

茶树组织与器官培养研究进展

江昌俊

(安徽农业大学农业部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

摘要:收集了自 20 世纪 60 年代以来茶叶研究者在国内外国际刊物上发表的重要论文, 对茶树组织与器官培养研究工作做了简要的介绍。近 40 年来茶树组织与器官培养研究取得了较大的进展, 但仍然还有不少难题未攻克。利用离体培养作为技术平台运用于茶树育种, 还有一段艰难的路程要走, 期待着茶叶研究者在今后的研究中取得更大的成果。

关键词:茶树; 组织培养; 器官培养; 进展

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2007)03-0348-07

Progress in the research on tissue and organ culture of tea plant

JIANG Chang-jun

(Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Since the 60's of the 20th century, the main research articles published on the Journals about the tissue and organ of tea plant (*Camellia sinensis*) are introduced and commented in this review paper. In nearly 40 years, a great progress has been made in the field of the tissue and organ culture, but there is a far way to make use of the culture *in vitro* in the breeding of tea plant. We expect more pretty research present in the coming years.

Key words: *Camellia sinensis*; tissue culture; organ culture; progress

自从 20 世纪 60 年代开始进行茶树茎和花药培养, 至今已走了近 40 年的研究历程, 但仍然还有不少难题未攻克, 这主要是由于茶树是多年生植物, 多酚类物质含量高本身特性引起, 造成培养的愈伤组织易褐化、难以分化、基因不能按序表达等。目前要获得经过多次继代培养的完整植株以及在大田中存活仍有较大的难度, 使组织和器官培养在茶树快速无性繁殖、种质资源的保存、作为外源基因转化的受体系统等育种中的应用还有较大距离。根据培养所用茶树外植体的种类和目的, 本文将茶树组织与器官培养的研究进展分为四个方面予以简要介绍, 为茶树育种和生物技术的研究工作提供参考。

1 茎和芽的培养研究

20 世纪 60 年代末英国剑桥大学首次进行了茶树茎培养^[1], 用以研究茶树咖啡碱合成途径。随后, 中国、日本、印度和前苏联等国的科学家在茶树组织和器官培养领域做出了不懈的努力, 并在许多方面获得了进展。

在 80 年代, Kato M (1985)^[2] 用茎 (茎的表皮层、除表皮的茎和完整的茎) 作材料, 从愈伤组织诱导再生植株。基本培养基为 MS, 添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ VB₁, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 烟酸, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ VB₆, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Gly, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 肌醇; 生根培养基为 MS, 添加 IBA 和 BA。中村顺行 (1987)^[1] 以薮北种顶芽为材料,

收稿日期: 2006-11-28

基金项目: 安徽省自然科学基金重点项目 (0504101021) 和安徽省教育厅自然科学研究计划重点项目 (2004kj137zd, 2005kj391zd) 共同资助。

作者简介: 江昌俊 (1957 -), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: jiangcj@ahau.edu.cn

研究了不同的培养基,以及激素浓度和比例对生长的影响。结果表明,在 8 种不加激素的基本培养基中,Nitsch,Gamborg 和 MS 等 3 种最好, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的组合能较好地促进愈伤组织的形成,在 1/2 或 1/4 浓度的 MS 液体培养基中加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 能诱导根的形成。前苏联科学家(1988)^[1]以茎切段为材料,培养出了完整的植株,认为愈伤组织增生和形态发生的条件是外源激素和内源激素的平衡。他们还以柯尔希达等 5 个茶树品种的腋芽作供试材料,采用 MS、B₅、W、H₂、N₅ 等 5 种基本培养基,附加不同浓度的 NAA 和 6-BA。结果表明:当 NAA 浓度超过 6-BA 时,所有品种均能形成愈伤组织,当两者浓度比例接近 1:1 时,有少量腋芽发育成芽苗。

