

# “宁杞 1 号”枸杞不同外植体愈伤组织诱导

徐蕊, 于元元, 石晶, 毛桂莲, 姚新灵, 郑蕊

(宁夏大学 生命科学学院, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021)

**摘要:**以不同生长来源的 3 种“宁杞 1 号”枸杞苗为试材, 通过比较其生长状态及特点, 筛选诱导愈伤组织形成的外植体来源枸杞苗。同时, 研究了不同激素组合对枸杞愈伤组织形成的影响。在此基础上, 比较了以叶片和茎段为外植体, 愈伤组织形成的时间及长势。结果表明:“宁杞 1 号”枸杞种子种植的无菌苗长势好, 继代后性状稳定, 可作为最佳外植体材料来源; 以叶片为外植体, 诱导愈伤组织形成时间短、长势好、不定芽形成早; 初步确定诱导枸杞叶片形成愈伤组织的最佳培养基为  $MS+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$ 。

**关键词:**“宁杞 1 号”枸杞; 材料来源; 叶片; 愈伤诱导

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)24-0091-05

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*)多年生落叶灌木, 是宁夏地区主要经济树种之一, 为宁夏“五宝”之首。传统医学认为枸杞子具有补肾益精、养肝明目、润肺止咳的作用。现代医学表明, 枸杞多糖具有多种功能, 比如, 调节机体免疫<sup>[1]</sup>、抗氧化、抗衰老<sup>[2]</sup>、抗肿瘤等作用<sup>[3]</sup>。此外, 枸杞中胚的衍生物还具有降血糖的功效<sup>[4]</sup>。

世界分布枸杞属约有 80 余种, 在我国大面积生产

推广应用的品种有“宁杞 1 号”“宁杞 4 号”“蒙杞 1 号”和菜用枸杞“宁杞菜 1 号”4 个新品种。其中, “宁杞 1 号”是宁夏农林科学院自 1973 年从中宁原农家品种大麻叶的丰产茨园中采用单株选优方法选育, 后经无性扩繁形成的无性系。它具有丰产、稳产、果粒大、品质好、易制干、病虫害抗性高、管理简单等综合优势, 广泛应用于枸杞种植和生产领域。

但在育种过程中, 由于缺乏自主知识产权及育种价值的基因和标记, 对控制重要性状的基因、基因间及其与环境互作的分子基础知之甚少, 多种遗传改良信息和技术的集成应用不足, 缺乏系统的品种设计思路, 导致育种进程缓慢, 枸杞品种相对单一, 不能很好地适应枸杞产业多元化发展的需求。

在已有研究中, 安焕霞等<sup>[5]</sup>以“青杞 1 号”叶片为外植体, 探索出诱导叶片生成愈伤组织的最佳培养基是

**第一作者简介:**徐蕊(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程。E-mail:1412807332@qq.com.

**责任作者:**郑蕊(1972-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail:xlzheng@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31360361, 31560418, 31401444, 31360168, 31360275)。

**收稿日期:**2016-09-26

## Cloning of *SsPIN2* Gene From *Sinningia speciosa* and Its Expression in Different Tissues

XU Weiping<sup>1</sup>, LIU Fengjuan<sup>2</sup>, BI Chunxiao<sup>2</sup>, HU Xin<sup>2</sup>, XU Quanle<sup>2</sup>, JIANG Jinglong<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-tech University, Hanzhong, Shaanxi 723001; 2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** *Sinningia speciosa* were used as materials, and 898 bp cDNA in length of *SsPIN2* gene was isolated. BLAST and phylogenetic trees via neighbor-joining (NJ) method were used to analysis sequence. And semi-quantitative RT-PCR was used to investigate the different expression level of *SsPIN2* gene in different tissues of leaf, shoot tips, root, stem, petal and calyx. The results indicated that *SsPIN2* shared a high sequence identity with *CsPIN2* and *PsPIN2*. *SsPIN2* was expressed in all of the above tissues and relatively higher in shoot tips, root, stem and calyx and relatively lower in leaf and petal.

