

福建乌龙茶种质离体保存研究 II

—无菌系继代增殖与生根

郭玉琼^{1,2}, 赖钟雄^{1,2}, 吕柳新², 林腾辉², 陈菁^{1,2}

(¹福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002; ²福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002)

摘要: 试验以铁观音茶树成年茎段离体培养诱导的丛生芽作为研究材料, 探讨无菌系的继代增殖和生根。试验结果表明: 适宜茶树成年茎段无菌系继代增殖的培养基为 1/2MS+1.0mg/L6-BA+0.2mg/LIAA+0.2mg/LGA₃, 培养基中附加 8g/L 琼脂糖, 30g/L 蔗糖, pH5.6。在此继代培养基上进行增殖, 茶树成年茎段平均增殖率为 7.57, 最高增殖率可达 13。适合茶树成年茎段离体培养生根的培养基是 1/2MS+3mg/LIBA+30g/L 蔗糖+7g/L 琼脂糖; 研究还表明随着继代生长时间的延长, 生根率提高, 最早生根的天数缩短。

关键词: 乌龙茶; 铁观音; 成年茎段; 继代增殖; 生根

中图分类号: S571.1 文献标识码: A

In vitro Preservation of Germplasm of Oolong Tea Trees (*Camellia sinensis*) in Fujian II —Subculturing Multiplication and Rooting Formation of Aseptic Lines from Adult Stem Nodes

Guo Yuqiong^{1,2}, Lai Zhongxiong^{1,2}, Lv Liuxin², Lin Tenghui², Chen Jing^{1,2}

(¹Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002;

²College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract: In this experiment the ramification from tea adult stem nodes was used as materials for the preliminary study on subculturing multiplication and rooting formation in *Camellia sinensis* cv Tieguanyin. The obtained results showed that the best medium for subculturing multiplication of tea adult stem nodes was 1/2MS+1.0 mg/L6-BA+0.2mg/LIAA+0.2mg/LGA₃ supplemented with 8g/L agarose and 30g/L sucrose, pH5.6. The average multiplication rate was 7.57 and the highest could come up to 13. The optimal medium for rooting formation of aseptic lines from adult stem nodes was 1/2MS+3mg/LIBA+30g/L sucrose+7g/L agarose; furthermore the rooting rate improved with prolonging subculturing time, while the days of rooting formation shortened.

Key words: oolong tea trees, Tieguanyin, stem nodes from adult trees, subculturing multiplication, rooting formation

茶树组培快繁技术已逐渐达到实用化阶段。Sarithchandraetal^[1]以田间植株的茎节为外植体, 1年中从 50 个外植体得到了 36153 个小植株; 印度 Tata 茶叶有限公司利用组培快繁技术培育出了高产优质茶树, 田间成活率达 90%^[2]; 日本将组培获得的无性系胚

胎包埋在海藻酸钠中制成人工无性种子^[3]。

研究已就不同消毒时间和取材气候条件对福建乌龙茶成年茎段外植体污染率的影响、不同生长状态茎段对腋芽萌发的影响以及不同激素水平对福建乌龙茶成年茎段离体培养的影响做了一定探讨, 初步建立了

基金项目: 福建省果茶重大科技专项(2004NZ02-2)资助项目的部分内容。

第一作者简介: 郭玉琼, 女, 1974 年出生, 博士, 讲师, 研究方向为茶树生物技术与遗传育种研究。通信地址: 350002 福建省福州市福建农林大学园艺学院茶学系, Tel: 0591-83789461, E-mail: guoyq828@163.com。

通讯作者: 赖钟雄, 男, 1966 年出生, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为园艺植物生物技术与遗传资源。Tel: 0591-83789165, E-mail: Laizx01@163.com。

收稿日期: 2008-05-14, 修回日期: 2008-06-15。

福建乌龙茶成年茎段离体培养无菌系。试验在已有研究的基础上,对茶树成年茎段无菌系继代增殖和生根等方面进一步探讨,为建立乌龙茶成年茎段完整的茶树再生体系和茶树组培快繁研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试乌龙茶品种为铁观音,以第二腋芽的茎段作外植体,诱导生长1个月后的茎段丛生芽作为继代增殖研究材料,以此诱导增殖的无根芽苗为供试材料探讨其生根。