90 年代以来,我国研究者在这方面做了大量的工作。黄亚辉(1992)^[3]发现茎尖含有大量的多酚类物质,尤其是红茶品种。切下茎尖当气温稍微升高时其中茶多酚便被氧化,产生褐化现象。奚彪等(1994)^[4]针对组培中外植体遗传特性与生理状况进行了初步研究,试验表明,生理因素对茶腋芽成苗和成苗后生长有重要作用,实生苗春季新梢,合适的外植体大小,并留部分叶均对萌发有良好的促进。试管苗作外植体时,萌发生长较好,但成苗率低,生长较慢。刘德华(1995)^[5]以继代培养的叶柄及其试管苗茎胚性愈伤组织为材料,对茶树愈伤组织继代培养与体细胞胚发生进行研究,认为多种培养基交叉继代培养,是延长胚性愈伤组织培养时间的重要途径之一。胚性愈伤组织在继代培养一段时间内,体细胞胚分化率上升,与细胞内多酚类物质减少有关。该课题组(2000)^[6]为了探讨茶树茎段培养中胚性状态的调控及其分化机理,以种子苗和成龄茶树嫩梢为材料,研究了培养基、培养时间对茎分化及分化状态保持的影响。结果表明,茎分化需要 2 个月以上的诱导培养过程,茎段产生分化后,在不同组分的培养基上交叉培养,维持分化能力的时间比在单一培养基上的长,具有少量母体组织的不定芽苗在其基部分化了体细胞胚、不定芽,并在其叶上分化了体细胞胚。不定芽苗在初代培养中,其切口处易诱导出非胚性愈伤组织,切除非胚性愈伤组织后,诱导出了胚性愈伤组织。

孙仲序等(2000)^[7]取幼嫩茎段作外植体进行离体培养,以 MS 作基本培养基,经添加不同激素水平及组合的试验,得到最佳分化率 83%,其培养基为 MS + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT;最佳生根率 80%,其培养基为 $1/2\text{MS} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 20 g

$\cdot \text{L}^{-1}$ 糖。选出了最佳移栽基质为蛭石 + 壤土 + 木屑,其配比为 2:1:1,移栽成活率达 85%。李家华等(2001)^[8]研究了不同激素配方对大叶种新梢组织培养的效果,结果表明, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 促进腋芽形成单生芽的效果最好, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 诱导愈伤组织形成和腋芽分化均获得较好效果, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 对促进丛芽形成效果最好。张亚萍等(2002)^[9]用嫩茎茎段为外植体,在含 $2 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的改良 MS 培养基上诱导产生愈伤组织。结果表明, $2 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 两个茶树品种的愈伤组织分化随浓度的增加而增加。张建华等(2003)^[10]以新梢腋芽、茎段为试验材料,研究组培快繁技术。试验表明,外植体在培养基 MS + $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 中可诱导出愈伤组织并能分化出芽,但在继代培养中以培养基 ER + $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 表现较好。周健等(2005)^[11]分析了激素对组培快繁中芽增殖和生长的影响。试验材料为春季新萌发枝条,切成带一个腋芽的 1 cm 长的茎段,继代方法是将从生芽团切开成每个带 1~3 个芽的新芽团,接种到新的不同培养基上,基本培养基为 MS。培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间为 12 h,光强 $2\,000 \sim 3\,000 \text{ lx}$ 。优化得到适宜的组培苗增殖条件是:MS + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃。该条件下培养 30 d,组培苗的增殖率可达 2.75 倍左右,高度大于 5 cm 的小苗成苗率在 20% 以上。杨国伟等(2006)^[12]以幼嫩茎段为材料对愈伤组织的诱导进行了研究,研究表明,茶树愈伤组织诱导培养中,外植体类型、培养基种类、激素对愈伤组织的诱导均有影响。通过对培养条件的优化,得到了愈伤组织生长的适宜培养基:MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA。同时测定了愈伤组织在 45 d 内的生长曲线,在培养的第 39 d,愈伤组织生长可达到最大值,其鲜重最大增殖倍数为 4.14 倍。

2 花药的培养研究

茶树是异花授粉植物,很难通过自交获得纯系,给茶树遗传育种工作和理论研究带来很大障碍。单倍体在茶树育种中有重要的应用价值:(1)通过对所获得的单倍体植株进行染色体加倍,便可获得纯合二倍体,可缩短育种所需年限。(2)利用单倍体及其细胞进行诱变育种,无论是发生显性还是隐性突变,均可在当代表现出来,便于鉴定和选择,然后

将发生有利突变的个体进行染色体加倍,即可获得遗传性稳定的纯合植株,从而加速育种进程。(3)利用单倍体植株的组织、细胞或原生质体作为外源基因转化的受体,有利于外源基因的整合表达。

