

小叶龙竹(*Dendrocalamus barbatus*)愈伤组织诱导及植株再生

王娟¹, 毕玮¹, 普晓兰¹, 陈芳², 彭桂莎¹, 杨宇明^{2,*}

¹西南林业大学, 国家林业局西南生物多样性保育重点实验室, 昆明650224; ²云南省林业科学院, 昆明650201

摘要: 以小叶龙竹种子为外植体, 通过研究MS培养基中不同植物生长调节剂浓度组合对外植体愈伤组织诱导和不定芽分化的影响以及不同配比对生根的作用, 建立了稳定的繁殖再生体系。试验结果表明愈伤组织诱导的最适培养基为MS+2,4-D 5.0 mg·L⁻¹; 不定芽分化的最适培养基为MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 0.25 mg·L⁻¹; 小苗的最适生根培养基为1/2MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.4 mg·L⁻¹。建立的繁殖再生体系将为进一步利用分子生物学技术对竹类植物进行遗传改良奠定基础。

关键词: 小叶龙竹; 愈伤组织诱导; 植株再生

Callus Induction and Plantlet Regeneration of *Dendrocalamus barbatus* Hsueh et D. Z. Li

WANG Juan¹, BI Wei¹, PU Xiao-Lan¹, CHEN Fang², PENG Gui-Sha¹, YANG Yu-Ming^{2,*}

¹State Forestry Administration Key Lab of Biodiversity Conservation in Southwest Region of China, Southwest Forest University, Kunming 650224, China; ²Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650201, China

Abstract: In this study, calli were induced from seed explants of *Dendrocalamus barbatus*. According to the research of the effects of different kinds and concentrations of plant growth regulator combination in MS medium on callus induction and bud differentiation and the influence of different regulator on rooting effect, a stable regeneration system was set up. The result indicated that the best medium for callus induction contained MS basal medium supplemented with 2,4-D 5.0 mg·L⁻¹; the feasible medium for adventitious shoots differentiation from callus was MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 0.25 mg·L⁻¹; and the best medium for seedling rooting was 1/2MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.4 mg·L⁻¹. The establishment of regeneration system lays a foundation for the further use of molecular biology techniques for the genetic improvement of bamboo plants.

Key words: *Dendrocalamus barbatus*; callus induction; plant regeneration

竹类是一次性开花植物, 开花周期长而不稳定, 开花后可能结实也可能不结实, 但都将死亡。因此, 人们还不能对竹类植物进行有规律的稳定的有性繁殖, 在大多数情况下散生竹是以竹鞭, 丛生竹以分蘖、埋秆、埋节或扦插等方式进行营养繁殖, 且在绝大多数情况下不知道这些个体或居群的生物学年龄和母本来源, 故难以像其他种子植物一样在个体水平上进行良种选育或遗传变异的实验研究。运用现代分子生物学手段对竹类植物开展选优、改良和育种技术研究, 不仅是从基因水平上获得适合产业化利用优良竹种的唯一选择, 也是研究其重要经济性状的基因调控机理的必然途径。竹类植物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(顾小平等2006; 张敏

等2007), 只有研究和建立完善的再生体系和稳定高效的遗传转化体系, 才能对竹类植物进行分子育种或基因改良。国内外自上世纪80年代以来不断有学者报道竹类植物组织培养的研究(Rao等1985; Rout和Das 1994, 1997), 概括起来有3种途径: 第1种是以芽繁芽实现竹种在试管里的大量繁殖(张光楚等1993; 何巨擘等2011); 第2种是通过愈伤组织途径, 获得再生植株(Jullien等1994; Saxena和Dhawan 1999; 阙国宁和诸葛强1994; 袁金铃等2009); 第3种是通过悬浮培养, 形成细胞团, 获得再

收稿 2012-01-30 修定 2012-02-28

资助 国家林业局948技术引进项目(2008-4-30)、云南省自然科学基金面上项目(2009CD073)和云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2010CI016)。

* 通讯作者(E-mail: yymbamb@163.com; Tel: 0871-5150250)。

生植株,但目前尚处于探索阶段(吴益民等2000;姚娜等2011)。只有通过竹类植物愈伤组织和悬浮细胞培养才能为通过体细胞诱变、细胞融合、外源有益基因的导入等途径培育新品种提供基础平台。

