

枸杞组织培养的研究进展

史 伟, 陈志国

(成都农业科技职业学院农学院园艺系, 四川 温江 611130)

摘 要: 综述了国内外枸杞组织培养研究进展, 全面了解枸杞的组培过程, 并提出了今后枸杞组培中需要解决的问题。

关键词: 枸杞; 组织培养; 研究进展

中图分类号: Q813.1+2

文献标识码: A

文章编号: 1006-1932(2006)10-0005-04

枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 在植物学分类学上属被子植物门, 双子叶植物纲, 茄科, 茄族, 枸杞亚族, 枸杞属多年生落叶灌木。枸杞始载于《神农本草经》, 在《本草纲目》中, 以枸杞名列为本经上品。枸杞的成分丰富, 果、果柄和叶都含有多种有机物质和营养成分, 它既是名贵的中药材, 又是很好的滋补品。枸杞富含多种营养及药用成分, 如蛋白质约 15%, 糖约 30%, 还含有枸杞多糖、胡萝卜素、甜菜碱、硫胺素、生物碱、甙类等生物活性物质及钙、磷、铁、硒等营养成分, 还有 V_E 、黄酮类等抗氧化活性物质^[2,10]。枸杞果实是补益治虚良药, 在《本草备要》中指出, 枸杞有“润肺、清肝、滋肾、益气、生精、助阳、补虚劳、强筋骨、祛风、明目”等作用。枸杞根皮, 气味苦寒, 有“能泻肝肾虚热, 能凉血而补正气, 治五内邪热, 吐血尿血, 咳嗽消渴, 外治肌热虚汗, 上除头痛, 中平胸肋痛, 下利大小肠”等作用。枸杞叶有降压和保肝作用, 叶的醇提取液有增强巨噬细胞吞噬功能的作用。近代医学表明, 枸杞还具有抗肿瘤、抗衰老、调节血脂和血糖、进行免疫调节等作用。现代药理实验证明枸杞子还具有抗肿瘤、抗衰老、调节血脂和血糖、进行免疫调节等作用^[1,12,13]。当前抗衰老药物受到世界各国科学家的关注, 枸杞子的抗衰老作用更受到人们的普遍重视, 因

此, 应用前景十分广阔。随着我国近年来枸杞药用保健价值进一步开发, 栽培面积不断扩大, 从而对枸杞育种工作提出更高的要求。近年发展较快的枸杞组织培养再生技术是一个重要的生物技术措施。目前, 植株器官、组织及原生质体等不同水平上均已能再生出植株, 特别是近年来建立在组织培养再生技术基础之上的植物原生质体融合及重组、遗传转化研究的迅速发展及分子生物学概念和方法直接与植物组织培养技术结合, 为枸杞品种改良开辟了一条新的途径。本文通过对枸杞组培的研究进展进行总结, 可望为以后的组培工作提供一些经验, 并提出了枸杞组织培养中需要解决的问题。

1 枸杞的组织培养研究

1.1 培养条件

培养基大多以 MS 为基本培养基, 琼脂浓度为 0.4%~0.6%, 蔗糖浓度 15%, pH5.8~6.0, 培养温度 22~28℃, 湿度 70%~80%, 光照强度 1 000~3 000 lx, 日光灯和白炽灯均可, 光照时间每天为 12~14 h。

1.2 研究成果

1.2.1 胚培养: 枸杞育种目标之一无籽枸杞, 是通过利用枸杞四倍体与二倍体杂交而产生的。张新宁等^[9]通过对枸杞四倍体同二倍体杂交种子中幼胚发育形成研究发现, 在授粉 9 d 到 14 d 期间, 杂交幼胚的发育形成基本正常。将授粉后 12 d 的幼胚接种在含有 BA 0.5~1.0 mg/L 和 IAA 0.5 mg/L 2 种激素的培养基上进行组织培养, 先预暗培养 24 h, 后转入正常培养。

