

泰国巨竹试管快繁研究

周玲, 王晓芹, 林新春

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 以泰国巨竹 *Gigantochloa tekserah* 成熟种胚为材料, 研究不同激素组合对泰国巨竹丛生芽增殖及生根的影响, 建立其试管繁殖体系。结果表明: 泰国巨竹丛生芽的最佳增殖培养基为 MS(Murashige and Skoog)+3 mg·L⁻¹ BA(6-苄基腺嘌呤)+0.01 mg·L⁻¹ TDZ(噻苯隆)+0.3 mg·L⁻¹ NAA(茶乙酸), 增殖系数为 2.11, 芽丛生旺盛; 最优生根培养基为 1/2MS + 3.0 mg·L⁻¹ IBA(吲哚丁酸), 生根率达 70%, 根系发达、粗壮; 试管苗移栽至等配比的泥炭、蛭石、珍珠岩的基质中, 成活率达 100%。图 1 表 2 参 8

关键词: 植物学; 泰国巨竹; 组织培养; 丛生芽; 植物生长调节物质

中图分类号: S723.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2014)05-0817-04

In vitro micropropagation of *Gigantochloa tekserah*

ZHOU Ling, WANG Xiaoqin, LIN Xinchun

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To establish a tissue culture system for commercial propagation, buds induced by mature embryos were used as explants to study the effect of different hormone combinations on bud multiplication and root induction of *Gigantochloa tekserah*. Results showed that for bud multiplication, since the highest proliferation coefficient was 2.11 and cluster buds grew well, Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 3 mg·L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BA), 0.01 mg·L⁻¹ thidiazuron (TDZ), and 0.3 mg·L⁻¹ 1-naphthylacetic acid (NAA) was the optimal medium. The best rooting medium was 1/2 MS supplemented with 3 mg·L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA) because of the rooting rate was up to 70% with long, thick roots. After transferring to an equal ratio mixture of peat, vermiculite, and perlite, the survival rate of hardening plantlets was 100%. [Ch, 1 fig. 2 tab. 8 ref.]

Key words: botany; *Gigantochloa tekserah*; tissue culture; clustered shoots; plant growth regulator

泰国巨竹 *Gigantochloa tekserah* 属禾本科 Poaceae 竹亚科 Bambusoideae 巨竹属 *Gigantochloa*, 主产东南亚及南亚次大陆, 多生于热带雨林中, 中国主要分布于云南地区。泰国巨竹竹竿高大直立, 竹材用途广, 竹笋营养丰富, 是笋材两用竹种^[1]。竹类植物的组织培养起步于 1968 年, 迄今已对刚竹属 *Phyllostachys*, 牡竹属 *Dendrocalamus*, 箬竹属 *Indocalamus* 等 20 余属 70 多个竹种进行了愈伤组织诱导、微体繁殖等研究^[2], 未见泰国巨竹的组织培养方面的报道。本研究通过探索不同植物生长调节物质组合对泰国巨竹试管快繁的影响, 成功建立了其组织培养体系, 能够实现方便地将基因导入需要改良的竹子材

收稿日期: 2013-10-18; 修回日期: 2013-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270677); “十二五”浙江省农业新品种选育“竹木育种协作组”课题(2012C12908-3); 浙江省自然科学基金重点资助项目(Z3100366); 浙江省优先主题重点农业项目(2010C12011)

