

竹子的离体培养研究*

王敬文 蒋 晶

摘要 近 20 a 来已对 20 个属 70 余种竹子进行了离体培养研究。以侧芽、顶芽、成熟胚作外植体诱导愈伤组织,由愈伤组织制备悬浮细胞进行细胞悬浮培养,由悬浮细胞制备原生质体进行原生质体培养。竹子愈伤组织经不定芽途径或体细胞胚发生途径再生完整植株。通过芽尖培养增殖新生芽进行竹微繁殖,并获得脱病毒种苗。以芽为外植体增殖的新芽或组培再生苗经继代培养诱导竹试管开花结实。

关键词 竹子 愈伤组织 悬浮细胞 原生质体 微繁殖 试管开花

竹子作为林木植物中占有重要地位的树种,在应用生物技术领域进行相关研究方面起步是比较晚的。1981 年 Huang 的博士论文^[1]是关于竹子组织培养的第一篇报告,此前仅有 2 篇有关竹子组织培养的简要报告,一篇是 Alexander 和 Rao^[2]描述籼竹(*Bambusa* sp.)成熟种子离体胚无菌萌发,另一篇是 Tseng 等^[3]报道一些试验原生质体分离的作物目录之一的籼竹。而至今通过因特网(Internet)可检索出近 40 篇论文,内容涉及竹子的组织和细胞培养、植株再生、微繁殖、试管开花和原生质体培养,而且随着对竹子研究的逐步深入,生物技术日益得到广泛应用,仅 1993~1995 年 3 a 中发表的竹子生物技术论文占 20 a 来总数的 56% 以上。据统计用于研究组织培养、微繁殖、试管开花或原生质体培养的研究材料约有 20 个属 70 种竹子,而其中又多集中于籼竹属(*Bambusa*)、牡竹属(*Dendrocalamus*)、刚竹属(*Phyllostachys*) 3 个属的竹种。

1 组织培养和植株再生

早在 1976 年 Huang 就开始竹子组织培养的研究,1981 年完成了她的博士论文,1983 年她发表的论文^[4]报道了绿竹属(*Dendrocalamus*)、籼竹属、刚竹属和赤竹属(*Sasa*)愈伤组织培养。1982 年 Mehata 等^[5]在第五届国际植物组织细胞培养会议上首次报道印度籼竹[*B. arundinacea* (Retz.) Willd.]愈伤组织通过体细胞胚发生途径获得再生植株。

Huang 和 Murashige^[4]发表了竹子组织培养的研究报告,选用了绿竹属、籼竹属、赤竹属和刚竹属的绿竹[(*D. oldhami* (Munro) Keng f.)、孝顺竹[*B. multiplex* (Lour.) Raeuschel ex Schult. f.)、翠竹[*S. pygmaea* (Miq.) E. G. Camus]和罗汉竹(*P. aurea* Carr. ex A. et C. Riviere) 4 个竹种,目标是建立愈伤组织培养。取活跃生长的侧芽或顶芽 3~6 cm 长的芽尖作外植体,置于下述培养基中,其成分为 MS 无机盐、蔗糖 3%、White 综合维生素、甘氨酸 100 mg/L、肌醇 100 mg/L 及琼脂 0.8%,在暗处及恒温 27℃ 下即可获得继代无限繁殖、生长迅速

1998—04—07 收稿。

王敬文研究员,蒋晶(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 1998 年浙江省自然科学基金资助项目。

的愈伤组织。其色泽因种而异, 绿竹和孝顺竹呈乳白色, 细胞含水量高而松软, 翠竹和罗汉竹则呈乳黄色颗粒状至根瘤状的组织。罗汉竹的愈伤组织移于光下培养则转变成紫红色, 其它 3 种无此转变而仍保持原色。从石蜡切片可证明愈伤组织源自芽尖幼叶, 愈伤组织生长的速度及色素都发生变异。4 种愈伤组织可用 Polyarylamide 电泳分析法分离 GOT 同工酶而鉴定。这 4 个竹种愈伤组织的发生和持续生长都需要 2, 4-D 或 Tordon, 培养基中缺少 2, 4-D 就不能产生愈伤组织, 继代培养也不能生长, 2, 4-D 的浓度范围在 1~3 mg/L 之间, 超过 10 mg/L 就产生毒害作用。NAA 和 IAA 不宜用于愈伤组织发生和培养, 一是其效应比 2, 4-D 差得多, 二是使愈伤组织发生褐变和坏死。外源的细胞分裂素(包括 KT 和 ZT)对这 4 种竹子愈伤组织的形成和生长也是不必要的。在含有 3 mg/L 2, 4-D 的培养基中, BA 没有表现出促进愈伤组织形成的作用, 其量 1 mg/L 时诱导外植体形成愈伤组织的频率显著降低, 在继代培养时 BA 不仅没有促进生长, 反而使生长量减少, 浓度低至 0.03 mg/L 时仍表现出抑制作用, BA 的负作用与所用的生长素种类无关。

