

霍霍巴组培快繁技术体系研究

I. 基本培养基与培养条件的优化

徐 进^{1,2}, 王玉珍^{1*}, 罗景兰¹, 刘小京¹

(1 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 河北 石家庄 050021; 2 中国科学院研究生院)

摘要:以霍霍巴为材料, 研究了外植体的消毒、基本培养基、取材部位和培养条件等因素对组培苗生长的影响。结果表明: 采用 0.1% HgCl_2 与 2% NaClO 1:1 混合的消毒合剂处理外植体 8 min, 灭菌成功率 99%; 改良 MS 培养基适合霍霍巴的分化培养; 最适外植体为双腋芽茎段; 培养条件: 温度 25~28 °C, 光照强度 3 000 lx, 光照时间 12~14 h/d, pH 5.5~6.0。

关键词: 霍霍巴; 基本培养基; 培养条件

中图分类号: S759.3⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2004)08-0021-04

Studies on the Technique System of Tissue Culture and Rapid Propagation of Jojoba

I. Selection of Basic Medium and Culture Condition

XU Jin^{1,2}, WANG Yu-zhen¹, LUO Jing-lan¹, LIU Xiao-jing¹

(1 Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences Shijiazhuang 050021, China; 2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences)

Abstract: The key techniques including explants disinfection, basic medium, suitable explant and culture condition were studied. By culturing the stems of Jojoba in vitro, the results showed as that the success percentage of disinfection reached 99% when the explants were treated by 1:1 mixture of 0.1% HgCl_2 and 2% NaClO for eight minutes, the modified MS was suitable for Jojoba micropropagation. The optimal explants were stems with double axillary buds. All the cultures were kept under the temperature of 25—28 °C, light intensity 3 000 lx, light time for 12—14 h/d, and pH 5.5—6.0.

Key words: Jojoba; Basic medium; Culture conditions

霍霍巴 (Jojoba), *Simmondsia Chinensis* (Link), 又称西蒙得木, 属西蒙得木科西蒙得木

属, 为一属一种的多年生常绿灌木或小乔木, 雌雄异株。原产于美国西南部和墨西哥西北部的荒漠

收稿日期: 2004-03-09

基金项目: 河北省国际科技合作计划项目资助 (03390162D)

作者简介: 徐 进 (1973-), 男, 山东青岛人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物细胞工程和基因工程。

* 王玉珍为通讯作者 (wangyz@ms.sjziam.ac.cn)

- [6] 肖凯, 王殿武, 张荣铄, 等. 植物不同器官和植物激素对叶片衰老的影响[J]. 国外农学——麦类作物, 1993, 17(6): 43—48.
- [7] 张明生, 谢波, 谈锋, 等. 甘薯可溶性蛋白、叶绿素及 ATP 含量的变化与品种抗旱性关系的研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 13—16.
- [8] 姜东, 于振文, 李永康, 等. 高产小麦营养器官临时储存物质积运及其对粒重的贡献[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 31—36.

- [9] 龚月桦, 高峻风, 杜伟莉. K 型杂交小麦 901 及其亲本原叶灌溉期的生理特征[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 138—144.
- [10] 于振文, 田奇卓, 潘庆民, 等. 黄淮麦区超高产栽培的理论与实践[J]. 作物学报, 2003, 28(5): 577—585.
- [11] 彭羽, 郭天才, 王晨阳. 冬小麦开花后水分调控对光合性能及产量的影响[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(4): 83—86.

地带,是一种盐生植物。其种子中的霍霍巴油经皂化水解后可以广泛应用于机械、化妆品、食品、燃料和医药工业等,具有极高的经济价值^[1]。我国自 1978 年开始引种,在四川、云南、福建试种成功。霍霍巴通常采用种子实生繁殖,繁殖速度较慢。近年来,由于扦插技术的发展,一定程度上提高了其繁殖率。利用组培快繁的方法,可以不受地区、气候的影响,扩繁速度比常规方法快数万倍。因而能够及时提供大量优质种苗,加速霍霍巴优良品种的繁育。本试验探讨了基本培养基、取材部位和培养条件等因素对霍霍巴组培苗生长的影响,为完善霍霍巴组培快繁体系提供了科学依据,从而为大量扩繁和优良品种的选育奠定了基础。