继代增殖培养基以MS为基本培养基,附加6-BA、IAA、GA₃三种不同浓度的激素。培养基附加20g/L蔗糖,8g/L琼脂糖,pH5.6。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌系继代增殖 当丛生芽长至1个月后,于超净工作台中,将芽从茎节上切下,置于继代培养基上增殖培养。1个月后观察记录继代增殖情况。

1.2.2 无菌系生根 当继代繁殖的丛生芽生长1~2个月

后,于超净工作台中,将丛生芽苗切割下来,接种到生根培养基中进行生根培养。

诱导茶树无根苗生根的培养基以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的IBA,30g/L蔗糖,7g/L琼脂糖,pH5.6。

培养室温度为(25±2)℃,每天连续光照12h,光强为2000lx。

2 结果与分析

2.1 激素对茶树成年茎段无菌系增殖的影响

为了获取数量最大的有效繁殖体,试验探讨了6-BA、IAA和GA₃不同激素的组合及其浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响。

2.1.1 不同6-BA浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响 6-BA作为细胞分裂素对增殖有极好效果,若无6-BA则外植体基本不增殖,表现出顶端优势明显的特性。6-BA的最适浓度不同研究者的研究结果存在差异^[4]。该试验不同6-BA浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响见表1。

表1 不同6-BA浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响

试验号	激素水平/(mg·L ⁻¹)			接种数/个	增殖率 (平均)	增殖生长情况
	6-BA	IAA	GA ₃			
1	0.5	0.2	0.2	32	2.13	在原有的基础上长大长粗
2	1.0	0.2	0.2	46	7.57	外植体生长粗壮,叶片正常
3	2.0	0.2	0.2	30	11.82	丛生芽多,弱小,叶片细长,出现玻璃化苗

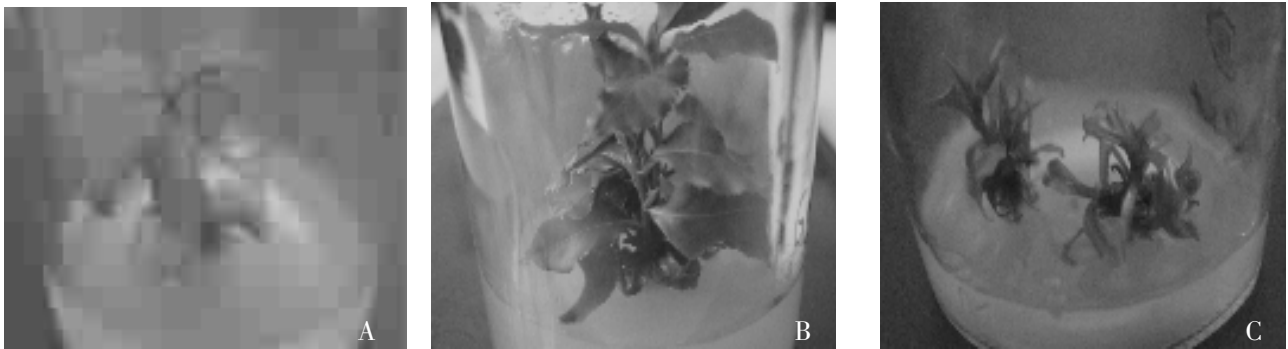


图1 茶树成年茎段无菌系在不同浓度6-BA的继代培养基上的增殖生长情况

注:A.6-BA浓度为0.5mg/L;B.6-BA浓度为1.0mg/L;C.6-BA浓度为2.0mg/L。

由表1可知,在IAA、GA₃及其它培养条件都一致的情况下,6-BA的浓度对茶树成年茎段继代增殖的增殖率有很大的影响(图1)。当6-BA的浓度为0.5mg/L,丛生芽的数量少,增殖率为2.13,增殖的外植体生长健壮,正常展叶(图1-A);随着6-BA浓度增加,丛生芽的数量随之增多,当6-BA的浓度为1mg/L,增殖率为7.57,增殖的外植体生长粗壮,展叶正常(图1-B);当6-BA的浓度达到2.0mg/L时,虽然丛生芽数量增多,增殖率达到11.82,但是丛生芽变得弱小,且影响展叶,

