

菲白竹组织培养技术

杨海芸, 桂仁意, 汤定钦, 方伟

(浙江林学院 浙江省现代森林培育重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 以菲白竹 *Sasa fortunei* 幼嫩竹秆和竹鞭为材料, 研究其组织培养快繁关键技术。结果表明: 以竹鞭为外植体萌芽率较高, 添加 6-苄基腺嘌呤(6-BA) 试管苗增殖效果优于噻二唑苯基脲(TDZ), 但 TDZ 能促进新芽生根; 以 MS (Murashige and Skoog) 为基本培养基, 分别添加 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶乙酸(NAA), 侧芽增殖系数达 3.60; 添加 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ, 增殖系数较高(3.43), 且伸长生长迅速, 生根率达到 100%, 可同时实现增殖与生根, 有利于菲白竹大规模快速繁殖。图 1 表 3 参 9

关键词: 植物学; 菲白竹; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S795.9; S723.1⁺32

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2008)02-0255-04

Micropropagation of *Sasa fortunei*

YANG Hai-yun, GUI Ren-yi, TANG Ding-qin, FANG Wei

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

Abstract: Micropropagation of *Sasa fortunei* was studied with shoots of young culms and rhizomes as explants. The results showed as follows: germination rate of rhizomes was better than that of culms. 6-Benzylaminopurine (6-BA) had a better effect on proliferation than thidazuron (TDZ). But TDZ was able to improve rooting. The highest proliferation rate (3.60) was obtained from the combination of $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA. The combination of $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ also had a high proliferation rate (3.43), achieving 100% rooting percentage and good growth performance. Therefore, it was potentially propitious to mass production. [Ch, 1 fig. 3 tab. 9 ref.]

Key words: botany; *Sasa fouteunei*; tissue culture; rapid propagation

菲白竹 *Sasa fortunei*, 矮小丛生, 株型优美, 叶片绿色间有黄色至淡黄色的纵条纹, 可用于地被、小型盆栽, 或配置在假山、大型山水盆景间, 兼文化、观赏和生态于一体, 是地被中的优良植物^[1]。菲白竹常规扩鞭繁殖或扦插繁殖率低, 生长势不均, 难以满足市场需求^[2]。我国对竹类植物的组织培养研究起步较晚, 已有文献^[3-5]报道, 初代培养污染率高, 不同竹种对植物生长调节物质及环境敏感程度差异较大, 且研究多集中在 6-苄基腺嘌呤(6-BA) 和茶乙酸(NAA) 对竹类离体繁殖的影响上。关于菲白竹组织培养的研究很少。已有研究^[2]以当年未展叶的新秆为材料, 取材受时间限制, 成活率不高。文章通过 TDZ (thidazuron, 噻二唑苯基脲) 对菲白竹组织培养的影响的研究, 为菲白竹工厂化生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为盆栽菲白竹的幼嫩枝条和竹鞭, 成苗后移栽基质为蛭石: 珍珠岩: 泥炭藓 = 1: 1: 1 的混

收稿日期: 2007-02-13; 修回日期: 2007-10-16

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2003C22025)

作者简介: 杨海芸, 助理实验师, 硕士, 从事植物生物技术研究。E-mail: yhy2006@zjfc.edu.cn。通信作者: 方伟, 教授, 博士, 从事竹类植物研究。E-mail: fwl@zjfc.edu.cn

合基质,组织培养所用药品均为 Sigma Aldrich 产品。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌培养体系建立 由于竹类植物的内生菌较多,取材前利用抗菌药剂对菲白竹盆苗喷雾处理,2周后选生长健壮的盆栽植株,取其饱满竹鞭和新秆,剪成长3 cm左右的含芽节段。浸入稀释10倍的次氯酸钠溶液(含少量吐温20)中抽真空灭菌10 min,然后用无菌水冲洗5次。在显微镜下,剥去外壳,切取0.5 cm长的茎尖,接入MS(Murashige and Skoog)基本培养基中,不添加任何植物生长调节物质。先暗培养2 d,再置于光周期为16 h/8 h,光强为2 800 lx,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的培养室中。培养4周后,调查并统计不同外植体初代培养的污染率和萌芽率。

1.2.2 不同植物生长调节物质及其质量浓度 试验采用单因素设计,第1阶段研究6-BA和TDZ对培养材料增殖生长的影响,所用质量浓度分别为:6-BA(1, 3, 5, 7, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), TDZ(0.000 1, 0.001 0, 0.010 0, 0.100 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),以不添加任何植物生长调节物质处理作为对照。第2阶段:根据第1阶段的结果,筛选出适合增殖生长的细胞分裂素种类及质量浓度,与不同质量浓度的NAA(0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组合,研究不同植物生长调节物质组合对菲白竹侧芽增殖及生长的影响。以上基本培养基为MS培养基, pH 5.8, 附加30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖和2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水晶洋菜。对照不添加植物生长调节物质。每个处理20管,每管接种1个外植体。每4周继代1次,观察菲白竹生长状况,8周后,统计试管苗增殖系数和生根率。增殖系数=新生总芽数/接种总芽数;生根率=(有根生成的材料数量/接种的材料数量) $\times 100\%$ 。

