植物学报 *Chinese Bulletin of Botany* 2025, **60** (2): 246–255, www.chinbullbotany.com
doi: 10.11983/CBB24143 cstr: 32102.14.CBB24143

·技术方法·

马来甜龙竹多倍体高效诱导及鉴定

郭政[1], 邵香君[2], 鲁海雯[1], 侯丹[1], 孔思梦[1], 李翔宇[1], 刘华倩[1], 林新春[1*]

[1]浙江农林大学竹子研究院, 杭州 311300; [2]杭州市临安区农林技术推广中心, 杭州 311300

摘要 由于大部分竹类植物开花周期长、花期难以预测且结实率低, 导致竹子育种一直是竹类植物研究的难题。多倍体育种作为植物育种的一种常用手段, 能够通过人工诱导获得具有优良性状的后代。在竹子育种中, 有关多倍体育种的研究较少。在已有马来甜龙竹(*Dendrocalamus asper*)再生体系的基础上, 分别使用液体悬浮法和固体培养基混培法对马来甜龙竹胚性愈伤组织进行秋水仙素处理。结果表明, 对于愈伤组织分化率和褐化率, 基于液体悬浮法用50 mg·L^{-1}秋水仙素处理愈伤组织48–72小时效果最佳。实验共得到再生植株54株, 其中对照组7株。利用流式细胞仪检测所有再生植株, 成功得到染色体加倍植株16株。在染色体加倍率方面, 采用100 mg·L^{-1}秋水仙素处理48小时产生的染色体加倍植株数量最多, 染色体加倍率达54.54%。与六倍体相比, 十二倍体植株的叶片更大、更厚, 下表皮气孔更大, 暗示其在抗逆生理方面具有一定的优越性。研究提出的基于竹子离体再生体系的高效率多倍体育种技术, 为培育竹类多倍体新种质提供了新方法。

关键词 马来甜龙竹, 秋水仙素, 愈伤组织, 倍性分析, 多倍体鉴定

郭政, 邵香君, 鲁海雯, 侯丹, 孔思梦, 李翔宇, 刘华倩, 林新春 (2025). 马来甜龙竹多倍体高效诱导及鉴定. 植物学报 **60**, 246–255.

竹子作为重要的森林资源, 在许多国家都具有重要的生态、经济及文化等多重价值。中国是世界上竹类资源最为丰富的国家之一, 竹产业的总产值在2021年已达3.6×10^{7}万元, 已经成为中国重要的森林支柱产业之一(国家林业和草原局, 2021)。竹子以无性繁殖为主, 因而种群内遗传变异小(Zhao et al., 2021), 良种资源匮乏(张云洁等, 2021; 高志民, 2023; 徐克凡等, 2024)。受限于其开花周期较长且花期不稳定等生物学特征(Sun et al., 2023), 在竹子中开展传统育种难度大且周期长, 因此有关竹子人工育种的报道较少。

植物在经历染色体加倍后通常表现出植株粗壮和抗逆性强等特点, 因此倍性育种技术常应用于提高果实品质、增强植株的抗倒伏能力和增大叶片等方面, 人工诱导多倍体育种已成为改良原品种品质的重要途径(曹嘉雯, 2022; 李淑洁等, 2023)。植物多倍体育种作为人工育种的成熟技术, 已广泛应用于各类植物中。例如, Correia等(2023)发现四倍体树番茄(*Solanum betaceum*)较二倍体具有更强的抗旱能力; Mangena (2023)证实多倍体大豆(*Glycine max*)具有缓解土壤高盐胁迫的能力。常用的多倍体育种方法有物理诱变法和化学诱变法。由于物理诱变法诱变率低, 定向性差, 当前研究多使用化学诱变法进行多倍体诱导(石庆华等, 2012), 其中以秋水仙素应用最为广泛。Zhou等(2020)以姜(*Zingiber officinale*)的幼嫩茎段为材料, 用秋水仙素处理并成功诱导产生四倍体姜。Wang等(2020)以中国矮樱桃(*Cerasus humilis*)茎尖为材料, 使用秋水仙素处理产生四倍体樱桃。竹类植物相关研究还停留在对种子和花药进行诱导。由于竹类植物开花周期长、花期难预测且结实率低, 导致对其进行多倍体诱导耗时费力, 而嵌合体的出现又使诱导率低且性状不稳定(Qiao et al., 2017; 徐鹏飞等, 2020)。

马来甜龙竹(*Dendrocalamus asper*)为禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)牡竹属(*Dendrocalamus*)大型丛生竹种。其笋味道鲜美且营养丰富, 是

收稿日期: 2024-09-18; 接受日期: 2024-11-15
基金项目: 国家重点研发计划(No.2021YFD2200503-3)和大学生创新创业教育基金(No.202210341015)
* 通讯作者。E-mail: lxc@zafu.edu.cn

一种美味健康的绿色蔬菜。其竿高大通直, 在东南亚各国常被作为建筑、手工艺品及纸张的原材料(陈松河等, 2018; Kong et al., 2020; Charoenphun and Pakeechai, 2023)。马来甜龙竹整竹形态优美, 常用于园林绿化, 具有极高的经济和观赏价值(Mustafa et al., 2021)。本研究在已有的马来甜龙竹离体再生体系的基础上(Zang et al., 2019), 以马来甜龙竹胚性愈伤组织为材料, 使用秋水仙素进行化学诱变处理, 对其染色体数目进行加倍, 旨在建立稳定的马来甜龙竹多倍体育种体系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料马来甜龙竹(*Dendrocalamus asper* (J. A. et J. H. Schult.) Backer ex Heyne)带芽茎段在愈伤组织诱导培养基(Zang et al., 2019)上诱导得到胚性愈伤组织((25±3)°C, 暗培养), 在增殖培养基上进行继代培养((25±3)°C, 暗培养), 每30天更换1次培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 秋水仙素诱导处理

