

文章编号: 1001-1498(2003)03-0245-09

杂种撑麻 7 号竹的组织培养研究

张光楚, 王裕霞

(广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要: 对 28 年生的撑麻 7 号竹的离体快速繁殖技术进行了系统研究, 结果发现: 降低培养基中大量元素用量, 提高 BA 质量浓度有利于形成丛芽; 在按正交设计的 9 组增殖培养基中, 芽的增殖率差异不显著, 芽的生长量相差近 4 倍, 而且凡配方中加有 KT 的苗的生长均比同质量浓度 BA 而未加 KT 的苗要好, 表明 KT 有促进生长的作用; 经反复试验比较, 认为 $3/4MS(m) + BA 2 mg \cdot L^{-1} + KT 1.25 mg \cdot L^{-1}$ 较适合增殖培养; 还发现试管苗在萌发新芽时最易生根, 采取先将苗生根培养 20~30 d 后, 转入增殖培养 5~7 d, 可以使苗同步地萌发新芽, 此时再将苗转入生根培养, 采取 2 次生根的办法使生根率达到 78.2%, 从而解决了试管苗生根时大量死亡的问题。

关键词: 撑麻 7 号竹; 组织培养; 成年竹; 离体快速繁殖

中图分类号: S722.3⁺7 **文献标识码:** A

杂种撑麻 7 号竹 (*Bambusa pervariabilis* McClure \times *Dendrocalamus latiflorus* Munro No. 7) 是人工授粉选育出来的一个优良无性系, 经多年的造林试验证明: 撑麻 7 号竹具有生长快、抗逆性强、干型通直、形态美观等特点, 可以笋、纸两用, 经济价值较高。为了加快其推广的进程, 进行了撑麻 7 号竹离体快速繁殖技术的研究。

早在 20 世纪 80 年代, 竹类植物的离体快速繁殖已引起国内外学者的关注, 相继报道了一些经济竹种组织培养的研究成果^[1,2], 但至目前为止, 研究成功并能进行工厂化生产的竹种外植体大多取自于幼年的组织, 如种胚、实生苗的茎段等, 而取自遗传品质好的成年竹子的组织培养, 成功的事例不多, 能工厂化生产的竹种就更少。这是因为木本植物随着年龄的增长, 其细胞的植株再生能力越来越衰退, 年龄越大、组织培养越困难。撑麻 7 号竹引入试管时的确切年龄(从种子发芽到取样时的年龄)是 24 年生, 经反复多次的试验、失败到基本上掌握各培养阶段的关键技术, 它的生理年龄已 28 年生。有了撑麻 7 号竹组织培养的经验教训, 近年来作者进行花吊丝竹 (*Dendrocalamus minor* var. *amoenus* (Q. H. Dai et C. F. Huang) Hsueh et D. Z. Li)、马来甜龙竹 (*Dendrocalamus asper* (Schult. f.) Backer ex Heyne) 及多个杂种的优良无性系(年龄大都在 30 a 以上)的组织培养, 均较顺利地得到完整植株, 表明撑麻 7 号竹组织培养具有一定的代表性, 可供其它成年竹组织培养参考。

收稿日期: 2002-09-20

基金项目: 广东省自然科学基金“笋用竹遗传改良及离体快速繁殖技术的研究”(930902)、广东省“九五”农业重点科技项目“笋用竹种质资源开发利用研究”中的部分研究内容

作者简介: 张光楚(1938—), 女, 湖北孝感人, 研究员。

1 材料与方 法

1.1 试验取材及消毒

外植体选用半木质化的枝条,材料表面清洁后在1‰~2‰的升汞或者2.5%的次氯酸钠溶液中浸洗15~30 min,无菌水冲洗3~5次,然后切成小段,每段1芽,节上节下各留1~2 cm。

1.2 培养基

基本培养基参照MS培养基^[3,4],其中大量元素、生长调节物质在不同培养阶段作了适当更改,维生素参照B5培养基,微量元素、铁盐、糖、甘氨酸、肌醇均同MS,pH值5.8~6.2。各培养阶段培养基筛选的试验方案如下:

