

黑果枸杞基茎丛生芽诱导及植株高效再生体系的建立

李娜^{1,2}, 黄衡宇^{1,3*}, 曾彪^{4*}

1. 云南中医药大学 中药材优良种苗繁育工程研究中心, 云南 昆明 650500
2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006
3. 丽江市古城区秋成种养殖有限公司, 云南 丽江 674100
4. 云南省农业科学研究院, 云南 昆明 650200

摘要: 目的 优化黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 离体培养方法及条件, 探索有效增殖方式, 筛选适宜的植株再生途径, 建立其人工高效繁殖技术体系。方法 以无菌实生苗带 1~2 个节的茎段为材料, 采用 MS、改良的 MS₁ 以及改良的 MS₂ 为基本培养基, 通过单因素、完全组合及 L₉(3⁴) 正交试验研究不同植物激素种类及其质量浓度对愈伤组织诱导、腋芽萌发、基茎不定丛芽诱导及植株再生的影响。结果 在 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.1 mg/L 培养基中, 可诱导出大量愈伤组织, 但其再分化能力较弱, 培养 35 d 后最高增殖系数仅为 4.36; 而在 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.05 mg/L+KT 0.5 mg/L 中培养, 随着腋芽萌发, 茎段与培养基接触的节处开始膨大并出现不定芽点, 萌发出基茎丛生芽, 发生率达 100%, 培养 45 d 增殖系数最高可达到 42.84; 试管苗生根的适宜培养基为改良的 MS₁+NAA 1.0 mg/L, 培养 40 d 后生根率达 98.9%; 试管苗经炼苗后移栽成活率 90% 以上。结论 研究通过基茎丛生芽这一全新的增殖途径, 成功建立了黑果枸杞体外高效再生体系, 不仅大大提高了试管苗的产量及品质, 也为枸杞属其他植物的体外快繁提供了另一思路。

关键词: 黑果枸杞; 茎段; 基茎丛生芽; 愈伤组织; 体外快繁

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3545-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.024

Cluster bud induction of base stem and establishment of high efficiency regeneration system of *Lycium ruthenicum*

LI Na^{1,2}, HUANG Heng-yu^{1,3}, ZENG Biao⁴

1. Engineering Research Center for Reproducing Fine Varieties of Chinese Medicinal Plants, Yunnan University of Chinese Traditional Medicine, Kunming 650500, China
2. College of Traditional Chinese Medicine of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
3. Lijiang Qiucheng Breeding Co., Ltd., Lijiang 674100, China
4. Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China

Abstract: Objective To optimize the culture methods and conditions for the rapid propagation of *Lycium ruthenicum in vitro*, explore effective proliferation methods, and screen suitable plant regeneration pathways, so as to establish an artificial high-efficiency breeding technology system. **Methods** Stem segments with one or two nodes of aseptic seedlings were used as materials. MS, modified MS₁ and modified MS₂ were used as basic media. The effects of different plant hormones and their concentrations on callus induction, axillary bud germination, basal stem adventitious cluster bud induction and plant regeneration were studied by single factor, complete combination and L₉(3⁴) orthogonal experiments. **Results** A large number of callus were induced in MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L medium, but the ability of redifferentiation was weak, and the highest multiplication coefficient was only 4.36 after 35 d of culture; While in MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 0.05 mg/L + KT 0.5 mg/L medium, with axillary buds starting to germinate, the node of stem segment contacted with culture medium began to swell and

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760695); 国家自然科学基金资助项目 (81860674); 云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础联合专项 (2017FF117-033) 联合资助

作者简介: 李娜 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 从事中药学研究。E-mail: LiNayzy@163.com

*通信作者 黄衡宇 (1969—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为植物发育生物学。E-mail: hhyhy96@163.com

曾彪 (1962—), 男, 学士, 副研究员, 主要研究方向为植物栽培学。E-mail: 2973492138@qq.com

appeared adventitious bud points, which sprouted basal stem cluster buds with the incidence rate of 100%. And the highest multiplication coefficient could up to 42.84 after 45 d of culture. The suitable medium (MS₁ + NAA 1.0 mg/L) for rooting of test-tube seedlings was modified. After 40 d of culture, the rooting rate reached 98.9%; And the survival rate of transplanted tube seedlings after refining was over 90%. **Conclusion** In this study, the basal stem cluster buds were used as a new way for proliferation, and an efficient propagation system of *L. barbarum* *in vitro* was successfully established, which not only greatly improved the yield and quality of test-tube seedlings, but also provided another idea for the rapid propagation of other *Lycium* plants *in vitro*.

Key words: *Lycium ruthenicum* Murr.; stem segment; basal stem cluster buds; callus; rapid propagation *in vitro*

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 为枸杞属多年生多刺棘灌木, 因其成熟浆果呈紫黑色而得名, 现集中产于我国青海省和新疆维吾尔自治区^[1]; 仅存的野生资源多分布于柴达木盆地的都兰、香日德、诺木洪等自然环境条件较为恶劣的戈壁荒滩上^[2]。黑果枸杞在藏药中称为“旁玛”, 其味甘、性平、清心热, 西藏医药名著《晶珠本草》将其列为传统珍贵中药^[3-4]。有研究指出, 黑果枸杞所含物质中微量元素、多糖以及维生素和脂肪远高于普通红枸杞^[5]; 其中富含的特有色素——花青素与原花青素, 具有强大的抗氧化作用^[6]; 现代药理学研究也表明黑果枸杞具有抗肿瘤、防止动脉硬化、提高免疫力、调血脂等作用^[7-9], 同时该植物极为耐干旱, 可生长在沙地、盐碱地, 是防风固沙、保持水土的重要植物^[2]。

