

文章编号:1001-1498(2006)01-0075-04

## 几种丛生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究

顾小平, 苏梦云, 岳晋军, 吴晓丽

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

**摘要:**利用小佛肚竹、凤尾竹和孝顺竹幼竹的茎尖和带节茎段研究了愈伤组织诱导和控制褐变的方法。试验结果表明:在3种生长调节剂(2,4-D、KT、IBA)的组合中,以2,4-D( $2 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )效果最好,愈伤组织的诱导率最高,大部分外植体都能诱导出愈伤组织,生长良好;2,4-D( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + KT( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )能使部分茎段诱导出愈伤组织,而茎尖诱导的愈伤组织水渍化,易褐变;KT( $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )能使个别茎段有愈伤组织产生,但易褐化;KT( $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IBA( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )能诱导出愈伤组织,但生长缓慢。添加抗氧化剂控制愈伤组织褐变的效果要优于吸附剂,其防褐化能力:抗坏血酸( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 半胱氨酸( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > PVP( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 活性炭( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。在培养基中加入抗坏血酸( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),使小佛肚竹、凤尾竹、孝顺竹的茎尖和茎段的褐变率分别比对照下降了51.3%、43.3%、36.8%和62.7%、42.7%、30.8%。外植体在无菌水或半胱氨酸( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )溶液中浸泡2~4 h也有利于控制褐化。暗培养有利于愈伤组织生长,对控制褐化也有一定作用。

**关键词:**丛生竹;愈伤组织;褐变控制

**中图分类号:**S795 **文献标识码:**A

## Study on Callus Induction and Brown Stain Prevention Techniques of Some Sympodial Bamboo Species

GU Xiao-ping, SU Meng-yun, YUE Jin-jun, WU Xiao-li

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** The stem tops and stems with node of young bamboo of *Bambusa ventricosa*, *B. multiplex* cv. Fernleaf and *B. multiplex* were used to study the callus induction and brown stain control. The results showed that among three regulator combinations (2,4-D, KT and IBA), 2,4-D ( $2 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treatment was the best with the highest callus induction rate, most of the explants induced callus and grew well. 2,4-D ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + KT ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treatment could induce callus from stem parts while the callus induced from the stem top was water-soaked and easy to be brown stained. KT ( $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treatment could induce callus on some stems but was easy to be brown stained. KT ( $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IBA ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treatment could induce callus but they grew very slowly. The effect of adding anti-oxidant was better than adding adsorbent in controlling brown stain of callus. The ability of brown stain control is in the order of ascorbic acid ( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > cysteine ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > activated carbon ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). By adding ascorbic acid ( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in culture media, the brown stain rates of stem top and middle part of *Bambusa ventricosa*, *B. multiplex*, var. *nana* and *B. multiplex* reduced by 51.3%, 43.3%, 36.8% and 62.7%, 42.7%, 30.8% respectively compared with that of the control. Soaking explants in non-bacteria water or cysteine ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 2 to 4 hours would benefit controlling the brown stain. Culturing in dark would benefit the growth of callus and control of brown stain.

**Key words:** sympodial Bamboo; callus; brown stain control

收稿日期: 2005-01-28

基金项目: 国家自然科学基金(2003—2005年,项目编号:30271099)和浙江省自然科学基金(2003—2005年,项目编号:ZA0204)

资助项目内容

作者简介: 顾小平(1959—),男,浙江杭州市人,博士,研究员。

竹子是热带、亚热带地区的重要经济植物,随着国民经济的迅猛发展,对竹子多方位的全面开发与持续发展提出了更高、更新的要求。近年来尽管竹类植物的组培研究受到重视<sup>[1~4]</sup>,但对于竹子遗传改良方面的研究还相当薄弱,尤其是基因工程育种才刚开始起步。组织培养是基因工程育种的基础,愈伤组织诱导和体细胞胚胎再生植株已成为竹子遗传改良的技术关键。在组织培养过程中,外植体尤其是愈伤组织极易产生褐变,若处理不当,常导致组织死亡,组培失败<sup>[1,5]</sup>。因此,如何防止或减少外植体特别是愈伤组织产生褐变,是竹子组培研究必须关注的问题之一。本文以几种丛生竹为试验材料,研究愈伤组织诱导及防止褐变的方法,以期为后续研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试外植体

