

## 甜茶组织培养研究

林 荣 王润珍 王秀琴

(广西植物研究所)

**摘要** 甜茶的茎段和实生苗培养在MS基本培养基中,研究植物激素对器官形成的影响,试验结果表明BA0.5—2.0毫克/升明显促进芽的形成和增殖;而对照(基本培养基)无形成芽。细胞分裂素对芽的起动力是必需的。BA0.5—2.0毫克/升和GA<sub>3</sub>1.0毫克/升配合使用,对茎段形成芽和增殖反而减少,但形成的苗较高和幼叶生长良好。通过继代培养,可繁殖大量小苗,它揭示出同一块外植体生长出许多小植株的可能,将无根苗转入含有IBA0.25—0.50毫克/升的1/2MS培养基中,能诱导生根,发展完整植株。试管苗移植土壤中,获得成功,幼苗生长良好。

**关键词** 甜茶;组织培养;植物激素;器官形成

甜茶 *Rubus suavissimus* S. Lee 是高甜度、低热性的甜料植物。甜茶叶含有甜茶素、多酚类、蛋白质、氨基酸、维生素C及矿物质等。其甜味成分比蔗糖甜300倍,是一种低热值的非糖甜味物质<sup>[1]</sup>,适宜于食品工业和医药工业应用,可供糖尿病、肥胖症患者长期使用。鉴于甜茶系野生植物,仅靠野生资源不能满足生产需要,必需进行人工栽培,但采用常规的分株和分根繁殖,繁殖系数较低,而种子繁殖,发芽率又低。为此,我们进行甜茶组织培养研究,促使其大量增殖,为甜茶快速繁殖提供新的途径。

### 材 料 和 方 法

采用茎段、嫩梢和实生苗为外植体。当果实成熟时,采收种子分别在3—4℃冰箱低温贮藏和室温贮藏,每月用TTC法测定一次种子生活力。种子经表面消毒后,分别以剪口和不剪口的种子进行试管播种,培养无菌苗。或者采取大田栽培的植株,选取尚未萌动带顶芽或者侧芽的枝条,去掉叶片,剪成长约2—3厘米的茎段,洗干净后,用70%酒精浸渍片刻,再用0.1%HgCl<sub>2</sub>溶液消毒14—16分钟,用无菌水冲洗4—5次,吸干水分,切成长约1厘米带芽的茎段进行接种。

以MS为基本培养基<sup>[2]</sup>,根据试验要求分别附加不同浓度和组合的6-苄基氨基嘌呤(BA)、吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)等。白糖浓度3%,琼脂0.7—0.8%。pH为5.8,以1公斤/厘米<sup>2</sup>高压蒸汽灭菌20分钟,接种后培养于25±2℃,每天用日光灯照光9—10小时,约2,000勒克司。

### 结 果 和 讨 论

#### 一、种子贮藏及理化处理对培养无菌苗的影响

甜茶种子细小,种皮坚硬,种子难于萌发,在甜茶分布区的自然条件下,很少发现实生

吴秉雁同志参加部分工作

苗,为了培养无菌苗作外植体,首先要了解种子发芽较难及发芽率低的原因。当5—7月间果实成熟时,将采收的种子分别用3—4℃低温贮藏和室温贮藏,每月用1%的2,3,5-氯化三苯基四氮唑溶液测定种子生活力,其结果(见表1)表明,甜茶种子寿命较短,在室温条件下,贮藏一个月,仍保持种子的生活力;贮藏两个月,种子大部分丧失发芽力;贮藏三个月,种子几乎全部丧失发芽力。而采用3—4℃低温贮藏,可延长种子的寿命,但只能保持两个月,如低温贮藏三个月,有生活力的种子只有15%,这说明在人工播种时,种子发芽率低,甚至不发芽,可能因贮藏期间种子已丧失生活力所致。因此,培养甜茶无菌苗,当种子采收后应及时进行试管播种,但播种后经历较长时间,培养基往往已变干,尚未见发芽。为此,我们进一步试验种子有否后熟期,当种子采收后用各种化学药剂处理及剪破种皮等处理,以不处理的种子作对照,进行试管播种,在播种后约两周剪破种皮的处理,种子开始萌发出苗,获得无菌苗,而其他各处理及对照均无种子发芽,这说明甜茶种子不需后熟期,种子难萌发系种皮坚硬,透性差所致,因此在人工播种育苗时,种子用湿砂层积处理,可促进种子萌发。

