

黑果枸杞的叶片分化与快速繁殖

孙晓红^{1,2,*}, 位书磊^{1,*}, 宋强¹, 张玉刚², 戴洪义^{2,**}

青岛农业大学¹生命科学学院, 山东省植物生物技术重点实验室, ²园艺学院, 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 以黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)成熟叶片为外植体, 诱导愈伤组织及不定芽的分化, 获得再生植株, 建立了黑果枸杞组织培养和快速繁殖技术新体系。结果表明: 诱导叶片脱分化形成愈伤组织的适宜培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, 诱导率100%; 诱导愈伤组织分化和生长的适宜培养基为MS+ZT 1.4 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹, 平均丛生芽数为23.7株; 诱导生根的适宜培养基为MS+IBA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹, 生根率100%; 将生长良好的组培苗移栽并覆盖保湿膜一周, 成活率达92.5%。试验成功建立了黑果枸杞快速繁殖体系。

关键词: 黑果枸杞; 叶片分化; 组织培养; 植株再生

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)是茄科(Solanaceae)枸杞属多年生多棘刺灌木, 常以灌丛状生长在海拔400~3 000 m的盐碱荒地、盐化沙地等各种盐渍化土壤或荒漠环境, 具有防风固沙作用, 是我国荒漠地区特有的野生植物(矫晓丽等2011)。其果实富含蛋白质、枸杞多糖、氨基酸、维生素、矿物质、微量元素等多种营养成分, 其药用和保健价值远远高于普通红枸杞, 还富含特有的原花青素和花青素, 是天然的抗氧化剂, 具有延缓衰老的作用(田磊等2015)。然而近年来, 由于自然环境恶化和人为采伐对植株的破坏, 使得其野生居群数量和规模大面积减少(汪智军等2013), 严重影响黑果枸杞产量(阿力同·其米克等2014), 因此对黑果枸杞的大量繁育工作就更加迫切。目前黑果枸杞的育苗主要是以嫩枝扦插为主(刘克彪等2014), 辅助以无菌黑果枸杞幼苗的子叶、下胚轴和胚根为外植体(乔永旭2015), 幼嫩茎段为外植体(陈晓丹等2015; 浩仁塔本等2005)的再生快繁手段。本研究以室外成熟黑果枸杞叶片为外植体, 进而对不定芽的诱导、增殖、生根及幼苗移栽进行研究, 以期建立野生黑果枸杞叶片的组织培养和快速繁殖技术, 为黑果枸杞的遗传转化、大面积栽培、开发利用及保护提供技术支持。

材料与amp;方法

1 实验材料

以黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)成熟的叶片为试材, 实验材料来源于青岛农业大学果树育种实验室人工栽培的来自青海的野生黑果枸杞种子萌发成长一年的植株。

2 方法

2.1 外植体消毒

剪取黑果枸杞成熟健康叶片, 用1%吐温(或洗衣粉)水浸泡15 min, 自来水冲洗20 min。在超净工作台上, 用75%的酒精浸泡消毒30 s, 无菌水冲洗1次, 再用0.1%氯化汞(HgCl₂)溶液浸泡消毒6~8 min, 期间不断晃动, 使外植体各面均接触到消毒液, 无菌水清洗5次, 获得无菌外植体材料。

2.2 培养基

以MS为基本培养基, 根据实验目的添加不同浓度的6-BA (苄基腺嘌呤)、ZT (玉米素)、NAA (萘乙酸)和IBA (吲哚丁酸), 添加蔗糖30 g·L⁻¹, 琼脂8 g·L⁻¹。调培养基pH值均为5.8, 121°C高压蒸汽灭菌25 min, 分装。

2.3 培养条件

培养温度25°C±1°C, 光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间12 h·d⁻¹。

2.4 初代培养(愈伤组织诱导培养)

将消毒好的叶片, 切成1 cm左右片段(一片叶约分为3段), 叶面朝上, 分别接种于含不同浓度6-BA (0.8、1.0、1.2 mg·L⁻¹)和NAA (0.15、0.20、0.25 mg·L⁻¹)的愈伤组织培养基上, 每个培养皿接种12片小叶段, 每组培养基接种3个培养皿。光照培养, 研究不同培养基对黑果枸杞愈伤组织诱导的影响, 计算诱导率和愈伤组织增殖倍数。