外植体选自中国林科院亚热带林业研究所竹类苗圃中的孝顺竹(*Bambusa multiplex* (Lour) Raeuschel ex Schult. f.)、凤尾竹(*B. multiplex* var. *nana* (Roxb.) Keng f. (*B. nana* Roxb.))和小佛肚竹(*B. ventricosa* McClure)的当年萌生幼竹。

### 1.2 外植体消毒

采来的外植体先用自来水冲洗,去除表面泥土和灰尘,然后细心地剥去竹箨,剪取长约1.5~2.0 cm带节的嫩茎段或茎尖。用 $\varphi$ (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)=75%溶液处理1 min,再在1 g·L<sup>-1</sup>升汞溶液中处理10 min,用无菌水冲洗4~5次,滴干水,并用无菌滤纸

吸干沾在茎段上的水分,取其茎尖及嫩茎节上方1~2 mm茎截断,分别接种于各种培养基中。

### 1.3 培养基

以WPM<sup>[6]</sup>为诱导愈伤组织的基本培养基,含水解酪蛋白1 g·L<sup>-1</sup>,糖25 g·L<sup>-1</sup>,琼脂7.5 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8,温度25℃±2℃,添加不同生长调节剂后,设定以下5种诱导培养基:(1)WPM+2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>;(2)WPM+2,4-D 3 mg·L<sup>-1</sup>;(3)WPM+2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>;(4)WPM+KT 4 mg·L<sup>-1</sup>;(5)WPM+KT 4 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>。每个处理10瓶,每瓶接4个外植体。

### 1.4 防褐变处理

1.4.1 外植体预处理 将经过冲洗剪切1.5~2.0 cm带节的嫩茎段或茎尖分别用无菌水、半胱氨酸溶液(100 mg·L<sup>-1</sup>)浸泡和流水冲洗0、2、4 h处理。

1.4.2 抗氧化试验 在培养基中分别添加抗坏血酸(5 mg·L<sup>-1</sup>)、半胱氨酸(100 mg·L<sup>-1</sup>)、PVP(1 g·L<sup>-1</sup>)、活性炭(1 g·L<sup>-1</sup>)及不添加任何抗氧化物质和吸附剂的处理。

1.4.3 不同光强度培养试验 设光强度800、2000 lx和暗培养3种处理。

防褐变处理的3种试验,也都按每处理10瓶,每瓶接4个外植体设计。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

