

茶树组织培养及影响因素

程柳, 汤浩如 (四川农业大学林学院园艺学院, 四川雅安 625014)

摘要 概述了茶树组织培养在快速繁殖、种质资源保存、次生代谢物生产方面的研究进展, 重点论述了基因型、外植体、培养基和植物生长调节剂等因素对茶树组织培养的影响。指出 茶树组织培养中存在的主要问题和未来的研究重点。

关键词 茶树; 组织培养; 进展

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)07-01960-04

An Overview of Progress in Vitro Culture of in Tea Plants and its Influencing Factors

CHENG Liu et al (College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract The Significant progress of tea plant tissue culture in the past decade on rapid propagation, germplasm conservation and metabolite production has been summed up. The factors influencing tissue culture of tea plants, such as different gene types, explants, culture medium and plant growth regulators were discussed in emphasis. The main problems that existed in tea plant tissue culture has been pointed out and some important suggestions for the further research of tea plant tissue culture were also expounded.

Key words Tea plants; Tissue culture; Progress

茶树(*Camelia sinensis* L)属山茶科山茶属多年生常绿木本植物^[1], 其叶经过加工后的茶饮品是世界上三大无酒精饮料之一^[2]。近年来, 随着茶叶产业的不断发展, 茶叶生产中对优良新品种的要求越来越迫切。虽然传统育种方法已培育出了一些产量高和品质优的品种, 但生产上仍缺乏低咖啡碱、高儿茶素和高茶氨酸等符合人们消费需求的优良品种^[3]。这主要是因为茶树基因的高度杂合性, 传统的育种方法在改良茶树品种方面难度较大^[4]。植物离体再生技术的日益成熟和基因工程技术的不断发展, 为培养茶树品种开辟了新的途径。基因工程技术的应用需要建立高频率的遗传转化体系, 而高频率的遗传转化体系又依赖于高频率的再生体系。为了推动基因工程技术在茶树上的应用, 笔者就茶树组织培养研究进展和影响组织培养因素进行概述。

1 茶树组织培养的研究进展

1.1 快速繁殖 利用组培进行茶树快繁不仅可大大提高繁殖系数, 而且能最大限度地保持品种的遗传稳定性, 对新品种和良种快速推广有重要价值。早在 1976 年, 吴振铎^[5]就用茶树子叶愈伤组织培育出了试管苗。随后, 安间舜等^[6]和王立等^[7]分别用成熟胚和未成熟胚获得了茶树的植株再生。由于胚及其附属物是杂交的产物, 难以保持优良母株的性状, 1984 年 Phukam 等^[8]便开始茶树茎尖和带腋芽茎段的培养研究。1987 年, Nakamura^[9]第 1 次从茶树茎尖培养中获得了再生植株。1990 年, Sarathchandra 等^[10]采用来自田间植株的茎节作为外植体建立了实用的茶树离体繁殖方法, 1 年从 50 个外植体得到 36 153 个新梢。2000 年, 孙仲序等^[11]取茶树茎段作为外植体进行离体培养, 1 个外植体经 3 次继代培养繁殖得到 47 棵苗。茶树组培苗增殖率低、生长速度慢和培养周期长等一直是茶树离体快速繁殖的瓶颈。周健等^[12]以 MS 为基本培养基, 通过不同植物生长调节剂及其组合优化了茶树离体快繁技术, 结果表明, 1 个带 1~3 个芽的芽团经 30 d 培养可增殖 2.75 倍, 且 20% 的小苗高度大于 5 cm。袁正仿^[13]和张娅婷^[14]等分别以薷北茶带腋芽的茎段为外植体建立起快速无性繁殖体系。中村顺行^[15]详细叙述了通

过芽培养、不定芽形成和不定胚形成等途径进行茶树快速繁殖的方法, 使得茶树离体快繁进入实用阶段。1 年内 1 个外植体可繁殖培育出 5 万株茶苗, 移栽成活率可达 90% 以上。

