

# 不同培养基对辣椒花药培养的影响

张 茹, 魏兵强, 陈灵芝, 王兰兰

(甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以 6 个辣椒品种为试材, 采用正交试验, 研究不同培养基, 添加不同浓度的 NAA、6-BA, 采取不同低温处理时间对辣椒花药培养愈伤组织诱导率的影响。结果表明, 甜椒类型愈伤组织诱导率较辣椒类高, MS 培养基添加 0.50 mg/L NAA 及 0.50 mg/L 6-BA、低温处理 48 h 的诱导效果最为显著。

**关键词:** 辣椒; 花药培养; 愈伤组织; 培养基

**中图分类号:** S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)07-0025-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.07.009

## Effects of Different Media on Cultured Anther of Pepper (*Capsicum annuum* L.)

ZHANG Ru, WEI Bingqiang, CHEN Linzhi, WANG Lanlan

(Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** Using orthogonal experiment, six pepper varieties (*Capsicum annuum* L.) are selected as materials, the effects of different media on cultured anther of pepper are studied, which pepper varieties, culture medium, two kind of plant growth regulator NAA, 6-BA and treatment time in low temperature. The result shows that the effect of NAA is better than others among the five factors, the effects of sweet pepper are better than others pepper varieties, MS medium is fit for anther culture, the processing time is 48 hours in 4 °C.

**Key words:** Pepper; Anther culture; Callus; Medium

相对于光皮辣椒类型, 皱皮型辣椒(亦称螺丝椒)果皮角质薄、果实较长、果肉味道鲜香, 符合西北市场消费习惯, 深受消费者青睐。近年来, 随着皱皮辣椒的推广, 南方及东北地区种植面积也逐渐扩大。目前主栽的皱皮辣椒品种多为 F<sub>1</sub> 代杂交种, 其产量高, 适应性强, 杂种优势明显。然而随着辣椒产业的发展, 国内外市场竞争日益加重, 对品种的要求越来越高, 市场针对性越来越强。为了加快皱皮辣椒育种进程, 提高育种效率, 选育出强优势组合, 利用花药和小孢子培养方法是优势育种最为理想的手段之一<sup>[1]</sup>。

不同培养基对不同材料花药培养效果的影响十分显著<sup>[2]</sup>。在辣椒单倍体诱导中, 采用的培养基主要有 C<sub>p</sub>、MS、N、NLN、B5、MS 等<sup>[3-4]</sup>。Lantos 等采用 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<sup>[5-6]</sup>。在相同的培养条件下, 不同基因型辣椒的单倍体诱导率有很大差异<sup>[7-8]</sup>, 适于甜椒花药培养的培养基不一定适于辣椒的花药培养, 适于光皮辣椒花药培养的培养基不一定适于皱皮辣椒的花药培养。我们采用 4 种常用培养基、6 种不同基因型辣椒(甜椒、光皮辣椒、皱皮辣椒)作为供试材料进行花药培养试验, 以期对辣椒花药培养寻找快捷便利的方法与再生培养体系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试辣椒类型及来源见表 1。

#### 1.2 试验方法

试验于 2012 年在甘肃省农业科学院兰州试验地进行。1 月 25 日播种, 3 月 28 日定植于塑料大棚, 正常管理。5 月于初花期开始时对各基因型材料混合取样。取样时间为 7:00 ~ 8:00 时或 17:00 时

收稿日期: 2015-04-23

基金项目: 农业部园艺作物学与种质创制学科群西北地区蔬菜科学观测实验站项目(2015-A2621-620321-G1203-066); 兰州市科技计划项目(2011-1-152); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项(2013GAAS32)

作者简介: 张 茹(1978—), 女, 甘肃兰州人, 副研究员, 博士, 主要研究生物技术在蔬菜育种中的应用。联系电话: (0)13609395567。E-mail: chouruer@163.com

