

# 耐冬山茶愈伤组织诱导研究

董慧慧<sup>1,2</sup>, 王奎玲<sup>1</sup>, 薛秋华<sup>2</sup>, 刘庆华<sup>1</sup>

(1. 莱阳农学院, 山东 青岛 266109; 2. 福建农林大学, 福建 福州 350002)

**摘要:** 重点探讨耐冬山茶愈伤组织诱导过程中不同植物生长调节剂、培养基 pH 值、不同培养基及不同类型外植体对愈伤组织诱导效应的影响。研究表明: MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.5 mg·L<sup>-1</sup>培养基是耐冬山茶愈伤组织诱导的最佳培养基;耐冬山茶愈伤组织诱导培养基 pH 值以 5.5 较为合适;耐冬山茶叶柄作为外植体,诱导率和生长状况最佳。

**关键词:** 耐冬山茶;组织培养;愈伤组织诱导

中图分类号: S685.14

文献标识码: A

文章编号: 1002-7351(2007)03-0135-04

## The preliminary studies on the callus induction of *Camellia japonica* "Naidong"

DONG Hui-hui<sup>1,2</sup>, WANG Kui-ling<sup>1</sup>, XUE Qiu-hua<sup>2</sup>, LIU Qing-hua<sup>1</sup>

(1. Laiyang Agriculture College, Qingdao, Shandong 266109, China;

2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** The experiment is to study the callus induction effect by using different kinds of hormones, different mediums, pH and different explants, in order to develop the technique systems of tissue culture and rapid propagation for *C. japonica* "Naidong". The major results as the following: Medium MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.5 mg·L<sup>-1</sup> is optimum for callus induction of *C. japonica* "Naidong"; The pH 5.5 is comparatively suitable for *C. japonica* "Naidong" callus induction; Using the leafstalk of *C. japonica* "Naidong" as the explants, the induction rate and the growth is best.

**Key words:** *Camellia japonica* "Naidong"; tissue culture; callus induction

山茶(*Camellia japonica* L.)又名“山茶花”、“海榴”、“海石榴”、“耐冬”、“红山茶”等,属山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)<sup>[1,2]</sup>植物,是山茶科名花之一,也是世界名花之一,具有很高的观赏和实用价值。

中国是世界山茶科植物的分布中心和起源中心,山茶属植物资源极为丰富,已定名的 280 多个物种中,有 238 个是原产中国的,占总数的 85%<sup>[3]</sup>。山茶在我国的野生种群主要分布于浙江沿海及台湾北部等亚热带地区,是典型的亚热带区系成分,现代的人工栽培范围遍布中国长江流域以南,北达胶东半岛,朝鲜半岛南部和日本也有分布<sup>[2,4]</sup>。青岛是我国山茶科植物自然分布的北缘,分布于该地区的山茶由于耐低温,在当地及有关文献称之为“耐冬”或“耐冬山茶”,本文统一称之为“耐冬山茶<sup>[5]</sup>”。

为了满足对山茶苗木的大批量需求,有人采用组织培养快速繁殖的方法来培育山茶苗木。颜慕勤、王以平等报道:以成年的山茶茎尖为外植体,在改良的 ER 培养基中培养。在温度为 25±1℃,湿度为 75%~85%,光照 2 000~2 500 Lux 的条件下培养,当试管苗长到 4~5 cm 时转移至生根培养基(1/2ER,附加 NAA 4 mg·L<sup>-1</sup>, IBA 4 mg·L<sup>-1</sup>),经 20~30 d 生根,然后在蛭石中炼苗,成活率可达 80%~85%<sup>[6]</sup>。夏泉生认为:采用 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>对山茶愈伤组织诱导是最适宜。MS+6-BA 2.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>和 MS+6-BA 3.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>两种培养基均能成功地从愈伤组织中诱导出芽,这部分芽直接用于再分化培养。生根培养试验中采用固体培养基法,用 1/2 MS+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 6 mg·L<sup>-1</sup>效果最好。采用液体培养基法,用 1/2 MS+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 8 mg·L<sup>-1</sup>效果最好,同时指出,附加吲哚乙酸 0.5 mg·L<sup>-1</sup>和 6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,是芽分化的最佳配比,在快速