1.2 种质资源保存 我国茶树资源丰富, 茶树种质资源保存的数量和质量直接影响茶树育种和茶树生物学研究的深度和广度, 茶树种质资源的保存主要有种质圃保存及种子、花药低温保存^[16]。虽然种质圃保存是最安全可靠的保存方法, 但占地面积大, 需要大量的人力和物力, 且易受自然条件的影响。种子和花粉低温贮藏保存虽然保存方法简单, 管理方便, 且茶树种子在 5℃ 下保存 9 年后仍有很高的发芽能力^[17], 但是, 茶树种子属于“顽拗型”, 不耐干燥^[18]。冰点以下的温度会使茶树种子很快丧失活力, 不利于茶树种质的长期保存。同时, 茶树为异花授粉植物, 用茶树种子和花粉保存只能保存基因而不能保存优良的基因型。近年来, 随着茶树组织培养技术的发展, 茶树茎尖^[9, 19]、茎段^[11-14, 20]、叶片^[21-22]、未成熟胚^[23]、成熟胚^[24-25]、子叶^[26-27]和花药^[28]等组织培养相继获得再生植株, 为茶树种质离体保存提供了新的技术途径。1986 年, 王立等^[29]成功地将不同茶树变种的 10 多个品种的未成熟胚诱导成植株, 并建立起有良好重复性和稳定性的未成熟胚培养技术, 诱导物自 1986 年以来在多次继代培养条件下均能形成一个反复增殖的系统。1996 年, 王立等^[30]又以春梢的茎切段为外植体, 以 MS 或改良 ER 为基本培养基, 附加植物生长调节剂和化学抑制剂如甘露醇 15 g/L、PP 3 330.5 mg/L 或 ABA 5 mg/L 等, 在弱光照和较低温度下, 保存茶树种质 2~3 年, 最长达 5 年, 被保存的培养物均具有较强的形态发生潜能, 已形成一个反复增殖的系统, 离体试管培养物保存, 如能与田间资源圃相结合, 可望建立我国茶树种质资源的复式保存体系, 从而对未来茶树育种产生深远影响。

1.3 次生代谢物生产 茶树是一个富含多种次生代谢产物的植物, 茶氨酸和儿茶素的药理功能促使国内外学者对如何经济地获取茶氨酸和儿茶素进行深入的研究^[31-32]。目前主要采取的成茶提取工艺获取茶氨酸和儿茶素, 但其工艺复杂、成本较高及原料受地域季节影响等因素限制了该工艺的大规模应用。利用茶树细胞培养法生产儿茶素和茶氨酸, 因其具有不受地域季节限制、不与传统饮料茶叶争原料和便于

