

桂花胚的离体培养

袁王俊 董美芳 尚富德*

(河南大学生命科学学院, 开封 475001)

摘要: 以不同发育时期的桂花胚为试材, 研究了不同生长调节剂组合、基本培养基、光照时间、蔗糖浓度对离体胚萌发, 以及不同培养基对萌发幼苗生根的影响。结果表明: 诱导胚萌发较理想的培养基为 $B_5 + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 3\% \sim 5\%$, 光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$; 生根较合适的培养基为 $B_5 + \text{BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 3\%$ 。

关键词: 桂花; 胚; 离体培养; 萌发; 生根

中图分类号: S 685.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1136-04

In Vitro Culture of Embryo of *Osmanthus fragrans*

Yuan Wangjun, Dong Meifang, and Shang Fude*

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: Factors which affect germination of different stage embryos of *Osmanthus fragrans* Lour and rooting were studied. Results showed that the optimum medium for embryo culture was $B_5 + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 3\% \text{ sucrose}$, light were $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$. The optimum medium on rooting was $B_5 + \text{BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{sucrose } 3\%$.

Key words: *Osmanthus fragrans*; Embryo; In vitro culture; Germination; Rooting

1 目的、材料与方法

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour) 又名木犀。目前我国有 4 个品种群, 100 多个品种, 每个品种群都有优、缺点, 而综合性状优良的品种较少, 选育综合各个品种群优点的优良品种是桂花育种的目标之一。桂花种子有后熟作用^[1,2], 采收后需要在湿润条件下保存到第 2 年才能萌发, 如贮藏不当, 在贮藏的过程中腐烂率高达 50% 以上, 成为桂花杂交育种的限制条件之一。为了缩短育种年限和提高萌发率, 我们进行了桂花胚离体培养条件的研究, 希望能为杂交育种提供技术支持。

试材取自河南大学校园内栽培的桂花树, 品种为籽银桂。分别于球形胚期、鱼雷胚期、胚形态成熟期采种。胚形态成熟期又分为: 胚乳尚未硬化、胚乳硬化、果皮发紫 3 个时期。

果实采收后, 首先用自来水冲洗干净, 去掉肉质的外果皮和中果皮, 沥干水分, 在超净工作台上用 75% 的酒精消毒 1 min, 然后用 0.1% 的升汞消毒 10 min, 最后用无菌水冲洗 6~8 遍, 剥取胚, 接种在诱导培养基上。每瓶接种 5 个, 3 瓶为 1 个处理, 每个处理设 3 次重复。培养温度 (25 ± 1), 光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 或全黑暗, 光照强度 $1500 \sim 2000 \text{ lx}$ 。每天观察胚的动态变化, 45 d 时统计萌发率, 进行方差分析。待苗高达 2 cm 以上时转入生根培养基中生根。

诱导培养基: 基本培养基分别是 MS、 B_5 、DCR; 植物生长调节剂为不同浓度的 6-BA 和 NAA 的组合。生根培养基: B_5 和不同浓度 NAA 或 BA 的组合。

2 结果与分析

收稿日期: 2004-11-22; 修回日期: 2005-01-16

基金项目: 河南省高等学校创新人才基金项目; 河南省自然科学基金项目 (0311031400); 河南省高校优秀中青年骨干教师基金项目 (G2002009)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fudeshang@henu.edu.cn)

2.1 不同生长调节剂对桂花胚离体萌发的影响

添加不同浓度 6-BA 与 NAA 对桂花胚进行培养 45 d, 结果如表 1 所示: 桂花胚在不含 6-BA 的培养基上不能萌发。6-BA 能促进桂花胚的萌发, 显著提高萌发率。NAA 对胚的生长也有一定的作用。NAA 浓度不宜大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA 浓度以 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。6-BA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萌发率非常低, 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萌发率虽较高但生长不良。6-BA 浓度大于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 浓度大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 茎的生长受到抑制, 愈伤化严重, 成苗率下降。6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胚的诱导, 萌发率达到 86.7%, 生长健壮 (图 1, A, B)。桂花种子休眠的原因可能是其胚内存在某种抑制物, 如 ABA 等。而细胞分裂素可以解除这种抑制, 促使其提前萌发。