收稿 2016-04-08 修定 2016-05-03

资助 山东省良种产业化工程项目、“十二五”农村领域国家科技计划项目(2013BAD02B01)和青岛农业大学大学生科技创新项目。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: hydai@qau.edu.cn)。

2.5 增殖培养(不定芽分化培养)

取长势旺盛的愈伤组织, 分割成生长状况和大小(约1 cm³)基本一致的愈伤组织团块, 分别接种于含不同浓度ZT (0.6、1.0、1.4 mg·L⁻¹)和NAA (0、0.02 mg·L⁻¹)的增殖培养基上, 每瓶接种3块愈伤组织团块, 每组重复6次。光照培养, 定期观察记录生长情况, 统计不同培养基对黑果枸杞愈伤组织分化不定芽的影响, 计算芽苗的高度和平均芽数。

2.6 生根培养

剪取株高3 cm以上, 带有10片左右叶片的枸杞增殖苗, 分别接种于含不同浓度IBA (0.6、0.8、1.0 mg·L⁻¹)和NAA (0.2、0.4 mg·L⁻¹)的生根培养基中, 每瓶接种3棵无根幼苗, 每组重复6次, 研究不同培养基对黑果枸杞生根诱导的影响, 15 d后记录生根率、平均根数、平均根长, 观察根系及小芽生长情况。

2.7 生根苗移栽

生根培养30 d左右, 选择根系发育良好, 株高8~10 cm, 根系长度约3 cm及以上的枸杞无菌苗, 把根部沾附的培养基轻轻捏碎, 在水中清洗干净, 在此过程中避免伤及根部或造成根部断裂、脱落, 将根系完整的幼苗移栽入灭菌的营养土中。不同移栽方式如下: (1)直接移苗。移苗后, 室内无直射

光照培养7 d, 转入正常光照生长; (2)炼苗后移苗。实验室自然光照, 室温通风条件下, 炼苗7 d, 移栽, 正常光照生长; (3)移苗覆膜。无需炼苗, 移苗后覆盖保湿膜7 d, 正常光照生长。35 d后统计成活率。

3 数据处理

数据采用Excel 2007以及DPS 9.5进行统计分析, 用平均值±标准误表示。

实验结果

1 黑果枸杞叶片愈伤组织诱导

将消毒后的外植体接种到诱导愈伤组织的培养基上(图1-A), 培养6~9 d后, 外植体切口处逐渐拱起, 膨大呈瘤状, 出现白色愈伤组织, 愈伤组织呈松散颗粒状; 2周左右开始增殖, 颜色由浅变深, 逐渐变成深绿色, 3周左右, 愈伤组织增值速度达到峰值, 同时, 愈伤组织开始分化; 4周后愈伤组织表面可见绿色不定芽点(图1-B)。表1为培养20 d的统计结果, 可以看出, 不同植物生长调节剂对诱导黑果枸杞愈伤组织生长的影响较大, 差异达到显著水平。在细胞分裂素6-BA浓度一定的情况下, 随着NAA浓度的升高, 愈伤组织的增值倍数相应增高; 在NAA浓度固定的情况下, 随6-BA浓度的增高, 愈伤组织诱导率和分化率均增高, 但愈伤组织玻璃化现象严重, 有效不定芽数减少。