由于具丰富的药用、保健以及环境保护价值, 黑果枸杞享有植物界的“黑钻石”以及“软黄金”的美称。然而在巨大利益驱使下, 该植物自然环境不断遭到人为破坏, 野生资源已濒临灭绝, 产量大幅下降, 以至于无法满足市场的需求。采用植物体外快繁技术, 不仅可以保留植株原有的优良性状, 还可以将优良单株快速繁殖成无性系, 继而在生产中大量推广^[10]。因此无论是以种源保护还是市场开发为目的, 建立黑果枸杞人工快繁体系已迫在眉睫。近年来黑果枸杞体外快繁研究多为以茎段^[11-13]、叶片^[6]、子叶及下胚轴^[14]为外植体, 使用外植体-愈伤组织-不定芽-再生植株的途径进行快速繁育, 但其增殖系数及种苗质量均不尽人意; 同时, 在枸杞属植物组培快繁中尚未见有关茎段直接诱导基茎丛生芽进行增殖的报道。本研究借鉴前人对黑果枸杞及同属其他植物体外快繁的经验, 以带节茎段为材料, 从多种增殖途径中选择最适宜的途径, 建立了黑果枸杞人工繁殖技术体系, 其繁殖系数远远超过已有的报道。本研究结果可为黑果枸杞自然资源的保护提供依据; 同时也可为其人工规模化栽培种植、种

质资源保存以及遗传转化研究提供实验基础。

1 材料

黑果枸杞种子由曲靖市沾益区万远中药材种植农民专业合作社毕绍文先生提供, 植株经云南中医药大学黄衡宇教授鉴定为茄科、枸杞属植物黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr.。选取单株无菌实生苗上带 1~2 个节的茎段为实验材料, 实验所用灭菌试剂升汞以及植物激素萘乙酸 (NAA)、6-苄基腺嘌呤 (6-BA)、激动素 (KT)、玉米素 (ZT) 均为分析纯, 购自北京鼎国生物科技有限公司。

2 方法

2.1 无菌实生苗获取及无菌体系建立

将黑果枸杞种子置于标准 1 000 mL 烧杯中, 流水下冲洗 30 min, 再于纯净水中静置 5 min, 将漂浮于水面的干瘪种子除去, 经纱布过滤保留底层饱满充实种子, 每 30~35 个种子用纱布包裹为 1 个小纱包, 将其置于超净工作台上; 用 75% 的乙醇浸泡 3 s, 再将其浸没于 0.1% 升汞溶液中消毒 20~80 s, 无菌水清洗 3 次, 每次不少于 3 min。将消毒灭菌后的小纱包置于无菌接种盘中, 用镊子将纱包打开, 夹取种子接种于空白 MS 培养基上。培养过程中统计种子萌发率及污染率, 60 d 后统计死亡率。

外植体的处理为剪去茎尖, 将长枝分为 1~1.5 cm 长的小段, 每个小段上有 1~2 个节, 较小叶片保留, 较长较大叶片视其具体情况剪去 1/2 至 3/4。

2.2 培养基

2.2.1 单因素确定培养基 (1) 基本培养基 (MS): 分别在其中添加不同质量浓度的植物激素 NAA、6-BA、KT、ZT: 其中, NAA 质量浓度梯度为 0.1、0.5、1、1.5 mg/L; 6-BA 质量浓度梯度为 0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L; KT 质量浓度梯度为 0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L; ZT 质量浓度梯度为 1.0、2.0 mg/L。根据相关文献对于减少黑果枸杞增殖过程中玻璃化现象的报道^[15], 将培养基中琼脂含量设置为原始 5.0 g/L 以及提高用量至 6.0 g/L 2 种, 2 种均在其中加入 30 g/L 的蔗糖; pH 值为 5.4~5.6。121 °C 下灭菌 25 min。

40 d 后分析记录各组生长情况, 筛选出后续实验适宜的基本培养基、植物激素种类和质量浓度范围以及琼脂含量。(2) 改良培养基配方 (MS₁): 原始 MS 培养基中大量元素硝酸钾 (KNO₃)、硝酸铵 (NH₄NO₃)、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、七水合硫酸镁 (MgSO₄·7H₂O) 以及二水合氯化钙 (CaCl₂·2H₂O) 用量减半, 其余成分含量不变。(3) 改良培养基配方 (MS₂): 原始 MS 培养基中大量元素硝酸钾 (KNO₃)、硝酸铵 (NH₄NO₃)、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、七水合硫酸镁 (MgSO₄·7H₂O) 以及二水合氯化钙 (CaCl₂·2H₂O) 用量减少三分之二, 其余成分含量不变。

2.2.2 愈伤组织发生、不定丛生芽诱导增殖培养基 选择 MS 为基本培养基, 加入不同质量浓度的 NAA 和 6-BA, 进行实验, 探究不同激素组合对黑果枸杞茎段愈伤组织诱导、不定芽分化的影响, 得到最佳激素配比方案, 35 d 后统计分析愈伤组织诱导率以及丛生芽发生情况, 重复实验 3 次, 验证其具有可重复性。培养基中添加 6.0 g/L 的琼脂以降低玻璃化现象。

2.2.3 基茎丛生芽诱导增殖培养基 根据单因素实验及完全组合实验结果, 引入可促进不定芽分化的细胞分裂素 KT, 建立 L₉(3⁴) 正交试验 (表 1), 45 d 后统计分析增殖情况。

表 1 黑果枸杞茎段诱导基茎丛生芽增殖 L₉(3⁴) 正交设计
Table 1 Orthogonal design of L₉(3⁴) for proliferation of cluster buds of basal stems induced by stem segments of *L. ruthenicum*

水平	因素		
	NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	KT/(mg·L ⁻¹)
1	0.1	0.01	0.1
2	0.5	0.05	0.5
3	1.0	0.10	1.0

2.2.4 生根培养基 根据单因素预实验结果, 以 MS 及改良的 MS₁ 为基本培养基, 分别在其中添加不同质量浓度的 NAA, 进行完全组合实验。选取增殖过程中长势均匀、株高 3 cm 以上的单苗, 接种于生根培养基中, 培养 30 d 后统计生根率。

