

可可茶子叶培养中体细胞胚状体 形成及植株再生^{*}

朱念德 刘蔚秋 叶创兴

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 用含有 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D或 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PCPA的 SH培养基 (含 d (蔗糖) = 3%) 培养可可茶的未成熟子叶, 2周后即可从合子胚的下胚轴诱导出胚状体, 5~7周后可以从子叶表皮直接诱导出胚状体. 在含 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D的培养基中, 子叶外植体在培养4周内即能分化出胚状体且分化频率较高. 培养1周后把培养物转接至含 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA加上 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA的培养基中 (含 d (葡萄糖) = 2.5%) 可以诱导出“种子状胚”、“芽状胚”和“杯状胚”, 并可使“种子状胚”和“芽状胚”转化成苗. 另外, 还可诱导出丛芽并使丛芽转化成无根苗. 若把“芽状胚”转移到含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA-3和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA的培养基中, “芽状胚”转化成无根苗的频率较高.

关键词 可可茶 (*Camellia ptilophylla* Chang), 体胚, 组织培养

分类号 Q 944.6

可可茶是一种新的野生茶叶资源^[1], 它的茶叶中所含的嘌呤生物碱以可可碱为主^[2], 因而与传统的茶叶很不相同, 在药理和生理作用上, 表现出较大的特殊性, 是一种具有开发前景的茶树种类. 由于它的资源较少, 分布范围很狭窄, 因此对它的快速繁殖进行研究, 具有重要的意义. 对它的组织培养的研究, 已经做过一些工作, 已成功地从胚和茎段诱导成苗^[3,4]. 本研究从未成熟的合子胚和子叶诱导出各阶段胚状体, 并产生小苗.

1 材料和方法

试验材料来源于中大校园栽培的可可茶 (*Camellia ptilophylla*), 9月份采摘种子, 选取绿色未成熟蒴果. 此时种皮呈黄褐色, 虽未完全成熟, 但种子已达到它的最终大小, d 约为 12 mm , 略硬. 剥去果皮, 种子于乙醇 (100%) 中表面消毒, 在 $d = 2\%$ 的 NaOCl 溶液中浸泡 10 min , 无菌水冲洗 3~4 次, 然后在无菌条件下剥除内外种皮, 注意不要伤及子叶表皮. 分离出合子胚, 将子叶切成约 50 mm^2 块状, 合子胚和子叶块分别置于下列 SH 或 MS 固体培养基上: SH1 (SH+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D), SH2 (SH+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D+ $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PCPA), SH3 (SH+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D), MS1 (MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D+ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA), 培养 15 周后, 再转接至 SH4 (SH+ $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA), SH5 (SH+ 5

* 广州市科委重点资助项目

收稿日期: 1997-10-17 朱念德, 男, 58岁, 副教授

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA), SH6 (SH+ $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA) 等培养基上. 其中培养基 SH1, SH2, SH3 和 MS1 中加入 $d=3\%$ 的蔗糖, 其它培养基加入 $d=2.5\%$ 的葡萄糖, pH 全部调至 5.6. 培养物置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养室内, 人工辅助光照 12 h/d , 光照强度 2000 lx , 每 30 天继代 1 次.

2 结 果

2.1 胚状体的诱导和发生

将子叶外植体分别接种于 SH 和 SH2 中, 2 周内, 外植体开始肿胀, 变绿并有愈伤组织长出, 此时愈伤组织多为白色, 少数为黄色、绿色. 5~7 周, SH1 及 SH2 上的外植体均有大量愈伤组织生长, 并开始长根及胚状体. 培养至第 14 周, 在 SH2 上的培养物, 胚状体发生频率为 20%, 长根频率为 32%, 在 SH1 上的外植体胚状体发生频率为 10%, 长根频率为 24%. 若在第 14 周把 SH 及 SH2 上的外植体转接到 MS1 上, 胚状体的发生频率比在原培养基中有所提高. 这些培养物产生的胚状体都在子叶表面直接形成, 不经过愈伤组织. 胚状体发生的顺序为球形-心形-鱼雷形, 在 SH1, SH3 和 MS1 上胚状体可以发育到心形和鱼雷形等阶段, 但不能转化成苗. 如果将愈伤组织继续在 SH 或 SH2 上培养, 3 个月后, 有少量胚状体从愈伤组织上产生. 从种子中分离的合子胚, 培养于 SH 或 SH2 上, 显示出较强的分化能力. 培养 2 周后, 合子胚的胚轴上即分化出胚状体, 诱导频率为 20%. 在 SH3 上, 子叶外植体培养 4 周即能分化出胚状体且分化频率达 25%.

2.2 胚状体的分化及丛芽的产生、生长

把在 SH1, SH2 上培养 1 周后的培养物转移至分化培养基中, 将产生以下变化.