中国作为竹子生产与利用大国,但竹类的繁殖仍以分植法为主,在愈伤组织诱导和体细胞胚胎再生植株方面却鲜有成功的实例。小叶龙竹(*Dendrocalamus barbatus*)为禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusa)牡竹属,为大型合轴丛生竹,秆高15~18 m,粗10~25 cm,主要分布在云南南部、越南、缅甸和老挝北部,海拔360~1 100 m的热带和南亚热带区域(李德铎和薛纪如1988, 1989)。由于竹笋品质佳,秆材纤维长,材质细致,材性优良,是产区最重要优质的笋用、建材、编制和纸浆用竹;同时梢头弯或微下垂,竹秆光滑,生长迅速,两年便可成林,姿态优美,为优良的景观用竹,是我国南部热带地区最具发展前景的大型经济竹种之一。国内外对小叶龙竹的研究仅限于对染色体数目(李秀兰等2001)、沿海沙地小叶龙竹林凋落物分解及养分归还动态(郑郁善等2008)、广东小叶龙竹竹炭性能(张文标等2008)、小叶龙竹的纤维特性(杨清等2008)、小叶龙竹花序和果实的补充描述(杨汉奇和孙茂盛2011)以及通过种胚以芽繁育方式进行小叶龙竹的快速繁殖与离体保存(何巨擘等2011)等研究,小叶龙竹通过愈伤组织的诱导建立再生体系的研究尚未见报道。本研究以小叶龙竹种子为外植体,对诱导愈伤组织及其植株再生进行研究,以期竹类植物遗传改良、有益外源基因导入等现代分子生物学遗传改良方法提供稳定的遗传转化体系奠定基础。

材料与方法

1 试验材料

小叶龙竹(*Dendrocalamus barbatus* Hsueh et D. Z. Li)种子于2009年采自云南勐腊县。以种子为外植体,接种于诱导愈伤组织培养基中。

2 材料消毒

无菌材料是组织培养的关键,接种前对外植体材料进行3种消毒实验,筛选出最佳的无菌消毒法。处理1:用0.3%高锰酸钾溶液浸种消毒12 h;处理2:用30%漂白剂加2滴吐温浸种消毒1~2 h;处理3:

用30%漂白剂加2滴吐温浸种消毒4 h以上。处理后,放入超净工作台,用0.1% HgCl₂溶液并加2滴吐温不停振荡,使材料消毒10 min,取出后用无菌水反复清洗5次,用无菌滤纸吸干水分,接种于诱导培养基,2周后统计污染率。每50粒种子为1个处理,每个处理3次重复。

3 愈伤组织诱导

基本培养基选用MS、N6和B5这3种,均添加2,4-D 5.0 mg·L⁻¹。每组10瓶,每瓶10粒种子,接种于诱导愈伤组织培养基中进行暗培养,1个月后统计出愈数和出愈率。

在基本培养基筛选试验完成后,为筛选适宜的生长调节剂,设计诱导培养基3组,即以MS为基本培养基,分别添加2,4-D 3.0、4.0和5.0 mg·L⁻¹。每组10瓶,每瓶10粒种子。

以上培养基均加入蔗糖30 g·L⁻¹,水解酪蛋白250 mg·L⁻¹,琼脂5 g·L⁻¹,pH 5.8。在22~25 °C下暗培养。

4 愈伤组织的分化

设计培养基3组:(1) MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 0.25 mg·L⁻¹; (2) MS+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 0.50 mg·L⁻¹; (3) MS+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+KT 1.00 mg·L⁻¹,培养基均加入蔗糖30 g·L⁻¹,水解酪蛋白250 mg·L⁻¹,琼脂5 g·L⁻¹。pH 5.8,培养温度为(25±3) °C,光照时间为14 h·d⁻¹,光照强度为20~30 μmol·m⁻²·s⁻¹。

5 生根与移栽

把长至1.5 cm以上的芽从中切离后接种到50 mL生根培养基中进行生根诱导,诱导培养基为1/2MS,附加6-BA 0.5 mg·L⁻¹、NAA 1.0 mg·L⁻¹以及IBA浓度分别为0.1、0.2、0.4和0.8 mg·L⁻¹,另加蔗糖20 g·L⁻¹和琼脂6 g·L⁻¹,将pH值调至5.8,每瓶接种5个芽。10瓶为1个处理,3次重复。5周后,统计生根的芽数。

