

麻疯树组培快繁技术研究进展

袁瑞玲, 郎南军, 陈芳, 吴涛, 孔继君 (云南省林业科学院, 云南昆明 650204)

摘要 综述了近年来麻疯树组培快繁技术中不同外植体、激素、其他添加物及培养条件对麻疯树愈伤组织的诱导、芽的分化与增殖的影响, 以及生根培养和驯化移栽等方面的研究进展, 并提出了继续深入研究的建议。

关键词 麻疯树; 组培快繁; 研究进展

中图分类号 S722.37 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12587-02

Research Progress of Tissue Culture and Rapid Propagation of *Jatropha curcas*

YUAN Rui-ling et al (Yunnan Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650204)

Abstract The progress of tissue culture and rapid propagation of *Jatropha curcas* in past few years was reviewed, which included the effects of different explants, hormones and other nutrition compositions and culture conditions on the inducement, multiplication and differentiation of callus, rooting and transplantation of plantlet. The suggestions for further research in tissue culture were put forward.

Key words *Jatropha curcas*; Tissue culture and rapid propagation; Research progress

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)又名小桐子、膏桐、黑皂树、芙蓉树、臭油桐等,为大戟科麻疯树属落叶灌木或小乔木,原产热带美洲,现广泛分布于世界热带地区,在我国分布于云南、四川、广西、广东、海南等地^[1]。麻疯树是优质的石油植物,其籽油经改性后可适用于各种柴油机使用,各项性能优于国产零号柴油;其副产品甘油、卵磷脂具有较高的经济价值^[2-3];其毒蛋白、麻疯酮等活性成分具有抗病毒、抗肿瘤等多种功效;是生物农药、制皂、制漆、饲蚕及化妆品生产等的重要原料;并且又是扶贫和生态环境建设的重要树种^[4-7],因此具有明显的经济生态效益和广泛的开发利用前景。

目前,麻疯树的产量低、品质良莠不齐和适种区域狭窄等问题制约了其产业化发展。因此,选育高产、高抗、高含油率品种及随后的快繁就成为其产业化发展的重要条件。利用组织培养法对具有优良品种特性的麻疯树进行快速繁殖,可在短期内得到大量整齐均匀的健壮种苗,有利于优良品种的产业化推广。近年来,麻疯树组织培养的研究报道日渐增多,笔者概述了近年来麻疯树组织培养与快繁技术的研究进展,包括外植体和激素的选择以及生根培养和驯化移栽等,以期对麻疯树的产业化生产发展提供参考。

1 外植体的选取

1.1 外植体的类型 理论上,麻疯树植株上的任何器官均可诱导产生愈伤组织。近年来研究报道选用的外植体有胚芽、子叶^[8]、下胚轴、叶片、叶柄^[9]、茎段^[10-11]、胚乳^[12]、花药^[13]和上胚轴^[14]等。其中,以子叶、叶片、叶柄、胚乳、花药作为外植体的组织培养与植株再生是通过先诱导产生愈伤组织,进而诱导分化出芽实现的。上胚轴和下胚轴可以先诱导产生愈伤组织后诱导分化出芽,也可以直接从表面直接诱导分化产生不定芽,这种方式比先形成愈伤组织的方式要节省时间^[14]。胚芽、茎段外植体是直接诱导出腋芽。在这些研究报道中,选取的外植体不同,愈伤组织的诱导及芽的分化率有很大差异。

1.2 外植体的灭菌 有关麻疯树的组织培养大多采用浓度

0.1% HgCl₂ 配合 70%~75% 酒精进行消毒灭菌。林娟等认为,种子去壳后在浓度 0.1% HgCl₂ 中浸泡 30 min,无菌水冲洗 3 次,转入浓度 70% 酒精中消毒 5 min 能达到理想的灭菌效果^[8]。陆伟达等将麻疯树的叶片和叶柄放入浓度 75% 酒精中摇 30 s,再转入浓度 0.1% HgCl₂ 中消毒 8 min,灭菌效果较好^[9]。但侯佩等认为,HgCl₂ 有剧毒,消毒后须用大量无菌水反复漂洗,但仍难以彻底消除残留 HgCl₂ 对外植体的毒害,而经 NaClO 消毒处理后易于除去残留,且其毒性较低。他们对麻疯树胚乳外植体用浓度 70% 酒精处理 30 s,然后用浓度 10% NaClO 处理 25 min,灭菌效果最佳^[12]。而对于采自野外的幼嫩枝条,有报道先用洗衣粉浸泡并用软毛刷擦洗,自来水冲洗 1~2 h 后,剪成短枝条在浓度 75% 酒精中浸泡 10 min,无菌水冲洗 6 次能达到灭菌效果^[10]。

