

金丝慈竹愈伤组织培养及植株再生研究

吴涛¹, 卢娟娟², 丁雨龙^{1*}

(1. 南京林业大学竹类研究所, 南京 210037; 2. 新疆农业大学林学院)

摘要:通过正交试验筛选出金丝慈竹愈伤诱导的最佳配方 MS+2,4-D 5 mg/L+6-BA(0.2~0.5) mg/L; 记录了愈伤发生过程中不同类型愈伤的发生时间及生长状态, 并通过对健康的 I 型愈伤组织进行增殖培养筛选出最佳增殖配方 MS+2,4-D(2~3 mg/L)+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。通过对增殖后健康的 I 型愈伤组织的诱导分化, 实现了器官再生, 并获得最佳芽体分化配方 MS+6-BA 5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 及不定根系发生诱导配方 MS+6-BA 1 mg/L+NAA (0.5~2 mg/L)。

关键词: 金丝慈竹; 愈伤培养; 植株再生

A Primary Study on Callus Induction and Plant Regeneration of *Bambusa affinis* 'viridiflavus' // WU Tao, LU Juan-juan, DING Yu-long

Abstract: The callus induction culture and plant regeneration of *Bambusa affinis* 'viridiflavus' were investigated in this paper. The results showed that the optimum medium for callus induction culture were MS + 2,4-D 5 mg/L + 6-BA (0.2 ~ 0.5) mg/L. The different types of callus were observed during the different culture stages, among which the type I callus could be further induced with the optimum medium of MS+2,4-D (2~3 mg/L) + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L for callus multiplication. According to the experiment, it was found that the better medium of bud differentiation was MS+6-BA 5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, and the optimum media of adventitious root was MS+6-BA 1 mg/L+NAA (0.5~2) mg/L.

Key words: *Bambusa affinis* 'viridiflavus'; Callus induction; Plant regeneration

First author's address: Bamboo Research Institute, Nanjing Forestry University, 210037, Nanjing, China

竹子是一类特殊的经济植物, 它很少开花结籽, 最常见的传统繁育方式是母竹分株或者利用竹秆、竹枝扦插, 这些方法存在消耗种竹多、种苗运输不方便、劳动强度大、繁殖系数低等问题, 很大程度上制约了竹林资源的有效利用。针对这些问题, 随着对竹类研究的深化, 人们开始研究竹类植物新的繁殖方法, 其中最直观有效的就是竹类组织培养获得再生植株。对于竹类植物的组织培养, 最早开始于 1968 年 Alexander 和 Rao 关于成熟种胚离体培养的报道^[1]。此后, 对于竹类植物的离体快繁研究内容层出不穷, 对于竹类植物的快速繁殖技术逐渐受到重视。1975 年 Tseng 等首次从竹叶分离出原生质体^[2]。1982 年 Metha 等、1985 年 Rao 等先后分别对印度籼竹 (*Bambusa arundinacea*) 和牡竹 (*Dendrocalamus strictus*) 种子成熟胚进行诱导, Metha 直接从印度籼竹种子获得胚起源的愈伤组织, 并获得再生植株^[3]。1983 年, Huang 和 Murashige 以籼竹属 (*Bambusa*)、刚竹属 (*Phyllostachys*)、箬竹属 (*Indocalamus*) 和籼竹属

(*Bambusa*) 生长活跃的侧芽和顶芽的芽尖作外植体, 对诱导愈伤组织产生的条件作了详细的研究^[4]。此后的几十年间, 国内外先后对 18 个属 70 多个竹种进行过组织培养研究, 其中的 60 种获得成功。自 90 年代起, 试管苗开花诱导成为竹子组织培养研究新的热点, 并有一些成功的报道^[5~7]。2000 年, 吴益民等对孝顺竹 (*Bambusa multiplex*) 的顶芽和节侧芽外植体进行诱导获得愈伤组织, 并建立悬浮细胞系^[7]。2002 年, 王光萍等以金镶玉竹等 11 种观赏竹新萌发的嫩芽为材料, 进行组织培养, 获得了 7 种观赏竹的再生植株^[8]。近年来, 就目前已有的报道来看, 不少关于竹类组织培养的最新报道都将侧重点放在了愈伤组织诱导进而得到植株再生方面^[9~14], 其中也不乏通过愈伤组织实现器官发生进而实现植株再生的。金丝慈竹 (*Bambusa affinis* 'viridiflavus'), 慈竹属, 竹秆分枝一侧具浅黄色条纹, 为优美的庭园观赏竹种, 南亚热带北部或中亚热带地区, 如四川, 湖南, 江西北部等均有分布。南京林业大学竹类研究所从各产地中筛选出一个耐寒性较好的种质, 经过 8 a 的栽培观察, 该种质在南京可以安全露天越冬, 竹秆直径达 6 cm、高达 12 m, 秆先端弯曲下垂, 形态极其优美。

