

苦丁茶愈伤组织诱导培养初步研究

马艳梅 张柱峰 李新昌

(华南农业大学农学系, 广州 510642)

摘要 苦丁茶是近年来从野生资源中开发利用的非茶类植物, 具适应性广、成材快、经济价值高等特点, 可作代用茶, 并有药用功能。用苦丁茶嫩梢茎切段及带柄叶片作外植体, 在含 2, 4-D 0.5 mg/L ~ 4 mg/L, KT 1 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L 的改良 MS 培养基上, 诱导产生愈伤组织, 在同样培养基或添加不同附加物的培养基上继代培养, 观察比较愈伤组织的生长情况。

关键词 苦丁茶; 愈伤组织培养; 茎切段; 改良 MS 培养基
中图分类号 S 188

苦丁茶(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)是冬青科冬青属的常绿乔木, 分布在我国长江以南山区, 叶片含茶多酚、儿茶素、氨基酸、咖啡碱及各种维生素, 可消炎止痛, 有降血压、血脂、胆固醇及减肥功效, 能抑制鼻咽癌、食道癌等多种疾病, 部分群众向有用作代茶或掺在茶中饮用习惯, 但由于多种原因, 已有 2 000 余年栽培历史的苦丁茶在清末民初已沦为珍稀树种。近年来, 随着经济发展, 苦丁茶适应性广、成材快、经济价值高等特点已引起广泛注意, 被加以开发利用并成为当今畅销国际市场的珍贵天然药用保健饮料, 享有“绿色黄金”的美誉。

由于苦丁茶种子不易采收, 且皮厚坚硬, 吸水困难, 休眠期长, 发芽率低, 目前一般采用无性繁殖法培育苦丁茶苗, 速度慢、成本较高、茶苗昂贵、运输困难, 难以满足建立成片苦丁茶园的需要。采用组织培养等方法, 无疑是解决快速育苗的较好途径。

目前对苦丁茶的研究, 主要是野生资源分布(刘祖生等, 1991a)、生物学特征特性(刘祖生等, 1990; 傅羽健, 1994)、化学成份(刘祖生等, 1991b, 1992)、栽培及育苗技术(林显秋等, 1994; 刘德华等, 1994b; 傅羽健等, 1994)等方面, 除 1971 年 Hu C. Y. 在同属植物枸骨叶冬青(*Ilex aguiifolium*)以子叶为外植体诱导胚状体外(胡适宜, 1982), 苦丁茶组织培养快速繁殖方面的研究仅见一篇报导(刘德华等, 1994a)。

苦丁茶试管育苗有多种途径, 由诱导产生愈伤组织再诱导分化成苗是其中之一。本文介绍诱导愈伤组织及其增殖使用的各种培养基, 并对外植体选择、激素和附加物使用等问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 取材与消毒

在华南农业大学茶园中取 5 株苦丁茶树嫩梢及带柄叶片作材料, 这些苦丁茶是 1987 年从广东大埔引种的扦插苗所长成的。以加入吐温 80 20 滴/L 的 1 g/L HgCl₂ 溶液浸泡 8 min ~ 12 min, 再以体积百分比浓度为 70% ~ 75% 酒精浸泡约 1 min, 每种药物处理后均用无菌水洗 3 次。

1.2 各种培养基

1~5 号培养基,以含 30 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂的 MS 为基本培养基,改维生素 B₁ 为 10 mg/L,并加入 3 g/L PVP、1 mg/L KT 配制而成,仅 2,4-D 浓度不相同,1~5 号培养基依次为 0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、3 mg/L、4 mg/L。又以 4 号培养基为基础,省去 PVP,添加 YE(酵母抽提物)、LH(水解乳蛋白)各 1 g/L 配成 6 号培养基。以 6 号为基础,添加不同附加物,配成 7~10 号培养基(依次为 7 号 3 g/L 脯氨酸,8 号 3 g/L 精氨酸,9 号 3 g/L 谷氨酸,10 号 30 g/L 甘露醇)。各种培养基 pH 值均调整到 5.7,按常规方法高压灭菌后备用。

