

花叶花秆绿竹的试管快繁研究

裴海燕, 方伟, 林新春, 桂仁意, 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: 以花叶花秆绿竹 *Bambusa oldhamii* f. *variegata* 腋芽为外植体, 筛选增殖最佳芽数 3 个·丛⁻¹ 来研究不同种类和质量浓度的植物生长调节剂对花叶花秆绿竹增殖的影响。结果表明: 单独添加时, 6-苄基腺嘌呤(BA)和噻二唑苯基脲(TDZ)效果优于激动素(KT)和 2-异戊烯基腺嘌呤(2ip); BA 和 TDZ 相互作用时, 效果优于各自单独添加。当 0.01 mg·L⁻¹ TDZ 与 3.00 mg·L⁻¹BA 结合时, 芽体增殖最佳, 增殖系数达 4.63, 芽丛生旺盛。外植体经 50.00 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA)处理 1 d, 再转移到 MS(Murashige and Skoog)基本培养基上, 发根率最大, 达 55%, 根系发达, 试管苗移栽成活率达 85%以上。图 1 表 4 参 13

关键词: 森林培育学; 花叶花秆绿竹; 组织培养; 丛生芽; 快速繁殖

中图分类号: S723.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2010)01-0149-06

Micropropagation of *Bambusa oldhamii* f. *variegata* by tissue culture

PEI Hai-yan, FANG Wei, LIN Xin-chun, GUI Ren-yi, HUANG Li-chun

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

Abstract: *Bambusa oldhamii* f. *variegata* is a form of *Bambusa oldhamii*, having good ornamental and economic value. This aim is to establish a tissue culture system for its commercial propagation. Multiplication of *B. oldhamii* f. *variegata* using different plant growth regulators and concentrations was studied with the lateral buds as the explant and three shoots per cluster. The results showed that 0.1 mg·L⁻¹ thidiazuron(TDZ) was best with the proliferation rate up to 3.60 when TDZ (0.000 1, 0.001 0, 0.010 0, 0.100 0, 1.000 0 mg·L⁻¹), 6-benzylaminopurine (BA)(1, 3, 5, 10 mg·L⁻¹), 2-isopentenyladenine (2ip) (1, 3, 5, 10 mg·L⁻¹) and kinetin (KT)(1, 3, 5, 10 mg·L⁻¹) were added respectively to determine suitable concentration for tissue culture, but the highest proliferation rate 4.63 was obtained with 3.00 mg·L⁻¹ BA + 0.01 mg·L⁻¹ TDZ when the combination of BA(0.001, 0.010, 0.100, 1.000, 3.000 mg·L⁻¹), TDZ (0.000 1, 0.001 0, 0.010 0, 0.100 0 mg·L⁻¹), and also good growing. Three shoots per cluster was treated only with 50.00 mg·L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA) for 1 day, then the explants were transferred to MS(Murashige and Skoog) basic medium, After 30 days the rooting rate was up to 55 percent, and developed well. The survival rate of transplanted potted plants was above 85 percent. [Ch, 1 fig. 4 tab. 13 ref.]

Key words: silviculture; *Bambusa oldhamii* f. *variegata*; tissue culture; clustered shoot; rapid propagation

花叶花秆绿竹 *Bambusa oldhamii* f. *variegata* 属禾本科 Gramineae 竹亚科 Bambusoideae 箬竹属 *Bambusa* 变型, 具有绿竹 *Bambusa oldhamii* 的特点^[1], 竹秆高大直立, 竹材纤维长, 竹秆与叶片现白绿条纹, 具有独特的观赏价值, 属珍稀观赏竹种。竹笋笋质脆嫩, 营养丰富, 含有多种人体必需的氨

收稿日期: 2009-02-02; 修回日期: 2009-06-02

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2006C12008); 经济竹类新品种选育关键技术研究与示范项目(2006C12008)

