

文献著录格式: 王利平, 陈珍, 江景勇, 等. 优质掌叶覆盆子快繁体系的建立 [J]. 浙江农业科学, 2013 (8): 967-970.

优质掌叶覆盆子快繁体系的建立

王利平¹, 陈珍¹, 江景勇², 郑江仙³, 徐婷婷¹, 宋颖婷¹

(1. 台州学院 生命科学学院, 浙江 台州 318000; 2. 浙江省台州市农业科学研究院, 浙江 临海 317000;

3. 天台县万年覆盆子专业合作社, 浙江 天台 317201)

摘要: 以掌叶覆盆子当年生茎段为外植体建立快繁体系。结果表明, 以 MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.01 mg · L⁻¹ 为诱导培养基, 腋芽萌发率可达 80% 以上; 以 MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 为继代培养基, 增殖系数达 15.1, 试管苗生长健壮。通过正交设计, 筛选出最佳生根培养基 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹。

关键词: 掌叶覆盆子; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S 663.9

文献标志码: B

文章编号: 0528-9017(2013)08-0967-04

掌叶覆盆子 (*Rubus chingii*) 为蔷薇科悬钩子属植物, 因其叶形多为五裂似掌状而得名, 作为常用中药材, 以未成熟果实入药, 具补肝益肾, 固精缩尿等功效^[1-2], 还具有抗菌、消炎、舒精缓和和抗氧化等免疫学作用^[2]。根、叶亦可药用。成熟果实富含氨基酸、各种维生素、矿质元素等成分, 尤其抗衰老物质 SOD 及抗癌物质 (鞣化酸) 含量高于现有栽培和野生水果, 且果实口感细腻, 酸甜可口, 营养丰富, 1993 年世界粮农组织 (FAO) 推荐其为世界第 3 代卫生无公害保健营养水果^[3-5]。掌叶覆盆子还是重要的生态恢复先锋树种和水土保持树种。在山区种植掌叶覆盆子投资少、周期短、潜力大、见效快, 经济寿命可达 20 年。因此, 开发和利用掌叶覆盆子有着极大的潜力和广阔的前景, 可为山区农民的收入带来新的经济增长点。

掌叶覆盆子多生长于低海拔至中海拔的林缘、疏林、山坡、路边和沟边等土壤较湿润地段。目前仍以野生为主, 资源分布较为分散, 无人管理, 产量极低。加之人为整株采摘, 破坏极为严重。而人工栽培重视不足, 发展缓慢, 多为当地农民利用野生种子于自留地零星栽培^[6]。为满足市场需求, 规范化和规模化的人工栽培势在必行。掌叶覆盆子的人工栽培一般采用扦插、压条、分株和分蘖等无性繁殖方法, 但繁殖系数低, 种苗的来源受到较大限制^[7-8]。建立掌叶覆盆子的组织培养体系, 可实现

脱毒复壮, 保持植株的优良特性和性状, 从而提高产量; 同时可缩短繁殖周期, 提高繁殖系数, 免受季节影响, 也可节省空间等^[9]。为扩大掌叶覆盆子的种苗来源, 我们从引种的 1 万多株幼苗中优选出果大、抗寒、质优的 2 个株系, 以此为材料, 完善组培快繁体系, 实现生物技术规模化繁育掌叶覆盆子的优质种苗。现将有关优质掌叶覆盆子快繁体系建立的试验结果总结如下。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

以优质掌叶覆盆子 (*Rubus chingii* Hu) 的扦插苗为快繁试材。

1.2 方法

1.2.1 不定芽的诱导

采集掌叶覆盆子扦插苗的当年生茎段, 剪去部分叶片, 流水冲洗后, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 0.1% 升汞 (加吐温 2~3 滴) 消毒 8~12 min, 无菌水冲洗 5 遍, 用无菌滤纸吸干表面水分。将外植体切成 1~2 cm 长的带芽茎段, 接种到诱导培养基 S1 上培养。