1.2.1 丛芽诱导阶段 以诱导形成丛芽为主要目的,在MS培养基的基础上变化大量元素、BA、NAA、GA用量,每因素3水平,大量元素分别为MS培养基中大量元素的全量、 $3/4$ 量、 $1/2$ 量(以下分别简写成1、 $3/4$ 、 $1/2$ MS(m)。MS(m)意指MS培养基中的大量元素,通常按标准用量 $10\times$ 配制成母液($1\text{MS(m)} = \text{母液 } 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $3/4\text{MS(m)} = \text{母液 } 75\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$,等);BA为0.5、3、 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3个水平;NAA分别为0、0.2、 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3个水平;GA设计了0、0.5、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3个水平,按正交试验 $L_9(3^4)$ 表组配了9个处理(见表1)。试验重复3次,第1次每处理接种外植体10段,第2、第3次每处理接8段,总共接外植体234段。通过试验寻找丛芽诱导的最佳培养基配方。

1.2.2 芽增殖阶段 以增加苗数和改善苗的生长为主要目的,在MS培养基的基础上改变大量元素、BA、KT、NAA用量,大量元素设1、 $3/4$ 、 $1/2$ MS(m)3水平,BA设0.5、1、 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3水平,KT设0、0.5、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3水平,NAA设0.2、0.4、 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3水平,按正交试验表 $L_9(3^4)$ 组配了9个处理如表2。每处理接30丛苗,分别统计因素、水平、处理的芽增殖率和苗的高生长量,找出影响组培苗增殖、生长的主导因素和最佳组配方案。

1.2.3 生根阶段 大量元素用 $1/2$ MS(m),蔗糖 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA、IBA分别设0.5、1、 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3水平,两种激素联合使用,组配9处理如表4。每处理随机接种36丛苗(6瓶,每瓶6丛),分别统计各处理的生根率。

1.3 培养条件

以上各培养阶段试验室的温度均控制在28~30℃之间,每日辅助光照10 h,光照强度约1600 Lx。

2 结果与分析

2.1 外植体选择和消毒

获得无菌的试验材料是竹子茎段培养必须先突破的一关,竹节中空,给外植体消毒带来许多困难,在消毒的过程中,污水和药液进入竹腔,常常导致消毒不彻底或者产生药害,作者从取材、控制消毒时间和消毒药液的剂量三方面综合考虑,反复试验获得了无菌的外植体。

在取材方面曾用木质化、半木质化和正在生长中的嫩枝做试验,结果是用半木质化的枝条作外植体比较好,这是因半木质化的枝条对消毒药剂的承受力比嫩枝强,而丛芽形成的速度比老枝快,所以是较理想的试验材料;完全木质化的枝条,枝箨已脱落,腋芽暴露于空气中,较难清除细菌污染,而且形成丛芽的时间较长;尚未停止生长的枝条,组织过于幼嫩,在消毒的过程

中容易产生药害, 故后两者都不是理想的试验材料。将枝条分为梢部(仅取顶端有芽的 2 个节)、中部(枝梢以下, 枝 1/3 以上) 和基部(枝 1/3 以下) 分别取样, 观察不同部位的节段形成丛芽的情况, 结果是: 梢部节段较容易得到无菌的外植体, 芽萌动快、生长快, 但因竹径细小, 竹壁薄, 能提供的营养有限, 若不能形成丛芽, 死亡也很快; 中部节段大都有一片竹箨保护, 在消毒的过程中腋芽不与消毒液直接接触, 受伤害少、萌发率高, 因茎秆较粗大, 养分较丰富, 形成丛芽的机率相对比较高; 基部节段组织较老, 枝箨脱落或者裂开, 腋芽暴露较难清除污染, 且容易受到药害, 芽萌动慢, 生长也缓慢, 故取外植体大多只利用枝条的中上部分, 而很少利用枝条的基部。

