

花秆绿竹试管快速繁殖

陈懿涵, 桂仁意, 林新春, 杨海芸, 黄丽春

(浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 花秆绿竹 *Bambusa oldhami* f. *striata* 是绿竹 *Bambusa oldhami* 的一个变型。以花秆绿竹的侧芽为材料, 研究不同质量浓度 6-苄基腺嘌呤(BA)及噻二唑苯基脲(TDZ)对花秆绿竹试管快繁的影响。结果表明: 单独添加 BA 或 TDZ, 随其质量浓度增加, 增殖系数逐渐上升, 但伸长生长受到抑制, 添加 TDZ 的效果显著优于 BA; BA 和 TDZ 相互作用时, 以 $3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 与 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 结合时芽体增殖及伸长生长最佳, 芽丛生长期旺盛; 培养过程中降低或去除细胞分裂素即可生根。表 2 参 10

关键词: 植物学; 花秆绿竹; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S723.1; Q813.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2008)03-0397-04

Micropropagation of *Bambusa oldhami* f. *striata* by tissue culture

CHEN Yi-han, GUI Ren-yi, LIN Xin-chun, YANG Hai-yun, HUANG Li-chun

(The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Bambusa oldhami* f. *striata* is a forma of *Bambusa oldhami*, having good ornamental value. This aim is to establish a tissue culture system for its commercial propagation. The new tender lateral bud were taken as the explants, Murashige and Skoog (MS) medium + $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar + $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Gelrite was the basic medium, and 6-Benzylaminopurine (BA) ($0, 0.30, 1.00, 3.00, 10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and thidiazuron (TDZ) ($0, 0.01, 0.10, 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were added respectively to determine suitable concentration for tissue culture. The results showed that the shoot proliferation rate gradually increased with the concentration increasing of BA or TDZ, the effect of TDZ was better than BA, but the height growth of shoot was suppressed. $3.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ was the best combination for shoot proliferation and shoot height growth. Declining or removing the cytokine could promote rooting. [Ch, 2 tab. 10 ref.]

Key words: botany; *Bambusa oldhami* f. *striata*; tissue culture; vegetative propagation

绿竹 *Bambusa oldhami* 为禾本科 Gramineae 多年生常绿竹类植物。绿竹竹竿一般较高大, 近直立, 可做建筑用材或劈篾编制用具; 绿竹竹纤维较长, 可作为造纸原料; 绿竹笋质嫩鲜美, 可供鲜食, 也可加工制成笋干或罐头; 绿竹竹茹可做中药药材^[1]。作者研究的花秆绿竹 *Bambusa oldhami* f. *striata* 除食用及其他实用价值与绿竹相同外, 竹竿上还呈现黄色条带, 具有较好的观赏价值。1981 年竹子组织培养成功建立试管培养及无性繁殖, 之后研究者相继报道了白绿竹 *B. oldhami*, 箬竹 *Sasa pygmaea*, 凤凰竹 *Bambusa multiplex*, 人面竹 *Phyllostachys aurea*, 印度簕竹 *Bambusa arundinacea*, 以及马甲竹 *B. tulda* 等 20 多个竹种的组织培养; 张光楚等^[2-7]主要集中在绿竹, 龙竹 *Dendrocalamus giganteus*, 麻竹 *D. latiflorus* 及一些丛生观赏竹的组织培养研究。作者在前人研究基础上, 以花秆绿竹侧芽茎尖为材料进行组织培养, 探讨试管快繁的条件, 为该竹种扩繁及工厂化提供技术支持。

收稿日期: 2007-10-22; 修回日期: 2008-03-04

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y305235); 浙江省重大科技攻关项目(2004C12034)

作者简介: 陈懿涵, 硕士, 从事竹类植物组织培养研究。E-mail: cyh-712@163.com。通信作者: 黄丽春, 教授, 博士, 从事竹类植物组织培养及其他经济植物生物技术研究。E-mail: bolch@gate.sinica.edu.tw