**Keywords:** *Sinningia speciosa*; *SsPIN2* gene; gene cloning; expression analysis

MS+0.7 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.7 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA;郑国琴等<sup>[6]</sup>以宁夏枸杞叶片为外植体,探索出MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA是其愈伤组织诱导的最佳培养基;马和平等<sup>[7]</sup>以“宁杞2号”为试材,将其叶片放在含1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA和1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA的1/2 MS分化培养基上,暗培养8 d后转到光下培养,28 d后可见到不定芽不经过或经过很少的愈伤组织阶段,直接从叶片上分化产生;HU等<sup>[8]</sup>以无菌播种获得的宁夏枸杞苗叶片为外植体,用0.9 μmol·L<sup>-1</sup>的2,4-D诱导愈伤组织进行遗传转化;RATUSHNYAK等<sup>[9]</sup>以宁夏枸杞叶片为材料,用0.4 mg·L<sup>-1</sup>的2,4-D诱导愈伤组织并用1.0 mg·L<sup>-1</sup>的2,4-D进行愈伤培养;杜国利等<sup>[10]</sup>以“宁红1号”枸杞叶片为材料,发现当2,4-D浓度为1.2 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D与KT浓度之比为15:1时愈伤诱导率最高;孙晓红等<sup>[11]</sup>以黑果枸杞为材料建立了快繁技术新体系,发现诱导叶片脱分化形成愈伤组织的最适培养基为MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA,诱导率为100%;杨宁等<sup>[12]</sup>同样以黑果枸杞为材料,建立了完整的遗传体系,其诱导愈伤最适培养基为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+10 g·L<sup>-1</sup>蔗糖,出愈率高达88%且长势优良。

尽管前人在枸杞愈伤组织诱导方面已经做了一些研究,但不同品种枸杞,甚至同一品种、不同途径来源的外植体,其愈伤诱导条件的重复性不是很高。现以3种不同来源的“宁杞1号”枸杞苗为试材,观察其生长状态及特点,选择生长状态最佳的枸杞叶片为外植体,探究不同外源激素组合及浓度配比对其愈伤组织诱导的影响,探索枸杞“宁杞1号”愈伤组织诱导的最佳外植体和最佳激素组合,为培养筛选农业和医药生产上有用的无性系,或用于原生质体培养中的原生质体来源和建立枸杞遗传体系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2015年收获“宁杞1号”枸杞种子、宁夏大学实验田“宁杞1号”枸杞扦插苗以及“宁杞1号”继代培养无菌苗。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料选取 将枸杞继代无菌苗转移到宁夏大学生命科学学院组培室进行为期7 d的适应性培养。待无菌苗长势旺盛时选取幼嫩的茎,去掉叶片后保留1~2个腋芽放入MS基础培养基(30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖,7 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.8~6.0)进行继代培养,每14 d继代1次,观察记录其生长情况。剪取枸杞扦插苗的幼嫩茎尖,用洗衣粉水涮洗,然后用流动的自来水缓缓冲洗20 min,置于超净工作台内,用75%的酒精振荡消毒1 min,无菌水冲洗2遍,1%的次氯酸钠溶液振荡消毒3~5 min,再用

无菌水清洗5~6遍即获得无菌茎段。将茎段插到MS基础培养基上进行生根培养,每14 d继代1次,观察长势。选取饱满的枸杞种子,4℃低温处理3 d,用无菌水将枸杞子浸泡30~40 min,直至果实膨大,置于超净工作台中。用75%酒精浸泡果实消毒2 min,无菌水冲洗2次,在装有75%酒精的培养皿中去除果肉留下种子,震荡2~3 min,再用无菌水冲洗2~3次后播种到MS基础培养基上,每14 d继代1次,观察发芽及生长情况。培养条件均为温度(25±2)℃,光照时间16 h·d<sup>-1</sup>,湿度40%~50%,光照强度2 000~2 500 lx。

1.2.2 不同外源激素组合及浓度配对外植体愈伤诱导的影响 以MS为初代诱导培养基。将枸杞叶片剪成0.5 cm×0.5 cm,接入12种添加不同激素的MS固体培养基上进行愈伤组织诱导,激素组合及浓度设置见表1。每个激素处理设置3板,每板接种30片叶片。每14 d继代1次,观察叶片生长变化、愈伤生成情况,并在30、50 d时记录愈伤诱导状态。用最佳激素组合及配比培养基,诱导长势最好的无菌枸杞苗的叶片及茎段,确定“宁杞1号”诱导愈伤组织形成的最佳外植体。培养温度为(25±2)℃,湿度40%~50%,光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>,光照强度为2 000~2 500 lx。蔗糖浓度为30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂为7 g·L<sup>-1</sup>,培养基pH 5.8~6.0。

