

金花茶组培芽不定根诱导技术研究

刘芳, 俞建妹, 刘玉军, 沈遐, 黄艳 (广西壮族自治区南宁树木园, 广西南宁 530031)

摘要 [目的]筛选出高生根率培养基配方和适宜的光照条件。[方法]以金花茶组培壮芽为材料,研究培养基养分含量、生长素种类组合和浓度对比对金花茶组培芽生根的影响,筛选适宜生根的光照条件。[结果]J、1/2 J、1/3 J 和 2/3 J 基本培养基对金花茶组培芽生根率的影响存在显著差异,大小排序为 2/3 J>1/2 J>1/3 J>J;不同浓度的 IBA、IAA、NAA 组合对金花茶组培芽生根率影响差异显著,正交极差分析和方差分析结果显示,IAA 起主导作用,IBA 起辅助作用;在 2/3J 培养基中添加不同浓度 Ca^{2+} ,结果表明培养基 Ca^{2+} 浓度以 2/3J 的 79.20 mg/L 基础上添加 19.60 mg/L 处理对金花茶组培芽生根培养比较适宜。[结论]最佳诱导金花茶组培芽生根培养基配方为 2/3J+ Ca^{2+} 16.90 mg/L [100 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]+2.0 mg/L IBA+5.0 mg/L IAA+0.3 mg/L NAA。

关键词 金花茶;组织培养;根系诱导

中图分类号 S503.53 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)25-0084-03

Study on Adventitious Root Inducement of *Camellia nittidissima* Chi Tissue Culture Shoots

LIU Fang, YU Jian-mei, LIU Yu-jun et al (Nanning Tree Garden, Nanning, Guangxi 530031)

Abstract [Objective] The formulation of high rooting rate culture medium and appropriate lighting conditions were screened out. [Method] *Camellia nittidissima* Chi tissue culture shoot was chosen as study materials in this experiment. This study investigated factors related to type of medium, type and concentration of auxin, concentration of calcium and lighting condition. [Result] There was significant difference in rooting rate among basic mediums of J, 1/2 J, 1/3 J, 2/3 J, in which the 2/3 J medium was the best, and the following was that in 1/2 J, 1/3 J and J. Rooting rate did differ significantly among combinations of concentrations of auxins including IBA, IAA and NAA, in which shows that IAA plays a leading role and IBA plays a subsidiary role. The concentration of calcium adding 19.60 mg/L to the 2/3 J medium of 79.20 mg/L offered a better growth condition to shoot of tissue culture. [Conclusion] The optimal rooting medium for *C. nittidissima* tissue culture shoot was 2/3J+ Ca^{2+} 16.90 mg/L [100 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] + 2.0 mg/L IBA+5.0 mg/L IAA+0.3 mg/L NAA.

Key words *Camellia nittidissima* Chi; Tissue culture; Root inducement

金花茶(*Camellia nittidissima* Chi)属山茶科山茶属,是山茶花家族中唯一具有金黄色花瓣的种类,是我国特有的传统名花,是世界珍稀观赏植物和种质资源,也是国家 8 种一级重点保护植物之一,国内将金花茶誉为“茶族皇后”“植物界的大熊猫”^[1],国外则称之为“幻想中的黄色山茶”“神奇的东方魔茶”。金花茶可直接用于室内外绿化,创造出独具特色的优美景观。金花茶含有天然有机锗、锌、硒、钼等多种对人体有重要保健作用的微量元素,以及茶多酚和人体所必需的氨基酸、维生素等,在降低血糖、血脂,防癌、抗癌方面有特殊功效^[2]。目前,市场上的金花茶产品倍受群众青睐,而金花茶主产区——广西只能满足其销售量的 1/10。为了尽快将金花茶优良资源应用于社会,许多学者开展了金花茶组织培养技术研究。颜慕勤等^[3]从 1980 年起陆续对 7 种具有重瓣、大花、芳香等特性的金花茶种进行组织培养研究,在 1981 年获完整植株并已移栽成活;1987 年廖汉刃等^[4]已开展金花茶嫩茎的组织培养,将继代培养所得茎段插于 1/2MS+6-BA 1~6 mg/L 培养基,生根率 30%~80%,移栽成活率较低,最高为 53%,将无根苗剪下嫁接到普通油茶或越南油茶的芽苗砧木上,成活率为 78%;黄晓娜等^[5]就金花茶进行了组培苗试管外生根研究,生根率可达 85%;李桂娥等^[6]将无菌苗基部浸泡于 500 mg/L IBA 溶液中 2 min,而后转于 1/3 改良 MS 生根培养基中培养,生根率达 86%,但生根率不稳定或生根技术复杂。为了既能简化生根技术,降低生产成本,又能获取高的生根率,笔者就金花茶组培芽生根技术进行了深入研究

