

# 特种油料新作物好好芭 (Jojoba) 组织培养研究进展

耿红卫, 施 璐, 张根发\*  
(北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

**摘要:**概述了好好芭组织培养和植株再生的研究成果以及研究进展。包括培养基及生长调节物质的应用规律, 外植体的获取和处理及转接的方法, 环境因子对克隆苗的影响, 以及移栽环节的做法和不足。探讨了研究中的重点和普遍问题, 并分析了问题产生的可能原因, 指出了研究中的不足, 明确了好好芭组织培养研究的思路及研究方向。

**关键词:**好好芭; 组织培养; 生长调节剂; 锻炼和移栽

**中图分类号:** S565.903.5 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1007-9084(2006)01-0104-05

好好芭(jojoba, 音“hohoba”, *Simmondsia chinensis* (Link) Schndider) 属西蒙得木属的唯一一种, 是雌雄异株常绿多年生灌木, 在良好的生长条件下成年植株高 3m 以上<sup>[1]</sup>。好好芭原产美国西南部和墨西哥北部的索诺门沙漠, 以及加利福尼亚州的拜家地带。分布在北纬 25~30° 和西经 109~117° 范围内, 面积超过了 256 000km<sup>2</sup><sup>[2]</sup>。好好芭由于其种子中所含的特种植物油而受到全世界的瞩目, 其干种子的出油率达 50%~60%, 好好芭油无色无味, 抗氧化能力极强, 未加工的油 97% 以上成分是直链蜡酯(ester), 其中 87% 以上的酯是 20~22 个碳原子的双链, 两条链通过酯键相连<sup>[1,3,4]</sup>。而普通的植物油是 16~18 个碳原子的脂肪酸。好好芭油被称为液体蜡(liquid wax), 其特性是高粘度系数, 高闪点和燃点, 高绝缘性, 高稳定性和高冰点, 这些性质和鲸油极其相似, 使得好好芭的经济价值和市场前景陡然增加, 好好芭油被誉为沙漠“液体黄金”<sup>[5]</sup>。目前好好芭油已经市场化, 主要用于润滑剂, 粘合剂, 食品, 电气绝缘, 化学工业, 药品, 阻燃剂, 以及化妆品等行业<sup>[5,6]</sup>。尤其是化妆品行业<sup>[7]</sup>, 美国已有多家公司专营好好芭化妆品, 含有好好芭油成分的化妆品价格普遍较高。

好好芭树体较小, 单位面积种植需要较多的种苗, 传统的营养繁殖方法可采用扦插<sup>[1]</sup>, 但扦插繁殖效率较低。也可用种子繁殖, 但用种子繁殖有兩

个主要缺陷: 1、好好芭种子繁殖的后代雌雄比例在 1:5 左右<sup>[2]</sup>, 而好好芭栽培的最佳雌雄比是 5~6:1<sup>[8,9]</sup>。此外, 好好芭只有在成年开花后才能判断性别(实生苗开花需 2~4 年), 幼年期没有性别上的形态学特征, 也没有观察到性染色体<sup>[6]</sup>, 因此早期无法判断好好芭植株性别。这极大地限制了种子繁殖。2、好好芭属异花授粉植物, 种子繁殖的后代将出现变异, 优良性状无法保持。因此各国研究者都将目光投向能够快速得到大量无毒且基因型一致苗木的组织培养研究。

## 1 好好芭组织培养的主要成果

好好芭体外繁殖主要通过两种途径实现: 1、快繁: 即通过茎尖或茎节的不定芽的诱导进行试管苗繁殖和扩增, 进一步诱导生根而达到的繁殖方式。该途径不存在脱分化过程, 很少发生变异。2、组织培养植株再生: 诱导外植体脱分化形成愈伤组织, 再经分化的诱导产生再生植株。植株再生的途径有两种: (1) 器官发生(organogenesis): 愈伤组织通过产生不定芽, 形成枝条后再诱导生根, 获得完整再生植株。(2) 体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis): 愈伤组织通过产生体细胞胚的方式再生植株。后者是快速而有效的繁殖方式, 具有更大的发展潜力。体细胞胚是脱分化的体细胞分化形成的, 理论上讲是供体(donor)植株的克隆。