幼胚愈伤组织的发生率 40%~60%，愈伤组织在 BA 0.5 mg/L 和 IAA 1 mg/L 的培养基上能诱导出完整的三倍体植株，染色体 36 条 ($2n=36$)，利用杂交授粉后 12 d 的幼胚进行胚培养，是解决无籽枸杞选育中杂交败育问题的有效途径。

牛德水等以种子下胚轴作为外植体，用 MS 培养基，附加 2, 4-D 0.2 mg/L 和 LH500 mg/L，诱导产生愈伤组织和继代培养，当愈伤组织直径达 1.5~2.0 cm 时，开始悬浮培养，所用培养基成分相同，只是不加琼脂。经过半年以上悬浮继代培养，再进行单细胞培养并获完整植株。为枸杞的研究和改良，特别是细胞突变体筛选打下了基础。田惠桥等由枸杞 (*Lycium barbarum* LCV.Ningqi No.1) 种子下胚轴原生质的愈伤组织转移到 MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的培养基上诱导芽，将带不定芽的愈伤组织转移到 1/2MS+BA 0.1 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的生根培养基上，形成再生植株。

王仑山等用枸杞无菌苗下胚轴于 MS+2, 4-D 0.25 mg/L+LH 500 mg/L 的诱导培养基上产生胚性愈伤组织，经 0.34% 的 EMS (半致死剂量) 处理恢复增殖 14 d，将存活组织转接到含有 1.5% NaCl 的诱导培养基上培养 28 d 再将少数存活的转移到含 1.0% NaCl 的同样培养基上继续培养，选出了 1.0% NaCl 的愈伤组织变异系，经 14 代选择培养后转入无盐培养基中继代 4 次，然后进行耐盐及耐盐稳定性的测定，从而证实了其耐盐能力，变异体在含 1.0% NaCl 的分化培养基 MS+BA 0.5 mg/L 上分化出再生植株。变异体在含体外诱导的耐盐幼株转到正常条件下往往失去耐盐性，而在一定浓度的盐压下连续选择数十代的培养组织或细胞，再转入无盐压的培养基中继代数代，如耐盐性即告消失。这说明是生理适应，不是遗传变异。此实验经叶片耐盐性等多种生理指标鉴定，说明筛选的耐盐愈伤组织及再生植株是抗盐变异体。

1.2.2 胚乳培养：由于胚乳细胞也具有“全能性”，胚乳是双受精产物，属于三倍体组织，故可通过胚乳离体培养来诱导三倍体植株，以获得无籽、大果枸杞新品种。目前，已成功地获得了不同倍性的胚乳植株，并培育胚乳植株开花结果，完成了生活周期。王莉等用开花后 20d 左右的枸杞胚乳，在附加 2, 4-D (0.2 mg/L) 的 MS 培养基上诱导愈伤组织，再转移至含 BA 0.2 mg/L 的 MS 培养基上分化出苗，小苗转入不加激素的 MS 培养基促生根，获得移栽成活不同倍性的 20 株胚乳植株。其中 5 株胚乳植株三倍体水平细胞占 50%。顾

淑荣等也对枸杞未成熟胚乳进行培养试验，获得几十株植株，其中对不同激素配比对枸杞胚乳愈伤组织分化植株能力的影响进行对比，指出以萘乙酸 (NAA) 和 BA 配合使用，愈伤组织分化频率高达 85.7%，即 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。通过对枸杞胚乳植株的诱导及染色体倍性的观察^[1]，发现枸杞胚乳培养获得二倍体、三倍体、四倍体和非整倍体植株。说明枸杞胚乳培养可以创造大量的无性变异株系。枸杞再生能力强，又可无性繁殖应用于生产。因此，枸杞胚乳培养工作在理论和实践上都有一定的意义。

