

## 珍稀竹种巨龙竹组织培养研究\*

李在留<sup>1,2</sup> 辉朝茂<sup>2</sup>

(1. 北京林业大学 北京 100083; 2. 西南林学院 昆明 650224)

**摘要:** 对巨龙竹幼年竹和成年竹材料采集、处理、试管引入、丛芽诱导、丛芽增殖和生根、再生植株炼苗等进行系统研究,采用正交设计筛选出各阶段的最佳培养基。结果表明:丛芽增殖倍数与 BA 用量成正比,但随着 BA 用量加大或长期在高浓度 BA 上培养易产生花芽,说明 BA 有使丛芽细胞从营养状态向生殖状态转变的作用;KT 在丛芽高生长方面起主导作用,能使丛芽节间伸长,使细胞从生殖状态向营养状态转变;椰乳有改善丛芽或苗生长的作用。在诱导丛芽生根过程中,IBA 起主导作用,配合少量 NAA 使用可得到生根良好、移栽成活率较高的再生小植株。巨龙竹成年竹组织培养与外植体采集部位、采集时间、采集地等相关。

**关键词:** 巨龙竹;组织培养;离体快速繁殖;种胚;成年竹

**中图分类号:** S722.3<sup>7</sup>; S795.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7488(2006)02-0043-06

Study on Tissue Culture of *Dendrocalamus sinicus*Li Zailiu<sup>1,2</sup> Hui Chaomao<sup>2</sup>

(1. Beijing Forestry University Beijing 100083; 2. Southwest Forestry College Kunming 650224)

**Abstract:** Tissue culture of young and mature bamboo of *Dendrocalamus sinicus* was studied systematically from aspects of explant collection, disposal, in vitro; and shoot inducement, proliferation, rooting; and plantlet hardening and so on in this experiment. The best media for every stage were discussed by orthogonal experiment. The results showed that the dosage of hormone BA and the shoot multiplication were proportioned positively. But if the dosage of BA enlarged or a long time's culture made in high thick of BA, flower buds would be seen. So BA had the function of making cells become progenitive performance from nutritious performance. Hormone KT was the main factor in height growth of shoot multiplication, which could make nodes elongate, make buds grow well and make cells become nutritious performance from progenitive performance. Coconut water (CW) had function of enhancing growth. Hormone IBA was the main factor in rooting. A few hormone NAA in combination with IBA could make rooting well and growing well. And the plantlets showed highly survival rate in hardening. The successes of explants in vitro and induced multiplication of shoots were related to the collected time and collected section etc. of the explants.

**Key words:** *Dendrocalamus sinicus*; tissue culture; in vitro rapid propagation; embryos; mature bamboo

竹类植物主要分布在发展中国家,受资金、技术等因素制约,组培研究起步较晚。国外始于 20 世纪 60 年代(Alexander *et al.*, 1968; Tseng *et al.*, 1975); 80 年代,进入系统研究阶段,主要通过诱导愈伤组织分化丛芽或胚状体获取再生小植株,或由愈伤组织进行细胞悬浮培养、原生质体培养(Huang *et al.*, 1983; 1988; 1989a; 1989b; 1990; Mehta *et al.*, 1982; Rao *et al.*, 1985; 1986; Yeh *et al.*, 1986a; 1986b; 1987; Hassan *et al.*, 1987); 90 年代,竹子组培研究进入了更深一层,主要通过以芽繁芽方式获得再生小植株(Tsay *et al.*, 1990; Saxena, 1990; 1993; Chambers, 1991; Prutpongse *et al.*, 1992; Rout *et al.*, 1994; Chang, 1995; Ramanayake, 1997; Lin *et al.*, 1998; Anil *et al.*, 2002),在组培条件下诱导外植体开花、结实(Nadgauda *et al.*, 1990; 1993; 1997; John *et al.*, 1993; 1995)。我国竹类植物组培研究起步更晚,始于 20 世纪 90 年代,现已有多篇报道(张光楚, 2000; 张光楚等, 1993; 1998; 2001; 2003; 2004; 吴益民等, 2000; 马艳梅等, 1993; 王光萍等, 2002; 张铁等, 2004)。

巨龙竹(*Dendrocalamus sinicus*)是世界上秆形最大的工业用材竹种,其秆高可达 30 m,直径 20~30 cm,具有重要经济价值和广阔开发前景。其自然分布区狭窄、资源量较少,大量试验研究表明采用传统育苗法十分困难,组织培养可解决种苗迫切需求,目前尚无系统研究的文献报道(辉朝茂等, 1999; 2002; 2003)。

收稿日期:2004-10-18。

基金项目:云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养计划(2003RC04)、云南省自然科学基金重点项目(1999C0006Z)、国家林业局林业重点工程关键技术应用研究与试验示范专项资助。

\*辉朝茂为通讯作者。本研究工作自始至终得到联合导师、广东省林业科学院张光楚研究员的具体指导,特致以衷心感谢。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及消毒处理