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验外植体材料来自浙江林学院智能温室盆栽花秆绿竹植株,取新生嫩枝上2~7 cm侧芽作为培养材料。

1.2 试验方法

1.2.1 材料来源 取材前2周,先以抗菌药品分别喷施于花秆绿竹植株上,进行净化处理。取材时切下侧芽,放入盛有无菌水的烧杯中带回实验室备用。清水洗净后,置于超净工作台内,以 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的次氯酸钠溶液真空抽滤消毒20 min,再用无菌水冲洗5次,最后在解剖显微镜下切取约0.8~1.2 cm长的生长点,每管1个芽,接种于诱导培养基MS (Murashige and Skoog) + $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄基腺嘌呤(BA) + $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ α -萘乙酸(NAA) + $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 固化剂(Gelrite)上, pH 5.7,将获得的花秆绿竹生长一致的芽作为增殖试验的材料。

1.2.2 试验设计 以MS为基本培养基预培养1周后,进行增殖培养。该阶段分别研究BA, TDZ以及BA与TDZ组合对芽增殖和植株生长的影响:BA的质量浓度为0, 0.30, 1.00, 3.00, 10.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, TDZ的质量浓度为0, 0.01, 0.10, 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;研究BA (0.30, 1.00, 3.00, 10.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)与TDZ (0.01, 0.10, 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)相互组合对芽增殖和植株生长的影响。培养基pH值均调至5.7,蔗糖 $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Gelrite $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

每试管加入20.0 mL培养基,置于高温高压灭菌锅中灭菌10 min。以上试验每个处理20管,每管接种1个芽,每芽高度约2.0 cm。置于温度为 $(25\pm2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、每天光照/黑暗为16/8 h,光强为2400 lx的培养室中。

1.2.3 数据分析 增殖试验4周后,观察并调查试管苗芽增殖与生长情况。增殖系数=新生总芽数/接种总芽数。

2 结果与分析

2.1 无菌培养体系的建立

以0.8~1.2 cm的茎尖小芽为外植体,接种1周后,污染率低于5%,萌芽率达90%以上。已萌芽的外植体生长势旺盛,芽体粗壮并有新芽产生且无褐化现象。

2.2 不同质量浓度BA和TDZ分别对花秆绿竹试管苗生长的影响

花秆绿竹经初期培养生长稳定后,可对其进行增殖培养。花秆绿竹在不同BA质量浓度的增殖培养基中培养,4周后芽体增殖情况如表1所示:随BA质量浓度增加,增殖系数提高。未添加BA的对照培养基中芽增殖缓慢,茎秆较长;BA质量浓度为 $10.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,增殖系数最大,达到3.6,但芽茎秆细弱矮小;BA质量浓度 $0.30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时芽伸长生长迅速,平均芽长为2.3 cm,但与BA $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或BA $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的差异不明显,BA $3.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和BA $10.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与低质量浓度的BA ($0\sim1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)相比较,在促进芽增殖上差异明显,但高质量浓度BA条件下的植株明显矮小,芽数较多呈现小丛生长且茎秆细弱;而低质量浓度BA条件下植株的茎秆比较粗壮,植株生长比较旺盛。

由表1可看出:4个不同质量浓度的TDZ的处理中,低质量浓度与高质量浓度处理之间的芽增殖系数差异明显,低质量浓度的TDZ即 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与对照处理中,芽增殖系数差异较小,TDZ为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 间的增殖差异也不明显;芽的伸长生长在TDZ $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最为迅速,平均芽长达到2.4 cm,但芽的增殖缓慢;随着TDZ质量浓度的增大,芽的伸长生长在不同处理间差异不太明显,但有随TDZ的质量浓度升高而减缓的趋势。

