

茶树带腋芽茎段组织培养研究

刘 静

(安康学院 现代农业与生物科技学院, 陕西 安康 725000)

摘要:以茶树带腋芽茎段为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,研究外植体的取材时间、外植体的放置方式、不同浓度激素对茶树腋芽诱导的影响,为建立茶树高效组织培养体系提供依据。研究表明:外植体的取材时间在 5 月上旬时,茶树腋芽诱导效果较好,相对于将茎段插入培养基中培养,茎段水平放置培养更有利于茶树腋芽的诱导。诱导腋芽的适宜培养基为 MS+6-BA2.0 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹,诱导率为 92%。

关键词:茶树;带腋芽茎段;组织培养

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 属山茶科山茶属多年生木本植物^[1]。茶叶为我国重要的饮料作物,茶叶中的茶多酚类、植物碱、蛋白质、氨基酸、维生素等有机化学成分和无机矿物元素具有很高的价值^[2]。茶树为异花授粉,其高度的自交不亲合性、自交衰退、结实率低等因素限制了遗传改良工作的进行^[3]。茶树按照繁殖方式的不同分为种子繁殖和无性繁殖,种子直播简单易行,成本低廉,但是由于茶树容易发生性状分离导致优良性状丢失,对茶园的长久发展带来了很大的困难。无性繁殖以扦插为主,但是该方法在育苗周期、繁殖系数、对自然环境的要求方面有一定的缺陷,在茶树新品种育成时,先需要经过多年的原种扩繁,等完成一定规模后,才能进行大面积栽种,这使得茶树新品种的繁育和推广速度受到限制^[4],利用植物组织培养来生产种苗,不仅可以保持优良性状,缩短育种年限,实现快速繁殖,还可以避免环境对育种时间的限制,实现批量化、大规模生产。在茶树的繁殖过程中,利用植物组织培养技术对叶片、茎段、腋芽以及根等外植体进行诱导来获得完整的植株,再进行移栽。为建立茶树高效组织培养体系提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验材料为“陕茶一号”茶树幼嫩枝条,由安康市双龙镇三星茶厂提供。

1.2 方 法

取茶树幼嫩枝条,切至长 2 cm 左右的带芽茎段,将带芽茎段流水冲洗 2 h,在超净工作台用

75% 的酒精消毒 30 s,再用 0.1% 氯化汞消毒灭菌 8 min,用无菌水冲洗 5~6 次后接种于不同培养基中进行培养,培养温度为 (25±1)°C,光照 8~10 h·d⁻¹,光照强度 1 500~2 000 lx。

1.2.1 不同取材时间对茶树腋芽诱导的影响

分别于 4 月上旬、5 月上旬、6 月上旬取茶树幼嫩茎段,将消毒过的茎段接种在 MS+6-BA2.0 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹ 培养基上,每个月份的材料接种 20 瓶,每瓶接种 2~3 个外植体,重复三次。接种 40 d 后比较不同取材时间对茶树腋芽诱导的影响,统计腋芽诱导率。

腋芽诱导率(%)=(分化出腋芽的外植体数/未污染外植体总数)×100%

1.2.2 外植体不同放置方式对茶树腋芽诱导的影响

将茶树带腋芽茎段灭菌以后接种在 MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹ 培养基上,共接种 40 瓶,每瓶 2~3 个外植体,其中 20 瓶培养基中茎段水平放置,另外 20 瓶培养基中茎段基部插入培养基,重复三次。观察腋芽的生长情况,40 d 以后比较茎段不同放置方式对茶树腋芽诱导的影响,统计腋芽诱导率。

腋芽诱导率(%)=(腋芽萌发的外植体数/外植体总数)×100%

1.2.3 附加不同浓度激素的 MS 培养基和 1/2MS 培养基和对茶树腋芽诱导的影响

将消毒过的带腋芽茎段接种到不同的培养基(1. MS+BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹ 2. MS+BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹ 3. MS+BA2.0 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹ 4. MS+BA2.0 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹ 5. 1/2MS

收稿日期:2020-04-30 修回日期:2020-05-10

基金项目:陕西省科技厅资助项目(编号:2015NY135);安康市林业局资助项目(编号:2017AYHX019);陕西省 2017 年重点研发计划项目(编号:2017NY-204)。

作者简介:刘静(1978-),女,陕西西安人,研究生,讲师,主要从事生物技术与植物细胞工程方面的研究。

+BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.2 mg · L⁻¹ 6. 1/2MS+BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹ 7. 1/2MS+BA2.0 mg · L⁻¹ + NAA0.2 mg · L⁻¹ 8. 1/2MS+BA2.0 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹) 上。每瓶培养基中接种 2~3 个外植体, 每种培养基接种 20 瓶。重复三次。接种 40 d 后统计腋芽诱导率, 比较不同培养基对茶树腋芽诱导的影响。

