

## 蓖麻离体再生体系的建立

邢超<sup>1</sup>, 金璐<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1</sup>, 阮颖<sup>1</sup>, 刘春林<sup>2\*</sup>

(湖南农业大学 1.生物科学技术学院; 2.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**以蓖麻品种淄 5 号和秀蓖 2 号的成熟种子胚轴为外植体, 在含 0.25 mg/L 苯基噻二唑基脲(TDZ)的改良 MS(蔗糖 20 g/L、琼脂 9 g/L)固体培养基上诱导生芽。结果显示: 淄 5 号和秀蓖 2 号平均每个外植体可产生 4 个不定芽, 2 品种间产生不定芽的数量没有明显差异; 不定芽经伸长、诱导生根能发育成完整的植株, 2 品种在根分化能力上没有明显差异。综合分析, 这 2 个蓖麻品种基因型对外体再生体系的建立没有明显影响。

**关键词:**蓖麻; 胚轴; 再生体系; 外植体

中图分类号: S565.6 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)05-0484-05

### Establishment of *in Vitro* regeneration system for *Ricinus communis*

XING Chao<sup>1</sup>, JIN Lu<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, RUAN Ying<sup>1</sup>, LIU Chun-lin<sup>2\*</sup>

(1.College of Bioscience and Biotechnology; 2.Hunan Provincial Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Crop, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The hypocotyl of Zi No.5 and Xiubi No.2 mature seeds were used as explants. Adventitious buds were induced on optimized MS medium(20 g/L sucrose, 9 g/L agar) with 0.25 mg/L TDZ. The results showed that an average of 4.0 normal buds was produced on each explant from Zi No.5 and Xiubi No.2 and the difference in the quantities of normal buds produced from Zi No.5 and Xiubi No.2 was not obvious. The plantlets were developed from vigorous buds of the two seeds by elongating and induced rooting. The results indicated that the amounts of adventitious buds as well as the difference in the capacity of root differentiation of the two selected castor species was not obvious, which reveals that there exists no significant differences between the two selected castor genotypes in construction of *in vitro* regeneration system.

**Key words:** *Ricinus communis*; embryo axes; plant regeneration; explants

蓖麻(*Ricinus communis*)属大戟科(Euphorbiaceae)双子叶一年或多年生草本植物。蓖麻的利用价值非常高,其种子中含有约 50%的蓖麻油,可广泛应用于国防、航空、航天、化工医药和机械制造等方面,因其可再生性而被称为“绿色石油”<sup>[1]</sup>。

近年来,在通过分子遗传育种方法培育蓖麻新品种方面已有了一些进展<sup>[2-4]</sup>,但因缺少分子育种新手段,依赖于田间选育以获得有价值蓖麻新品种的方式面临困境,而通过转基因技术可以弥补常规分子遗传育种的不足获得蓖麻新品种。Sujatha 等<sup>[5]</sup>

首次利用农杆菌介导法获得转基因蓖麻植株,并于 2008 年<sup>[6]</sup>用基因枪法再次获得了转基因蓖麻植株, Malathi 等<sup>[7]</sup>通过农杆菌转化法获得了抗虫的蓖麻转基因植株。而通过基因工程手段获得转基因蓖麻植株首先必须建立有效的再生体系<sup>[5]</sup>。目前,关于蓖麻组织培养方面的研究报道较少,而国内外研究者对蓖麻再生体系的建立做了一些研究工作,早期的研究主要将蓖麻的营养组织作为外植体进行培养,但结果并不理想,很难诱导生芽且出芽率低<sup>[6-9]</sup>。随后,研究者以具分生能力的组织作为外植体,得到

收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家“973”计划项目(2011CB111514)

作者简介: 邢超(1989—),女,湖南益阳人,硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究, daisydazh@163.com; \*通信作者, liuc100@126.com

了丛生芽,但从生芽数量少或诱导产生的愈伤组织不能有效地分化出不定芽<sup>[10-12]</sup>。

本研究以蓖麻成熟种子胚轴为外植体,建立了稳定的蓖麻离体再生体系,为得到转基因蓖麻植株作好了准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蓖麻淄5号(来自永州,常规种)和秀蓖2号(购自北京秀禾国际农业发展有限公司,杂交种)2个品种的成熟种子。

蔗糖、琼脂、BA(卞氨基嘌呤)、IBA(吲哚丁酸)、TDZ(苯基噻二唑基脒)、GA(赤霉素)。均购自Bomeibio公司。MS培养基的配制见文献[13]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 外植体预培养

