

含可可碱野生茶树的未成熟 胚诱导胚状体的研究^{*}

叶创兴¹⁾ Iain E P Taylor²⁾

(1) 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2) 加拿大不列颠哥伦比亚大学植物学系)

摘 要 利用可可茶未成熟胚的子叶, 在 SH 培养基附加低浓度的细胞分裂素 2, 4-D 诱导出了胚状体, 组织切片表明, 胚状体发生于皮层的较深部。

关键词 可可茶 *Camellia ptilophylla*, 可可碱, 2, 4-D, 体胚, 组织培养

分类号 Q 944. 6

可可茶 *Camellia ptilophylla* Chang 是一种野生茶^[1], 它的芽叶嘌呤碱以可可碱为主^[2], 和栽培茶树含咖啡碱为主完全不同. 利用可可茶顶芽和腋芽为材料诱导丛芽的组织培养已经有过报道^[3, 4], 但是以不成熟的胚作为外植体诱导胚状体的组织培养则未见报道。

1 材料和方法

1.1 外植体材料的来源

1995 年 8 月 5 日采自 2 株可可茶树未成熟的果实, 用砂藏置于 4℃ 的冰箱中. 母树芽叶化学成分见表 1.

表 1 母树芽叶化学成分

母树编号	检测时间	可可碱 %	茶叶碱 ‰	咖啡碱
No. 1	199507	5. 18	2. 8	--
No. 1	199508	5. 99	3. 6	--
No. 2	199507	5. 86	5. 1	--
No. 2	199508	6. 30	5. 1	--

1.2 外植体材料的处理

将剥去种皮的种子置于 5% 漂白粉溶液中浸泡 10 min, 用灭菌的 ddH₂O 冲洗, 用灭菌的吸水纸吸干种子表面的水液, 在无菌操作条件下把胚挑出, 将每一个子叶切成 6~8 小块. 然后, 除去子叶的胚和子叶块被分别转移到培养基中, 培养 1 个月, 部分的子叶块在无菌操作下被切成薄片, 转入同样的培养基培养。

^{*} 广州市科委重点资助项目 (956148-98-2-70)

收稿日期: 1997-02-24 叶创兴, 男, 51 岁, 副教授

1.3 培养基的配制

全部实验均使用修改过的 Schenk & Hildebrandt^[5] (SH)基本培养基,在不同的组合中附加不同的细胞分裂素和生长激素.

(1) 固体培养基I:在 SH基本培养基中每升附加 2,4-D 0.05 g,蔗糖 30 g,琼脂 8 g, pH值调节至 5.8,用铝箔封好三角锥瓶的口部.培养基在 120℃, 20个大气压下灭菌 20 min.经高压灭菌的培养基待稍冷,在无菌操作下分装到一次性的塑料培养皿.小心将冷凝后的培养基封装于无菌的塑料袋中,置于 4℃的冰箱中备用.

(2) 液体培养基:按照固体培养基I的配方,但是不加琼脂配制,然后调整 pH值至 5.8,高压灭菌,候冷分装到大口的培养瓶中备用.

(3) 固体培养基II:除按培养基I配制外,另外每升附加 NAA 0.5 mg, KT 2.5 mg, 2-ip 1 mg, GA₃ 1 mg,调整 pH值和高压灭菌同固体培养基I.

每隔 3~4周用相同的培养基继代一次,培养室温度为(25±0.5)℃,光周期为 12/12 h 或暗培养.

将具有愈伤组织块和不同阶段的胚的组织块经 FAA固定,用石蜡包埋切片,切片以联苯胺蓝(Toluidine Blue)染色,在显微镜下检查,拍照.

2 结果和讨论

在 SH培养基上,每升附加 NAA 0.5 mg, KT 2.5 mg, 2-ip 1 mg.在 12/12 h 光暗周期培养和暗培养条件下,无论是去掉子叶的种胚或子叶,包括子叶块和子叶薄片,均只能诱导愈伤组织团.在光周期培养条件下,经过 30 d,子叶块愈伤组织的诱导率是 58.3%,子叶薄片的诱导率是 69.6%;经 60 d培养后,愈伤组织的诱导率在子叶块和子叶薄片分别上升到 83%和 80%.在光周期条件下培养 30 d,然后转入暗培养条件下,再培养 30 d,愈伤组织的诱导率在子叶块和子叶片分别为 41.6%和 77.5%.

在 12/12 h 光周期条件下培养 30 d,再转入同样的光周期条件进行液体培养,虽然 100%的组织块产生了愈伤组织,但不产生胚性组织.