1 材料与方法

试验于 2003 年 7~12 月在中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心组培实验室进行。供试材料为我所温室内盆栽 2 年生霍霍巴。

1.1 外植体灭菌条件的选择

取 2 年生植株上当年抽出的幼嫩枝条做外植体,去叶后用自来水冲洗 30 min。灭菌滤纸吸干水分,用 75%酒精表面消毒 30 s 后,进行以下 3 组不同消毒剂灭菌处理:Ⅰ、0.1% HgCl₂;Ⅱ、0.1% HgCl₂ 与 2% NaClO 1:1 混合;Ⅲ 0.1% HgCl₂ 与 10% H₂O₂ 1:1 混合。每组各设 6 min、8 min、10 min 3 个时间处理。再用无菌水冲洗 5~6 遍,灭菌滤纸吸干水分。切成 1 cm 大小,带 1 个节的茎段,竖直插入培养基 0.3 cm。每瓶 4~5 个。10 d 后统计污染率和存活率。

1.2 基本培养基的选择

试验旨在确定基本培养基类型,以 WPM、MS、SH、改良 MS[与 MS 的区别在于: NH₄NO₃ 0mg/L, KNO₃ 1 900 mg/L, CaCl₂·2H₂O 0 mg/L, MgSO₄·7H₂O 370 mg/L, KH₂PO₄ 340mg/L, (NH₄)₂SO₄ 400 mg/L, KCl 150 mg/L, Ca(NO₃)₂ 250mg/L, MnSO₄·4H₂O 0.17 mg/L, 其他同 MS] 为基本培养基,附加 6-BA 1 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L。

1.3 培养条件和取材部位的选择

选定了基本培养基后,分别用光强 1 000 ~

5 000 lx,温度 8~38 ℃, pH 5.0~7.0 进行不同环境条件下的培养。剪取幼株的茎尖、单腋芽茎段、双腋芽茎段分别进行诱导分化,以筛选最适宜的外植体。以上均培养 45 d 后统计株高、叶片数和分化数。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌条件的灭菌效果

试验采用了 3 种不同消毒剂对外植体进行灭菌处理。从表 1 看出,利用消毒合剂的效果优于单独使用 HgCl₂。进一步比较可知,利用Ⅱ组处理 8 min 对霍霍巴幼株茎段外植体消毒的效果最好,成功率达 99%。外植体在培养基上生长状况良好,没有出现伤害现象。

表 1 不同消毒剂的灭菌效果比较

处理	消毒时间 (min)	死亡率 (%)	污染率 (%)	成功率 (%)
Ⅰ	6	1	25	74cd
	8	4	4	92ab
	10	35	0	65d
Ⅱ	6	0	16	84bc
	8	1	0	99a
	10	23	0	77cd
Ⅲ	6	0	3	87bc
	8	5	2	93ab
	10	27	0	73cd

注:采用 Duncan 新复极差法进行检验,同一列内不同字母表示达到 0.05 水平显著差异。下同

2.2 不同培养基对芽启动和增殖的影响

基本培养基是植物组织培养的重要基质,由于各种植物的遗传背景、生物学特征不同,因而对营养成分的需求也不同。选择合适的培养基对于组织培养成败至关重要。本试验采用 WPM (NH₄⁺/NO₃⁻=0.68)、MS(NH₄⁺/NO₃⁻=0.5)、改良 MS (NH₄⁺/NO₃⁻=0.16)、SH (NH₄⁺/NO₃⁻=0.10)4 种基本培养基。表 2 表明:在 WPM 培养基上生长的外植体,分化数少,生长状态较差,培养基褐化现象较严重,因此不适合作为霍霍巴的培养基。在 SH、MS 和改良 MS 培养基上的外植体生长状态较好。其中改良 MS 效果优于其他 2 组,褐化率较低。因此,在以后的试验里,均使用改良 MS 作为基本培养基。

