

青海野生黑果枸杞再生体系的建立 及遗传稳定性分析

高思丹^{1,2,3}, 王联星^{1,2,3}, 郭佳磊^{1,2,3}, 杨莉娜⁴, 何桂芳¹, 何 涛^{1,2,3*}

(1 青海大学 生态环境工程学院, 西宁 810016; 2 青海省园林植物与观赏园艺重点实验室, 西宁 810016; 3 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016; 4 青海大学 农牧学院, 西宁 810016)

摘 要:以野生黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)的无菌苗叶片作为外植体,建立了两条再生体系:一条是经愈伤组织再分化的间接再生体系,一条是不经愈伤组织再分化的直接再生体系。并采用流式细胞术(FCM)及 ISSR 分子标记技术对两种途径再生苗进行了遗传稳定性分析。结果表明:(1)最佳愈伤组织诱导培养基为 MS+1.5 mg · L⁻¹ 2, 4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),诱导率达 100%;最佳分化培养基为 MS+1.5 mg · L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)+0.1 mg · L⁻¹ 吲哚-3-丁酸(IBA),1 g 愈伤组织上的平均不定芽数为 39.4 个。(2)叶片直接诱导不定芽的最佳培养基为 MS+0.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.3 mg · L⁻¹ α-萘乙酸(NAA),不定芽诱导率为 92.9%,每个外植体上平均不定芽数为 18.1 个。(3)两条途径再生的不定芽在不含植物生长调节剂的 MS 培养基上,2 周内均可正常生根。(4)FCM 结果显示亲本苗及 2 种再生苗均为二倍体。(5)ISSR 分析表明,间接再生苗的平均遗传相似性系数为 0.84,直接再生苗的平均遗传相似性系数为 0.91,直接再生体系是一种更加快速高效的繁殖方法。

关键词:黑果枸杞;再生体系;愈伤组织;不定芽;遗传稳定性

中图分类号:Q813.1;S663

文献标志码:A

Establishment of the Regeneration System of Wild *Lycium ruthenicum* from Qinghai and Analysis in Its Genetic Stability

GAO Sidan^{1,2,3}, WANG Lianxing^{1,2,3}, GUO Jialei^{1,2,3}, YANG Lina⁴, HE Guifang¹, HE Tao^{1,2,3*}

(1 School of Eco-Environment Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China; 2 Key Laboratory of Landscape Plants of Qinghai Province, Qinghai University, Xining 810016, China; 3 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China; 4 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: Two regeneration systems were established by using sterile leaves of wild *Lycium ruthenicum*. The direct organogenesis is differentiated by leaves, and the indirect organogenesis is differentiated by calli. The genetic stability of the regenerated plantlets was assessed by the ISSR markers and flow cytometry (FCM). The results showed that: (1) the best medium for callus induction was MS+1.5 mg · L⁻¹ 2,4-D, with induction rate of 100%; the optimum medium for callus differentiation was MS+1.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.1 mg · L⁻¹ IBA, with 39.4 shoots per gram of calli. (2) The suitable medium for direct shoot induction was MS+0.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.3 mg · L⁻¹ NAA, with induction rate of 92.9%, and 18.1 shoots

收稿日期:2019-11-27;修改稿收到日期:2020-01-28

基金项目:国家自然科学基金(31660217)

作者简介:高思丹(1993—),女,硕士,主要从事组织培养技术研究。E-mail:1723344680@qq.com

* 通信作者:何 涛,博士,教授,主要从事植物生物技术研究。E-mail:hetaoxn@aliyun.com

per explant. (3) After adventitious buds were transferred to the MS medium without hormones, the roots could form within two weeks. (4) FCM results showed that parental plantlets and regenerated plantlets were diploid. (5) ISSR analysis showed that the average genetic similarity coefficients of indirect and direct regenerated plantlets were 0.84 and 0.91. The direct organogenesis was a more effective method for plant regeneration of *L. ruthenicum*.

Key words: *Lycium ruthenicum*; regeneration system; callus; adventitious buds; genetic stability

枸杞为茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*)的植物^[1]。中国有枸杞属植物 7 种 2 变种,主要分布于西北荒漠区^[2]。其中,分布于青藏高原地区的枸杞有 2 种 1 变种,即宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)、北方枸杞(*Lycium chinense* Mill. var. *potaninii* A. M. Lu)和黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)。因富含多糖、色素、黄酮类化合物,枸杞成为中药、藏药中的常用药材。其中,黑果枸杞中含有 14 种花青素,不仅种类丰富而且总含量也比较高,可作为健康食品和天然色素资源^[3]。黑果枸杞的适应性很强,可以生长在沙地、盐碱地或荒漠中,可作为水土保持的灌木和盐碱地开树先锋,具有很高的林业价值。与宁夏枸杞相比,黑果枸杞的抗逆性更强,但是存在野生资源有限、产量低等弊端^[4]。随着人类对大自然的开发,野生枸杞的生存空间愈来愈少,因此,对枸杞开展细胞工程研究则显得尤为重要。