表 1 6-BA 和 NAA 对桂花胚离体萌发的影响

Table 1 The effect of 6-BA, NAA on the gemination of embryo of *O. fragrans*

序号 Code	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	萌发率 nation rate (%)	试管苗长势 Way plantlet growing
1	0	0	0a	
2	0	1.0	0a	
3	0	2.0	0a	
4	0.5	0.1	31.1b	+
5	1.0	0.1	80.0c	++
6	2.0	0.1	86.7c	++++
7	2.0	0.5	20.0b	+
8	3.0	0.1	26.7b	+

注: 培养基 $B_5 + 3\%$ 蔗糖; 光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$; 取材时期 04 - 20。不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著, 下表同。

Note: Media being $B_5 + 3\%$ sucrose; Light $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$; Date 04 - 20. The different small letters indicate the significance at 5% level, the same below.



图 1 桂花胚的离体培养

A. 变绿的胚; B. 胚萌发的幼苗; C、D. 生根的诱导苗。

Fig 1 In vitro culture of embryos of *Osmanthus fragrans*

A. Embryos turning green; B. Plantlets derived from embryos; C and D. Plantlets with roots

2.2 果实不同发育时期对离体胚萌发的影响

取不同发育时期的胚进行离体培养成功率差异很大 (表 2)。球形期胚珠培养一段时间后胚珠发褐死亡。鱼雷期的胚仅发绿, 个体有所增大, 但生长点始终没有萌发, 这可能是营养条件不能满足此时期胚发育的要求。随着胚的进一步发育, 可以在离体条件下萌发, 胚乳硬化后萌发率达到最高点。果皮发紫后萌发率虽不能提高, 但生长速度明显提高, 幼苗长势也比较健壮。试验中还发现, 胚乳硬化后, 胚的剥离更加容易, 成功率更高。因此桂花胚的离体培养应该在胚乳硬化到种子完全成熟前进行。

2.3 不同基本培养基对桂花胚离体萌发的影响

本试验选用了3种不同的基本培养基 B₅、MS、DCR。MS培养基含有较高的钾盐和硝酸盐，B₅培养基钾盐含量较高，但硝酸盐含量较低，而DCR培养基的钾盐和硝酸盐都比较低。从表3可以看出，DCR培养基萌发率显然比B₅和MS低，B₅和MS培养基之间萌发率没有明显差异，但MS培养基诱导苗生长缓慢，说明桂花胚萌发过程中对钾盐需求较高，硝酸盐虽对萌发率没有影响，但影响胚的生长，含量过高，胚生长不良。综合考虑，较好的基本培养基为B₅。

2.4 不同蔗糖浓度对桂花胚离体萌发的影响

以胚乳硬化后的胚为材料，在B₅+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹基础上，添加不同浓度的蔗糖。结果表明：蔗糖3%和5%对胚萌发效果较好，萌发率分别为86.7%和82.2%，植株生长健壮，茎秆粗壮。培养基中不含蔗糖时胚不能萌发；但蔗糖浓度过高（7%），也使萌发率下降（24.4%），这可能是较高的蔗糖浓度引起培养基渗透压的改变，导致胚的萌发受到抑制^[3]。

2.5 不同光照条件对桂花胚离体萌发的影响

在以上研究的基础上，以胚乳硬化后的胚为材料，研究光照条件对胚萌发的影响，发现光照是桂花胚离体萌发的必需条件。将材料置于全黑暗条件下30d，胚虽有一定的生长，但始终没有生长点出现。在12h·d⁻¹光照条件下，5d后胚开始变绿和增大，20d左右开始萌发，萌发率86.7%，生长健壮。全黑暗条件下30d后，置于12h·d⁻¹光照下，胚也能很快萌发，萌发率84.4%，但节间较长，生长稍弱。

2.6 生根培养基的筛选

当胚诱导的无菌苗长度超过2cm时，带胚根或切去胚根转入生根培养基进行生根培养（表4）。

结果显示，切去胚根不利于根的诱导，而带有胚根则根的诱导较为容易。试验中发现胚轴部位在萌发过程中会产生愈伤组织，如果切除胚轴以下部位，则会降低生根率，所以在操作时只剔除愈伤组织而不能切除胚根。带有胚根时，BA浓度为2.0mg·L⁻¹生根率最高，而且单株生根数也最多，根较粗壮。浓度较高时，没有根的生成。浓度较低或不加BA，生根率和单株生根数都显著降低。NAA 2.0mg·L⁻¹生根率较低。因此，B₅+BA 2.0mg·L⁻¹最适合桂花胚苗的生根培养（图1，C、D）。