1.3 接种与培养

选苦丁茶嫩梢切成长约 1 cm 的节段,每切段带 1 个休眠腋芽,以带叶柄的嫩叶半片至 1 片作外植体。设计以各种培养基作不同处理,以不同时期取的各批材料作重复。

1.3.1 愈伤组织的诱导 设 5 种处理(1~5 号培养基)3 次重复进行愈伤组织诱导试验,每处理接种 10 瓶,每瓶接种 5 块材料。接种后置培养室内自然光、温下培养,每 3 周继代培养 1 次。分别调查各处理出现愈伤组织的初现期及培养 20 d 各处理的愈伤组织诱导率,比较各处理诱导愈伤组织的效果。

1.3.2 愈伤组织增生 分别取多批外植体接种到 4 号培养基上,每 3.5 周继代培养 1 次,待愈伤组织增长到一定数量,分别称重,转入 6~10 号培养基继代培养,每瓶接种 5 块愈伤组织,共进行了 4 批愈伤组织的接种,每批每种培养基接种的瓶数相同(3~6 瓶),待愈伤组织增生至 1 个月左右,分别称取各瓶的愈伤组织重量,记录并整理数据,以 6 号培养基为对照比较各处理的增殖效果。

2 结果与分析

2.1 激素的使用

表 1 不同生长素浓度诱导愈伤组织的初现期¹⁾方差分析 d

培养基	接种批次			T_i	$\bar{X}$	差异显著性测验结果	
	I	II	III			0.05	0.01
1	15	14	14	43	14.3	a	A
2	14	11	11	36	12.0	ab	AB
3	13	11	10	34	11.3	b	AB
5	11	11	11	33	11.0	b	AB
4	10	12	8	30	10.0	b	B
T_i	63	59	54	176			
$\bar{X}$	12.6	11.8	10.8				

1) 愈伤组织出现率为 10% 的天数

表 2 培养 20 d 后愈伤组织诱导率¹⁾ %

培养基	接种批次			T_i	X	差异显著性测验结果	
	III	II	I			0.05	0.01
4	56.0	56.6	53.3	165.9	55.30	a	A
5	54.4	50.0	48.0	152.4	50.80	b	A
3	26.7	32.0	30.0	88.7	29.57	c	B
1	20.6	31.4	26.7	86.7	28.90	c	B
2	30.0	26.7	28.0	84.7	28.23	c	B
T_i	195.7	196.7	186.0	578.4			
X	39.14	39.34	37.20				

1) 诱导率= 出现愈伤组织的外植体数/ 接种的外植体总数× 100%

方差分析结果表明, 各种培养基诱导愈伤组织的效果, 从较快诱导产生愈伤组织和 20 d 的诱导率两方面看, 都以 4、5 号培养基较合适, 4 号培养基较好(见表 1, 2), 说明苦丁茶的愈伤组织诱导采用 2, 4—D 3 mg/L; KT 1 mg/L 为较佳。从激素配比的角度看, 以 2, 4—D/KT 3∶1 为佳, 重复间差异均不显著, 说明各批外植体情况接近, 结论应较准确。

原代培养未长出愈伤组织的外植体和已长出的愈伤组织, 在同样培养基上连续进行继代培养, 诱导率会继续增加, 愈伤组织也能持续生长(见图版 1, 2)。

2.2 各种不同附加物对愈伤组织增生的影响

为消除始重不同的影响, 进行协方差分析, 结果表明, 7~10 号培养基不论从增长速度还是日增重率来看均不比对照优越(见表 3, 4)。说明添加各种不同氨基酸或甘露醇不能加速愈伤组织的生长。这可能是由于各种培养基都添加了 YE 和 LH 天然有机物, 6 号培养基已基本具备了愈伤组织所必需的营养, 再添加单种氨基酸所起的作用不明显, 渗透稳定剂甘露醇的添加, 对促进愈伤组织吸收养份似无明显作用。