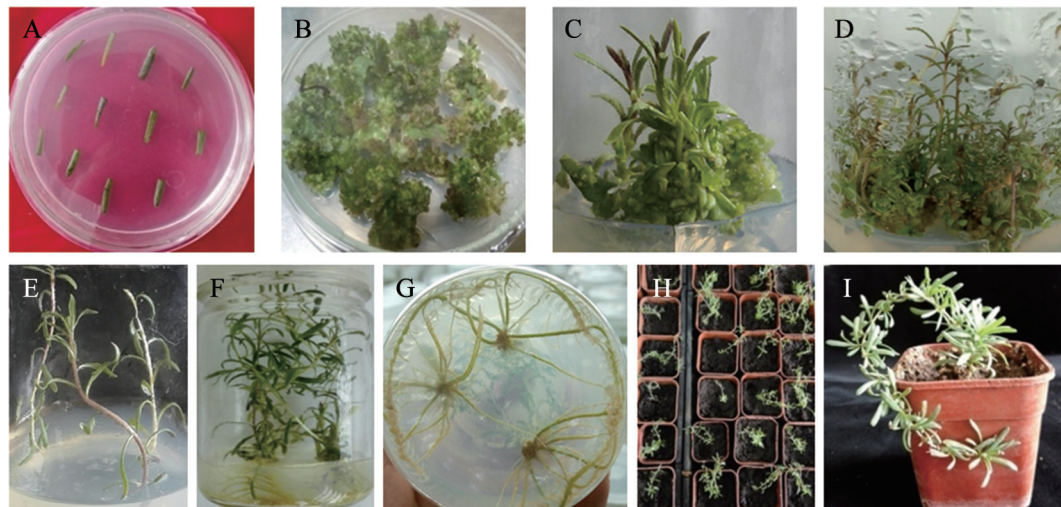


图1 黑果枸杞的丛生芽诱导和植株再生

Fig.1 Buds induction and plant regeneration of *L. ruthenicum*

A: 接种外植体; B: 外植体诱导20 d产生的愈伤组织; C: 分化丛生芽; D: 丛生芽生长20 d; E: 生根培养; F: 植株生长良好, 粗壮; G: 根生长情况; H: 移栽的穴盘苗; I: 移栽2个月后的壮苗。

表1 不同植物生长调节剂对黑果枸杞愈伤组织诱导生长的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulator combinations on callus induction of *L. ruthenicum*

植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		愈伤组织诱导率/%	愈伤组织增殖倍数	愈伤组织生长情况
6-BA	NAA			
0.8	0.15	83	2.01±0.22 ^d	长势慢, 淡黄色愈伤组织, 疏松
0.8	0.20	88	4.10±0.14 ^c	淡黄色愈伤组织, 有白色小泡, 较致密
0.8	0.25	91	3.99±0.18 ^c	淡黄色, 有白色小泡, 较致密
1.0	0.15	94	4.95±0.20 ^c	长势稍快, 淡绿色, 致密团
1.0	0.20	100	9.01±0.57 ^a	长势快, 绿色愈伤组织, 致密团块
1.0	0.25	100	8.03±0.65 ^a	长势快, 绿色愈伤组织, 结构致密
1.2	0.15	100	6.20±0.43 ^b	黄色愈伤组织, 致密团块, 个别玻璃化
1.2	0.20	97	7.92±0.41 ^a	长势较快, 黄绿色愈伤组织, 有玻璃化
1.2	0.25	100	8.09±0.51 ^a	长势快, 愈伤绿色组织, 玻璃化严重

愈伤组织诱导率为诱导愈伤组织的外植体数/总外植体数×100%; 愈伤组织增殖倍数为愈伤组织体积与接种时叶片体积比值的平均数; 同列数字上标不同小写字母表示处理间的差异显著($P<0.05$), 下表同此。

综合结果, 培养基MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹愈伤组织的诱导率达100%, 愈伤组织生长快, 增值倍数为9.01, 愈伤组织绿色, 致密团状, 无玻璃化, 为本试验诱导枸杞愈伤组织生长的最适宜激素配比。

2 黑果枸杞不定芽分化培养

将黑果枸杞外植体诱导出的带不定芽点的愈伤组织, 培养15 d后统计和观察不定芽的增殖情况(表2、图1-C)。由表2可知, 培养基中单纯添加玉米素ZT, 随着ZT浓度的升高, 丛生芽的平均高度和数目均增加, 芽生长状态由弱到强, 但都有不同程度的玻璃化; 培养基中添加0.02 mg·L⁻¹的NAA后再添加ZT, 玻璃化程度大大减弱, 且随着ZT浓度的升高, 丛生芽的平均高度和数目都有增加, 且长势均匀, 叶片鲜绿。

综合平均芽苗高度及平均芽数目和丛生芽形

态, 可知培养基MS+ZT 1.4 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹最适合黑果枸杞的不定芽分化, 在此培养基下, 平均丛生芽数为23.7, 幼苗长势均匀, 最高可达4.5 cm, 且植株粗壮, 利于生根(图1-D)。