剥去蓖麻种子外种皮,在75%乙醇中浸泡30s,无菌水洗涤1次后放入0.1%升汞浸泡10min,然后用无菌水洗3次,每次10min,将种子在无菌纸上沥干后铺种到含0.1mg/L BA的MS固体培养基上,每个平皿(规格9cm)接种8~10个外植体,置于黑暗培养箱(温度26℃)中培养7d。

#### 1.2.2 不定芽诱导

黑暗培养7d后,将胚轴切下,并在形态学上端划出1~2道伤口,将切口朝上垂直接种到含0.25mg/L TDZ的改良MS(蔗糖20g/L、琼脂9g/L)固体培养基中,置于26℃、相对湿度65%、光照强度1500lx、光周期16h/d的条件下培养。

2周后,将分化出芽点的胚轴继代至含0.5mg/L BA的改良MS固体培养基中。

#### 1.2.3 不定芽伸长

当芽点长至长约5mm时,将从生芽分成单个的芽继代至含0.2mg/L BA和0.2mg/L GA的改良MS培养基中。

#### 1.2.4 根的诱导

当再生芽长约2cm时,将芽转移至含1.5mg/L IBA的1/2MS(蔗糖20g/L、琼脂7g/L)生根培养基中。

#### 1.2.5 再生植株的移栽

取出培养瓶中长出健壮根系的小苗,用灭菌水洗净根部琼脂,并将根部置于0.2%多菌灵溶液,浸泡10min,然后移栽到已灭菌的蛭石中,并用透气小塑料杯扣住幼苗,置于培养室光线较暗处,10~14d后取走烧杯,逐步置于光照之下,再将植株移栽到含有混合土壤的花盆中生长。

## 2 结果

### 2.1 外植体预培养效果

蓖麻种子胚约2mm左右,肉眼观察胚轴、胚芽和胚根难以区分。经预培养的2个蓖麻品种的生长情况相似,种子的胚轴、胚根逐渐伸长,子叶逐渐展开。培养3d时,胚根突破内种皮;培养7d时,胚根能伸长至2cm左右,胚芽已长出约1mm。此时,肉眼能很清晰地辨认出胚轴部分(图1,彩版见封二)。笔者还观察到:在黑暗培养条件下,子叶的颜色为黄色,胚轴颜色较子叶略浅,胚根则呈白色。



图1 淄5号种子暗培养7d后的效果

Fig. 1 Seeds of Zi No.5 cultured for 7 d in the dark

### 2.2 不定芽诱导效果

切下的胚轴在含TDZ的改良MS培养基中逐渐膨大伸长。10d时,在形态学上端切面上可观察到分化出的绿色芽点;14d时平均每个外植体分化出3~5个约1~2mm的淡绿色小芽(图2,彩版见封二),芽体密集粗短呈橄榄球形。2个蓖麻品种在不定芽形态上没有明显差别。淄5号共接种220个胚轴外植体,外植体出芽率为67%,不定芽增值倍数为4.3;秀蓖2号共接种150个外植体,外植体出芽率为62.5%,不定芽增值倍数为3.8。可见,淄5号和秀

藨 2 号在外植体出芽率和产生不定芽数量上没有明显差异, 平均每个外植体可产生 4 个不定芽。在不定芽分化过程中未见明显愈伤组织的形成, 但胚轴接触培养基部分易形成一圈愈伤, 其组织形态紧密、坚实, 呈现褐色, 没有观察到不定芽的分化。

