

多效唑在木薯组织培养中的应用研究

黎萍^{1,2}, 刘连军³, 彭靖茹^{1,2}, 石兰蓉^{1,2}, 李慧敏^{1,2}, 黄秋伟^{1,2}, 黄强^{1,2}

(1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西南宁 530001; 2. 广西木薯研究所, 广西南宁 530001; 3. 广西南亚热带农业科学研究所, 广西龙州 532415)

摘要:以“GR911”木薯的腋芽为外植体,通过无菌培养获得的组培苗为材料,研究经不同浓度多效唑(0、1、2、3、4、5 mg·L⁻¹)与 6-BA、NAA 组合处理对组培苗增殖、生根、壮苗及移栽成活效果的影响。结果表明:多效唑浓度在 3 mg·L⁻¹时,附加 6-BA 浓度 0.2 mg·L⁻¹增殖系数达 3.24,比对照提高 2.18 倍;经多效唑(4 mg·L⁻¹)处理组培苗生长高度达 5~6 cm、生根数 6 根以上时移栽成活率达 87.64%,有利于培育壮苗,从而能提高移栽成活率。

关键词:木薯 GR911;多效唑;组培苗;增殖;移栽

中图分类号:S533;S482.8⁺92

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)10-0061-03

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是世界三大薯类作物(木薯、马铃薯、甘薯)之一^[1]。利用组织培养技术快速繁殖方法可在短时间内获取大量无性系组培苗,对于加速木薯良种繁殖和推广良种有重要意义^[2]。在木薯组培中,由于随着分化倍数和继代次数的增加,组培苗出现退化现象,如叶柄细弱、叶片黄化,在生根阶段细弱黄化的组培苗生根效果差,出瓶后抗逆性差,移栽成活率低,将多效唑应用于木薯组织中可很好地解决这一问题。

多效唑(PP₃₃₃)是一种新型的广谱植物生长延缓剂,其应用于大田生产已取得了明显的增产效果,目前在蔬菜、果树、花生、粮食及其它作物上被广泛应用^[3]。在植物的生长过程中可发挥促进分枝及分蘖,控长矮化,提高叶绿素含量,它对于提高植物抗逆性和壮苗生根等有重要的作用^[4]。除谭凤巧^[5]曾报道多效唑对木薯组培苗有矮化作用外,其它在木薯组培中的应用未见报道。因此,进行了不同浓度的多效唑与 6-BA、NAA 组合处理对木薯组培苗生长的影响以及移栽后成活对比试验,以期在栽培中解决移栽成活率低的问题,探讨多效唑在木薯组织培养中应用的可能性,为

木薯离体快繁大规模生产中的应用提供参 考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

参试品种为广西亚热带作物研究所选育的木薯优良品种 GR911。多效唑为上海亚泰农 资有限公司总代理生产的 15%可湿性粉剂。

1.2 方 法

1.2.1 无 菌 苗 的 培 养 从 室 温 大 棚 取 当 年 生 木薯带有腋芽的嫩枝作外植体,剪去叶片,将茎段两端剪掉,剪成带 1 个腋芽、长 1.5~2.5 cm 的小段,用自来水洗净,在超净工作台上用 75%酒精浸泡 8~10 s,再用 0.1%的升汞消毒 10 min,无 菌水冲洗 4 遍。将已消毒的芽接到 MS+6-BA 1.2 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹培养基上进行不 定芽的诱导,约 30 d 后将不定芽分切出来,转接 到增殖培养基 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹,约 25~30 d 为 1 个周期进行继代培 养,连续继代 2~3 代。

1.2.2 培 养 基 配 制 以 MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+ NAA0.1 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 6.5 g·L⁻¹ 为相同培养基,1~6 号培养基分别附加 0、1、2、3、 4、5 mg·L⁻¹的多效唑,共 6 个处理,其中 1 号为对 照(CK)。

1.2.3 增 殖 培 养 采 用 1.2.1 中 已 继 代 2~3 代、生长势基本保持一致的 GR911 木薯无 菌组培苗,在无菌条件下将其切成带有 1~2 叶 茎段分别接种于 1~6 号培养基,每个处理 100 株,每瓶接 种 5 株,培养基 pH5.8,培养温度为(25±2)℃,

收稿日期:2012-07-13

基金项目:广西科学研究与技术开发计划资助项目(主席科技基金 10169-02);广西科学研究与技术开发计划资助项目(主席基金 09203-03)

