

桂花花梗与叶片的愈伤组织诱导研究

胡甜甜, 王亚莉, 杨秀莲, 王良桂

(南京林业大学 风景园林学院, 江苏 南京 210037)

摘要:以桂花幼嫩花梗和叶片为外植体,通过植物组织培养技术,研究了桂花无菌体系的建立,不同品种群的桂花花梗在不同培养基配方下的出愈情况和植物生长调节剂、蔗糖浓度及暗处理时间等因素对不同桂花品种群的叶片愈伤组织诱导培养的影响。结果表明:桂花花梗最佳消毒方式为5% NaClO消毒3 min,叶片最佳消毒方式为0.1% HgCl₂消毒5 min。花梗愈伤组织的诱导培养结果表明,“波叶金桂”的最佳配方为MS+2.00 mg/L 6-BA+0.40 mg/L 2,4-D;“紫梗籽银桂”为B5+2.00 mg/L 6-BA+0.40 mg/L 2,4-D;“雨城丹桂”为B5+1.00 mg/L 6-BA+0.10 mg/L 2,4-D;“日香桂”为B5+2.00 mg/L 6-BA+0.10 mg/L 2,4-D。叶片愈伤组织的诱导培养结果表明,最佳蔗糖浓度为25 g/L,最适宜的暗培养天数为22 d;最利于“雨城丹桂”叶片愈伤组织诱导培养基的配方为MS+3.00 mg/L 6-BA+1.00 mg/L 2,4-D,当6-BA浓度为2.00 mg/L为“天香台阁”的最佳诱导配方。

关键词:组织培养;愈伤组织;桂花;培养基

中图分类号:S 635.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)19-0095-07

桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)属木犀科(Oleaceae)木犀属(*Osmanthus*)常绿阔叶观赏树种,素以花香著称。桂花寿命长、病虫害少、适应性广等特点使其在园林和庭院的绿化、美化、香化及装饰盆景上有特殊地位^[1]。由于目前桂花食用、药用和观赏等功能的进一步研究与开发,市面上对桂花的需求不断增大,桂花繁育工作也得到广泛研究。

传统桂花育种方式如扦插、嫁接和播种等方式,因其繁殖系数小、周期长、生长缓慢等局限性^[2],难以满足市场需要,而植物组织培养不受季节、气候等因素的制约,便于集约化管理和工厂化生产^[3-4],BONGA^[5]也曾将有性繁殖法与无性繁殖法遗传效益进行比较,认为无性繁殖法可获得更大的遗传效益,因此近年来桂花组织培养研究方兴未艾。目前桂花离体繁殖多以种胚、茎段、茎尖等为外植体诱导丛生芽,以胚、叶盘和茎尖等器官为外植体诱导愈伤组织,而对桂花花梗的愈伤组织诱导研究很少,同时,由于目前桂花叶片愈伤组织诱导培养

均存在组织褐变、愈伤组织板结等未攻克问题,课题组探究了不同培养条件对桂花叶片愈伤组织诱导的影响。现以不同品种群的桂花花梗为外植体,以正交实验方法研究其愈伤组织诱导的最佳培养配方,旨在为今后桂花的组织培养研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013年3月采集南京林业大学校园内生长良好无病虫害的桂花新梢的幼嫩新叶,品种分别为“天香台阁”(O. *fragrans* ‘Tianxiang Taige’)和“雨城丹桂”(O. *fragrans* ‘Yucheng Dangui’);2013年9月采集不同品种桂花初花期新鲜幼嫩花梗,分别为“四季桂”(O. *fragrans* ‘Sijigui’),“波叶金桂”(O. *fragrans* ‘Boye Jingui’),“紫梗籽银桂”(O. *fragrans* ‘Zigeng Zi Yingui’),“雨城丹桂”(O. *fragrans* ‘Yucheng Dangui’)和“日香桂”(O. *fragrans* ‘Rixiang Gui’)。采集时间在有阳光的10:00—12:00进行。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌体系的建立 将采摘的“四季桂”新鲜花梗在流水下冲洗1 h,置于超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,无菌水漂洗3遍,然后用5% NaClO消毒1、3、5、8 min,无菌水漂洗5遍并在超净工作台上切成1.5 cm左右小段接种于添加1.50 mg/L 6-BA和0.10 mg/L 2,4-D的MS培养基上。将“天香台阁”叶片在流水下冲

第一作者简介:胡甜甜(1991-),女,硕士,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:htt0726@163.com.

