云南农业大学学报 Journal of Yunnan Agricultural University, 2011, 26 (3): 359 - 363 http: //xb. ynau. edu. cn
ISSN 1004 - 390X; CODEN YNDXAX E-mail: xb@ ynau. edu. cn

DOI: 10.3969/j. issn. 1004 - 390X (n) . 2011. 03. 014

小叶龙竹的快速繁殖与离体保存*

何巨擘[1,2], 程治英[2], 郭振华[2**], 曾千春[1]
(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 利用小叶龙竹种子培养的试管苗对其快速繁殖体系的建立与离体保存进行了研究, 结果表明: 根、茎、叶和小芽各外植体中, 小芽切段可以较好的诱导芽的增殖且基本培养基 MS 附加 3 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 为芽增殖最适培养基, 增殖率可达 1:4.4。培养基 1/2MS 附加 1 mg/L NAA 和 1 mg/L IBA 为最佳生根培养基, 15 d 丛芽生根率为 93%, 27 d 丛芽生根率则达到了 100%。MS 培养基附加 10 mg/L CCC 培养基为最佳离体保存培养基, 保存时间可达 120 d 以上, 转接到 MS 外加 3 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的恢复培养基上, 培养 50 d, 可以 100% 恢复生长。据调查: 小叶龙竹的快速繁殖与离体保存研究国内外尚属首次报道。

关键词: 小叶龙竹; 快速繁殖; 离体保存
中图分类号: S 795.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004 - 390X (2011) 03 - 0359 - 05

Rapid Propagation and Reservation *in vitro* of *Dendrocalamus barbatus* Hsueh et D. Z. Li

HE Ju-bo[1,2], CHEN Zhi-ying[2], GUO Zhen-hua[2], ZENG Qian-chun[1]
(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The test-tube plantlets cultured from the seeds of *Dendrocalamus barbatus* Hsueh et D. Z. Li were utilized to investigate the system of rapid propagation and reservation *in vitro*, the results revealed that the shoot of seedlings was a better one of the explants that could induce shoots propagation, for which the MS medium supplemented with 3 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA was the best one and the ratio of propagation can be 1 to 4.4. While the 1/2 MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 1 mg/L IBA was the best root medium in which the rooting ratio can be 93% in 15 days and 100% in 27days. The plantlets could be sustained more than 120 days in the best reservation MS medium in vitro supplemented with 10 mg/L CCC, which also could survive and grow in 50 days in the MS medium supplemented with 3 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA. As reported, this research is the latest fruits in the world.

Key words: *Dendrocalamus barbatus* Hsueh et D. Z. Li; rapid propagation; reservation *in vitro*

小叶龙竹 (*Dendrocalamus barbatus* Hsueh et D. Z. Li)[1]分布于云南东南部至西南部海拔 360 ~ 1 100 m 的低中山沟谷竹木混交林中, 均为栽培, 是我国传统的优良丛生竹, 生长快速, 2 年便可

收稿日期: 2010 - 10 - 22 修回日期: 2010 - 11 - 23 网络出版时间: 2011 - 05 - 13 10: 25
* 基金项目: 中国西南野生生物种质资源库 (0802261411)。
作者简介: 何巨擘 (1985 -), 男, 湖南冷水江人, 在读硕士研究生, 主要从事作物遗传育种和竹子组培及开花诱导研究。E-mail: forever8561@ 163. com
* * 通讯作者 Corresponding author: 郭振华 (1975 -), 女, 山东人, 研究员, 博士后, 主要从事植物比较功能基因组学与生物信息学的研究。E-mail: guozhenhua@ mail. kib. ac. cn
网络出版地址: http: //www. cnki. net/kcms/detail/53. 1044. S. 20110513. 1025. 201103. 359_176. html