第一作者简介:黎萍(1966-),女,广西壮族自治区博白县人, 学士,农艺师,从事生物技术研究。E-mail:lipingx1026@ 163.com。

通讯作者:黄强(1967-),男,广西壮族自治区灵山县人,硕 士,高级农艺师,从事农作物育种与推广研究。E-mail:rzshq @163.net。

光照度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h·d⁻¹,接种 60 d 后统计组培苗增殖倍数、株高、茎粗、生根数及壮苗情况。

1.2.4 炼苗与移栽试验 试验证实 5 号组培苗生长较粗壮,叶片肥厚,根多且长,能提高移栽成活率,继续扩繁 5 号组培苗为下一步移栽做试验。1 号和 5 号组培苗经 3~4 d 炼苗后,洗净根部残留培养基,以 1 号组培苗为对照,5 号组培苗按生长高度、生根数不同分别设置为高度 3~4、4~5、5~6、>6 cm,生根数 4、5、6、6 根以上,然后移栽基质,每项处理 20 个植株、重复 3 次,试验数据于移栽后 30 d 用 Excel 进行数据统计,比较不同等级的苗对移栽成活率的影响,对 3 次重复的试验数据采用 STST 软件进行统计分析。

表 1 不同浓度多效唑对木薯再生苗增殖和生根及壮苗的影响

Table 1 The effects of different paclobutrazol concentrations on proliferation, rooting and seedling of cassava regeneration seedlings

培养基编号 Medium No.	接种株数 Vaccination number	增殖系数 Propagation coefficient	平均株高/cm Average height	平均茎粗/mm Average Stem diameter	叶片形态特征 Leaf morphological characteristics	平均生根数 Average root number	根系形态特征 Root morphology characteristics
1(CK)	100	1.02	>10	0.5	淡绿、短小、薄	2.1	少、细长、黄
2	100	2.18	5.56	1.37	绿、小、薄	3.6	较多、细长、淡白
3	100	2.96	5.52	2.08	浓绿、宽大、肥厚	4.2	多、粗长、乳白
4	100	3.24	5.20	2.25	浓绿、宽大、肥厚	5.6	多、粗长、乳白
5	100	3.12	5.21	2.36	浓绿、宽大、肥厚	5.8	多、粗长、乳白
6	100	3.09	4.93	2.82	浓绿、宽大、肥厚	6.2	最多、粗短、淡白

注:表中数据均为接种 60 d 统计,对照生长高度>10 cm。

Note: The data in the table are statistics of vaccination 60 d, the growth height of the control was more than 10 cm.

根系发达,叶色深绿,出瓶后抗逆性强,移栽成活率高。

2.2 多效唑对木薯组培苗移栽成活率的影响

2.2.1 不同生长高度对多效唑组培苗移栽成活率的影响 从表 2 中可以看出,经多效唑处理后的植株移栽成活率显著高于对照,处理后株高不等的植株生根后对木薯组培苗移栽成活率的影响也不同。株高矮小的植株对外界环境的适应能力较弱,叶片数量增长率低,达不到光合作用的效果^[7],从而影响了移栽的成活率;株高在 5~6 cm 的苗移栽后叶片数量的增长较高,生活力强,移栽成活率也得到提高,平均移栽成活率最高,达 87.64%;株高>8 cm(CK)的苗移栽时萎蔫程度较严重,恢复能力弱,成活率最低仅为 45.25%。

2.2.2 不同生根数对多效唑组培苗移栽成活的

2 结果与分析

2.1 多效唑对木薯再生植株苗生长的影响

多效唑对再生苗的矮壮作用极为明显,经处理的再生植株根茎较对照粗壮,叶片变短、肥厚,叶色深绿,株高明显比对照降低^[6]。随着多效唑浓度的提高,组培苗叶片越来越小和厚,生长速度明显下降(见表 1)。当浓度达到 5 mg·L⁻¹时矮壮效果非常明显,但生长速度越来越慢,影响移栽后生长速度;当浓度达到 4 mg·L⁻¹时再增加多效唑浓度增殖倍数有所下降,在一定浓度范围内,多效唑与 6-BA 配合使用能提高增殖倍数。试验证明,多效唑浓度在 3 mg·L⁻¹时,附加 6-BA 浓度 0.2 mg·L⁻¹增殖倍数达最高;多效唑浓度在 4 mg·L⁻¹时,较适合矮壮作用,生长速度不受影响,

