

油茶组织培养研究

颜凤霞, 田凡, 侯娜, 王港, 文骏, 王莲辉*

贵州省林业科学研究院, 贵阳 550005

摘要: 为了筛选最适合油茶诱导腋芽生长、分化及油茶生根的培养条件及试管苗移栽基质, 以油茶带腋芽的茎段为外植体, 通过不同激素组合, 激素配比等方式进行试验。结果表明: 油茶腋芽诱导培养基为 MS, 茎段在含有 MS + 2.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA + 3% 糖 + 0.4% 琼脂的培养基中芽的增殖能力较强; 适宜的生根培养基为 MS + 2.0 mg/L IBA + 3% 糖 + 0.4% 琼脂, 适宜试管苗移栽基质为河沙: 珍珠岩 = 2: 1, 移栽成活率达 98%。

关键词: 油茶; 组织培养; 培养条件

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.022

Tissue Culture Technology of *Camellia oleifera*

YAN Feng-xia, TIAN Fan, HOU Na, WANG Gang, WEN Tao, WANG Lian-hui*

Guizhou Academy of Forestry, Guizhou Guiyang 550005, China

Abstract: In order to select the culture conditions of the most suitable induced lateral bud growth, differentiation and differential rooting, taking stem with axillary bud as explant, tested through different hormone combinations and hormone proportion. The results were as follows: the suitable induced lateral bud growth was MS + sucrose 30 g/L + Agar 4.0 g/L, and its suitable differentiation medium was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + sucrose 30 g/L + Agar 4.0 g/L, the differential rooting was MS + 2.0 mg/L IBA + sucrose 30 g/L + Agar 4.0 g/L. The substrate of suitable tube seedlings transplanting was a mixture of river sand and perlite, ratio of 2: 1, transplanting survival rate was 98%.

Key words: *Camellia oleifera*; tissue culture; culture conditions;

油茶 (*Camellia oleifera*) 属山茶科山茶属植物, 为常绿小乔木或灌木, 主要分布于我国长江流域及以南的 18 个省份和直辖市, 是我国南方主要的木本食用油料树种^[1], 与油棕、橄榄和椰子并称为世界四大木本食用油料树种^[2]。油茶全身都是宝, 茶籽、茶树、茶壳、果皮等有可以加工利用, 具有重要的经济利用价, 广泛用于食品、工业、医药、保健、化妆品等多个行业, 因此, 油茶被誉为“东方橄榄油”, 有“绿色油库”之美誉^[3]。采用常规育种方式育种油茶周期较长, 而且受远缘杂交不亲和等条件的限制, 阻碍了油茶的开发和利用^[4,5]。利用组织培养技术可以在短时间内将优良的单株大量繁殖, 保证母株的优良性状, 而且还具有繁殖周期短、速度快、节省材料、苗木生命力较强等优点^[6]。目前, 广西、湖南、福建等油茶主产区都对其开展了组培研究, 但都处于研究阶段, 还未实施大规模组培苗种植。前人

用油茶的花药、叶片、枝条进行了组织培养研究, 均诱导出了愈伤组织^[6-11]。本文以油茶带有腋芽的茎段为外植体, 进行组织培养试验, 筛选最适合油茶诱导腋芽生长、分化及油茶生根的培养基, 以期油茶优良无性系快速繁殖和大规模推广提供技术保障, 推进油茶产业的发展具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试油茶材料采自贵州省林科院油茶基地, 来源于施秉油茶扦插一年生植株新抽出的幼嫩枝条, 选长势较旺盛, 无病虫害, 粗壮直立的嫩茎, 切取除顶芽外的 4~10 cm 的茎段作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒

将采集的油茶外植体, 除去叶柄及叶片, 切成带有 1~2 个腋芽, 长约 1.5 cm 的茎段, 将其用洗洁净清洗, 在流水下冲洗 2 h 后备用。在超净工作台上用 70% 酒精将清洗好的茎段灭菌 30 s, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 4 min 后立即用无菌水冲洗四至五

