

茶树组织培养研究进展

曹丹, 金孝芳* (湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 湖北武汉 430064)

摘要 从茶树外植体的选取、表面灭菌、培养基的确定及生长调节物质的确定等方面对茶树组织培养技术体系的研究进行综述, 指出目前研究中存在的问题, 并对今后的研究进行了展望, 为进一步开展茶树组织培养研究提供参考。

关键词 茶树; 组织培养; 灭菌; 培养基

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)29-10086-02

Research Advance on Tissue Culture of Tea

CAO Dan, JIN Xiao-fang* (Fruit and Tea Research Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract The choices and disinfection of the explants, the determinations of culture medium and growth regulators were reviewed for tissue culture of tea in this paper. The present problems and the research in future were pointed out. It would provide a scientific basis for further research on tissue culture of tea.

Key words Tea; Tissue culture; Disinfection; Culture medium

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 属于山茶科山茶属茶组, 是多年生常绿异花授粉木本植物。其叶经过加工后的饮品是世界上三大消费量最大的饮料之一, 具有营养价值和保健功效^[1]。

组织培养技术既可用于大量生产优良无性系植株, 又可打破种属间的界限, 克服远缘杂交不亲和等障碍, 对于开展茶树种质资源的保存、新品种的培育及种性改良等方面的研究具有重要意义。茶树组织培养技术的研究于 20 世纪 60 年代开始, 英国剑桥大学以茶树幼嫩茎段为材料研究离体咖啡碱的合成^[2], 目前已在次级代谢的研究、次级代谢产物的生产、茶苗的繁殖、诱导单倍体植株和种质资源的保存等方面取得了较多的成果。笔者就目前国内外茶树组织培养现状及问题进行综述, 旨在为研究和优化茶树组织培养技术, 对茶树育种及良种繁育等方面的研究提供参考。

1 研究现状

1.1 外植体的选取 外植体的选择对组织培养技术至关重要。目前, 茶树已经成功地从茎尖^[3-4]、茎段^[5-9]、腋芽^[10-12]、子叶^[13-14]、叶片^[15-16]、胚^[17-19]、下胚轴^[20]和花药^[21]等成熟或未成熟组织中通过愈伤组织或者直接产生不定芽的方式进行器官发生和植株再生。外植体供体植株间的差异也将影响外植体的生理状态, 进而影响组织培养的形态发生。一般而言, 较小的外植体再生能力较弱, 而大的则强。此外, 多数研究者倾向于采用春季新梢及冬季催芽萌发的嫩茎作为芽和茎的材料, 且室内控制条件下培养的实生苗和组培苗比田间生长的茶树污染轻, 消毒处理也较方便, 是组织和器官培养较好的材料来源^[22]。

1.2 外植体的灭菌 外植体的灭菌是组织培养的关键步骤。接种前应对外植体进行彻底的表面消毒和深度灭菌^[23], 外植体消毒的常用方法有用洗衣粉清理表面、自来水冲洗、置超净工作台、75% 乙醇消毒处理、消毒剂处理(常用

的消毒剂有次氯酸钠、升汞等)及无菌水冲洗等。

谭和平等^[24]以茶树腋芽为外植体, 先用水冲洗干净, 70% 乙醇浸 15~30 s, 再用 0.1% 的氯化汞溶液消毒 8~12 min, 无菌水洗 5 次。易鑫等^[25]采用正交试验研究茶树外植体的最佳消毒方式, 结果表明, 在适量的洗衣粉溶液中洗涤 5 min 后, 置于自来水下冲洗 2 h。将外植体用 75% 的乙醇溶液浸泡 30 s, 再用 0.1% 的氯化汞灭菌, 当把灭菌时间设定为 8 min 时, 灭菌效果最好。

1.3 培养基的确定 在茶树组织培养中, 常将 MS 作为基本培养基。张娅婷等^[8]以 MS、White 和 N₆ 为基本培养基, 附加等量的维生素、氨基酸、糖和植物生长调节剂, 对薷北茶芽苗进行培养, 结果发现, MS 基本培养基效果优于 White 和 N₆ 基本培养基。杨国伟等^[26]研究发现, MS 比 White、Heller 培养基更有利于茶树愈伤组织的生长, 茶树愈伤组织在 MS 培养基上诱导率高达 90%。Haldeman 也比较了 MS 与 Anderson's Rhodo dendron 培养基对茶树愈伤组织培养的效果, 结果表明, MS 培养基效果最佳。