作者简介 程柳(1981-), 女, 重庆垫江人, 硕士研究生, 研究方向: 茶树生物技术。

收稿日期 2006-11-29

产业化等优点,近年来受到了国内外的重视。大量的试验表明,在茶树愈伤组织的培养和增殖过程中仍具有合成次生代谢物的能力。成浩^[33]认为,培养细胞茶氨酸合成能力取决于其活力。袁弟顺^[34]报道,茶树愈伤组织的生长及其代谢产物的累积能力与其品种特性关系密切。Zaprometovetal^[35]将 KT 添加到含有植物生长素的培养基中促进了茶培养细胞酚类化合物的合成、细胞的分化和木质化。利用植物细胞培养生产次生代谢物的关键在于提高其含量。Takanobu Matsuura 等^[36]报道,当培养基中含有 NO_3^- 而无 NH_4^+ 时,茶氨酸含量可大大增加。余继红等^[37]报道,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,并利于茶氨酸积累。Shervingtonetal^[38]报道,在培养基中加入一定含量的茶氨酸合成前体乙胺可提高细胞中氨基酸含量。成浩等^[39-42],系统地研究了培养基中大量元素、微量元素和有机成分等对茶树愈伤组织悬浮细胞儿茶素形成的影响。通过改良培养基,使茶树细胞培养中形成的儿茶素总量提高至细胞干重的 30%^[43],超过了一般茶树品种鲜叶的儿茶素总量水平。Matsuuraetal^[44]报道,在 $\text{MS} + \text{BA}4.0 \text{ mg/L} + \text{IBA}2.0 \text{ mg/L}$ 的 B 培养基中加入 25 mmol/L 乙酰胺,茶树愈伤组织干重中茶氨酸含量可达 223 mg/g 。同时,Matsuuraetal^[45]还指出,在 $\text{MS} + \text{NO}_3^- 40 \text{ mmol/L} + \text{PO}_4^{3-} 4 \text{ mmol/L} + \text{Mg}^{2+} 2.76 \text{ mmol/L}$ 培养基上培养的愈伤组织中,茶氨酸含量是在 B 培养基上的 2.2 倍。陈瑛等^[46]报道,以 $6\text{-BA}4 \text{ mg/L} + \text{IAA}2 \text{ mg/L}$ 或 $6\text{-BA}3 \text{ mg/L} + \text{IAA}1.5 \text{ mg/L} + \text{TA}2 \text{ mg/L}$ 的组合时茶愈伤组织干重的茶氨酸含量最高可达 170 mg/g 。钟俊辉等^[47]以碧云嫩叶为诱导材料,对茶树愈伤组织培养所要求的光照、温度、培养基、碳源、激素和前体物等条件进行研究,并在此基础上,系统地分析了摇床转速、接种量、装液量和培养基主要成分对茶树细胞悬浮培养及茶氨酸生产的影响;提出了茶树悬浮细胞生产茶氨酸的最佳工艺。在这一工艺条件下培养的茶树悬浮细胞干重的茶氨酸含量可达 233.25 mg/g ^[41]。这些愈伤组织细胞干重的茶氨酸含量都高于天然茶树 1 芽 2 叶干重的茶氨酸含量^[48] ($10 \sim 30 \text{ mg/g}$)。

2 影响茶树组织培养的因素

2.1 基因型 材料的基因型对愈伤组织产生及器官分化都会有决定性的作用。据中村顺行^[49]报道,子叶培养的诱导率与品种有关,Yabukita、Kurasawa 不定胚诱导率为 25% ~ 50%,而 Hourgoku、Da-Yeh Oolong、Manipuri9 等不定胚诱导率不到 6%。中村顺行^[50]还报道,在茎段组织培养中,适制绿茶品种不定芽的分化有明显差异,而适制红茶或乌龙茶的品种不定芽的分化率没有差异。据土井芳宪^[51]报道,在相同培养条件下,不同品种花药愈伤组织诱导率和发根率均不同,其中愈伤组织诱导率和发根率均较高的是 Byoji,而有很高的愈伤组织诱导率的 Yutakamidori 几乎不发根,F1ACG、C4、Benihomar 表现出高的愈伤组织诱导率,低的发根率,而 Brikaori 几乎不形成愈伤组织。谭和平^[52]认为,遗传差异是影响组培成功的一个关键因素。他在试验中发现,相同条件下不同茶树品种启动率明显不同。袁弟顺^[34]也发现,不同茶树品种愈伤组织生长量不同,愈伤组织生长量的大小顺序为福鼎大白茶 > 福云 595 > 福安大白 > 福鼎大毫 > 福云六

号。不同基因型对不同培养条件的反应不同,可能是在培养过程中那些与茶树代谢及信号传递有关的基因不同而造成的。

2.2 外植体 组织培养技术应用于作物改良的一个基本的前提是能够从培养细胞或组织中得到再生植株。目前,茶树已经从茎尖^[9,19]、腋芽^[53-55]、茎段^[11-14,20]、叶片^[21-22]、子叶^[26-27]、下胚轴^[56]、胚^[23-25]和花药^[28]等成熟或未成熟组织中通过愈伤组织或直接产生不定芽的方式成功地进行器官发生和植株再生。

