

麻疯树叶片高效再生体系与不定芽起源*

宗桦^{1,2} 王盛华¹ 邓新林¹ 欧阳超¹ 陈放^{1**}

(¹四川大学生命科学学院 成都 610064)

(²西南交通大学建筑学院 成都 610031)

摘要 建立了培养周期短、再生效率高的麻疯树叶片再生体系。6-BA是诱导麻疯树叶片产生愈伤组织的关键外源激素,添加低浓度的2,4-D能增强6-BA的诱导效果。最佳愈伤组织诱导培养基是MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L 2,4-D,瘤状愈伤组织的诱导率高达91.98% ± 2.1%。光培养下产生的愈伤组织质地紧密,瘤状结构丰富,再生能力强。随着继代次数的增加,愈伤组织褐化加重,逐渐失去再生能力。不定芽再生培养基中,比较了3种细胞分裂素6-BA、KT和TDZ对诱导愈伤组织分化不定芽的影响。6-BA诱导不定芽的能力最优,其次是TDZ,KT最差。KT与BA的组合诱导不定芽再生的能力最强,最适的不定芽再生培养基为MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L GA₃,再生率高达68.01% ± 2.5%,平均每个愈伤组织分化出4.25个芽。70%的再生苗在MS培养基添加0.2 mg/L IBA或NAA(0.1或0.2 mg/L)中均能产生根系,平均根系5.2个。对麻疯树叶片再生的各阶段进行了石蜡切片,揭示了不定芽的起源及发育的全过程,明确了不定芽起源于叶片的表皮细胞层。图3 表3 参30

关键词 麻疯树; 叶片; 再生; 植物生长调节剂; 不定芽; 愈伤组织

CLC Q813 : Q949.753.505

Effective Regeneration from Leaf of *Jatropha curcas* L. and Origin of Its Adventitious Shoots*

ZONG Hua^{1,2}, WANG Shenghua¹, DENG Xinlin¹, OUYANG Chao¹ & CHEN Fang^{1**}

(¹College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(²Faculty of Architectures, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract A highly effective and rapid plant regeneration protocol for the bio-diesel species, *Jatropha curcas* L., has been developed using the calli of its young leaves. At the stage of callus induction, 6-BA played an important role, and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) could promote the effect of 6-BA. Maximum nodular callus induction rate (91.98% ± 2.1%) was observed on the callus induction medium containing 2.0 mg/L benzyladenine (6-BA) and 0.05 mg/L 2,4-D. Calli in darkness formed earlier, but more friable with less nodules than those under light. The nodular structure richness and frequency of shoot regeneration from calli gradually decreased with the increasing of subculture times. 6-BA, kinetin (KT) and thidiazuron (TDZ) were used to induce adventitious shoots from nodular calli. 6-BA was more effective than both KT and TDZ. TDZ had greater influence than KT, but most adventitious shoots were abnormal and finally dead. The combination of 6-BA (0.5 mg/L) and KT (0.5 mg/L) generated the best regeneration frequency (68.01% ± 2.5%, 4.25 shoots per callus). More than 70% of the regenerated shoots were successfully rooted on the MS medium containing 0.2 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) or NAA (0.1 or 0.2 mg/L), with an average of 5.2 roots. The production and development of the adventitious shoots were studied by histological analysis for the first time. We observed that calli and adventitious shoots primarily originated from epidermal cells of leaf explants. Fig 3, Tab 3, Ref 30

Keywords *Jatropha curcas* L.; leaf; regeneration; plant growth regulator (PGR); adventitious shoot; callus

CLC Q813 : Q949.753.505

伴随着全球对化石燃料的需求日益增长,存储的化石燃料即将耗尽^[1],人们越来越关注可再生的生物柴油。在可产生生物柴油的候选植物中,属于大戟科的麻疯树(*Jatropha curcas* L.)具有明显的优势,它的种子含油量高,种仁含油量可达40%~60%^[2],同时,麻疯树油中含有活性成分多,如毒蛋白、麻疯酮等有着重要的农药和医药价值^[3]。最近研究表

