

苦丁茶组培苗工厂化生产若干问题探讨*

Several Questions of Factorial Production on Tissue Culture of *Ilex kudingcha*

李海鹰 王桂文 周 兴 范嘉晔
Li Haiying Wang Guiwen Zhou Xin Fan Jiaye

(广西科学院生物研究所 南宁 530003)

(Institute of Biology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, 530003)

摘要 探讨苦丁茶 (*Ilex kudingcha*) 组培苗工厂化生产中外植体选择、繁殖系数、生根与移栽以及生产中污染问题, 提出在秋季采摘的 2 年生苦丁茶实生苗上的幼嫩茎段作外植体, 获无菌材料的得率最高。继代增殖的适宜配方为 MS+ 6BA 1.0 mg/L ~ 4.0 mg/L+ 蔗糖 3% ~ 4%+ 琼脂 0.3%, 增殖倍数可达 2.72~ 3.0, 生产周期 1.5~ 2 个月。基内诱导生根后经蛭石假植再移栽, 成活率达 90% 以上; 无根苗直接下土移栽, 相对成活率约 75%, 认为严格遵守无菌操作规程, 是防止苦丁茶组培苗生产中出现大量污染的有效举措。

关键词 苦丁茶 组织培养 工厂化生产

Abstract Dealed with several determinative questions such as how to select stem explants, pick up subculture speed, induct root formation and prevent from pollution of the factorial production of the tissue culture of *Ilex kudingcha*. The survival rate could be the highest by using some moderate tender shoots of the two-year-old seedlings of *Ilex kudingcha* as the explants for the tissue culture. The favourable subculture medium was MS+ 1.0~ 4.0 mg. L⁻¹ 6 BA+ 3% ~ 4% sugar+ 0.3% agar with a multiplication rate up to 2.72~ 3.0 times every 1.5~ 2.0 months. The root-free plants were inducted root formation, then the root plants were heeled in vermiculite and transplanted to the field, the survival rate, which was above 90%, was higher than that of straight transplantation, which was about 75%. To strictly observe the aseptic manipulation was an effective measure for preventing from pollution in a large scale on the production of tissue culture of *Ilex kudingcha*.

Key words *Ilex kudingcha*, tissue culture, factorial production

中图法分类号 S 722.37; S 792.99.05

苦丁茶 (*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) 属冬青科冬青属高大乔木, 其叶具有消暑祛病, 除烦解渴, 降低血压等功效, 在主要产区常用于保健饮料。随着植物资源的不断开发和利用以及苦丁茶的药理作用的报道^[1,2], 苦丁茶越来越受到人们的青睐。

利用种子和扦插等常规繁殖方法扩大苦丁茶栽培面积, 速度较慢, 笔者于 1992 年开始苦丁茶的组培苗快速繁殖的研究。经多年的努力, 无菌材料的获取、继代增殖、生根与移栽等进行了系统的试验和研究, 在此基础上, 进行了小规模工厂化生产, 总结出具有一定实效的生产工艺。

无菌材料的获取、继代增殖、生根移栽等阶段性成果的有关论文已于有关刊物发表, 本文仅就苦丁茶工厂化生产遇到的几个关键性问题进行探讨。

1 外植体的选择

选择何种树龄、处于何种生理状态的材料、于什么季节取材等是获得无菌材料的关键, 也是苦丁茶种苗工厂化生产中值得探讨的首要问题。许多研究者认为, 木本植物培养初期, 外植体的变褐常是诱导脱分化及再生芽的重大障碍^[3]。变褐与植物细胞中的生物氧化体系有关, 当植物被切破或损伤, 或被病菌感染而破坏时, 多酚氧化酶和底物接触, 酚被氧化成为醌, 产生棕褐色^[4]。棕褐色物质会逐渐扩散到培养基中, 抑制其它酶的活性, 毒害整个外植体组织, 往往使培养难以进行下去。而褐变的程度与植物种类、基因型、外植体的部位及生理状态有关。笔者选择苦丁茶实生苗嫩梢茎段作材料, 共接外植体 527 个, 成功 251 个, 成活率 47.5%^[5]。分析其原因: 若取自 2 年左右树龄的实生苗, 外植体初次培养时褐变较少, 较易培养; 若取自 4 年生以上的实生苗, 褐变严重, 虽经多次转管, 亦难以根除, 酚污染严重导致初次培养失败。以此说明, 苦丁茶的外植体具有明显的幼龄效应。