收稿日期: 2007-12-10

基金项目: 国家“十一五”科技支撑课题资助(编号: 2006BAD19B02)。

第一作者简介: 吴涛(1982-), 女, 硕士生, 研究方向为植物发育学。

通讯作者: 丁雨龙, 男, 教授。E-mail: ylding@njfu.com.cn

应用研究

与长江中下游地区常见的丛生观赏竹——孝顺竹相比,观赏价值更高。鉴于传统繁育方式所需耗费大量人力物力,本实验旨在建立由愈伤组织培养进行植株再生的一个完整体系,为金丝慈竹新种质繁育开辟一条新的途径。

1 材料与方法

供实验的材料来自南京林业大学竹类研究所竹子快繁实验室中的快繁无菌苗。选取无菌快繁体系中健康茁壮的无菌苗,以试管苗无污染、无玻璃化现象、体系稳定、繁育出的新芽饱满为最好。具体步骤:

(1)将快繁无菌体系竹苗发出的饱满新芽由原植株体上切下,切割时保证芽体饱满,用无菌水清洗去原有培养基,将芽体外部的较老箨片剥去,留下芽体和幼嫩的箨片,然后将材料接种到愈伤诱导培养基上进行愈伤诱导;

(2)根据第一阶段诱导出的不同类型的愈伤组织,选取合适类型的愈伤接种到愈伤增殖培养基上进行增殖;

(3)将增殖后的健康的愈伤组织接种到诱导分化培养基上进行器官诱导分化,因竹类愈伤组织诱导极易生根,故在此以诱导芽体为主;

(4)待实现愈伤组织器官发生后,将已有分化出的芽体从愈伤组织上切下,接种到生根培养基上进行生根诱导,根发生后移植到基质中进行炼苗,实现再生体系的完整化。

进行上述操作之后,隔日进行观察,记录愈伤组织诱导率和生长状态,并对愈伤生长状态进行评价,采用正交实验对各阶段所需的最佳激素配比进行分析,筛选出最佳的愈伤诱导配方,愈伤增殖配方,诱导分化配方和诱导生根配方。

因金丝慈竹稳定的快繁(以芽繁芽)体系培养基为MS培养基,为维持芽体的稳定,故以上实验中的基础培养基都为MS培养基,蔗糖浓度均为3%,愈伤诱导阶段和增殖阶段均为暗培养,诱导分化阶段前期为暗培养,后期和诱导生根阶段,每日辅助光照10h,光照强度约1600lx。防褐化剂采用抗坏血酸,温度控制为25~28℃。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

以激素2,4-D(0.5~7)mg/L分别与KT(0.1~1)mg/L和BA(0.1~1)mg/L进行配比组合,通过实验观察可以得出随着2,4-D浓度的升高,愈伤组织的发生率和致密程度都呈上升趋势,愈伤诱导率最高

