

茶树组织培养研究综述

唐君曼¹ 余飞燕² 刘婧智¹ 刘爽¹ 冯雪薇¹

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院 陕西 咸阳 712100;

2. 西北农林科技大学 林学院 陕西 咸阳 712100)

【摘要】从茶树组织培养无菌体系的建立、不同外源激素与培养基的影响、茶树不同部位的组培、茶树组培抗褐化方法等方面,对近年来茶树组培快速繁殖技术的研究进展进行了综述,同时提出目前研究中存在的几个问题及今后的发展方向。

【关键词】茶树;组织培养;研究;综述

茶树 - 中国的传统特色经济作物。近年来,随着茶树产业的发展,人们对优质茶树的需求有所增加。传统的育种方法已不能跟上步伐,满足人们的需求。植物组织培养,作为一种植物快速繁殖技术,具有高效,生长周期短,繁殖速度快,环境因子便于控制,节省材料等一系列的优点,除此以外,还可以使幼苗脱毒,保持植物原本的优良性状,如果能在短期内进行相关操作,而大量获得相同特征的植物用以在茶树繁殖中应用。但我国茶树组培与其他组织培养相比起步较迟,同时茶树组织培养存在有可重复性差、外植体生长缓慢、外植体易褐化等问题,所以茶树的组织培养到目前为止仍没能建立高效完整的再生体系^[1]。本文主要就国内茶树组培相关研究进行了归纳陈述,以期对相关科研工作提供借鉴。

1. 无菌体系的建立

在茶树的组织培养中,防止细菌的污染是最基础,最关键的条件。外植体无菌体系的建立,能有效地防止细菌感染。因此,建立一个完整的消毒系统是茶树的组织培养过程中的关键一步。

1.1. 取材部位及时间

在取材部位及时间上,陈菁^[2]等认为茶树组织培养的外植体材料选用春季一芽二叶时期二叶位的成年茶树茎段为宜,在一年中其他季节和其他部位所取得的材料中,它更容易消毒,诱导不定芽效果也更好。究其原因是因为春天的气候正在变暖,植物生长旺盛,而植更容易发芽。而夏季气候湿热,植物生长减缓,但这样的气候却极其适合微生物生长,夏季的外植体通常因无法彻底消毒造成高污染率。

1.2. 消毒方式

在消毒方法上,史俊^[2]所选择的第二和第三腋芽作为外植体则取材于一年内生长的半木质化分支。为达到灭菌的效果,通过洗涤剂,自来水,酒精,升汞,无菌水等材料进行不同时间段的处理。而王贞红,李永霞^[3]选用的材料是茶枝茎段,消毒则是用75%的酒精浸泡1min,而后用无菌水冲洗3次,最后经过6min的0.1%氯化汞消毒,7次无菌水冲洗。周国兰,黄燕芬^[4]等人则是在前期处理中特别加入了4~5mg/L的抗坏血酸溶液处理20min以防褐化。而赖钟雄^[5]等人则将2~3cm长的茎段(带有腋芽且叶片剪去3/4)作为外植体。用洗衣粉,酒精及升汞溶液进行相应处理,最后为清理表面残留,用无菌水反复5次冲洗。

2. 不同培养基及激素的影响

2.1. 不同培养基

对于同一品种茶树愈伤组织的诱导,培养基种类不同其生长状态也不同。王贞红^[3]等分别采用1/2MS、MS、WPM、White 4种培养基,将不同品种的茶树外植体分别接种到这几种培养基中,探索比较不同培养基中茶树外植体增殖生长的不同。结果表明,MS培养基的诱导效果最好,成功率为70%以上。另外,茶树组织培养的过程中,外植体褐化程度及腋芽萌发生长也受培养基影响,培养基不同,所带来的影响也不尽相同。对此,周国兰^[4]等做了相应研究试验。他们将外植体分别接种到1/2MS培养基与MS

