

# 桂花子叶切块培养再生苗的研究

王珍华<sup>1</sup>, 庞基良<sup>1</sup>, 陈益红<sup>1</sup>, 丁旭升<sup>2</sup>, 沈柏春<sup>2</sup>, 陈伯翔<sup>2</sup>

(1. 杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036; 2. 杭州园林绿化工程有限公司, 浙江 杭州 310020)

**摘要:**以桂花品种大花金桂(*Osmanthus fragrans* 'Dahuaqingui')的子叶切块为外植体,研究了不同激素水平对桂花子叶切块愈伤组织诱导、芽分化和试管苗生根的影响。结果表明:诱导出的愈伤组织在分化培养基(1/2MS+0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA)上继代培养9次后分化不定芽,不定芽分化率为22.86%,平均再生苗数为3.22,继代培养10次后,不定芽分化率高达36%。进行生根试验,确定桂花最佳生根培养基为1/2MS+0.5 mg/L IBA+2.0 mg/L NAA,生根率达到70%。

**关键词:**桂花;子叶切块;离体培养;不定芽分化;TDZ

**中图分类号:**S 685.13 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)09-0126-03

桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)是木犀科木犀属的代表物种,也是我国十大名花之一,集绿化、美化、香化于一身,在园林绿化上广泛栽培。虽然桂花有诸多优点,但也存在许多不足,如桂花单朵花期极短,只有8~9 d,使其美化、香化功能受到了一定程度的影响;另外,桂花的叶色单一,还无彩叶的桂花品种;桂花的抗寒能力弱,长江以北难以栽培。如何培育出花期长、彩叶、抗寒能力强的桂花新品种是今后桂花育种中的长期课题。由于桂花是木本植物,它的童期较长,若采用常规的杂交育种方法,将很难达到目的,所以,需利用现代生物技术来培育桂花新品种。

目前,关于桂花组织培养的报道较少,主要集中在桂花茎段、茎尖和胚培养上。秦新民<sup>[1]</sup>用带嫩芽的幼嫩茎段成功诱导了桂花丛生芽的产生;袁王俊等<sup>[2]</sup>通过对不同时期取材外植体的培养,获得了最佳的取材时间和培养条件;宋会访等<sup>[3]</sup>通过对胚和新梢茎段的培养,确定了桂花离体培养与快速繁殖的最佳培养条件。袁王俊等<sup>[4]</sup>、刘有全等<sup>[5]</sup>分别以不同桂花品种的种子为材料进行离体萌发试验,明确了桂花种子的最佳萌发条件。由茎段、茎尖和胚培养产生的芽是由外植体上已存在的芽原基形成的,因而无法用这些再生体系进行桂花的遗传转化。该研究以桂花子叶切块为外植体进行组织培

养,先诱导愈伤组织,然后从愈伤组织上分化不定芽的方式获得了桂花再生苗,这为桂花的遗传转化提供了可能,也将为桂花新品种培育提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大花金桂的成熟果实(图1,A)于5月上旬采自杭州绿地种业有限公司桂花品种繁育中心。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 去除果实的果肉,取出种子。剥去种子的种皮后,在超净工作台上用70%酒精浸泡30 s,再用0.1%升汞灭菌3 min,无菌水冲洗4次。然后将每片子叶切成4块,将近轴端并带有胚组织的子叶切块接入愈伤组织诱导培养基,每瓶接种4个外植体(图1,B)。

1.2.2 愈伤组织的诱导和增殖 愈伤组织诱导培养基:(1)1/2MS+0.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 2,4-D;(2)1/2MS+0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D。每种培养基接种120个外植体,子叶切块接种到愈伤组织诱导培养基后,每30 d转接1次,暗培养60 d。

1.2.3 愈伤组织的再分化 子叶切块愈伤组织大量形成后,转接到分化培养基中,分化培养基的配方为1/2MS+0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA+0.05% PVP,见光培养,每30 d继代1次,每次继代接种60块愈伤组织。继代9次后愈伤组织上出现芽的分化。分别记录了继代8、9、10、11次愈伤组织的芽分化率和平均再生苗数。