2.3 不同质量浓度BA和TDZ组合对花秆绿竹试管苗生长的影响

采用BA 4个质量浓度,TDZ 3个质量浓度,共12个组合的处理,如表2。结果表明,TDZ质量浓度为 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着BA质量浓度增大,增殖系数增大,BA $10.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增殖系数达到5.0,但植株基部有较多褐色物质;当TDZ质量浓度为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,变化趋势与TDZ $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

表 1 BA 和 TDZ 分别对花秆绿竹生长的影响

Table 1 Effect of different concentration of BA and TDZ on growth of *Bambusa oldhami* f. *striata*

处理	培养基植物生长调节物质 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	接种 数/个	新生芽 数/个	芽增殖 系数	芽长/cm	芽生长情况
1	0	20	28	1.4 c	2.15 ab	新生芽少，芽较长，根长而细
2	BA 0.30	20	40	2.0 bc	2.28 ab	新生芽较少，但芽伸长生长迅速
3	BA 1.00	20	48	2.0 b	2.00 ab	新生芽较少，但茎秆粗壮，芽较长
4	BA 3.00	20	58	2.9 b	1.95 bc	新生芽较多，但小丛生生长，茎秆较细
5	BA 10.00	20	72	3.6 a	1.92 bc	新生芽较多，但小丛生生长，茎秆较细新生芽
6	TDZ 0.01	20	32	1.6 c	2.43 a	较少，但芽伸长生长迅速，茎秆粗壮
7	TDZ 0.10	20	74	3.7 a	1.97 b	芽增殖明显，芽茎秆细弱，黄化
8	TDZ 1.00	20	76	3.8 a	1.64 c	芽增殖明显，芽茎秆细弱，短小

说明：基本培养基为 MS；同列不同字母代表在 0.05 水平差异显著。

表 2 不同质量浓度 BA 和 TDZ 组合对花秆绿竹生长的影响

Table 2 Effect of different hormone combination on growth of *Bambusa oldhami* f. *striata*

处理	植物生长调节物质/(mg·L ⁻¹)		接种 数/个	新生芽 数/个	芽增殖 系数	芽长/cm	芽生长情况
	BA	TDZ					
1	0.3	0.01	20	36	1.8 d	2.04 a	新芽生长较少，但伸长生长迅速
2	1.0	0.01	20	60	3.0 c	1.99 ab	叶片舒展，新生小芽较少
3	3.0	0.01	20	58	2.9 c	1.91 ab	叶片舒展，新生小芽较少
4	10.0	0.01	20	100	5.0 ab	1.43 c	基部有大量褐色物质，小芽多但矮小
5	0.3	0.10	20	78	3.9 b	1.75 b	叶片较绿，植株伸长生长较缓
6	1.0	0.10	20	76	3.8 bc	1.93 ab	叶绿色，新生芽生长良好
7	3.0	0.10	20	74	3.7 bc	1.99 ab	叶绿色，新生芽个体较大，生长良好
8	10.0	0.10	20	116	5.8 a	1.40 c	基部有褐色物质，新生芽较多
9	0.3	1.00	20	84	4.2 b	1.62 bc	植株矮小，整丛小芽生长异常，茎秆细
10	1.0	1.00	20	74	3.7 bc	1.59 bc	弱，叶色偏黄，基部褐化较明显
11	3.0	1.00	20	70	3.5 bc	1.67 bc	植株矮小，整丛小芽生长异常，茎秆细
12	10.0	1.00	20	94	4.7 ab	1.35 c	弱，叶色偏黄，基部褐化较明显

说明：基本培养基为 MS。

时相同，10.00 mg·L⁻¹BA +0.10 mg·L⁻¹TDZ 在 12 个处理中增殖芽数最多，但芽很细弱；3.00 mg·L⁻¹BA + 0.10 mg·L⁻¹TDZ 时，植株茎秆粗壮，新生的小芽生长旺盛，无水化、褐化现象，增殖较明显；TDZ 质量浓度为 1.00 mg·L⁻¹，BA 各不同质量浓度处理的芽增殖数量也较多，但是植株矮小并有整丛小芽生长异常的情况，植株褐化较严重。因此，花秆绿竹的最佳繁殖培养基为 3.00 mg·L⁻¹BA + 0.10 mg·L⁻¹TDZ。