培养基中,保证二者激素配比相同。结果发现,1/2MS培养基更利于其生长,因为其腋芽萌动时间缩短了6d,外植体褐化率降低5%,生长状态良好。

2.2. 不同激素

在组培实验中,不同激素产生的影响不尽相同。史俊^[2]就不同浓度的激素6-BA、NAA对碧云茶树的丛生芽诱导的影响进行了研究,结果表明相比其他浓度,在6-BA浓度为2.0mg/L时,对外植体的诱导分化更为有利;NAA对茶树芽增殖比例的影响不大,但对于组培苗生长而言2.0mg/L的NAA更适宜。基于此,得MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂0.7%组合而成的培养基,对于茶树外植体的诱导和增殖更为有利。还有实验表明芽诱导培养基MS+6-BA1.5mg/L+IBA0.1mg/L为宜^[6],MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L+GA₃

3.0mg/L更适宜芽的生长繁殖^[6]。郭秀宏^[7]等研究了6-BA、NAA单独因素及其组合的不同比例对茶树组培苗的诱导及生长的影响,发现单独使用6-BA,随着浓度的升高,虽然继代苗增殖系数增大,但并不大影响苗的高度;而NAA单独使用时,苗高度变化明显,且在愈伤组织形成上高浓度NAA可促进。而两种激素配合使用,试验表明当6-BA与NAA浓度比在7.5~15范围内时,生长较好,当比值为15时,继代苗增殖生长更为有利,其平均株高较大,增值率较高。另有研究表明,继代培养基以MS+6-BA1.5mg/L+IBA0.2mg/L为宜,增殖达4.5倍^[7]。培养基1/2MS+IBA0.3mg/L更利于生根,甚至达到90%^[6]的生率。不同种类的植物生长调节物及其配比对茶树胚状体分化和形成小植株的影响,颜慕勤^[8]等对此进行了研究,结果表明,单独使用2,4-D,其浓度低于1.5mg/L时,可加快胚状体的形成。而若要提高胚状体分化率时就将2,4-D与KT或BA配合使用。研究表明,在茶树组织培养中,GA₃的作用尤为重要。郭秀宏^[7]等研究得出GA₃配合低浓度NAA会产生非常好的使用效果,并且GA₃可抑制继代培养过程中组培苗愈伤组织生长,并且这种效果在隔代时最好。同时GA₃可促进腋芽的萌发与分化^[9]。

3. 组培外植体种类及培养注意事项

自1960年代以来,在中国茶树的组织培养研究已经开始,并用不成熟的组织已经成功进行了器官或植株再生^[10],这已经取得了很大进展,但却很少能把营养器官作为外植体进行组培并获得成功。不同外植体其离体反应的能力和愈伤组织开启时间是不同的。相关研究表明,在愈伤组织诱导率中,叶片最高,相比于根尖和嫩茎^[11]。

不同部位其处理方式与接种条件都不相同。以茶树枝条作为外植体的实验很多,韦景枫^[6]等通过对古茶树的腋芽离体培养来研究其最佳条件。试验结果表明,在不同阶段运用适宜外植体生长的培养基,其生根率可达到90%,数量变为原来的4~5倍。史俊^[2]等用当年春季新萌发出的半木质化碧云茶树枝条,切成小段每段带一个腋芽作为试验材料,接种于MS基本培养基上,结果发现其茎段基部形成的愈伤组织的长势更好。同时,周国兰^[6]等