Mehata 等^[5]首次报道印度籼竹通过体细胞胚发生途径再生竹植株引人注目, 因为组织培养的主要目的之一是从细胞、愈伤组织和原生质体再生完整植株, 若经不定芽途径再生植株需要再经诱导生根程序, 而经体细胞胚状体途径可直接获得完整植株。此后, Rao 等^[6~12]都先后从不同来源愈伤组织通过体细胞胚发生途径获得再生植株, 所选用的竹种材料有牡竹[*D. strictus* (Roxb.) Nees]、印度籼竹、钓丝竹(*B. beecheyana* Munro)、绿竹和麻竹[*Sinocalamus latisfora* (Munro) McClure]。

Rao^[6]以牡竹种子的成熟胚作外植体, 以 B₅ 培养基作基本培养基, 加入 $1 \sim 3 \times 10^{-5}$ mol 2, 4-D 从胚端诱导出愈伤组织, 培养 30 d 即出现绿色的胚状体, 转移到含 5×10^{-7} mol IBA 和 10^{-7} mol NAA 的 B₅ 培养基中即萌发出小植株。Yeh 等^[7,8]以绿竹的幼花簇为外植体, 在加入 3 mg/L 2, 4-D 的 MS 培养基上诱导出愈伤组织, 培养 6 个月后在瘤状的愈伤组织上长出了多达 6 个以上的胚状体簇, 据扫描电镜观察, 每个胚状体都具有胚芽鞘和盾片, 胚状体起源于愈伤组织的表面, 胚状体在成熟时仅松松地贴附于愈伤组织团块。有胚发生能力的愈伤组织, 可以继代培养, 也可以保存在诱发愈伤组织的同一培养基上或无激素培养基上长达 16 个月之久而丧失分化胚状体的能力。胚状体在愈伤组织团块上或在无激素培养基上自动萌发, 长成小植株。但 Yeh 等^[9]发现麻竹与绿竹不同, 胚状体只是在转移到含 6% 琼脂、3 mg/L 2, 4-D、2 mg/L 动力精和无 PVP 的 MS 培养基上才萌发并产生小植株。

Rao 等^[6]在牡竹愈伤组织分化胚状体的实验中, 加入 2, 4-D 不能诱导分化出胚状体, 而加入 IBA 和 NAA 诱导分化出胚状体, 认为 2, 4-D 是无效的。而 Yeh 等^[7~10]在墨西哥雨竹(*O-tatea acuminata aztecorum*)、钓丝竹、绿竹的试验中恰恰相反, 认为 NAA、IBA 是无效的, 只有 2, 4-D 是必需的, 高水平的(6 mg/L) 2, 4-D 不仅对诱导愈伤组织而且对胚状体发生都是必需的, 低浓度的 2, 4-D(1~3 mg/L) 时愈伤组织生长不多, 也没有胚状体发生, 没有其它的生长素(IAA, NAA)能够代替 2, 4-D。然而, 在如此高水平的 2, 4-D 存在时部分胚状体在它们形成后又发生愈伤组织化, 因此在胚状体形成后, 为获得正常的小植株就迅速转移到萌发培养基中, 这种差异可能是由于竹种的不同造成的。

竹子也能通过不定芽再生途径获得再生植株。Huang 等^[13]将绿竹、孝顺竹、罗汉竹和翠竹的芽尖外植体培养在含有 2, 4-D 的培养基上产生了乳白色愈伤组织, 在各个生长素、细胞分

