

枸杞组培优化体系的研究

马和平¹, 李毅², 马彦军², 杨尧军², 何芳兰²

(1. 西藏农牧学院高原生态研究所, 西藏 林芝 860000;

2. 甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 选用“宁杞2号”离体组织进行了愈伤组织诱导和生根状况的研究, 筛选出了适宜的愈伤组织诱导和生根的培养基。结果表明, 最适的愈伤组织诱导培养基为 1/2MS+BA1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L; 最适的生根培养基是: 1/2MS+NAA0.6 mg/L+IBA0.2 mg/L。

关键词: 枸杞; 组织培养; 愈伤组织; 生根

中图分类号: Q 813.1⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1003-4315(2006)01-0020-04

Studies on the optimization system for tissue culture of *Lycium barbarum*

MA He-ping¹, LI Yi², MA Yan-jun², YANG Yao-jun², HE Fang-lan²

(1. Institute of Plateau Ecology, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi 860000;

2. College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Stem pieces of *Lycium barbarum* cv. 'Ningqi NO. 2' were used for inducing callus and rooting. The optimum medium for callus inducing and rooting of stem pieces was selected out. The results showed that the best medium for callus inducing is 1/2 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, and the best medium for rooting is 1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+IBA 0.2 mg/L.

Key words: *Lycium barbarum*; tissue culture; callus; rooting

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)系茄科, 枸杞属的落叶灌木树种, 全国各地均有栽培, 共有7个种和3个变种。试验所用的“宁杞2号”是宁夏农林科学院1987年选出的枸杞优良品种, 果粒大, 果肉厚, 富含多种维生素和人体必需的氨基酸; 而且丰产性好, 抗病虫, 刺少。关于枸杞的组织培养虽有报道, 但还未见其简化培养基的研究报道^[1~4]。本试验从简化培养基, 减少培养程序, 降低生产成本着手, 进行“宁杞2号”组培快速繁殖技术的研究, 旨在为枸杞优良品种的快速繁殖和降低成本提供依据^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料来源

试验采用甘肃农业大学林学院实验园地栽种

作者简介: 马和平(1977—), 男, 甘肃陇西人, 硕士, 主要从事林木遗传育种研究。

通讯作者: 李毅, 男, 湖北汉川人, 教授。

资助基金: 中国科学院和甘肃省自然科学基金
(Ys021-A21-001)。

收稿日期: 2004-09-16

的、生长正常健康的“宁杞2号”枸杞的春季嫩枝。

1.2 表面消毒方法

将选择采集的嫩枝先用毛刷蘸洗衣粉溶液轻轻地刷洗, 再用自来水冲洗浸泡数分钟, 然后切成1.0~1.5 cm长茎段(含1~2个腋芽), 将叶片剪去2/3, 在超净工作台上用75%酒精消毒数秒钟后, 再用0.1%升汞消毒10 min, 最后用无菌水冲洗5次。

2 培养基的配置和培养条件的确定

2.1 培养基的配置

以MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS培养基为基本培养基, 分别加入不同浓度的IAA、NAA、IBA、6-BA、KT, 每个处理中加蔗糖20 g/L, 琼脂5 g/L, 用NaOH溶液或HCl调整pH值至5.8左右。

2.2 培养条件

温度(25±1)℃, 起始培养和继代培养时光强为1 000~16 000 lx, 生根培养时光强为1 600~2 000 lx, 光照时数16 h/d; 采用的培养环境为RXZ型人工气候箱。

3 结果与分析

3.1 培养基的筛选

3.1.1 基本培养基的筛选以及对芽生长的影响
为了得到最适宜枸杞组织培养的培养基,通过进行不同浓度的盐对外植体腋芽生长影响的对比试验,以MS为基本培养基,结果如表1。

表1 基本培养基对芽生长的影响

Tab.1 Effects of the basic culture medium on bud growth

编号	培养基	接种外植体数/个	萌发20d的生长量	平均每个外植体分化数	生长情况
1	MS	40	2.0	1.0	前期长势好,后期变褐死亡
2	1/2MS	40	2.5	2.1	长势最好
3	1/3MS	40	1.8	1.5	长势较好
4	1/4MS	40	1.8	1.5	长势慢

