



珍稀观赏竹白纹椎谷箬的组培快繁与叶色变异

王婧雅, 王晓芹, 姜可以, 李朝娜, 杨海芸*

浙江农林大学, 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 竹业科学与技术教育部重点实验室, 杭州311300

*通信作者(yhy2006@zafu.edu.cn)

摘要: 白纹椎谷箬(*Sasaella glabra* f. *albostrata*)是一种引自日本的珍稀地被观赏竹, 为了建立其高效快繁体系, 以当年生幼嫩带芽茎段为外植体, 对芽增殖培养基、生根培养基及继代培养时间进行筛选。在组培苗移栽1年后进行埋鞭繁殖, 研究组培竹苗的繁育能力。结果表明: 最佳芽增殖培养基为MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.001 mg·L⁻¹ TDZ, 培养30 d时, 增殖系数为6.5; 最佳生根培养基为MS+0.3 mg·L⁻¹ IBA或0.3 mg·L⁻¹ NAA, 生根率可达100%, 根系良好, 移栽后成活率100%。来源组培苗的微型鞭段埋鞭繁殖1年后, 出笋系数为相同规格容器苗微型鞭段的4.21倍。组培苗在移栽第2年出现叶色分离现象, 由原来的白绿相间的单一颜色, 转变为少量全绿叶、全白叶、白叶绿条纹、绿叶白条纹4种类型的叶片。叶片的光合色素含量均随着叶片绿色条纹加宽而显著增加, 但是叶绿素a/b却无显著差异。选取了15个叶色变异相关基因进行了半定量RT-PCR分析, 发现*psaA*、*psbB*、*psbC*和*psbD*基因在叶片的白色组织中转录水平明显低于绿色组织。

关键词: 白纹椎谷箬; 组培快繁; 微鞭繁殖; 叶色变异

Tissue culture and leaf color variation of rare ornamental bamboo *Sasaella glabra* f. *albostrata*

WANG Jingya, WANG Xiaoqin, JIANG Keyi, LI Zhaona, YANG Haiyun*

Key Laboratory of Bamboo Science and Technology, Ministry of Education, State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

*Corresponding author (yhy2006@zafu.edu.cn)

Abstract: In this study, buds from the current year young stems were used as explants to establish an efficient micropropagation system of *Sasaella glabra* f. *albostrata* from Japan including the optimal bud proliferation medium, rooting medium and subculture time. One year after transplanting, the micro-rhizome of bamboo seedlings were used for propagation to study the breeding ability of tissue cultured bamboo seedlings. The optimal bud proliferation medium was MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.001 mg·L⁻¹ TDZ, and the proliferation coefficient was 6.5 when culturing for 30 days. The optimal rooting medium was MS+0.3 mg·L⁻¹ IBA or 0.3 mg·L⁻¹ NAA, the roots were strong and the rooting rate was 100%. The survival rate of transplanting was 100%. After planting for one year, the shoot propagation coefficient by the micro-rhizome from tissue cultured seedlings was 4.21 times that of the micro-rhizome from container seedlings with the same size. Leaf color separation of tissue culture seedlings appeared in the second year of transplanting, which

收稿 2023-05-19 修定 2023-11-20

资助 国家自然科学基金(31901370)、宜宾市引进高层次人才项目(2018YG02)、宜宾竹产业科技专项(2020YLZ004)和安吉林业财政项目(H20210198)。

changed from the original single color of white-green stripe leaves to a few green leaves, white leaves, white leaves with green stripes, and green leaves with white stripes. The photosynthetic pigment contents of leaves increased significantly with the widening of green stripes, but chlorophyll A/B had no significant difference. A total of 15 genes related to leaf color variation were selected for semi-quantitative RT-PCR analysis, and it was found that the transcription levels of *psaA*, *psbB*, *psbC* and *psbD* genes in white tissue were significantly lower than those in green tissue.

Key words: *Sasaella glabra* f. *albostrata*; tissue culture; micro-rhizome propagation; leaf color variation

彩叶竹种具有极高的观赏价值,在园林造景中发挥着重要的作用。近年来越来越多的珍稀观赏竹受到了园林设计者的青睐,珍稀竹种质与种苗的需求量日益增大。白纹椎谷箬(*Sasaella glabra* f. *albostrata*)又名白条赤竹,属于混生竹种,引自日本,是一种珍稀地被观赏竹,株型矮小挺拔,叶型宽大,叶片具有白色或浅黄色条纹,喜阳也耐阴,可广泛应用于园林景观、家庭盆景等方面。但目前白纹椎谷箬苗量较少,生产上仅靠分株繁殖等方法,不能满足市场需求。植物组织培养繁殖速度快、增殖系数高,且不受季节限制等特点,可以很好解决上述问题。目前竹子的组织培养快繁在我国已有较多应用(张春玲2019)。主要为一些经济价值较高竹种,如毛竹(*Phyllostachys edulis*; 李蓉等2008)、麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*; 王裕霞和张光楚2000)、马来甜龙竹(*Dendrocalamus hamiltonii*; 苏海等2004),和一些具有观赏价值的竹种,如花叶凤尾竹(*Bambusa glaucescens* f. *albo*; 何安国等2020)、日本平安竹(*Pseudosasa japonica* ‘*Tsutsumiana*’; 王光萍和黄敏仁2002)、花叶矢竹(*Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*; 杨海芸等2010)等。但是关于白纹椎谷箬的离体快繁体系的建立尚未见报道,因此建立白纹椎谷箬的组培快繁体系,对其快繁与推广具有重要意义。

白纹椎谷箬叶片上白绿相间的条纹,使其具有较大的观赏性。目前已有一些针对花叶竹类叶色变异的研究。王啸晨等(2012)发现白纹椎谷箬叶片的白色组织叶绿体发育异常,基粒片层降解,而叶片的绿色组织中叶绿体发育正常。陈凌艳等(2017)在对银丝竹不同颜色叶片光合色素含量的测定中发现,叶片光合色素含量随着叶片绿色组织面积的下降而降低。杨海芸(2015)对花叶矢竹的叶

