

枸杞髓组织离体培养及高频率植株再生的研究

曹有龙¹, 陈放¹, 罗青², 曲琳²

5567.103-5

(1. 四川大学生物系, 四川成都 610064. 2. 宁夏农科院农业生物技术研究室, 宁夏银川 750002)

摘要: 枸杞髓组织在 4 种 MS 培养基上都能诱导出愈伤组织, 诱导率 53.7%~100%。在培养基 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 获得的愈伤组织, 呈颗粒状, 分散性能好, 胚性细胞多。将其转移到 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L 的分化培养基上获得大量绿色小芽, 小芽在 MS+6-BA 0.2 mg/L 的培养基上得到快速繁殖, 繁殖系数 50~150 株/芽·月。丛生芽在 MS+NAA 0.2 mg/L 的培养基上形成完整植株。

关键词: 枸杞; 髓组织; 离体培养; 植株再生

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A

In vitro culture of pith tissue and high-frequency plant regeneration of *Lycium barbarum* L.

CAO You-long¹, CHEN Fang¹, LUO Qing², QU Lin²

(1. Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Laboratory of Biotechnology, Ningxia Academy of Agricultural Sciences, Yinchuan 750002, China)

Abstract: A study on pith tissue culture on MS medium with different hormone, the induction rate was 53.7%~100%. Among which the calli induced on medium MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L were smallest in particle size and had good dispersion ability with a large quantity of embryonic cells. The calli were moved onto MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L differentiation medium and a large quantity of embryonic plants were obtained. The embryonic plants were reproduced rapidly after they were removed onto medium MS+6-BA 0.2 mg/L with the reproduction rate of 50~150 clusters shoot/bud·month. Complete plants were induced on MS+NAA 0.2 mg/L medium.

Key words: *Lycium barbarum* L.; pith tissue culture; *in vitro* culture; plant regeneration

枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 是重要的药用植物, 多年来, 国内外科技工作者十分重视枸杞的组织培养, 已有用叶片、花药、下胚轴、茎端及幼嫩子房为材料进行组织培养分化出植株的^[1,2,3], 我们在此基础上, 以枸杞髓组织为试验材料进行组织培养, 获得了再生植株, 为枸杞细胞突变体的筛选、细胞悬浮培养、原生质分离、细胞杂交、基因转移的研究提供依据。

收稿日期: 1998-08-09

作者简介: 曹有龙 (1963-), 男, 博士研究生, 植物学专业。

基金项目: 国家九五攻关项目

1 材料和方法

1.1 试验材料 供试材料为宁夏农科院枸杞研究所培育的高产优质枸杞新品种——宁杞1号。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 取当年生长的明显分化成髓组织的枝条,摘除叶子、侧芽和带有分生组织的顶端100 mm,把外植体的切端蘸熔蜡封着伤口,然后浸入70%酒精中20 s,再转入0.1% HgCl₂溶液中,经过8~10 min后,用无菌水冲洗3遍,最后以吸水纸吸干,从茎的两端各切除10 mm,余下部分切成20 mm的小段,用无菌镊子夹着茎的切段,用瓶塞打孔器从切段中取出圆柱体髓组织,并将其转移到90 mm的无菌培养皿中,用解剖刀切成2~3 mm厚的小圆片,接种到4种含不同激素的MS固体培养基上诱导愈伤组织发生。

1.2.2 愈伤组织的继代培养 在P₂培养基中加入500 mg/L的水解酪蛋白作为继代培养的培养基,挑选色泽鲜艳、生长迅速的愈伤组织进行继代培养,每次20 d,2~3次继代后,出现疏松颗粒状胚性愈伤组织,选择颗粒较细的愈伤组织,加快继代频率(2周1次),当愈伤组织易碎、颗粒均匀且生长迅速时,改为3周1次保存之。

