

油茶组织培养与植株再生研究进展^{*}王 瑞¹, 陈永忠²

(1. 江西农业大学园林与艺术学院, 江西 南昌 330045; 2. 湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 综述了近年来油茶组织培养的研究现状, 从外植体、培养基、植物激素与其他添加物等方面, 总结了影响油茶植株再生体系的各种因素, 并提出了油茶组织培养与植株再生过程中存在的问题, 为油茶植株再生体系的建立提供参考。

关键词: 油茶; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 794.4.04 **文献标识码:** B **文章编号:** 1003-5710(2006)05-0063-04

油茶 (*Camellia oleifera*) 属山茶科山茶属, 为常绿小乔木或灌木, 分布于闽、湘、赣、桂等 18 个省 500 多个县, 总面积达 400 万 hm^2 , 占我国木本油料栽培面积的 80% 以上, 是我国南方主要的木本食用油料树种, 与油棕、橄榄和椰子并称为世界四大木本食用油料树种^[1,2]。油茶的主要产品是茶油, 茶油是 2 亿多人的主要食用油来源, 是国际粮农组织重点推荐的健康型食用油之一, 被誉为“东方橄榄油”^[3]。我国年产茶油约 0.75 亿 kg, 有“绿色油库”、“绿色金库”之美誉^[4], 此外, 茶油在工业上可被用于制取油酸及其酯类、生产肥皂和凡士林等, 也可制成硬脂酸和甘油; 在医药上, 可用于制作针剂和调制各种药膏、药丸等; 在化妆品上, 通过精炼可制作成天然高级美容护肤系列化妆品。茶籽榨油后的枯饼, 可提取残油、茶皂素, 发酵后可作高蛋白饲料, 还能通过粉碎用来作生物杀虫剂和机床的抛光粉等。油茶全身都是宝, 具有重要的经济利用价值和社会资源价值。作者对油茶组织培养与植株再生的研究进展做了一个综合性的概述, 为油茶组织培养与植株再生的建立提供参考。

1 油茶组织培养及植株再生研究概况

植物组织培养是指将植物的离体器官、组织、细胞以及去除细胞壁的原生质体, 放在离体无菌、人工控制的环境条件下, 和人工配制的培养基上, 使其生长、分化并成长为完整植株的过程^[5]。自 1902 年德国植物生理学家 Haberlandt 最早提出植物细胞全能性的概念, 到 1958 年 Steward 和 Reinert 用胡萝卜髓细胞培养成植株证实植物细胞全能性以来, 植物组织培养得到了迅速发展, 通过组培再生植株的植物种类和品种日益增多, 其

应用范围也越来越广泛, 植物组织培养已成为当今世界新技术革命的一个重要组成部分和生物科学中的重要技术和手段之一, 它在科学研究和生产上开辟了多个新领域, 已在快繁、脱毒、育种、次生代谢产物生产和种质资源保存等方面取得了巨大的经济效益、社会效益和生态效益^[6-9]。近年来随着基因工程、细胞工程研究的不断深入和提高, 组织培养越来越显示其不可替代的作用^[10]。

1.1 植株再生的途径

通常细胞组织培养获得再生植株有两条途径^[6]。

(1) 器官发生途径。是指离体植物组织(外植体)或细胞(悬浮培养的细胞和原生质体)在组织培养的条件下形成不定芽、根和花芽等器官的过程。器官发生包括由茎尖、腋芽、原球茎、球茎、块茎、鳞茎等外植体直接分化成器官的直接发生和外植体先脱分化形成愈伤组织再分化成器官的间接器官发生。此途径中茎芽和根是在愈伤组织或外植体的不同部位分别独立形成的。

(2) 体细胞胚胎发生途径。是指双或单倍体的体细胞在特定条件下, 未经性细胞融合而通过与合子胚胎发生类似的途径发育出新个体的形态发生过程^[11]。外植体通过培养分化出胚状体, 一般经球形期、心形期、鱼雷期和子叶期发育成再生植株^[12-14]。

木本植物的器官发生植株再生途径可分为两类: 一是先从外植体上诱导出愈伤组织, 再从愈伤组织上诱导出不定芽或不定根原基的间接器官发生过程, 包括从愈伤组织或悬浮培养的细胞和原生质体再生植株; 二是不经过愈伤组织阶段, 直接从原始外植体上诱导产生不定芽或不定根的直接器官发生^[15]。

