

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.04.031

麻疯树根高效再生体系的建立及不定芽起源研究

彭天祥, 代 娇, 陈 放, 徐 莺

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘 要: 为了克服现有麻疯树快繁技术的不足, 分别以麻疯树胚根和子叶外植体诱导的不定根为外植体诱导不定芽。麻疯树子叶不定根诱导的最佳培养方式为: MS+5 mg/L IBA 上培养4天, 然后转至 MS₀ 培养基上生根。诱导生根率和生根数分别达到 93.33% 和 6.54 个/外植体。子叶不定根诱导不定芽的最佳培养基是 MS+3.0 mg/L 6-BA+3 mg/L IAA, 诱导率达到 83.33%。麻疯树胚根的最佳不定芽诱导培养基为 MS+0.2 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IBA, 分化率达 67.80%, 平均出芽数为 3.25 个/外植体。对麻疯树胚根再生的各阶段进行了石蜡切片观察, 明确了不定芽起源于根的薄壁细胞层。与现有技术相比, 本方法具有周期短、再生效率高的特点。

关键词: 麻疯树; 根外植体; 分化; 不定芽

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2019)04-0779-06

The study of plant regeneration from root explants of *Jatropha curcas* and origin of adventitious shoots

PENG Tian-Xiang, DAI Jiao, CHEN Fang, XU Ying

(Key Laboratory of Bio-source and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to overcome the shortcomings of the existing propagation technology of *Jatropha curcas*, adventitious buds were induced from the adventitious root explants of cotyledon and radicle explants respectively. The optimal way to get adventitious root from cotyledons of *Jatropha curcas* L. was that it would be precultured on the MS medium containing 5 mg/L IBA for 4 days, then transferred to MS₀ medium for rooting. The rooting inducing rate and adventitious root number reached 93.33% and 6.54/explant, respectively. The optimal medium for adventitious buds inducing was MS+3.0 mg/L 6-BA+3 mg/L IAA. The induction rate could reach 83.33%. The optimal adventitious bud induction medium from the radicle explants of *Jatropha curcas* L. was MS+0.2 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IBA. The differentiation rate was 67.80%, and the average number of sprouts was 3.25 per explant. Paraffin sections were observed at each stage of bud regeneration and it seems that adventitious buds originate from parenchyma of roots. Compared with the prior methodology, the method presented here has the characteristics of a shorter cycle and higher regeneration efficiency.

Keywords: *Jatropha curcas* L.; Root explant; Regeneration; Adventitious shoot

收稿日期: 2018-08-11

基金项目: 欧盟“伊拉斯谟+”项目(586083-EPP-1-2017-1-IT-EPPKA2-CBHE-JP)

作者简介: 彭天祥(1988-), 男, 四川眉山人, 硕士, 主要研究领域为资源植物学。E-mail: 402125493@qq.com

通讯作者: 徐莺。E-mail: xuying@scu.edu.cn

1 引言

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)为落叶灌木或小乔木^[1],其种仁含油量可高达 40%~60%,全年开花,全年结果,被认为是发展生物柴油最具潜力的树种之一^[2].麻疯树原产美洲,现广泛分布于热带和亚热带地区,在我国分布在广东、广西、云南、福建、海南以及四川等省区^[3].其分布的局限性、麻疯树良种不足、种子产量低、经济效应低等问题制约了其产业化发展和推广.高效的植株再生体系能为基因转化提供良好平台,而通过农杆菌介导的转基因技术是获得性状改良、适应力更强的麻疯树的重要条件,因此组织培养法可以作为改良麻疯树的树种的基础^[4].此外,再生体系可对麻疯树良种进行快速繁殖,利于其产业化推广,也将对麻疯树种质资源的保护和优良嫁接芽的奠定基础.

关于麻疯树组织培养已经有多年的研究,有关麻疯树组织培养的研究主要分为两种方式:经过愈伤组织介导的间接不定芽再生;通过植物器官作为外植体的直接不定芽再生.其中通过植物器官作为外植体的应用越来越广泛,通常麻疯树组织培养再生体系中被作为外植体的器官主要包括了叶^[5-9],子叶^[10,11],叶柄^[12],节点^[13,15],下胚轴^[16-17],上胚轴^[18]等.虽然利用麻疯树不同组织进行不定芽再生的研究已渐渐成熟,但根作为外植体再生芽的体系国内外还尚未研究.

