



利用微嫁接技术促进麻疯树再生不定芽的生长

刘颖¹, 杨跃生¹, 童欣¹, 陈晓阳², 刘振兰^{1*}

(1 华南农业大学 生命科学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642; 2 华南农业大学 林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642)

摘要: 该研究以麻疯树种子实生苗的小芽和芽条为接穗, 以带有胚根的实生苗下胚轴为砧木进行无菌微嫁接, 试图建立新的有效微嫁接方法, 解决农杆菌介导的麻疯树遗传转化体系中再生的转化不定芽难以顺利发育成完整植株的问题。结果表明: (1) 抗生素对嫁接苗的生长有显著的抑制作用。 (2) 进行微嫁接所用砧木的苗龄以 5 d 为宜。 (3) 进行微嫁接时适宜采用的砧木类型为带有部分胚根的下胚轴。 (4) 嫁接苗在 0.3 mg/L IBA + 2 mg/L 谷氨酰胺 + 1/2 MS 培养基上的生长效果最好。 (5) 嫁接苗的移栽成活率最高可达 76.40%。 (6) 以小芽或芽条为接穗的嫁接苗均可正常生长。该研究建立的麻疯树微嫁接体系, 为解决麻疯树转化不定芽或芽条生长发育困难的问题提供了一条新的途径。

关键词: 麻疯树; 组织培养; 遗传转化; 微嫁接

中图分类号: Q813.2

文献标志码: A

Development of an *in vitro* Micrografting Method for the Enhancement of Growth of Isolated Shoots and Buds in *Jatropha curcas* L.

LIU Ying¹, YANG Yuesheng¹, TONG Xin¹, CHEN Xiaoyang², LIU Zhenlan^{1*}

(1 College of Life Sciences, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 College of Forestry, Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Adventitious buds regenerated through *Agrobacterium*-mediated *Jatropha curcas* L. transformation systems are usually difficult to develop to whole plantlets. In order to solve the problem, we tested *in vitro* micrografting methods by using *J. curcas* buds and shoots isolated from seedlings as scions and the lower part of *J. curcas* seedlings as stocks. The experimental results showed that: (1) Antibiotics could hinder the further growth of grafted seedlings significantly; (2) The most suitable stocks were those prepared from 5-day-old seedlings; (3) The hypocotyls with the upper part of the radicals were the most appropriate type of stocks; (4) Significant enhancement on the growth of buds in culture was confirmed in 1/2 MS medium containing 0.3 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) and 2 mg/L L-glutamine (Gln); (5) The grafted seedlings could be transplanted to soil with quite high survival rate (76.40%); (6) The grafted seedlings with shoots or buds served as scions could grow normally. The growth of the transformed buds and shoots could be enhanced effectively by making use of the established *in vitro* micrografting system.

Key words: *Jatropha curcas* L.; tissue culture; genetic transformation; *in vitro* micrografting

麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 是原产南美洲的大戟科麻疯树属的一种植物, 广泛分布在热带和亚

热带地区。麻疯树种子含油量高 (40%~60%), 提取的种子油可用于生产高品质的生物柴油^[1-2]。由

收稿日期: 2014-05-16; 修改稿收到日期: 2014-08-06

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目 (9351064201000002)

作者简介: 刘颖 (1985—), 男, 在读博士研究生, 主要从事植物生物技术和分子生物学研究。E-mail: liuying85168@126.com

* 通信作者: 刘振兰, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: zhenlan_liu@scau.edu.cn

于麻疯树种子油性能优越,因而被当作一种重要的可再生资源而受到世界各国的广泛关注^[2]。此外,其组织提取物具有重要的药用价值^[3-4]和杀虫作用^[5]。然而,由于麻疯树种子产量低以及生长区域有限,限制了麻疯树生物柴油产业化发展。为了提高麻疯树种子含油量以及改变油脂的组分,增强麻疯树的抗病虫和对环境适应的能力以扩大其种植面积,遗传改良逐渐成为麻疯树育种的一个重要手段。

目前,植物遗传转化的技术已经基本成熟,而最常用的方法是应用农杆菌介导法将外源基因导入到受体植物细胞并整合到染色体基因组中以实现外源基因的稳定遗传。农杆菌介导的遗传转化方法已经在麻疯树遗传改良中得到了一定的应用^[6-10]。为了抑制农杆菌侵染后外植体上农杆菌的过度增殖,通常需要在培养基中添加一定浓度的抗生素。同时,为了减少后期转基因再生苗的分子检测工作量,通常需要在培养基中添加一定浓度的筛选剂(如潮霉素),以期在外植体培养过程中将非转化的再生芽剔除。但是,对那些组织培养再生相对困难的植物,抗生素和筛选剂在外植体转化培养体系中的使用往往会对再生芽的进一步生长产生一定的抑制作用^[11-15],往往导致只能得到少量的完整植株。

