

桂花离体培养与快速繁殖技术的初步研究

宋会访^{1*} 葛红² 周媛¹ 王彩云^{1**}

(¹ 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; ² 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 胚和新梢茎段为外植体进行了离体培养与快速繁殖研究, 筛选出最适培养基——(1) 胚萌发: MS+BA 1.00 mg·L⁻¹+蔗糖 3%; (2) 新梢茎段启动培养: LMc+KT 8.00 mg·L⁻¹+NAA 0.10 mg·L⁻¹+蔗糖 3%; (3) 继代增殖培养: LMc+TDZ 0.50 mg·L⁻¹+NAA 0.10 mg·L⁻¹+蔗糖 3%; (4) 生根培养: 1/2MS+NAA 2.00 mg·L⁻¹+蔗糖 3%。采用腐殖质土为栽培基质, 移栽成活率可达 80%以上。

关键词: 桂花; 离体培养; 快速繁殖

中图分类号: S 685.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 04-0738-03

Primary Study on in Vitro Culture and Micropropagation of Sweet Osmanthus

Song Huifang^{1*}, Ge Hong², Zhou Yuan¹, and Wang Caiyun^{1**}

(¹ College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ² Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Using the embryo, stem-segment of new shoots as the explants, in vitro culture and high frequency propagation of sweet osmanthus were studied. The results showed that the optimizing media for various stages were as follows: (1) Initial medium for embryo: MS+BA 1.00 mg·L⁻¹+3% sucrose; (2) Initial medium of stem-segment for new shoots: LMc+KT 8.00 mg·L⁻¹+NAA 0.10 mg·L⁻¹+3% sucrose; (3) Clump shoot regeneration medium: LMc+TDZ 0.50 mg·L⁻¹+NAA 0.10 mg·L⁻¹+3% sucrose; (4) Rooting medium: 1/2 MS+NAA 2.00 mg·L⁻¹+3% sucrose. Using humus soil as culture substrate, the survival percentage of plantlets could reach 80%.

Key words: Sweet osmanthus; In vitro culture; Rapid propagation

1 目的、材料与方法

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 是中国传统十大名花之一^[1]。前人对桂花组织培养的系统研究报道^[2]极少。本研究对桂花离体培养与快速繁殖的适宜培养基进行了筛选, 为进一步建立遗传再生体系和工厂化育苗提供了良好的技术支撑。

试材取自华中农业大学校园内生长健壮的金桂 (*Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* Mak) 植株。2003年 2月和 4月分别取其种子 (先去除果肉、种皮) 和成年植株的新梢茎段, 用自来水冲洗 1~2 h, 75%酒精浸泡 30 s, 转入 0.1%升汞溶液中灭菌, 时间分别为 3 min和 10 min, 用无菌水冲洗 5~6次。将已灭菌的茎段、子叶尚未萌发的幼胚接种到启动培养基上。当启动成功后, 将获得的无菌苗切成 0.5~1 cm带腋芽茎段, 转入继代培养使其增殖。将无根试管苗转入生根培养基中培养, 获得完整植株。生根试管苗长至 3~4 cm时炼苗, 移栽到腐殖土中。

诱导胚萌发的基本培养基为 MS, 新梢茎段启动培养的基本培养基为 LMc (Lloyd and McCown), 增殖与生根的基本培养基为 LMc和 1/2MS, 附加不同浓度的 BA、NAA及 TDZ (thidiazuron, N-苯基-N'-1, 2, 3-噁重氮-5-基脲, N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea), 琼脂 0.8%, pH 5.8。培

收稿日期: 2004-09-28; 修回日期: 2004-11-15

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2001AA241201)

*现工作单位: 武汉工程大学, 430070; **通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangcy@mail.hzau.edu.cn)

养温度 (26 ± 2) ; 光照 14 h/d, 光强 3 000 lx。每处理接种 30个外植体, 3次重复。

2 结果与分析

2.1 胚萌发培养基的筛选

以 MS为基本培养基, 配合不同浓度的 BA和 NAA, 双因子随机区组试验设计, 共 12个组合。结果表明, 15 d后, 12种培养基均可诱导种胚发芽, 但发芽率与长势存在较大差异。BA和 NAA对胚萌发有极显著的影响 ($P < 0.001$), 多重比较结果表明 (表 1): BA为 0时发芽率最低, 且长势最弱, 与其它 3个水平达到极显著差异, 说明不加入 BA不利于胚萌发。BA为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时发芽率最高, BA为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时虽然萌芽率没达到显著差异水平, 但生长势最好。随着 NAA浓度的升高, 萌芽率呈下降趋势, 长势也随之变弱, 各水平间达到显著差异, 这表明 NAA的存在不利于胚发芽 (表 1)。因此, 筛选出适宜胚萌发的培养基为 MS+BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图版, 1)。