甜茶果实成熟期不一致,不同成熟度的种子,其生活力有很大的差异,如果实呈红黄色,成熟的种子,有生活力的种子占72%;而果实呈红绿色,未成熟的种子,有生活力的种子只有30%,一般种子具有生活力在50%左右,这也是造成种子发芽率低的因素之一,因此,必需待果实充分成熟时分批采收,以提高发芽率。

表1 甜茶种子贮藏方法对种子生活力的影响

贮藏方法	种子测定日期	测定种子数(粒)	有生活力种子	
			数量(粒)	%
采收后立即测定	1982, 7, 13	100	58	58
室温贮藏	1982, 8, 13	100	45	45
室温贮藏	1982, 9, 13	100	4	4
室温贮藏	1982, 10, 13	100	1	1
3—4℃低温贮藏	1982, 8, 13	100	55	55
3—4℃低温贮藏	1982, 9, 13	100	52	52
3—4℃低温贮藏	1982, 10, 13	100	15	15

## 二、植物激素对芽分化的影响

培养基中植物激素的状况,在诱导植物组织形成器官起着重要的作用<sup>[3]</sup>。不同植物对激素浓度及组合比例的要求有很大的差异。试验结果表明(见表2—3),细胞分裂素BA0.5—2.0毫克/升明显促进甜茶茎段、实生苗分化丛生芽和形成苗。当BA浓度从0.5毫克/升提高到2.0毫克/升,分化芽、苗的数量也随着增多,而无激素的对照组(基本培养基)无分化丛生芽。由此可见,甜茶组织诱导芽分化需要依赖外源激素的供给。

BA和GA<sub>3</sub>配合使用,对茎段诱导分化芽、苗数反而比单独使用BA的各处理减少,但形成的苗生长较好,表现苗较高且幼叶生长良好,因此,赤霉素对小苗长高和幼叶的伸展均有一定的作用。

取材不同对培养效果有明显的影响,采用茎段和实生苗作外植体,培养在适宜的培养基,均能诱导芽的分化,分化率达80%以上,在茎段幼芽的周围和实生苗的基部分化许多不定芽,通过继代培养,增殖速度快;而采用嫩梢作外植体,不仅分化率低,仅20%左右,且增殖速度慢,在培养过程嫩梢往往干枯死亡。因此,甜茶茎段和实生苗作为无性系快速繁殖是较好的培养材料。

茎段和实生苗培养在适宜的培养基,培养约一周外植体开始长大,培养约三周在苗的基部或茎段的腋芽周围开始分化丛生芽,随后形成许多无根苗,培养四至五周培养瓶已长满小

表2 激素对茎段分化芽的影响

激素浓度 (毫克/升)	外植体 数目 (块)	分化 丛生芽		形成苗数 (株/块)
		块	%	
MS	20	0	0	1.0
MS+BA0.5	20	20	100	9.9
MS+BA1.0	20	20	100	15.9
MS+BA2.0	20	17	85	22.9
MS+BA0.5+GA <sub>3</sub> 1.0	20	19	95	8.5
MS+BA1.0+GA <sub>3</sub> 1.0	20	20	100	8.1
MS+BA2.0+GA <sub>3</sub> 1.0	20	20	100	8.7

表3 激素对实生苗分化丛生芽的影响

激素浓度 (毫克/升)	外植体 数量 (块)	分化 丛生芽		形成苗数 (株/株)
		株	%	
MS	20	0	0	1.0
MS+BA0.5	20	17	85	5.5
MS+BA1.0	20	19	95	5.5
MS+BA2.0	20	19	95	8.2
MS+BA0.5+GA <sub>3</sub> 1.0	20	18	90	7.5
MS+BA1.0+GA <sub>3</sub> 1.0	20	18	80	7.5
MS+BA2.0+GA <sub>3</sub> 1.0	20	16	80	6.7

苗必需进行转管, 将健壮而无根苗转入生根培养基诱导生根, 一般转管后约两周开始形成根, 获得完整植株。将丛生幼芽和小苗转入新鲜培养基进行继代培养, 增殖速度快, 每个培养瓶可分化几十株甚至一百多株小苗(见图1—3)。为了培养较健壮的小苗, 控制增殖苗数不宜过多, 在继代培养时降低BA浓度, 以MS+BA0.2—0.5毫克/升+GA<sub>3</sub>1.0毫克/升为宜。每30—40天继代一次, 以10倍速度增殖, 一年内一块外植体可繁殖几十万株小苗。因此, 甜茶组织培养可作为快速繁殖的有效途径。