以种胚和成年竹茎段为外植体,在云南西盟县采集饱满、污染较轻的种子,共163粒。用2%~2.5%的NaClO溶液消毒15 min,蒸馏水清洗3次,催芽12~16 h。接种前,用0.2% HgCl<sub>2</sub>溶液消毒30 min,清洗5次。

成年竹茎段分别采自新平、沧源以及西南林学院大棚(引自西盟县),当年萌芽嫩枝与2年生枝条作对比试验。用75%的酒精擦洗2~3次,4℃下保存12~24 h,接种前用2%~2.5%的NaClO溶液与0.2% HgCl<sub>2</sub>溶液各消毒15 min与20 min。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种胚的离体培养 1)培养基及培养条件:采用改良MS、3/4MS和1/2MS作基本培养基,加入不同浓度的细胞分裂素(BA、KT)或生长素(NAA、IBA)及椰乳(CW),外加蔗糖20 g·L<sup>-1</sup>,琼脂粉6.4 g·L<sup>-1</sup>。pH值5.8~6.2,温度(25±4)℃,每天辅助光照12 h,光照强度1 600~2 000 lx。 2)无性系增殖培养:种子消毒后接种于MS+BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>培养基上,萌芽至4 cm高时(15~25 d)转接到3/4MS+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+CW 100 mL·L<sup>-1</sup>培养基中诱导丛芽,根据褐化情况进行继代培养,并大量淘汰萌芽慢、生长慢、无法诱导丛芽的无性系。选取增殖芽较正常的无性系进行正交试验,探讨MS、BA、KT、CW用量对苗生长、增殖作用(表1),并重复试验,筛选最佳增殖培养基。所有正交试验进行3次以上重复,每次供试芽丛不低于30个。 3)无性系生根培养:1/2MS培养基,外加生长素NAA和IBA,正交设计试验,筛选最佳生根培养基(表2)。 4)再生小植株炼苗移栽:组培苗根半木质化时,旋松瓶盖,自然散射光下炼苗5~7 d,洗去培养基,植入多种配比的基质中;与苏麻竹(*D. brandisii*)作对照,筛选较佳的炼苗基质。

1.2.2 成年竹茎段培养 采用1/2MS+BA 3~5 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.8~1.2 mg·L<sup>-1</sup>+CW 150 mL·L<sup>-1</sup>+蔗糖3%培养基,进行成年竹茎段试管引入、丛芽诱导,探索成年竹组织培养材料采集时间、部位、地点对诱导的影响,并根据丛芽诱导与增殖情况调整各生长调节剂的配比,5~15 d继代一次。

## 2 结果与分析

### 2.1 种胚的离体培养

2.1.1 试管引入结果及生长情况 163粒种子,4粒污染,7粒未萌芽,无菌种苗得率高达93.25%。继代5~7次后,获得63个能增殖的无性系。

2.1.2 无性系增殖及生根培养基筛选 选取增殖倍数较大的23号与增殖倍数适中的49号无性系进行丛芽增殖及生根培养基筛选试验,方案设计、统计与分析参照相关资料(毕庆雨,1990;庄楚强等,2002)。

为获得增殖倍数适中、增殖芽高、生长良好的丛芽,进行了正交试验(表1)。从表1可看出,对增殖倍数影响顺序为BA>MS>KT>CW,BA的极差最大,经F检验达到0.1水平,表明它在丛芽增殖诱导中起主导作用,各因素水平的最佳组合为:3/4MS+BA 2.5 mg·L<sup>-1</sup>+CW 100 mL·L<sup>-1</sup>;对增殖芽高度影响顺序为KT>CW>BA>MS,KT的极差最大,经F检验达0.1水平,在丛芽高生长方面起主导作用,各因素水平的最佳组合为:3/4MS+BA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.6 mg·L<sup>-1</sup>+CW 100 mL·L<sup>-1</sup>。BA的用量与丛芽增殖倍数成正比,与丛芽高生长成反比;KT对增殖倍数的影响在0~0.3 mg·L<sup>-1</sup>用量范围内成反比关系,在0.3~0.6 mg·L<sup>-1</sup>用量范围内成正比关系,为提高增殖倍数和丛芽高生长,理论上可加大KT用量,但经长期大量试验发现:随着KT用量增加,丛芽生长加快、节间增长,形成畸形芽。BA用量达2.5 mg·L<sup>-1</sup>时也产生较多畸形芽,且随着继代次数增多,丛芽逐渐矮化,形成花芽,说明BA使丛芽细胞从营养状态向生殖状态转化。逐渐降低BA用量到1.5 mg·L<sup>-1</sup>,获得增殖倍数为5.23倍,生长良好、性状正常的苗,丛芽高度为4.09 cm,最佳培养基为:3/4MS+BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+CW 100 mL·L<sup>-1</sup>。另外,长期在高浓度BA上培养产生花芽的苗,加大KT用量,可分化出正常的丛芽,即:KT有使细胞从生殖状态向营养状态转化的作用。