液体悬浮法: 使用含不同浓度(0、50和100 mg·L^{-1})秋水仙素(colchicine) (购自上海生工生物)的液体培养基处理马来甜龙竹愈伤组织24、48和72小时, 每个锥形瓶中约30块愈伤组织。实验重复3次。液体培养基以MS培养基为基本培养基, pH5.7, 添加1.0 mg·L^{-1} 6-苄基嘌呤(6-BA)、1.0 mg·L^{-1}激动素(KT)和0.25 mg·L^{-1}萘乙酸(NAA)。

固体培养基混培法: 使用含不同浓度(0、20、40、50和100 mg·L^{-1})秋水仙素的固体培养基处理愈伤组织7、14和30天, 每皿培养20块愈伤组织。实验重复3次。固体培养基以MS为基本培养基并添加0.5 mg·L^{-1}噻苯隆(TDZ)。

将用上述2种不同方式处理获得的愈伤组织转移至含2.0 mg·L^{-1} 6-BA、1.0 mg·L^{-1} KT和0.25 mg·L^{-1} NAA的MS固体培养基上进行分化培养。培养条件: 光照强度为45 μmol·m^{-2}·s^{-1}, 光周期为16小时光照/8小时黑暗, 温度为(25±2)°C。30天后统计愈伤组织的褐化率和分化率。

褐化率=(愈伤组织褐化数目/愈伤组织总数)×100%;

分化率=(出现绿色愈伤组织数目/愈伤组织总数)×100%。

1.2.2 组培苗基因组倍性分析

取对照组和实验组再生苗心叶, 使用CyStain®PI Absolute P倍性分析试剂盒(Sysmex, 日本, 购自杭州新景生物)对样品进行处理, 然后利用cytoFLEX分析型流式细胞仪(Beckman coulter, 美国)进行分析。具体操作如下: 取心叶基部1 cm叶片置于培养皿中, 加入3–4滴细胞核萃取液(总量500 μL), 使用锋利的刀片快速切割60秒后加入剩余的细胞核裂解液, 裂解孵育60秒。裂解后样品用50 μm滤膜过滤, 并加入2 mL细胞核染液, 避光孵育30–60分钟, 最后上机分析。

1.2.3 细胞学分析

1.2.3.1 叶片下表皮气孔观察

收集组培苗叶片, 对其进行细胞学比较。参考张立荣和陈南(2009)的新方法分离叶片下表皮。切取叶片中部约1 cm^{2}作为材料, 使用502胶水将叶片下表皮粘在载玻片上, 待胶水凝固后, 使用50%次氯酸钠对其进行漂白处理2小时, 用流水冲洗干净后, 在轻缓水流下用牙刷将叶肉等多余组织刷去, 得到叶片下表皮。风干后在显微镜下对叶片气孔进行观察比较, 并统计保卫细胞畸形率。

畸形率=(20倍物镜下畸形保卫细胞数目/保卫细胞总数)×100%。

1.2.3.2 叶片解剖结构观察

取马来甜龙竹心叶中部, 用锋利的刀片进行徒手切片。将切出的薄且均匀的样品放在载玻片上, 滴加蒸馏水并盖上盖玻片制成临时装片, 置于显微镜下观察。

1.2.4 形态学比较

选取驯化后移栽至大棚中生长90天的野生型和染色体加倍植株(12×)各3株及多次加倍植株(18×) 2株, 对当年同一时期生长的直径约5 mm枝条上第2–6片成熟叶片的叶长和叶宽进行测量, 并计算叶片长宽比。

1.2.5 数据分析

以未加入秋水仙素的处理为对照组, 添加不同浓度秋

水仙素的处理为实验组。统计对照组和实验组愈伤组织的分化率、褐化率及玻璃化率。对叶片气孔形态和解剖结构进行观察时，利用ImageJ软件对保卫细胞长度和宽度及叶片解剖结构进行测量。实验数据用Excel软件整合处理。用SPSS 22.0软件进行Duncan's差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 秋水仙素诱导效果

2.1.1 液体悬浮法诱导效果

液体培养条件下，秋水仙素的浓度和处理时间对马来甜龙竹愈伤组织生长状态具有显著影响。随着秋水仙素浓度的增加，愈伤组织褐化率呈上升趋势，同时分化率随之降低。在相同的处理时间下，随着液体培养基中秋水仙素浓度的增加，愈伤组织褐化率逐渐增高(图1A)，同时分化率呈现一定程度的下降(图1B)。而在处理浓度固定的条件下，随着处理时间的延长其愈伤组织褐化率呈增长趋势。从愈伤组织褐化与分化情况看，用50 mg·L^{-1}秋水仙素处理愈伤组织48–72小时为佳。

2.1.2 固体培养基混培法诱导效果

在固体培养基中，不同浓度秋水仙素对愈伤组织的影响主要体现在玻璃化率的不同。其中50和100 mg·L^{-1}秋水仙素实验组愈伤组织出现严重的玻璃化现象(图2A)。后续实验中使用低浓度秋水仙素对愈伤组织进行处理，发现20 mg·L^{-1}秋水仙素处理14天或30天愈伤组织玻璃化率均较低(图2B，C)，表明低浓度秋水仙素长时间处理对愈伤组织的影响较小。而在40和50 mg·L^{-1}秋水仙素处理下，将处理时间缩短至14天可有效降低愈伤组织玻璃化率和褐化率，愈伤组织状态较好，但后期愈伤组织分化较困难，成苗时间长(图2D, E)。综上，在固体培养基中，用于诱导多倍体的秋水仙素应低于50 mg·L^{-1}，培养时间为14天。

2.2 再生苗倍性检测

经驯化得到马来甜龙竹再生植株54株，其中对照组7株。将实验组植株和对照组植株(6×)进行鉴定，结果显示，对照组的相对荧光强度峰值位于160处(图3A)，实验组部分植株相对荧光强度峰值位于320处,表明

