

温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响

庄军平¹, 巩振辉¹, 苏菁²

(1. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨陵 712100; 2. 华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

摘要: 以辣椒杂一代为材料, 研究了不同温度处理对辣椒花药愈伤组织形成的影响。结果表明: 接种前花蕾经 1~ 7 d 0~ 4℃低温预处理有利于花药愈伤组织的形成, 其中以 3~ 5 d 处理的效果最好; 接种后经 12~ 60 h 32℃短期热激处理, 也有利于花药愈伤组织的形成, 但超过 60 h 反而抑制愈伤组织的形成。试验还对低温预处理和短期热激处理的效果进行了比较, 发现单独热激处理的效果稍优于单独低温预处理, 而两者配合处理的效果与单独热激处理的效果差异不明显。

关键词: 辣椒; 花药培养; 温度处理; 愈伤组织诱导率

中图分类号: S641. 3, Q418 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2001) 02-0049-03

The Effects of Temperature Treatment on Callus Induction of *Capsicum Anuum* L.

ZHU ANG Jun-ping¹, GONG Zheng-hui¹, SU Jing²

(1. Horticulture College, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forstry, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Biotechnology College, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642, China)

Abstract The effects of temperature treatments on callus induction of *Capsicum anuum* L. were studies. The results indicated that lower temperature pretreatment with 0~ 4℃ for 1~ 7 d on buds befor inoculating were beneficial to callus induction, and the best treatments were pretreatments with 0~ 4℃ for 3~ 5 d; Heat shocks with 32℃ for 12~ 60 h after inoculating also contributed much to callus induction, but the callus induction were inhibited beyond 60 h; Comparison lower temperature pretreatment before inoculating with heat shocks after inoculating indicated that the former was more efficient than the later. The differences of the callus inducing frequency between the combination for lower temperature with heat shock and heat shock alone were not apparent.

Key words *Capsicum anuum* L.; Anther culture; Temperature treatment; Frequency of callus induction

自 1964 年 Goha 首次在毛叶曼陀罗上花药培养取得成功后, 花药培养便成为生物学科中研究的重要内容之一, 并且广泛应用于植物遗传育种^[1, 9]。国内外在水稻、小麦等禾本科作物上的研究表明, 在花药培养中愈伤组织的诱导率除受植物基因型、培养基、花药发育时期和植物激素配比等因素的影响外, 低温预处理和热激处理也是影响花药愈伤组织形成的主要因素^[2, 3, 10]。然而关于低温预处理和热激处理对辣椒花药愈伤组织形成的影响尚未见报道。本试验探索了不同低温预处

理时间及不同热激时间对辣椒花药愈伤组织形成的影响, 旨在为提高辣椒花药愈伤组织诱导率, 推动辣椒花药培养的实用化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试材

供试辣椒品种湘研 18 洛椒 98 系 A 型种子由西北农林科技大学农城种业中心提供。2000 年 2 月播于阳畦, 4 月下旬定植于露地, 6 月初开始采样。每天上午采长 5.2 mm 花萼长 4.0 mm 大

* 收稿日期: 2000-12-28

作者简介: 庄军平 (1971-) 男, 陕西勉县人, 讲师, 在读硕士, 主要从事蔬菜生物技术及育种研究。电话: (029) 7092428

小一致的花蕾用冰壶带回实验室,立即进行低温预处理或接种后进行热激处理

1.2 方法

将供试的花蕾用镊子剥去花萼,在 70%酒精中浸泡 15 s,然后用 0.2%升汞溶液浸泡 8 min,再用 2%的新洁尔灭消毒 8 min^[11]。最后用无菌水冲洗 3 次后在无菌条件下剥出花药,接种在 MS 无机盐附加 0.5 mg NAA/L 1 mg BA/L 6%蔗糖、0.8%的琼脂,pH 为 6.2 的培养基上。接种密度为每 250 ml 的三角瓶接 5 个花蕾(约 30 个花药),每处理接 10 瓶(约 300 个花药)。在白天 26℃、夜晚 23℃、光照 14 h/d 光强 1 500 lx 的人工气候室中培养

1.2.1 低温预处理 在进行低温预处理时,将花蕾用湿纱布包好后置 0~ 4℃冰箱中进行 0(CK)、1 2 3 4 5 6 7 d 不同天数的低温预处理

1.2.2 热激处理 将接种的花药放在 32℃的光照培养箱中进行 0(CK)、12 24 36 48 60 72 h 的短期热激处理

1.2.3 低温预处理与热激处理配合使用效果 设置 5 个处理:(1)取花药接种按常规条件培养

(CK);(2)将花蕾经 0~ 4℃低温预处理 5 d 后接种;(3)接种后再经 32℃、48 h 热激处理;(4)先经 0~ 4℃、5 d 低温预处理后接种,再经 32℃、48 h 短期热激处理;(5)先将花蕾进行 0~ 4℃低温预处理 5 d,接种后在 0~ 4℃低温下处理 48 h