收稿日期: 2005-03-14

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5042012); 农业部 948 资助项目(981026); 国家教育部高等学校骨干教师资助项目

作者简介: 耿红卫(1975—), 男, 博士研究生。

\* 通讯作者: 电话: 010-58809453, E-mail: gfhz@bnu.edu.cn

首次好好芭体外繁殖研究始于 1977 年,之后 Rost 和 Hinchee<sup>[10]</sup>诱导了愈伤组织,用幼嫩茎尖、叶、茎和子叶再生了植株。诱导愈伤组织的 MS 培养基中加入了 2,4-D、NAA 和 IAA 等生长素,以及 IPA、激动素和玉米素等细胞分裂素。随后又有多位研究者用不同的外植体尝试快速繁殖和植株再生,如幼嫩茎尖,多节茎段,单节和双节茎段,叶,茎和子叶,未成熟的合子胚等,迄今为止所获主要成果见表 1。

## 2 组织培养的环境因子

常用的组培室温度是 25 ~ 28℃,也有研究者使用较低的温度(23℃)<sup>[28]</sup>。在 15 ~ 25℃ 之间好好芭的发育基本正常,只是生长速度受影响,高于 35℃ 生长受到抑制<sup>[29]</sup>。室内相对湿度在 60% 左右<sup>[28]</sup>,但大多数研究并未提及湿度值。因为克隆苗是置于密封的大试管或三角瓶中,其中的湿度接近饱和,外界湿度对其影响甚微。近几年来已报道适度通风