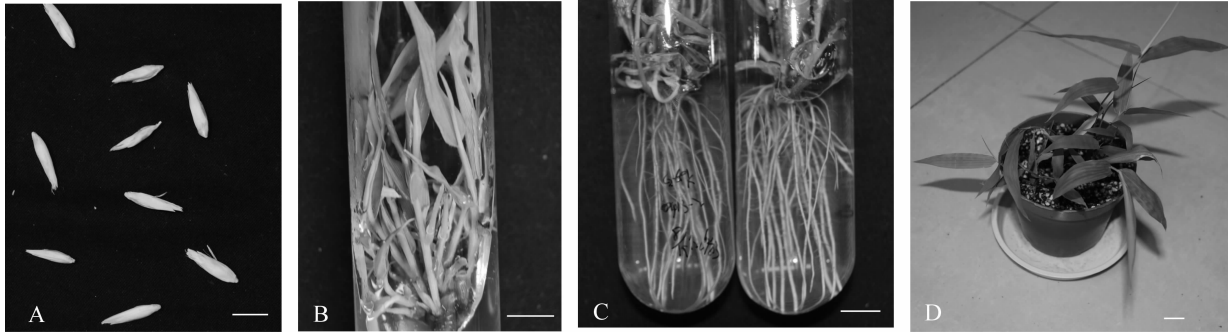
作者简介: 周玲, 从事林木生物技术与种质创新研究。E-mail: 848449187@qq.com。通信作者: 林新春, 教授, 博士, 博士生导师, 从事竹林培育与利用研究。E-mail: lxc@zafu.edu.cn

料中,进行遗传转化得到竹子新品种。同时,试管苗免受季节限制,可以根据科研者的需要随时进行取材,为科学研究提供实验材料。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

泰国巨竹成熟种子采自云南省。种子乳白色,长圆形,千粒质量为71.2 g,大小如图1A。



A.泰国巨竹种子; B.泰国巨竹在MS+3.0 mg·L⁻¹BA+0.010 mg·L⁻¹TDZ+0.3 mg·L⁻¹NAA培养基中增殖; C.泰国巨竹在3.0 mg·L⁻¹IBA培养基中生根; D.练苗移栽后的植株。比例尺为10 mm。

图1 泰国巨竹的试管快速繁殖

Figure 1 In vitro rapid propagation of *Gigantochloa tekserah*

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将泰国巨竹的种子在自来水下冲洗12 h左右,用体积分数约2.5%的次氯酸钠(NaClO)溶液真空抽滤20 min,无菌水冲洗5~6次,在超净工作台上体视显微镜(OLYMPUS SZ61)下剥离种胚,于MS培养基中进行丛生芽增殖培养。约4周后分化出芽,从而获得泰国巨竹的无菌苗。将诱导出的长势一致的芽作为增殖试验的材料。

1.2.2 增殖培养 基本培养基为MS(Murashige and Skoog)培养基,同时添加30 g·L⁻¹蔗糖和8 g·L⁻¹A型琼脂,pH 5.7,并设计了BA(6-苄基腺嘌呤)质量浓度(1.0, 3.0, 10.0 mg·L⁻¹),TDZ(噻苯隆)质量浓度(0, 0.001, 0.010 mg·L⁻¹),KT(激动素)质量浓度(0, 0.3, 1.0 mg·L⁻¹)和NAA质量浓度(0, 0.3, 1.0 mg·L⁻¹)的4因素3水平正交试验。试验材料选择高度约3 cm丛生芽,3个·丛⁻¹,1丛·管⁻¹,20管·处理⁻¹。1月后,观察芽的生长情况。

1.2.3 生根 选取增殖良好的长势一致的丛生芽接种于生根培养基中:1/2 MS+IBA(吲哚丁酸)(0, 1.0, 3.0, 10.0 mg·L⁻¹),共4个处理,20管·处理⁻¹。1月后,观察泰国巨竹生根状况。

1.2.4 练苗与移栽 泰国巨竹在根长4~5 cm左右时放在驯化室强光下(20 000 lx)炼苗1周,之后取出试管苗用温水(30℃左右)洗净根部残余的培养基后,移栽于泥炭、蛭石、珍珠岩的混合基质中并套袋,7 d左右后开始剪袋,15 d左右完全脱袋。期间进行养护管理,1个月后统计移栽成活率。

1.2.5 培养条件与统计分析 培养室温度为(25±2)℃,光照强度2 400 lx,光照时间16 h·d⁻¹。运用SPSS 17.0与DPS 9.50进行数据分析,方差分析采用Duncan法。增殖系数=新生总芽数/接种芽数;试管苗根诱导率=(诱导出根的试管苗/试管苗总数)×100%