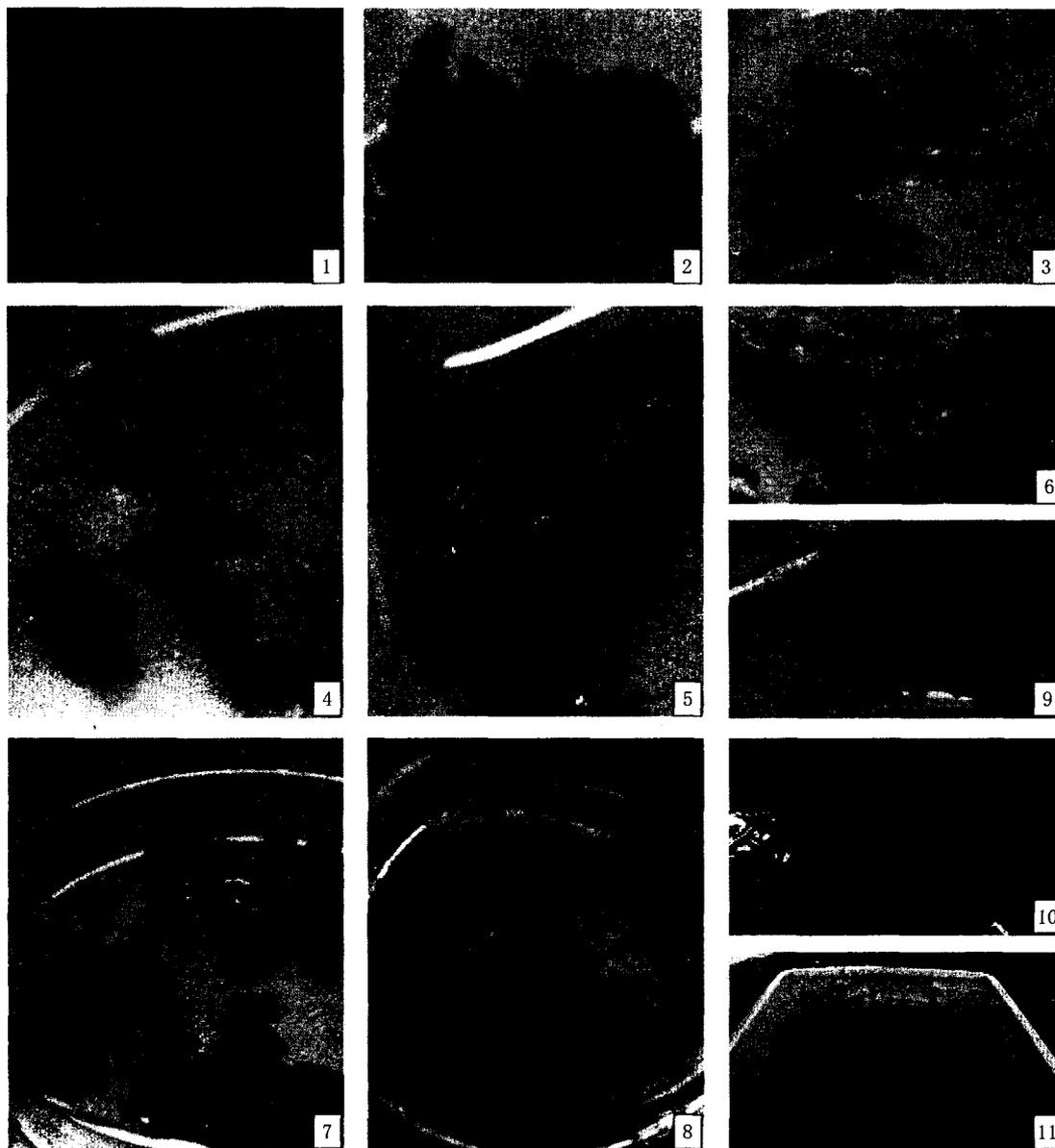
可达100%。但当超过一定量的时候,诱导而出的愈伤组织就会褐化死亡。2,4-D浓度偏低时,基本不出愈,或者愈伤比较水渍化且具粘性,不利于愈伤的进一步增殖和分化,经过一段时间的继代培养后就会褐化死亡。2,4-D和6-BA两种激素的配比对于愈伤组织类型(见图1)的决定和发生率都起着重要作用。当2,4-D浓度太低时愈伤发生时间延长,愈伤粘性,量少且容易发生水渍化;随着浓度增加,愈伤粘性程度逐渐降低;但若6-BA浓度过高时,就会加速愈伤的分化,存在发出的愈伤还未进行增殖培养就已分化的现象,不利于愈伤状态的统一。

就已发生的愈伤来看,通过这几种激素配比培养诱导出的愈伤组织主要可分为3种类型:I型为增殖和分化的最佳愈伤,松散颗粒状,结构致密,色泽鲜亮,多为黄绿色;II型为白色或浅褐色的粘性愈伤,此类愈伤在出愈的最初阶段多易发生,愈伤为团状,水渍化,无法分离;III型为白色半透明愈伤,其含水率很高,以松散状态存在。此3类愈伤,II型愈伤多发生于诱导最初阶段,I型和III型愈伤多在其后产生,根据激素配比组合不同,产生出不同的愈伤。总体来说,除II型愈伤外其他两种愈伤褐化程度都较轻,尤其是I型愈伤,基本无褐化现象,是状态最好的愈伤,因此判定金丝慈竹愈伤诱导的最佳激素配比组合为2,4-D 5 mg/L+6-BA(0.2~0.5)mg/L或者2,4-D 5 mg/L+KT 1 mg/L。