微嫁接(*in vitro* micrografting)是一种在试管内将砧木与接穗进行嫁接的技术,它是植物组织培养与嫁接技术的结合^[16-17]。该技术最初被用来从感染病毒的植株上切取外植体以获得无毒的植株^[18]。微嫁接培养体系中的砧木为接穗提供了充足的营养来源,可以有效地促进接穗的生长。目前,这种方法已被成功应用于外植体脱毒以外的许多其他技术实践中^[19-20]。与常规嫁接方法相比,微嫁接技术有以下几个优点:(1)嫁接后培养条件可以人为控制,更易提高嫁接成活率;(2)周期短、费用低、占地少、成活率高;(3)有利于开展嫁接亲和力相关的工作;(4)不受环境和季节限制的影响,可以在实验室内常年进行^[21]。本研究期望建立一种有效的麻疯树微嫁接体系,为解决麻疯树转化不定芽条生长迟缓及生根困难等问题提供一条新途径。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本研究所用的麻疯树种子来源于种植在海南省海口市东山林场的编号为 M-19 的无性系,由华南农业大学林学院陈晓阳教授提供。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基及培养条件 本研究所有试验均在相同培养条件下进行,所用基本培养基为 MS^[22]、B5 和 1/2 MS,以及添加了不同浓度抗生素、吲哚丁酸(IBA)和谷氨酰胺(Gln)的 MS 或 1/2 MS 培养基。所有培养基均使用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调整 pH 至 5.8~6.0,然后在 121 ℃、0.1 MPa 的条件下高压灭菌 20 min。组织培养条件为 2 000 lx 的光照强度,12 h/d 的光照时间,(25±1) ℃ 的培养温度。无特殊说明情况下,所用培养基中均添加了 100 mg/L 肌醇、3%蔗糖和 0.7%琼脂。

1.2.2 接穗和砧木的获得 去壳的麻疯树种子经次氯酸钠常规灭菌后接种到无激素 MS 培养基上培养形成无菌种子苗。切取发芽 5 d 小苗带胚芽和上胚轴部分作为小芽接穗材料,切取发芽 15 d 小苗带胚芽和上胚轴部分作为芽条接穗材料(长度为 0.5 cm 左右)。分别取发芽 5、15 和 30 d 的小苗,在子叶的下方横切,弃除上方的子叶和上胚轴作为砧木(长度为 1.5 cm 左右)。

1.2.3 嫁接方法 嫁接时,用无菌手术刀将小芽和芽条的基部切割成楔形切面,作为接穗;将砧木材料分别制备成带有完整胚根、带有部分胚根(保留的胚根长度约为 0.5 cm)和完全不带胚根的 3 种类型的砧木。用手术刀在砧木形态学上端横切面的中部竖着向下切 0.5 cm 左右,把准备好的接穗小心插入砧木切口正中完成嫁接。

1.2.4 嫁接后的培养 用镊子夹住已经嫁接有接穗的砧木,小心地将砧木的形态学下端朝下转移到新配制的培养基上,用镊子夹住下胚轴根茎处往下轻压稍作固定,嫁接苗在组织培养室内进行培养。培养 5 d 龄小芽接穗和不同苗龄和类型砧木嫁接获得的嫁接苗所用培养基包括不添加抗生素的 MS 培养基、添加抗生素的 MS 培养基、不同类型的基本培养基(MS,B5,1/2 MS)和添加了不同浓度吲哚丁酸(IBA)和谷氨酰胺(Gln)的 1/2 MS 培养基。培养 15 d 龄芽条接穗和 5 d 龄砧木嫁接获得的嫁接苗所用培养基为添加了不同浓度谷氨酰胺(Gln)的 1/2 MS 培养基。

1.2.5 嫁接苗的出瓶炼苗和种植 待接穗和砧木接口愈合,接穗芽条有明显的伸长生长后,即可将嫁接苗取出培养瓶,洗净根上的培养基后栽种到基质(沙砾:土壤=1:1)中。在栽种早期进行常规方法的组培苗保湿炼苗,20 d 后即可进行常规栽培管理。

1.2.6 实验结果记录和数据处理 本研究所有试

验处理均重复 3 次,每个重复包括 20~25 个外植体,试验数据均用 3 次重复的平均值±标准差(SD)表示。数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较($P\leq 0.05$)。