材料消毒通常使用 1%~ 2% 的升汞或 2.5%~ 5% 的次氯酸钠溶液浸泡 15~ 30 min, 水洗 3~ 5 次。曾试验低剂量长时间浸洗、高剂量短时间浸洗、一种药剂重复多次浸洗和两种药剂先后交替浸洗等方式消毒, 结果以后两种方式消毒的效果较好, 无菌活体的得率大约可达 30%~ 60%。

2.2 丛芽诱导

成年竹的组织培养与幼年竹的组织培养^[5] 的主要不同点在于芽萌动后迟迟长不起来, 不容易形成丛芽。故在丛芽诱导培养基筛选方案中, 除变更 MS 培养基中的大量元素外, 还增加了 BA、NAA、GA 3 个变化因素, 设计了 4 因素 3 水平的正交试验, 按表 1 配制 9 种培养基, 试验重复 3 次, 但由于无菌的节段得率不高, 因此数据处理是将 3 次试验的结果合并起来当作 1 次重复来计算。表 4 是接种 2 个月后的丛芽诱导情况, 诱导率按 $x' = \sin^{-1} \sqrt{x}$ 作数值转换。

表 1 丛芽诱导试验统计

处理	因 素			无菌活体数	得丛芽数	丛芽诱导率 $x/\%$	数值转换 $x \approx \sin^{-1} \sqrt{x}$
	MS(m)	BA	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				
1	1	0.5	0.0	0.0	7	0	0.00
2	1	3.0	0.2	0.5	7	1	14.29
3	1	6.0	0.4	1.0	5	0	0.00
4	3/4	0.5	0.2	1.0	4	0	0.00
5	3/4	3.0	0.4	0.0	10	2	20.00
6	3/4	6.0	0.0	0.5	11	1	9.09
7	1/2	0.5	0.4	0.5	4	1	25.00
8	1/2	3.0	0.0	1.0	9	2	22.22
9	1/2	6.0	0.2	0.0	10	1	10.00
T_1	22.22	30.00	45.52	45.00			$T = 142.74$
T_2	44.12	76.76	40.64	69.77			$T^2 = 20371.85$
T_3	76.39	35.97	56.57	27.97			
X_1	7.41	10.00	15.17	15.00			
X_2	14.71	25.58	13.55	23.26			
X_3	25.46	11.99	18.86	9.32			
(极差)	18.05	15.58	5.31	13.44			

X_1 、 X_2 、 X_3 分别表示各水平的平均值。

试验得到 8 株丛芽, 相对于接种数(234 段) 诱导率只有 3.4%, 相对于消毒后的活体数(67

段) 诱导率是 12%。诱导率不高,其原因除了撑麻 7 号竹年龄偏大、生理活性较差以外,在消毒过程中,外植体受到一定程度的药害也有影响。但从表 1 的试验结果仍可看到:4 因素中,大量元素的极差最大,经 F 检验达到 0.1 水平,表明它在丛芽诱导阶段是起主导作用,降低大量元素用量,有利于丛芽形成;BA 的极差较大,经 F 检验也达到 0.1 水平,表明 BA 也是关键因素,适当增加 BA 浓度,可以得到较好的诱导效果。本试验处理 5: $3/4MS(m) + BA 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和处理 8: $1/2MS(m) + BA 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + GA 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 基本上反应了以上规律,因此得到的丛芽数相对较多。若每个因素中用诱导率最高的一个水平来组配方,那么本试验丛芽诱导最佳的理论配方应该是: $1/2MS(m) + BA 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + GA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在实际应用中,考虑到 NAA、GA 对于丛芽诱导并非重要因素,而后来又发现 KT 既有增殖的作用又有调节高生长的作用(参看下一节),因此作者近期试验诱导丛芽,培养基中通常不加 NAA、GA,而加少量 KT。

2.3 增殖培养

丛芽诱导出来以后,开始数量太少,不能作正规的培养基筛选试验,只能试探性的培养,但不久发现苗的长势越来越差,达不到正常的生长量和增殖速度,为改善苗的生长,待苗有了一定数量以后做了芽增殖培养基筛选试验。大量元素设 $1, 3/4, 1/2 MS(m)$; BA 设 $0.5, 1, 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; KT 设 $0, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; NAA 设 $0.2, 0.4, 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按正交表 $L_9(3^4)$ 组配 9 个处理配方,每处理接种 30 丛苗,观察芽的增殖和新芽的生长,试验结果如表 2。