2.2 愈伤组织的增殖

愈伤组织的增殖是决定是否能够实现愈伤状态的初步统一化比较关键的一个阶段。以上实验发生的3种类型愈伤,因II类型愈伤到愈伤发生后期阶段基本都已褐化,故不在考虑到增殖范围。将剩余两种类型的愈伤接种到增殖培养基上进行增殖培养。

在增殖阶段,愈伤对2,4-D的依赖不再像诱导阶段一样高,但仍需维持在一定浓度,低浓度的6-BA和适中浓度的NAA对愈伤的增殖都有良好的效果。在2,4-D(1~5)mg/L与6-BA(0.2,1)mg/L以及NAA(0.1~0.5)mg/L激素浓度范围的配比实验下,I型愈伤和III型愈伤都有所增殖,且所增殖的愈伤都维持在原状态,基本没有分化现象。I型愈伤所增殖的愈伤黄白色,致密,含水率相对其他两种愈伤来说较低,无水渍化现象,结构致密,用镊子拨开可分散成颗粒状;III型白色松散愈伤增殖后仍然为白色松散状,含水率高,用镊子轻轻挤压会有水分产生,愈伤松散成粉团状。



1. 愈伤诱导起的金丝慈竹芽体, 示刚出愈的愈伤; 2. 示 I 型愈伤, 黄绿色, 致密, 可剥落为颗粒状; 3. 示 II 型愈伤, 白色或浅褐色的粘性愈伤, 团状, 水渍化; 4. 示 III 型白色半透明愈伤, 可见其含水率很高, 愈伤松散; 5. 体视解剖镜下的 I 型愈伤, 示开始分化的芽点; 6. 开始分化的愈伤长出芽体; 7. 示愈伤芽丛产生的同时, 其余部分的愈伤褐化死亡; 8. 示分化出的芽丛; 9、10. 植株体根系发生; 11. 炼苗后移栽成活。

图 1 愈伤诱导及再生体系

当激素配比在 2, 4-D (2 ~ 3 mg/L) + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 这个浓度范围时, 愈伤增殖倍数可以维持在原有体积 2 ~ 3 倍, 最高可达 4 倍, 并且可以维持愈伤基本处于发育及分化较为统一的最佳状态。

2.3 诱导器官分化

愈伤组织的分化是通过愈伤组织的培养实现植株再生的重要步骤, 包括诱导芽体的产生和根系的发生。选取增殖情况良好的 I 型愈伤将其植入诱导分化培养基, 诱导芽体或者体胚产生的培养基, 诱导植株再生。

在芽丛的诱导阶段, 对于 6-BA 和 NAA 两种激

素配比较为敏感, 故实验浓度范围设定在 6-BA (1 ~ 6) mg/L 和 NAA (0.1 ~ 1) mg/L。健康 I 型愈伤诱导植株分化 30 d 左右都有芽丛产生, 但当 NAA 用量偏高以后, 容易诱发根的产生, 根据实验观察, 当愈伤组织在产生芽之前先产生根, 愈伤块很快就会褐化死亡。因此, 在诱导愈伤进行分化时应尽量控制 NAA 的用量。根据实验, 诱导金丝慈竹愈伤块分化出再生植株最佳的配方为 MS+6-BA 5 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

愈伤诱导分化过程中, 褐化现象严重, 有的愈伤块严重褐化死亡, 对于激素用量非常敏感。且在愈伤产生芽丛的同时, 会有部分由黄转绿的绿色点状愈伤

应用研究

块剥落,疑似体胚,但需进一步进行的切片和电镜观察佐证。

2.4 再生植株诱导生根

诱导再生植株生根,是实现无菌体系循环,实现大棚移栽的必要步骤。将诱导分化出的健康芽丛长成的小植株转入生根培养基进行生根诱导,激素浓度范围设定在 NAA(0.5~2)mg/L 和 6-BA 1 mg/L。

金丝慈竹再生植株诱导生根是个相对其他过程较为容易的步骤,多数植株对生根配方均有反应,区别只在于发根量的多少及根系的状态,当 NAA 浓度达到一定量(≥ 0.5 mg/L)后,植株的根系都有所发生,最高发根率可达 100%。在 NAA 的基础上再添加 6-BA 则会促进发根量的增加。根据发根量,再生植株诱导生根最佳配方为 MS+6-BA 1 mg/L + NAA (0.5~2)mg/L。