嫁接成活率(%)=(成活的嫁接苗数/总嫁接苗数)×100%

株高增加量(cm)=成活嫁接苗株高增加量

芽长增加量(cm)=成活嫁接苗接穗长度增加量

根数增加量(条)=成活嫁接苗上根数增加量

根长增加量(cm)=成活嫁接苗上根长增加量

移栽成活率(%)=(移栽后成活的嫁接苗数/移栽的总嫁接苗数)×100%

2 结果与分析

2.1 抗生素对麻疯树嫁接苗生长效果的影响

为了探讨羧苄青霉素和头孢霉素对麻疯树嫁接苗生长发育的影响,本研究以 5 d 苗龄的带有完整胚根的砧木和小芽接穗进行微嫁接并将嫁接苗分别接种到不添加抗生素、添加 200 mg/L 羧苄青霉素或 200 mg/L 头孢霉素的 MS 培养基上,培养 30 d 后记录嫁接苗生长情况(表 1)。由表 1 可见,嫁接苗在添加 200 mg/L 羧苄青霉素的培养基上生长效果最差,其嫁接成活率、株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量均最小,分别为 69.33%、0.53 cm、0.14 cm、0.21 条和 0.17 cm;嫁接苗在不添加抗生素的培养基上的生长状态显著优于添加了抗生素组的生长状态,其嫁接成活率、株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量均为最大值,

分别为 86.67%、0.74 cm、0.52 cm、0.78 条和 1.95 cm。表明嫁接苗在含有抗生素的培养基中生长状态较差,抗生素对嫁接苗的芽条和根的生长发育有明显的抑制作用。

2.2 不同苗龄砧木对嫁接苗生长的影响

将 5 d 苗龄的小芽接穗嫁接到 5、15 和 30 d 苗龄的带有完整胚根的砧木上,然后将嫁接苗接种到不添加抗生素的 MS 培养基上,培养 30 d 后记录嫁接苗生长情况。由表 2 可见,5 d 苗龄种子苗的砧木获得的嫁接苗的嫁接成活率、株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量均最大,分别为 86.67%、0.74 cm、0.52 cm、0.78 条和 1.95 cm;而 15 和 30 d 苗龄种子苗的砧木获得的嫁接苗的生长效果较差,其嫁接成活率、株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量均明显降低。表明不同苗龄的砧木对嫁接苗的生长有明显的影响,5 d 苗龄种子苗的砧木获得的嫁接苗生长效果最佳。

2.3 基本培养基对嫁接苗生长的影响

将 5 d 苗龄的带有完整胚根的砧木和小芽接穗进行微嫁接,然后将嫁接苗分别接种至不添加激素和抗生素的 1/2 MS、MS 和 B5 等 3 种基本培养基上,培养 30 d 后记录嫁接苗生长情况。由表 3 可见,1/2 MS 培养基上生长的嫁接苗的株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量均为最大值,分别为 0.86 cm、0.67 cm、1.08 条和 2.08 cm;而嫁接苗在 B5 培养基上的生长状态最差,其株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量均为最小值,分别为 0.61 cm、0.47 cm、0.54 条和 1.59 cm。

表 1 抗生素对嫁接苗生长的影响

Table 1 Effect of antibiotic on the growth of the grafted seedlings

抗生素处理 Antibiotic treatment	嫁接成活率 Survival rate of grafting/%	株高增加量 Increase in height/cm	芽长增加量 Length of shoot increased/cm	根数增加量 No. of root increased	根长增加量 Length of root increased/cm
无抗生素 No antibiotic	86.67±4.62a	0.74±0.06a	0.52±0.03a	0.78±0.08a	1.95±0.15a
头孢霉素 Cefazolin sodium (200 mg/L)	78.67±2.31b	0.59±0.02b	0.16±0.06b	0.23±0.07b	0.19±0.02b
羧苄青霉素 Carbenicillin disodium (200 mg/L)	69.33±4.62c	0.53±0.05b	0.14±0.02b	0.21±0.05b	0.17±0.03b

注:表中试验数据均为嫁接 30 d 后统计所得,且均为 3 次重复的平均值±标准差(SD),数据后字母不同表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: All results were recorded after grafting for 30 days. Values represent means±SD (standard deviation) in three independent experiments. Data in the same column followed by different letters are significantly different at 0.05 level. The same as below.