茶树花药组织培养研究也开始得比较早,日本胜尾清于 1968 年就开始对茶树花药培养进行研究,用了将近 4 年的时间分化出了根^[1]。

对茶树花药培养的研究,主要集中在上世纪 70 年代。1973 年中国农业科学院茶叶研究所开始花药培养,诱导出了愈伤组织^[1]。1974 年陈振光等^[13]对 9 个茶树品种的花药进行培养,最后从“福云”7 号诱导出了根。通过几年研究,获得了具有根、茎、叶的完整植株(1982, 1983),这是用花药作外植体首次成功获得植株。对植株根尖进行染色体数目鉴定为单倍体和非整倍体,未发现二倍体。与其它植物相同,接种花药的小孢子发育期为单核中晚期,用 H、Blaydes、改良的 MS、N₆ 和 SJ-1 等 5 种基本培养基进行试验, SJ-1 培养基的愈伤组织诱导率最高(36.6%)。日本仓贯幸一 1978 年以来^[1],对花药培养中花粉粒的分裂进行了研究。结果表明,花药的初代培养以高蔗糖浓度(10%)培养基的分裂频度最高,但随着培养时间增加,退化花粉粒数目增加。在继代培养中低蔗糖浓度培养基(2%)有利于提高花药中含分裂花粉粒的频度和增加花粉粒的分裂次数。1979 年林知兴等诱导出单倍体根^[1]。1981 年土井芳宪^[1]从花药形成的愈伤组织中分化出绿色小突起和根,附加 0.02 mmol·L⁻¹ NAA, 0.02 mmol·L⁻¹ Kin 激素组合,根的分化率最高。1995 年下门久等通过体细胞途径也获得了花药再生植株^[1]。

影响花药培养的因素非常之多,从目前研究的结果分析,主要有以下几个方面。

2.1 外植体的基因型

研究表明外植体的基因型对花药培养过程中的出愈率和分化率均有影响。中国农业科学院茶叶研究所报道,选用福鼎大白茶、龙井 43、紫阳种、格鲁吉亚 1 号、平云等品种的花药进行培养,都能产生愈伤组织,但差异悬殊。以云南大叶种天然杂种——平云最高,其次为有性群体品种紫阳种,最低的是有性系格鲁吉亚 1 号。无性系龙井 43 虽然产生愈伤组织频率也较高,但是生长一直处于僵化状态。陈振光等以福云 6 号、福云 7 号、赤叶奇兰、政和大白茶等品种为培养材料,只有福云 7 号的花药能诱导出植株。

2.2 培养基

陈振光等证明用 SJ-1 为基本培养基(pH6.8)作为愈伤组织诱导培养基,愈伤组织诱导率最高,其次为 MS 和 H 培养基,Blaydes 和 N₆ 培养基最低。中国农业科学院茶叶研究所采用 MS 和 Miller 两种培养基作为基本培养基,诱导茶树花药愈伤组织,因其附加成分不同而有差异,附加 2 mg·L⁻¹ 2,4-D 和 10% 椰子汁的比仅加 2,4-D 的诱导频率高,且生长较正常。当愈伤组织长到绿豆大小时,即将其转移到附加有 0.5 mg·L⁻¹ IAA 和 15% 椰子汁的培养基上进行分化苗的培养。茶树花药愈伤组织诱导研究表明,在同一细胞分裂素下,随着 2,4-D 浓度的增加,花药体细胞愈伤组织诱导率亦提高。当 2,4-D 为 0.3 mg·L⁻¹ 时,愈伤组织诱导率为 30.4%; 2,4-D 上升到 0.5 mg·L⁻¹ 时为 35.6%; 2,4-D 提高到 1 mg·L⁻¹ 时为 45%。表明 2,4-D 浓度提高能促进花药壁体细胞脱分化,为了控制体细胞的过度增殖,常采用 0.2~0.5 mg·L⁻¹ 浓度水平的 2,4-D。

2.3 小孢子发育阶段

通常在 11 月前取发育正常健壮的花蕾,雄核发育处于单核中晚期的花药接种较好,这与其它植物花药培养基本相同。但由于气候及花蕾着生位置等的影响,不同花蕾颜色及大小略有差异,而且同一个花蕾的花药之间也有发育期差异,一般取橙黄色花药为佳。经冷处理(花蕾在 0℃ 冰箱中贮藏 24 h)产生花药愈伤组织的频率较高,质量也较好。

虽然实践已证明花药培养对诱导形成单倍体植株是有效的,但也存在不足之处。最主要的问题是通过花药培养途径所获得的植株往往不仅来源于花粉,有些是来源于花药壁、绒毡层等不同部位的体细胞,结果造成所获得的植株群体常常是一个既有单倍体,又有二倍体、甚至多倍体的混合群体,这就给以后的鉴定及利用带来一定的困难。花粉培养则可以完全排除花药组织的干扰,使诱导形成的植株全部来源于单倍体的花粉,从而省略对其鉴定的程序或可以直接利用。此外,如果结合突变体筛选以及进行基因操作等研究时,花粉培养更具有其独特的优越性。但是花粉培养所要求的技术比花药培养更为复杂,许多不明的因素有待研究,目前尚未见有关茶树花粉培养的报道。