2.3 培养条件和接种方法

2.3.1 无菌种子萌发以及生根过程培养条件 培养温度 (25±2) °C, 光照强度 1 200 lx, 光照时间 12 h/d。

2.3.2 增殖过程培养条件 根据相关文献对于减少黑果枸杞试管苗玻璃化的报道^[15], 将光照强度调整至 1 400 lx, 光照时间提升至 14 h/d。

2.3.3 接种方法 种子接种 5 颗 1 瓶, 接种于培养基表面; 茎段外植体接种 5 株 1 瓶; 单苗生根培养时, 5 株 1 瓶; 均匀接入培养基。

2.4 驯化及移栽

生根培养 40 d 后, 苗长至 4~5 cm 高, 根系粗壮、叶片繁茂即可移栽, 在自然光下露苗 7 d 后去除封口, 将植株取出, 在流水下轻柔地洗去根部附着的培养基, 以避免根部损伤, 移栽至经质量浓度为 0.2% 高锰酸钾消毒后的腐殖土-蛭石 (1:1) 的基质中, 用塑料薄膜覆盖, 保温 (25±2) °C, 保湿 (50%~70%) 培养 60 d 后统计成活率。

2.5 统计指标及数据处理

得到数据均采用 Excel 和 SPSS 19.0 软件处理分析。各指标计算公式如下。

愈伤组织发生率 = 茎段下部产生的愈伤组织数/接入茎段数

不定芽发生率 = 产生不定芽的愈伤数/茎段产生愈伤数

不定芽分化系数 = 产生的不定芽数/茎段产生愈伤数

基茎丛生芽发生率 = 产生基茎丛生芽的茎段数/接入茎段数

增殖系数 = 有效转接瓶数/原始接种瓶数

生根率 = 生根的单苗数/接种材料总数

移栽成活率 = 成活苗数/移栽总苗数

3 结果与分析

3.1 种子萌发及无菌实生苗获得

无菌接种 10 d 后种子开始萌发, 出现明显白色胚根 (图 1-B); 25 d 后胚根长势迅速, 可见明显胚根胚轴及子叶 (图 1-C); 40 d 后叶片舒展, 茎段变绿变硬, 获得无菌实生苗 (图 1-D)。

由表 2 可看出, 在 0.1% 升汞溶液中, 经过不同消毒时间处理的种子生长情况不同, 其中, 消毒 20 s 以及 40 s 时间较短, 灭菌不充分, 虽然有一些种子成功萌发, 但分别有 51.23% 以及 25.67% 的污染率; 消毒 60 s 种子无污染, 死亡 12.64%, 萌发率 85.82% 为 4 组中最高; 而消毒 80 s 时间过长, 虽萌发率为 76.42%, 但对种子造成了损伤, 种子死亡率达到了 58.62%。综上, 虽然种子消毒时间 60 s 与 80 s 在死亡率及萌发率上无显著差异, 但消毒 60 s 污染率为 0, 因此本实验中种子消毒最佳方案为 0.1% 升汞溶液中消毒 60 s。

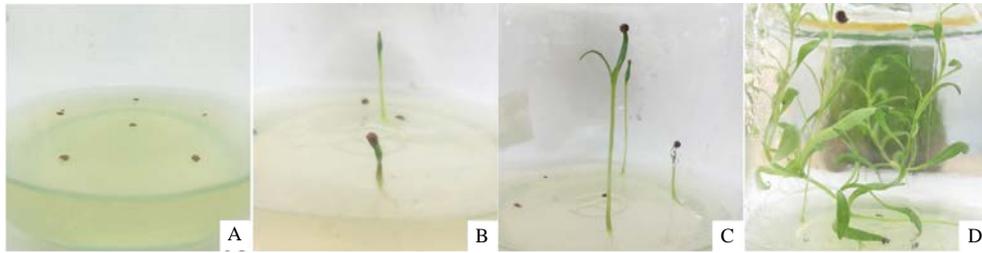


图 1 种子萌发及无菌实生苗获得过程
A-刚接种进培养基的种子 B-培养 10 d 后生长出白色胚根 C-培养 25 d 后可见明显胚根胚轴胚芽 D-40 d 后无菌实生苗长成
A-Seeds just inoculated into medium B-After 10 d of culture, white radicle grew C-After 25 d of culture, obvious radical hypocotyl germ could be seen D-After 40 d, sterile seedlings grew up

图 1 种子萌发及无菌实生苗获得过程

Fig. 1 Seed germination and acquisition of sterile seedlings

表 2 不同消毒时间梯度处理种子的污染及死亡情况

Table 2 Pollution and death of seeds treated with different time gradients of disinfection

消毒时间/s	接种数	萌发率/%	污染率/%	60 d 后死亡率/%
20	50	23.43±0.962 ^b	51.23±0.989 ^a	1.33±0.571 ^d
40	50	45.67±0.741 ^c	25.67±0.741 ^b	5.67±0.513 ^c
60	50	85.82±0.698 ^a	2.31±0.446 ^c	12.46±0.731 ^b
80	50	76.43±0.827 ^a	0.54±0.153 ^c	58.62±1.154 ^a

同列不同字母表示在 5% 水平上有显著性差异 $P < 0.05$, 下同
Different letters in the table indicate significant differences, $P < 0.05$, same as below

3.2 单因素实验结果分析

单因素实验结果表明, 在激素及琼脂含量固定的情况下, 以 MS 及改良的 MS₁ 作为基本培养基, 茎段均可产生 3~4 条细弱根系, MS 培养基促进不定芽分化增殖的作用更优, 为探究黑果枸杞生长所需营养下限, 设置了改良的 MS₂ 培养基, 在该培养基中, 植株生长缓慢、低矮细小, 不产生根系, 出现生长停滞现象, 显然已经不能为植株提供充足养