叶片变得狭长,并出现玻璃化芽苗(图1-C)。因此,6-BA的浓度以1.0mg/L为宜。

2.1.2 不同IAA浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响 Nakamura^[5]的研究表明组织培养过程中,新梢伸长会因生长素种类和浓度的不同而不同,各种生长素对新梢伸长的效果为IBA≥IAA≥2,4-D。黄亚辉^[6]的研究表明MS+2.0mg/LBA+1.5mg/LIAA+0.02mg/LGA培养基适于茎尖生长。该研究就不同IAA浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响作了探讨,结果见表2。

表2 不同 IAA 浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响

试验号	激素水平/(mg·L ⁻¹)			接种数/个	增殖率 (平均)	增殖生长情况
	6-BA	IAA	GA ₃			
1	1.0	0.2	0.2	46	7.57	外植体生长粗壮, 叶片正常
2	1.0	0.4	0.2	38	3.12	茎段切口出现少量愈伤组织
3	1.0	0.6	0.2	30	1.73	基部长出大量愈伤组织



图2 茶树成年茎段无菌系在不同浓度 IAA 的继代培养基上增殖生长情况

注: A. IAA 浓度为 0.2mg/L; B. IAA 浓度为 0.4mg/L; C. IAA 浓度为 0.6mg/L。

表2表明,在6-BA的浓度(1.0mg/L)、GA₃的浓度(0.2mg/L)及其它培养条件都一致的情况下,IAA的浓度与茶树成年茎段继代增殖丛生芽的生长状态有密切关系。加入适宜浓度的IAA(0.2mg/L)可加速切口的愈合,有利于芽的萌发和长出新的丛生芽,而且长出的丛生芽生长快(图2-A)。IAA浓度为0.4mg/L时,在茎段切口处出现少量的愈伤组织(图2-B);IAA浓度达到

0.6mg/L时,基部长出大量愈伤组织,不利于芽的萌发与生长(图2-C)。

2.1.3 不同 GA₃ 浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响 研究认为在培养基中加入一定量的赤霉素(GA₃),能加速芽梢的生长,若与BA配合使用加速芽梢生长的效果更明显^[7,8]。不同GA₃浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响见表3。

表3 不同 GA₃ 浓度对茶树成年茎段无菌系增殖的影响

试验号	激素水平/(mg·L ⁻¹)			接种数/个	增殖率 (平均)	增殖生长情况
	6-BA	IAA	GA ₃			
1	0.5	0.2	0.0	30	1.82	新梢抽发不明显
2	0.5	0.2	0.2	32	2.13	长丛生芽, 增殖外植体粗壮
3	2.0	0.5	0.2	30	9.27	长丛生芽, 抽发新梢, 部分玻璃化苗出现, 切口出现少量愈伤组织
4	2.0	0.5	0.5	30	7.62	长丛生芽, 抽发新梢, 部分玻璃化苗, 切口出现少量愈伤组织

结果表明,GA₃对茶树成年茎段离体增殖苗高生长有明显的促进作用。将从生芽上切下的芽体接种到不含GA₃的培养基1/2MS+0.5mg/L6-BA+0.2mg/LIAA上进行继代增殖,不长丛生芽,且原有的芽体无法抽发新梢;接种到添加0.2mg/LGA₃的2号培养基上,芽体长丛生芽,生长粗壮,并能抽发新梢。将从生芽上切下的芽体接种到3号培养基1/2MS+2mg/L6-BA+0.5mg/LIAA+0.2mg/LGA₃上继代增殖,芽体长丛生芽,且增殖的芽体粗壮并抽发新梢;当的GA₃浓度提高到0.5mg/L,抽发新梢的高度反而下降。

试验表明,附加适宜浓度的6-BA和IAA,虽然可获得较高的诱导率和芽数,但产生的芽比较小,且不易再生为正常植株。添加一定的GA₃后,获得了较高的诱导率,同时芽数也有了明显的增加,芽体生长正常,

均能再生植株。

2.1.4 最适茶树成年茎段无菌系继代增殖的培养基 该试验选用6-BA、IAA和GA₃三种激素,通过调控激素水平来提高增殖率和获得最大数量的有效繁殖体。试验表明适宜茶树成年茎段无菌系继代增殖的激素组合为1.0mg/L6-BA+0.2mg/LIAA+0.2mg/LGA₃,同时,为控制继代增殖过程中玻璃化苗的产生,该试验选用1/2MS为增殖的基本培养基,将琼脂糖的浓度提高到8g/L琼脂糖。因此,适宜茶树成年茎段无菌系继代增殖的培养基为1/2MS+1.0mg/L6-BA+0.2mg/LIAA+0.2mg/LGA₃,培养基中附加8g/L琼脂糖,30g/L蔗糖,pH5.6。在此继代培养基上进行增殖,茶树成年茎段平均增殖率为7.57,最高增殖率可达13,见图3。