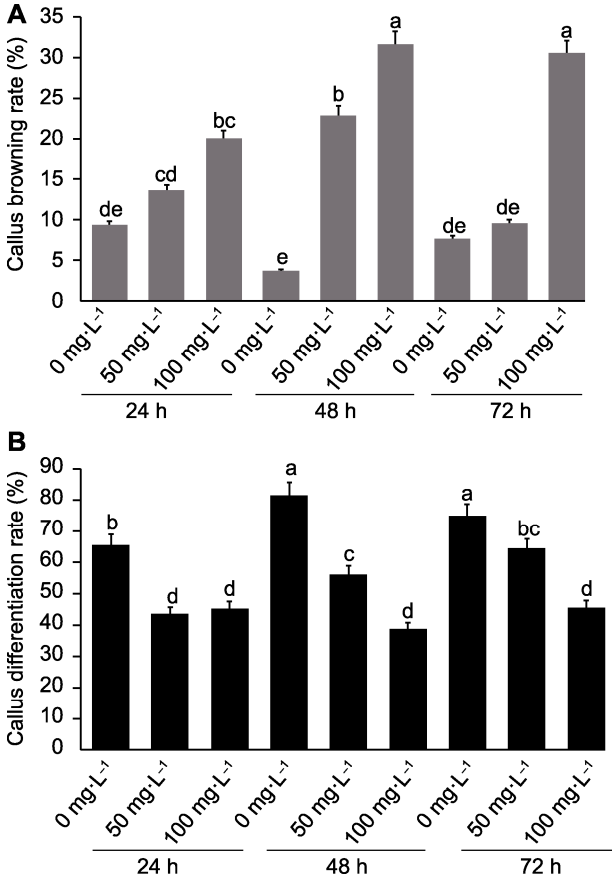


图1 基于液体悬浮法用秋水仙素处理马来甜龙竹愈伤组织的结果

(A) 不同秋水仙素浓度和不同处理时间愈伤组织褐化率；**(B)** 不同秋水仙素浓度和不同处理时间愈伤组织分化率。数据为平均值±标准差(n=10)，不同小写字母表示不同处理间差异显著。

Figure 1 Results of colchicine treatment of *Dendrocalamus asper* calluses based on liquid suspension method

(A) Callus browning rate at different colchicine concentrations and treatment times; **(B)** Callus differentiation rate at different colchicine concentrations and treatment times. Data are means ± SD (n=10), and different lowercase letters indicate significant differences among different treatments.

经过秋水仙素处理后细胞核内的DNA含量增加了1倍(图3B)。此外，有2株实验组植株相对荧光强度峰值出现在约500处，显示其细胞内DNA比对照组增加了2倍(图3C)。在实验组47株中，我们成功获得了14株染色体加倍植株(12×) (图3E)和2株多次加倍植株(18×)。结果显示，用液体悬浮法获得再生苗数量(44株)远多于固体培养基混培法(3株)，大部分染色体加倍植株来源于液体悬浮法(13株)；其中，采用100 mg·L^{-1}秋水仙素液体悬浮处理48小时产生的染色体

