

桂花离体胚的组织培养

刘友全,梁茂厂,陈跃华

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院,湖南 长沙 410004)

摘要: 为给桂花的良种快繁奠定基础,采用不同培养基和激素对金桂胚的组织培养进行了初步研究。在胚苗培养中,进行了胚的初代萌发诱导培养、胚苗的伸长培养和生根培养,其最佳培养基配方分别为:MS+(1.00~2.00) mg·L⁻¹ 6-BA+(0.00~0.05) mg·L⁻¹ NAA; B5+2.00 mg·L⁻¹ GA; 1/2MS+3.00 mg·L⁻¹ NAA。还进行了胚的愈伤组织初代诱导培养和胚苗茎段初代萌发诱导培养,其最佳培养基配方分别为:LMC+(0.12~0.30) mg·L⁻¹ 2,4-D; B5+1.00 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA。

关键词: 金桂; 胚; 萌发诱导; 伸长培养

中图分类号: S685.13

文献标识码: A

文章编号: 1003-8981(2008)02-0012-05

Embryo Culture of *Osmanthus Fragrans* Lour. in Vitro

LIU You-quan, LIANG Mao-chang, CHEN Yue-hua

(College of Life Science and Technology, Central South University
of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: In order to lay a foundation for fine varieties rapid propagation, embryo culture of *Osmanthus fragrans* Lour. was researched by using different media and hormones. Primary germinating induction culture, embryo seedlings elongation culture and rooting culture were carried out. The optimum culture medium for primary germinating induction culture was MS supplemented with 1.00~2.00 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.00~0.05 mg·L⁻¹ NAA; the one for embryo seedlings elongation culture was B5 supplemented with 2.00 mg·L⁻¹ GA; the one for rooting culture was 1/2 MS supplemented with 3.00 mg·L⁻¹ NAA. Primary callus induction and primary bud germination culture were carried out. The optimum culture medium for primary callus induction was LMC supplemented with 0.12~0.30 mg·L⁻¹ 2,4-D; the one for primary bud germination culture was B5 supplemented with 1.00 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.05 mg·L⁻¹ NAA.

Key words: *Osmanthus fragrans* Lour.; embryo; germinating induction; elongation culture

桂花 *Osmanthus fragrans* Lour. 为木犀科木犀属植物,原产于我国,属我国十大传统名花之一^[1],其栽培历史悠久,也是我国重要的观赏及经济树种之一。其果实为核果,幼果呈绿色,成熟果实呈紫色;种子成熟后,其胚需经生理后熟,种子休眠,到第2年才能萌发。通过组织培养可以打破种子休眠,使胚提前萌发。然而,目前国内外关于桂花组织培养的研究报道却很少^[2],因此,笔者对桂花胚的组织培养进行了初步研究,以期为进一步的良种快繁奠定基础。

1 实验目的、材料与方法

实验材料取自中南林业科技大学校园内生长健壮的成年桂花植株。2007年2月选取未成熟的金桂果实,去除外果皮后用自来水冲洗1~2 h,以75%的酒精浸泡1~2 min,用无菌水漂洗3次,转入0.1%的升汞溶液中灭菌,时间为2~12 min,用无菌水漂洗5~6次。

将已灭菌的幼胚接种到培养基上,进行胚的萌发诱导、伸长培养、生根培养和胚的愈伤组织诱导培养;利用

收稿日期: 2007-10-09

作者简介: 刘友全(1946—),男,四川营山人。教授,博士生导师,主要从事林木遗传育种和生物技术方面的教学和科研工作。

胚苗茎段进行茎段初代萌发培养。

实验选用 B5、MS、LMC 三种培养基,蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[3],培养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光培养中每天光照 14 h,光照强度为 $1\,500 \sim 2\,000 \text{ lx}$ ^[4,5]

采用数学分析——隶属函数法^[6]计算隶属值,增殖系数=增殖的芽数/接种的芽数^[7],生长系数=总生长量/接种时茎段长度^[7],增殖度=增殖系数×生长系数^[7]。

2 结果与分析

2.1 胚的萌发诱导培养

2.1.1 基本培养基的种类对胚萌发的影响

各培养基中激素 6-BA 和 NAA 的不同浓度的组合设计如表 1。于 2 月下旬接种,先进行 4 d 的暗培养,然后转入光培养,第 45 天后统计生长情况。各培养基上幼胚的萌发情况分别见表 2~4。根据表 2~4 的 6 个指标值,可比较不同培养基上胚萌发的隶属值,比较结果见表 5。运用隶属函数来比较三种培养基对幼胚苗单株株形生长状况的影响,比较表 5 的平均隶属值后发现,MS 培养基是促使幼胚苗单株株形正常生长(见图 1a)的最佳培养基。