裂素水平上继代培养没有分化出芽,但相反却在联合施用 NAA 和 BA 培养中产生了绿色的部分器官化的颗粒状或瘤状的愈伤组织,进一步培养这种愈伤组织仍保持这种部分器官化状态,最后出现了不定芽,新芽不久又生根。腋芽内由于强烈的细胞分裂产生的愈伤组织发生不规则的膨胀,最后也绽出芽,新芽原基是在膨胀组织的表面细胞层特别是在上皮层区域分化出来,上皮层形成原基部分。较老的培养物主要表现为在新形成的芽中通过膨胀增加无定形愈伤组织以及分化附芽。颗粒状或瘤状的质地是由于在整个发育阶段中散布芽的坚硬的愈伤组织聚合的结果。解剖观察也证明不定芽不是衍生于单个细胞。

2 悬浮细胞和原生质体培养

阙国宁等^[14]进行了黄竹(*D. membranaceus* Munro)细胞悬浮培养,发现通常需 14 d 后才出现线性增长,30~45 d 出现对数生长期高峰,其最终增殖率可达 8~10 倍。悬浮培养的黄竹细胞分散性良好,多数为单细胞或 5~10 个细胞聚集的小细胞团,少数为 50~60 个细胞以上的细胞团,其细胞形状大致有圆形、长形和不规则形三类,随着继代培养次数的增加,培养细胞逐渐趋向一致。

竹子悬浮细胞和原生质体培养还有 Huang 等^[15~17]3 篇报道,Tseng 等^[3]曾在报道几种作物原生质体分离目录中提到竹子分离原生质体,用酶处理分离原生质体,但没有报道是否有活力。Huang 等^[16]详细报道了竹子原生质体分离制备的方法。2.5 g 悬浮细胞置于 10 mL 酶溶液中,于 12 及 80 r/min 振荡下处理 16 h,可分离 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个原生质体,酶溶液包括 MS 无机盐、改良 White 维生素、肌醇及 0.5%~2% Cellulysin 或 Cellulase CEI、12% Driselase、0.5%~1% Pectolyase Y23 和 0.7 mol 甘露醇,分离液中加入 50 mmol 精氨酸盐酸盐、0.1% BSA 和 0.05% 麦芽提取物可提高原生质体产量 1~2 倍,低温处理不仅提高原生质体产量,更显著增进和维持原生质体活力,分离后原生质体经等浓度甘露醇/蔗糖双层法净化清洗,可促进原生质体成活及细胞分裂。以孝顺竹和绿竹为材料,以芽尖为外植体诱导出愈伤组织,由愈伤组织制备悬浮细胞,以悬浮细胞作为原生质体的供体。先是按 Tseng^[3]从叶制备的方法没能分离出原生质体,后又按 Uchimiyu 和 Murashige 从悬浮的烟草细胞制备原生质体的方法也没能分离出竹子原生质体,之后联用 1%~5% Celluysin 和 0.2%~1% Macerace 消化悬浮细胞 2~24 h,同样也没取得成功,最后将 Celluysin 的量增加到 10%,Macerace 增加到 4%,并分别添加达到 5%的 Driselase 和 4%的 Pectolyase 才最终成功地分离竹原生质体。供体细胞样品对原生质体分离影响很大,当细胞培养物处于鲜重线性增长阶段时原生质体产量最高,虽然还不能确定细胞培养物快速增加鲜重是否主要靠细胞分裂,但对于孝顺竹和绿竹来说,供体细胞放置于新鲜营养液中 5 d 后能够获得高产量的鲜活的原生质体。在分离原生质体时,细胞量与消化介质的体积之间有一种平衡关系影响原生质体产量,烟草细胞量(g) 消化液(mL)以 1:10 为最佳,而竹子为 1:4。原生质体的产量与温度的关系是出人意料的,Dorokov 和 Alk-sandrova^[18]提出在接近冰点的温度下分离烟草悬浮细胞的原生质体,可获得完整的有活力的原生质体,若在室温或较高温度(37℃)下分离所得的原生质体是肿胀无活力的,低温下能得到高产优质的原生质体可能是由于减少外源酶和受伤害细胞或原生质体释放的其它去稳定和促衰老物质造成的细胞溶解,因此 Huang 等^[16]在低于 12℃和低酶浓度下分离竹子原生质体也取得了好的效果,其产量和活力都优于 27℃时的结果。制备竹原生质体,一个严重的问题是