责任作者:王良桂(1962-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物栽培与应用和园林工程管理。E-mail:wlg@njfu.com.cn.

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2013BA001B06);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

收稿日期:2015-06-04

洗 2 h,置于超净工作台上用 75% 的酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3 遍,由花梗消毒试验结果及资料查阅发现,当消毒时间小于 3 min 时,外植体的消毒不彻底,故使用 5% NaClO 或 0.1% HgCl₂ 对叶片消毒 3、5、8 min,无菌水漂洗 5 遍,沿主脉切成 1 cm×1 cm 的小块接种于添加 1.00 mg/L 6-BA 和 0.20 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上。

1.2.2 花梗愈伤组织诱导的培养 将“波叶金桂”、“紫梗籽银桂”、“雨城丹桂”、“日香桂”的新梢幼嫩花梗消毒后,在超净工作台上切成 1.5 cm 左右小段,平接于基本培养基(1/2MS、MS、B5)、6-BA(1.00、2.00、3.00 mg/L)、2,4-D(0.10、0.40、0.80 mg/L)3 因素 3 水平的正交设计 L₉(3⁴) 组合(表 1)的基质中,进行愈伤组织诱导培养,观察花梗脱分化情况,30 d 后统计不同处理的花梗出愈率。

表 1 正交实验设计方案 L₉(3⁴)

Table 1 Plan of orthogonal experiment design L₉(3⁴)

水平 Level	因素 Factor			误差空列 Null columns of error
	A 培养基 Medium	B 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg·L ⁻¹)	C 2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg·L ⁻¹)	
1	1/2MS	1.00	0.10	
2	MS	2.00	0.40	
3	B5	3.00	0.80	

1.2.3 叶片愈伤组织的诱导培养的单因素试验 暗处理时间对叶片愈伤组织诱导的影响:以“天香台阁”叶片为外植体,消毒处理后沿主脉切成 1 cm×1 cm 的小块接种于添加 2.00 mg/L 6-BA 和 0.50 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中进行诱导培养,并暗处理 0、7、15、22、30、35 d 后统计不同暗处理时间的叶片出愈率。蔗糖浓度对叶片愈伤组织诱导的影响:将“天香台阁”叶片(处理方式同上)接种于添加 2.00 mg/L 6-BA 和 0.50 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中进行诱导培养,并分别添加不同浓度蔗糖 15、25、40 g/L,30 d 后统计不同处理的叶片出愈率。植物生长调节剂对叶片愈伤组织诱导的影响:将“天香台阁”、“雨城丹桂”叶片(处理方式同上)分别接种于添加不同浓度 6-BA(1.00、2.00、3.00 mg/L)和 2,4-D(0.10、0.40 mg/L) 双因素完全设计组合的 MS 培养基上进行愈伤组织的诱导培养,观察各种培养基配方对叶片愈伤组织的诱导效果,30 d 后统计不同处理的叶片出愈率。

1.2.4 培养条件与统计方法 无菌体系的建立阶段共接种 50 个外植体,其余每次处理均 10 瓶,每瓶接种 3 个外植体,重复 3 次;各处理(除研究蔗糖浓度对诱导培养的影响外)添加的蔗糖浓度均为 30 g/L,用于固化的琼脂均为 6.4 g/L;培养温度(25±1)℃;光照强度为 18.75~25.00 μmol·m⁻²·s⁻¹,连续光照 12 h/d;所有培养基使用前,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调 pH 值至 5.5,并在 121℃、1.1 kg/cm² 压力下高温高压灭菌 20 min。

1.3 项目测定

出愈率(%)=诱导愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数×100;无菌存活率(%)=存活的无菌外植体总数/接种的外植体×100;污染率(%)=污染的外植体数/接种的外植体总数×100;死亡率(%)=死亡的外植体数/接种的外植体总数×100。

1.4 数据分析

试验中单因素和双因素试验设计所得的数据直接使用 SPSS 软件进行分析,正交设计所得的数据先采用极差分析,然后利用 SPSS 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 消毒方式对无菌体系建立的影响

2.1.1 消毒时间对幼嫩花梗消毒效果的影响 由表 2 可知,桂花花梗在以 5% NaClO 溶液消毒处理时,外植体无菌存活率随着时间增长呈先上升后下降的趋势,消毒 3 min 时效果最好,污染率和死亡率均较低,分别为 8.00% 和 12.00%;当消毒 1 min 时,无菌存活率最低,外植体污染率高于其死亡率,说明短时间的消毒不能很好的消除外植体污染;当消毒时间为 8 min 时外植体污染率虽然降低,但死亡率却显著升高,可能是外植体较幼嫩,长时间的消毒使其组织细胞受到毒害,死亡率增大。因此,花梗的最佳消毒方式为 5% NaClO 灭菌 3 min。