图3 茶树成年茎段无菌系继代增殖最高增殖率可达 13

注:培养基为 1/2MS+1.0mg/L6-BA+0.2mg/LIAA+0.2mg/LGA₃。

2.2 不同浓度 IBA 对茶树离体繁殖生根的影响

生根是将壮苗阶段的组培苗转入生根培养基使其生根并生成完整再生植株的过程。一般而言,木本植物往往先诱导成愈伤组织,然后在愈伤组织上诱导长根。

试验探讨了不同浓度 IBA 对茶树再生植株生根的作用,将继代生长 1.5 个月的茶树无根苗接种到含不同浓度 IBA 的生根培养基上,培养 1.5 个月后进行观察记录,结果见表 4。

表 4 不同浓度 IBA 对茶树无根苗生根的影响

IBA 浓度/(mg · L ⁻¹)	接种数/株	生根数/株	生根率/%	生长情况
0	18	0	0	未生根
1	18	3	16.7	生根数少
2	18	7	38.9	正常生根,长出侧根
3	18	13	72.2	正常生根,长出侧根
4	18	11	61.1	切口形成大量愈伤组织

表 4 可知,生长 45d 的无根苗接种到不添加 IBA 的生根培养基上,未能生根,图 4-A;将无根苗接种到添加 1mg/LIBA 的培养基上,培养一段时间后,部分再生植株能生根,生根率为 16.7%,但生根数较少,仅为 1~2 根,图 4-B,也有部分再生植株不能正常生根;随着培养基中

IBA 浓度的提高,生根率随之提高,且每株再生植株的生根数也随之增加,为 3~4 根,并能长出侧根,图 4-C 所示;当 IBA 的浓度为 4 时,生根率反而下降,且在基部形成愈伤组织,这是由于 IBA 的浓度提高到一定程度后,有利于诱导愈伤组织,从而使发根率下降,见图 4-D。