2 诱导分化研究

组培快繁关键要获得大量芽苗,而芽苗产生是从器官发生开始的,其有 2 条途径:直接器官发生和间接器官发生。直接器官发生是从起始外植体上诱导出芽或根,不经愈伤组织阶段;间接器官发生是从起始外植体先诱导出愈伤组织,再从愈伤组织诱导产生芽或根。

2.1 愈伤组织的诱导 不同研究者因选用的外植体、激素种类和浓度不同,得出的试验结果有较大差异。只有添加合适激素的培养基才能诱导愈伤组织生长、分化以及根芽器官发生。已有的研究报道中常用的细胞分裂素有 6-BA 和 KT,生长素有 IBA、NAA、2,4-D。有关研究表明,单独使用较高浓度的生长素 IBA、NAA,均可从麻疯树的下胚轴、叶柄和叶片中诱导出愈伤组织,但不会有根芽器官发生^[15-16]。只有混合使用细胞分裂素和生长素才能有器官形成。目前,多数研究者认为,6-BA + IBA 的激素组合适于麻疯树愈伤组织的诱导和分化^[8-10,14,16]。陆伟达等研究指出,IBA 在愈伤组织的诱导过程中起主要作用,6-BA 起协同作用,提高 IBA 的浓度对愈伤组织的诱导有很好的效果,当 IBA 浓度为 1 mg/L 时,下胚轴、叶柄、叶片的愈伤组织诱导率均在 85% 以上^[9]。魏琴等以 MS + 6-BA 0.1~1.0 mg/L + IBA 0.5~1.5 mg/L 培养基诱导麻疯树上胚轴愈伤组织,诱导率颇高,达 82%~100%,但其中只有 3 组培养基诱导的愈伤组织能分化出小苗,最佳的分化培养基是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 1.0

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD32B02)子项目资助。

作者简介 袁瑞玲(1982-),女,云南寻甸人,硕士,研究实习员,从事林木遗传育种与生理生化研究。

收稿日期 2008-07-23

mg/L,分化率44%^[14],这种情况,林娟等^[8]也有类似报道。而秦虹等研究发现,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。采用MS+6-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+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基上可以有效地从子叶、下胚轴诱导出不定芽,分化率高达80%^[17]。也有一些研究人员认为,KT、2,4-D或KT、NAA的激素搭配适于诱导愈伤组织^[12-13,18]。

2.2 芽的分化与增殖 一般认为,在诱导分化阶段对细胞分裂素浓度要求较高,而生长素浓度要求较低,目前常用6-BA和IBA激素组合。如MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.01 mg/L+AgNO₃ 5 mg/L培养基对胚芽诱导产生腋芽时的诱导作用最好,外植体平均腋芽诱导数可达8.35,且在培养基中加入5 mg/L AgNO₃添加物能防止褐化,减少畸形苗,促进芽的分化^[18]。魏琴等的研究表明,在6-BA 0.2~0.7 mg/L与IBA 0.1 mg/L组合的条件下,不定芽从上胚轴外植体的表面直接被诱导分化,其中以在MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L培养基上的诱导率最高,为38%,比林娟等的下胚轴表面直接诱导分化出芽率21%要高^[14]。有研究表明,对于茎段芽的诱导,不必添加外源激素,在MS培养基上即有较高的出芽率,为75%,但产生的芽细小,生长缓慢,如果在MS中添加6-BA,可使诱导芽正常生长。在6-BA和IBA配比的培养基中,随着6-BA浓度的增加,芽增殖率随着升高。但能诱导叶片、叶柄和下胚轴愈伤组织形成不定芽的6-BA、IBA激素组合并不能诱导茎段芽的形成,说明不同外植体的内源激素有很大区别,并且不同外植体细胞的分化速度也不同,这些都和不同外植体的再生潜力密切相关^[10]。Kalimuthu等研究发现,高浓度的植物生长素会抑制细胞形态发生,低浓度的KT+IAA和稍高浓度的BAP诱导出芽最佳,在MS+BAP 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L培养基上培养30~40 d,每个外植体诱导出芽多达30~40个,并且在10周内成功获得小植株^[11]。