无性系增殖到一定数量后进行生根,培养基如表2。从表2可看出:4个因素对苗的生根、生长、成活的作用为IBA>KT>CW>NAA,IBA起主导作用,经F检验达到0.1水平。加大IBA、CW、NAA用量,4个指标逐渐变优;在0~0.005 mg·L<sup>-1</sup>内加大KT用量,对4个指标产生优化作用,在0.005~0.010 mg·L<sup>-1</sup>内加大KT用量,对4个指标产生抑制作用。综合分析得最佳培养基为:1/2 MS+IBA 6.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+KT

表 1 丛芽增殖诱导培养基配方试验及结果分析  
Tab.1 Experiments and results on inducement media of shoot proliferation

		因素 Factors				试验指标 Trial index	
		改良 MS Modified MS	CW/ (mL·L <sup>-1</sup> )	BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	KT/ (mg·L <sup>-1</sup> )	增殖倍数 Rate of multiplication	增殖芽高 Height of shoot proliferation/cm
处理 Treatment	1	1	0	0.1	0.0	2.03	0.89
	2	1	100	1.0	0.3	4.02	2.36
	3	1	200	2.5	0.6	8.27	4.02
	4	3/4	0	1.0	0.6	4.59	4.51
	5	3/4	100	2.5	0.0	9.93	1.18
	6	3/4	200	0.1	0.3	2.29	2.43
	7	1/2	0	2.5	0.3	5.48	1.13
	8	1/2	100	0.1	0.6	1.17	4.64
	9	1/2	200	1.0	0.0	3.83	0.98
增殖倍数 Rate of multiplication	T <sub>1</sub>	14.32	12.10	5.49	15.79	T = 41.61	T = 22.14
	T <sub>2</sub>	16.81	15.12	12.44	11.79	T <sup>2</sup> = 1 731.39	T <sup>2</sup> = 490.18
	T <sub>3</sub>	10.48	14.39	23.68	14.03	T <sub>i</sub> 表示 i (i = 1, 2, 3) 水平的总和; X <sub>i</sub>	
	X <sub>1</sub>	4.77	4.03	1.83	5.26	表示相应的平均值。R 为最大与最小水平	
	X <sub>2</sub>	5.60	5.04	4.15	3.93	间距。增殖倍数 = 继代时芽的总个数/接	
	X <sub>3</sub>	3.49	4.80	7.89	4.68	种时芽的总个数。下同。	
	R	2.11	1.01	6.06	1.33	T <sub>i</sub> expressed the sum of i (i = 1, 2, 3)	
增殖芽高 Height of shoot proliferation	T <sub>1</sub>	7.27	6.53	7.96	3.05	levels; X <sub>i</sub> expressed the average of the	
	T <sub>2</sub>	8.12	8.18	7.85	5.92	corresponding levels. R showed the difference	
	T <sub>3</sub>	6.75	7.43	6.33	13.17	between maximum and minimum. Rate of	
	X <sub>1</sub>	2.42	2.18	2.65	1.02	multiplication was the sum number of subcultured	
	X <sub>2</sub>	2.71	2.73	2.62	1.97	shoot proliferation divided by the sum number of	
	X <sub>3</sub>	2.25	2.48	2.11	4.39	shoot proliferation placed on media. The same	
	R	0.46	0.55	0.54	3.37	below.	

0.005 mg·L<sup>-1</sup> + CW 100 mL·L<sup>-1</sup>。继而加大 IBA、CW、NAA 用量,4 指标无明显增强。长期使用以上配方生根,4 指标表现出较稳定的优良性。另外,对 IBA 与 NAA 作专门试验,发现加大 NAA 用量,每丛苗生根数量增多,根细长;NAA 用量大于或等于 4.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,丛芽基部膨大形成愈伤组织,从愈伤组织上产生多条根,再生植株根系发达而茎叶枯黄,炼苗成活率低;仅用 NAA 且用量大于或等于 7.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,再生植株只长根,地上部分枯死;仅用 IBA 且用量大于或等于 7.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,每丛再生植株生根条数少(1~3 条),根短、粗、壮,炼苗也难成活,故适量 IBA 与 NAA 配合使用有利于丛芽生根和再生植株炼苗成活。

2.1.3 再生植株炼苗 23 号无性系与苏麻竹组培苗进行对比炼苗,采用 6 种基质(体积比)炼苗:1)100%河砂;2)100%珍珠岩;3)100%蛭石;4)河砂+珍珠岩(1:1);5)河砂+蛭石(1:1);6)河砂+腐质土(1:1)。每组基质栽种生长情况相同的根半木质化(生根培养基上培养 40 d)的小苗 50 丛。炼苗 40 d 后,结果为:23 号成活率分别为 50%、35%、23%、38%、29%、55%;苏麻竹为 97%、89%、84%、93%、91%、98%。

