

文章编号: 0490-6756(2006)05-1116-05

麻疯树的促腋芽分枝快繁及生根诱导

李化, 曾妮, 贾勇炯, 唐琳*, 陈放

(四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要:为了保存、推广和改良麻疯树的种质,对麻疯树进行了促腋芽分枝和生根诱导实验.发现KT、2,4-D的激素搭配适于诱导愈伤;培养基MS+1.0 mg/L BA+0.01 mg/L IBA+5.0 mg/L AgNO₃的腋芽分枝效果较好;pH值的变化对腋芽分枝的影响不大;采用瞬时高浓度生长素刺激或者无激素的活性炭培养基都能得到92%以上的生根率.

关键词:麻疯树;腋芽诱导;快繁;生根诱导

中图分类号:Q943 **文献标识码:**A

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)属于大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属(*Jatropha*)落叶灌木或小乔木,原产于热带美洲,分布于世界热带亚热带地区.在我国栽培或半野生于台湾、广东、广西、四川、贵州、海南和云南^[1].麻疯树的有效成分可以用于抗肿瘤、抗病毒以及生物防治等^[2].它的种子含油量高,其种仁含油约50%^[3].种子油略微加工就可以作为柴油的替代品.而且麻疯树耐干旱贫瘠,是干热河谷地区荒山造林的好树种,因此具有广泛的开发利用前景.

促进腋芽分枝是快繁中一种重要的离体繁殖方法.腋芽增殖产生的枝条是由原本存在的营养分生组织发育而来,保持原无性系的基因型和表现型.因为它方法简便,繁殖速度快,且可保持遗传稳定性,所以广泛用于园艺、农林果树的繁殖.

目前对麻疯树愈伤诱导快繁的报道较多^[4-6],但关于促腋芽分枝和生根诱导的报道还很少.本实验主要针对影响麻疯树促腋芽分枝和生根的培养条件开展研究,为麻疯树优良种质的保存、推广及改良奠定基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为2003年8月份采自四川省攀枝花市的麻疯树种子.实验采用的BA(Benzylaminopurine, 6-苄基腺嘌呤)、NAA(Naphthylacetic acid, 萘乙酸)、IBA(Indole butyric acid, 吲哚丁酸)、KT(Kinetin, 激动素)、2,4-D(dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-二氯苯氧乙酸)和AgNO₃(硝酸银)等均为化学纯.

1.2 实验方法

1.2.1 无菌苗培养 剥开麻疯树种子的种皮,取出种仁,放入70%酒精中摇动1min,弃去酒精,再用0.1%HgCl₂溶液消毒7min,弃去HgCl₂,无菌水冲洗3次,彻底洗去残余HgCl₂,再加无菌水浸泡48h.之后倒掉无菌水,按上述消毒过程再操作一次.吸干种仁表面的水份后,用刀片沿纵轴切开种仁(胚乳),剥出两片白色子叶(两片子叶基部夹带有种胚),将子叶接种在培养基(1)~(3)中培养.培养基pH值5.8,培养

收稿日期:2005-12-28

基金项目:“十五”国家科技攻关项目(2004BA411B01);四川省科技攻关项目(2006Z07-004-01)

* 通讯作者. Tel:028-85417281; E-mail: tanglin@scu.edu.cn

温度为 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照度 2000lx , 光照时间 12h/d .

1.2.2 促腋芽分枝 取萌发 $20\sim 30\text{d}$ 的无菌苗, 将胚芽切下, 分别接种在培养基(4)~(17)中, 诱导腋芽, 培养方式同上. 培养一个月后, 测定腋芽诱导量.

1.2.3 生根诱导 待诱导的腋芽长到 $1\sim 2\text{cm}$ 时, 切下芽, 一部分移至生根培养基(见表 5)中诱导生根. 另一部分采用高浓度生长素瞬时刺激的方式诱导生根, 先将芽的切口在灭过菌的 200mg/L 的 NAA 中浸泡 1h , 再移至生根培养基中. 同时作空白对照, 培养方式同上. 培养 40d 后, 统计生根率.