成林，高度可达 15 ~ 18 m，茎粗 10 ~ 15 cm[2]。国内外对小叶龙竹的研究报道极少，目前只有李秀兰在中国部分丛生竹染色体报道中对其染色体数目进行了研究[3]，郑郁善等对沿海沙地小叶龙竹林凋落物分解及养分归还动态进行了研究[4]，张文标等对广东小叶龙竹竹炭性能进行了研究[5]，杨清等对小叶龙竹的化学成分与制浆性能进行了研究[6]，其中杨清等的研究表明小叶龙竹具有纤维平均长度较长、长宽比较高、纤维素含量较高、木质素含量较低的优势，其成浆容易，撕裂强度较高，是一种优良的竹类纤维原料。由于小叶龙竹对中国热带地区利用大型丛生竹开发制浆造纸等产业有着极其重要的意义，笔者对小叶龙竹的快速繁殖体系的建立与离体保存进行了研究，以期为小叶龙竹的生理生化反应、开花成因及逆转、遗传改良、开发利用等提供试验数据和技术支撑。据调查，小叶龙竹的快速繁殖与离体保存研究国内外至今尚属首次报道。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 4 月于云南红河采集的小叶龙竹种子及其萌发生长后小苗的芽、茎、叶和根段。

1.2 方法

1.2.1 培养基配置及其培养条件

（1）种子萌发培养基：3/4 MS[7] + BA 0.5 mg/L（单位下同）。

（2）种子苗的叶切段、根切段和茎切段和芽切段各不同部位的芽诱导培养基：MS + BA 3。

（3）芽增殖培养基：MS 基本培养基外加① BA 2 + NAA 0.2；②BA 3 + NAA 0.1；③BA 5 + NAA 0.1。

（4）生根培养基：1/2 MS 基本培养基外加① NAA 1 + IBA 1；②NAA 1 + IBA 5；③NAA 1 + IAA 5；④NAA 1 + IAA 1；⑤NAA 1；⑥NAA 5；⑦IBA 2。

（5）离体常温保存培养基：MS + TDZ1 基本培养基外加①PP_{333}（多效唑）10；②CCC（矮壮素）10；③MH（青鲜素）50 ④B_9（丁酰肼）50 ⑤$B_9$50 + CCC10；⑥TRIA（三十烷醇）10。

（6）离体低温保存培养基：①MS + BA 3；② MS + CCC10。

（7）恢复增殖培养基：MS + BA 3 + NAA 0.1（即芽增殖培养基中的②号培养基）。

以上培养基均加 0.65% 琼脂固化，pH 5.8，糖浓度除生根培养基为 2% 外，其余的都为 3%。光照强度为 20 μm/（m^2 · s），光照强度为 2 000 lx 时间为 12 h/d，培养温度除离体低温保存外都为（25 ±3）℃。

1.2.2 种子消毒与萌发

将 98 粒保存于云南野生种质资源库的小叶龙竹种子用 75% 酒精表面消毒 2 min，然后剥掉种子外种皮，然后用蒸馏水清洗后，用有效氯含量为 3% 次氯酸钠（NaClO）溶液作种子表面活性剂，消毒 15 min，蒸馏水清洗 3 次后，用淡红色的高锰酸钾水溶液浸种 12 ~ 16 h。接种前，在超净工作台上再用 0.1% 的升汞（$HgCl_2$）溶液消毒 12 min，无菌蒸馏水清洗 5 次，然后将无菌种子接种在培养基（1）上。

1.2.3 不同外植体诱导丛生芽的比较

将 10 株试管苗长约 1 cm 的芽切段、根切段、叶切段和茎切段接种在培养基（2）上培养待观察。

1.2.4 不同激素浓度组合对丛芽增殖的影响

将同一株系增殖的 120 个小芽分为 3 组、每组 10 瓶、每瓶 4 个小芽分别接种在培养基（3）上，每周观察 1 次。每 2 个月重复试验 1 次，共重复 3 次。

1.2.5 生根培养

将培养的以 2 ~ 3 个芽为一丛的高度约在 5 cm 的丛芽转接到培养基（4）上，每周观察 1 次，2 个月后再重复试验 1 次，每次接种芽丛数见表 1。

1.2.6 组培苗的离体保存

（1）常温下，将生长旺盛的组培苗分别接种至培养基（5）上保存。

（2）将生长旺盛的组培苗接种至培养基（6）上，于 12 ℃，60% 湿度的环境下保存。上述 1 组实验按每个保存条件 20 瓶，每瓶 4 丛的比例半年重复 1 次试验，现已重复到第 3 次试验阶段。