从结果看:苏麻竹炼苗比巨龙竹容易,2 种苗在有河砂的基质上炼苗成活率较高,在有腐质土的基质上成活率更高,生长更绿、更高、更快,发笋数更多,根系更发达,说明基质 6) 相对较优,但总体成活率偏低。

为了提高炼苗成活率,采用了多种措施,如:添加多种基质配比(河砂与腐质土以体积比 1:1 为上层、珍珠岩垫底)对照、改变小植株在培养瓶内的培养时间、水培炼苗、尽可能提高相对湿度、加强管护等,成活率仍较低。经观察,发现小植株生根数越多,成活率越低,根系从丛芽基部膨大、似愈伤组织物上分化而来,对丛芽生根培养基作多次试验,发现高浓度 NAA 使丛芽生根前先产生愈伤组织再分化出较多细弱的根,降低 NAA 用量到 2 mg·L<sup>-1</sup>,并延长小植株在生根培养基上的生长时间(50~60 d),成活率可提高到 70%~90%。所有无性系在河砂与腐质土以体积比 1:1 为上层、珍珠岩垫底的基质上成活率最高,小苗生长最健壮。在长期炼苗试验中,发现在昆明 5—8 月份是最佳的炼苗时期。

## 2.2 成年竹茎段培养试验

2.2.1 材料最佳采集时间 2002 年 9、10、11 月和 2003 年 3 月进行了 4 次巨龙竹成年竹枝条试管引入试验,每次接种 60 段。发现成年竹枝条试管引入无污染活体数越来越难获得,丛芽诱导也越来越困难;2003 年 5、6、7、8 月所引入材料无菌活体得率高达 70% 以上,丛芽诱导率达 60% 以上,说明材料在 5—8 月采集最佳。

表 2 种胚丛芽生根诱导培养基配方及结果分析表<sup>①</sup>

Tab.2 Experiments and results of rooting culture media for shoots multiplication from embryos

处理 Treatment	因素 Factors				试验指标 Trial index				数值转换 Data switch			综合评分 Grade of integration
	CW/ (mL·L <sup>-1</sup> )	IBA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	KT/ (mg·L <sup>-1</sup> )	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(4)	
1	0	1	0	0.000	18.94	59.95	1.59	浅黄 White yellow	25.86	50.74	1	366.05
2	0	3	2	0.005	89.76	96.13	4.25	黄 Yellow	71.34	78.65	2	884.93
3	0	6	4	0.010	63.89	97.45	4.01	较绿 More green	53.06	80.81	5	721.28
4	50	1	2	0.010	31.71	97.91	3.08	深绿 Black green	34.27	81.69	6	539.17
5	50	3	4	0.000	90.05	96.76	6.97	绿 Green	71.61	79.63	4	902.36
6	50	6	0	0.005	95.21	97.99	5.82	较绿 More green	77.36	81.85	5	968.10
7	100	1	4	0.005	88.92	97.91	6.63	较绿 More green	70.56	81.69	5	900.58
8	100	3	0	0.010	49.69	100.00	2.91	深绿 Black green	44.82	90.00	6	661.13
9	100	6	2	0.000	99.82	90.87	6.49	浅绿 White green	87.57	72.41	3	1 042.00
T <sub>1</sub>	1 972.3	1 805.8	1 995.3	2 310.4	X <sub>1</sub>	657.4	602.0	665.1	770.1			
T <sub>2</sub>	2 409.6	2 448.4	2 466.1	2 753.6	X <sub>2</sub>	803.2	816.1	822.0	917.9			
T <sub>3</sub>	2 603.7	2 731.4	2 524.2	1 921.6	X <sub>3</sub>	867.9	910.5	841.4	640.5			
R	210.5	308.5	176.3	277.3								

①(1)(2)(3)(4)分别代表生根率、生根成活率(因发现不同培养基上有生根后死苗现象,故引入此指标)、每丛苗生根条数、生根苗生长情况。为进行统计分析,对(1)(2)(4)作数值转换:(1)(2)作反正弦处理;(4)将苗生长表现浅黄的定为1,由浅黄到深绿各个等级增加一个单位1来表示。为兼顾4个指标,采用综合评分法;对炼苗成活率而言,生根是必须的,故生根率相对其他指标最重要;每丛苗生根条数最次要,若将其对炼苗成活率的作用定为1,则生根率可看作其作用的10倍,苗的生长情况是其5倍,生根成活率是其2倍,综合分数=10×(1)+5×(4)+2×(2)+1×(3),其中1,2,5,10分别为4个指标的权数。(1)(2)(3)(4) expressed individually the rate of rooting, survival rate of rooting (the reason which given here was we found there were death plantlets on different media after rooting), roots number of every bunches of rooting shoots and living condition of the rooting plantlets. The data of (1)(2)(4) were switched for mathematical statistics and processing. Data of (1)(2) were processed with asin. White yellow leaves of the rooting plantlets were prescribed as one number in data of (4) and others were added one number according to their leaves' color from white yellow to black green. Grade of integration method was adopted for giving attention to the four indexes. Rooting was primary for exercising successfully. So the rate of rooting was the most important index. The rooting number of every bunch of shoots was subordinate. Therefore, if it was prescribed as number one of its function on the living rate of exercising, the rate of rooting could be seen as its ten times, the living condition of the plantlets could be five times and survival rate of rooting be two times. So the grades of integration were 10×(1)+5×(4)+2×(2)+1×(3). Number 1,2,5,10 were degree importance of the four indexes.