1.2.4 培养苗的移栽和管理 将生了根的苗打开瓶口练苗 3d 后从培养容器中取出, 在清水中浸泡 12h , 完全洗去其根上的培养基后, 小心的转至装满蛭石的花盆中, 每日用清水浇灌, 保持基质的湿润和通气.

2 结果与分析

2.1 激素对无菌苗萌发的影响

由于每个叶片的叶腋都有腋芽原基, 为了得到更多的腋芽分枝, 首先要得到更多的叶片. 所以我们首先选择能产生较多叶片的培养基进行无菌苗的萌发. 从表 1 可以看出, 在基本的 MS 培养基上通过 25d 的培养, 有 53.33% 的植株能长出 4 片真叶, 100% 植株根部发育正常, 没有形成任何愈伤组织. 在添加了少量细胞分裂素 BA 的 MS 培养基上, 无菌苗发育迅速, 有 84.38% 的植株长出了 4 片以上的真叶, 它们的茎明显较无激素的植株粗壮, 有 90.63% 的植株在根部形成绿色球状愈伤. 甚至有一部分植株在根部只形成愈伤, 完全不长根. 在添加了少量生长素 NAA 的 MS 培养基上, 无菌苗发育缓慢, 仅有 9.68% 的植株能长出一片真叶, 所有植株的根部异常发达, 分枝多且粗壮.

表 1 不同激素对麻疯树真叶形成的影响*

Tab.1 Effect of hormone on *J. curcas* leaves formation

培养基	激素浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		接种总胚数(个)	有四片以上真叶的 无菌苗数(个)	正常长叶率(%)
	BA	IBA			
(1)	0	0	30	16	53.33
(2)	0.1	0	32	27	84.38
(3)	0	0.1	31	0	0.00

* 培养 25d 后统计(基本培养基为 MS 培养基)

不同培养基对无菌苗真叶的形成产生明显影响. 添加细胞分裂素 BA 可以抑制根的形成, 促进侧芽生长, 产生大量真叶. 添加生长素 NAA 可以促进根部发育, 抑制地上部分的形态发育. 从本实验结果看, 在培养基 MS+ 0.1mg/L BA 上, 麻疯树无菌苗的真叶生长情况最佳.

2.2 培养基对腋芽诱导的影响

2.2.1 不同激素配比的影响 为了得到较好的腋芽诱导效果, 我们先选取了 4 种不同激素, 2 个体系的激素配比方案. 从表 2 中可以看出, BA 和 IBA 的搭配比较适合于麻疯树的腋芽诱导. 在培养基(4)~(6)上, 胚芽切口处都会形成一团绿色的愈伤组织, 而后胚芽上部开始发育, 在叶腋处长出腋芽. 而在 KT、2, 4-D 搭配的培养基上, 接种的胚芽大多数都没有生长发育的迹象, 一直比较细小. 在培养基(7)上, 胚芽切口处几乎无愈伤生长. 在培养基(8)上, 胚芽切口处有绿色愈伤生长, 大小为胚芽直径的 $3\sim 5$ 倍. 在培养基(9)上, 胚芽切口处有大量白色半透明的愈伤生长, 大小为胚芽直径的 $6\sim 7$ 倍. 本实验中, 采用培养基 MS+ 2mg/L BA+ 0.01mg/L IBA, 腋芽的诱导率最高, 外植体平均诱导腋芽数可达 5.3. 采用 KT、2, 4-D 的激素搭配不适于腋芽的诱导, 培养基 MS+ 2mg/L KT+ 0.1mg/L 2, 4-D 最适于诱导形成大量的愈伤.

