

## 研究报告

## Research Report

# 木本油料作物美藤果组织培养植株再生体系的建立

董玉玲<sup>1,2</sup> 陈茂盛<sup>1</sup> 王秀兰<sup>1</sup> 牛龙见<sup>1</sup> 付乾堂<sup>1</sup> 徐增富<sup>1\*</sup>

1 中国科学院西双版纳热带植物园, 热带植物资源可持续利用重点实验室, 勐腊, 666303; 2 中国科学院大学, 北京, 100049

\* 通讯作者, zfxu@xtbg.ac.cn

**摘要** 美藤果(*Plukenetia volubilis*)是大戟科(Euphorbiaceae)多年生木质藤本植物,其种子油富含多不饱和脂肪酸高达 85%,特别是  $\alpha$ -亚麻酸含量高达 50%,具有很高的营养价值。为了建立高效的美藤果植株再生体系,本研究采用正交实验方法,对影响美藤果芽再生效率的细胞分裂素 6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)、生长素吲哚丁酸(indole butyric acid, IBA)的浓度和不同发育阶段的美藤果子叶外植体这 3 个因素进行分析。结果表明 6-BA 浓度、IBA 浓度和子叶外植体发育阶段对美藤果再生芽诱导均有显著影响,作用效果依次为:不同外植体发育阶段>6-BA 浓度>IBA 浓度。在 5.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IBA 的条件下,用阶段(授粉后 130 d 的果实)的美藤果子叶作为外植体,有较好的再生芽诱导效果,最高芽诱导效率为 91.67%,每个外植体的再生芽数目为 5.5 个。此外,IBA 和 NAA 都可以促进美藤果再生植株根的形成,且 IBA 作用效果高于 NAA。IBA 和 NAA 的浓度分别为 0.6 mg/L 和 0.4 mg/L 的组合时,再生根的诱导效果最好,再生根诱导效率为 41.67%,每个芽的根数目为 7.1 个。美藤果植株再生体系的建立为优良苗木的大量无性繁殖,以及进一步的基因功能研究和利用基因工程技术进行品种改良奠定了基础。

**关键词** 美藤果, 子叶, 再生体系, 芽诱导, 根诱导

## Establishment of *In Vitro* Regeneration System of Woody oil Crop *Plukenetia volubilis*

Dong Yuling<sup>1,2</sup> Chen Maosheng<sup>1</sup> Wang Xiulan<sup>1</sup> Niu Longjian<sup>1</sup> Fu Qiantang<sup>1</sup> Xu Zengfu<sup>1\*</sup>

1 Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Menglun, 666303; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049

\* Corresponding author, zfxu@xtbg.ac.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.014.000462

**Abstract** Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) belonging to the Euphorbiaceae family, is a woody perennial vine. The polyunsaturated fatty acids content was approximately 85% in its seed oil, of which about 50% was the  $\alpha$ -linolenic acid. In order to develop a regeneration system of Sacha inchi, we optimized the conditions for regeneration from cotyledons at six developmental stages used as explants with different concentrations of 6-benzyladenine (6-BA) and indole butyric acid (IBA). The results showed that the best suitable conditions were cotyledon explants at developmental stage (130 day after pollen, DAP) and MS medium with 5.0 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L IBA. The effect of them on regeneration shoot induction was as following: the developmental stage of explant>6-BA>IBA. The shoot induction efficiency was 91.67% and the number of ones per explant was 5.5. Moreover, the suitable condition for regeneration root induction was 1/2 MS medium with 0.6 mg/L IBA and 0.4 mg/L NAA. The effect of IBA on root induction was more significant than one of NAA. The root induction efficiency was 41.67% and the number of roots per explant was 7.1. Our study provides a base for the rapid propagation and improvement of Sacha inchi varieties using genetic engineering method.

**Keywords** *Plukenetia volubilis*, Cotyledon, Plant regeneration, Shoot induction, Root induction

基金项目 本研究由云南省 2012 年技术创新暨产业发展专项资金项目(2012XB050)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-Z-15-01)和中国科学院“一三五”专项(XTBG-T02)共同资助