表1 不同外源激素和浓度组合

Table 1 Combinations of exogenous hormones with different concentration

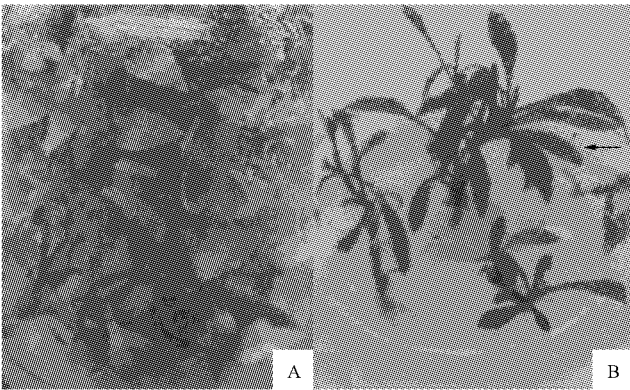
处理 Treatment	6-BA	2,4-D	NAA	KT	IAA
M1		0.1			
M2		0.2			
M3		0.3			
M4	1.0	0.1			
M5	1.0	0.2			
M6	1.0	0.3			
M7	1.0		0.1		
M8	1.0		0.2		
M9	1.0		0.3		
M10	1.0			1.0	0.2
M11	1.0			1.0	0.4
M12	1.0			1.0	0.6

## 2 结果与分析

### 2.1 试验材料的确定

枸杞继代无菌苗生长初期旺盛(图1A),叶片较为宽大,但经过2~3次继代培养后出现异常叶片,1个叶柄长出2~3叶,如图1B箭头所示,且随着继代次数的增加,无菌苗生长缓慢,叶片变黑,因而不适于作为叶片愈伤组织外植体的材料来源。

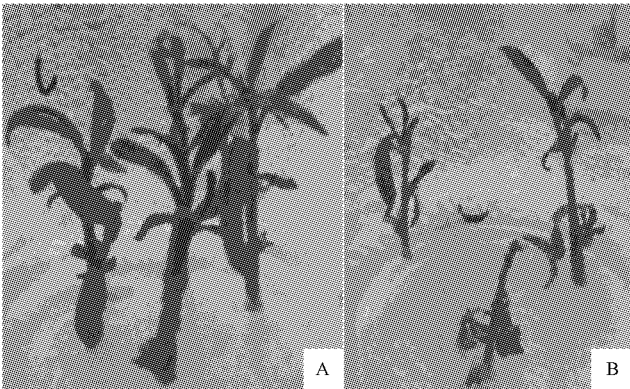
枸杞扦插苗经消毒培养成无菌苗后,生长缓慢,约15 d左右开始生长新的腋芽,叶片狭窄肥厚(图2A),经过继代培养后大多枯死(图2B),且该材料的获得受枸杞



注:A. 无菌苗;B. 继代苗。  
Note: A. Aseptic seedling; B. Subculture seedling.

图1 枸杞品种“宁杞1号”继代苗

Fig. 1 Aseptic seedling of wolfberry ‘Ningqi No. 1’



注:A. 扦插苗;B. 继代苗。  
Note: A. Cutting seedling; B. Subculture seedling.

图2 枸杞品种“宁杞1号”扦插苗

Fig. 2 Cutting seedling of wolfberry ‘Ningqi No. 1’

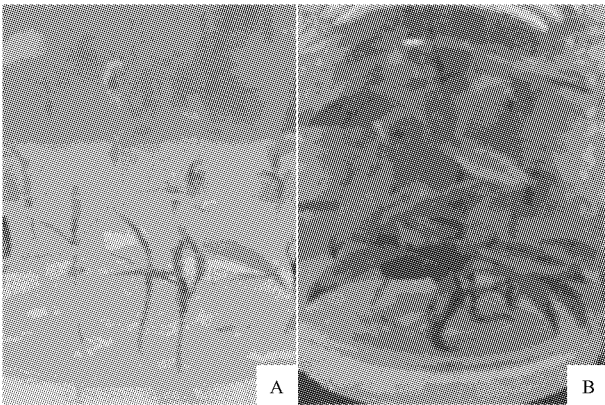
生长季节的限制,不利于秋冬季开展试验。  
枸杞种子经消毒后置于 MS 培养基中培养,7 d 左右可发芽(图 3A),25 d 左右生长健壮,叶片浓绿肥厚