国内关于枸杞的组织培养研究始于 20 世纪 80 年代,陈维伦等^[5]、牛德水等^[6]通过枸杞的叶片、下胚轴、茎端和幼嫩子房的愈伤组织诱导植株间接再生,此后,还有用枸杞髓组织、枸杞花药的愈伤组织诱导植株再生的报道。但这些研究多以宁夏枸杞为研究对象,对黑果枸杞的组织培养研究较少。近几年对黑果枸杞再生的报道逐渐增多,Hu 等^[7]以根为外植体获得了再生植株,乔永旭^[8]利用子叶、下胚轴和胚根获得了再生植株,孙晓红等^[9]、陈海军等^[10]、裴小鹏等^[11]利用叶片获得了再生植株。此外还有研究者利用嫩茎诱导丛生芽得到了再生植株^[12]。本实验同样以黑果枸杞叶片为实验材料,除了对叶片进行愈伤组织诱导并进一步分化外,还通过添加不同激素诱导叶片直接分化不定芽,即直接的器官发生途径,并对其进行了遗传稳定性分析,为野生黑果枸杞的种质资源保护和人工抚育提供理论和技术支撑。

1 材料和方法

1.1 植物材料

实验材料为采自青海省柴达木盆地东沿都兰县

的野生黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将采集到的黑果枸杞干果用清水泡 1~2 d,去掉外部果肉,获得种子,用 0.1% HgCl_2 (升汞)处理 5 min,处理过程中不断晃动,使种子与 HgCl_2 充分接触,用无菌蒸馏水冲洗 5 次,每次 1 min,将消毒后的种子接种到不含植物生长调节剂的 MS 固体培养基上,放入人工气候箱,进行种子萌发,获得无菌苗。以上消毒、接种操作均在超净工作台上进行。

1.2.2 不定芽的诱导 取 30 d 苗龄的无菌苗幼嫩叶片为外植体,采用两条途径进行不定芽的诱导,第一条是间接的器官发生途径即先诱导愈伤组织,进而诱导愈伤组织分化形成不定芽;第二条是直接的器官发生途径即利用叶片直接进行不定芽的诱导。

(1) 叶片→愈伤组织→不定芽途径 取无菌苗叶片,切成宽 0.5 cm 左右的小段,接种到含不同浓度的 2,4-D($0\sim 2.0\text{ mg L}^{-1}$)和 6-BA($0\sim 1.0\text{ mg L}^{-1}$)组合的 MS 培养基上进行愈伤组织诱导,共 13 个浓度梯度,每个梯度做 6 组重复,接种的材料置于人工气候箱内培养,30 d 后观察其诱导情况并统计愈伤组织诱导率。将诱导的初级愈伤组织转接到含 0.5 mg L^{-1} 2,4-D 的继代培养基上,每隔 3 d 称量 1 次鲜重,绘制其生长曲线。称取 1 g 快速生长期的愈伤组织接种到含不同浓度的 6-BA($0\sim 2.0\text{ mg L}^{-1}$)和 IBA($0\sim 0.2\text{ mg L}^{-1}$)组合的 MS 培养基上进行愈伤组织分化,共 13 个浓度梯度,每个梯度做 6 组重复,放置在人工气候箱内培养,45 d 后观察其分化情况并统计数据。

(2) 叶片→不定芽途径 取无菌苗叶片,切成宽 0.5 cm 左右的小段,接种到含不同浓度的 6-BA($0\sim 2.0\text{ mg L}^{-1}$)和 NAA($0\sim 0.6\text{ mg L}^{-1}$)组合的 MS 培养基上进行叶片分化,共 13 个浓度梯度,每个梯度做 6 组重复,放置在人工气候箱内培养,50 d 后观察其分化情况并统计不定芽诱导率。

1.2.3 不定芽的生根培养与炼苗移栽 将长至 1.5 cm 左右的长势良好的不定芽切下,转接到不含植物

生长调节剂的 MS 基本培养基中,每瓶接种 3 个不定芽,观察其生根情况。

待再生的组培苗根系长至 10 cm 左右时,打开瓶口,往培养基中加入 20 mL 无菌水(加水浸泡一段时间后植株根部的培养基更容易去除),先在培养箱中炼苗 5 d,再转移到室内过渡 2 d 时间,然后轻轻洗去苗根部的培养基,移栽至混有营养土和蛭石(比例为 2∶1)的基质中。30 d 后观察其生长情况。

1.2.4 培养条件 实验过程中所用培养基均为 MS 基本培养基(内含 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $5.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, pH5.8),按照要求添加不同浓度植物生长调节物质后置于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 101 kPa 条件下进行高温高压灭菌 25 min。培养箱条件为 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下光照 16 h, $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下黑暗 8 h。

1.2.5 ISSR 分子检测 参照 He 等^[13]的方法,部分实验条件稍加改动。以亲本苗为对照,从 2 种再生体系获得的再生苗中各随机挑选 8 株进行遗传稳定性分析。用 CTAB 法分别提取亲本苗和两种再生苗的总 DNA,选用实验室筛选出的 4 条引物(表 1)进行 ISSR 分子检测,PCR 反应体系见表 2。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 36 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物在 $1\times\text{TAE}$ 配制的 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离,电压 150 V,时间 60 min。电泳结束后用凝胶成像仪拍照并分析。

1.2.6 外标法测定两种途径再生植株的倍性 采用美国 Beckman 公司的 Cytoflex LX 的流式细胞

仪进行检测,以已知是二倍体的黑果枸杞^[14]植株(亲本)作为参照样本,测定 2 种再生苗的倍性,使用上海月下生物科技中心的植物倍性检测试剂盒对待测材料进行裂解及染色处理。取植物娇嫩部分的材料,置于 400 目的滤网上,将滤网放置在一个小皿中。加入 1~2 mL 检测试剂,并用手术剪或者刀片在滤网中将植物材料快速剪切成 1 mm 左右的碎片。收集小皿中的液体,并用 400 目滤网再次过滤至上样管中,反复猛烈吹打 1~2 min。上机检测,激发波长为 405 nm。用流式细胞仪中的 CytExpert 软件分析检测结果。当参照样品与待测样品分别检测时为外标法,参照样本与待测样本混合检测时为内标法。

