

茶树组织培养研究进展

段运裳

(四川农业大学茶学系, 雅安 625014)

摘要 生物技术飞速发展, 彻底改变了人们对世界的看法, 它为生物系统的操作提供了前所未有的机会, 茶树也不例外。文章综述了这几年茶树组织培养技术的研究进展, 以及它在茶树育种、快速繁殖、种质保存、次生代谢产物的生产等方面的应用。

关键词 茶树; 组织培养

茶树生物技术研究始于20世纪60年代末英国剑桥大学化学系以茶树幼茎小块为材料研究了离体咖啡碱的合成。而我国的茶树组织培养虽起步较晚, 但是发展十分迅速。我国的茶叶科学研究者做了大量的工作, 在吸收前人经验的基础上, 使我国的茶树组织培养取得了很大的进步。

1 茶树组织培养的现状

1.1 器官培养

1.1.1 芽培养 邝平喜等^[1]采集大小较均匀的福鼎大毫、福云6号健壮的幼嫩芽叶消毒切成小块接种于固体培养基上, 三周左右即可在切口表面产生肉眼可见的愈伤组织。周带娣^[28]研究指出用腋芽增殖小苗, 可大大增加繁殖系数。

1.1.2 茎段培养 P.VArulpragasam and R.Latiff^[2]用茶树枝条上的茎尖和带腋芽的节在所配制的两种培养基上繁殖幼苗成功。王立等^[3]以MS或改良ER基本培养基附加BA0.04mg/L+4mg/L+NAA0.04mg/L+0.50mg/L诱导茎切段, 效果较好。刘德华等^[4]以种子苗和成龄茶树嫩梢为材料, 发现茎段产生分化后, 在不同组分的培养基上交叉培养比在单一培养基上, 维持分化能力的时间长。王玉军等^[5]取茶树嫩茎段离体培养, 得最佳分化率83%, 其培养基配方为MS+BA1.5mg/L+ZT0.5mg/L; 最佳生根率80%, 其培养基配方为1/2MS+IBA0.2mg/L+20g/L糖, 且一个外植体经三次继代培养可繁殖47棵苗, 并得出以春季嫩茎和冬季催芽萌发的嫩茎段接种培养为佳。李家华等^[6]以茶树新梢带腋芽茎切段为外植体, 在MS基本培养基上培养, 发现一定浓度的2,4-D、GA₃、6-BA组合能促进腋芽的萌发和生长, 6-BA在一定浓度范围内, 高浓度可能促进腋芽分化和生长, 而低浓度下NAA促进愈伤组织的生长。张建华等^[7]以新梢带腋芽茎段为外植体, 在培养基MS+BA4mg/L+NAA0.1mg/L中可诱导愈伤组织并能分化出芽, 但在继代培养中以培养基ER+BA3+NAA0.1mg/L表现较好。同时, 袁正仿等^[8]以蕪北茶树带腋芽的茎段为外植体, 得最佳诱导培养基为MS+6-BA2.0mg/L; 芽增殖培养基为MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.2mg/L; 最佳生根培养基为1/2MS+6-BA0.5mg/L+IBA0.1mg/L+NAA0.2mg/L+Al³⁺0.01mg/L。张亚萍^[9]等将云南大叶种茎尖切下来, 采用抗坏血酸浸泡, 有效地减少了材料的褐变, 并成功地诱导出了愈伤组织。张亚婷等^[10]用蕪北茶带腋芽的茎段作为外植体在MS培养基上培养得出, 芽增殖培养基为1/2MS+1.0mg/LIBA+0.2mg/LIBA; 生根壮

苗培养基为1/4MS+0.5mg/LBA+0.1mg/LIBA+0.01mg/LAL³⁺。杨国伟等^[11]研究表明, 茶树幼茎诱导出的愈伤组织质地较硬, 诱导率较高, 时间短, 并得到了其愈伤组织生长的适宜培养基: MS+2,4-D1.0mg/L+NAA1.0mg/L+6-BA0.5mg/L。