色变异机理进行了研究,发现*ELIPs*等基因的异常表达可能与花叶矢竹白叶的形成有关。大量研究表明,叶绿体结构发育不良、叶绿素合成累积受阻以及相关基因异常表达都会导致叶片的白化现象(成敏敏等2018; 李宁2012)。

因此,本研究采用白纹椎谷箬当季生枝条的幼嫩茎段作为外植体,通过对增殖培养,生根培养和继代时间等条件的探究,以及不同来源容器苗的鞭段繁殖能力的比较,获得了白纹椎谷箬的高效快繁体系。同时,测定了不同叶色类型组培苗的叶片色素含量和15个叶绿体合成相关基因的表达,为进一步探索彩叶竹叶色变异机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于浙江农林大学智能温室(30°15'31''N, 119°43'55''E)盆栽种植在白纹椎谷箬(*Sasaella glabra* f. *albostrata* Muroi),该品种来源于日本。

1.2 外植体消毒与初代培养

剪取生长健壮的幼嫩枝条,剥去枝条上的叶鞘后,剪成带1~2个节的小段(每段长约5 cm),用洗洁精溶液清洗后,自来水冲洗2 h,放置于超净工作台进行消毒。消毒步骤:用75%乙醇振荡消毒30 s,无菌水冲洗3次,再用有效氯浓度为0.5% NaClO消毒20 min,最后用无菌水冲洗5~6次(每次3 min,期间不断摇动),将材料放置于无菌滤纸上吸干表面水分。消毒后的茎段切除头尾两段,留取中间1.0~1.5 cm含芽的部分,接种到不添加植物生长调节物的MS培养基中培养,30 d后,筛选无污染且侧芽萌发的外植体,作为增殖培养的材料。

1.3 不同生长调节剂组合对芽增殖生长的影响

选取生长势一致的初代试管苗作为材料, 每丛2个芽, 探究不同浓度6-BA (0、0.5、1、2、4和10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对芽增殖生长的影响。在得到的最适6-BA浓度下, 探究4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+TDZ (0.001、0.01、0.1和0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组合处理对芽增殖生长的影响。每个处理30管, 每管接种1个外植体, 培养30 d后统计每管苗的芽数和芽长。

1.4 试管苗继代培养时间对芽增殖生长的影响

选取生长势一致的初代试管苗作为材料, 每丛2个芽, 在添加4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的MS培养基中增殖培养, 在培养30、45、60和90 d, 统计每瓶苗的芽数、芽长和芽的生长状况, 每个处理30瓶, 每瓶接种1个外植体。

1.5 生根培养基的筛选与移栽驯化

取增殖培养中生长一致的试管苗, 每丛2个芽, 将试管苗接种于分别含有IBA (0.03、0.1、0.3、3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和NAA (0.03、0.3、3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的MS培养基中, 以不添加植物生长调节物质的MS培养基为对照, 探究NAA和IBA浓度对白纹椎谷箬生根的影响。每个处理30管, 培养30 d后, 统计生根管数、每管苗的生根数和根长。最后选取生长良好、根长4~5 cm的组培苗, 将瓶苗在驯化室(光照强度20 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)放置7 d进行炼苗移栽, 培养1个月后, 统计移栽成活率及生长状况。

1.6 埋鞭方式和鞭段来源对竹鞭繁殖能力的影响

分别选取来源于组培移栽苗和传统繁殖容器苗的当年生鞭段为实验材料, 选取每根鞭3芽, 共2根鞭; 每根鞭4芽, 共2根鞭; 每根鞭2芽, 共3根鞭; 每根鞭3芽, 共3根鞭的4种不同埋鞭方式进行埋鞭实验, 分别置于64格穴盘中, 每个处理5盘, 埋鞭2个月, 统计白纹椎谷箬组培苗和容器苗的鞭段成活率、出笋系数及株高。在每段4芽2鞭的埋鞭2个月、1年和2年后, 统计不同来源的鞭段的出笋系数和繁殖能力。

1.7 叶色复绿过程的光合色素含量测定

白纹椎谷箬的组培苗在移栽后发生叶色分离现象, 以分离后花叶(白绿条纹叶)、白叶、花叶中的白条纹及花叶中的绿条纹为实验材料。采用80%丙酮提取法提取叶片叶绿素, 并用DU800紫外/可

见分光光度计(Beckman Coulter, USA)对叶绿素含量进行测定, 使用Arnon法(张宪政1986)修正公式进行计算。

1.8 15个叶绿体编码基因的半定量PCR

RNA提取及cDNA合成: RNA提取材料为白纹椎谷箬组培苗移栽后的变异株, 切取4种不同类型的幼嫩叶片组织, 包括花叶(F)、白叶(W)、花叶中的白条纹(FW)及花叶中的绿条纹(FG), 每种样品各100 mg, 使用凯杰RNeasy Plant Mini Kit试剂盒提取RNA, 具体方法详见说明书(www.qiagen.com/handbooks), 将RNA用赛默飞Invitrogen反转录试剂盒合成cDNA, 具体方法详见说明书(Cat.No:18080-051)。cDNA的半定量PCR: 选取15个由质体编码的基因, 并参照袁丽钗等(2010)设计引物, 所有引物均由Invitrogen公司合成, PCR扩增条件: 94°C 2 min; 94°C 40 s, 60°C 40 s, 72°C 1 min, 25个循环。其中Actin为内参基因, 每个基因重复3次。

1.9 数据统计分析

采用Excel和SPSS 17.0软件对数据进行分析, 差异显著性检验采用单因素方差分析和LSD法。增殖系数=增殖的总芽数/接种管数; 平均芽长=丛生芽总长度/接种数; 生根率(%)=(生根材料数/接种数) $\times$ 100; 平均根数=生根的总数/接种数; 平均根长=根的总长度/根的数量; 鞭段成活率(%)=(出笋鞭段数/实验鞭段数) $\times$ 100, 出笋系数=平均每鞭每芽新抽生的竹株数; 平均株高=新竹株高总和/新竹总株数; 竹鞭繁殖能力的差异=(组培苗出笋系数-容器苗出笋系数)/容器苗出笋系数 $\times$ 100%。

