

文章编号: 1001-1498(2010)03-0326-04

麻疯树叶盘法高效再生的研究

刘伯斌¹, 卢孟柱², 李玲², 陈介南^{1*}

(1. 中南林业科技大学生物环境科学与技术研究所, 湖南长沙 410004;

2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: 以温室中1年生麻疯树顶端幼嫩叶片为外植体, 研究了在MS基本培养基中添加不同浓度的6-苄基腺嘌呤(6-BA)和吲哚丁酸(IBA)对不定芽再生的影响, 并采用60天暗培养的方法筛选出愈伤组织诱导和不定芽诱导的最佳激素组合为MS+5 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹IBA, 该组合的不定芽诱导率高达75.8%。将该组合诱导出的愈伤组织接种至MS+1.5 mg·L⁻¹6-BA+0.05 mg·L⁻¹IBA的固体培养基中, 研究了赤霉素对不定芽再生的影响, 最佳赤霉素浓度为0.05 mg·L⁻¹, 麻疯树叶盘再生率达到90.9%, 平均不定芽个数达到4.6个。

关键词: 麻疯树; 叶盘; 不定芽再生; 赤霉素

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

The Study of High-Efficiency Plant Regeneration of *Jatropha curcas*

LIU Bo-bin¹, LU Meng-zhu², LI Ling², CHEN Jie-nan¹

(1. Institute of Biological and Environmental Science & Technology, Central South University of Forestry and Technology,

Changsha 410004, Hu 'nan, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The seedling leaves grown in greenhouse were used as explants to study the effects of different concentrations of 6-BA and IBA added in MS media on the regeneration of adventitious shoots. Cultured in the dark condition for 60 days, it is found that the optimal hormone combination for callus induction and adventitious shoots induction is 6-BA 5 mg·L⁻¹ and IBA 0.5 mg·L⁻¹. The induction rate of adventitious shoots is as high as 75.8%. Based on the optimal combination, the effect of gibberellic acid (GA₃) on the regeneration of adventitious shoots was studied. The regeneration frequency of leaf-discs could reach to 90.9% and the average number of adventitious shoots was up to 4.6 when the concentration of GA₃ was 0.05 mg·L⁻¹.

Key words: *Jatropha curcas*; leaf-disc; adventitious shoots regeneration; gibberellic acid (GA₃)

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)是生长在热带和亚热带的落叶灌木或小乔木^[1]。麻疯树种子含油量高,可达40%~60%^[2],均比油菜(*Brassica napus* L.)和大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)等常见油料作物的含油量高^[3],并且麻疯树油可作为生物柴油用于各种柴油发动机^[4],是一种重要的能源植物;但是,目前麻疯树种植区域狭窄,仅分布在亚洲、非洲和美洲的热带和亚热带地区^[5],我国自然分布约

有1.1万hm²,主要集中在四川、云南、贵州。麻疯树产量较低,目前人工种植的麻疯树林产果量仅为1500~4500kg·hm⁻²,约可加工450~1500kg生物柴油^[6]。窄分布和产量低限制了其作为能源植物进行大规模栽培和产业化。通过基因工程的方法可以改良麻疯树的抗性、产量等性状,从而扩大麻疯树的分布范围,提高结实产量、种子含油量和油质。

关于麻疯树叶盘再生的研究国内外只有少量的

收稿日期: 2009-02-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No.2007AA10Z182),林业公益性行业科研专项(No.200904038)

作者简介: 刘伯斌,硕士研究生,从事植物基因工程研究. E-mail: 163liubobin0377@163.com

* 通讯作者: 陈介南,教授,从事生物能源与生物环境研究. E-mail: chenjie@besti.org

报道。陆伟达^[7]通过在MS固体培养基中添加不同浓度的6-BA和IBA,在光照的条件下首先经过3周诱导出愈伤组织,然后在同样的培养条件和培养基中经过4周诱导出不定芽,最佳组合为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA,不定芽诱导率为56%;Johnson^[8]使用TDZ,经过6周诱导实现了叶盘直接诱导出不定芽,最佳组合为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA,诱导率为53.5%;Mukherjee^[9]采用靠近顶端分生组织的幼嫩叶片研究了麻疯树的体胚发生,胚性愈伤组织的诱导率为56%。虽然上述报道的结果能达到麻疯树增殖的目的,但是低的再生频率不利于麻疯树的遗传改良和快速繁殖。本文以温室中的麻疯树叶片为材料,进一步研究了6-BA和IBA对愈伤组织和不定芽诱导率的影响,并且测定了不同赤霉素(GA_3)浓度对不定芽诱导率的影响,有效的提高了麻疯树叶盘法不定芽诱导率,为建立麻疯树遗传改良和优良品种的快繁奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为中国林科院科研温室中1年生的麻疯树,2008年12月取样实验。