影响 从表 3 可知,经多效唑处理后的植株移栽成活显著高于对照,除对照外生根数 5、6、6 根以上与生根数 4 之间移栽成活率达显著差异,生根数 5、6、6 根以上之间无显著差异,经多效唑处理组培苗移栽成活率随着生根数的增加而提高。其中生根数达 6 根以上时的组培苗移栽成活率最高,为 89.96%,其组培苗根系活力旺盛,幼苗健壮;其次是生根数达 6 根时移栽成活率为 89.13%,对照移栽成活率最低,仅为 40.54%。从试验结果可知,不经多效唑处理组培苗根系较弱、长,苗生长状态较差,显然不能提高移栽成活率,因此,移栽时可选择多效唑浓度在 4 mg·L⁻¹范围生根数达 6 根以上的试管苗,此时根系发达,主茎粗和节间较短,利于移栽时操作,显然能提高移栽成活率。

表 2 不同植株生长高度对组培苗移栽成活率的影响

Table 2 The effect of different plants growth height on survival rate of tissue culture seedlings transplant

植株株高/cm Plant height	株高增长率/% Plant height growth rate	叶数增长率/% Leaf number growth rate	平均移栽成活率/% The average survival rate of transplanting
>8(CK)	2.09	2.56	45.25 c
3~4	1.58	3.12	74.75 b
4~5	1.40	3.98	83.50 a
5~6	1.39	3.45	87.64 a
>6	1.37	3.21	85.53 a

注:不同小写字母表示 0.05 水平上的差异显著性。下同。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level. The same below.

表 3 不同植株生根数对多效唑组培苗移栽成活率的影响

Table 3 The effect of different plant rooting number on survival rate of tissue culture seedlings transplant

植株生根数/根 Plant root number	株高增长率/% Plant height growth rate	叶数增长率/% Leaf number growth rate	平均移栽成活率/% The average survival rate of transplanting
>5(CK)	1.65	2.95	40.54 c
4	1.89	3.13	78.69 b
5	2.08	3.56	88.69 a
6	2.15	3.36	89.13 a
>6	2.58	3.59	89.96 a

3 结论与讨论

试验表明,在木薯组培苗扩繁培养基中加入适宜浓度($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的多效唑与 6-BA 配合使用可提高增殖率,组培苗增殖效果稳定良好,增殖倍数达 3.24,比对照提高 2.18 倍,证明加入多效唑后的配方更具普适性和高效性,同时植株矮化健壮,根系发达。袁展汽等^[8]研究结果也表明,木薯叶面喷施多效唑可抑制木薯地上部生长,使植株矮化,这主要是由于多效唑抑制赤霉素的生成从而抑制细胞伸长,降低了株高^[9],与对照相比,组培苗的适应性和抗性加强,其移栽成活率明显提高,新根萌动快,长势良好。

通过木薯组织培养获得的再生植株,因培养时间与正常生长季节常常不能一致,致使许多再生植株成苗后不能及时移栽而死亡,以至造成人力、物力、财力的浪费,且影响生产^[10]。因此通过加入适宜浓度($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的多效唑控制调整再生植株的生长过程,使其能在正常移栽季节移栽,移栽成活率在 87%左右。

参考文献:

- [1] 沈光. 广西木薯产业的发展前景与对策[J]. 热带农业科学, 2001, 90(2): 24-27.
- [2] 杨美纯, 黄永才, 李斌, 等. 木薯良种“GR911”的组织培养[J]. 广西农业生物科学, 2007, 1(3): 243-246.
- [3] 王东昌. 植物生长调节剂在苹果优势高产技术中的应用[J]. 延边大学农学学报, 2001, 23(1): 13-15.
- [4] 朱金英, 王友平, 张洪勇, 等. 多效唑在无核葡萄组织培养中的应用[J]. 北方果树, 2005(6): 9-10.
- [5] 谭凤巧. 多效唑对木薯试管苗的矮壮作用[J]. 广西热作科技, 1997(1): 46-47.
- [6] 王正询, 段敏妍. 多效唑对香蕉试管苗生长的影响[J]. 植物生理通讯, 1994, 30(5): 346-348.
- [7] 许建兰, 韦军, 俞明亮, 等. Damas1869 李组培苗移栽技术研究[J]. 江苏农业科学, 2009(2): 143-144.
- [8] 袁展汽, 刘仁根, 汪瑞清, 等. 喷施多效唑对木薯产量及生长的影响[J]. 广东农业科学, 2010(2): 13-14.
- [9] 潘远智. 植物生长延缓剂对花卉植物矮化效应的研究[J]. 四川林业科技, 2000, 21(4): 36-40.
- [10] 陈传红, 余志坚, 李荣国, 等. 多效唑在生姜组织培养中的应用研究[J]. 长江蔬菜, 2006(1): 43-44.