1.2.4 再生苗的生根 将愈伤组织上分化的苗切下,转入壮苗培养基1/2MS+0.5 mg/L TDZ,待苗长到2~3 cm高时,转入添加不同浓度NAA、IBA的1/2MS生根培养基,每处理接种20株苗,培养30 d后统计生根率。

**第一作者简介:**王珍华(1985-),女,在读硕士,现从事植物发育研究工作。E-mail:wangzhenhua\_2005@163.com。

**责任作者:**庞基良(1963-),男,硕士,教授,硕士生导师,现从事植物发育生物学研究工作。E-mail:pangrenshuiliang@yahoo.com.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31071818);浙江省重点科技创新团队资助项目(2010R50039)。

**收稿日期:**2012-01-05

## 2 结果与分析

### 2.1 激素对桂花子叶切块愈伤组织诱导的影响

桂花子叶切块在愈伤组织诱导培养基上培养 15 d 左右,在子叶切块的边缘开始膨大,与子叶切块相联的胚组织膨大更显著;培养 30 d 后,子叶切块的周边几乎都愈伤化,子叶切块上的胚组织也愈伤化,并转为绿色(图 1,C)。由表 1 可知,在 1 号培养基上,愈伤组织形成率达 65.8%;而在 2 号培养基上,愈伤组织形成率只有 58.3%。另外前者的生长势也要优于后者,说明适当提高培养基中的 NAA 和 2,4-D 浓度有利诱导愈伤组织的形成及生长。愈伤组织诱导形成后,转接到 1 号培养基上,愈伤组织的生长加快,并逐渐转为绿色。继代培养 30 d 后,愈伤组织块会增大数倍(图 1,D)。

表 1 不同激素组合对桂花子叶切块愈伤组织诱导的影响

培养基	激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			愈伤组织形成率/%	生长势
	TDZ	NAA	2,4-D		
1 号培养基	0.5	0.5	0.5	65.8	++++
2 号培养基	0.5	0.1	0.1	58.3	++

注:培养 30 d 后统计结果。“+”越多,说明长势越好。

### 2.2 激素及继代对子叶切块愈伤组织芽分化的影响

由表 2 可知,子叶切块愈伤组织在分化培养基上连续继代 9 次后,分化出不定芽(图 1,E,F),随着培养时间的延长,不定芽会长出 3~5 个丛生芽(图 1,G)。继代 9 次后的芽分化率达 22.86%,平均再生苗数为 3.22。继代 10、11 次愈伤组织的芽分化率分别为 36%和 25%,平均再生苗数分别为 1.56 和 1.25。随着继代次数的增加,芽分化率有所增加;但平均再生苗数随着继代次数的增加,会略有下降。

表 2 激素及继代次数对子叶切块愈伤组织芽分化的影响

激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		继代次数	芽分化率/%	平均再生苗数
TDZ	NAA			
0.5	0.1	8	0.00	0.00
0.5	0.1	9	22.86	3.22
0.5	0.1	10	36.00	1.56
0.5	0.1	11	25.00	1.25

注:芽分化率=分化芽的愈伤组织块数/总愈伤组织块数,平均再生苗=再生苗的总数/分化芽的愈伤组织块数。

### 2.3 激素对桂花试管苗生根的影响

将长 2~3 cm 的试管苗接入生根培养基,培养 15 d 左右,在苗下部的切口周围产生愈伤化,培养 20 d 后,根原基明显突起,培养 30 d 后不定根已陆续出现(图 1,I),此时统计生根率。由表 3 可知,当培养基中含 2.0 mg/L NAA,另添加 0.5 mg/L IBA 时,生根率高达 70%,IBA 浓度升高或降低均不利于大花金桂试管苗的生根,当 IBA 浓度为 2.0 mg/L 时,生根率显著降至 20%。此外,单独使用 IBA 或 NAA 时的效果均不及 IBA 与 NAA 结