S1 培养基为 MS (0.8% 琼脂和 3% 白糖, pH 值 5.8) + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.01 mg · L⁻¹。培养温度为 (25 ± 1) °C, 光照强度为 80~100 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光照时间为 12 h · d⁻¹ (培养

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 台州市科技计划项目 (071KY07, 102TG01); 台州学院学生科研项目 (12XSKY03)。

作者简介: 王利平 (1991-), 男, 本科生, 研究方向植物组织培养。E-mail: 13750669780@139.com。

通信作者: 陈珍 (1979-), 女, 讲师, 研究方向植物生理和生物技术。E-mail: chenzh@tzc.edu.cn。

条件下同)。

1.2.2 不定芽的增殖

待嫩芽长至 1.5~2.0 cm 长时, 将其切下转入 S1-S4 增殖培养基中。S2: MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹; S3: MS + 6-BA 2.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹; S4: MS + 6-BA 3.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹。每瓶接种 5~6 个芽, 6 个重复。

1.2.3 不定根的诱导

切取 2~3 cm 长势良好的不定芽接种到生根培养基中。通过正交设计 9 种生根培养基 R1-R9。培养基中不加肌醇, 蔗糖浓度为 2%, 其他条件同。

1.2.4 炼苗和移栽

待组培苗植株 4~5 cm 高, 且根势健壮时, 打开瓶盖通风炼苗适应 2 d 后, 洗去根部培养基, 栽于基质中, 以保鲜膜覆盖保湿, 待苗健壮后移入土中栽植。

1.2.5 统计分析

数据采用平均数 ± 标准差表示。数据分析采用 DPS 软件进行方差统计和 LSD 检验, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导

接种的新生带芽茎段在诱导培养基中培养 1 周后, 开始萌发腋芽, 萌发率达 80% 以上, 20 d 左右萌芽长成 1.5~2.0 cm (图 1)。

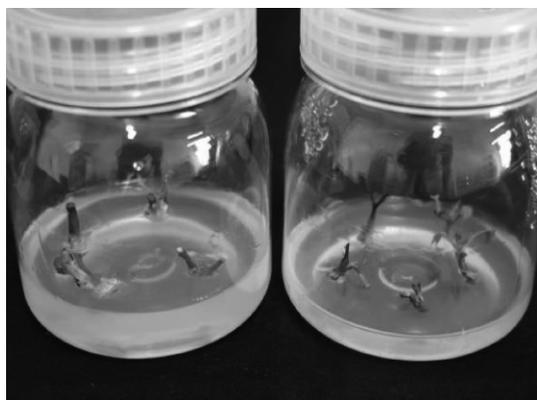


图 1 掌叶覆盆子不定芽的诱导

2.2 不定芽的增殖

通常随着细胞分裂素浓度的增加, 不定芽增殖系数增加。而在掌叶覆盆子培养中, 6-BA 浓度增

加会诱导接种的茎段基部形成大量的愈伤组织而抑制出芽速度, 经由愈伤组织再分化的叶芽矮小簇生, 延长了生产周期。若降低浓度使 6-BA 0.5~1.0 mg · L⁻¹ 时, 与 NAA 组合能诱导掌叶覆盆子茎段较快增殖, 增殖系数达平均 10.1~15.1 (图 2, 表 1)。2 周左右增殖的苗叶片浓绿, 宜继代转至新鲜培养基或转入生根培养。若继代周期延长, 既不利于缩短繁殖周期, 还会导致叶片生长疏松或玻璃化。