作者简介: 裴海燕, 硕士, 从事植物组织培养研究。E-mail: msphy233@163.com。通信作者: 黄丽春, 教授, 博士, 从事竹类植物及其他经济植物生物技术等研究。E-mail: bolch@gate.sinica.edu.tw

伸长到 2 ~ 3 cm。约 20 d 后，有的外植体基部产生少量丛生芽，芽体健壮且无褐化或轻微褐化，4 周后仍用此培养基继代培养，材料生长正常。

2.2 增殖培养

2.2.1 每丛芽数对花叶花秆绿竹增殖的影响 花叶花秆绿竹经初期培养生长稳定后，对它们进行增殖培养。筛选出长势一致丛生芽，1 芽·丛⁻¹，3 芽·丛⁻¹和 5 芽·丛⁻¹接种于 MS + 0.500 0 mg·L⁻¹BA + 30.000 0 g·L⁻¹蔗糖 + 2.500 0 g·L⁻¹固化剂的培养基中培养 30 d。试验结果(图 1)表明：每丛芽数都可以使试管苗持续增殖，节芽分蘖形成丛生芽，但在相同的时间内(仅 30 d)，增殖率差异显著，3 芽·丛⁻¹平均增殖芽数最高可达 2.05，外植体褐化轻，长势旺盛，可在此基础上做进一步的增殖探讨。此外，1 芽·丛⁻¹时，外植体褐化严重，生长缓慢；5 芽·丛⁻¹的平均芽长度也不及 3 芽·丛⁻¹。

2.2.2 植物生长调节剂对花叶花秆绿竹增殖的影响 ①不同植物生长调节剂对花叶花秆绿竹增殖的影响。从表 1 中可以看出：不同植物生长调节剂对花叶花秆绿竹增殖影响很大，且分别随着质量浓度的增加，增殖系数提高。BA 和 TDZ 的增殖效果明显，KT 和 2ip 明显不及 BA 和 TDZ。②当 BA 质量浓度是 5.000 0 mg·L⁻¹时，增殖系数最大可达 2.95，但此时的外植体褐化较重，茎秆纤弱，植株矮小，不利于新生小芽的生长；当 BA 质量浓度是 10.000 0 mg·L⁻¹时，芽数很多呈现小丛生长，但畸形芽、黄化苗也明显增多，褐化严重以致死亡，新芽茎秆细弱，长势不好；当 BA 为 3.000 0 mg·L⁻¹时，增殖系数较大，植株的茎秆比较粗壮，长势健壮，有利于丛生芽增殖健壮生长。低质量浓度与高质量浓度 TDZ 的各处理之间，芽增殖系数差异显著。低质量浓度 TDZ 即 0.000 1 和 0.001 0 mg·L⁻¹与对照处理比较，芽增殖系数差异不明显，增殖系数小，TDZ 质量浓度在 0.010 0, 0.100 0 mg·L⁻¹时芽增殖系数都比较大，差异很小，但 TDZ 0.010 0 mg·L⁻¹，芽伸长较迅速，平均芽长最长，适合花叶花秆绿竹丛生芽增殖。TDZ 质量浓度 0.100 0, 1.000 0 mg·L⁻¹时，芽长呈减缓降低趋势，外植体褐化、黄化加剧，并出现玻璃化。③BA 和 TDZ 组合对花叶花秆绿竹增殖的影响。表 1 的试验结果表明，花叶花秆绿竹分别在 BA 和 TDZ 中增殖效果较好，因此，采用 BA 5 个质量浓度，TDZ 4 个质量浓度，共 20 个组合的处理，做进一步的增殖探讨，结果如表

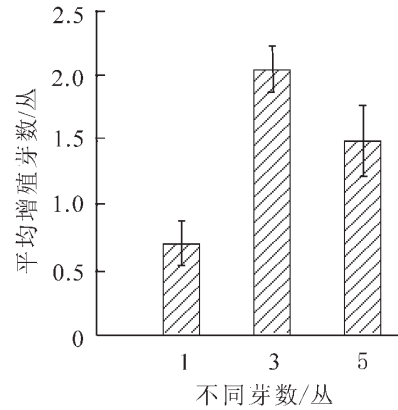


图 1 每丛芽数对花叶花秆绿竹增殖的影响

Figure 1 Effect of shoot numbers per clustered on multiplication of *Bambusa oldhamii* f. *variegata*