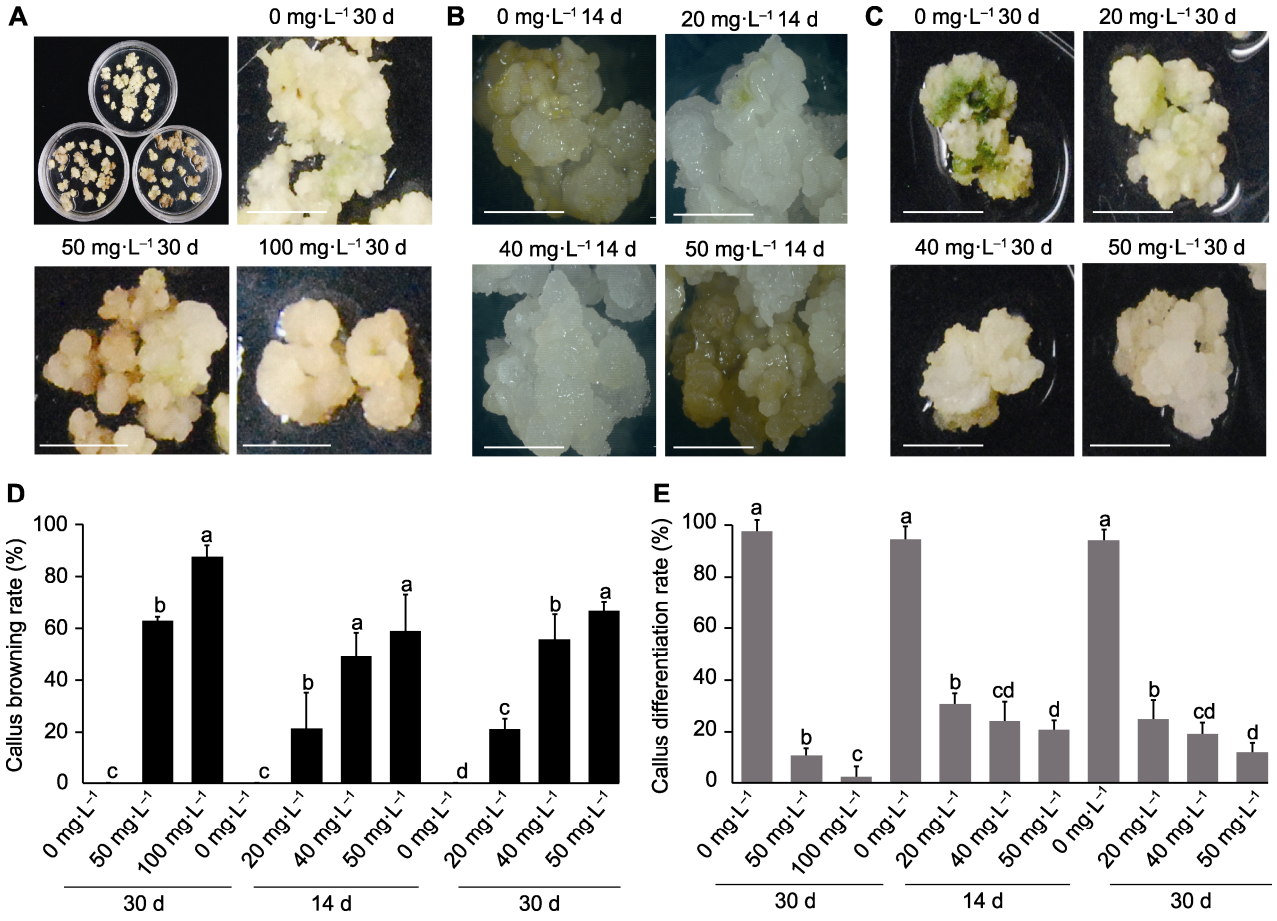


图2 基于固体培养基混培法用秋水仙素处理马来甜龙竹愈伤组织的结果

(A) 0、50和100 mg·L^{-1}秋水仙素处理30天; **(B)** 0、20、40和50 mg·L^{-1}秋水仙素处理14天; **(C)** 0、20、40和50 mg·L^{-1}秋水仙素处理30天; **(D)** 愈伤组织褐化率; **(E)** 愈伤组织分化率。数据为平均值±标准差(n=10), 不同小写字母表示不同处理间差异显著。Bars=5 mm

Figure 2 Results of colchicine treatment of *Dendrocalamus asper* calluses based on solid medium mixed culture method

(A) Treat with 0, 50, and 100 mg·L^{-1} colchicine for 30 days; **(B)** Treat with 0, 20, 40, and 50 mg·L^{-1} colchicine for 14 days; **(C)** Treat with 0, 20, 40, and 50 mg·L^{-1} colchicine for 30 days; **(D)** Callus browning rate; **(E)** Callus differentiation rate. Data are means ± SD (n=10), and different lowercase letters indicate significant differences among different treatments. Bars=5 mm

加倍植株数量最多, 共6株, 染色体加倍率达54.54% (表1)。用固体培养基混培法产生的再生苗数量少, 仅3株, 但全部为染色体加倍植株。

此外, 与对照组(图3D)相比, 我们观察到18×马来甜龙竹明显畸形, 其植株整体矮小、分蘖减少、节间缩短, 叶片显著缩小、变厚、易碎、边缘呈卷曲状(图3F)。后续该植株因生长不良而死亡。这可能是由于染色体联会紊乱所致。

2.3 多倍体叶片形态

2.3.1 叶片大小

通过比较分析, 发现12×和18×马来甜龙竹的叶片在形态特征上与6×植株存在一定差异(图4A–C)。具体而言, 12×植株的叶片明显增大, 而18×植株的叶片则相对较小。然而, 在叶片长宽比方面, 12×和18×植株均高于6×植株。上述结果表明, 染色体加倍对马来甜龙竹叶片的大小和形态产生显著影响, 但影响方式随倍性水平的不同而有差异。

2.3.2 叶片横切面结构

对3种倍性的马来甜龙竹叶片横切面进行显微观察, 并测量统计叶片厚度以及上、下表皮厚度。结果表明, 与6×对照组相比, 12×和18×马来甜龙竹的叶片厚度以及上、下表皮厚度均显著增加(表2)。具体而言, 12×

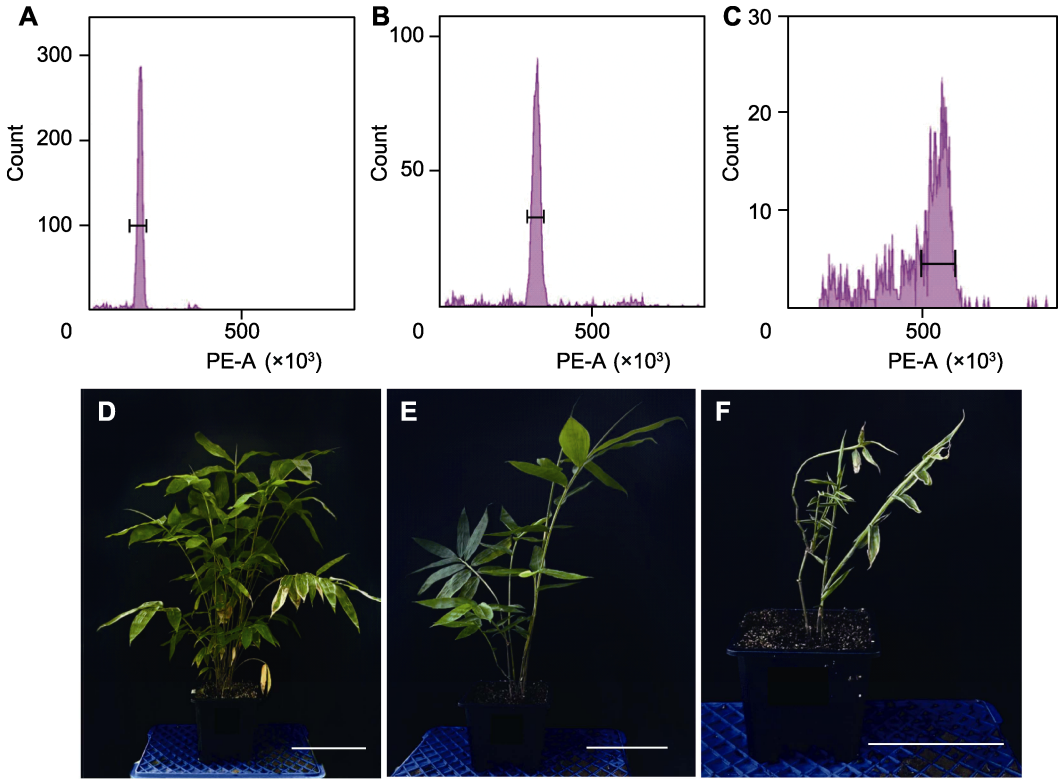


图3 马来甜龙竹不同多倍体流式细胞仪分析和形态学观察结果
(A), (D) 对照组六倍体(6×); **(B), (E)** 实验组十二倍体(12×); **(C), (F)** 实验组十八倍体(18×)。Bars=20 cm

Figure 3 Results of flow cytometry analysis and morphological observation of different polyploids in *Dendrocalamus asper*
(A), (D) Control group of hexaploid (6×); **(B), (E)** Experimental group of dodecaploid (12×); **(C), (F)** Experimental group of octaploid (18×). Bars=20 cm