2.2.1 从愈伤组织上产生胚状体 从子叶外植体的切口上产生的愈伤组织有 3 类: ① 愈伤组织呈灰绿色, 表面粗糙, 增殖较快, 有的可以分化出根, 但没有显示出胚胎发生能力; ② 愈伤组织呈淡黄色, 致密, 表面具光泽, 增殖能力较弱, 当转移至 SH4 上时, 可以分化出胚状体和芽.

2.2.2 次生胚状体的产生及胚状体的萌发 共有 3 种不同类型的胚状体: ① “种子状胚”, 淡黄色, 类似合子胚, 通常具有 2 片子叶, 有时有多于 2 片子叶, 子叶肥厚, 大小相同或不同, 有时子叶部分或全部融合在一起 (图 1-1); ② “芽状胚”, 绿色, 长形, 具根极及茎极 (图 1-2); ③ “杯状胚”, 黄绿色, 酒杯状, 有明显的根极和茎极 (图 1-3).

在初始的培养中 (SH1, SH2), 仅有种子状胚产生, 当转移至 SH4 上 5 周后, 在初生胚状体上或其基部长出大量次生的胚状体 (图 1-4). 另外, 当转至 SH4 后, 有芽状胚形成, 并可长成小苗, 在有些小苗的茎、芽上又可产生一些棒形的芽状胚, 而在小芽、小苗与外植体的交界处以及小芽、小苗附近的外植体上均具较强的种状胚或芽状胚发生能力. 当在 SH4 上培养到 11 周时, 出现杯状胚, 但杯状胚的发生频率是很低的.

不同类型的胚状体, 其转化成苗的能力是不同的. 种子状胚当继续培养于 SH4 上时, 它具较强的次生胚状体发生能力, 种子状胚在 SH4 上能发育成完整的小苗, 但转化频率很低. 若将种子状胚分离出来单独培养, 转化频率稍有提高, 但也不高于 20%. 如果将种子状胚再转至 SH6 上, 有些胚状体异常生长, 长出畸形的小苗. 当在 SH4 上培养至 11 周后, 一些种子状胚逐渐老化 (图 1-5). 芽状胚的转化成苗的频率较高, 条件适宜时, 转化率可达 40%. 芽状胚在 SH4 上能发育成完整的小苗, 若在 SH5 上, 芽状胚转化成苗的频率较高, 但长成

的多是无根苗. 杯状胚在培养过程中, 能够长大, 但此后即逐渐褐化死亡, 无论是在 SH4 或是在 SH6 上它都不能转化成苗.

2.2.3 丛生芽及苗的发生 淡黄色, 致密且具光泽的愈伤组织, 连同产生它的子叶外植体转移到 SH4 或 SH5 上, 8 周后, 即可从愈伤组织分化出丛生芽, 这些芽几乎可以 100% 在原培养基上直接长成无根苗 (图 1-6). 由种子状胚、芽状胚或丛芽长成的小苗在每一叶腋处可产生至多个腋芽, 切下腋芽, 转移至新鲜培养基上, 每上腋芽又可萌生多数丛生芽. 腋生丛芽也能在原培养基上高频率地发育成无根苗.

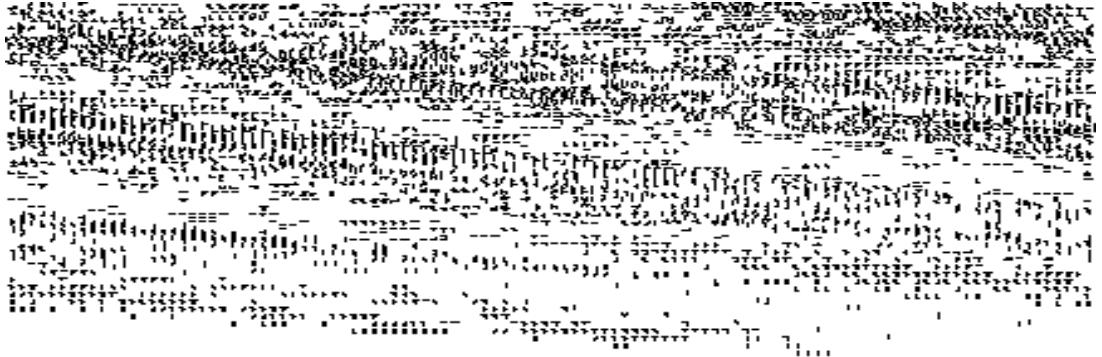


图 1 可可茶未成熟子叶培养诱导出的胚、丛生芽及再生小苗

Fig. 1 Embryos, caespitose-buds and regenerated plantlet induced from immature cotyledons of *Camellia ptilophylla*

- 1 种子状胚以及由种子状胚转化成的小苗 (a 种子状胚; b 种子状胚转化成的小苗; c 不定根);
2 芽状胚以及由芽状胚转化成的小苗; 3 杯状胚; 4 次生胚状体形成;
5 胚状体开始老化; 6 丛生芽高频率地转化成无根苗