表 2 不同消毒时间对花梗消毒效果的影响

Table 2 The effect of peduncle sterilization with disinfected time

消毒时间 Sterilizing time	接种数 Amount of explants	无菌存活率 Sterile survival rate	污染率 Pollution rate	死亡率 Death rate
/min		/%	/%	/%
1	50	58.00	24.00	18.00
3	50	80.00	8.00	12.00
5	50	76.00	10.00	14.00
8	50	70.00	4.00	26.00

2.1.2 消毒剂 and 消毒时间对幼嫩叶片消毒效果的影响

NaClO 可分解出具杀菌作用的氯气,灭菌处理后易于除去,不留残留^[6];HgCl₂ 消毒效果虽好,但消毒后需要使用无菌水多次冲洗外植体再进行试验,以减小 HgCl₂ 对外植体的毒害作用^[7]。NaClO 和 HgCl₂ 分别对“天香台阁”叶片消毒不同时间的试验结果表明(表 3),使用 5% NaClO 溶液对叶片消毒时,污染率和死亡率随着处理时间的延长均逐渐降低,当消毒时间为 8 min 时效果最好;但此时外植体污染率仍然高于死亡率,说明消毒时间应适当延长使外植体得到充分消毒;使用 0.1% HgCl₂ 溶液处理叶片的时间为 5 min 时效果较好,无菌存活率为 66.70%,消毒时间继续增加时死亡率则明显增高。分析可知,在相同时间的消毒处理下,0.1% HgCl₂ 溶液比 5% NaClO 溶液效果更好,因此以“天香台阁”叶片为外植体的最佳消毒剂 and 消毒时间为 0.1% HgCl₂ 溶液处理 5 min。综合花梗与叶片的消毒试验结果发现,在相同消毒剂(NaClO)、消毒相同时间下,叶片

表 3 不同消毒剂、消毒时间对
幼嫩叶片消毒效果的影响

Table 3 The effect of young leaf sterilization with
different disinfectants and disinfected time

NaClO 消毒时间 NaClO sterilizing time/min	HgCl ₂ 消毒时间 HgCl ₂ sterilizing time/min	污染率 Pollution rate /%	死亡率 Death rate /%	无菌存活率 Sterile survival rate/%
3		50.00	25.00	25.00
5		37.50	20.80	41.70
8		25.00	16.70	58.30
	3	20.80	20.90	58.30
	5	12.50	20.80	66.70
	8	8.30	37.50	54.20

的效果不及花梗,可能是因为叶片消毒表面积大于花梗,叶片表面附着的细菌也更多,需要适当延长消毒时间。

2.2 不同培养基配方对花梗愈伤组织诱导的影响

在“波叶金桂”花梗的愈伤组织诱导试验中发现 15 d 左右花梗两端边缘部位开始慢慢出现浅白色愈伤组织突起,质地紧密(图 1)。由表 4 可知,处理 6 的花梗愈伤组织诱导的效果较好,出愈率高达 75.00%,与其它处理差异显著;出愈率状况较差的为处理 1 和处理 3,出愈率低于 20.00%,说明当 MS 大量元素减半时无法满足愈伤组织诱导所需营养。通过极差分析,3 因素对试验影响效应:培养基>2,4-D>6-BA;由均值比较结果可知,试验的最优处理组合为 A₂B₂C₂;因此,“波叶金桂”花梗愈伤诱导的最佳培养配方为 MS+2.00 mg/L 6-BA+0.40 mg/L 2,4-D。

表 4 “波叶金桂”花梗愈伤组织诱导结果

Table 4 The ‘Boye Jingui’
peduncle callus inducement result

处理 Treatment	A 培养基 Medium	B 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg·L ⁻¹)	C 2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg·L ⁻¹)	出愈率 Callus rate /%
1	1/2MS	1.00	0.10	19.44±1.20 e
2	1/2MS	2.00	0.40	41.67±1.17 d
3	1/2MS	3.00	0.80	12.50±4.17 f
4	MS	1.00	0.80	50.00±0.00 c
5	MS	2.00	0.10	66.67±3.17 b
6	MS	3.00	0.40	75.00±3.17 a
7	B5	1.00	0.40	62.50±0.67 b
8	B5	2.00	0.80	49.99±4.48 c
9	B5	3.00	0.10	54.17±3.17 c
k1	25.00	44.44	47.22	
k2	63.89	52.78	59.72	
k3	55.56	47.22	37.50	
R	38.89	8.34	22.22	

注:各数值均指试验的 3 个重复的平均值。小写字母表示在 0.05 显著水平下进行多重比较,有相同字母的表示两者差异不显著。下同。

Note: All values represent the average of three repeated experiments. Lowercase letters represent multiple comparisons significant at 0.05 level, the same lowercase letter indicating a difference between the same letter are not significant. The same below.



