

霍霍巴组培快繁技术体系研究

II. 分化和生根培养中的激素配比

徐进^{1,2}, 王玉珍^{1*}, 罗景兰¹, 刘小京¹, 刘香玲^{1,2}

(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:研究了霍霍巴茎段初代培养、继代培养和生根培养3个技术环节的激素配比。结果表明:以改良MS为基本培养基,初代培养的激素配比以6-BA 2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L+IBA 0.05 mg/L为宜,诱芽率100%,增殖系数4.9;在继代培养中,若用单激素6-BA, 1mg/L时即可维持较高的增殖系数(7.8);如用2 mg/L 6-BA和0.5 mg/L GA₃,增殖系数达8.3,可见低浓度GA₃和6-BA组合可以促进霍霍巴多芽的分化;使用6-BA的浓度不宜超过3 mg/L,因为较高的细胞分裂素明显增加了组培苗超度含水态的比率;以改良1/2MS为基本培养基,生根培养的激素配比为3 mg/L NAA+1.5 mg/L IBA+0.5 mg/L IAA,培养20 d时的生根率达83%。

关键词:霍霍巴;组织培养;快速繁殖;激素配比

中图分类号:S759.3⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-3268(2004)11-0022-04

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

II. Various Hormone Combinations in the Differentiation and Rooting Culture

XU Jin^{1,2}, WANG Yu-zhen^{1*}, LUO Jing-lan¹, LIU Xiao-jing¹, LIU Xiang-ling^{1,2}

(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: Studies on hormone combinations of 3 kinds of cultures including primary culture, sub-culture and rooting culture in the micropropagation method of jojoba showed that the axillary buds of nodal segments were induced to proliferation on modified MS medium supplemented with 2 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L GA₃ and 0.05 mg/L IBA. On an average, 4.9 shoots were formed per original explant in the initial cultures. The number of shoots in subsequent culture reached 7.8 on 1 mg/L 6-BA-containing medium. If using the combination of 2 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L GA₃, the multiplication coefficient reached 8.3. It indicated that 6-BA combining with low concentration of GA₃ promoted the shoots propagation. 6-BA shouldn't exceed 3 mg/L, because high concentration of cytokinin enhanced the ratio of hyperhydricity. After culture for 20 days on the 1/2 modified MS medium supplemented with 3 mg/L IBA, 1.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L IAA, about 83% of the shoots had developed roots.

Key words: Jojoba; Tissue culture; Rapid propagation; Hormone combination

霍霍巴[*Simmondsia Chinensis* (Link)] 是一种具有极大经济价值和发展潜力的木本油料经济

作物^[1]。在霍霍巴的引种栽培和推广中,组培技术的研究和完善有越来越重要的作用。有关霍霍

收稿日期:2004-06-26

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,研究方向:植物细胞工程和基因工程。

通讯作者:王玉珍

巴成年植株和实生苗的茎尖繁殖国内外已有报道^[1,3]。郑若仙(1989)报道了 6-BA 和 GA₃ 对多芽增殖的促进作用^[1]；V. Agrawal(2002)采用 MS 培养基附加 6-BA (20 μmol/L) 进行分化培养, 启动率为 11.5%, 增殖系数 2.7±0.4, 继代培养的增殖系数达 4.7±2.0, 采用两步生根法, 生根率达 85%^[3]。笔者在研究霍霍巴组培快繁体系中关于外植体的消毒、基本培养基、适宜的取材和培养条件等组培苗工厂化生产关键技术的基础上^[4], 对霍霍巴茎段初代培养、继代培养和生根培养中的激素配比进行了研究, 旨在探讨霍霍巴组培苗增殖和一步生根的方法, 提高分化数和生根率, 缩短生根时间, 初步建立霍霍巴组培快繁技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

取 2 年生植株上当年抽出的嫩枝做外植体, 去叶后用自来水冲洗 30 min。灭菌滤纸吸干水分, 75%酒精表面消毒 30 s 后, 用 0.1% HgCl₂ 与 2% NaClO 1:1 混合消毒剂处理材料 8 min。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, 竖直插入培养基中。