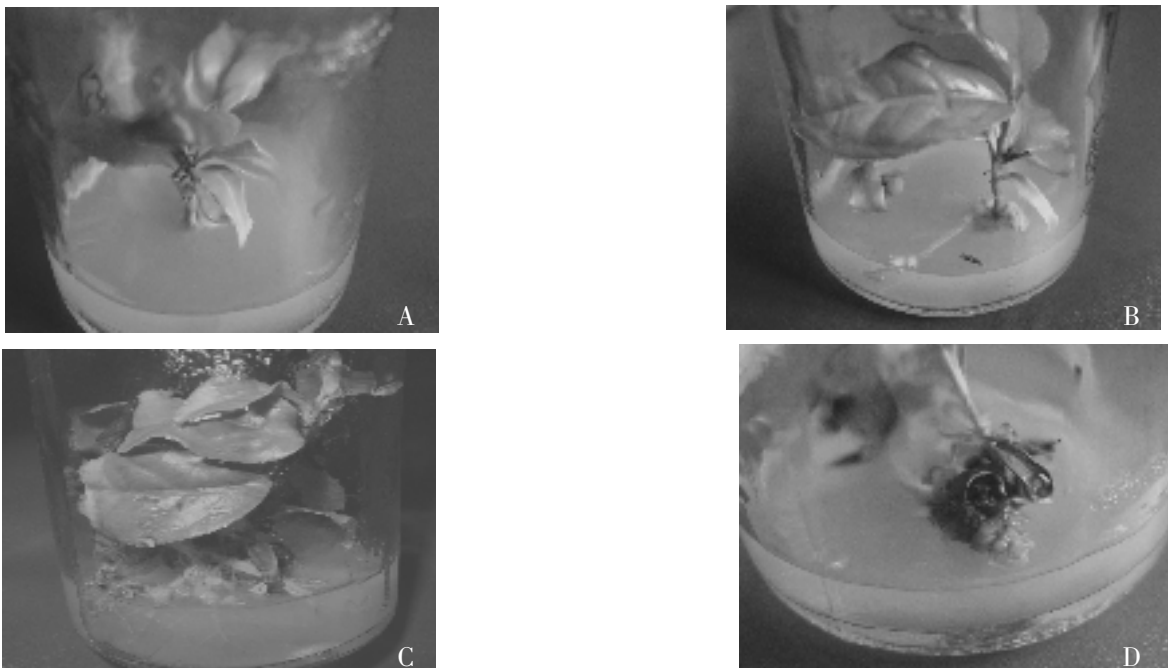


图 4 茶树无根苗在不同浓度 IBA 生根培养基上的生根状况

注: A.培养基不添加 IBA; B.培养基添加 1mg/LIBA; C.培养基添加 3mg/LIBA; D.培养基添加 4mg/LIBA。

综上所述, 适合铁观音茶树成年茎段离体繁殖生根的培养基为 1/2MS+3mg/LIBA+30g/L 蔗糖+7g/L 琼脂糖, pH5.6。

2.3 丛生芽生长时间对茶树离体繁殖生根的影响

试验以 1/2MS+3mg/LIBA+7g/L 琼脂糖+30g/L 蔗糖的培养基作为生根培养基, 探讨丛生芽生长时间对茶树离体繁殖生根的影响, 结果见表 5。

表 5 表明丛生芽生长时间对茶树离体繁殖生根有很大的影响。将继代生长 30d 的再生植株接种到生根

培养基上进行生根培养, 结果生根率为 21.7%, 且最早的生根时间为 67d; 随着继代生长时间的延长, 生根率提高, 最早生根的天数缩短, 将继代生长 45d 的再生植株接种到生根培养基上进行生根培养, 结果生根率提高至 40%, 最早生根时间缩短至 51d; 将继代生长 60d 的再生植株接种到生根培养基上进行生根培养, 结果生根率提高至 72.2%, 最早生根时间缩短至 32d。考虑到随着继代生长时间的进一步延长, 培养基中的营养成分会消耗与分解, 因此没有探讨更长继代培养时间

表 5 丛生芽生长时间对茶树生根的影响

丛生芽生长时间/d	接种数/株	生根数/株	生根率/%	最早生根时间/d
30	23	5	21.7	67
45	20	8	40	51
60	18	13	72.2	32

对茶树离体繁殖生根的影响。

3 讨论

3.1 外源激素对茶树成年茎段离体培养继代增殖的影响

植物离体培养继代增殖与外源激素的种类、浓度有很大的关系。一般而言, 中低浓度的激素组合促进植物生长, 高浓度激素组合抑制生长。试验表明 6-BA、IAA、GA₃ 等激素的浓度对茶树成年茎段无菌系继代增殖都有重要的影响。其中, 6-BA 的浓度主要影响茶树成年茎段继代增殖的增殖率, 适宜的 6-BA 浓度对于打破顶端优势, 促使腋芽萌发, 提高增殖率是有利的, 这与 Nakamura 等^[5]的研究 BA 可以增加芽梢的增殖率结果一致; IAA 的浓度主要影响丛生芽的生长状态, 当 IAA 浓度提高到一定程度, 会促进愈伤组织的生长而抑制丛生芽的生长; GA₃ 的浓度主要影响增殖苗高度, 但并不与抽发新梢的高度成正比, 当浓度过高, 高度反而下降。

3.2 茶树成年茎段离体培养继代增殖苗变异的控制

植物离体培养增殖的方式主要有三种途径: 腋芽萌发、诱导不定芽和体胚发生。对于无性繁殖的材料通常采用腋芽萌发或诱导不定芽, 再以芽繁殖芽的方法进行增殖; 如果采取体胚发生的方式, 首先诱导愈伤组织, 容易产生变异。因此, 茶树成年茎段离体培养继代增殖也是采用腋芽萌发或诱导不定芽, 而且在继代增殖中应剔除愈伤组织形成的芽苗, 选用正常的芽苗增殖, 来控制增殖苗的变异。

植物离体增殖若条件控制不当, 会出现叶片肿胀、半透明的玻璃化苗。在茶树成年茎段离体培养继代增殖试验中, 将琼脂糖的浓度由 6.0g/L 提高至 8.0g/L, 蔗糖的浓度由 20g/L 提高至 30g/L, 基本培养基选用