2 实验结果

2.1 无菌培养体系的建立

接种外植体300个, 在接种30 d后统计结果, 外植体的萌芽率87.67%, 污染率为7.33%, 褐化率为5%, 已萌发新芽生长良好, 芽体粗壮(图1-A)。

2.2 增殖培养

2.2.1 不同浓度6-BA对芽增殖生长的影响

6-BA对白纹椎谷箬试管苗增殖起促进作用, 随着6-BA浓度的增加, 丛生芽增殖系数升高, 平均芽长增加, 当添加4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-BA时, 增殖系数为4.90, 显著高于其他处理, 平均芽长为1.38 cm, 与其

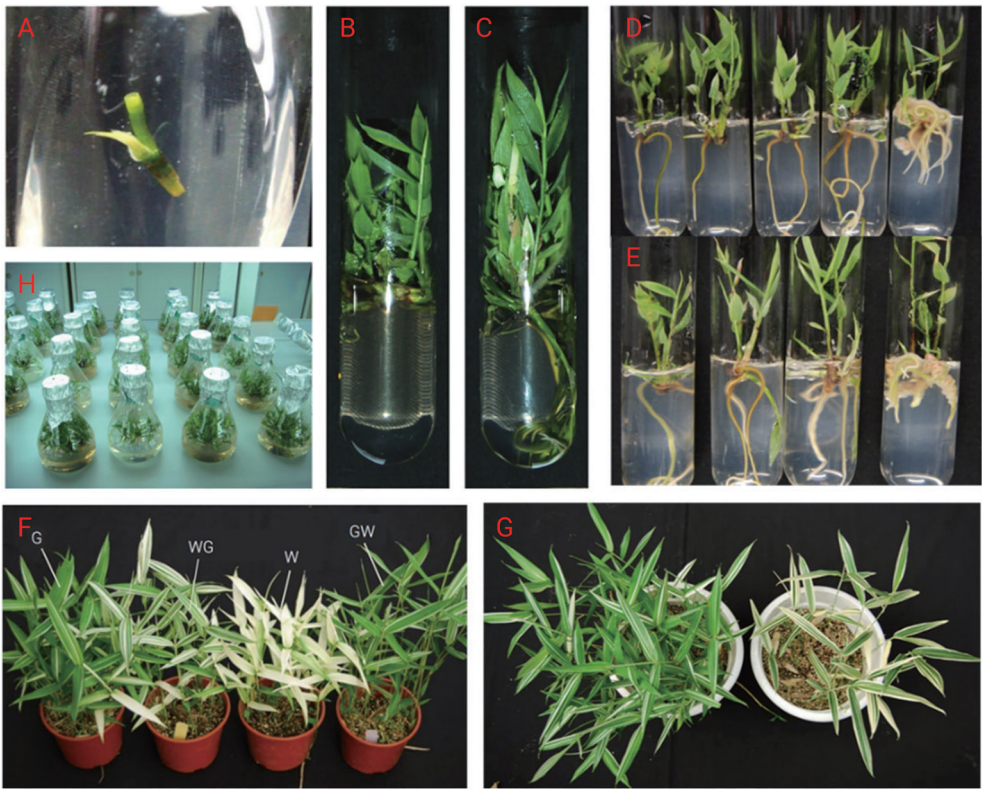


图1 白纹椎谷箬组织培养与叶色变异

Fig. 1 Tissue culture and leaf color variation of *S. glabra*

A: 茎段外植体; B: 不定芽增殖; C: 不定芽生根; D: 不同浓度NAA生根状况(浓度依次为0、0.03、0.1、0.3、3 mg·L⁻¹); E: 不同浓度IBA生根状况(浓度依次为0、0.03、0.3、3 mg·L⁻¹); F: 组培苗移栽1年后出现叶色的性状分离(G: 绿叶; WG: 白叶绿条纹; W: 白叶; GW: 绿叶白条纹); G: 组培苗和野外来源的竹鞭扩繁获得的竹株; H: 组培苗大量繁殖。

他处理差异不显著(表1); 当6-BA浓度增加到10 mg·L⁻¹时, 试管苗的增殖系数降低, 表明高浓度的6-BA抑制试管苗的增殖生长。在生长过程中还发现, 未添加6-BA的处理的芽褐化较严重, 叶片绿

色, 少量细条纹, 而随着6-BA浓度的升高, 褐化逐渐减轻, 花叶现象越来越明显, 白化苗增多。综上, 最适宜白纹椎谷箬芽增殖生长的6-BA浓度为4 mg·L⁻¹。

表1 不同浓度6-BA对芽增殖生长的影响

Table 1 Effects of different 6-BA concentrations on bud proliferation and growth

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	增殖系数	平均芽长/cm	芽生长状况
0	2.35±0.25 ^c	1.55±0.14 ^a	褐化严重, 叶片绿色, 少量细条纹
0.5	3.25±0.36 ^{bc}	1.43±0.14 ^a	褐化严重, 叶片绿色, 少量细条纹
1.0	4.00±0.54 ^{ab}	1.60±0.18 ^a	中度褐化, 新芽白化苗较多, 花叶特征明显
2.0	3.85±0.58 ^{bc}	1.14±0.11 ^{ab}	中度褐化, 花叶特征明显
4.0	4.90±0.43 ^a	1.38±0.25 ^{ab}	褐化最轻, 花叶特征明显
10.0	3.85±0.37 ^{ab}	0.92±0.08 ^b	中度褐化, 花叶特征明显