1.2.3 花药花粉培养：单倍体植株在枸杞品种选育及遗传分析中具有重要意义。单倍体植株在枸杞上的获得主要通过花粉和花药培养^[9]。樊映汉^[9]采取含单核晚期花粉的花药培养，在 MS+KT 0.2 mg/L+IAA 20 mg/L，MS+KT 0.5 mg/L+2, 4-D 0.2 mg/L，KT 1.0 mg/L+2, 4-D 0.5 mg/L 培养基上诱导形成较多胚状体，不经转培即能发育形成绿苗。经根尖染色体检查 $2n=12$ ，证明为来自花粉的单倍体植株。将子叶期的胚状体转移至含 1.0 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的分化培养基，再将其转至生根培养基上，形成大量生根单倍体植株。枸杞属植物花粉植株诱导，以胚状体途径为主。幼苗的增殖和染色体加倍是通过花粉胚子叶下胚轴的培养同时进行的。由花粉胚下胚轴愈伤组织分化形成的植株，叶子较大，生长较快，经根尖染色体检查 $2n=24$ ，证明为自然加倍的纯合二倍体。

1.2.4 子房培养：牛德水等采用宁夏枸杞未受粉的子房为材料，接种到改良的 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L，接种后材料置于 0~4℃ 条件下预处理 40 h。然后在室温下培养，在获得的再生植株中，经根尖细胞染色体检查，有四倍体和非整倍体，通过对四倍体和它的二倍体母本对比观察，诱导出的枸杞同源四倍体枸杞表现出花和果实大，种子少，充分显示出其潜在价值。

1.2.5 茎段及茎尖培养：无性植株的再生是植物通过组织培养和遗传工程进行品种改良的一个先决条件。生产栽培中的枸杞一般通过无性繁殖如扦插、根蘖，保持原代性状的稳定性和一致性。而组织培养是一种无性快速繁殖的技术，通过对宁杞 1 号等优良品种苗木离体茎尖组织培养，进行了试管母本的建立，不同激素配比对枸杞芽增殖和生长的调节作用，生根状况及再生植株移栽等研究，进而探索了提高快繁速度，降低成本及适合生产上应用的组织培养技术，加速了优良株系的繁殖和推广。鲁海等^[10]选初春枸

杞萌发的嫩梢,经表面消毒,将嫩芽切成0.3~0.5 cm小段,接种于培养基MS+KT1 mg/L+2,4-D1 mg/L和N6+BA1 mg/L+2,4-D1 mg/L上,诱导效果可达100%;MS+2,4-D (0.2 mg/L)诱导愈伤组织^[6,8],诱导率为90%。愈伤组织一方面在相同培养基上进行继代培养,半月转一次,另一方面转到MS+BA0.2 mg/L的分化培养基上,10 d之后可长到约1.5 cm,此时切下来转到1/2MS+NAA0.2 mg/L的培养基上生根。试管苗幼嫩细弱,转移到土壤中能否成活与试管苗本身质量、移栽土壤、气温及移栽后管理有关。如能掌握移栽技术,移栽苗在盆内成活率高达90%,在生长季节都可栽植,枸杞茎尖培养快速繁殖技术已成功用于生产。

而艾先元等用秋水仙素处理枸杞茎尖组织,通过组织培养获得同源四倍体枸杞苗。从秋水仙素处理效果、加倍类型及产生倍性细胞的比例看,利用0.1%的秋水仙素处理效果最好。对不同浓度秋水仙素处理存活的12株试管苗进行茎尖细胞染色体检查,其中3株为四倍体(2n=4x=48),9株是嵌合体苗。3株四倍体试管苗已经扩繁培育成一批四倍体枸杞无性系,表现了多倍体植株特有的“巨型”特征,叶片略有下垂,根系少而粗。

1.2.6 叶培养:叶片培养。原生质体培养可以用于体细胞杂交,基因转化及细胞学研究。枸杞原生质体培养已有分化成苗的报道。陈维伦等从新生的幼嫩叶片愈伤组织、种子下胚轴愈伤组织都可得到原生质体并诱导出愈伤组织。孙勇如等以枸杞(*Lycium chinense*)幼嫩叶片诱导愈伤组织,以MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.3 mg/L+LH 500 mg/L,用作继代培养,继代4个月左右,15~20 d转移1次愈伤组织,酶液处理16 d左右可得大量原生质体。将其愈伤组织转移到MS+BA0.1 mg/L+NAA0.05 mg/L的培养基上诱导芽,将带不定芽的愈伤组织转移到1/2MS+BA 0.2 mg/L+IBA 0.1 mg/L的生根培养基上,可形成再生植株。