其次外植体的选择与材料的生理状态亦密切相关, 虽取自同一树龄的嫩梢茎段, 但茎段幼嫩程度不一, 获无菌材料的多寡差异甚大。若取材稍嫩易受消毒剂药害而失去活性; 而取木质化程度高的芽条, 则酚污染严重, 不易得到无菌材料, 故取材相当考究。笔者的生产实践证明, 选取幼嫩适中的外植体成苗率较高。

另外不同季节采摘的外植体也有差异, 以秋季最佳, 其余季节次之。

2 繁殖系数

繁殖速度快在生产实践中才有应用价值, 衡量速度快慢一般用繁殖系数。所谓繁殖系数是指繁殖材料在继代中一个周期产生不定芽的倍数。影响苦丁茶不定芽繁殖系数有: 培养基配方、激素配比、光照等因素。通过一系列的试验与规模化生产实践的结果表明, 目前植物组培中广泛使用的 MS 培养基亦适用于苦丁茶组培。细胞分裂素 6BA 加入量以 1.0 mg/L~4.0 mg/L 为宜, 并应掌握前期高, 后期低的原则。而生长素 NAA 和 6BA 配合使用反而降低增值倍数, 故在苦丁茶组培增殖中不必添加生长素。适宜的继代增殖配方为 MS+6BA 1.0 mg/L~4.0 mg/L+蔗糖 3%~4%+琼脂 0.3%。生长适温为 22°C~28°C, 1000 lx 左右的光照度即可。为降低成本, 简化工艺, 可以用自来水、市售白砂糖作为水源和碳源, 用自然光并适当辅以人工光源, 以减少能耗。适当降低琼脂的添加量 (使用量为 0.3%), 不但其增值倍数、生长量和可生根的芽苗数显著优于固体和液体培养基, 而且可减少琼脂的使用量。经过规模生产的验证, 苦丁茶的增值倍数为 2.72~3.0, 生产周期 1.5~2 个月^[6], 污染

3 大量生产的污染问题

国内外实践证明,植物组织培养种苗工厂化生产,防止污染是提高效率和降低成本的极其重要的措施。防污染在苦丁茶组培的生产是需花力气去解决的问题。它的污染源与其它植物组培的情况大体相似,主要是真菌与细菌。真菌污染主要来源于环境,细菌污染主要来源于接种材料及工具。防止污染的主要措施是:(1)改善环境条件。接种室与培养房要定期做好消毒与净化,接种前工作台或接种箱要开紫外灯 30 min 以上。(2)在消毒塑料盖封口的培养瓶灭菌结束后,消毒锅的压力表降到零后不能马上出锅,因冷热空气作用产生的负压效应,使外界环境的冷空气倒吸入已灭菌的培养瓶内引起真菌污染,为避免该现象的发生,消毒后培养瓶应待锅内稍冷却后才出锅,时间长短视设备条件灵活掌握。(3)严查接种材料。必须淘汰被真菌与细菌污染的接种材料。(4)对接种中所需的工具,必须经严格灭菌后才能使用。(5)提倡使用铁盖培养瓶。因为用铁盖培养瓶的污染率比塑料盖的低^[5]。(6)接种人员应严格执行灭菌操作规程,以避免带菌操作。

4 生根与移栽

在苦丁茶组培苗的生根诱导上笔者尝试了基内诱导生根、基外诱导生根、无根苗直接下土移栽等试验方法^[6]。

4.1 基内诱导生根

经正交试验证明,苦丁茶组培苗生根诱导的主要影响因子是 NAA,其次是培养基大量元素含量。适宜的生根诱导配方为 1/4MS+ NAA 0.1 mg/L~ 0.2 mg/L+ 糖 2%~ 3%+ 琼脂 0.6%,其生根率可达 85% 左右。把生根苗直接移到田间营养坯与经蛭石假植后再移栽,两种方法对比,后者的成活率比前者高出五个百分点,达 90% 以上。