1.2.3 分化培养 将上述继代过程中产生的胚性愈伤组织转移到含不同浓度的6-BA和NAA的MS培养基上,4周后观察不同培养基上愈伤组织的分化出芽情况。

1.2.4 生根培养 选择较为健壮的丛生芽,切除底部的叶片,只保留上部2~3片叶,插入生根培养基中,3周后观察其生根情况。

在上述各步骤中,各外植体均接种于容量为120 ml的三角瓶中,每瓶3~4个外植体,每处理3~4次重复。培养条件:温度20~25℃,每日光照10~12 h,光照强度为2 500~3 000 lx。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和生长

枸杞髓组织切片接到诱导培养基上3 d后开始膨大,在切面上开始形成白色愈伤组织(图版I:1),其中P₁培养基诱导频率最高,可达95.7%;P₃与P₄培养基诱导的愈伤组织白色紧密,不易分散,经过30 d继代培养,有的可直接分化出苗,但频率很低(表1),而P₂培养基上诱导的愈伤组织为淡黄色松散型,这种愈伤组织继代转接后能迅速生长,多次

继代培养后,颗粒小,分散好,难以用镊子夹起来,而且胚性细胞多,分化频率高。

2.2 2,4-D对愈伤组织继代的影响

在P₁培养基中,我们加入植物激素2,4-D 0.5 mg/L诱导愈伤组织发生,诱导率为100%,这说明2,4-D对枸杞愈伤组织的诱导有一定的促进作用,将其转入含不同激素成分的培养基中进行继代培养,结果如表2。

表1 枸杞髓组织在不同激素配比培养基上的诱导情况
Table 1 Effects of hormones on calli induction of *Lycium barbarum* L. pith tissue

培养基编号 No. of medium	培养基组分 (mg/L) Contents of medium	开始启动时间 (d) Time of calli produced	接种块数 (块) Number of explants planted	出愈块数 (块) Number of explants with calli induction	诱导频率 (%) Percentage of calli induction
P ₁	MS+2,4-D 0.5	3	95	95	100
P ₂	MS+6-BA 0.1+NAA 0.5	10	95	75	78.9
P ₃	MS+6-BA 0.5+NAA 0.5	14	95	70	73.7
P ₄	MS+NAA 0.1+KT 0.5	14	95	51	53.7

从表 2 可以看出, 2, 4-D 对枸杞愈伤组织的形成在一定范围内(0.5~2 mg/L)随 2, 4-D 浓度的增加, 愈伤组织生长加快, 但褐化时间提前。当 0.5 mg/L 2, 4-D 与 0.5 mg/L KT 配合使用时, 愈伤组织生长速度很低, 而且变得十分坚硬, 颜色也由白色转为绿色, 近培养基部分 2 d 后出现褐化; 培养基中添加 500 mg/L CH 对愈伤组织的生长有很好的促进作用。

当把培养基含 2, 4-D 0.5 mg/L 诱导出的愈伤组织转到 P₂ 培养基后, 愈伤组织逐渐转变为颗粒状胚性愈伤组织, 与 P₂ 培养基上诱导的愈伤组织物质很相似(图版 I: 2), 因此, 如果用含 2, 4-D 0.5 mg/L 的培养基诱导愈伤组织发生, 用 P₂ 培养基进行继代培养, 将获得大量颗粒状胚性愈伤组织, 因此, 这种方法是枸杞进行离体快繁较为适宜的途径。

2.3 分化培养

将经过 P₂ 培养基进行继代培养 15 d 的愈伤组织转入附加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂, 500 mg/L CH, pH5.8~6.0 含不同 6-BA 浓度的 MS 分化培养基, 两周后开始形成芽点, 可进一步发展成芽丛(图版 I: 3), 所做不同植物激素配比试验结果表明, 枸杞愈伤组织芽的分化需要一定浓度 6-BA, 所使用的 5 种含 6-BA 的培养基分化频率都在 90% 以上, 6-BA 浓度高, 每块愈伤组织得苗数多, 但玻璃化苗也多, 6-BA 与 NAA 配合使用, 能显著提高愈伤组织的分化频率, 但同时愈伤组织也得到增殖, 分化得到的苗必须及时转移, 否则苗的基部又会转化为愈伤组织。单独使用 6-BA, 浓度为 0.5 mg/L 或者附加 NAA 0.01 mg/L 时愈伤组织分化频率略为下降, 但分化出的苗正常, 比较几种培养基分化出苗的结果, 以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L 结果最好(表 4)。