明,麻疯树油不仅可以在肥皂和医药行业发挥作用^[4],提取油后的渣还可作肥料,树叶可饲养家蚕,一些杂交品种还被用来美化和绿化环境^[5]。

然而,大力推广麻疯树的种植却面临一系列问题,虽然麻疯树种子中含油量高,但种子产量不高;种油中活性成分多,但仍需要改变油的成分才能直接替代化石燃料;麻疯树对环境要求较高,耐寒能力弱,分布区域较窄。麻疯树属包括175个种,可以通过种间杂交引入优良性状,但所需周期长,不能够获得特异的外源基因,故主要通过基因转化改变遗传背景^[6]。高频率的植株再生体系是基因转化的基础。目前国内外在麻疯树的植株再生上采用了多种外植体,包括茎段、

收稿日期: 2010-04-19 接受日期: 2010-06-07

*国家“十一五”重大科技支撑计划课题(Nos. 2007BAD50B01-02-04, 2007BAD50B05)资助 Supported by the Key Sci-tech Project of the “11th 5-year-plan” of China (Nos. 2007BAD50B01-02-04, 2007BAD50B05)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: chenfang@scu.edu.cn)

胚轴, 叶柄、子叶、叶片、腋芽, 经由愈伤组织或是直接再生的方式获得再生植株^[7-14]。然而, 这些再生体系均存在周期长(80 d以上)、再生率不高的问题, 制约了麻疯树遗传转化研究的开展。本研究缩短了麻疯树叶片再生的周期, 提高了不定芽的再生率, 并揭示了不定芽的起源和发育过程, 确定了转化的目标细胞层, 为今后开展麻疯树基因改良奠定了基础。

1 材料与与方法

文中缩写含义: 6-BA, 6-benzylaminopurine, 6-苄氨基嘌呤; IBA, indole-3-butyric acid, 吲哚丁酸; MS, Murashige and Skoog medium; NAA, α -naphthaleneacetic acid, 萘乙酸; TDZ, thidiazuron, 噻苯隆; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxy, 二氯苯氧基; KT, 6-furifuryl-aminopurine, 6-糠氨基嘌呤; PGRs, plant growth regulators, 植物生长调节剂。

1.1 植物材料

试验所需的成熟麻疯树种子来源于四川省攀枝花市。种苗种植于盛满沙和营养土的塑料钵中, 于温室中生长2 mo, 每日光照16 h, 暗培养8 h, 室温保持26 °C。待种子萌发成苗后, 取第1~3节上的幼嫩叶片为外植体进行试验。

1.2 外植体的处理

嫩叶在自来水下冲洗1 h, 先用75% (V/V) 酒精浸泡1 min, 用无菌水清洗3次后放入0.5%的氯化汞(HgCl₂)溶液浸泡5 min, 最后用无菌水冲洗5~7次。

1.3 愈伤组织的诱导和继代培养

在超净工作台上将无菌的叶片切成1 cm²的小块, 每块均带有中脉或是叶缘, 随后接入愈伤组织诱导(CI)培养基。CI培养基配方为如下: MS^[15] + 1.0~3.0 mg/L 6-BA, 或是MS + 1.0~3.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L 2,4-D。CI培养基附加有3%蔗糖、0.7%琼脂粉, pH=6.0, 室温保持26 °C。将部分叶块置于光周期16 h/8 h中培养, 剩余的采用暗培养, 均培养3 wk, 比较光培养和暗培养对愈伤组织的影响。每个处理用20个叶块, 重复3次。

3 wk后, 将诱导出的愈伤组织分成两部分, 一部分切成1.5 cm³的小块接入再生培养基诱导不定芽, 剩余部分切成1.5 cm³的小块转接入新鲜的CI培养基中进行继代培养, 每3周重复一次, 比较多次继代培养对愈伤组织的影响。