不同外植体,其离体反应能力也不相同。中村顺行^[57]报道,茎段、叶片、子叶、根和花药的愈伤组织启动时间不同。杨国伟^[58]报道,叶和茎能产生愈伤组织,但诱导的时间不一样,叶为 23 d,茎为 11 d,而种子则不能诱导出愈伤组织。袁地顺^[59]报道,叶片愈伤组织诱导率为 80%,高于嫩茎愈伤组织诱导率 53%,嫩茎愈伤组织诱导率又明显高于根尖 36%。带腋芽的茎段^[11-14,20,60]、子叶^[26-27]能够直接产生不定芽,腋芽^[53-55]、叶片^[21-22]和花药^[28]等主要通过愈伤组织诱导的方式进行器官发生。为了能快速建立植株的再生系统,许多研究者选用带腋芽的茎段建立培养物,因其在连续的培养中能直接产生更多的丛生芽,且丛生芽生长较好。

外植体的大小和起始培养物的幼嫩程度也影响愈伤组织产生和器官发生能力。中村顺行^[49]在以子叶作为外植体进行培养时,发现不定胚的发生频率与子叶大小有一定的相关性。在一定范围内,子叶面积越大,不定胚的发生率越高。Nakamura^[8]认为,较长的植株在生根培养中产生的愈伤组织往往较少,因而生根也较容易。幼态组织比老态组织具有较高的形态发生能力。茶树嫩叶可诱导出体胚,老叶则不行^[61]。幼叶、幼茎和顶芽能诱导出愈伤组织,老叶和老茎则不行^[58]。

外植体的不同取材时间也对离体培养产生极大的影响。孙仲序^[11]分别在春、夏、秋、冬季取相同部位的材料作为外植体和经过相同的处理,冬季催芽后剪取的茎段培养成活率最高,而夏、秋季剪取的茎段成活率最低。中村顺行^[49]认为,子叶取材最适时期是 9 月下旬 ~ 10 月中旬种子成熟时期,这时采取的子叶不定胚分化率最高,未成熟或贮藏过的种子子叶不定胚的诱导率均低于刚成熟的种子子叶,而且污染率也较高。仓贯幸一^[62]报道,10 月中、下旬完全成熟的种子的胚轴的诱导和生长最好。这可能是不同发育时期外植体内源激素水平变化和对生长调节物质的敏感性不同所致。

2.3 培养基 在茶树组织培养中,大多数学者用 MS 作基本培养基。张娅婷^[14]以 MS、N6 和 White 基本培养基的无机盐,附加相同量的维生素、氨基酸、糖及植物生长调节剂,对数北茶芽苗进行培养发现,MS 培养基中所形成的芽苗数及苗高度均优于其他 2 种基本培养基。Haldeman^[8]也比较了 MS 和 Anderson's Rhodo dendron 培养基对茶树愈伤组织培养的效果,结果以 MS 最佳。杨国伟^[58]报道,MS 比 Heller、White 培养基更利于茶树愈伤组织的生长。而中村顺行^[9]也曾比较了多种培养基,认为 Nitsch、Camborg、MS 培养基一样对顶芽的生长都很好。然而,张建华^[63]在试验中发现,ER 比 MS 培养基更适合于茶树组织培养,尤其是增殖培养。另外,Toru

Kuboi^[64]报道,B5 液体培养基比固体培养基更利于茶树愈伤组织的生长。

此外,基本培养基中的大量元素对茶树组织培养影响很大。成浩^[8]认为,MS 培养基大量元素减半,不仅有利于茎段的诱导和生长,而且有利于减少茎段的褐化,提高成活率。张娅婷^[14]在试验中发现,半量的 MS 培养基比全量的 MS 培养基效果好,并认为是 MS 中含有的无机离子浓度较高对芽苗的分化起到一定的抑制作用。但在实际应用中,大多数学者在诱导和增殖培养时采用全量的大量元素,而在生根培养时采用半量的大量元素。