美藤果(*Plukenetia volubilis*),又名星油藤、南美洲油藤、印奇果、野花生、萨夏花生和山花生等,属于大戟科,原产于南美洲的热带雨林,是一种多年生木质藤本油料作物(蔡志全, 2011)。美藤果种子含油量约41%~54%,含蛋白质25%~27%,其油脂成分中多不饱和脂肪酸约占85%(Guillén et al., 2003)。美藤果种子油在食品、制药和化妆品的开发等方面具有巨大的应用潜力(Moser et al., 2007)。目前对美藤果的研究主要集中在对其种子成分和其油成分的分析(Cai et al., 2011; Gutiérrez et al., 2011; Maurer et al., 2012),以及对其生理生态特性方面的研究(Cai et al., 2012; Chandrasekaran and Liu, 2014; Wang et al., 2014)。有研究表明遮阴处理和高密度种植能够延迟美藤果的开花时间,降低光合作用效率,降低植株生物量,最终使花和果实的数目减少,表明美藤果是一种高需光性植物(Cai, 2011; Cai et al., 2013)。Tian等(2013)对接种丛枝菌根真菌的美藤果幼苗进行研究,发现在水分条件良好的条件下,丛枝菌根真菌能够促进美藤果的生长,提高美藤果光合作用效率及水分利用率。这种菌根真菌能与美藤果形成菌根共生体,提高光合作用效率和水分利用率,同时它能够激活抗氧化酶的作用,特别是降低干旱胁迫下过氧化氢的积累和氧化伤害。Niu等(2014)用时域核磁共振测定了不同发育阶段的美藤果种子含油量,结果表明,随着发育时间的增加,美藤果种子的含油量呈直线型增长。Fu等(2014)发现喷施6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)能够使美藤果雄花转变为雌花,显著提高单个果序的结果数量。Nascimento等(2013)从美藤果的叶片中提取到抗氧化物质,可抑制抗恶性肿瘤增殖。

植株再生体系的建立是利用植物离体组织、器官、细胞和原生质体等(Hill and Schaller, 2013),在一定的物理和化学条件下诱导出愈伤组织、不定芽和不定根,最后形成完整植株的过程。在植物的组织培养中,植物的子叶经常被选择作为外植体进行再生体系建立的研究(da Silva et al., 2013; Ren et al., 2013; Sugimoto and Meyerowitz, 2013)。

Wei等(2004)以小桐子(*Jatropha curcas* L.)的下胚轴为外植体, Murashige和Skoog(MS)培养基为基础培养基,添加不同浓度的6-BA和吲哚丁酸(IBA)进行再生芽和再生根的诱导,成功获得了再生植株。Pan等(2010)以小桐子成熟种子的子叶为外植体,配合不同浓度的6-BA和IBA,也成功诱导出再生芽,并利用IBA成功诱导出再生根。Konan等(1997)以木

薯(*Manihot esculenta* Crantz.)的茎节(Node)和腋芽分生组织为外植体,MS为基础培养基,添加不同浓度的6-BA、苯基噻二唑基脲(Thidiazuron, TDA)、激动素(Kinetin)和玉米素(Zeatin)成功诱导不定芽的形成。然而,有关美藤果的组织培养再生体系的研究还未见国内外报道。

本研究以美藤果不同发育阶段种子的子叶为外植体,采用不同浓度的6-BA、IBA和NAA进行摸索和优化,成功建立了美藤果的再生体系。高效的植株再生体系是优良苗木的大量无性繁殖和建立遗传转化体系的基础。因此,我们的研究结果对开展美藤果基因功能研究、发掘有重要应用价值基因的基础,进行美藤果优良品种的快速繁殖和品种改良具有重要意义。

## 1 结果与分析

### 1.1 美藤果子叶不定芽的诱导

我们选取了6个不同发育阶段的美藤果果实和种子(图1),取其子叶作为外植体,诱导再生芽。

发育阶段分别为授粉后65 d、80 d、95 d、110 d、120 d和130 d的美藤果种子。其中,阶段为发育阶段早期的种子,子叶较小;阶段种子的子叶大小不再变化,而种子颜色变深,逐渐成熟;阶段为已经完全成熟的种子,干物质含量达到稳定状态(Niu et al., 2014)。用上述6个发育阶段的子叶进行再生芽诱导,置于芽诱导培养基后,在第10天时,子叶开始变绿(图2B),在第60天时,再生芽长度为1~3 cm(图2C)。此时统计芽诱导效率和每个外植体诱导出的再生芽的数目。

随着6-BA浓度的升高,不定芽诱导效率相应升高(表1)。当6-BA的浓度为5.0 mg/L时,诱导效果最好;而随着IBA浓度的升高,芽诱导效率先升高,后降低,IBA浓度为0.2 mg/L时,诱导效果最好。美藤果种子的发育阶段对子叶的芽诱导效果有明显影响,随着美藤果种子逐渐成熟,芽诱导效率逐步升高。第阶段的子叶的芽诱导效率最好,而第阶段的子叶的芽诱导效率略有降低(表1),而对每个外植体的平均再生芽数目诱导效果最好的发育阶段为(表1)。方差分析显示,影响美藤果子叶再生芽诱导效果的3个因素中,外植体发育阶段影响最大,其次为6-BA,而IBA的作用不显著(表1;表2;表3)。使用第阶段的美藤果种子的子叶,在5.0 mg/L 6-BA和0.2 mg/L IBA的条件下,再生芽诱导效果最好,最

表 1 美藤果子叶再生芽诱导结果

Table 1 Results of shoot induction of *Plukenetia volubilis* with cotyledons as explants