不同生长调节剂诱导愈伤组织的情况见表1。

表1 不同生长调节剂对小佛肚竹、凤尾竹和孝顺竹愈伤组织的诱导

生长调节剂	小佛肚竹	凤尾竹	孝顺竹
2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup>	外植体诱导出白色愈伤组织较快。茎段诱导的愈伤组织光滑、颗粒状,继代后部分愈伤组织块褐化;茎尖诱导的愈伤组织柔软、水渍化,易褐变。但可以从少数褐化的愈伤组织块中重新长出乳白色愈伤组织	部分外植体能诱导出愈伤组织,乳白色易褐变,茎段愈伤组织呈颗粒状,而茎尖水渍化。	茎尖开始水渍化,很快诱导出愈伤组织,乳白色,继代后部分愈伤组织褐化,茎段产生颗粒状愈伤组织,生长缓慢,易褐化。
2,4-D 3 mg·L <sup>-1</sup>	基本同2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> 处理状况。	大部分茎尖和茎段能诱导出愈伤组织,生长良好。	与2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> 处理状况相同。茎尖愈伤组织继代后易褐化,并脆。
2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> +KT 0.5 mg·L <sup>-1</sup>	茎尖愈伤组织水渍化,易褐化,少数茎截段易诱导出白色愈伤组织,易褐变。	茎尖愈伤组织水渍化,极易褐化;少数茎截段能诱导出愈伤组织,易褐变。	茎尖愈伤组织水渍化,易褐化;部分茎截段能诱导出愈伤组织,乳白色颗粒状,但褐变严重。
KT 4 mg·L <sup>-1</sup>	茎尖愈伤组织水渍化,易褐化,茎截段少数诱导出白色粒状愈伤组织,生长缓慢。	茎尖愈伤组织水渍化,易褐化,个别茎截段有愈伤组织发生,生长缓慢,易褐变。	茎尖愈伤组织水渍化,易褐化,个别茎截段能诱导出愈伤组织,生长缓慢
KT 4 mg·L <sup>-1</sup> +IBA 0.5 mg·L <sup>-1</sup>	茎尖水渍化,易褐化,大部分茎截段能诱导出愈伤组织,易褐化,生长缓慢。	茎尖愈伤组织水渍化,易褐化,部分茎截段能诱导出愈伤组织,乳白色、颗粒状生长缓慢,易褐变。	大部分茎尖有愈伤组织产生,脆,易褐化;个别茎截断有愈伤组织出现,生长缓慢。

对小佛肚竹、凤尾竹和孝顺竹来说,2,4-D 是较适合诱导愈伤组织的主要生长调节剂,出愈率较高,生长良好,其茎段诱导的愈伤组织呈白色或乳白色,颗粒状,而茎尖诱导的愈伤组织白色、柔软、水渍化(图1~6),诱导出的愈伤组织极易从上部开始褐化(图7),但少数小佛肚竹茎尖诱导的愈伤组织褐

化后,还可以见到从褐变的愈伤组织中重新长出乳白色的愈伤组织(图8);在2,4-D + KT 和 KT 的培养基中,茎尖基本水渍化,茎段愈伤组织诱导率也极低,多褐变;KT + IBA 的培养基能诱导出愈伤组织,但生长缓慢,易褐变。