收稿日期: 2006-11-27; 修回日期: 2007-02-24

基金项目: 本文为山东省良种工程项目“耐冬山茶种质资源研究”的部分研究内容

作者简介: 董慧慧(1983-),女,山东济南人,福建农林大学园艺学院 2005 级在读硕士研究生,从事园林植物与观赏园艺研究。

繁殖中单独用 6-BA 比激动素效果好,浓度为  $0.25 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [7]。

耐冬山茶的栽培有较长的历史,但由于其种源少、自花结实率低、自然繁殖困难等原因限制了耐冬山茶应有的园林作用的发挥,因此急需对耐冬山茶组培繁殖体系进行研究,建立起耐冬山茶的组织培养快速繁殖体系,确定最优的耐冬山茶组培繁殖方案,并进行苗木工厂化生产,形成产业,满足生产需求。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

本实验材料于 3~5 月份采自青岛兴都实业公司生长的健壮的耐冬山茶植株,用嫩梢的茎段、已展开的新叶和叶柄 3 种材料作为外植体。

### 1.2 试验方法

将这 3 种材料进行消毒后,把叶片剪成  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  大小的方块、叶柄及茎均切成  $5 \text{ mm}$  左右小段,接种于附加不同激素的 MS 和 WAP 培养基上做初代培养,每日光照  $12 \sim 14 \text{ h}$ ,温度  $22 \sim 28^\circ\text{C}$ ,光强  $1\ 000 \sim 2\ 000 \text{ lux}$ ,静置培养。30 d 后统计污染率、愈伤组织诱导率及其生长状况。

1.2.1 培养基配制 按照 MS、WAP 基本配方配制培养基母液,培养基及添加的生长调节物质如表 1 所示,然后根据试验设计配制 3 种配比方案(见表 2~表 4)。每个处理做 10 瓶,每瓶需培养基  $25 \text{ ml}$ ,则每个处理需要培养基  $250 \text{ ml}$ 。在  $121^\circ\text{C}$  下高压灭菌  $20 \text{ min}$ 。

表 1 生长调节物质组合的配比

编号	6-BA	IAA	2,4-D
1	$1(2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$1(0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$1(0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
2	$2(3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$2(0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$2(0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
3	$3(4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$3(1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$3(1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
4	$1(2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$2(0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$2(0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
5	$2(3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$3(1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$3(1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
6	$3(4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$1(0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$1(0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
7	$1(2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$3(1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$3(1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
8	$2(3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$1(0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$1(0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
9	$3(4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$2(0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$	$2(0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$

表 2 A 处理的配比(以 MS 为基本培养基,采用 6-BA + IAA 为植物生长调节物质组合)

处理号	琼脂 /g	蔗糖 /g	Fe 盐 /ml	大量元素 /ml	微量元素 /ml	有机物 /ml	6-BA /ml	IAA /ml	pH
A-1	4.5	15	5	25	0.5	5	2.0	0.05	4.5
A-2	4.5	15	5	25	0.5	5	1.5	0.25	4.5
A-3	4.5	15	5	25	0.5	5	1.0	0.50	4.5
A-4	4.5	15	5	25	0.5	5	2.0	0.25	5.0
A-5	4.5	15	5	25	0.5	5	1.5	0.5	5.0
A-6	4.5	15	5	25	0.5	5	1.0	0.05	5.0
A-7	4	15	5	25	0.5	5	2.0	0.50	5.5
A-8	4	15	5	25	0.5	5	1.5	0.05	5.5
A-9	2	7.5	2.5	12.5	0.25	2.5	1.0	0.25	5.5

1.2.2 外植体处理 选取生长健壮的耐冬山茶(*Camellia japonica* L.)植株,剪取枝条嫩梢的茎段、已展开的新叶及其叶柄 3 种材料作为组培外植体。接种前先将植物材料用洗洁精洗干净,在自来水下冲洗  $1 \text{ h}$  左右,在超净工作台上用  $75\%$  酒精中浸泡  $0.5 \text{ min}$ ,转入次氯酸钠中消毒  $10 \text{ min}$ ,无菌水漂洗  $3 \sim 5$  遍,用无菌纸吸干水后接种。