MS+6-BA 2.00 mg/L+2,4-D 0.10 mg/L

图 1 “波叶金桂”花梗愈伤组织诱导

Fig. 1 The ‘Boye Jingui’ peduncle callus inducement

“紫梗籽银桂”花梗的愈伤组织诱导试验表明(表 5、图 2),处理 8 效果较好,出愈率高达 83.33%,与其它 8 个处理均存在显著差异;其次为处理 5、6、7,出愈率均在 70.00%~75.00%,3 个处理间无显著差异。通过极差分析,3 个因素对试验影响效应:培养基>6-BA>2,4-D;通过均值比较,各因素最优水平分别为 A₃B₂C₂,因此,“紫梗籽银桂”花梗愈伤组织诱导的最佳培养配方为 B5+2.00 mg/L 6-BA+0.40 mg/L 2,4-D。

表 5 “紫梗籽银桂”花梗愈伤组织诱导结果

Table 5 The ‘Zigeng Zi Yingui’ peduncle callus inducement result

处理 Treatment	A 培养基 Medium	B 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg·L ⁻¹)	C 2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg·L ⁻¹)	出愈率 Callus rate /%
1	1/2MS	1.00	0.10	25.00±1.17 f
2	1/2MS	2.00	0.40	54.17±1.17 d
3	1/2MS	3.00	0.80	45.82±1.17 e
4	MS	1.00	0.80	66.67±1.00 c
5	MS	2.00	0.10	70.80±4.17 bc
6	MS	3.00	0.40	75.00±3.17 b
7	B5	1.00	0.40	70.80±0.17 bc
8	B5	2.00	0.80	83.33±5.17 a
9	B5	3.00	0.10	66.67±2.84 c
k1	41.67	54.17	54.17	
k2	70.83	69.43	66.67	
k3	73.60	62.50	65.27	
R	31.93	15.27	12.50	



B5+6-BA 2.00 mg/L+2,4-D 0.80 mg/L

图 2 “紫梗籽银桂”愈伤组织诱导

Fig. 2 The ‘Zigeng Zi Yingui’ peduncle callus inducement

“雨城丹桂”花梗的愈伤组织诱导培养结果表明(表6、图3),处理7出愈率较高,达62.50%,与其它8个处理有显著差异;处理3出愈率最低仅为4.17%。通过极差分析,3因素对试验影响效应:6-BA>培养基>2,4-D;通过均值比较,各因素的最优水平为 $A_3B_1C_1$,因此,“雨城丹桂”花梗愈伤诱导最佳培养配方为 $B5+1.00\text{ mg/L }6\text{-BA}+0.10\text{ mg/L }2,4\text{-D}$ 。

表6 “雨城丹桂”
花梗愈伤组织诱导结果

Table 6 The ‘Yucheng Dangui’
peduncle callus inducement result

处理 Treatment	A 培养基 Medium	B 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg · L ⁻¹)	C 2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg · L ⁻¹)	出愈率 Callus rate /%
1	1/2MS	1.00	0.10	45.83±1.17 c
2	1/2MS	2.00	0.40	25.00±1.17 f
3	1/2MS	3.00	0.80	4.17±2.16 g
4	MS	1.00	0.80	58.33±4.17 b
5	MS	2.00	0.10	41.67±1.67 d
6	MS	3.00	0.40	29.17±1.84 e
7	B5	1.00	0.40	62.50±2.50 a
8	B5	2.00	0.80	45.83±1.17 c
9	B5	3.00	0.10	41.67±1.67 d
k1	25.00	55.55	43.06	
k2	43.06	37.50	38.89	
k3	50.00	25.00	36.11	
R	25.00	30.55	6.95	