4.2 基外诱导生根

将无根苗经高浓度 NAA 处理切口后,以蛭石为基质,扦插生根,然后再移栽到营养坯,其生根率比上述方法略偏低,约 80%。

4.3 无根苗直接下土移栽

以健壮无根苗扦插到营养坯中移栽而不经生根诱导阶段,其成活率在 75% 左右。该法对移苗的管理技术要求较高,对营养坯的土质要求较严,心土使芽苗不易染病,菜园土利于芽苗茁壮生长,兼顾考虑,营养坯上层为心土,下层装菜园土为宜。

上述 3 种方法,各有利弊。基内诱导生根后经蛭石假植再移栽,成活率高,苗生长健壮,但多一道工序,耗时多 1 个月。无根苗直接下土移栽,生产工艺简化,但管理技术要求较高。采用何种工艺,可视生产任务及所允许的时间灵活掌握。

笔者还利用组培大苗生长旺盛而木质化程度不高的优点进行扦插加繁,可加快繁殖速度亦可进一步降低生产成本。

苦丁茶组培苗移栽中要提高成活率,关键是遮荫、保湿和杀虫防病,要定期喷杀菌剂和叶面肥。

3 年的试验与生产实践证明,苦丁茶组培苗是广西继桉树之后第 2 种能进行工厂化生产的木本植物。

(下转第 39 页)

基本符合选优标准的, 予以编号标记、登记并采集标本, 作为初选优株。

(2) 复选: 第 2 年到果定型期再实测初选优株性状指标, 不符合标准的淘汰, 符合标准的定为复选优株, 予以登记。

(3) 决选: 第 3 年果定型期再实测复选优株各项性状指标, 符合标准的可作为中选优株, 采样分析和登记, 并作优株标记, 施行优株保护措施。

(4) 对中选优株主要经济性状作出分析评价。

3.3 优株当代鉴定试验

要把优株变成良种就必须证明在无性后代的遗传性是稳定的, 性状是优良的, 适应性是强的。鉴定的方法一是进行生产力试验; 二是区域试验。两个试验可合并安排, 采用原株(中选优株)接穗嫁接在大砧上。鉴定试验要根据不同气候土壤类型多布点, 以确定品种的生产力水平和适应推广地域。未经当代鉴定的优株株系(家系)在不同的生态环境, 不一定都能表现出优良性状。生产力试验和区域试验是良种选育重要过程, 又是良种繁育的开端。通过选优和对优株(原株)当代鉴定试验繁育出的株系称为无性系品种。

参考文献

- 1 林 协. 银杏的起源与分布. 生物学通报, 1965, (3): 32~ 33.
- 2 南京林产工业学院. 树木遗传育种学. 北京: 科学出版社, 1980, 79~ 100.
- 3 梁立新. 中国银杏. 济南: 山东科学技术出版社, 25~ 36.
- 4 刘燕君. 湖北省安陆市银杏品种资源调查及良种选择初报. 全国首届银杏学术研讨会论文集, 1992, 75~ 83.

(上接第 34 页)

参考文献

- 1 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.
- 2 陈 一, 李开双, 谢唐贵. 苦丁茶冬青叶的降压作用研究. 中草药, 1995, (5): 250~ 252.
- 3 陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986. 34.
- 4 焦鸿俊主编. 基础生物化学. 南宁: 广西民族出版社, 1995. 207.
- 5 王桂文, 周 兴, 李海鹰等. 木本经济植物苦丁茶组培增殖研究. 广西农业大学学报, 1997, 16 (2).
- 6 王桂文, 周 兴, 李海鹰等. 苦丁茶冬青茎段离体培养. 植物生理学通讯, 1995, 31 (5): 358.