1.2 分化和生根培养

初代和继代培养: 分别以改良 MS 为基本培养基, 添加不同配比的 KT(6-糠基嘌呤, 0.5~2.0 mg/L)、ZT(玉米素, 1.0~4.0 mg/L)、6-BA(6-苄基氨基嘌呤, 1.0~4.0 mg/L)、GA₃(赤霉素, 0.5~1.5 mg/L)、IBA(吲哚丁酸, 0.05~0.2 mg/L), 蔗糖 30 g/L, LH(水解乳蛋白) 400 mg/L, 肌醇 500 mg/L, 琼脂 6 g/L, pH 6.0。培养 45 d 后统计芽启动率和分化数。

生根培养: 以改良 1/2 MS 为基本培养基, IBA(吲哚丁酸, 1.0~2.0 mg/L)、IAA(吲哚乙酸, 0.5~1.5 mg/L)、NAA(萘乙酸, 1.0~3.0 mg/L) 为参试因子, 进行三水平处理, 采用 L₉(3³) 正交试验方案进行激素种类及浓度的配比试验, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6 g/L, pH 6.0。培养 10 d 后开始统计生根状况。以上每处理接种外植体 10 块, 3 次重复。

1.3 培养条件

光照强度 3 000 lx, 光照时间 12~14 h/d, 温

度 25~28 ℃, pH 5.5~6.0。

2 结果与分析

2.1 初代培养

2.1.1 激素的不同种类、浓度对多芽苗启动和增殖的影响 激素种类对霍霍巴潜在腋芽的启动及多芽增殖的效果有很大区别。KT、ZT 和 6-BA 3 种细胞分裂素在一定浓度范围内, 都可以启动和促进霍霍巴多芽苗的分化(表 1), 但使用 KT 的效果不明显。单独使用 6-BA 或 ZT, 在 1~3 mg/L 浓度范围内对多芽的启动和增殖都有显著促进作用, 但作用程度不同。使用 6-BA 时芽的分化数比 ZT 略高。当 6-BA 或 ZT 浓度达 3 mg/L 时, 超度含水态比率明显增加, 叶片和嫩梢变形, 6-BA 可达 45%, ZT 达 62%。综合分析, 使用 2 mg/L 6-BA 效果最好。

表 1 初代培养中激素种类和浓度对芽启动和增殖的影响

激素	浓度 (mg/L)	芽启动率 (%)	分化数 (个)	备注
KT	0.5	35	1.0	
	1.0	55	1.5	
	1.5	44	0.6	
	2.0	43	0.4	
ZT	1.0	96	2.2	
	2.0	99	2.6	
	3.0	98	3.0	62% 出现超度含水态
	4.0	97	1.8	72% 出现超度含水态
6-BA	1.0	97	2.8	
	2.0	98	3.0	
	3.0	98	2.4	45% 出现超度含水态
	4.0	96	1.5	60% 出现超度含水态

2.1.2 不同激素对比对多芽苗启动和增殖的影响 为进一步探求 6-BA、GA₃ 和 IBA 3 种激素组合对多芽苗启动和增殖的影响, 进行了双激素和三激素的组合试验(表 2), 结果表明: ①GA₃ 浓度为 0.5 mg/L 时, 与 1~3 mg/L 6-BA 配合使用, 芽分化数随 6-BA 浓度的升高而显著增加。但是超度含水态的比率也随之升高。可见, 6-BA 对霍霍巴多芽诱导和分化起至关重要的作用; 加入低浓度 GA₃ 对多芽形成有促进作用。②6-BA 浓度为 1 mg/L 时, 与 0.5~1.5 mg/L GA₃ 配合使用, 芽分化数随 GA₃ 浓度的升高而显著减少。可见, GA₃ 对腋芽生长的促进作用只能在低浓度范围内起作用, 浓度升高反而会抑制多

芽的形成。这与郑若仙(1989)报道的结果相似。

③三激素组合试验表明:在霍霍巴初代培养中,IBA 浓度不宜超过 0.1 mg/L;6-BA 在 1~3 mg/L 范围内,用量增大对多芽形成有明显促进作用。但提高 6-BA 浓度的同时,IBA 浓度不宜同步增加。当 6-BA 浓度达 3 mg/L 时,超度含水态比率明显增加。综上分析,初代培养的激素配比以 6-BA 2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L +IBA 0.05 mg/L 最好,增殖系数达 4.9。