2 结果与分析

2.1 植物生长调节物质对泰国巨竹丛生芽增殖的影响

不同植物生长调节物质组合对泰国巨竹芽的增殖产生不同的影响。由R值可看出:BA在芽增殖中作用最大(0.60),KT作用最小(0.02)。由表1可见:当BA质量浓度从1.0 mg·L⁻¹增加到3.0 mg·L⁻¹时,芽增殖系数升高,但当增加到10.0 mg·L⁻¹时,增殖系数下降;KT的添加对芽增殖效果不显著,但随着KT的质量浓度增大,芽褐化较严重,叶片发黄;NAA的添加亦是随着质量浓度的增加,增殖系数先升高后下降,在质量浓度为0.3 mg·L⁻¹时,芽生长良好,绿色、健壮;随着TDZ的质量浓度升高,芽的增

殖系数呈先升高后降低的趋势。综上所述, 处理 6 时, 芽的增殖系数为 2.21, 与其他处理差异显著, 芽生长健壮、叶片鲜绿, 几乎没有褐化, 为最适合的培养基, 即泰国巨竹的最佳增殖培养基为 MS + 3.0 mg·L⁻¹ BA+0.010 mg·L⁻¹ TDZ+0.3 mg·L⁻¹ NAA。

2.2 IBA 对泰国巨竹生根诱导的影响

泰国巨竹的生根状况受 IBA 浓度的影响(表 2), 在没有添加 IBA 的 1/2 MS 培养基中, 只有 2 管生根, 且根纤细, 根数 1~2 条; IBA 质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 时, 生根率升高, 但根仍纤细, 较短。IBA 质量浓度为 3.0 mg·L⁻¹ 时, 生根率达到最大, 为 70%, 生根数为 10 条, 根较粗壮, 植株生长良好(图 1C)。但是, 在添加 10.0 mg·L⁻¹ IBA 的培养基中所诱导出的根粗短、基部膨大, 为畸形根, 且植株发黄, 易褐化, 长势较差。综上所述, 泰国巨竹最优生根培养基为 1/2 MS + 3.0 mg·L⁻¹ IBA。

2.3 移栽

将生根的泰国巨竹组培苗在强光下练苗 1 周, 移栽于等配制比的泥炭、蛭石、珍珠岩的混合基质中, 期间进行观察、浇水等养护管理, 1 个月后苗成活率达 100%(图 1D)。

3 结论与讨论

一般认为内源激素的平衡决定植物器官分化的倾向, 外源激素则通过改变内源激素平衡从而产生作用。为了让内源细胞分裂素和生长素达到一定平衡, 外加的细胞分裂素以及生长素必须达到一定的质量浓度和比例, 才能使器官分化达到预期目的^[3-4]。细胞分裂素可有效地促进芽的萌发与不定芽增殖, 较低浓度的生长素促进茎的伸长生长。本研究运用正交试验讨论了 BA, TDZ, KT, NAA 的组合对泰国巨竹试管繁殖的影响。在一定范围内, 高质量浓度的 BA 能够促进植株的增殖; BA 的质量浓度愈大, 对增殖的影响会越明显。但当质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 时, 芽易褐化, 叶片发黄, 生长不健康。较低质量浓度的 BA 既能在一定程度上促进增殖, 但效果不明显。这与卓仁英^[5]的研究结果一致, 即当 BA 质量浓度过高时可能会对竹类植物生长有一定的抑制或毒害作用。TDZ 在植物组织培养中可以独立使用, 或者与其他植物生长调节物质共同使用, 实现对植物细胞的诱导和调节作用, 具有很强的促进细胞分裂的活性, 能够高效诱导离体材料的再生生长。但若浓度过高则会抑制生长, 导致苗过细、偏黄、生长状况差。陈意涵等^[6]、张铁等^[7]和张桂和^[8]对花秆绿竹 *Bambusa osdhami* f. *striata* 及麻竹 *Dendrocalamns latiflorus* 等研究发现, TDZ 活性明显优于 BA, 添加一定质量浓度的 TDZ 芽的增殖系数显著增加。本实验中选取添加 0.01 mg·L⁻¹ TDZ 的处理, 增殖系数为 2.11, 苗长势良好, 对泰国巨竹植株的增殖生长和伸长生长最有利, 为最适合质量浓度。通过泰国巨竹丛芽诱导实验发现, 培养基中添加 KT 对泰国巨竹的芽增殖生长没有太大意义, 这与王曙光等^[9]的研究结果一致。一般研究认为, 在试管快速繁殖中, 添加一定质量浓度的生长素更有利于诱导生根^[10]。