2.3 根的诱导 对于麻疯树再生苗的生根,一些研究人员认为,用MS基本培养基即可,生根率可达78.3%~86.0%^[8-10,14]。一些研究人员认为,添加合适的激素生根效果更加,更有利于后期的移栽。目前常用的激素有NAA、IAA、IBA。有的认为加入1.0 mg/L NAA的1/2 MS培养基对生根最为有利^[17]。有的认为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。采用高浓度生长素瞬时刺激的方法,将芽苗切口放在200 mg/L的NAA中浸泡1 h,然后再移入MS培养基中培养,生根率达92%^[18-19]。Kalimuthu等研究认为,MS+IAA 1.0 mg/L培养基生根效果最佳,6~7 d 100%生根,而IBA不适合生根,因为会在切口部位形成愈伤组织^[11]。该结论与Sujatha M等的研究结果^[15]一致。而Mukul等的研究与上述研究结果差异较大,他们认为,MS+IBA是最佳培养基,而MS或1/2 MS培养基不能诱导生根^[20]。Ro-

jore等以茎尖为外植体的研究也认为,MS与IBA配比的培养基适合生根^[21]。

3 培养条件

所有培养基均附加3%蔗糖,0.4%~0.8%琼脂,pH值5.8~6.0。培养温度(25±2)℃,光照度1 500~3 000 lx,光照时间12~14 h/d。

4 驯化移栽

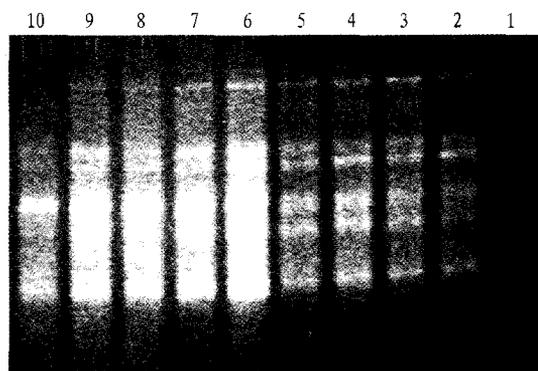
组培苗移栽成活率直接影响麻疯树组培效率及育苗生产的成败。而移栽成活率与移栽环境、基质等因素有关。小苗在瓶内处于高湿和温度、光照相对稳定的环境中,因此出瓶前必须经过一段时间的练苗。移栽前将培养瓶盖打开,炼苗2~3 d,然后将苗取出,洗净附着根系的培养基,即可移栽到装有基质的小花盆中生长。基质的种类不同,提供的水、肥、气、热状况不同,基质的选择直接影响再生苗移栽的成活率和移栽后的生长状况。在麻疯树组培苗的驯化移栽研究中,以椰壳糠:珍珠岩:有机复合肥=1:1:1为基质的移栽成活率高达85%^[11];采用蛭石:腐殖土=1:1为基质,以渗透浇水的方式浇透水,成活率可高达87%^[8,17,20];也有用蛭石^[9],干净河沙^[10]为基质的,以浓度1 mg/L的IBA溶液浇灌湿透,再用塑料薄膜封好,待新根长出可逐渐揭开薄膜炼苗,注意管理,一个月左右移到土壤中定植,成活率达80%以上。

5 建议

近年来,尽管国内外在麻疯树组培快繁方面的研究取得了一定进展,但仍存在一些问题,而且有些研究结果不一致,说明不同外植体对培养基激素的要求不同。因此,应对麻疯树组织培养的影响因素进行更加细致系统的研究,以更好地实现麻疯树的快繁。另一方面,目前关于麻疯树组织培养遗传稳定性方面的研究很少,由于愈伤组织细胞再生的植株容易发生变异,因此需要对麻疯树组培苗是否易发生变异作进一步的深入研究。此外,目前的研究仍停留在实验室阶段,尚未进行工厂化育苗,以后的研究应该包括生产实践方面。

