

崇庆枇杷茶组织培养初步研究

胡洪沙, 唐琳

(四川大学 生命科学院, 四川 成都 610064)

摘要:以崇庆枇杷茶的带芽茎段为试材,对外植体的消毒、愈伤的诱导、芽的启动和增殖进行了初步研究。结果表明:以培养室扦插苗的带芽茎段为材料,用多菌灵处理 20 min,0.1%升汞消毒 10 min 后再用 0.05%升汞消毒 3 min 效果最好,其存活率可达 88.5%;适合愈伤诱导的培养基为 MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA,愈伤颜色鲜绿,质地较硬,转入 MS+(1,2 mg/L)TDZ 中愈伤表面变为颗粒状;有利于芽启动的培养基为:MS+2 mg/L BA+0.05 mg/L IAA+0.5 mg/L GA₃,有利于芽增殖的培养基为 MS+1 mg/L TDZ+1 mg/L GA₃,2 种培养基交叉培养有利于芽的增殖。

关键词:崇庆枇杷茶;消毒;愈伤诱导;增殖

中图分类号:S 571.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0122-03

崇庆枇杷茶 (*Camelia sinensis* cv. Chongqing pipacha)系山茶科常绿乔木,主要分布在四川省崇州市、大邑县等地区,海拔约 600~1 500 m 处。其主要形态特征为:主干明显,树姿直立,树高 3~10 m;分枝较疏,分枝高度 1 m 以上;中心主轴生长占优势,远视全株呈圆锥形;叶长 11~20 cm,叶幅 5.5~8.0 cm;花冠直径 4 cm 左右,花瓣数 7~8,花粉粒大,为金黄色,具有浓烈的芳香;种子近似肾形,一端略圆,一端稍尖,背上有一条突出的明显棱纹^[1]。另外,崇庆枇杷茶具有强大的根系,对春旱有较强的抗性;能够抵抗严冬低温的侵害,但在-8℃时会出现一定程度冻害;对茶云纹叶枯病具有较强的抗性。它的初次采摘期一般在 3 月份,较一般茶树早,细茶和边茶的产量也比当地一般茶树高^[2]。

有报道显示,崇庆枇杷茶属于野生或半野生栽培种^[3]。RAPD 分析结果显示,崇庆枇杷茶属于原始类型的茶树品种^[4],它的植株形态及枝、叶、茶、果、种子等,均具有一定的原始特征,对研究茶树起源、演化、传播以及生产应用都有重要意义,应采取必要的保护措施和进行深入的研究^[5]。崇庆枇杷茶还是四川省茶树良种委员会认定的省级传统良种之一^[6],具有很好的饮用、保健及观赏价值。因此,崇庆枇杷茶种质资源的保护和繁育意义重大。目前,崇庆枇杷茶的繁殖方式为种子繁殖和扦插,其中种子繁殖易产生变异,而扦插生根的成活率

据报道为 30.2%^[7],成活率较一般茶树低,繁殖速度也比较慢。植物离体快繁不仅繁殖速度快,而且通过离体快繁可以获得基因型、长势一致的优良种苗。至今,还没有文献对崇庆枇杷茶的组织培养技术进行过报道。现对崇庆枇杷茶的组织培养进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择 3~6 月份室外生长的茶树或者培养室(温度 25℃、光照时间 16 h/d)中的扦插苗的带芽茎段,自芽而下剪取 1~2 cm。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制及筛选 采取 MS 基本培养基,附加细胞分裂素 BA、TDZ、生长素 NAA、IAA、赤霉素 GA₃(激素配比见表 2,3),蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.4~5.6,用常规方法配制分装后,经 121℃高压灭菌 20 min 后备用。

1.2.2 材料消毒 将所选材料用肥皂水清洗 15 min,0.5%多菌灵浸泡 0 或 20 min,流水冲洗 2 h,用滤纸吸干表面水分,去掉芽外层及茎段上的小叶片。在无菌操作台上用 70%酒精消毒 30~40 s,0.1%升汞消毒 10 min,无菌水冲洗 4~5 遍。然后采用以下 2 种处理:A:不再消毒;B:将茎段基部切去,再用 0.05%升汞消毒 3~4 min,无菌水冲洗 4~5 遍。接种在 100 mL 的三角瓶里,每瓶接种 1 个外植体,每次接种 15 瓶左右,2 次重复,根据表 1 共 4 个处理,第 7 和 15 天后统计结果。