1.1.3 叶的培养 王毅军等^[12]以茶树叶片为外植体, 以MS培养基附加4mg/L 6-BA, 2mg/LIAA, 3mg/L GA₂和0.2-0.3%活性炭诱导愈伤组织和胚状体, 进一步形成了小植株。袁弟顺等^[1]研究发现, 幼嫩叶切块的诱导率比全叶的高出一倍多, 但是其生长情况却没有全叶的愈伤组织生长好。

1.1.4 叶柄培养 叶柄培养分化率存在明显的基因型效应, 但都能形成胚性愈伤组织。黎星辉等^[13]研究表明在叶柄培养中, 从茎节上撕下的外植体, 在叶柄基部与腋芽的连接处能诱导胚性愈伤组织和再生不定芽。

1.1.5 根培养 根中的维管束和导管不易脱分化, 诱导效果欠佳。倪元栋等^[1]采集大小较均匀的福鼎大毫、福云6号健壮的根尖嫩部, 消毒切成小块接种于固体培养基上, 根尖愈伤组织诱导效果均较差。高秀清等^[14]也在实验中发现茶树的根不如茎、叶易诱导愈伤组织。

1.1.6 子叶、子叶柄培养 吴振辉首次以祁门种子叶为外植体获得再生植株^[40]。廖利民等^[15]用子叶柄, 添加2,4-D、NAA、IBA2mg/L、GA₃3mg/L、BA1mg/L组合培养, 分化出了大量的胚状体和胚性细胞, 最终培养成了植株。熊格生等^[16]研究表明, 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, 而子叶柄的则随光照度下降而下降。

1.1.7 花药培养 日本的胜尾清^[41]于1972年从茶树花药分化出了根。上井芳宪^[42](1981)从花药形成的愈伤组织中分化出绿色小突起和根。陈振光等^[17]于1980年获得具根、茎、叶的完整植株, 并指出适宜花药愈伤组织诱导的蔗糖浓度为5%-7%。郭玉琼等^[18]以茶树(铁观音品种)花药为外植体, 研究表明SJ-1基本培养基对茶树花药愈伤组织的诱导率最高。

1.1.8 胚培养 王玉书等^[19]用菊花春等品种的未成熟胚, 采用MS基本培养基和改良的ER基本培养基, 其中大量元素和蔗糖浓度减半, 分别加IBA1mg/L, 结果得到了较理想的置根效果。

1.1.9 胚轴培养 张学文等^[20]把胚轴切取作外植体接种在诱导培养基上进行培养, 诱导率可达到84%, 且在胚轴中还观察到芽的分化。刘德华等^[21]研究指出, 下胚轴是一种分化芽能力

很强的外植体,容易形成丛生芽,易继代培养,繁殖系数很大。

1.2 毛状根的诱导

高秀清等^[14]利用几种不同发根农杆菌株系感染茶树外植体,得到茶树毛状根,并证实了乙酰丁香酮对诱导具有促进作用。另外,彭正云等^[22]以大田茶树的根为材料,从茶树根愈伤组织中诱导出了发状根,并发现在不同组分的培养基上轮换继代培养,对发状根的分化与增殖有明显的促进作用。