1.4 不定芽的再生

将诱导出的愈伤组织接种到含有生长素(0.1 mg/L IBA和0.1 mg/L GA₃)的再生(PR)培养基上, PR培养基中的细胞分裂素为0.1~1.0 mg/L 6-BA或0.1~1.0 mg/L KT或0.05~0.5 mg/L TDZ, 或是3种CTK的两两组合(表3)。PR培养基附加有3%蔗糖、0.7%琼脂粉, pH=6.0, 室温保持26 °C, 光周期16 h/8 h。每个处理20个愈伤, 重复3次。1 mo后统计不定芽数量。

1.5 生根培养

当不定芽伸长至2~3 cm便转移到生根培养基中, 生根培养基配方为MS + 0.05~0.4 mg/L IBA或MS + 0.05~0.4 mg/L NAA, 筛选出最佳生根培养基后, 再在其中添加0.1% (w) 活性炭(AC)比较活性炭对生根的影响。每个处理20个不定芽, 重复2次。1 mo后统计生根情况。

1.6 生根苗的移栽

再生苗生根后, 将三角瓶封口膜揭开, 仍置于温室中培

养1 wk, 期间不定时向培养基加水, 避免培养基过分蒸腾失水。随后小心取出生根苗, 仔细洗去依附于植株上的培养基, 将其移入加满珍珠岩:沙:营养土=1:1:1(V/V/V)的培养钵中, 培养钵仍放于温室内, 用水浇透。待生根苗存活后, 再移出温室。

1.7 石蜡切片观察不定芽再生过程

取叶片再生过程中不同阶段的外植体进行石蜡切片, 每隔3 d取材料一次, 直至不定芽再生为止。取样后, 固定于FAA溶液中, 采用石蜡切片法, Leica RM2128 切片机切片, 切片厚度为8~10 mg/L, 酒精脱水、二甲苯透明、番红-固绿对染、中性树胶封片, 在UOP型(UB200i)光学显微镜下观察、拍照。观察麻疯树不定芽再生的起源和发育全过程。

1.8 计算方法

愈伤组织诱导率=(愈伤组织块数/接种外植体数)×100%

不定芽分化率=(分化不定芽的愈伤组织块数/接种外植体数)×100%

生根率=(生根的不定芽数/接种的不定芽数)×100%

对计算结果用SPSS软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的作用 将叶片接种到CI培养基后, 7 d内就会产生愈伤组织。从表1可以看出, 6-BA是诱导麻疯树叶片产生愈伤组织的关键植物生长调节剂, 培养基中只需添加6-BA, 就能诱导叶片出愈。随着6-BA浓度的升高, 叶片出愈率随之升高, 但愈伤组织的质地变得松散。单独添加2.0 mg/L的6-BA能诱导88.73% ± 2.1%的叶片产生瘤状愈伤组织, 高浓度的6-BA(3.0 mg/L)虽然也能诱导愈伤组织大量产生, 但愈伤组织质地疏松, 瘤状结构稀少, 再生能力差。添加2,4-D后发现, 低浓度的2,4-D(0.05 mg/L)对麻疯树叶片形成愈伤有促进作用。0.05 mg/L 2,4-D与2.0 mg/L 6-BA的组合对诱导麻疯树叶片产生瘤状愈伤组织的效果最佳, 诱导率高达91.98% ± 2.1% (图1-a)。

表1 植物生长调节剂对麻疯树叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of PGRs on callus induction from young leaf of *J. curcas*

植物生长调节剂浓度 Concentration of PGRs (ρ /mg L ⁻¹)		出愈率 Callus induction rate (r/%)	愈伤组织形态 Morphology of callus
6-BA	2, 4-D		
1.0	0	62.69±4.0 ^b	紧实, 瘤状结构少 Compact, with a few nodules
2.0	0	88.73±2.1 ^a	紧实, 瘤状结构多 Compact, with many nodules
3.0	0	96.65±4.2 ^a	疏松, 瘤状结构少 Loose, with a few nodules
1.0	0.05	65.08±1.1 ^b	紧实, 瘤状结构少 Compact, with a few nodules
2.0	0.05	91.98±2.1 ^a	紧实, 瘤状结构多 Compact, with many nodules
3.0	0.05	98.33±1.9 ^a	疏松, 瘤状结构少 Loose, with a few nodules