2.2.2 BA 梯度的影响 陆伟达等^[5]曾报道, BA 在麻疯树下胚轴的愈伤组织出芽过程中起主要作用, IBA 可能起协同作用. 这与前面 BA 能刺激无菌苗大量长叶的结果有相似之处. 所以我们进行了一个 BA 梯度实验, 以求得到最佳的腋芽诱导 BA 浓度. 附加 AgNO_3 有利于芽的形成, 同时有助于防止褐化, 减少畸形苗. 从表 3 中可以看出, 随着 BA 浓度的增加, 腋芽诱导数也大量增加. 如在培养基 MS+ 2mg/L BA+

0.01 mg/L IBA + 5 mg/L AgNO₃上,外植体平均腋芽诱导数可达 8.35.但是在这种 BA 浓度下,正常的苗芽数并不高.一方面腋芽都密集于迅速膨大的茎尖上不便于操作,另一方面,在高浓度 BA 诱导下产生的苗芽容易变异,成为畸形苗.所以我们认为培养基 MS + 1.0mg/L BA + 0.01mg/L IBA + 5mg/L AgNO₃的效果较好,外植体平均出芽数可达 3.65,畸形苗也少.

表 2 不同激素对比对麻疯树腋芽诱导的影响*

Tab.2 Effect of hormone on *J. curcas* axillary buds induction

培养基	激素浓度(mg·L ⁻¹)		接种外植体数(个)	诱导腋芽数(个)	外植体平均诱导腋芽数(个)
	BA	IBA			
(4)	2.0	0.01	20	106	5.30
(5)	2.0	0.05	20	84	4.20
(6)	2.0	0.1	20	65	3.25
	KT	2,4-D			
(7)	2.0	0.01	20	2	0.10
(8)	2.0	0.05	20	0	0.00
(9)	2.0	0.1	20	0	0.00

* 培养一个月后统计(基本培养基为 MS 培养基)

表 3 BA 梯度对麻疯树腋芽诱导的影响*

Tab.3 Effect of concentration of BA on *J. curcas* axillary buds induction

培养基	激素浓度(mg·L ⁻¹)			接种外植体数(个)	诱导腋芽数(个)	外植体平均诱导腋芽数(个)
	BA	IBA	AgNO ₃			
(10)	0.1	0.01	5.0	20	9	0.45
(11)	0.5	0.01	5.0	20	24	1.20
(12)	1.0	0.01	5.0	20	73	3.65
(13)	1.5	0.01	5.0	20	98	4.90
(14)	2.0	0.01	5.0	20	167	8.35

* 培养一个月后统计(基本培养基为 MS 培养基)

2.2.3 pH 梯度的影响 由于 pH 值对营养物质和植物激素的吸收有影响,我们进行了一个 pH 梯度实验.从表 4 中可以看出,pH 值在 4.8~6.8 的范围内变化,对麻疯树腋芽诱导的影响不大.

表 4 pH 梯度对麻疯树腋芽诱导的影响*

Tab.4 Effect of pH on *J. curcas* axillary buds induction

培养基	pH 值	激素浓度(mg·L ⁻¹)			接种外植体数(个)	诱导腋芽数(个)	外植体平均诱导腋芽数(个)
		BA	IBA	AgNO ₃			
(15)	4.8	1.0	0.01	5.0	20	70	3.50
(16)	5.8	1.0	0.01	5.0	20	71	3.55
(17)	6.6	1.0	0.01	5.0	20	74	3.70

* 培养一个月后统计(基本培养基为 MS 培养基)

2.3 生根方式对诱导腋芽生根的影响

从表 5 中可以看出,由高浓度 BA (>0.5 mg·L⁻¹) 诱导产生的腋芽,不能像由低浓度 BA (<0.5 mg·L⁻¹) 诱导产生的腋芽一样,在 MS 培养基上自发的生根.从中我们可以推断麻疯树的内源生长素含量是比较高的,所以能在缺乏外源生长素刺激的情况下自发生根.这与麻疯树有较高的扦插成活率的报告是一致的^[7].