因此,本研究通过麻疯树子叶根直接诱导和根诱导再生芽等进行研究,构建了麻疯树根再生技术.同时优化了麻疯树根再生芽过程中的关键技术,提高了整个过程中麻疯树根的生芽率,为今后麻疯树种质资源的保护、优良树种的快繁以及麻疯树的遗传转化研究做了良好铺垫.并揭示了不定芽的起源和发育过程,为今后开展麻疯树基因改良奠定了基础.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 植物材料 麻疯树种子采自四川省攀枝花市.

2.1.2 外植体材料 方法 1(麻疯树无菌苗根系法):将消毒后的种子用解剖刀沿纵轴切开,用镊子轻轻取出两片完整的子叶,接种于含 MS 培养基中培养,1 w 后得到的胚根可作为外植体(图 1).方法 2(麻疯树子叶诱导根系法):将消毒后的种子用解剖刀沿纵轴切开,取子叶上部的 4/5 部分.

2.2 方法

2.2.1 植物材料消毒 挑选当年生饱满成熟的麻疯树种子,在超净台上去壳,用无菌水浸泡 4 h.在无菌操作台上用 75%(V/V)酒精浸泡 30 s,然后用无菌水清洗 4~5 次,再在 0.1%的升汞(HgCl_2)溶液中浸泡 10~15 min,用无菌水冲洗 4~5 次,晾干.

2.2.2 预处理 方法 1:将相同根龄的麻疯树胚根切下,长度为 1~2 cm,接种于含不同 IBA(0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L)和 6BA(0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L)的 MS 培养基上进行 3~4 d 预处理.方法 2:子叶在含不同 IBA 水平的 MS 培养基上培养 4 d 后,再转接到 MS_0 培养基诱导不定根,培养时间为 4 w.每种方法处理预处理样本数为 180 个.

2.2.3 不定芽诱导 方法 1:将上述预处理后的根外植体接种于不定芽诱导培养基($\text{MS}+\text{IBA}$ 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L)上进行不定芽诱导,每隔 3 d 观察并统计.方法 2:培养 4 w 后,切去大部分子叶,把保留部分子叶的不定根直接接种到不定芽诱导培养基上.每种方法的不定芽诱导材料数为 120 个.

2.2.4 不定芽伸长、生根及移栽 将麻疯树根所诱导的不定芽切下,转接入 $\text{MS}+6\text{-BA}$ 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L 培养基中.将伸长至 2~3 cm 的麻疯树不定芽转接入 $\text{MS}+\text{IBA}$ 0.2 mg/L 的固体培养基中进行生根培养.生根后的不定芽,洗去根上的培养基后,小心移入装有高压灭菌的蛭石:营养土混合物=1:1(V/V)的容器中,并用保鲜膜遮盖以减少水分丧失.观察其生长状态并统计其存活率.

2.2.5 培养条件 基础培养基为 MS 培养基,含 3%蔗糖、0.75%琼脂粉、 $\text{pH}=5.8$,使用前 121°C 高压灭菌 20 min.为了不同的实验目的,在基础培养基上添加不同种类和浓度的激素.培养温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为 1500~2500 lx,光照时间为光/暗:16 h/8 h.

2.2.6 石蜡切片观察不定芽再生过程 取再生过程中不同阶段的麻疯树根外植体进行石蜡切片,步骤如下:将材料固定于 FAA 溶液中,采用石蜡切片法,Leica RM2128 切片机切片,切片厚度为 8~10 μm ,酒精脱水、二甲苯透明、番红-固绿对染、中性树胶封片,在 UOP 型(UB200i)光学显微镜下观察、拍照.

3 结果与分析

3.1 麻疯树子叶外植体诱导不定根

麻疯树子叶外植体在 MS₀ 培养基上进行培养, 仅发生膨大, 随着培养时间的增长, 膨大的子叶逐渐萎蔫、变褐色, 不能生长出根. 但是若将子叶外

植体接种于含高浓度 IBA 的 MS 培养基上进行刺激处理, 处理过程中, 子叶逐渐膨大发生卷曲, 颜色由乳白色变为黄色. 4 d 后将外植体再转接到 MS₀ 培养基上进行培养, 1 w 后可见瘤状凸起, 并逐渐长出白色肉质的不定根. 培养 4 w 后, 不定根长度可达 4~5 cm(图 1).