表 1 好好芭体外繁殖的形态反应

Table 1 Morphogenic response of *S. chinensis* (jojoba) *in vitro* propagation

外植体	组织状况	培养基	再生	参考文献
茎尖 Shoot tip	幼嫩 Juvenile	MS + 0.5mM NAA + 0.01mg/L Kn	茎和根 Shoots and roots	—
—	—	MS + 0.5mM IBA + 10μM BA	茎尖生长,根初始形成 Shoot growth and root initiation	11
叶 Leaf	成熟 Mature	1、MS + 0.5mM NAA + 0.1mM IPA/0.1mg/L Kn /0.25mg/L Zea	愈伤组织 Callus	10
茎 Stem	—	2、MS + 0.5mM NAA + 0.1mM IPA/0.1mg/L Kn	根 Roots	—
子叶 Cotyledon	幼嫩 Juvenile	1、MS + 0.5mM NAA + 0.5mM IPA/0.5gm/L Zea	愈伤组织 Callus	—
茎尖 Shoot tip	—	2、MS + 0.5mM NAA + 25% CW	根 Roots	—
未成熟的胚	—	MS + 0.5mg/L NAA + 0.1mg/L Zea	根 Roots	—
Immature embryo	—	或 MS + 1.5mg/L IAA + 1mg/L IPA	丛生嫩茎 Multiple shoots	—
未成熟的合子胚	—	1、MS + 0.36mM NAA + 0.23μM IPA/0.01mg/L Zea	—	—
Immature zygotic embryo	—	2、MS + 0.25mM NAA + 0.3mM IPA + 0.5mg/L GA	小植株 Plantlets	—
茎节 Node	四年生盆栽植株 Four year - old potted plants	3、1/2MS + 0.5mM IBA	体细胞胚 Somatic embryos	12
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 15μM BA + 0.5mM NAA + 10μM 2,4 - D	—	13
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 5μM 2,4 - D + 10μM BA	—	13
茎节 Node	幼嫩 Juvenile	MS + 1.5mg/LGA <sub>3</sub> + 1mM NAA	嫩茎大量扩增 Shoot proliferation	14
茎节 Node	成熟 Mature	1、SH + 1.5mM BAP + 0.5mg/L IAA	嫩茎 Shoots	15
茎节 Node	幼嫩 Juvenile	2、SH + 0.5mM IBA + 0.25mM NAA + 1g/L Caffeic acid	小植株 Plantlets	15
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 20μM BA	嫩茎 Shoots	16
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 1mg/L BA	—	17
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 0.5mM IBA + 15μM BA + 0.5% AC	小植株 Plantlets	18, 19
茎节 Node	半木质化 Unentirely lignification	1、MS 或 B <sub>2</sub> + 20μM BA + 0.5mM IBA + 0.5mg/L GA <sub>3</sub>	初始培养 Initial culture	20
茎尖和茎节 Shoot and node	幼嫩 Juvenile	2、MS + 1μM Kn 或 10μM BA、B <sub>2</sub> + 0.5μM Kn 或 5μM BA	嫩茎扩增 Shoot growth	—
茎 Stem	幼嫩 Juvenile	3、1/2MS + 0.5mM IBA 或 B <sub>2</sub> + 0.5mM IBA	根 Roots	—
叶 Leaf	幼嫩 Juvenile	改良 DKW + 26.6μM BA + 3mg/L AgNO <sub>3</sub>	嫩茎 Shoots	21
种子 Seed	—	改良 DKW + 98.4μM IBA + 107.4μM NAA	根和植株 Roots and plantlets	21
茎节 Node	成熟 Mature	1/2MS + 0.5mM IBA + 0.1mM 或 0.015mM CD	茎、根、植株 Shoots, roots and plantlets	22
茎节 Node	幼嫩 Juvenile	1/2MS + 3.16μM 2,4 - D + 1.33μM BA + 1.21μM CPPU	体细胞胚和愈伤组织 Somatic embryos and callus	23
茎节 Node	成熟 Mature	或 1.11μM F3IP(单用或组合)	—	—
茎节 Node	成熟 Mature	SH + 120mg/L IBA + 1.35mg/L BA	茎、根 Shoots and roots	24
茎节 Node	幼嫩 Juvenile	MS + 20μM BA	茎扩增 Shoot growth	25
茎节 Node	幼嫩 Juvenile	MS + 20μM BA + 50μM IBA + 0.5% AC	根、植株 Roots and plantlets	25
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 10μM BA + 0.5% AC 或 1g/L CH 或 5% CW	植株 Plantlets	26
茎节 Node	成熟 Mature	或 0.05mM PVP 或 10μM TIBA	—	—
茎节 Node	成熟 Mature	MS + 10μM BA 或 MS + 10μM IBA	茎扩增 Shoot growth	27

(ventilation)可提高组培苗质量,减少玻璃化(vitrification,超度含水)苗的比例,利于移栽成活,并可增加抗旱性<sup>[28,30]</sup>。通风的方法是用通气的封口膜代替密闭的封口材料。此外,玻璃化苗是好好芭组培中的常见形态异常现象,有时发生的比例很高,玻璃化苗呈水浸状,体型肥大,茎粗壮,叶肥厚,叶色变深,无法再利用。

光照普遍采用日光灯管型的冷光源,光照强度在 $38 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 之间,光照时间在12~16h之间。好好芭起源于靠近热带的沙漠地域,可以推断强光照和长日照有利于生长,而实际培养中很难测定到好好芭叶片上的光照强度,仅靠外部测量和肉眼观察,因此容易发生光照不足现象,这可能是造成不同试验结果差异较大的原因之一。

### 3 外植体的处理

从田间取材的外植体接种更为困难,原因是易受微生物的污染<sup>[7,15]</sup>,研究发现,用巴斯汀和 $\text{HgCl}_2$ 可解决这个问题。以Agrawal<sup>[25]</sup>的方法具有代表性,其方法是,从成年植株上剪取20~30cm长的枝条,用自来水冲洗30min,去掉叶片,切成段,浸于0.5%巴斯汀(Bavistin,一种杀菌剂)溶液中,摇床振荡10min,用水冲洗6~7遍,在摇床上用0.5% $\text{HgCl}_2$ 表面灭菌10min,之后再用水冲洗4~5遍。这一系列步骤连续进行,中间吸干水分的过程中茎段干燥的时间要短。之后剪去两端变黄的部分,即可用于接种。茎段的长度在1~1.5cm之间,过长或过短克隆苗的长势均下降。这样处理后98%的茎段能形成健康苗,但仍有个别茎段的芽被杀死或不能萌发,茎节插入培养基的深度是0.3~0.5cm。