1.3 数据分析

数据处理和分析采用 Excel 和 SAS 软件。只计算清晰稳定的条带,在同一迁移率位置有谱带记为“1”,无谱带记为“0”,记录 4 条引物的谱带构建“0, 1”矩阵。

愈伤组织诱导率(%) = 诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数 $\times 100\%$

不定芽诱导率(%) = 诱导出不定芽的外植体数/接种的外植体总数 $\times 100\%$

$$GS=2N_{ij}/(N_i+N_j)$$

GS 为遗传相似系数, N_{ij} 为亲本苗和再生苗相同条带数, N_i 为亲本苗条带数, N_j 为再生苗条带数。

倍性计算公式:

待测样本倍性 = 参照样本倍性水平 \times (待测样本峰荧光均值/参照样本峰荧光均值)^[15]

2 结果与分析

2.1 无菌苗的获得

消毒好的种子 1 周左右开始陆续萌发,30 d 后整个植株长至 5~8 cm,有 8~10 片真叶(图 1),同时根系发达,其叶片适合用于后续诱导实验。30 d 时统计黑果枸杞的萌发率为 $(44.3\pm3.1)\%$,萌发率较低,可能与种子休眠和种子消毒时间、处理方式有关。

2.2 不定芽的诱导

2.2.1 不同植物生长调节剂对黑果枸杞愈伤组织诱导的影响 单独添加适量的 2,4-D 能有效促进愈伤组织的产生,3 d 左右就能观察到叶片边缘有膨大现象;10 d 左右时能观察到愈伤组织的出现;30 d 时,有大量愈伤组织形成,且颜色质地都较好,为黄

表 1 ISSR 引物

Table 1 ISSR primers

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence	Tm/ $^{\circ}\text{C}$
UBC825	ACACACACACACACT	50.8
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGYTT	48.7
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAYTT	47.0
UBC879	CTTCACTTCACTTCA	40.1

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system

试剂 Reagent	体系 System
Premix Taq	12.5 μL
ddH ₂ O	10.5 μL
Primer	1 μL (10 pmol)
Template DNA	1 μL (50 ng $\cdot\text{L}^{-1}$)
Total	25 μL

绿色颗粒状(图 2,A)。当 2,4-D 浓度过低、过高或与不同浓度的 6-BA 组合时,对愈伤组织的诱导率没有促进作用,但产生的愈伤组织量少且多发干、发黄,不利于后续实验的进行。本实验结果表明(表 3),当单独添加 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 时诱导效果好,诱导率为 100%,愈伤组织整体呈现黄绿色颗粒状。

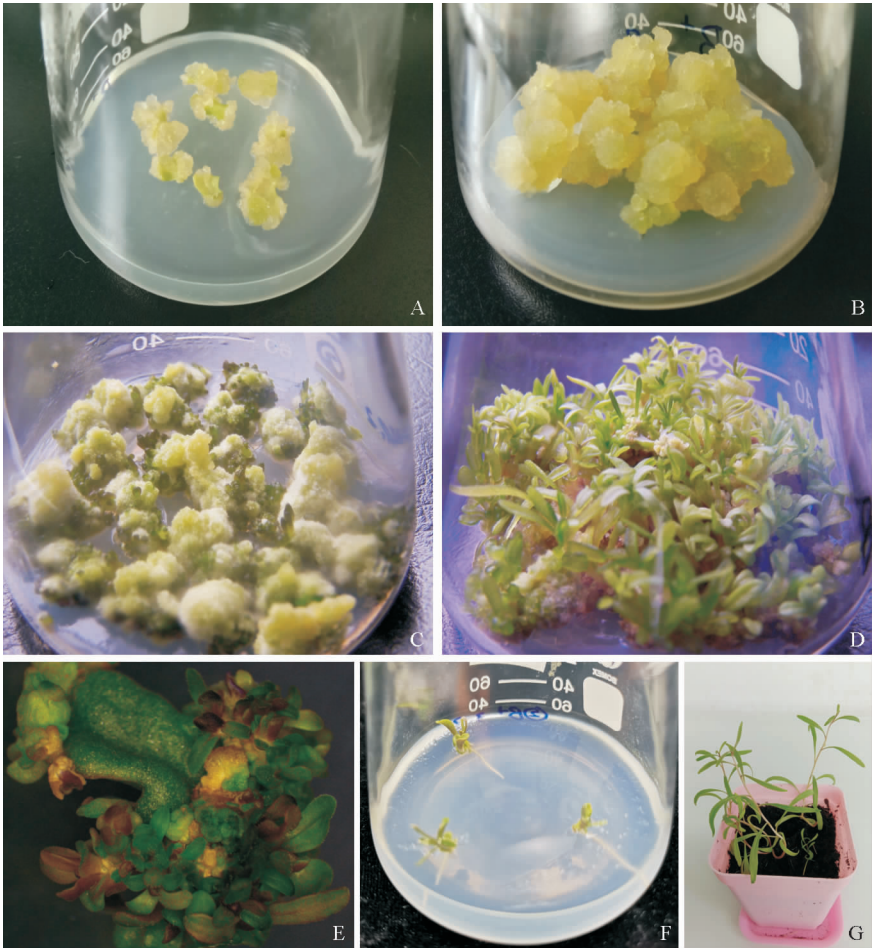


图 1 种子萌发的无菌幼苗

Fig. 1 Sterile seedlings obtained from seed germination

2.2.2 愈伤组织生长曲线的测定 转入继代培养基的愈伤组织生长趋势呈“S”型曲线(图 3),生长周期为 33 d,分成 4 个阶段:延迟期、快速生长期、缓慢生长期和静止期。处于快速生长期(12~21 d)的愈伤组织细胞分裂旺盛,颜色质地良好,呈绿色颗粒状(图 2,B),选择该时期的愈伤组织诱导分化,效果更好。