在附加物(6-BA 0.5 mg/L, IBA 0.2 mg/L)相同的条件下,MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS的培养基上培养20d,从苗高及产生不定芽个数看,1/2MS培养基优于其它培养基,在MS培养基上,前期长势好,后期易褐化,继而枯死,表明含盐量过高;但降低盐浓度可减缓芽生长。

3.1.2 植物激素对初接种外植体生长的影响
在植物组织培养中起重要作用的激素主要是生长素和细胞分裂素,初培养使用较高浓度的生长素,以诱导脱分化和促进愈伤组织。高水平的细胞分裂素倾向于诱导不定芽的形成,也使侧芽增生加速,会导致形成过于细密的不定芽,同时嫩芽的质量下降,不利于下一步的生根和种植到介质中。因此,在力求提高嫩茎质量兼顾有较多数量的情况下,必须减少细胞分裂素的用量^[6]。通常情况下,若生长素浓度过低,则表现为组织块不能生长,颜色逐渐变淡,时间过长,植物组织会死亡;若生长素浓度过高,则表现为愈伤组织生长旺盛,细胞团松散,几乎不可能分化出苗。

高等植物每个叶腋中都有隐芽存在,在一定条

件下可使其萌发形成丛芽,从而达到快繁的目的。以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度6-BA、IBA、NAA、KT进行最佳组合筛选。培养20d后,对萌发率、长势、愈伤组织诱导、芽增殖情况进行调查,发现不同浓度的组合,对芽增殖效果有显著差异(表2)。

在1/2MS+6-BA 1.0~2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L培养基中,芽生长快,但分枝少,繁殖系数低,芽增殖效果较差;在1/2MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L中,多为单茎生长,增殖效果不明显;在1/2MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L中,苗长势快,产生小分枝多,繁殖系数较高;当6-BA浓度高于1.0 mg/L时,外植体上易形成愈伤组织。由此可见,腋芽增殖阶段最适宜培养基为1/2MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L。

表2 植物激素对腋芽增殖生长的影响

Tab.2 Effects of plant hormone on axillary bud proliferation

编号	激素水平/mg·L ⁻¹				处理数/个	20d后平均苗高/cm	平均每个腋芽萌发不定芽数/个
	6-BA	KT	NAA	IBA			
1	2.0			0.2	25	2.0	1.1
2	1.0			0.5	18	2.5	2.9
3		1.0	0.2		20	2.1	1.5
4	0.5			0.5	32	1.9	2.6
5	1.0		0.2		16	1.7	1.1

3.1.3 植物激素对愈伤组织诱导分化的影响
当无菌苗长出的第7片真叶完全展开时,将其叶片分别切成0.5 cm×0.3 cm的小块(外植体),放在附加不同激素的培养基上,30d时观察并统计叶片愈伤组织诱导情况及诱导率^[7,8](愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织外植体的数量/放置外植体的数量)。在试验中发现,由于所附加的激素浓度不同,愈伤组织的生长发育状况也不尽相同(见表3)。

实验表明,用枸杞叶片可以完全诱导愈伤组织,1号培养基,在第8天叶块边缘便产生黄绿色愈伤

表3 不同激素对愈伤组织分化的影响

Tab.3 Effects of different hormone on differentiation of callus

培养基	激素水平/mg·L ⁻¹				外植体数/个	诱导率/%	死亡率/%	愈伤组织生长发育状况
	IBA	NAA	6-BA	KT				
1	1.0		1.0		30	85	8	增长分化最快
2		0.2	1.0		17	20	15	长势缓慢
3		0.3		0.2	30	75	10	增长分化较快
4		0.2		0.3	35	76	12	增长分化较快
5		0.1	0.5		20	62	16	后期易褐化死亡

