

小桐子的组织培养和植株再生*

秦虹^{1,2}, 宋松泉^{1**}, 龙春林³, 程红焱⁴

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201;

3 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 4 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 以小桐子 (*Jatropha curcas*) 的胚芽、子叶、下胚轴、叶柄、叶片和茎段作为外植体, 用不同浓度的 6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 和 α -萘乙酸 (NAA) 对其进行愈伤组织的诱导和植株再生的研究。结果表明: 在 MS 培养基中加入 5.0 mg/L 6-BA 和 1.0 mg/L NAA 对愈伤组织的诱导效果最好; 加入 5.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 对不定芽的诱导最为有效, 加入 0.1 mg/L 6-BA 和 1.0 mg/L NAA 有利于芽的生长; 加入 1.0 mg/L NAA 的 1/2 MS 培养基对生根最为有利。

关键词: 小桐子; 种子; 外植体; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)06-649-04

Tissue Culture and Plant Regeneration of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae)

QIN Hong^{1,2}, SONG Song-Quan^{1**}, Long Chun-Lin³, CHENG Hong-Yan⁴

(1 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;

2 College of Landscape and Gardening, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

4 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: In this paper, plumules, cotyledons, hypocotyls, leaf blades, petioles and stalks of physic nut (*Jatropha curcas* L.) were used as explants, and callus induction and plant regeneration were studied on MS medium contained different concentrations of 6-BA and NAA. The results showed that the MS medium with 5.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA was the best for callus induction, and with 5.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA, for formation of adventitious buds, and with 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA, for bud growth, and that 1/2 MS medium with 1.0 mg/L NAA was the best for formation and growth of adventitious roots.

Key words: Callus; Explant; *Jatropha curcas* L.; Seed; Tissue culture

小桐子 (*Jatropha curcas* L.), 又名麻疯树、膏桐 (云南)、黄肿树 (广东)、假花生 (广西)、桐油树 (台湾)、南洋油桐 (日本), 为大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属半肉质的小乔木或大灌木 (林娟等, 2004), 原产中美洲, 现分布于非洲、拉丁美洲和亚洲, 绝大多数生长在美洲和亚洲

的热带地区, 在我国主要分布于云南、四川、贵州、广西、广东及台湾等地区 (钟志权, 1984)。野生小桐子种仁的最高含油量约为 60%, 超过油菜和大豆等常见的油料作物。用小桐子种子生产的新燃料可适用于各种柴油发动机, 并在闪点、凝固点、硫含量、一氧化碳排放量、颗粒值等关键

* 基金项目: 国家发展改革委员会产业化项目; 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (KSCX2-SW-117), 中国科学院“百人计划”项目, 科技部国家科技基础条件平台工作项目 (2004DKA30430)

** 通讯作者: Author for correspondence. E-mail: sqsong@xtbg.org.cn; Tel: 0691-8715474

收稿日期: 2006-07-12, 2006-08-30 接受发表

作者简介: 秦虹 (1980-) 女, 硕士研究生, 主要从事生物质能源的研究。

指标上均优于国内零号柴油;而且这种“生物柴油”除了更加清洁和高效外,还具有加工成本低廉以及可再生的优势(邓志军等,2005;Heller,1996;The national Oilseeds and Vegetable Oils Development Board,2004-2005;Openshaw,2000;Augustus等,2002)。此外,小桐子还具有很强的抗旱、耐贫瘠的习性,能在环境较差的土壤中生长而不与作物竞争耕地,因此,小桐子是目前公认的一种具有产业化应用前景的能源植物。

目前,小桐子的产量较低和适宜种植区域狭窄,严重地制约了其产业化发展。因此,选育高产、优质和抗逆性强的新品种以及随后的快速繁育就成为生物柴油发展的重要条件。林娟等(2002),陆伟达等(2003),Wei等(2004)曾以种胚、子叶、下胚轴,叶柄和叶片及上胚轴作为外植体,利用不同浓度的6-BA和吲哚丁酸(IBA)激素配比的培养基,进行了小桐子的组织培养及植株再生,但在愈伤组织的诱导率和诱导速率、芽和根的分化率和分化速率等方面都有待提高。本文以小桐子的胚芽、子叶、叶片(嫩叶)、叶柄和茎段(未木质化的枝条)为外植体,利用不同6-BA和NAA激素配比的培养基,研究了不同激素配比对不同外植体的愈伤组织的诱导以及芽和根的分化的影响,试图为高产、优质和抗逆性强的新品种的快速繁育和转基因植物提供技术参数。