1.2.3 接种 取材:在室内水培  $10 \text{ d}$  的耐冬叶片和茎段,用流水冲洗  $30 \text{ min}$ ,再用  $75\%$  的酒精消毒  $0.5 \text{ min}$ ,无菌水冲洗,然后用  $10\%$  的次氯酸钠浸泡  $5 \sim 6 \text{ min}$ ,然后用无菌水冲洗。

将这 3 种消毒后的材料,叶片剪成  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  大小的方块,叶柄及茎切成  $5 \text{ mm}$  左右小段,接种于附加不同激素的 MS 和 WAP 培养基上做初代培养,每日光照  $12 \sim 14 \text{ h}$ ,光强  $1\ 000 \sim 2\ 000 \text{ lux}$ ,静置培养。

1.2.4 观察 每天对已接种的培养基进行观察、记录,初代培养完成后总结记录结果。

表3 B处理的配比(以MS为基本培养基,采用6-BA+2,4-D为植物生长调节物质组合)

处理号	琼脂/g	蔗糖/g	Fe盐/ml	大量元素/ml	微量元素/ml	有机物/ml	6-BA/ml	2,4-D/ml	pH
B-1	4.5	15	5	25	0.5	5	2.0	0.05	4.5
B-2	4.5	15	5	25	0.5	5	1.5	0.25	4.5
B-3	4.5	15	5	25	0.5	5	1.0	0.50	4.5
B-4	4.5	15	5	25	0.5	5	2.0	0.25	5.0
B-5	4.5	15	5	25	0.5	5	1.5	0.50	5.0
B-6	4.5	15	5	25	0.5	5	1.0	0.05	5.0
B-7	4	15	5	25	0.5	5	2.0	0.50	5.5
B-8	4	15	5	25	0.5	5	1.5	0.05	5.5
B-9	2	7.5	2.5	12.5	0.25	2.5	1.0	0.25	5.5

表4 C处理的配比(以WAP为基本培养基,采用6-BA+IAA为植物生长调节物质组合)

处理号	琼脂/g	蔗糖/g	Fe盐/ml	大量元素/ml	微量元素/ml	有机物/ml	6-BA/ml	IAA/ml	pH
C-1	4.5	15	5	25	0.5	5	2.0	0.05	4.5
C-2	4.5	15	5	25	0.5	5	1.5	0.25	4.5
C-3	4.5	15	5	25	0.5	5	1.0	0.50	4.5
C-4	4.5	15	5	25	0.5	5	2.0	0.25	5.0
C-5	4.5	15	5	25	0.5	5	1.5	0.50	5.0
C-6	4.5	15	5	25	0.5	5	1.0	0.05	5.0
C-7	4	15	5	25	0.5	5	2.0	0.50	5.5
C-8	4	15	5	25	0.5	5	1.5	0.05	5.5
C-9	2	7.5	2.5	12.5	0.25	2.5	1.0	0.25	5.5

## 2 试验结果与分析

### 2.1 试验结果

外植体按照试验处理分别接种,MS为基本培养基的每瓶1个外植体,WAP为基本培养基的每瓶3个外植体,每个处理不少于10瓶。外植体材料接种培养后,观察2~6d的污染情况,统计被污染的外植体数,计算出污染率和诱导率,并确定合理的外植体灭菌时间。

污染率 = 污染的材料数 / 总接种材料数 × 100%

诱导率 = 形成愈伤组织的材料数 / 总接种材料数 × 100%

A、B、C 3种处理的生长状况见表5。

表5 A、B、C 3种处理的生长状况统计

处理号	出现愈伤组织/瓶			诱导率/%			污染数/瓶			污染率/%			死亡数/瓶			愈伤组织生长情况		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	2	5	5	20	50	50	1	2	0	10	20	0	3	2	0	++	++	++
2	2	1	4	20	10	40	0	1	1	0	10	10	2	5	0	++	+	++
3	9	5	3	90	50	30	0	0	0	0	0	0	0	5	0	+++	++	++
4	2	4	1	20	40	10	1	0	2	10	0	20	5	6	0	++	++	+
5	5	4	2	50	40	20	0	1	0	0	10	0	3	5	0	++	++	++
6	3	8	1	30	80	10	2	1	1	20	10	10	3	1	0	++	+++	+
7	5	6	6	50	60	60	2	0	0	20	0	0	1	2	0	++	++	++
8	10	4	0	100	40	0	0	0	1	0	0	10	0	6	0	+++	++	+
9	0	8	0	0	80	0	0	0	6	0	0	60	10	3	0	+	++++	+