2.4 植物生长调节剂 由于不同器官之间激素水平和对外源生长调节物质的敏感性不同,不同品种和类型的外植体对不同的生长调节剂种类及其配比反应也不同。一般说来,在快速繁殖时,生长素的水平应低一些,因为高水平的生长素会导致愈伤组织的形成,而愈伤组织的形成会降低增殖率。周健^[12]认为,NAA 浓度在 0.1 mg/L 以下促进增殖的效果明显,在 0.2 mg/L 以上时小苗基部会产生愈伤组织,从而阻碍生长。谭和平^[52]认为,在细胞分裂素相同的条件下,生长素 IAA 比 NAA 对茶树芽的诱导效果好。高水平的细胞分裂素能有效地降低愈伤组织的形成,有利于芽的诱导和生长。李家华^[60]、刘德华^[65]、张建华^[63]等在无 BA 条件下,没有得到丛生芽,而在高浓度 BA 条件下得到丛生芽。周健^[12]认为,BA 浓度在 2.0 mg/L 左右最合适,低于 1.0 mg/L 时,由于细胞分裂素用量不足,不能尽快促进增殖,但高于 2.0 mg/L 时,则会抑制增殖甚至引起培养物死亡。张娅婷^[14]则认为,当 BA 和浓度为 0.2 mg/L IBA 配合使用时,BA 浓度为 1.0 mg/L 最合适,此时分化率最高,增殖倍数也较大。而李家华^[61]在 4.0 mg/L BA 诱导出丛生芽。仓贯幸一^[62]认为,GA₃ 对茶树胚轴生长是不必要的。谭和平^[53]报道,GA₃ 和 VH 对茶树丛生芽的增殖效果不明显。而周健^[12]在试验中发现,GA₃ 对增殖和生长都有较好的促进作用,特别是能够较好促进芽头生长成为小苗,尤其 GA₃ 当浓度为 3.0 mg/L 左右时,茶苗不仅增殖生长快,而且较为健壮。在生根培养中,一般认为先对材料进行预处理,再转入新的培养基进行生根才有利于提高发根率。一般采用 IBA 进行预处理,发根率并不受 IBA 预处理时间的影响,而主要受 IBA 浓度的影响^[8]。孙仲序^[11]认为,IBA 浓度不可超过 0.2 mg/L,若浓度过高,往往产生较大的软组织,对生根不利。袁正仿^[13]认为,在低浓度的 BA 和 IBA 的配合下有利于生根。此外,张娅婷^[14]和袁正仿^[13]还发现,在培养基中加入适当浓度的 Al³⁺ 能提高茶苗生根率,这可能是由于茶树是喜铝植物的原因。

2.5 其他条件 茶树再生体系的建立除与培养基和生长调节剂有关外,还与提供的培养环境相关性很大。刘德华^[66]认为,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 光照度下培养时子叶片的胚状体分化率较高;子叶柄的胚状体和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。土井芳亮^[67]报道,在 32 ℃ 培养条件下茶树愈伤组织生长速度最快。钟俊辉^[47]则认为利于茶细胞生长和茶氨基酸累积的最佳温度都为 25 ℃,如果在 32 ℃ 或 35 ℃ 下培养,愈

伤组织褐变、枯死。暗培养比光培养更有利于茶氨酸的累积。

3 展望

茶树是多年生木本植物,其自身的一些特性,如长生育周期、自交不亲和性、高度自交衰退和坐果率低等,限制了其遗传改良的进行。利用遗传转化途径进行茶树育种越来越受到重视,目前对茶树遗传转化研究的报道非常少,这是因为茶树离体再生非常困难,而且已报道的再生途径中,其再生频率也非常低,因此,提高茶树离体的再生频率成为茶树遗传转化研究的重点之一。茶树的茎段较其他外植体易建立高频率再生体系,它们的再生能力随基因型的不同差异较大。继续研究不同基因型茶树的最适培养基,探索更有利于组培苗增殖和生长的培养条件,是今后研究的重要内容。在次生代谢物生产方面,需要进一步研究不同茶树品种的细胞培养对不同次生代谢物生产的影响,寻求某种次生代谢物的最适品种的细胞培养和最适的培养条件,是利用组培生产次生代谢物的关键,也是今后研究的重点。