1.3 愈伤组织的培养

刘德华^[23]证明利用添加不同种类、浓度的1/2MS修改培养基, B₂培养基交叉培养茶树愈伤组织,有利于延长愈伤组织继代培养时间和维持体细胞胚分化能力。钟俊辉等^[24]研究表明,茶愈伤组织生长的最适培养温度是25℃,并在蔗糖浓度为6%时生长最好。成浩等^[25]研究发现大部分的大量元素对茶愈伤组织生长都有一定程度的影响,培养基氮源浓度与组成最为显著,且各种营养元素之间都可能存在有相互作用。陈瑛等^[26]研究发现MS培养基中添加2mg/LIAA和4mg/L6-BA或MS培养基中添加1.5mg/LIAA, 3mg/L6-BA及2mg/LTA对茶愈伤组织的生长最为有利。华萍等^[28]将婺源绿茶嫩叶用MS培养基(加IBA2mL, 6-BA4mL)进行茶叶愈伤组织悬浮培养,在NH⁺₄/NO³⁻ 1.0/60.0mmol/L、K⁺100.0mmol/L、Mg²⁺ 3.0mmol/L、H₂PO₄⁻ 3mmol/L、蔗糖30g/L、水解酪蛋白2g/L条件下,茶叶细胞生长量达到最高值;提高培养基中蔗糖和水解酪蛋白浓度可使细胞对数生长期和稳定期得到延长。

2 组织培养技术在茶树上的应用

2.1 次级代谢的研究

成浩等^[29]通过向茶树培养细胞饲喂标记苯丙氨酸前体,可以得到标记的L-表儿茶素和D,L-儿茶素,放射化学产率最大可达2%左右。李素芳等^[30]发现当标记的外源苯丙氨酸饲喂水平小于1000μmol/L时,各成分含量的增长均与饲喂量正相关,培养细胞乙酸乙酯萃取物中各成分的产量增加,产物的组成比例也有变化。

2.2 次级代谢产物的生产

王立等^[31]研究发现White培养基上的细胞儿茶素累积最高,KT10mg/L和IBA0.1mg/L组合,对儿茶素累积最为有利;提高蔗糖浓度有利于次生代谢产物的形成,但浓度不能过高;在一个生长周期中,儿茶素累积在愈伤组织鲜重增长的直线期末,静止期初高。陶汶沂等^[24]以4mg/L6-BA+2mg/LIAA或3mg/L6-BA+1.5mg/LIAA+2mg/LTA的组合,添加于MS培养基上,茶氨酸积累良好。钟俊辉等^[26]认为IAA2mg/L和6-BA4mg/L时对茶氨酸积累最有利,暗培养更有利于茶氨酸的累积。赖钟雄^[18]证实以茶树(铁观音品种)花药为外植体诱导的花药愈伤组织,已具有合成酚类化合物的能力。成浩^[32]等,研究发现,在培养基中添加前体盐酸乙胺时,细胞中茶氨酸含量在培养第5d时已经达到了4.06%,远高于不添加前体的对照处理,且添加水解酪蛋白的效果优于酵母浸膏。孙威江等^[33]通过对福鼎大白等五个品种进行愈伤组织诱导和继代培养,发现茶氨酸含量的大小顺序为福鼎大白茶、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24-28d。余继红等^[27]将婺源绿茶嫩叶用MS培养基(加IBA2mL, 6-BA4mL)进行茶叶愈伤组织悬浮培养,在NH⁺₄/NO³⁻ 1.0/60.0mmol/L、K⁺100.0mmol/L、Mg²⁺ 3.0mmol/L、H₂PO₄⁻ 3.0mmol/L、蔗糖30.0g/L、水解酪蛋白2.0g/L条件下,茶氨酸积累量均达到最高值;并发现H₂PO₄⁻浓度主要影响细胞生长速率和茶氨酸积累速率的同步性,K⁺和Mg²⁺影响细胞茶氨酸合成酶活性,每天进行少量补充盐酸乙胺可大幅度提高茶氨酸积累量。杨国伟等^[11]将继代4代以上的愈伤组织接

种到MS+2.4-D1.0mg/L+NAA1.0mg/L+6-BA0.5mg/L培养基上,附加蔗糖30g/L, pH5.8,发现在培养的前18d,茶氨酸含量增加缓慢,18d后进入快速生长阶段,在生长的第42d含量可达到75.7mg/g(干重)。高秀清等^[14]还利用几种不同发根农杆菌株系感染茶树外植体,诱导出茶树毛状根,并测得其中茶氨酸含量(鲜重)为0.016%。此外,李素芳等^[34]以细胞色泽为指标,筛选可以作为选择儿茶素高产细胞系。