表1 马来甜龙竹再生苗染色体加倍率

Table 1 Chromosome doubling rate of regenerated plantlets of *Dendrocalamus asper*

	Colchicine concentration and treatment time	Number of chromosome doubling	Number of regenerated plantlets obtained	Doubling rate (%)
Liquid suspension method	50 mg·L^{-1}, 24 h	0	7	0
	50 mg·L^{-1}, 48 h	2	7	28.57
	50 mg·L^{-1}, 72 h	3	8	37.50
	100 mg·L^{-1}, 24 h	0	5	0
	100 mg·L^{-1}, 48 h	6	11	54.54
	100 mg·L^{-1}, 72 h	2	6	33.33
Solid medium mixed culture method	40 mg·L^{-1}, 14 d	1	1	100
	40 mg·L^{-1}, 30 d	1	1	100
	50 mg·L^{-1}, 14 d	1	1	100

植株的叶片厚度增加47.12%，上、下表皮厚度分别增加60.40%和11.54%；18×植株叶片厚度增加103.72%，上、下表皮厚度分别增加144.14%和109.46%。上述结果表明，染色体加倍导致马来甜龙竹叶片整体厚度及上、下表皮厚度均增加，且这种增加效应与倍性水平呈正相关。

2.3.3 下表皮保卫细胞大小

对3种倍性的马来甜龙竹叶片下表皮气孔的显微观察表明，与6×对照组相比，12×和18×植株呈现典型的

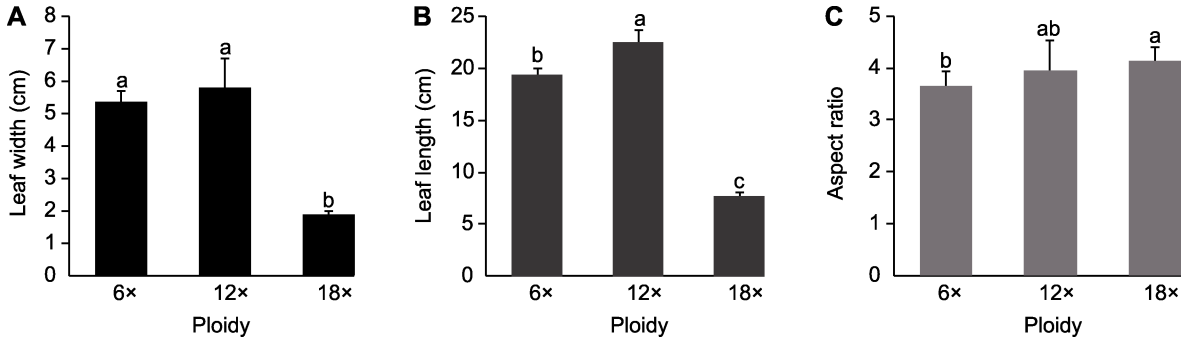


图4 不同倍性马来甜龙竹叶片形态学特征

(A) 叶宽比较; **(B)** 叶长比较; **(C)** 长宽比比较。数据为平均值±标准差(*n*=10), 不同小写字母表示3种倍性之间差异显著。

Figure 4 Morphological characteristics of *Dendrocalamus asper* leaves with different ploidy

(A) Comparison of leaf width; **(B)** Comparison of leaf length; **(C)** Comparison of aspect ratio. Data are means ± SD (*n*=10), and different lowercase letters indicate significant differences among the three ploidies.

表2 不同倍性马来甜龙竹叶片组织参数分析

Table 2 Analysis of leaf tissue parameters of *Dendrocalamus asper* with different ploidy

Ploidy	Blade thickness (μm)	Upper skin thickness (μm)	Lower skin thickness (μm)
6×	82.83±7.19 c	9.47±0.56 c	7.19±0.30 b
12×	121.86±5.30 b	15.19±0.86 b	8.02±1.58 b
18×	168.74±11.47 a	23.12±0.53 a	15.06±0.50 a

数据为平均值±标准差(*n*=10), 同列数据后不同小写字母表示3种倍性之间差异显著。

Data are means ± SD (*n*=10), and different lowercase letters after the data in the same column indicate significant differences among the three ploidies.

保卫细胞增大(图5A–C)。用ImageJ软件对保卫细胞的长度和宽度进行定量分析, 结果表明, 12×植株的保卫细胞长度增加40.10%, 宽度增加19.32% (表3)。此外, 在18×马来甜龙竹叶片下表皮气孔中, 还观察到保卫细胞畸形情况(图5D), 且保卫细胞畸形率也随着倍性的增加而增高(图5E)。

2.4 讨论

作为热带地区植物, 马来甜龙竹具有多种优良特性, 主要分布在我国云南及台湾等气候温暖湿润的地区。然而, 由于光照、温度和降水等环境因素的限制, 马来甜龙竹无法种植到我国北方地区(Zang et al., 2019)。多倍体育种是一种常见的育种方式, 由于其诱变手段简单, 产出品种的经济价值高而备受青睐。应用多倍体育种能够提高植物的环境适应能力, 增强马来甜龙竹的抗逆性, 进而有助于扩大种植范围并提高传播成功率(李淑洁等, 2023; 郭恒琳和勾晓婉, 2024)。在竹子多倍体育种方面, Qiao等(2017)以麻竹(*D. latiflorus*)花药为外植体, 构建了其再生体系并成功获得麻竹十二倍体, 说明竹亚科可以进行多倍体育种。徐鹏飞等(2020)对毛竹(*Phyllostachys edulis*)的种子和萌发的幼胚芽进行诱导, 获得了四倍体和六倍体毛竹。但在以种子及花药作为实验材料的多倍体育种中, 由于竹子开花结实周期长, 导致实验材料较难获得, 且无法完全避免出现嵌合体。由于嵌合体中染色体加倍的细胞数量有限, 随着时间的推移, 染色体加倍的细胞会最终被原倍体细胞包围并逐渐消失(张俊芳等, 2009; 周慧文等, 2015)。在本研究中, 我们对马来甜龙竹胚性愈伤组织进行秋水仙素处理, 再生苗由体细胞胚胎发育途径产生, 其来源为单个细胞个体, 极大地避免了嵌合体的产生, 确保加倍后植株性状稳定。

