

⑤
30-34

苦丁茶的组织培养和快速繁殖研究 Studies on the Tissue Culture and Rapid Propagation of *Ilex kudingcha*

姚军
Yao Jun

张燕玲[✓]
Zhang Yanling

林荣
Lin Rong

Q949.754.6

(广西植物研究所 桂林 541006)
(Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006)

A 摘要 用苦丁茶当年生枝条的顶芽和侧芽作外植体, 培养在附加了各种浓度BA的MS培养基上. 当BA浓度为3.0 mg/L时诱导芽形成及增殖效果最佳, GA₂·0+NAA 0.2 mg/L和BA配合使用有利于壮苗; 在1/2MS培养基中, 附加NAA 0.5 mg/L, 生根效果最佳. 试管苗高2 cm~3 cm、根数2~3条时开盖炼苗2 d~3 d移入培养土中, 试管苗移栽成活率高.

关键词 苦丁茶 细胞分裂素 快速繁殖 组织培养 冬青科

Abstract The tissue culture of *Ilex kudingcha* with the tip of shoots and lateral bud as explants was experimented in MS medium with addition of different concentration of BA. The results show that sprouting of bud and multiplication of adventitious buds was best in MS medium with the addition of BA 3.0 mg/L; and vigorous and healthy bud was best on MS medium with the addition of BA 3.0+GA₂·0+NAA 0.2 mg/L; and the growth of roots was best on 1/2 MS medium with the addition of NAA 0.5 mg/L. Transplantation from test-tube, when the plantlets are 2 cm~3 cm high and have 2~3 roots and after they stayed 2 d~3 d without cap of test-tube gave the highest percentage of survival.

Key words kudingcha, cytokinin, rapid propagation

苦丁茶 (*Ilex kudingcha* C J Tseng) 又名苦丁、茶丁, 冬青科冬青属植物^[1], 为多年生常绿乔木, 国家保护的珍稀植物之一, 是广西特产的一种珍贵天然药用保健饮料植物. 近年来对苦丁茶成分分析的结果表明, 苦丁茶含有鸟苏酸、 α -香树脂、 β -谷甾醇、苦丁茶甙元、蛋白质、维生素、无机盐、微量元素及氨基酸等多种化学成分^[1], 经药理实验证明, 苦丁茶具有清热解毒、降压减肥之良效^[2], 被誉为“益寿茶”。

苦丁茶生长在广西南部的一部分县(市), 由于乱采滥挖, 使得苦丁茶种源非常稀少. 虽然近年来人们对苦丁茶进行了人工栽培, 但由于其种子休眠后熟期长, 种子需摧芽处理18个月

后才开始发芽,加上扦插繁殖材料不足,苦丁茶苗木奇缺,不能满足生长上的需要。组织培养技术已经成功地应用在一些种子少和因种子发芽率低而常规无性繁殖较难的树木种类上^[3]。为了加速苦丁茶苗木的生产,寻找苦丁茶育苗的新途径,我们进行了苦丁茶组织培养快速繁殖研究,本文报道这项研究的结果。

1 材料和方法

用种植在广西植物研究所苦丁茶种质圃中4~6年生优株的顶芽和一年生带腋芽茎段作外植体。为了比较不同时间的外植体对芽苗形成的影响,分别在苦丁茶的3次抽梢期(3月上旬、5月中旬、8月上旬)进行采样。所有的材料均去掉展开的叶片,用自来水冲洗数遍后,在超净工作台上用70%酒精浸泡1min,然后放在0.1% HgCl_2 溶液中消毒5min~7min,最后用无菌水冲洗4~5次。消毒好的材料放在预先消毒过的滤纸上以除去水分,将材料剪成长1cm左右的小段进行接种。基本培养基试验采用的基本培养基为MS、White、WPM三种培养基;分化培养基中附加BA0.5mg/L~5.0mg/L以促进芽苗形成,并附加GA、NAA与BA配合使用进行壮苗培养;生根培养基用1/2MS培养基,附加NAA或IBA0.2mg/L~2.0mg/L。所有的培养基用粉状琼脂5g/L,pH值为5.8,在120℃和1.1kg/cm²饱和蒸汽压下消毒20min。培养材料放在25±2℃的培养室中培养,每天光照10h,光照度约1500lx。每个试验培养30个材料,重复3次,培养一个月后统计芽苗生长情况及生根情况。

2 结果和讨论

2.1 基本培养基与芽苗形成的关系

培养基是决定组织培养成败的重要因子。试验结果显示,决定培养基效率的因子除激素外还有矿物质^[4]。为了确定适合苦丁茶芽苗生长的基本培养基,我们用MS、

White和WPM基本培养基的无机盐,附加相同量的维生素、氨基酸、糖及植物激素进行了比较试验。试验结果(表1)表明,苦丁茶外植体在MS培养基中所形成的芽苗数及苗高度均优于其他两种基本培养基。由于MS培养基的无机盐浓度高于White和WPM培养基,因此苦丁茶芽苗适合在含高浓度无机盐的培养基中生长,所以以后的试验均采用MS作基本培养基。