2.2.3 不同植物生长调节剂对黑果枸杞愈伤组织诱导不定芽的影响 单独添加 IBA 时不利于不定芽的诱导,而是诱导出许多毛状根;单独添加 6-BA 虽然能诱导出不定芽,但不定芽生长状态不好,出现严重玻璃化现象;当 6-BA 和 IBA 合理组合时,显示出好的生长状态(图 2,C、D)。综合比较,以添加 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 的培养基诱导效果最佳(表 4),每克愈伤组织上平均能长出 39.4



A. 由叶片外植体诱导的愈伤组织; B. 继代培养的愈伤组织; C. 愈伤组织诱导出的芽点; D. 愈伤组织诱导出的不定芽; E. 由叶片外植体直接形成的不定芽; F. 由叶片直接产生的不定芽诱导出生根; G. 移栽成活的黑果枸杞再生苗

图 2 黑果枸杞的组织培养与离体再生

A. Calli induced by leaf explants; B. Calli subcultured; C. Buds differentiated from calli; D. Adventitious buds differentiated from calli; E. Adventitious buds differentiated from leaves; F. Adventitious buds induce rooting; G. Regenerated seedlings

Fig. 2 Tissue culture and *in vitro* regeneration of *Lycium ruthenicum*

表 3 不同激素浓度对黑果枸杞愈伤组织诱导的影响

Table 3 Induction of calli from *L. ruthenicum* under different hormone concentrations

2, 4-D /(mg · L ⁻¹)	6-BA /(mg · L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	生长情况 The growth of plants
—	—	0e	外植体极少数有膨大现象 There are very few explants that have swelling
0.5	—	95.0±10.7abcd	愈伤组织量一般,黄色、质地干燥 Ordinary amount of callus, yellow, dry texture
0.5	0.5	97.5±4.6abc	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture
0.5	1	100a	愈伤组织量极少,黄色、质地干燥 Very small amount of callus, yellow, dry texture
1	—	98.8±3.5ab	愈伤组织量多,黄绿色颗粒状 Large amount of callus, yellow-green granular
1	0.5	100a	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture
1	1	87.5±18.3bcd	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture
1.5	—	100a	愈伤组织量多,黄绿色颗粒状 Large amount of callus, yellow-green granular
1.5	0.5	88.8±18.1cd	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture
1.5	1.0	87.5±20.5abc	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture
2	—	98.8±3.5ab	愈伤组织量一般,黄绿色颗粒状 Ordinary amount of callus, yellow-green granular
2	0.5	98.8±3.5ab	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture
2	1	81.3±19.6d	愈伤组织量少,黄色、质地干燥 Small amount of callus, yellow, dry texture

注:数值后不同字母表示有显著差异($P\leq 0.05$);下同
Note:Different letters after the value indicate significant differences ($P\leq 0.05$); the same as below

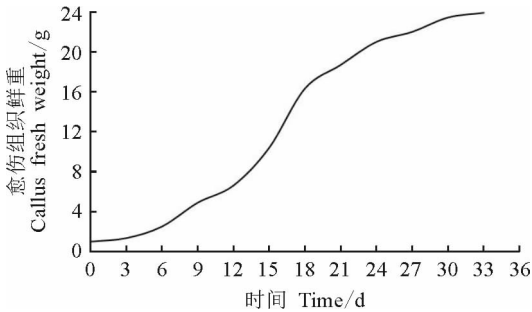


图 3 愈伤组织的生长曲线
Fig. 3 Growth curve of calli

个不定芽,且随着时间的延长,愈伤组织还在继续分化。分化出的不定芽呈现出紫色和绿色两种颜色,不同颜色芽的出现跟激素种类和浓度不呈现规律性变化。实验中发现降低培养箱中的空气湿度,可以明显降低不定芽的玻璃化现象。

2.2.4 不同植物生长调节剂对黑果枸杞叶片直接诱导不定芽的影响 6-BA 与 NAA 的合理组合能有效诱导黑果枸杞叶片直接分化,产生不定芽(图 2,E)。单纯添加不同浓度的 6-BA 可以诱导芽分化,但是不定芽数量少,且随着 6-BA 浓度的增加,不定芽的长势变差,畸形芽的数量变多。添加一定浓度的 NAA 能有效提高叶片的分化率、减少畸形芽的出现,但是当 NAA 的浓度升高时,分化不定芽的同时还会诱导出较多的愈伤组织,进而影响不定芽的生长。综合比较,当添加 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA+