处理 Treatment	6-BA 浓度(mg/L) Concentration of 6-BA (mg/L)	IBA 浓度(mg/L) Concentration of IBA (mg/L)	外植体发育阶段 Development stage of explant	芽诱导效率(%) Shoot induction efficiency (%)	芽数目 / 外植体 Shoot number/Explant
1	3	0.1		3.97±4.18	0.1±0.1
2	4	0.2		2.38±4.12	0.0±0.0
3	5	0.3		5.95±5.45	0.1±0.1
4	3	0.1		46.43±3.57	0.7±0.2
5	4	0.2		47.62±5.45	0.7±0.1
6	5	0.3		84.52±10.91	1.7±0.2
7	3	0.2		53.87±8.94	1.2±0.2
8	4	0.3		55.95±5.45	1.5±0.4
9	5	0.1		65.48±5.45	1.8±0.5
10	3	0.3		50.00±7.14	1.1±0.2
11	4	0.1		52.44±5.47	1.5±0.1
12	5	0.2		75.19±5.86	1.7±0.4
13	3	0.2		50.14±6.45	0.9±0.2
14	4	0.3		59.83±6.67	2.2±0.4
15	5	0.1		81.57±2.76	2.7±0.5
16	3	0.3		47.93±5.38	1.2±0.2
17	4	0.1		46.43±10.72	1.2±0.1
18	5	0.2		91.67±8.99	5.5±0.9
k1 (芽诱导效率)	42.06	49.39	4.10		
k1 (Shoot induction efficiency)					
k2 (芽诱导效率)	44.11	53.48	59.52		
k2 (Shoot induction efficiency)					
k3 (芽诱导效率)	67.40	50.70	58.43		
k3 (Shoot induction efficiency)					
k4 (芽诱导效率)			59.21		
k4 (Shoot induction efficiency)					
k5 (芽诱导效率)			63.85		
k5 (Shoot induction efficiency)					
k6 (芽诱导效率)			62.01		
k6 (Shoot induction efficiency)					
R (芽诱导效率)	25.34	4.09	59.75		
R (Shoot induction efficiency)					
k1 (芽数目 / 外植体)	0.90	1.30	0.10		
k1 (Shoot number/explant)					
k2 (芽数目 / 外植体)	1.20	1.70	1.00		
k2 (Shoot number/explant)					
k3 (芽数目 / 外植体)	2.30	1.30	1.50		
k3 (Shoot number/explant)					
k4 (芽数目 / 外植体)			1.40		
k4 (Shoot number/explant)					
k5 (芽数目 / 外植体)			1.90		
k5 (Shoot number/explant)					
k6 (芽数目 / 外植体)			2.60		
k6 (Shoot number/explant)					
R (芽数目 / 外植体)	1.40	0.40	2.50		
R (Shoot number/explant)					

注: k 为各因素同一水平的芽诱导效率或芽数目 / 外植体的平均值; R 值= $k_{\max}-k_{\min}$

Note: k values are shoot induction efficiency or shoot number/explant at every level of different factors; R represents the value of  $k_{\max}$  value minus  $k_{\min}$  value

表 2 美藤果再生芽诱导效率方差分析

Table 2 ANOVA analysis of shoot induction efficiency of *Plukenetia volubilis*

方差来源	型平方和	均方	F 值	p 值
Source of variation	Quadratic sum	Mean square	F value	p value
6-BA	7 131.75	3 565.87	38.78	0.00
IBA	157.07	78.53	0.85	0.43
外植体发育阶段	24 129.10	4 825.82	52.48	0.00
Developmental stage of explant				
误差	4 045.95	91.95		
Error				

表 3 美藤果每个外植体再生芽数目的方差分析

Table 3 ANOVA analysis of shoot number per explant of *Plukenetia volubilis*

方差来源	型平方和	均方	F 值	p 值
Source of variation	Quadratic sum	Mean square	F value	p value
6-BA	18.80	9.4	14.50	0.00
IBA	1.80	0.9	1.40	0.26
外植体发育阶段	34.10	6.8	10.50	0.00
Developmental stage of explant				
误差	28.60	0.9		
Error				