究,现将其组培生根关键技术介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为从广西南宁树木园标本园内优选出的生长健壮、花朵繁多的金花茶植株当年生嫩枝,通过消毒灭菌,继代培养获取高 4~6 cm 的壮芽。

1.2 方法

1.2.1 培养基筛选。将组培壮芽分别接种于含有 IBA 1.0 mg/L 和 IAA 2.0 mg/L 的 J(MS+ NH_4NO_3 1 650 mg/L+ Na_2SO_4 50 mg/L)、1/2 J、1/3 J 和 2/3 J 基本培养基内培养。每种培养基接种 30 瓶,6 株/瓶,3 次重复。培养 40 d,记录始根时间,统计每瓶苗木生根数量及每株苗木根系数量,计算生根率。

1.2.2 生长调节剂对不定根的诱导。IBA 设 0、1.0、2.0 mg/L 3 个梯度,IAA 设 0、2.5、5.0 mg/L 3 个梯度,NAA 设 0、0.3、0.5 mg/L 3 个梯度,以 2/3 J 为基本培养基,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,共设计 9 个处理,每个处理 3 瓶,每瓶接种 5 个组培壮芽,重复 3 次,接种 40 d 统计芽生根率。

1.2.3 Ca^{2+} 浓度对不定根的诱导。以①2/3 J+IBA 2.0 mg/L+IAA 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 为对照,对照培养基 Ca^{2+} 浓度 79.20 mg/L,在此基础上分别添加② Ca^{2+} 浓度 8.45 mg/L [50 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$],③ Ca^{2+} 浓度 16.90 mg/L [100 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$],④ Ca^{2+} 浓度 25.40 mg/L [150 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$],⑤ Ca^{2+} 浓度 33.80 mg/L [200 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$],每个处理接种 45 个组培壮芽,3 次重复,接种 40 d 统计芽生根率。

1.2.4 光照强度对不定根的诱导。将组培壮芽接种于 2/3 J+ Ca^{2+} 16.90 mg/L+IBA 2.0 mg/L+IAA 5.0 mg/L+NAA

作者简介 刘芳(1983—),女,山西吕梁人,工程师,硕士,从事植物组织培养、苗木培育研究。

收稿日期 2018-04-24;修回日期 2018-05-07

0.3 mg/L 培养基内,首先置于 800~2 000 lx 的光照条件下培养 7~10 d,之后分别置于自然散射光为 800~2 000、2 500~3 500、4 000~6 000 和 6 500~8 000 lx 的光照条件下继续培养,每种处理摆放 10 瓶,9 株/瓶,3 次重复,培养 40 d 统计生根率,记录根的形态特征。

1.3 培养条件 在上述所有培养基中添加蔗糖 30 g/L、琼脂 4.5 mg/L,pH 5.8,培养基经高温高压(121 ℃,0.14 MPa)灭菌 20 min。除试验外,将生根瓶苗置于 800~2 000 lx 的光照条件下培养 7~10 d,再置于 4 000~6 000 lx 的光照条件下培养,光照时间 12~14 h/d,培养室温度(25±3)℃,光照主要来源于太阳光。

1.4 数据统计与分析 采用 Microsoft Office Excel 2007,DPS7.05 统计分析软件对数据进行处理,公式如下:生根率=生根苗数/接种芽总数×100%;平均根数=生根苗根系总数/生根苗数。