分, 因此在后续实验过程中将不再使用改良的 MS₂ 培养基; 在同一基本培养基中, 单一使用任一植物激素对黑果枸杞增殖均有促进作用, 相比较而言, 6-BA (适宜质量浓度范围为 0.01~0.10 mg/L)、KT (适宜质量浓度范围 0.1~1.0 mg/L) 可诱导产生较多愈伤并伴有不定芽发生, 不定芽发生率为 15% 左右, 且 6-BA 可促进腋芽萌发, 萌发率为 80%, 而 KT 实验组出现了基茎丛生芽发生现象, NAA 在 0.1~1.0 mg/L 内对愈伤及根系诱导有显著影响, 愈伤诱导率为 40% 左右, 诱导生根率为 75%, ZT 效果与 6-BA 以及 KT 相当, 因其较高的价格所以舍弃不用。实验还观察到使用琼脂质量浓度为 6.0 g/L 的培养基可减少黑果枸杞玻璃化现象, 则后续增殖实验均添加 6.0 g/L 的琼脂。

3.3 茎段愈伤组织诱导及不定丛芽分化完全组合实验结果分析

由表 3 可知, 所有激素组合均可诱导茎段产生愈伤组织, 且当 6-BA 质量浓度一定时, 随着 NAA 浓度升高, 愈伤组织发生概率也升高, 说明 NAA

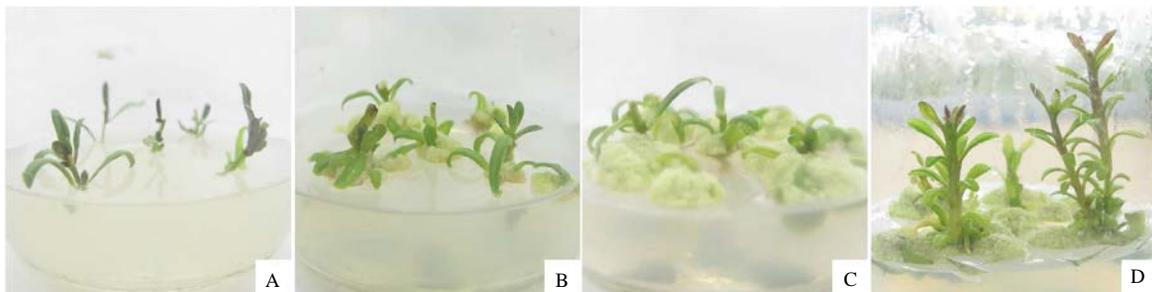
表 3 NAA 与 6-BA 不同质量浓度组合对茎段诱导不定芽的影响

Table 3 Effects of different concentration combinations of NAA and 6-BA on adventitious bud induction in stem segments

组别	植物激素/(mg·L ⁻¹)		接种数	愈伤组织发生率/%	不定芽发生率/%	不定芽分化系数
	NAA	6-BA				
A1	0.1	0.01	50	77.860±0.208 ^d	27.190±0.072 ^b	2.190±0.043 ^d
A2		0.05	40	72.320±0.128 ^e	33.140±0.124 ^a	1.270±0.026 ^e
A3		0.10	45	82.140±0.156 ^c	24.120±0.163 ^c	4.260±0.074 ^a
A4	0.5	0.01	50	82.460±0.777 ^c	18.260±0.428 ^d	3.250±0.038 ^b
A5		0.05	50	80.100±0.466 ^{cd}	33.210±0.136 ^a	2.470±0.050 ^c
A6		0.10	50	92.920±0.140 ^b	22.220±0.133 ^c	2.430±0.073 ^c
A7	1.0	0.01	50	90.730±0.202 ^b	12.180±0.173 ^e	1.210±0.044 ^e
A8		0.05	45	99.060±0.731 ^a	22.150±0.109 ^c	2.340±0.084 ^d
A9		0.10	50	92.560±0.122 ^b	17.120±0.180 ^d	2.560±0.065 ^d
A10	0.0	0.00	50	36.490±0.162 ^f	3.210±0.083 ^f	0.520±0.042 ^f

对愈伤组织的诱导具有促进作用；而当 NAA 质量浓度一定时，愈伤组织诱导不定芽发生概率随着 6-BA 质量浓度的升高而呈先上升后下降的态势，说明过高或过低的 6-BA 都会阻碍不定芽的发生以及生长。实验表明 A9 组，即 NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.1 mg/L 为最适宜茎段诱导愈伤组织、不定芽分化的激素组合。在 A9 实验组中，培养 10 d 后，茎段腋芽以及基茎不定休眠芽开始萌发伸长，与此同时，茎段下端开始出现浅绿色愈伤组织（图 2-A）；培养 25 d 后，愈伤组织生长迅速，由浅绿色转变为白绿

色，质地紧密，虽有不定芽分化，但数量稀少（图 2-C）；培养 35 d 后，愈伤组织逐渐变白变硬，分化出的不定芽生长停滞并明显白化（图 2-D）。根据表 3 可知，不定芽分化率及分化系数都较低，证明该完全组合实验效果不佳，不宜作为黑果枸杞增殖途径。因单因素实验中在极少数实验组中发现茎段诱导基茎丛生芽萌发的现象，该方式从未在文献中有过报道，为了进一步研究该途径是否可以成为黑果枸杞全新的一种高效增殖方法，进行正交试验，以求获得更高比例基茎丛生芽的发生。



A-茎段接种 10 d 后腋芽开始萌发生长，下端开始出现少量愈伤组织 B-接种 15 d 后，愈伤组织逐渐增多 C-愈伤组织生长迅速，由浅绿色转变为白绿色，质地紧密 D-培养 35 d 后，愈伤组织逐渐变白变硬，分化出的不定芽生长停滞并明显白化
A-After 10 d of inoculation, axillary buds began to germinate and grow, and a few callus appeared at the lower end B-After 15 d of inoculation, callus increased gradually C-Callus grew rapidly from light green to white green with compact texture D-After 35 d of culture, the callus gradually became white and hard, and the bud clusters differentiated stagnated and obviously whitened

图 2 茎段诱导愈伤组织及不定丛芽分化增殖过程

Fig. 2 Callus induced by stem segment and differentiation and proliferation of adventitious cluster buds