表 2 不同苗龄砧木对嫁接苗生长的影响

Table 2 Effect of age of stock plants on the growth of the grafted seedlings

砧木萌发时间 Age of stock/d	嫁接成活率 Survival rate of grafting/%	株高增加量 Increase in height/cm	芽长增加量 Length of shoot increased/cm	根数增加量 No. of root increased	根长增加量 Length of root increased/cm
5	86.67±4.62a	0.74±0.06a	0.52±0.03a	0.78±0.08a	1.95±0.15a
15	46.67±4.62b	0.39±0.02b	0.33±0.05b	0.43±0.12b	0.89±0.14b
30	32.00±4.00c	0.27±0.04c	0.22±0.03c	0.14±0.08c	0.22±0.08c

表明基本培养基类型对嫁接成活率影响不大,但对嫁接苗的生长有显著的影响,1/2 MS 培养基对嫁接苗生长最佳。

2.4 砧木类型对嫁接苗生长的影响

将 5 d 苗龄的小芽接穗嫁接到 3 种类型(带有完整胚根、带有部分胚根和完全不带胚根)5 d 苗龄的砧木上,并将嫁接苗接种至不添加激素和抗生素的 1/2 MS 基本培养基上,培养 30 d 后记录嫁接苗生长情况(图 1,A、B;表 4)。由表 4 可见,带有部分胚根原基的砧木所获得嫁接苗的株高增加量、芽长增加量、根数增加量和根长增加量都为最大值,分别为 0.92 cm、0.74 cm、1.74 条和 2.54 cm,但其株高增加量和芽长增加量与带有完整胚根的嫁接苗相比

差异并不显著;而完全不带胚根的砧木所获得嫁接苗的生长状态最差,除根数增加量外,其株高增加量、芽长增加量和根长增加量均为最小值,分别为 0.66 cm、0.38 cm 和 1.73 cm。表明,不同类型的砧木对嫁接苗的生长有显著的影响,带有胚根的砧木所获得嫁接苗具有较好的生长状态。

2.5 IBA 对嫁接苗生长的影响

将 5 d 苗龄的小芽接穗嫁接到 5 d 苗龄带有部分胚根的砧木上,并将嫁接苗接种至添加不同浓度(0、0.1、0.3、0.6、1 mg/L)IBA 的 1/2 MS 培养基上,培养 30 d 后记录嫁接苗生长情况。由表 5 可见,添加 0.3 mg/L IBA 时嫁接苗的生长情况最佳,不仅株高增加量(1.54 cm)、芽长增加量(1.27 cm)、

表 3 基本培养基对嫁接苗生长的影响

Table 3 Effect of basic medium on the growth of the grafted seedlings

培养基类型 Type of growth medium	嫁接成活率 Survival rate of grafting/%	株高增加量 Increase in height/cm	芽长增加量 Length of shoot increased/cm	根数增加量 No. of root increased	根长增加量 Length of root increased/cm
1/2 MS	85.33±2.31a	0.86±0.02a	0.67±0.04a	1.08±0.18a	2.08±0.17a
MS	86.67±4.62a	0.74±0.06b	0.52±0.03b	0.78±0.08b	1.95±0.15a
B5	84.00±4.00a	0.61±0.05c	0.47±0.02b	0.54±0.13b	1.59±0.14b

表 4 砧木类型对嫁接苗生长的影响

Table 4 Effect of stock types on the growth of the grafted seedlings

砧木类型 Stock type	嫁接成活率 Survival rate of grafting/%	株高增加量 Increase in height/cm	芽长增加量 Length of shoot increased/cm	根数增加量 No. of root increased	根长增加量 Length of root increased/cm
带完整胚根 Hypocotyls with intact radical	85.33±2.31a	0.86±0.02a	0.67±0.04a	1.08±0.18c	2.08±0.17b
带部分胚根 Hypocotyls with partial radical	87.83±4.01a	0.92±0.05a	0.74±0.11a	1.74±0.09a	2.54±0.10a
不带胚根 Hypocotyls only	86.67±2.30a	0.66±0.05b	0.38±0.07b	1.36±0.13b	1.73±0.08c