表 3 巨龙竹成年竹节段消毒与无菌段数得率

Tab.3 Culms sanitizing and the asepsis ratios of the mature *D. sinicus*

枝条 Branch	段数 Number	污染 Contaminated	药害 Drug harm	产生丛芽 Induced multiple shoots	药害率 Rate of drug harm/ %	污染率 Rate of contamination/ %	无菌活体得率 Rate of uncontaminated explants/%	丛芽诱导率 Induced rate of shoot proliferation/%
较老的 Older	20	0	0	0	0	0	0	0
较嫩的 Tender	20	6	9	3	45	30	25	15
居中的 Middle	20	2	1	17	5	10	85	85

2.2.2 材料最佳部位选取 2003年5月引入60段枝条,较老的、较嫩的和居中的分开消毒,考虑到NaClO药性较烈,HgCl<sub>2</sub>相对温和些,故嫩枝条采用2次HgCl<sub>2</sub>消毒。消毒情况如表3。从表3可看出:枝条过嫩容易受药害,过老难诱导丛芽,且小枝上通常稍部节尚未分化出芽点;以枝条为外植体诱导丛芽,目的是诱导节上芽点萌芽并产生丛芽。一般半木质化枝上第1,2个节上未分化出芽点,第3个节上开始有芽,但消毒极易受药害而难于诱导成功,且诱导出的丛芽细小,生长不良,多次继代后变黄枯死。过老的节上芽点长期不萌动,极易褐化枯死。只有枝上第4,5个节芽较易诱导萌发,获得无菌材料,并进一步诱导产生丛芽。

2.2.3 不同采集地材料诱导情况 巨龙竹成年竹无菌活体,在1/2MS+BA 3~5 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.8~1.2 mg·L<sup>-1</sup>+CW 150 mL·L<sup>-1</sup>+蔗糖3%的培养基上多次继代培养后,发现不同时期、不同地点采集的材料对BA、KT用量产生不同结果。采用相同培养基分别对采自新平、沧源以及西南林学院大棚(引自西盟县)的材料进行培养,发现新平枝条BA用量在4 mg·L<sup>-1</sup>以上,KT在1.0~1.5 mg·L<sup>-1</sup>时可诱导丛芽;沧源枝条BA在2~3 mg·L<sup>-1</sup>,KT 0.8~1.0 mg·L<sup>-1</sup>时产生丛芽;大棚里的枝条BA 3.0~3.5 mg·L<sup>-1</sup>,KT 1.0~1.2 mg·L<sup>-1</sup>,经继代6~8次产生丛芽。前二者需10~12次继代后才产生细弱丛芽,易褐化,需5~7 d继代一次,生长差,增殖倍数在1.15~1.21。后者10~15 d转移一次,丛芽生长健壮,增殖倍数在1.6~2.5,相对种胚,增殖倍数较低。

2.2.4 成年竹丛芽增殖、生根试验 成年竹诱导丛芽后,因产生大量无效苗,而逐渐降低激素用量,当降到BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.8 mg·L<sup>-1</sup>时,丛芽增殖倍数、苗生长量显著降低;对培养基作正交试验,其结果如表4。

从表 4 可看出,4 因素中,对丛芽增殖倍数影响最大的是 BA,BA 的极差最大,经  $F$  检验达到 0.1 水平,表明它在成年竹丛芽诱导增殖阶段起主导作用;其次是 CW,经  $F$  检验也达到了 0.1 水平,4 因素作用为  $BA > CW > KT > MS$ ,各因素水平的最佳组合为:3/4MS + CW 150 mL·L<sup>-1</sup> + BA 2.5 mg·L<sup>-1</sup> + KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>;4 因素中,对丛芽高生长影响为  $KT > CW > BA > MS$ ,KT 的极差最大,经  $F$  检验达 0.1 水平,为主导因素,其次是 CW,各因素水平的最佳组合为:1/2MS + CW150 mL·L<sup>-1</sup> + BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>。经分析,既适宜提高增殖倍数又利于高生长的最佳培养基为:2/3MS + CW 150 mL·L<sup>-1</sup> + BA 2.2 mg·L<sup>-1</sup> + KT 1.0 mg·L<sup>-1</sup>。