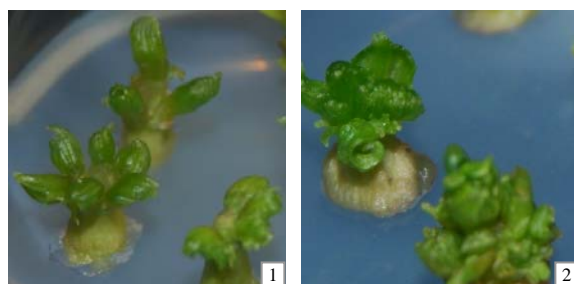


图2 TDZ诱导淄5号产生的正常芽

Fig. 2 Normal adventitious buds from Zi No.5 induced by TDZ

不定芽(带胚轴)在含 BA 的改良 MS 固体培养基上培养 2 周时, 绝大部分外植体没有观察到新芽点的分化, 不定芽在数量上没有明显增加。但不定

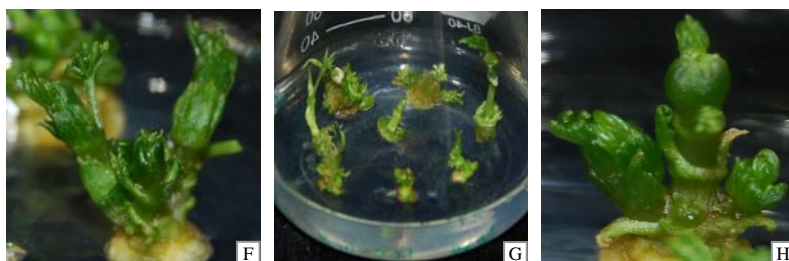
芽的形态有明显变化, 其长度由原来 1~2 mm 长至 4~5 mm。由图 3(彩版见封二)可观察到秀藨 2 号分化出的不定芽密集程度比淄 5 号的大, 但这 2 个品种产生的不定芽在形态上没有明显区别。将单个的不定芽转移到添加 BA 和 GA 的改良 MS 培养基 2 周时, 芽明显伸长, 大部分芽的长度可由原来 5 mm 长至 1~2 cm, 并且有分节和幼叶的形成(图 4, 彩版见封二)。2 个藨麻品种的不定芽伸长情况没有明显差异。



1 淄 5 号分化出的不定芽; 2 秀藨 2 号分化的不定芽。

图3 不定芽在BA培养基上生长的效果

Fig. 3 Adventitious buds grown on BA medium



F、G 为淄 5 号不定芽在添加 BA 和 GA 的改良 MS 培养基中生长 2 周的结果; H 为秀藨 2 号不定芽在添加 BA 和 GA 的改良培养基中生长 2 周的结果。

图4 不定芽在伸长培养基上的生长效果

Fig. 4 The elongation of adventitious buds

### 2.3 根的诱导效果

将生长约 2 cm 的不定芽转移至生根培养基中, 约 20 d 时可在芽的基部观察到根点的分化, 随培养时间延长, 根逐渐伸长, 2 周时, 能形成 6~8 cm 的根系。淄 5 号和秀藨 2 号的生根率分别为 21.2% 和 20.7%, 平均每个不定芽的生根数为 7~10 条。图 5 为再生芽诱导生根 30 d 的结果。诱导的不定根呈辐射状分布, 表面光滑, 比较粗壮的不定根又可长出若干次级不定根, 不定根最上端直径约 3~4 mm, 根尖部位直径约 1 mm。在不定根的形成过程中芽

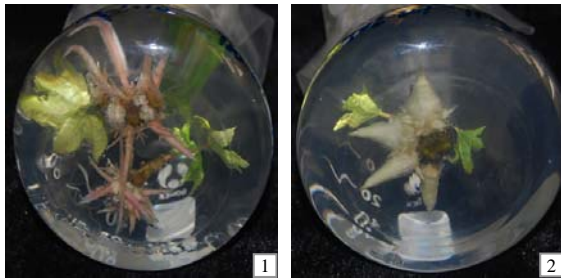
体本身没有明显变化。2 个品种诱导产生的不定根在形态上没有明显差异。



图5 淄5号再生芽的诱生根

Fig. 5 Roots induced from regenerated bud of Zi No.5 by IBA

在根的诱导过程中, 2 个蓖麻品种均出现了不同形态的根(图 6, 彩版见封二), 图 6-1 中诱导的不定根数目比较多, 约 8~10 条, 根细长。这种形态的根在诱导过程中出现的频率比较大, 约 95%, 在随后的发育中逐渐长至如图 5 所示时, 形态与种子正常萌发形成的根(图 7-1, 彩版见封二)相似, 可将其移栽至蛭石中。图 6-2 中为不定根数目比较少, 约 4 条, 根较肥大, 呈白色纺锤状, 表皮有细小绒毛, 诱导出这种形态根的频率较小, 约 5%, 在随后的发育中逐渐长至如图 7-2 所示: 不定根的数目有所增加, 约 6~8 条, 与图 6-1 中形成的不定根数目相近。大部分不定根相对膨大, 根偏上部的表皮疏松、易剥落, 剥落后的根呈白色肉质状, 表面粗糙, 有细小的绒毛状突起。