2.3 茶苗的繁殖

张娅婷^[10]用数北茶带腋芽的茎段作为外植体进行组织培养,以MS为基本培养基,附加各种浓度的植物激素,继代培养3-4代后形成完整植株。周健等^[35]优化得到适宜的茶树组培苗增殖条件是:MS+BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L+GA33.0mg/L。王丽鸳等^[36]用100mg/L的IBA短时浸蘸处理,诱导茶树组培苗在温室内生根,70天后,小苗的成活率为66.7%,生根率达到60%。刘德华等^[28]指出在移栽过程中,发根多而长的小苗,一般难于成活,而始发根的小苗移栽成活率较高。

2.3 诱导单倍体植株

单倍体植株对缩短植物的育种周期具有非常重大的意义。陈财珍等^[18]试验表明SJ-1基本培养基对于诱导茶树单倍体植株不是一种好的选择。

2.4 种质资源的保存

王玉书等^[3]进行了茶树茎切段试管苗保存技术的研究,指出以MS或改良ER基本培养基附加BA0.04mg/L-4.00mg/L-NAA0.04mg/L-0.50mg/L为宜;茎外植体采样以春梢为好;弱光照、较低温和适当添加化学抑制剂(如甘露醇、PP₃₃₃、ABA等)有利于延缓培养物生长、增加培养物保存期。

2.5 其它

方祖桢^[37]用秋水仙素快速、有效诱导茶树愈伤组织多倍体为茶树多倍体育种提供了一条新的途径。张学文^[20]选用较致密的愈伤组织切块与带NPT II和GUS基因Ti质粒的根农杆菌共培养,通过卡那霉素抗性选择,得到了抗性愈伤组织和芽的分化,抗性愈伤组织的诱导率在5%左右;且在共培过程中发现茶树愈伤组织能较强烈地促进农杆菌生长,它在茶树愈伤组织周围聚结。

3 茶树组织培养的展望

综上所述,我国在茶树的愈伤组织培养、次级代谢产物的生产,茶苗的繁殖、种质资源的保存等方面取得了可喜的进步,但还有很多工作需要继续努力,大致有如下几个方面:

3.1 基础研究进一步加强

一个国家的基础研究是其综合实力强有力的支撑,所以,茶树组织培养的基础研究,如培养条件的优化,褐化现象的预防,激素的调控机理等应进一步加强。

3.2 加快新品种的培育与推广

茶树的组织培养可提供大量培养物和基因转移的理想受体,这样能加快育种的进程,缩短育种周期,提高育种的效率。如在茶树育种中应用单倍体培育、原生质体融合体细胞杂交、胚培养技术等,则能提高种子能育率,获得远缘杂种,实现基因的转移,较快地获得稳定的具有某些优良性状品种。

另一方面,茶树组织培养技术只需要很少的植物组织就可以获得大量的植株,不受季节、气候的限制,是加快茶树繁殖速度的重要手段。

3.3 进一步优化次级代谢产物的生产条件

茶树富含次级代谢产物,如茶氨酸、咖啡碱、类黄酮等,它们大多都具有一定的药理功能,所以,我们要进一步研究次生代谢产物的合成,优化茶树次生代谢产物生产的组培条件和分

离提纯的方法,从而提高愈伤组织中次生代谢产物的含量,降低成本,弥补天然资源的不足。

3.4 种质资源的保存和珍稀野生茶树品种的应用

我国茶树资源丰富,其内在的遗传基因同样也是多种多样的,不同品种的差异是很明显的,且有自己独特的风味,特别是一些古老的野生珍稀大茶树。但是,由于一些原因,我国的很多茶树品种都渐渐被无性系良种所取代或者逐渐走入珍稀濒危植物的行列,所以可望通过组织培养或细胞培养进行茶树种质资源的保存,特别是不育或败育率很高的品种,这对节约空间、时间及维持我国茶树品种的多样性不可或缺。而且,许多野生茶树数量稀少,我们可以利用组织培养技术来进行快速、大量地繁殖。