3.4 茎段基茎丛生芽分化 $L_9(3^4)$ 正交试验分析

由正交试验结果（表 4）可知，基茎丛生芽诱导极差显示为 $R_C > R_B > R_A > R_D$ ，NAA、6-BA、KT 3 种激素的极差均大于空白列，表明上述激素对茎段诱导基茎丛生芽有可靠作用，这 3 种激素的影响效应表现为 $KT > 6-BA > NAA$ ，证明基茎丛生芽诱

导增殖主要与 KT 浓度有关。通过分析表 5 方差数据，表明激素 KT 对增殖系数有显著影响 ($P < 0.05$)，NAA、6-BA 无显著影响。进一步进行 KT 3 水平 Duncan 检验可知，最适合茎段诱导基茎丛生芽进行增殖的质量浓度为水平 2 (0.5 mg/L)，其次为水平 3 (1.0 mg/L)，影响最小为水平 1 (0.1 mg/L)。通过比较分析平均值，最适宜黑果枸杞增殖的植物激素组合为 $A_1B_2C_2$ ，即 NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.05 mg/L+KT 0.5 mg/L，利用此最佳组合进行基茎丛生芽诱导增殖实验。

表 4 茎段诱导基茎丛生芽 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results of $L_9(3^4)$ proliferation of basal stem cluster buds induced by stem segments

组别	植物激素/(mg·L ⁻¹)				增殖系数
	A (NAA)	B (6-BA)	C (KT)	D (空白)	
B1	0.1	0.01	0.1	(1)	20.42
B2	0.1	0.05	0.5	(2)	42.84
B3	0.1	0.10	1.0	(3)	25.23
B4	0.5	0.01	0.5	(3)	27.96
B5	0.5	0.05	1.0	(1)	28.68
B6	0.5	0.10	0.1	(2)	38.21
B7	1.0	0.01	1.0	(2)	22.34
B8	1.0	0.05	0.1	(3)	18.04
B9	1.0	0.10	0.5	(1)	36.79
K_1	0.299	0.219	0.257	0.286	
K_2	0.278	0.267	0.391	0.294	
K_3	0.257	0.248	0.287	0.254	
R	0.042	0.052	0.134	0.040	

将茎段接种于上述培养基中，培养 5 d 后节上叶片腋部开始萌发出小芽（下称“腋芽”），茎

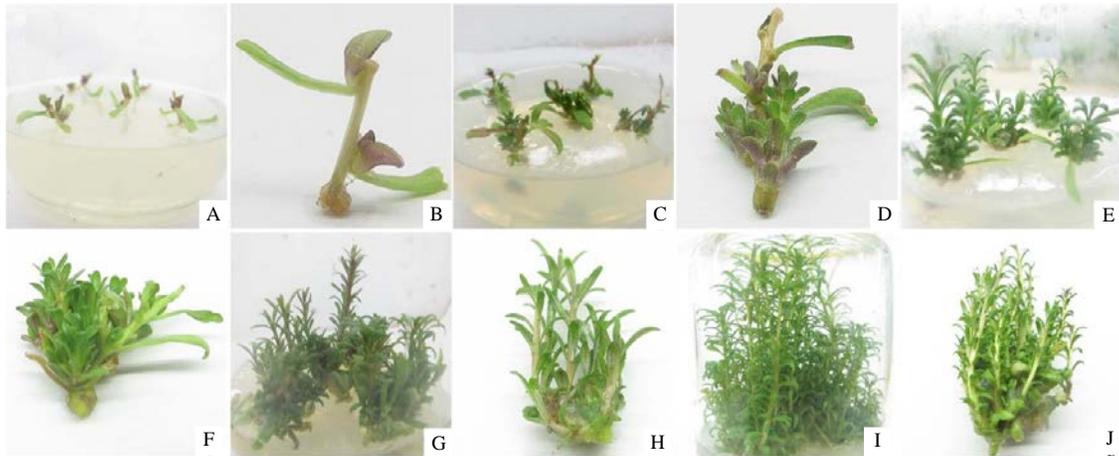
表 5 增殖系数方差分析结果

Table 5 Analysis of variance of multiplication coefficient

激素	III 型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A (NAA)	0.267	2	0.013	0.191	$P > 0.05$
B (6-BA)	0.705	2	1.850	1.249	$P > 0.05$
C (KT)	13.646	2	11.823	16.077	$P < 0.05$
误差	0.236	2	0.118	0.167	$P > 0.05$

段基部与培养基接触的节上开始出现芽点 (图 3-A、B); 10 d 后基部节上芽点分化出小芽 (下称“基茎丛生芽”, 图 3-C、D), 经观察统计, 基茎丛生芽发生率为 100%; 培养 15 d 后, 腋芽明显伸长, 基部不定芽丛明显增多, 并开始伸长,

整体呈翠绿色 (图 3-E、F); 30 d 后, 基部不定芽丛长势迅猛, 叶片伸展, 颜色由翠绿色转为深绿色 (图 3-G、H); 经过 45 d 的培养, 植株长成茂密的芽丛 (图 3-I、J), 增殖系数平均可达到 40 以上。



A、F-培养 5 d 后节上叶片腋部开始萌发出腋芽, 茎段基部与培养基接触的节上开始出现芽点 B、G-10 d 后基部节上芽点分化出基茎丛生芽 C、H-培养 15 d 后, 腋芽明显伸长, 基部不定芽丛明显增多 D、I-30 d 后, 基部不定芽丛长势迅猛 E、J-经过 45 d 的培养, 植株长成茂密的芽丛

A, F-After 5 d of culture, axillary buds began to germinate in the axillary part of the leaves on the ganglion, and bud spots appeared on the ganglion where the base of the stem segment contacted the culture medium B, G-After 10 d, the basal node buds differentiated into basal stem cluster buds C, H-After 15 d of culture, axillary buds elongated significantly and adventitious bud clusters at the base increased significantly D, I-After 30 d, adventitious bud clusters grew vigorously at the base E, J-After 45 d of cultivation, the plants grew into dense bud clusters