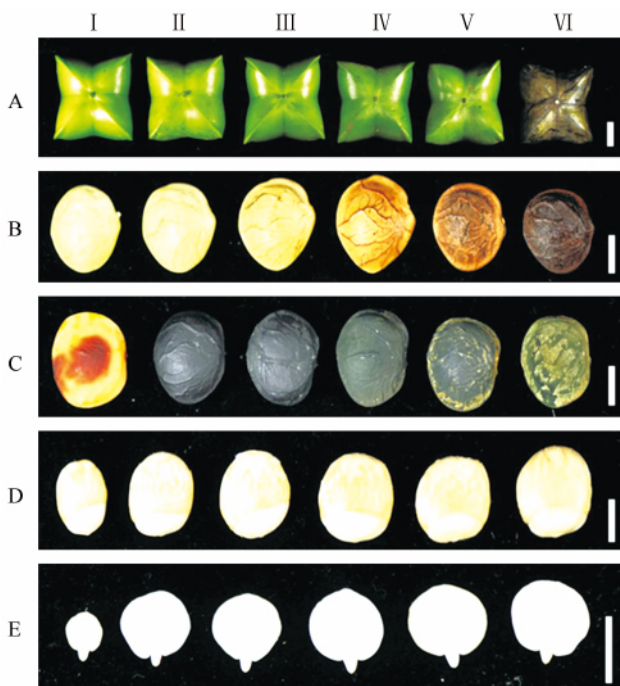


图 1 美藤果 6 个不同发育阶段的种子和胚

注: ~ : 分别为授粉后 65 d, 80 d, 95 d, 110 d, 120 d 和 130 d 的材料; A: 果实; B: 带外种皮的种子; C: 无外种皮的种子; D: 无外壳的种子; E: 胚; 标尺: 1 cm

Figure 1 Seeds and embryos of six different developmental stages  
Note: ~ : Indicated the 65 d, 80 d, 95 d, 110 d, 120 d, 130 d, respectively; A: Fruits; B: Seeds with exopleura; C: Seeds without exopleura; D: Uncoated seeds; E: Embryo; Bars: 1 cm

高芽诱导效率可达 91.67%, 每个外植体诱导出的再生芽为 5.5 个。

### 1.2 美藤果再生芽生根诱导

我们选取生长健壮、有明显主茎的美藤果再生芽, 分别用 0.3 mg/L、0.6 mg/L、0.9 mg/L IBA 和 0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.6 mg/L NAA 进行生根诱导(图 2D), 30 d 后开始统计生根效率及每个芽的根数目(图 2E)。如表 4 所示, 随着 IBA 浓度的增加, 根诱导效率先升高、后降低, 当 IBA 的浓度为 0.6 mg/L 时, 根诱导效率最好; NAA 的效果与 IBA 相似, 随着 NAA 浓度的增加, 诱导效率先升高、后降低, NAA 的浓度为 0.4 mg/L 时, 效果最好。方差分析显示, IBA 和 NAA 对美藤果根诱导都有明显影响, IBA 的诱导效果更好(表 4; 表 5; 表 6)。上述结果表明, 当 IBA 和 NAA 的浓度分别为 0.6 mg/L 和 0.4 mg/L 时, 对美藤果根诱导效果最好, 平均每个再生芽可以诱导形成 7.1 条再生根, 根诱导效率可以达到 41.67%。

### 1.3 美藤果再生苗的移栽

选取生长状况良好, 根系发达的组培苗, 洗净根部培养基, 置于 0.1% 多菌灵溶液中浸泡 1 h 后, 移植到灭菌处理的花卉土中, 用保鲜膜覆盖, 保持湿度。12 d 后去掉保鲜膜, 20 d 后可确定其成活(图 2F), 统



表 4 美藤果根诱导  $L_9(3^2)$  正交试验结果

Table 4 Orthogonal experiment results  $L_9(3^2)$  of *Plukenetia volubilis* root induction

处理 Treatment	IBA 浓度(mg/L) IBA concentration (mg/L)	NAA 浓度(mg/L) NAA concentration (mg/L)	根诱导效率(%) Root induction efficiency (%)	生根数(条)/芽 Root number/shoot
1	0.30	0.20	6.25±3.12	5.6±0.4
2		0.40	10.42±1.80	4.3±0.6
3		0.60	9.38±3.13	6.2±0.6
4	0.60	0.20	15.62±3.13	6.2±0.7
5		0.40	41.67±4.78	7.1±0.3
6		0.60	26.04±4.78	5.5±0.5
7	0.90	0.20	13.54±1.80	4.9±0.1
8		0.40	25.00±3.13	5.8±0.7
9		0.60	17.71±3.61	5.3±0.8
k1 (根诱导效率) k1 (Root induction efficiency)	8.98	11.81		
k2 (根诱导效率) k2 (Root induction efficiency)	29.31	25.70		
k3 (根诱导效率) k3 (Root induction efficiency)	20.24	20.73		
R (根诱导效率) R (Root induction efficiency)	20.33	13.89		
k1 (生根数(条)/芽) k1 (Root number/shoot)	5.40	5.60		
k2 (生根数(条)/芽) k2 (Root number/shoot)	6.80	5.70		
k3 (生根数(条)/芽) k3 (Root number/shoot)	5.30	6.20		
R (生根数(条)/芽) R (Root number/shoot)	1.50	0.60		

注: k 为各因素同一水平的根诱导效率或生根数(条)/芽的平均值; R 值= $k_{max} - k_{min}$

Note: k values are root induction efficiency or root number/shoot at every level of different factors; R represents the value of  $k_{max}$  value minus  $k_{min}$  value