2.2 不同时期的外植体与芽苗形成的关系

培养材料的污染和成活是影响木本植物组织培养的两个关键因素,而这通常由外植体的切割时间决定的。苦丁茶一年生长中的抽梢期有3次,分别在3月上旬、5月中旬和8月上旬。为了确定苦丁茶外植体萌发及避免污染率高的适宜时间,我们分别取苦丁茶在这三个抽梢期的顶芽及侧芽进行培养,培养结果(表2)表明,污染率、萌发率和萌发天数与外植体采集时间和外植体类型有一定的关系,3月上旬采集的外植体萌发率达100%,且污染率低;8月上旬采集的外植体,污染率非常高,其中侧芽污染率高达93%,而且不易萌发,这可能与气候特点有关,春天气候温暖,植物生长充满活力,因而容易萌发,而8月由于高温高湿的天气影响,植物生长减慢,微生物生长则非常旺盛,外植体难以彻底消毒致使污染率非常高,因此苦丁茶组织培养以采用春天萌发的顶芽和侧芽作外植体较好。

表1 基本培养基与芽苗形成的关系

基本培养基	接种数(个)	形成芽苗数(个/块)	苗高度(cm)
MS	30	3.5	2.5
White	30	2.0	1.5
WPM	30	1.5	1.0

2.3 植物激素对芽苗分化的影响

培养基中植物激素的状况,在诱导植物组织形成器官中起着重要的作用^[5]。苦丁茶的外植体在MS培养基中进行培养,约70%的外植体萌发出新梢,将无菌苗剪下培养在附加了细胞分裂素BA0.5 mg/L~5.0 mg/L的分化培养基中,培养结果(表3)表明,BA明显促进芽苗的形成,但浓度过高过低都不利于芽的分化,当BA浓度超过0.5 mg/L时,则分化率升高,增殖倍数

也随之增大,当BA浓度超过3.0 mg/L时,茎却逐渐缩短,在BA浓度达到5.0 mg/L时表现更加明显,虽然增殖倍数最高,但叶极小,茎短,这种分化芽在以后的壮苗培养过程中,叶、茎也不易伸长,从而影响了以后的生根培养和移栽。因此BA浓度过高对苦丁茶的芽生长有抑制作用,我们的试验结果表明,要既能达到繁殖目的,又能得到壮苗,以BA3.0 mg/L为较好。当GA2.0 mg/L和NAA0.2 mg/L加到培养基中与BA配合使用时,对芽苗有壮苗作用,此时茎叶生长正常,叶显深绿色,苗挺拔健壮,为以后生根和移栽成活打下了基础。因此苦丁茶分化培养基以MS+BA3.0 mg/L+GA 2.0 mg/L+NAA0.2 mg/L为宜。

表2 不同时期外植体和芽苗形成的关系

外植体类型	采集时间	外植体数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	萌发天数 (d)	萌发数 (个)	萌发率 (%)
顶芽	3月上旬	30	10	33	15	20	100
	5月中旬	30	15	50	25	15	100
	8月上旬	30	25	83	25	2	40
侧芽	3月上旬	30	10	33	20	20	100
	5月中旬	30	20	67	30	5	50
	8月上旬	30	28	93	-	0	0

表3 植物激素对芽苗分化的影响

激素浓度 (mg/L)	外植体 (个)	分化芽数 (个)	分化率 (%)	芽苗增殖数 (个)	增殖倍数	苗高 (cm)	培养天数 (d)
BA0	30	15	50	30	1	0.5	25
BA0.5	30	20	67	60	2	1.5	25
BA1.0	30	24	80	69	2.3	1.5	25
BA2.0	30	26	87	75	2.5	2.0	25
BA3.0	30	27	90	90	3.0	2.5	25
BA4.0	30	27	90	99	3.3	1.0	25
BA5.0	30	27	90	120	4.0	0.5	25

2.4 生根培养

将高度为1.5 cm以上的芽苗切割下来转到附加不同浓度的NAA和IBA的1/2MS培养基中诱导生根。试验结果(表4)表明,NAA对苦丁茶芽苗生根有效,IBA则效果非常差。当NAA0.5 mg/L时,10 d~12 d芽苗基部即有白色突起;20 d时,有2~3条白色短根伸出,但当NAA浓度达1.0 mg/L以上时,芽苗基部开始产生大量白色愈伤组织,其后根从愈伤组织中长出,在栽培中发现,这种类型的试管苗移栽不易成活,因此诱导苦丁茶芽苗生根以1/2MS+NAA0.5 mg/L为好,其生根率达80%,且苗质量为健壮型,为移栽成活创造了条件。

