

樟叶越桔的组织培养与快速繁殖

罗旭璐¹, 唐军荣², 李娜¹, 丁勇¹, 张德国¹, 马焕成², 赵平^{1,*}

西南林业大学¹西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室,²国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 昆明650224

摘要: 以野生樟叶越桔幼嫩带芽茎段为外植体, 通过对初代启动培养、增殖及生根培养方案的筛选, 建立了樟叶越桔的组织培养和快速繁殖体系。结果表明, 最适启动培养基为WPM+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, 外植体诱导萌发率达83.33%; 增殖培养基为WPM+ZT 2.0 mg·L⁻¹, 可获得较高的增殖倍率, 且暗培养7 d可达最佳增殖效果; 生根最适培养基为WPM+IBA 0.2 mg·L⁻¹, 生根率达86.67%。

关键词: 樟叶越桔; 茎段; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Vaccinium dunalianum*

LUO Xu-Lu¹, TANG Jun-Rong², LI Na¹, DING Yong¹, ZHANG De-Guo¹, MA Huan-Cheng², ZHAO Ping^{1,*}

¹Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, ²Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Taking the healthy tender stem segments of wild *Vaccinium dunalianum* as explants, the media for axillary bud induction, subculture and rooting culture were selected. The results showed that the optimal medium for initial culture with an induction rate of 83.33% was WPM+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, and the optimal medium for subculture was WPM+ZT 2.0 mg·L⁻¹ with darkness cultured for 7 d. The optimal rooting medium was WPM+IBA 0.2 mg·L⁻¹, with a rooting rate of 86.67%.

Key words: *Vaccinium dunalianum*; stem segment; tissue culture; rapid propagation

樟叶越桔为杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium*)常绿灌木(侯宽昭1998), 主产于云南、四川、贵州、西藏等地, 我国台湾以及锡金、不丹、印度(东北部)、缅甸(东北部)至越南亦有分布, 在云南省境内则主要分布于云南西北部经滇中高原至滇南和滇东南(吴征镒1984; 方瑞征1986)。其花冠为淡绿带紫红色或淡红色, 宽钟状, 浆果球形, 直径4~12 mm, 成熟时呈紫黑色, 被白粉, 花期4~5月, 果期9~12月。其果实营养丰富, 具有较高的药用和保健价值(罗旭璐等2014)。樟叶越桔的幼嫩叶芽因形似雀嘴呈锥状, 在云南彝族民间又称“雀嘴茶”, 据记载自明代开始就作为一种茶代用品长期饮用至今, 具有祛风除湿、舒筋活络等功效(杨芳等2011)。

樟叶越桔还是一种富含咖啡酰熊果苷类物质的特殊资源植物(Zhao等2008), 其主要成分的黑色素生成抑制活性优于熊果苷, 且毒性仅为熊果苷的1/2 (Xu等2014)。熊果苷是源于绿色植物的天然活性物质, 是当今流行的最为安全有效的美白原

料, 也是国际公认的21世纪的理想皮肤美白祛斑活性剂(Akiu等1991; Maeda和Fukuda 1996; Wei等2007)。由于熊果苷作为次生代谢产物通常以微量形式存在于植物体中, 且天然植物来源困难, 因此, 樟叶越桔有望作为熊果苷天然替代品资源加以应用, 具有重要的开发价值。

目前, 樟叶越桔仍处于野生状态, 其生长缓慢, 且分布量有限, 加之随着对雀嘴茶的关注度不断提高, 导致其连年遭受破坏性采摘, 野生樟叶越桔数量急剧减少。迄今为止, 国内外对越桔属多种植物的组织培养已有报道(Debnath和McRae 2001; Meiners等2007; 兰士波2010; 李铁军等2012; 朱宏芬等2012), 而有关樟叶越桔组织培养和快速繁殖的研究尚未见报道。为此, 本研究以樟叶越桔幼嫩茎段为外植体, 建立其组织培养和快速繁殖体

收稿 2014-09-15 修定 2014-10-23

资助 国家自然科学基金(21462040和31460076)。

* 通讯作者(E-mail: hypzhao@yahoo.com; Tel: 0871-63863022)。

系, 以为该植物的种质资源保护及进一步的综合开发利用提供基础。

材料与amp;方法

1 植物材料

供试樟叶越桔(*Vaccinium dunalianum* Wight)材料于2013年5月采自云南省楚雄彝族自治州武定县, 选取当年新生无病虫害、生长健壮的幼嫩茎段作为外植体。