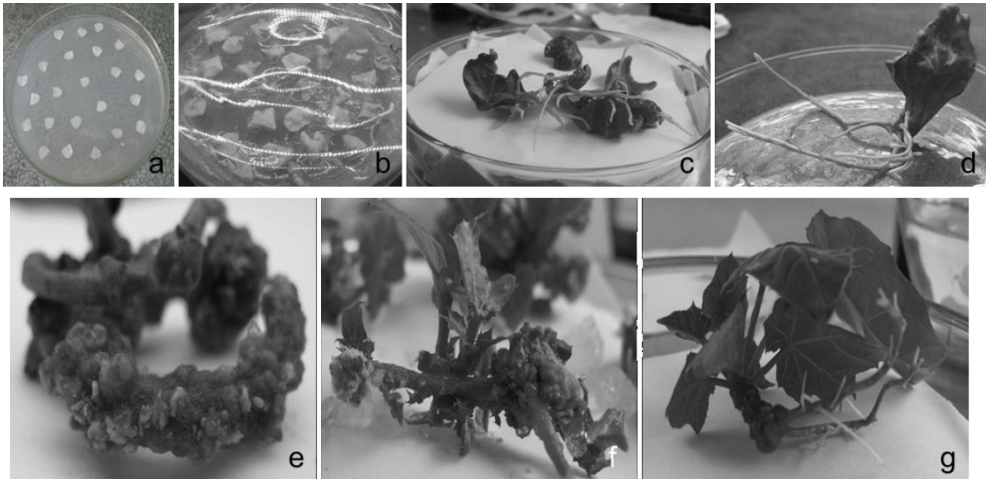


图 1 子叶外植体诱导不定根和不定芽的过程

Fig. 1 Adventitious roots and buds induced by cotyledon explants

a. 麻疯树离体子叶; b. 预处理后的子叶; c~d. 刺激后转接到 MS 培养基生根情况; e~f. 不定芽诱导培养; g. 不定芽生根.

对不同浓度 IBA 的刺激效果进行分析, 发现较高浓度 IBA 能够更好地刺激子叶外植体直接生根(表 1). 当 IBA 浓度为 5.0 mg/L 时, 平均生根率和单个外植体生根数均达到最高水平(93.33%, 6.54), 浓度减小或增加都不利于麻疯树子叶直接生根.

表 1 激素对子叶外植体不定根再生的影响
Tab. 1 Effects of hormones on adventitious root regeneration of cotyledon explants

IBA(mg/L)	平均生根率(%)	平均生根数/外植体
1.0	13.79	2.75
3.0	35.71	3.90
4.0	58.62	5.11
5.0	93.33	6.54
7.0	93.10	6.07
9.0	89.66	6.11
11.0	82.14	5.17

3.2 子叶不定根诱导不定芽

将由子叶诱导得到的麻疯树不定根接种于芽诱导培养基. 培养过程中发现, 不定根外植体逐渐不均匀膨大成瘤状, 15 d 左右可观察到明显的芽点出现, 继续培养到 30 d 芽点长成不定芽(图 1).

IAA 的浓度对不定芽的形成效率具有影响(表 2). 当 IAA 浓度为 3.0 mg/L 时, 不定芽诱导率最高, 达到 83.33%; 同时单个外植体上不定芽数量达到最大值, 为 9.20 个. IAA 浓度的增加或降低, 不定芽诱导和出芽数都降低.