3 讨 论

结果显示 *C. ptilophylla* 胚的离体子叶和胚轴不经过愈伤组织阶段而直接发生胚状体. Sharp 等^[5]认为, 这种现象反映了预胚性的决定细胞 (Pre-embryonic determined cell) 分化胚状体的潜在能力, 生长调节物有助于这些细胞释放潜能. 低浓度的 2, 4-D 对子叶外植体形成胚状体的最初诱导有一定作用. 由合子胚的子叶和胚轴直接发生初生胚状体和长期保持胚胎发生能力, 这种直接分化的能力是具有很大潜能的微繁殖系统, 对不含或含少量咖啡因的 *C. ptilophylla* 获得无咖啡因的种苗有重要价值.

从 *C. ptilophylla* 子叶培养中所产生的胚状体形态相似于 Vieitez 等^[6]从 *C. japonica* 的合子胚上获得的胚状体, 即有种子状胚和芽状胚. 关于芽状胚的产生, Ammirato^[7]和 Vieitez^[6]都认为与高浓度的细胞分裂素有关. 本研究证实了这一说法, 当子叶外植体培养于 SH1, SH2 上时, 仅有种子状胚的形成而无芽状胚的产生. 只有当转移到含 BA 的 SH4 以后才有“芽状胚”的形成.

Jia 等^[8]曾报导, 从 *C. sinensis* 未成熟胚培养中获得杯状胚 (cup shape). 本研究中从 *C. ptilophylla* 子叶培养中产生的杯状胚, 相似于 Jia 报导的杯状胚. 这种杯状胚具有根极与茎极, 在含低浓度的 GA 和 IAA 的培养基中, 杯状胚的根极明显伸长, 产生主根, 但茎极

没有伸长, 也没见杯状胚有产生次生胚状体的能力. 杯状胚的发生频率很低, 它的发生和发育尚待进一步研究.

低浓度 2, 4-D 对子叶外植体愈伤组织的形成和胚状体的最初诱导有一定作用, 但不利于胚状体的进一步发育和次生胚状体的形成. 在含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 的培养基上培养 3 个月的胚状体转移到诱导培养基 SH4 后, 转化成苗的频率很低, 可能与 2, 4-D 的作用有关.

子叶在体外培养可较高频率地发生丛生芽. 丛生芽除从愈伤组织产生的小芽发生外, 胚状体萌发时也可在胚轴处发生丛生芽. 此外, 从无根苗茎段转接后亦可产生丛生芽, 在适宜的培养基上大量增殖. 丛生芽的多途径发生和增殖是微繁的有效途径之一.

参 考 文 献

- 1 张宏达. 山茶属植物的系统研究. 中山大学学报论丛, 1981 (1): 122~ 123
- 2 张宏达, 叶创兴. 中国发现新的茶叶资源——可可茶. 中山大学学报 (自然科学版), 1988 (3): 131~ 133
- 3 朱念德, 陈爱玉. 毛叶茶组织培养的初步研究. 北京林业大学学报, 1990, 12 (2): 140~ 141
- 4 朱念德, 李静. 毛叶茶微型繁殖及激素对器官发生的影响. 生态科学, 1992 (1): 110~ 115
- 5 Sharp W R, Sonahal M R, Caldas R S, et al. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Horticult Rev, 1980 (2): 268~ 310
- 6 Vieitez A M, Barciela J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990 (21): 267~ 274
- 7 Ammirato P V. Patterns of development in culture. In Henke R R, Hughes K W, Constantin M P, et al, eds. Tissue culture in forestry and agriculture. New York: Plenum Press Corporation, 1985. 9~ 29
- 8 Jha T B, Jha S. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of an elite Darjeeling tea clone. Plant Sci, 1992 (84): 209~ 213

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Cotyledon Cultures of *Camellia ptilophylla* Chang

Zhu Niande* Liu Weiqiu Ye Chuangxing

Abstract When immature cotyledons of *C. ptilophylla* were cultured on SH medium supplemented with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D or $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D and $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PCPA, somatic embryos could be induced from hypocotyls of zygotic embryos after two weeks of culture, and after 5~ 7 weeks somatic embryos could be induced directly from the epidermis of cotyledons. Embryos could be induced after only 4 weeks of culture and the induced frequency was improved by reducing the content of 2, 4-D to $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. If these cultures were transferred to SH medium supplemented with $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA after 15 weeks, “seed-like embryos”, “bud-like embryos” and “cup-shape embryos” were induced and plantlet could be regenerated from these somatic embryos in the medium. “Caespitose-buds” could also be induced and developed into shoots in this medium. If “bud-like embryos” were transferred to medium with $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA-3 and $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, they developed into shoots without root with higher frequency.

Keywords *Camellia ptilophylla* Chang, somatic embryo, tissue culture

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China