

茶树组织培养中外植体褐化的控制

赵 玮

(甘肃省农业科学院啤酒原料研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 研究了不同浓度的铁盐对茶树组织培养中褐化率的影响, 结果表明, 在 0.50 倍 MS 标准铁盐浓度下, 茶树外植体褐化率较低, 为 40.5%, 生长良好; 在此条件下控制茶树组培褐化的最佳培养基配方为 0.50 倍标准铁盐浓度 MS+Na₂S₂O₃ 0.50 g/L+AC 0.50 g/L。

关键词: 茶树; 组培; 褐化; 控制

中图分类号: S571.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2008)06-0010-03

Control Browning of the Explants in Tissue Culture of Tea Plant

ZHAO Wei

(Institute of Beer Materials, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: We studied the different concentration iron salt on the browning in tissue culture of tea plant by different methods, and the results showed that the optimal iron salt concentration was 0.50 times standard iron salt in MS substrate, and on this condition, the percent browning of the explants was lower and could grow well, was 40.5%; and the best prescription of substrate to control the browning in tissue culture of tea plant was MS (with 0.50 times standard iron salt concentration)+Na₂S₂O₃(0.50 g/L)+AC(0.50 g/L).

Key words: Tea plant; Tissue culture; Browning; Control

组织培养是加快茶树繁殖速度的重要手段, 通过研究者的不懈努力, 该项技术已经日趋完善, 并被

广泛应用于茶树无性快繁与茶树种质资源室内保护等方面^[1]。但在茶树组织培养愈伤组织诱导阶段, 由

收稿日期: 2008-02-18

作者简介: 赵 玮(1976—), 男, 甘肃景泰人, 助理研究员, 主要从事中药材与茶树组织培养工作。联系电话: (0931) 7613319。

Mega, Maris Huntsman, Hobbit, Caplle Desprez 分别含有成株抗性基因 Yr-3b、4b、Yr-11、Yr-12、Yr-13、Yr-14、Yr-16, 上述基因在苗期多表现感病, 但在成株期表现抗病。如抗性基因 Yr-3b、4b, 苗期对条中 32 号表现感病, 但成株期表现抗病, 因此对这些基因的评价和利用更有价值。Yr-11、Yr-12、Yr-13、Yr-14、Yr-16 虽在前人的研究中被评价为成株抗性基因, 但在本试验中, Yr-11 和 Yr-12 对条中 32 和及水 14 表现为中抗-中感, 且以中感为主, Yr-13 和 Yr-14 对供试菌系表现中抗-中感, 总体抗性程度较低, 因此利用价值不大。

2) 含有抗条锈基因 Yr-Su 和 Yr-3b、4b 血缘的抗源材料近年来已广泛应用于生产, 并已选育出诸多的生产品种。但已有的研究表明, 近年来对抗条锈基因 Yr-Su 的毒性频率保持在 92% 以上; 对抗条锈基因 Yr-9 的毒性频率保持在 85% 以上, 对 Yr-3b、4b 的的毒性频率保持在 30% 以上, 说明含有 Yr-Su、Yr-9、Yr-3b、4b 的菌系对生产品种有很强的致病力, 是造成品种抗性丧失的主要小种类型^[5]。

3) 分析结果表明, 水 14 较条中 32 号含有更为广

泛的毒性基因谱, 因此较条中 32 号威胁更大。同时, 经研究发现, T. spelta alba (Yr-5)、Moro (Yr-10)、VPM (Yr-17)、92R178 (Yr-26)、Selkirk (Yr-27) 在田间抗性较好, 说明抗条锈基因 Yr-5、Yr-10、Yr-17、Yr-26、Yr-27 对条中 32 号和水 14 是有效的, 可在今后抗条锈病育种中进一步利用。

参考文献:

- [1] FLOR H H. Current status of the gene-for-gene concept[J]. Ann. Rev. Phytoph. 1971(9): 275-296.
- [2] 杨华安, 吴立人. 我国小麦条锈菌生理小种毒性基因及致病性特点分析[J]. 植物病理学报, 1990, 20(3): 213-216.
- [3] 王凤乐, 吴立人, 万安民. 中国小麦条锈菌群体毒性变异研究[J]. 中国农业科学, 1995, 28(1): 8-14.
- [4] 金社林, 李继平, 贾秋珍. 小麦条锈菌新小种条中 31 号及致病类型洛 13Ⅱ、洛 13Ⅷ毒性基因推导[J]. 甘肃农业科技, 1996(10): 33-34.
- [5] 贾秋珍, 金社林, 曹世勤, 等. 2002—2003 年甘肃省小麦条锈菌生理小种监测结果[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 44-47.