表 2 不同外源激素组合对比对诱导愈伤组织的影响

Table 2 The effect of different combinations of exogenous hormone on the callus status

处理 Treatment	接种量 Inoculation amount /片	30 d			50 d		
		外植体状态 Explant status	愈伤长势 Growth potential	愈伤状态 Callus status	外植体状态 Explant status	愈伤长势 Growth potential	愈伤状态 Callus status
M1	90	嫩绿	+++++	嫩绿;松散	嫩绿	+++++	膨大水化
M2	90	嫩绿	+++++	嫩绿;松散膨大	嫩绿	+++++	水化泛白硬化
M3	90	嫩绿	+++++	嫩绿;松散膨大	嫩绿	+++++	严重水化硬化
M4	90	变黄	+	黄绿;紧实	黄褐色	+	萎缩死亡
M5	90	变黄	++	黄绿;紧实	褐色	+	萎缩死亡
M6	90	变黄	++	黄绿;紧实	褐色	+	萎缩死亡
M7	90	翠绿色	++	翠绿;紧实	翠绿色	+++++	绿色加深;紧实
M8	90	翠绿色	+++++	翠绿;紧实	翠绿色	+++++	翠绿泛白;不定芽略褐化
M9	90	翠绿色	+++	翠绿;紧实	翠绿色	+++++	翠绿;出现不定芽
M10	90	翠绿色	+++++	翠绿;紧实	深绿色	+++++	深绿泛白;不定芽略褐化
M11	90	翠绿色	+++++	翠绿略褐化;紧实	深绿色	+++++	绿褐化;不定芽严重褐化
M12	90	翠绿色	+++++	深绿略褐化;紧实	深绿色	+++++	绿褐化;不定芽严重褐化

注:“+”表示生长状况,数量越多表示长势越好。  
Note: ‘+’ indicates the growth status, the more ‘+’, indicates the better growth situation.



注:A. 种子幼苗;B. 种子壮苗。  
Note: A. Young seedling; B. Strong seedling.

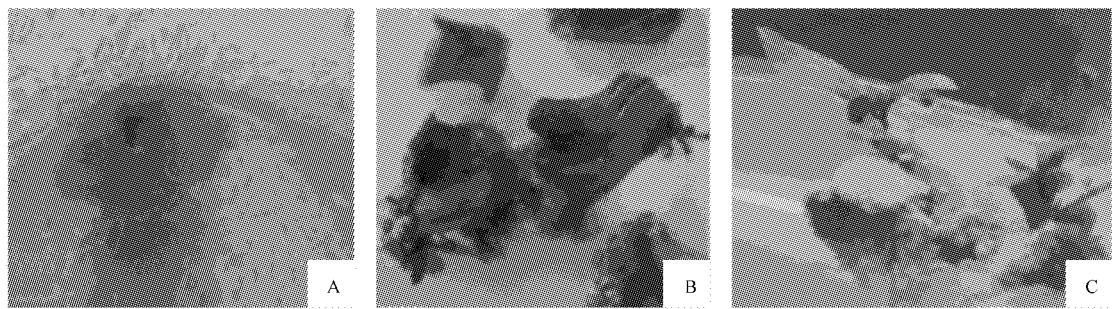
图3 枸杞品种“宁杞1号”种子萌发苗

Fig. 3 Seedling of wolfberry ‘Ningqi No. 1’ seed

(图 3B)。种子发芽获得无菌苗不受季节限制,适于作为枸杞愈伤组织诱导外植体的来源。

2.2 不同外源激素组合及浓度对愈伤组织的影响

从表 2 可以看出,只含有 2,4-D 的培养基诱导出的愈伤长势好,30 d 时颜色翠绿,但是到了生长后期,50 d 时严重水化(图 4A),最终硬化死亡,但是愈伤率高。含 6-BA 的组合能诱导出较紧实的愈伤组织。6-BA 和 2,4-D 组合可以诱导长出愈伤组织,但愈伤组织后期变黄、萎缩、坏死。M7、M8、M9 和 M10、M11、M12 都能诱导出紧实的愈伤组织。M10、M11、M12 培养基激素组合诱导形成愈伤组织快且长势好,但在生长后期,叶片外植体、愈伤组织都出现不同程度的褐化且长势缓慢(图 4B)。M7、M8、M9 培养基激素组合诱导的愈伤组织长势快、状态好,褐化不明显,能较早的分化出不定芽。不定芽长势好(图 4C)。其中 M8 即  $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$  培养基诱导出的愈伤组织长势和不定芽生长状态最好,最有利于后继枸杞再生苗研究的开展。



注:A. M1~M3 培养基诱导的愈伤组织;B. M10~M12 培养基诱导的愈伤组织;C. M7~M9 培养基诱导的愈伤组织。  
Note: A. Calluses on M1—M3 medium; B. Calluses on M10—M12 medium; C. Calluses on M7—M9 medium.