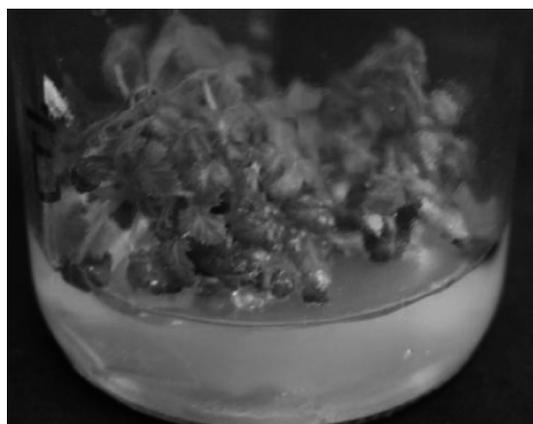


图 2 掌叶覆盆子不定芽的增殖

表 1 不同培养基配方对掌叶覆盆子不定芽增殖的影响

代号	增殖系数	芽生长情况
S1	10.1 ± 0.5 b	叶较大, 致密, 绿
S2	15.1 ± 0.3 a	叶较小, 致密, 浓绿
S3	6.3 ± 0.9 c	叶大, 疏松, 绿
S4	6.6 ± 1.6 c	叶矮小簇生, 淡绿

注: 同列数据后标有不同小写字母表示两者差异显著。表 2 同。

2.3 不定根的诱导

表 2 可见, 各处理培养基均能诱导生根, 但 1/4 MS 培养基使苗色淡黄, 植株矮小。随着培养基营养恢复, 植株生长渐壮 (图 3)。

观察根数和根长, R7 和 R5 为掌叶覆盆子的适宜培养基, 推荐外源激素浓度低且生根良好的 R7 培养基。

2.4 组培苗的移栽

待瓶内带根健壮苗 4~5 cm 高时, 揭开瓶盖, 敞口放置 2 d, 再取出掌叶覆盆子植株, 洗净根部培养基, 栽植于小粉土中, 以保鲜膜覆盖, 1 周后揭膜正常培养。在本试验中, 组培苗的移栽成活率在 90% 以上。

表2 不同培养基配方对掌叶覆盆子不定根增殖的影响

代号	基本培养基	NAA/ (mg · L ⁻¹)	IBA/ (mg · L ⁻¹)	根数/条	每株最长根长/cm	平均根长/cm	植株长势	叶片	根
R1	1/4MS	0.1	1.0	7.1 ± 2.3 c	4.98 ± 1.50 ab	3.67 ± 1.24 a	矮小	较绿	细
R2	1/4MS	0.5	0.5	7.1 ± 1.5 bc	4.05 ± 0.95 bc	2.69 ± 0.53 b	矮小	较绿	细
R3	1/4MS	1.0	0.1	5.3 ± 1.9 c	2.09 ± 0.60 e	1.32 ± 0.55 d	一般	较绿	细
R4	1/2MS	0.1	0.5	5.6 ± 2.6 c	3.25 ± 0.58 cd	2.02 ± 0.84 c	一般	绿	较粗
R5	1/2MS	0.5	0.1	14.5 ± 1.1 a	5.22 ± 1.27 a	2.91 ± 0.61 b	较茁壮	浓绿	粗
R6	1/2MS	1.0	1.0	10.9 ± 0.6 a	4.06 ± 0.59 bc	2.06 ± 0.60 c	较茁壮	浓绿	粗
R7	MS	0.1	0.1	14.0 ± 1.5 a	5.32 ± 0.88 a	3.29 ± 1.01 ab	茁壮	浓绿	粗
R8	MS	0.5	1.0	13.5 ± 1.8 a	3.47 ± 1.00 cd	2.00 ± 0.57 c	茁壮	浓绿	粗
R9	MS	1.0	0.5	10.9 ± 2.3 ab	2.96 ± 0.53 de	1.63 ± 0.41 cd	较茁壮	浓绿	粗