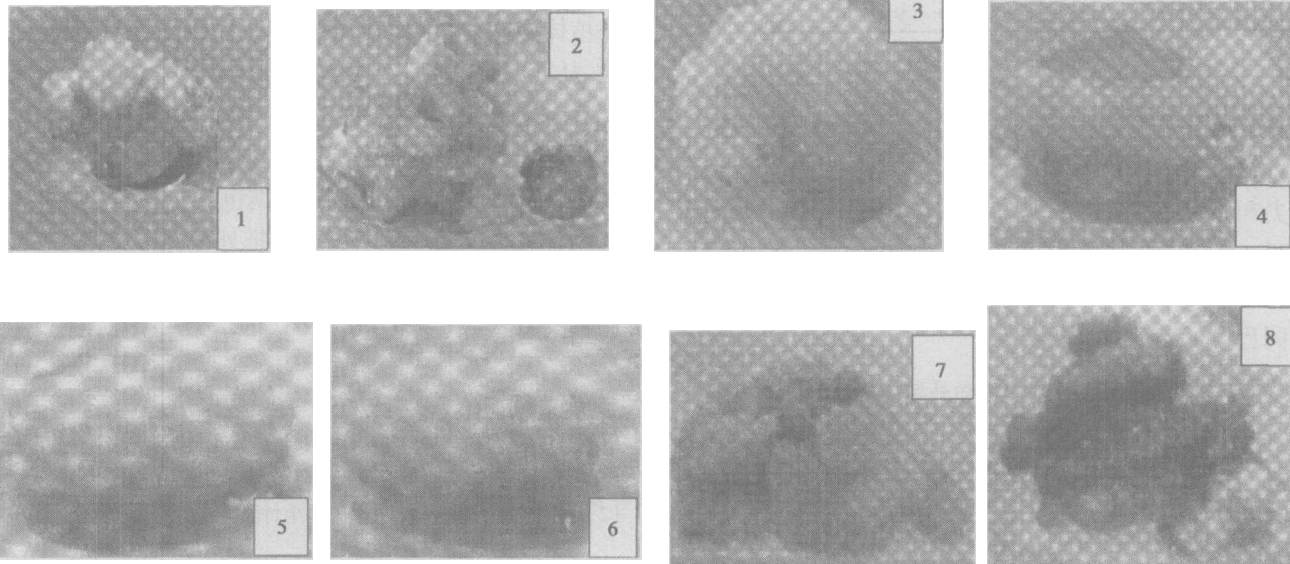


图1~3 茎尖诱导的愈伤组织,水渍化;图4~6 分别为凤尾竹、小佛肚竹、孝顺竹茎段诱导的愈伤组织;图7 开始褐化的愈伤组织;图8 从褐化的愈伤组织中分化出新的愈伤组织

### 2.2 几种防褐化措施对外植体褐变的影响

外植体的褐化主要是由酚类化合物氧化成相应的醌类物质引起的。在含有2,4-D  $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中,添加一些防酚类氧化的物质或对外植体采取适当的预处理及控制光强度等措施,在一定程度上能阻止或减缓外植体的褐变。

2.2.1 外植体预处理的防褐变效果 外植体在剥去竹箨后分别在10倍体积的无菌水或半胱氨酸( $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )溶液中浸泡或流水冲洗2、4 h,然后按正常操作程序灭菌后接种到添加抗坏血酸( $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的培养基中,也有一定的防褐变效果。由于处理2、4 h的结果差异不大,所以表2中只列了处理4 h的试验结果。

从表2可以看出:3种处理对降低小佛肚竹、凤尾竹、孝顺竹茎尖外植体的褐变率有一定的作用。以半胱氨酸( $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )浸泡的效果较明显,褐变率分别从对照的26.5%、50.7%和28.2%下降到16.8%、42.8%和21.6%,对茎段

外植体也有一定作用。无菌水浸泡和流水处理之间无明显差异。

表2 外植体预处理对3种丛生竹的防褐化效果比较

处理	褐变率/%					
	小佛肚竹		凤尾竹		孝顺竹	
	茎尖	茎段	茎尖	茎段	茎尖	茎段
半胱氨酸( $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )浸泡	16.8	8.5	42.8	41.7	21.6	27.2
无菌水浸泡	19.2	8.6	45.2	42.5	22.0	26.4
流水冲洗	20.4	8.5	44.9	42.0	21.8	26.6
CK	26.5	11.4	50.7	46.0	28.2	28.5

2.2.2 防酚氧化物对外植体褐化的缓解作用 在培养基中,分别添加抗坏血酸( $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )或半胱氨酸( $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )对外植体有明显的防褐变效果。就小佛肚竹来看:茎尖和茎段的褐化率分别从对照的54.5%和50.4%下降到26.5%、35.0%和18.6%、28.5%。防褐化效果:抗坏血酸 > 半胱氨酸 > PVP,活性炭效果不明显。对凤尾竹和孝顺竹的诱导也表现出同样结果(表3)。

表3 防褐化物质对3种丛生竹的效果比较

处理	褐变率/%					
	小佛肚竹		凤尾竹		孝顺竹	
	茎尖	茎段	茎尖	茎段	茎尖	茎段
抗坏血酸/(5 mg · L <sup>-1</sup> )	26.5	18.6	51.6	44.8	28.8	29.6
半胱氨酸/(100 mg · L <sup>-1</sup> )	35.0	28.5	55.1	45.4	32.5	30.4
PVP/(1 g · L <sup>-1</sup> )	50.6	45.5	85.3	70.8	41.4	39.2
活性炭/(1 g · L <sup>-1</sup> )	52.7	48.2	90.2	75.6	45.2	41.6
CK	54.5	50.4	91.0	78.2	45.6	42.8