0.3 mg · L⁻¹ NAA 时结果最佳,不定芽诱导率为 92.9%,每个叶片外植体上平均分化出 18.1 个不定芽(表 5)。

2.3 不定芽的生根培养及炼苗移栽

长势良好的不定芽转接至不添加任何激素的 MS 基本培养基中,10 d 左右基本都可以正常生根,有 1~2 条根,长 1 cm 左右(图 2,F)。图 2,F 中显示的为由叶片直接诱导出的不定芽的生根情况,由愈伤组织诱导出的不定芽生根情况与之无明显差异。炼苗 30 d 后观察到有 50% 的苗可正常生长(图 2,G)。

2.4 遗传稳定性分析

衡量再生体系的好坏,其诱导率是一方面,再生植株的遗传稳定性也是重要的一个方面。ISSR 分子标记法及流式细胞术检测植物倍性是检测植物遗传稳定性两种常用且有效的办法。

2.4.1 ISSR 法检测结果 真核生物基因组中普遍存在着由 1~4 个核苷酸组成的简单重复序列(SSR),ISSR 技术利用 SSR 序列设计引物,对两侧具有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增,然后进行电泳、染色,根据谱带的有无及相对位置,进行多态性分析,揭示遗传上的差异。

根据琼脂糖凝胶电泳结果进行数据统计,4 条引物共扩增出 41 条谱带,其中多态性谱带 26 条,部分扩增结果见图 4。经计算,8 株间接再生植株与对

表 4 不同激素浓度对黑果枸杞愈伤组织分化的影响

Table 4 Differentiation of calli from *L. ruthenicum* under different hormone concentrations

6-BA /(mg·L ⁻¹)	IBA /(mg·L ⁻¹)	不定芽数量 Number of adventitious buds formed per 1 g of callus	生长情况 The growth of plants
—	—	0d	无不定芽,有少数毛状根 No adventitious buds, but there are a few hairy roots
0.5	—	26.6±9.3bc	不定芽小且多,部分呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, partially purple
0.5	0.1	21.4±8.8c	不定芽较少,多数呈紫色 Less adventitious buds, mostly purple
0.5	0.2	27.0±5.7bc	不定芽长势较好,多数呈紫色 Adventitious buds grow better, mostly purple
1	—	34.1±12.4ab	不定芽小且多,少数呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, a few are purple
1	0.1	31.3±5.0ab	不定芽小且多,少数呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, a few are purple
1	0.2	21.7±6.6c	不定芽较少,多数呈紫色 Less adventitious buds, mostly purple
1.5	—	33.9±10.0ab	不定芽小且多,部分呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, partially purple
1.5	0.1	39.4±8.8a	不定芽小且多,部分呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, partially purple
1.5	0.2	36.0±5.4a	不定芽小且多,多数呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, partially purple
2	—	33.8±12.7ab	不定芽小且多,部分呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, partially purple
2	0.1	32.2±6.3ab	不定芽小而多,多数呈紫色 Adventitious buds are small and numerous, partially purple
2	0.2	19.7±4.8c	不定芽长势较好,呈紫色 Adventitious buds grow better, purple

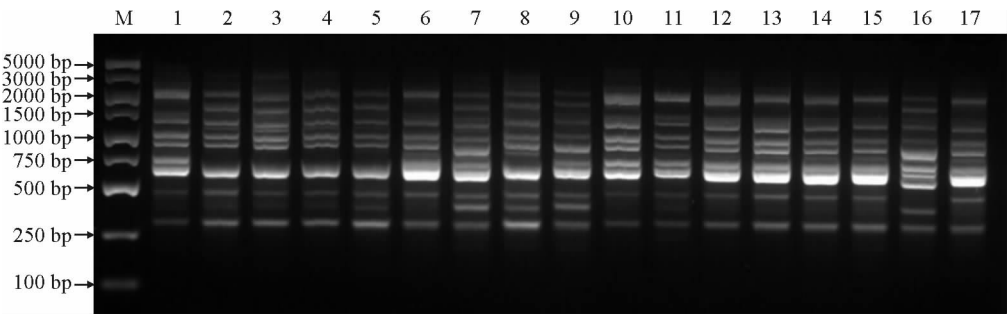
表 5 不同激素浓度对黑果枸杞不定芽诱导的影响

Table 5 Induction of adventitious buds from *L. ruthenicum* under different hormone concentrations

6-BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	不定芽诱导率 Adventitious bud induction rate/%	平均芽数 The average number of adventitious buds	生长情况 The growth of plants
—	—	0f	0d	外植体无明显变化 No significant changes in explants
0.5	—	97.1±4.9ab	7.2bc	不定芽长势良好 Adventitious buds grow well
0.5	0.3	92.9±18.9a	18.1a	不定芽长势良好 Adventitious buds grow well
0.5	0.6	98.6±3.8ab	17.5a	有少量愈伤组织出现,不定芽长势良好 A small amount of cal- lus appeared, and the adventitious buds grow well
1	—	77.1±25.0bc	8.2bc	不定芽长势不好,多畸形 Adventitious buds are not good, many deformities
1	0.3	72.9±43.5ab	17.0a	不定芽长势一般 Adventitious buds grow generally
1	0.6	51.4±35.3cd	7.9bc	有少量愈伤组织出现,不定芽长势一般 There is a small a- mount of callus, and the adventitious buds grow generally
1.5	—	40.0±20.0d	6.4bc	不定芽长势一般,多畸形 Adventitious buds grow generally, many deformities
1.5	0.3	88.6±26.1ab	19.9a	大部分不定芽小而密集,长势不好 Most of the adventitious buds are small and dense, and the growth is not good
1.5	0.6	57.1±38.6cd	11.9b	有少量愈伤组织出现,不定芽长势一般 There is a small a- mount of callus, and the adventitious buds grow generally
2	—	17.1±11.1e	3.2cd	不定芽长势不好,多畸形 Adventitious buds are not good, many deformities
2	0.3	51.4±35.8cd	9.5b	不定芽长势一般,多畸形 Adventitious buds grow generally, many deformities
2	0.6	0f	0d	有少量愈伤组织出现 A small amount of callus appeared