参考文献

- [1] 张明生,樊卫国,尹杰,等.麻疯树资源概况及其开发利用[J].贵州农业科学,2005,33(6):97-98.
- [2] 何文淑,肖文贵,杨晓琼,等.麻疯树在贫困地区农村发展和生态建设中的开发前景[J].中国中医药信息杂志,2002,9(10):31-33.
- [3] 杨顺林,范月清,沙毓沧,等.麻疯树资源的分布及综合开发利用前景[J].西南农业学报,2006(19):447-452.
- [4] 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,1996:148.
- [5] 万泉.能源植物的开发和应用[J].福建林业科技,2005,32(2):1-5.
- [6] 李振华,郭子琦,麻德平,等.能源植物小桐子的研发现状及展望[J].河南农业科学,2007(7):10-12.
- [7] 刘杰,李黔柱,尹航,等.麻疯树植物资源的研究与开发利用进展[J].贵州大学学报:自然科学版,2006,23(2):105-110.
- [8] 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,2002,38(3):252.
- [9] 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.
- [10] 陈金洪,高敏,黄记生.麻疯树茎段离体培养及快速繁殖研究[J].广西农业科学,2006,37(3):221-223.
- [11] KALIMUTHU K, PAULSAMY S, SENTHILKUMAR R, et al. *In vitro* propagation of biodiesel plant *Jatropha curcas* L. [J]. Plant Tissue Cult & Biotech, 2007, 17(2):137-147.
- [12] 侯佩,张淑文,杨琳,等.麻疯树胚乳愈伤组织诱导及其污染消除[J].应用与环境生物学报,2006,12(2):264-268.
- [13] 任琛,侯佩,邓骛远,等.麻疯树花药愈伤组织诱导的初步研究[J].四川大学学报:自然科学版,2006,43(3):717-719.



注:1~10 分别为 0.02、0.05、0.08、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 $\mu\text{mol/L}$ 引物浓度。

Note:1~10 are 0.02,0.05,0.08,0.10,0.15,0.20,0.30,0.40,0.50,0.60 $\mu\text{mol/L}$ primer concentration.

图7 引物量对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig.7 Effects of primer concentration on ISSR-PCR amplification

试验用的 Taq 酶所带的 $10 \times$ Buffer 有 2 种:一种含有 Mg^{2+} (15 mmol/L),随 Buffer 一起加入;另一种不含 Mg^{2+} ,需另加。试验发现,20 μl 反应体系加入 2 μl 含 Mg^{2+} 的 $10 \times$ Buffer 即可满足 Mg^{2+} 的需要,无需另加 Mg^{2+} ,这样可简化试验操作。另外,在延伸时间和循环数上借鉴了另一种山茶科植物金花茶的 ISSR-PCR 反应程序^[13],延伸时间 2.0 min,40 个循环,效果良好,故未作进一步优化。

3 讨论

贵州石笔木 DNA 提取方法的研究尚未见报道,从该试验结果看出,SDS 法略优越于 CTAB 法,虽然提取 DNA 的量稍少,但质量更高些,在材料来源没有什么限制的情况下不失是一种高效、快速、经济的石笔木基因组 DNA 提取法;而 CTAB 法提取 DNA 时得率较高,虽然质量不如 SDS 法好,但也可满足一般的分子标记的需要,若对于 DNA 质量要求不高,也可利用此法进行提取。从石笔木种子中提取到的 DNA 的浓度和纯度不如叶片中提取的高,但还是能满足后续的各种分子生物学操作的要求。以石笔木种子为材料提取基因组 DNA 时,可以避免以叶片为材料受季节、培育石笔木幼苗消耗时间和物力及提取过程中需要液氮研磨等弊端,也是可以考虑使用的提取 DNA 的植物材料。在提取过程中,种皮要去除干净,以减少种皮中杂质的污染并利于研磨,尽量在冰上研磨,加入样品的量不要太多,以防止蛋白和 RNA 去除不彻底而导致污染,影响 DNA 的纯度。叶片尽量采用新鲜幼嫩的部位。分离缓冲液的 pH 值应调到 8.0,因为 DNA 在偏碱的条件下比较稳定,RNA 不稳定。抽提时先用酚:氯仿