参考文献

- [1] 袁地顺,倪元栋,邱平喜.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,2003,3:25-26.
- [2] P.VA ruIpragasam and R .Latiff (詹嘉放译)茶树组织培养的研究:茎繁殖培养方法.农业科技情报:西南农学院,1990,1:27-27.
- [3] 王立,杨素娟,王玉书,等.茶种质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.
- [4] 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.湖南农业大学学报,2000,4:110-112.
- [5] 王玉军,刘杰山,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.
- [6] 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,2001,3:27-28.
- [7] 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.
- [8] 袁正仿,远凌威,等.蕪北茶树的组织培养研究.信阳师范学院学报(自然科学版),2003,4:215-217.
- [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] 张娅婷,张伟.蕪北茶的组织培养.周口师范学院学报,2004,第21卷,第5期,74-76.
- [11] 杨国伟,兰蓉,王晓杰,辛秀兰.茶树愈伤组织诱导和组织培养[J].江苏农业科学,2006,4:122-124.
- [12] 王毅军,严学成,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
- [13] 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.作物学报,1995,5:291-295.
- [14] 高秀清.中国农业科学院研究生院茶叶研究所硕士学位论文—茶氨酸生物合成研究.2002,5月.
- [15] 刘德华,廖利民.茶树组织培养的研究I.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.
- [16] 刘德华,周带娣,熊格生,陈庆余,等.茶树体细胞植株再生的光照效应[J].湖南农业大学学报,1999,4:112-115.
- [17] 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.
- [18] 郭玉琼,陈财珍,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.
- [19] 杨素娟,王玉书,王立.茶树未成熟胚培养中根的诱导及形态[J].中国茶叶,1989,(2):14-15.
- [20] 张学文,刘选明,董延瑜,等.茶树愈伤组织诱导与共生转化的初步研究[J].湖南农学院学报,1994,20(6):550-554.
- [21] 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.
- [22] 彭正云,刘德华,肖海军.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),2004,4:138-141.
- [23] 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,1995,7:470-474.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 陈瑛,钟俊辉.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,1998,1:74-77.
- [27] 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.
- [28] 刘德华,廖利民,周带娣.茶树组织培养的研究II.腋芽微繁殖和叶微繁殖技术的研究[J].湖南农学院学报,1991,(增刊):589-599.
- [29] 成浩,李素芳,等.外源茶丙氨酸对茶树培养细胞儿茶素合成的影响[J].农业生物技术报,2001,9(2):132-135.
- [30] 成浩,李素芳,沈星荣,孙锦荷.利用外源前体饲喂生物合成¹⁴C-儿茶素的研究[J].茶叶科学,2003,23(增刊):82-8
- [31] 成浩,杨素娟,王立,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.
- [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] 袁弟顺,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),2004,6,第33卷,第2期,178-181.
- [34] 成浩,李素芳,等.茶树培养细胞花色苷累积型与非累积型间的差异性研究[J].茶叶科学,2000,20(2):124-128.
- [35] 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.
- [36] 周健,成浩,王丽鸳.激素处理对茶树组培苗温室内直接诱导生根的影响[J].茶叶科学,2005,25(4):265-269.
- [37] 方祖桢.茶树愈伤组织多倍体诱导[J].黄山学院学报,第26卷,第6期,87.
- [38] 成浩,李素芳,等.利用茶树培养细胞合成¹⁴C-儿茶素的研究[J].核农学报,2001,15(1):38-44.
- [39] 王立,杨素娟,王玉书,成浩.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.
- [40] 黄华涛.茶树组织培养研究现状和利用[J].茶叶,1986;(3):12-14,26.
- [41] 胜尾清.茶树的药培养について(予报)[J].茶叶研究报告,1968,(31):1.
- [42] 土井芳究.千七の药培养しおける根の分化率.茶叶研究.1981,60:1-3.