表中不同字母表示邓肯氏最小显著差数测验差异显著($P \leq 0.05$)。下同
The different letters in the same column mean the significant difference ($P \leq 0.05$) by Duncan's LSD Test. The same below

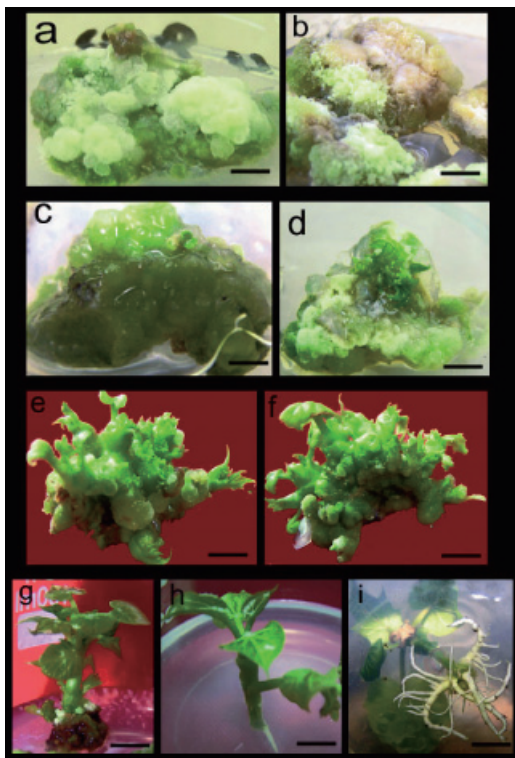


图1 麻疯树的叶片再生

Fig. 1 Regeneration of shoots from young leaf callus of *J. curcas*

a: 叶片接种于最佳CI培养基上3 wk后产生瘤状愈伤组织; b: 经历了4次继代培养的愈伤组织出现褐化现象, 瘤状结构消失; c, e, f: 瘤状愈伤组织转移到最佳PR培养基MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L GA₃上, 产生大量丛生芽; d: 添加0.1 mg/L TDZ的PR培养基诱导出大量玻璃化畸形芽; g: 不定芽芽的伸长生长; h, i: 再生植株的生根
a: Nodular callus induced from young leaf after 3 wk culture on the optimal CI medium; B: Calli turned brown and gradually loss nodular structures after four subcultures; c, e, f: Shoots appeared and developed from nodular calli on the optimal PR medium supplemented with 0.5 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L KT, 0.1 mg/L IBA and 0.1 mg/L GA₃; D: Abnormal buds induced from nodular callus on the PR medium supplemented with 0.1 mg/L TDZ; G: Shoot elongation; h, i: Rooting of shoots

2.1.2 光周期对愈伤组织诱导的影响 将叶片外植体分别进行光培养(16 h/8 h)和暗培养, 3 wk后观察发现, 光培养和暗培养均能诱导愈伤组织形成。暗培养产生的愈伤组织质地松散、体积大、出现早, 平均5 d就能观察到愈伤产生; 但这种愈伤组织不能马上用于分化, 必须继续在光下培养2 wk待其转绿后才能恢复分化能力。光培养条件下, 至少7 d后才有愈伤组织生成, 但愈伤组织颜色墨绿, 质地紧密, 瘤状结构明显; 3 wk后这种愈伤组织即可转入分化培养基, 2wk内就能产生不定芽。

2.1.3 继代次数对麻疯树愈伤组织的影响 多次继代培养后, 愈伤组织的结构和颜色均发生明显变化。由表2可以看出, 随着继代次数的增加, 愈伤组织逐渐失绿褐化, 增殖能力下降, 质地变得松散, 瘤状结构消失, 不定芽再生率也随之减少。尤其是第4次继代以后, 愈伤组织严重褐化, 产生不定芽的能力显著下降(图1-b)。