1 诱导的不定根多; 2 诱导的不定根少。

图6 淄5号再生芽在生根培养基中诱导产生的2种不同形态的根

Fig. 6 Two different phenotypes of roots from Zi No.5 on root induction media



1 淄5号种子在基础培养基中培养 15 d 的生长状况; 2 秀蓖2号再生芽诱导出的膨大根。

图7 种子生根和再生芽诱导出的膨大根

Fig. 7 Root generated from seed and inflated root induced by IBA

### 2.4 再生植株的移栽

将再生植株移栽至蛭石中, 诱导出正常根的再生芽逐渐伸长并分节, 叶片逐渐长大(图 8), 存活率

为 20%。而具膨大根的再生芽在移栽过程中容易腐烂, 存活率为 0%。



图8 淄5号移栽成活的再生植株

Fig.8 Regenerated plantlet of Zi No.5 survived after transplanted in vermiculite

### 3 讨论

本试验所用的外植体是种子培养 7 d 后的胚轴, 在切除已长出的芽时需保留部分顶端分生组织, 以利于芽增殖, 较快地形成不定芽。若只切下胚轴部分, 则不能分化产生不定芽, 这与 Sangduen<sup>[7]</sup>和 Ahn<sup>[9]</sup>的结果一致。在试验中发现, 形态学上端划出伤口更有利于生芽, 因胚轴接触培养基部分易产生愈伤组织, 并且产生的愈伤组织的不定芽的分化不能被观察到, 所以外植体放置顺序为伤口朝上垂直接种于培养基, 以防止生芽端产生愈伤。

笔者最开始使用的生长调节剂是 BA 和 KT, 但发现在 BA 和 KT 的共同作用下, 平均每个外植体只产生 1~2 个不定芽。随后, 笔者选择 TDZ 作为诱导不定芽的生长调节剂, 发现其对丛生芽形成有显著作用。但同时也发现 TDZ 产生的不定芽在发育过程中容易玻璃化, 不定芽在生长过程中逐渐死亡。笔者发现诱导出的玻璃化芽在时间上比正常芽较早, 并且玻璃化芽生长速度比较快, 因此对 MS 培养基进行优化, 蔗糖由原来 30 g/L 降低至 20 g/L, 琼脂由 8 g/L 增加至 9 g/L, 降低不定芽生长速度, 既保证了芽分化生长所需的营养环境, 又有效地减少了玻璃化现象的发生。同时, 外植体在含 TDZ 培养基中培养的时间不宜超过 2 周, 以减少玻璃化现象的产生<sup>[8]</sup>。

在 不定芽伸长过程中, 将丛生芽上的不定芽分别切开培养, 有利于芽的伸长。玻璃化的芽在培养

过程中虽然也有伸长现象,但其组织逐渐破碎、凋落,最终导致死亡。再生植株移栽的存活率低,需保证一定湿度环境条件及注意对病虫害防治,以保证植株的存活率。不定根诱导过程中产生的膨大根在移栽过程中容易腐烂,不易存活。后续工作将对产生特异根的现象进行深入研究。

由于蓖麻是离体再生比较困难的植物<sup>[8]</sup>,本试验获得的芽来自于蓖麻的顶端分生组织,所以本研究的结果比较理想,可以用于蓖麻遗传转化研究。目前,国内外建立的蓖麻再生体系主要通过其顶端分生组织,而成功地从愈伤组织中分化出芽的研究鲜有报道。在今后的研究中将换用其他种类的生长调节物质,探寻愈伤组织再分化途径。

#### 参考文献:

- [1] 姚远,李凤山,陈永胜,等.国内外蓖麻研究进展[J].内蒙古民族大学学报:自然科学版,2009,24(2):172-175.
- [2] 白建明,刘树清.中国蓖麻杂种优势育种研究的现状及建议[J].云南农业科技,2007(1):58-61.
- [3] 朱国立.我国蓖麻杂优利用研究现状及展望[J].中国油料作物学报,2003,25(2):110-113.
- [4] 张英杰.蓖麻高产栽培技术[J].安徽农学通报,2012,18(1):81-85.
- [5] 张利明,侯玲玲,李文彬,等.蓖麻组织培养和植株再生的研究[J].中国油料作物学报,2009,31(2):253-255.
- [6] Reddy K, Bahadur B. Adventitious bud formation from leaf cultures of castor (*Ricinus communis* L.)[J]. Curr Sci, 1989, 58: 152-154.
- [7] Sangduen N, Pongtongkam P, Ratisoontorn P, et al. Tissue culture and plant regeneration of castor(*Ricinus communis* L.)[J]. Sabrao J Breed Genet, 1987, 19: 144-149.
- [8] Genyu Z. Callus formation and plant regeneration from young stem segments of *Ricinus communis* L.[C]// Margaret R, Asit K. Genetic Manipulation in Crops. Oxford: The University Press, 1984: 393.
- [9] Sujatha M, Reddy T. Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.)[J]. Plant Cell Rep, 1998, 17(6): 561-566.
- [10] Ahn Y J, Vang L, McKeon T A, et al. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.)[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2007, 43(1): 9-15.
- [11] Kumari K G, Ganesan M, Jayabalan N. Somatic organogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(1): 17-25.
- [12] 丁兰,王涛,景宏伟,等.蓖麻的组织培养[J].西北师范大学学报:自然科学版,2010(1):79-83.
- [13] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473-497.

责任编辑: 罗 维  
英文编辑: 罗 维