## 2.2 结果分析

2.2.1 不同植物生长调节物对耐冬山茶愈伤组织诱导的影响 本试验配比使用 6-BA 和 2,4-D 或 IAA 植物生长调节物质,附加在 MS 和 WAP 培养基上,观察耐冬山茶产生愈伤组织的情况,包括出现愈伤组织前外植体的形态变化,愈伤组织出现的时间及愈伤组织的形态特征(包括愈伤组织的颜色、质地和色泽等);并计算外植体的愈伤组织诱导率。

表 6 不同植物生长调节物对耐冬山茶愈伤组织诱导的影响

处理	生长调节物质组合 /mg·l <sup>-1</sup>	接种外植体块数	愈伤组织块数	诱导率/%	愈伤组织生长情况
A	MS+6-BA+IAA	90	38	42	++
B	MS+6-BA+2,4-D	90	45	50	+++

表 6 为处理 A 与处理 B 的比较,基本培养基都为 MS,从表中可以看出,6-BA+IAA 与 6-BA+2,4-D 作为生长调节物质时愈伤组织的诱导率相差不明显,但由实际观察可得,处理 B 比处理 A 愈伤组织生长状况好,其中处理 B-9 生长势最好,由此得知,生长调节物质为 6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的组合最佳。由于品种等方面的原因,这一结论与夏泉生认为<sup>[3]</sup>:采用 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 对山茶愈伤组织诱导是最适宜的有所不同,还需进一步研究。

2.2.2 不同培养基对耐冬山茶愈伤组织的诱导的影响 本试验采用 MS 和 WAP 2 种培养基作为基本培养基,观察耐冬山茶愈伤组织诱导率。

表 7 为处理 A 与处理 C 的比较,基本培养基分别为 MS 和 WAP,从表中可以看出,6-BA+IAA 作为生长调节物质时愈伤组织的诱导率相差不明显,但由实际观察可得,处理 A 愈伤组织生长状况要优于处理 C,由此得知,最适宜耐冬山茶初代培养的培养基为:MS+6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 组合。

表 7 不同培养基对耐冬山茶愈伤组织诱导的影响

处理	生长调节物质组合 /mg·l <sup>-1</sup>	培养基	接种外植体总数	愈伤组织块数	诱导率/%	愈伤组织生长情况
A	6-BA+IAA	MS	90	38	42	++
C	6-BA+IAA	WAP	90	22	24	+

2.2.3 培养基 pH 值对耐冬山茶愈伤组织诱导的影响 外植体的培养基增殖都要求一定的 pH 值。通常一般培养基的 pH 值都在 5.6~6.0 之间。如果 pH 值不适,则直接影响外植体对营养物质的吸收,进而影响外植体的脱分化、增殖和器官形成。不过 pH 值对不同植物的影响会有差异。此外,培养基中含有 Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 和 FeCl<sub>3</sub> 时,pH 值应在 5.2 以下,否则铁盐不溶解而沉淀,引起缺铁症,阻碍生长<sup>[4]</sup>。

表 8 为生长状况最好的处理 B 中 pH 值对愈伤组织诱导的影响,本试验将叶片、叶柄及茎段接种于 MS 培养基上,由表 8 可知,不同 pH 值虽然对愈伤组织诱导率差异不大,均在 37% 以上,但愈伤组织生长量上差异较明显,pH 5.5 的诱导率最大,愈伤组织块大,故耐冬愈伤组织诱导培养基 pH 值以 5.5 较为合适。