2.4 芽的扩增

在愈伤组织上分化形成的芽, 等长到 2 cm 高时, 将其沿基部切下, 转入含不同 6-BA 浓度的培养基中, 使其扩增, 结果如表 5。从表 5 可以看出, 以 MS+6-BA 0.2 mg/L 时, 芽生长正常, 经过 20 d 的培养, 每芽可产生 50~150 株无根苗(图版 I: 4), 但 BA 为 1 mg/L 时, 芽不能进行扩增, 培养 20 d 后就转变为玻璃化苗, 6-BA 0.5 mg/L 的培养基虽能进行扩繁, 但随着培养时间的延长, 部分也转化为玻璃化苗。

表 2 2,4-D 对枸杞愈伤组织的影响

Table 2 Effects of 2,4-D on calli of *Lycium barbarum* L.

培养基编号 No. of medium	激素浓度 (mg/L) Hormone concentration	生长情况 Growth status	褐化时间(d) Time of calli become brown	愈伤组织特点 Calli characteristics
(1)	MS+2,4-D 2	+++	10	白色水质状、生长快
(2)	MS+2,4-D 1	+++	12	白色水质状、生长快
(3)	MS+2,4-D 0.5	++	25	白色松散、生长较快
(4)	MS+2,4-D 0.5+CH	++	38	白色松散、生长较快
(5)	MS+2,4-D 0.5+KT 0.5	-	2	白色紧密, 颜色由白转绿
(6)	MS+NAA 0.5+6-BA 0.5	++	-	淡黄色、颗粒状

注 愈伤组织生长情况分四级 +很少 ++少 +++中等 ++++大量
Four classes were divided according to the callus growth: +very small ++small +++medium ++++large

表 3 不同植物激素对枸杞愈伤组织分化频率的影响

Table 3 Effects of different hormones on differentiation rate of *Lycium barbarum* L. calli

培养基 (mg/L) Medium	分化频率(%) Regeneration rate	每块愈伤组织平均的苗数(个) Average number of shoots on a single callus	特征 Characteristics
6-BA 2	100	12	大多数玻璃化
6-BA 1	90	10	部分玻璃化
6-BA 0.5	97	8	正常
6-BA 0.5+NAA 0.5	90	10	芽基部有愈伤组织产生
6-BA 0.5+NAA 0.01	93	11	正常

表 4 枸杞芽的扩繁

Table 4 Reproduction of buds

培养基 Medium	繁殖系数(株/月·芽) Coefficient of reproduction	特征 Characteristics
MS+6-BA 1	0-5	转变为玻璃化苗
MS+6-BA 0.5	10-30	部分有玻璃化现象
MS+6-BA 0.2	50-150	正常苗

2.5 生根培养

将丛生芽沿基部切下, 接种到生根培养基上诱导生根, 结果如表 5。

从表 5 可以看出, 无激素或者高浓度的生长素不利于枸杞幼芽根的形成, 低浓度的生长素对根的形成有促进作用, 当培养基中含有 NAA 0.2 mg/L 时, 能形成大量完整植株 (图版 I: 5), 生根率可达 92%, 且不定根较粗, 并有侧根出现。