参考文献

- [1] 陈宗懋.中国茶经[M].上海:上海文化出版社,1994:5.
- [2] 李斌,陈国本,陈娟,等.茶树天然无咖啡碱珍稀种质资源的研究[J].广东茶叶,2000(4):6-10.
- [3] 黎星辉,章专政,黄启为,等.咖啡碱合成酶基因在特异茶树资源种质创新中的应用[J].经济林研究,2005,23(4):106-108.
- [4] 湖南农学院.茶树育种学[M].2版.北京:中国农业出版社,1999:12.
- [5] 黄涛.茶树组织培养研究现状和利用[J].茶叶,1986(3):12-14,26.
- [6] 安间舜,铃木由惠.Decotylated embryo culture in tea plant[J].茶叶研究报告,1980,52:7-10.
- [7] 王立,杨素娟,王玉书.茶树未成熟胚离体培养及植株的形成[J].中国茶叶,1988(4):16-18.
- [8] 成浩,李素芳.茶树微繁殖技术的研究与应用[J].中国茶叶,1996(2):29-31.
- [9] 中村顺行.Shoot tip culture of tea cultivar yabukita[J].茶叶研究报告,1987,65:1-7.
- [10] SARATHCHANDRA T M, UPALI P D, ARLPRAGASAM P V. Progress towards the commercial propagation of tea by tissue culture techniques[J]. S L J Tea Sci, 1990, 59(2):62-64.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 袁正仿,孔凡权,远凌威,等.栽培茶树的组织培养研究[J].信阳师范学院学报:自然科学版,2003,16(2):215-217.
- [14] 张娅婷,张伟.栽培茶树的组织培养[J].周口师范学院学报,2004(9):74-76.
- [15] 中村顺行. In vitro propagation techniques of tea plant[J].茶叶研究报告,1991,74:31-38.
- [16] 湖南农学院.茶树育种学[M].2版.北京:中国农业出版社,1999:43-44.
- [17] 武田善行,武弓利雄, NAMIKO IKEDA. Long term storage of seeds and pollen in tea germplasm[J].茶叶研究报告,1990,71:29-35.
- [18] 郭玉琼,赖钟雄,郭志雄,等.茶树生物技术研究进展[J].福建农林大学学报:自然科学版,2002,31(4):470-475.
- [19] 黄亚辉.茶树组织培养的现状[J].茶叶通讯,1990(4):29-31.
- [20] 土井芳亮. Callus induction and root differentiation in stem and leaf segment culture of tea plant[J].茶叶研究报告,1983,57:7-11.
- [21] 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.
- [22] 刘德华,廖利民.茶树组织培养的研究——胚状体和胚性细胞的形成及植株再生[J].湖南农学院学报,1989,15(3):33-37.
- [23] 王立,杨素娟,王玉书.茶树未成熟胚离体培养及植株的形成[J].中国茶叶,1988(4):16-18.
- [24] 安间舜,铃木由惠.Decotylated embryo culture in tea plant[J].茶叶研究报告,1980,52:7-10.
- [25] 陈平,严毅勤,王以红.大叶茶的组织培养[J].植物生理学通讯,1985(2):45-46.
- [26] 刘德华.茶籽子叶柄培养直接分化芽[J].中国茶叶,1987(6):15-17.
- [27] 莫典义,黄雁萍.茶树胚状体的诱导和植株的再生[J].中国茶叶,1981