2 结果与分析

2.1 种子消毒与萌发

种子培养 9 d 后开始萌发，培养 26 d 以后的种子没有萌发了。种子接种总数为 98 粒，萌发数为 24 粒，种子萌发率为 24.48%。但萌发成种子苗最终成功的仅有 11 株，占萌发种子总数一半不到。如图 1。

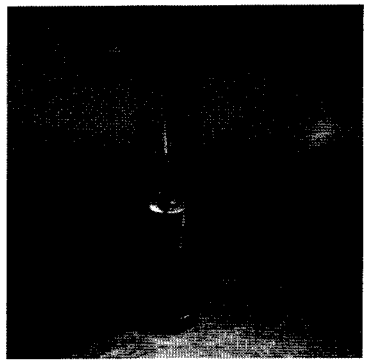

图 1　小叶龙竹种子萌发
Fig. 1　Seed budding of *D. barbatus*

2.2　不同外植体诱导丛生芽的比较

据观察统计，叶切段培养 70 d 后褐化死亡，根切段培养 80 d 后死亡，均无任何变化。茎切段培养 50 d 后长出腋芽，增殖率为 1∶1.6；小芽切段培养 30 d 后增殖率为 1∶4。因此用于快速繁殖的外植体应选用小芽最为合适。

2.3　不同激素浓度组合对小芽增殖的影响

小芽增殖 47 d 后统计结果如表 1 所示。

表 1　小叶龙竹不同激素浓度对小芽增殖影响的统计
Tab. 1　Statistics of different effect of auxins to shoots propagation of *D. barbatus*

增殖培养基 propagation medium	小芽增殖平均速率 average ratio of shoot propagation	增殖标准方差 standard deviation of propagation	丛芽平均高度/cm average height
① MS + BA 2 + NAA 0.2	1：2.5	3.12	7.0
② MS + BA 3 + NAA 0.1	1：4.4	0.75	5.5
③ MS + lBA 5 + NAA 0.1	1：4.0	1.45	5.0

注：表格中除 MS 外，其它培养基组分单位均为 mg/L，下同。
Note：The units for the medium components are "mg/L", the same as below.

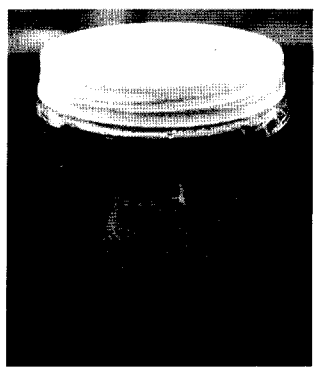

图 2　小叶龙竹丛生芽诱导
Fig. 2　Multiple shoots induction of *D. barbatus*

由于在本试验中以小芽增殖率为第 1 指标，高度为第 2 指标，且培养基②上的小芽增殖率标准差为 0.75 小于增殖培养基③上的小芽增殖率的标准差 1.45，故增殖培养基②最适合小芽的快速繁殖。2 次重复实验结果一致。如图 2。

2.4　生根培养

从表 2 可得出，丛生芽生根培养的最适培养基为生根①号培养基：1/2MS + NAA 1 + IBA 1，15 d 丛芽生根率为 93%，27 d 丛芽生根率则达到了 100%。如图 3。

表 2　小叶龙竹根诱导试验统计
Tab. 2　Statistics of root induction of *D. barbatus*

生根培养基 rooting medium	接种芽丛数 numbers of inoculated cluster	15 d 丛芽生根率/% rooting ratio of cluster shoots in 15days	27 d 丛芽生根率/% rooting ratio of cluster shoots in 27days
① MS + AA 1 + IBA 1	14	93	100
② MS + AA 1 + IBA 5	15	87	95
③ MS + lNAA 1 + IAA 5	22	59	95
④ MS + AA 1 + IAA 1	6	34	100
⑤ MS + AA 1	6	67	83
⑥ MS + NAA 5	6	67	83
⑦ MS + IBA 2	13	54	54