图 3 茎段基茎丛生芽分化增殖过程

Fig. 3 Differentiation and proliferation of basal stem cluster buds

3.5 生根培养及无菌苗移栽

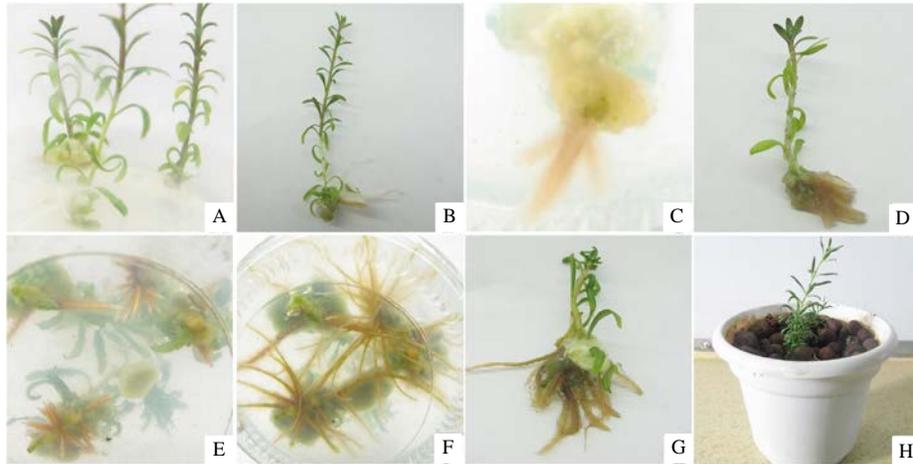
观察不同基本培养基以及不同质量浓度 NAA 完全组合实验对黑果枸杞诱导生根的情况 (表 6) 可知, 添加 NAA 的实验组生根率显著高于空白 MS 及空白改良 MS₁ 对照组 ($P < 0.05$), 证明生长素 NAA 对根系诱导有显著影响; 当基本培养基固定时, 加入 NAA 质量浓度越高, 生根率也随之升高; 当 NAA 质量浓度固定时, 相对于 MS 培养基来说, 以改良的 MS₁ 为基本培养基更有利于根的诱导。由 C1、C3 以及 C5、C6 实验组可知, 无论以 MS 还是以改良 MS₁ 为基本培养基, 在其中添加 0.1 mg/L 或 0.5 mg/L NAA 均无明显差异 ($P > 0.05$), 表明在根系诱导过程中, 添加高质量浓度的生长素才能造成显著影响。由表 3 可知, 最适宜黑果枸杞生根的培养基为改良的 MS₁ + NAA 1.0 mg/L, 在该培养基中, 培养 10 d 后, 植株下端出现愈伤, 且接触培养基的节处优先长出细弱覆有白毛的根系 (图 4-A、E); 15 d

表 6 不同基本培养基及不同质量浓度 NAA 完全组合对试管苗生根的影响

Table 6 Effects of different basic mediums and different concentrations of NAA complete combination on rooting of plantlets

组别	基本培养基类型	NAA/(mg·L ⁻¹)	接种	生根率/%
C1	MS	0.1	50	81.9±0.090 ^c
C2		0.5	50	86.5±0.209 ^c
C3		1.0	45	87.2±0.140 ^d
C4		0.0	50	12.3±0.157 ^f
C5	改良 MS ₁ 培养基	0.1	40	95.9±0.196 ^b
C6		0.5	50	96.4±0.075 ^b
C7		1.0	50	98.9±0.218 ^a
C8		0.0	50	17.4±0.151 ^e

后, 植株底端出现粗壮的根系生长 (图 4-B、F); 培养达到 40 d, 底端根系发达、粗壮 (图 4-D、G); 炼苗移栽 60 d 后植株生长旺盛, 叶片饱满 (图 4-H)。



A、B-培养 10 d 后，植株下端出现愈伤，出现覆有白毛的不定根 C、D-15 d 后，植株底端出现粗壮的定根生长 E-培养 25 d，定根生长迅速 F、G-培养达到 40 d，不定根与定根发达 H-60 d 后成功驯化的生根试管苗取出移栽基质中

A, B-After 10 d of culture, callus and adventitious roots covered with white hairs appeared at the lower end of the plant C, D-Fifteen days later, strong rooting growth appeared at the bottom of the plant E-Fixed roots grow rapidly after 25 d of culture F, G-After 25 d of culture, the roots grew fast and robust H-Rooting test-tube seedlings successfully domesticated 60 d later were taken out of transplanting media

图 4 生根培养及无菌苗移栽过程

Fig. 4 Rooting culture and aseptic seedling transplantation

4 讨论

4.1 黑果枸杞体外快繁中的有效增殖方式

近年来，随着黑果枸杞比普通红枸杞更为丰富的营养成分被发现^[16-17]，黑果枸杞的无性繁殖已成为一大热门项目。据相关报道，在枸杞属植物的再生体系建立方面，获得再生植株的方式主要有 3 种：其一为外植体-愈伤组织-丛生芽或不定芽-生根苗，研究者利用种子^[18]、叶片^[6]、下胚轴^[14,19]、茎段^[15,20-22]以及花药^[21]诱导出愈伤组织，再诱导愈伤组织分化出不定芽形成再生植株；其二为外植体-腋芽-生根苗，以茎段^[15-17]为外植体，直接诱导腋芽发生来形成再生植株；其三则为外植体-不定芽-生根苗，采用茎段^[23]以及胚轴^[23]直接诱导形成不定芽，不定芽分化生长形成再生植株。以上 3 种增殖方式，第一种为间接器官发生途径，二和三皆为直接器官发生途径，且各有优劣：采用间接器官发生途径，增殖系数可观，但培养过程复杂，生长周期较长，产生玻璃化现象明显且后代易发生变异；直接诱导腋芽发生途径，玻璃化现象较诱导愈伤方法减轻，但腋芽萌发所需时间长，随着腋芽的不断分化，次级植株愈渐细弱，不利于大规模生产；直接诱导不定芽发生途径，增殖系数较其余 2 种方式略高且所需时间短，但也遭受植株玻璃化的困扰。