将生根后的健康植株(根系达 10 条以上)由培养瓶取出置于自然散射光、有一定昼夜温差的实验室内,3~5 d 后除去封口膜,再炼苗 3~5 d,从瓶中取出竹苗,洗净培养基,移栽于育苗箱的基质上(蛭石:珍珠岩:砂壤土=1:1:1),浇足定根水,定期喷洒营养液,用塑料膜调节温度、湿度和光照,后统计成活率及竹苗生长状况,待新发健壮根系后移往大棚。

3 讨论

(1)金丝慈竹的愈伤组织诱导单纯从激素因素来考虑,可以通过 2,4-D 和 6-BA、KT 组合来实现,实验中可以产生 3 种不同类型的愈伤:I 型为增殖和分化的最佳愈伤,松散颗粒状,结构致密,色泽鲜亮,多为黄绿色;II 型为白色或浅褐色的粘性愈伤,此类愈伤在出愈的最初阶段多易发生,愈伤为团状,水渍化,无法分离;III 型为白色半透明愈伤,其含水率很高,以松散状态存在。其中 I 型愈伤是诱导增殖和进一步分化的优质愈伤,在适当的继代培养后,愈伤可以进一步增殖,并且诱导器官发生,从而形成新的植株。通过对新植株的移栽,完成无菌体系向栽培体系转化。

(2)此次实验中通过对金丝慈竹愈伤组织的诱导,增殖并实现植株体再生,完成了植物体组织培养脱分化到再分化的整个过程,就其本身而言是具有生物学意义。建立竹子愈伤诱导再生植株体系,不仅为新竹繁育开辟出一条新的途径,同时也有助于竹林育种研究。世界范围内基因工程育种在禾本科进行了广泛的应用研究,但绝大多数集中在禾亚科的农作物中,同为禾本科的竹亚科几乎没有基因工程育种成功的报道。其原因是多方面的,竹子主要分布在发展

中国家,经济因素,技术因素,环境因素都起极大的制约作用。组织培养是基因工程育种的基础,愈伤组织诱导和通过体细胞胚胎获得再生植株已成为竹子遗传改良的技术关键。通过对愈伤发育发生阶段的统一,进而为竹类基因工程育种后续阶段提供适宜的材料,使此次实验在育种方面又具有了另一番重要的意义。

参考文献

- [1] Alexander M P, Rao T C. In vitro culture of bamboo embryos[J]. Cur Sci, 1968, 37:415.
- [2] Tseng T C, Liu D F, Shaio S Y. Isolation of protoplasts from crop plants[J]. Bot Bull Acadmia Sinica, 1975(16):55-60.
- [3] Metha U, Rao H Y, Mohan R, et al. Somatic embryogenesis in bamboo [J]. Plant Tissue Cell Cult, 1982(Proceeding 5th International Cong): 109-110.
- [4] Rao U, Rao I. V. Ramanuja, Narang V. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo [J]. Plant Cell Reports, 1985(4): 191-194.
- [5] Nadgauda R S, Parasharami V A, Mascrenhas A F. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos [J]. Nature, 1990, 344(6264):335-336.
- [6] 张光楚,陈富枢,王裕霞,等. 麻竹离体快速繁殖技术的研究[J]. 竹子研究汇刊, 1993, 12(4):7-15.
- [7] 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[J]. 竹子研究汇刊, 2000, 19(1):52-55.
- [8] 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.
- [9] Ramanayake S M. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro) [J]. Scientia Horticulturae, 2003(98):195-200.
- [10] 韩文军,周宏,何钢. 毛竹愈伤组织培养中褐变现象的研究[J]. 湖南林业科技, 2004, 31(3):4-6.
- [11] 赵光俊. 试管内竹类之器官发生与植株再生[R]. 台湾大学园艺学研究所 2004 年度作物组专题讨论, 2004.
- [12] 周宏,何钢. 毛竹愈伤组织培养研究[J]. 湖南林业科技, 2005, 32(4):41-42.
- [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]. 林业科技开发, 2006, 19(1):75-78.
- [14] Savita G, Anil S. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro [J]. Current Science, 2002, 83(7):885-890.

(责任编辑 周贤军)