表 1 供试辣椒类型及来源

| 编号 | 类型       | 来源 |
|----|----------|----|
| M1 | 甜椒       | 山西 |
| M2 | 甜椒       | 安徽 |
| M3 | 甜椒       | 上海 |
| M4 | 牛角椒 (皮光) | 北京 |
| M5 | 羊角椒 (皮皱) | 甘肃 |
| M6 | 羊角椒 (皮皱) | 甘肃 |

以后,采集萼瓣比接近为 1 的花蕾(小孢子处于单核靠边期)。将采集的样品带回实验室,于 4℃低温预处理 48 h。将样品用自来水冲洗 20 min,再经 70%酒精浸泡 20 s 后用 1%的升汞浸泡 10 min,无菌水冲洗 3~4 次。无菌条件下,将花药接种于培养基上。将接种好的培养皿放入 35℃的恒温培养箱中黑暗培养 8 d,以 25℃的恒温培养箱中黑暗培养 8 d 为对照。再转入光照培养箱中暗培养至有胚状体长出,培养条件为温度白天(25±0.5)℃、夜晚(23±0.5)℃,光照度 15 lx,光照 16 h/d。当花药分化出幼小胚状体时,将胚状体接种到无激素培养基中,进一步分化成苗。

采用正交试验  $L_{24}(6^1 \times 4^4)$  设计,试验因素及水平见表 2,每组试验接种花药 100 枚。

表 2 试验因素及水平

| 因子水平 | A(材料) | B(培养基) | C(6-BA)<br>(mg/L) | D(NAA)<br>(mg/L) | E(低温处理)<br>(h) |
|------|-------|--------|-------------------|------------------|----------------|
| 1    | M1    | MS     | 0.10              | 0.10             | 0              |
| 2    | M2    | B5     | 0.25              | 0.25             | 24             |
| 3    | M3    | Cp     | 0.50              | 0.50             | 48             |
| 4    | M4    | N6     | 1.00              | 1.00             | 72             |
| 5    | M5    |        |                   |                  |                |
| 6    | M6    |        |                   |                  |                |

### 1.3 数据统计与分析

花药接种培养 40 d 后统计分析各处理辣椒花药形成的愈伤组织诱导率。

愈伤组织诱导率(%)=(愈伤组织产生数/接种

花药总数)×100

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理下愈伤组织诱导率正交试验结果及极差分析

从表 3 可以看出,处理 5、6、4、16、8 组合的愈伤组织诱导率较高,极差分析结果(表 4)表明,各因子对辣椒愈伤组织诱导率大小的影响顺序由大到小依次为是 D、C、A、B、E,相对应的因子依次为 NAA、6-BA、材料、培养基及低温处理。其中供试材料 M2 诱导率高。MS 培养基有较强的普适性(图 1),添加 0.50 mg/L NAA 及 0.50 mg/L 6-BA 的诱导效果最为显著。低温处理的时间为 48 h 为适宜。综合来看,  $A_2B_1C_3D_3E_3$  为该愈伤组织诱导率最高的处理组合。

表 3 不同处理辣椒花药愈伤组织诱导率的正交试验结果

| 处理 | A | B | C | D | E | 愈伤组织诱导率<br>(%) |
|----|---|---|---|---|---|----------------|
| 1  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 16.55          |
| 2  | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 20.98          |
| 3  | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 18.66          |
| 4  | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 26.75          |
| 5  | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 30.18          |
| 6  | 2 | 2 | 1 | 4 | 4 | 28.32          |
| 7  | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 13.20          |
| 8  | 2 | 4 | 2 | 2 | 1 | 26.30          |
| 9  | 3 | 1 | 3 | 4 | 2 | 24.00          |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 1 | 18.50          |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 4 | 17.60          |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 18.90          |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3 | 13.40          |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 20.60          |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 12.50          |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2 | 26.30          |
| 17 | 5 | 1 | 3 | 4 | 2 | 17.80          |
| 18 | 5 | 2 | 1 | 3 | 4 | 23.10          |
| 19 | 5 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3.50           |
| 20 | 5 | 4 | 4 | 2 | 1 | 13.20          |
| 21 | 6 | 1 | 4 | 2 | 3 | 8.30           |
| 22 | 6 | 2 | 3 | 1 | 4 | 11.40          |
| 23 | 6 | 3 | 2 | 4 | 1 | 4.50           |
| 24 | 6 | 4 | 1 | 3 | 2 | 8.60           |