3 子叶和胚的培养研究

吴振铎(1976)^[14]首先以子叶为外植体诱导形成了愈伤组织和胚状体,并得到了植株。接着安间舜等^[1]在 1980 年用去除子叶的胚培养形成芽和根。

上世纪 80 年代,研究者主要采用子叶作外植体开展了大量培养研究工作。莫典义等(1981)^[15]用子叶诱导胚状体并再生植株,将种胚接种于 MS 培养基,附加 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA,30 d 后将材料转入附加有 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LH,5% 蔗糖的 MS 培养基上,培养 20 d 后即可出现胚状体。将胚状体移入低激素和无激素的培养基中,诱导出完整的小苗。在胚状体诱导过程中,加入 5%~10% 椰乳和 $100\sim300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LH,有促进胚状体形成作用。1982 年加藤^[1]用子叶的愈伤组织,在培养基中添加 BA、NAA、IBA 等激素的组合分化出胚状体,然后再生获得幼苗。颜慕勤等(1983)^[16]用茶树子叶培养形成胚状体。方法是剥除种子内外种皮,在附加有 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT(或 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA)、 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CH 的改良 ER 固体培养基上经 3~4 周培养后,子叶表皮上逐渐产生胚状体,然后转移到 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZT, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的培养基上,经 4~5 周胚状体即长成小植株,待胚根长到 1.5~2.0 cm 长时移植。中村顺行(1985)^[1]培养子叶胚获得完整植株。陈平等(1985)^[17]用子叶诱导愈伤组织及分化丛生苗。培养基为自制培养基,添加 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA。诱导生根培养基为 1/2ER,添加 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA,最终形成完整植株,并移栽成活。Kato M(1986)^[18]用子叶进行培养,基本培养基为 MS,添加 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ VB₁, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟酸, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ VB₆, $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Gly, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肌醇;生根培养基为 MS,添加 IBA、BA、NAA 和 GA₃。

刘德华(1987)^[19]用茶籽子叶柄培养直接分化芽。分化培养基采用 MS 培养基的无机成分,附加 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ VB₁, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 烟酸, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ VB₆, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肌醇, $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Gly, $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA,3% 蔗糖,0.8% 琼脂,pH 为 5.7。1999 年该课题组^[20]以种胚和茎段为材料,对茶树不同组织体细胞胚、不定芽分化进行了研究。胚性愈伤组织在 2 种培养基上交叉培养,保持分化能力在 15 个月以上。体细胞胚、不定芽都能在相应的培养基上增殖,但随着继代次数增加,有些胚性愈伤组织丧失胚性。研究认为每次继代培养选择色淡绿、鲜嫩、结构较疏松的愈伤组织在不同培养基上进行交叉培养是很重要的一个环节。同年^[21]为了探寻光照对体细胞植株再生的影响效果,他们以全胚、具有子叶柄的子叶为材料,研究了 500、1 500 lx、黑暗 3 种光照条件对植株再生的影响。结果表明,胚状体主要发生在子叶柄和子叶片的隆起处,子叶片隆起

发生率随光照度增加而降低,子叶片发生隆起的子叶培养物在 500 lx 光照度下培养,胚状体分化率较高;子叶柄的胚状体、不定芽分化率随光照度下降而下降;连续在黑暗下培养,子叶片的畸形胚发生率高,且数量多;在相同光照度下培养,全胚的总分化率低于子叶。王立等(1988)^[22]采用 MS 的改良 ER 培养基,附加 $0.5\sim0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.10\sim0.53\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,对未成熟胚进行培养,成功地诱导出合子胚、不定胚及不定芽,并形成植株。芽苗长至 3 cm 左右时,移入 MS 和改良 ER 培养基中,当 IBA 浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时发根最好。如果将生长健壮的茶苗直接插入土中,发根率也可达 60%~70%。