照植株之间的遗传相似系数在 0.83~0.87 之间,平均遗传相似系数为 0.84;8 株直接再生植株与对照植株之间的遗传相似系数在 0.82~0.97 之间,平均遗传相似系数为 0.91。2 种再生体系得到的再生植株均能较好地保持亲本的遗传性状,其中直接再生植株的遗传稳定性更高。

2.4.2 倍性检测结果 根据流式细胞仪检测原理,峰的平均荧光强度可以反映细胞核中 DNA 总量的



M. DL5000;1. 对照植株;2~9. 间接再生植株;10~17. 直接再生植株

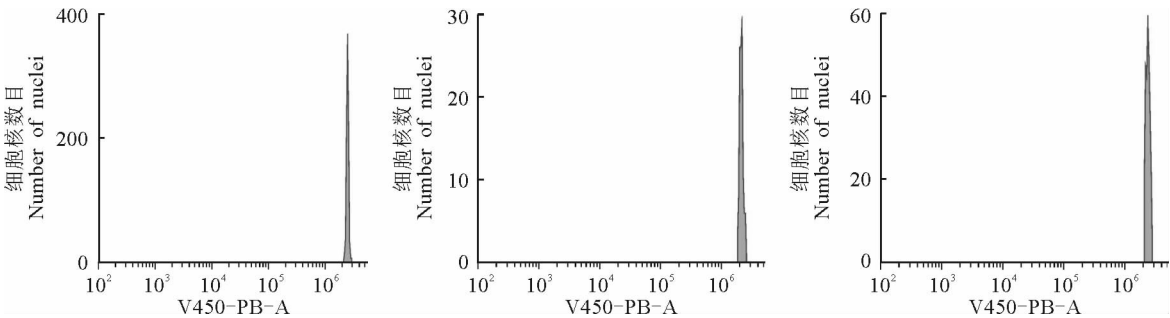
图 4 UBC 834 号引物在亲本苗和再生苗中扩增出的条带

M. DL5000; 1. Control plants; 2–9. Indirectly regenerated plants; 10–17. Directly regenerated plants

Fig. 4 ISSR products generated from mother plant and regenerated plantlets of *L. ruthenicum* using primer UBC 834

表 6 倍性检测结果
Table 6 Ploidy test result

样本 Sample	荧光均值 Average value of fluorescence channel	变异系数 Coefficient of variation/%	倍性 Ploidy
亲本苗 Parental plant	2 387 634.8	4.55	2C
直接再生苗 Direct regeneration plant	2 053 317.3	7.24	2C
间接再生苗 Indirect regenerated plant	2 239 772.5	7.54	2C



A. 亲本; B. 直接再生苗; C. 间接再生苗

图 5 倍性检测结果

A. Parental plant; B. Direct regeneration plant; C. Indirect regenerated plant

Fig. 5 Ploidy test result

变化。经待测样本与对照样本的平均荧光强度计算可知(表 6),2 种再生途径获得的植株均为二倍体,在倍性上没有发生改变(图 5)。

3 讨 论

以黑果枸杞叶片为外植体进行组织培养,多数报道都是通过间接器官发生途径来建立再生体系,再生周期通常在 3 个月以上^[9, 11]。本研究通过不同浓度 6-BA 和 NAA 的组合,完善并优化了黑果枸杞叶片的直接再生方法,减少了愈伤诱导步骤,将黑果枸杞的再生周期缩短到 2 个月左右,是一种更加快捷高效的再生体系。研究发现,单独添加 6-BA 即可诱导不定芽的形成,且随着 6-BA 浓度的升高,不

定芽的诱导率和平均芽数降低,不定芽的长势也越来越差。类似的结果也存在于刨花润楠^[16]和海伦兜兰^[17]不定芽的诱导中。在含有 6-BA 的培养基中添加一定量的 NAA 可以显著提高黑果枸杞叶片产生的不定芽数,这一现象与 Prakash 等^[18]在研究 *Searsia dentata* 的再生时得出的结果相吻合。NAA 与 6-BA 的组合有利于芽形态的建成,可促进芽的生长^[17]。曹君迈等^[19]研究说明 6-BA 和 2,4-D 的组合不利于枸杞叶片直接分化,诱导叶片分化的最好条件是单独添加 0.1 mg · L⁻¹ NAA,其再生植株诱导率为 33.3%,这个诱导率低于本研究结果。分析认为,可能是他们对不同浓度 NAA 与其他激素的组合没有进行梯度处理选出最佳条件;二是作

者实验地点在青海地区,气压低、氧气含量低的环境条件有利于植物分化诱导研究,He 等^[13]在对 *Anisodus tanguticus* 的研究中也提到过这一点;另外还可能与外植体的幼嫩程度、培养条件等因素有关。