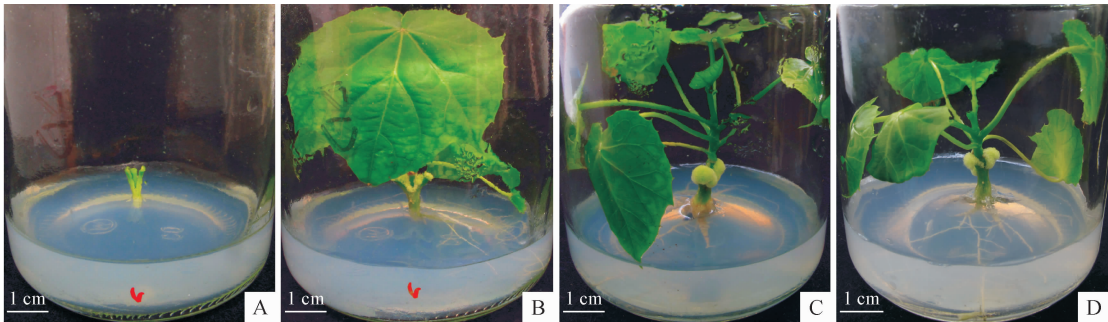


图 1 IBA 和 L-谷氨酰胺(Gln)对嫁接苗生长的影响

A. 5 d 苗龄接穗嫁接当天的情况;B. 来自 5 d 苗龄接穗的嫁接苗在添加 0.3 mg/L IBA 的培养基上培养 30 d;C. 来自 5 d 苗龄接穗的嫁接苗在添加 0.3 mg/L IBA+2 mg/L Gln 的培养基上培养 30 d;D. 来自 15 d 苗龄接穗的嫁接苗在添加 0.3 mg/L IBA+2 mg/L Gln 的培养基上培养 30 d。所用基本培养基均为 1/2 MS,砧木均为 5 d 苗龄带有部分胚根的下胚轴

Fig. 1 The influence of L-glutamine (Gln) and indole-3-butyric acid (IBA) on the growth of the grafted seedlings

A,B. A grafted plant with bud scion from 5-day-old germinated seed was inoculated onto 1/2 MS medium containing 0.3 mg/L IBA for 0 days(A),and for 30 days(B);C. A grafted plant with bud scion from 5-day-old germinated seed was inoculated onto 1/2 MS medium containing 0.3 mg/L IBA and 2 mg/L L-glutamine for 30 days;D. A grafted plant with shoot scion from 15-day-old germinated seed was inoculated onto 1/2 MS medium containing 0.3 mg/L IBA and 2 mg/L L-glutamine for 30 days

表 5 IBA 对嫁接苗生长的影响

Table 5 Effect of indole-3-butyric acid (IBA) on the growth of the grafted seedlings

IBA 浓度 IBA concentration (mg/L)	株高增加量 Increase in height/cm	芽长增加量 Length of shoot increased/cm	根数增加量 No. of root increased	根长增加量 Length of root increased/cm	移栽成活率 Survival rate after transplantation/%
0	0.92±0.05c	0.74±0.11b	1.74±0.09c	2.54±0.10c	54.73±3.19b
0.1	1.28±0.12b	0.87±0.08b	4.46±0.29b	2.55±0.17c	68.57±2.49a
0.3	1.54±0.06a	1.27±0.10a	5.83±0.31a	3.23±0.10a	70.58±2.58a
0.6	1.32±0.11b	1.20±0.07a	4.88±0.13b	2.94±0.07b	68.70±3.18a
1.0	0.66±0.10d	0.53±0.11c	1.07±0.25d	1.26±0.18d	42.78±2.78c

表 6 L-谷氨酰胺对嫁接苗生长发育的影响

Table 6 Effect of L-glutamine (Gln) on the growth of the grafted seedlings

Gln 浓度 Gln concentration (mg/L)	接穗类型 Scion type	株高增加量 Increase in height/cm	芽长增加量 Length of shoot increased/cm	根数增加量 No. of root increased	根长增加量 Length of root increased/cm	移栽成活率 Survival rate after transplantation/%
0	小芽 Buds	1.54±0.06bc	1.27±0.10bc	5.83±0.31b	3.23±0.10bc	70.58±2.58ab
0	芽条 Shoots	1.44±0.17c	1.21±0.14c	5.49±0.83b	3.16±0.18c	69.26±3.61b
2	小芽 Buds	1.86±0.08a	1.48±0.07a	8.13±0.59a	3.72±0.36a	76.40±3.29a
2	芽条 Shoots	1.78±0.09a	1.43±0.04a	7.29±0.51a	3.67±0.31ab	73.25±2.16ab
6	小芽 Buds	1.73±0.07a	1.37±0.05ab	5.73±0.51b	3.09±0.23c	70.27±3.56ab
6	芽条 Shoots	1.69±0.06ab	1.35±0.04ab	5.12±0.43b	3.07±0.30c	68.65±3.16b

根数增加量(5.83 条)和根长增加量(3.23 cm)为最大值,嫁接苗的移栽成活率也为最大值(70.58%)。但当添加 IBA 的浓度为 1 mg/L 时,嫁接苗的生长状态比不添加 IBA 时还要差。表明不同浓度的 IBA 对嫁接苗的生长有显著的影响,添加较低浓度的 IBA(0.1~0.6 mg/L)对嫁接苗的生长和移栽成活率有明显的促进作用。