- (4):17.
- [28] 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.
- [29] 王立. 应用组织培养技术保存茶树种质资源[J]. 中国茶叶,1990(6):30-31.
- [30] 王立,杨素娟,王玉书,等. 茶种资源室内保存技术研究——茶树茎切段试管苗保存技术[J]. 茶叶科学,1996,16(1):37-42.
- [31] 吕毅,郭鹏飞,倪捷儿,等. 茶氨酸的生理作用及合成[J]. 茶叶科学,2003,23(1):1-5.
- [32] 于新芯,曲军,丛月珠. 茶叶的化学成分及药理作用研究[J]. 中草药,1995,26(4):219.
- [33] 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.
- [34] 袁弟顺,林丽明,孙威江,等. 不同品种茶树愈伤组织的培养与茶氨酸的积累[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2004,33(2):178-181.
- [35] ZAPROMETOV M N, ZAGOSKINA N V. Regulation of phenolic compounds formation in cultured cells of tea plant (*Camellia sinensis* L.) [C]//Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Proceedings of international tea-quality-human health symposium. Hangzhou: Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 1988:62-65.
- [36] 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.
- [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] STREKOVA V Y, ZAGOSKINA N V, SUBBOTINA G A, et al. Effects of prolonged illumination on the synthesis of phenolic compounds and chloroplast development in tea callus tissues[J]. Fiziol Rast, 1989,36(1):83-88.
- [39] 成浩,杨素娟,王玉书,等. 茶树愈伤组织培养及其儿茶素积累[J]. 茶叶科学,1993,13(2):109-114.
- [40] 成浩,王玉书,杨素娟,等. 茶树悬浮细胞培养儿茶素的产生[J]. 中国茶叶,1985,17(4):2-4.
- [41] 成浩,王玉书,杨素娟,等. 大量元素对茶愈伤组织生长及其儿茶素累积的影响[J]. 茶叶科学,1994,14(1):31-36.
- [42] 成浩,王玉书,杨素娟,等. 培养基组分对茶树悬浮培养细胞儿茶素含量的影响[J]. 茶叶科学,1995,15(2):111-116.
- [43] CHENG H, YANG S J, WANG Y S, et al. Studies on catechin accumulation in tea cultured cells[C]//Tea Society of China. Proceedings of 95 international tea-quality-human health symposium. Hangzhou: Tea Science Society of China, 1995:308-312.
- [44] MATSUUR A T, KAKUD A T. Effects of precursor, temperature, and illumination on theanine accumulation in tea callus[J]. Agric Biol Chem, 1990,54(9):2283-2286.
- [45] MATSUUR A T, KAKUD A T, KINOSHI T A T, et al. Production of theanine by callus culture of tea[C]//The organizing committee of ISTS. Proceedings of international symposium tea science. Shizuoka: The organizing committee of ISTS, 1992:432-435.
- [46] 陈瑛,陶文沂. 几种激素对茶愈伤组织合成茶氨酸的影响[J]. 无锡轻工大学学报,1998,17(1):74-77.
- [47] 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.
- [48] 陈瑛. 茶氨酸在茶树体内的分布规律和年变化的研究[J]. 绍兴文理学院学报,1999,19(5):70-73.
- [49] 中村顺行. Efficient differentiation of adventitious embryos from cotyledon culture of *camellia sinensis* and other *camellia* species[J]. 茶叶研究报告,1988,67:1-7.
- [50] 中村顺行. Differentiation of adventitious buds and its varietal difference in stem segment culture of *camellia sinensis* (L.) O. Kuntze[J]. 茶叶研究报告,1989,70:41-48.
- [51] 土井芳宪. Varietal difference of callus induction rate and root differentiation rate in arther culture of tea[J]. 茶叶研究报告,1983,57:13-17.
- [52] 谭和平,余桂容,杜文平,等. 不同茶树品种组织培养快繁技术研究[J]. 西南农业学报,2003,16(1):102-104.
- [53] 刘德华,廖利民,周带娣. 茶树组织培养的研究. 腋芽微繁殖和叶微繁殖技术的研究[J]. 湖南农学院学报,1991(5):589-599.
- [54] 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.
- [55] NAKAMUR A Y. Effects of the kind of auxins on callus induction and root differentiation from stem segment culture of *Camellia sinensis* [J]. Chagyo Kenkyu Hokoku, 1988,68:1-7.
- [56] 刘德华,廖利民. 茶籽子叶柄下胚轴组织培养的研究[J]. 茶叶通讯,1990(3):6-11.
- [57] 中村顺行. Cultivation and characteristics of tea callus[J]. 茶叶研究报告,1984,60:7-14.
- [58] 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.
- [59] 袁地顺,倪元栋. 茶细胞培养法生产茶氨酸的技术研究——茶愈伤组织的诱导体系建立[J]. 福建茶叶,2003,23(3):27-28.
- [60] 李家华,周红杰,李明珠. 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,2003(3):27-28.
- [61] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2004:46-47.
- [62] 仓贯幸一. Effects of sampling time of seeds, desiccation of excised axes, and combination of plant growth regulators on the tea embryonic[J]. 茶叶研究报告,1992,76:1-8.
- [63] 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(114):32-33.
- [64] TORU K, MASAYUKI K. Establishment of tea cell lines with high growth rate [J]. 茶叶研究报告,1994,80:1-8.
- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 土井芳宪. Influence of temperature on growth of callus induced from stem segment of young tea shoots[J]. 茶叶研究报告,1981,53:42-44.