丧失活性快, 试用了一些据报道有抗衰老和延长活力的几种物质作为添加物加入到酶液中, 其中精氨酸很有效果, 而多胺、丁二胺、亚精胺无效, 赤霉素也无效。牛血清蛋白的好处可能是防止蛋白酶水解, 但麦芽提取物的作用还不清楚。培养供体细胞的培养液成分对原生质体产量和随后的培养活力也是有益的, 它们的效应不可能仅限于提供了钙和维生素。分离和制备不同竹种的原生质体大部分参数是相同的, 而关键的几个参数又往往是不同的, 例如, 供体细胞是绿竹为 1 g, 孝顺竹为 2.5 g, 消化酶液中的 Cellulase、Driselase 和 Pectolyase 的含量绿竹需要分别达到 0.5%、1% 和 0.5%, 而孝顺竹则需要分别达到 2%、2% 和 1%。

Huang 等^[17]详细报道了竹子原生质体培养获得了愈伤组织, 没有报道是否获得植株。促进竹子细胞的原生质体成活及进行细胞分裂的基本条件为哺育细胞的辅助培养及定时递降渗透压, 培养基的成分为细胞培养基中加入 BSA、精氨酸盐酸盐、MES 及甘露醇(始自 0.6 mol), 原生质体嵌于 1 mL 大的 Sea Prep Aparose 点滴中, 点滴外供以悬浮培养细胞以资哺育, 4 周后无需哺育, 原生质体可顺利成活, 液体培养的细胞需每周更新, 渗透压以 0.2 mol 之比率于培养后第 2、6、7 周递降, 液体培养的孝顺竹成活率为 60%, 绿竹为 40%。逐步递降原生质体培养基中甘露醇的浓度对促进原生质体分裂增殖是十分重要的, 在 0.6 mol 的高浓度中约有 30% 的原生质体分裂, 但没能超过二细胞阶段, 没有产生一个多于 10 个细胞的团簇, 但若 2 周后甘露醇浓度降至 0.4 mol, 有 45% 的原生质体发生分裂, 8 周后近乎 20% 增殖成具有 26~200 个细胞的团簇。虽然原生质体的总的分裂频率仅为 31.7%, 由于 6 周后进一步降低甘露醇浓度到 0.2 mol, 实际上都已达到 26~200 个细胞大小的团簇。研究认为最适宜的递降渗透压方案应该是: 甘露醇 0.6 mol 维持 2 周, 0.4 mol 4 周, 第 7 周开始为 0.2 mol, 最终排除甘露醇。维持竹原生质体分裂导致产生愈伤组织需要哺育细胞和按时降低渗透浓度, 琼脂糖滴法可适用于此项操作。

3 芽尖培养和微繁殖

许多竹种由于采伐和缺少繁殖方法以及缺少开花控制方面的知识而处于濒危之中, 现在采用的繁殖方法仍然是依靠竹杆插条、根茎切分或种子, 这些方法是浪费和低效的, 微繁殖对于所选造林无性系的快速增加和保存具有相当的潜力, 因此竹子微繁殖的研究和应用受到重视。Saxena^[19]成功地进行了马甲竹(*B. tulda* Roxb.) 微繁殖, 这是印度东北部广泛栽培的制浆、建材、食笋俱优的竹种。将种子消毒后在 MS 培养基上萌发, 取 5 cm 或更长些的芽作外植体, 在含 8×10^{-6} mol BA 的 MS 培养基上 3 周内芽增殖 2~3 倍, 若 BA 和其它细胞分裂素类激素联合应用, 芽增殖率可达 4~5 倍, 芽是通过腋芽分枝增殖的, 没有发生愈伤组织。MS 培养基中 2% 蔗糖是理想的, 1% 蔗糖时芽减少且不健壮, 3%~4% 蔗糖时虽不影响增殖芽数, 但白化苗现象严重, 若再继代培养都会变成白化苗, 然而当转回到 2% 蔗糖培养基上时一些苗又绿化了, 再经继代培养全部又是绿色健壮的苗。试管苗不可能在盆栽混合基质中生根, 需要无菌条件下在改良的 MS 培养基上诱导生根, 10^{-5} mol IAA 处理获得最好的生根效果, 75% 的苗 3 周内生根, 一般在繁殖体基端生出 2~3 条根, 没有愈伤组织发生。4 周龄的生根小植株移植到盆栽混合介质中, 若直接移植成活率只有 40%~50%, 若在试管中控制水分进行炼苗, 成活率可达到 80%~90%。Chambers 等^[20]用版纳甜龙竹(*D. hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro) 胚轴或是整个的或是再切成单个的茎切段作外植体, 在含有不同浓度 BA 的 MS 培养