研究表明, 基本培养基中大量元素的含量对茶树组织培养影响很大, 成浩等^[27]发现 MS 培养基大量元素降为原来的 1/2, 不仅可以促进茎段的诱导和生长, 也可以降低茎段的褐化率。但在实际操作中, 大多数研究者分别采用全量的大量元素进行诱导与增殖, 采用半量的大量元素进行生根培养。

1.4 生长调节剂的确定 生长调节剂是培养基中的关键物质, 其种类与配比是外植体能否成功启动的关键因素之一。因器官不同, 其激素水平存在差异, 且对外源性的生长调节物质的敏感性也不同, 故不同品种及不同类型的外植体对不同生长调节剂的种类和配比反应也不同。在快速繁殖时, 通常生长素含量应稍低, 这是因为生长素含量过高易导致愈伤组织的形成, 而愈伤组织的形成会降低增殖率。此外, 细胞分裂素含量高时将会阻碍愈伤组织的形成, 而有利于芽的诱导和生长。刘德华等^[28]、李家华等^[29]和张建华等^[30]在没有添加 BA 的情况下, 无从生芽长出, 而在添加高浓度 BA 的情况下长出了丛生芽。在生根培养中, 一般认为先对外植体进

基金项目 湖北省农业科技创新中心项目(2011-620-005-003-04)。
作者简介 曹丹(1988-), 女, 河南开封人, 研究实习员, 硕士, 从事茶资源与育种研究。* 通讯作者。
收稿日期 2014-09-04

行预处理,再转入新的培养基有利于提高其生根率,一般采用 IBA 进行预处理,但生根率不受 IBA 预处理时间的影响,而主要受 IBA 浓度的影响^[27]。

1.5 其他 茶树组织培养除与培养基与生长调节剂等相关外,还与培养环境有关。刘德华等^[31]研究发现,子叶片隆起发生率在一定程度上与光照强度呈负相关,子叶胚的胚状体和不定芽分化率在一定程度上与光照强度呈正相关。钟俊辉等^[32]研究发现,促进茶氨酸累积和茶细胞生长的最佳温度是 25 ℃,而在 32 ℃或 35 ℃下进行培养,愈伤组织将会褐变,甚至枯死,且暗培养比光培养更能促进茶氨酸的聚集。

2 存在问题与措施

从 20 世纪初开始,植物组织培养技术已成功应用于农业、林业和医药业等领域,并产生了巨大的经济效益和社会效益。褐化、污染和玻璃化是植物组织培养公认的三大难题^[33-34]。茶树因多酚含量高,且自身携带较多内生菌,在试验过程中会出现外植体、污染等问题。

2.1 外植体褐化 茶树中的酚类物质含量较高,而进行组织培养时,由于外植体要进行切割造成伤口,使得多酚类物质与底物多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)的隔离被打破,遇到氧气发生氧化反应产生褐色物质,褐色物质逐渐扩散到整个培养基,最终造成外植体褐变^[35]。此外,外植体褐变还与外植体部位、取样时间、培养基成分和消毒方式等因素有关。黄燕芬等^[36]探讨了外植体的灭菌时间、激素比例、取样方式及外源物质等因素在茶树组织培养过程中对外植体褐化程度的影响,结果表明,外植体用 0.1% 的升汞表面消毒 7~8 min,接种外植体带腋芽叶片保留 2/5,每隔 3 d 进行一次转瓶,培养基中添加 1.0 g/L Vc 和 1.0 g/L 吸附剂 AC,能将外植体的褐化率降至 41%。

减少外植体的褐化,主要从以下几个方面着手:①选择适当的外植体。从生长健壮的植株上选取发育正常的部位作为外植体,在组织培养过程中不易发生褐变,在取样时还需注重基因型的选择,可以将不易发生褐变的品种作为外植体。②吸附剂与抑制剂的使用。在培养基中加入抗氧化剂及其他抑制剂能有效减轻外植体在组织培养过程中的酶促褐变,如在培养基中加入多羟基还原物质 Vc,另外,可作为抑制剂的物质如氰化钾、氨基酸、蛋白水解产物、多胺等都用来防止褐变现象。此外,活性炭吸附性强,可以用来吸附培养基中的醌和酚等有害物质,减轻褐变,同时培养基中生长调节物质也将被吸附,故在培养基中加入活性炭时也需注意不同激素间的配比,在防止褐变的同时能保证外植体的正常发育。③及时转瓶。接种后,每隔 3~5 d 转瓶一次,可有效减少酚类物质在培养基中的富集,有效减轻褐变。④改善培养条件。接种后先在低温或者黑暗中预培养几天可降低褐化程度。