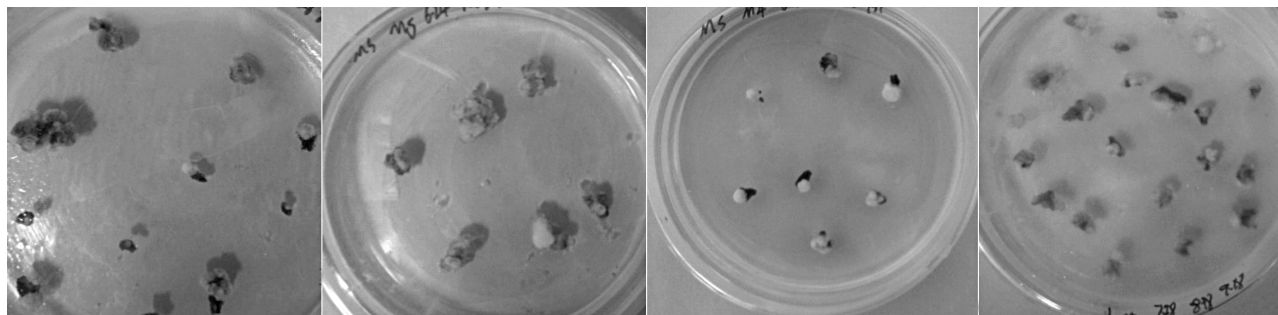


图 1 MS 培养基上形成的花药愈伤组织

表 4 不同处理辣椒花药愈伤组织诱导率的极差分析

| K <sub>j</sub> | A    | B    | C    | D    | E    |
|----------------|------|------|------|------|------|
| K1             | 65.4 | 65.2 | 71.8 | 11.4 | 59.8 |
| K2             | 76.3 | 62.8 | 43.4 | 86.7 | 62.4 |
| K3             | 73.7 | 58.7 | 72.6 | 92.3 | 66.7 |
| K4             | 63.5 | 60.3 | 67.9 | 76.8 | 63.1 |
| K5             | 34.5 |      |      |      |      |
| K6             | 28.9 |      |      |      |      |
| R              | 5.82 | 3.14 | 6.18 | 22.8 | 2.76 |

## 2.2 不同处理下愈伤组织诱导率的方差分析

方差分析及新复极差测验多重比较结果(表 5、6)表明,因子 D 与其余各因子之间差异达极显著水平;因子 C 与因子 A 差异显著,与因子 B、因子 E 差异极显著;因子 A 与因子 B 差异显著,与因子 E 差异极显著;因子 B 与因子 E 差异显著。

表 5 不同处理辣椒花药愈伤组织诱导率的方差分析

| 变异来源 | 平方和    | 自由度 | 均方     | F     | 显著水平   |
|------|--------|-----|--------|-------|--------|
| 处理间  | 419.31 | 4   | 104.83 | 83.07 | 0.0001 |
| 处理内  | 6.31   | 5   | 1.26   |       |        |
| 总变异  | 425.62 | 9   |        |       |        |

表 6 辣椒花药愈伤组织诱导率新复极差测验多重比较

| 因子 | 均值    | 5%显著水平 | 1%极显著水平 |
|----|-------|--------|---------|
| D  | 29.18 | a      | A       |
| C  | 21.20 | b      | B       |
| A  | 17.55 | c      | BC      |
| B  | 14.50 | d      | CD      |
| E  | 10.05 | e      | D       |