表 2 不同激素组合在初代培养中对芽增殖的影响			
激素配比 (6-BA :GA ₃ :IBA , mg/L)	分化数 (个)	备注	
1 :0.5 :0	3.2		
1 :1 :0	2.4		
1 :1.5 :0	1.1		
2 :0.5 :0	3.8		
3 :0.5 :0	4.2	25%出现玻璃化	
4 :0.5 :0	3.0	45%出现玻璃化	
1 :0.5 :0.05	3.9		
1 :0.5 :0.1	3.5		
1 :0.5 :0.2	2.0		
2 :0.5 :0.05	4.9		
2 :0.5 :0.1	2.9		
2 :0.5 :0.2	2.8		
3 :0.5 :0.05	5.0	25%出现玻璃化	
3 :0.5 :0.1	3.9	21%出现玻璃化	
3 :0.5 :0.2	3.0	24%出现玻璃化	

2.2 继代培养

2.2.1 激素的不同种类、浓度对多芽苗继代增殖的影响 霍霍巴继代增殖培养对细胞分裂素的要求与初代培养时相似,但浓度有所下降。6-BA 的效果仍优于 ZT,KT 的效果最差。虽然增殖效应仍随 ZT 或 6-BA 浓度升高而上升,但已不如初代培养时明显,1~3 mg/L 内无显著差异(表 3)。当 6-BA 或 ZT 浓度达 3 mg/L 时,超度含

表 3 继代培养中激素种类和浓度对多芽增殖的影响			
激素	浓度 (mg/L)	分化数 (个)	备注
KT	0.5	3.5	
	1.0	3.0	
	1.5	2.4	
ZT	1.0	6.7	
	2.0	7.2	
	3.0	7.3	41%出现超度含水态
6-BA	1.0	7.8	
	2.0	7.4	
	3.0	8.2	35%出现超度含水态

水态比率明显增加。综上分析,使用 1 mg/L 6-BA 效果最好,增殖系数达 7.8。

2.2.2 不同激素对比对多芽苗生长和增殖的影响 6-BA、GA₃ 和 IBA 的双激素和三激素组合试验结果(表 4)表明:①与初代培养时相似,低浓度 GA₃ (0.5 mg/L)与 1~3 mg/L 6-BA 配合使用,增殖系数提高,最多达 8.6。但 6-BA 浓度超过 3 mg/L 时,超度含水态比率明显增加。②三激素组合试验表明,与添加双激素时相比,添加 IBA 对芽增殖已没有显著影响。综上分析,增殖培养的最佳激素组合为:6-BA 2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L。

表 4 不同激素组合对多芽增殖的影响			
激素配比 (6-BA :GA ₃ :IBA , mg/L)	分化数 (个)	备注	
1 :0.5 :0	8.0ab		
2 :0.5 :0	8.3a		
3 :0.5 :0	8.6a	30%出现玻璃化	
1 :0.5 :0.05	8.0ab		
2 :0.5 :0.05	8.2a		
3 :0.5 :0.05	8.5a	30%出现玻璃化	
1 :0.5 :0.1	5.7c		
2 :0.5 :0.1	6.1b		

2.3 生根培养

对正交试验的结果(表 5)进行极差分析可知:在生根培养中,NAA 对生根率的影响最大,IBA 次之,IAA 的影响最小;其生根率与使用相同浓度组合的 IBA、NAA 的试验结果相似,但是添加 IAA 后明显缩短了生根时间(结果未列出)。

表 5 不同激素组合对生根的影响				
处理号	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)	生根率 (%)
1	1.0	1.0	0.5	34
2	1.0	2.0	1.0	51
3	1.0	3.0	1.5	68
4	1.5	1.0	1.0	49
5	1.5	2.0	1.5	60
6	1.5	3.0	0.5	83
7	2.0	1.0	1.5	43
8	2.0	2.0	0.5	73
9	2.0	3.0	1.0	75

即以 IBA 1.5 mg/L+NAA 3.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 组合最佳,生根率达 83%,培养 9 d 时基部膨大,形成淡黄色的愈伤组织,13~15 d 开始生根,形成的根较硬,移栽成活率高。(下转第 69 页)