基上诱导芽增殖。当完整的上胚轴用作外植体时,仅在4周后从节上就生出新芽,12周内一直增生新芽,12周后 $4.4\text{ }\mu\text{mol BA}$ 处理产生的芽最多,而对照仅产生1~2个芽。在所有BA处理中一些培养物产生根,但用特别的生根激素却没能使小植株生根。在培养前将上胚轴切分成节切段,在含BA的培养基上也增殖,其数目类似于整个的下胚轴外植体。Woods等^[10]成功地繁殖了墨西哥雨竹,在暗中补加 $3\text{ mg/L } 2,4\text{-D}$ 、 $0.5\text{ mg/L } 6\text{-BA}$ 和2%蔗糖的MS基本培养基上由合子胚愈伤组织分化出体细胞胚,95%萌发形成了芽和根,移植土壤中的成活率为85%。张光楚等^[21]用人工辅助授粉得来的麻竹种子和幼茎为材料,培养基由不同比例的MS和不同浓度的BA、NAA组成,先诱导出芽,然后以芽繁芽,芽增殖月平均2.3倍,试管苗生根率90%,移栽成活率80%,试管外生根率65%,数千棵试管苗移植到地里并正常生长。

Prutpongse 和 Gavinlertvatan^[22]试验了67种竹子,54种成功地进行了微繁殖,几乎每个竹种增殖芽都是从培养于含BA的MS培养基上的茎节切段上的侧芽产生出来的,极少数可从愈伤组织无定性地再生出来,在含有 $2.7\sim 5.4\text{ }\mu\text{mol NAA}$ 培养基上生根,有几个种在 $1/2\text{MS}$ 培养基上室温条件下可在试管内储存15个月以上。当外植体在含有 $22\text{ }\mu\text{mol BA}$ 的MS培养基上培养时大多数竹种从幼芽(笋)茎节的侧芽上在30 d内产生了增殖芽,有几种竹如*Arundinaria pusilla*、灰秆竹(*B. polymorpha* Munro)、小佛肚竹(*B. ventricosa* McClure)和*Sasaella suwekoana*还需要加入 $5.4\text{ }\mu\text{mol NAA}$ 才能增殖芽。有几种竹如孝顺竹、长舌巨竹(*Gigantochloa ligulata* Gamble)、马来甜龙竹[*D. asper* (Schult. f.) Backer ex Heyne]、*G. hosseusii*、*D. nutans*和糯竹(*Cephalostachym pergracile* Munro)增殖芽很多,每节多于10个芽,增殖率高低依赖于基因型,如马来甜龙竹的3个无性系增殖率有4倍的变异,但也与繁殖体的大小有关,含有3个以上芽的繁殖体增殖率最高,单个芽的最低。继代培养也能使增殖率提高,如马来甜龙竹第一次继代每芽增生3个芽,第三次继代后每芽可增生9个芽。竹在试管中生长很快,需要频繁地继代培养,然而如果培养物置于 $1/2\text{MS}$ 培养基上25℃条件下不必继代也可以保存1 a以上,在这1 a中老的芽变褐色,在老芽死之前新的小绿芽产生出来,它们不再伸长,直到转移到新鲜培养基上再继代培养时这些芽又长成健康的正常植株。