1.2.4 愈伤组织诱导率统计 接种后 28 d 统计各处理中未污染瓶内形成的愈伤组织数,计算愈伤组织诱导率^[4]:愈伤组织诱导率(%)=(形成愈伤组织的花药数/接种花药数)× 100%。

2 结果与分析

2.1 低温预处理对愈伤组织诱导率的影响

表 1 表明,供试 2 个材料经 1~ 7 d 低温预处理后花药愈伤组织诱导率均明显高于对照,其中湘研 18 号 4~ 5 d 预处理效果最好,诱导率达 14.24%~ 16.22%;洛椒 98 系 A 型 3~ 5 d 预处理效果最好,诱导率达 11.48%~ 13.00%。

2.2 短期热激处理对愈伤组织诱导率的影响

从表 2 可看出,接种后适当的短期热激处理有利于提高愈伤组织的诱导率。发现在 12~ 48 h 内随着热激处理时间的增加,诱导率逐步增高,但

表 1 低温预处理对愈伤组织诱导率的影响

Table 1 The effect of lower temperature pretreatment on the frequency of callus induction

低温预处理 天数(d) Day of lower temperature pretreatment	品种 Cultivar	接种花 药个数 No. of anther inoculated	愈伤组织 形成数 No. of calluses	愈伤组织 诱导率(%) Percentage of callus induction	低温预处理 天数(d) Day of lower temperature pretreatment	品种 Cultivar	接种花 药个数 No. of anther inoculated	愈伤组织 形成数 No. of calluses	愈伤组织 诱导率(%) Percentage of callus induction
0(CK)	湘研 18号	271	13	4.79	0(CK)	洛椒 98系	302	17	5.63
1	Xiangyan	300	26	8.67	1	A 型	304	21	6.91
2	No. 18	272	24	8.82	2	Luojiao 98	270	18	6.67
3		303	37	12.20	3	strain	238	28	11.76
4		300	49	16.33	4	A type	270	31	11.48
5		302	43	14.24	5		300	39	13.00
6		301	37	12.29	6		269	21	7.81
7		270	23	8.52	7		302	21	6.95

表 2 短期热激处理对愈伤组织诱导率的影响

Table 2 The effect of heat shock on the frequency of callus induction

热激处理 时间(h) Hour of heat shock	品种 Cultivar	接种花 药个数 No. of anther inoculated	愈伤组织 形成数 No. of calluses	愈伤组织 诱导率(%) Percentage of callus induction	热激处理 时间(h) Hour of heat shock	品种 Cultivar	接种花 药个数 No. of anther inoculated	愈伤组织 形成数 No. of calluses	愈伤组织 诱导率(%) Percentage of callus induction
0(CK)	湘研 18号	270	15	5.56	0(CK)	洛椒 98	300	18	6.0
12	Xiangyan	300	28	9.33	12	系 A 型	301	27	8.93
24	No. 18	240	22	9.17	24	Luojiao	268	217	10.07
36		271	36	13.28	36	98 strain	302	40	13.25
48		302	52	17.22	48	A type	301	41	13.62
60		298	31	10.40	60		240	22	9.17
72		302	10	3.31	72		271	12	4.32

当超过 60 h 后,诱导率反而低于对照。以 48 h 处理效果最好,湘研 18 号诱导率达 17.22%,洛椒 98 系 A 型达 13.62%。认为,短期热激处理的诱导率略高于低温预处理的效果

2.3 低温预处理与短期热激处理相配合对愈伤组织诱导率的影响

从表 3 看出,单独进行低温预处理或短期热激处理均比对照有利于愈伤组织的形成。将低温预处理和短期热激处理相配合后,也有利于诱导

率的提高。同时可以看出,配合后湘研 18号诱导率 (17. 4%) 低于单独热激处理的诱导率 (18. 33%), 而洛椒 98 系 A 型的诱导率 (14. 76%) 稍高于单独热激处理的诱导率 (13. 42%),但二者都高于低温预处理的诱导率。

表 3 低温预处理与短期热激处理相配合对愈伤组织诱导率的影响
Table 3 The effect of the combination of lower temperature pretreatment on with heat shock on the frequency of callus induction