2 结果与分析

2.1 培养基养分含量对组培芽生根的影响 在植物组织培养过程中,培养物不同的生长发育阶段对培养基养分的要求不一致,芽增殖和生长阶段需要培养基内含有较高浓度的无机盐,而生根阶段为了避免芽徒长,利于芽生根,要求培养基无机盐浓度相对偏低。为了筛选适宜的生根基本培养基,将组培壮芽接种于不同无机盐浓度的培养基中进行试验,结果详见表 1。

表 1 不同培养基养分对组培芽生根的影响
Table 1 The effects of different nutrient content on rooting rate of tissue culture shoots

序号 No.	培养基 Medium	始根时间 The time of first root appearance//d	生根率 Rooting rate//%
1	J+IBA1.0 mg/L+IAA2.0 mg/L	—	0
2	1/2 J+IBA1.0 mg/L+IAA2.0 mg/L	19	30.00
3	1/3 J+IBA1.0 mg/L+IAA2.0 mg/L	25	17.80
4	2/3 J+IBA1.0 mg/L+IAA2.0 mg/L	15	51.70

由表 1 可知,不同养分培养基中金花茶组培芽生根率大小排序为 4 号、2 号、3 号、1 号,除 3 号外,随着培养基无机盐的减少,组培芽生根率由 0 逐渐提高,生根率最高的是 4 号培养基(51.70%)。MS 属高浓度无机盐培养基,NH₄⁺和 NO₃⁻含量均较高,高 N 培养基对芽生长有利但对根系的发生和生长存在抑制作用。该试验中,使用 J 全量的 1 号培养基,N 含量较高,芽生根率为 0;3 号培养基,芽始根时间较晚,接种 25 d 才生根,且根系细弱,这可能是因为 3 号培养基养分含量少,仅 1/3 J,无法提供足够芽生根需要的养分;4 号培养基无机盐浓度比较适宜金花茶不定根诱导和生长,始根时间早,仅 15 d,分别比 2 号和 3 号培养基早 4、10 d,且根系健壮。

2.2 生长调节剂对不定根诱导的影响 极差分析结果表明(表 2),参试因素之间极差值大小排序为 B>A>C,B 对金花茶继代芽不定根诱导起着主导作用,A 为辅助作用。在 A 浓度为 0、2.0 mg/L 时,芽的生根率随着 B 浓度的增加而提高,A 浓度为 2.0 mg/L 的处理中,B 浓度增加到 5.0 mg/L 的 9

号处理,芽的生根率最高(80.00%),比 7 号和 8 号处理的生根率分别高 349.94%和 157.15%,最适宜的组合是 A₃B₃C₂。极差分析结果表明,A、B 因素 k₃ 值分别为 42.96 和 49.63,均大于相应因素的 k₁ 和 k₂,C 因素 k₂ 值则最大(40.74),结果最优组合也是 A₃B₃C₂,可见理论分析结果和试验实际结果相一致,该试验金花茶组培芽生根培养基最理想的生长调节剂组合和浓度配比为 IBA2.0 mg/L+IAA5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal test results

序号 No.	生长调节剂 Growth regulator//mg/L			生根率 Rooting rate//%
	IBA (A)	IAA (B)	NAA (C)	
1	0	0	0	0
2	0	2.5	0.3	26.67
3	0	5.0	0.5	33.33
4	1.0	0	0.3	15.56
5	1.0	2.5	0.5	55.56
6	1.0	5.0	0	35.56
7	2.0	0	0.5	17.78
8	2.0	2.5	0	31.11
9	2.0	5.0	0.3	80.00
K ₁	60.00	33.33	66.67	
K ₂	106.67	113.33	122.22	
K ₃	128.89	148.89	106.67	
k ₁	20.00	11.11	22.22	
k ₂	35.56	37.78	40.74	
k ₃	42.96	49.63	35.56	
极差 Range	22.96	38.52	18.52	
最优组合 Optimum combination	A ₃	B ₃	C ₂	