(本文责编: 程亚军)

于茶树组织中酚类物质含量较其它木本植物高,外植体褐化成为限制组织培养的一个棘手问题^[2],而有关茶树组织培养褐化问题的研究报道又较少,鉴于此,笔者从铁盐胁迫浓度、添加抗氧化剂、吸附剂以及运用物理处理方法控制茶树组织培养中的褐化效果进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为茶树品种龙井43春茶茎段组织,采自甘肃省康县;分析纯 Na₂-EDTA 由天津市科密欧化学试剂中心生产,分析纯 FeSO₄·7H₂O 由西安化学试剂厂生产。

1.2 方 法

1.2.1 铁盐浓度对茶树茎段培养的影响 分别用标准铁盐含量的 0(CK)、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00倍 MS 培养基对春茶茎段进行分化培养,对诱导出的愈伤组织进行继代培养,以空白培养为对照(CK)。每处理 10 瓶,3 次重复。每 5 d 观察 1 次褐化情况,共观察 6 次,以平均值计算褐化率。

1.2.2 抗氧化剂、吸附剂及其配比对茶树茎段组培褐化的控制效果 ①不同抗氧化剂、吸附剂的控制效果。在 0.50 倍标准铁盐 MS 培养基中,分别加入 Vc(抗坏血酸)、AgNO₃(硝酸银)、Na₂S₂O₃(硫代硫酸钠)各 0.50 g/L,AC(活性炭)0.25 g/L,将茶树茎段先用 Na₂S₂O₃ 0.20 g/L 溶液浸泡 10 min、再用 45℃温水浸泡 15 min,以空白培养为对照(CK1)。每处理 10 瓶,3 次重复,每 5 d 观察 1 次褐化情况,共观察 6 次,以平均值计算褐化率。②抗氧化剂、吸附剂不同配比控制褐化的效果。在 0.50 倍铁盐标准 MS 培养基的条件下,分别加入 AC 0.25 g/L+Vc 0.50 g/L,AC 0.25 g/L+AgNO₃ 0.50 g/L,AC 0.25 g/L+Na₂S₂O₃ 0.50 g/L,以空白培养为对照(CK2)。每处理 10 瓶,3 次重复,每 5 d 观察 1 次褐化情况,共观察 6 次,以平均值计算褐化率。

2 结果与分析

2.1 铁盐浓度对茶树茎段分化培养的影响

从实验结果(表 1)可知,在培养的 30 d 内,随着铁盐浓度的增加,茶树茎段组织褐化呈加重趋势,以对照和 0.25 倍铁盐培养基的茶树茎段组织褐化率低,分别为 28.0%和 31.1%;其次 0.50 倍铁盐培养

基表现较好,褐化率为 40.5%;0.75 倍以上铁盐培养基褐化率均较高,为 45.4%~92.0%;铁盐浓度达到 2.00 倍时,茎段组织 5 d 内全部褐化,并在短时间内毒害致死。另据观察,对照和 0.25 倍铁盐培养基的茶树茎段组织在生长后期丛生芽尖叶片失绿发白,生长停滞;1.25 倍以上高浓度铁盐培养基后期生长表现为真叶内卷,芽尖、茎段褐变干枯,丛生芽分化能力减弱,生长缓慢甚至中毒致死;0.50 倍铁盐培养基的茶树茎段组织表现最好,丛生芽生长健壮,颜色深绿。

表 1 不同铁盐浓度培养基上茶树茎段组织的褐化率

标准铁盐的 倍数	不同培养天数茶树茎段组织褐化率(%)					
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
0(CK)	0	0	5.8	10.6	17.6	28.0
0.25	0	6.7	9.8	16.3	25.1	31.1
0.50	0	4.5	10.2	24.4	37.9	40.5
0.75	6.1	9.8	19.4	28.7	36.6	45.4
1.00	11.4	23.0	28.7	35.1	40.8	53.6
1.25	15.6	23.3	46.5	62.5	67.6	70.8
1.50	25.0	33.1	46.6	56.3	82.2	92.0
1.75	49.1	86.3	100.0			
2.00	100.0					

2.2 铁盐浓度对茶树茎段继代培养的影响

从实验结果(表 2)看出,随着铁盐浓度的增加,茶树茎段愈伤组织褐化率呈加重趋势,培养 30 d 时,0.25 倍铁盐培养基愈伤组织褐化较轻,褐化率为 20.7%,其次为 0.50 倍铁盐培养基,褐化率为 21.8%;当铁盐浓度为 2.00 倍时,5 d 内褐化率达到 75.0%。另据观察,当铁盐浓度为 0.25 倍时玻璃化严重,生长表现为白色透明的疏松状愈伤组织,基本失去再分化能力;当铁盐浓度为 2.00 倍时,5 d 内虽然没有全部中毒致死,但整个愈伤组织增殖停止,到第 20 天,愈伤组织全部褐化;只有在 0.50 倍铁盐浓度下,愈伤组织生长表现良好,能产生致密、深绿的组织结构。