从纯理论角度讲, 利用组培技术, 自然界中现存的植物物种都可以再生植株, 但由于受有些物种或种类研究、开发价值等因素所限, 投入在这些物种或类型上的研究还不多, 但随着对植物资源研究开发的不断深入和保护资源多样性意识的增强, 组培技术的潜力将进一步

收稿日期: 2006-07-11

修订日期: 2006-08-16

^{*} 国家林业局重点项目“油茶全国区域性试验”和国家科技部重点推广项目“油茶优良新品系繁育中试示范”资助

得到发挥^[16]。随着植物组织培养研究工作的不断深入和发展,世界上已有多种木本植物离体培养后得到了完整植株,有不少试管苗已应用于生产实践^[7]。目前已有 1 000 多种植物能离体再生,其中得到完整植株的木本植物已有 150 多种。

1.2 油茶组织培养及植株再生研究进展

长期以来,油茶由于品种良莠不齐,经营管理粗放,单位面积产量普遍偏低。目前国内多应用油茶优良无性系造林,有利于大幅度提高产量。随着分子和细胞育种的深入开展,将来会产生更多更好的优良无性系,这些优良无性系的育成往往需要利用组织培养技术。然而,油茶同其他山茶属植物一样,细胞不易诱导分化再生植株,造成油茶组织培养的难度较大,目前国内外关于油茶组织培养的报道还很少,20 世纪 80 年代初期,国内有学者对油茶组织培养开展了研究,广西壮族自治区林科所颜慕勤于 1980 年报道,主要通过油茶组织培养诱导出了胚状体,通过胚状体形成了再生植株^[17];1981 年和 1982 年,隆振雄和卢天玲先后分别利用油茶未成熟子叶幼胚离体培养获得再生植株^[16,18,19],此后,隆振雄对油茶花药培养进行了研究,通过组织培养诱导产生了愈伤组织,并获得了绿色芽点和根,但未获得再生植株^[20]。随后油茶组织培养基本停滞,2002 年,中南林学院毕方铨等对油茶的茎段、幼胚、子叶在离体条件下进行诱导,获得再生植株^[21],并筛选出了再生丛芽、子叶形成胚性愈伤组织及其不定芽分化的最适培养基配方;还通过 RAPD 鉴别,发现分子水平上的变异,为油茶优良无性系组培扩繁和生物技术育种的再生体系建立打下了基础。2004 年,中南林学院张智俊以油茶优良无性系湘林 4 号腋芽和子叶为外植体,分别采用附加不同种类激素的 MS 培养基对其进行组织培养实验,诱导出了完整植株;通过对胚状体形成过程中细胞组织学显微观察,实验结果初步揭示了油茶胚状体的起源和大致的发生过程:即油茶胚状体起源于单细胞原胚或者多细胞团,胚状体多从表皮细胞的胚性愈伤组织诱导产生。另外,再生植株过程中各阶段的组培材料经 RAPD 鉴定分析,在 DNA 水平上均未发现变异,说明通过组织培养建立的油茶优良无性系再生植株无变异,最终获得的组培苗木能够保持原无性系的优良特性,其遗传是稳定的。由腋芽培养产生的再生植株可用于优良无性系的快速扩繁,而以子叶诱导产生胚状体获得油茶优良无性系的再生植株,不仅能满足常规育种的需要,也将为今后开展油茶转基因育种工作打下良好的基础^[22]。

在生产实际中,油茶优良无性系在低产油茶林改良中起了非常关键的作用,是提高油茶产量和品质的重要保障。目前,我国南方大面积油茶改良急需优质种苗的供应,而常规的扦插嫁接繁殖远不能满足生产的需要。另外,对油茶优良无性系的进一步培育工作,如对杂种

后代的繁殖,原生质体培养,外源基因的遗传转化等,都需要依靠组织培养的技术手段来解决这些问题。因此,开展油茶优良无性系的组织培养研究具有重大的生产和科研价值。

2 影响油茶植株再生的因素

植株再生的研究通常包括外植体、培养基的选择、激素和其他培养物的添加、植株再生及其他条件等方面的研究。

2.1 外植体的选择

外植体的选择是组织培养中一个非常重要的环节。从理论上讲,植物细胞具有全能性,每一种植物的任何部位、任何一个细胞都能恢复胚性^[23],所以无论选用植物的哪一部分做外植体都能诱导成植株。但由于技术和条件的限制,这种可能性不能完全成为现实。有必要依据培养对象的生理特性和生态学特性选择适宜的外植体。研究表明,不同的植物器官和组织,其形态发生能力不同^[24]。一株树木的不同组织或部位在器官发生能力上有相当大的区别^[25]。同一个品种的同一种外植体取材的时间、大小不同也影响着再生的效果。

