

宁夏枸杞叶片组培快繁技术研究

郑国琴^{1,2}, 柳金凤²

(1. 宁夏大学 生命科学学院,宁夏 银川 750004;2. 宁夏林业研究所股份有限公司 种苗生物工程国家重点实验室,宁夏 银川 750004)

摘要:以宁夏枸杞的叶片为外植体,进行愈伤组织诱导、不定芽诱导、分化、试管苗生根、移栽的研究。结果表明:MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L是叶片愈伤组织和不定芽诱导的最佳培养基;MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.8 mg/L是试管苗分化的最佳培养基;1/2MS+IBA 0.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L是试管苗生根的最佳培养基。

关键词:枸杞;外植体;叶片;组织培养

中图分类号:S 665.903.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)01-0122-03

枸杞(*Lycium barbarum* L.)是茄科枸杞属的多分枝灌木植物^[1],具有较高的药用价值^[2-3]。由于自然环境恶化以及生产管理不到位,严重阻碍了枸杞产业的发展^[4]。这就对枸杞育种工作提出了更高的要求,随着植物耐盐分子机制研究的不断深入和转基因技术的不断完善,目前已有很多耐盐转基因植物的成功报道^[5]。由于枸杞本身就是耐盐农作物,更是西北地区重要的经济作物,如果能够利用转基因技术培育出耐盐性更高的枸杞,就能够利用更多闲置的盐碱地,具有很大的社会价值。耐盐转基因试验多采用叶盘侵染法^[6-7],因此叶片再生体系的建立和优化至关重要。该试验以枸杞叶片为外植体,建立并优化其再生体系,以期为枸杞耐盐转基因试验的开展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为银川植物园的枸杞,取长势健康、无病虫害的叶片为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 培养温度为(25±2)℃,光照时间为12 h/d,光照强度为2 000~2 500 lx。以MS为基本培养基,诱导和分化培养基中的蔗糖浓度为30 g/L,生根培养基所用蔗糖浓度为15 g/L,琼脂均为7 g/L,附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。

1.2.2 外植体消毒灭菌 将采来的枸杞叶片用洗衣粉水涮洗,然后用自来水冲洗20 min置于超净工作台上,用75%的酒精振荡消毒30 s,用无菌水冲洗1遍,然后用0.1%的氯化汞溶液振荡消毒3~4 min,再用无菌水

清洗5~6遍,即获得无菌叶片。

1.2.3 培养基设计 愈伤组织和芽诱导培养基有M1:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;M2:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;M3:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L;分化培养基有M4:MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.8 mg/L;M5:MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.8 mg/L;M6:MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.8 mg/L;生根培养基有M7:1/2MS+IBA 0.3 mg/L+NAA 0.05 mg/L;M8:1/2MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;M9:1/2MS+IBA 0.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织和不定芽的诱导

将无菌叶片剪成0.5 cm×0.5 cm,接入附加不同激素配比的MS固体培养基上进行愈伤组织的诱导。每个处理5板,每个平皿中接种12个叶片。从表1可看出,NAA与6-BA搭配的诱导效果比较好,M1:MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L是叶片愈伤组织、不定芽诱导的最佳培养基,不仅诱导率高,而且所用的诱导时间最短。

表1 不同激素配比对枸杞愈伤组织
和不定芽诱导的影响

激素水平 /mg·L ⁻¹		接种量 /片	愈伤数 /个	观察 时间 /d	愈伤率 /%	萌芽数 /d	萌芽 时间 /d	萌芽率 /%
6-BA	NAA							
1.0	0.2	60	59	8	95	58	14	99
1.0	0.5	60	23	19	38	4	33	17
1.0	1.0	60	49	22	82	19	26	39

将枸杞叶片转入诱导愈伤组织培养基中后,4 d左右叶片体积开始增大。在培养过程中发现叶片边缘卷曲,约8 d左右,在切口边缘可见绿色的愈伤组织,继续观察,14 d左右发现有芽点出现,25 d左右发现大量芽点出现。还有一部分叶片,一开始形成了疏松的团状白