1.2.3 培养条件 接种后放入组培室中光照培养(12 h/d),组培室的温度控制在 23~25℃,光照强度为 1 500 lx 左右。

1.2.4 统计结果 污染率(%)=(污染外植体数/总外

第一作者简介:胡洪沙(1984-),女,在读硕士,研究方向为风景园林。E-mail: huhongsha9@126.com。

责任作者:唐琳(1966-),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为植物学。E-mail: tangl66@sina.com。

收稿日期:2011-12-14

植体数)×100;褐化率(%)=(褐化外植体数/总外植体数)×100;存活率%=(成活外植体数/总外植体数)×100;芽启动率(%)=(启动芽数/存活外植体数)×100;平均增殖系数=不定芽总数/启动芽数。对统计数据用 Spss13.0 软件进行卡方检验,比较差异性^[8]。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒

2.1.1 升汞处理时间对灭菌效果的影响 从表 1 可看出,第 1、2 组随着升汞处理时间的延长,污染率明显下降,虽然褐化率有所增加,但是存活率明显提高。且 2 组污染率、褐化率、存活率的卡方检验值均为 $P=0.000<0.01$,差异达极显著水平。综合考虑,采用第 2 组处理,即用 0.1% 升汞消毒 10 min 后,再用 0.05% 升汞消毒 3~4 min,灭菌存活率可达 56.7%。

表 1 不同处理对外植体消毒效果的影响

编号	0.5%多菌灵 浸泡/min	升汞 处理	选材	接种数	污染率 /%	褐化率 /%	存活率 /%
1	0	A	室外茶树带芽茎段	30	70.0	6.7	23.3
2	0	B	室外茶树带芽茎段	30	20.0	26.7	56.7
3	20	B	室外茶树带芽茎段	27	14.8	33.3	70.4
4	20	B	培养室扦插苗带芽茎段	26	3.8	7.7	88.5

2.1.2 0.5%多菌灵对灭菌效果的影响 从表 1 可看出,第 2、3 组 2 组污染率、褐化率、存活率的卡方检验值均为 $P=0.000<0.01$,差异达极显著水平。将褐化的外植体在 2~3 d 及时转接,可以减轻褐化,避免死亡,从而提高存活率。由此可见,用 0.5% 多菌灵浸泡 20 min 要比不用多菌灵的效果好,存活率可达 70.4%。

2.1.3 取材对灭菌效果的影响 对于室外生长的崇庆枇杷茶树或培养室扦插苗带芽茎段,采用不同的消毒方法,研究其对消毒效果的影响。由表 1 可知,第 3、4 组污染率、褐化率、存活率的卡方检验值均为 $P=0.000<0.01$,差异达极显著水平,采用培养室扦插苗带芽茎段作为外植体,其污染率、褐化率均降低了,且存活率高达 88.5%。究其原因可能是扦插苗在培养室中不易受到污染,且生长环境较好,嫩梢长得比较健壮。

2.1.4 不同时间段的外植体消毒状况 通过图 1-a 可看出,处理组 2 即用方法 B 消毒前 7 d 污染数较少,7 d 后污染率增加了很多,可能与处理组 2 不能有效地遏制外植体内的内生菌有关。处理组 3 与处理组 2 相比,在第 7 天时污染率反而高的原因可能与取材有关。通过图 1-b 的 1 组和 2 组可看出,在增加了升汞的处理时间后,褐化率明显增加了,且褐化率在第 7 天后就稳定不变了。通过 3、4 组和 1、2 组可看出,第 15 天时的褐化率比第 7 天时明显增加,说明 0.5% 多菌灵的使用会造成外植体的褐化。通过图 1-c 可以看出,4 组灭菌处理的结果均为第 15 天的存活率比第 7 天的有所下降,这与污染率或褐化率的上升有关。