1.2.3 移栽驯化 将生根的试管苗置入驯化室中,在强光(2万lx)下练苗2周后,进行单株套袋移植。移植后每2 d将塑料袋剪口1次,1周后完全脱袋并移入温室。

2 结果与分析

2.1 不同来源外植体对菲白竹无菌培养体系建立的影响

由表1可知,外植体污染率较低,低于5%。竹鞭萌芽率远远高于幼嫩秆茎尖萌芽率。从生长表现来看,也是竹鞭生长势旺盛(图1A),竹鞭茎尖作为外植体的芽生长粗壮,且有新芽生长。由此表明,竹鞭可以作为良好的外植体来源。

表1 不同来源外植体对菲白竹无菌培养体系建立的影响

外植体	污染率/%	萌芽率/%	生长状况
幼嫩秆茎尖	4.7	5.0	外植体褐化严重,芽细弱
竹鞭茎尖	4.0	64.0	芽粗壮,且有新芽生成

2.2 不同培养条件对菲白竹试管苗增殖的影响

2.2.1 不同质量浓度的6-BA和TDZ对菲白竹试管苗增殖的影响 由表2可知,添加6-BA和TDZ可显著促进菲白竹试管苗增殖,且6-BA效果好于TDZ,对照无侧芽生成。添加3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的处理,菲白竹试管苗增殖系数最大,且新生芽个体较大,但随着6-BA质量浓度的升高,增殖系数逐渐变小。添加TDZ的处理中,试管苗增殖系数显著低于添加6-BA的处理,但植株伸长生长较快,且有根生成,根系生长良好(图1B)。随着TDZ质量浓度的增加,生根率逐渐增大,添加0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ的处理,生根率最大,达到80.0%,但芽较短粗,伸长生长缓慢;而添加0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ的处理,新芽生长势最好。培养过程中发现,对照中试管苗基部分泌大量褐色物质,褐化严重,6-BA次之,添加TDZ的处理,无褐化现象。因此,添加3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA适合菲白竹试管苗增殖,添加TDZ有利于菲白竹试管苗侧芽的伸长生长与生根。

2.2.2 不同植物生长调节物质组合对菲白竹试管苗生长的影响 由表3可以看出,3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA与不同质量浓度的NAA和TDZ结合,均显著促进菲白竹试管苗生长。当3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA与0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA结合时,侧芽增殖系数最大,达3.60,且新芽密集,但无伸长生长,根粗壮较短;随着NAA质量浓度的增加,侧芽增殖系数逐渐下降,生根率逐渐升高。而3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA与0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ结合,植株伸长生长良好,生根率最高,达到100%,且根系发达(图1C)。

表2 不同质量浓度的6-BA和TDZ对菲白竹试管苗增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and TDZ on proliferation of *Sasa fortunei*

植物生长调节物质	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	增殖系数	生根率/%	生长状况
ck	0	0 e	0 e	接入芽切口分泌大量褐色物质, 新生叶片卷曲
6-BA	1	2.90 a	5.0 d	叶片舒展, 基部少量褐色物质
	3	2.93 a	0 e	叶片舒展, 新生芽个体较大
	5	2.19 bc	0 e	新生芽生长良好
	7	1.94 bcd	0 e	新叶未展平, 且部分植株生长缓慢
	10	1.80 cd	0 e	基部老叶片变黄色, 植株生长缓慢
	0.000 1	1.70 d	12.5 c	接入芽与新芽均生长良好, 根长而细
TDZ	0.001 0	1.70 d	37.5 c	接入芽与新芽均生长良好, 根长而细
	0.010 0	1.70 d	60.0 b	新芽伸长生长较快、良好, 根长且粗壮
	0.100 0	2.10 bcd	80.0 a	新芽粗壮, 但几乎无伸长生长

说明: 同列不同小写字母代表在0.05水平差异显著。



图1 菲白竹试管苗组培快繁

(A: 离体竹鞭萌芽; B: 菲白竹侧芽增殖; C: 生根试管苗; D: 菲白竹大量繁殖)

Figure 1 Tissue culture of *Sasa fortunei*

(A: bud sprouted from rhizome; B: lateral buds multiplied; C: plants rooted in tube; D: mass propagation)

