *Capsicum frutescens* L. *Acta Physiol Plant*, 28 (1): 35 – 39.
- Nowaczyk P, Kisiala A. 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J Appl Genet*, 47 (2): 113 – 117.
- Nowaczyk P, Nowaczyk L, Olszewska D, Krupska A. 2009a. Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *C. chinense* Jacq. hybrids. *Acta Physiol Plant*, 31: 877 – 879.
- Nowaczyk P, Olszewska D, Kisiala A. 2009b. Individual reaction of *Capsicum* F<sub>2</sub> hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica*, 168: 225 – 233.
- Ochatt S, Pech C, Grewal R, Conreux C, Lulsdorf M, Jacas L. 2009. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). *J Plant Physiol*, 166: 1314 – 1328.
- Ochoa-Alejo N, Ramirez-Malagon R. 2001. *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 37: 701 – 729.
- Ouyang Jun-wen, Jia Shuang-e, Zhang Chi, Chen Xue-dong, Fen Guo-hong. 1989. A new synthetic medium (W14) for wheat anther culture. Annual report for 1987 – 1988. Institute of Genetics, Academia Sinica. Beijing: Science Press: 102. (in Chinese)
- 欧阳俊闻, 贾双娥, 张 弛, 陈学东, 冯国宏. 1989. 一个新的小麦花药培养基——W14 培养基. 中国科学院遗传研究所研究工作年报 1987—1988 年报. 北京: 科学出版社: 102.
- Özkum D, Tipirdamaz R. 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk J Bot*, 26: 131 – 139.
- Özkum D, Tipirdamaz R, Ellialtıoglu S. 2001. The relationship between the endogenous abscisic acid content of anther and *in vitro* androgenesis in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Acta Hort*, 560: 327 – 329.
- Özkum D, Tipirdamaz R. 2007. Effect of silver nitrate, activated charcoal and cold treatment on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Hort*, 729: 133 – 136.
- Özkum D, Tipirdamaz R. 2011. Effects of L-proline and cold treatment on pepper (*Capsicum annuum* L.) Anther Culture//Gökçekus H. Survival and Sustainability, Environmental Earth Sciences, Part 1: 137 – 143.
- Parra-Vega V, Palacios N, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM. 2010. Establishment of isolated microspore cultures in pepper of the California and Lamuyo types//Prohens J, Rodríguez-Burruezo A. Advances in genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant: Proceedings of the XIVth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant. Valencia, Spain: Editorial Universidad Politécnica de Valencia: 411 – 415.
- Pauk J, Lantos C, Somogyi G, Vagi P, Abraham T Z, Gémes Juhász A, Mihaly R, Kristof Z, Somogyi N, Timar Z. 2010. Tradition, quality and biotechnology in Hungarian spice pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding. *Acta Agron Hung*, 58 (3): 259 – 266.
- Prem D, Gupta K, Gautam S, Agnihotri A. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 93: 269 – 282.
- Qin X, Rotino G L. 1995a. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Acta Hort*, 402: 313 – 316.
- Qin X, Rotino G L. 1995b. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro*-grown androgenic pepper plantlets. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 41: 153 – 160.
- Rodeva V N, Irikova T P, Todorova V J. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): Comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol Biotechnol Eq*, 18: 34 – 38.
- Seguí-Simarro J M, Nuez F. 2008a. How microspores transform into haploid embryos: Changes associated with embryogenesis induction and

- microspore-derived embryogenesis. *Physiol Plant*, 134: 1 – 12.
- Seguí-Simarro J M, Nuez F. 2008b. Pathways to doubled haploidy: Chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenet Genome Res*, 120: 358 – 369.
- Seguí-Simarro J M, Bárány I, Suárez R, Fadón B, Testillano P S, Risueño M C. 2006. Nuclear bodies domain changes with microspore reprogramming to embryogenesis. *Eur J Histochem*, 50: 35 – 44.