2.2.3 光照对外植体褐变的影响 暗培养或在弱光下培养,可以部分降低外植体的褐变率,以小佛肚竹较为明显。暗培养和在弱光(800 lx)下培养的茎尖和茎段的褐变率从强光(2 000 lx)下培养的22.6%和12.5%分别下降到19.0%、9.2%和21.5%、10.4%。孝顺竹和凤尾竹的褐变率也有不同程度的下降(表4)。

表4 光照对3种丛生竹外植体褐变的影响

处理光照强度/lx	褐变率/%					
	小佛肚竹		凤尾竹		孝顺竹	
	茎尖	茎段	茎尖	茎段	茎尖	茎段
2 000	22.6	12.5	46.4	44.5	24.0	26.6
800	21.5	10.4	44.2	43.6	22.4	24.4
暗	19.0	9.2	43.0	41.4	21.5	24.0

### 3 讨论

在竹子组织培养中常用2,4-D + KT组合和NAA + BA组合来诱导愈伤组织,已有不少成功报道<sup>[1]</sup>。本试验中采用2,4-D(2~3 mg · L<sup>-1</sup>)能很好地诱导茎尖和茎段产生愈伤组织。茎尖的初代愈伤组织为白色、水渍化柔软组织;茎段初代愈伤组织为浅黄色,颗粒状,生长良好;说明2,4-D是比较适合丛生竹诱导愈伤组织的生长调节剂。

外植体褐变主要是在培养过程中酚类化合物溢出,很快在多酚氧化酶的催化下氧化成褐色的醌类物质和水,而醌类物质进而在酪氨酸酶等的作用下,与外植体组织中的蛋白质发生聚合,导致组织代谢活动紊乱,最终衰老死亡<sup>[7,8]</sup>。有关植物组织培养中的褐变问题已有很多研究<sup>[5,9]</sup>,在培养基中添加抗氧化剂

-抗坏血酸(5 mg · L<sup>-1</sup>)有明显降低褐变效果,这与木兰科(Magnoliaceae)树种的结果相同<sup>[10,11]</sup>,半胱氨酸和PVP也能降低外植体褐化,这与马来甜龙竹(*Dendrocalamus asper*(Schult. f.) Backer ex Heyne)<sup>[3]</sup>和龙竹(*D. giganteus* Munro)<sup>[4]</sup>的研究结果相似,但活性炭的防褐变效果不明显。外植体在半胱氨酸溶液(100 mg · L<sup>-1</sup>)或无菌水中预处理2~4 h,也能减少外植体褐变,这主要是外溢的酚类物质得到及时扩散,从而减轻了危害。外植体暗培养或在弱光下培养也有一定的防褐变效果,这是因为在黑暗的条件下,一些光诱导参与酚类合成和氧化的酶活性减弱,导致酚类合成减少,其氧化产物醌类也相应减少,使褐变得到一定程度的控制<sup>[7]</sup>。如果把外植体预处理、抗氧化剂和暗培养三种措施结合起来,预计会取得更好的防褐变效果。

### 参考文献:

- [1] 吴益民. 当前竹子的组织培养和植株再生研究[J]. 竹子研究汇刊, 1999, 18(1): 32~37
- [2] 张光楚, 王裕震, 谭源杰, 等. 丛生竹的组织快繁技术[J]. 竹子研究汇刊, 2004, 23(1): 13~20
- [3] 龚力波, 郑思乡, 肖龙骞, 等. 马来甜龙竹的组织培养繁殖试验[J]. 云南林业科技, 2003(3): 5~7
- [4] 杨本鹏, 白梅. 龙竹的组织培养[J]. 热带作物学报, 2003, 24(3): 82~87
- [5] 姚洪军, 罗小芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78~84
- [6] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 376~377
- [7] Debergh P C, Zimmerman R H. Micropropagation[M]. Kluwer Academic publishers, 1991: 1~13
- [8] Marks T R, Simpson S E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low level of irradiance[J]. J Hort Sci, 1990, 65: 103~111
- [9] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501~506
- [10] 陈金慧, 施季森, 诸葛强. 杂交鹅掌楸的不定芽诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(5): 459
- [11] 苏梦云, 姜景民. 乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 757~762