表 1 不同植物生长调节剂对花叶花秆绿竹增殖的影响

Table 1 Effect of different hormone on multiplication of *Bambusa oldhamii* f. *variegata*

| 处理号 | 植物生长调节物质/(mg·L ⁻¹) | 接种丛数/个 | 新生丛数/个 | 芽增殖系数 |
|-----|--------------------------------|--------|--------|----------|
| 1 | 对照 | 20 | 35 | 1.75 h |
| 2 | BA 1.000 0 | 20 | 48 | 2.40 de |
| 3 | BA 3.000 0 | 20 | 55 | 2.75 cd |
| 4 | BA 5.000 0 | 20 | 59 | 2.95 bc |
| 5 | BA 10.000 0 | 20 | 47 | 2.35 ef |
| 6 | KT 1.000 0 | 20 | 38 | 1.90 fgh |
| 7 | KT 3.000 0 | 20 | 45 | 2.25 efg |
| 8 | KT 5.000 0 | 20 | 46 | 2.30 efg |
| 9 | KT 10.000 0 | 20 | 37 | 1.85 gh |
| 10 | 2ip 1.000 0 | 20 | 40 | 2.00 fgh |
| 11 | 2ip 3.000 0 | 20 | 41 | 2.05 efg |
| 12 | 2ip 5.000 0 | 20 | 44 | 2.20 efg |
| 13 | 2ip 10.000 0 | 20 | 39 | 1.95 efg |
| 14 | TDZ 0.000 1 | 20 | 36 | 1.80 gh |
| 15 | TDZ 0.001 0 | 20 | 41 | 2.05 fgh |
| 16 | TDZ 0.010 0 | 20 | 67 | 3.35 ab |
| 17 | TDZ 0.100 0 | 20 | 72 | 3.60 a |
| 18 | TDZ 1.000 0 | 20 | 55 | 2.75 cd |

说明：3 芽·丛⁻¹；同列不同字母代表在 0.05 水平差异显著。

2。TDZ质量浓度为0.000 1 mg·L⁻¹时,随着BA质量浓度的升高,增殖系数逐渐提高,且最大达3.95,但从芽基部褐色物质增多,不利于新芽生长。TDZ质量浓度为0.001 0 mg·L⁻¹时,变化趋势与TDZ 0.000 1 mg·L⁻¹基本相同,当BA质量浓度是3.000 0 mg·L⁻¹时,增殖系数达4.15,与同组其他4个处理差异明显,并且新生小芽长势旺盛,无褐化、水化现象,较适宜花叶花秆绿竹增殖培养。TDZ质量浓度为0.010 0 mg·L⁻¹时,在BA的5个质量浓度下,BA 1.000 0, BA 3.000 0 mg·L⁻¹与其他3个处理有明显差异,都适宜花叶花秆绿竹增殖培养,但20个处理最大增殖系数BA 3.000 0 mg·L⁻¹时可达4.65,植株茎秆粗壮,叶片舒展鲜绿,新生芽长势旺盛,小芽生长较快,花叶花秆绿竹增殖最理想。TDZ质量浓度为0.100 0 mg·L⁻¹时,对应BA的5个质量浓度中也都有增殖,但植株矮小,叶片卷曲发黄,并有畸形芽出现,不适宜从芽增殖。因此,目前花叶花秆绿竹增殖最佳培养基MS + 3.000 0 mg·L⁻¹BA + 0.010 0 mg·L⁻¹TDZ。