B5+6-BA 2.00 mg/L+2,4-D 0.10 mg/L

图3 “雨城丹桂”花梗愈伤组织诱导

Fig.3 The ‘Yucheng Dangui’ peduncle callus inducement

“日香桂”花梗愈伤组织诱导试验结果表明(表7、图4),处理5与处理9出愈率明显高于其它处理,2个处理无显著差异,出愈率分别为66.67%和70.83%;处理3出愈率最低仅为16.67%。通过极差分析,各因素对试验结果影响效应大小为:培养基>2,4-D>6-BA,由均值比较可知,3因素的最优水平组合是 $A_3B_2C_1$;因此,“日香桂”花梗愈伤诱导的最佳培养配方为 $B5+2.00\text{ mg/L }6\text{-BA}+0.10\text{ mg/L }2,4\text{-D}$ 。

表7 “日香桂”花梗愈伤组织诱导结果

Table 7 The ‘Rixiang Gui’peduncle callus inducement result

处理 Treatment	A 培养基 Medium	B 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg · L ⁻¹)	C 2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg · L ⁻¹)	出愈率 Callus rate /%
1	1/2MS	1.00	0.10	45.82±5.84 de
2	1/2MS	2.00	0.40	33.33±3.33 f
3	1/2MS	3.00	0.80	16.67±1.67 g
4	MS	1.00	0.80	41.67±4.67 e
5	MS	2.00	0.10	66.67±3.00 a
6	MS	3.00	0.40	50.00±4.00 cd
7	B5	1.00	0.40	58.33±1.67 b
8	B5	2.00	0.80	54.17±1.17 bc
9	B5	3.00	0.10	70.83±4.17 a
k1	31.93	48.61	61.10	
k2	52.79	51.38	47.21	
k3	61.11	45.84	37.52	
R	29.18	5.54	23.58	



B5+6-BA 2.00 mg/L+2,4-D 0.80 mg/L

图4 “日香桂”花梗愈伤组织诱导

Fig.4 The ‘Rixiang Gui’ peduncle callus inducement

2.3 暗处理时间对叶片愈伤组织诱导的影响

暗处理对接种于添加2.00 mg/L 6-BA和0.50 mg/L 2,4-D的MS培养基中的“天香台阁”叶片愈伤组织诱导的试验结果表明(表8),暗培养22 d时出愈率最高为81.27%,暗培养30 d时出愈率次之,为77.10%,2个处理间无显著差异;暗培养0~15 d时出愈率无显著差异,但出愈率明显低于暗培养22 d和30 d。这说明一定时间的暗培养有利于“天香台阁”叶片愈伤组织的形成,但并不是暗培养时间越长越好,超过最佳时间出愈率将会有所降低。综上,“天香台阁”叶片的愈伤组织诱导最佳的暗培养天数为22 d。

表8 不同暗处理时间对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 8 The inducement effect of leaf callus with different dark days

处理 Treatment	暗培养时间 Dark days/d	出愈率 Callus rate/%
1	0	50.00±6.25 b
2	7	47.92±7.21 b
3	15	60.42±9.55 b
4	22	81.27±6.25 a
5	30	77.10±3.64 a

2.4 蔗糖浓度对叶片愈伤组织诱导的影响

不同蔗糖浓度对“天香台阁”叶片愈伤组织的诱导能产生显著影响(表 9),蔗糖浓度为 25 g/L 时出愈率最高达 73.59%,与蔗糖浓度为 40 g/L 时出愈率无显著差异;当蔗糖浓度为 5 g/L 时出愈率最低仅为 29.16%,与蔗糖浓度为 25、40 g/L 时出愈率均存在显著性差异;因此,本着经济合理的原则,认为“天香台阁”叶片愈伤组织诱导的最佳蔗糖浓度为 25 g/L。

表 9 不同蔗糖浓度对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 9 The inducement effect of leaf callus with different concentrations of sucrose

处理 Treatment	蔗糖浓度 Concentration of sucrose/(g · L ⁻¹)	出愈率 Callus rate/%
1	5	29.16±4.17 b
2	25	73.59±4.83 a
3	40	65.26±6.37 a

2.5 不同培养基配方对叶片愈伤组织诱导的影响

在 MS 培养基上添加不同浓度配比的生长调节剂的“天香台阁”叶片愈伤组织诱导试验结果表明(表 10、图 5),处理 3 出愈率最高可达 75.00%,与其它处理差异均显著;处理 6 出愈率效果最差仅为 43.00%,且形成的愈伤组织较为干燥;分析发现 6-BA 浓度不变时,0.50 mg/L 2,4-D 诱导出愈率均优于其浓度为 1.00 mg/L 时的出愈率,说明低浓度 2,4-D 更利于叶片愈伤组织诱导,这可