### 4 培养基及生长调节剂

如表1所示,常用的培养基是MS和SH培养基,加入3%蔗糖和0.6%~0.8%琼脂及生长调节物质后,培养基pH值调整到5.7~5.8左右。研究表明,细胞分裂素BA对好好芭组培苗的良好生长是必需的。最简单的方案是MS培养基+BA即可取得良好结果,但雌雄株BA的最佳浓度不同,雄株需要 $10 \mu\text{M}$  BA而雌株是 $20 \mu\text{M}$ <sup>[18]</sup>。迄今为止已有十余种不同的生长调节物质用于调控外植体的生长,生长调节剂的调控效果视研究不同取得的结果有差异,概述如下:1、不同的生长阶段需要不同的激素。2、 $10 \mu\text{M}$  BA对促进嫩芽数量的扩增是必需的,但是BA也导致产生较多的玻璃化苗。3、0.5mg/L

2,4-D、0.5mM NAA、0.5mg/l IAA等生长素和1mg/L IPA等细胞分裂素促进芽的萌发和分化。4、0.5mg/L  $\text{GA}_3$ 促进嫩茎的伸长,但其效果受到BA、IAA等影响。5、在使用BA的基础上,单用2,4-D或再配合使用NAA、IAA可诱导形成愈伤组织。6、用高浓度的IBA(120mg/L)短时处理基部对诱导生根有促进作用,大多数克隆必需用IBA处理才能生根,但雌雄株所需的最佳浓度不同,生根培养基中IBA和NAA组合使用可促进生根,同时生根培养基中BA的浓度极低。7、3mg/L  $\text{AgNO}_3$ 、0.5%活性炭等抑毒物质对组培有益处,但不促进生长和生根。

### 5 试管苗的锻炼和移栽

取出培养基中已生根的试管苗,首先用无菌水彻底洗掉根上粘带的培养基,移植到无菌的基质中,置于可控温湿度的人工气候箱中,或置于温室内,给予适当强度的光照,初期保持较高的相对湿度,随后逐步减少,最终移栽到室外土壤中形成再生苗<sup>[20~22,25,27]</sup>。锻炼时期环境温度、湿度和基质成分对成活率影响很大<sup>[29]</sup>。较高的基质温度(17~30℃)比低温(20~25℃)成活率要高,但不同的克隆对基质温度的要求不同,而某些克隆对基质温度不敏感。可用MS营养液代替水灌溉<sup>[25]</sup>,也可用水灌溉,再配以自动喷雾装置保持湿度<sup>[21]</sup>,但多数研究并未提及是浇灌营养液还是单纯灌水。已经知道营养液中磷浓度较高会抑制根的生长,低磷降低叶片中镁和钙的含量,但对根生长和叶绿素含量没有影响<sup>[31]</sup>。小苗种植于玻璃瓶中,逐渐打开盖子减小湿度,或用塑料包裹,逐渐撕开塑料,直至移栽到室外土壤中。这一阶段需要21d~3个月。基质以蛭石:珍珠岩(2:1)和蛭石:珍珠岩:泥煤炭(1:1:1)效果最好,以蛭石:沙(2:1)成本最低。移栽成活率变化范围很大,在0~96%之间<sup>[29,32]</sup>,故移栽技术仍需深入研究,移栽属于好好芭再生中的最薄弱环节。当成活率很低时,微繁殖的成本将超过传统的营养繁殖方法,成活率不稳定时,微繁殖方法将无法实际应用。

### 6 小结

综上所述,好好芭组培研究虽然不断深入,但是仍未形成一套通用的可靠方案,所有的再生方案仅停留在试验阶段,未在生产中普遍应用。现已明确,雌雄株所需的培养条件不同<sup>[17~19]</sup>,外植体的来源多种多样,取材部位和老幼差别直接影响组培苗的质