江昌俊课题组(2004)^[23,24]选用新梢的叶片、叶柄和茎段,8 月采摘的种种子叶和幼胚以及 10 月采摘的种子成熟子叶和成熟胚作为组培材料,试验证明,各种外植体均可诱导产生愈伤组织,但不同外植体的出愈时间和出愈率均不同。由嫩茎诱导产生愈伤组织最快,约需 12~18 d;叶柄次之,约需 15~23 d;叶片最慢,约需 18~27 d。各外植体的出愈率,茎段最高,可达 90% 以上;再次是叶柄,叶片的出愈率最低,仅为 55.3%~84.4%。从诱导愈伤组织的效果来看,2,4-D 优于 NAA。不同外植体的分化能力不同,来源于营养器官的外植体往往只能分化出根,较难分化出芽,来源于种子的子叶外植体较易诱导产生体细胞胚或不定芽。并通过研究确定了“子叶外植体→体细胞胚(分化芽)→再生植株”的茶树再生体系。2005 年该课题组^[24]用成熟胚为外植体,研究了 2,4-D、6-BA 等不同植物激素对培育成苗的影响。结果表明,在合适的激素组合条件下,愈伤组织诱导率为 97%,在附加 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基上,愈伤组织的芽分化率为 14.2%,认为 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的 MS 培养基适合胚直接培育幼苗。方祖桢(2004)^[25]以种子胚芽为材料,在培养基中添加秋水仙素诱导愈伤组织产生多倍体。基本培养基为 MS;无菌苗萌发培养基:MS + $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA;胚性愈伤组织诱导培养基:MS + $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D + $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA;胚性愈伤组织增殖培养基:MS + $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA;愈伤组织染色体诱变培养基:MS + $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA + 0.1% 秋水仙素。以上培养基均附加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂,pH 5.8,培养温度(28 ± 1)℃,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,光照度 1 200~1 500 lx。结果显示,大量的愈伤组织细胞染色体数加倍。

从前人和目前的研究结果分析,用子叶作外植

体获得再生植株是较为理想的茶树再生体系,但仍有许多有待解决的问题:一是成年茶树外植体的体胚发生;二是如何建立高频率、高重复、稳定的再生体系等等。

4 叶片培养

日本土井芳宪(1981)^[1]用薮北种叶片为材料,对愈伤组织的诱导和根的分化条件进行了研究。结果表明,当培养基中添加一定浓度的 NAA 和 Kin,能较好地诱导愈伤组织,根分化以 NAA 最为有效。刘德华等(1989)^[26]用 MS 培养基附加不同激素的种类及浓度的组合配比,研究在叶片组织培养中对愈伤组织、胚状体、芽和小植株分化能力影响,并得到健壮苗。研究表明叶片的组织培养中诱导愈伤组织、分化胚状体和小植株的形成所需要的外源激素的种类组合及浓度配比上存在明显差异。

王毅军等(1994)^[27]对体细胞胚胎发生的组织细胞学进行了研究,他们以叶片为外植体,MS 培养基中附加 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA, $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA 和 0.2% ~ 0.3% 活性碳,诱导出愈伤组织和胚状体,进一步形成小植株。切片观察表明,愈伤组织胚状体的发生,起源于愈伤组织表层及其内部的单个细胞和细胞团,胚状体发育顺序与合子胚大致相似,经球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚阶段,但发育过程中常有畸形胚出现。暨淑仪等(1995)^[28]以叶片为外植体,诱导产生愈伤组织,并对愈伤组织的形成进行细胞组织学的观察。观察结果表明,叶外植体叶肉中的小叶脉周围以及主脉中的薄壁细胞首先启动,脱分化而进行分裂,形成分生细胞团,继而形成愈伤组织。

根据茶树植物组织与器官培养的研究结果,将应注意的基本问题总结如下:

4.1 外植体

选用外植体时应考虑供体植株的生理状况及所取的部位,尽管每个器官或组织均可作为外植体,但成功的难易程度有所不同。一般来说,较大的外植体有较强的再生能力,而小的则弱。外植体太大易污染,太小多形成愈伤组织,甚至难以成活。多酚类含量高的品种,如红茶品种更易褐化。

未成熟胚及相关外植体的取材在茶树幼果生产季节从田间取需要培养的茶树品种的幼果,田间生长的茶树、扦插苗、实生苗、室内培养的实生苗、组织培养苗等均可作为茎尖及相关培养材料的来源,大多数研究者倾向用春季新梢作为茎和芽的材料,可能是由于新梢细胞分裂能力强于秋冬季的新梢。室

内控制条件下培养实生苗和组织培养苗比田间开放条件下生长的茶树污染轻,消毒处理比较方便,是组织与器官培养较好的材料来源,取一芽一、二叶新梢,小心摘除叶片,切取所需的外植体。如用叶片作外植体则取茶树采摘面中央春季生长健壮的芽下第一、二叶。叶片主脉与支脉交界处常有真菌休眠孢子存在,所以切割时首先切除主脉,同时去掉叶子的顶端、基部和边缘部分,以减少污染。