在 SH培养基上,每升附加 2,4-D而不加入 NAA, KT, 2-ip等生长素和细胞分裂素,随 2,4-D浓度的增加,外植体的反应有所不同.

在每升只附加 0.05 mg 2,4-D,在固体培养基上,光周期培养 51 d后,诱导出了胚状体,在子叶块和子叶薄片的诱导率均为 20%~25%,每一组织块最少产生 4个最多产生 10个球状体的胚.而愈伤组织的诱导率分别为 66.7%和 50%.经 30 d光周期培养,再转入暗培养,又经 30 d,无论子叶块或子叶薄片均只能诱导出愈伤组织,诱导率均为 100%.没有任何胚性组织发生.

在将 2,4-D增加 1倍,使每升培养基含量达到 0.1 mg,经过同样的光周期条件下的培养,在子叶块或子叶薄片等外植体上,只能诱导出无定型的愈伤组织.

从茶树不成熟的子叶诱导体胚也有过报道,当 MS培养基每升附加 2,4-D 0.05 mg, KT 0.05 mg时,可以诱导出各个阶段的体胚,而高浓度的 2,4-D和 KT只能产生形态多变的块状组织^[6].

当外植体培养 6~8周后,所产生的培养物可以大致划分出 3种形态,其中 2种属于无定型的愈伤组织:一种是浅黄绿色,快速增长的,疏松的组织团,表面充满了小球状突起(图

1 1), 这种愈伤组织不能转化为胚性组织, 它们主要来源于子叶块和子叶切片; 另一种是无色透明的泡状突起的组织团 (图 1: 2), 这种愈伤组织同样不能转化为胚性组织, 它们可以来源于子叶, 也可以来源于同样的培养基上培养的除去子叶的胚, 由胚萌发后伸展出来的真叶; 第三种细胞系是浅黄色的, 组织看起来结实, 致密而光滑, 表面没有小球状的泡状突起, 外形上已经有组织分化, 并且增长缓慢, 这一细胞系是胚性组织的, 由它们可以诱导出体胚来 (图 1: 3, 4).