腋芽诱导率(%)=(分化出腋芽的外植体数/未污染外植体总数)×100%

2 结果与分析

2.1 不同取材时间诱导对茶树腋芽诱导的影响

从表 1 中可以看出, 4 月上旬茶树腋芽诱导

率为 71%, 5 月上旬腋芽诱导率为 88%, 6 月上旬腋芽诱导率为 77%。与 4 月和 6 月相比, 5 月份外植体诱导率较高。茶树为多年生灌木, 其最适的生长温度为 20~30℃, 4 月份气温开始回升, 茶树开始抽枝生长, 处于生长初期的枝条比较幼嫩, 在消毒过程中容易受到损伤, 不利于腋芽的诱导。5 月气温上升, 雨水充沛, 利于茶树生长, 茶树枝条达到 15~20 cm, 节间较长较嫩, 脱分化能力强。6 月份温度继续升高, 茶树生长较快, 枝条逐渐木质化, 脱分化能力弱, 不利于茶树腋芽诱导。因此, 5 月份的茶树枝条更有利于腋芽诱导, 且诱导腋芽所需的时间短, 芽的长势也好。

表 1 不同取材时间对茶树腋芽诱导的影响

取材时间	外植体数	腋芽萌发数	诱导腋芽所需天数/d	诱导率/%	腋芽生长情况
4 月	77	55	30	71	腋芽生长缓慢, 芽瘦小
5 月	78	69	14	88	腋芽生长快速, 健壮
6 月	77	60	16	77	腋芽生长较慢, 芽稍壮

2.2 比较茎段的不同放置方式对茶树腋芽诱导的影响

从表 2 可知, 茎段不同的放置方式对茶树腋芽诱导率的影响不同。水平放置培养的茎段, 腋芽的萌发率是 83%, 基部插入培养基培养的茎段, 腋芽的萌发率是 36%。从实验结果可知, 茎段水平放置培养, 腋芽的萌发率更高, 可能的原因是材料水平放置, 增加了材料与培养基的接触面积, 有利于营养物质的吸收, 材料基部插入培养基中培养的方式, 材料与培养基的接触面积较少, 材料吸收培养基中营养物质少且慢, 导致腋芽生长发育缓慢。所以将材料水平放置更有利于茶树腋芽的诱导。

表 2 茎段的不同放置方式对茶树腋芽诱导的影响

外植体放置方式	外植体数	腋芽萌发数	萌发率/%
水平放置于培养基	42	35	83
基部插入培养基	45	16	36

2.3 附加不同浓度植物激素的 MS 培养基和 1/2MS 培养基对茶树腋芽诱导的影响

实验以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 在含有 NAA 和 6-BA 的培养基上, 带芽茎段接种一周后, 茎段开始膨大(图 1A); 外植体培养 20d 后, 切口有少量愈伤组织出现, 腋芽萌发(图 1B); 培养 40 d 后, 腋芽叶片开始舒展(图 1C), 接种 90 d 后, 腋芽发育成有 5~6 片真叶的枝条(图 1D)。由表 3 可以看出: MS 培养基中, 6-BA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹, NAA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时, 诱导率最高, 为 92%。因此, 在 MS 基本培养基中, 腋芽诱导的最适激素浓度配比为: 6-BA2.0 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹。在 1/2MS 的培养基中, 6-BA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹, NAA 浓度为 0.2 mg · L⁻¹ 的诱导率较高, 为 88%。因此, 当基本培养基为 1/2MS 时, 腋芽诱导的最适浓度配比为: 6-BA2.0 mg · L⁻¹ + NAA0.2 mg · L⁻¹。

表 3 不同的植物激素对腋芽诱导的影响

编号	培养基	外植体数	腋芽萌发数	萌发率/%	腋芽生长情况
1	MS	34	25	74	腋芽萌发慢, 生长缓慢, 芽瘦弱。
2	MS	34	27	79	腋芽萌发慢, 生长缓慢, 芽瘦弱。
3	MS	38	30	79	腋芽萌发慢, 生长缓慢, 芽瘦弱。
4	MS	38	32	92	腋芽萌发快, 生长迅速, 芽健壮。
5	1/2MS	35	28	80	腋芽生长较慢, 生长较快。
6	1/2MS	32	26	81	腋芽生长较慢, 生长较快。
7	1/2MS	40	35	88	腋芽萌发较快, 生长较快。
8	1/2MS	36	28	78	腋芽萌发慢, 生长缓慢。

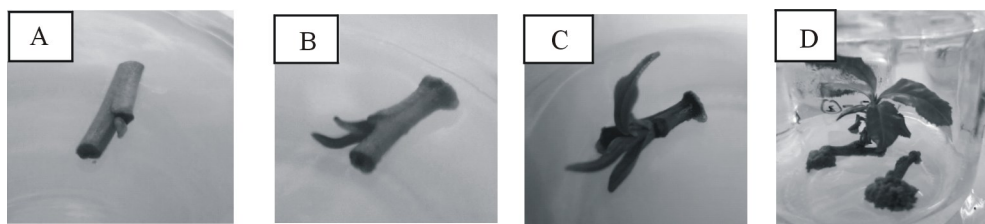


图 A:茎段接种一周后,茎段开始膨大; 图 B:茎段接种 20 d 后,腋芽萌发,切口有少量愈伤组织出现;
图 C:茎段接种 40 d 后,腋芽叶片开始舒展; 图 D:茎段接种 90 d 后,腋芽发育成有 5~6 片真叶的枝条