2.3 生根培养基筛选

2.3.1 吲哚丁酸(IBA)处理不同天数对生根诱导的影响 竹子生根难,生根诱导也是竹类试管快繁成功的关键。生根培养通常是在培养基上加生长素类物质,但外植体长期在富含生长素的培养基上普遍易褐化死亡,竹类更加明显。花叶花秆绿竹经50.000 0 mg·L⁻¹的IBA处理1 d,再转移到MS培养基上,15 d后开始生根,30 d时生根率可达55%,且根系发达健壮。IBA处理的天数增多时,也有发根现象(表3),但20 d后,明显看出发根苗发褐变黄,叶片卷曲干枯,试管苗难以继续生长。

2.3.2 不同质量浓度的IBA对生根诱导的影响 无论是对照组还是经不同质量浓度IBA处理1 d,分别接种到MS基本培养基上,30 d调查分析,都有发根现象,差异较显著。相对来说,IBA 50.000 0 mg·L⁻¹的处理中,试管苗基部萌动力强,根系粗壮发达,且上部的丛芽簇叶片明显舒展,伸长生长较

表2 植物生长调节剂组合对花叶花秆绿竹增殖的影响

Table 2 Effect of combination hormone on multiplication of *Bambusa oldhamii* f. *variegata*

| 处理号 | 植物生长调节物质质量浓度/(mg·L ⁻¹) | | 接种丛数/个 | 新生丛数/个 | 芽增殖系数 multiplication |
|-----|------------------------------------|---------|--------|--------|----------------------|
| | BA | TDZ | | | |
| 1 | 0.001 0 | 0.000 1 | 20 | 25 | 1.25 i |
| 2 | 0.010 0 | 0.000 1 | 20 | 31 | 1.55 hi |
| 3 | 0.100 0 | 0.000 1 | 20 | 35 | 1.75 h |
| 4 | 1.000 0 | 0.000 1 | 20 | 70 | 3.50 cdef |
| 5 | 3.000 0 | 0.000 1 | 20 | 79 | 3.95 bede |
| 6 | 0.001 0 | 0.001 0 | 20 | 61 | 3.05 g |
| 7 | 0.010 0 | 0.001 0 | 20 | 63 | 3.15 g |
| 8 | 0.100 0 | 0.001 0 | 20 | 65 | 3.25 defg |
| 9 | 1.000 0 | 0.001 0 | 20 | 75 | 3.75 bede |
| 10 | 3.000 0 | 0.001 0 | 20 | 83 | 4.15 abc |
| 11 | 0.001 0 | 0.010 0 | 20 | 73 | 3.65 bedef |
| 12 | 0.010 0 | 0.010 0 | 20 | 75 | 3.75 bede |
| 13 | 0.100 0 | 0.010 0 | 20 | 80 | 4.0 bed |
| 14 | 1.000 0 | 0.010 0 | 20 | 85 | 4.25 ab |
| 15 | 3.000 0 | 0.010 0 | 20 | 93 | 4.65 a |
| 16 | 0.001 0 | 0.100 0 | 20 | 61 | 3.05 g |
| 17 | 0.010 0 | 0.100 0 | 20 | 77 | 3.85 bedef |
| 18 | 0.100 0 | 0.100 0 | 20 | 78 | 3.90 bc |
| 19 | 1.000 0 | 0.100 0 | 20 | 67 | 3.35 efg |
| 20 | 3.000 0 | 0.100 0 | 20 | 59 | 2.95 g |

说明:3个芽·丛⁻¹;同列不同字母代表在0.05水平差异显著。

表3 IBA处理不同天数对生根诱导的影响

Table 3 Different treatment time of IBA treatments on rooting of *Bambusa oldhamii* f. *variegata*

| 50 mg·L ⁻¹ IBA处理/d | 接种丛数/个 | 新生丛数/个 | 生根率/% |
|-------------------------------|--------|--------|-------|
| 0 | 20 | 4 | 20 b |
| 1 | 20 | 11 | 55 a |
| 2 | 20 | 7 | 35 ab |
| 3 | 20 | 3 | 15 b |