叶柄培养。张尔荣等取未发芽的枸杞枝条,在室内插入水中,3周后取新发的幼嫩叶柄,用自来水冲洗干净,常规方法消毒,接种到附加BA3 mg/L+NAA2 mg/L的MS固体培养基上,每瓶放3个切段。接种后的叶柄外植体7 d后两端明显膨大,20 d后在叶柄两端产生白中带绿的不透明的愈伤组织。将叶柄产生的愈伤组织切成的小块,转移到附加不同成分的固体分化培养基上,2周后同时分化出芽和根,30 d形成完整的植株。

1.2.7 髓组织培养:魏琴等^[9,10]采用宁杞1号的髓组织进行离体培养,取当年生长的具有明显分化成髓组织的枝条,摘除并丢弃叶子,侧芽和带有分生组织的顶端100 mm。经处理后,接种到MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L的固体培养基上,诱导的愈伤组织用植物毒素及组织培养的方法进行了枸杞离体抗根腐病变异体的筛选研究^[11]。曹有龙等用枸杞髓组织诱导产生的胚性愈伤组织,再用⁶⁰Co- γ 射线的半致死剂量处理一批胚性愈伤组织,然后转入诱导培养基中使其恢复增殖,14 d后存活的胚性愈伤组织转移至含60%枸杞根腐病菌制成的毒素诱导培养基中,28 d后将少数存活下来的愈伤组织转移至含30%的同样培养基中培养,每21 d转1次共继代14次,经不断选择,选出了耐30%毒素的愈伤组织变异体。再接种于含30%毒素的分化培养基MS+BA0.1 mg/L+NAA0.5 mg/L培养,28 d后接种在生根培养基上诱导生根,获得抗性再生植株。经苗期生理生化指标分析,室内叶片经过根腐菌分生孢子液接种鉴定,表明再生植株是抗病变异体。

2 小结

植物离体培养中,影响脱分化和再分化的因子应该从外因和内因两方面来考虑,所谓外因是指植物细胞的营养条件和环境条件,内因是指植物的遗传特性和生理状态。根据研究者们对枸杞愈伤组织的诱导、植株再生和繁殖进行的系统研究,可作如下小结:枸杞不同品种之间由于基因型的不同导致生理类型的不同、形态建成能力的不同,组织培养中对激素种类、浓度、生长环境和营养状况的要求亦不同。培养基中激素浓度的对比对枸杞形态建成起着重要作用。其中6-BA与IAA、NAA的相对比例对试管苗的生长和繁殖起关键作用,比值低促进植株长高,比值高有利于形成腋芽,促进分化与增殖,移栽后成活率高;而高浓度的2,4-D有利于枸杞细胞脱分化,低浓度或不含2,4-D的培养基则有利于脱分化形成的细胞团转入再分化。

3 需要解决的问题

目前枸杞的主要病害:流胶病^[14]、黑果病^[15]及根腐病^[16]。这些真菌性病害以及影响枸杞生产的重要害虫——枸杞蚜虫(*Aphis* sp.)^[17],生产上每年用于防治这些病虫害的费用占生产成本的20%~40%。若采用现代生物技术,导入抗真菌、抗蚜虫基因,在短期内可实现品种抗病性、抗虫性的定向改良,迄今基因转化研究仍停留在利用报告基因来探索转基因途径