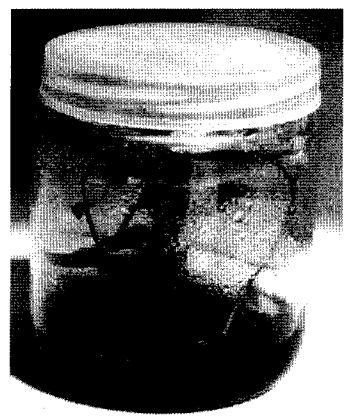

图 3　小叶龙竹根的诱导
Fig. 3　Root induction of *D. barbatus*

2.5　组培苗的离体保存

经过数次试验，小叶龙竹在组织培养中，一般 28 d 左右必须继代 1 次，否则培养物就会大面积坏死，继代标准是培养物的 20% 都出现褐化和死亡。用添加生长抑制剂的培养基（5）在室温下保存试管苗，可以 75 d 继代 1 次，但是用培养基（6）①号在低温下对试管苗进行保存，则平

版社，1996.

[3] 李秀兰，林汝顺，冯学琳，等. 中国部分丛生竹类染色体数目报道 [J]. 植物分类学报，2001，39 (5)：433 - 442，T001 - T002.

[4] 郑郁善，荣俊冬，陈礼光，等. 沿海沙地小叶龙竹林凋落物分解及养分归还动态 [J]. 福建农林大学学报：自然科学版，2008，37 (5)：487 - 490.

[5] 张文标，傅金和，周光益，等. 2 种广东丛生竹炭性能的研究 [J]. 竹子研究汇刊，2008，27 (1)：46 - 49.

[6] 杨清，周承贵，苏光荣，等. 小叶龙竹的化学成分与制浆性能 [J]. 南京林业大学学报：自然科学版，2008，32 (1)：65 - 68.

[7] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture [J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15 (3): 473 - 497.

[8] JONES G E. Chromosome numbers and phylogenetic relationships in the Araceae [J]. Dissertation Abstracts International, 1957, 17: 2394.

[9] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro* [J]. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1957, 11: 118 - 130.

[10] ALEXANDER M P, RAO T C. *In vito* culture of bamboo-embryos [J]. Current Science, 1968 (37): 415.

[11] NADGAUDE R S, PARASHARAMI V A, MASERENHAS A F. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos [J]. Nature, 1990, 344: 335 - 336.

[12] WOODI S H, PHILLIPS G C, WOODS J E, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic explant in Mexica weeping bamboo, *Otatea acuminata aztecorum* [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11 (5/6): 257 - 261.

(上接第 347 页)

本研究建立了“铁头金刚”甘蓝叶片高频再生体系，筛选出最佳培养基为 MS + 6-BA 1 mg/L + $AgNO_3$ 0.01 mg/L，不定芽诱导率可达 96.7%，每个外植体上的不定芽数高达 8 个。高的再生频率和增殖率是利用叶绿体基因工程进行品种改良的前提，本研究结果为通过叶绿体基因工程进行甘蓝品种遗传改良奠定了良好的基础。

[参考文献]

[1] 余建明，蔡小宁，朱祯，等. 结球甘蓝的离体再生及基因转化条件研究 [J]. 江苏农业学报，1996，12 (3)：6 - 9.

[2] 卫志明，黄健秋，徐淑平，等. 甘蓝下胚轴的高效再生和农杆菌介导 Bt 基因转化甘蓝 [J]. 上海农业学报，1998，14 (2)：11 - 18.

[3] 陆芽春. 结球甘蓝离体再生及若干影响因素的研究 [J]. 广西园艺，2004，15 (5)：2 - 3.

[4] LIU C W, TSENG M J. Development a high-frequency method of plastid transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) [J]. Horticulture NCHU, 2005, 30: 27 - 38.

[5] 刘娟，汤浩茹，王小蓉，等. 硝酸银在植物离体培养中的应用之研究进展 [J]. 中国农学通报，2007，23 (10)：400 - 406.

[6] 李会珍，张志军，周伟军. 基因型和 $AgNO_3$ 对甘蓝型油菜子叶外植体植株再生的影响 [J]. 中国油料作物学报，2003，25 (4)：20 - 22.

[7] 吕爽，王超. 结球甘蓝离体培养的研究进展 [J]. 北方园艺，2004，(3)：6 - 7.

[8] SCOTT S E, WILKINSON M J. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rape* [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 390 - 392.

[9] STAUB J M, GARCIA B, GRAVES J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 333 - 338.