收稿日期: 2015-05-08

接受日期: 2015-07-15

基金项目: 油茶优质苗木规模化繁育技术体系研究 (2009-6004-3); 贵州本地油菜良种扩繁及高产栽培技术示范推广 (2015-5016)

* 通讯作者 Tel: 86-851-3921038; E-mail: gzwanglianhui@163.com

次,并用灭菌滤纸吸干外植体表面水分。将茎段两端受损处切除,接种于培养基上。

1.2.2 试验方法

本试验采用 MS、DKW、WPM、White 培养基,附加不同浓度的植物生长调节激素 BA、Kt、IBA、NAA,单位均为 mg/L(单位下同),从中筛选最适宜腋芽诱导、分化、增殖、壮苗、生根的培养基。所有培养基均添加 0.4% 琼脂和 2% 蔗糖,pH 为 5.8~6.0。接种后培养条件为:温度(25±2)℃,光照强度 30~40 μmol/m²·s,光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对腋芽诱导的影响

将消毒好的油茶外植体分别接种在不加任何激

素的 MS、DKW、WPM 和 White 四种培养基上,观察诱导产生腋芽的情况,统计诱导率(产生腋芽的外植体占外植体总数的百分率)。

无菌材料培养 20 d 左右腋芽开始萌动,随后苞片张开,露出绿色小芽,70 d 后,新抽嫩梢部分长达 4~5 cm。White 培养基上腋芽萌发仅出现芽苞状态继而褐化,几乎未见植株的高生长;DKW 和 WPM 培养基上油茶腋芽极少萌发,嫩茎细长,生长量小,DKW 培养基上有芽褐化现象,WPM 培养基上有少部分芽枯梢进而死亡现象;MS 培养基上芽梢生长较快,嫩茎粗壮,叶片不褐化,植株生长正常。四种培养基上油茶腋芽诱导生长情况见表 1。综合分析可知,MS 培养基对油茶的腋芽诱导及高生长影响较大,宜采用 MS 作为基本培养基。

表 1 不同培养基对诱导初始腋芽的影响

Table 1 The influence of different culture medium for inducing initial axillary bud

培养基 Medium	接种数 Inoculation number	诱导叶腋芽数 No. of induced bud	诱导率 Inductive rate(%)	备注 Note
MS	24	19	79	部分嫩芽伸长到 4 cm
DKW	24	14	58	芽萌发但有褐化现象
WPM	25	10	40	少部分芽梢枯萎
White	23	5	22	植株高生长缓慢

2.2 不同激素组合及浓度对油茶腋芽分化的影响

以 MS 为基本培养基,分别添加不同种类及不同浓度的激素(具体激素种类和浓度组合见表 2),以诱导油茶腋芽分化。从表 2 可知,当生长素 NAA 浓度一定,均为 NAA 0.1 mg/L 时,分别添加不同浓度的 BA、Kt,腋芽增殖分化的数量和芽生长表现存在明显差异;Kt 与 NAA 组合的培养基,NAA 浓度一定,在一定的浓度范围内,油茶腋芽分化率随 Kt 浓度的增加而增加。当 Kt 浓度为 2.0 mg/L 时,其分化率最大,达到 230%,但该培养基上长出的芽长势差,部分芽体扭曲变形,叶子呈褶皱状,正常芽数少。当 Kt 浓度为 3.0 mg/L 时,其芽分化呈下降趋势,植株呈玻璃化现象,说明 Kt 对芽的分化不利,影响了植株的正常表现;而 BA 与 NAA 组合的培养基,随着 BA 浓度的增加,芽的分化较敏感,腋芽的诱导数量也不同程度地发生变化,当 BA 浓度为 0.1~2.0 mg/L 时,腋芽的分化率随 BA 浓度的增加成递增趋势,在 BA 浓度为 2 mg/L 时,腋芽增殖效果最好,分化率达 362%,芽的增殖速度较快,芽体生长健壮