3 黑果枸杞生根培养

剪取株高3 cm以上带有10片左右叶片的枸杞单苗在生根培养基上培养(图1-E), 7 d开始诱导生根, 突出根生长点, 15 d后统计生根实验结果(表3)。培养基MS+IBA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹与其他培养基相比差异显著, 表现为生根速率快, 根系生长迅速, 且根长势均匀、数量多, 植株最高约5 cm, 健壮, 叶片肥厚, 深绿色。生长约30 d, 株高可达10 cm以上, 根系长满培养基(图1-F、G)。添加IBA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹和添加IBA 0.8 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹的培养基生根慢, 根丛生, 粗短, 个别不生根, 植株生长慢。MS+IBA 0.8 mg·L⁻¹+NAA 0.2

表2 不同植物生长调节剂对黑果枸杞分化培养的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulator combinations on adventitious shoot differentiation of *L. ruthenicum*

植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		平均株高/cm	芽玻璃化程度/%	平均丛生芽数/个	丛生芽生长状况
ZT	NAA				
0.6	0	<1.0	70	6.33±0.76 ^d	苗长势缓慢、叶片肥厚含水量大, 玻璃化严重
1.0	0	<1.0	55	10.83±2.09 ^{cd}	苗长势不均、矮细, 叶片粗短, 玻璃化严重
1.4	0	<2.0	35	15.33±1.23 ^{bc}	苗长势较均匀、叶片微卷曲, 部分玻璃化
0.6	0.02	1~2.5	10	13.10±1.45 ^{bc}	苗长势均匀、茎细弱、叶片少量玻璃化
1.0	0.02	1~3.5	0	16.83±1.27 ^b	苗长势较均匀、叶片细长伸展, 浅绿色
1.4	0.02	2~4.5	0	23.66±3.14 ^a	长势均匀茂盛、高壮, 叶鲜绿色, 最高可达4.5 cm

平均丛生芽数为所有愈伤组织块上分化的芽数之和与总接种的愈伤组织数比值。

表3 不同植物生长调节剂对黑枸杞生根的影响
Table 3 Effects of different plant growth regulator combinations on rooting of *L. ruthenicum*

植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		生根率/%	平均根数/条	根长/cm	根生长情况
IBA	NAA				
0.6	0.2	100	3.2±1.28 ^{bc}	0.5~1	生根慢, 根丛生, 整齐度稍差
0.8	0.2	100	4.3±1.86 ^b	0.5~1	生根较快, 粗壮, 部分基部有愈伤组织
1.0	0.2	83	2.3±1.14 ^c	≤0.5	生根慢, 几乎无侧根, 个别不生根, 植株低矮
0.6	0.4	100	6.1±1.44 ^a	0.5~1.5	生根快, 根系旺盛, 植株健壮
0.8	0.4	88	3.1±0.49 ^c	≤0.5	生根慢, 根短, 个别不生根
1.0	0.4	94	2.6±0.62 ^c	≤0.5	生根慢, 根细, 侧根少, 植株细弱

mg·L⁻¹培养基生根较快, 但部分基部有愈伤组织, 植株长势旺盛。IBA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹以及IBA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹的培养基生根缓慢, 侧根少或几乎无侧根, 个别不生根, 植株矮小, 生长缓慢。

综合根的数目、长度及苗的生长状况, 筛选出MS+IBA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹为适合黑果枸杞再生苗生根的培养基。

4 黑果枸杞无菌苗移栽

不同的移栽方式, 枸杞幼苗的成活率不同, 移栽35 d后统计的成活率见表4。幼苗移栽(图1-H)时, 不进行炼苗处理, 直接移苗, 且用保湿膜覆盖, 保持幼苗的湿度和温度, 可大大增加枸杞幼苗存活率, 达到92.5%。不经炼苗且不进行任何保湿措施, 成活率只有45%; 炼苗后移苗, 成活率85%。枸杞幼苗生长2个月可高达20 cm (图1-I)。

表4 不同移栽方法对枸杞幼苗存活率的影响
Table 4 Effects of different planting methods on survival rate of *L. ruthenicum*