表中数值代表平均值±标准误; 采用Duncan法进行多重比较; 同一列数据后不同小写字母表示在P<0.05水平下显著差异, 下同。

2.2.2 6-BA与不同浓度TDZ组合对芽增殖生长的影响

表2显示, 随着TDZ浓度的增加, 增殖系数呈先升高后降低的趋势, 当添加0.001~0.1 mg·L⁻¹的TDZ时, 芽增殖系数显著高于对照组, 而当TDZ浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 增殖系数出现下降; 各处理的增殖系数差异不显著。因为TDZ的价格较昂贵, 在工业化生产过程中, 为了节省开支, 应采用低浓度的TDZ。当添加4 mg·L⁻¹ 6-BA和0.001 mg·L⁻¹ TDZ时, 试管苗的增殖系数为6.5, 平均芽长为1.45 cm。综上, 可选择MS+4 mg·L⁻¹ 6-BA+0.001 mg·L⁻¹ TDZ芽增殖培养基。

2.3 试管苗继代时间对芽增殖生长的影响

如表3所示, 随着培养时间的增加, 白纹椎谷箨的芽增殖系数和芽长呈现先升高后降低的趋势, 当培养45 d时增殖系数为6.85, 为培养30 d时增殖系数的2倍左右, 丛芽生长密集且新芽粗壮(图1-B)。当培养60 d时, 芽增殖系数和芽长达到最大值, 但试管苗出现褐化并开始生根, 继续培养, 增殖系数出现下降, 且平均芽长变短, 因此接种时间为45 d时较适宜。

2.4 生根培养与移栽驯化

2.4.1 IBA和NAA对试管苗生根的影响

添加低浓度的NAA或者IBA都能促进白纹椎

谷箨生根。当添加IBA时, 随着IBA浓度的升高, 生根率呈先升高后降低的趋势, 当添加0.3 mg·L⁻¹ IBA时, 白纹椎谷箨的生根率达到100%, 平均根数为2.80个, 平均根长为4.33 cm (表4和图1-C), 当IBA浓度为3 mg·L⁻¹时, 生根率显著降低, 生根数增加, 根短缩; 添加NAA时, 随着NAA浓度的升高, 生根率和生根数也相应增加, 但根长变短, 当NAA浓度达到3 mg·L⁻¹时, 根短缩膨胀, 根系过短或根数过多都影响移栽成活率(图1-D)。综上所述, 在培养基中添加0.1、0.3 mg·L⁻¹ IBA或0.3 mg·L⁻¹ NAA时, 平均根数和根长差异不显著, 都较适宜进行生根培养, 但添加NAA时生根率为93.3%, 而添加0.1、0.3 mg·L⁻¹ IBA时生根率为100%。且从整体生长势来看, 添加0.3 mg·L⁻¹ IBA处理的根系生长势优于0.1 mg·L⁻¹ IBA处理(图1-E), 故最终选择MS+0.3 mg·L⁻¹ IBA作为生根培养基。

2.4.2 驯化移栽与叶色变异

经过继代繁殖后, 得到了大量的试管苗(图1-H), 选取150株长势良好的试管苗移入添加0.3 mg·L⁻¹ IBA的生根培养基, 生根后移栽到驯化室内, 移栽30 d后成活率为100%, 竹苗生长良好。在移栽培养的第一年内, 移栽苗的叶色与组培苗一致, 均为绿叶暗条纹, 在转至温室的第二年春天, 移栽苗

表2 6-BA和不同浓度TDZ对芽增殖生长的影响

Table 2 Effects of different concentrations of TDZ and 6-BA on bud proliferation and growth

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	TDZ浓度/mg·L ⁻¹	增殖系数	平均芽长/cm
4	0	4.90±0.43 ^b	1.38±0.25 ^a
	0.001	6.50±0.53 ^a	1.45±0.07 ^a
	0.01	6.75±0.42 ^a	1.45±0.07 ^a
	0.1	6.35±0.50 ^a	1.30±0.09 ^a
	0.5	5.65±0.38 ^{ab}	1.68±0.15 ^a

表3 试管苗接种时间对芽增殖生长的影响

Table 3 Effect of inoculation time on bud proliferation and growth

继代时间/d	增殖系数	平均芽长/cm	芽生长状况
30	3.45±0.3 ^c	0.85±0.07 ^b	正常
45	6.85±0.51 ^b	1.39±0.07 ^a	正常
60	8.40±0.49 ^a	1.48±0.10 ^a	褐化, 开始生根
90	5.40±0.29 ^c	1.38±0.14 ^a	褐化, 根较长

表4 不同浓度IBA和NAA对试管苗生根的影响
Table 4 Effects of different concentrations of IBA and NAA on rooting of tube plantlets

IBA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	平均根数/个	平均根长/cm
0	0	86.67 ^b	1.73 ^d	5.07 ^a
0.03	0	86.67 ^b	1.53 ^d	4.13 ^a
0.10	0	100.00 ^a	2.27 ^{cd}	5.53 ^a
0.30	0	100.00 ^a	2.80 ^{cd}	4.33 ^a
3.00	0	66.67 ^c	5.00 ^b	2.27 ^b
0	0.03	93.33 ^{ab}	2.47 ^{cd}	5.20 ^a
0	0.30	93.33 ^{ab}	3.53 ^{bc}	2.13 ^b
0	3.00	100.00 ^a	7.47 ^a	1.27 ^b

长出的新竹中发生了叶色分离现象, 由原来的白绿相间的单一颜色, 转变为少量全绿叶、全白叶、白叶绿条纹和绿叶白条纹4种类型的叶片(图1-F), 条纹在叶片上的位置、数量、宽窄具有不确定性。其中绿叶(G)比例为8.67%, 白叶(W)为18.67%, 绿叶白条纹(GW)为37.33%, 白叶绿条纹(WG)为35.33%。

2.5 埋鞭方式和鞭段来源对竹鞭繁殖能力的影响

2.5.1 不同鞭段规格和鞭数对竹鞭繁殖能力的影响

选取组培苗和大田苗的当年生鞭段, 以4种不同的埋鞭方式进行埋鞭繁殖。埋鞭2个月后, 成活率、出笋系数和平均株高差异显著(表5)。来源组培苗的3芽3鞭和4芽2鞭的处理, 出笋系数和平均株高显著高于其他处理。大田苗4芽2鞭的出笋系数与组培苗4芽2鞭的差异不显著, 但是平均株高显著低于组培苗, 且成活率只有63%。因此, 组培