第一作者简介:郑国琴(1985-),女,在读硕士,现从事植物基因工程研究工作。E-mail:409995127@qq.com。

基金项目:宁夏自治区科技攻关资助项目(S20116400004)。

收稿日期:2011-10-10

色愈伤组织,随后形成致密的绿色愈伤组织,继续生长,出现芽点,继续培养芽点可长成小植株。

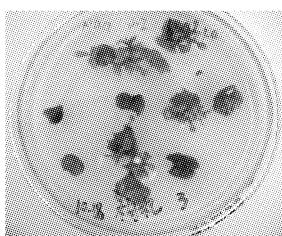


图1 愈伤组织和不定芽诱导



图2 枸杞试管苗分化

2.2 芽分化培养

将从愈伤诱导出的芽(当芽长至0.5~1.0 cm时)转入到MS分化培养基中进行分化培养。在培养基中分别加入不同浓度配比的6-BA与IAA,在培养箱中培养。由表2可知,M4:MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.8 mg/L是最佳的分化培养基。当生长素的浓度为0.8 mg/L时,细胞分裂素的浓度越高,分化苗的玻璃化现象越严重,且生长缓慢,培养基M6的结果表明,细胞分裂素的浓度过高,反而会抑制枸杞芽的分化生长。当细胞分裂素浓度为0.3 mg/L时,即生长素与其浓度配比为2.6时,芽分化系数最高,生长最旺盛。分化培养中出现了玻璃化现象,玻璃化通常与培养基成分以及培养湿度方面有很大关系。该试验采用提高培养基中蔗糖含量和改善培养容器透气性2种方法缓解玻璃化现象。提高蔗糖含量是从根本上降低培养基中的渗透势,降低植物细胞的吸水量,减少培养基中植物组织可获得的水分,从而解决试管苗玻璃化问题。

表2 不同激素配比组合对无根苗分化的影响

激素水平 /mg·L ⁻¹		接种量 /株		分化时间 间/d		分化系数		分化数 /株		分化率 /%		组培苗生长情况
6-BA	IAA											
0.3	0.8	30	12	4.9	29	97						长势较快,伸长生长平均1~2 cm,无玻璃化现象
0.5	0.8	30	15	4.0	25	83						丛生芽较多,生长较弱,部分发生玻璃化现象
1.0	0.8	30	15	2.6	20	67						生长缓慢,玻璃化现象较为严重

2.3 生根培养

待芽接到分化培养基中3~4周,选取长势健康的单株分化苗转入不同浓度配比的生根培养基中。由表3可看出,M9:1/2MS+IBA 0.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L是试管苗生根的最佳培养基。利用IBA与NAA不同浓度的配比,筛选能够诱导生根的生长素与细胞分裂素组合。当IBA和NAA浓度太小时,根系生长较弱,且生根率低,随着浓度的增大,发现浓度配比为IBA 0.6 mg/L、NAA 0.2 mg/L时,试管苗生根情况最好。不仅生根时间短、生根率高,且根系生长旺盛。

表3 不同浓度激素配比对生根的影响

IBA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种量 /株	生根时间 间/d		生根数 /株	生根率 /%	根系生长情况
			生根时 间/d	观察时 间/d			
0.3	0.05	35	15	20	21	59	多数1~2条根,根系较弱
0.5	0.1	35	11	20	32	91	平均根长0.3~0.5 cm,单株2~3条根
0.6	0.2	35	7	20	33	95	平均根长0.5~1.0 cm,根系生长旺盛,单株4~6条根,生根时间短

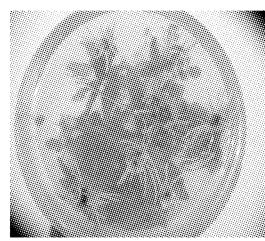


图3 枸杞组培苗生根

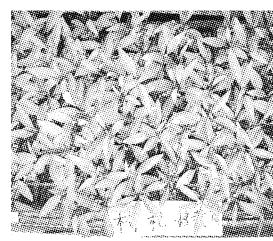


图4 枸杞移栽苗

2.4 练苗移栽

当试管苗生长至4~6 cm、根长到0.8~1.0 cm时,选取生长健壮的60株组培苗转移到温室进行练苗。练苗3 d后,打开瓶盖,继续练苗1~2 d,取出小苗,洗净根上的培养基,移栽至基质中。基质可以选用草炭:蛭石:珍珠岩配比为2:1:1。移入基质的小苗应加强管护,保证80%以上的相对湿度。温度控制在20~25℃。每隔4~5 d浇1次水,保持基质的含水量为90%,避免阳光直射。30 d后,统计移栽苗成活率为95%。

3 结论与讨论

通过统计愈伤组织和芽诱导率得出,MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L是叶片愈伤组织和不定芽诱导的最佳培养基;根据芽分化率及长势情况得出,MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.8 mg/L是最佳的分化培养基;当培养基为1/2MS+IBA 0.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L时,试管苗根系生长旺盛,生根率最高,为最适的生根培养基。郭辉等^[8]在进行枸杞不同外植体离体培养芽形成的研究中发现,以叶片为外植体不能诱导出芽,与该试验的结论不同。这可能与品种、培养环境及培养成分等因素有关。

