

苦丁茶体细胞组织培养再生植株的研究^{*}

何琼英 李 斌 张志胜

(华南农业大学农学系, 广州 510642)

摘要 报道了苦丁茶不经愈伤组织直接从外植体获得分化芽及愈伤组织诱导的结果, 讨论了体细胞组织培养技术在苦丁茶上应用的可能性。

关键词 苦丁茶 体细胞组织培养 非胚性愈伤组织

中图分类号 S 188

苦丁茶(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)是我国南方古代传统的饮料和药用植物。它保健功能好, 性凉, 清热解毒, 治痧气、感冒、腹痛、疟疾、咽喉肿痛及其它炎症, 修剪的枝叶可煮水外洗, 消炎去毒, 对降血压、降血脂有明显效果。苦丁茶味道独特, 先苦后甘, 生津止渴, 口感甚好, 可茶药两用, 其药理、成分分析及保健作用已有报道(文永新等, 1990; 朱莉芬等, 1994)。苦丁茶作为一种特有的保健饮料, 具有广阔的市场前景, 是山区脱贫致富的饮料植物之一。然而在繁殖技术上若采用有性繁殖, 则存在种质分离、种性退化及植株分枝成蓬较慢的缺点; 若采用无性扦插繁殖, 因受到树龄和季节等因素限制, 难以周年生产; 而组织培养不受季节影响, 繁殖速度快, 成本较低。马艳梅等(1996)曾报道苦丁茶愈伤组织诱导培养的初步研究结果; 但有关苦丁茶体细胞组织培养再生植株的研究鲜见报道, 而且如何通过体细胞组织培养建立一个稳定的再生实验系统, 将是苦丁茶细胞悬浮培养, 实现细胞水平苦丁茶遗传操作的关键性问题。为此, 本文在相关研究的基础上, 报导了苦丁茶体细胞组织培养经器官分化方式再生植株研究的部分结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦丁茶(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)供试材料取自华南农业大学农学系茶园。

1.2 试验步骤和方法

将苦丁茶茎段, 经常规消毒后, 切成 1 cm 左右带腋芽茎段, 用可溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP)预处理, 浸泡 10~15 min。

将茎段接入 3 种不同配方的培养基, 20~30 d 继代一次。3 种培养基配方如下: (1)MS+2, 4-D 4 mg/L+6-BA 0.5 mg/L(MSD); (2)N₆+2, 4-D 4 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+水解乳蛋白(LH) 2 g/L+活性炭(AC)1 g/L (N₆D); (3)N₆+6-BA 4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+LH 2 g/L+AC 1 g/L (N₆B)。上述培养基, pH 为 5.8, 含 8 g/L 的琼脂和 40 g/L 的蔗糖。

接种后材料置于昼夜变温 18~25℃, 室内自然光培养, 当外植体直接诱导出芽以及将愈伤组织转入 N₆B 分化培养基后采用弱光培养(500 lx)。

2 试验结果

2.1 外植体不经过愈伤组织, 直接分化成单生芽

将 1 cm 左右带腋芽的苦丁茶茎段, 接入上述 3 种培养基中. 培养 15 d 后, 接种在 N₆B 培养基上的部分外植体, 茎与叶柄之间裂开, 出现绿色分化物, 腋芽迅速膨大; 1 个月左右长出 1~2 cm 高的单生芽(图版 6、7). 反复切割这些芽并继代培养, 利用培养基中的生长激素, 可解除腋芽的顶端优势, 使腋芽不断分化和生长, 逐渐形成芽丛, 在短期内得到大量的芽.

由于外植体未经愈伤组织阶段, 因此就可能为体细胞的组织培养, 建立一个稳定的再生实验系统; 也可望为繁殖种性比较一致的苦丁茶无性系, 建立一种微繁殖技术.

2.2 愈伤组织的诱导及继代培养

苦丁茶茎段接种在已设计的 3 种培养基后, 切口部位均可长出愈伤组织. 但是, 不同的培养基对苦丁茶愈伤组织的诱导率及褐变程度影响不同(见表 1).