表 1 6-BA 和 NAA 的不同浓度组合设计
Table 1 Different concentration combinations between 6-BA and NAA

实验处理 Treatment	NAA 浓度 NAA concentration /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	6-BA 浓度 6-BA concentration /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	0.20	1.50
2	0.05	3.00
3	0.00	1.00
4	0.20	2.50
5	0.05	0.50
6	0.00	2.00

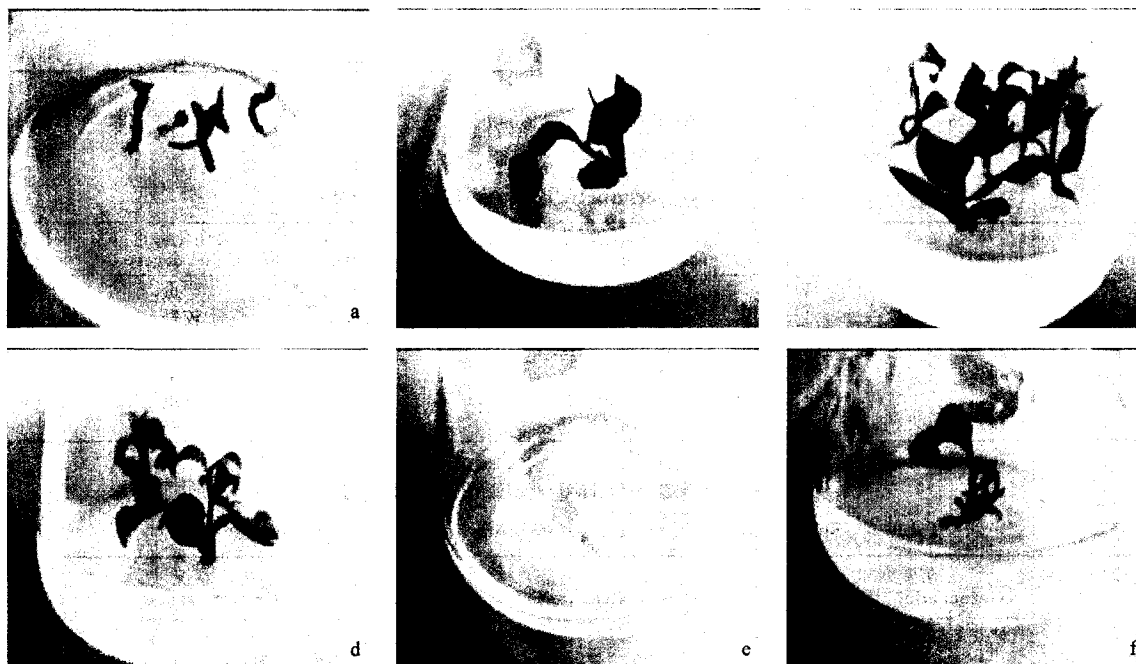


图 a 为 MS 培养基上胚的萌发状况;图 b~d 为不同浓度的 6-BA 和 GA 组合中胚苗的伸长生长状态;图 e 为胚愈伤组织培养状态(培养基配方为 LMC+ $0.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D);图 f 为胚苗茎段初代萌发培养状态(其培养基配方为: B5+ $3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA)。

a. Embryo germinating in MS medium; b-d. Young plant elongating growth status in different concentrations of 6-BA and GA; e. Callus culture growth status, and LMC supplemented with $0.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D; f. Primary germinating culture of young plant stem, and B5 supplemented with $3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA.

图 1 金桂胚组织培养结果

Fig. 1 Result of embryo culture in *O. fragrans*

2.1.2 不同浓度 6-BA 与 NAA 的激素组合对胚萌发的影响

实验选用 MS 培养基,激素组合见表 1,培养条件同上,胚的萌发统计结果见表 4。比较分析表 4 中各项实验结果后发现,实验处理 2、3、6 的胚萌发生长状况较好,第 5 天胚萌发变绿^[8]。实验中发现,NAA 含量越高,茎基部愈伤化越严重,越不利于茎的伸长,子叶不生长或者能生长却易形成畸形叶。若 6-BA 含量太低,则容易造成幼胚萌发率不高;若 6-BA 含量较高,则易形成畸形叶。所以,桂花幼胚最佳培养基配方为:MS+(1.00~

2.00) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + (0~0.05) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

表 2 B5 培养基上胚的萌发情况[†]