表 2 激素对子叶再生根的不定芽形成的影响
Tab. 2 Effect of hormones on adventitious bud formation of cotyledon regeneration roots

6-BA(mg/L)	IAA(mg/L)	诱导百分率(%)	出芽数
3.0	4.0	63.33	7.47
3.0	3.0	83.33	9.20
3.0	2.0	66.67	7.05
3.0	1.0	56.67	3.94

3.3 麻疯树胚根诱导不定芽

将麻疯树无菌苗的胚根外植体直接接种于 MS₀ 培养基中, 外植体仅形成愈伤组织, 继续培养仍无不定芽出现. 但是, 将胚根外植体接种于含不同 6-BA 和 IBA 激素组合的 MS 基本培养基上培养 3 d 后, 在转接入芽诱导培养基上培养后, 可以发现, 培养 3 d 时根段就逐渐开始膨大; 7 d 后, 根外植体膨大更加明显且切口处开始出现瘤状凸起;

14 d 后,切口处开始形成芽点;20 d 后,外植体表面可见明显的不定芽(图 2)。

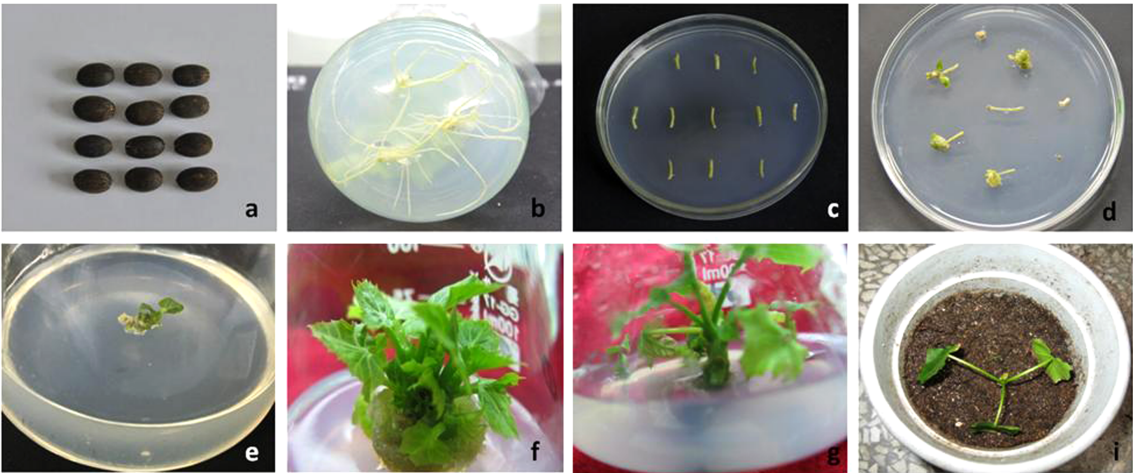


图 2 麻疯树胚根不定芽的诱导

Fig. 2 Induction of adventitious buds from radicle root explants of *Jatropha curcas*

a. 麻疯树种子; b. 麻疯树根外植体; c. 麻疯树根接种于预培养基; d~e. 不定芽诱导; f. 不定芽伸长; g. 不定芽生根; h. 移栽后的再生苗

为了得到最高的不定芽分化效率,对 6-BA 和 IBA 处理的浓度进行筛选优化,结果表明,相同 IBA 浓度下,0.2 mg/L 的 6-BA 对出芽数最有利;而相同 6-BA 浓度下,IBA 浓度的变化,出芽情况表现出不同的趋势.通过单个外植体出芽数和分化效率综合考虑,最佳激素组合为 IBA 1.0 mg/L 和 6-BA 0.2mg/L,此时分化效率最高,达到 67.80%,单个外植体出芽数也最高,达到 3.25 个/外植体(表 3).

表 3 激素对胚根外植体分化的影响

Tab. 3 Effects of hormones on differentiation of radicle ex-
plants

激素浓度(mg/L)		出芽数/外植体	再生效率(%)
6-BA	IBA		
0.1	0.5	0.24	18.22
	1.0	0.90	24.62
	1.5	2.41	52.91
	0.5	2.96	54.32
0.2	1.0	3.25	67.80
	1.5	2.92	56.67
	0.5	2.37	52.66
0.3	1.0	2.66	59.80
	1.5	1.93	47.68

3.4 不定芽的伸长、生根和移栽

将诱导获得的不定芽切下,转接入 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L 的培养基中,培养 14 d 后不定芽即可长至 3~4 cm 高.将其进而转接到

MS+IBA 0.2 mg/L 固体培养基中进行生根培养,14 d 后生根率可达 91%以上.

将根再生芽移入装有蛭石:营养土=1:1 (v/v)的容器中培养,移栽存活率为 90%以上.