2.2 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响

由表3可以看出, 3种CTK单独使用时, 随着CTK浓度的增加, 不定芽再生率都呈现先增高后降低的趋势。其中,

表2 继代次数对愈伤组织形成和分化的影响
Table 2 Effect of subculture times on callus and shoot regeneration of *J. curcas*

继代次数 Subculture times	愈伤组织形态 Morphology of callus	不定芽再生率 Frequency of adventitious shoot formation (r/%)
1	绿白色, 瘤状结构丰富 Greenish white, with many nodules	67.94±9.4 ^a
2	绿白色, 瘤状结构丰富 Greenish white, with many nodules	67.85±5.4 ^a
3	绿白色, 较少瘤状结构 Greenish white, with a few nodules	52.24±1.8 ^{ab}
4	黄绿色, 较少瘤状结构 Yellowish green, with a few nodules	35.30±1.5 ^b
5	黄绿色, 松散 Loose, yellowish green	15.56±6.3 ^c
6	褐色, 松散 Loose, brown	9.68±3.9 ^c

6-BA诱导不定芽再生的效果最好, TDZ其次, KT最差。6-BA的最佳浓度为0.5 mg/L, 此浓度下, 不定芽再生率高达63.83% ± 3.6%, 每个愈伤组织平均产生4.25个芽。TDZ的最佳浓度为0.1 mg/L, 不定芽诱导率为63.39% ± 3.3%, 但诱导出的芽玻璃化现象严重, 基部产生大量愈伤组织, 生长极为缓慢(图1-d); 继续培养2 wk后, 生长过盛的愈伤组织抑制了不定芽的伸长生长, 最终导致不定芽生长不良而死亡。在3种CTK最佳浓度的两两组合中, KT与6-BA组合的效果最好, 诱导不定芽再生的能力最强, 再生率最高(68.01% ± 2.5%), 不定芽数量多且健壮(图1-e, f)。与之相比, KT+TDZ和TDZ+6-BA的组合对不定芽诱导产生了负作用, 诱导效果反而不如单独使用TDZ或6-BA。因此, 促进麻疯树不定芽再生的最佳培养基为: MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L GA₃。将愈伤组织接种到最佳分化培养基上7~15 d就能开出不定芽, 继续培养1~2 wk不定芽便能伸长至2~3 cm(图1-g)。

表3 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响
Table 3 Effect of CTK on induction of adventitious shoots from calli of *J. curcas*

细胞分裂素 (μg/mg L ⁻¹) Concentration of CTK			不定芽再生率 Frequency of shoot formation (r/%)	每愈伤组织产生的平均芽数(个) Number of shoots
6-BA	KT	TDZ		
0.1			16.05±3.1 ^d	1.25 ^d
0.5			63.83±3.6 ^a	4.25 ^a
1.0			50.26±4.2 ^b	3.5a ^b
	0.1		7.97±2.8 ^d	0.83 ^d
	0.5		34.07±3.4 ^c	2.50 ^{bc}
	1.0		33.95±1.9 ^c	2.67 ^{bc}
		0.05	39.95±1.7 ^{bc}	1.25 ^d
		0.1	63.39±3.3 ^a	4.00 ^a
		0.5	43.40±2.4 ^{bc}	2.67 ^{bc}
0.5	0.5		68.01±2.5 ^a	4.25 ^a
0.5		0.1	43.38±6.8 ^{bc}	2.75 ^{bc}
	0.5	0.1	31.99±2.5 ^c	1.67 ^{cd}

2.3 再生植株诱导生根

IBA和NAA是诱导植株生根的常用生长素, 我们比较了不同浓度的IBA和NAA对麻疯树再生苗生根的影响。由图2可以看出, MS培养基中添加0.2 mg/L IBA 和添加0.1 mg/L或0.2 mg/L的NAA均能使70%以上的再生苗在1周内产生根系,

平均产生根系5.2个,平均根系长度为3 cm(图1-h, i), 3 wk内即可移栽. 其中, 0.2 mg/L IBA能最早的诱导根系萌动, 平均4 d就有根系出现, 为最佳生根培养基. 虽然高浓度的IBA(0.4 mg/L)和NAA(0.4 mg/L)也能诱导根系产生, 但在根系与茎干的结合部位会产生大量的愈伤, 愈伤组织的旺盛生长将会抑制根系生长. 移栽试验发现, 基部有大量愈伤组织的生根苗很难存活. 在生根培养基中添加0.1%的AC能促进根系生长粗壮, 但在生根率和平均根数上差异不显著.