## 3 小结与讨论

1) 研究表明,在辣椒花药培养中,影响愈伤组织诱导率的因子由大到小依次为 NAA、6-BA、基因型、培养基及低温处理。其中,甜椒类型诱导率较辣椒类型高,MS 培养基中添加 0.50 mg/L NAA 及 0.50 mg/L 6-BA 适合辣椒花药培养,有较强的普适性;低温处理 48 h 的诱导效果最为显著。

2) 辣椒花药培养因培养基的种类、辣椒基因型、激素的配比以及培养条件的不同,一直是众多学者研究的重点内容<sup>[9-10]</sup>。培养基的选择对于辣椒花药培养十分重要。现已报道的适宜辣椒花药培养的培养基有 NTH、N6、Cp 培养基等<sup>[11-12]</sup>,但是这些培养基较 MS、B5 等培养基配方复杂,使用范围窄,因此,利用 MS、B5 等常用培养基摸索培养条件,对简化培养条件、提高培养效率,加速辣椒花药培养的步伐有着重要意义<sup>[13]</sup>。本研究中,MS 培养基就表现出良好的效果,诱导率高于其他培养基,这可能与本试验中的操作、供试

材料基因型的选择有关。

3) 花药培养过程中在培养基中添加适当浓度的激素,能够促进愈伤组织和胚状体的形成。本研究采用的 NAA 对辣椒花药培养中愈伤的形成具有明显的作用,并且 NAA 与 6-BA 有着较好的协同作用,在二者的共同作用下,辣椒花药愈伤有着较高的发生频率。NAA 与 6-BA 的浓度不宜太大,都为 0.5 mg/L,这与其他研究人员结论一致<sup>[14]</sup>。激素对辣椒花药培养的影响为极显著,选择激素的种类及用量对辣椒花药培养中愈伤组织和胚状体的形成极为重要。

4) 辣椒的基因型也是影响辣椒花药培养的因素之一。辣椒花药培养研究的初期,研究者认为甜椒类型较辣椒类型的培养率高,但随着研究方法的进步与深化,辣椒类型的诱导率有明显提高。低温处理可在一定程度上延缓小孢子退化,提早雄核发育,并增加参与雄核发育小孢子的比率,从而有利于愈伤组织的发生。将辣椒花蕾进行不同时间段的低温处理以便提高诱导率。本研究表明,经过 48 h 的低温处理,大大提高了花药愈伤组织的形成,这与他人研究结果相同<sup>[15]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 陈斌,耿三省,张晓芬,等. 辣椒单倍体培养研究进展[J]. 长江蔬菜, 2007(12): 36-41.
- [2] 张树根,沈火林,蒋钟仁,等. 辣椒花药培养单倍体育种技术研究进展[J]. 辣椒杂志, 2006(3): 1-6.
- [3] 王立浩,张宝玺. 辣椒花药培养研究进展[J]. 中国蔬菜, 2001(3): 52-53.
- [4] 杨博智,周树栋,张竹青,等. 不同培养基和激素对辣椒花药培养的影响[J]. 湖南农业大学学报, 2009, 35(1): 61-64.
- [5] LANTOS C, JUHÁSZ A G, VÁGI P, et al. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Plant Biotechnology Report, 2012(6): 123-132.
- [6] 张正海,毛胜利,王立浩,等. 辣椒单倍体离体诱导及育种应用[J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1 715-1 726.
- [7] NOWACZYK P, NOWACZYK L, OLSZEWSKA D, et al. Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *C. chinense* Jacq. Hybrids[J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31: 877-879.
- [8] NOWACZYK P, OLSZEWSKA D, KISIALA A. Individual reaction of *Capsicum* F2 hybrid genotypes in anther cultures[J]. Euphytica, 2009, 168: 225-233.