(上接第1952页)

壤养分的要求上。在当今植被大面积破坏、环境旱化及土壤贫瘠的情况下,黄连的自然种群难以找到适宜的生境。同时,种子萌发为幼苗,是植株自然更新的主要方式。但栽培研究发现,黄连种子常出现较多空瘪籽粒,直接影响了种群的发展和扩大。另外,种子休眠是植物本身适应环境和延续后代生存的一种方式,自然界里很多种子都有休眠现象。但在自然状况下,黄连种子后熟时间长,虽然人工低温层积可缩短休眠,但自然种群种子在土壤中仍需经历约10个月的后熟过程,并且长期在土壤中的存留,易造成种子腐烂、受雨水冲洗、被其他生物破坏等。这些因素不同程度地影响了黄连种子的生活力。黄连生活史过程中存在的这些脆弱环节,共同影响着黄连植株的形成和种群大小,加上人工的过度采挖,其自然种群的不断消失也就不难理解了。该研究表明,只要控制好栽培条件,在低海拔的平原地带同样可以完成黄连的移栽,且黄连植株能够完成开花、结实等过程,从而实现在栽培地的定居。引种栽培黄连可在对黄连进行异地保护的同时,为栽培地的农民带来经济效益,具

有重要意义。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 兰进, 杨世林, 郑玉权, 等. 黄连的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(12): 1139-1141.
- [3] 朱静, 石任兵, 刘斌. 黄连的药理学研究进展(综述)[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(6): 51-53.
- [4] 张丽萍, 陈震, 马小军, 等. 不同氮素水平对黄连植株生长及根茎小檗碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(7): 394-396.
- [5] 黄正方, 杨美全, 孟忠贵, 等. 黄连生物学特性和主要栽培技术[J]. 西南农业大学学报, 1994, 16(3): 299-302.
- [6] 苏智先, 张素兰. 珙桐种群生殖物候及其影响因子研究[J]. 四川师范学院学报, 1999, 20(4): 313-318.
- [7] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [8] CLAMPITT C A. Reproductive biology of *aster curtus*, a pacific northwest endemic[J]. Amer J Bot, 1987, 74: 941-946.
- [9] KARRON J D. Genetic structure of populations of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae) [J]. Amer J Bot, 1988, 75(8): 1114-1119.
- [10] 李正理, 李荣敖. 黄连种子后熟过程的解剖学研究[J]. 植物学报, 1985, 27(2): 122-127.
- [11] 李先恩, 陈瑛, 张军. 黄连种子胚后熟期间的生理生化变化及激素的影响[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(5): 272-274.