苗以每段3芽3鞭和每段4芽2鞭的方式进行埋鞭, 可以获得较高的出笋系数。

2.5.2 不同来源鞭段繁殖能力的差异

采用每段4芽2鞭的方式进行埋鞭繁殖, 埋鞭后持续2年进行跟踪调查。结果表明, 组培苗来源的竹鞭出笋系数持续高于容器苗。埋鞭2个月有新竹长出, 来源组培苗的竹鞭出笋系数达3.18, 1年后出笋系数达36.53, 增加了近10倍, 2年后增加了近20倍。与大田苗相比, 3个时间点分别提高了93.6%、4.22倍、5.18倍。由图1-F和G可以看出, 来源组培苗的竹鞭再生后, 竹苗生长更加旺盛, 叶片色泽深绿。

2.6 白纹椎谷箬叶色分离特性研究

2.6.1 不同叶色光合色素含量的差异

对白叶、白叶绿条纹、绿叶白条纹和绿叶4种不同的叶色类型白纹椎谷箬进行叶片光合色素含

表5 不同鞭段规格和鞭数对白纹椎谷箬繁殖生产力的影响
Table 5 Effects of different whip segment specifications and whip number on reproductive productivity of *S. glabra*

竹鞭来源	不同埋鞭方式	鞭段成活率/%	出笋系数	平均株高/cm
组培苗移栽的容器苗	每段3个芽, 2条鞭	100.00 ^a	2.33 ^c	2.33 ^c
	每段4个芽, 2条鞭	100.00 ^a	3.60 ^{ab}	3.60 ^{ab}
	每段2个芽, 3条鞭	97.00 ^a	3.14 ^b	3.14 ^b
	每段3个芽, 3条鞭	100.00 ^a	3.67 ^a	3.67 ^a
分株繁殖获得容器苗	每段3个芽, 2条鞭	86.67 ^b	1.45 ^{dc}	1.45 ^{dc}
	每段4个芽, 2条鞭	63.33 ^d	3.60 ^{ab}	1.83 ^{cd}
	每段2个芽, 3条鞭	56.67 ^e	1.31 ^e	1.31 ^e
	每段3个芽, 3条鞭	76.67 ^c	2.00 ^c	2.00 ^c

量测定。结果(表6)表明,4种叶片中叶绿素a (Chl a)、叶绿素b (Chl b)、叶绿素(a+b)[Chl (a+b)]及类胡萝卜素/叶绿素(Car/Chl)均随着叶片绿色条纹组织的加宽而显著增加,其中,绿叶比白叶分别高76.0%、77.1%、77.0%和78.3%,但是叶绿素a/b (Chl a/b)却无显著差异。

2.6.2 叶色变异相关基因差异表达分析

为了研究白纹椎谷箬移栽后叶色分离现象,通过半定量RT-PCR分析在不同叶色组织中15个质体发育相关基因的表达。半定量RT-PCR结果(图2)显示, *atpB*只在FG中有少量表达, *ndhE*在4种组织中均没有表达,其中基因*psaA*、*psbB*、*psbC*、*psbD*

在4种不同类型叶片间的转录水平有明显差异,在叶片白色组织中的表达量较少,而在叶片绿色组织中的表达量较高,而基因*atpH*、*ndhC*、*ndhG*、*petD*、*psbA*在4种不同类型叶片间的转录水平没有明显差异。

3 讨论

3.1 建立一种组织培养与竹鞭繁殖相结合的快速育苗方法

目前已有多种竹子以侧芽为外植体建立组培快繁体系,如云南甜龙竹(*Dendrocalamus brandiss*; 郑祥乾等2019)、箬竹(*Qiongzhuea tumidinoda*) (郑

表6 白纹椎谷箬不同类型叶片的叶绿素含量及相对比值
Table 6 Chlorophyll content and relative ratio of different types of leaves of *S. glabra*

叶片类型	叶绿素a含量/ mg·L ⁻¹	叶绿素b含量/ mg·L ⁻¹	叶绿素a+b含量/ mg·L ⁻¹	叶绿素a/ 叶绿素b	类胡萝卜素/ 叶绿素
白叶	10.50±0.43 ^d	3.76±0.19 ^d	13.82±0.62 ^d	2.67±0.04 ^a	1.89±0.07 ^d
白叶绿条纹	23.58±4.61 ^c	8.78±1.72 ^c	32.36±6.32 ^c	2.69±0.01 ^a	4.15±0.81 ^c
绿叶白条纹	33.90±2.32 ^b	12.32±0.99 ^b	46.21±3.29 ^b	2.76±0.06 ^a	6.17±0.18 ^b
绿叶	43.75±1.08 ^a	16.43±0.34 ^a	60.19±1.38 ^a	2.66±0.03 ^a	8.71±0.35 ^a