选取茶树茎段(带腋芽)作为外植体进行试验。发现外植体为茶树带腋芽茎段进行组培,夏秋季污染现象及其严重。因此,茶树茎段组培最好选择春季嫩梢带腋芽的材料。而邬秀宏^[7]等则以‘渝茶1号’当年生还没有木质化的新梢作为初代组织培养的外植体,后进行了经过初代诱导后培养的第1代苗的实验,得到的继代苗叶绿、茎粗、节间较长、愈伤较少。除了直接使用各生长阶段的枝条外,由于木本植物的离体培养通常比较困难,因而茶树离体培养也少以成年树茎段为外植体。然而福建农林大学的陈菁、赖钟雄^[9]等的茶树组织培养试验则选用乌龙茶品种武夷名丛中的成年树茎段作为外植体,实验发现取材的季节不同,外植体生长明显不同,实验发现腋芽和茎段外植体都适合在取材于春季。因为当外植体生长旺盛时,褐变明显减弱。除此之外,也常用种子作为外植体,王贞红^[3]等选择易贡川茶、重庆川茶等五种茶树种子,将其无菌实生苗切成1~1.5cm的茎段,作为外植体,通过改变培养基和激素的种类及浓度,研究比较其对茶树组培生长的作用。此外还有颜慕勤^[8]等使用优良品种龙井茶种子作为外植体,将其在无菌条件下剥除外种皮,从子叶基部切取0.5立方厘米的小块置于改良ER固体培养基进行培养,最后获得了通过使用茶树子叶生成胚状体、假珠芽和切口上的红色愈伤组织再培养成完整植株的快速获得大量茶树组培苗的途径。

4. 褐化问题研究

茶树中酚类物质含量比其它木本植物高,因此在茶树组织培养中,降低褐化率是提高其组培成活率的重要因素。研究表明:茶树中的酚类物质会随着培养基中无机盐浓度的升高而增加,从而加重褐化^[12],但是当MS培养基中铁盐浓度减半时,组培苗生长良好且褐化率降低。赵玮^[13]就此做了相关研究,发现茶树茎段和茶树愈伤组织的褐化率会随着铁盐浓度的增加而增加。其中,CK的褐化率最低,其次为0.25倍铁盐浓度,再次为0.5倍铁盐浓度的,当铁盐浓度达到两倍时,植株全部褐化。从各方面考量,0.5倍铁盐培养基较适合茶树茎段和茶树愈伤组织的生长,而在其他铁盐浓度的培养基中,组培苗均生长缓慢,以至于死亡。在杨亚萍^[14]的实验中,通过研究证实了在MS标准铁盐的0.5倍条件下,茶树外植体生长表现较好。赵玮^[13]的研究还发现褐化率会随时间延长而升高,但若在培养基中单独添加抗氧化剂、吸附剂能有效降低褐化率。另外,培养到30d时,Na₂S₂O₃处理的褐化率最低。同时不同配比抗氧化剂和吸附剂对降低褐化率效果也比较明显,其中用AC0.25g/L+Na₂S₂O₃0.50g/L的处理效果最好。黄燕芬、周国兰、赵华富^[4]的研究还表明,对外植体消毒及处理方式不同,褐化程度也不同。1%的升汞溶液消毒时间越长褐化程度越高。对于外植体的处理,杨亚萍^[14]的实验还提到通过自来水冲洗过夜,以及15min的45℃温水浸泡可达到降低褐化率的目的。邬秀宏^[5]认为,尽量减小叶片切面面积和操作时尽量减少外植体受损面积,均能够降低褐化面积。除此之外,雷攀登、孙俊、张正竹^[17]发现低温可以抑制酚类化合物的合成从而可减轻外植体褐化率。将接种后的茶树腋芽在25℃下培养褐化率达38.7%,而在和8℃条件下培养,褐化率仅为20.6%。

5. 问题与展望

组培技术是快速繁殖茶树的理想途径,同时也是研究茶树次生代谢产物的合成机制和茶树种质资源的保存的有效方法。但是目前茶树组培研究存在如下一些问题:

(1) 茶树的组织培养起步比较晚,研究不深,并且茶树的组培成功率受多种因素影响,如外植体的来源、部位和取材时间等限制范围较广,导致其可重复性差的局限性。因此,茶树组织培养完整的高频再生体系到目前为止仍未建立^[1]。