在试验中发现，萌发后的胚苗只要加强管理成苗率可达100%。通过胚的离体培养，可以使桂花种子提前10个月萌发，解决了桂花种子需要长期贮藏、发芽晚和贮藏期间腐烂的问题。

表2 不同取材时期对桂花离体胚萌发的影响

Table 2 The effect of stage to fetch material on the germination of embryo of *O. fragrans*

时期 Date (M-D)	胚胎发育期 Stage of embryo	萌发率 Germination rate (%)	试管苗长势 Way plantlet growing
12-01	球形胚 Global embryo	0a	
03-25	鱼雷形胚 Topedo embryo	0a	
04-08	胚乳未硬化 Unsclerotic endospem	42.2b	++
04-20	胚乳硬化 Sclerotic endospem	86.7c	++++
04-26	果皮发紫 Purple pericarp	88.9c	++++

注：培养基 B₅+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹；光照 12 h·d⁻¹。

Note: Media being B₅+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹; Light 12 h·d⁻¹.

表3 不同基本培养基对桂花离体胚萌发的影响

Table 3 The effect of basic media on the germination of embryo of *O. fragrans*

基本培养基 Basic media	萌发率 Germination rate (%)	试管苗长势 Way plantlet growing
MS	82.2a	+++
B ₅	86.7a	++++
DCR	42.2b	++

注：6-BA 2.0 mg·L⁻¹，NAA 0.1 mg·L⁻¹，3%蔗糖；光照 12 h·d⁻¹；取材时期 04-20。

Note: 6-BA 2.0 mg·L⁻¹，NAA 0.1 mg·L⁻¹，3% sucrose; Light 12 h·d⁻¹; Date 04-20.

表4 不同培养基对桂花胚培养幼苗生根的影响

Table 4 The effects of different media on rooting of embryo of *O. fragrans*

	BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	生根率 Rooting rate (%)	生根条数 Number of rooting
无胚根 Without radicle	0	0	0a	0
	1.0	0	6.7b	1.00
	2.0	0	35.7c	1.00
	3.0	0	13.3b	1.00
带胚根 With radicle	0	0	24.4b	1.27
	1.0	0	46.7c	1.63
	2.0	0	71.1d	2.63
	3.0	0	0a	0
	0	1.1	30.8b	1.43
	0	2.0	35.6c	1.38

注：培养基 B₅+3%蔗糖；光照 12 h·d⁻¹。

Note: Media being B₅+3% sucrose; Light 12 h·d⁻¹.

参考文献:

- 1 杨康民, 朱文江. 桂花. 上海: 上海科学技术出版社, 2000. 1~50
Yang KM, Zhu W J. *Osmanthus fragrans*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2000. 1~50 (in Chinese)
- 2 尚富德, 伊艳杰, 张 彤. 河南 17 个桂花品种的 RAPD 分析. 园艺学报, 2004, 31 (5): 685~687
Shang FD, Yi Y J, Zhang T. The RAPD analysis of 17 *Osmanthus fragrans* cultivars in Henan province. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31 (5): 685~687 (in Chinese)
- 3 张国裕, 程智慧, 李 娟, 周文安, 王新华. 银条茎尖培养快繁及离体根状茎的诱导. 园艺学报, 2004, 31 (1): 106~108
Zhang G Y, Cheng Z H, Li J, Zhou W A, Wang X H. Studies on tip meristem culture rapid propagation and induction of in vitro stolon of many flower betony (*Stachys floridana* Schuttl. ex Benth.). *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31 (1): 106~108 (in Chinese)

南京不同类型梅花品种香气成分的比较研究

金荷仙^{1,2} 陈俊愉^{3*} 金幼菊⁴ (¹中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; ²浙江林学院园林与艺术学院, 临安 311300; ³北京林业大学园林学院, 北京 100083; ⁴北京林业大学生物中心, 北京 100083)