### 三、影响小苗生根的因素

甜茶组织培养诱导芽的分化较容易, 而诱导生根较困难。试验结果表明生长素、苗长势及培养基的湿度等因素对小苗生根均起重要的作用。我们采用NAA0.2—2.0毫克/升及IBA0.25—5.0毫克/升等不同浓度的试验结果表明以 $\frac{1}{2}$ MS培养基, 附加IBA0.25—0.50毫克/升效果较好, 但生根率仍较低, 均在30%以下, 这可能由于甜茶组织培养诱导芽的增殖较多, 往往一个培养瓶形成许多小苗, 苗长势较弱, 转入生根培养基尚未形成根, 培养基开始变干, 致使苗干枯死亡而影响生根率。为此, 我们采用不同长势苗和瓶口包扎物等试验, 其生根率有明显的差异(见表4), 以 $\frac{1}{2}$ MS+IBA0.25毫克/升, 采用壮苗, 同时用硫酸纸及塑料薄膜包扎瓶口, 生根率可达91.7%, 而采用细苗, 用棉花塞封口, 生根率仅20%。由此可见培养壮苗是促进小苗生根的基础, 供给外源激素是促进生根的关键, 改善培养基的湿度状况是促进生根的因素。

表4 苗长势及瓶口包扎物对小苗生根的影响

生长素 (毫克/升)	苗长势	瓶口包扎物	无根苗 数目 (株)	诱导生根 株 %
$\frac{1}{2}$ MS+IBA0.25	壮苗	硫酸纸+塑料薄膜	60	55 91.7
	细苗	棉花塞	60	12 20.0
$\frac{1}{2}$ MS+IBA0.50	壮苗	硫酸纸+塑料薄膜	60	50 83.3
	细苗	棉花塞	60	18 26.7

用50ppm IBA或NAA浸泡小苗基部4小时, 直接种植在营养杯中, 亦可促进根部生长和发育。

#### 四、幼苗移植

甜茶组培苗较幼嫩，从培养瓶移入土壤栽培环境条件发生急剧的变化，如不加以注意不易成活。在生根培养基，培养五周左右，多数小苗已形成根系，在室温自然光下开口炼苗两天，取出幼苗，洗净粘附在根部的培养基，立即栽植于营养杯中，培养土用草皮泥2份和粗砂1份混合，移植后用玻璃瓶或塑料薄膜覆盖一周，并控制水分的供应，待幼苗长出新叶后揭开，继续培养2—3周，将幼苗移植于苗圃，按一般管理，让幼苗在自然条件下生长，幼苗移植获得成活，壮苗成活率高达90%以上，幼苗生长良好（见图4），移植半年平均株高达72.1厘米，茎粗0.42厘米，叶片20.3枚，叶较大，长5—10厘米，宽6—10厘米，掌状7深裂，开始分枝；而细弱苗移植难以成活。

根据多次移植试验结果表明，培育壮苗是移植成活的基础，幼苗锻炼和控制水分供应是移植成活的关键。

#### 参 考 文 献

- [1] 徐位坤等, 1981: 甜茶的成分研究, 广西植物, 1(4): 16  
 [2] Murashige, F. and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.  
 [3] Skoog, F. and Miller, C. O., 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 118-130.

## STUDIES ON TISSUE CULTURE OF RUBUS SUAVISSIMUS

Lin Rong, Wang Run-zhen and Wang Xiu-qin

(Guangxi Institute of Botany)

**ABSTRACT** The stem explants and the seedlings of *Rubus Suavissimus* were grown on MS basal medium, the effects of plant hormones on organogenesis were studied. The results showed that BA markedly stimulated the bud formation and proliferation in concentration ranging from 0.5 to 2.0 mg/l, but there was no bud formation in control treatment (MS basal medium). Cytokinin was necessary for bud initiation. In using the combination of BA 0.5—2.0 mg/l and GA<sub>3</sub> 1.0 mg/l, the efficiency of bud formation and proliferation of the stem explants was decreased, but the shoot was taller and young leaf was growing well. Through subculture numerous plantlets could be propagated. It suggests that the possibility of numerous plantlets could be secured from a single explant. When the shoots were transferred into ½ MS basal medium with 0.25—0.50mg/l IBA, they developed into whole plantlets with root systems. Transplanting of test-tube plantlets in the soil was succeeded and plants were grown well.

**Key words** *Rubus suavissimus*; Plant tissue culture; Plant hormone; Organogenesis