2.2.4 外植体种类对山茶愈伤组织诱导的影响 从表 9 可以看出,在相同实验条件下,叶柄比茎段和叶片更容易产生愈伤组织,生长势最好。

表 8 不同 pH 值对愈伤组织诱导的影响

培养基 pH 值	接种外植体总数	愈伤组织块数	诱导率/%	愈伤组织生长情况
4.5	30	11	37	+
5.0	30	16	53	++
5.5	30	18	60	+++

表 9 外植体种类对愈伤组织诱导的影响

外植体	接种外植体总数	愈伤组织块数	诱导率/%	愈伤组织生长情况
叶片	188	62	33	++
叶柄	29	17	59	+++
茎段	68	26	38	+

- [6] Soule M E. Conservation: tactics for a constant crisis[J]. Science, 1991, 253:744 - 750.
- [7] NAS (National Research Council). Conserving biodiversity: a research agenda for development agencies[M]. Washington D C: National Academy Press, 1992.
- [8] BCCA (Biodiversity Committee of The Chinese Academy of Science). Biodiversity in China, status and conservation[M]. Beijing: Science Press, 1992.

(上接第 138 页)

### 3 结论

#### 3.1 植物生长调节剂与耐冬山茶愈伤组织诱导的关系

生长调节物质是培养基中不可缺少的关键物质,其用量虽少,但它们对外植体愈伤组织的诱导起着重要和明显的调节作用,其中以生长素类和细胞分裂素类最为常用。在诱导愈伤组织的培养基中,植物生长调节剂是可调节幅度最大的成分。一般来说,高生长素和低细胞分裂素有利于愈伤组织的诱导及生长,但生长素和细胞分裂素是愈伤组织的形成所必需的,缺一不可。本试验中,使用 6-BA 细胞分裂素和 IAA、2,4-D 两种生长素的组合,发现外植体的反应不同,6-BA + 2,4-D 组合诱导率高,产生愈伤组织的时间早,且生长状况最佳。

#### 3.2 基本培养基与耐冬山茶愈伤组织诱导的关系

在离体培养条件下,不同植物由于各自的遗传特性、生物学特性都不一样,因此植物组织保持良好生长的营养要求随植物种类而变化,甚至同一植物的不同部位的组织以及同一部位的组织在不同生长时期对营养的要求也不一样,只有满足了它们各自的要求,才能正常生长,因此选择适宜的培养基对植物组织培养特别重要。本试验采用 MS 和 WAP 培养基,试验结果 MS 培养基对耐冬山茶愈伤组织的诱导效果远远优于 WAP 培养基。

#### 3.3 外植体与山茶愈伤组织诱导的关系

愈伤组织的诱导主要受外植体本身、培养基和培养条件 3 方面因素的共同影响,其中外植体是人们最难以控制的,这与外植体本身的生长发育和生理化状态有关,因而对外植体的筛选是组织培养中很关键的技术。本试验中,耐冬山茶叶柄作为外植体,诱导率和生长状况最佳,而叶片和茎段作为外植体时,诱导率相差不明显,茎段的生长状况最差,很少长出愈伤组织。

综上所述,耐冬山茶初代培养最佳方案为:培养基采用 MS + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 2.4-D  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值为 5.5,接种外植体采用新叶叶柄,在每日光照 12~14 h,温度 22~28℃,光强 1 000~2 000 lux 的培养条件下静置培养。

#### 参考文献:

- [1] 闵天禄. 山茶属山茶组植物的分类、分化和分布[J]. 云南植物研究, 1998, 20(2):127 - 148.
- [2] 闵天禄. 山茶属的系统大纲[J]. 云南植物研究, 1999, 21(2):149 - 159.
- [3] 罗春清, 谭晓风, 漆龙霖, 等. 山茶属植物分类综述[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(30):78 - 81.
- [4] 王献涛, 张春静. 山东青岛沿海岛屿耐冬山茶濒临灭绝的原因及就地保护问题[J]. 广西植物, 1992, 12(3):272 - 278.
- [5] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京:中国林业出版社, 1990.
- [6] 梁盛业. 中国名优茶花[M]. 北京:金盾出版社, 2000.
- [7] 夏泉生. 山茶花[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2000.