Comparison of Different Cultivars of *Prunus mume*'s Major Gas Ingredients

Jin Hexian^{1,2}, Chen Junyu^{3*}, and Jin Youju⁴ (¹Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ²School of Landscape Architecture, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, China; ³College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ⁴Biology Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

关键词: 梅花; 动态顶空套袋采集法; 挥发性物质

中图分类号: S 685.17 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 06-1139-01

1 材料与方法 采用活体植株动态顶空套袋采集法和 TCT/GC/MS (热脱附/气相色谱/质谱联用) 技术分析南京梅花山真梅种系直枝梅类宫粉型 '玉露宫粉'、玉蝶型 '宇治里'、黄香型 '黄金鹤'、朱砂型 '姬千鸟'、绿萼型 '变绿萼'、洒金型 '复瓣晚跳' 及垂枝梅类白碧垂枝型 '双碧垂枝' 的香气组成。2002 年 3 月 5 日采样, 将采样后的吸附管套上聚四氟乙烯套, 放在干燥器中低温保存。样品分析时间为 2002 年 4 月 27 日。同时采集和分析空气作对照。采用 Xcalibur 1.2 版本软件及 NIST98 谱图库进行梅花香气成分的检索, 兼顾挥发物出峰的保留时间鉴定。其含量比较采用归一化法, 以百分含量表示。热脱附 (TCT) 的主要条件: 载气压力 20 kPa; 色谱进样口温度 250 (10 min); 冷阱富集温度 -120, 进样时冷阱骤然升温至 260; GC 的工作条件: 色谱条件为 CP-Sil8 Low Bleed/MS 柱 (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 程序升温: 40 保持 3 min 后, 以 6 /min 速率升至 250, 再保持 3 min; 停止采集后, 色谱柱在 270 继续运行 5 min; MS 的工作条件: 离子化方式 E 源; 电子能量 70 eV; 质量范围: m/z 29~350; GC/MS 接口温度: 250; 源温: 200, 灯丝发射电流: 150 μA。

2 结果 表 1 为扣除空气后的数据, 表明乙酸苯甲酯与 -蒎烯、-蒎烯、3-萜烯等一起以不同的配比构成了梅花香气的主要成分。朱砂型梅花的香气较淡, 由此可推测, 乙酸苯甲酯可能是影响梅花香气浓淡的关键化学成分, 其含量可以作为梅花香气浓淡的主要标志, 按香气浓淡依次为玉蝶型、绿萼型、垂枝梅类白碧垂枝型、洒金型、宫粉型、黄香型、朱砂型。

鉴于野外采集挥发物的条件所限, 本研究未在同一时段对不同品种梅花的挥发物进行采集。因此, 本试验结果有待进一步验证。

表 1 南京不同类型梅花品种主要香气成分比较

Table 1 Comparison of major volatile components from different cultivars of *Prunus mume* in Nanjing (%)

品种 Cultivar	-蒎烯 pinene	苯甲醛 Benzaldehyde	-蒎烯 pinene	1,3,8-对孟 三烯 1,3,8-p- menthatriene	3-萜烯 3-carene	2-壬烯- 1-醇 2-nonen- 1-ol [E]-	庚基过氧化氢 Hydroperoxide heptyl	乙酸苯甲酯 Acetic acid, phenylmethyl ester
玉露宫粉 Yulu Gongfen	23.78	0.38	17.96	ND	21.34	0.23	0.06	35.46
宇治里 Yu Zhi Li	ND	0.49	ND	ND	ND	ND	1.39	98.12
黄金鹤 Huangjin He	43.54	ND	27.31	24.51	ND	0.59	0.11	20.79
姬千鸟 Ji Qianniao	33.44	ND	29.53	0.04	35.62	ND	ND	ND
变绿萼 Bian L üe	0.86	2.10	1.58	1.44	ND	1.49	0.09	89.87
复瓣晚跳 Fuban Wantiao	18.17	0.33	1.58	12.29	16.90	0.76	0.17	49.94
双碧垂枝 Shuangbi Chuizhi	10.44	1.00	8.50	ND	9.93	0.48	ND	68.14

注: "ND" 表示未检出。Note: ND: not detected

收稿日期: 2005-03-14; 修回日期: 2005-08-09

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (6012009)

* 通讯作者 Author for correspondence