2 培养方法

2.1 培养基及培养条件

以WPM为基本培养基, 添加蔗糖30 g·L⁻¹和琼脂5 g·L⁻¹, 调整pH值为4.8~5.2, 配制分装后于121 °C灭菌18 min。培养温度为(25±2) °C, 光照强度30~50 μmol·m⁻²·s⁻¹, 每天光照12 h。

2.2 外植体处理

剪除外植体上的叶片, 剪成4~6 cm长的茎段, 选用洗洁净水浸泡30~60 s (刘明群等2013), 流水冲洗1~2 h, 在75%的酒精中浸泡30 s, 然后采用0.1% HgCl₂和2% NaClO进一步消毒, 用无菌水冲洗4~5次。于消毒过的滤纸上将其切成带1~2个叶腋的茎段并吸干茎段上的水分, 然后叶腋朝上斜插于WPM+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹的培养基上。每个处理接种30瓶, 每瓶3个茎段。15 d后观察并统计各处理的死亡率、污染率及成活率, 从而筛选出外植体消毒的最佳方案。死亡率=(死亡的外植体数/接种的外植体总数)×100%; 污染率=(污染的外植体数/接种的外植体总数)×100%; 成活率=(成活的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

2.3 腋芽诱导的启动

将灭菌后的樟叶越桔带腋芽茎段分别接种于添加不同浓度6-BA和NAA的WPM培养基上, 30 d

后统计芽诱导率=(诱导出芽的外植体数/接种总外植体数)×100%。

2.4 继代与增殖

将茎段分别接种于WPM+0.5、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹玉米素(ZT)的腋芽增殖培养基上。每个处理接种30瓶, 每瓶1个茎段。培养30 d后统计平均芽数和增殖系数, 观察新芽的生长状况。接种在WPM+ZT 2.0 mg·L⁻¹培养基上的茎段分别经0、7、14 d暗培养处理, 再转移到光照条件下培养30 d后观察暗培养对增殖培养的影响。增殖系数=增殖后的芽苗数/接种的外植体总数。

2.5 生根

选择健壮的小苗, 切成5~8 cm的茎段, 转入添加不同浓度IBA的WPM培养基中进行生根培养。每个处理接种30瓶, 每瓶1个单株, 重复3次。30 d后统计生根数和生根率, 并观察试管苗的生长情况。生根率=(生根的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

实验结果

1 外植体的消毒处理

从表1中可以看出, HgCl₂的消毒效果好于NaClO, 随着HgCl₂消毒时间的延长, 污染率均降低, 但对外植体造成了伤害, 致使死亡率升高。所以最佳的消毒处理方案为75%酒精30 s+0.1% HgCl₂ 8 min, 成活率可达76.67%。

2 腋芽诱导的启动培养

不同浓度的6-BA及NAA组合对樟叶越桔腋芽诱导的影响见表2。当6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹时, 诱导率较低, 浓度为2.0~3.0 mg·L⁻¹较适宜, 芽苗生长健壮; NAA浓度的影响不明显, 浓度较高时容易产生愈伤组织, 所以使用0.2 mg·L⁻¹的浓度效果较好。最佳诱导培养基为WPM+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+

表1 不同消毒处理对樟叶越桔死亡率、污染率和成活率的影响

Table 1 Effects of different disinfection treatments on mortality rate, contamination rate and survival rate of *V. dunalianum*

消毒处理	接种数/个	死亡率/%	污染率/%	成活率/%
75%酒精30 s+0.1% HgCl ₂ 6 min	30	10.00	40.00	50.00
75%酒精30 s+0.1% HgCl ₂ 8 min	30	6.67	16.67	76.67
75%酒精30 s+0.1% HgCl ₂ 10 min	30	23.33	10.00	66.67
75%酒精30 s+2% NaClO 8 min	30	10.00	46.67	43.33
75%酒精30 s+2% NaClO 10 min	30	13.33	23.33	63.33
75%酒精30 s+2% NaClO 12 min	30	16.67	23.33	60.00

表2 不同浓度6-BA和NAA对腋芽诱导的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on axillary bud induction of *V. dunalianum*

处理编号	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	接种数/个	萌发数/个	诱导率/%
1	1.0	0.1	30	17	56.67
2	1.0	0.2	30	18	60.00
3	1.0	0.5	30	20	66.67
4	2.0	0.1	30	19	63.33
5	2.0	0.2	30	22	73.33
6	2.0	0.5	30	21	70.00
7	3.0	0.1	30	20	66.67
8	3.0	0.2	30	25	83.33
9	3.0	0.5	30	23	76.67