4.2 培养基

茶树大多数品种多酚类含量可达 20% ~ 30% 以上,克服的办法可以在培养基中加入一些抗氧化剂,如抗坏血酸、PVP、DTT 等;或将外植体预先浸入抗氧化剂溶液中,然后再接种到培养基上;或减低光照强度或置于黑暗中培养;或者一旦培养基变褐即转移至新的培养基等。茶树初代培养中多用 MS 培养基为基本培养基。在所用的生长调节物质中,细胞分裂素类以 6-BA 效果最好,其次是 Kin、ZT 等。在生长素类物质中,以 2,4-D 或 NAA 较多,也有用 IAA 的。各个研究者的研究结果有一些差异,还未获得规律性结论,这可能是因为诱导愈伤组织、苗和根形成的激素浓度范围比较狭窄,而且不同的茶树品种,不同的外植体所需的激素种类、浓度和比例不同所致。

到目前为止,组织培养中愈伤组织的产生,苗和根的分化虽然难度不大,但要经多次继代培养成苗并移栽到大田成活,仍有相当大的难度。

5 组织培养生产天然产物的研究

利用组织培养生产有用次生代谢物是茶树细胞工程研究的一个重要领域,有关组织培养次生代谢物的研究多数以叶片和嫩茎为外植体。由于茶树次生代谢产物丰富,利用细胞培养生产有用次生代谢物,如茶多酚、咖啡碱、茶氨酸等是解决资源不足的重要途径。

成浩等自 1993 年以来,对培养条件下儿茶素形成和累积进行了系统的研究。1993 年课题组^[29]用春梢嫩叶作外植体,经多次继代培养获得愈伤组织系,愈伤组织诱导与继代培养均采用 MS 基本培养基。试验证明,激素 IBA 或 KT 在单独使用时,效果各异,但两者间存在明显的互相作用效应,其中以 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 组合,对儿茶素累积最为有利。MS 培养基适合愈伤组织生长,而 White 培养基上的细胞儿茶素累积最高,提高蔗糖浓度有利于次生代谢产物的形成。通过对培养材料来源的选择和培养基组成的调节,可使愈伤组织儿茶素含

量(鲜重)从不足 $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高至 $16 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。1995 年该课题组^[30]研究了培养基组分对茶树悬浮细胞儿茶素含量的影响,结果表明,全硝态氮对于愈伤组织儿茶素形成最为有利,而 $\text{NH}_3^-:\text{NH}_4^+$ 为 7:3 时愈伤组织生长最快,总氮浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织生长量最高,提高氮浓度则导致儿茶素含量急剧下降,添加 K^+ 能促进愈伤组织生长并使儿茶素含量降低, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 对儿茶素形成最为有利。此外, PO_4^{3-} 对愈伤组织生长影响较大,而 SO_4^{2-} 对儿茶素形成影响较大, Mg^{2+} 浓度对两者均无显著影响。同年,他们在细胞固体培养研究的基础上,系统分析了培养基大量元素、微量元素和有机物质等对茶树悬浮培养细胞儿茶素产生的影响^[30]。根据试验结果,设计了儿茶素生产培养基,使茶悬浮细胞儿茶素总量提高至干重的 30% 左右,并且分析了不同品种来源的茶树培养细胞在儿茶素形成能力上的差异和细胞筛选的效果。2001 年^[31]他们研究了在培养基中添加类黄酮生物合成前体苯丙氨酸后,对于培养细胞表儿茶素等次生产物合成的影响。试验结果表明,当外源饲喂 $1000 \text{ umol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯丙氨酸时, L-表儿茶素(L-EC)与 D, L-儿茶素(D, L-C)的含量比对照增加了 40%, 由二种儿茶素和多种儿茶素低聚体组成的乙酸乙酯萃取物的总量增长了 66%。2004 年课题组^[32]对不同外植体来源的茶树培养细胞的茶氨酸生物合成能力、适宜培养细胞合成茶氨酸的培养基条件、培养细胞茶氨酸生物合成动态和更新培养基对提高培养细胞茶氨酸累积含量的效果等进行了分析。结果表明,在一个培养周期中,培养细胞的茶氨酸累积高峰出现在第 11 d 左右。在以每 10 d 更新一次培养基的条件下,培养细胞茶氨酸合成能力可维持至第 30 d 左右,达到细胞干重的近 20%。郭玉琼等(2001)^[33]以花药为外植体,进行愈伤组织的诱导和茶多酚含量的测定研究。试验表明,基本培养基与附加物对愈伤组织诱导效果具有差异,所诱导的花药愈伤组织已具有合成酚类化合物的能力。