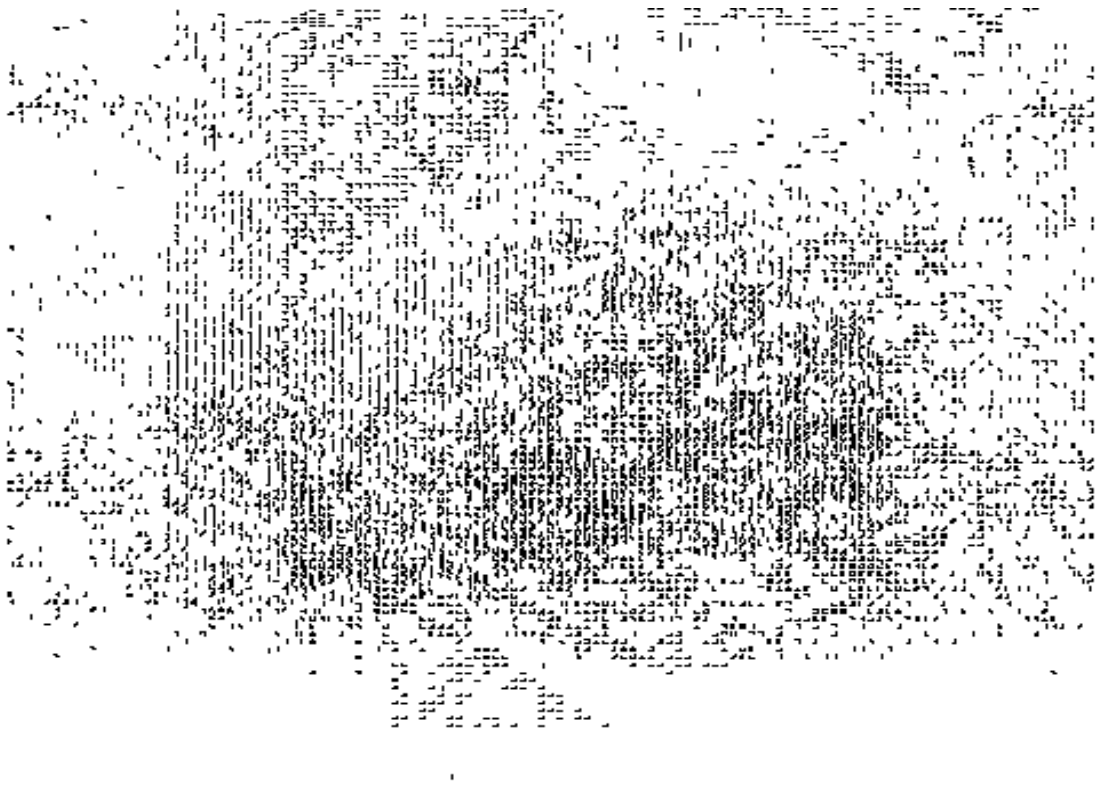


图 1 可可茶不成熟的子叶上诱导出的愈伤组织和胚

1 无定型, 浅黄色的愈伤组织: a 表面充满细小球体的愈伤组织; 2 愈伤组织, 胚状体, 不定根: b 无色透明的愈伤组织, c 胚的心形体阶段, d 浅黄绿色的愈伤组织, e 胚的鱼雷体阶段, f 胚的鱼雷体阶段的进一步发展; 3 示胚性组织: g 胚性组织; 4 胚性组织和不定根: h 胚的球状体阶段, i 不定根, j 无定型的愈伤组织, k 胚的杯状体阶段; 5 体胚的杯状体阶段: l 杯状体胚, m 种胚; 6 体胚在外植体中的起源: n 胚发生于皮层的较下部, o 示胚中的管状细胞, p 胚状体上面部分的横切面

在培养物中常可以出现不定根, 上有浓密的根毛 (图 1: 4). 从不定根似乎不能诱导出胚性组织来, 因为随着培养时间的推移, 根状体产生了大量的愈伤组织.

除去子叶的胚虽然能够少许生长, 但是继续培养, 并不能使它们生根, 长成完整的植株. 这可能是在培养基中只有细胞分裂素 2, 4-D, 而缺少 IBA 等促进生根的生长素的原因.

体胚是子叶块和子叶薄片这些外植体在光周期下培养 6~8 周缓慢出现的. 最初是较小的球状体 (图 1: 4), 表面是光滑的, 在试管培养中称球形胚, 然后是较大的球形胚. 球形胚进

一步发育便成为心形胚(图 1: 2),心形胚可以是对称的,也可以是不对称的,中间的陷落—凹入处,是一个生长锥或生长点.生长锥继续生长,便发展到鱼雷状胚.鱼雷状胚尾部扩大,类似于玻璃汽水瓶瓶口的上端部分,这一阶段的鱼雷状胚进一步生长,形成腰鼓状—两头小,中间大(图 1: 2).腰鼓形的胚最且发展为杯状的胚(图 1: 5),杯状体口部比较小,基部较宽,下端有一柄,杯内看起来是空的,已有极性的分化,这实际上已到达胚的萌发阶段.

一般把胚的发展分为球形阶段,心形体阶段,鱼雷状体阶段,但从可可茶的不成熟的子叶诱导出体胚来看,还应有一些过渡阶段,如从鱼雷体阶段开始,经历两端小,中间大的腰鼓形阶段,杯状体阶段.一些学者也把栽培茶发生的体胚具柄阶段称为杯状体胚^[7].

愈伤组织既可起源于表皮组织(图 1: 1)也可源于近表皮的皮层组织.而胚性组织均起源于皮层组织(图 1: 6).在愈伤组织内细胞没有组织分化,全部是相似的薄壁细胞,外围没有明显的界限;在胚性组织内具有组织上的分化,可见正在分化的形成层细胞,较大的薄壁组织,长的管状细胞,在周围有一层或数层厚壁的细胞,因此有一个明显的界限.

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)
- 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.毛叶茶向型繁殖及激素对器官发生的影响.生态科学, 1992(1): 110~115
- 5 Schenk R V, Hildebrandt A C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot, 1972, 50: 199~204
- 6 Bano Z, Rajarathnam S, Mohanty B D. Somatic embryogenesis in cotyledon cultures of tea (*Thea sinensis* L.). J of Horticult Sci, 1991, 66(4): 465~470
- 6 Jha T B, Jha S, Sen S K. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of an elite Darjeeling tea clone. Plant Sci (Linmerick), 1992, 84(2): 209~213

Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledon Cultures of *Camellia ptilophylla* Chang Containing Theobromine as Predominant Content of Purine Alkaloids

Ye Chuangxing* Iain E P Taylor

Abstract From immature cotyledons of *Camellia ptilophylla* Chang, sommatic embryos were induced on Schenk & Hildebrandt (SH) basal medium, supplemented with low concentrated 2, 4-D. When the 2, 4-D concentration was higher, lump calli were formed. The sommatic embryos were developed from inner cortex from morpho-histological evidence.

Keywords *Camellia ptilophylla*, theobromine, 2, 4-D, embryogenesis, tissue culture

* Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275