NAA 0.2 mg·L⁻¹, 诱导率为83.33%, 培养4周后生长良好(图1-A)。

3 继代与增殖培养

由表3可以看出, 不同的ZT浓度对樟叶越桔增殖培养的效果不同。当ZT浓度较低时, 效果不明显; 随着ZT浓度的增加, 组培苗茎的伸长生长明显增加, 浓度为 2.0 mg·L⁻¹时增殖倍数最高, 苗生长最粗壮(图1-B); 当ZT浓度为3.0 mg·L⁻¹时, 茎短, 较壮, 生长受到抑制。

将刚接种在WPM+ZT 2.0 mg·L⁻¹培养基上的樟叶越桔茎段进行7 d的暗培养, 能促进茎段的增殖, 但暗培养时间不宜太长, 否则会导致苗的玻璃化(表4)。

4 生根培养

由表5可见, 樟叶越桔组织培养苗在添加不同浓度IBA的培养基上均可生根, 其中, 在WPM+IBA 0.2 mg·L⁻¹培养基上培养30 d后, 生根率最高, 达到86.67%, 根多且粗壮, 植株生长健壮(图1-C)。

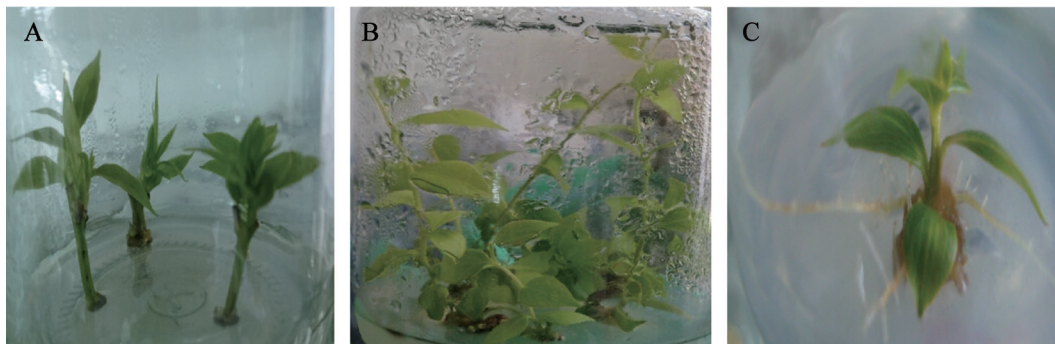


图1 樟叶越桔在不同培养基中的生长情况

Fig.1 Growth of *V. dunalianum* in different media

A: 诱导培养基(WPM+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹)培养4周; B: 增殖培养基(WPM+ZT 2.0 mg·L⁻¹)培养6周; C: 生根培养基(WPM+IBA 0.2 mg·L⁻¹)培养4周。

表3 不同ZT浓度对樟叶越桔继代培养的影响

Table 3 Effects of different concentrations of ZT on the subculture of *V. dunalianum*

继代培养基	接种数/个	平均芽数/个	增殖系数	苗的生长情况
WPM+ZT 0.5 mg·L ⁻¹	30	67	2.23	叶绿, 茎细长
WPM+ZT 1.0 mg·L ⁻¹	30	70	2.33	叶浓绿, 茎粗壮
WPM+ZT 2.0 mg·L ⁻¹	30	83	2.77	叶浓绿, 茎粗壮
WPM+ZT 3.0 mg·L ⁻¹	30	73	2.43	叶较绿, 茎短, 较壮

表4 暗培养对樟叶越桔增殖效果的影响

Table 4 Effects of darkness culture on propagation of *V. dunalianum*

暗培养时间/d	接种数/个	平均芽数/个	增殖倍数
0	30	79	2.63
7	30	83	2.77
14	30	76	2.53

表5 不同IBA浓度对樟叶越桔生根培养的影响

Table 5 Effects of different concentrations of IBA on rooting culture of *V. dunalianum*

生根培养基	接种数/个	生根数/个	生根率/%
WPM+IBA 0.1 mg·L ⁻¹	30	19	63.33
WPM+IBA 0.2 mg·L ⁻¹	30	26	86.67
WPM+IBA 0.5 mg·L ⁻¹	24	13	54.17

讨 论

植物组织培养的第一步是建立无菌材料(陈正华1986),消毒时间可依枝条采集时间及老嫩情况而定(刘明群等2013),一般宜控制在6~8 min。本试验选取当年生生长健壮的樟叶越桔幼嫩带芽茎段为外植体,筛选出最佳的消毒处理方案为75%酒精30 s+0.1% HgCl₂ 8 min,此时成活率最高。

Meiners等(2007)认为,Anderson、WPM和MS培养基均适合蓝莓组培,其中WPM的效果最好。樟叶越桔与蓝莓同为杜鹃花科越桔属植物,我们也将比较了MS、2/1MS、WPM等培养基,结果表明WPM对樟叶越桔最为适宜,所以本试验选用WPM为基本培养基。