图 4 不同外源激素组合培养基诱导叶片愈伤组织

Fig. 4 Calluses on MS medium of different combinations of exogenous hormone

以“宁杞 1 号”枸杞种子萌发无菌苗的叶片和茎段为外植体,在 M8 培养基上诱导愈伤组织,30 d 和 50 d 的愈伤组织状态见表 3。

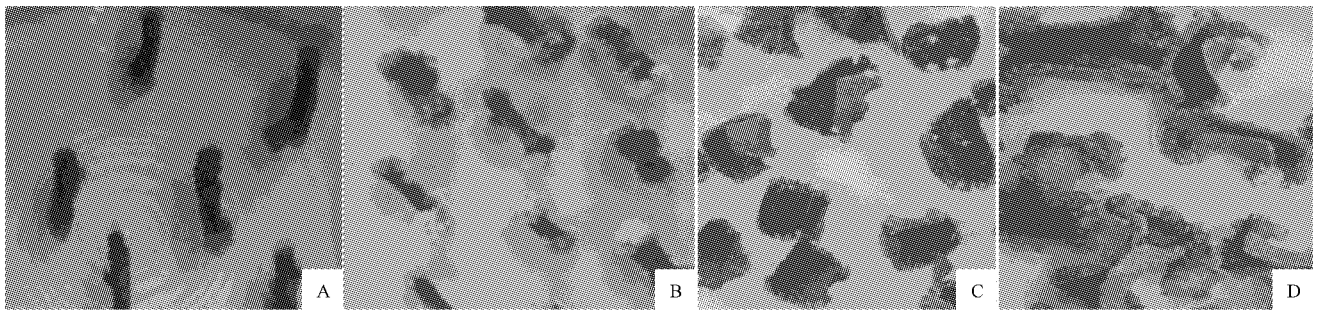
由表 3 可以看出,30 d 时以茎段为外植体诱导形成愈伤组织的速度快,生长状态良好(图 5A);但是 50 d 时,愈伤组织变松散泛白(图 5B),且不定芽出现的晚。

而以叶片诱导愈伤组织,30 d 和 50 d 时长势均好(图 5C、5D),愈伤组织翠绿、紧实,外植体略有褐化,与茎诱导愈伤组织相比,不定芽出现的早。说明 6-BA 和 NAA 组合最佳,M8 即  $MS + 1.0\text{ mg} \cdot L^{-1} 6-BA + 0.2\text{ mg} \cdot L^{-1} NAA$  培养基更适于叶片诱导愈伤组织。

表 3 “宁杞 1 号”枸杞茎段、叶片形成愈伤组织状态

Table 3 Callus induced by stem and leaf of ‘Ningqi No. 1’ aseptic seedling

外植体 Explant	接种量 /个	外植体状态 Explant status	30 d		外植体状态 Explant status	50 d	
			愈伤长势 Growth potential	愈伤状态 Callus status		愈伤长势 Growth potential	愈伤状态 Callus status
茎段	20	嫩绿	+++++	嫩绿;紧实	嫩绿	+++++	嫩绿泛白;变松
叶片	20	翠绿	++++	翠绿;紧实	翠绿	+++++	翠绿加深;紧密



注:A. 30 d 茎段;B. 50 d 茎段;C. 30 d 叶片;D. 50 d 叶片。

Note: A. Callus induced from stem explant for 30 days; B. Callus induced from stem explant for 50 days; C. Callus induced from leaf explant for 30 days; D. Callus induced from leaf explant for 50 days.