为了进一步检验 IAA、IBA 和 NAA 组合和浓度配比对金花茶组培芽生根影响的差异性,对芽生根率结果进行了方差分析,结果表明生根率方差分析结果的 P=0<0.05,说明 IAA、IBA 和 NAA 对组培芽生根率影响的差异极显著,影响大小表现为 IAA>IBA>NAA,与极差分析结果一致。

2.3 Ca²⁺浓度对组培芽生根的影响 由图 1 可知,随着培养基内 Ca²⁺的增加,金花茶组培芽生根率先增加后减少,生根率大小排序为③>②>④>①>⑤。①~③处理,组培芽生根率随着培养基内 Ca²⁺浓度的增加逐渐提高,当添加 Ca²⁺浓度 16.90 mg/L(处理③)时,生根率达到高峰(95.60%),之后 Ca²⁺浓度增加,生根率逐渐下降,Ca²⁺浓度最高的处理⑤生根率最低(仅 66.70%),且苗木根系数量也少,因为高 Ca²⁺浓度下根系表面会附着一层白色黏膜抑制新根的生长^[7]。该试验以在对照培养基的基础上添加 16.90 mg/L Ca²⁺的处理③对金花茶组培芽生根培养比较适宜。

2.4 光照强度对金花茶组培芽生根的影响 由图 2 可知,不同光照条件影响下,金花茶组培芽的生根率不一致。800~2 000 lx 光照处理生根率偏低(仅 59.30%),2 500~3 500 lx 光照强度有所提高,生根率随之提高(72.60%),4 000~6 000 lx 光照处理生根率达最大值(96.30%),分别比 800~2 000、2 500~3 500 lx 光照处理的生根率高 62.39%和 32.64%。光照强度提高到 6 500~8 000 lx 时,因光照过强,组培芽有不同

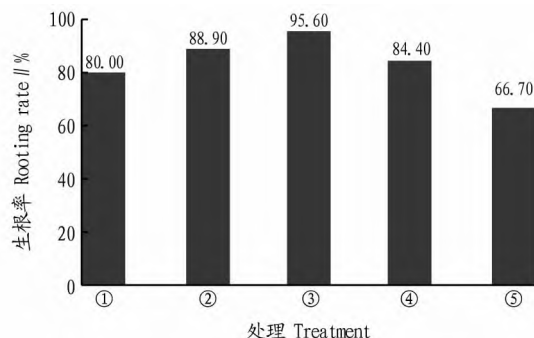


图1 Ca^{2+} 浓度对组培芽生根的影响

Fig. 1 The effects of different concentrations of Ca^{2+} on rooting rate of *Camellia nittidissima* Chi tissue culture shoots

程度的灼伤现象,有的芽叶片被灼伤,有的整颗芽被灼伤致死,芽的生长力大大减弱,生根率严重下降(仅 63.00%)。所以,金花茶组培芽生根培养比较理想的光照条件为接种初期在 800~2 000 lx 光照下培养 7~10 d,然后置于 4 000~6 000 lx 光照强度下继续培养。培养 15~20 d 根长长出,30~40 d 根系长 1.0~1.5 cm,此时可以将生根苗移至环境条件比较接近大气候的大棚炼苗。

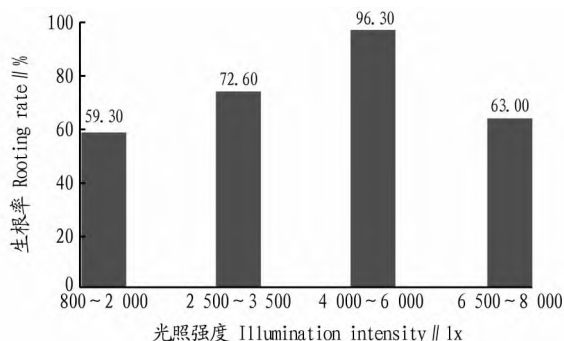


图2 光照强度对金花茶组培芽生根的影响

Fig. 2 The effects of illumination intensity on rooting rate of *Camellia nittidissima* Chi tissue culture shoots