上,缺乏抗虫、抗逆等目的基因。在花药培养、三倍体选育、抗性体细胞突变筛选等方面,虽取得了一定成果,除新品种宁杞2号以外,目前尚未获得可在生产中大面积推广的枸杞新品种(系)。这些措施的实施,应该以组培为基础,而组织培养只有与更深入的生物技术研究结合起来,才能更好的显现出它的优势。中草药具有融预防、治疗和保健为一体的独特功效,枸杞药用植物资源的开发利用已受到世界各国的关注,这就需要枸杞育种学家借鉴先进的生物技术手段,推进无籽枸杞育种,培育出抗病、抗虫、抗逆性综合性状良好的新品种。故组培技术的完善,将为今后更深入的研究枸杞打下坚实的基础。

参考文献

- [1] 高南南,田泽,李玲玲,等.枸杞乙醇提取物对半乳糖所致衰老小鼠的改善作用[J].中药药理与临床,1996,(1):24.
- [2] 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).
- [3] 张新宁,沈效东,王锦绣.枸杞四倍体同二倍体杂交败育的形态分析及解决方法[J].宁夏农林科技,1992,(1):30-32.
- [4] 顾淑荣,桂耀林,徐延玉.宁夏枸杞研究[M].银川:宁夏人民出版社,1998.89-92.
- [5] 樊映汉,藏淑英,赵敬,等.宁夏枸杞研究[M].银川:宁夏人民出版社,1998.61-62.
- [6] 任玉芬,沈效东.激素对枸杞芽分化和生长的调节[J].宁夏农林科技,1998,(2):28-30.
- [7] 鲁海,薛红霞,安君.枸杞组织培养及试管快繁实验初报[J].内蒙古林业,2002,(007):32.
- [8] 杨云龙,张雅文,韩素英,等.枸杞组培快速繁殖技术研究[J].山西农业大学学报,1996,16(4):397-399.
- [9] 魏琴,曹有龙,陈放,等.枸杞髓组织培养中体细胞胚胎发生与过氧化物酶同工酶分析[J].广西植物,2000,20(2):168-171.
- [10] 曹有龙,贾勇炳,罗青,等.宁夏枸杞研究[M].银川:宁夏人民出版社,1998.61-62.
- [11] 曹有龙,贾勇炳,赵军,等.应用组织培养技术离体筛选枸杞抗根腐病变异体的研究[J].植物病理学报,1999,29(2).
- [12] 秦红兵.枸杞抗衰老药理作用的研究近况[J].上海中医药杂志,1994,(1):43-44.
- [13] 谢梅林.枸杞子提取物的抗衰老作用[J].中国野生植物资源,1996,(12):9-11.
- [14] 鲁占魁.枸杞流胶病因研究进展[J].北方园艺,1998,3(4):76-77.
- [15] 任月萍.宁夏枸杞研究[M].银川:宁夏人民出版社,1998.343-344.
- [16] 鲁占魁,王国珍,张丽荣,等.枸杞根腐病的发生及防治研究[J].植物保护学报,1994,(3):249-254.
- [17] 钟定琪.宁夏枸杞研究[M].银川:宁夏人民出版社,1998.329-333.
- [18] 许洁昕,廖凤霞.枸杞复合汁的研制[J].食品研究与开发,2004,25(1).

全国畜牧兽医优秀期刊 湖北省惟一畜牧兽医类专业期刊 全国畜牧兽医行业职称评审认定期刊

湖北畜牧兽医

邮发代号: 38-352

月价4元, 全年价48元

信息快 服务好

欢迎订阅! 欢迎投稿! 欢迎广告惠顾!

投稿邮箱: hbxm87389001@163.com

广告发行热线: 027-87389634

★建设新农村指导期刊

★发家致富必读期刊

邮发代号: 38-84

月价1.8元, 全年价21.6元



农家顾问

致富宝典

农事参谋

生活顾问

投稿邮箱: njgw001@126.com 广告发行热线: 027-87389634

★全国中文核心期刊 ★中国科技核心期刊 ★国家期刊奖百种重点期刊

湖北农业科学

邮发代号: 38-21

双月刊, 全年价48元

Email: hbnykxzz@126.com

广告发行热线: 027-87389634