表 10 不同浓度 6-BA 与 2,4-D 对“天香台阁”叶片愈伤组织诱导的影响

Table 10 The inducement effect of ‘Tianxiang Taige’ leaf callus with different concentrations of 6-BA and 2,4-D

处理 Treatment	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg · L ⁻¹)	2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg · L ⁻¹)	出愈率 Callus rate/%
1	1.00	0.50	62.67±1.82 b
2	1.00	1.00	50.50±1.50 c
3	2.00	0.50	75.00±3.60 a
4	2.00	1.00	60.23±1.76 b
5	3.00	0.50	54.53±2.25 c
6	3.00	1.00	43.00±3.22 d



图 5 “天香台阁”叶片愈伤组织诱导

Fig. 5 ‘Tianxiang Taige’ leaves callus inducement

能与 2,4-D 趋向于抑制植物形态发生的效应有关^[8]。因此,“天香台阁”叶片愈伤诱导的最佳培养配方为 MS+2.00 mg/L 6-BA+0.50 mg/L 2,4-D。

以“雨城丹桂”叶片为外植体,MS 为基本培养基时,6-BA 与 2,4-D 不同浓度组合下愈伤组织诱导试验结果表明(表 11、图 6),处理 6 出愈率最高,可达 70.20%,与其它 5 个处理差异显著;处理 1 出愈率效果最差,仅为 25.00%;分析发现,当 6-BA 浓度为 1.00 mg/L 和 2.00 mg/L 时的出愈率均未超过 50%,且当 2,4-D 浓度不变时,6-BA 在一定浓度范围对愈伤组织诱导的促进作用随浓度升高而升高,而说明较高浓度的 6-BA 利于外植体的愈伤组织诱导,这与董閃等^[9]、和凤美等^[10] 研究结果一致。因此,“雨城丹桂”叶片愈伤诱导的最佳培养配方为 MS+3.00 mg/L 6-BA+1.00 mg/L 2,4-D。

表 11 不同浓度 6-BA 与 2,4-D 对“雨城丹桂”叶片愈伤组织诱导的影响

Table 11 The inducement effect of ‘Yucheng Dangui’ leaf callus with different concentrations of 6-BA and 2,4-D

处理 Treatment	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg · L ⁻¹)	2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D/(mg · L ⁻¹)	出愈率 Callus rate/%
1	1.00	0.50	25.00±3.60 e
2	1.00	1.00	41.69±2.07 d
3	2.00	0.50	50.00±3.60 c
4	2.00	1.00	41.69±2.07 d
5	3.00	0.50	61.83±5.45 b
6	3.00	1.00	70.20±2.08 a



MS+6-BA 3.00 mg/L+2,4-D 0.50 mg/L

图 6 “雨城丹桂”叶片愈伤组织诱导

Fig. 6 ‘Yucheng Dangui’ leaves callus inducement

3 结论与讨论

该试验表明,外植体的取材部位、消毒方式、生长调节剂浓度配比等均能影响愈伤组织的形成。宋会访等^[11] 曾以无菌短枝扦插途径对桂花进行组织培养研究,发现其组培效果明显优于直接取自树体的器官进行组培试验的结果,这说明无菌体系的建立对于桂花的组织培养尤为重要,能否有效控制污染是植物组织培养成功的关键^[12]。该试验中对叶片使用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min 能达到较好效果,此时污染率仅 12.50%;新鲜花梗则适

于使用 5% NaClO 处理 3 min,污染率仅为 8.00%。

花梗愈伤组织诱导结果发现,不同桂花品种在不同配方的培养基中均能进行不同程度的脱分化,但其愈伤组织诱导效果均不同,“紫梗籽银桂”花梗的愈伤组织诱导效果明显优于其它品种,而以“雨城丹桂”花梗为外植体时,其平均出愈率仅为 39.35%,这可能与培养条件及外植体基因型相关;极差分析和均值比较发现培养基与激素对不同桂花品种愈伤组织诱导试验的影响效应及其最优处理组合均不同,证明愈伤组织的诱导能表现出明显的品种特异性^[13],基因型对其有较大影响,这可能与植物体内激素种类和水平不同有关^[14];分析不同品种桂花花梗愈伤组织诱导试验中不同因素对试验影响效应发现,最佳基本培养基为 MS 和 B5,证明了高盐培养基和高硝态氮培养基适合于愈伤组织诱导^[15];分析各桂花品种最优配方发现,当 6-BA 浓度在 1.00~2.00 mg/L,2,4-D 浓度在 0.10~0.40 mg/L 间时适合桂花花梗的愈伤组织诱导,这与彭尽晖等^[16]、王文房等^[17]研究花梗愈伤组织诱导试验结果一致。