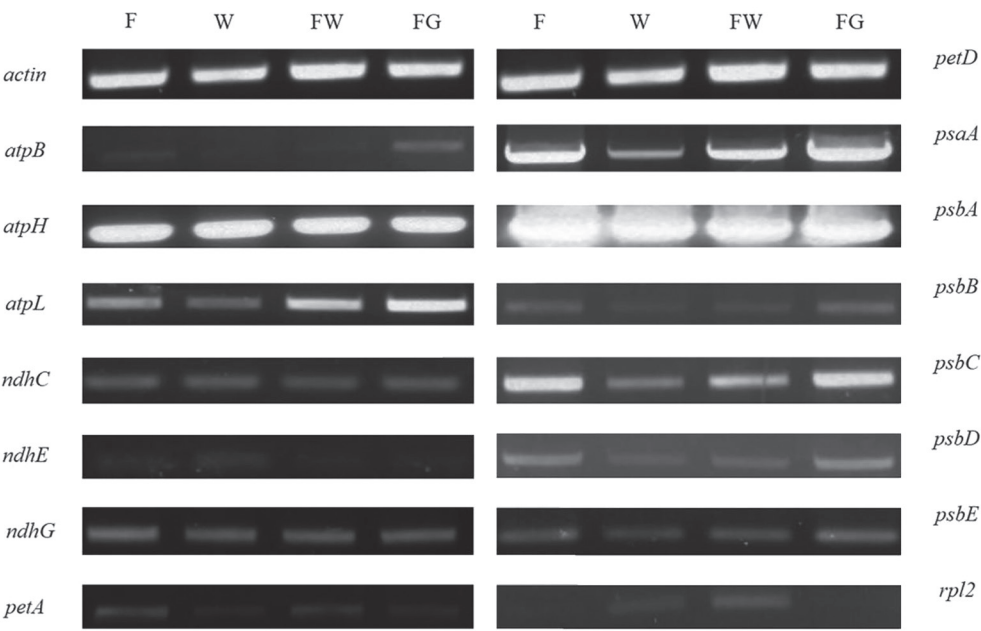


图2 白纹椎谷箬不同叶片15个叶绿体基因半定量RT-PCR
Fig. 2 Semiquantitative RT-PCR of 15 chloroplast encoding genes in different leaves of *S. glabra*
F: 花叶; W: 白叶; FW: 花叶中的白条纹; FG: 花叶中的绿条纹。

静楠等2021)、巨龙竹(*Dendrocalamus sinicus*; 杨树鹏等2004)等丛生竹,集中在培养基筛选、组培各阶段操作技术等方面开展研究,探讨消毒剂、细胞分裂素与生长素等对竹子组织培养的影响。本研究中探讨的从30到45 d延长的继代时间对试管苗增殖生长增殖系数提高了近1倍,这一发现可为大量竹苗生产节约时间和成本。另外,研究中利用组培苗移栽驯化苗微型竹鞭埋鞭繁殖,繁殖能力提升了5倍多,繁殖效率高,速度快,苗木质量好,成本低,为竹子快速育苗提供了一种新思路,对珍稀观赏竹种苗繁育与大面积推广具有重要意义。

孟勇等(2021)曾探究毛金竹鞭段年龄对埋鞭繁殖的影响,结果发现1龄鞭段的埋鞭成活率最高,显著高于2~3龄鞭段和4~5龄鞭段,且随鞭龄增加,竹鞭上健壮鞭芽数量呈下降趋势,鞭段育苗系数呈下降趋势。组培苗来源的竹鞭繁育能力远高于普通容器苗,可能因为组培苗来源于外植体竹节芽的顶端分生组织,其为具有较强再生潜力的细胞团。组培苗移栽后作为埋鞭繁殖的母竹,其相对生理年龄小于容器苗母竹,因此鞭段再生能力会较强。另外,组培苗生根过程中添加的植物生长调节剂IBA,也可能对组培苗移栽后的埋鞭繁殖能力产生了影响。李朝娜等(2013)探究了不同植物生长调节剂对金镶玉竹埋鞭繁殖能力的影响,结果发现ABT对鞭段出笋系数的影响最大,其次是IBA, NAA最差。虽未在埋鞭繁殖时使用生长素浸泡,但组培苗生根过程中使用了IBA,这是否对移栽后鞭段的繁殖能力产生影响,还需要进一步探究。

3.2 竹苗离体快繁能力的影响因子

虽然有较多竹种建立了离体快繁体系,但是不同竹种的繁殖能力差异较大,不同植物生长调节剂对侧芽诱导、增殖培养、生根培养的影响各不相同。其中6-BA能够促进植物侧芽的萌发及芽的伸长,大部分植物在6-BA浓度为2~5 mg·L⁻¹时可以诱导出芽(周玉洁等2019); TDZ可以促进芽萌发及增殖,对竹子不定芽的增殖培养有很好的效果(吴霞等2022)。本研究在6-BA浓度为4 mg·L⁻¹,获得了较大增殖效率,而高浓度的6-BA (10 mg·L⁻¹)对丛芽的增殖起抑制作用,这与李在留和辉朝茂(2006)的研究结果一致。低浓度的TDZ可以激发

新芽萌发活力, TDZ浓度过高,抑制芽的增殖生长,这与谢寅峰等(2011)的研究结果一致。综合考虑TDZ的价格较为昂贵,建议采用低浓度的TDZ。生长素NAA和IBA常用于竹子的生根培养(林树燕等2015),生长素的浓度影响了组培苗的生根数量、根长及形态特征,因此,在竹子组织培养过程中,生长素对生根培养有重要的作用。

总之,植物生长调节剂的种类与浓度会影响竹子不定芽的诱导和不定根的形成,不同竹种对植物生长调节物质的响应范围和程度不相同,这可能与不同竹种母本地下茎发育和枝条发育特性差别较大有关,不同竹种的萌蘖程度不同,有些竹种是多分枝、而有些竹种只有一分枝。

3.3 叶片色素差异累积与叶绿体发育相关基因差异性表达

绿叶变异主要受叶绿素等光合色素含量变化影响,而光合色素在叶绿体中形成和累积,因此,色素累积的差异与叶绿体相关基因表达的差异都可能导致叶色变异(成敏敏等2018; 杨海芸2015)。本研究中白叶和白叶绿条纹的叶绿素含量显著低于绿叶或绿叶白条纹。