综合以上实验结果,茶树组织培养以 0.50 倍标准铁盐浓度最适合。在此条件下培养的外植体生长均好于其它铁盐浓度下的组织生长状态。

表3 不同处理茶树茎段组织的褐化率

处理	不同培养天数茶树茎段的褐化率(%)					
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
AC	11.0	14.5	22.5	35.1	45.6	68.3
VC	8.9	17.8	25.6	40.2	51.9	77.0
AgNO ₃	10.5	19.6	22.6	39.8	46.5	59.4
Na ₂ S ₂ O ₃	12.3	27.9	33.2	40.5	46.6	56.1
45℃温水	15.6	32.7	36.3	46.9	58.6	69.8
CK1	33.6	49.8	66.5	72.2	78.8	86.4
AC 0.25 g/L+VC 0.50 g/L	0	7.3	17.1	19.8	22.1	30.1
AC 0.25 g/L+AgNO ₃ 0.50 g/L	0	2.6	12.5	23.5	30.8	38.9
AC 0.25 g/L+Na ₂ S ₂ O ₃ 0.50 g/L	0	0	6.3	8.9	10.0	15.1
CK2	0	13.2	19.8	28.9	38.6	40.6

表2 不同铁盐浓度培养基上茶树茎段愈伤组织的褐化率

标准铁盐 的倍数	不同培养天数茶树茎段愈伤组织褐化率(%)					
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
0(CK)	0	0	4.1	10.7	10.7	10.7
0.25	0	8.2	13.6	16.9	16.9	20.7
0.50	0	10.0	14.1	20.7	20.7	21.8
0.75	7.8	10.1	12.6	20.3	26.3	28.6
1.00	24.0	26.5	38.1	40.2	45.3	45.3
1.25	28.0	36.9	39.7	56.8	70.2	71.4
1.50	36.5	45.2	66.8	71.1	71.1	83.2
1.75	56.7	66.5	68.8	92.3	98.6	98.6
2.00	75.0	79.8	96.5	100.0		

2.3 不同抗氧化剂、吸附剂及其配比对茶树茎段组培褐化的控制效果

实验结果(表3)表明,在培养基中单独添加不同抗氧化剂、吸附剂后,随着培养时间的延长,褐化率呈上升趋势,但各处理均低于对照。培养到30 d时,以添加Na₂S₂O₃处理的褐化率最低,为56.1%,其余处理的褐化率均在59.0%以上,可见各处理控制褐化的效果均不太理想。而添加不同配比抗氧化剂和吸附剂后,茎段褐化的控制效果均有明显提高,其中以添加AC 0.25 g/L+Na₂S₂O₃ 0.50 g/L的处理效果最好,在30 d内褐化率为15.1%;其次为添

加AC 0.25 g/L+VC 0.50 g/L的处理,褐化率为30.1%;加入AC 0.25 g/L+AgNO₃ 0.50 g/L的处理,褐化率为38.9%。

3 结论与讨论

1) 实验结果表明,茶树组培最佳铁盐浓度为MS标准铁盐的0.50倍,在此条件下外植体褐化率较低,而且生长表现良好。

2) 在0.50倍标准铁盐浓度条件下,控制茶树茎段外植体褐化的最佳培养基配方为:0.50倍标准铁盐浓度MS+Na₂S₂O₃ 0.50 g/L+AC 0.50 g/L。

3) 实验中我们发现,接种前对外植体先用自来水冲洗过夜,再用45℃温水浸泡15 min,更能有效降低褐化率。另据报道,对外植体进行空白琼脂培养、细胞筛选、外植体勤转瓶等方法都能有效减轻褐化的影响^[3],因此茶树组培外植体褐化问题的解决还有待于更深入的研究。

参考文献:

- [1] 王立,杨素娟,王玉书,等.茶种质资源室内保存技术研究[J].茶叶科学,1996,16(1):37-42.
- [2] 曾镭,刘燕.植物组织培养中褐化问题的研究进展[J].安徽农学通报,2007,13(14):49-50.
- [3] 崔堂兵,郭勇,张长远,等.植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J].广东农业科学,2001(3):16-19.

(本文责编:张雪琴)