量和成活率。而外植体的取材也似乎很难做到整齐划一,迄今为止还没有结论认为哪种外植体是最优的,用组织培养获得的再生植株,在其生长一年后,比其他方式繁殖的植株更为健壮,树体更大<sup>[33]</sup>。由此看来,好好芭的体外繁殖应从实际应用出发,根据地域不同,针对目前表现高产的克隆,总结出的一套简单有效的方案,再结合传统的繁殖方法,在引种和扩繁的过程中,选育表现良好的克隆。而重要的是加强好好芭生理和遗传学方面的研究,以期尽快阐明再生率波动很大的原因。

#### 参考文献:

- [1] National Research Council. Jojoba: New Crop for Arid Lands, New Material for Industry. National Academy Press. Washington, D. C., 1985, 2—12.
- [2] Gentry H S. The natural history of jojoba (*Simmondsia chinensis*) and its cultural aspects[J]. *Eco Bot*, 1958, 12: 261—295.
- [3] Sanchez N, Martinea M, Aracil J, et al. Synthesis of oleyl oleate as a jojoba oil analog[J]. *J. Amer. Oil Chem Soc*, 1992, 69:1150—1153.
- [4] Binman S, Belfer S, Shani A. Functionalization at the double - bond region of jojoba oil. 7. Chemical binding of jojoba liquid wax to polystyrene resins[J]. *J. Amer. Oil Chem Soc*, 1996, 73: 1075—1081.
- [5] Benzioni A. Jojoba domestication and commercialization in Israel[J]. *Hort Rev*, 1995, 17: 233—266.
- [6] Benzioni A, Forti. Jojoba. In: Downey R K, Robbelen G, Ashri A. (Eds). *Oil Crops of the World*. Tata McGraw Hill Publishing Company. London, 1985. 448—461.
- [7] Mills D, Wenkart S, Benzioni A. Micropropagation of *Simmondsia chinensis* (Jojoba). In: Bajaj YPS (Eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High - tech and Micropropagation* Springer, Berlin Heidelberg New York, 1997, 40(6): 370—393.
- [8] Laidig G L, Knox E G, Buchanan R A. Under exploited crops. In: P. V. Ammirato, D. A. Evans W. R. Sharp and Y. Yamada (Eds.), *Hand Book of Plant Cell Culture*. Vol. III, Crop. Species, Macmillan Publishing Company, New York, 1984, 38—63.
- [9] Harsh L N, Tewari J C, Patwal D S, et al. Package and practices for cultivation of jojoba (*Simmondsia chinensis*) in arid zone. Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, 1987.
- [10] Rost T L, W. Hinchee M A. Preliminary report of the production of callus, organogenesis and regeneration of jojoba (*Simmondsia chinensis*, Link, Schneid.) in tissue culture[J]. *J. Hort Sci*, 1980, 55: 299—305.
- [11] Mandani A, Lee C W, Hogan L. In vitro propagation of *Simmondsia chinensis* via shoot tip culture[J]. *Hort Sci (Abstr.)*, 1978, 13: 35.
- [12] Lee C W, Thomas J C. Jojoba embryo culture and oil production[J]. *Hort Sci*, 1985, 20:762—764.
- [13] Wang Y C, Janick J. Somatic embryogenesis in jojoba [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1986, 111: 281—287.
- [14] Jacoboni A, Standardi A. Tissue culture of jojoba (*Simmondsia chinensis* Link) [J]. *Acta Horti*, 1987, 212: 557—560.
- [15] Chaturvedi H C, Sharma M. In vitro production of cloned plants of jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) through shoot proliferation in long term culture[J]. *Plant Sci*, 1989, 63: 199—207.
- [16] Agrawal V, Prakash S, Gupta S C. In vitro plantlet regeneration via juvenile explants of jojoba (*S. chinensis*) - a promising petro crop. *Proc. Int. Conf. Biotech. Biodiv. (Abstr.)*. Kathmandu, 1996, 4.
- [17] Prakash S, Agrawal V, Gupta S C. High efficiency in vitro clonal propagation of female jojoba (*Simmondsia chinensis*) plants. *Proc. Nat. Symp. Emerg. Trends. Pl. Tiss. Cult. Mol. Biol. Osmania Univ.*, Hyderabad, 1997, 41.
- [18] Agrawal V, Prakash S, Gupta S C. Differential hormonal requirements for male and female jojoba plants. IX Int. Cong. Pl. Tiss. Cell. Cult, Jerusalem, 1998. 25—28.
- [19] Agrawal V, Prakash S, Gupta S C. Differential hormonal requirements for male and female jojoba plants. In A. Altman, S. Lzhar and M. Ziv (Eds). *Proceedings IX Int. Cong. Plant Tissus and Cell Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
- [20] Llorente B E, Apostolo N M. Effect of different growth regulators and genotype on in vitro propagation of jojoba [J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1998, 26: 55—62.
- [21] Roussos P A, Tllia - Marilli A, Pontikis C A, et al. Rapid multiplication of Jojoba seedlings by *in vitro* culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 57: 133—137.
- [22] Apostolo N M, Brutti C, Ferrarotti S A, et al. Stimulation of root development with cyclodextrins on jojoba shoots in vitro [J]. *In vitro Cell Dev Biol*, 2001, 37: 414—418.
- [23] Hamama L, Baaziz M, Letouze R. Somatic embryogenesis and regeneration from leaf tissue of jojoba [J]. *Plant Cell, Tissus and Organ Culture*, 2001, 65: 109—113.