植物生长调节剂是培养基中的关键元素,在组织培养中用量虽然微小,但却是发挥生物学效力最强的培养因素,可以调节培养物的生长发育进程、分化方向和器官发生^[18]。研究表明,在配合使用 2,4-D 和 6-BA 的情况下,愈伤组织诱导率要高于单独使用 2,4-D,但 2,4-D 浓度不宜过大,否则易引起组织褐化^[19-20]。在叶片的愈伤组织诱导中,“雨城丹桂”最佳的配方为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D;“天香台阁”的最佳配方为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D;糖的使用可维持良好的渗透关系,试验发现培养基中最佳的蔗糖浓度为 25 g/L;研究表明,遮光培养有利于愈伤组织诱导^[21],最适宜的暗培养天数为 22 d,这与彭尽晖等^[16]研究“四季桂暗”培养结果不同,可能是由于外植体的培养环境不同和品种差异性。

该试验对比了不同品种桂花花梗的组织培养研究,建立了良好的无菌体系,成功诱导其愈伤组织,并探究出“天香台阁”和“雨城丹桂”叶片组织培养的最佳配方和培养条件。但由于时间问题,该试验对可能影响愈伤组织诱导培养的其它因子,如培养温度、糖的种类等问题还未涉及,这将是桂花愈伤组织诱导培养今后的研究方向。

参考文献

- [1] 聂谷华,向其柏. 桂花研究现状及其存在的问题[J]. 九江学院学报(哲学社会科学版),2008,26(3):85-87.
- [2] 张丽霞,王毅彰. 桂花的离体快繁技术[J]. 江苏农业科学,2013(3):42-43.
- [3] 蔡新玲,胡惠露. 桂花茎尖初代组织培养试验研究[J]. 安徽林业科技,2009(1):17-19.
- [4] 胡海波,黄丹,许岳香. 木犀科植物组织培养研究综述[J]. 林业科技开发,2009(3):5-8.
- [5] BONGA J M. 树木组织培养[M]. 阙国宁,等译. 北京:中国林业出版社,1988.
- [6] 潘瑞焜. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社,2000:20-21.
- [7] 杜燕,蒋海玉,刘其宁. 贮存过期油菜种子消毒方法的研究[J]. 种子,2003(2):39-40,42.
- [8] WANG Y P, LIU Q C, LI A X, et al. *In vitro* selection and identification of drought tolerant mutants in sweet potato[J]. Agricultural Sciences in China,2003,2(12):1314-1320.
- [9] 董闪,李明,唐堃,等. 白木香愈伤组织的诱导及培养[J]. 湖北农业科学,2014(15):3673-3677.
- [10] 和凤美,朱永平,杨晓红,等. 冬樱花愈伤组织诱导和抑制褐化初探[J]. 中国农学通报,2010(12):130-134.
- [11] 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(4):738-740.
- [12] 喻晓雁,刘克旺,梁文斌. 穗花杉组织培养初探[J]. 中南林学院学报,2005(2):55-58.
- [13] 任桂芳,王建红,冯慧,等. 现代月季(*Rosa hybrida*)叶片植株再生体系的建立[J]. 园艺学报,2004(4):533-536.
- [14] 蔡新玲. 不同桂花品种群组织培养的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2007.
- [15] 吕晋慧,孔冬梅. 园艺植物组织培养[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:24.
- [16] 彭尽晖,吕长平,周晨. 四季桂愈伤组织诱导与继代培养[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2003(2):131-133.
- [17] 王文房,李修岭. 樱花花柄的组织培养[J]. 安徽农业科学,2006(22):5839-5841.
- [18] 王金刚,张兴. 园林植物组织培养技术[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:27-28.
- [19] 丁路明,龙瑞军,朱铁霞. 2,4-D 和 6-BA 对早熟禾愈伤组织诱导的影响[J]. 草原与草坪,2003(1):34-37.
- [20] 周宜君,周生闯,刘玉,等. 植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2007(1):23-28.
- [21] 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.