表 1 不同浓度 BA和 NAA对胚萌发的影响

Table 1 Influences of different concentrations of BA and NAA on the germination of embryo

BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	萌芽率 Germination ratio (%)	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	萌芽率 Germination ratio (%)
1.00	74.69aA	0	68.64aA
2.00	71.99aA	0.10	57.17bB
0.50	52.61bB	0.20	52.74cB
0	38.78cC		

表 2 不同浓度 KT、TDZ对新梢启动培养的影响

Table 2 Influences of different concentrations of KT and TDZ on initial culture of new growth

组合 Combination ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			萌芽率 Rate (%)	长势 The condition of plants growth
KT	TDZ	NAA		
4.0	0	0.1	47.67c	++
8.0	0	0.1	70.67a	++++
12.0	0	0.1	61.0ab	+++
0	0.5	0.1	57.67bc	++
0	1.0	0.1	35.67d	+

2.2 不同植物生长调节剂、不同浓度对新梢茎段启动培养的影响

以 LMc为基本培养基, NAA浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 配合不同浓度的 KT与 TDZ (表 2)。新梢茎段在接种后 15 d腋芽明显增大, 20 d真叶展开。30 d后统计萌芽率, 结果表明, KT $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对新梢茎段腋芽萌发效果理想, 茎切段在该培养基上萌芽快, 腋芽长而粗壮, 与 KT $12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 差异不显著, 但长势比其好, 与其它处理差异显著。由表 2可看出 KT诱导效果比 TDZ好。TDZ诱导的茎段切口处有大量黄绿色愈伤产生, 抑制了芽的萌发 (图版, 2); KT培养基中只有少量愈伤产生, 芽生长较快 (图版, 3)。

2.3 继代增殖培养

将长 3 cm的无菌苗剪成带腋芽小茎段, 转入增殖培养基 (表 3), 经过 30 d的培养, 腋芽萌发可形成 3~5个 $0.5 \sim 2 \text{ cm}$ 高的丛生芽。将其接种到 LMc+BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上使其节间数增加和植株伸长, 得到更多茎段。然后将茎段再转接到增殖培养基, 得到大量幼芽。结果显示 TDZ为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时株高、节间数、增殖系数都为最高 (图版, 4、5), 与其它处理差异显著, 萌芽率虽比 TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 稍低, 但与其差异不显著, 且后者易出现畸形, 表现为茎部增粗, 叶片变厚、变大, 节间紧凑, 生长缓慢 (图版, 6、7)。因而确定适宜增殖的培养基为 LMc+TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由表 3还可看出, TDZ的增殖效果好于 KT, 增殖率明显增高。

表 3 不同浓度 KT、TDZ对增殖培养的影响

Table 3 Influences of different concentrations of KT and TDZ on clump shoot regeneration

组合 Combination ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			萌芽率 Rate (%)	株高 Plant height (cm)	节间数 Intersegmental No.	增殖系数 Multiplication coefficient
KT	TDZ	NAA				
4.0	0	0.1	16.67e	0.50d	1.4c	1.4
8.0	0	0.1	36.67d	0.64d	1.8c	2.2
12.0	0	0.1	61.00bc	0.76cd	2.0c	3.0
0	0.15	0.1	57.33c	0.92c	2.8b	8.4
0	0.50	0.1	72.10ab	2.82a	4.2a	16.8
0	1.00	0.1	78.07a	1.34b	3.8a	11.4

注: 增殖系数是在外植体继代培养 60 d后统计, 增殖系数 = 增殖茎段数/原接种茎段数。

Note: Multiplication coefficient was investigated after subculture for 60 days. Multiplication coefficient = No. of multiplication stems/No. of inoculated stems.

2.4 生根培养

将长至 2.0 ~ 3.0 cm 高的芽, 单个转入生根培养基, 20 d 左右其切口周围出现黄白色愈伤组织的根状突起。30 d 后不定根陆续出现, 40 d 后统计生根率、根数和根长。试验采用三因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交设计, 结果表明, 1/2MS 培养基比 MS 和 LMc 培养基生根效果好, 生根率最高, 根多, 长而粗壮, 生根试管苗健壮。MS 培养基最差, 说明大量元素减半有利于生根。NAA 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生根效果最好, 与 NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 差异显著 (表 4)。BA 在试验范围内对生根差异不显著, 说明在生根培养中, BA 不起主要作用 (图版, 8)。