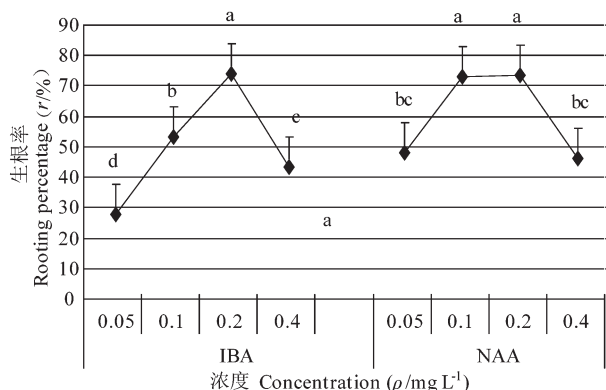


图2 IBA和NAA对再生苗生根的影响

Fig. 2 Effect of IBA or NAA on rooting of the regenerated shoots of *J. curcas*

2.4 不定芽的起源和发育

石蜡切片揭示了麻疯树叶片愈伤组织和不定芽产生与发育的全过程, 表明不定芽起源于叶片的表皮细胞层. 叶片(图3-A)接种在CI培养基中4 d后开始膨大化, 叶表皮细胞转入脱分化状态进入快速分裂期, 产生了脱分化细胞团. 脱分化细胞团继续活跃的分裂, 形成愈伤组织. 培养12 d后, 愈伤组织原本平滑的表面逐渐突起呈现瘤状结构(图3-B), 这种突起就是分生细胞团(分生组织节), 分生细胞团往往是愈伤组织的生长中心^[21]. 继续培养至d 17, 瘤状分生细胞团内部开始出现独立的维管束结构(图3-C), 随后, 瘤状分生细胞团内部的维管束与原叶片的维管束相连, 此时瘤状愈伤组织发育完全. 将其转移到PR培养基上诱导不定芽再生, 培养3~5 d后芽原基形成(图3-D). 培养至7~10 d左右, 芽原基中围绕着顶端分生组织的周边细胞区分化产生叶原基(图3-E), 随后细胞沿生长方向不断分裂而伸长, 14 d内形成不定芽(图3-F).

3 讨论

本研究建立了麻疯树叶片高效再生体系, 从叶片开始培养到再生苗移栽共只需70 d, 再生周期明显短于之前的研究(均在80~112 d之间). 叶片再生率高达68.01% ± 2.5%, 每个愈伤组织平均产生4.25个芽. 不定芽再生率远高于之前的报导: Deore (53.5%)^[14], Li (38%)^[10]和Sujatha (50%)^[9]. 麻疯树叶片产生瘤状愈伤组织的最佳培养基是MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L 2,4-D. 不定芽再生的最优培养基是MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L GA₃. 最佳生根培养基为MS + 0.2 mg/L IBA.

木本植物的叶片再生通常要经由愈伤组织途径, 前期的研究表明, 木本植物不定芽通常发生在愈伤组织的绿色瘤状

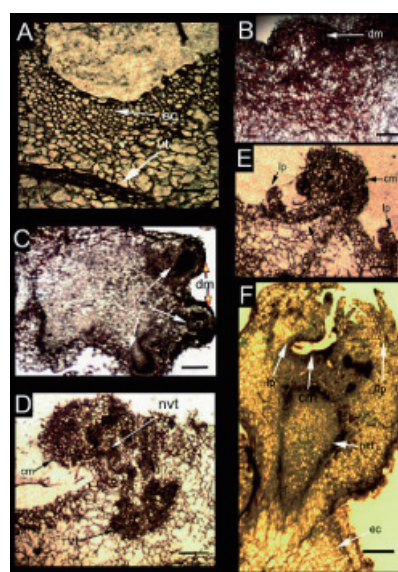


图3 麻疯树叶片的愈伤组织和不定芽的起源与发育

Fig. 3 The production and development of calli and shoots from leaf of *J. curcas*