3.5 胚根诱导不定芽的起源和发育研究

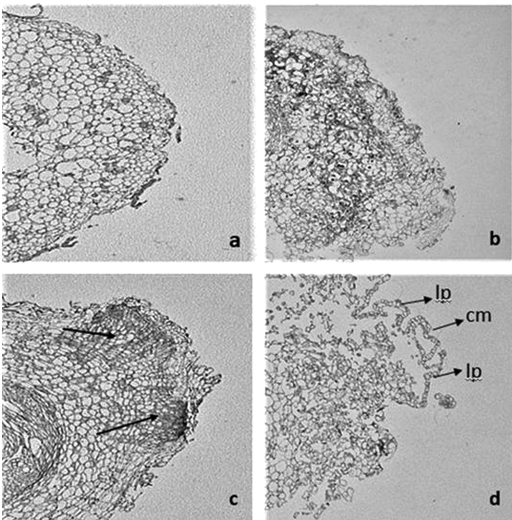


图 3 麻疯树根不定芽分化过程的形态学观察

Fig. 3 Morphological observation of adventitious bud differentiation of *Jatropha curcas* Roots

a. 刚接种的麻疯树根外植体横切细胞图; b. 接种 7d 后的麻疯树根横切细胞图; c. 接种 14d 后麻疯树根横切细胞图; d. 接种 21d 后麻疯树根横切细胞图

石蜡切片揭示了麻疯树胚根外植体不定芽产生与发育的全过程,表明不定芽起源于胚根的薄壁细胞层(图 3).将麻疯树胚根外植体刚接种于预培养的

培养基时,细胞排列整齐,显示出典型的植物的根的结构(图 3a).但在接入芽再生培养基 1 w 后,可以观察到胚根薄壁细胞开始快速分裂(图 3b).培养 2 w 后,可以观察到芽原基的形成,该区域的细胞细胞质浓厚(图 3c).培养至 3 w 左右,芽原基中围绕着顶端分生组织的周边细胞分化产生叶原基(图 3d),随后细胞沿生长方向不断分裂而伸长形成不定芽.

4 讨 论

麻疯树分布面积广、资源丰富,不仅可从中获取生物柴油、生物医药材料、杀虫剂的活性成分、动物饲料等^[19].还因其具有良好的耐盐性,对土壤要求不高,能适应干旱、半干旱气候,是干热河谷地区荒山造林的好树种,具有广阔的开发利用前景.由于麻疯树种子产量较低、良种不足,导致其繁殖的经济效益低,制约了其产业化发展.因此,选育高产、高抗、高含油率的麻疯树品种,以及保证其遗传稳定的快速繁殖方法就成为了促进其产业化发展的重要条件.

常规的麻疯树组织培养技术一般需要经过愈伤组织过程,尤其是木本植物,通常需要经过愈伤组织途径,获得优质的愈伤组织对于整个再生体系的建立至关重要^[20].而通过愈伤的再生体系往往存在诸多不足.如愈伤组织的去分化过程,该过程容易发生基因突变,从而导致植物的遗传稳定性得不到保持.因此,不经过愈伤组织的器官直接发生途径逐渐受到青睐.林青等构建了油桐下胚轴的直接器官再生体系,为油桐快速繁殖和遗传转化奠定了基础^[21].张艳等以猕猴桃叶片为外植体,构建了猕猴桃直接再生体系^[22].在麻疯树中,不经过愈伤组织的直接再生体系逐渐得到建立^[6,23].运用麻疯树外植体培养直接得到再生苗的组织培养方法具有周期短和经济等多种优势,符合现代快速繁殖和育种的要求.

外植体选择对于植物稳定再生体系至关重要.麻疯树的叶、子叶、叶柄、下胚轴和上胚轴等均可作为外植体建立稳定的再生体系.以根为外植体取材方便、数量大,且可以多次收获,能够提供足够的材料.根尖分生区组织为幼嫩部位,其细胞增殖速度快,相比成熟组织,再生相对容易.麻疯树通过农杆菌介导的遗传转化体系相对还不成熟,仅由麻疯树叶盘的农杆菌转化法得到建立及应用^[24].以叶片为外植体的转基因技术要么需要经历愈伤组织过

程,要么需要诱导出芽才能做检测,导致麻疯树通过农杆菌介导的遗传转化体系获得的品种仍存在转化植株遗传稳定性差和转化周期长等问题.