2.2 外植体污染 外植体污染是植物组织培养中普遍存在的问题。茶树组织培养分为一般性污染和内生菌污染。一般性污染是针对不同类型外植体选择的消毒剂不当,导致材料消毒不彻底或是实验人员在操作过程中未严格按照要求

进行操作从而导致的污染。一般性污染可采取一定措施尽量降低或避免。而内生菌污染是茶树自身携带的内生菌引起的,且茶树内生菌含量较丰富,在对其进行组织培养时极易发生内生菌污染,其防治十分困难。

目前有关防治茶树组织培养过程中外植体污染的报道较少,故今后应深入开展这方面的研究。

3 展望

茶树组织培养技术虽然在多方面取得了较大成就,但在基础研究方面以及进一步优化次级代谢产物的生产条件、利用组培技术快速大量繁殖茶树种质资源、提高茶树组织培养的再生频率等方面的研究还需继续加强。另外,由于茶树离体再生较困难且转化效率极低^[37],虽然目前在对茶树遗传转化的探索较多,但突破性的进展较少,故应加强相关方面的研究。

参考文献

- [1] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 江昌俊. 茶树育种学[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [3] 中村顺行. Shoot tip culture of tea cultivar yabukita[J]. 茶叶研究报告, 1987, 65: 1-7.
- [4] 黄亚辉. 茶树组织培养的现状[J]. 茶叶通讯, 1990(4): 29-31.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 袁正仿, 孔凡权, 远凌威, 等. 薷北茶树的组织培养研[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版, 2003, 16(2): 215-217.
- [8] 张娅婷, 张伟. 薷北茶的组织培养[J]. 周口师范学院学报, 2004(9): 74-76.
- [9] 土井芳宪. 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.
- [10] 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(S1): 589-599.
- [11] 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.
- [12] NAKAMUR A Y. Effects of the kind of auxins on callus induction and root differentiation from stem segment culture of Camellia sinensis[J]. Chagyō Kenkyū Hokoku, 1988, 68: 1-7.
- [13] 刘德华. 茶籽子叶柄培养直接分化芽[J]. 中国茶叶, 1987(6): 15-17.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 安间舜, 铃木由惠. Decotylated embryo culture in tea plant[J]. 茶叶研究报告, 1980, 52: 7-10.
- [19] 陈平, 严慕勤, 王以红. 大叶茶的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1985(2): 45-46.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 江昌俊. 茶树组织与器官培养研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 348-354.
- [23] 金江群, 韩素英, 郭泉水. 柏科植物组织培养研究现状与展望[J]. 世界林业研究, 2010, 25(2): 34-40.
- [24] 谭和平, 余桂容, 杜文平, 等. 不同茶树品种组培快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2003, 16(1): 102-104.
- [25] 易鑫, 万志刚, 顾福根, 等. 碧螺春茶树微繁殖技术研究[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 95-96.

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制 从没食子酸标准曲线(图1)可看出,没食子酸浓度在10~70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与吸光度值呈良好的线性关系,线性回归方程为 $y = 0.010x + 0.017$ ($R^2 = 0.9981$)。

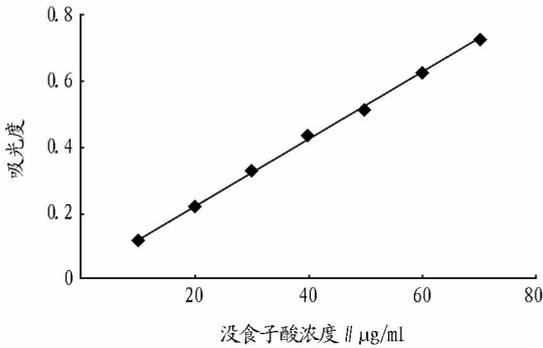


图1 没食子酸标定多酚标准曲线

2.2 西沙诺尼果汁中总多酚的含量测定 分别对20120112、20120625、20120911、20130326、20130603这5个生产批次的西沙诺尼果汁进行测定,结果发现其总多酚的含量分别为104.07、115.23、110.98、118.92、121.39 $\text{mg}/100\text{ml}$,平均值为114.12 $\text{mg}/100\text{ml}$ 。

2.3 大溪地诺尼果汁中总多酚的含量测定 测定Tht-1、Tht-2、Tht-3、Tht-4、Tht-5大溪地诺尼果汁多酚含量发现,其范围为96.24~134.65 $\text{mg}/100\text{ml}$;大溪地不同产品间多酚含量有所差异,其中Tht-3含量最高,为134.65 $\text{mg}/100\text{ml}$,其次为Tht-4和Tht-5,分别为121.78和112.28 $\text{mg}/100\text{ml}$,而Tht-1和Tht-2多酚含量较低,分别为97.62、96.24 $\text{mg}/100\text{ml}$ 。