(1:1),再用氯仿:异戊醇(24:1)抽提,以求最大限度地去除酚和蛋白;另外,在叶片 DNA 提取的缓冲液中要加入 2% 的 3% β -巯基乙醇和 2% 的 PVP,这样可以防止提出来的 DNA 显现褐色,而在种子的提取缓冲液中无须加入那么高浓度的 β -巯基乙醇。该研究已经用 SDS 法以石笔木种子为材料进行了 10 多份 DNA 的提取,结果可靠。

ISSR 技术是基于 PCR 的一种标记,所以其反应条件易受许多因素的干扰,如模板 DNA、Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物等浓度都能影响 ISSR-PCR 扩增的结果,因此需要优化固定 PCR 反应的各种条件,以期试验得到较好的重复。试验发现,石笔木 ISSR-PCR 对 DNA 模板的质量与浓度要求不甚严格,同时用含 Mg^{2+} 的 $10 \times$ Buffer 即可满足体系对 Mg^{2+} 的需要,因而在具体的试验中,模板 DNA 浓度和 Mg^{2+} 可以不作为重点优化的对象。而 Taq 酶的质量以及使用量则直接影响扩增反应的成功与否,而且同一厂家不同批次的产品也有可能存在一定的差异,因此,为了减少试验误差,应尽量使用同一厂家同一批次生产的产品。需要指出的是,采用单因子试验可以较为直观快速地得出该因子对试验结果的影响,但其忽视了各因子间的互作效应,这样很难得到最佳的反应体系:因此,在具体的试验中,还可做进一步的优化,以期得到最佳试验结果。

参考文献

(上接第 12588 页)

- [14] 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): 475-478.
- [15] SUJATHA M, MUKTA N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 44: 135-141.
- [16] SARDANA J, BATRA. In vitro plantlet formation and micropropagation of *Jatropha curcas* (L.) [J]. Advances Plant Sci, 1998, 11(2): 167-169.
- [17] 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.
- [18] 李化, 曾妮, 贾勇炯, 等. 麻疯树的促腋芽分枝快繁及生根诱导 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2006, 43(5): 1116-1120.
- [19] 郑成木, 刘进平. 热带亚热带植物微繁殖 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001.
- [20] MUKUL M D, PRIYANKA M, BISWAJIT G, et al. In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.) [J]. Current Science, 2007, 93(10): 1438-1442.
- [21] ROJORE S, BATRA A. Efficient plant regeneration via shoot tip explants in *J. curcas* L. [J]. J Plant Biochemistry and Biotechnology, 2005, 17: 73-75.
- [1] 邹天才, 金平. 贵州石笔木种质资源与利用基础研究 [J]. 贵州科学, 1996, 14(4): 60-65.
- [2] 邹天才. 贵州特有及稀有种子植物 [M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 2001.
- [3] 刘遵春, 廖明安. 金花梨基因组 DNA 提取方法及部位的比较研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(11): 2062-2063.
- [4] 陈瑾, 迪丽拜尔·托乎提, 郭卫东. 五种提取草珊瑚叶片总 DNA 方法的比较研究 [J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2008, 27(1): 87-89.
- [5] ZIETICWIEZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [6] SANKAR A A, MOORE G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 206-274.
- [7] MORENO S, MARTIN J P, ORTIZ M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm [J]. Euphytica, 1998, 101: 117-125.
- [8] WOLFE A D, RANDLE C P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences [J]. Syst Bot, 2001, 26: 120-130.
- [9] 薛志忠, 艾鹏飞, 魏景芳, 等. 油葵种子 DNA 提取和 RAPD 反应体系的优化 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(6): 2259-2261.
- [10] 何燕, 卓嘎, 旦巴. SDS 法提取青稞叶片总 DNA 的改进方法 [J]. 西藏科技, 2005(7): 14-15.
- [11] 赵杨, 陈晓阳, 李桐森, 等. 胡枝子 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 西南林学院学报, 2006, 26(2): 6-9.
- [12] 邹喻琴, 葛颂. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 宾晓芸, 唐绍清, 周俊亚, 等. 金花茶遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(1): 20-26.