在植物离体快速繁殖中,植物生长调节剂的种类和浓度以及培养基的组成都会影响组培苗的生长与分化(王明莹等2013)。本试验选用不同浓度的6-BA与NAA组合,结果表明,WPM+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹为最适外植体诱导培养基,诱导率达83.33%。但6-BA与NAA对樟叶越桔苗的增殖效果较差,生长缓慢,且容易诱导出愈伤组织。在培养基中添加1.0~2.0 mg·L⁻¹的ZT比较适合樟叶越桔的增殖培养,尤以WPM+ZT 2.0 mg·L⁻¹中的增殖倍数最高;这与李丽容等(2013)和陶俊锋等(2014)在蓝莓中的研究结果一致。另外,孙书伟(2009)在对蓝莓试管苗进行生根培养时发现,IBA诱导生根最为有效;我们也在生根培养基中添加

了不同浓度的IBA,结果表明WPM+0.2 mg·L⁻¹ IBA对诱导樟叶越桔组织培养苗的生根效果最好,生根率达86.67%。

参考文献

- 陈正华(1986). 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 24~74
- 方瑞征(1986). 中国越桔属的研究. 云南植物研究, 8 (3): 239~258
- 侯宽昭(1998). 中国种子植物科属词典. 北京: 科学出版社, 509~510
- 兰士波(2010). 天然笃斯越桔优异种质选择及组织培养技术. 经济林研究, 28 (2): 73~77
- 李丽容, 金开正, 赖联森(2013). 玉米素对蓝莓组培增殖生长的影响研究. 安徽农业科学, 41 (30): 11961~11962
- 李铁军, 朴炫春, 廉家盛, 廉美兰(2012). 利用生物反应器接触培养法增殖笃斯越桔丛生苗. 林业科学, 48 (11): 130~133
- 刘明群, 张凯, 赵建华, 于德红(2013). 蓝莓茎段初代启动培养研究. 现代农业科技, (21): 74~75
- 罗旭璐, 张德国, 李永和, 赵平(2014). 樟叶越桔阴干果实的营养成分. 江苏农业科学, 42 (1): 242~244
- 孙书伟(2009). 蓝莓组培苗瓶内生根的探讨. 湖北农业科学, 48 (4): 786~788
- 陶俊锋, 李叶芳, 宋杰, 关文灵(2014). ‘灿烂’蓝莓组培与快繁技术. 亚热带植物科学, 43 (2): 159~163
- 王明莹, 李杰, 黄学文, 罗红灾(2013). 蓝莓‘美登’组培苗繁殖技术研究. 中国园艺文摘, 29 (2): 4~5
- 吴征镒(1984). 云南种子植物名录(下册). 昆明: 云南人民出版社, 1138~1145
- 杨芳, 邵金良, 杨斌, 严红梅, 兰珊珊, 陈锦玉, 杨万林(2011). 雀嘴茶营养成分的分析及评价. 现代食品科技, 27 (12): 1516~1519
- 朱宏芬, 沈岚, 黄坚, 张国芳, 王芳, 刘健(2012). 兔眼蓝莓‘灿烂’组织培养与植株再生研究. 北方园艺, (19): 105~107
- Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, Fukuda M (1991). Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. Nihon Hifuka Gakkai Zasshi, 101 (6): 609~613
- Debnath SC, McRae KB (2001). An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. In Vitro Cell Dev-Pl, 37 (2): 243~249
- Maeda K, Fukuda M (1996). Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. J Pharmacol Exp Ther, 276 (2): 765~769
- Meiners J, Schwab M, Szankowski I (2007). Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. Plant Cell Tissue Org Cult, 89 (2~3): 169~176
- Wei Y, Zhang Z-J, Zhang Y-T, Sun Y-H (2007). Simple LC method with chemiluminescence detection for simultaneous determination of arbutin and L-ascorbic acid in whitening cosmetics. Chromatographia, 65 (7): 443~446
- Xu M, Lao Q-C, Zhao P, Zhu X-Y, Zhu H-T, Luo X-L, Yang C-R, He J-H, Li C-Q, Zhang Y-J (2014). 6'-O-Caffeoylarbutin inhibits melanogenesis in zebrafish. Nat Prod Res, 28 (12): 932~934
- Zhao P, Tanaka T, Hirabayashi K, Zhang Y-J, Yang C-R, Kouno I (2008). Caffeoyl arbutin and related compounds from the buds of *Vaccinium dunalianum*. Phytochemistry, 69 (18): 3087~3094