Table 2 Embryo germinating status in B5 medium

实验处理 Treatment	萌发率 Germinating ratio/%	平均叶长 Mean leaf length/cm	平均叶宽 Mean leaf width/cm	平均茎高 Mean stem height/cm	愈伤化程度 Calus degree	生长状况 Growth status
1	92.31	0.96	0.24	0.78	严重	++++
2	50.00	1.28	0.36	1.18	很轻	++
3	100.00	1.26	0.21	0.69	无	++
4	80.00	1.21	0.23	0.25	无	++
5	100.00	1.55	0.48	0.26	较重	+++
6	100.00	1.26	0.23	0.31	无	+++

[†] “++++”表示生长很好,“+++”表示生长较好,“++”表示生长一般。表 4 与此相同。
“++++” shows better growth status. “+++” shows good growth status, “++” shows general growth status. The same is in table 4.

表 3 LMC 培养基上胚的萌发情况[†]

Table 3 Embryo germinating status in LMC medium

实验处理 Treatment	萌发率 Germinating ratio/%	平均叶长 Mean leaf length/cm	平均叶宽 Mean leaf width/cm	平均茎高 Mean stem height/cm	愈伤化程度 Calus degree	生长状况 Growth status
1	100.00	1.25	0.25	0.15	较重	+
2	75.00	1.05	0.26	0.67	较轻	++
3	57.14	1.02	0.21	0.12	较轻	++
4	75.00	1.03	0.23	0.24	较重	+
5	55.56	1.26	0.25	0.21	较重	++
6	90.00	1.13	0.23	0.87	无	++

[†] “++”表示生长一般,“+”表示生长较差。
“++” shows general growth status, “+” shows bad growth status.

表 4 MS 培养基上胚的萌发情况

Table 4 Embryo germinating status in MS medium

实验处理 Treatment	萌发率 Germinating ratio/%	平均叶长 Mean leaf length/cm	平均叶宽 Mean leaf width/cm	平均茎高 Mean stem height/cm	愈伤化程度 Calus degree	生长状况 Growth status
1	91.67	1.23	0.37	1.06	严重	+++
2	88.91	1.35	0.38	1.17	较轻	++++
3	81.82	1.28	0.27	1.08	无	++++
4	41.67	0.66	0.22	0.63	较重	+++
5	70.00	1.43	0.27	0.37	较重	++++
6	81.82	1.24	0.29	1.17	较轻	++++

表 5 不同培养基上胚萌发的隶属值的比较结果

Table 5 Subjection value of embryo germination in different media

培养基种类 Media	萌发率 Germinating ratio/%	叶长 Leaf length/cm	叶宽 Leaf width/cm	茎高 Stem height/cm	生长状况 Growth status	平均值 Mean
B5	0.74	0.29	0.08	0.35	0.42	0.38
MS	0.69	0.70	0.50	0.68	0.75	0.66
LMC	0.45	0.43	0.57	0.34	0.67	0.49

2.2 幼胚苗的伸长增殖培养

长期以来,根据培养的物种、组织、目的的不同,人们已设计了许多种基本培养基^[9],不同的培养目的需要选择合适的基本培养基^[10]。

在 MS 培养基上进行胚的萌发诱导,胚经初代培养 20 天后基本停止生长,幼胚苗一般只有两片叶,生长缓慢。袁王俊^[11]指出,B5 培养基中试管苗的生长较快,MS 培养基中试管苗的生长相对较慢。因此,在胚苗伸长培养中选用 B5 培养基,激素为 6-BA、GA,30 天后统计苗的生长状况,结果见表 6。实验中发现,仅加 GA 时,幼胚苗伸长生长的效果非常明显;加入 6-BA 对胚苗的伸长生长并没有起到非常显著的作用(见图 1 中的 b~d)。统计结果可知,第 2 个处理为该组合中诱导幼胚苗伸长增殖培养的最佳配方,即 B5 + 2.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA。

2.3 幼胚苗的生根培养

王彩云等人^[12]认为,1/2MS + 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 是桂花生根培养的最佳培养基配方。实验选用了 1/2MS 培养基,激素 NAA、IBA 对桂花生根培养的影响的实验结果见表 7。实验中发现,幼胚

苗初代萌发培养中,胚根萌发形成根,同时茎基部可能会有愈伤组织出现,NAA能使幼苗基部的愈伤组织分化生出新根,因而增生的新根数目较多。而IBA不能使幼苗基部的愈伤组织分化生出新根,其浓度高时反而会使愈伤组织褐化,因而增生的新根数目较少。由表7可知,最佳生根培养基为:1/2MS+3.00 mg·L⁻¹ NAA。