化学试剂可用于诱导植物染色体加倍, 当前进行多倍体育种时, 多使用氨磺灵及秋水仙素作为诱变剂(陶抵辉等, 2007)。研究表明, 秋水仙素只有在一定浓度范围和适当的处理时间内才能有效诱导植物产生多倍体。其作用机理为秋水仙素能特异性结合于由α-微管蛋白和β-微管蛋白组成的二聚体, 从而降低微管二聚体在微管上的组装数量。该机制导致微管的拆卸速率超过其组装速率, 最终造成微管解聚。在此过程中, 尽管染色体数量发生了加倍, 细胞质却未进行分裂, 从而导致染色体数量增加(周慧文等, 2015)。使

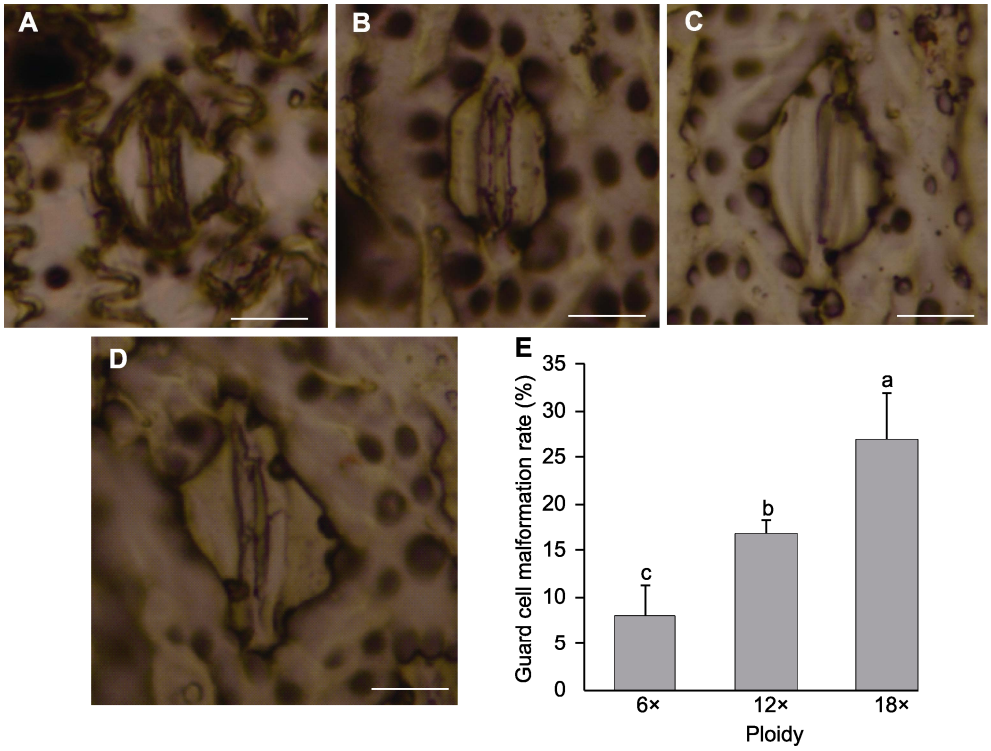


图5 不同倍性马来甜龙竹保卫细胞观察

(A) 对照组六倍体(6×); **(B)** 实验组十二倍体(12×); **(C)** 实验组十八倍体(18×); **(D)** 畸形保卫细胞; **(E)** 保卫细胞畸形率(不同小写字母表示3种倍性之间差异显著)。Bars=10 μm

Figure 5 Observation of guard cells of different ploidy of *Dendrocalamus asper*

(A) Control group of hexaploid (6×); **(B)** Experimental group of dodecaploid (12×); **(C)** Experimental group of octaploid (18×); **(D)** Malformed guard cells; **(E)** Guard cell malformation rate (different lowercase letters indicate significant differences among the three ploidies.). Bars=10 μm

表3 不同倍性马来甜龙竹气孔参数

Table 3 Stomatal parameters of *Dendrocalamus asper* with different ploidy

Ploidy	Guard cells	
	Length (μm)	Width (μm)
6×	20.25±1.30 c	7.04±1.02 b
12×	28.37±2.20 b	8.40±0.81 a
18×	36.54±5.58 a	8.96±1.32 a

数据为平均值±标准差(*n*=10), 同列数据后不同小写字母表示3种倍性之间差异显著。

Data are means ± SD (*n*=10), and different lowercase letters after the data in the same column indicate significant differences among the three ploidies.

用秋水仙素时, 其毒性效果与浓度和处理时间成正比, 通常认为在接近半致死浓度下, 能够获得最高的多倍体诱导率(罗静等, 2005)。本研究参考李高科等(2021)处理玉米(*Zea mays*)单倍体胚性愈伤组织所使用的秋水仙素浓度, 设置浓度梯度并探索适用于诱导马来甜龙竹愈伤组织染色体加倍的秋水仙素最适浓度和处理时间。结果表明, 对于马来甜龙竹胚性愈伤组织, 用含100 mg·L^{-1}秋水仙素的液体培养基暗处理48小时能够获得较多的再生苗与染色体加倍植株, 染色体加倍率达54.54%。固体培养基混培法产生的再生苗全部为染色体加倍植株, 但数量仅有3株。后续需要扩大实验规模, 以验证结果的可重复性。

在植物多倍体产生过程中, 会出现全基因组水平的遗传和表观遗传修饰的改变, 从而使染色体加倍植株与原植株出现共性和异性现象(李霖锋和刘宝, 2019)。经过秋水仙素诱导染色体加倍后, 植物会出现与原倍性植株有所区别的变异现象, 这些变异通常表现在植株形态和细胞学特征上(Li et al., 2024; 符勇耀等, 2024)。本研究表明, 叶片长宽比随着染色体倍性的增加而增加, 但当染色体数量超过一定限制

