

文章编号:1009-0002(2006)03-0384-03

研究报告

枸杞的组织培养及植株再生的条件优化

杜国利,宋长征,张更林

卫生部生物技术药物重点实验室,山东省医药生物技术研究中心,山东 济南 250062

[摘要] 目的:探讨枸杞组织培养及其植株再生条件的优化。方法:应用 MS 培养基为基本培养基,以各种不同激素配比进行枸杞愈伤诱导、分化诱导及根的诱导。结果:以枸杞叶片为外植体,利用 2,4-D(2,4-二氯苯氧基乙酸)与 KT(细胞分裂素)不同配比诱导出了愈伤组织。利用 6-BA(6-苄基腺嘌呤)与 NAA(α -萘乙酸)不同浓度的配比组合,成功地进行了杞再生芽诱导及根系诱导。结论:以 MS 培养基为基本培养基,并采用各种激素的不同配比,可以优化枸杞植株的再生条件。

[关键词] 枸杞;再生;愈伤组织**[中图分类号]** Q945.39; Q949.777.7**[文献标识码]** A

Studies on Regeneration and Propagation of *Lycium barbarum* L.

DU Guo-li, SONG Chang-zheng, ZHANG Geng-lin

Key Laboratory for Biotech-Drugs of Ministry of Health, Shandong Medical Biotechnology Center, Ji'nan 250062, China

[Abstract] **Objective:** To approach on the regeneration and propagation of *Lycium barbarum* L. (*L. barbarum*). **Methods:** Depending on the MS base medium mixed with different plant hormones, the calli, buds and roots of *L. barbarum* were induced. **Results:** The Chinese traditional herb of the *L. barbarum* calli were induced from *L. barbarum* leaves on the MS medium with 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)(3.0 ppg) and KT(kinetin)(0.2 ppg). Depending on the MS base medium mixed with 6-BA(6-benzyl adenine) and NAA(naphthylacetic acid), the regenerated buds were successfully obtained, and the roots come out. **Conclusion:** The MS base medium mixed with different plant hormones could be used for the regeneration of *L. barbarum*.

[Key words] *Lycium barbarum* L.; regeneration; callus

枸杞(*Lycium barbarum* L.)为茄科植物,是我国宝贵的中药资源。枸杞易于遗传操作,可长期栽培生长,遗传性状稳定。与其同科的烟草、番茄和马铃薯已被用于表达重组疫苗。同样,也有研究者利用转基因枸杞遗传性状的优势,构建新型的表达体系,在现有基础上对枸杞的植株快速再生生长条件进行优化,并获得了转基因植株^[1]。

1 材料和方法

1.1 材料

宁红一号枸杞种子,外植体为枸杞种子长成的试管苗。

MS 基础培养基。6-BA(6-benzyl adenine, 6-苄基腺嘌呤); NAA(naphthylacetic acid, α -萘乙酸); 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-二氯苯氧基乙酸); KT(kinetin, 细胞分裂素)。

1.2 枸杞种子外植体的培养

将宁红一号枸杞种子置于灭菌的三角烧瓶中,先用灭菌水冲洗 4 遍,加 75% 的乙醇处理 50 s,再用灭菌水冲洗 4 遍,然后用 1% 的次氯酸钠处理 3 min,再用灭菌水冲洗 4 遍,最后将种子接种于灭菌的 MS+6-BA(0.5 mg/L)+NAA(0.3 mg/L)的培养基中,培养条件为光照 14 h 和暗培养,培养温度为(28 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C。

1.3 愈伤组织的诱导、分化

将枸杞试管苗的不同部位分别处理。无菌幼茎切成 0.6 cm 长度,无菌叶片剪成 0.5 cm 见方,分别接入附加不同激素配比的愈伤组织诱导培养基中,于 28 $^{\circ}$ C 暗培养进行愈伤组织的诱导。将诱导出的愈伤组织于愈伤组织继代培养基上每 4 周进行继代培养。选取生长旺盛、质地致密、表面有细颗粒状结构、颜色鲜黄的愈伤组织进行分化诱导。

1.4 芽生根培养

将 3~4 个长约 1.5 cm 的由无菌试管苗繁殖所得的芽转入到 MS 芽生根培养基中进行生根诱导。在培养基中分别加入不同浓度配比的 6-BA 与 NAA,还须加入不同浓度的活性炭(分别为 0、1、2 ppg),在上述无菌苗生长环境下培养,观察生根时间,记载生根诱导率。

2 结果

2.1 激素对愈伤组织诱导的影响

细胞分裂素和生长素的共同作用,能诱导体外培养的枸杞愈伤组织的生成。本试验研究了 2 种不同的组合及其不同浓度

[收稿日期] 2006-01-21**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30271215, 30471621)**[作者简介]** 杜国利(1980-),男,硕士研究生**[通讯作者]** 宋长征, (E-mail) genesong@sina.com