Study on Pedicels and Leaves Callus Induction of *Osmanthus fragrans*

HU Tiantian, WANG Yali, YANG Xiulian, WANG Lianggui

(College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: The young pedicels and leaves of *Osmanthus fragrans* were used as the explants in the study. Through the plant tissue culture techniques, the experiment studied the establishment of *Osmanthus fragrans* sterile system, pedicels callus

淡黄花百合珠芽诱导愈伤组织 再分化出丛生芽的研究

张翔宇, 陈杰, 吉云, 严显进, 王彩云, 阮培均

(毕节市中药研究所, 贵州 毕节 551700)

摘要:以淡黄花百合珠芽为试材,采用植物组织培养方法,研究不同浓度的 TDZ、NAA、2,4-D、ZT 对淡黄花百合珠芽愈伤组织诱导及再分化出丛生芽的影响。结果表明:MS+0.3 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L ZT 为最佳培养基,最快可在 15 d 诱导出愈伤组织,愈伤组织诱导率为 $(98.67\pm 2.31)\%$,最快可在 32 d 分化出丛生芽,丛生芽诱导率为 $(98.67\pm 2.31)\%$,平均出芽数为 (17.67 ± 0.58) 个。

关键词:淡黄花百合;珠芽;愈伤组织;再分化;丛生芽

中图分类号:S 644.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)19-0101-05

淡黄花百合(*Lilium sulphureum* Baker)属百合科百合属多年生草本植物^[1]。其鳞茎可预防和治疗肺结核、慢性气管炎、咳嗽、肺气肿、肺嗽咯血、体虚肿弱、疮痈肿瘤等症,若服食清蒸百合,还可治胃病、肝病、贫血等,是多种滋补药的主药^[2]。

百合的传统繁殖主要有珠芽繁殖、子球繁殖、鳞片繁殖 3 种方式^[3]。采用组织培养方式进行百合快速繁殖,因其繁殖系数高而成为目前百合重要的繁殖方式之一。要使百合组织培养与生产衔接,关键是要针对不同品种制订与之相匹配的组培快繁方案^[4]。杨雪清等^[5]

以淡黄花百合的鳞片为外植体,采用“一步法”进行丛生小鳞茎及其植株再生发现,MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 为小鳞茎最佳诱导培养基,诱导率最高达到 95.0%。李黛等^[6]在 MS 固体培养基上研究不同浓度蔗糖、6-BA 及 NAA 对淡黄花百合芽增殖和愈伤组织生长的影响时发现,芽增殖的最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+4%蔗糖。愈伤组织增殖的最适培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+3%蔗糖。邱宁宏等^[7]以淡黄花百合的鳞片为外植体进行试管培养,研究发现丛生芽诱导最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+3%蔗糖,继代增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+3%蔗糖。以上研究均采用了 6-BA 和 NAA 2 种植物生长调节剂组合,但二者使用浓度比例存在较大差异。有研究报道,TDZ 作为细胞分裂素的活性是 6-BA 的 50 倍、异戊烯腺嘌呤(Zip)的 1 000 倍^[8]。因此,该试验以

第一作者简介:张翔宇(1986-),男,硕士,助理研究员,现主要从事药用植物资源工程等研究工作。E-mail:304626335@qq.com。

基金项目:国家科技支撑计划子课题资助项目(2015BAI05B00);毕节市成果转化资助项目[毕科成字(2014)8]号;贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(黔科合 SY 字(2014)3078-5 号)。

收稿日期:2015-05-20

induction in different media formulations of varieties of *O. fragrans* groups and the influences of plant growth regulators, sucrose concentration, dark processing time etc. to leaves callus induction of different varieties of *O. fragrans* groups. The results showed that the best way to sterilize pedicels was using 5% NaClO for 3 min, the best way to sterilize leaves was using 0.1% HgCl for 5 min. The best mediums for pedicels of different varieties of *O. fragrans* were as follow, *O. fragrans* 'Boye Jingui' was MS+2.00 mg/L 6-BA+0.40 mg/L 2,4-D, *O. fragrans* 'Zigeng Zi Yingui' was B5+2.00 mg/L 6-BA+0.40 mg/L 2,4-D, *O. fragrans* 'Yucheng Dangui' was B5+1.00 mg/L 6-BA+0.10 mg/L 2,4-D, *O. fragrans* 'Rixiang' was B5+2.00 mg/L 6-BA+0.10 mg/L 2,4-D. The results of leaves callus induction showed that, the best sucrose concentration was 25 g/L; it was best to put the mediums in dark condition for 22 days. The best medium for leaves of *O. fragrans* 'Yucheng Dangui' was MS+3.00 mg/L 6-BA+1.00 mg/L 2,4-D. The best medium for *O. fragrans* 'Tianxiang Taige' was MS+2.00 mg/L 6-BA+0.50 mg/L 2,4-D.

Keywords: tissue culture; callus; *Osmanthus fragrans*; mediums