2.3.1 芽的增殖 各处理芽的增殖倍数由表 2 可以看出:

(1) 4 因素中仅 BA 的极差较大,表明 BA 在增加芽数方面起了较重要的作用,但水平间的差异未达到显著水平。

(2) 9 组配方芽的增殖倍数变化不大,都是 1 倍多,方差检验差异没有达到显著水平,反应出成年竹的组织培养,芽的增殖对于培养基配方中药剂浓度的变化和配比反应不敏感。

(3) NAA 芽的增殖倍数有随浓度增加反而下降的趋势,表明 NAA 对于芽的增殖起抑制作用。

(4) 本试验效果较好的配方是处理 5: $3/4MS(m) + BA 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和处理 9: $1/2MS(m) + BA 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。考虑到 NAA 对芽增殖刚好起反作用,因此实际应用配方可以不加 NAA。

2.3.2 新芽的生长 单看芽的增殖倍数还不足以反应培养基是否适合,因为前面已述,进入增殖阶段以后,突出的问题是苗的长势越来越差,影响了正常的增殖,因此筛选培养基时,除观

表 2 芽的增殖倍数统计

处理	因 素			芽的增殖 倍数	
	MS(m)	BA	KT NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
1	1	0.5	0.0	1.10	
2	1	1.0	0.5	1.32	
3	1	2.0	1.0	1.10	
4	$3/4$	0.5	0.5	1.16	
5	$3/4$	1.0	1.0	1.44	
6	$3/4$	2.0	0.0	1.36	
7	$1/2$	0.5	1.0	1.12	
8	$1/2$	1.0	0.0	1.27	
9	$1/2$	2.0	0.5	1.43	
T_1	3.52	3.38	3.73	3.97	$T = 11.30$
T_2	3.96	4.03	3.91	3.80	
T_3	3.82	3.89	3.66	3.53	
X_1	1.17	1.13	1.24	1.32	
X_2	1.32	1.34	1.30	1.27	
X_3	1.27	1.30	1.22	1.18	
(极差)	0.15	0.21	0.08	0.14	

察芽的增殖系数以外, 还应更多地关注苗的生长状况。表 3 是本次试验新芽的平均生长量。

从表 3 的试验结果可以看出:

(1) 4 因素中 BA 的极差最大, 经方差检验差异达到极显著水平, 表明 BA 对于新芽的生长起主导作用; KT 达到显著水平, 表明 KT 也起重要的作用, 4 因素对芽生长的重要性主次排序是 BA > KT > 大量元素 > NAA。

(2) 9 处理间新芽的平均生长有明显的差异。如处理 5, 新芽的平均生长量达到 2.33 cm, 约相当处理 1 新芽平均生长量 (0.6 cm) 的 4 倍, 而且还可以明显地看到: 凡配方中加 KT 的苗的高生长均比 BA 同水平不加 KT (浓度为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的要好, 生长量增幅约 10% ~ 100%, 通常增加 20% 左右, 表明 KT 有调节新芽生长的作用。

(3) 各因素的不同水平对生长的影响表现为: 减少大量元素, 苗的生长有改善趋势, 但水平间的差异未达到显著水平; BA 水平间 2 水平芽的平均生长量 (2.14 cm) 相对 1 水平 (0.92 cm) 差异极显著, 相对 3 水平 (1.95 cm) 差异不显著, 3 水平芽的平均生长相对 1 水平差异极显著, 表明 BA 浓度低时苗长不起来, BA 浓度高时改善生长的作用未随之递增, BA 浓度不高也不低时苗生长最好; KT 水平间 3 水平芽的平均生长 (1.87 cm) 相对于 1 水平 (1.42 cm) 差异显著, 2 水平 (1.72 cm) 相对于 1 水平差异接近显著, 2 水平与 3 水平之间差异不显著, 显示苗的生长有随 KT 浓度增加而上升的趋势; NAA 水平间的差异相当小, 表明它对改善芽的生长作用不大, 在培养基中可以不加。鉴于以上试验结果, 芽增殖阶段有利苗生长比较好的培养基配方是: $3/4\text{MS}(\text{m}) + \text{BA } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $1/2\text{MS} + \text{BA } 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