图 1 培养基对茶树腋芽诱导的影响

3 结论与讨论

3.1 茶树外植体取材时间对腋芽诱导的影响

目前,关于茶树茎段组织培养的研究报道较少,茶树在不同时间取材,腋芽诱导率有明显差异,王树芝^[5]等研究发现,与 8 月份和 10 月份相比,5 月份取材的外植体腋芽萌动最快,萌发率最高,10 月份取材的外植体腋芽萌动最慢,萌发率最低,8 月份取材的外植体的腋芽萌发时间和萌发率介于 5 份月和 10 月份之间,本次实验研究发现 5 月份茎段腋芽的诱导率明显高于 4 月份和 6 月份。且 5 月份茎段腋芽诱导所需的时间也比 4 份月和 6 月份短,这与王树芝等研究结果相似,综上所述,在茶树茎段腋芽诱导中,带芽茎段的最佳取材时间为 5 月,在此期间取材培养,腋芽诱导率较高。

3.2 不同浓度植物激素对茶树腋芽诱导的影响

研究发现培养基中植物激素的种类和浓度会对外植体的分化能力产生影响,高浓度生长素会促进愈伤组织的形成,而愈伤组织的形成会降低增殖率,高浓度的细胞分裂素会抑制愈伤组织的形成,但对芽的诱导和生长有一定的促进作用。李家华等^[6]以大叶种茶树新梢为外植体,认为 $6-BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2.4-D 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 促进腋芽形成单生芽的效果最好, $6-BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导愈伤组织形成和腋芽分化均获得较好效果, $6-BA 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对促进丛芽形成效果最好。袁正仿等^[7]以蕪北茶树带腋芽的茎段为外植体,认为最佳腋芽诱导培养基为 $MS + 6-BA 2.0$

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,芽增殖培养基为 $MS + 6-BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + IBA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在此次实验中,培养基中添加的生长素是萘乙酸(NAA),细胞分裂素是 6-BA,通过对比附加不同植物激素的培养基对腋芽诱导的影响,我们发现:在 MS 培养基上,NAA 和 6-BA 的浓度都较高时,腋芽的诱导率较高,说明在 MS 培养基上附加较高浓度的植物激素可以促进腋芽的诱导;在 1/2MS 培养基上,NAA 浓度较低和 6-BA 浓度较高时,腋芽的诱导率较高,而 NAA 和 6-BA 浓度都为高浓度时,腋芽诱导率明显下降,说明在 1/2MS 培养基上,腋芽诱导所需的植物激素有一个最适浓度,超过这个浓度范围,腋芽诱导率会明显降低。以 1/2MS 为基本培养基的四种培养基的平均腋芽诱导率要稍优于以 MS 为基本培养基的平均腋芽诱导率。

参 考 文 献:

- [1] 陈宗懋. 中国茶经[M]. 上海:上海文化出版社, 1994:5.
- [2] 边世平. 茶叶的化学成分及其保健作用[J]. 青海大学学报(自然科学版),2004(04):64-65.
- [3] 董丽娟. 茶树杂交育种研究进展[J]. 茶叶科学,2001(01):7-10.
- [4] 成浩,曾建明,周健等. 茶树种苗工厂化快速繁育技术[J]. 茶叶科学,2007(03):231-235.
- [5] 王树芝,刘德华,刘黎等. 冬青苦丁茶树组织培养的研究[J]. 湖南农业科学,2009(02):131-133.
- [6] 李家华,周红杰,李明珠. 云南大叶种茶树新梢带腋芽茎段组织培养初探[J]. 茶业通报,2001(03):28.
- [7] 袁正仿,孔凡权,远凌威等. 蕪北茶树的组织培养研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),2003(02):215-217.
- [8] (上接第 32 页)
- [9] 王金明,徐慧森,张杰,等. 不同水平钙对氟中毒大鼠肾组织细胞内质网凋亡通路的影响[J]. 畜牧兽医学报,2018,49(12): 2 723-2 732.
- [10] Prokhorova EA, Kopeina GS, Lavrik IN, et al. Apoptosis regulation by subcellular relocation of caspases [J]. Scientific Reports, 2018 (08): 12 199.
- [11] de Macedo FHP, Aires RD, Fonseca EG, et al. TNF- α mediated upregulation of Na_v1.7 currents in rat dorsal root ganglion neurons is independent of CRMP2 SUMOylation [J]. Mol Brain, 2019 (12): 117.
- [12] Zhang S, Niu Q, Gao H, et al. Excessive apoptosis and defective autophagy contribute to developmental testicular toxicity induced by fluoride [J]. Environ Pollut, 2016, 212: 97-104.
- [13] Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, et al. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts [J]. Toxicology, 2008, 243 (03): 340-347.