表 5 美藤果再生根诱导效率方差分析

Table 5 ANOVA analysis of root induction efficiency of *Plukenetia volubilis*

方差来源 Source of variation	型平方和 Quadratic sum	均方 Mean square	F 值 F value	p 值 p value
IBA	1 549.41	774.70	24.78	0.00
NAA	888.04	444.02	14.20	0.00
误差 Error	687.88	31.27		

表 6 美藤果每株再生苗平均根数目数量方差分析

Table 6 ANOVA of root number per explant of *Plukenetia volubilis*

方差来源 Source of variation	型平方和 Quadratic sum	均方 Mean square	F 值 F value	p 值 p value
IBA	8.8	4.4	7.9	0.00
NAA	1.7	0.8	1.5	0.00
误差 Error	12.3	0.6		0.25

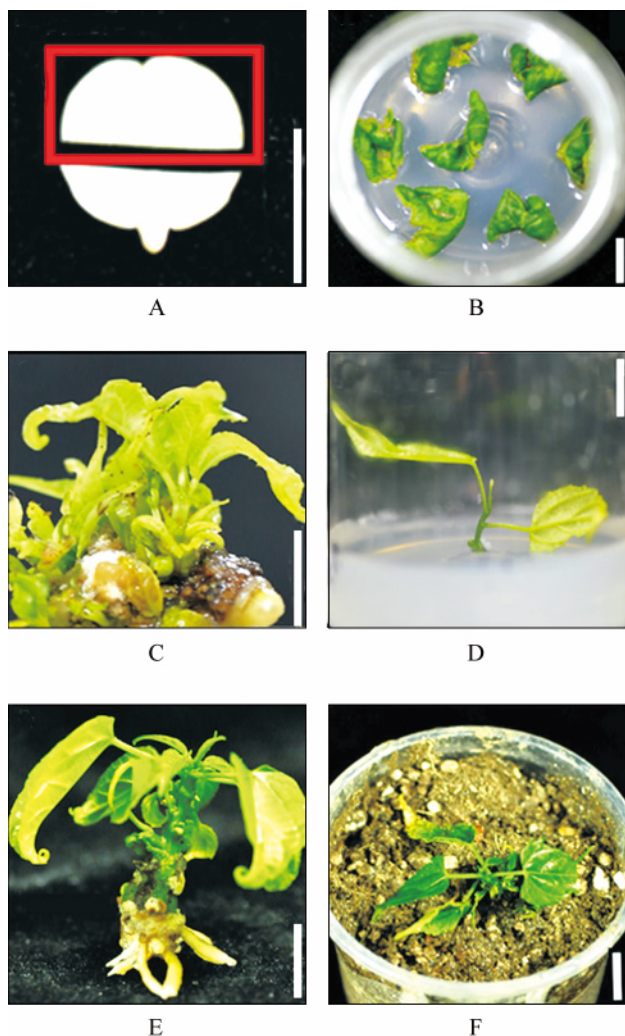


图2 美藤果组织培养再生体系

注: A: 子叶外植体; B: 芽诱导培养基上 10 d 后的外植体; C: 再生芽; D: 根诱导培养基的再生芽; E: 生根的再生苗; F: 移栽炼苗的再生植株; 标尺: 1 cm

Figure 2 Plant tissue culture and regeneration of *Plukenetia volubilis*

Note: A: Cotyledon explant; B: Explants status growing on the shoot induction medium for 10 days; C: Regenerated shoots; D: Regenerated shoot on root induction medium; E: Culture seedling with root; F: Transplant seedling; Bars=1 cm

计其移栽的成活率可达 92%。

## 2 讨论

本研究以不同发育阶段的美藤果子叶为外植体, MS 为基本培养基, 在不同浓度的 6-BA 和 IBA 的条件下, 对美藤果的再生芽诱导效率进行筛选。结果表明, 美藤果子叶发育阶段、细胞分裂素和生长素 3 个因素都对美藤果再生芽诱导有明显影响, 影响作用依次为: 子叶发育阶段 > 6-BA > IBA。除发育阶

段子叶再生芽诱导效率较低外, 其它几个发育阶段的子叶都有比较高的诱导效率。其中、和发育阶段子叶的诱导效果较好, 时期的子叶的芽诱导效率略有降低, 发育不完全种子的再生芽诱导效率下降, 可能是由于成熟胚和未成熟胚对芽诱导的机制不一致造成的(Murín et al., 2012)。Mirici 等(2005)发现芽诱导效率的不同可能与种子内源激素水平有关。Pal 等(2012)在对银合欢(*Leucaena leucocephala*)未成熟胚的组织培养时, 发现未成熟胚能够更好地诱导再生芽是因为含较多的全能性细胞。时期子叶的诱导效果较差可能是由于其处于发育的早期, 子叶质地较为幼嫩, 且在我们的实验过程中发现其较易受到损伤, 不易恢复, 所以致使其再生效果较差。