在进行枸杞愈伤组织诱导时,Hu 等^[7]使用的是 2,4-D,陈海军等^[10]、孙晓红等^[9]、乔永旭^[8]、裴小鹏等^[11]、王聪慧等^[12]使用 6-BA 和其他植物生长调节剂的组合。本研究使用的是 6-BA 和 2,4-D 这两种激素不同浓度的组合,结果表明,6-BA 的使用对愈伤组织的诱导没有帮助,反而不利于愈伤组织的生长,这与前人的研究结果相悖,原因可能是诱导愈伤组织的过程中内源激素和外源激素需要达成一种动态平衡,不同基因型的枸杞内源激素表达量不同,导致在诱导时需要添加的外源激素种类和浓度也有所不同。2,4-D 的添加量过高和过低都不利于愈伤组织的生长,赵杨阳等^[20]在诱导家独行菜(*Lepidium sativum* L.)的时候也发现了类似现象,浓度适宜时才能诱导优质的愈伤组织。多数研究者进行再分化的时候通常选择长势旺盛的愈伤组织,但没有给出具体继代时间^[9]。本研究测定了黑果枸杞愈伤组织的生长曲线,能更好地了解愈伤组织的生长趋势,在最合适的时间选择愈伤组织进行分化处理。

体细胞无性系变异是组织培养中一种常见的现象^[21]。用于检测遗传稳定性的分子标记有多种,ISSR 因其快速高效、模板用量少、耗资少被广泛使用^[22]。Marimuthu 等^[23]用 ISSR 法对 16 份香蕉进行了分类,结果显示扩增的条带具有足够的多态性

和可重复性,说明 ISSR 是一种检测遗传多样性可靠有效的手段。He 等^[13]对 *Anisodus tanguticus* 的再生苗进行 ISSR 鉴定时发现其再生苗具有高的遗传稳定性;吕秀立等^[21]在对岩白菜属的 3 种不同植物后代进行遗传稳定性分析时发现,秦岭岩白菜再生苗的稳定性较其他两种高;Thorat 等^[24]提出在对 *Saccharum officinarum* 进行间接器官诱导的过程中出现了体细胞克隆变异。这都表明再生植株的稳定性与植物基因型、再生方式不同等因素有关。Raimondi 等^[25]也提出继代培养次数、培养条件、基因型等均对遗传稳定性有影响。近几年,流式细胞术的快速发展给鉴定遗传稳定性提供了新方法。利用流式细胞仪对亲本和再生植株做倍性鉴定成为继核型分析、分子标记和同工酶法之后较为可靠快速的分析手段。尹明华等^[26]在做山药遗传稳定性检测时就使用了分子标记法和流式细胞术。罗青等^[27]在宁夏枸杞花药培养时,对获得的再生植株进行染色体压片和流式细胞术倍性检测结果一致,为单倍体,染色体数目及倍性是母本的一半。本研究中,两种途径获得的再生苗在倍性上与亲本无差别,均为二倍体,但在 DNA 总量上跟亲本略有不同,这可能是造成再生苗与亲本苗在 ISSR 法鉴定时有部分条带增减的原因之一。直接再生苗的遗传相似系数高于间接再生苗,且直接再生的不定芽比间接再生的不定芽长势好、生根快,是一种更加快速高效的繁殖方法。

参考文献:

[1] 袁海静,安巍,李立会,等. 中国枸杞种质资源主要形态学性状调查与聚类分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, **14**(4): 627-633.
YUAN H J, AN W, LI L H, *et al.* The investigation and cluster analysis of main morphological characters for germplasm of Chinese wolfberry[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, **14**(4): 627-633.

[2] 董静洲,杨俊军,王琰. 我国枸杞属物种资源及国内外研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, **33**(18): 2 020-2 027.
DONG J Z, YANG J J, WANG Y. Resources of *Lycium* species and related research progress[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, **33**(18): 2 020-2 027.

[3] 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.

[4] 郝媛媛, 颜耀文, 张文培, 等. 荒漠黑果枸杞研究进展[J]. 草业科学, 2016, **33**(9): 1 835-1 845.
HAO Y Y, XIE Y W, ZHANG W P, *et al.* The research progress on desert *Lycium ruthenicum* [J]. *Pratacultural Science*, 2016, **33**(9): 1 835-1 845.

[5] 陈维伦, 郭东红. 枸杞叶片愈伤组织的诱导及植株的再生[J]. 植物生理学通讯, 1980, **16**(6): 40-41.
CHEN W L, GUO D H. Callus induction and plant regeneration of *Lycium* leaves[J]. *Plant Physiology Communications*, 1980, **16**(6): 40-41.

[6] 牛德水, 邵启全, 王莉, 等. 枸杞下胚轴、茎端和幼嫩子房的愈伤组织诱导及其植株再生[J]. 遗传, 1983, **5**(6): 24-26.
NIU D S, SHAO Q Q, WANG L, *et al.* Plant regeneration from calli of hypocotyl, shoot and young ovary of *Lycium barbarum* L[J]. *Hereditas*, 1983, **5**(6): 24-26.