1.2 试验方法

1.2.1 温室中外植体的处理 选取生长旺盛的麻疯树顶端幼嫩叶片,在无菌条件下用20% NaClO(有效氯浓度约为2%)消毒20 min,无菌水洗涤3次,切成约为 9 mm^2 叶盘,近轴端朝上接种于添加不同激素的MS固体培养基上。

1.2.2 6-BA和IBA对愈伤组织和不定芽的诱导 在MS基本培养基中添加不同浓度的6-苄基腺嘌呤(6-BA)(0.5 、 1.5 、 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和吲哚丁酸(IBA)(0.05 、 0.15 、 $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),共9种浓度配比(表1),每种浓度配比接种3盘叶盘。每个培养皿中接种18~20个叶盘,共接种486~600个叶盘。暗培养30 d和60 d统计不定芽的诱导率。

1.2.3 赤霉素对不定芽的诱导 以1.2.2筛选出的最佳愈伤组织诱导激素组合诱导出的愈伤组织,接种至添加不同赤霉素(GA_3)浓度(0.0 、 0.05 、 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的MS+ $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA^[10]的固体培养基中,每种浓度接种3盘叶盘,每盘接种18~20块愈伤组织,共接种54~60个叶盘,光照培养30天,重复3次,测定赤霉素对不定芽诱导率的影响。

1.2.4 不定芽的延长以及不定根的诱导 在MS基本培养基中添加不同浓度的6-BA(0.50 、 0.20 、 0.05 、 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA,将诱导出的不定芽接种其中。当不定芽长约2~3 cm时,在激素为 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/2MS固体培养基中进行生根培养^[10]。

不定芽诱导率=(再生叶片数/接种叶片总数) $\times 100\%$,平均诱导芽数=再生不定芽总数/接种叶片总数。

1.3 培养基及培养条件

采用MS(蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)为基本培养基,加入植物激素后把培养基pH值调整为5.8~6.2,121 灭菌15 min。光培养温度为25℃,光照强度为 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间为16 h·d⁻¹。暗培养在密闭纸箱中进行,温度为25℃。所有试验皆在中国林科院重点开放实验楼组培室中进行。