表 3 不同浓度 NAA 和 IBA 结合对桂花试管苗生根的影响

NAA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IBA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生根率 /%	NAA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IBA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生根率 /%
2.0	0	50	2.0	2.0	20
2.0	0.5	70	0	2.0	40
2.0	1.0	50	0	1.0	0

注:培养 30 d 后统计结果。

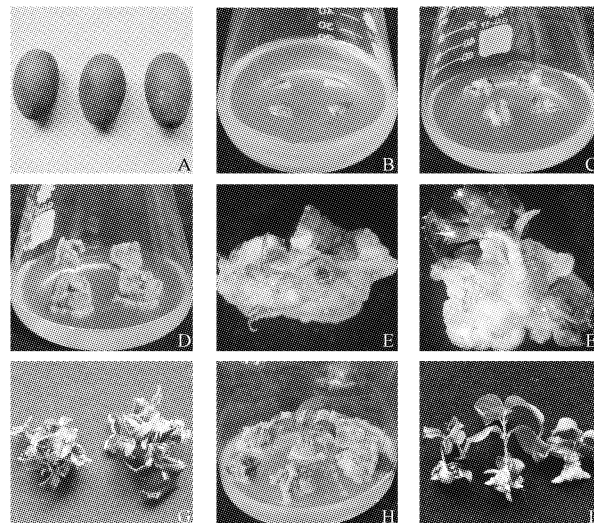


图 1 离体培养桂花子叶切块再生苗

注:A.成熟果实;B.刚接种的子叶切块;C.培养 30 d 后的子叶切块,表面形成愈伤组织;D.继代培养 30 d 后的子叶切块,形成大量绿色愈伤组织;E.愈伤组织在分化培养基上继代培养 9 次后,分化出不定芽;F.愈伤组织上分化的不定芽进一步长大;G.不定芽长出 3~5 个丛生芽;H.愈伤组织在分化培养基上继代 10 次后长出再生苗;I.生根的试管苗。

合的效果好。

## 3 结论与讨论

激素是植物组织培养中的关键影响因子,在愈伤组织诱导中,选用 TDZ、NAA 和 2,4-D 的不同组合,都能诱导愈伤组织的产生,但效果明显不同,适当提高 NAA 和 2,4-D 的浓度有利于愈伤组织的诱导。TDZ (Thidiazuron, 噻苯隆)是一种新型的植物生长调节剂,具有极强的细胞分裂素活性,同时兼有一定的生长素活性,能促进侧芽及不定芽的发生<sup>[6]</sup>。宋会访等<sup>[3]</sup>报道的桂花离体培养继代增殖的最适激素配方为 0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA。选用 TDZ 为主要激素来诱导桂花子叶切块愈伤组织的形成,在培养过程中,筛选到最佳的愈伤组织继代培养基,并用此培养基继代 9 次后,发现有再生芽产生,此培养基为 1/2MS+0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA+0.1% PVP。培养基中添加 0.1% PVP (聚乙烯吡咯烷酮)可防止愈伤组织长期继代的褐化。

目前的报道显示 TDZ 对木本植物的再生是最有效的,能诱导月季<sup>[7]</sup>、杜鹃叶片<sup>[8]</sup>分化不定芽。桂花是一种难分化的木本植物,通过该研究也进一步证实 TDZ 能

有效诱导木本植物芽的分化。该研究首次成功诱导桂花子叶切块愈伤组织分化营养芽,这使桂花通过农杆菌介导的遗传转化成为可能,可通过转化乙烯信号转导相关基因、花色相关基因、抗冻基因等,以期培育花期长、新花色、耐寒的桂花新品种。

#### 参考文献

- [1] 秦新民. 桂花的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1988(3):55.
- [2] 袁王俊, 张维瑞, 尚富德. 桂花茎尖离体培养体系的建立[J]. 西北植物学报, 2008, 28(2): 244-248.
- [3] 宋会访, 葛红, 周媛, 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.
- [4] 袁王俊, 董美芳, 尚富德. 桂花胚的离体培养[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1136-1139.
- [5] 刘友全, 梁茂厂, 陈跃华. 桂花离体胚的组织培养[J]. 经济林研究, 2008, 26(2): 12-16.
- [6] 秦静远. TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(2): 19-22.
- [7] Ibrahim R, Debergh P C. Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet explants of roses (*Rosa hybrida* L.) [J]. Acta Hort, 2000, 520: 271- 276.
- [8] 秦静远, 黄玉敏. 杜鹃的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 38.