[7] HU Z, HU Y, GAO H H, *et al.* Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum*

- root explants[J]. *Biologia Plantarum*, 2008, **52**(1): 93-96.
- [8] 乔永旭. 黑果枸杞高频再生体系的建立[J]. 中药材, 2015, **38**(10): 2 031-2 034.
- QIAO Y X. Highly frequent regeneration system establishment of *Lycium ruthenicum*[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2015, **38**(10): 2 031-2 034.
- [9] 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.
- SUN X H, WEI S L, SONG Q, *et al.* Leaf differentiation and rapid propagation of *Lycium ruthenicum*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, **52**(5): 653-658.
- [10] 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, **39**(4): 14-23.
- CHEN H J, LIU J W, LI J, *et al.* Ue culture and establishment of high efficient regeneration system of wild *Lycium ruthenicum*[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University* (Natural Science Edition), 2018, **39**(4): 14-23.
- [11] 裴小鹏, 金 芳, 李文娟, 等. 三种黑果枸杞组织培养技术初探[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, **53**(2): 64-68.
- PEI X P, JIN F, LI W J, *et al.* Tissue culture technique on black wolfberry[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2018, **53**(2): 64-68.
- [12] 王聪慧, 王铁军, 高 芳, 等. 黑果枸杞离体快繁技术研究[J]. 森林工程, 2019, **35**(2): 32-36.
- WANG C H, WANG T J, GAO F, *et al.* Micropropagation of *Lycium ruthenicum* murr[J]. *Forest Engineering*, 2019, **35**(2): 32-36.
- [13] HE T, WANG H T, YANG L N, *et al.* Micropropagation of *Anisodus tanguticus* and assessment of genetic stability of regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, **5**(25): 5 993-5 998.
- [14] 何丽君, 陈海军, 单玉梅, 等. 野生黑果枸杞染色体核型分析[J]. 分子植物育种, 2018, **16**(18): 6 055-6 060.
- HE L J, CHEN H J, SHAN Y M, *et al.* Karyotype analysis of wild *Lycium ruthenicum* murr[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, **16**(18): 6 055-6 060.
- [15] 孔令月, 李冬梅, 刘雅莉. 6种葡萄风信子倍性鉴定[J]. 西北林学院学报, 2018, **33**(2): 100-103.
- KONG L Y, LI D M, LIU Y L. Ploidy identification of six grape hyacinths[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, **33**(2): 100-103.
- [16] 陈怡佳, 鲁好君, 赵 帅, 等. 刨花润楠组织培养技术的初步研究[J]. 植物生理学报, 2016, **52**(10): 1 519-1 526.
- CHEN Y J, LU H J, ZHAO S, *et al.* Primary study of tissue culture of *Machilus pauhoi*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, **52**(10): 1 519-1 526.
- [17] 胡琦敏, 李勇毅, 黄云峰, 等. 海伦兜兰的无菌播种与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2016, **52**(9): 1 443-1 448.
- HU Q M, LI Y Y, HUANG Y F, *et al.* Aseptic seeding and rapid propagation of *Paphiopedilum helenae* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, **52**(9): 1 443-1 448.
- [18] PRAKASH S, STADEN VAN. Micropropagation of *Searsia dentata*[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2008, **44**(4): 338-341.
- [19] 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.
- CAO J M, MA H J, TAN Y P. Regeneration pathways of *Lycium ruthenicum* Murr in vitro[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2018, **36**(5): 54-58.
- [20] 赵杨阳, 刘佳钰, 马 征, 等. 家独行菜的组织培养与高频再生[J]. 植物生理学报, 2017, **53**(2): 234-240.
- ZHAO Y Y, LIU J Y, MA Z, *et al.* Tissue culture and high-frequency regeneration of *Lepidium sativum*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, **53**(2): 234-240.
- [21] 吕秀立, 张 群, 陈香波, 等. 岩白菜属植物规模化繁殖及遗传稳定性[J]. 植物学报, 2018, **53**(5): 643-652.
- LÜ X L, ZHANG Q, CHEN X B, *et al.* Mass propagation and genetic stability of *Bergenia* species[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, **53**(5): 643-652.
- [22] RECHE J, GARCÍA-MARTÍNEZ S, CARBONELL P, *et al.* Relationships between physico-chemical and functional parameters and genetic analysis with ISSR markers in Spanish jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, **253**: 390-398.
- [23] MARIMUTHU S S, SUBBARAYA U, DURAIRAJAN S G, *et al.* Comparison of two different electrophoretic methods in studying the genetic diversity among plantains (*Musa* spp.) using ISSR markers[J]. *Electrophoresis*, 2019, **40**(9): 1 265-1 272.
- [24] THORAT A S, SONONE N A, CHOUDHARI V V, *et al.* Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers[J]. *3 Biotech*, 2017, **7**: 16.
- [25] RAIMONDI J P, MASUELLI R W, CAMADRO E L. Assessment of somaclonal variation in *Asparagus* by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses[J]. *Scientia Horticulturae*, 2001, **90**(1-2): 19-29.
- [26] 尹明华, 徐志坚, 章彦琴, 等. 江西山药茎尖包埋玻璃化法超低温保存及其遗传稳定性检测[J]. 浙江农业学报, 2016, **28**(6): 984-991.
- YIN M H, XU Z J, ZHANG S Q, *et al.* Cryopreservation of Jiangxi yam shoot-tip by encapsulation-vitrification and its detection of genetic stability[J]. *Acta Agriculturae Zhejianensis*, 2016, **28**(6): 984-991.
- [27] 罗 青, 张 波, 李彦龙, 等. 枸杞花药离体培养获得单倍体植株[J]. 宁夏农林科技, 2016, **57**(6): 17-19, 63.
- LUO Q, ZHANG B, LI Y L, *et al.* Wolfberry anther culture to obtain haploid plants[J]. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2016, **57**(6): 17-19, 63.