目前,茶氨酸制备方法主要有化学合成、微生物发酵、植物细胞(组织)培养,很少采用单纯从茶叶中提取。钟俊辉等(1997)^[34]用春梢嫩叶作为外植体,对不同的培养条件下愈伤组织生长及其茶氨酸累积情况进行了研究。结果表明,激素 IAA 和 6-BA 结合作用时,存在着相互效应,其中以 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 和 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 时对茶氨酸累积最有利。不同碳源对于愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响相近,增加糖浓度有利于次生代谢物的累积,最适培养温度和

累积温度都是 25°C , 暗培养更有利于茶氨酸的累积。茶氨酸的累积曲线与愈伤组织生长密切相关,通过调节培养基成分使茶氨酸在愈伤组织中的含量达到了 $201.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。袁弟顺等(2004)^[35]选取已在 MS 培养基继代培养多次的福鼎大白茶、福鼎大毫、福云六号、福云 595、福安大白 5 个茶树品种的愈伤组织,培养温度 25°C , 黑暗培养,培养基添加 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 前体盐酸乙胺、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA,培养基初始 pH5.4,对不同品种茶树愈伤组织的培养与茶氨酸的积累进行了研究。试验证明,愈伤组织生长量与茶氨酸含量呈显著正相关 ($P < 0.01$); 福鼎大白的愈伤组织生长量与茶氨酸质量分数最高,分别是 $2.26 \text{ g} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 、 $176.143 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 愈伤组织生长量与茶氨酸含量的大小顺序均为福鼎大白茶、福云 595、福安大白、福鼎大毫和福云六号;茶氨酸的最佳收获时间为培养后 24 ~ 28 d。吕虎等(2005)^[36]以嫩叶愈伤组织为材料,分析了茶氨酸合成前体盐酸乙胺($\text{ZtNH}_2\text{-HCl}$)的添加方式和剪切力对培养细胞增长量和茶氨酸合成量的影响。结果显示,在一个培养周期中,培养细胞茶氨酸积累高峰出现在第 20 ~ 22 d,添加盐酸乙胺可大幅度提高茶氨酸积累量。该课题组(2006)^[37]以嫩叶为外植体, MS 培养基(加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA、 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸乙胺)进行茶叶愈伤组织悬浮培养,研究了培养基不同组成条件对茶叶细胞大规模悬浮培养过程中细胞生长与茶氨酸合成的影响。结果显示,整个培养周期中,细胞收获量和茶氨酸积累量峰值出现时间为培养的第 19 ~ 22 d; 茶叶细胞生长量和茶氨酸积累量分别可达到 $163.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养液和 $33.57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养液;提高培养基中水解酪蛋白浓度可使细胞对数生长期和稳定期得到延长,并有利于茶氨酸积累; $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 对茶氨酸合成具有非常显著的影响。从生产效率考虑,培养周期以 19 ~ 22 d 为宜。

彭正云等(2004)^[38]为了获得茶树发状根,生产茶叶中的有用物质,以大田茶树的根为材料,在离体培养下对其诱导发状根。结果表明,从茶树根愈伤组织中诱导出的发状根具有生长快、无向地性、密生白色根毛和较强的分枝能力。发状根分枝,存在直接分枝和在发状根上出现瘤状突起后在其附近发生侧根 2 种类型。发状根及其愈伤组织轮换在不同组分的培养基上继代培养,对发状根的分化与增殖有明显的促进作用。根外植体在以 MS 培养基为基本成分,添加不同质量浓度的 BA 和 IBA 的 17 种培养基上都诱导出了愈伤组织,但不同品种的根外植体

愈伤组织诱导率存在明显差异。

参考文献:

- [1] 江昌俊. 茶树育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [2] Kato M. Regeneration of plantlets from tea stem cuttings[J]. Japan J Breed, 1985, 35(4): 317-322.
- [3] 黄亚辉. 茶树茎尖培养研究初报[J]. 茶叶通讯, 1992(2): 29-31.
- [4] 奚彪, 刘祖生. 外植体性质对茶腋芽组培快繁的影响[J]. 茶叶, 1994, 20(4): 14-17.
- [5] 刘德华. 茶树愈伤组织继代培养与体细胞胚发生[J]. 作物学报, 1995, 21(4): 470-474.
- [6] 刘德华, 周带娣, 肖文军. 茶树茎段培养胚性状态的调控及其分化[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(2): 110-112.
- [7] 孙仲序, 刘静, 王玉军, 等. 山东茶树良种组织培养及繁殖能力的研究[J]. 茶叶科学, 2000, 20(2): 129-132.
- [8] 李家华, 周红杰, 李明珠, 等. 对不同激素配方对大叶种茶树新梢组织培养的效果[J]. 云南农业科技, 2001(3): 27-28.
- [9] 张亚萍, 邵鸿刚. 不同茶树品种组织培养的初步研究[J]. 贵州茶叶, 2002(4): 10-12.
- [10] 张建华, 毛平生, 彭火辉. 茶树的组培快繁技术初探[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2003(4): 32-33.
- [11] 周健, 成浩, 王丽鸳. 茶树组培快繁技术的优化研究[J]. 茶叶科学, 2005, 25(3): 172-176.
- [12] 杨国伟, 兰蓉, 王晓杰, 等. 茶树愈伤组织诱导和组织培养[J]. 江苏农业科学, 2006(4): 122-124.
- [13] 陈振光, 廖惠华. 茶树花药培养诱导单倍体植株的研究[J]. 福建农学院学报, 1988, 17(3): 185-190.
- [14] 吴振铎. 茶树组织培养的研究[J]. 中华农学会报, 1976, 93: 30-42.
- [15] 莫典义. 茶树胚状体的诱导和植株再生[J]. 中国茶叶, 1981(4): 45.
- [16] 颜幕勤, 陈平. 茶树子叶离体培养形成胚状体的研究[J]. 林业科学, 1983, 19(1): 25-29.
- [17] 陈平, 颜幕勤. 大叶茶的组织培养[J]. 植物生理通讯, 1985(2): 45.
- [18] Kato M. Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* L and *Sinensis* L[J]. Japan J Breed, 1986, 36(1): 31-38.
- [19] 刘德华. 茶籽子叶柄培养直接分化芽[J]. 中国茶叶, 1987(6): 15.
- [20] 刘德华, 周带娣, 黎星辉, 等. 茶树不同组织体细胞胚、不定芽分化的研究[J]. 作物学报, 1999, 25(3): 291-295.
- [21] 刘德华, 周带娣, 熊格生, 等. 茶树体细胞植株再生的光照效应[J]. 湖南农业大学学报, 1999, 25(2): 112-115.
- [22] 王立, 杨素娟, 王玉书. 茶树未成熟胚培养及植株的形成[J]. 中国茶叶, 1988(4): 16-18.
- [23] 余有本. 茶树中咖啡碱合成酶基因的抑制及在其他生物体中的表达[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004.
- [24] 蔡海云. 茶树成熟胚培育成苗的初步研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005.
- [25] 方祖桢. 茶树愈伤组织多倍体诱导[J]. 黄山学院学报, 2004, 6(6): 87.
- [26] 刘德华, 廖利民. 茶树叶片组织培养的初步研究[J]. 福建茶叶, 1989(2): 13-16.
- [27] 王毅军, 严学成, 暨淑仪, 等. 茶离体培养体细胞胚胎发生的组织细胞学研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(2): 47-51.
- [28] 暨淑仪, 严学成, 王毅军. 茶叶片愈伤组织形成的细胞组织学观察[J]. 茶叶, 1995, 21(2): 11-13.
- [29] 成浩, 杨素娟, 王玉书, 等. 茶叶愈伤组织培养及其儿茶素的积累[J]. 茶叶科学, 1993, 13(2): 109-114.
- [30] 成浩, 杨素娟, 王玉书, 等. 培养基组分对茶树悬浮细胞儿茶素含量的影响[J]. 茶叶科学, 1995, 15(2): 111-118.
- [31] 成浩, 李素芳. 外源苯丙氨酸对茶树培养细胞儿茶素合成的影响[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 132-135.
- [32] 成浩, 高秀清. 茶树悬浮细胞茶氨酸生物合成动态研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(2): 115-118.
- [33] 郭玉琼, 陈财珍, 赖钟雄, 等. 茶树花药愈伤组织诱导及茶多酚含量测定[J]. 福建茶叶, 2001(4): 7-10.
- [34] 钟俊辉, 陶文沂. 茶愈伤组织培养及其茶氨酸的积累[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(3): 1-7.
- [35] 袁第顺, 倪元栋, 邝平喜. 茶愈伤组织的诱导[J]. 福建茶叶, 2003(3): 21-25.
- [36] 吕虎, 华萍, 余继红, 等. $ZnNH_2-HCl$ 和剪切力对茶叶细胞悬浮培养中茶氨酸合成的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1472-1476.
- [37] 余继红, 华东, 华萍, 等. 大规模悬浮培养茶叶细胞合成茶氨酸培养基组成优化研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(2): 131-135.
- [38] 彭正云, 刘德华, 肖海军, 等. 茶树根愈伤组织及发状根诱导的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(2): 138-141.