油茶培养成功的外植体有普通油茶的子叶、下胚轴、幼胚、花药、腋芽,以及油茶与越南油茶杂交品种的子叶胚,油茶与小果油茶杂交品种的成年树茎尖^[6,17~22]。

2.2 培养基的选择

长期以来,根据培养的组织不同,目的不同,已设计了多种培养基^[26]。初代培养能否启动与分化,培养基的选择是一个关键^[27]。

在器官组织培养中,一般采用固体培养,而在细胞和原生质体培养中,则采用液体培养基,培养基中的盐浓度对外植体褐变和试管苗玻璃化均有一定影响,初代培养时培养基中无机盐浓度过高可引起酚类外溢物质的大量产生,导致外植体褐变,降低盐浓度则可以减少酚类外溢,从而减轻褐变^[28]。此外,培养基中的某些离子会增加酚类合成与氧化酶的活性,降低盐浓度则可起到一定的抑制作用^[29]。对于玻璃化苗来说,提高培养基中 Ca^{2+} 的浓度,增加培养基中 Mg、Mn、K、P、Fe、Cu 元素含量,降低 N 和 Cl 元素比例,特别是降低铵态氮浓度,可降低玻璃化^[30~34]。

油茶组织培养已用过的基本培养基有以下数种:MS、N6、White、改良 ER、SH。Liopy 和 Mccown 在 MS 培养基的基础上,针对木本植物的特点,曾创出一种专门用于木本植物的培养基 WPM(Woody Plant Medium),其中许多成分较之 MS 都有一定的改变^[35]。此种培养基在山茶上应用效果较好,在油茶组培中的应用还有待研究。

2.3 糖类

在组织培养时,由于培养物的光合作用能力较弱,

所以需要在培养基中添加一些糖类^[26]。一方面,糖作为碳源,为细胞的呼吸代谢提供底物和能源;另一方面,在培养过程中,组织不断的从培养基中吸取糖,随时间增长,逐渐降低了糖的浓度,不能维持正常的渗透压。另外适宜的糖浓度对器官的发生也有重要作用。不同含糖量的培养基有不同的效果,从提高丛生苗长势及较持久的生长速度看,以蔗糖浓度为4%较好。浓度低了碳源不足,影响苗生长;浓度过高可能使渗透势太低,影响培养物的水分代谢和物质运输。诱导愈伤组织增殖常用蔗糖3%,壮苗仍以4%较好^[6]。

2.4 植物生长调节物质

植物生长调节物质是培养基中的关键物质,虽用量极小,但在组织培养中起着重要和明显的调节作用。激素的种类和不同功能激素的配比是影响外植体成功启动的关键因素之一。植物生长调节剂是所有诱导因素中最活跃的因子。Skoog和Miller 1957年提出植物的器官分化是受两大类激素(生长素和细胞分裂素)的互作控制的^[36-39]。在油茶组培中,常用的生长素是2,4-D、NAA、IBA,细胞分裂素是6-BA、KT、TDZ、ZT。由于不同品种的油茶内源激素水平不同,对特定的调节剂敏感性不同,因此外源调节剂的种类、浓度、配比都会有所不同。通常生长素与细胞分裂素配合使用。有时只需要一种^[40]。油茶组织培养中植物激素选用情况见表1。

表1 油茶组织培养中植物激素选用一览表 (mg·L⁻¹)

外植体	诱导胚状体激素	芽分化激素	根分化激素
茎尖		BA2.5 + IAA1.5 + ZT5 + CH500	NAA8 IBA5 + NAA5
杂种幼胚		BA3 + NAA0.05	
花粉		BA2 + IAA0.5	IAA4 - 8
腋芽		6-BA3.0 + NAA1.0	NAA7.0
子叶	2,4-D 2.0 + KT1.0	6-BA3.0 + NAA0.05 BA2.5 + IAA1.5 + CH500	NAA7.0
茎段		6-BA3.0 + NAA1.0	NAA7.0
幼胚	2,4-D 2.0 + KT1.0	BA3 + NAA0.05 BA2.5 + IAA1.5	NAA7.0