我们借鉴 Pan 等(2010)对大戟科植物小桐子的植株再生体系的建立方法, 所用的细胞分裂素为 6-BA, 可以促进愈伤组织和芽的形成; 所用的生长素为吲哚丁酸(IBA), 可促进生根, 尤其是不定根和芽的生长。有研究表明, 细胞分裂素与生长素的比值较大时, 可以促进再生芽的形成(Ibrahim and Debergh, 2001)。而在美藤果中, 再生芽的形成主要受细胞分裂素影响。当 6-BA 浓度为 5.0 mg/L 时, 子叶再生芽的诱导效率都最高, 而 IBA 对再生芽效率的影响较小, 在 0.2 mg/L 时, 有较好的效果。

本研究借鉴 Pan 等(2010)对同为大戟科植物小桐子的植株再生体系的建立中所用的生长素类激素 IBA, 添加另一生长素类激素 NAA, IBA 和 NAA 都为生长素类植物生长调节物质, 可诱导植株的不定根形成。在美藤果组织培养过程中, IBA 与 NAA 都能显著影响美藤果再生根的形成, 而 IBA 的作用效果更好。0.6 mg/L 的 IBA 和 0.4 mg/L 的 NAA 可较好地诱导美藤果植株再生根形成。

美藤果芽诱导效率最佳时 6-BA 浓度为 5.0 mg/L, IBA 浓度为 0.2 mg/L, 其细胞分裂素与生长素的比为 25:1。Pan 等(2010)小桐子再生芽的诱导中, 细胞分裂素与生长素类激素的比可高达 100:1 (3.0 mg/L 6-BA, 0.03 mg/L IBA)。Sujatha 和 Mukta (1996)最早探究小桐子再生芽的诱导时, 细胞分裂素与生长素类激素的比例为 0.9:1 (2.22  $\mu\text{mol/L}$  6-BA, 2.46  $\mu\text{mol/L}$  IBA), 芽诱导效率可达 67%。而 Catapan 等(2002)对叶下珠(*Phyllanthus urinaria* L.)的再生芽的诱导使用的细胞分裂素与生长素类激素的比例为 0.5:1 (1.25  $\mu\text{mol/L}$  6-BA, 2.50  $\mu\text{mol/L}$  2-isopentenyladenine (2-iP)。虽然上述几个植物都属于大戟科植物, 而诱导再生芽的细胞分裂素与生长素类激素的比例相差很大, 可能由于物

种之间的种属差异较大,对外源激素的敏感性不同所致。因此对具体物种再生芽诱导的合适激素比例需更加详细摸索。在本研究中,美藤果的最高芽诱导效率为 91.67%,但根的诱导效率仅有 41.67%,较小桐子的 51.9% (Kumar et al., 2010)略低,较叶下珠的 91%~100% (Catapan et al., 2002),五蕊油柑(*Phyllanthus tenellus* Roxb.)的 100% (Victório et al., 2010),蓖麻(*Ricinus communis* L.)的 87.5% (Alam et al., 2010)较低,说明美藤果的再生芽的根诱导条件需要继续优化。

本实验通过对细胞分裂素、生长素和美藤果子叶发育阶段 3 个因素的优化组合,初步建立了美藤果的再生体系,为美藤果优良苗木的大量无性繁殖以及遗传转化方法的建立和基因功能的研究奠定了基础。然而植物的再生诱导效率受品种、外植体的组织部位以及培养基中的植物激素种类和浓度影响较大(Gaspar et al., 1996; Murín et al., 2012; Akoyi et al., 2013)。因此,为了建立一个更高效的美藤果再生体系,需要对基因型和外植体的选择以及激素的配比等进行更多的改进和优化实验。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

美藤果植株种植于中国科学院西双版纳热带植物园,位于云南省勐腊县勐仑镇,东经 101°25',北纬 21°41',海拔 570 m。分别收集授粉后 65 d、80 d、95 d、110 d、120 d 和 130 d 的 6 个发育阶段的美藤果种子子叶(图 1)作为外植体,用于植株再生体系的建立。

#### 3.2 芽诱导

芽诱导培养基以 MS 为基本培养基,分别添加 3.0 mg/L、4.0 mg/L、5.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L IBA 的不同组合。分别收集 6 个发育阶段的美藤果果实,去果皮和种皮,洗净,用 75%乙醇浸泡 1 min,期间不断摇晃,无菌水冲洗 3 次,然后用 9.1%次氯酸钠溶液处理 15 min,期间不断摇晃,无菌水冲洗 3 次。剥取种子胚,切除近胚轴端约 1/4 的子叶,剩余子叶部分作为外植体(图 2A)。将外植体置于不同的培养基上进行再生芽的诱导,每 20 天继代一次。第 40 天时统计再生芽诱导效率,第 60 天时统计每个外植体的再生芽数目。培养室光照强度为 135  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照周期为 14h/10h,温度为(25±2)°C。