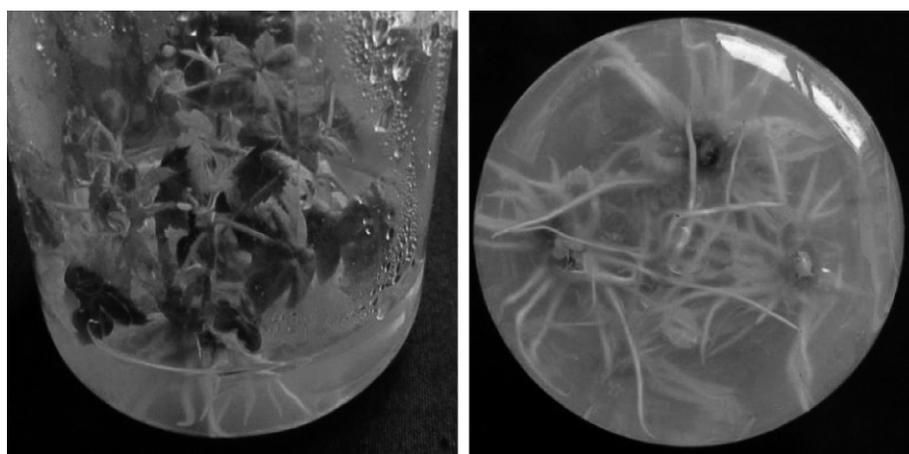


图3 掌叶覆盆子组培苗的生根

3 小结与讨论

结果表明, 掌叶覆盆子带节茎段可诱导腋芽, 适中浓度的 6-BA 有利于其迅速增殖, 2 周内增殖系数达 15.1; 及时继代扩大繁殖, 健壮的苗经生根后炼苗移栽, 可提供大量优质的种苗来源。

关于培养基配方, 刘计权^[10]首次报道了应用组织培养对覆盆子进行快速繁殖的研究, 认为 MS + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + GA₃ 0.05 mg · L⁻¹ 为最佳的继代培养基, 平均增殖系数为 8.12。接着, 潘彬荣等^[9]研究结果表明, 掌叶覆盆子茎段的最佳诱导培养基为 MS + 1.5 mg · L⁻¹ BA + 0.2 mg · L⁻¹ NAA, 诱导率可达 93.3%, 最佳分化培养基为 MS + 2.0 mg · L⁻¹ KT + 0.4 mg · L⁻¹ NAA, 增殖达到 3.6 倍。本试验结果表明, 掌叶覆盆子茎段在 MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.01 mg · L⁻¹ 培养基上平均增殖系数可达 10.1, 而适当提高 6-BA 浓度, 当培养基配比为 MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 时, 平均增殖系数增加到 15.1。可见, 6-BA 和 NAA 的组合既可以简化生产

操作, 又能达到最佳的增殖效果。且生长周期短, 苗生长健壮, 节约生产成本, 提高产量。当浓度继续增加, 大于 6-BA 1.0 mg · L⁻¹, 茎段基部易形成大量愈伤组织, 由此分化产生新的不定芽, 使得增殖时间延长, 且增殖系数降低。郭玉霞等^[11]在红树梅组培快繁时也提出在树莓用于工厂化组培生产时 6-BA 浓度不宜过高。