的配比,结果见图 1,其中以 2,4-D 与 KT 的组合最佳(表 1)。

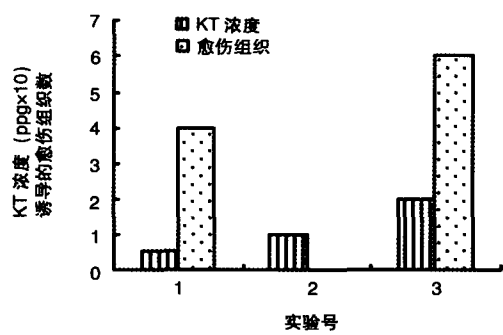


图 1 不同浓度 KT 诱导的枸杞愈伤组织

2.2 激素对丛生芽诱导的影响

利用 6-BA 与 NAA 不同浓度的配比组合,对愈伤组织进行芽诱导与增殖试验,确立了最佳浓度配比,见图 2。当 6-BA 浓度为 1.5 ppg 时诱导芽的发生率最高;对此时不同浓度的 NAA 诱导芽的发生率进行统计学分析,最终确定丛生芽诱导的最佳浓度配比为 6-BA 1.5 ppg、NAA 0.3 ppg。

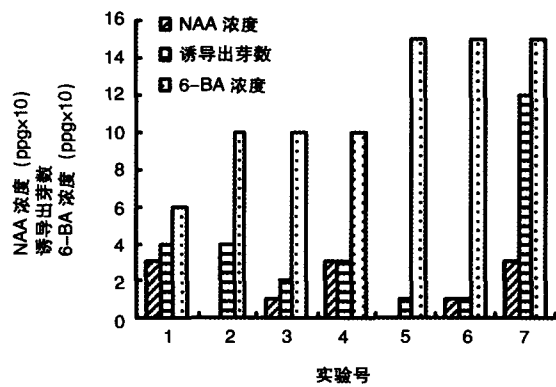


图 2 6-BA 与 NAA 不同浓度的配比诱导的枸杞芽分化

2.3 枸杞的生根诱导

利用 6-BA 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。在试管苗生根培养过程中,发现在培养基中加入活性炭更有利于根的形成,参见图 3。当 MS 培养基

中含 2.0 g/L 活性炭时,最佳浓度配比为 1.0 ppg 的 6-BA、0.1 ppg 的 NAA,可作为试管苗的生根培养基,1 周左右即可长出 5~6 条根,生根率可达 90%以上,并获得了生长健壮的试管苗。

图 4 为按照上述实验结果确定的诱导流程培养下的枸杞植株再生。

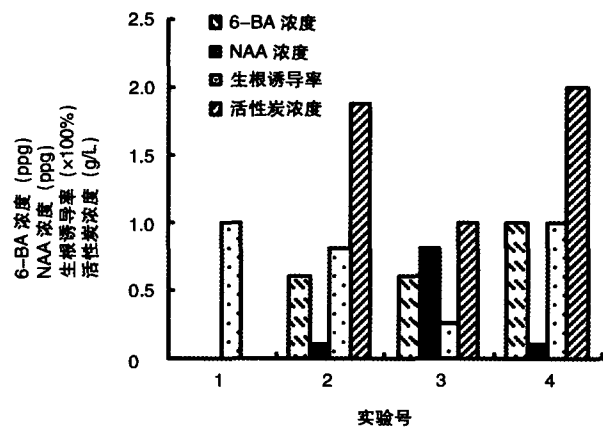


图 3 6-BA 与 NAA 不同浓度的配比诱导的枸杞根分化

3 讨论

3.1 不同生长素与细胞分裂素组合对枸杞愈伤组织诱导形成的影响

细胞分裂素和生长素共同作用,能诱导植物外植体的愈伤组织形成。将不同浓度的 6-BA、NAA、2,4-D 及 KT 加入 MS 培养基中进行愈伤组织的诱导,培养 1 个月 after 观察记录愈伤组织的诱导率,可发现 2,4-D 与 KT 的组合更有利于枸杞愈伤组织的诱导形成。而选取诱导率最高的 2,4-D 与 KT 浓度配比,固定 2,4-D 浓度,分析不同 KT 浓度下枸杞愈伤组织的诱导状况,可发现当 2,4-D 浓度为 3.0 ppg、2,4-D 与 KT 浓度之比为 15:1 时的诱导率最高。细胞分裂素对植物的生长和发育有多方面的调节作用,细胞分裂素能促使种子萌发、果实发育、开花等^[2]。如果细胞分裂素含量很高,则可抑制愈伤组织的形成。本实验利用不同激素的配比,在用生长素诱导愈伤形成的同时适量加入细胞分裂素,有利于获得的愈伤组织容高频的分化和再生^[3,4]。