(如图 1)。当 BA 浓度达到 3.0 mg/L 时,腋芽的分化率反而下降,为 174%,说明高浓度的 BA 对芽的增殖有抑制作用。



图 1 油茶腋芽分化

Fig. 1 Axillary bud differentiation

所有 BA 与 NAA 组合的培养基上无论芽分化率如何,苗的质量较好,表现出较强的生长势,培养 80~90 d 的腋芽成丛生状,分割芽丛继代增殖培养,又可增殖形成新的芽丛,最高时,增值率为每丛 3~4 个芽,多次继代,芽仍然保持较强的增殖能力,所以诱导油茶芽分化的最适培养基的为 MS + BA2 mg/L + NAA0.1 mg/L。

表2 不同激素及浓度对腋芽分化的影响

Table 2 different hormone and concentration effects on axillary bud differentiation

序号 No.	培养基 Medium	BA (mg/L)	Kt (mg/L)	NAA (mg/L)	接种芽数 (个)	分化芽数 (个)	分化率 (%)
1	MS	0.1	0	0.1	23	6	26
2	MS	0.5	0	0.1	20	19	95
3	MS	1	0	0.1	22	54	245
4	MS	2	0	0.1	21	76	362
5	MS	3	0	0.1	23	40	174
6	MS	0	0.5	0.1	23	18	78
7	MS	0	1.5	0.1	21	29	138
8	MS	0	2	0.1	20	46	230
9	MS	0	3	0.1	19	39	205

2.3 不同浓度的 IBA 对油茶诱导生根的影响

以 1/2 MS 作为基本培养基,添加不同浓度的 IBA(见表 3)作为生根培养基诱导无菌油茶苗生根,培养 30 d 左右,油茶基部切口处有如黄豆粒大小致密白色愈伤组织产生,再经 30 d 天的培养,愈伤组织处产生白色的幼根,20 d 后形成 34 厘米长的多条细根。

从表 3 可知,当培养基中未添加 IBA 时,油茶不生根,添加不同浓度的 IBA 时油茶都有不用程度的生根,说明 IBA 对油茶生根有较大程度的影响。在

一定的范围内(1~2 mg/L),生根率随 IBA 浓度的增大而增大,当 IBA 浓度为 2 mg/L 时,生根根条数多且粗壮,达到 3~4 条,生根率达到最大,为 85%,且植株生长健壮;随着 IBA(3~5 mg/L)浓度的增加,生根数量下降,生根率降低,植株生长不良,总体苗质下降,严重影响了试管苗的移栽成活率。结果表明高浓度的 IBA 对油茶的生根具有抑制作用,所以诱导油茶生根的最适培养基为 1/2 MS + IBA 2 mg/L。

表3 不同浓度的 IBA 对油茶诱导生根的影响

Table 3 The influence of different concentration of IBA on differential induced root

序号 No.	培养基 Medium	IBA (mg/L)	接种苗数 Inoculated number	生根苗数 Rooting number	生根率 Rooting rate (%)
1	1/2MS	0	20	0	0
2	1/2MS	0.05	20	49	24.5
3	1/2MS	0.2	20	12	60
4	1/2MS	1	20	14	70
5	1/2MS	1.5	20	15	75
6	1/2MS	2	20	17	85
7	1/2MS	3	20	8	40
8	1/2MS	4	20	7	35
9	1/2MS	5	20	4	20

2.4 油茶组培生根苗移栽

当油茶苗在生根培养基中根长至 3~4 cm 时,在温室内打开瓶盖炼苗 2 d 后(通风和散射光),小心洗净根部琼脂,移栽至灭过菌的混合基质上(腐

殖土和珍珠岩 = 2:1),浇足水,保持室内湿度 90% 以上,温度控制在 24~26 °C。注意遮阴和通风换气,每 2 d 喷一次水,大约 20 d 左右度过缓苗期,两个月后小苗长势挺拔,有的长出幼嫩新叶,这时可以