2.5 琼脂

琼脂是从海藻中提取的一种高分子碳水化合物,它的主要作用是使培养基在常温下凝固,以作固体培养基用,也可以吸附某些代谢有害物质^[41]。Debergh指出琼脂加量与培养基硬度呈线形相关,影响到培养基的一些物理性质,并降低细胞分裂素的活性。一般使用浓度为4~10 g/L,若浓度太高,培养基就会变得很硬,营养物质就难于扩散到培养物组织中去。在避免“玻璃化现象”时,常增加琼脂用量^[6]。

2.6 活性炭

活性炭具有强大的吸附能力,它主要吸附非极性物质和色素等大分子,可以减少一些有害物质的影响,如防止酚类物质污染而引起组织褐化死亡。但是吸附的

选择性很差,温度低吸附力强,温度高吸附力减弱,甚至解吸附。活性炭的通常使用浓度为0.5~10 g/L。

3 油茶组织培养及植株再生中的问题

3.1 油茶组织培养中的褐变问题

油茶组织中酚类物质含量较高,酚类的糖苷化合物是木质素、单宁和色素合成的前体^[3]。因此,当酚类化合物含量高时,木质素、单宁或色素形成就多,易导致褐变的发生^[29,42,43],有些细胞会因褐变而死亡。通过对油茶带腋芽茎段培养,发现油茶组织培养褐变发生程度与培养温度、培养基中激素浓度和无机盐含量等因素有关;较高的培养温度、培养基中较高浓度的无机盐、较高浓度的激素及木质化程度高的外植体都会促进褐化的发生;培养基中加入吸附剂能有效地抑制褐化的发生。实验证明,以添加吸附剂(活性炭和PVP)的培养基效果最好,褐变得得到一定控制;添加抗氧化剂的培养基褐化较严重,其中添加硫代硫酸钠培养的外植体褐化最严重。在添加Vc的培养基上,愈伤组织生长好,颜色为黄绿色;在添加吸附剂的培养基上,愈伤组织长势一般^[44]。

3.2 油茶组织培养中的污染问题

能否有效地控制微生物污染是油茶无性系组织培养能否成功的关键技术之一。在油茶无性系组织培养中污染可分为外植体、培养基和无菌操作3个方面,其中以外植体方面的污染最复杂,也最难控制^[45]。在实验中发现,对不同时期采集的腋芽进行培养,通常在春季2~3月份和秋冬季的腋芽在培养基上容易萌发,且污染现象不明显;而在夏季采的腋芽则既不容易萌发,又很容易被污染,往往造成实验失败。其中的原因,一方面可能与外植体的季节性带菌情况有关;另一方面又同外植体的生理状态有关^[21]。

3.3 油茶组织培养中生根难的问题

油茶生根有相当大的难度,在油茶幼苗的生根培养中,用NAA和IBA产生的生根效果均较好,且出根快,但获得的再生苗大多只有一条主根,须根很少。在空气中未接触培养基所形成的不定根,却有很多白色绒毛状的须根出现,但很细弱,在继代培养中易折断,这可能与油茶的遗传特性(主根性明显)有关^[21]。

4 油茶组织培养与植株再生展望

现代生物技术的迅速发展,为植物组织培养研究与开发带来了新的契机,作为重要经济植物的油茶,其组织培养与再生植株的研究今后还应该在下面几个方面展开:建立高效稳定的不同方式的再生体系,为基因工程育种和诱变育种奠定基础;加强珍稀品种及引进品种的研究,以便加强种质资源的离体保存;建立油茶植株再生的模式体系,系统的研究油茶植株再生的发生及其

调控机制,从而更好地利用植物细胞的全能性;深入开展再生植株遗传与变异的研究。

参考文献:

- [1] 庄瑞林.中国油茶[M].北京:中国林业出版社,1988.
- [2] 张宏达.山茶属植物的系统研究[M].广州:中山大学学报编辑部,1981.
- [3] 黎先胜.我国油茶资源的开发利用研究[J].湖南科技学院学报,2005,26(11):127-129.
- [4] 高瑞龙,姚克平,陈鼎源,等.油茶优良无性系栽培技术研究[J].经济林研究,1996,14(2):30-34.
- [5] 王清连.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [6] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1998.
- [7] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1999.
- [8] 韩一凡.德国林业生物技术研究现状[J].世界林业研究,1993(2):23-26.
- [9] 罗士韦.植物细胞和组织培养的应用与展望[J].植物生理学通讯,1983(2):1-6.
- [10] 朱建华,彭士勇.植物组织培养实用技术[M].北京:中国计量出版社,2002.
- [11] 欧阳权.桉树愈伤组织胚状体的发生[J].植物生理学报,1980,6(4):429-432.
- [12] 张宗勤.红豆杉的愈伤组织诱导及培养研究[J].西北植物学报,1996,16(5):16-18.
- [13] 周俊彦.植物体细胞在组织培养中产生胚状体[J].植物生理学报,1998,7(4):389-397.
- [14] 崔凯荣.植物体细胞胚胎发生研究的某些现状[J].植物学通讯,1993(10):14-20.
- [15] 黄学林,李菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995.
- [16] 伊华林.我国经济植物组织培养概况[J].湖北农学院学报,2001,21(3):279-284.
- [17] 颜慕勤.油茶体细胞胚状体的发生[J].实验生物学报,1980,3(3):343-347.
- [18] 隆振雄.油茶幼胚离体培养初获完整植株[J].林业科技通讯,1981(1):12-16.
- [19] 卢天玲.油茶未成熟子叶幼胚离体培养成苗的研究[J].实验生物学报,1982,5(4):393-403.
- [20] 隆振雄.油茶花药培养获得绿芽点和根[J].林业科技通讯,1981(5):6-9.
- [21] 毕方铖,谭晓风,张智俊,等.油茶离体培养诱导再生植株的研究[J].经济林研究,2004,22(2):5-9.
- [22] 张智俊,罗淑萍,李亚玲,等.油茶优良无性系子叶体细胞胚植株再生[J].植物学通报,2005,22(增刊):43-49.
- [23] 王傲雪,李景富.植物体细胞胚状体的诱导研究及应用[J].黑龙江农业科学,1999(2):39-41.
- [24] 吴国芳,等.植物学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1992.
- [25] 张明丽,李青.木本观赏植物组织培养及植株再生的研究进展[J].河北林业科技,2004,4(2):23-26.
- [26] Debergh P, AiykenChristie J, Cohen D et al. Reconsideration of the term viticification as used in micropropagation[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1992(30):135-140.
- [27] 王熊.地生兰个体发生途径研究[J].植物生理学报,1990,16(3):264-266.
- [28] 高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-503.
- [29] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [30] Pierik RLM. In Vitro Culture of Higher Plant[M]. Mattinus Nijhoff Publishers,1987.
- [31] 崔丽华.植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J].辽宁师范专科学校学报,2000,2(2):97-99.
- [32] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及调控[M].北京:科学出版社,1995.
- [33] 卜学贤,陈维伦.试管植物的玻璃化现象[J].植物生理学通讯,1987(5):13-18.
- [34] 邢世岩.木本植物组织培养玻璃化的成因和控制[J].泰安林业科技,2000,17(2):11-14,37.
- [35] 朱大保.国外杨树组培微繁殖技术的进展[J].北京林业大学学报,1990,12(1):84-91.
- [36] 林伯年,等.园艺植物繁育学[M].上海:上海科学技术出版社,1994.
- [37] 陈振光.茶树的花药培养实验[J].福建农业科技,1979(4):39-41.
- [38] 黄学林,李悠菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995.
- [39] 桂耀林,马诚.植物组织培养[M].北京:科学出版社,1985.
- [40] 姜璐琰,杨建平,张松,等.洋葱组织培养研究进展[J].山东农业大学学报:自然科学版,2003,34(2):299-302.
- [41] 杨乃博.画眉草的组织培养[J].植物生理学通讯,1994(4):28-30.
- [42] 张卫芳,高疆生,欧勇慧,等.抑制核桃组培中的褐化现象初探[J].落叶果树,2003(3):4-7.
- [43] 李风华,汤绍虎,孙一铭,等.降低何首乌愈伤组织褐化研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2005,30(2):337-340.
- [44] 阙生全,彭凌,朱必凤,等.油茶组织培养过程中防止褐变的研究[J].韶关学院学报:自然科学版,2006,27(3):67-69.
- [45] 张守英,姚小华,任华东,等.余甘子丛生芽的诱导和快速繁殖研究[J].经济林研究,2002,20(1):11-13.