表 2 不同培养基对芽启动和增殖的影响

培养基	株高 (cm)	叶数 (个)	启动率 (%)	分化数 (个)	组培苗生长状况
WPM	1. 0b	0. 4c	16c	0. 2c	基本无生长, 褐化严重
MS	1. 6a	3. 6a	79b	0. 9b	生长健壮, 很少出现褐化
SH	1. 5a	3. 9a	84a	1. 0b	生长健壮, 基本无褐化
改良 MS	1. 8a	4. 3a	83a	1. 3a	生长健壮, 叶片厚, 深绿色, 无褐化

2.3 不同取材部位的诱导分化效果

剪取茎尖、单腋芽茎段、双腋芽茎段分别进行诱导分化。试验发现(表 3): 不同外植体, 芽启动需要的时间和出芽数均有不同。双腋芽茎段和茎尖之间无明显差异; 而单腋芽茎段芽启动的时间较晚, 分化能力较低。这可能是由于不同外植体在内源激素和养分含量上的差异造成的。双腋芽茎段由于解除了顶端优势, 所以分化能力提高。

表 3 不同取材部位的 诱导分化效果

项目	茎尖	双腋芽茎段	单腋芽茎段
芽启动时间(d)	23b	21b	35a
分化数(个)	1. 1a	1. 4a	0. 7b

2.4 不同培养条件对分化苗生长的影响

2.4.1 光照强度 试验结果表明(表 4), 当光强为 1 000 lx 时, 分化数少, 且叶片发黄、狭小, 包在节间不能展开, 15%的外植体出现褐化; 随光照强度增加, 分化数明显增多, 叶片增大; 在 3 000 ~ 5 000 lx, 各处理间差异不显著, 植株生长状况较

好, 叶片深绿色。霍霍巴原产地的生活环境阳光充足, 因此, 在霍霍巴组织培养过程中适当增加光照强度, 有利于多芽的形成。

表 4 不同光强对芽分化的影响

光强(lx)	分化数 (个)	平均叶长 (cm)	组培苗生长状况
1 000	0. 5c	0. 2b	15%出现褐化
2 000	0. 9b	0. 3ab	基本无褐化
3 000	1. 3a	0. 35a	无褐化
4 000	1. 6a	0. 35a	无褐化
5 000	1. 4a	0. 39a	无褐化

2.4.2 温度 温度是霍霍巴组织培养中不可忽视的要素之一(表 5)。在 8~15 ℃时, 组培苗生长缓慢, 分化数少, 叶片发黄, 超度含水态现象严重。在适宜温度条件下, 培养物较早进入正常生长, 在 15~25 ℃, 丛生芽生长基本正常; 25~28 ℃生长状态最佳; 35 ℃以上生长减缓, 褐化和污染率都有增加。

表 5 不同培养温度下的芽分化状况

温度 (℃)	分化数 (个)	芽高 (cm)	污染率 (%)	组培苗生长状况
8~15	0. 5c	1. 0b	3. 8d	生长缓慢, 叶片发黄, 42%超度含水态
15~25	1. 0b	1. 5a	6. 0c	生长健壮, 叶片深绿色
25~28	1. 2a	1. 7a	9. 6c	生长健壮, 叶片深绿色
28~35	1. 4a	1. 7a	16. 0b	生长健壮, 叶片深绿色
35~38	1. 0b	1. 8a	35. 0a	生长减缓, 33%褐化

2.4.3 pH pH 值直接影响到植物对离子的吸收, 因此, 对霍霍巴组培苗生长有显著影响(表 6)。pH 值低于 5.3 时, 外植体分化数较低, 培养 20d 左右, 超度含水态比例升高; 由于在低 pH 值条件下培养基常会出现软化, 增加了接种操作的难度, 导致污染加重, 影响了外植体的生长和分化。pH 值 7.0 时, 生长减缓, 叶片出现黄化或颜色加深, 褐化率升高。以 pH 值 5.5~6.0 的处理最优。

表 6 不同 pH 值对外植体生长的影响

pH	分化数 (个)	芽高 (cm)	组培苗生长状况
5. 0	0. 5c	0. 9c	生长缓慢, 45%超度含水态
5. 3	0. 8b	1. 3b	生长缓慢, 26%超度含水态
5. 5	1. 3a	1. 7a	生长状况良好
6. 0	1. 2a	1. 8a	生长状况良好
7. 0	1. 0b	1. 5b	生长缓慢, 叶片黄化或颜色加深, 19%褐化