## Study on Regenerating Shoots from Cotyledon Segment Cultures in *Osmanthus fragrans*

WANG Zhen-hua<sup>1</sup>, PANG Ji-liang<sup>1</sup>, CHEN Yi-hong<sup>1</sup>, DING Xu-sheng<sup>2</sup>, SHEN Bai-chun<sup>2</sup>, CHEN Bo-xiang<sup>2</sup>

(1. College of Life and Environment Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036; 2. Hangzhou Landscape Garden Engineering Corporation, Hangzhou, Zhejiang 310020)

**Abstract:** Cotyledon segments of *Osmanthus fragrans* 'Dahuaqingui' were used as explant, the effect of hormone levels on the callus induced of cotyledons sliced of osmanthus, shoot differentiation and tube seedlings rooting were studied. The results showed that adventitious buds were differentiated from cotyledon segment calli after subculturing 9 times on differentiated medium (1/2MS+0.5 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA) Differentiation rate of the adventitious bud was 22.86%, and average number of regenerating shoots was 3.22. After cotyledon segment calli were subcultured 10 times on same differentiated medium, frequency of the adventitious bud differentiation was up to 36%. The optimum rooting medium was 1/2MS+0.5 mg/L IBA+2.0 mg/L NAA, and the rooting rate could reach 70%.

**Key words:** *Osmanthus fragrans*; cotyledon segments; *in vitro* culture; adventitious bud differentiation; thidiazuron

## 桂花的分布及药用价值

园林桂花原产于我国西南喜马拉雅山东段,印度、尼泊尔、柬埔寨也有分布。我国桂花集中分布和栽培的地区,主要是岭南以北至秦岭、淮河以南的广大热带和北亚热带地区,大致相当于北纬 24°~33°地区。该地区水热条件好,降水量适宜,土壤多为黄棕壤或黄褐土,植被则以亚热带阔叶林类型为主。在上述条件的孕育和影响下,桂花生长良好,并形成了湖北咸宁、湖南桃源、江苏苏州、广西桂林、河南信阳商城县、浙江杭州和四川成都几大全国有名的桂花商品生产基地。桂花也是杭州的市花。

中医认为,桂花有很好的药用价值。古人说桂为百药之长,所以用桂花酿制的酒能达到“饮之寿千岁”的功效。桂花性温、味辛,入肺、大肠经,煎汤、泡茶或浸酒内服,有温中散寒、暖胃止痛、化痰散淤的作用,对食欲不振、痰饮咳嗽、痔疮、痢疾、经闭腹痛有一定疗效。红茶性温,有暖脾胃、助消化的功能,可以促进食欲;红糖具有益气养血,健脾暖胃,驱风散寒,活血化淤之效,特别适于产妇、儿童及贫血者食用。因此,脾胃虚寒及脾胃功能较弱的人可以适当喝桂花红糖茶温胃。但表现为胃脘灼热疼痛,口干,饥饿却不想吃东西,小便色黄,大便粘腻等症状的脾胃湿热的人不适合饮用。现在很多药店、超市都有卖干桂花的,读者可以自己在家做桂花茶。做法是:将 7~10 朵干桂花加入适量的红茶、红糖后,以热水冲泡。除了饮用桂花茶外,还可以将桂花、纯藕粉加白糖冲调成桂花藕粉,味美且开胃;或取上等小枣,加糖煮,汤将尽时,加入桂花,即成健脾开胃的桂花蜜枣。