时, 可能会导致染色体联会紊乱, 植株发育畸形, 叶片明显缩小。细胞学特征, 如保卫细胞的大小和叶片厚度也会随倍性的增加而增加。

叶片厚度是评估植物抗旱能力的重要指标之一。叶片越厚, 植物的储水能力越强, 抗旱能力也越强(王江银等, 2023)。本研究发现, 12×马来甜龙竹再生苗的叶片大小和厚度均大于6×植株, 其叶片下表皮保卫细胞也更大, 暗示12×马来甜龙竹的抗旱性可能更强(唐军荣等, 2016; 王江银等, 2023)。通常多倍体植株较二倍体具有更强的抗性。Jin等(2022)对楸子(*Malus prunifolia*)多倍体进行耐盐性分析, 发现多倍体叶片表皮和栅栏组织较二倍体更厚, 与本研究结果相似, 后续需通过实验验证12×马来甜龙竹的抗胁迫能力。

高浓度秋水仙素和长时间处理会造成马来甜龙竹愈伤组织褐化或玻璃化, 导致分化率下降。本研究分别对马来甜龙竹愈伤组织进行液体悬浮法和固体培养基混培法处理, 结果表明, 由于液体悬浮处理时愈伤组织与秋水仙素接触时间较短, 受秋水仙素的影响较小, 愈伤组织分化率和褐化率都较固体培养基混培法效果好, 且固体培养基混培法处理后的愈伤组织分化率低, 成苗周期长, 较液体悬浮法存在缺陷。因此, 本研究获得诱导马来甜龙竹多倍体的最适方案为采用含100 mg·L^{-1}秋水仙素的液体培养基处理愈伤组织48小时, 在可控的褐化和玻璃化条件下, 该方案能有效产生染色体加倍的再生植株, 并获得较多的染色体加倍植株, 同时秋水仙素浓度也接近愈伤组织半致死浓度。本研究诱导获得14株12×马来甜龙竹和2株18×马来甜龙竹, 成功驯化和移栽14株12×马来甜龙竹。由于所得18×马来甜龙竹数量较少, 无法进一步分析其与不同秋水仙素处理方案下的相关性, 有待后续探索。与野生型植株相比, 12×马来甜龙竹的保卫细胞大小、叶片厚度和叶片大小均有所增加, 暗示其在能量利用及抗逆性等方面优于野生型。未来可结合多倍体培育、生理生化分析和分子生物技术等手段探索多倍体马来甜龙竹的抗逆性和推广潜力。综上, 本研究探索了基于竹子离体间接再生体系的多倍体育种技术, 为高效培育竹类多倍体新种质提供了新方案。

作者贡献声明

郭政: 实验数据采集与处理, 撰写论文初稿; 鲁海雯, 侯丹, 李翔宇: 实验技术指导和协助修改论文; 邵香君, 孔思梦: 协助规划实验方案, 参与论文讨论; 刘华倩: 图片处理; 林新春: 实验整体方案设计, 技术指导及论文修改完善。

参考文献

曹嘉雯 (2022). 软枣猕猴桃多倍体诱导及倍性鉴定. 硕士论文. 长春: 吉林农业大学. pp. 42–44.

陈松河, 马丽娟, 丁振华, 罗祺, 刘婧 (2018). 5种牡竹属笋用竹竹笋营养成分之比较. 竹子学报 **37**(4), 4–8, 19.

符勇耀, 蔡莉, 李丰耀, 杨文俊, 徐文姬, 姜思佳, 杨利平 (2024). 兰州百合多倍体离体诱导及其分子细胞鉴定. 草业学报 **33**(7), 172–181.

高志民 (2023). 竹类植物遗传育种研究进展. 世界竹藤通讯 **21**, 1–9.

郭恒琳, 勾晓婉 (2024). 作物倍性育种研究进展. 现代农业科技 (2), 20–26.

国家林业和草原局 (2021). 林业和草原统计年鉴2021. 北京: 中国林业出版社. pp. 10–11.

李高科, 陈琦, 孟鑫, 林海建 (2021). 秋水仙素加倍玉米单倍体胚性愈伤组织的初步研究. 植物遗传资源学报 **22**, 1606–1614.

李霖锋, 刘宝 (2019). 植物多倍化与多倍体基因组进化研究进展. 中国科学: 生命科学 **49**, 327–337.

李淑洁, 裴怀弟, 刘新星, 陈军, 江晶, 张朝巍 (2023). 植物染色体加倍的表型和遗传学效应研究进展. 寒旱农业科学 **2**, 1079–1084.

罗静, 周厚成, 王永清 (2005). 园艺植物化学诱变与抗性突变体筛选研究进展. 中国农学通报 **21**(8), 302–305.

石庆华, 刘平, 刘孟军 (2012). 果树倍性育种研究进展. 园艺学报 **39**, 1639–1654.

唐军荣, 李斌, 朱丽娜, 张俊, 何承忠, 李贤忠, 辛培尧 (2016). 滇杨多倍体苗期叶片形态及光合生理比较分析. 林业科学研究 **29**, 103–109.

陶抵辉, 刘明月, 肖君泽, 邓建平 (2007). 生物多倍体诱导方法研究进展. 生命科学研究 (S1), 6–13.

王江银, 徐婉宁, 苏洋, 张博 (2023). 干旱胁迫下紫花苜蓿和黄花苜蓿实生苗叶片形态及解剖结构变化. 华北农学报 **38**(S1), 228–236.

徐克凡, 彭忠明, 皮培尧, 周明兵, 汤定钦 (2024). 开花雷竹埋鞭繁育竹种间杂交育种的开花小苗. 分子植物育种 1–11. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20240131.1413.004.html.

徐鹏飞, 杨艳红, 张毓婷, 陈云, 汤定钦 (2020). 毛竹四倍体

诱导及初步鉴定. 林业科学 **56**(8), 55–62.

张俊芳, 刘庆华, 王奎玲, 刘庆超, 孙阳 (2009). 秋水仙素诱导青岛百合四倍体研究. 核农学报 **23**, 454–457.

张立荣, 陈南 (2009). 分离植物叶片上、下表皮新方法. 生物学通报 **44**(12), 49–50, 63.