兰州大尾羊耳缘组织成纤维细胞系的建立

乔自林^{1,2},冯玉萍¹,李明生¹,关伟军³,冯若飞²,王家敏²,马忠仁¹

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心,甘肃 兰州 730030;2. 西北民族大学/生物工程与技术国家民委重点实验室,甘肃 兰州 730030;3. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所,北京 100193)

摘要:通过物种体细胞培养和长期保存,可在细胞水平上保存珍贵的种质资源。采用组织块培养法培养耳缘组织原代细胞,并通过差速消化和差速贴壁法纯化成纤维细胞并用液氮保存,细胞复苏后进行了活力、形态、生长特性、微生物污染和染色体等检查。结果表明:保存了兰州大尾羊 27 个个体的耳缘细胞,保存的细胞平均复苏活力 97.6%,生长良好,形态呈成纤维型,生长曲线呈“S”型,最大增殖浓度 3.01×10^5 个·mL⁻¹,倍增时间为 26.1 h,细菌、真菌、病毒和支原体检查为阴性,染色体为 $2n=54$,二倍体占 88%。最终,成功培养并保存了兰州大尾羊耳缘组织成纤维细胞,使这一珍贵的种质资源在细胞水平上得以长期保存。

关键词:兰州大尾羊;耳缘成纤维细胞;细胞培养;冷冻保存

中图分类号:S826.89

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)10-0064-05

兰州大尾羊(Lanzhou fat-tailed sheep)属于中国绵羊品种中的长脂尾型,为我国 16 个著名地方绵羊品种之一,主要分布在甘肃省兰州市城关

区、安宁区、七里河区和西固区城市郊区,属城市郊区绵羊品种。近年来,兰州大尾羊的品种特征、特性混杂和退化,存栏数急剧减少,保种工作刻不容缓。兰州大尾羊存栏量从 1981 年的 1.2 万只,下降到 1986 年的 8 000 只^[1-2]。1999 年,兰州大尾羊被国家列为濒临灭绝保护动物。2005 年马月辉^[3]等研究表明该品种灭绝频率为 0.77,居我国北方地区 11 个绵羊品种之首,品种贡献率 10.52%,位居第三,保护潜力值 0.141 9,位居第一。2006 年 6 月,农业部依据《畜牧法》确定兰州

收稿日期:2012-07-12

基金项目:国家自然科技资源共享平台资助项目(2005DKA 21101-29);兰州市科技计划资助项目(2006-2-59)

第一作者简介:乔自林(1976-),男,甘肃省永靖县人,学士,高级实验师,从事动物细胞培养技术和动物细胞生物反应器的研究与教学工作。E-mail:qiaozilin@xbmu.edu.cn。

通讯作者:马忠仁(1962-),男,甘肃省临夏市人,博士,教授,从事动物医学工程研究。E-mail:670267497@qq.com。

Study on Application of Paclobutrazol in Tissue Culture of Cassava

LI Ping^{1,2}, LIU Lian-Jun³, PENG Jing-ru^{1,2}, SHI Lan-rong^{1,2}, LI Hui-min^{1,2}, HUAN Qiu-wei^{1,2}, HUAN Qiang^{1,2}

(1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Research Institute for Subtropical Crops, Nanning, Guangxi 530001; 2. Guangxi Cassava Research Institute, Nanning, Guangxi 530001; 3. South Subtropical Agricultural Scientific Research Institute in Guangxi, Longzhou, Guangxi 532415)

Abstract: Taking the axillary of “GR911” cassava as explant, seedling of the sterile cultivation as materials, the effects on proliferation, rooting, healthy seedling and transplanting survival rate of tissue culture by different concentrations paclobutrazol(0, 1, 2, 3, 4, and 5 mg·L⁻¹) and 6-BA and NAA combination treatments were researched. The results showed that: proliferation coefficient was 3.24 of paclobutrazol 3 mg·L⁻¹ additional 6-BA 0.2 mg·L⁻¹, more than the contrast 2.18 times; The transplant survival rate for 87.64% when tissue culture seedling height reach to 5~6 cm and rooting more than six with paclobutrazol 4 mg·L⁻¹, could promote the breeding of seedling, and increase the survival rate of transplanting.

Key words: GR911 cassava; paclobutrazol; seedling cultivation; proliferation; transplanting