2.5 生根试管苗移栽

3 月份将生根培养 40 d 达到移栽标准的生根试管苗瓶口打开, 在培养室散射光下进行开口炼苗, 提高适应能力。5 d 后取出移栽。移栽基质为腐殖质土, 移栽前将基质浇透水, 移栽后 3 d 内用 1/2 LMc 营养液喷施。移栽后 1 ~ 3 周, 每天喷水 5 ~ 6 次。这一阶段为生根试管苗移栽后管理的重要时期, 空气相对湿度应保持在 60% ~ 80%, 避免直射光照射。移栽成活率可达 80% 以上。

本试验成功地建立了桂花快繁体系, 60 d 时增殖倍数就达到了 16.8; 胚培养解除了种子的休眠特性, 使种子不经生理后熟就可萌发, 这对桂花的规模化生产和推广具有重要的实践指导意义。

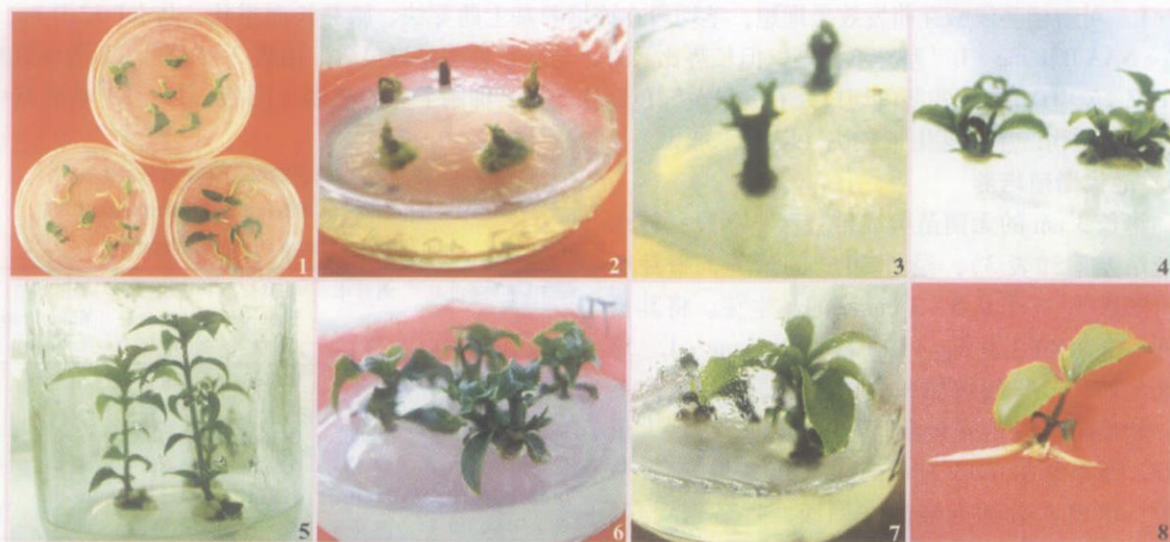
参考文献:

- 1 陈俊愉. 中国花卉品种分类学. 北京: 中国林业出版社, 2001. 198 ~ 206
Chen J Y. Chinese flower species taxonomy. Beijing: China Forestry Publishing House, 2001. 198 ~ 206 (in Chinese)
- 2 王彩云, 白吉刚. 桂花的组织培养. 北京林业大学学报, 2001, 23: 24 ~ 25
Wang C Y, Bai J G. Tissue culture of sweet osmanthus. Journal of Beijing Forestry University, 2001, 23: 24 ~ 25 (in Chinese)

表 4 不同培养基和不同浓度的 NAA 对生根率的影响

Table 4 Influences of different media and NAA concentrations on the rooting ratio

培养基 Media	生根率 Rooting ratio (%)	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根率 Rooting ratio (%)
1/2MS	62.86a	2.0	70.12a
1/2LMc	54.33ab	1.0	49.00b
MS	38.00b	0.5	36.07b



图版说明: 1. 胚萌发 (上面的培养基是 $\text{MS} + \text{BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 左下为 $\text{MS} + \text{BA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 右下为 $\text{MS} + \text{BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 2, 3. 茎段启动培养 (2 由 TDZ 诱导新梢茎段腋芽萌发, 3 由 KT 诱导新梢茎段腋芽萌发); 4 ~ 7. 增殖培养 (4 和 5 为 TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导的丛生芽及长成的植株, 6 和 7 为 TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导的丛生芽及长成的植株); 8. 生根苗。

Explanation of plates: 1. Embryo germination (The medium of upper is $\text{MS} + \text{BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the left-lower one is $\text{MS} + \text{BA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the right-lower one is $\text{MS} + \text{BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 2, 3. Initial in stems vitro culture (2 TDZ, 3. KT); 4 - 7. Multiplication culture (Clump shoots of Na 4 induced by TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Plants of 5 from adventitious buds induced by TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with medium made of $\text{MS} + \text{BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{GA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Na 6 and Na 7 induced by TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). 8. Rooting seedlings