目前已有对叶绿体发育基因在不同叶色中差异表达的相关报道,杨海芸等(2014)对曙矢竹3种不同叶色的突变株进行半定量PCR,结果发现基因*atpB*、*psaA*、*psbA*、*psbB*、*psbC*、*petA*、*psbE*在叶片绿色组织和白色组织间的转录水平有明显差异,且均表现为绿色组织的转录水平高于白色组织。袁丽钗等(2010)对菲白竹绿化突变体和白化突变体的研究表明,基因*atpL*在白化突变体中的表达量明显低于绿化突变体,而基因*ndhE*和*ndhG*在白化突变体中的表达量明显高于绿化突变体。不同竹种白绿叶质体发育相关基因表达各不相同,其变异机制可能存在差异。白纹椎谷箬中*atpB*只在FG中有少量表达,*ndhE*在4种组织中无表达,部分基因在突变后的白纹椎谷箬白色组织中转录水平明显低于绿色组织,其中*psaA*基因编码光系统I (PSI)作用中心A1蛋白,*psbB*、*psbC*、*psbD*编码光系统II (PSII)作用中心蛋白(何培民和张荣铨2000),它们均参与编码形成叶绿体基粒类囊体蛋白复合体的重要元件,它们的低表达可能与白叶组织中的

类囊体结构损伤有重要的关系,王啸晨等(2012)已经报道了其叶绿体结构的损坏。

在自然培养条件下,光照、温度、水分等环境条件的改变都有可能引发植物的叶色变异,白纹椎谷箬在绿化栽培若干年后,发现处于树荫遮蔽下的竹株也会出现叶色分离的现象。本研究中组培苗未见叶色变异显现,但在组培苗移栽1年后,生成的新竹发生叶色分离。组培苗移栽后由异养生长转变为自养生长,光照条件、营养来源等都发生了变化,这种叶色分离可能是竹子本身在“逆境”下的反应,光照条件的改变可能是一个诱因。有研究表明,在弱光条件下,光合有效辐射强度减弱,植物光合作用和光形态建成受到影响,进而影响了光合色素在叶绿体中的形成和累积(薛伟等2011),在组织培养过程中的竹苗也会出现叶色变异现象,这可能与组培过程中添加的植物生长调节剂的种类与浓度有关(杨海芸等2010)。这种自然条件下叶色变异和组培后的叶色分离都有待进一步进行分子机制的研究。

参考文献(References)

- Chen LY, He LT, Lai JL, et al (2017). The variation of chlorophyll biosynthesis and the structure in different color leaves of *Bambusa multiplex* 'Silverstripe'. *J Forest Environ*, 37 (4): 385–391 (in Chinese with English abstract) [陈凌艳, 何丽婷, 赖金莉等(2017). 银丝竹不同叶色叶绿素合成及叶结构差异. *森林与环境学报*, 37 (4): 385–391]
- Cheng MM, Chen KY, Zhu XY, et al (2018). Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* during green-revertible albino stage. *Sci Silv Sin*, 54 (4): 1–8 (in Chinese with English abstract) [成敏敏, 陈柯伊, 朱雪玉等(2018). 花叶矢竹复绿期光合特性及叶绿体结构. *林业科学*, 54 (4): 1–8]
- He AG, Shi WH, Zuo LY, et al (2020). Establishment of tissue culture and rapid propagation system of *Bambusa glaucescens* (f. *albo*). *Mol Plant Breed*, 18 (7): 2320–2325 (in Chinese with English abstract) [何安国, 史文辉, 左璐莹等(2020). 花叶凤尾竹(*Bambusa glaucescens* f. *albo*)组培快繁体系的建立. *分子植物育种*, 18 (7): 2320–2325]
- He PM, Zhang RX (2000). DNA and gene map of alga chloroplast genome. *J Shanghai Fish Univ*, 9 (1): 51–58 (in Chinese with English abstract) [何培民, 张荣铤(2000). 藻类叶绿体DNA和基因图谱. *上海水产大学学报*, 9 (1): 51–58]
- Li N (2012). Characteristics and genetic analysis of yellow-green mutants in wheat (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese with English abstract) [李宁(2012). 小麦黄绿突变体特性研究与遗传分析(学位论文). 北京: 中国农业科学院]
- Li R, Guo QR, Zeng BS, et al (2008). A preliminary study of tissue culture and propagation of Moso bamboo by shoot proliferation. *World Bamboo Rattan*, 6 (6): 9–13 (in Chinese with English abstract) [李蓉, 郭起荣, 曾炳山等(2008). 毛竹种子“以芽繁芽”组培快繁初步研究. *世界竹藤通讯*, 6 (6): 9–13]
- Li ZL, Hui CM (2006). Study on tissue culture of *Dendrocalamus sinicus*. *Sci Silv Sin*, 42 (2): 43–48 (in Chinese with English abstract) [李在留, 辉朝茂(2006). 珍稀竹种巨龙竹组织培养研究. *林业科学*, 42 (2): 43–48]
- Li ZN, Chen R, Jiang KY, et al (2013). Research on effect factors for rhizome planting of *Phyllostachys aureosulcata* f. *spectabilis*. *J Fujian For Sci Tech*, 40 (2): 82–85 (in Chinese with English abstract) [李朝娜, 陈荣, 姜可以等(2013). 金镶玉竹埋鞭育苗影响因子研究. *福建林业科技*, 40 (2): 82–85]
- Lin SY, Zhao R, Zheng X (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Bambusa glaucophylla*. *Plant Physiol J*, 51 (12): 2175–2180 (in Chinese with English abstract) [林树燕, 赵荣, 郑笑(2015). 马来箭竹的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 51 (12): 2175–2180]
- Meng Y, Zhang ZP, Ai WS, et al (2021). Influence factors to seedling breeding with rhizome segments of *Phyllostachys nigra* var. *henonis*. *World Bamboo Rattan*, 40 (2): 82–85 (in Chinese with English abstract) [孟勇, 张泽平, 艾文圣等(2021). 毛金竹鞭段育苗的影响因素. *世界竹藤通讯*, 19 (5): 17–24]
- Su H, Zhong M, Cai SK, et al (2004). Tissue culture and rapid propagation of *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Physiol Commun*, 40 (4): 468–468 (in Chinese with English abstract) [苏海, 钟明, 蔡时可等(2004). 马来甜龙竹的组织培养和快速繁殖. *植物生理学通讯*, 40 (4): 468–468]
- Wang GP, Huang MR (2002). Tissue culture and rapid propagation of *Pseudosasa japonica* cv. 'Tsutsumiana'. *Plant Physiol Commun*, 38 (1): 47 (in Chinese with English abstract) [王光萍, 黄敏仁(2002). 日本平安竹的组织培养及快速繁殖. *植物生理学通讯*, 38 (1): 47]
- Wang XC, Yue XH, Wu J, et al (2012). Appearance and structure analysis of chimeric leaves from two ornamental bamboos. *China Agric Sci Bull*, 28 (16): 233–238 (in Chinese with English abstract) [王啸晨, 岳祥华, 吴杰等(2012). 2种观赏彩叶竹形态结构的观察与分析. *中国农学通报*, 28 (16): 233–238]
- Wang YX, Zhang GC (2000). Growth of *Dendrocalamus latiflorus* seedlings from tissue culture of its seed clones. *For Sci Technol*, 16 (3): 1–5 (in Chinese with English ab-