综合以上试验结果, 既有利于芽的增殖又有利于芽的生长的培养基配方是: $1/2$ (或 $3/4$) $\text{MS} + \text{BA}2$ (或 1) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT}1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上仅是在设计范围内筛选出来的较好的培养基配方, 但超出了设计范围, 苗的生长又会如何变化? 为了进一步改善苗的生长, 以本次试验为基础, 作者对培养基中 BA、KT 的浓度往下、往上还作一些补充的试验观察:

(1) 培养基中不加细胞分裂素 (BA、KT 均为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 BA、KT 均为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比较, 试验重复 2 次。结果是: 培养基中完全无细胞分裂素时, 几乎所有的苗都死亡了, 而在 BA、KT 均为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中, 苗能生存和增殖, 只是生长较慢, 表明细胞分裂素对于成年竹子的组织培养显得非常重要, 它是延续生命所不可缺少的重要因素, 一旦缺乏, 就会引起植株死亡。

(2) 在 $\text{BA } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中培养并与原配方 ($\text{BA } 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 作比较。试验连续观察 3 个月, 每月换培养基 1 次, 第 1 次继代, 苗的生长比原配方中的苗有明显改善, 但第 2、3 次继代, 新增殖的植株生长过于迅速, 节间长, 叶长而窄, 质地脆嫩 (似玻璃化苗), 约 20 d 时出现枯叶, 30 多 d 转移时, 植株死亡数较多, 显然 KT 的质量浓度偏高了,

表 3 新芽的高生长量统计计算

处理	MS(m)	因 素			新芽平均生长/cm	
		BA	KT	NAA	x_i	x_i^2
		(mg·L ⁻¹)				
1	1	0.5	0.0	0.2	0.60	0.36
2	1	1.0	0.5	0.4	2.15	4.62
3	1	2.0	1.0	0.8	2.00	4.00
4	3/4	0.5	0.5	0.8	0.89	0.79
5	3/4	1.0	1.0	0.2	2.33	5.43
6	3/4	2.0	0.0	0.4	1.73	2.99
7	1/2	0.5	1.0	0.4	1.28	1.64
8	1/2	1.0	0.0	0.8	1.95	3.80
9	1/2	2.0	0.5	0.2	2.11	4.45
T_1	4.75	2.77	4.28	5.04	$T = 15.04$	$T^2 = 28.08$
T_2	4.95	6.43	5.15	5.16		
T_3	5.34	5.84	5.61	4.84		
X_1	1.58	0.92	1.42	1.68		
X_2	1.65	2.14	1.72	1.72		
X_3	1.78	1.95	1.87	1.61		
(极差)	0.2	1.22	0.46	0.11		

而在原配方($BA\ 2\ mg\cdot L^{-1} + KT\ 1\ mg\cdot L^{-1}$)培养基中,能正常增殖,但只有部分新芽生长正常,还有部分新芽生长缓慢,到后来不得不被淘汰(作者称它为无效增殖芽),表明培养基中KT的质量浓度偏低。

(3)当 $BA\ 2\ mg\cdot L^{-1} + KT\ 1.25\ mg\cdot L^{-1}$ 时,无效增殖芽减少了,获得了株形、长势均较正常的植株(图1),用此配方连续培养7个月,增殖倍数大致维持在每月1.5倍左右,表明这一质量浓度搭配对于撑麻7号竹的增殖是较合理的。