表 4 不同农药种类对酶的抑制率与植株鲜重的关系

农药种类	酶抑制率 (%)	植株鲜重 (kg)	回归方程	农药种类	酶抑制率 (%)	植株鲜重 (kg)	回归方程
A ₂₁	48.7	0.90	$y = -5.9677x + 53.795$	C ₂₁	62.4	0.55	$y = -6.2227x + 66.056$
A ₂₂	50.0	0.49	$r = -0.9216$	C ₂₂	64.8	0.36	$r = -0.7785$
A ₂₃	52.6	0.30		C ₂₃	64.2	0.21	
A ₂₄	52.7	0.25		C ₂₄	64.9	0.18	
B ₂₁	62.4	0.49	$y = -28.705x + 77.261$	D ₂₁	84.4	0.36	$y = -5.6149x + 92.192$
B ₂₂	70.0	0.31	$r = -0.9624$	D ₂₂	90.1	0.75	$r = -0.3194$
B ₂₃	72.8	0.14		D ₂₃	95.1	0.15	
B ₂₄	74.4	0.11		D ₂₄	93.8	0.12	

注: y 表示酶抑制率, x 为植株鲜重

3 结论与讨论

1) 4 种有机磷农药对酶的抑制率随时间的动态变化, 与农药的种类和农药的使用浓度有很大关系; 在夏萝卜生产中, 敌敌畏、辛硫磷降解速度较快, 但使用时要把浓度控制在推荐浓度以下。

2) 4 种农药对酶的抑制率与植株的叶绿素含量呈正相关性, 表明植株光合作用越强, 植株吸收农药越多, 农药残留越多。

3) 从 4 种农药对酶的抑制率与植株负相关性可以看出: 植株越大, 农药在植株单位面积的分布越小, 即说明鲜重较大的萝卜植株对农药有相对的稀释作用。

4) 4 种农药对酶抑制率动态变化与农药浓度、植株叶绿素含量、鲜重之间交互作用以及其他环境因素(如温度、农药的使用时间等)的关系还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 单正军. 农药的生态环境特性与农药残留[J]. 农药科学与管理, 1999(增刊): 33— 36.

[2] 陈南京. 有机磷农药的危害及其防范[J]. 农业环境保护, 1982, 8(4): 16— 17.

[3] 王恒亮, 张保民, 王兰芝. 酶活性抑制测定农药残毒技术的研究[J]. 河南农业科学, 1997(1): 25— 26.

[4] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 260— 261.

(上接第 24 页)

3 结论

本试验对霍霍巴组培快繁过程中的分化和生根培养的激素种类和配比进行了优化, 找到了适宜的初培养、继代培养和生根培养的激素组合。初步建立起霍霍巴组培快繁技术体系。试验表明: 初代培养的激素配比以 6—BA 2 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L + IBA 0.05 mg/L 为宜, 诱芽率 100%, 增殖系数 4.9; 继代培养中, 若用单激素 6—BA, 1 mg/L 时即可维持较高的增殖系数(7.8)。如用 2 mg/L 6—BA 和 0.5 mg/L GA₃, 增殖系数达 8.3, 可见低浓度 GA₃ 和 6—BA 组合可以促进霍霍巴多芽的分化。使用 6—BA 的浓度不宜超过 3 mg/L, 因为较高的细胞分裂素明显增加了超度含水态的比率; 生根培养的激素配比为

3 mg/L NAA + 1.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L IAA, 18 d 后统计生根率达 83%。

参考文献:

[1] 郑若仙, 李启任. 西蒙得木茎段组织培养中腋芽生长和增殖的激素调节[J]. 天然产物研究与开发, 1989, 1(1): 95— 100.

[2] 杨培君, 陈德经, 赵桦, 等. 蒙花忍冬的组织培养与快速繁殖研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1 304— 1 307.

[3] V Agrawal, S Prakash, S C Gupta. Effective Protocol for in vitro Shoot Production Through Nodal Explants of Simmondsia Chinensis[J]. Biologia Plantarum, 2002, 45(3): 449— 453.

[4] 徐进, 王玉珍, 罗景兰, 等. 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[J]. 河南农业科学, 2004(8): 21— 24.