处 理 Treatment	品种 Cultivar	接种花 药个数 No. of anther inoculated	愈伤组织 形成数 No. of calluses	愈伤组织 诱导率 (%) Percentage of callus induction	处 理 Treatment	品种 Cultivar	接种花 药个数 No. of anther inoculated	愈伤组织 形成数 No. of calluses	愈伤组织 诱导率 (%) Percentage of callus induction
1(CK)	湘研 18号	240	15	6. 25	1(CK)	洛椒 98	271	19	7. 01
2	Xiangyan	300	46	15. 33	2	系 A 型	271	31	14. 44
3	No. 18	302	55	18. 33	3	Luojiao 98	298	40	13. 42
4		270	47	17. 40	4	strain	298	44	14. 76
5		300	32	10. 67	5	A type	300	28	9. 33

注: Note 1.取花药接种按常规条件培养 Cultivated as the normal method; 2.将花蕾经 5 d 0~ 4℃ 低温预处理后接种 0~ 4℃ , 5 d lower temperature pretreatment on buds before inoculating; 3.接种后经 32℃ 48 h 的热激处理 32℃ 48 h heat shock after inoculating; 4.先将花蕾进行 0~ 4℃ 5 d 低温预处再接种后经 32℃ , 48 h 的短期热激处理 0~ 4℃ , 5 d lower temperature pretreatment on buds before inoculating then 32℃ 48 h heat shock after inoculating; 5.先将花蕾进行 0~ 4℃ 5 d 的低温预处理,接种后再进行 48 h 0~ 4℃ 低温处理 0~ 4℃ , 5 d lower temperature pretreatment on buds before inoculating then 0~ 4℃ 48 h lower temperature treatment after inoculating.

3 讨 论

低温预处理有利于花药培养的事实在禾本科作物中已有报道^[3]。本实验表明,这种处理方法也有利于辣椒花药愈伤组织的形成。其主要原因有两方面: (1)低温预处理后显著延长了花药壁退化的时间,同时,在花药壁中积累了大量的淀粉,为花粉的进一步生长发育提供了物质基础^[5]。(2)低温预处理也延长了花粉的退化时间,促进了花粉的起动和去分化,提高了花粉发育的百分率^[5]。

热激处理在花药 (花粉)培养中对诱导小孢子细胞分裂和胚胎发生具有决定性的影响^[6~ 8]。热激处理之所以有利于花药培养,主要是热激能引起编码高分子量蛋白基因的转录。同时热激后出现在胚性小孢子中的一些 m R N A,特别是编码高分子量蛋白质的 m R N A,在培养前的新鲜花药 (小孢子)中不存在或含量很低。热激蛋白对细胞增殖具有重要功能,对细胞周期也具有调节作用,还可能中断配子体 (花粉)发育途径,同时,在热胁迫作用下进入孢子体发育途径。

低温预处理与热激处理相配合,虽然愈伤组织的诱导率均高于对照和单独的低温预处理的诱导率,但在湘研 18号上低于热激处理的效果,在洛椒 98系 A型上则高于热激处理的效果。这一结果是否说明低温预处理与热激胁迫效应之间存在叠加或拮抗作用,尚需进一步研究。同时该实验

也表明,辣椒花药培养中单独进行低温预处理或热激处理,均可明显提高辣椒花药愈伤组织诱导率,且热激处理的效果略好于低温预处理的效果。低温预处理和热激处理配合使用对提高花药愈伤组织的诱导率效果不明显。

参 考 文 献:

[1] 王纪芳,金波.蔬菜组织培养[M].上海:上海科学技术出版社,1983. 19~ 20.
[2] 欧阳俊闻.小麦花药培养研究进展[A].胡含,王恒立.植物细胞工程育种[C].北京:北京工业大学出版社,1990. 1~ 5.
[3] 卢良恕.中国大麦学[M].北京:中国农业出版社,1996. 243 ~ 250.
[4] 曹鸣庆,刘凡.芸薹属 (*Brassica*)蔬菜游离小孢子培养研究进展[A].园艺学年评[C].北京:科学出版社,1996. 72~ 74.
[5] 刘公社,李岩,刘凡,等.高温对大白菜小孢子培养的影响[J].植物学报,1995, 37: 140~ 146.
[6] Phippen C, Ockendon D J. Genotype, plant, bud size and media affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* Var. botrytis) [J]. Theor Appl Genet, 1990, 79: 33~ 38.
[7] Pechan P M, Bartels D, Brown DCW, et al. Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* Microspore embryogenesis [J]. Plant, 1991, 161~ 165.
[8] 王成社,邹淑芳,李景琦,等.小麦花培苗化学越冬技术研究[J].西北农业学报,1999, 8(3): 53~ 55.
[9] 张海,易永华,左田夫,等.提高棉花花药愈伤组织诱导率的研究[J].西北农业学报,1998, 7(3): 1~ 3.
[10] 马锋旺,李嘉瑞.山桃原生质体培养再生愈伤组织[J].西北农业学报,1999, 8(3): 73~ 76.