2.6 L-谷氨酰胺对麻疯树嫁接苗生长发育的影响

将 5 d(小芽)和 15 d 苗龄(芽条)的接穗嫁接到 5 d 苗龄带有部分胚根的砧木上,并将嫁接苗接种至添加 0.3 mg/L IBA 和 0、2、6 mg/L Gln 的 1/2 MS 培养基上,培养 30 d 后记录嫁接苗生长情况。由表 6 可知,添加 2 mg/L 的 Gln 对嫁接苗的生长有明显的促进作用,不仅株高增加量(1.78~1.86 cm)、芽长增加量(1.43~1.48 cm)、根数增加量(7.29~8.13 条)和根长增加量(3.67~3.72 cm)均显著大于未添加 Gln 处理,而且嫁接苗移栽成活率也显著提高,最高达 76.40%;但当 Gln 浓度为 6 mg/L 时,并未对嫁接苗的生长起明显的促进作用。因此,培养基中添加 Gln 的适宜浓度为 2 mg/L。另外,来自不同苗龄接穗的嫁接苗均可正常发育生长;在相同培养条件下,5 d 苗龄接穗嫁接苗的生长状态(图 1,C)与 15 d 苗龄接穗嫁接苗的生长状态(图 1,D)在各项测量数据之间均无显著差异(表 6)。

3 讨 论

在农杆菌介导的麻疯树遗传转化过程中,为了

使克隆于植物双元表达质粒载体上的目的基因整合到植物基因组中,需要利用携带重组质粒的农杆菌菌液对植物的外植体进行侵染和共培养,因此共培养后的外植体会带有农杆菌。为了抑制后续培养过程中外植体上农杆菌的过度生长,通常会在培养基中添加浓度为 200~500 mg/L 的头孢霉素或者 200 mg/L 的羧苄青霉素^[6,8,10-11]。同时,为了抑制非转化细胞的生长,还需要在培养基中添加筛选剂,如卡那霉素或者潮霉素等^[23-25]。然而,在培养基中添加抗生素或者筛选剂会对植物细胞(包括转化和非转化细胞)的生长发育产生不利影响,导致转化细胞再生出的大部分不定芽生长状态不佳,同时也会导致获得适宜驯化移栽的完整转化植株的周期变长^[13-14]。本研究表明,抗生素对麻疯树嫁接苗的生长也有显著的抑制作用。但在微嫁接技术中,接穗不需接触培养基,接穗上的农杆菌不会污染培养基,培养嫁接苗的培养基中无需添加抗生素。

大豆微嫁接的研究发现,不同类型的基本培养基对嫁接苗的生长有显著影响^[12]。不同类型的基本培养基中含有不同种类和浓度的碳源、氮源和微量元素等物质,而这些物质对嫁接苗的生根和生长可能起决定作用,因此不同物种适宜选用的基本培养基可能不同。本研究结果表明,基本培养基的类型对麻疯树嫁接苗的生长也有显著影响,采用 1/2 MS 培养基时,嫁接苗的生长效果最佳。

研究表明,柑桔的苗龄对微嫁接的成活起非常关键的作用,14 d 苗龄砧木的嫁接成活率最高,而

较大与较小苗龄的试管苗嫁接成活率均较低^[26-27]。本研究结果表明,麻疯树砧木的苗龄对嫁接苗的成活率和生长效果有明显的影响,5 d 苗龄砧木的嫁接效果最佳,随着砧木苗龄的增加,嫁接效果变差。这可能是由于砧木苗龄较老时,维管组织成熟度高,伤口愈合能力下降,导致与接穗的愈合效果变差,使得接穗由于无法及时得到砧木传送的营养物质而易变干、变褐以致死亡。

赵改荣等研究认为,用带根苗作砧木的葡萄微嫁接苗成活后生长起始早、叶片大、生长势强^[28]。本研究结果表明,带有部分胚根的砧木的微嫁接苗生长效果最佳,这可能是由于砧木带根嫁接后不需生根,直接就可以吸收营养,同时由于去掉了胚根的根尖,打破了根的顶端优势,可以促进二级根的发生和生长,增加了根的数量,扩大了吸收营养的面积,有益于嫁接苗的生长。带有完整胚根的砧木因为保留了胚根的根尖,因此保持了根的顶端优势,可能会对二级根的发生和生长产生抑制作用。