表6 不同浓度的6-BA和GA激素对幼胚苗伸长培养的影响结果

Table 6 Effects of different concentrations of 6-BA and GA on elongation culture

实验处理 Treatment	6-BA 浓度 6-BA concentration/(mg·L ⁻¹)	GA 浓度 GA concentration/(mg·L ⁻¹)	新增叶片数 Number of new leaves	新增节数 Number of new nodes	生长量 Increment/cm
1	0.00	1.00	4.60	2.00	0.94
2	0.00	2.00	6.00	2.38	1.39
3	1.00	1.00	4.75	2.00	1.08
4	1.00	2.00	3.67	2.17	1.33
5	2.00	1.00	4.63	2.13	1.04
6	2.00	2.00	5.00	2.40	0.90

表7 幼胚苗生根培养的实验结果

Table 7 Result of young embryo plant rooting culture

NAA 浓度 NAA concentration/(mg·L ⁻¹)	IBA 浓度 IBA concentration/(mg·L ⁻¹)	平均根长 Mean root length/cm	平均新生根数 Mean number of new roots
2.00	0.00	2.01	1.77
3.00	0.00	2.70	3.33
0.00	2.00	1.56	1.01
0.00	3.00	3.06	1.01

2.4 胚的愈伤组织初代诱导培养

实验采用B5、MS、LMC三种培养基,选择2,4-D和6-BA两种激素,运用L9(3⁴)正交实验设计,先进行45 d暗培养,然后转入光培养。愈伤组织一般生于子叶叶基背面或胚根部位,浅黄白色,质地致密^[13](见图1中的e)。第60天统计愈伤组织形成情况。

桂花胚愈伤组织诱导的实验结果见表8。由表8可知,实验处理4、9不仅愈伤组织诱导率高,而且愈伤组织生长状况好。由极差比较结果可知,2,4-D的效应最为显著,对实验结果的影响最大;培养基种类对实验结果的影响效应居于其次;6-BA对实验结果的影响最小。由均值比较结果可知,2,4-D浓度在0.12~0.30 mg·L⁻¹时均有利于愈伤组织的诱导,培养基种类中B5和LMC是较合适的培养基。鉴于经济因素考虑,胚的愈伤组织诱导的最佳配方为:LMC+(0.12~0.30) mg·L⁻¹ 2,4-D。

表8 桂花胚愈伤组织诱导的实验结果[†]

Table 8 Result of embryo callus induction

实验处理 Treatment	2,4-D 浓度 2,4-D concentration/(mg·L ⁻¹)	6-BA 浓度 6-BA concentration/(mg·L ⁻¹)	培养基种类 Media	愈伤组织诱导率 Induction rate/%	生长状况 Growth status
1	0.00	0.00	B5	40.00	—
2	0.00	1.50	LMC	11.77	—
3	0.00	3.00	MS	21.05	—
4	0.12	0.00	LMC	87.50	+++++
5	0.12	1.50	MS	41.67	—
6	0.12	3.00	B5	78.26	+
7	0.30	0.00	MS	31.25	+++++
8	0.30	1.50	B5	85.71	+++++
9	0.30	3.00	LMC	88.00	+++++
均值 Mean 1	24.27	52.92	67.99		
均值 Mean 2	69.14	46.38	62.42		
均值 Mean 3	68.32	62.44	31.32		
极差 Range	44.87	16.05	36.67		

[†] “+++++”表示愈伤组织生长最好,“++++”表示愈伤组织生长较好,“+”表示愈伤组织生长一般,“—”表示愈伤组织形成量很少。
“+++++” shows the best growth status, “++++” shows better growth status, “+” shows general growth status, “—” shows little callus formation.

2.5 胚苗茎段初代萌发诱导培养

将幼胚苗叶片切掉,取长约0.2 cm带节的幼嫩茎段,茎段选择顶芽或顶芽以下第1~2个节的位置。将茎段接种到诱导芽的培养基上。MS基本培养基不适用于桂花茎尖的组织培养,可能是桂花茎尖适合较低氮态氮的缘故,而B5培养基最适用于桂花茎尖的培养^[11]。

实验选用B5培养基,6.5 g·L⁻¹琼脂,pH值5.6。每天光培养14 h,第30天后观察新芽的诱导形成情况,

实验结果见表 9。实验中发现,幼嫩茎段在各处理中均能萌发诱导出新芽,芽的生长状况良好,尤其在第 5 个处理中,叶腋处也萌发诱导增生出新芽(见图 1 中的 f),提高了芽的繁殖系数,B5 培养基上茎段萌发诱导的最佳配方为:B5+3.00 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA。