表 3 不同附加物对愈伤组织增长速度¹⁾的影响 g/d

培养基	接 种 批 次				T_i	X	校正 X	差异显著性测验结果	
	II	IV	I	III				0.05	0.01
6(CK)	0.10	0.07	0.07	0.02	0.26	0.065	0.069	a	A
7	0.10	0.06	0.04	0.02	0.22	0.055	0.056	ab	A
9	0.09	0.05	0.05	0.02	0.21	0.053	0.048	b	AB
8	0.08	0.04	0.03	0.02	0.17	0.043	0.043	b	B
10	0.05	0.05	0.03	0.01	0.14	0.035	0.034	b	B
T_i	0.42	0.27	0.22	0.09	1.00				
X	0.084	0.054	0.044	0.018					

1) 增长速度=(终重-始重)/培养天数

表 4 不同附加物愈伤组织的日增重率¹⁾

(%) / d

培养基	接 种 批 次				T_i	$\bar{X}$	校正 $\bar{X}$	差异显著性测验结果	
	II	IV	I	III				0.05	0.01
6(CK)	8.36	3.39	2.99	1.69	16.43	4.108	3.911	a	A
7	5.40	2.43	2.42	1.57	11.82	2.955	2.906	a	A
9	4.38	2.06	2.11	0.79	9.34	2.335	2.539	a	A
8	4.70	1.56	1.75	0.80	8.81	2.203	2.183	b	A
10	2.36	2.01	1.50	0.68	6.55	1.637	1.699	b	B
T_i	25.20	11.45	10.77	5.53	52.95				
$\bar{X}$	5.040	2.290	2.154	1.106					

1) 日增重率=[(终重-始重)/始重×100%]/培养天数

2.3 外植体的选择

选择带柄嫩叶作外植体时诱导出的愈伤组织变褐程度低,但愈伤组织的生长不如茎切段快。以顶芽作外植体诱导产生愈伤组织较困难。试验过程中,对培养在 1~5 号培养基上的各种外植体经 25 d 培养进行比较,茎切段的愈伤组织诱导率为 66.67%~100.00%,平均 85.48%,叶的诱导率为 21.21%~50.50%,平均 37.01%,顶芽为 0%。在茎切段中,正在生长的嫩梢、尤其是呈紫红色的嫩梢顶芽下第 1 片展开叶的茎切段不仅消毒过程难于控制,而且诱导愈伤组织效果也不佳,而采用第 2~5 片展开叶间的各切段或已形成驻芽枝条的驻芽下 1~4 叶各茎切段不仅消毒方便,且能较快诱导产生愈伤组织,诱导率亦较高。这可能是由于较粗老的枝条切段逐渐进入半木质化状态,除具耐药性较强的优点外,生理成熟程度也适于作外植体。

2.4 愈伤组织的质地

1~6 号培养基原代培养长出的愈伤组织有两种,茎切段切口处长出的愈伤组织在培养室自然光温条件下,是无色透明、表面光滑、有柔和光泽、质地疏松易碎的;叶柄切口、叶脉或叶缘处长出的愈伤组织呈白色、无光泽、质地结实的小颗粒状。上述两种愈伤组织当继代培养在同样的培养基或 7~10 号培养基上,并移到阳光可照到的位置或日光管灯照射下,除体积增大外,大多数颜色从无色或白色转变为淡绿色或墨绿色,质地也从疏松渐趋于结实。

3 讨论

3.1 休眠芽的萌动

在愈伤组织生长良好、迅速的情况下,茎切段休眠腋芽一般很少萌动。但在试验过程中曾发现,当取比较壮旺的春梢作外植体时,在室温 25℃的条件下,在 2、3、4、9、10 等号培养基上培养 20 d 后休眠芽开始萌动,在 1~2 次继代培养中缓慢生长(图版 3),其中以 4、9、10 号培养基上的生长较迅速。而相反,在不含生长素只含细胞分裂素的培养基上,休眠芽却不萌动。这是否可说明:合适愈伤组织生长的培养基即含生长素的培养基对腋芽萌动不一定不合适,相反,加入一些生长素或长出少量愈伤组织反而可能促进腋芽萌动。所以培养基中不宜完全取消生长素,可保持较低的生长素浓度。