随着分子生物学研究的不断深入,利用转基因技术已成功培育出转基因水稻、番茄等^[9]。将耐盐基因导入到经济价值很高的农作物枸杞中,以期获得耐盐能力更强的枸杞新品种,不仅可以为抗逆优新品种的选育提供新资源,还能为盐碱地改良和扩大利用提供新途径。因此,枸杞叶片再生体系的建立,为耐盐转基因枸杞试验的开展奠定了前期试验基础,对提高经济作物抗逆性研究也非常有意义,具有很好的参考价值。

三种玉簪新品种离体快繁技术的研究

杨 丹¹, 顾德峰¹, 董 然¹, 赵和祥¹, 孙唯一²

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 长春市宽城区园林管理处, 吉林 长春 130118)

摘要:以3种玉簪“金头饰”(*H. ‘Gloden Tiaia’*)、“小黄金叶”(*H. ‘Gloden Cadet’*)和“金鹰”(*H. ‘Gloden Eagle’*)的幼嫩花蕾为外植体诱导不定芽, 成功的建立了3个品种的离体快繁体系。结果表明: 不定芽诱导最佳培养基为MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 在增殖培养基中, “金头饰”最佳增殖培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; “小黄金叶”最佳增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; “金鹰”最佳增殖培养基MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 无生长调节剂的MS为“金鹰”的最佳生根培养基, 生根率达100%以上; “小黄金叶”在培养基MS+NAA 0.5 mg/L中生根率达到100%以上; “金头饰”在培养基MS+NAA 0.3 mg/L中生根率也达到100%以上。其移栽成活率均为100%。

关键词:玉簪; 不定芽; 组织培养

中图分类号:S 682.1⁺⁹ **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)01-0124-03

玉簪属植物是多年生宿根草本花卉, 喜荫, 具有丰富

第一作者简介:杨丹(1984-), 女, 在读硕士, 现主要从事植物组织培养研究工作。E-mail:yangdanmoon@163.com。

责任作者:顾德峰(1956-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事植物组织培养研究工作。E-mail:gu.df@163.com。

基金项目:长春市科技计划资助项目(2008245)。

收稿日期:2011-10-10

富的生物多样性。株形、叶形、叶色、质地丰富多样, 花色、花形也颇具特色, 是花叶具佳的观赏花卉^[1]。同时, 玉簪的嫩芽可食, 全草入药^[2-3]。近些年来, 玉簪已成为极具开发前景的花卉和药用植物, 仅采用传统的分株繁殖法, 繁殖速度太慢, 而且由于母株资源和土地资源有限, 使玉簪的新品种难以在短时期内形成一定的数量规模, 无法满足当前花卉市场的需求, 这是现在我国玉簪

参考文献

- [1] 杜国利, 宋长征, 张更林. 枸杞的组织培养及植株再生的条件优化[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 384-386.
- [2] 马和平, 李毅, 马彦军, 等. 枸杞叶片再生体系的建立[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(2): 15-18.
- [3] 史伟, 陈志国. 枸杞组织培养的研究进展[J]. 草业与畜牧, 2006(10): 5-8.
- [4] 耿玉珂, 周宜君, 丁宁, 等. 植物耐盐突变体筛选与耐盐转基因研究[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2009, 18(4): 10-17.
- [5] Mansour M M F, Salama K H A, Al-Mutawa M M. Transport proteins

- and salt tolerance in plants[J]. Plant Science, 2003, 164: 891-900.
- [6] 尹小燕, 杨爱芳, 张可炜, 等. 转AtNHX1基因玉米的产生及耐盐性分析[J]. 植物学报, 2004, 46(7): 24-29.
- [7] 王关林, 方宏钩. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 郭辉, 沈宁东. 宁夏枸杞不同外植体离体培养芽形成的研究[J]. 北方园艺, 2008(9): 168-170.
- [9] Zhang H X, Blumward E. Transgenic salt-tolerant tomato Plant accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 765-768.

Study on Rapid Propagation by Leaf Tissue Culture of the *Lycium barbarum* L.

ZHENG Guo-qin^{1,2}, LIU Jin-feng¹

(1. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. Seedlings Biological Engineering State Key Laboratory of Ningxia Forestry Research Institute Limited Company, Yinchuan, Ningxia 750004)

Abstract: The leaf of *Lycium barbarum* L. was used as explants, induction of the callus and adventitious buds, differentiation, taking roots and transplant were studied. The results showed that the best media for inducing callus and adventitious buds was MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L; the best media for differentiation was MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.8 mg/L; the best media for inducing roots was 1/2MS+IBA 0.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L.

Key words: wolfberry; explant; leaves; tissue culture