(2) 对外植体内代谢过程、物质合成途径研究较少,导致组培实验目的多停留在选出最佳培养基种类和最适浓度的生长调节剂之上。

(3) 茶树中酚类物质含量比其它木本植物高,因此在茶树组织培养愈伤组织诱导阶段中,外植体褐化这一因素严重影响了组培成活率。赵玮的实验表明,在0.50倍标准铁盐浓度MS培养基+Na₂S₂O₃0.50g/L+AC0.50g/L条件下外植体褐化率较低,而且生长表现良好^[13]。而对于茶树组培外植体褐化问题,还没有得到根本的解决,需要进一步的研究。

(4) 古茶树组培技术已取得突破性进展,但与其它植物组培相比,生长缓慢问题有待于进一步解决。

茶树组培技术的发展有利于茶树种质资源的保存,并且茶树组织培养技术节约原材料可迅速大量繁殖出遗传性状一致的植株,不受气候、时间的限制,有利于良种茶树的推广,可以使优异珍稀种质得到最充分的利用。因此加快茶树组培再生体系的建立,提高古茶树组培的速率与效率,对于茶树产业的发展有重大意义。

参考文献

- [1] 郝 娟. 茶树组织培养研究进展[J]. 南方农业, 2017(33): 117-118.
- [2] 史 俊, 许建忠. 不同激素对碧云茶丛生芽增殖培养的影响实验. 西部林业科学. 1672 - 8246 (2011) 04 - 0070 - 03
- [3] 王贞红, 李永霞. 不同激素和对培养基茶树愈伤组织诱导的影响. 中国园艺文摘. 1007-5739 (2015) 13-0012-01
- [4] 周国兰, 黄燕芬等人. 湄潭苔茶良种组培快繁技术初探. 贵州农业科学. 1001-3601 (2012) 01-0006-0019-03
- [5] 赖钟雄, 郭玉琼, 孙威江. 乌龙茶品种武夷名丛成年材料的离体培养1671-5470 (2011) -03-0257-07
- [6] 韦景枫、蒙先举等. 千年古茶树组培技术研究[J] 现代农业科技, 2015, 13: 12~14
- [7] 邬秀宏、杨娟等. 不同激素配比对‘渝茶1号’继代增殖生长的影响[J] 西南农业学报, 2013, 26(4): 1454~1458.
- [8] 颜慕勤、陈平. 茶树子叶离体培养形成胚状体的研究[J] 林业科学, 1983, 19(1): 25~30
- [9] 陈菁、赖钟雄等. 乌龙茶品种武夷名丛成年材料的离体培养[J] 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(3): 257~263
- [10] 程柳, 汤浩如. 茶树组织培养及影响因素[J]. 安徽农业科学, 2007(7): 1960-1963.
- [11] 欧少云, 陈春兰, 郑正. 清远笔架茶不同器官诱导愈伤组织的研究[J]. 科技资讯, 2011(24): 3.
- [12] 雷攀登、吴琼、徐奕鼎等. 茶树腋芽离体培养中的褐化控制研究[J]. 中国农学通报. 2012, 28(7): 190-193
- [13] 赵玮. 茶树组织培养中外植体褐化的控制[J]. 甘肃农业科技. 2008(6): 10-12
- [14] 杨亚萍, 郑新强. 茶树组织培养中的褐化控制研究[J]. 茶叶, 2013, 39(1): 3-7.
- [15] 黄燕芬、周国兰、赵华富. 降低茶树组织培养中外植体褐化程度的研究[J]. 西南农业学报. 2009(6): 1492-1495
- [16] 邬秀宏, 李中林, 陈正明等. 茶树组织培养中外植体褐化控制的研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(3): 1065-1068
- [17] 雷攀登、孙俊、张正竹. 茶树腋芽初代培养过程中外植体褐化的控制措施研究[J]. 茶叶通报. 2010. 32(3): 101-104