2.4 生根培养

作者先后做了6次生根试验,前5次都失败了,大量植株变褐死亡。经仔细观察发现:保存下来的苗均有1个刚刚萌发的小芽,而根是由这小芽的基部长出,先前长出的植株均不生根;死亡的苗大都没有新萌生的小芽,也没有根,而且植株越老死亡越快,这一现象似乎表明成年竹组培苗生根:(1)与苗的生长状态有关,植株刚萌新芽时较易生根;(2)与激素有关,前5次生根试验培养基中都是按常规未加细胞分裂素,而成年竹的生理活性比较低,无论繁芽阶段还是生根阶段都不能缺少细胞分裂素,一旦缺乏细胞分裂素时,植株就会死亡(参看上一节的补充试验)。为证实是否是以上原因,在作第6次生根试验时,作者采取了以下措施:(1)在生根基本培养基中添加少量KT和椰乳;(2)挑选有新小芽的苗丛做试验,筛选生根培养基的最佳配方;(3)当未生根的植株濒危时赶紧挽救,将它转入繁芽培养基,待有新芽长出,再立即转入生根培养基第2次生根。由于以往的试验已证明NAA、IBA联合使用生根的效果较好,故本次试验设计2因素3水平组配9个处理,每处理接种苗36丛,总共324丛,另外还有510丛苗作试验统计外的辅助观察。表4是生根培养的试验结果。

由表4的试验结果可以看出:NAA促进生根的作用远比IBA强,方差分析已近极显著。水平间的多重比较,3水平(49.8)相对1水平(22.0)差异极显著、相对2水平(32.9)差异显著,表现出生根率有随NAA质量浓度提高而升高的趋势。两种药剂以较高浓度组配的效果比较好,如8、9处理,NAA的质量浓度是 $1.5\ mg\cdot L^{-1}$,IBA的质量浓度是 $1\sim 1.5\ mg\cdot L^{-1}$,其生根率分别为63.9%、61.1%。

将未生根的植株挑出转入增殖培养($3/4\ MS(m) + BA\ 2\ mg\cdot L^{-1} + KT\ 1.25\ mg\cdot L^{-1}$),第5d时,几乎所有植株萌发新芽,第6d将这批植株再转生根培养。根据前面的试验,二次生根时,作者同样在培养基中加少量KT和椰乳,并把生根培养基中NAA、IBA的质量浓度都提高到 $2\ mg\cdot L^{-1}$,结果抽查10瓶,共有78丛苗,其中有61丛生根,生根率平均达到78.2%,最高达到90%。第6次试验共用苗834丛(包括试验苗和辅助观察苗),经过两次生根,最终得到560丛生根植株(图1),总平均生根率达

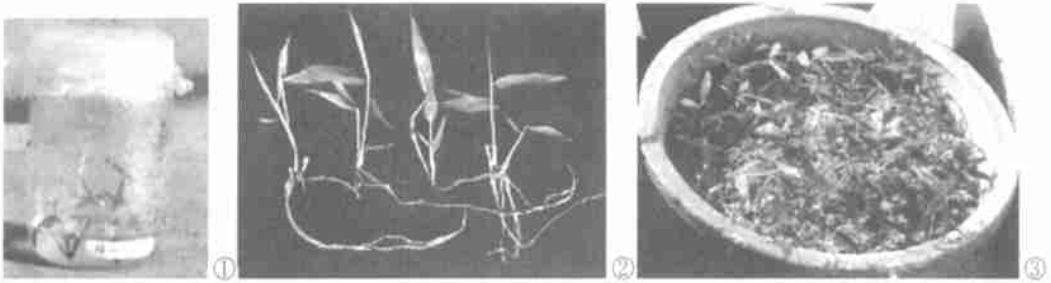
表4 撑麻7号生根试验统计

处理	NAA	IBA	生根 苗数 丛	生根率 $x/\%$	数值转换 $x' = \sin^{-1}\sqrt{x}$
	$(mg\cdot L^{-1})$				
1	0.5	0.5	9	25.0	30.0
2	0.5	1.0	3	8.3	16.7
3	0.5	1.5	4	11.0	19.4
4	1.0	0.5	10	27.8	31.8
5	1.0	1.0	10	27.8	31.8
6	1.0	1.5	12	33.3	35.2
7	1.5	0.5	18	50.0	45.0
8	1.5	1.0	23	63.9	53.1
9	1.5	1.5	22	61.1	51.4
T_1	66.1	106.8			314.4
T_2	98.8	101.6			
T_3	149.5	106.0			
X_1	22.03	35.60			
X_2	32.93	33.86			
X_3	49.83	35.33			
(极差)	27.80	1.74			