1/2MS 以降低大量元素的浓度, 从而有效地避免玻璃化苗的产生。

3.3 茶树成年茎段离体培养继代增殖体系的建立

茶树成年茎段离体培养继代增殖体系的建立, 必须考虑达到最高的增殖率, 同时还要兼顾繁殖体的遗传性稳定。因此, 铁观音茶树成年茎段无菌系继代增殖的最适培养基为 1/2MS+1.0mg/L6-BA+0.2mg/LIAA+0.2mg/LGA₃ 附加 8g/L 琼脂糖, 30g/L 蔗糖, pH5.6, 在这种培养基中继代增殖的丛生芽数量多, 而且丛生芽生长粗壮, 展叶正常。

3.4 茶树成年茎段离体培养诱导生根

在茶树成年茎段离体繁殖中, 诱导再生植株生根是一个重要的阶段。影响诱导生根的主要因素除基本培养基中的大量元素外, 选用合适的外源激素配比十分重要。

前人的研究表明较低浓度的大量元素一般较有利于根的形成。刘德华等^[9]的研究表明根分化在 1/2ER、1/2MS 培养基上效果较好。Nakamura 的研究认为, 在降低了大量元素浓度的条件下即由 MS 调整为 1/2MS, 发根率和根的最大长度都比 MS 的原浓度为好^[5]。Seneviratne 的研究表明, 发根只发生在 30g/L 蔗糖的条件下, 当蔗糖的浓度减为 20g/L 或 15g/L 时, 不能诱导发根^[10], 试验无根苗生根培养中也是附加 30g/L 蔗糖。

对于外源激素适合的配比, 研究表明, IBA (0.05~100mg/L)、NAA (0.05~75mg/L) 和 IAA (0.5~75mg/L) 都能诱导再生植株生根, 各生长素对根诱导的作用顺序为 IBA≥NAA>IAA>2,4-D^[5]。

试验结果表明, 适合茶树成年茎段离体繁殖生根的培养基是 1/2MS+3mg/LIBA+30g/L 蔗糖+7g/L 琼

脂糖,于温度为(25±2)℃,每天连续光照 12h,光强为 2000lx 的培养室中进行培养,可完成正常生根。当然,诱导生根有基因型之间的差异,不同品种所要求外源激素的水平也不相同。

试验探讨了不同继代生长时间对茶树离体繁殖生根的影响,表明随着继代生长时间的延长,生根率提高,最早生根的天数缩短。但是,随着继代生长时间的延长,应考虑培养基中的营养成分会消耗与分解。

参考文献

- [1] SARATHCHANDRA T M, UPALIP D, ARLPRA GASAM P V. Progress towards the commercial propagation of tea by tissue culture techniques[J]. S L J Tea Sci, 1990, 59(2):62-64.
- [2] LAI R. High technology in tea [J]. The Journal of Tea World, Tea Trade, 1995, 3(5):20-22.
- [3] 江春园. 生物技术在茶树良种选繁中的应用[J]. 茶叶通报, 1999, 21(3):21-22.
- [4] 曾亮, 蔡利娅, 黄建安, 等. 茶树微繁殖技术的研究进展[J]. 福建茶叶, 2006, (1):3-6.
- [5] NAKAMURA Y. Effects of the Kind of Auxins on Callus Induction and Root Differentiation from Stem Segment Culture of *Camellia sinensis* [J]. Chagyo Kenkyu Hokoku, 1988, 68:1-7.
- [6] 黄亚辉. 茶树茎尖组织培养研究初探[J]. 茶叶通讯, 1992, (2):18-20.
- [7] 刘德华, 廖利民. 茶树叶片组织培养的初步研究[J]. 福建茶叶, 1989 (2):13-16.
- [8] 向邓云. 植物生长调节物质对植物组织培养形态建成的调节控制. 涪陵师专学报[J]. 2001, 17(3):119-123.
- [9] 刘德华, 廖利民, 周带娣. 茶树组织培养的研究 II. 腋芽微繁殖和叶微繁殖技术的研究[J]. 湖南农学院学报, 1991(增刊):589-599.
- [10] 成浩, 杨素芳. 茶树微繁殖技术的研究和应用[J]. 中国茶叶, 1996, (2): 29-31.