3.2 愈伤组织分化的诱导

表 1 不同的生长素与细胞分裂素组合对愈伤组织诱导的影响

生长素与细胞分裂素组合	愈伤组织的平均诱导率/%	产生愈伤组织的平均时间/d	愈伤组织的最高诱导率/%	产生愈伤组织的最短时间/d
6-BA 与 NAA	7.41	15.13	33.3	8
2,4-D 与 KT	56.5	7.33	100	4

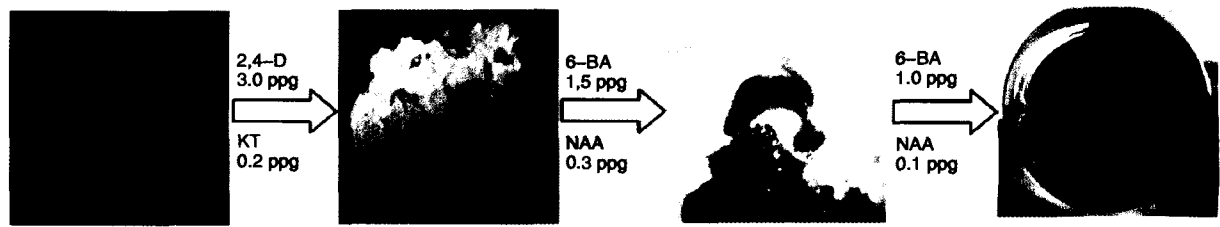


图 4 诱导流程

选用枸杞叶片形成的愈伤组织进行分化诱导,利用含有不同浓度的细胞分裂素和生长素的MS培养基对诱导出的愈伤组织进行培养,在4周时愈伤组织出现大面积的绿化点,但未有芽形成,7周时方能观察到长出大量丛生芽,8周时计数。所诱导出的芽大部分玻璃化。当采用6-BA浓度为0.6 ppb、NAA浓度为0.3 ppb或6-BA浓度为1.0 ppb、NAA浓度为0 ppb的配比时,诱导出的玻璃芽最严重,最高能达到80%~90%;而当6-BA浓度为1.5 ppb、NAA浓度为0.3 ppb时,玻璃化现象减轻。玻璃化通常与培养基的环境条件和生理生化因素有很大关系,增加琼脂浓度、降低培养基中的渗透势、控制温度及调整激素的浓度可以控制分化苗的玻璃化。

3.3 枸杞的生根诱导

当将6-BA与NAA浓度分别调整为1.0 ppb与0.1 ppb时,所有接种无菌苗均能生根,且长出的苗粗壮。在枸杞生根诱导过程中加入2.0 ppb的活性炭,能够使配制的培养基结构疏松,透气保水,且可固定植株,比不加活性炭的培养基诱导出根的时间更早,同期诱导率更高,且枸杞植株也更高。实验中发现诱导出的根须越多,则植株越高;而如果培养基中不加任何激素,也可生根,这说明植物本身也产生促进其生根的激素。但其叶片较之上述培养基所培育的枸杞叶片较小,其植株不粗壮^[9]。这证明同时加入生长素与细胞分裂素,在促进其生根的同时,也有利于植株的生长。

我们利用所构建的枸杞植株再生系统,将由HIV-1基质蛋白(MA)的最后4个氨基酸残基结合到壳蛋白(CA)的N端形成

的MA₄-CA目的片段转入枸杞,并借助于水稻中一个富含甘氨酸的内质网信号肽(GRP),使生成的疫苗被导入枸杞根细胞间隙,并从根系不断地分泌到培养液中,由此产生了高纯度的HIV疫苗^[9]。

参考文献

- [1] 谢忱,徐丽珍,李宪铭,等.枸杞子化学成分的研究[J].中国中药杂志,2001,26(5):323
- [2] Chen L, Zhu X, Gu L, *et al.* Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem)[J]. Plant Cell Rep, 2005,24(7):401
- [3] Wang Y, Zhao H, Sheng X, *et al.* Protective effect of Fructus Lycii polysaccharides against time and hyperthermia-induced damage in cultured seminiferous epithelium[J]. J Ethnopharmacol, 2002,82(2-3):169
- [4] 李春斌,方宏筠,王关林.药用植物栽培的组织培养快速繁殖与植株再生的研究[J].中草药,2000,31(11):853
- [5] Haensch KT. Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis [J]. Plant Cell Rep, 2004,23(4):211
- [6] 杜国利,宋长征,张更林,等.转基因植物表达HIV疫苗的研究进展[J].生物技术通讯,2005,17(3):343