- [24] 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, 2000, 36(1): 101—105.
- [25] Agrawal V, Prakash S, Gupta S C. Effective protocol for *in vitro* shoot production through nodal explants of *Simmondsia chinensis* [J]. *Biologia Plantarum*, 2002, 45(3): 449—453.
- [26] Prakash S, Agrawal V, Gupta S C. Influence of some adjuvants on *in vitro* clonal propagation of male and female jojoba plants [J]. *In vitro Cell Dev Biol*, 2003, 39: 217—222.
- [27] Tyagi P K, Prakash S. Genotype - and sex - specific for *in vitro* micropropagation and medium - term conservation of jojoba [J]. *Biologia Plantarum*, 2004, 48(1): 19—23.
- [28] Mills D, Zhou Y Q, Benzioni A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation [J]. *In vitro Cell Dev Biol*, 2004, 40: 396—402.
- [29] Prat L, Botti C, Palzkill D. Rooting of jojoba cuttings: the effect of clone, substrate composition and temperature [J]. *Industrial Crops and Products*, 1998, 9: 47—52.
- [30] Mills D F, Ruth, Benzioni A. Response of jojoba shoots to ventilation *in vitro* [J]. *Israel j of Pl Sci*, 2001, 49: 197—202.
- [31] Benzioni A, Ventura M. Effect of phosphorus concentration in irrigation water on the development of jojoba cuttings [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1998, 21(12): 2697—2706.
- [32] Cardran P. Clonal variations in rooting of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. M. S. Thesis. University of Arizona A Z, 1980, 98.
- [33] Bimbaum E, Matisa S, Wenkart S. Vegetative propagation of jojoba by tissue culture. In: Wisniak J, Zabicky J. (Eds.). *Proceedings of the Sixth International Conference on Jojoba and its Uses*. Beer - sheva, Israel, Ben Gurion University, 1984. 233—241.

### Progress of *in vitro* tissue culture of a unique oil crop - jojoba

GENG Hong - wei, SHI lu, ZHANG Gen - fa

(College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**Abstract:** This paper reviews the progress of jojoba *in vitro* tissue culture. Several aspects related to jojoba tissue culture were summarized and analyzed, including culture medium and growth regulators, explants, environment factors, and plant regeneration. The report emphasized on the common troubles and shortcomings existed in previous researches on jojoba tissue culture. The prospects of jojoba *in vitro* culture was also discussed.

**Key words:** Jojoba; *Simmondsia chinensis*; Tissue culture; Plant growth regulator; Acclimation and transplant