图 5 M8 培养基诱导愈伤组织

Fig. 5 Callus formation on M8 medium

### 3 结论与讨论

目前国内外关于枸杞组培方面的研究较少,且枸杞品种多,不同品种需要的愈伤组织诱导条件都不同。不同生长来源的枸杞苗在继代过程中,其长势及性状不一。以其为外植体来源,会影响后继诱导愈伤组织形成的得率及质量。该研究以不同生长来源的 3 种“宁杞 1

号”枸杞苗为试验材料,比较其生长状态及特点,确定“宁杞 1 号”枸杞种子种植的无菌苗长势好,继代后性状稳定,可作为最佳外植体材料来源。

植物外源激素是组织培养中的关键因素,不同外源激素及浓度的组合在愈伤组织培养中起着极为重要的调节作用。该研究表明,2,4-D 尽管能快速诱导出大量

的愈伤组织,但是愈伤组织后期会严重水化,不适用于进一步分化出不定芽愈伤的诱导。这与 TAN 等<sup>[13]</sup>关于香草兰愈伤诱导的研究相同。6-BA 与 NAA 组合诱导的愈伤状态好,并可在此愈伤上分化出不定芽。MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 与 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 培养基都可作为愈伤组织诱导的最佳组合。其中 MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 诱导生成的愈伤组织不利于不定芽的分化,进而获得再生植株。但是可用于大规模工厂化生产有用化合物,或用于细胞培养筛选工业、农业、医药生产上有用的无性系,或用于原生质体培养中的原生质体来源。而 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 组合更有利于枸杞“宁杞 1 号”愈伤诱导,愈伤长势好,且能快速分化出不定芽,可用于后继再生植株的来源。

枸杞“宁杞 1 号”应选用叶片为外植体,在 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 培养基上诱导愈伤组织形成,可以得到稳定紧实的愈伤组织,为进一步不定芽分化及成苗研究打下基础。

#### 参考文献

- [1] 冯艳忠,李凤兰,张廷荣,等. 枸杞多糖的免疫调节功能[J]. 河北中医,2004(11):37-38.
- [2] 高春燕,田呈瑞,周默. 枸杞多糖体清除自由基活性研究[J]. 三峡大学学报(自然科学版),2005,27(5):456-458.
- [3] 马亚兵. 枸杞多糖在肿瘤治疗中的作用研究概况[J]. 齐鲁肿瘤杂志,1996,3(2):150-151.
- [4] 王亚军,安巍,石志刚,等. 枸杞药用价值的研究进展[J]. 安徽农业科学,2008(30):13213-13218.
- [5] 安焕霞,王占林,侯宪宽. 不同激素对青杞 1 号枸杞叶片愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 江苏农业科学,2015(4):59-61.
- [6] 郑国琴,柳金凤. 宁夏枸杞叶片组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2012(1):122-124.
- [7] 马和平,李毅,马彦军,等. 枸杞叶片再生植株体系的建立[J]. 河北农业大学学报,2005(2):15-18.
- [8] HU Z, YANG J, GUO G. High-efficiency transformation of *Lycium barbarum* L. mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgenic plant regeneration via somatic embryogenesis[J]. Plant Cell Reports,2002,21(3):233-237.
- [9] RATUSHNYAK Y I, 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.
- [10] 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(3):384-386.
- [11] 孙晓红,位书磊,宋强,等. 黑果枸杞的叶片分化与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2016(5):653-658.
- [12] 杨宁,李宜琰,陈霞,等. 黑果枸杞的组织培养和快速繁殖[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2016(2):84-88.
- [13] TAN B C, CHIN C F, ALDERSON P. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2011,105(3):457-463.

## Callus Induction From Different Explants of Wolfberry ‘Ningqi No. 1’

XU Rui, YU Yuanyuan, SHI Jing, MAO Guilian, YAO Xinling, ZHENG Rui

(College of Life Sciences, Ningxia University/Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** The experiment has compared the growth and characteristics of ‘Ningqi No. 1’ seedlings from three different kinds of sources, by which the best explant sources were found out. At the same time, effect on callus induction and their status under different combinations of exogenous hormones was also investigated. On this basis, callus formation from leaf and stem explants and their growth status were compared. The results showed that seedling from aseptic seeding grew well, and kept stably after subculture, which can be used as the best explants. Callus formation time from leaf explant was short. Besides, callus grew better and came into bud earlier. The optimum conditions for callus induction of wolfberry leaves were found out to be MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA.

**Keywords:** wolfberry ‘Ningqi No. 1’; material source; leaf; callus induction