组织,且生长速度快,第 25 天愈伤组织布满整个叶表面,同时愈伤组织块表面有颗粒状的凸起,出现大量球形,棒状胚状体。2 号培养基产生愈伤组织迟,在第 15 天开始出现,但颜色发黄,有褐化现象,生长缓慢。3 和 4 号培养基的诱导率较好。5 号较差且颜色发黄,有褐化现象,生长缓慢。

通过比较不同培养基上的愈伤组织诱导情况可以看出,在 1/2MS+6-BA1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L 培养基中诱导率可达 85%,死亡率低,生长快;在 1/2MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.2 mg/L 培养基中,诱导率低,生长缓慢;在 1/2MA+NAA0.3 mg/L+KT0.2 mg/L 或 1/3MS+NAA

0.2 mg/L+KT0.3 mg/L 培养基中,愈伤组织诱导率较高,但 30 d 后褐化死亡率高;在 1/3MS+6-BA0.5 mg/L+NAA0.1 mg/L 培养基中,诱导率较高,但后期易褐化死亡。所以愈伤组织诱导分化最适培养基为:1/2MS+6-BA1.0 mg/L+IBA1.0 mg/L。

3.1.4 枸杞组培苗生根的诱导 从前面的试验中发现,当培养基中只有生长素的情况下容易生根。选取 2 种生长素 4 水平进行正交试验(表 4)。30 d 后统计生根率(有生根现象的茎段数/原接种的茎段数)和生根系数(生根系数/有生根系数的茎段数)。

表 4 不同培养基对枸杞组培苗生根的诱导

Tab. 4 Effects of different medium on root differentiation of *Lycium barbarum*

培养基	激素水平		生根率 /%	生根系数 /%	根的生长发育
	NAA	IBA			
1	0	0	5	2.35	生根少
2	0	0.2	32	2.00	有部分生根,但根少且短
3	0	0.5	56	3.80	生根较多,无愈伤组织产生
4	0	1.0	48	3.60	有部分生根,但有少量愈伤组织产生
5	0.2	0	34	2.44	生根较少,根短粗
6	0.2	0.2	56	4.11	生根多且壮,无愈伤组织产生
7	0.2	0.5	60	4.54	生根较多,但根稍短,有少量愈伤组织产生
8	0.2	1.0	36	3.70	生根较少,根短粗
9	0.6	0	78	5.11	部分生根,根短粗,茎基有愈伤形成
10	0.6	0.2	92	6.00	生根很多,但根稍短,有少量愈伤组织产生
11	0.6	0.5	80	7.11	生根很多,根短粗,茎基有愈伤形成
12	0.6	1.0	71	5.54	部分生根,根短粗,茎基有愈伤形成
13	1.0	0	23	3.67	生根少,根短粗,有少量愈伤组织产生
14	1.0	0.2	36	4.33	生根少,根短粗,有少量愈伤组织产生
15	1.0	0.5	47	6.00	生根少,根短粗,有少量愈伤组织产生
16	1.0	1.0	31	8.25	生根少,根短粗,有少量愈伤组织产生

结果表明 IBA 不同浓度对生根率和生根系数的影响与 NAA 浓度密切相关。当 NAA 的浓度在 0.6 mg/L 时,IBA 在 0.2 mg/L 时生根率最高,但茎基有愈伤组织形成;当 NAA 为 0.6 mg/L 及 IBA 为 0.5 mg/L 时,生根系数与生根率相对其他较高,且茎基多生成愈伤组织;当 NAA 为 0.2 mg/L,IBA 为 0.2 mg/L 时,虽然生根率和生根系数均不是最高,但根长,无愈伤组织产生,有利于移栽后的成活^[9]。

方差分析表明:NAA 和 IBA 不同水平对生根率和生根系数的影响均差异显著,多重比较结果表明:NAA 为 0.6 mg/L 和 IBA0.2 mg/L 时,对生根培养最为有利,且验证了以上观察结果。因此生根培养基的最适配方为:1/2MS+NAA0.6 mg/L+IBA