移栽到自然光下正常生长、管理。在新的环境下,油茶组培苗的移栽成活率可达80%以上。

3 讨论

本研究筛选出了适合油茶诱导腋芽生长、分化及油茶生根的培养条件及试管苗移栽基质,在前人的研究基础上有一定程度的突破,在实际应用及生产过程中还应该进一步优化各生长阶段的技术。油茶在诱导分化过程中,所用的激素种类(Kt、6-BA)有限,其他的激素如Zt、2ip、TDZ等并没有与之很好的组合及配比,故可进一步研究。再者本试验油茶取材也有局限性,对于胚及未成熟胚及各个生长阶段的嫩梢没有作对比试验,导致的结果不太理想,上述问题有待进一步深入研究。

参考文献

- Li XS (黎先胜). Study on the development and utilization of *Camellia oleifera* resources. *J Hunan Instit Technol* (湖南科技学院学报), 2005, 26: 127-129.
- Zhang HD (张宏达). The system study of camellia plants. *J Zhongshang University* (中山大学学报), 1981.
- Ye Z (叶子). Delicate cate camellia. *China's Food* (中国食品), 2006, 15: 24-25.
- Huang LY (黄莉雅), Zhang RQ (张日清), Mao JL (马锦林), et al. Screening of induction conditions of callus and bud in *Camel iaoleifera*. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2010, 28: 30-34.
- Wen L (闻丽), Zhang RQ (张日清), Li JA (李建安), et al. Application prospect of *Camellia germplasm* improvement status and Anther Culture. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2004, 4: 73-77.
- Tang GT (唐国涛), Zhang HY (张汉永), Huang JR (黄锦荣), et al. A preliminary study on tissue culture technology of *Camellia oleifera*. *Guangdong Forestry Sci Technol* (广东林业科技), 2014, 30(3): 25-29.
- Li JA (李建安), Hu FM (胡芳名), Tan XF (谭晓凤), et al. Anther culture (pollen) and the application in economic forest improved varieties. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2002, 20(4): 68-70.
- Li JA (李建安), Zhang RQ (张日清), Shi MW (石明旺), et al. *Camellia* callus induction of anther culture of the two species. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2003, 21(3): 36-38.
- Ding ZL (丁植磊), Zhang RQ (张日清), Liu YQ (刘友全), et al. 12 species of *Camellia* callus induction and subculture. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2007, 25: 20-24.
- Wang R (王瑞), Chen YZ (陈永忠). Study on induction of *Camellia oleifera* leaf callus. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2009, 27(2): 35-39.
- Wang R (王瑞), Chen YZ (陈永忠). Research progress of culture and plantlet regeneration of *Camellia oleifera* tissue. *Hunan Forestry Sci Technol* (湖南林业科技), 2006, 33(5): 63-66.
- Zheng M, Liu C, Pan F, et al. Protective effects of flavonoid extract from *Apocynum venetum* leaves against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31: 421-428.
- Zheng M, Liu C, Pan F, et al. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from *Apocynum venetum* leaves: possible cellular mechanisms. *Phytomedicine*, 2012, 19: 145-149.
- Zhao HX (赵海霞), Zhou XJ (周小江), Hu Y (胡园), et al. Protective effect of six Kaixin San formulas on nerve cells injured by different materials. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 3472-3476.
- Abbas G, Naqvi S, Erum S, et al. Potential antidepressant activity of *Areca catechu* nut via elevation of serotonin and noradrenaline in the hippocampus of rats. *Phytother Res*, 2013, 27(1): 39-45.
- Khan S, Abbas G, Ahmed FS, et al. Effect of dichloromethane fraction of *Areca catechu* nut on monoamines associated behaviors and tyramine pressor sensitivity in rodents. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27: 303-307.

(上接第112页)