腋芽能否萌动看来受外植体壮旺程度、生理成熟程度是否合适、适宜的温度及培养基中激素配比诸因素的影响。

3.2 外植体的变褐

变褐是很多植物,尤其是木本植物组织培养中较难解决的问题。苦丁茶外植体变褐速度快,嫩梢采下 30 min 后伤口开始变褐,在接种前创伤较多、消毒药物浓度较高或处理时间较长时尤为严重,接种到培养基上时,褐变从切口渐渐延伸到整块外植体甚至培养基,毒害周围的外植体。长出愈伤组织后也会变褐,尤其是当温度高达 30℃以上、光照加强时,变褐更严重,会导致整块愈伤组织死亡。加入 PVP 抗褐剂不能有效地防止变褐。在 1~5 号培养基上以加入 3 g/L PVP 与不加入 PVP 的进行比较,培养 20 d 后材料褐变百分率前者依次为 40.0、36.7、36.0、16.7、43.3;后者依次为 28.6、30.0、20.0、4.0、15.6。方差分析表明:初现期,愈伤组织诱导率均无显著差异,故需采用综合措施防褐。

致谢 试验过程中,华南农业大学陈国本教授、郑永球、陈伟栋讲师曾给予支持和帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 刘祖生,梁月荣,徐月荣,等. 1990. 苦丁茶生物学特性显微结构. 福建茶叶, (1): 16~20
- 刘祖生,梁月荣,徐月荣,等. 1991a. 浙江苦丁茶资源调查和植物学鉴定. 茶叶, 17(4): 14~17
- 刘祖生,梁月荣,徐月荣,等. 1991b. 苦丁茶化学成分研究: 游离氨基酸分析. 浙江农业大学学报, 17(1): 71~74
- 刘祖生,梁月荣,徐月荣,等. 1992. 苦丁茶化学成分研究: 黄酮类化合物的 HPLC 分离鉴定. 浙江农业大学学报, 18(增刊): 66~69
- 刘德华,廖利民,张金莲. 1994a. 苦丁茶树微繁殖技术的研究. 湖南农学院学报, 20(3): 235~239
- 刘德华,廖利民,张金莲. 1994b. 苦丁茶树种子育苗的研究. 湖南农学院学报, 20(4): 242~344
- 林显秋,韦文添. 1994. 苦丁茶的栽培. 广西农业科学, (4): 168~169
- 胡适宜. 1982. 被子植物胚胎学. 北京: 高教出版社, 283
- 傅健羽. 1984. 苦丁茶叶片光合作用特性的初步研究. 茶叶通讯, (1): 14~17
- 傅健羽,刘德华,廖利民,等. 1984. 苦丁茶树短穗扦插苗技术的研究. 湖南农学院学报, 20(4): 118~125

PRELIMINARY STUDY ON INDUCTION AND CULTURE OF CALLUS IN *Ilex kudingcha*

Ma Yanmei Zhang Zhufeng Li Xinchang

(Dept. of Agronomy, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Ilex kudingcha C. J. Tseng is a none-tea plant in the nature, which has been tapping and utilizing from the natural resources in recent years. It has wide adaptability and grows rapidly. It has considerable economic importance, because it has some property of medicine, and it can be used as a substitute tea. Callus formation from explants of *Ilex kudingcha* Tseng cutting shoots and leaves with stalk was induced on modified Murashige & Skoog basal medium supplemented with the 2, 4-D 0.5 mg/L~4 mg/L, kinetin 1 mg/L, sugar 3 g/L and agar 0.7 g/L. Calli were subcultured on the same medium or medium supplemented with other

additions. Propagation and growth of calli were investigated.

Key words *Ilex kudingcha*; callus culture; cutting shoots; modified Murashige & skoog medium



简 讯

我 刊 入 编 中 国 科 学 引 文 数 据 库

《华南农业大学学报》从 1996 年开始被中国科学引文数据库收录为来源期刊。
中国科学引文数据库利用该库的数据资源已开发出两种产品, 即《中国科学引文索引》(光盘版)和(印刷版)。欲购者请与中科院文献情报中心中国科学引文数据库联系。
电话: (010)62564354 传真: (010)62566846