在本研究中，茎段培养出现 2 种效果截然不同的增殖方式。与王方琳等^[19]、曹君迈等^[20]的实验结

果不同，在本研究中，采用外植体-愈伤组织-丛生芽的途径尽管能在 2 种外源激素的作用下诱导出大量愈伤组织，但无论如何调整激素配比，愈伤再分化能力都极低下，即使有少量不定芽产生，但在增殖效果上基本无可利用性，且植株玻璃化的比例极高，该问题在曹君迈等^[20]的研究中也有所提及。即使引入另一促进芽分化的外源激素 KT，效果也不理想；推测可能与黑果枸杞所属生境多为缺水干旱的荒滩戈壁有关。有研究指出^[24-25]，干旱胁迫会导致植物体内源生长素（IAA）合成量降低，为满足愈伤诱导的需要，供给大量的外源生长素是必需的，然而一旦生长素含量增加，将使细胞分裂素/生长素比值减小，对不定芽的发生产生拮抗，再增大细胞分裂素的浓度又会引起植株玻璃化，故而两相矛盾，本研究结果支持这一观点。在进一步正交实验中发现，茎段基接触或靠近培养基的节部位，会膨大继而大量基茎丛生芽发生，这一现象在枸杞属中未见报道。不同研究者对基茎丛生芽的观点并不统一，王琴琴等^[26]通过对臭参 *Codonopsis bulleyana* Hook. f. et Thoms 的研究认为其基茎不定芽为愈伤-不定芽，即间接器官发生途径；而遼卫国等^[27]认为盐节木 *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. 的基茎丛生芽本质为腋芽丛生，属直接器官发生。本研究中出现基茎丛生芽与上述 2 个物种的发生情况均有类似之处。一般来说，生长在枝条上的具有一定位

置的芽称为定芽，而从茎的节间、根或叶上生出的不具有一定位置的芽称为不定芽。本研究中出现基茎丛生芽并不是从茎段腋芽部位生长出来，而是由与培养基接触的节上不定位置萌发，由此可判断基茎丛生芽为不定芽。也有研究指出^[25]，植物的芽是由芽原基逐步发育而成，不定芽的发生和顶芽、腋芽不同，它的发生与一般顶端分生组织无直接关系，而是受到外源激素的刺激，细胞分裂组成分生组织，当这种分生组织形成第一叶时，不定芽与产生芽的原组织结构之间建立起维管组织的连续，而这种连续就是由不定芽的分化和原有的维管组织相接而形成的。从这一观点来看，本研究中出现基茎丛生芽是因为其与产生腋芽的芽原基构成了维管组织的联系，继而进行萌发生长形成丛状。在此过程中，尽管茎段基部也会产生少量淡绿色、疏松的愈伤组织，但其上并未形成芽点，推测仅起到扩大植株与培养基接触面积的作用，实质为输导组织而非分生组织。综上所述，本研究认为黑果枸杞的基茎丛生芽增殖途径为直接器官发生途径。

另一值得注意的现象是，无论愈伤组织还是基茎不定丛芽，均为茎段上部腋芽发后出现，表明其与节上腋芽的萌发关系密切。推测黑果枸杞幼嫩芽尖具合成愈伤组织发生所需的如内源生长素或其他生长调节物质的能力，由于形态学上的向基性而导致比器官培养，如茎尖或叶培养，更易于愈伤组织的产生。在本课题组研究的地皮消 *Pararuellia delavayana*(Baill.) E. Hossain^[28]、青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho & W. L. Shi^[29]、滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl^[30]、金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu^[31]等物种中也存在这样的现象。

本研究结果表明，黑果枸杞基茎丛生芽直接发生途径，与众多学者所使用的增殖过程不同^[16-21]，省略了愈伤组织的诱导过程，简化了组培的步骤，缩短了成苗时间，提高了快繁的效率，且增殖系数大大超过枸杞属已有的报道，可在满足大规模生产需要的同时，又保持了植株的优良性状，为其人工快繁最有效的增殖方式。

4.2 增殖过程中激素的选择及影响

在本研究中，以完全组合实验、正交试验结果与单因素实验结果对比可知，多种激素间的协同作用效果比单一激素对于黑果枸杞增殖表现更为优秀。在实验过程中，利用 NAA 与 6-BA 组合进行茎

段愈伤组织的诱导以及不定芽的分化，可发现 NAA 在愈伤诱导方面起到了关键性作用，但诱导出来的愈伤缺乏再分化的能力，而其节上腋芽的萌发比之空白对照更加快速，说明 6-BA 可大大促进腋芽发生，结论与杜敏智^[32]所述一致。

对于诱导基茎丛生芽增殖来说，KT 为基茎丛生芽诱导增殖的主导因素。这是由于不定丛生芽从基茎的节上直接诱导出来，不经过愈伤组织分化过程，故具有促进芽分化、生长作用的细胞分裂素在其中起着决定性作用，而 L₉(3⁴) 试验应用到 6-BA 及 KT 2 种细胞分裂素，6-BA 易使植株产生玻璃化阻碍生长，故 KT 对基茎丛生芽的诱导影响更大。通过方差分析，也可发现 KT 影响增殖系数的效果显著 ($P < 0.05$)，它与 NAA 及 6-BA 协同作用，很大程度地提高了增殖系数，此结果与张楠等^[22]以及孙晓红等^[6]实验结论一致，在朱春艳等^[33]对于云锦杜鹃 *Rhododendron fortune* Lindl. 的组培快繁实验中也发现了类似现象，实验证明利用 NAA、6-BA、KT 组合来诱导基茎丛生芽从而达到增殖的目的，不仅有效且增殖系数较高，而且完成了高效快速繁殖的目标。