表 1 不同植物生长调节物质处理的泰国巨竹丛生芽增殖情况

Table 1 Circumstances of different plant growth regulators on buds multiplication of *Gigantochloa tekserah*

处 理	植物生长调节物质/(mg·L ⁻¹)				增殖系数	长势
	BA	TDZ	KT	NAA		
1	1.0	0	0	0	1.02±0.120 9 de	芽不伸长
2	1.0	0.001	0.3	0.3	1.78±0.196 9 ab	叶片偏黄
3	1.0	0.010	1.0	1.0	1.56±0.110 3 bc	叶片黄绿
4	3.0	0	0.3	1.0	1.42±0.096 3 bc	芽簇生
5	3.0	0.001	1.0	0	1.62±0.167 1 ab	芽簇生
6	3.0	0.010	0	0.3	2.21±0.244 0 a	芽簇生, 生长健壮
7	10.0	0	1.0	0.3	1.21±0.097 1 cd	苗枯黄
8	10.0	0.001	0	1.0	1.12±0.085 6 d	苗易褐化
9	10.0	0.010	0.3	0	1.11±0.174 5 d	生长差
x ₁	1.45	1.210	1.45	1.26		
x ₂	1.75	1.630	1.44	1.73		
x ₃	1.15	1.510	1.46	1.37		
R	0.60	0.420	0.02	0.47		

说明: 表中增殖系数代表平均值±标准误; 多重比较采用 Duncan 法, 数值后有相同字母表示差异不显著(P<0.05)。x 为各因素在同一水平实验指标(增殖系数)的平均数。R=x_{max}-x_{min}。

表 2 不同质量浓度 IBA 处理的泰国巨竹诱导生根情况

Table 2 Circumstances of different concentrations of IBA on roots induction of *Gigantochloa tekserah*

IBA /(mg·L ⁻¹)	接种数/管	生根率/%	生根数/条	根状况
0	20	10	1.50 ± 0.500 a	纤细, 较短
1.0	20	15	4.00 ± 1.000 a	纤细, 较短
3.0	20	70	10.00 ± 1.000 b	粗壮, 较长
10.0	20	40	8.13 ± 1.125 b	粗短, 膨大

说明: 表中生根数代表平均值±标准误; 多重比较采用 Duncan 法, 同一栏中有相同字母表示差异不显著(P<0.05)。

本实验中, 泰国巨竹在未添加植物生长调节物质的 1/2 MS 中诱导的根数量少, 较纤细, 对于移栽成活不利^[6, 11]。在培养基中添加 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 时, 试管苗生根率最高, 根粗壮、发达, 生长最好。但质量浓度过高 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 所诱导的根基部膨大、较短, 为畸形根, 植株长势较差, 易褐化, 这与刘倩倩等^[11]的研究结果相同。练苗移栽在试管快繁技术中是很重要的一环, 练苗是否过关直接限制了工厂化育苗能否成功运行。同时, 练苗成活率直接影响繁殖系数, 最终影响商业化生产规模。本实验将生根的泰国巨竹组培苗在强光下练苗 1 周, 移栽于等配制比的泥炭、蛭石、珍珠岩的混合基质中, 成活率达 100%。