从激素的综合效果来看, 生长素类的 2, 4-D 4 mg/L 和细胞分裂素 6-BA 0.5 mg/L 共同使用对愈伤组织的诱导效果较好. 当外植体接种在 N₆D 和 MSD 培养基上时, 成愈率达 50%和30%. 在N₆D培养基上, 切口部位产生大量白色的愈伤组织(图版 3, 4). 但外植体接种在不含 2, 4-D 的 N₆B 培养基上, 切口部位只产生少量的愈伤组织, 且颜色较暗(图版 1). 培养 1 个月后, 有些外植体转绿, 茎与叶柄间裂开, 腋芽开始萌动(图版 5). 可见, 加入 2, 4-D 的培养基对诱导愈伤组织有利, 而不加 2, 4-D 的培养基对分化芽效果较好. 但是来自 MSD 的愈伤组织颜色较褐, 无光泽, 大多为非胚性愈伤组织. 将这些愈伤组织的第 3 代分别转入 MSD 固体培养和液体静置培养(液体培养是在培养瓶内加入 MSD 液体培养基, 用锦伦支撑滤纸, 经高温高压消毒后, 在滤纸上接入愈伤组织). 每 20 d 继代一次, 5 个月后再转入 MSD 固体培养基继代及 N₆B 分化培养. 整个培养程序如图 1.

研究结果发现, 两种培养方法没有明显的差异, 经细胞学检查, 大多数仍是非胚性愈伤组织, 表现为细胞排列不规则, 细胞内含物少, 细胞松散, 无明显结构, 透明, 多数为薄壁细胞团. 将这些愈伤组织转入 N₆B 分化培养基上培养, 也仍未分化. 据观察, 随着培养时间的延长, 愈伤组织的生长, 原有的母体愈伤组织逐渐褐化变黑, 进而导致新的愈伤组织褐化, 如及时切下未褐化的愈伤组织, 则无论是转至新的继代培养基上继代培养, 还是在分化培养基上培养, 愈伤组织均能继续生长, 但褐化速度越来越快, 并且不分化. 可见, 从基本培养基效果来看, N₆ 优于 MS.

表 1 不同培养基的诱导反应¹⁾

培养基	成愈率(%)	褐化程度
MSD	30	++
N ₆ D	50	0, +
N ₆ B	14~20	+

1) 褐化程度: “0”为正常无褐化, “+”为轻度褐化, “++”为严重褐化

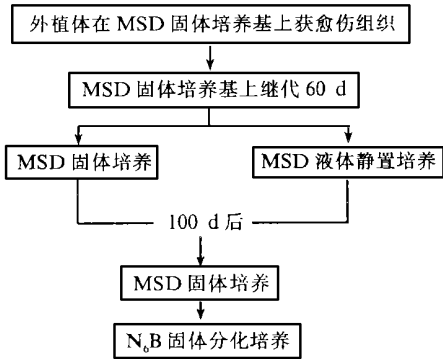


图 1 不同培养方式进程图

3 讨论

3.1 外植体直接分化成芽

植物组织和细胞培养中能形成各种器官, 如芽、根、茎叶、花以及多种变态器官如吸器、鳞茎、球茎、块茎等。在有些情况下, 器官是由切下的外植体中已存在的器官原基发育而成的。但在不少的场合下是重新形成的。重新形成器官原基的外植体, 其分生组织的形成, 一般包括两个不同的生长时期。第一步, 即离体的外植体脱分化形成愈伤组织; 第二步, 即在形成的愈伤组织或经继代培养的愈伤组织中, 形成一些分生细胞团, 随后由它分化成不同的器官原基。

席与烈等(1986)在热带甜玉米微型繁殖的研究中认为, 要使组织培养试管苗保持品质性状上一致, 最好使培养物不通过愈伤组织, 而直接诱导产生不定分生组织, 分化根和芽, 长成试管苗, 就有可能成为生产上可采用的“微型繁殖”技术。本试验从苦丁茶茎段中未经愈伤组织直接获得单生芽。这一初步试验表明, 通过体细胞组织培养, 从器官原基中直接分化芽, 从而建立一个稳定的再生实验系统, 实现细胞水平苦丁茶遗传操作是完全可能的。