# 低温胁迫下梨枝条电解质外渗与抗寒力相关性分析

王 玮, 李红旭, 曹素芳, 赵明新

(甘肃省农业科学院林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以一年生梨苗休眠枝条为试材, 应用电导仪测定梨品种黄冠、玉露香在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温下分别处理12、24、36、48、60 h的电解质外渗率的变化, 并与低温处理下的冻害级别进行相关性分析。结果表明, 随着处理温度的降低及处理时间的延长, 2个梨品种的电解质渗出率变化呈“S”型曲线,  $-20$ 、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温对梨枝条细胞伤害尚属于可逆的自我保护阶段, 在一定时间段内对低温具有适应能力, 质膜透性的变化不能反映外部形态的变化, 且黄冠梨对低温的自我保护反应要强于玉露香梨。

**关键词:** 低温胁迫; 梨品种; 电解质渗出率; 冻害级别

**中图分类号:** S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)07-0028-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.07.010

## Correlation Analysis of the Pear Branches' Cold Resistance Ability and Electrolyte Leakage under Low Temperature Stress

WANG Wei, LI Hongxu, CAO Sufang, ZHAO Mingxin

(Institute of Fruit and Floriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** In this study, the dormant branches of the pear seedlings with one-year-old branches are selected as materials, using electric conductivity meter, the changes of electrolyte leakage is determined with the branches under the  $-20$ 、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  low temperature and 12、24、36、48、60 hours, and its correlation is analysed with the freezing injured level under the treatment of indoor different low temperature and 12、24、36、48、60 hours. The results shows that the decreasing of treatment temperatures and the prolonging of time, the change of electrolyte leakage showed S-type curve for the two pear cultivars; the pear branches cells is yet belonging to a reversible self-protective stage under the  $-20$ 、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  low temperature, which has ability to adapt to the low temperature during a certain period of time, the change of external morphology can't reflected by the cell membrane permeability. The self-protecting response of Huangguan pear is stronger than Yuluxiang pear.

**Key words:** Temperature stress; Pear varieties; Electrolyte leakage; Freeze injury grades

植物低温胁迫伤害时, 细胞的质膜透性发生改变的生理指标<sup>[1]</sup>。近年, 运用电导法测定梨、苹果、柑橘、枣、葡萄、扁桃、果梅、樱桃、李等果树变, 电解质不同程度外渗, 这种变化可作为抗寒性

**收稿日期:** 2015-03-19

**基金项目:** 国家现代梨产业技术体系(CARS-29-41), 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室(10218020), 甘肃省农业科技创新专项(2011GAAS08)

**作者简介:** 王 玮 (1982—), 男, 甘肃环县人, 助理研究员, 主要从事果树栽培与品种选育工作, 联系电话: (0)15193155170。E-mail: 312290705@qq.com

- [9] 张 芳, 李海涛, 张馨宇. 碳源组分及浓度对辣椒花药培养的影响[J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 341-345.
- [10] 刘广霞, 张晓伟, 蒋武生, 等. 温度及培养基中添加物对辣椒花药培养胚状体诱导的影响[J]. 河南农业科学, 2009(5): 97-100.
- [11] 王立浩, 张宝玺, 郭家珍, 等. 辣椒花药培养中若干影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 199-204.
- [12] 李春玲, 佟曦然, 朱至清, 等. 辣(甜)椒游离小孢子培养中的雄核发育和胚胎发生 [J]. 园艺学报, 2008, 35(11): 1 613-1 620.
- [13] JIYEON KIM, YOUNG SOON KIM, GIBUM YI, et al. Anther culture of transgenic pepper(*Capsicum annuum* L.)[J]. Korean Journal of Breed, 2005, 37(4): 241-246.
- [14] ZHAO JI, ZOU XUOXIAO, ZHANG ZHUQING, et al. Influences of carbon sources and plant growth regulators on anther culture efficiency of pepper [J]. Agricultural Science and Technology, 2010, 11(4): 102-105.
- [15] 刘晓荣, 陶承光, 吕书文, 等. 番茄花药培养的影响因素研究[J]. 河南农业科学, 2008(7): 94-97.

(本文责编: 陈 伟)