培养基中大量元素的含量、蔗糖浓度、活性炭等含量均对木本植物组培苗的生根有显著甚至极显著的影响^[12]。因此, 试管苗生根时常通过降低培养基的营养元素和糖浓度来提高生根率。但在本试验中却观察到, 低盐培养基影响了掌叶覆盆子幼苗的健壮生长, 因而选择 MS 基本培养基添加 NAA 0.1 mg · L⁻¹ 和 IBA 0.1 mg · L⁻¹ 为最佳的生根培养基配方。这与吴茱萸等^[13-14]木本植物组培苗生根时宜选择 1/4MS 基本培养基时并不相同。此外, 由于肌醇对生根影响不大, 某些条件下甚至起抑制作用, 故而去掉。通过培养基的再筛选, 优化了掌叶覆盆子的组培过程, 形成了一套良好的快繁体系, 为生物技术规模化培育优质种苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] 盛义保,张存莉,童普升,等. 掌叶覆盆子的开发利用研究概况 [J]. 陕西林业科技, 2001 (4): 71-74.
- [2] Ding H Y. Extracts and constituents of *Rubus chingii* with 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2011, 12: 3941-3949.
- [3] 徐冰,张聪恪,王海玉,等. 覆盆子提取物祛黄褐斑作用研究 [J]. 中国实用医药, 2012, 7 (8): 24-25.
- [4] Yau M H, Che C T, Liang S M, et al. An aqueous extract of *Rubus chingii* fruits protects primary rat hepatocytes against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress [J]. Life Sciences, 2002, 72 (3): 329-338.
- [5] 肖洪明,祖灵博,李石平,等. 掌叶覆盆子化学成分的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21 (3): 220-225.
- [6] 汪传佳,徐小静,康志雄,等. 覆盆子资源开发利用研究综述 [J]. 浙江林业科技, 2004, 24 (1): 65-68.
- [7] 孙长清,邵小明,祝天才,等. 掌叶覆盆子的根插繁殖 [J]. 中国农业大学学报, 2005, 10 (2): 11-14.
- [8] 潘彬荣,张永鑫,岳高红,等. 氮肥对掌叶覆盆子植株性状和产量的影响 [J]. 江西农业学报, 2010, 22 (12): 69-71.
- [9] 潘彬荣,罗天宽,张永鑫. 掌叶覆盆子的组织培养技术 [J]. 浙江农业科学, 2010 (3): 508-510.
- [10] 刘计权. 应用组织培养对覆盆子快速繁殖的研究 [J]. 中南药学, 2006, 4 (6): 426-428.
- [11] 郭玉霞,董彦琪,刘喜存,等. 红树梅组培快繁技术研究 [J]. 河南农业科学, 2011, 40 (4): 127-128, 133.
- [12] 李湘阳,曾炳山,裘珍飞,等. “罗宾戈登”银桦组培苗不定根的诱导 [J]. 北方园艺, 2012 (9): 145-148.
- [13] 徐涌,孙骏威,陈珍. 不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养的影响 [J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28 (3): 500-504.
- [14] 陈珍,孙骏威,许海丹,等. 天台乌药的组织培养与快速繁殖 [J]. 浙江农业学报, 2012, 24 (2): 243-246.

(责任编辑: 张瑞麟)

(上接第966页)

表2 不同修剪次数对食凉茶枝叶产量的影响

修剪次数	单株产量/g
1	348
2	602
不修剪 (CK)	296

103%。说明食凉茶比较耐修剪,修剪可以明显提高其枝叶产量,每年修剪2次,枝叶产量最高。

3 小结与讨论

食凉茶属于耐修剪的植物,修剪可以明显提高其枝叶产量。最佳修剪留茬高度为40 cm,每年6月和11月修剪2次的食凉茶,单株产量最高,达602 g,比不修剪的提高103%。因此在食凉茶人工种植中,科学修剪十分重要。

食凉茶修剪时间,根据食凉茶中挥发油含量以及食凉茶生长周期来确定。据丽水市中医院孙晓勇等人试验,每年的6月和11月食凉茶中挥发油含量最高,这2个时间也是食凉茶枝叶采摘的最佳时间,在食凉茶枝叶采摘后及时修剪,可以有效促进食凉茶新枝生长,为第2次枝叶采摘提供保障。因此认为,将食凉茶的修剪时间确定在6月和11月

为宜。

经过修剪的食凉茶,因为养分丢失过多,枝条的抽生和叶片的生长均受影响,在修剪后要及时追施有机肥,以满足食凉茶抽生新枝和新叶生长所需养分。

参考文献:

- [1] 应国清,廖青青,易喻. 柳叶蜡梅化学成分的研究 [G] // 中国化学会. 中国化学会第26届学术年会有机化学分会场论文集. 天津: 中国化学会, 2008: 120.
- [2] 陈柏谊. 不同修剪深度对茶树神域和产量的影响 [J]. 茶叶通讯, 1992 (2): 6-8.
- [3] 孙晓勇,袁宙新,王丽仙,等. 浙江丽水产山蜡梅叶提取挥发油的最佳采收季节 [G] // 第2届浙江中西部科技论坛文集 (药学分卷). 丽水 《第二届浙江中西部科技论坛论文集》编辑部, 2005: 39-40.
- [4] 钟秉全. 春茶产量与修剪留叶技术的关系 [J]. 西南农业学报, 1994 (7): 32-37.
- [5] 刘南祥,程文亮,李建良,等. 畜药食凉茶标准化种植及加工技术 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23 (4): 8-9.

(责任编辑: 张才德)