表 5 不同生根方式对诱导腋芽生根的影响 *
Tab.5 Effect of different rooting methods on buds rooting

培养基	接种外植体种类	接种外植体数(个)	生根外植体个数(个)	生根率(%)
MS	由低浓度 BA($<0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的腋芽	20	13	65
MS	由高浓度 BA($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的腋芽	20	0	0
MS+ $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭	由高浓度 BA($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的腋芽	50	50	100
MS	由高浓度 BA($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的,且经过瞬时刺激的腋芽	50	46	92

* 培养 40d 后统计

但是当麻疯树外植体经过高浓度的 BA 诱导快繁后,内部细胞分裂素的含量被提高,从而不能在缺乏外界生长素刺激的情况下自发生根. 所以需要生长素刺激:将诱导芽切下以后,把切口放在 $200\text{mg}/\text{L}$ 的 NAA 中浸泡 1h,然后再移植入 MS 培养基中培养. 实验结果表明,采用这种方式的生根率达 92%. 这种方式生成的根与低浓度 BA 培养的外植体自然生成的根(图 1)相似,根比较粗壮,带绿色. 只是经过瞬时刺激产生的根的数量远远较自发的根要多(图 2).

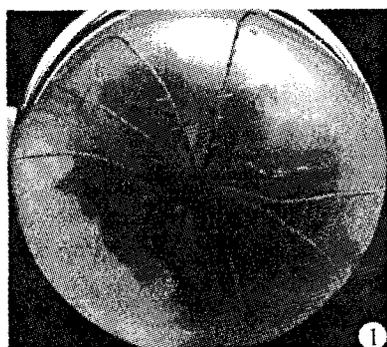


图 1 由低浓度 BA($<0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的腋芽在 MS 培养基上生根

Fig.1 Rooting of the axillary buds induced by low concentration of BA ($<0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in MS medium

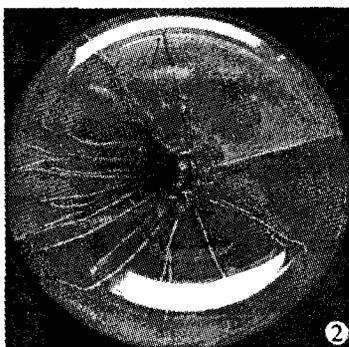


图 2 由高浓度 BA($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的,且经过瞬时刺激的腋芽在 MS 培养基上生根

Fig.2 Rooting of the axillary buds induced by high concentration of BA ($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and stimulated with high concentration of auxin short time in MS medium

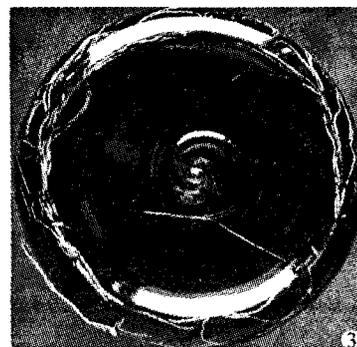


图 3 由高浓度 BA($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导在腋芽在 MS+ $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭培养基上生根

Fig.3 Rooting of the axillary buds induced by high concentration of BA ($>0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in MS+ $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ active carbon medium

我们还另外采用了添加活性炭的 MS 进行生根诱导,生根率达到 100%. 这种方式诱导的根又细又白(图 3),和刺激产生的根相比要长很多.

2.4 培养苗的移栽和管理

自然生根和刺激生根的培养苗的移栽成活率达 85%;活性炭生根的成活率略低,为 72%. 因为活性炭诱导产生的根又细又长,在清洗根部附着的培养基时,根容易被折断,从而影响了培养苗的移栽成活率.