1.4 数据分析

所有数据均采用SPSS数据分析软件进行统计分析。

2 结果与分析

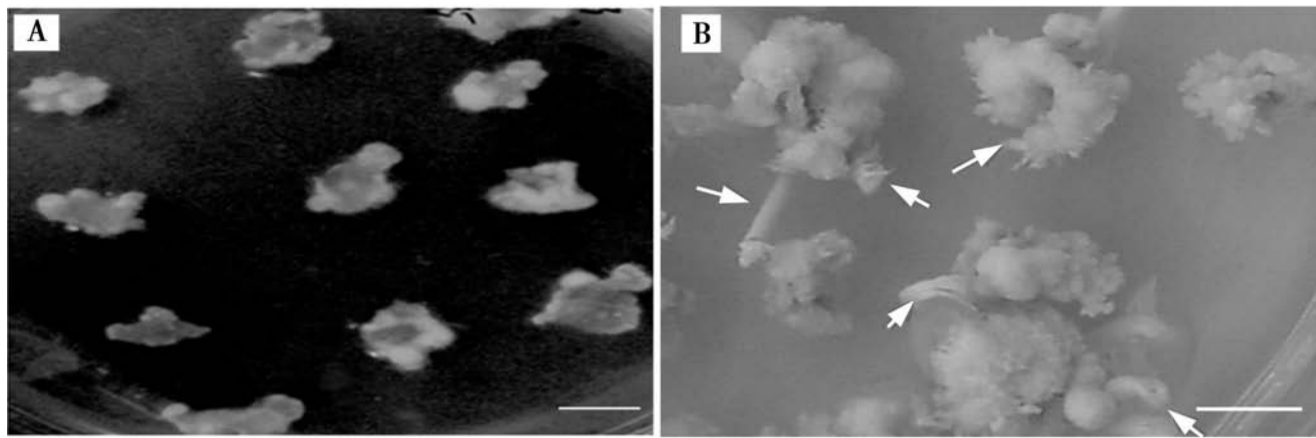
2.1 6-BA、IBA对愈伤组织和不定芽诱导率的影响

6-BA和IBA激素的不同浓度组合见表1,经过30天的暗培养观察后,所有激素组合下的叶盘100%诱导出愈伤组织(图1-A)。为确定诱导不定芽的最佳激素组合,延长暗培养时间至60天,观察有黄色不定芽出现(图1-B),统计结果见表1。

表1 6-BA和IBA对麻疯树不定芽诱导率的影响

代号	6-BA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不定芽诱导率/%	单因素分析			F值
				因素	水平	不定芽诱导率/%	
1	0.5	0.05	0.0 ±0.0d	6-BA	0.5	11.4 ±5.3b	13.487* [*]
2	0.5	0.15	13.2 ±0.2dc		1.5	43.3 ±5.3a	
3	0.5	0.50	21.1 ±1.6bdc		5.0	46.5 ±5.3a	
4	1.5	0.05	30.0 ±4.7bdc	IBA	0.05	12.8 ±5.3b	
5	1.5	0.15	48.3 ±2.4bac		0.15	38.9 ±5.3a	
6	1.5	0.50	51.5 ±2.1ba		0.50	49.5 ±5.3a	
7	5.0	0.05	8.3 ±11.8d				
8	5.0	0.15	55.2 ±16.2ba				
9	5.0	0.50	75.8 ±15.3a				

注:* * 表示差异极显著($\alpha=0.01$)。



A: 30 d 暗培养诱导的愈伤组织; B: 60 d 暗培养诱导的黄色不定芽(箭头所指)

图1 愈伤组织诱导和不定芽分化(横线代表1 cm)

从表1可以看出:当6-BA为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和IBA为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,黄色不定芽的诱导率最高,为75.8%,将其作为诱导愈伤组织和不定芽的最佳培养基;单因素分析结果表明:黄色不定芽的诱率随着6-BA和IBA浓度的增加而增加,6-BA和IBA对不定芽再生有极显著的促进作用。

2.2 赤霉素(GA_3)对不定芽诱导的影响

从表2可以看出:赤霉素对不定芽的诱导有促进作用,但没有达到显著水平;而赤霉素对平均叶盘再生不定芽个数的影响极显著,并且随着赤霉素浓度的增加而增加。当赤霉素浓度达到 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,平均不定芽个数达到7.4个,但是有些不定芽叶片细长,呈畸形(图2-C),故选择赤霉素浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