表 9 幼胚苗幼嫩茎段初代萌发诱导的实验结果

Table 9 Result of initial germinating induction of tender stem from young embryo plant

实验处理 Treatment	6-BA 浓度 6-BA concentration /(mg·L ⁻¹)	NAA 浓度 NAA concentration /(mg·L ⁻¹)	增殖系数 Multiplication coefficient	生长系数 Growth coefficient	增殖度 Multiplication degree
1	1.00	0.05	1.00	1.08	2.08
2	1.00	0.10	1.20	1.75	2.10
3	2.00	0.05	1.17	1.54	1.80
4	2.00	0.10	1.40	1.43	2.00
5	3.00	0.05	1.57	2.08	3.27
6	3.00	0.10	1.00	2.00	2.00

3 讨 论

(1)在胚的初代萌发诱导培养中发现,NAA 含量高时容易在诱导形成的茎段基部生成绿色的愈伤组织,形成的愈伤组织会制约胚根的分化,同时会降低胚的萌发率^[14],且胚的萌发生长缓慢。关于生长素在培养基中的用量,多次实验结果均表明了其浓度不宜过高。

(2)激素是植物组织培养的关键物质,虽用量极少,但在植物组织培养中却起着重要和明显的调节作用^[15,16]。细胞分裂素促进细胞分裂和分化,生长素诱导愈伤组织的形成、胚状体的产生及试管苗的生根。桂花种子休眠的原因可能是胚体内存在某种抑制物,如 ABA 等,这抑制了胚的体内萌发,有关研究结果表明,6-BA 可以促进 ABA 的降解^[17,18]。本实验通过 6-BA 促使胚提前萌发,但组培苗生长速度缓慢,至于 6-BA 在自然状态下是否能解除桂花的休眠,还需要在以后的实验中进一步验证。

(3)以胚为外植体获得的胚性愈伤组织通过植株再生途径能否使愈伤组织分化出丛生芽,这是以后要进行的实验工作中的重要一步,愈伤组织诱导再生的植株对于园林观赏植物来说尤为重要^[19],是选育优良变异植株的重要途径,需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 宋会访,葛 红,王彩云,等.桂花离体培养与快速繁殖技术的初步研究[J].园艺学报,2005,32(4):738—740.
- [2] 陈俊愉.中国花卉品种分类学[M].北京:中国林业出版社,2001:198—206.
- [3] 梁称福.植物组织培养研究进展与应用概况[J].经济林研究,2005,23(4):99—105.
- [4] 曾艳玲,谭晓凤,乌云塔娜.梨不同杂交和自交组合幼胚组织培养的研究[J].中南林学院学报,2005,25(1):29—32.
- [5] 苏冬梅,罗丽华,杨定海.板栗愈伤组织的诱导[J].经济林研究,2004,22(3):17—19.
- [6] 袁志发,周静芊.多元统计分析[M].北京:科学出版社,1993.
- [7] 李春秀,石大兴,王米力.丽格海棠组织培养外植体再生体系建立关键技术研究[J].四川农业大学学报,2002,20(4):330—333.
- [8] 冯金玲,陈 辉,陈世品,等.锥栗成熟胚离体培养初报[J].经济林研究,2004,22(3):29—31.
- [9] 杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987.
- [10] 王红梅,续九如.枣树离体培养研究进展[J].河北林果研究,2003,18(4):375—381.
- [11] 袁王俊.桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)组织培养的研究[D].开封:河南大学生命科学学院,2005.
- [12] 王彩云,白吉刚.桂花的组织培养[J].北京林业大学学报,2001,23(1):24—25.
- [13] 金晓玲,何 平.大叶桉愈伤组织诱导与继代培养的影响因素[J].中南林学院学报,2003,23(1):32—36.
- [14] 袁王俊,董美芳,尚富德.桂花胚的离体培养[D].开封:河南大学生命科学学院,2005.
- [15] 刘天颐,陈炳铨,陈锡沐.激素对沙漠玫瑰愈伤组织培养的影响[J].经济林研究,2004,22(1):25—28.
- [16] 张红晓,康向阳,沈 燕,等.白刺组培快繁的研究[J].经济林研究,2003,21(4):60—63.
- [17] 谷晓峰,唐仙英,罗正荣.罗田甜柿幼胚培养条件的研究[J].果树学报,2001,18(2):80—83.
- [18] 赵淑清,郭剑波,常留印.植物生长调节剂对离体培养早熟杏胚休眠的破除[J].果树学报,2001,18(2):84—86.
- [19] 宋会访.桂花组织培养技术体系的研究[D].武汉:华中农业大学,2004.

[本文编校:伍敏涛]