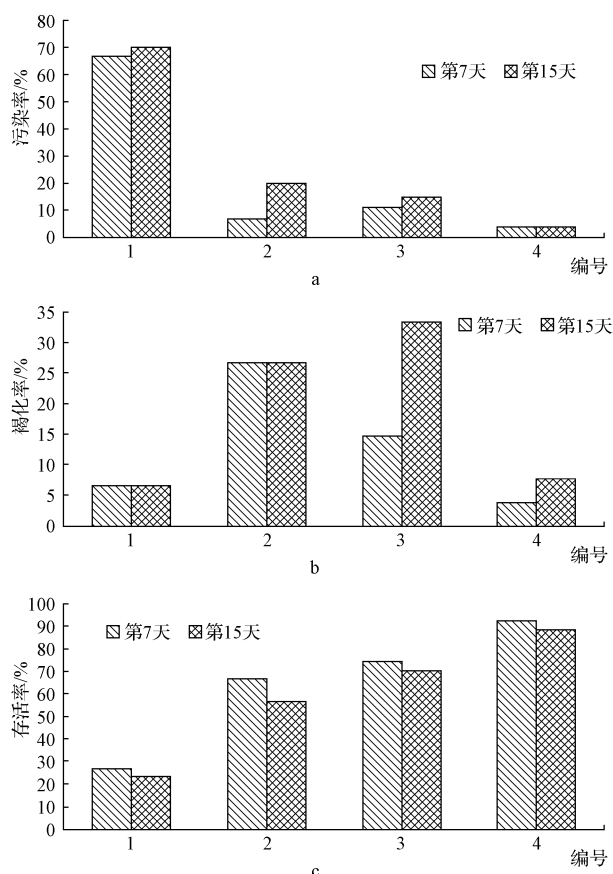


图 1 不同时间段的外植体消毒状况

2.2 愈伤组织的诱导

由表 2 可知,通过卡方检验两两比较可以看出只有 P1 和 P2 之间的 $P=0.004<0.01$,具有极显著的差异性,而其它几组的两两比较的 $P>0.05$,差异不显著。由此可得出,0.5 mg/L 的 NAA 对崇庆枇杷茶愈伤的诱导起到了很重要的作用(图 2)。将所得愈伤组织转入 MS+1 mg/L TDZ 或 MS+2 mg/L TDZ 中均没有愈伤分化现象,但是愈伤的形态有所变化,愈伤组织表面变为淡绿色颗粒状(图 3)。

表 2 不同激素组合对愈伤诱导的影响

编号	培养基	接种外 植体数/个	诱导愈 伤数/个	处理结果
P1	MS+1 mg/L BA	20	0	没有长出愈伤
P2	MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA	20	7	颜色鲜绿,结构紧密
P3	MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA	20	4	颜色鲜绿,结构紧密
P4	MS+3 mg/L BA+0.5 mg/L NAA	20	3	颜色鲜绿,结构紧密

2.3 芽的增殖

按表 3 的配方,进行丛生芽的诱导。通过卡方检验可以看出,这 2 组的芽启动率和平均增殖系数的比较 $P=0.000<0.01$,差异达极显著水平。在试验过程中,2 种培养基上的外植体都易造成玻璃化现象,且 2 种配方利于叶的生长,不利于茎段的伸长,原因还不是很清楚。将芽转接到 MS 或 MS+0.5 mg/L IBA 上可以减轻玻璃化现象,同时可使茎段伸长。将外植体接到 2 种培养基

上交替培养,可获得比较好的增殖效果(图4),其增殖芽数可达5~6,由于结果较少,还有待于增加试验量。

表3 不同激素组合对芽的启动和增殖的影响

培养基	接种外 植体数	60 d 存 活数	启动 芽数	芽启动 率/%	增殖后不 定芽数	平均增 殖系数
MS+2 mg/L BA+0.05 mg/L IAA+0.5 mg/L GA ₃	91	34	22	44.7	30	1.36
MS+1 mg/L TDZ+1 mg/L GA ₃	94	36	7	19.4	17	2.43

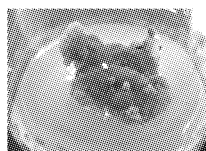


图2



图3

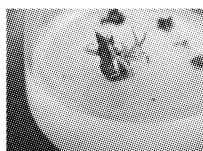


图4

注:图2,在BA和NAA组合的培养基上诱导的愈伤组织形态;图3,转入含有TDZ的培养基后的愈伤组织形态;图4,在MS+2 mg/L BA+0.05 mg/L IAA+0.5 mg/L GA₃和MS+1 mg/L TDZ+1 mg/L GA₃2种培养基上交替培养2次后的增殖芽。