2.3 驯化移栽

菲白竹试管苗继代培养3个月后, 将生根的试管苗(图1D)置于驯化室内炼苗, 7 d后移栽到口径10 cm的塑料盆中, 20 d后有新根生成, 成活率达98%。

3 结论与讨论

有关外植体灭菌, 常用的方法是用乙醇和升汞进行外植体消毒^[6]。由于竹类内生菌较多, 外植

表3 不同植物生长调节物质组合对菲白竹试管苗增殖的影响

Table 3 Effects of different hormone combination on proliferation of *Sasa fortunei*

处理	增殖系数	生根率/%	生长状况
ck	0 e	0 d	接入芽切口分泌大量褐色物质, 新生叶片卷曲
3 mg · L ⁻¹ 6-BA	2.93 c	0 d	叶片舒展, 新生芽个体较大
3 mg · L ⁻¹ 6-BA + 0.01 mg · L ⁻¹ TDZ	3.43 ab	100 a	植株伸长生长, 且根系生长良好
3 mg · L ⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L ⁻¹ NAA	2.96 c	5.0 c	新生叶卷曲, 基部分泌褐色物质
3 mg · L ⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L ⁻¹ NAA	3.60 a	13.3 b	植株无伸长生长, 基部着生侧芽, 且有褐色物质分泌
3 mg · L ⁻¹ 6-BA + 1.0 mg · L ⁻¹ NAA	3.20 b	15.8 b	植株无伸长生长, 基部着生侧芽, 且有褐色物质分泌
3 mg · L ⁻¹ 6-BA + 2.0 mg · L ⁻¹ NAA	2.27 d	20.0 b	植株生长缓慢, 新叶卷曲

说明: 同列不同小写字母代表在 0.05 水平差异显著。

体污染率较高, 本实验对取材植株进行 2 周抗菌预处理, 然后用次氯酸钠浸泡的同时真空泵抽虑灭菌, 污染率大大降低, 不到 5%, 保证了无菌材料的获得。同时, 用次氯酸钠溶液替代升汞等灭菌剂, 也避免了环境污染。

TDZ 是人工合成的苯基脲衍生物之一, 在很多植物材料中表现很高的细胞分裂素活性^[7]。在许多植物组织培养中, 可促进愈伤组织生长及芽的形成, 活性超过一般的细胞分裂素。Letham^[8]曾指出, TDZ 促进休眠芽生长素的合成, 当质量浓度很低时, 所产生的生长素的水平可能对芽的生长是合适的, 质量浓度过高, 则不利于生长。Chapupa^[9]却认为, TDZ 不仅能促进芽繁殖, 还有利于芽的再生, 且存在一个 TDZ 临界质量浓度, 低质量浓度的 TDZ 或许仅促进腋芽增殖, 而高质量浓度的 TDZ 可能促进腋芽增殖又提高芽的再生能力。本实验中, TDZ 与 6-BA 结合, 显著促进菲白竹伸长生长与生根, 且根系发达, 长期保持生长势旺盛, 可能是由于 TDZ 处理后, 菲白竹萌发大量的新芽, 且刺激芽体合成的生长素, 长期继代培养后, 内外源植物生长调节物质逐渐达到平衡, 促进菲白竹新芽再生。

竹子组织培养的一大难题在于材料褐变, 相对而言, 生根材料的褐化程度比增殖材料要轻得多。在植物离体快繁过程中, 通常将材料增殖与生根分隔开来, 但是, 在竹类植物组织培养过程中, 切割材料的伤口分泌大量褐色物质, 会影响侧芽的增殖和生根。研究发现, 当同时外加 3 mg · L⁻¹ 6-BA 与 0.010 0 mg · L⁻¹ TDZ 时, 培养 8 周后, 材料的增殖系数较高(3.43), 生根率达到 100%, 植株生长健壮, 没有褐变现象发生。这样可简化操作程序, 降低生产成本, 较易实现工厂化生产。

参考文献:

- [1] 方伟. 竹子分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995.
- [2] 张春霞, 王福升, 黄月英. 菲白竹组培繁殖技术研究[J]. 林业科技开发, 2006, 20(5): 31-33.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 郝培应. 竹类组织培养技术研究的现状与展望[J]. 淮南师范学院学报, 2003, 5(3): 27-30.
- [6] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996.
- [7] 周国彦, COLLET G F. Thidiazuron 的细胞分裂素活性研究(I), 对番木瓜愈伤组织诱导及芽生长的作用[J]. 西北植物学报, 1989, 9(4): 203-210.
- [8] LETHAM D S. *Phytohormones in Reteopects* [M]. New York: Plencem Press, 1987: 1-27.
- [9] 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.