2.6 试管苗移栽

直接从培养基中取出立即移栽的幼苗一般不易成活, 7 d 后就枯萎死亡。但再生苗经过 7 d 的练苗后, 再进行移栽, 所栽 6 盆 36 株幼苗, 成活 14 株, 成活率 38.9%, 再生苗移栽 20 d 后开始生长, 叶片变绿、变厚, 侧枝萌发, 30 d 后主茎杆形成, 开始木质化, 三个月后形成完整植株 (图版 I: 6)。

3 讨论

枸杞体细胞胚的诱导和植株再生已有过报道^(4,5), 并已用愈伤组织进行了悬浮培养^(6,7,8), 最近, 通过原生质体培养得到了愈伤组织, 但没有形成再生植株。本文报道的试验结果与以往相比, 一是培养材料选用枸杞髓组织, 二是筛选出了具高分化潜能的颗粒状愈伤组织, 继代一年多仍保持较高的分化频率, 为枸杞抗病突变体筛选, 原生质体融合培养以及外源基因转移的研究提供了一个有用的系统。

枸杞髓组织由薄壁细胞组成, 细胞间隙较大, 在诱导培养条件下易于发生突变⁽⁹⁾, 我们以其为材料进行离体培养并获得再生植株, 这为枸杞筛选新的品种打下基础。

我们以枸杞髓组织为实验材料, 在取材方面, 采用石蜡封着切口, 防止 HgCl₂ 和酒精等消毒液侵入髓组织内部而使髓细胞遭到破坏, 得到比较满意的效果。

植物激素 2,4-D 在枸杞髓组织的愈伤组织诱导中有重要的作用, 但高浓度的 2,4-D 不利于愈伤组织的诱导, 而以 0.5 mg/L 效果最佳, 诱导率达 100%。以 MS + 0.5 mg/L 2,4-D 诱导愈伤组织发生; 以 P₂ 培养基进行继代培养; 以 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L 进行分化培养; 以 MS + 0.2 mg/L NAA 进行生根培养, 这是枸杞进行离体培养的一条理想途径。

参考文献

- (1) 王莉. 枸杞胚乳植物的诱导和它的倍性水平 (J). 遗传学报, 1985, 12 (6): 440~444
- (2) 张尔荣, 刘成安. 枸杞叶柄的组织培养 (J). 植物学通报, 1995, 8 (4): 50~51
- (3) 陈维伦, 郭东红. 枸杞叶片愈伤组织的诱导及植株再生 (J). 植物学报, 1980, (6): 40~41
- (4) 顾淑荣, 林光耀, 刘淑琼. 枸杞胚乳愈伤组织的悬浮培养及无丝分裂的活体观察 (J). 植物学报, 1991, 33 (6): 478~481
- (5) 杨汉民, 高清强. 植物体细胞胚的诱导和形态发生. 植物学通报 (J), 1991, 8 (增刊): 56~62
- (6) Liu C S. An efficient method for selecting embryogenic callus from *Lycium chinensis* L. cell culture (J). *Plant Science (Limerpuck)*, 1992, 79 (1): 99~104
- (7) Ratushnyak Y, Rudas V A, Piven N M. Regeneration of *Lycium barbarum* L. plants from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts (J). *Plant Cell Reports*, 1990, 9 (2): 84~87
- (8) Spies J J, Van Wyk S M C. Cell fusion: A possible mechanism for the origin of polyploid (J). *South African Journal of Botany*, 1995, 61(2), 60~65
- (9) Constantin M J. Chromosome instability in cell and tissue culture and regenerated plants (J). *Environmental and Experimental Botany*, Printed in Great Britain 1981, 21 (3/4): 359

表 5 不同植物激素浓度对枸杞幼芽生根的影响
Table 5 Effects of different hormones concentration on inducing root of *Lycium barbarum* L.

培养基 (mg/L) Medium	接种苗数(个) Number of planted shoots	生根芽数(个) Number of shoots with induced root	生根率(%) Rate of root formation
MS 0	50	2	4
MS+NAA 1	50	0	0
MS+NNAA 0.5	50	1	2
MS+NAA 0.2	50	46	92