3 讨论与结论

木本植物组织培养中无菌材料的建立比较困难,采用0.1%升汞作为消毒剂,处理时间过短,消毒不彻底,外植体污染率高,而时间过长,外植体易受到伤害,甚至褐化死亡。该试验表明,用0.1%升汞处理10 min后,再用0.05%升汞处理3 min,灭菌效果比较好。试验中发现,在外植体的消毒试验中,选材很重要。培养室中的扦插苗上的带芽茎段比室外茶树上的带芽茎段更为健壮,其本身所带菌也比较少,经相同的方法消毒灭菌后,存活率达88.5%,能获得较多的无菌材料。另外,选自室外茎尖的外植体在接种后1~2 d,其基部周围易出现黑色的圈,及时转接能有效减少褐化,而在培养基中添加活性炭(2 g/L)、PVP(2 g/L)、酸水解酪蛋白(1 g/L)后,不能明显减少褐化。有研究显示,接种前用4~5 mg/L

抗坏血酸和20 mg/L青霉素浸泡20 min可以防止褐化^[9],对于崇庆枇杷茶是否有效有待于进一步的研究。

在愈伤诱导试验中,NAA对愈伤的诱导起到了重要的作用,单独施用BA没有诱导作用。BA浓度的增加可能会抑制愈伤组织的生成,且增大BA的浓度后没有发现愈伤组织的再分化现象。将愈伤组织转入MS+TDZ(1,2 mg/L)后愈伤组织表面变为颗粒状,表明加入TDZ改变了愈伤组织的质量。在芽的增殖试验中,部分丛生芽出现玻璃化现象,可能与培养瓶的通气条件、培养基的激素浓度、蔗糖浓度、琼脂浓度等条件有关^[10],如何减少芽体玻璃化的产生,还有待于进一步的探索。崇庆枇杷茶的扦插生根比一般茶树困难。在离体快繁中,用MS、MS+0.5 mg/L NAA、MS+0.5 mg/L IBA和1/2MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L IBA+1%活性炭做生根培养基,均不能使崇庆枇杷茶的芽或茎段生根。因此,崇庆枇杷茶离体培养下的生根还有待于进一步探索。

参考文献

- [1] 江济和,邹翔.论四川大茶树资源[J].茶叶通报,1993(3):20-23.
- [2] 钟渭基.崇庆枇杷种[J].茶叶,1959(5):31-32.
- [3] 郭元超.我国栽培茶树的起源与演化[J].福建茶叶,1991(3):10-18.
- [4] 林郑和,陈常颂,陈荣冰.我国39个茶树品种的RAPD分析[J].分子遗传育种,2006(5):695-701.
- [5] 侯渝嘉,彭萍,钟渭基,等.四川茶树种质资源鉴定与评价[J].西南农业大学学报,1998(3):235-238.
- [6] 罗凡,王云,李春华,等.四川茶树品种研究现状与发展趋势[J].贵州科学,2008,26(2):52-57.
- [7] 魏芳华.茶树短穗扦插技术研究[J].茶叶通报,1989(2):21-23.
- [8] 董时富.生物统计学[M].北京:科学出版社,2002:172-181.
- [9] 张建华,毛平生,彭火辉.茶树的组培快繁技术初探[J].蚕桑茶叶通讯,2003(4):32-33.
- [10] 何芳兰,李毅,赵明,等.影响高山杜鹃试管苗玻璃化的几个因素研究[J].西北林学院学报,2008,23(1):104-107.

A Primary Study on Tissue Culture of *Camelia sinensis* cv. Chongqingpipacha

HU Hong-sha, TANG Lin

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract: Using *Camelia sinensis* cv. Chongqingpipacha buds as materials, explants sterilization, callus induction, and proliferation culture of buds were studied. The results showed that using cutting seedling in culturing room as explants, the optimal sterilization time was about 3 minutes with 0.05% HgCl₂ after the 10 minutes with 0.1% HgCl₂, and its survival rate was about 88.5%. The optimal induction of callus was MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA. The callus color was bright green, and its texture was harder, then its surface turn to granular when was transferred to MS+(1,2 mg/L) TDZ. The best medium for proliferation of buds was MS+2 mg/L BA+0.05 mg/L IAA+0.5 mg/L GA₃ and MS+1 mg/L TDZ+1 mg/L GA₃. The alternate cultivation on the two medium was in favor of proliferation of buds.

Key words: *Camelia sinensis* cv. Chongqingpipacha; sterilization; callus induction; proliferation