A: 刚接种的叶盘的纵切面图. 表皮细胞(ec), 维管组织(vt). B: 表皮细胞快速分裂形成脱分化细胞团. 脱分化细胞团(dm). C: 瘤状愈伤组织的纵切面图. D: 瘤状分生细胞团内部的维管束延伸与原叶片的维管束相连, 并再分化形成芽原基. 芽原基(cm), 新产生的维管束(nvt). E: 芽原基的周围细胞分化出叶原基. 芽原基(cm), 叶原基(lp). Bars = 100 μm (A, B, D, E), 200 μm (F), 400 μm (C). F: 不定芽芽端结构

结构处^[16-17], 瘤状愈伤组织具有分化出丛生芽的能力, 因此愈伤组织的质量决定丛生芽产生频率^[18]. 而植物生长调节剂的种类、浓度和配比是调控植物器官产生高质量愈伤组织的主导因素^[18], 其中6-BA被认为是诱导外植体产生愈伤组织的最有效的外源激素^[9-10, 12-13], 2,4-D也常用于诱导多种植物的外植体产生愈伤^[19-21]. 实验证明麻疯树叶片愈伤组织的诱导必须依赖于植物生长调节剂的添加, 6-BA是诱导叶片产生瘤状愈伤组织的关键外源激素, 2.0 mg/L 6-BA产生的愈伤组织质量最好, 低浓度的2,4-D能辅助6-BA发挥更好的作用, 并且不会影响愈伤组织的质量与结构.

研究发现, 麻疯树叶片产生的愈伤组织经历多次继代培养后, 会逐渐丧失分化能力. Rodriguez也报导过类似现象, 西洋白花菜的愈伤组织经过5次继代培养后失去了增殖的能力^[22]. 最近的研究表明, 愈伤组织一旦褐化, 叶绿素和类胡萝卜素就会减少, 细胞松散并且无序排列, 最终将会因失去分化能力而死亡^[23]. 光周期也是影响愈伤组织诱导和生长发育的重要因素, 例如枣树^[24]和风铃草^[25]的叶片需暗培养才能产生具有分化能力的愈伤组织, 而有些植物愈伤组织的诱导和生长必需在光下, 而有些则在光、暗条件下均可进行^[26]. 本研究证明麻疯树叶片在光下和黑暗中均能产生愈伤组织, 光下产生的愈伤组织质地紧密, 瘤状结构丰富, 再分化时间

短, 更有利高效再生体系的建立。

CTK能刺激细胞分裂, 促进不定芽形成^[27]。许多研究表明TDZ促进不定芽再生的能力比6-BA强^[28-30]。本研究发现, 对麻疯树而言, 6-BA促进不定芽的能力强于TDZ, 使用6-BA诱导的不定芽健壮、生长速度快。TDZ虽然也能诱发不定芽, 但畸形芽多, 玻璃化严重。这一现象和许多报道一致, 使用TDZ产生的再生植株大多数是白化苗或出现玻璃化^[28-29]。