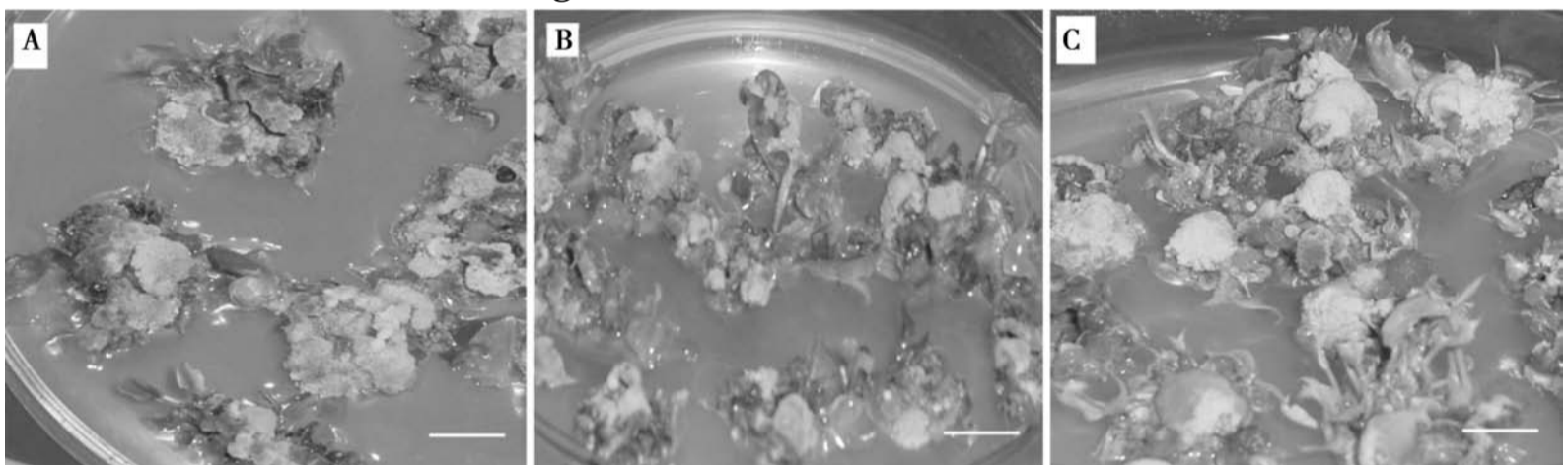
表2 赤霉素(GA_3)对不定芽诱导的影响

$\text{GA}_3 /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	不定芽诱 导率/%	<i>F</i> 值	平均不定芽 个数/个	<i>F</i> 值
0.00	$84.5 \pm 8.4 \text{ a}$		$2.8 \pm 0.4 \text{ b}$	
0.05	$90.9 \pm 9.1 \text{ a}$	1.948	$4.6 \pm 0.8 \text{ ab}$	33.429**
0.25	$97.0 \pm 5.3 \text{ a}$		$7.4 \pm 0.45 \text{ a}$	

注:**表示差异极显著($\alpha=0.01$)。

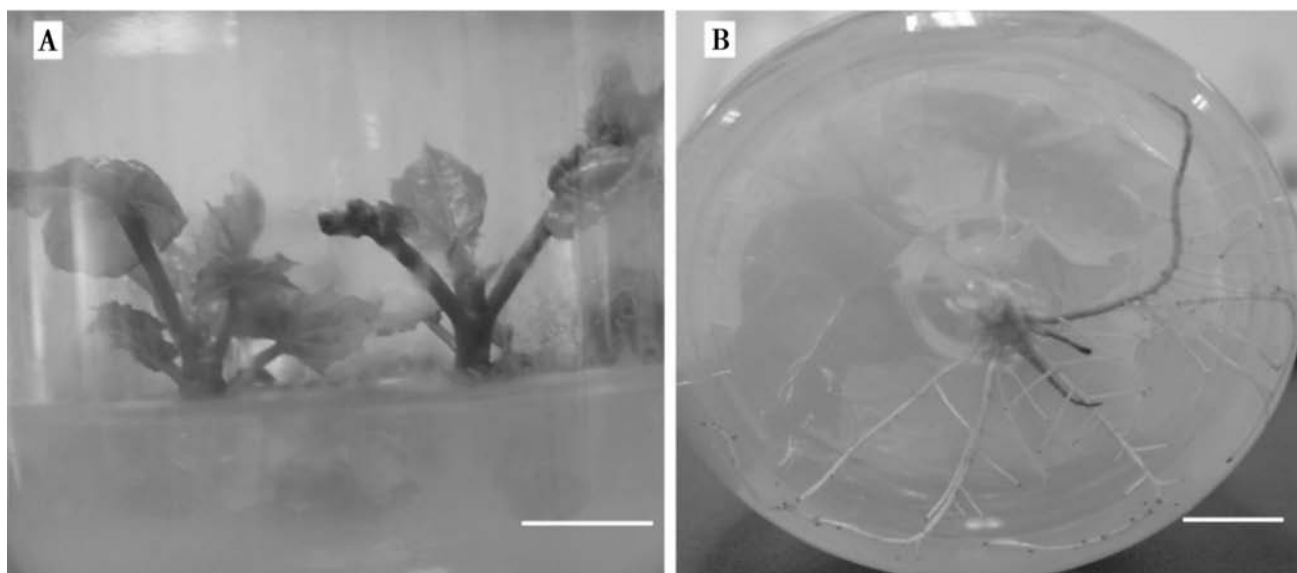
2.3 不定芽的延长以及不定根的诱导

在激素组合为 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA的MS固体培养基中,不定芽经过20天的延长就可以生长至2~3 cm(图3-A)。在 $\text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA的培养基中进行不定根的诱导,如图3-B所示为在生根培养基中30天的结果,不定根的诱导率为88.2%。



A、B、C分别表示赤霉素浓度为0.00、0.05、0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图2 赤霉素对不定芽再生的影响(横线代表1 cm)