本研究利用正交实验研究了泰国巨竹芽的增殖状况, 之后进行生根诱导, 从而成功获得完整植株, 对于其他巨竹属的组织培养研究具有一定参考性。竹子种子很难获得, 且通过种胚快繁产生幼苗的变异性较大, 优良性状难以保持。采用变异性小的幼枝节段进行快速繁殖, 还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 耿伯介, 王正平. 中国植物志: 第 9 卷第 1 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 434 - 435.
- [2] 张春霞, 谢寅峰, 张幼法, 等. 竹子组织培养研究的进展及应用前景[J]. 竹子研究汇刊, 1999, **18**(3): 46 - 49.
ZHANG Chunxia, XIE Yinfeng, ZHANG Youfa, *et al.* The current advance of bamboo tissue culture and its prospective [J]. *J Bamboo Res*, 1999, **18**(3): 46 - 49.
- [3] 杨南, 李福秀, 普晓兰, 等. 竹类植物育苗技术的研究进展[J]. 竹子研究汇刊, 2008, **27**(3): 37 - 41.
YANG Nan, LI Fuxiu, PU Xiaolan, *et al.* Advances in bamboo breeding technology [J]. *J Bamboo Res*, 2008, **27**(3): 37 - 41.
- [4] 谢利娟, 韩蕾, 钱永强, 等. 爆仗竹组培快繁 6-BA 与 NAA 组合浓度配比优化分析[J]. 核农学报, 2005, **19**(3): 181 - 185.
XIE Lijuan, HAN Lei, QIAN Yongqiang, *et al.* Optimization of the concentration of 6-BA and NAA in the rapid propagation of *Russelia equisetiformis* [J]. *Acta Agric Nucl Sin*, 2005, **19**(3): 181 - 185.
- [5] 卓仁英. 竹子生物技术育种研究进展[J]. 浙江林学院学报, 2003, **20**(4): 424 - 428.
ZHUO Renying. Advances of bamboo molecular breeding [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2003, **20**(4): 424 - 428.
- [6] 陈懿涵, 桂仁意, 林新春, 等. 花秆绿竹试管快速繁殖[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25**(3): 397 - 400.
CHEN Yihan, GUI Renyi, LIN Xinchun, *et al.* Micropropagation of *Bambusa oldhami* f. *striata* by tissue culture [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25**(3): 397 - 400.
- [7] 张铁, 万京. 勃氏甜龙竹的组培快繁[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2004, **13**(3): 203 - 206.
ZHANG Tie, WAN Jing. The organizationl culture and quick proliferate propation of *Dendrocalamus brandisi* [J]. *J Yunnan Minzu Univ Nat Sci Ed*, 2004, **13**(3): 203 - 206.
- [8] 张桂和. 麻竹茎尖培养及离体快繁研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1997, **15**(4): 298 - 303.
ZHANG Guihe. Studies on shoot-tip culture and in-vitro propagation of *Dendrocalamus latiflorus* [J]. *Nat Sci J Hainan Univ*, 1997, **15**(4): 298 - 303.
- [9] 王曙光, 丁雨龙, 林树燕, 等. 慈竹组织培养消毒方法筛选及丛芽诱导研究[J]. 西部林业科学, 2013, **42**(1): 38 - 41.
WANG Shuguang, DING Yulong, LIN Shuyan, *et al.* Optimization of disinfection method for *Neosinocalamus affinis* and its multiple shoot induction[J]. *J West China For Sci*, 2013, **42**(1): 38 - 41.
- [10] HUANG L C, MURASHIGE T. Tissue culture investigations of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa* [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1983, **24**: 31 - 52.
- [11] 张有珍, 刘倩倩, 何冬冬, 等. 铺地竹试管快速繁殖研究[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(1): 151 - 154.
ZHANG Youzhen, LIU Qianqian, HE Dongdong, *et al.* In vitro micropropagation of *Sasa argenteastriatus* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, **29**(1): 151 - 154.