张云洁, 蔡昌杨, 冉取丙, 高鸿烨, 朱强 (2021). 竹子遗传改良技术研究进展. 世界林业研究 **34**(5), 26–31.

周慧文, 冯斗, 严华兵 (2015). 秋水仙素离体诱导多倍体研究进展. 核农学报 **29**, 1307–1315.

Charoenphun N, Pakeechai K (2023). Effect of thickness on qualities of dried sweet bamboo shoots (*Dendrocalamus asper* Backer) products. *J Food Health Bioenviron Sci* **14**, 1–8.

Correia S, Braga A, Martins J, Correia B, Pinto G, Canhoto J (2023). Effects of polyploidy on physiological performance of acclimatized *Solanum betaceum* Cav. plants under water deficit. *Forests* **14**, 208.

Jin Y, Zhao Y, Ai S, Chen X, Liu X, Wang H, Han Y, Ma F, Li C (2022). Induction of polyploid *Malus prunifolia* and analysis of its salt tolerance. *Tree Physiol* **42**, 2100–2115.

Kong CK, Tan YN, Chye FY, Sit NW (2020). Nutritional compositions, biological activities, and phytochemical contents of the edible bamboo shoot, *Dendrocalamus asper*, from Malaysia. *Int Food Res J* **27**, 546–556.

Li XY, Zhang LY, Wei XC, Datta T, Wei F, Xie ZQ (2024). Polyploidization: a biological force that enhances stress resistance. *Int J Mol Sci* **25**, 1957.

Mangena P (2023). Impact of polyploidy induction for salinity stress mitigation in soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Plants* **12**, 1356.

Mustafa AA, Derise MR, Yong WTL, Rodrigues KF (2021). A concise review of *Dendrocalamus asper* and related bamboos: germplasm conservation, propagation and molecular biology. *Plants* **10**, 1897.

Qiao GR, Liu MY, Song KL, Li HY, Yang HQ, Yin YF, Zhuo RY (2017). Phenotypic and comparative transcriptome analysis of different ploidy plants in *Dendrocalamus latiflorus* Munro. *Front Plant Sci* **8**, 1371.

Sun HY, Wang JF, Li H, Li TK, Gao ZM (2023). Advancements and challenges in bamboo breeding for sustainable development. *Tree Physiol* **43**, 1705–1717.

Wang P, Mu X, Gao YG, Zhang J, Du J (2020). Successful induction and the systematic characterization of tetraploids in *Cerasus humilis* for subsequent breeding. *Sci Hortic* **265**, 109–216.

Zang QL, Liu QQ, Zhuge F, Wang XQ, Lin XC (2019). *In vitro* regeneration *via* callus induction in *Dendrocalamus asper* (Schult.) Backer. *Propag Ornamental Plants* **19**, 66–71.

Zhao HS, Sun S, Ding YL, Wang Y, Yue XH, Du X, Wei Q, Fan GY, Sun HY, Lou YF, Yang HM, Wang J, Xu X, Li LC, Yang KB, Xu H, Wang JL, Zhu CL, Wang SN, Shan XM, Hou YG, Wang Y, Fei BH, Liu X, Jiang ZH, Gao ZM (2021). Analysis of 427 genomes reveals moso bamboo population structure and genetic basis of property traits. *Nat Commun* **12**, 5466.

Zhou J, Guo F, Fu J, Xiao Y, Wu J (2020). *In vitro* polyploid induction using colchicine for *Zingiber officinale* Roscoe cv. ‘Fengtou’ ginger. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **142**, 87–94.

Efficient Induction and Identification of Polyploids in *Dendrocalamus asper*

Zheng Guo[1], Xiangjun Shao[2], Haiwen Lu[1], Dan Hou[1], Simeng Kong[1]
Xiangyu Li[1], Huaqian Liu[1], Xinchun Lin[1*]

[1]*Bamboo Industry Institute, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China*
[2]*Hangzhou Lin'an District Agricultural and Forestry Technology Promotion Center, Hangzhou 311300, China*

Abstract Due to the long flowering cycle, unpredictable flowering period and low seed setting rate of most bamboo plants, bamboo breeding has been a challenge in the research of bamboo plants. Polyploid breeding, as a common mean of plant breeding, is able to obtain progeny with excellent traits through artificial induction. In bamboo breeding, there are fewer studies on polyploid breeding. In this study, based on the existing regeneration system of *Dendrocalamus asper*, the embryonic calluses of *D. asper* were treated with colchicine using the liquid suspension method and the solid medium mixed culture method, respectively. The results showed that, based on the differentiation and browning rates of the calluses, the better results were obtained by treating the calluses with 50 mg·L^{-1} colchicine for 48–72 hours using the liquid suspension method. A total of 54 regenerated plants, including 7 control plants, and 16 chromosome doubled plants were successfully obtained from *D. asper* using flow cytometry to test all the regenerated plants. In terms of chromosomal doubling, treatment with 100 mg·L^{-1} colchicine for 48 h produced the highest number of chromosome-doubled plants with a polyploidy rate of 54.54%. Compared with 6-ploid plants, the 12-ploid plants presented larger and thicker leaves, and larger lower epidermal stomata, implying their superiority in stress tolerance physiology. This study provides an efficient polyploid breeding technique based on the *in vitro* indirect regeneration system of bamboo, and offers a new solution for breeding new polyploid germplasm of bamboo.

Key words *Dendrocalamus asper*, colchicine, callus, ploidy analysis, identification of polyploid

Guo Z, Shao XJ, Lu HW, Hou D, Kong SM, Li XY, Liu HQ, Lin XC (2025). Efficient induction and identification of polyploids in *Dendrocalamus asper*. *Chin Bull Bot* **60**, 246–255.

---

* Author for correspondence. E-mail: lxc@zafu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者简介

林新春, 教授, 博士生导师。长期从事竹类经营与利用的教学与研究工作。主持国家自然科学基金项目4项, 省部级项目10余项。以第一作者或通讯作者身份发表学术论文80余篇。授权国家发明专利10项。参与完成的科研成果获省部级二等奖以上奖励3项。