4 试管开花

由于竹子开花周期长(12~120 a),开花的不可预见性,开花的复杂多变性,开花后植株死亡和结实率极低等原因,使竹子的杂交育种除极个别竹种获得成功外,绝大多数竹种难以实行,竹种改良难以取得重要进展。利用离体操作在时间和空间上的优势,诱导竹子试管开花,建立竹子试管开花结实实验系统,进行试管杂交,克服田间杂交所面临的种种困难,为竹子种质改良开辟新途径,是很值得探索的。Nadgauda等^[23]首次报道竹子试管开花结实,以印度籼竹和勃氏甜龙竹[*D. brandisii* (Munro) Kurz]种子为外植体进行无菌培养,竹苗长至5~6 cm高时切取含有胚芽鞘(具生长点)的幼茎,在MS培养基上进行培养形成丛生芽,连续进行继代培养3次,这两种竹都形成了具有正常小穗的复总状花序,将复总状花序的开花枝分切为小穗在相同培养基上继续继代培养,两种竹都能形成几个花序,继续培养这两种竹都正常结实获得了种子。Chambers等^[20]报道版纳甜龙竹试管开花,在培养前将种子实生苗上胚轴切分成节切段,在含BA的培养基上增殖芽,经继代培养首先在 $4.4\text{ }\mu\text{mol}$ 和 $22\text{ }\mu\text{mol BA}$ 2个处理的芽上开花,如果在 $22\text{ }\mu\text{mol BA}$ 培养8周后再转移到无激素培养基上,开花比率从24%提高到

47%。花像籼竹芽一样主要是从起初的切节处产生,花具有内稃和外稃,含有5~6个雄蕊,1~3个羽状柱头,1个带毛的子房,雄蕊和花柱呈粉红色,在花发育期间柱头首先从内稃和外稃伸出来,几天后雄蕊从花上挂垂着。从花药获得了花粉,经丙酮-胭脂红染色证明是有活力的。继代培养开花植株,28周后从节上产生更多的花,花的结构类似于田间开的花。当节外植体在 $2.2\mu\text{mol BA}$ 培养基上培养8周后再转移到无激素培养基培养时产生花的频率最高,细胞分裂素BA可能加速了先已存在的花分生组织的生长,然而也未必是这样,因为营养生长的最适BA水平高于诱导开花所需的BA水平,BA在诱导成花中的作用仍不清楚,尚需进一步研究。Rout和Das^[12]在研究龙头竹(*B. vulgaris* Schrader ex Wendl.)、龙竹(*D. gigantea* Munro)和牡竹体细胞胚发生时也发现,这3种竹的体细胞胚发生植株的节间外植体再生芽在1/2 MS培养基中添加0.25 mg/L IBA和0.5 mg/L GA₃时,继代培养12周诱导开了花,液体培养基比半固体培养基开花频率提高约1倍以上,花器发育正常,每种竹都获得了3~4粒种子。

至今已报道试管开花的竹种总共有9种,即印度籼竹、孝顺竹、龙头竹、勃氏甜龙竹、龙竹、版纳甜龙竹、麻竹、牡竹、翠竹,其中有5种获得了正常发育的种子。在竹试管开花的研究中,尽管外植体来源、使用的激素种类及组合各不相同,但都需要添加细胞分裂素类激素,其中BA的效果最佳,还都需要经过1~3次以上的继代培养才能诱导开花。成功诱导开花的竹子还是局限于少数竹种,还需要继续进行深入研究,但这表明竹子试管开花结实是完全可能的,具有很大潜在应用价值。还需要进一步深入研究试管开花的调节和控制,建立竹子试管开花结实实验系统,这对于了解竹子由稳定的无性生长状态到一次性开花状态的生理学和分子生物学变化,分析细胞分裂素在诱导花分化中的特殊作用,研究竹林成片开花和死亡的原因等都有重要意义。同时这一实验模式系统将为竹类的杂交育种辅平道路,可望有效地培育竹类种间杂种,并一年四季生产竹类种子。