- stract) [王裕霞, 张光楚(2000). 麻竹实生苗无性系的组培繁殖及其生长. 广东林业与科学, 16 (3): 1–5]
- Wu X, Fan LL, Wang XM, et al (2022). Rapid propagation system of *Bambusa multiplex* ‘Silverstrip’ tissue culture. Mol Plant Breed, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220409.0854.004.html> (in Chinese with English abstract) [吴霞, 凡莉莉, 王小妹等(2022). 银丝竹组培快繁体系建立. 分子植物育种, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220409.0854.004.html>]
- Xie YF, Zhang ZM, Shang XL, et al (2011). Germination of axillary buds from stem segments and proliferation of multiple shoots of *Cyclocarya paliurus*. Sci Silv Sin, 47 (1): 50–55 (in Chinese with English abstract) [谢寅峰, 张志敏, 尚旭岚等(2011). 青钱柳茎段腋芽萌发和丛生芽增殖. 林业科学, 47 (1): 50–55]
- Xue W, Li XY, Zhu JT, et al (2011). Effects of shading on leaf morphology and response characteristics of photosynthesis in *Alhagi sparsifolia*. Chin J Plant Ecol, 35 (1): 82–90 (in Chinese with English abstract) [薛伟, 李向义, 朱军涛等(2011). 遮阴对疏叶骆驼刺叶形态和光合参数的影响. 植物生态学报, 35 (1): 82–90]
- Yang HY (2015). Study on mechanism of spontaneous leaf color variation of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* H. Okamura (dissertation). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [杨海芸(2015). 花叶矢竹叶色变异机理研究(学位论文). 北京: 北京林业大学]
- Yang HY, He AG, Jiang KY, et al (2014). Biological effects on tissue culture plants of *Pseudosasa japonica* induced by ^{137}Cs - γ ray. J Nuc Agric Sci, 28 (11): 1941–1949 (in Chinese with English abstract) [杨海芸, 何安国, 姜可以等(2014). ^{137}Cs - γ 射线辐照矢竹类组培苗生物学效应. 核农学报, 28 (11): 1941–1949]
- Yang HY, Wang XQ, Zhang N, et al (2010). Tissue culture and leaf color variation of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*. J Bamboo Res, 29 (4): 15–20 (in Chinese with English abstract) [杨海芸, 王晓芹, 张宁等(2010). 日本花叶矢竹组织培养与叶色变异研究. 竹子研究汇刊, 29 (4): 15–20]
- Yang SP, Zhang SZ, Hui ZM, et al (2004). Tissue culture and rapid propagation of *Dendrocalamus sinicus*. Plant Physiol Commun, 40 (3): 346 (in Chinese with English abstract) [杨树鹏, 张树珍, 辉朝茂等(2004). 巨龙竹的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 40 (3): 346]
- Yuan LC, Li XP, Peng ZH, et al (2010). Ultrastructure of the albino and green mutants of *Pleioblastus fortunei* and expression of 15 chloroplast genes. Chin Bull Bot, 45 (4): 451–459 (in Chinese with English abstract) [袁丽钗, 李雪平, 彭镇华等(2010). 菲白竹组培苗白化、绿化突变体的超微结构及15个叶绿体编码基因的表达. 植物学报, 45 (4): 451–459]
- Zhang CL (2019). Research progress in tissue culture of bamboos. Modern Hortic, (12): 7–8 (in Chinese with English abstract) [张春玲(2019). 竹子组织培养研究进展. 现代园艺, (12): 7–8]
- Zhang XZ (1986). Measurement of chlorophyll content in plants: acetone ethanol mixture. Liaoning Agric Sci, (3): 26–28 (in Chinese with English abstract) [张宪政(1986). 植物叶绿素含量测定—丙酮乙醇混合液法. 辽宁农业科学, (3): 26–28]
- Zheng JN, Dong WY, Zhong H, et al (2021). Technical research on rapid propagation of *Qiongzhusua tumidinoda* tissue culture. J Northeast For Univ, 49 (1): 50–58 (in Chinese with English abstract) [郑静楠, 董文渊, 钟欢等(2021). 箬竹组培快繁技术. 东北林业大学学报, 49 (1): 50–58]
- Zheng XX, Chen LN, Sun MS, et al (2019). A study of tissue culture and rapid propagation of *Dendrocalamus brandisii* based on embryo sterile seedlings. World Bamboo Ratt, 17 (4): 26–29 (in Chinese with English abstract) [郑祥乾, 陈凌娜, 孙茂盛等(2019). 基于种子无菌苗的云南甜龙竹组培快繁研究. 世界竹藤通讯, 17 (4): 26–29]
- Zhou YJ, Wei XF, Shen CQ, et al (2019). Tissue culture and rapid propagation of the endangered plant *Loropetalum subcordatum*. Plant Physiol J, 55 (5): 635–641 (in Chinese with English abstract) [周玉洁, 韦雪芬, 申长青等(2019). 濒危植物四药门花的组培快繁. 植物生理学报, 55 (5): 635–641]