3 讨论

大量科学研究表明多酚是诺尼果汁重要的功效成分,具有抗氧化、提高机体免疫力、抗辐射、抗衰老和保护心血管系统等生物活性^[5-8]。前期研究表明西沙诺尼果汁是一种营养丰富、天然健康的饮品,基本营养成分与库克、大溪地诺尼果汁相当,甚至粗多糖、钾、铁等含量均优于进口产品^[13],且具有辅助改善癌症患者化疗副作用的效果^[14]。在此基础上,笔者对我国西沙诺尼果汁多酚含量进行了测定,发现含量范围为104.07~121.39 $\text{mg}/100\text{ml}$,平均值为114.12 $\text{mg}/100\text{ml}$ 。与陈守江等报道的果蔬汁如番茄原汁76.88 $\text{mg}/100\text{g}$ 、桔子原汁

86.09 $\text{mg}/100\text{g}$ 、西瓜原汁4.40 $\text{mg}/100\text{g}$ 和葡萄原汁86.09 $\text{mg}/100\text{g}$ 相比^[15],西沙诺尼果汁多酚含量较高,但低于蓝莓汁(459 $\text{mg}/100\text{g}$)^[16]。

笔者对5种大溪地诺尼果汁进行了检测,多酚含量范围为96.24~134.65 $\text{mg}/100\text{ml}$,与我国西沙诺尼果汁相比无明显差异。该研究采用的Folin-Ciocalteu比色法,可为诺尼果汁的质量评价和产品的开发应用提供参考依据。

参考文献

- [1] WANG M Y, NOWICKI D, ANDERSON G, et al. Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (Noni) [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2008, 63(2): 59-63.
- [2] PALU A K, KIM A H, WEST B J, et al. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system; its molecular mechanism of action [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(3): 502-506.
- [3] BROWN A C. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit; a review [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(10): 1427-1440.
- [4] LI J, STICKEL S L, BOUTON-VERVILLE H, et al. Fermented Noni exudate (fNE): a mediator between immune system and anti-tumor activity [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(6): 1505-1509.
- [5] WENG C J, YEN G C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(1): 76-87.
- [6] WILLIAMS R J, SPENCER J P. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease, 2012, 52(1): 35-45.
- [7] CHOI D Y, LEE Y J, HONG J T, et al. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease [J]. *Brain Research Bulletin*, 2012, 87(2/3): 144-153.
- [8] KHAN N, AFAQ F, MUKHTAR H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(3): 475-510.
- [9] 张伟敏, 魏静, 施瑞诚, 等. 诺尼果的活性成分和生理功能的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007(19): 1087-1091.
- [10] DUSSOSSOY E, BRAT P, BONY E, et al. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(1): 108-115.
- [11] 陈建国, 李金霞, 程池. 诺尼抗氧化作用机制的研究进展 [J]. *老年医学与保健*, 2013, 19(6): 5-8.
- [12] 刘清, 李玉, 姚慧源. Folin-Ciocalteu比色法测定大麦提取液中总多酚的含量 [J]. *食品科技*, 2007(4): 175-177.
- [13] 李金霞, 刘文慧, 程池, 等. 西沙诺尼果汁的营养成分分析 [J]. *食品科技*, 2014, 39(5): 56-59.
- [14] 程池, 陈建国, 刘洋, 等. 西沙诺尼果汁辅助改善鼻咽癌患者化疗副作用1例报告 [J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(4): 56-58.
- [15] 陈守江, 姜松. 果蔬汁品质的总抗氧化活性评价 [J]. *食品工业科技*, 2003, 24(6): 62-64.
- [16] 刘翼翔, 吴永沛, 陈俊, 等. 蓝莓不同多酚物质的分离与抑制细胞氧化损伤功能的比较 [J]. *浙江大学学报*, 2012, 39(4): 428-434.

(上接第10087页)

- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.

- [33] 胡彦, 赵艳. 植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题 [J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(S1): 130-134.
- [34] 赵蓬晖, 张江涛, 马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策 [J]. *河南林业科技*, 2001, 21(2): 2.
- [35] 叶梅. 植物组织培养的研究进展 [J]. *重庆工商大学学报: 自然科学版*, 2005, 22(4): 326-329, 381.
- [36] 黄燕芬, 周国兰, 赵华富. 降低茶树组织培养中外植体褐化程度的研究 [J]. *西南农业学报*, 2009, 22(5): 1492-1495.
- [37] MONDAL T K, BHATTACHARYA A, LAXMIKUMARAN M, et al. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 76(3): 195-254.