石蜡切片揭示了麻疯树叶片再生的全过程, 表明不定芽起源于叶片表皮细胞层。不定芽再生细胞层的明朗, 为今后开展麻疯树的遗传转化奠定了基础。

References

- Kandpa JB, Madan M. *Jatropha curcas*: A renewable source of energy for meeting future energy needs. *Renewable Energy*, 1995, **6** (2): 159~160
- Liberalino AA, Bambirra EA, Moraes Santo ST, Vieira EC. *Jatropha curcas* L. seeds: Chemical analysis and toxicity. *Arq Biol Technol*, 1988, **31**: 5392~5501
- Grimm C. Evaluation of damage to physic nut (*Jatropha curcas*) by true bugs. *Entomol Exp Appl*, 1999, **92**: 127~136
- Adebowale KO, Adedire CO. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *Afr J Biotechnol*, 2006, **10**: 901~906
- Sujatha M, Prabakaran AJ. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. *Gen Resour & Crop Evol*, 2003, **50** (1): 75~82
- Liu BB (刘伯斌), Lu MZ (卢孟柱), Chen JN (陈介南), Wang Q (王琼). Research progress of genetic transformation of *Jatropha curcas*. *Seedling Cultivation* (育苗技术), 2009, **5**: 30~32
- Sujatha M, Makkar HPS, Becker K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regul*, 2005, **47**: 83~90
- Sujatha M, Mukta Dhingra. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1993, **35**: 293~296
- Sujatha M, Mukta N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1996, **44**: 135~141
- Li MR, Li HQ, Hua WJ, Pan XP, Wu GJ. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2008, **92**: 173~181
- Lu WD (陆伟达), Wei Q (魏琴), Tang L (唐琳), Yan F (颜纺), Chen F (陈放). Induction of callus from *Jatropha curcas* and rapid propagation. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9**: 127~130
- Lin J (林娟), Tang L (唐琳), Chen F (陈放). Tissue culture and plantlet regeneration of *Jatropha curcas*. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2002, **38**: 252
- Wei Q, Lu WD, Liao Y, Pan L, Xu Y, Tang L, Chen F. Plant Regeneration from Epicotyl Explant of *Jatropha curcas*. *Plant Physiol Mol Biol*, 2004, **30**: 475~478
- Deore AC, Johnson ST. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: An important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep*, 2008, **2**: 7~11
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, **15**: 473~479
- Sharma VK, Kothari SL. High frequency plant regeneration in tissue cultures of *Glycine clandestine*-A wild relative of soybean. *Phytomorphology*, 1993, **43**: 29~33
- Meyers JR, Kysely W, Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB. Plant regeneration of wild *Glycine* species from suspension culture-derived protoplasts. *Plant Cell Rep*, 1989, **8**: 112~115
- Ji SY (暨淑仪), Yan XC (严学成), Wang YJ (王毅军). 茶叶片愈伤组织形成的细胞组织学观察. *J Tea* (茶叶), 1995, **21** (2): 11~13
- Morini S, Onofrio CD, Bellocchi G, Fisichella M. Effect of 2, 4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2000, **63**: 47~55
- Ma GH, Xu QS. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, **70**: 281~288.
- Shen XL, Michael E, Kane, Chen JJ. Effects of genotype, explant source, and plant growth regulators on indirect shoot organogenesis in *Dieffenbachia* cultivars. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2008, **44**: 282~288
- Rodríguez R, Rey M, Cuzzo L, Ancora G. *In vitro* propagation of caper (*Capparis spinosa* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 1990, **26**: 531~536
- He Y, Guo XL, Lu R, Niu B, Pasapula Vijaya, Hou Pei, Cai Feng, Xu Ying, Chen Fang. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009, **98**: 11~17
- Gu XF, Zhang JR. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) using leaf explants. *Plant Cell Rep*, 2005, **23**: 775~779
- Srskandarajah S, Frello S, Jørgensen K, Serek M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Campanula carpatica*: factors affecting transformation and regeneration of transgenic shoots. *Plant Cell Rep*, 2004, **23**: 59~63
- Zheng XB (郑先波). Studies on callus induction and plantlet regeneration of triploid *Citrullus lanatus* seedings: [Master Degree Dissertation]. Zhengzhou, China: Henan Agricultural University (郑州: 河南农业大学), 2003
- Mithila J, Hall JC, Victor JMR, Saxena PK. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Rep*, 2003, **21**: 408~414
- Chalupa V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol Plant*, 1988, **30**: 414~421
- Feyissa T, Welander M, Negash L. *In vitro* regeneration of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. (Rosaceae) from leaf explants. *Plant Cell Rep*, 2005, **24**: 392~400
- Husain MK, Anis M, Shahzad A. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2007, **43**: 59~64