3 结论与讨论

(1) 试验结果表明,IBA、IAA 和 NAA 组合和不同浓度配比对金花茶组培芽生根率的影响存在显著差异,IAA 起主导作用,IBA 起辅助作用。金花茶组培芽生根对 NAA 浓度反应比较敏感,当培养基内 NAA 浓度提高到 0.5 mg/L 时,芽基部愈伤组织丰富,愈伤头直径一般为 0.3~0.7 cm,芽体发育形成的根系粗短,玻璃化严重。此现象与吴幼媚等^[8]在油茶组培苗生根中的研究结果一致。是否因为 NAA 浓度较

高,加速了它在芽体内运输和细胞分裂的速度,引起细胞分裂失衡,导致萌发的根系玻璃化有待深入研究。

(2) 在 2/3 J 培养基中添加适量的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,一方面给培养的苗木提供更充足的 Ca^{2+} ,同时 NO_3^- 能促进植物对 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子的吸收,这与前人的研究结果一致^[9]。试验中,当培养基内 Ca^{2+} 浓度为 16.90 mg/L 时,生根率从对照的 80.00% 提高到 95.60%,始根时间从 25 d 提前到 15 d。而当 Ca^{2+} 浓度为 33.80 mg/L 时,抑制了组培芽生根,生根率仅 66.70%。这可能是因为 Ca^{2+} 浓度过高,使根系细胞内胞质 Ca^{2+} 增加过多,液泡中有机酸的释放受到影响,液泡中有机酸的积累加剧,pH 平衡受到破坏,导致植株根系衰亡^[8]。由此说明金花茶组培芽生根诱导培养基内 Ca^{2+} 浓度为 96.10 mg/L (2/3 J+16.90 mg/L) 比较适宜,其生长机理还有待进一步研究。

(3) 该试验组培芽光照来源于太阳散射光,通过对光照强度和光照时间的调节,充分发挥了太阳光对金花茶组培苗生长的促进作用。组培壮芽扦插于生根培养基内,首先在 800~2 000 lx 光照下培养 7~10 d,然后置于 4 000~6 000 lx 光照强度下继续培养者,生根率高达 90%~96%,而置于 6 500~8 000 lx 强光照条件继续培养者,因芽受到灼伤生根率显著下降。因此,金花茶生长虽然需要一定的庇荫条件,但在组织培养过程中要求光照强度不能过低,否则,满足不了叶片光合作用需要的光能,降低了有机养分合成能力而引起营养缺乏,芽生长力减弱,从而影响生根率。但也不能过强,否则会造成芽灼伤,严重致死,导致生根率偏低,其详细机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] 梁盛业. 金花茶[M]. 北京:中国林业出版社,1993.
- [2] 陆敏珠. 中国金花茶饮用与人体健康[M]. 北京:中国林业出版社,2006.
- [3] 颜慕勤,陈平,王以红,等. 广西七种金花茶的组织培养快速繁殖[J]. 实验生物学报,1988,21(1):1-4.
- [4] 廖汉刀,周传明,董学军,等. 金花茶组织培养及其试管苗嫁接繁殖试验初报[J]. 广西农学报,1987(2):66-70.
- [5] 黄晓娜,叶品明,黄连冬,等. 金花茶组培苗试管外生根研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(18):5751-5752.
- [6] 李桂娥,文萍,李志辉,等. 不同处理方法对金花茶组培苗不定根发生的影响[J]. 安徽农业科学,2016,44(10):157-159.
- [7] 申加枝,张新富,胡建辉. 钙过量对茶树新梢品质成分及根系生长的动态影响[J]. 湖北农业科学,2014,53(7):4108-4111.
- [8] 吴幼媚,王以红,蔡玲,等. 油茶单芽组培生根研究[J]. 西部林业科学,2012,41(4):25-28.
- [9] 吴幼媚,王以红,蔡玲,等. 香樟优良无性系快繁技术的研究[J]. 广西农业生物科学,2006,25(1):60-64.

科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长,不需做详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。