参 考 文 献

- 1 Huang L C. Tissue culture investigation of bamboo (Bambusoideae, Poaceae). PhD. Dissertation. University of California, Riverside, 1981.
- 2 Alexander M P, Rao T C. *In vitro* culture of bamboo embryos. Cur. Sci., 1968, 37: 415.
- 3 Tseng T C, Liu F, Shiao S Y. Isolation of protoplasts from crop plants. Bot. Bull. Acad. Sin., 1975, 16: 55~60.
- 4 Huang L C, Murashige T. Tissue culture investigation of bamboo I. Callus culture of *bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. Bot. Bull. Acad. Sin., 1983, 24: 31~52.
- 5 Mehata U, Rao V R, Ram H Y M. Somatic embryogenesis in bamboo, in: Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture, 1982, 109~110.
- 6 Rao I U, Rao I V R, Narang V. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. Plant Cell Reports, 1985, 4: 191~194.
- 7 Yeh M L, Chang W C. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). Theor. Appl. Fenet., 1986, 73: 161~163.
- 8 Yeh M L, Chang W C. Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*. Plant Cell Reports, 1986, 5: 409~411.
- 9 Yeh M L, Chang W C. Plant regeneration via somatic embryogenesis in mature embryo-derived callus culture of *Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure. Plant Science, 1987, 51: 93~96.
- 10 Woods S H, Phillips G C, Woods J E, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants in Mexican weeping bamboo, *Oatea acuminata aztecorum*. Plant Cell Reports, 1992, 1: 257~261.
- 11 Chang W C, Lan T H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from roots of bamboo (*Bambusa beecheyana*).

- Journal of Plant Physiology, 1995, 145: 535 ~ 538.
- 12 Rout G R, Das P. Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. Plant Cell Reports, 1994, 13: 12, 683 ~ 686.
 - 13 Huang L C, Huang B L, Chen W L. Tissue culture investigation of bamboo . Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices. Env. Exp. Bot. , 1989, 29: 307 ~ 315.
 - 14 阙国宁, 诸葛强. 黄竹细胞悬浮培养和原生质体分离. 林业科学研究. 1994, 7(1): 44 ~ 47.
 - 15 Huang L C, Chen W L, Huang B L. Tissue Culture investigations of bamboo . Liquid suspension cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa* cells. Bot. Bull. Academia Sinica, 1988, 29: 177 ~ 182.
 - 16 Huang L C, Chen W L, Huang B L. Tissue culture investigations of bamboo . A method for viable protoplast isolation from *Bambusa* cells of liquid suspension culture. Bot. Bull. Academia Sinica, 1989, 30: 49 ~ 57.
 - 17 Huang L C, Huang B L, Chen W L. Tissue culture investigation of bamboo . Recovery of from protoplast of suspension-cultured *Bambusa* cells. Bot. Bull. Academia Sinica, 1990, 31: 29 ~ 34.
 - 18 Dorokov Y L, Aleksandrova N M. Isolation of tobacco mesophyll protoplast at low temperature and analysis of polyribosomes during their regeneration. Fiz. Rast. , 1981, 28: 1151 ~ 1156.
 - 19 Saxena S. *In vitro* propagation of bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Reports, 1990, 9: 431 ~ 434.
 - 20 Chambers S M, Heuch J H R, Pirrie A. Micropropagation and *in vitro* flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1991, 27: 45 ~ 48.
 - 21 张光楚, 陈富枢, 王裕霞. 麻竹离体快速繁殖技术的研究. 竹子研究汇刊, 1993, 12(4): 7 ~ 15.
 - 22 Prutpongse P, Gavinlertvatan P. *In vitro* Micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. Hortscience, 1992, 27(5): 453 ~ 454.
 - 23 Nadgauda R S, Parasharami V A, Mascarenhas A F. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue cultured bamboo. Nature, 1990, 344(22): 335 ~ 336.

Study on Culture *in vitro* of Bamboo

Wang Jingwen Jiang Jing

Abstract 70 species of bamboo in 20 genera were cultured *in vitro* in recent 20 years. Plant regeneration via somatic embryogenesis and adventitious shoot was achieved in callus cultures derived from explants excised axially buds, shoot apices or mature zygotic embryos. Liquid suspension culture cells of bamboo served as protoplasts donors, and high yields of viable protoplasts were obtained, and callus from protoplasts of suspension-cultured bamboo cells were recovered. About 70 species of bamboo tested were successfully propagated *in vitro*. For nearly each species, multiple shoots were produced from axially buds on stem node segments cultured on MS medium containing BA. A few callus plant could be regenerated adventitiously from callus. *In vitro* flowering was induced on shoot developed from nodal explant taken from regenerated plants. The flowering of bamboo shoots of some species occurred in unison, but not that of other species.

Key words bamboo callus cell suspension protoplast micropropagation *in vitro* flowering