3.2 愈伤组织的诱导与分化能力

研究结果表明, 加入 2, 4-D 4 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L 的 N₆D 培养基对愈伤组织的诱导效果较好。马艳梅等(1996)也报导苦丁茶的愈伤组织诱导采用 2, 4-D / KT 3 : 1 为佳。可见一定浓度的 2, 4-D 与较低浓度的细胞分裂素配比, 对诱导愈伤组织是有利的。遗憾的是诱导的愈伤组织难于分化, 甚至根本不分化。

研究者们发现在组织培养过程中, 细胞实际上是处在严重的胁迫条件下脱分化产生愈伤组织, 因而分化的细胞具有不稳定性(Fredrick Mein). 它可能产生胚性和非胚性愈伤组织, 非胚性愈伤组织丧失分化能力, 而胚性愈伤组织在长期继代培养中, 又可能由于失去某些基因表达的基础或丧失了某些基因而导致丧失分化能力(刘德华, 1995)。因此如何诱导苦丁茶产生较多的胚性愈伤组织并保持其分化能力, 将是值得深入研究的课题。

3.3 褐变问题

植物组织培养过程中, 外植体常变褐, 特别是含酚类物质多的木本植物尤为突出。何琼英等(1995)曾报导用抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变, 认为香蕉吸芽外植体褐变是由于酚类物质在多酚氧化酶作用下被氧化成醌的结果; 验证了抗坏血酸对香蕉吸芽褐变抑制作用是通过将多元酚氧化酶作用下形成的醌类, 重新还原为酚而实现的, 因此是消耗性的。本研究用 2 g/L 的 PVP 预处理外植体, 并在培养基中加入 1 g/L 的活性碳, 拟防外植体褐变, 获得较好的效果, 产生白色的愈伤组织和绿色的单生芽, 这就为苦丁茶组织培养研究中采用何种办法阻止褐变的问题提供了经验和改进的路子。至于阻止苦丁茶褐变的生理依据及其机理还有待进一步研究。

致谢 华南农业大学系林少群、陈国华同学参加部分工作!

参 考 文 献

- 马艳梅, 张柱峰, 李新昌. 1996. 苦丁茶愈伤组织诱导培养初步研究. 华南农业大学学报, 17(4): 29 ~ 34
文永新, 陈秀珍, 金静兰, 等. 1990. 苦丁茶化学成分的研究. 广西植物, 10(4): 364 ~ 368
朱莉芬, 李美珠, 钟伟新, 等. 1994. 苦丁茶的心血管药理研究. 中药材, 17(3): 37 ~ 40

刘德华. 1995. 茶树愈伤组织继代培养与体细胞胚发生. 作物学报, 21(4): 470~474
何琼英, 张东方, 王润华. 1995. 抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变的研究初报. 华南农业大学学报, 16(3): 79~82
席与烈, 温英建, 张昆瑜, 等. 1986. 热带甜玉米微型繁殖的初步研究. 热带作物学报, 7(1): 117~124
Fredrick M. 1983. Heritable variation in plant cell culture. Annual Review of Plant Physiology, 34: 327~346

STUDIES ON TISSUE AND CELL CULTURE AND PLANT
REGENERATION OF *Ilex kudingcha*

He Qiongying Li Bin Zhang Zhisheng
(Dept. of Agronomy, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The differentiation buds of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng were successfully induced directly from the explant without passing through the period of callus. But the callus of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng were also induced from the explant. The applied possibility about the technology of so-matic cell and tissue culture in *Ilex kudingcha* C. J. Tseng was discussed.

Key words *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; somatic cell and tissue culture; inembryonic callus



图版 外植体在不同的培养基上的诱导效果

1 在 N₆B 培养基上, 切口部位产生少量较褐的愈伤组织; 2 在 MSD 培养基上多次继代的褐色愈伤组织; 3 4 在 N₆D 培养基上, 切口部位产生大量白色的愈伤组织; 5 在 N₆B 上培养 1 个月后, 腋芽开始萌动; 6 7 在 N₆B 培养基上诱导的单生芽