A: 延长的不定芽; B: 生根的不定芽

图3 不定芽延长和生根(横线代表1 cm)

3 结论及讨论

在麻疯树叶盘法不定芽诱导过程中, 6-BA 和 IBA 的浓度起关键性的作用。良好状态的愈伤组织是快速诱导不定芽的关键。相对相关报道^[7-9], 本文进一步增加 6-BA 的浓度, 采用长时间暗培养的方式, 第 30 天观察统计时, 100% 诱导出愈伤组织; 第 60 天观察统计时, 部分愈伤组织已经长出黄色的不定芽。愈伤组织诱导和不定芽诱导的最佳激素组合为 MS + 5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L⁻¹ IBA, 该组合的不定芽诱导率高达 75.8%。

Li^[10] 在研究麻疯树子叶叶盘不定芽诱导时发现, 添加一定的赤霉素就能大幅度增加不定芽的再生率, 但由于子叶做为外植体不适合优良品种的快繁和遗传改良, 所以本研究采用叶盘进行再生研究。在麻疯树叶盘再生的研究中, 本文作者发现添加赤霉素虽然不能显著提高不定芽的诱导率, 但却能大幅度增加平均不定芽个数。在叶盘愈伤组织诱导不定芽时, 平均不定芽个数随着赤霉素浓度的增加而增加, 平均不定芽能达到 4.6 个, 促进作用极显著, 并且有效诱导率可以达到 90.9%, 远高于文献 [7-9] 报道的麻疯树叶盘法诱导率。赤霉素是一种广谱高效的植物生长促进物质, 一方面它能提高植物体内生长素的含量^[11], 促进细胞生长分裂, 促进萌芽^[12]; 另一方面与其他激素还存在促进或协调作用。赤霉素在麻疯树不定芽的再生过程中首先起促进萌芽的作用, 良好状态下的愈伤组织在赤霉素的作用下能大幅度增加不定芽个数; 其次起协调作用, 提高不定芽体内生长素含量, 故当赤霉素浓度超出一定范围时, 细胞分裂和细胞生长就会出现不协调, 从而出现畸形苗。

研究结果表明: MS + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05

mg · L⁻¹ IBA + 0.05 mg · L⁻¹ GA₃ 为最佳不定芽诱导的激素组合, 使麻疯树叶盘不定芽诱导率达到 90.9%, 平均不定芽个数达到 4.6 个, 从而解决麻疯树叶盘法不定芽诱导率低的问题, 为麻疯树的遗传改良和扩繁奠定基础。

参考文献:

- [1] 于曙明, 孙建昌, 陈波涛. 贵州的麻疯树资源及其开发利用研究 [J]. 西部林业科学, 2006, 35(3): 14 - 17
- [2] Liberalino A A, Bambira E A, Moraes-Santos T, et al. *Jatropha curcas* L. seeds: chemical analysis and toxicity [J]. Arq Biol Technol, 1988, 31: 539 - 550
- [3] 邓志军, 程红焱, 宋松泉, 等. 麻疯树种子的研究进展 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(6): 605 - 612
- [4] 秦虹, 宋松泉, 龙春林, 等. 小桐子的组织培养和植株再生 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(6): 649 - 652
- [5] Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise [J]. Biomass and Bioenergy, 2000, 19(1): 1 - 15
- [6] 吕文, 王春峰, 王国胜, 等. 中国林木生物质能源发展潜力研究(1) [J]. 中国能源, 2005, 27(11): 21 - 26
- [7] 陆伟达, 魏琴, 唐琳, 等. 麻疯树愈伤组织的诱导及快速繁殖 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(2): 127 - 130
- [8] Deore A C, Johnson T S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant [J]. Plant Biotechnol Rep, 2008, 2(1): 7 - 11
- [9] Tinir B J, Mukherjee P, Datta M M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant [J]. Plant Biotechnol Rep, 2007, 1(3): 135 - 140
- [10] Li M R, Li H Q, Wu G J, et al. Establishment of an Agrobacterium-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 92: 173 - 181
- [11] 王廷芹, 杨暹. 外源赤霉素对青花菜茎尖内源激素含量的影响 [J]. 中国蔬菜, 2008(7): 22 - 25
- [12] Ozden T Y, Ozudogru E. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 106(3): 415 - 426