采用不同培养基进行多次生根试验,生根率均较低,生根后死苗现象严重。目前尚未达到较好效果。

表 4 成年竹丛芽增殖诱导培养基配方的  $L_9(3^4)$  试验及结果

Tab.4 Experiments and results of shoot proliferation on different media for mature bamboo

		因素 Factors				试验指标 Trial guideline				
		改良 MS	CW/ (mL·L <sup>-1</sup> )	BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	KT/ (mg·L <sup>-1</sup> )	增殖倍数 Rate of multiplication		增殖芽高 Height of shoot proliferation/cm		
处理 Treatment	1	1	50	2.0	0.8	2.01		2.98		
	2	1	100	2.5	1.0	2.48		3.25		
	3	1	150	3.0	1.2	2.24		3.15		
	4	3/4	50	2.5	1.2	2.29		3.03		
	5	3/4	100	3.0	0.8	2.18		3.05		
	6	3/4	150	2.0	1.0	2.35		3.39		
	7	1/2	50	3.0	1.0	2.17		3.19		
	8	1/2	100	2.0	1.2	2.13		3.24		
	9	1/2	150	2.5	0.8	2.36		3.12		
增殖倍数 Rate of multiplication	$T_1$	6.73	6.47	6.49	6.55	$X_1$	2.243	2.157	2.163	2.183
	$T_2$	6.82	6.79	7.13	7.00	$X_2$	2.273	2.263	2.377	2.333
	$T_3$	6.66	6.95	6.59	6.66	$X_3$	2.220	2.317	2.197	2.220
	$R$	0.053	0.160	0.213	0.150					
增殖芽高 Height of shoot proliferation	$T_1$	9.38	9.20	9.61	9.15	$X_1$	3.127	3.067	3.203	3.050
	$T_2$	9.47	9.54	9.40	9.83	$X_2$	3.157	3.180	3.133	3.277
	$T_3$	9.55	9.66	9.39	9.42	$X_3$	3.183	3.220	3.130	3.140
	$R$	0.057	0.153	0.073	0.227					

### 3 结论与讨论

通过对巨龙竹幼年竹、成年竹组织培养研究,发现成年竹组培比幼年竹困难,这与张光楚等对麻竹、苏麻竹、杂种撑麻 7 号竹(*Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamus latiflorus* No.7)的研究结果相同(张光楚等,1993;2003;2004),难诱导产生丛芽;丛芽增殖倍数低,难生根;易褐化、死苗,这是竹类植物进行优质种源快繁殖难以解决的大问题,有待从基因角度进一步研究。巨龙竹种胚离体培养很成功,组培苗在圃地生长良好,但巨龙竹是世界上秆形最大的竹子,来源于种胚的无性系是否保持母本优良性状,需进行优良无性系的选择(另文报道)。竹子开花、结实少见,巨龙竹开花、结实更难见,通常整丛开花,产生自花传粉,后代生活力和适应性下降,遗传品性单一(Saxena,1990),传统优良无性系筛选方法时间长、经费高、效率低,若能引入生化或分子水平检验(卓仁英,2003),可克服以上不足。

竹类植物组培较一般植物困难,接种时间长,成本高,随着继代次数增多,无性系增殖倍数逐渐降低;丛芽易老化、褐化、黄化。传统分株育苗成本相对较低,无需激素刺激,对小苗的长期分化无较大影响,故可进行实验室组培快繁、田间分株并进,提高育苗效率,降低成本。

根据细胞分裂素 BA 有促进试管苗开花的作用,可考虑人工促进巨龙竹开花及人工授粉,获取遗传品性较好的种子,用于直接离体培养。

巨龙竹受水热条件限制,分布区狭窄。若能导入抗寒基因,可扩大其适应范围,有利于推广利用。另外,还可进行细胞和原生质体的培养、体细胞杂交、遗传诱导转化及其他的转基因操作,来获取性状更优的突变体或新品种,以便将植物生物技术应用到竹亚科(Bambusoideae)植物中(邢新婷等,2003;田波等,2005),研究提高竹类植物的利用价值。