4.3 体外快繁过程中玻璃化现象及解决

玻璃化现象为植物体外快繁中最为常见、也最为棘手的异常现象之一，在枸杞属的体外快繁过程中，玻璃化也一直影响着试管苗的产量及质量^[12,34-35]。对于其成因及防治措施，有众多的学者专门进行了研究，发现主要形成因素包括外植体的类型、植物激素种类及质量浓度、基本培养基类型、琼脂浓度、培养器具透气性和光照强度及时间等^[34-35]。如何减轻或消除玻璃化，达到生产效益最大化，成为学者们的研究课题。本研究将光照强度提升至 1 400 lx，光照时间提升至 14 h/d，并将琼脂提高至 6.0 g/L 进行增殖实验，以降低培养瓶中的水分，发现玻璃化现象有所缓解；而经本研究验证，植物激素 6-BA 的确会提高黑果枸杞在增殖过程中发生玻璃化的概率，由此确定培养瓶中过多的水分以及细胞分裂素 6-BA 是造成黑果枸杞玻璃化的其中 2 个原因，以上方法在杜敏智^[32]及曹有龙等^[15]关于黑果枸杞玻璃化的研究中也有所提及。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 姬孝忠. 黑果枸杞育苗繁殖技术 [J]. 中国野生植物资

- 源, 2015, 34(2): 75-77.
- [3] 张绘芳, 李霞, 王建刚, 等. 塔里木河下游植物群落结构特征分析 [J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1219-1224.
- [4] Zheng J, Ding C X, Wang L S, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai Tibet plateau [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 859-865.
- [5] 张鸣号, 王秀玉, 王秀梅, 等. 枸杞多糖对小鼠移植性肝癌抑制作用的实验研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1142-1146.
- [6] 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, 52(5): 653-658.
- [7] Liu Z G, Dang J, Wang Q L, et al. Optimization of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* fruit using RSM and its anti-oxidant activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 127-134.
- [8] 林丽, 李进, 吕海英, 等. 黑果枸杞花色苷对小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1460-1466.
- [9] 张芳, 郭盛, 钱大玮, 等. 枸杞多糖的提取纯化与分子结构研究进展及产业化开发现状与前景分析 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 424-432.
- [10] 全妙华, 欧立军, 贺安娜, 等. 天门冬组培快繁体系研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1599-1603.
- [11] 马彦军, 程艳青, 张荣梅. 黑果枸杞组织培养快繁技术研究 [J]. 林业科技通讯, 2015(6): 26-28.
- [12] Sun S Y, Cao H M, Yao H, et al. Study on tissue culture and rapid propagation technology system of *Lycium barbarum* L [J]. *Agric Sci Technol*, 2016, 17(5): 1060-1064.
- [13] 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(7): 32.
- [14] 乔永旭. 黑果枸杞高频再生体系的建立 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2031-2034.
- [15] 曹有龙, 贾勇炯, 陈放, 等. 枸杞花药愈伤组织悬浮培养条件下胚状体发生与植株再生 [J]. 云南植物研究, 1999, (3): 80-84.
- [16] 王翠平, 陈建伟, 严莉, 等. 黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 203-210.
- [17] 刘爱红, 陈洁, 孙美玲. 黑果枸杞的营养保健成分及其开发应用研究进展 [J]. 食品工程, 2018(4): 5-7.
- [18] 陈海军, 刘嘉伟, 李佳, 等. 黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*) 组织培养与再生体系的建立 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2018, 8(24): 1-12.
- [19] 王方琳, 柴成武, 魏小红, 等. 荒漠区药用植物黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*) 的组织培养 [J]. 干旱区资源与环境, 2016, 30(10): 104-109.
- [20] 曹君迈, 马海军, 谭亚萍. 离体黑果枸杞再生途径的研究 [J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(5): 54-58.
- [21] 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.
- [22] 张楠, 曹后男, 宗成文, 等. 大果黑果枸杞组培快繁技术体系的研究 [J]. 辽宁林业科技, 2016(1): 22-24.
- [23] 刘思, 安文娟, 蔡超, 等. 三种枸杞组培快繁技术的研究 [J]. 吉林林业科技, 2010, 39(5): 8-11.
- [24] 陈荣建, 熊丹, 欧静, 等. 持续干旱下杜鹃花类菌根真菌对桃叶杜鹃内源激素的影响 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2018, 40(3): 26-33.
- [25] 李志军, 焦培培, 周正立, 等. 灰叶胡杨根蘖繁殖的形态解剖学特征 [J]. 植物学报, 2012, 47(2): 133-140.
- [26] 王琴琴, 王元忠, 黄衡宇, 等. 臭参组培快繁体系研究 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1262-1266.
- [27] 遼卫国, 胡灵芝, 宫慧芳, 等. 盐节木同化枝的腋芽丛生与快速繁殖 [J]. 植物生理学报, 2016, 52(4): 431-435.
- [28] 吕美萍, 王元忠, 黄衡宇. 地皮消愈伤组织诱导及植株高效再生体系的建立 [J]. 植物学报, 2016, 51(1): 89-97.
- [29] 黄衡宇, 黄骥, 王美蓉, 等. 青叶胆组织培养条件优化及不同交配方式子代植株再生能力比较研究 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 480-487.
- [30] 席银凯, 王元忠, 黄衡宇, 等. 滇龙胆丛芽高效诱导与植株再生体系的建立 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1398-1404.
- [31] 曹磊, 钱子刚, 黄衡宇, 等. 金铁锁体外高效再生体系的建立 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 12-17.
- [32] 杜敏智. 大果黑果枸杞组培快繁技术体系的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2015.
- [33] 朱春艳, 李志炎, 鲍淳松, 等. 云锦杜鹃组培快繁技术研究 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 335-337.
- [34] Wu Z, Chen L J, Long Y J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L. Shoot [J]. *In Vitro Cell Develop Biol Plant*, 2009, 45: 483-490.
- [35] Ivanova M, Van S J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2008, 92: 227-231.