试管苗生根后20 d,把培养瓶打开放到自然光下炼苗5~7 d后,先移入河沙的基质中,最高移栽成活率可达80%,1~2个月后换盆到红壤:河沙:腐殖土为1:1:1和2:1:0.5的基质中,60 d后统计其成活率与生长状况。

实验结果

1 不同消毒剂灭菌效果

试验结果见表1:处理1效果不好,污染率高达

表1 不同消毒剂灭菌效果比较

Table 1 Comparison of different sterilizing treatments

| 处理 | 消毒方法 | 接种数/粒 | 污染数/粒 | 污染率/% | 萌发数/粒 |
|----|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.3%高锰酸钾溶液浸种消毒12 h | 150 | 83 | 55.3 | 25 |
| 2 | 30%漂白剂加2滴吐温浸种消毒1~2 h | 150 | 14 | 9.3 | 84 |
| 3 | 30%漂白剂加2滴吐温浸种消毒4 h以上 | 150 | 8 | 5.3 | 8 |

接种在MS+2,4-D 5.0 mg·L⁻¹培养基中。

55.3%; 处理2较好, 既能保持种子生活力又能控制污染率在10%以内; 处理3虽然污染率很低, 但多数种子丧失生活力, 其萌发率仅为5.3%。因此, 对小叶龙竹种子最佳消毒处理为用30%漂白剂加2滴吐温浸种消毒1~2 h, 放入超净台后, 用0.1%的HgCl₂溶液消毒10 min, 取出后用无菌水反复清洗。

2 愈伤组织诱导情况

2.1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

合子胚接种在附加2,4-D 5.0 mg·L⁻¹的MS、N6和B5这3组基本培养中(图1-A), 20 d转接1次, 60 d

后进行观察, 3组培养基的诱导率差异较大, B5较易褐化, 出愈率仅为5%, 且结构松散, 不易分化出芽; N6出愈率为22%, 愈伤组织水渍, 易褐化; MS培养基出愈率最高, 达69%, 且愈伤组织致密, 颗粒状, 能分化出芽, 因此, 是最适宜小叶龙竹愈伤组织诱导的培养基。

2.2 不同2,4-D浓度对愈伤组织诱导的影响

以MS培养基附加3种浓度2,4-D作为初始培养基进行愈伤组织诱导实验, 4 d即可见到有愈伤组织开始产生, 培养至20 d后, 依据其颜色、形状、

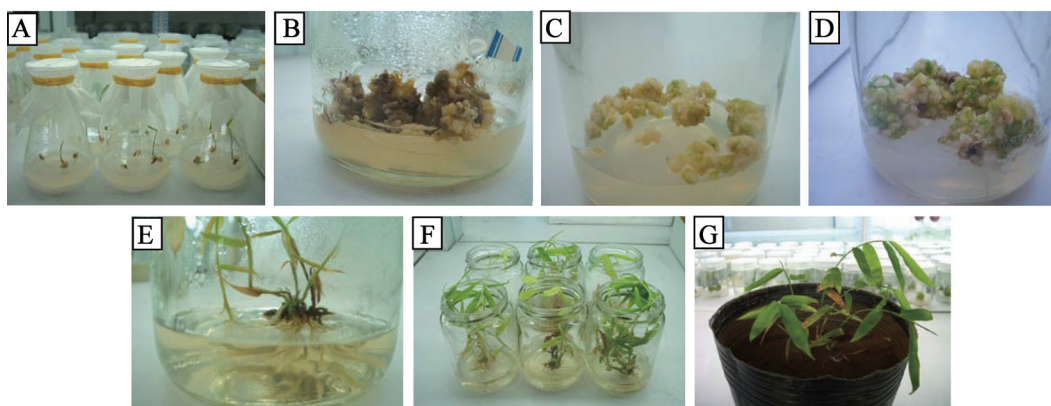


图1 小叶龙竹愈伤组织诱导及植株再生

Fig.1 The callus induction and plant regeneration of *D. barbatus*

A: 合子胚诱导愈伤组织; B: 褐化后的I型愈伤组织; C: 增殖II型愈伤组织; D: 增殖III型愈伤组织; E: 生根; F: 炼苗; G: 移栽成活幼苗。