3 讨论

1) 试验结果表明, 基本培养基 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值在 0.5 以下时, 霍霍巴芽的分化无显著差异, 而高 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值明显不利于霍霍巴外植体的生长, 提高培养基中 P、K、S 的含量、降低 Mn 的含量, 有利于霍霍巴组培苗的生长, 减少褐化的发生。这可能是由于霍霍巴叶片蜡质, 对磷、钾、硫需求量较高; Mn^{2+} 是参与酚类合成与氧化酶类的组成成分或辅因子, 因而促进褐化的发生。

2) 超度含水态(玻璃化)是霍霍巴组织培养中最常见的问题。由于超度含水态苗的生长发育停止, 生理活性降低, 引起生根率和移栽成活率明显降低。研究发现: 0.5 cm 以下的外植体, 超度含水态的比例较高; 大于 1 cm 的外植体, 超度含水态的比例明显降低。这可能是由于较大外植体的分生组织远离培养基表面, 使其生长环境的水分状况得到改善。温度低于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 pH 值低于 5.0 时, 超度含水态比例明显升高; 培养瓶的通气状况越好, 组培苗超度含水态的比率越低。因此, 选用通气性较好的封口材料可以有效减少超度含水态的发生。低 pH 值使培养基出现软化, 增加

了培养基中的水势, 使培养容器内相对湿度过高, 从而导致超度含水态的发生。

3) 蔗糖作为碳源, 除为细胞生命活动提供能源外, 在培养基中还起着维持一定渗透压的作用。试验表明, 蔗糖浓度与霍霍巴组培苗的超度含水态发生率呈极显著负相关。

参考文献:

- [1] 张根发, 高晓光, 梁前进, 等. “好好芭”种子实生苗茎节无性系建立及其遗传差异[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2000, 36(1): 101—105.
- [2] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 456—465.
- [3] 李云. 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究[J]. 北京林业大学学报, 1996(1): 52—57.
- [4] P A Roussos, A Tolia-Marioli, C A Pontikis, et al. Rapid multiplication of Jojoba seedlings by in vitro culture[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1999, 57(2): 133—137.
- [5] D Mills G Zhang, A Benzioni. Effect of different salts and of ABA on growth and mineral uptake in Jojoba shoots grown in vitro[J]. Journal of Plant Physiology, 2001, 158(8): 1 031—1 039.

2003 ~ 2004 年度国家黄淮海区小麦区域试验总结会在江苏淮安召开

2003~2004 年度国家黄淮海区小麦区域试验总结会于 2004 年 7 月 25~27 日在江苏省淮安市召开。来自中国农科院的有关专家、黄淮海区南片和北片水地区域试验承试单位、育种单位、种子企业等约 120 人参加了会议。会议由国家黄淮海区小麦区域试验主持单位河南省农科院小麦所主办, 江苏省徐淮地区淮阴农科所承办。

会议由河南省农科院小麦所赵虹研究员主持, 全国农技服务中心良繁区试处邱军同志、江苏省种子站周春和站长作了重要讲话。会议在公平、公正、科学、高效的原则下对品种进行了合理评价, 认为黄淮南片中间试验中表现较好的小麦新品系有: 周麦 18、新麦 9408(强筋)、郑麦 004、矮抗 58、泛麦 5 号、皖宿 9908、中原 98—68、濮麦 9 号、豫农 949、郑育麦 029、豫麦 34—6(强筋)、周麦 17、郑农 16(强筋)、郑麦 005(强筋)、阜阳 936、徐州 954 等。黄淮北片中间试验中表现较好的品系有泰山 9419、98—5229、988044、冀优 9409(强筋)、济麦 20(强筋)、泰山 269、衡 7228、石 20—7221、烟农 19 等。

会议还邀请区试鉴定评价、育种方面的专家作了学术报告, 就如何改进区域试验质量、提高鉴定和品种评价水平等进行了研讨和培训。

会议沟通了品种鉴定单位与农技推广部门及育种家与企业之间的联系, 促进了省际间的品种交流, 在引导黄淮海区小麦品种合理布局与利用、企业经营、小麦品种选育等方面起到了重要作用。

(本刊讯)