3 讨论

通过不同的培养条件,探索麻疯树促腋芽快繁的最佳方式. 结果发现,激素的种类和浓度对腋芽的诱导有很大影响. BA 在诱导过程中表现为主要作用,IBA 表现为协同作用. 但是目前得到的外植体平均诱导腋芽数的值还仅为 3.65. 当 BA 浓度高时,诱导腋芽数增加,因为细胞分裂素可以促进细胞分裂,打破顶端优势,促进侧芽的产生与增殖. 但是畸形苗的数量也随之增加,其原因有待进一步研究.

pH 梯度对麻疯树腋芽诱导的影响很小,说明在腋芽诱导过程中,适宜 pH 值的范围较宽.可能这也是麻疯树耐贫瘠,分布广的原因之一.

实验中发现,培养基中添加 5mg/L AgNO_3 能够防止褐化,减少畸形苗,促进芽的分化.组织学研究表明, AgNO_3 可使薄壁细胞直接参与形成芽原基并发育成苗,不定根和愈伤组织的形成及生长则被抑制.有人认为 AgNO_3 可能抑制乙烯产生,从而提高芽分化,但 Roustan^[8] 等研究表明, AgNO_3 并非抑制乙烯合成,而是通过促进多胺合成而提高器官发生和体细胞胚胎发生频率.虽然 AgNO_3 的作用机理有待继续研究,但都证明 AgNO_3 可以提高芽分化^[9].

芽的生根需要生长素刺激,但是生长素主要在根诱导和启动阶段(即生长素敏感期)发生作用,在根的伸长阶段并非必需,而且会抑制根的生长发育及产生愈伤组织^[10].所以采用高浓度生长素瞬时刺激的方式,这样不仅可以提高生根率和有效根的数目,而且可以限制苗芽基部愈伤组织的生成.这样做比常用的两步法生根要经济而且简便.采用添加了活性炭的 MS 培养基也取得了很好的生根效果.其原因可能是因为活性炭吸附了外植体释放的细胞分裂素以及其它有毒害的物质,解除了这些物质对生根的抑制.活性炭具体的作用机制还有待继续研究.

参考文献:

- [1] 扬钦周.四川树木分布[M].贵阳:贵州科技出版社,1997.
- [2] 林娟,周选围,唐克轩,等.麻疯树植物资源研究概况[J].热带亚热带植物学报,2004,12(3):285.
- [3] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴[M].北京:科学出版社,1980.
- [4] 林娟,唐琳,陈放.麻疯树的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,2005,38(3):252.
- [5] 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.
- [6] Wei Q, Lu W D, Liao Y, et al. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas* [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004,30(4): 475.
- [7] 施宗明,李云,罗玉兴,等.能源植物小桐子的开发利用和栽培研究[J].云南师范大学学报,1992,12(2): 31.
- [8] Roustan J P, Latche A, Fallot J. Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid[J]. Biologic Plantarum, 1990, 32(4): 273.
- [9] 许本波,张学昆,殷家明,等.培养条件对甘蓝型黄籽油菜下胚轴的再生影响[J].中国油料作物学报,2003,25(4): 23.
- [10] 郑成木,刘进平.热带亚热带植物微繁殖[J].长沙:湖南科学技术出版社,2001.

Enhanced Axillary Branching and Rooting Induction of *Jatropha curcas*

LI Hua, ZENG Ni, JIA Yong-jiong, TANG Lin, CHEN Fang
(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Enhanced axillary branching and rooting induction of *Jatropha curcas* were researched, to save, exploit and optimize the qualities of *J. curcas*. The results showed that compounding of KT、2,4-D was good for callus inducement; axillary buds induced well in the medium of MS + 1.0mg/L BA + 0.01 mg/L IBA + 5.0mg/L AgNO_3 ; effect of pH was low; ratio of rooting could get to 92%, both by stimulated with high concentration of auxin short time or cultured in the active carbon medium.

Key words: *Jatropha curcas*; axillary bud inducement; rapid propagation; rooting inducement