表4 激素对生根培养的影响

激素浓度 (mg/L)	接种株数 (株)	生根株数 (株)	生根率 (%)	根数 (条)	根长 (cm)	根生长情况
NAA	0.2	30	50	1~2	1.5~1.7	细长
	0.5	30	80	2~3	1.5~2.0	粗长
	1.0	30	67	1~3	0.5~0.8	细短、有愈伤组织
	2.0	30	10	1~2	0.3~0.5	细短、有愈伤组织
IBA	0.2	30	—	—	—	—
	0.5	30	—	—	—	—
	1.0	30	—	—	—	—
	2.0	30	3	10	1~2	0.3~0.5 细短、基部 有愈伤组织

2.5 继代培养

苦丁茶的芽在适宜培养基培养10 d时, 芽开始伸长, 培养25 d时开始形成丛生小芽, 通常是在腋芽处先长出新梢, 然后新梢的腋芽又长出新梢, 从而形成丛生芽苗(图1), 此时将丛生芽分割进行继代培养, 无根苗转生根培养基, 约20 d时形成根获得完整植株(图2)。由于苦丁茶为木本植物, 芽开始继代培养时增殖倍数较低, 仅1~2倍, 从第5代以后增殖速度加快, 增殖倍数达8~9倍。为了培养壮苗, 需调整激素浓度, 以控制适当的增殖倍数, 一般保持增殖3~5倍, 约35 d继代1次, 可繁殖大量试管苗。

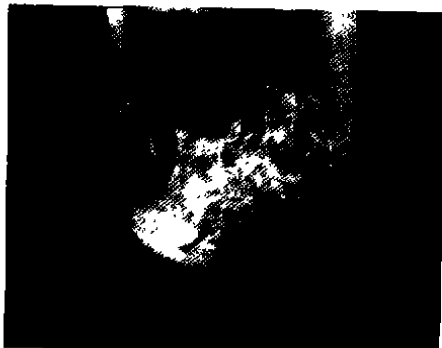


图1 形成丛生芽



图2 生根形成完整植株

2.6 试管苗的移栽

当试管苗根长至2.0 cm左右, 根数达2~3条, 苗高2 cm~3 cm时, 开盖炼苗2 d后移栽容易成活。生根小苗从培养瓶中取出, 用清水冲洗干净根部培养基, 栽于用草皮泥作基质的营养袋中, 浇透水, 最后用塑料薄膜覆盖, 20 d后去盖, 苦丁茶试管苗移栽成活率达93%, 目前移栽成活的试管苗生长良好(图3)。

3 结论

以3月采集的顶芽和侧芽作材料,在附加BA3.0 mg/L + GA2.0 mg/L + NAA0.2 mg/L的MS培养基上,诱导芽分化的效果最佳。

在 $\frac{1}{2}$ MS培养基中附加NAA0.5 mg/L,生根效果最佳,并利于试管苗移栽。

当苗高2 cm~3 cm,每株根数2~3条,根长2 cm左右时,用草皮泥作基质,试管苗移栽易于成活。

致谢

唐高凤参加本项目试管苗移栽试验工作,试验材料由广西植物研究所苦丁茶课题组提供,在此一并致谢。



图3 移栽成活的试管苗

参考文献

- 1 文永新,陈秀珍,金静兰等.苦丁茶化学成分的研究.广西植物,1990,10(4):364~368.
- 2 朱莉芬,李美珠,钟伟新等.苦丁茶的心血管药理作用研究.中药材,1994,17(3):37.
- 3 James OP. Propagation in vitro of apple trees and other woody fruit trees; methods and application. Scientific Hortic, 1979, 30: 44~48.
- 4 高金润.培养基关键因素的研究.山西林业科技,1988,(4):18~20.
- 5 Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol, 1957, 11: 118~130.

海内外青年学者聚会大连 研讨生物化工前沿问题

来自美国、日本、澳大利亚、英国等国的250名我国留学人员及40多名国内代表,最近赴大连参加了首届海内外青年学者生物化工前沿学术讨论会。这次青年学者讨论会是国家教委、国家自然科学基金委员会自1995年以来资助的两个新学科领域海内外青年会议之一。青年学者们就生物反应工程、生物分离工程、蛋白质、微生物和基因工程、环境生物工程、生物过程的检测分析与控制等方面近年来国内外的新进展进行了广泛学术交流,并围绕留学人员与国内同行在某些领域或课题上的合作进行了热烈讨论。

大连市长薄熙来出席会议并讲了话。

(蒋汉明摘)