移苗方式	移栽总株数/株	存活株数/株	存活率/%
直接移苗	40	18	45
炼苗后移苗	40	34	85
移苗覆膜	40	37	92.5

讨 论

黑果枸杞的外植体(叶片), 利用75%乙醇处理30 s, 0.1%氯化汞溶液处理7 min, 消毒效果良好, 基本无染菌现象。

黑果枸杞叶片愈伤组织诱导最适宜培养基是MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, 在此培养基中, 叶片易被诱导, 短时间内(7 d左右)开始生成愈

伤组织, 在切口处膨大成浅绿色瘤, 呈松散粒状, 随着培养时间的延长, 愈伤组织大量增值, 同时颜色转变为深绿色, 并开始分化出现绿色不定芽点。叶片的愈伤组织较茎尖基部有更强的分化能力(王芳等2004), 且随着细胞分裂素6-BA浓度升高愈伤组织诱导率升高(浩仁塔本等2005), 分化率升高。洪震等(2015)在研究秀丽野海棠叶片不定芽再生时也得出同样的结论。继续升高6-BA浓度, 玻璃化现象加重, 这与紫叶狼尾草(*Pennisetum setaceum* 'Rubrum')的研究结果一致(魏进莉等2015)。玻璃化的发生也与培养皿内湿度密切相关, 皿内湿度大, 在培养皿上盖凝结成小水滴, 也可能提高玻璃化的发生率(曹有龙等2008)。适量减少细胞分裂素, 降低培养基湿度, 可以减少愈伤组织玻璃化(杜国利等2006)。

在黑果枸杞不定芽分化培养中, 培养基MS+ZT 1.4 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹分化效果最好, 幼苗长势均匀, 最高可达4.5 cm, 且植株粗壮, 利于生根, 该培养基为本试验枸杞分化最佳配方。单纯的ZT, 不利于芽的分化, 芽生长缓慢, 叶片浅绿色, 易出现玻璃化现象。但随着ZT浓度增加, 小芽生长情况变好, 颜色变深, 茎粗壮, 有效芽增多, 高浓度ZT处理的小芽高度高于低浓度的, 具有显著性差异。朱春艳等(2006)研究云锦杜鹃(*Rhododendron fortunei*)对ZT的反应也出现类似现象。培养基中添加NAA明显提高了不定芽的分化率, 且叶片颜色深绿, 长势旺盛; 适当降低琼脂浓度至6.5 g·L⁻¹, 可以提高丛生芽的分化, 降低玻璃化程度(曹有龙等2008)。后续的试验可以继续提高ZT和NAA的浓度, 研究二者更合适的配比, 在提高分化率的基础上, 有效提高分化速度, 为黑果枸杞的遗传转化提供参考。

黑果枸杞分化芽在MS+IBA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹培养基上,生根率100%,生根速率快,根长势均匀,侧根多,为本试验枸杞生根培养最佳激素配比,这与郑国琴和柳金凤(2012)对宁夏枸杞叶片的研究和马彦军等(2015)对黑果枸杞茎段的研究稍有不同。IBA和NAA被广泛应用于组培苗的生根培养,尤其添加NAA能有效诱导生根(刘芳等2016),组培苗根数越多,根对养分的吸收面积越大,生根苗的长势越好,可提高移栽成活几率。

在移苗过程中,未经炼苗直接移栽,在室内无直射阳光处,生长良好,挪到阳光下,叶片大部分萎蔫,成活率只有45%;第二种移苗方式需要炼苗,在炼苗过程中,培养基容易受到外界环境污染,培养基中水分蒸发,根部培养基干燥,难以清洗干净,易引起移栽苗烂根死亡,影响苗子的成活率;第三种移苗方式,无需炼苗,直接移栽,用地膜覆盖保湿,随着时间的延长,逐步打开地膜,7 d后完全解膜,正常光照生长,成活率可达92.5%。基质的灭菌是十分必要的程序,试管苗从无菌环境转入有菌环境生长,如果没有灭菌的保护性措施就很难抵御外界杂菌的侵染,在移栽前必须做好基质的消毒工作。