- Seguí-Simarro J M, Corral-Martínez P, Parra-Vega V, González-García B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep*, 30: 765 – 778.
- Seguí-Simarro J M. 2010. Androgenesis revisited. *Bot Rev*, 76: 377 – 404.
- Shariatpanahi M E, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plant*, 127: 519 – 534.
- Shrestha S L, Luitel B P, Kang W H. 2011. Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52 (2): 196 – 203.
- Shrestha S L, Luitel B P, Lee T J, Kang W H. 2010. Cytological and morphological characterization of anther derived plants from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) cv. 'Special'. *Kor J Breed Sci*, 42 (5): 431 – 438.
- Sibi M, Dumas de Vaulx R, Chambonnet D. 1979. Obtention de plantes haploïdes par androgénèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amélior Plantes*, 29: 583 – 606.
- Supena E D J, Custers J B M. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Hortic*, 130: 769 – 774.
- Supena E D J, Muswita W, Suharsono S, Custers J B M. 2006a. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Sci Hortic*, 107: 226 – 232.
- Supena E D J, Suharsono S, Jacobsen E, Custers J B M. 2006b. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep*, 25: 1 – 10.
- Swanson E B. 1990. Microspore culture in *Brassica*. Pollard J W, Walker J M. *Methods in molecular biology*, vol 6. Plant cell and tissue culture. New Jersey: Humana Press: 159 – 170.
- Tang X C, He Y Q, Wang Y, Sun M X. 2006. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *J Exp Bot*, 57: 2639 – 2650.
- Testillano P S, Coronado M J, Seguí J M, Domenech J, Gonzalez-Melendi P, Raska I, Risueno MC. 2000. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *J Struct Biol*, 129: 223 – 232.
- Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E. 2001. The microspore: A haploid multipurpose cell. *Adv Bot Res*, 35: 53 – 109.
- Wang Li-hao, Zhang Bao-xi, Guo Jia-zhen, Yang Gui-mei, Du Mei-zhen. 2004. Studies of effects of several factors on anther culture of *Capsicum annuum* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (2): 199 – 204. (in Chinese)
- 王立浩, 张宝玺, 郭家珍, 杨桂梅, 堵玫珍. 2004. 辣椒花药培养中若干影响因素的研究. *园艺学报*, 31 (2): 199 – 204.
- Wang T T, Li H X, Zhang J H, Ouyang B, Lu Y G, Ye Z B. 2009. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinesis* var. *purpurea* Hort.). *Sci Hort*, 121: 419 – 424.
- Wang Ye, Zhang Bao-xi, Lian Yong, Wang Li-hao. 2004. Influence of pretreatment to alive frequency of isolated microspore in *Capsicum annuum* L. *China Vegetables*, (4): 4 – 6. (in Chinese)
- 王 烨, 张宝玺, 连 勇, 王立浩. 2004. 不同预处理对辣椒小孢子存活率的影响. *中国蔬菜*, (4): 4 – 6.
- Wang Yu-ying, Sun Jing-san, Wang Jing-ju, Qian Nan-fen. 1973. The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* anther culture. *Sci Sin*, 16: 104 – 107. (in Chinese)
- 王玉英, 孙敬三, 王敬驹, 钱南芬. 1973. 小黑麦 (*Triticale*) 和辣椒 (*Capsicum annuum*) 花粉植株的诱导. *中国科学*, 16: 104 – 107.
- Zhang Shu-gen, Shen Huo-lin, Jiang Zhong-ren, Li Chun-ling, Xing yong-ping. 2006. Advance in anther culture and haploid breeding in *Capsicum*. *Journal of China Capsicum*, (3): 1 – 8. (in Chinese)
- 张树根, 沈火林, 蒋钟仁, 李春玲, 邢永萍. 2006. 辣椒花药培养单倍体育种技术研究进展. *辣椒杂志*, (3): 1 – 8.