#### 3.3 根诱导

根诱导培养基以 1/2 MS 为基础培养基,分别添

加 0.3 mg/L、0.6 mg/L、0.9 mg/L 的 IBA 和 0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.6 mg/L 的 NAA。待再生芽长至 1~3 cm 时,将生长较为健壮、有明显主茎的芽切下,并接入根诱导培养基,30 d 后统计根诱导效率和每株再生苗的生根数目。培养室光照强度为 135  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照周期为 14 h/10 h,温度为(25±2)°C。

#### 3.4 正交实验设计

芽诱导分别以不同发育阶段的子叶、6-BA 和 IBA 浓度 3 个因素的不同水平进行正交设计,共得到有 18 个组合(表 1)。每组包括 3 次生物学重复,每个生物学重复包含 28 个外植体。根诱导培养包含 IBA 和 NAA 浓度两个因素的 3 水平的组合,共 9 个组合(表 4)。每组包括 3 次生物学重复,每个生物学重复包含 32 个再生芽。

#### 3.5 数据处理

再生芽诱导效率=诱导出芽的外植体数量/总外植体数量×100%;芽数量/外植体=每处理中产生总芽数量/总外植体数量。再生根诱导率=生根的芽数量/总接种芽数量×100%。

数据的方差分析利用 SPSS 19.0 (ver. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL)的单因素方差分析方法进行,所有参数为默认。

#### 作者贡献

董玉玲是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成数据分析和论文初稿的写作;陈茂盛参与论文的写作与修改;王秀兰和付乾堂参与前期的实验条件摸索;牛龙见帮助完成实验材料的采集和数据的收集;徐增富是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

本研究由云南省 2012 年技术创新暨产业发展专项资金项目(2012XB050)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-Z-15-01)和中国科学院“一三五”专项(XTBG-T02)共同资助。

#### 参考文献

Akoyi J., Mgtutu A.J., Machuka J., Van Lijsebettens M., Taracha C., and Anami S.E., 2013, Dicamba growth regulator promotes genotype independent somatic embryogenesis from



- immature zygotic embryos of tropical maize inbred lines, *Journal of Life Sciences*, 7(7): 677-689
- Alam I., Sharmin S.A., Mondal S.C., Alam J., Khalekuzzaman M., Anisuzzaman M., and Alam M.F., 2010, 'In vitro' micropropagation through cotyledonary node culture of castor Bean (*Ricinus communis* L.), *Australian Journal of Crop Science*, 4(2): 81-84
- Cai Z.Q., 2011, Advance in research on a special woody oilseed crop of *Plukenetia volubilis* L., *Zhongguo Youzhi (China Oils and Fats)*, 36(10): 1-6 (蔡志全, 2011, 特种木本油料作物星油藤的研究进展, *中国油脂*, 36(10): 1-6)
- Cai Z.Q., 2011, Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) plants, *Industrial Crops and Products*, 34(1): 1235-1237
- Cai Z.Q., Jiao D.Y., Lei Y.B., Xiang M.H., and Li W.G., 2013, Growth and yield responses of *Plukenetia volubilis* L. plants to planting density, *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 88(4): 421-426
- Cai Z.Q., Jiao D.Y., Tang S.X., Dao X.S., Lei Y.B., and Cai C.T., 2012, Leaf photosynthesis, growth, and seed chemicals of *Sacha Inchi* plants cultivated along an altitude gradient, *Crop Science*, 52(4): 1859-1867
- Cai Z.Q., Yang Q., Tang S.X., and Dao X.S., 2011, Nutritional evaluation in seeds of a woody oil crop, *Plukenetia volubilis* Linneo, *Acta Nutrimenta Sinica*, 33(2), 193-195
- Catapan E., Luís M., da Silva B., Moreno F.N., and Viana A.M., 2002, Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(3): 301-309
- Chandrasekaran U., and Liu A., 2014, Stage-specific metabolization of triacylglycerols during seed germination of *Sacha Inchi (Plukenetia volubilis* L.), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8): 1764-1766
- da Silva J.A.T., Dobránszki J., and Ross S., 2013, Phloroglucinol in plant tissue culture, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(1): 1-16
- Fu Q.T., Niu L.J., Zhang Q.F., Pan B.Z., He H.Y., and Xu Z.F., 2014, Benzyladenine treatment promotes floral feminization and fruiting in a promising oilseed crop *Plukenetia volubilis*, *Industrial Crops and Products*, 59: 295-298
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., and Thorpe T.A., 1996, Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4): 272-289
- Guillén M.D., Ruiz A., Cabo N., Chirinos R., and Pascual G., 2003, Characterization of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR, comparison with linseed oil, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 80(8): 755-762
- Gutiérrez L.F., Rosada L.M., and Jiménez Á., 2011, Chemical composition of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction, *Grasasy Aceites*, 62(1): 76-83
- Hill K., and Schaller G.E., 2013, Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity, *Plant Signaling & Behavior*, 8(10): 212-224
- Ibrahim R., and Debergh P.C., 2001, Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.), *Scientia Horticulturae*, 88(1): 41-57
- Konan N.K., Schöpke C., Cárcamo R., Beachy R.N., and Fauquet C., 1997, An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems, *Plant Cell Reports*, 16 (7): 444-449
- Kumar N., Vijay Anand K.G., and Reddy M.P., 2010, Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of jatropha curcas: a biodiesel plant, *Acta Physiol Plant*, 32(5): 917-924
- Maurer N.E., Hatta-Sakoda B., Pascual-Chagman G., and Rodriguez-Saona L.E., 2012, Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil, *Food Chemistry*, 134 (2): 1173-1180
- Mirici S., Parmaksız I., Özcan S., Sancak C., Uranbey S., Sarıhan E.O., Gümüşcü A., Gürbüz B., and Arslan N., 2005, Efficient in vitro bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(3): 239-246
- Moser P., Freis O., Gillon V., and Danoux L., 2007, Extract of a plant belonging to the genus *Plukenetia volubilis* and its cosmetic use, US20070264221A1
- Murín R., Mészáros K., Nemecek P., Kuna R., and Faragó J., 2012, Regeneration of immature and mature embryos from diverse sets of wheat genotypes using media containing different auxins, *Acta Agronomica Hungarica*, 60(2): 97-108
- Nascimento A.K.L., Melo-Silveira R.F., Dantas-Santos N., Fernandes J.M., Zucolotto S.M., Rocha H.A.O., and Scortecchi K.C., 2013, Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae), *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, eCAM 2013: 1-10
- Niu L., Li J., Chen M.S., and Xu Z.F., 2014, Determination of oil contents in *Sacha inchi (Plukenetia volubilis)* seeds at different developmental stages by two methods: Soxhlet extraction and time-domain nuclear magnetic resonance, *Industrial Crops and Products*, 56: 187-190
- Pal A., Negi V.S., and Borthakur D., 2012, Efficient *in vitro* re-