参考文献

- Alitong Q, Jin XF, Ye ZM, Wang QF, Chen JM, Yang CF (2014). Reproductive ecology research on populations of a medicinal plant (*Lycium ruthenicum* Murr.) from Xinjiang reveals factors affecting fruit production. *Plant Sci J*, 32 (6): 570–576 (in Chinese with English abstract) [阿力同·其米克, 金晓芳, 叶忠铭, 王青锋, 陈进明, 杨春锋(2014). 新疆产药用植物黑果枸杞有性生殖产出差异的繁殖生态学研究. *植物科学学报*, 32 (6): 570–576]
- Cao YL, Luo Q, Zhang XY, Li XY (2008). Effects of different culture conditions on vitrification of *Lycium barbarum* L. plantlets in tissue culture. *Agric Sci Technol*, 9 (2): 30–32 (in Chinese with English abstract) [曹有龙, 罗青, 张曦燕, 李晓莺(2008). 不同培养条件对枸杞组培苗玻璃化的影响. *农业科学与技术*, 9 (2): 30–32]
- Chen XD, Li AM, Zhang ZH, Zhang Y (2015). The establishment of rapid propagation system of *Lycium ruthenicum* Murr. *Spec Wild Eco Anim Plant Res*, (4): 14–17 (in Chinese with English abstract) [陈晓丹, 李爱民, 张正海, 张悦(2015). 苏枸杞快繁体系建立. *特产研究*, (4): 14–17]
- Du GL, Song CZ, Zhang GL (2006). Studies on regeneration and propagation of *Lycium barbarum* L. *Lett Biotechnol*, 17 (3): 384–388 (in Chinese with English abstract) [杜国利, 宋长征, 张更林(2006). 枸杞的组织培养及植株再生的条件优化. *生物技术通讯*, 17 (3): 384–388]
- Haoren TB, Zhao Y, Guo YS, Liu PS (2005). Tissue culture of *Lycium ruthenicum* Murr. *Plant Physiol Commun*, 41 (5): 631–632 (in Chinese) [浩仁塔本, 赵颖, 郭永盛, 刘平生(2005). 黑果枸杞的组织培养. *植物生理学通讯*, 41 (5): 631–632]
- Hong Z, Zhu LJ, Fu XQ, Fan WF, Xia GH (2015). Establishment of high frequency shoot regeneration system from leaf of *Bredia amoena*. *Plant Physiol J*, 51 (2): 241–245 (in Chinese with English abstract) [洪震, 朱乐杰, 傅晓强, 范文峰, 夏国华(2015). 秀丽野海棠叶片不定芽高频再生体系的建立. *植物生理学报*, 51 (2): 241–245]
- Jiao XL, Chi XF, Dong Q, Xiao YC, Hu FZ (2011). Analysis of the nutritional components of *Lycium ruthenicum*. *Amino Acids Biotic Resour*, 33 (3): 60–62 (in Chinese with English abstract) [矫晓丽, 迟晓峰, 董琦, 肖远灿, 胡凤祖(2011). 柴达木野生黑果枸杞营养成分分析. *氨基酸和生物资源*, 33 (3): 60–62]
- Liu F, Tang YH, Yuan YM, Guo QQ, Shen F, Chen JR (2016). Tissue culture of the succulent plant *Sedum clavatum*. *Chin Bull Bot*, 51 (2): 251–256 (in Chinese with English abstract) [刘芳, 唐映红, 袁有美, 郭清泉, 沈帆, 陈建荣(2016). 多肉植物劳尔的组织培养. *植物学报*, 51 (2): 251–256]
- Liu KB, Li AD, Li FM (2014). Effects of four kinds of growth regulators on softwood cuttings seedling in *Lycium ruthenicum*. *Nonwood Forest Res*, 32 (3): 99–103 (in Chinese with English abstract) [刘克彪, 李爱德, 李发明(2014). 四种生长调节剂对黑果枸杞嫩枝扦插成苗的影响. *经济林研究*, 32 (3): 99–103]
- Ma YJ, Cheng YQ, Zhang RM (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Lycium ruthenicum* Murr. *Forest Sci Technol*, (6): 26–28 (in Chinese with English abstract) [马彦军, 程艳青, 张荣梅(2015). 黑果枸杞组织培养快繁技术研究. *林业科技通讯*, (6): 26–28]
- Qiao YX (2015). Highly frequent regeneration system establishment of *Lycium ruthenicum*. *J Chin Med Mate*, 38 (10): 2031–2034 (in Chinese with English abstract) [乔永旭(2015). 黑果枸杞高频再生体系的建立. *中药材*, 38 (10): 2031–2034]
- Tian L, Jiang BP, Fan XF (2015). Study on anti-aging effect of *Lycium ruthenicum* Murr. *Prac Pharm Clin Remedies*, 18 (10): 1147–1150 (in Chinese with English abstract) [田磊, 蒋宝平, 樊晓峰(2015). 黑果枸杞抗衰老作用研究. *实用药物与临床*, 18 (10): 1147–1150]
- Wang F, Ding XY, Tian YX, Wen F, Wu B (2004). The callus differentiation and plant regeneration of *Lycium barbarum*. *J Xinjiang Agric Univ*, 27 (4): 19–22 (in Chinese with English abstract) [王芳, 丁燕红, 田玉秀, 文峰, 武斌(2004). 新疆野生枸杞愈伤组织分化及植株再生. *新疆农业大学学报*, 27 (4): 19–22]
- Wang ZJ, Jin KY, Gu LS (2013). Resource investigation and conservation measures of *Lycium* L. in Xinjiang. *Northern Hortic*, (3): 169–171 (in Chinese with English abstract) [汪智军, 靳开颜, 古丽森(2013). 新疆枸杞属植物资源调查及其保育措施. *北方园艺*, (3): 169–171]
- Wei JL, Li LF, Yu XB (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Pennisetum setaceum* 'Rubrum'. *Plant Physiol J*, 51 (2): 207–211 (in Chinese with English abstract) [魏进莉, 李丽芳, 于学斌(2015). 紫叶狼尾草的组织培养与快速繁殖. *植物生理学*