### 参 考 文 献

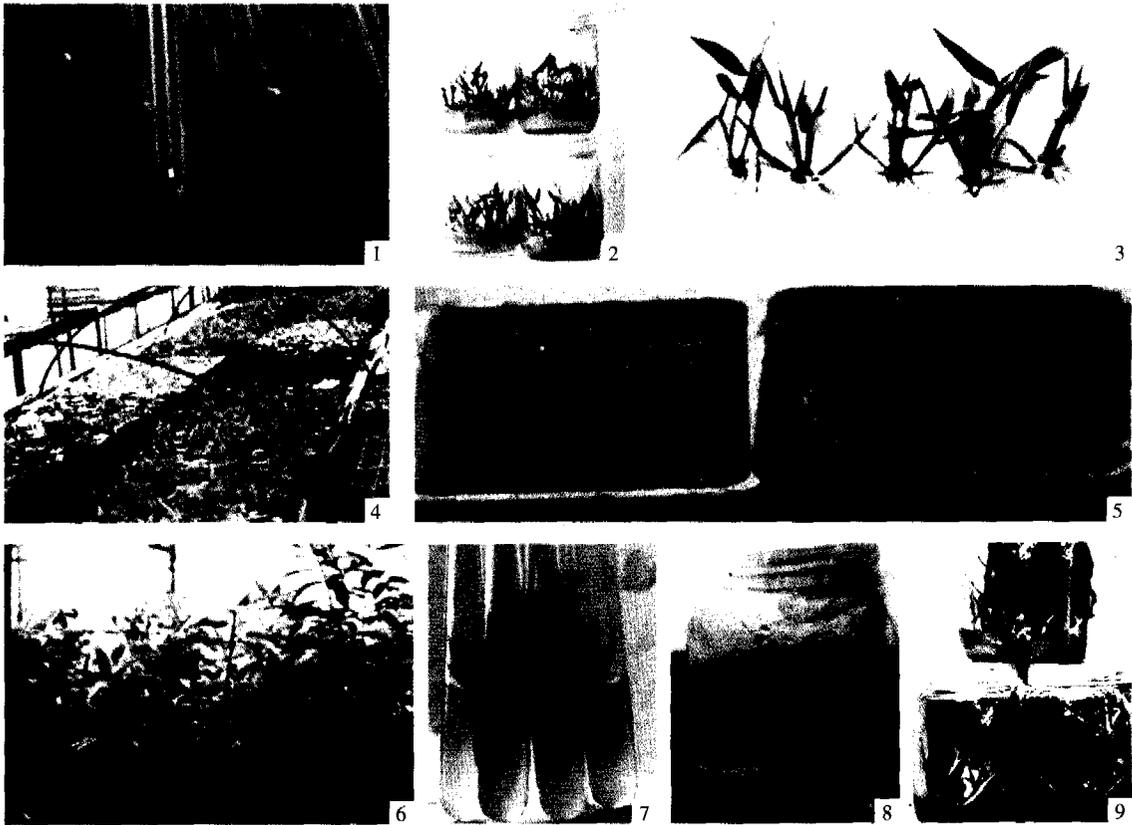
- 辉朝茂,杨宇明.1999.材用竹资源及其工业化利用.云南:云南科技出版社,7-23
- 辉朝茂,杨宇明.2002.中国竹子培育和利用手册.北京:中国林业出版社,24-25
- 辉朝茂,杨宇明.2003.云南竹亚科植物多样性及其保护发展研究.林业科学,39(1):145-152
- 马艳梅,何远燕,何琼英,等.1993.华南农业大学学报,14(3):131-140
- 田波,陈永燕,严远鑫,等.2005.一个竹类植物 MADS 盒基因的克隆及其在拟南芥中的表达.科学通报,50(2):145-151
- 王光萍,丁雨龙.2002.几种观赏竹种组织培养研究.竹子研究汇刊,21(2):5-9
- 吴益民,边红武,王君晖,等.竹子悬浮细胞系的建立和组织培养试管苗移栽观察.竹子研究汇刊,19(1):52-56
- 邢新婷,傅懋毅.2003.竹类植物遗传改良研究进展.林业科学研究,16(3):358-365
- 张光楚,王裕霞.1993.麻竹离体快速繁殖技术的研究.竹子研究汇刊,12(4):8-15
- 张光楚,王裕霞.1998.竹子育种工作现状及前景.竹子研究汇刊,17(1):6-8
- 张光楚.2000.竹子育种工作近况.竹子研究汇刊,19(3):13-15
- 张光楚,王裕霞.2001.竹子试管苗开花的初步研究.竹子研究汇刊,20(1):1-4
- 张光楚,王裕霞.2003.杂种撑麻7号竹的组织培养研究.林业科学研究,16(3):245-253
- 张光楚,王裕霞,谭源杰,等.2004.丛生竹的组培快繁技术及其应用.竹子研究汇刊,23(1):13-20
- 张铁,万京.2004.勃氏甜龙竹的组培快繁.云南民族大学学报,13(3):203-206
- 庄楚强,吴亚森.2002.应用数理统计基础.广州:华南理工大学出版社,383-587
- 卓仁英.2003.竹子生物技术育种研究进展.浙江林学院学报,20(4):424-428
- Alexander M P, Rao T C.1968. In vitro culture of bamboo embryos. Curr Sci,37:415
- Anil S, Ahuja P S, Madhu S, et al. 2002. In vitro protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71:55-63
- Chambers S M, Heuch J H R, Pirie A. 1991. Micropropagation and in vitro flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27(1):45-48
- Chang W C, Lan T H.1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from roots of Bamboo (*Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*). Plant Physiol, 145:535-538
- Hassan A E, Debergh P.1987. Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure. Plant cell Tissue Organ Culture, 10:73-77
- Huang L C, Murashige T.1983. Tissue culture investigation of bamboo I: Callus culture of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. Bot Bull Acad Sin, 24:31-52
- Huang L C, Chen W L, Huang B L.1988. Tissue culture investigations of bamboo II: Liquid suspension cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa* cells. Bot Bull Acadmia Sinica, 29:177-182
- Huang L C, Chen W L, Huang B L.1989a. Tissue culture investigations of bamboo III: A method for viable protoplasts isolation from *Bambusa* cells of liquid suspension culture. Bot Bull Acadmia Sinica, 30:49-57
- Huang L C, Chen W L, Huang B L.1989b. Tissue culture investigations of bamboo IV: Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices. Environmental and Experimental Botany, 29:307-315
- Huang L C, Chen W L, Huang B L.1990. Tissue culture investigation of bamboo V: Recovery of callus. Bot Bull Acadmia Sinica, 31:29-34
- John C K, Nadgauda R S, Mascarenhas A F.1993. On the 'monocarpic' flowering of bamboos. Curr Sci, 65:665-666
- John C K, Nadgauda R S, Mascarenhas A F.1995. Floral biology and breeding behaviour in *Bambusa arundinacer* (Retz.) Willd. J Cytol Genet, 30:101-107
- Lin C S, Chang W C.1998. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field grown culms and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Reports, 17:617-620
- Mehta U, Rao I V R, Ram H Y M.1982. Somatic embryogenesis in bamboo. In: Proc. V. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, 109-110