表4 不同质量浓度IBA对生根诱导的影响

Table 4 Effect of different concentrations IBA on rooting of *Bambusa oldhamii* f. *variegata*

| IBA质量浓度/(mg·L ⁻¹) | 接种丛数/个 | 新生丛数/个 | 生根率/% |
|-------------------------------|--------|--------|-------|
| 0 | 20 | 4 | 20 b |
| 25.000 0 | 20 | 5 | 25 b |
| 50.000 0 | 20 | 11 | 55 a |
| 75.000 0 | 20 | 8 | 40 ab |
| 100.000 0 | 20 | 3 | 15 b |

好，茎秆长势旺盛，上下协同生长效果好。IBA 质量浓度过高时，达 $100.000\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，发根率已降低，叶片卷曲，茎叶枯黄，不易练苗成活(表 4)。花叶花秆绿竹发根较难，用 $0.300\ 0$ 或 $1.000\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA)均不能发根。综上分析，目前花叶花秆绿竹发根较好培养基是 $50.000\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理 1 d，再转移到 MS 基本培养基中。

3 结论与讨论

在丛生竹试管繁殖过程中，单个芽体培养生长势弱，若以芽数为 $3\sim 5$ 个·丛⁻¹ 进行繁殖会更利于生长。本研究探讨了不同丛芽数对花叶花秆绿竹繁殖的影响。1 个芽也能分蘖增殖，但基部诱导新芽生成能力低，植株生长明显缓慢。每丛芽数增多时，基部萌动新芽的能力会增强，当每丛芽数过多时，在相同时间内，增殖速率会下降。因此，严格筛选适宜的每丛芽数，既保证了增殖的最佳效果和最高速率，又保证了实验的准确一致。

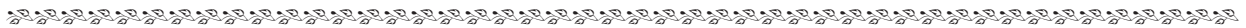
有关丛生竹增殖涉及的植物生长调节剂种类很多。李在留等^[8]在巨龙竹组织培养中认为 BA 对丛生芽增殖影响大，KT 在丛生芽伸长生长中起主导作用。Thomas 等^[9]实验证明 TDZ 可诱导细胞分裂素的生物合成，并发现 TDZ 抑制内源生长素的降解。本研究针对各种不同的细胞分裂素，首先在各种不同质量浓度下进行筛选，结合外植体的生长势、增殖系数多方面因素考虑，发现 BA 和 TDZ 的增殖效果较好，在此基础上，又进一步验证两者相互作用对花叶花秆绿竹增殖的影响，当 2 种植物生长调节物质相互作用时，增殖系数比单独使用其中一种效果显著，最大可达 4.63，新生小芽长势旺盛，植株茎秆粗壮。但质量浓度都不宜过高，BA 质量浓度过高会抑制新芽发生和生长，可能与在培养基上存在一定程度的累积效应^[10]有关，这与卓仁英^[11]的研究一致。Chapupa^[12]认为，TDZ 也存在一个临界质量浓度，低质量浓度会促进腋芽增殖。

竹子生根主要是通过添加外源激素、添加物及增加光照等改变外界条件来打破外植体基部隐芽的休眠，诱导根源基分化与发育，长成新植株。生根培养基配方固然重要，但褐化对生根的影响也不可忽视。褐化是竹子组织培养最常见的现象，褐化通常也是从外植体基部开始，是酚类物质氧化成醌类物质造成的^[13]。当添加外源激素或增加光照时，会促使其氧化程度加重，对培养材料尤其待发根的基部毒害愈大，给生根带来一定困难，采用两阶段发根法，可以得到一定的缓解。本实验采用两阶段发根发现，在第 1 阶段中，一定范围内，无论是用 IBA 处理天数的增加，还是随 IBA 质量浓度的升高，第 2 阶段的 MS 培养基都有发根现象，差异显著，最佳组合是 $50.000\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理 1 d，转移到 MS 培养基中，发根率最高，长势旺盛，根系健壮。用 $50.000\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理 3 d 或 IBA 质量浓度增加至 $100.000\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，随着第 2 阶段时间的推移，外植体枯黄现象愈加严重，说明高质量浓度的生长素或生长素作用时间长，都不利于试管苗发根和正常生长。