报, 51 (2): 207–211]
Zhen GQ, Liu JF (2012). Study on rapid propagation by leaf tissue culture of the *Lycium barbarum* L. Northern Hortic, (1): 122–124 (in Chinese with English abstract) [郑国琴, 柳金凤(2012). 宁夏枸杞叶片组培快繁技术研究. 北方园艺, (1): 122–124]

Zhu CY, Li ZY, Bao CS, Gu HH, Zhu DH (2006). *In vitro* rapid micropropagation of *Rhododendron fortunei*. Chin Agric Sci Bull, 22 (5): 335–337 (in Chinese with English abstract) [朱春艳, 李志炎, 鲍淳松, 顾宏辉, 朱丹华(2006). 云锦杜鹃组培快繁技术研究. 中国农学通报, 22 (5): 335–337]

Leaf differentiation and rapid propagation of *Lycium ruthenicum*

SUN Xiao-Hong^{1,2,*}, WEI Shu-Lei^{1,*}, SONG Qiang¹, ZHANG Yu-Gang², DAI Hong-Yi^{2,**}

¹Key Laboratory of Plant Biotechnology of Shandong Province, College of Life Sciences, ²Qingdao Key Laboratory of Genetic development and breeding in Horticultural Plants, College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: In the paper, we studied *in vitro* culture of *Lycium ruthenicum* by using leaf explants, including callus induction, adventitious shoot differentiation and plantlet regeneration. The results indicated that MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹ was the suitable medium for callus induction, with an induction rate of 100%; MS+ZT 1.4 mg·L⁻¹+NAA 0.02 mg·L⁻¹ was the optimizing medium for multiple shoot clumps, the multiplication coefficient could reach up to 23.7; MS+IBA 0.6 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹ was the best medium for rooting, the rooting rate could reach to 100%. The strong rooting plantlets were transplanted into nutritive soil and covered the young plants with plastic farm film for a week, the survival rate were 92.5%. We have established a high-frequency regeneration system for *L. ruthenicum*.

Key words: *Lycium ruthenicum*; leaf differentiation; tissue culture; plantlet regeneration

Received 2016-04-08 Accepted 2016-05-03

This work was supported by the Seed Industrialization Project in Shandong Province, the “Twelfth Five-Year” Plan Project by National Science and Technology in Rural Areas (Grant No. 2013BAD02B01), and the Project of Scientific Innovation for University Students, Qingdao Agricultural University.

*Co-first author.

**Corresponding author (E-mail: hydai@qau.edu.cn).