植物生长调节剂可减轻氧化作用,促进接穗与砧木切口表面愈伤组织的形成,显著提高嫁接成活率^[27,29-30]。IBA 作为一种植物生长调节剂,常被用来诱导芽条生根,在麻疯树组织培养中应用广泛^[31-32]。Gln 作为一种在植物新陈代谢中起重要作用的内源氨基酸,为核酸及其它含氮化合物的生物合成提供氮源^[32],并且作为一种有机态氮常被添加在植物组织培养的培养基中^[33]。研究发现,外源的 Gln 对再生芽条生根有积极的促进作用^[34-36]。本研究结果表明,在培养嫁接苗的培养基中添加 0.3 mg/L IBA 和 2 mg/L Gln 可以显著提高嫁接苗的

生根效率和生长效果。

嫁接是园艺学上常用的一种栽培技术,常用于将具有优良性状的芽或者芽条嫁接至相同或者相近物种的砧木上以达到快速扩繁的目的。近年来,嫁接技术也在其他非园艺作物上得到了应用,例如利用嫁接技术获得转基因棉花植株^[37]。目前,传统嫁接技术在麻疯树遗传改良中也得到了应用,但已有研究均采用传统的嫁接方法,即直接以成年植株或者在土壤中萌发的种子苗(21 d 苗龄)为砧木进行嫁接,而非无菌微嫁接;以上研究对作为接穗的芽条的长度和质量均有一定的要求,即选用的芽条要健壮且长度至少为 2.5 cm,同时在砧木与接穗的接合部位要用塑料膜进行包裹来达到固定和保湿的目的^[10,38]。本研究报告的微嫁接方法,只需获得长度大于或等于 0.5 cm 的芽条即可作为接穗用于微嫁接,且不需要在接合部位进行包裹;同时,所用砧木只需采用 5 d 苗龄的无菌种子苗的带有部分胚根的下胚轴,因此适用性更广,获得嫁接苗的周期更短,生产效率更高。

本研究建立了一种有效的麻疯树无菌微嫁接体系,即以麻疯树无菌种子幼苗带有部分胚根的下胚轴作为砧木,将接穗嫁接到该砧木上。由于砧木下端带有部分胚根,因此嫁接苗易于生根而不需要麻疯树组织培养体系中再生芽条的生根培养步骤。接穗芽条经过嫁接后能够和砧木愈合成为一颗完整并正常生长发育的植株。用本方法可缩短麻疯树遗传改良的周期并获得更多健壮的转化植株,为解决麻疯树转化不定芽条生根难的问题提供了新途径。

参考文献:

- [1] LIBERALINO A A, BAMBIRRA E A, MORAES-SANTOS T, et al. *Jatropha curcas* L. seeds: chemical analysis and toxicity[J]. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 1988, **31**(4): 539—550.
- [2] GHOSH A, CHAUDHARY D R, REDDY M P, et al. Prospects for *jatropha methyl ester* (biodiesel) in India[J]. *International Journal of Environmental Studies*, 2007, **64**(6): 659—674.
- [3] GUPTA R C. Pharmacognostic studies on 'Dravanti' Part I* *Jatropha curcas* Linn. [J]. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Plant Sciences*, 1985, **94**(1): 65—82.
- [4] OPENSHAW K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant unfulfilled promise[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2000, **19**(1): 1—15.
- [5] ADEBOWALE K O, ADEDIRE C O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, **5**(10): 901—906.
- [6] LI M R, LI H Q, JIANG H W, et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008, **92**(2): 173—181.
- [7] HE Y, PASAPULA V, LI X A, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Jatropha curcas*: factors affecting transient transformation efficiency and morphology analysis of transgenic calli[J]. *Silvae Genetica*, 2009, **58**(3): 123—128.
- [8] KUMAR N, VIJAY ANAND K G, SUDHEER PAMIDIMARRI D V N, et al. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants[J]. *Industrial Crops and Products*, 2010, **32**(1): 41—47.
- [9] KAJIKAWA M, MORIKAWA K, INOUE M, et al. Establishment of bispyribac selection protocols for *Agrobacterium tumefaciens*- and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the oil seed plant *Jatropha curcas* L. [J]. *Plant Biotechnology*, 2012, **29**(2): 145—153.