- generation of *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos as explants, *Agroforestry Systems*, 84(2): 131-140
- Pan J., Fu Q., and Xu Z.F., 2010, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection, *African Journal of Biotechnology*, 9(39): 6477-6481
- Ren Y., Bang H., Gould J., Rathore K.S., Patil B.S., and Crosby K.M., 2013, Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus), *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49 (2): 223-229
- Sugimoto K., and Meyerowitz E.M., 2013, Regeneration in Arabidopsis tissue culture, *Plant Organogenesis* (Springer), 959: 265-275
- Sujatha M., and Mukta N., 1996, Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(2): 135-141
- Tian Y.H., Lei Y.B., Zheng Y.H., and Cai Z.Q., 2013, Synergistic effect of colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves growth and drought tolerance of *Plukenetia volubilis* seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3): 687-696
- Victório C.P., Henriques A.B., Tavares E.S., Esquibel M.A., and Lage C.L.S., 2010, Standardized production of *Phyllanthus tenellus* Roxb. by plant tissue culture, *Revista Ciência Agronômica*, 41(2): 272-278
- Wang Y., Xie Y., Cui H.D., and Dong Y., 2014, First report of *Meloidogyne javanica* on sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) in China, *Plant Disease*, 98: 165
- Wei Q., Lu W.D., Liao Y., Pan S.L., Xu Y., Tang L., and Chen F., 2004, Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*, *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30(4): 475-478

### 《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的月刊科学期刊。《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学和应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶和发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表和引用文献等均实行中英文对照。

《基因组学与应用生物学》,前身是原《广西农业大学学报》,创刊于1982年。《基因组学与应用生物学》(原名《广西农业生物科学》)入编了2011-2014年版北大图书馆《中文核心期刊要目总览》核心期刊,是中国科学引文数据“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA: JYYSAZ)、美国《剑桥科学文摘: 自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

《基因组学与应用生物学》(Genomics and Applied Biology) ISSN1674-568X, CN45-1369/Q, 邮发代号: 48-213; 月刊, 每月25日出版, 国内定价: ¥40.00/期, ¥480.00/年, 国际定价 \$40.00/期, \$480.00/年。

订户可到当地邮局订阅或直接通过邮局汇款至编辑部。

邮局汇款:

地址: 广西南宁市大学东路100号广西大学西校园《基因组学与应用生物学》编辑部1楼111室

邮编: 530004

收款单位: 《基因组学与应用生物学》编辑部

联系电话: 0771-3239102, 0771-3232621

传真: 0771-3232621

E-mail: gab@gabcn.org

网址: www.gabcn.org