- Nadgauda R S, Parasharami V A, Mascarenhas A F.1990. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue cultured bamboos. Nature, 344:335-336
- Nadgauda R S, John C K, Mascarenhas A F.1993. Floral biology and breeding behaviour in the bamboo: *Dendrocalamus strictus* Nees. Tree Physiol, 13:401-408
- Nadgauda R S, John C K, Parasharami V A, et al. 1997. A comparison of in vitro with in vivo flowering in bamboo: *Bambusa arundinacer*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48:181-188
- Prutpongse P, Gavinlertvatana P. 1992. In vitro micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. Hort Science, 27(5):453-454
- Ramanayake SMSD, Yakandawala K.1997. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. Plant Sci. 129:213-223
- Rao I U, Rao I V R, Narang V.1985. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. Plant Cell Rep, 4:191-194
- Rao I V R, Narang V, Rao I U.1986. Origin and development of embryogenic callus and somatic embryos in the bamboo, *Dendrocalamus strictus* // IV International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Minneapolis, U. S. A., 134
- Rout G R, Das P.1994. Somatic embryogenesis and in vitro culture of 3 species of bamboo. Plant Cell Rep, 13(12):683-686
- Saxena.1990. In vitro propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Rep, 9:431-434
- Saxena S, Bhojwani S S.1993. In vitro clonal multiplication of four year old plants of the *D. longispithus* Kurz. In Vitro Cell Dev Biol, 290:135-142
- Tsay H S, Yeh C C, Hsu J Y. 1990. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of bamboo (*Sinocalamus latiflorus* McClure). Plant Cell Rep, 9:349-351
- Tseng T C, Liu F, Shiao S Y.1975. Isolation of protoplasts from crop plants. Bot Bull Acadmia Sinica, 16:55-60
- Yeh M L, Chang W C.1986a. Plant regeneration through somitic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). Theory Appl Genet, 73:161-163
- Yeh M L, Chang W C.1986b. Somitic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence of *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*. Plant Cell Reports, 5:409-411
- Yeh M L, Chang W C.1987. Plant regeneration via somitic embryogenesis in mature embryo derived callus culture of *Sinocalamus latiflora* (Munro) Mc. Clure. Plant Science, 51:93-96

李在留等：珍稀竹种巨龙竹组织培养研究

Li Zailiu *et al.*: Study on tissue culture of *Dendrocalamus sinicus*

图版 I

Plate I



1.巨龙竹种胚引入试管后第3天; 2.最佳培养基上的丛芽增殖; 3.组培再生小植株; 4.小植株炼苗1周,开始成活; 5.小植株炼苗6周,生长良好; 6.各无性系在圃地长势良好; 7.成年竹茎段引入试管10 d后萌芽; 8.茎段诱导产生丛芽; 9.最佳培养基上茎段丛芽增殖。

1.Three-day-old of embryos in vitro culture of *D. sinicus*; 2.Shoot multiplication in the best medium; 3.Tissue cultured plantlets; 4.Survival plantlets after one-week hardening; 5.Well growing plantlets after six-month hardening; 6.All clones growing healthily in garden; 7.Nodal cuttings sprouting after ten days cultured in vitro; 8.Shoot proliferation induced from nodal explants; 9.Shoot multiplication in the best medium.