2.4 移栽驯化

将生根的试管苗移至驯化室，在强光(2 万 lx)下驯化 2 周后，即可移栽。移栽时用清水洗去根部的培养基，将植株移至泥炭、珍珠岩、蛭石比例为 1：1：1 的基质中，单个花盆套袋。移栽后每 2 d 将塑料袋剪口 1 次，1 周后完全脱袋并移入温室，成活率达 80%。

3 结论与讨论

生物技术在竹类植物研究上有独特的意义，其应用不仅仅局限于通过组培进行快速繁殖，更在于

通过基因转化和细胞系筛选等途径,培育出符合需求的新品种,缩短育种周期^[8]。花秆绿竹为绿竹属一个变型,具有较高的观赏性,但此前关于其组培快繁技术的研究尚未见报道。

本实验首次探讨 BA 和 TDZ 单独添加与组合时对花秆绿竹试管繁殖的影响。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。较低质量浓度的 BA 既能在一定程度上促进增殖,也可以促进芽的伸长生长。卓仁英等^[8,9]认为当 BA 过高时可能会对植株生长起到一定的抑制或毒害,与本研究的结果一致。高质量浓度的 TDZ 可以明显促进植株的细胞分裂,从而达到较好的增殖效果,但若过高则会抑制植株的生长,使得芽体过细且黄化,因此在培养基中添加一定质量浓度的 TDZ 才利于植株的增殖和伸长生长。分别添加 TDZ 和 BA 时,TDZ 的细胞分裂素活性比 BA 的作用更为显著,增殖生长的效果明显优于 BA。当这 2 种植物生长调节物质相互作用时增殖系数比单独使用其中一种效果显著,新生小芽生长健壮,植株茎秆较粗壮。花秆绿竹的生根比较容易,降低或去除细胞分裂素的质量浓度即会自然发根,且根系生长良好。

在繁殖过程中,单个芽体培养生长势比较弱,若以 3~5 个小芽为一丛进行繁殖会更利于花秆绿竹的生长。褐化在竹类组培中是常见的现象^[10],但是在花秆绿竹的繁殖过程中,这一现象表现不突出,每 4 周继代一次即可减少植株受到酚类氧化物的毒害。

参考文献:

- [1] 耿伯介,王正平.中国植物志:第9卷第1分册被子植物门双子叶植物纲禾本科(1)竹亚科[M].北京:科学出版社,1996:141.
- [2] HUANG L C. Tissue culture investigation of bamboo (Bambusoideae, Poaceae)[D]. Riverside: University of California, 1981.
- [3] HUANG L C, MURASHIGE T. Tissue culture investigation of bamboo (I) callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys*, and *Sasa* [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1983, **24**: 31-52.
- [4] HUANG L C, CHEN W L, HUANG B L. Tissue culture investigations of bamboo (IV) organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices [J]. *Environ Exper Bot*, 1989, **29**: 307-315.
- [5] SAXENA S. In vitro propagation of bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 431-434.
- [6] 张光楚,陈富枢,王裕霞,等.麻竹离体快繁技术的研究[J].竹类文摘,1993, **6**(1): 45-47.
- [7] 王光萍,丁雨龙.几种观赏竹种组织培养研究[J].竹子研究汇刊,2002, **21**(2): 5-9.
- [8] 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.
- [9] 陈锐亮,杨振德.壮绿竹茎段培养的初步研究[J].广西热作科技,1999(3): 20-21.
- [10] 张铁,万京.勃氏甜龙竹的组培快繁[J].云南民族大学学报,2004, **13**(3): 203-206.