3.1.5 枸杞组培小苗的炼苗及移栽 生根培养 20~25 d 后将小苗移置温室大棚进行炼苗,此时小苗长出 6~8 个根尖,根长 0.5~0.8 cm,炼苗基质为腐质土:蛭石:河沙=1:1:1,pH6.5。移栽前用 0.1%多菌灵溶液或 0.3%硫酸亚铁溶液消毒。大棚中炼苗 10~12 d 后,再置于自然条件下炼苗 7~10 d。当小苗长出侧根,且新根长达 3~5 cm,苗高达 4 cm 时,成活率可达 90%以上,此时可以移栽至酸性土壤。移栽小苗应带部分基质,以提高成活率。光强对移栽有很大影响,移栽初期,苗木幼嫩,光线强易死苗。因此必须遮荫,使光强为全光的 30%左右,苗木成活后逐渐拆除遮荫棚,使散射光逐渐转到直射光,移栽技术好的成活率可达 94%^[10~12]。

4 讨论与结论

植物激素是影响组培快繁的重要因素^[13,14]。本试验通过对激素的筛选表明:初接种最佳培养基为1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L;增殖培养基为1/2 MS+6-BA 0.5~1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L;愈伤组织分化培养基为1/2 MS+6-BA 0.6 mg/L+IBA 1.0 mg/L;最适生根培养基为1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+IBA 0.2 mg/L;最佳接种时间为3月初至4月上旬;最佳消毒剂以及消毒时间为0.1% HgCl₂, 10~12 min。

在木本植物的组织培养中,褐变是普遍存在的一种现象,受培养温度、激素浓度、光照等因素影响^[15,16]。褐化是由于植物受伤后体内多酚氧化酶被激活,使酚类物质氧化产生醌类物质造成的,它们会逐渐扩散到培养基中,抑制其它酶的活性,毒害整个外植体组织。

研究表明:在外植体接种前进行低温处理,即将采后的外植体密封置于4~6℃环境中3~5 d后接种,且在弱光(500 lx)下培养,褐化现象可被明显抑制^[17,18]。此外,在培养基中加入0.3%的活性炭防止褐化效果最好。活性炭作为吸附剂可以吸附醌类物质,减轻对外植体的毒害作用。

参考文献

- [1] 田惠桥,肖翎华,刘文芳. 枸杞下胚轴原生质体培养[J]. 实验生物学报, 1993, 2(1): 89~91
- [2] 田惠桥. 枸杞茎尖培养[J]. 植物生理学通讯, 1983, 7(6): 39
- [3] 陈维龙,郭东红. 枸杞叶片愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1997, 4(6): 40~41
- [4] Ratushnyak Y I, Pren N M, Rudas V A. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. plant cell[J]. Tissue and Organ Culture, 1989, 3(17): 183~191
- [5] 钟生元. 枸杞高产栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1998: 15~16
- [6] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 55~57
- [7] 范国强,黎明,贺容青. 悬铃木体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 林业科学, 2004, 5(3): 71~73
- [8] 李尚中,李唯,李胜. 小麦胚性愈伤组织诱导研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 4(2): 136~138
- [9] 任继文. 银露梅离体繁殖[J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 6(2): 231~232
- [10] 傅建敏,高筱慧,杨绍彬. 美国黑莓快繁技术研究[J]. 经济林研究, 2003, 2(4): 54~56
- [11] 李浚明. 植物组织教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 106~107
- [12] 刘云龙,王本昌. 组织培养中植物生长调节剂的调控[J]. 农业与技术, 1999, 7(2): 23~25
- [13] 徐振彪,傅作中. 植物组织培养中的褐变现象[J]. 国外农学—杂粮作物, 1997, 5(1): 55~56
- [14] 高国州. 植物组织培养中的褐变[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501~505
- [15] 郑子成,何淑勤. 大果沙棘组织培养技术[J]. 中南林学院学报, 2003, 8(4): 45~46
- [16] 汪秀峰. 植物组织培养“抗褐”之初探[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(4): 325~326