1 材料和方法

1.1 材料

小桐子的种子、叶片(嫩叶)、叶柄和茎段(未木质化的枝条)均采自西双版纳勐腊县勐仑镇巴卡村寨(21°41'N,101°25'E;海拔600~700m)。

1.2 方法

1.2.1 外植体的灭菌 (a) 种子的灭菌:浸入75%酒精中2min,再放入0.1% HgCl₂溶液中20min,无菌水冲洗4次;去掉种皮后,用0.1% HgCl₂溶液灭菌5min,再用无菌水冲洗4次并浸泡1h后,剥去胚乳;(b) 叶片的灭菌:浸入75%酒精中1min,再放入0.1% HgCl₂溶液中7min,无菌水冲洗4次;(c) 叶柄的灭菌:浸入75%酒精中1min,再放入0.1% HgCl₂溶液中10min,无菌水冲洗4次;(d) 茎段的灭菌:浸入75%酒精中1min,再放入0.1% HgCl₂溶液中15min,无菌水冲洗4次。

1.2.2 培养基配方 以下培养基均附加3%蔗糖、0.9%

琼脂,pH 5.8。

- 1号:MS+BA 5.0mg/L+NAA 0.1mg/L
- 2号:MS+BA 5.0mg/L+NAA 0.5mg/L
- 3号:MS+BA 5.0mg/L+NAA 1.0mg/L
- 4号:MS+BA 2.5mg/L+NAA 0.1mg/L
- 5号:MS+BA 2.5mg/L+NAA 0.5mg/L
- 6号:MS+BA 2.5mg/L+NAA 1.0mg/L
- 7号:MS+BA 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L
- 8号:MS+BA 1.0mg/L+NAA 0.5mg/L
- 9号:MS+BA 1.0mg/L+NAA 1.0mg/L
- 10号:MS+BA 0.1mg/L+NAA 1.0mg/L
- 11号:MS+BA 0.1mg/L+NAA 0.5mg/L
- 12号:1/2MS+NAA 1.0mg/L

1.2.3 培养方法 (a) 种子:将胚接种在MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 1.0mg/L+活性炭2g的培养基上,在黑暗下培养3d后,转入光照下培养,成苗后将子叶和下胚轴分别接种在3号培养基上,依次进行愈伤组织的诱导。培养温度为24~28℃,光照强度为45μmol m⁻² s⁻¹,每天光照12h,下同。(b) 叶柄和叶片:将未木质化的叶柄切成1~2cm的切段,将叶片切成1~2cm²的小块,分别接种在2号和3号培养基上,进行愈伤组织的诱导;然后将诱导出的愈伤组织转入分化培养基上,进行丛芽的诱导。(c) 茎段:将带有节的茎段切下,接种在9号和11号培养基上,进行腋芽的诱导。(d) 根的诱导:将不定芽转移至12号培养基上进行生根培养。

2 结果

2.1 培养基的筛选

把在MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 1.0mg/L+活性炭2g的培养基上培养出的小苗取出,将子叶和下胚轴分别接种在1~9号培养基上。结果表明,子叶外植体在1~8号培养基上能形成愈伤组织(图1:a),但形成愈伤组织的速率和随后分化成不定芽的分化率不同(表1)。例如,在3号培养基上愈伤组织的形成速率较快,但在随后培养60d后,没有不定芽的分化;与3号培养基相比,1号和2号培养基上愈伤组织形成的速率较慢,但培养60d后,可以分化出不定芽(表1,图1:b),而且在培养过程中的污染率也较低;在9号培养基上不能形成愈伤组织,3号培养基对诱导愈伤组织最为有利,而1号培养基对诱导不定芽最为有效。下胚轴外植体在1~9号培养基中的愈伤组织形成和随后的不定芽分化的结果与子叶类似。

2.2 生长和分化的情况

2.2.1 胚芽的诱导 把无菌苗的胚芽切下, 接种在 11 号培养基上, 大约 10 d 后, 插入培养基的部分长出黄绿色的愈伤组织, 随后在一部分愈伤组织上长出白色的根系, 在胚芽的顶部长出一片真叶。继续培养约 30 d 后, 将顶芽从两片子叶处切下, 接种于 11 号培养基上, 生长形成小苗。切去顶芽的胚芽继续接种在 11 号培养基上, 培养 20 d 后, 会在切口处的两边长出新的芽。