到 67.1%，基本上解决了试管苗生根时大量植株死亡的问题。

2.5 试管苗移植

将第 6 次生根所获得的 560 丛完整植株移植, 基质土用河沙, 土壤提前用 2‰ 的高锰酸钾水溶液消毒, 出苗前先拧松瓶盖, 让苗在自然的散射光下锻炼 1 周, 然后将苗取出移植于砂盆中, 淋足定根水, 用塑料薄膜罩覆盖, 每天往叶面喷水, 保持小环境湿润。1 周后开始揭盖透气并逐渐延长每一天的透气时间, 直至完全去掉覆盖, 使苗逐步适应自然环境, 移植 40 d 统计, 成活率达 90% (图 1)。



①增殖苗长势: ②试管苗生根: ③试管苗移植

图 1 撑麻 7 号竹的试管苗生长与移植

2.6 试管苗局部复壮

撑麻 7 号竹在试管里繁殖 1 a 以后, 苗的长势越来越弱, 增殖率也越来越低, 在这样的情况下, 作者只好让试管苗生根, 虽然生根时有大量植株死亡, 但保留下来的植株生长渐渐转好, 叶色转绿, 经过一段时间蓄积养分以后, 再将苗转入增殖培养, 新增殖的苗明显地比未经生根复壮的苗长势要好, 增殖率也相应提高。但继代几次以后, 苗的长势又渐渐减弱, 故以后每隔 6~8 个月又将苗生根局部复壮 1 次, 维持竹苗在试管里繁殖长达 6 a 之久, 为各阶段反反复复的试验提供了足够的竹苗, 保证了各阶段试验任务的完成, 苗的形态未出现任何变异。

3 讨论

竹子因为很少开花结实, 它的繁殖、传播以往都是靠营养体分生来实现, 而竹子一般的无性繁殖方法都存在着耗种多、劳动强度大、种苗运输不便、增殖率低等问题, 因此竹子的组织培养研究成了近 10 多年来的热门研究项目。幼年的竹子组织培养比较容易, 成年的竹子组织培养比较困难, 而自然界里现有优良品种、优良无性系大都是成年的竹子, 从开发利用现有优良种质资源的角度考虑, 成年竹子的组织培养远比幼年竹子的组织培养重要。

撑麻 7 号竹是一个知道真实年龄的优良的无性系, 在研究它组织培养的过程中遇到了: (1) 不容易诱导出丛芽; (2) 诱导出丛芽后苗的长势不好; (3) 生根时大量植株死亡等问题, 这些是成年竹子组织培养带有共性的问题。作者长时间研究撑麻 7 号竹组织培养, 除了它的经济价值以外, 更重要的是想探索成年竹子组织培养的一般规律和解决以上问题的方法、途径。通过撑麻 7 号竹的组织培养, 认为有以下几点可供其它成年竹的组织培养参考:

(1) 外植体选用半木质化的枝条, 其识别方法是: 枝梢展叶 3~7 片、基部枝箨干枯开始剥落, 手摇枝条, 感觉柔中带韧, 有轻微反弹力。枝条选好后取材时应注意选取枝箨紧裹的竹节, 那些芽裸露、箨裂开或者有虫咬伤口的竹节都应丢弃。

(2) 丛芽诱导阶段培养基中的大量元素的浓度宜低, 用 1/2MS(m) 或 3/4MS(m) 较适宜, BA 浓度宜高, 用 $3\sim 6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 较适宜。当丛芽形成以后, BA 的浓度应下降, 否则植株生长不好。