- [10] QU J, MAO H Z, CHEN W, *et al.* Development of marker-free transgenic *Jatropha* plants with increased levels of seed oleic acid[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, **5**(1): 10.
- [11] LIU Y, YU L, FU Y L, *et al.* Transformation of *ALO* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in soybean using hypocotyl explants and partial incubation method[C]. 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering (BMCE 2013). DEStech Publications, Inc, 2013: 263–269.
- [12] LIU Y, YU L, FU Y L, *et al.* Development of an *in vitro* grafting method for the enhancement of growth of isolated shoots and buds in soybean (*Glycine max* L.)[C]. Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB), 2012 International Conference on. IEEE, 2012: 1 003–1 006.
- [13] OLHOFT P M, LIN K, GALBRAITH J, *et al.* The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, **20**(8): 731–737.
- [14] OLHOFT P M, FLAGEL L E, DONOVAN C M, *et al.* Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. *Planta*, 2003, **216**(5): 723–735.
- [15] ZONG H (宗桦), WANG SH H (王盛华), *et al.* Effective regeneration from leaf of *Jatropha curcas* L. and origin of its adventitious shoots[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology* (应用与环境生物学报), 2010, **16**(6): 789–793 (in Chinese).
- [16] JONARD R, HUGARD J, *et al.* *In vitro* micrografting and its applications to fruit science[J]. *Scientia Horticulturae*, 1983, **20**(2): 147–159.
- [17] ESTRADA-LUNA A A, LOPEZ-PERALTA C, CARDENAS-SORIANO E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2002, **92**(3–4): 317–327.
- [18] MURASHIGE T, BITTERS W P, RANGAN T S, *et al.* A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clone[J]. *Hort Science*, 1972, **7**(2): 118–119.
- [19] PALMA B, VOGT G F, NEVILLE P. A combined *in vitro*/*in vivo* method for improved grafting of *Acacia senegal* (L.) Willd[J]. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 1996, **71**(3): 379–382.
- [20] HINCHEE M A W, CONNOR-WARD D V, NEWELL C A, *et al.* Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, **6**(8): 915–922.
- [21] ZHANG J L (张金林), WANG S M (王锁民), XU R C (许瑞), *et al.* Researches and applications of plant *in vitro* micrografting[J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 2005, **41**(2): 247–252 (in Chinese).
- [22] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, **15**(3): 473–497.
- [23] DI R, PURCELL V, COLLINS G B, *et al.* Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, **15**(10): 746–750.
- [24] MEURER C A, DINKINS R D, COLLINS G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, **18**(3–4): 180–186.
- [25] SATO S, XING A Q, YE X G, *et al.* Production of γ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean[J]. *Crop Science*, 2004, **44**(2): 646–652.
- [26] NAVARRO L, ROISTACHER C N, MURASHIGE T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1975, **100**(5): 471–479.
- [27] SONG R L (宋瑞琳), WU R J (吴如健), KE CH (柯冲). Elimination of the main *Citrus* virus and virus-like diseases by shoot-tip grafting[J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1999, **29**(3): 275–279 (in Chinese).
- [28] ZHAO G R (赵改荣), YU D H (余旦华). Study on the graft method for grape *in vitro* plantlets[J]. *Journal of Fruit Science* (果树科学), 1998, **15**(3): 277–279 (in Chinese).
- [29] JONARD R, SOEDHARMA I, VILLEMUR P. Analysis of the influence of various factors on the improvement of successful micrografts in *Citrus*[J]. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 1987, **305**(2): 45–49.
- [30] OBEIDY A A, SMITH M A L. A versatile new tactic for fruit tree micrografting[J]. *Hort Technology*, 1991, **1**(1): 91–95.
- [31] KOCHHAR S, SINGH S P, KOCHHAR V K. Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant—*Jatropha curcas*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2008, **32**(12): 1 136–1 143.
- [32] THEPSAMRAN N, THEPSITHAR C, THONGPUKDEE A. *In vitro* induction of shoots and roots from *Jatropha curcas* L. explants[J]. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2008, **83**(1): 106–112.
- [33] FRANKLIN C I, DIXON R A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures[M]//DIXON R A, GONZALES R A. *Plant Cell Culture: A Practical Approach*-2nd Edition. Oxford: IRL Press, 1994: 1–25.
- [34] HIGASHI K, KAMADA H, HARADA H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, **45**(2): 109–114.
- [35] OGITA S, SASAMOTO H, YEUNG E C, *et al.* The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2001, **37**(2): 268–273.
- [36] VASUDEVAN A, SELVARAJ N, GANAPATHI A, *et al.* Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. [J]. *Biologia Plantarum*, 2004, **48**(1): 125–128.
- [37] JIN S X, LIANG S G, ZHANG X L, *et al.* An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, **85**(2): 181–185.
- [38] JAGANATH B, SUBRAMANYAM K, MAYAVAN S, *et al.* An efficient in planta transformation of *Jatropha curcas* (L.) and multiplication of transformed plants through *in vivo* grafting[J]. *Protoplasma*, 2014, **251**(3): 591–601.