2.2.2 子叶和下胚轴芽的诱导 从无菌苗上切下子叶和下胚轴, 将子叶切成 1 cm^2 的小块, 下胚轴切成 2 cm 长的切段, 接种到 3 号培养基上。子叶在 3 号培养基上培养 10 d 后, 在切口处逐渐形成愈伤组织。培养 30 d 后, 将愈伤组织转至 1 号培养基上进行不定芽的诱导, 20 d 后可观察到被诱导出的不定芽。

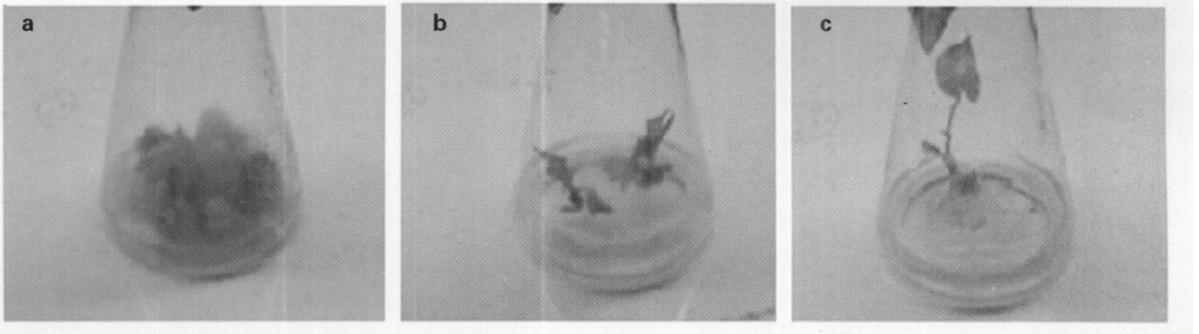


图 1 小桐子愈伤组织的诱导和植株再生。a. 愈伤组织; b. 由愈伤组织形成的不定芽; c. 不定芽生成的根

Fig. 1 Callus induction and plant regeneration of *Jatropha curcas* L. a. calli; b. adventitious buds from calli; c. root from adventitious buds

下胚轴在 3 号培养基上培养 15 d 后, 插入培养基的下胚轴基部明显地膨胀, 20 d 后在基部产生黄绿色的愈伤组织。随着培养时间的延长, 黄绿色的愈伤组织会逐渐变为透明; 将透明的愈伤组织转至 1 号培养基上, 透明的愈伤组织会逐渐变为褐色并死亡。将下胚轴接种到 2 号培养基上, 培养 20 d 后, 在基部形成透明的愈伤组织, 在切段的上部会形成细小的白色愈伤组织, 随着培养时间的延长, 白色的愈伤组织会分化出不定芽。

2.2.3 茎段、叶片和叶柄芽的诱导 将当年生未木质化的茎段灭菌后切成小段, 每段带有一个节, 接种到 9 号培养基上。大约 10 d 后, 在叶腋处长出腋芽, 而且在茎段的基部也长出愈伤组织。将其形成的腋芽切下, 接种于 9 号培养基, 形成小苗。

表 1 不同 6-BA 和 NAA 配比的培养基对子叶愈伤组织形成和随后不定芽分化的影响

Table 1 Effects of media with different 6-BA and NAA concentrations on callus formation and subsequently adventitious buds differentiation from *Jatropha curcas* cotyledons

培养基	形成愈伤组织 (%)	形成愈伤组织的最初时间 (d)	接种 30 d 后的污染情况	接种 60 d 后不定芽的分化率 ^a (%)
1	100	17	+	80
2	100	13	+	20
3	100	10	++	0
4	100	16	++	20
5	100	20	++++	0
6	100	16	+++	0
7	100	20	+++	0
8	100	20	+++	0
9	0	-	-	0

^a 分化率为分化瓶数占总接种瓶数的百分比; 培养温度为 24~28℃, 光照强度为 $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 每天光照 12h