(3) 在增殖阶段由于成年的竹子芽的增殖率对培养基浓度的变化和配比反应不敏感, 而增殖苗的生长会因 BA、KT 浓度的变化相差甚悬殊, 因此调节培养基中 BA、KT 的浓度, 使苗有正常的形态和较好的长势至关重要。BA、KT 浓度都低时, 苗生长、增殖缓慢; BA 浓度高 KT 浓度低时, 新芽节间密、株型矮小, 高生长量低, 容易开花^[6]; KT 浓度偏高时, 苗生长较快, 节间长、叶窄、色淡、质脆, 容易枯叶; 只有把 BA、KT 的浓度调节到合适的程度, 增殖苗才有正常的形态和较好的长势, 才能维持试管苗持续增殖。成年竹子的组织培养能否成功, 在很大程度上取决于细胞分裂素的用量和配比是否得当。

(4) 成年竹组培苗生根相对比幼年竹组培苗生根困难, 要提高生根率首先要注意苗的生长状态, 选择生长健壮而且有新芽的植株生根, 效果会好一些。其次, 生根培养基中加少量细胞分裂素和活性物质(如椰乳)可以减少植株生根时死亡。第三, 要筛选一个较好的培养基配方, 如撑麻 7 号竹, NAA $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 IBA $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组配, 生根率达到 78.2%~90%。但不同品种、不同年龄的竹子生根要求的配方是不一样的, 试验者应很好地调试。第四, 采取二次生根技术往往可以获得很好的效果。这是因为通过生根转短期的增殖培养来调节植株的生长状态, 使植株同步地萌发新芽, 在最佳状态下再生根当然生根率会比较高。

鉴于成年竹组织培养难度大, 而成本比较高, 因此它的应用应在珍稀优良品种、濒危品种、优良无性系扩大繁殖基础方面, 有了一定的种苗基础, 再配合常规的分株育苗技术, 就能快速繁殖出大量竹苗, 满足山区造林需要。

参考文献:

- [1] Nadgi A L, Phadke C H, Gupta P K, et al. Rapid multiplication of bamboo by tissue culture[J]. *Silvae Genetica*, 1984, 33(6): 219~223
- [2] Supabulwattana K, Prutpongse P. *In vitro* culture of some commercial bamboo IV. International Bamboo Workshop[C]. Chiangmai Thailand, 27~30 November, 1991. 137~138
- [3] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 1~110
- [4] Bonga J M, Duyzan D J. 树木组织培养[M]. 阙国宁, 郭达初, 李金田译. 北京: 中国林业出版社, 1988
- [5] 张光楚, 王裕霞. 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
- [6] 张光楚, 王裕霞. 竹子育种现状及前景[J]. 竹子研究汇刊, 1998, 17(4): 6~9

Study on *in vitro* Rapid Propagation of the Hybrid of *Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamus latiflorus* No. 7

ZHANG Guang-chu, WANG Yu-xia

(Guangdong Forest Research Institute, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: Systematic research was taken on *in vitro* rapid propagation of the hybrid of 28-year-old (*Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamus latiflorus*) No. 7. The results are as follows: (1) Both reducing the salt concentration of MS medium and raising BA (6-Benzyl aminopurine) consistency favor the forming of clumping shoots; (2) In 9 sets of mediums for shoot proliferation, which were designed according to the diagonal intersection, the difference of shoot increase rate is not notable, the growth capacity of shoots differs near 4 times and in all the formula, if with the same BA concentration, the growth condition of the plantlets is better with KT (Kinetin) than that without KT in medium, which indicates that KT has an improving function on shoot growth; (3) The medium of 3/4 MS + BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ is fit to shoot proliferation; (4) New shoots are easy to root, culturing shoots in rooting medium for 20~30 days and then in proliferating medium for 5~7 days can make new shoots come up synchronously, the new shoots are cultured in rooting medium again and the rooting rate can achieve 78.2%. In this way the problem of shoot dying in rooting medium is solved. Following the experience mentioned above, many species such as *Dendrocalamus minor* var. *amoen* and *Dendrocalamus asper* ect. (all are more than 30 years old) have been successfully cultured.

Key words: *Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamus latiflorus* No. 7; tissue culture; mature bamboo; *in vitro* rapid propagation