总的来看,本研究以麻疯树根为外植体,对根来源和培养基组成等条件进行探索,建立了麻疯树根的再生体系建立.同时,利用石蜡切片技术对不定芽起源进行解析.该方法的探索和建立为麻疯树技术的改良奠定了一定的技术基础,也将为其他木本植物组织培养和转化方法的建立提供借鉴.

参考文献:

- [1] Grimm C. Evaluation of damage to physic nut (*Jatropha curcas*) by true bugs [J]. Entomol Exp Appl, 1999, 92: 127.
- [2] Clark T E, Appleton C C, Kvalsvig J D. Schistosomiasis and the use of indigenous plant molluscicides; a rural south African perspective [J]. Acta Trop, 1997, 66: 93.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 44 卷第 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [4] 郑万钧. 中国树木志(第 3 卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
- [5] 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: 7.
- [6] Khurana-Kaul V, Kachhwaha S, Kothari S L. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium[J]. Biol Plantarum, 2010, 54: 369.
- [7] Zhang C, Fu S, Tang G, et al. Factors influencing direct shoot regeneration from mature leaves of *Jatropha curcas*, an important biofuel plant [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2013, 49: 529.
- [8] Medipally S R, Naresh B, Kumar S M, et al. Somatic embryogenesis from leaf and shoot tip explants of *Jatropha curcas* L. [J]. Indian Sci Tech, 2014, 7: 1842.
- [9] 王琼, 刘伯斌, 孔倩倩, 等. 能源植物麻疯树分子育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2014, 3: 1.
- [10] Kumar N, Anand K G V, Reddy M P. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant [J]. Acta Physiol Plant, 2010, 32: 917.
- [11] Kumar N, Reddy M P. Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole ex-

plants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: a candidate biodiesel plant [J]. Ind Crops Prod, 2012, 39: 62.

[12] Kumar N, Anand K G V, Reddy M P. In vitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas* [J]. Ind Crop Prod, 2011, 33: 146.

[13] Rajore S, Batra A. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. [J]. J Plant Biochem Biotech, 2005, 14: 73.

[14] Datta M M, Mukherjee P, Ghosh B, *et al.* In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.) [J]. Curr Sci India, 2007, 93: 1438.

[15] Kalimuthu K, Paulsamy S, Senthilkumar R, *et al.* In vitro propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. [J]. Plant Tiss Cult Biotech, 2007, 17: 137.

[16] Kaewpoo M, Te-Chato S. Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry [J]. Intern J Agri Tech, 2010, 6: 391.

[17] Sharma S, Kumar N, Reddy M P. Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of in vitro regeneration [J]. Ind Crops Prod, 2011, 34: 943.

[18] Wei Q, Lu W D, Liao Y, *et al.* Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas* [J]. J Plant Physio Mol Bio, 2004, 30: 475.

[19] 杨千, 吉柔风, 李晨阳, 等. 川滇琼地区麻疯树种子核糖体失活蛋白资源调查[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2017, 54: 197.

[20] 刘伯斌, 卢孟柱, 李玲, 等. 麻疯树叶盘法高效再生的研究[J]. 林业科学研究, 2010, 23: 326.

[21] 穆燕, 侯金艳, 陈晶, 等. 油桐下胚轴直接再生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2016, 4: 1821.

[22] 张艳玲, 吴秀华, 周月, 等. ‘秦美’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2016, 38: 20.

[23] Kumar N, Reddy M P. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant [J]. Ann Appl Bio, 2010, 156: 367.

[24] Li C, Fu Q, Niu L, *et al.* Three TFL1 homologues regulate floral initiation in the biofuel plant *Jatropha curcas* [J]. Sci Rep-UK, 2017, 7: 43090.

引用本文格式:

中 文: 彭天祥, 代娇, 陈放, 等. 麻疯树根高效再生体系的建立及不定芽起源研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 779.

英 文: Peng T X, Dai J, Chen F, *et al.* Plantregeneration from root explants of *Jatropha curcas* and origin of adventitious shoots [J]. J Sichuan Univ; Nat Sci Ed, 2019, 56: 779.