将经过灭菌的叶片切成 1 cm^2 左右的小块, 接种于 3 号培养基上, 培养约 20 d 后, 在切口处有愈伤组织形成; 再培养 40 d, 将愈伤组织转至 1 号培养基上, 继续培养 30 d 后, 可诱导不定芽形成。

将经过灭菌的叶柄切成 1 cm 左右的切段, 接种于 2 号培养基上。约 10 d 后可观察到叶柄切段的上部裂开, 继续培养 15 d 后, 在裂开处逐渐形成愈伤组织, 此后愈伤组织不断膨大; 约 60 d 后, 在愈伤组织上有不定芽出现; 将产生的不定芽切下并转至 10 号培养基上, 剩余部分继续放入原来的培养基中, 可以继续产生不定芽。

2.2.4 芽的生长和生根 将分化产生的不定芽转入 11 号培养基中, 不定芽逐渐长大; 培养 30 d 后, 不定芽长到 2~3 cm; 然后转入 12 号培养基, 10 d 后, 不定芽基部膨大, 在膨大的部分有

白色的根系长出 (图 1: c)。当小苗的根系长到 5 cm 时, 开始练苗; 把经过练苗的小苗洗去琼脂, 移栽到装有蛭石和腐植土 (1: 1) 的育苗钵中, 以渗透浇水的方式浇透水, 生长情况良好。

3 讨论

关于小桐子的组织培养, 在国内外仅有少量的文献报道 (林娟等, 2002; 陆伟达等, 2003; Sardana 等, 2000; Wei 等, 2004)。在这些仅有的报道中, 在以小桐子的子叶、下胚轴和真叶为外植体进行组织培养和植株再生时都是采用不同的 6-BA 和 IBA 配比的培养基 (林娟等, 2002; 陆伟达等, 2003; Sardana 等, 2000; Wei 等, 2004)。经本实验室的重复实验发现, 6-BA 和 IBA 配比的培养基存在愈伤组织形成缓慢、愈伤组织小、分化率低等问题。使用 6-BA 和 NAA 配比的培养基, 则愈伤组织形成的速率较快, 愈伤组织较大, 并且分化率也相应地提高。

本文以小桐子的子叶和下胚轴为外植体, 采用 MS+ BA 5.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L 培养基, 可以较快地形成愈伤组织, 在 MS+ BA 5.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 培养基上可以有效地诱导出不定芽, 分化率高达 80%。以胚芽、茎段、叶片和叶柄为外植体, 在合适的培养基上也成功地诱导出幼苗。

此外, 用 75% 酒精和 0.1% HgCl₂ 灭菌不同外植体的效果随时间延长而加强 (未表明数据)。值得注意的是, 当灭菌时间较长时, 外植体会受到伤害, 甚至死亡。

〔参 考 文 献〕

- 钟志权, 1984. 小桐子一种大有希望的能源植物 [J]. 热带植物研究, 25: 62—65
- Augustus GDPS, Jayabalan M, Seiler GJ, 2002. Evaluation and bioinduction of energy components of *Jatropha curcas* [J]. *Biomass Bioenergy*, 23: 161—164
- Deng ZJ (邓志军), Cheng HY (程红焱), Song SQ (宋松泉), 2005. Studies on *Jatropha curcas* seeds [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 27: 605—612
- Heller J, 1996. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. I. Physic nut (*Jatropha curcas* L.) [Z]. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Lin J (林娟), Tang L (唐琳), Chen F (陈放), 2002. Tissue culture and plantlet regeneration of *Jatropha curcas* [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 6 (3): 38
- Lin J (林娟), Zhou XW (周选围), Tang KX (唐克轩), et al, 2004. A survey of the resources of *Jatropha curcas* [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 12 (3): 285—290
- Lu WD (陆伟达), Wei Q (魏琴), Tang L (唐琳), et al, 2003. Induction of callus from *Jatropha curcas* and rapid propagation [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 9 (2): 127—130
- Openshaw K, 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant unfilled promise [J]. *Biomass Bioenergy*, 19: 1—15
- Sardana J, Batra A, Ali DJ, 2000. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. [J]. *Phytomorphology*, 50 (3-4): 239—242
- The National Oilseeds and Vegetable Oils Development Board. 21 St. Annual Report [R]. 2004-2005, Ministry of Agriculture of India
- Wei Q, Lu WD, Liao Y, et al, 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas* [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 30 (4): 475—478