参考文献：

- [1] 郑蓉，方伟，郑维鹏，等. 绿竹研究[J]. 竹子研究汇刊，2007，**26** (1): 20 - 25.
ZENG Rong, FANG Wei, ZENG Weipeng, et al. Research progress in *Dendrocalamopsis oldhamii* [J]. *J Bamboo Res*, 2007, **26** (1): 20 - 25.
- [2] SAXENA S. In vitro propagation of bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 431 - 434.
- [3] CHAMBERS S M, HEUCH J H R, PIRRIC A. Micropropagation and in vitro flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1991, **27**: 45 - 48.
- [4] PRUTPONGSE P, GAVINLERTVATAN P. In vitro micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo [J]. *HortScience*, 1992, **27** (5): 453 - 454.
- [5] 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.
WANG Guangping, DING Yulong. Investigation on tissue culture of some ornamental bamboo [J]. *J Bamboo Res*, 2002, **21** (2): 5 - 9.
- [6] 杨本鹏，管丽梅. 龙竹的组织培养[J]. 热带作物学报，2003，**24** (3): 82 - 87.

- YANG Benpeng, ZAN Limei. Tissue culture of *Dendrocalamus giganteus* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2003, **24** (3): 82 – 87.
- [7] 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 oldhamii* f. *striata* by tissue culture [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25** (3): 397 – 400.
- [8] 李在留, 辉朝茂. 珍稀竹种巨龙竹组织培养研究[J]. 林业科学, 2006, **42** (2): 43 – 47.
LI Zailiu, HUI Chaomao. Study on tissue culture of *Dendrocalamus sinicus* [J]. *Sci Silv Sin*, 2006, **42** (2): 43 – 47.
- [9] THOMAS J C, KATTERMAN F R. Cytokinin activity induced by thidiazuron [J]. *Plant Physiol*, 1986, **81**: 681 – 683.
- [10] 张敏, 卢义山, 蒋泽平, 等. 竹子组织培养研究现状与应用前景[J]. 江苏林业科技, 2007, **34** (5): 40 – 44.
ZHANG Min, LU Yishan, JIANG Zeping, *et al.* Current situation of bamboo tissue culture and its perspectives for application [J]. *J Jiangsu For Sci Technol*, 2007, **34** (5): 40 – 44.
- [11] 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.
- [12] CHAPUPA V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation [J]. *Biol Plant*, 1988, **30**: 414 – 421.
- [13] 顾小平, 苏梦云, 岳晋军, 等. 几种丛生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究[J]. 林业科学研究, 2006, **19** (1): 75 – 78.
GU Xiaoping, SU Mengyun, YUE Jinjun, *et al.* Study on induction and brown stain prevention techniques of some sympodial bamboo species [J]. *For Res*, 2006, **19** (1): 75 – 78.



浙江林学院荣获“浙江省自然科学基金管理工作先进集体”称号

2009年11月13日, 2009年度浙江省自然科学基金依托单位管理工作会议在嘉兴召开。会上, 浙江林学院被评为浙江省自然科学基金管理工作先进集体, 全省共评选出先进集体10家。

近年来, 学校高度重视自然科学基金管理工作, 大力营造良好基础研究氛围和创新环境, 切实提升学校基础研究水平与创新能力; 通过制订激励政策措施, 设立预研基金项目专项, 支持基础研究的前期积累; 通过规范项目过程管理, 开展基金项目前期申报动员、中期检查跟踪、后期结题验收等培训指导, 提高基金项目资助率和研究绩效。

2007 – 2009年来, 浙江林学院获国家自然科学基金资助44项, 浙江省自然科学基金资助50项。其中, 2009年, 获国家自然科学基金项目19项, 在全国林业类高校和院所位居前列; 浙江省自然科学基金项目资助29项(其中重点项目1项), 位居全省高校前列, 标志浙江林学院基础研究水平进一步提升, 必将为浙江省基础研究发展作出更大贡献。

罗锡平