结构及发展趋势可将诱导产生的愈伤组织分为3种类型。I型愈伤组织, 结构致密粘性、生长缓慢、质地柔软, 含水率高, 颜色多为灰白色或者褐色, 无固定形状, 一般以团状存在, 非常容易褐化, 在经过3~5 d的培养后基本都会褐化(图1-B)。II型愈伤组织, 旺盛分裂、结构疏松, 白色透明的细小颗粒状, 或是含水率极高, 柔软呈絮状, 非常容易分散。此类愈伤组织容易继代培养, 但几乎丧失分化能力, 为分化能力较差的愈伤组织(图1-C)。III型愈伤组织, 生长稍快、复杂多样、色泽鲜亮,

基本为浅黄色或浅黄绿色, 表面较粗糙, 质地坚硬, 由致密的颗粒结节状愈伤组织组成, 含水率低, 在继代的过程中用镊子拨弄可以分散为颗粒状, 长期继代仍能分化, 培养过程中基本不会褐化, 能分化出芽(图1-D)。

愈伤组织的增殖培养主要选用介于II型和III型的愈伤组织。实验显示以5.0 mg·L⁻¹ 2,4-D浓度出愈最快, 出愈率最高, 且愈伤组织质量良好, 在暗培养条件下, 4 d即可产生愈伤组织。值得注意的是培养20 d后, 3种不同浓度2,4-D处理中, 5.0

mg·L⁻¹ 2,4-D浓度的出愈率最高, 达82%, 且产生的愈伤组织属于III型愈伤组织, 色泽浅黄色, 质地坚硬, 大部分为致密的颗粒结节状愈伤组织, 长期继代仍能分化, 表现出诱导的愈伤组织结构和颜色等均优于3.0和4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D浓度诱导的愈伤组织(表2)。但培养时间超过一个月时部分愈伤组织变黄, 粘性大, 且增殖幅度下降。从其出愈率来看,

诱导的前10 d, 5.0 mg·L⁻¹ 2,4-D浓度的出愈率为30%, 到第20天为82%, 增幅达172.6%, 但从第20天到第30天, 出愈率仅从82%增加至87%, 仅增加5.0%。因此, 诱导愈伤组织以MS+2,4-D 5.0 mg·L⁻¹为宜, 但培养20 d左右必须减少2,4-D的用量至MS+2,4-D 3.0 mg·L⁻¹, 才能保证诱导出的愈伤组织保持旺盛的生长状态, 避免褐化。

表2 2,4-D对小叶龙竹愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of 2,4-D on callus induction of *D. barbatus*

| 2,4-D/mg·L ⁻¹ | 愈伤组织诱导率/% | | | 愈伤组织诱导情况及性状描述 |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|
| | 10 d | 20 d | 30 d | |
| 3.0 | 12 ^{Cc} | 72 ^{Cc} | 83 ^{Bb} | 出愈慢, 偏黄白色, I型 |
| 4.0 | 23 ^{Bb} | 75 ^{Bb} | 84 ^{Bb} | 出愈慢, 多数愈伤质量好, 但少数愈伤粘性大, 偏灰色, II型 |
| 5.0 | 30 ^{Aa} | 82 ^{Aa} | 87 ^{Aa} | 出愈快, 多数愈伤质量好, 少数愈伤粘性大, 偏黄绿色, III型 |

同一列数字旁大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$), 小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

3 2,4-D、6-BA和KT不同浓度对比对愈伤组织分化的影响

分别在培养基中添加2,4-D、6-BA和KT的不同浓度配比, 其分化结果见表3。对愈伤组织诱导不定芽, 培养20 d左右就可见不定芽出现, 40 d后3个浓度的2,4-D对愈伤组织分化能力存在较大差异, 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 0.25 mg·L⁻¹的愈伤组织的分化率最高, 达24%, 是增殖后愈伤组织进行分化的最佳培养基。

实验中我们得到黄绿色的愈伤组织, 但只有很少植株形成, 于是用2种培养方式来比较愈伤组织的再生能力。一种方式即按常规方法, 每次都继代于相同的分化培养基; 另一种方式是在分化培养基和MS空白培养基上交替培养。继代培养3个月后比较, 交替继代培养的愈伤组织分化为不定芽的比例为40%以上, 每次都继代于相同分化培

养基的愈伤组织芽的分化率仅为23%, 交替继代培养可以在一定程度上较长时间保持愈伤组织的再生能力。

4 根的诱导与移栽

将从生芽接种在4组培养基上, 1周后, 在丛生芽基部产生白色的根原基并开始形成根, 培养至20 d可看到不定根较为集中发生。值得注意的是, 当大多数根尚未长出时茎叶呈现逐渐变黄的趋势, 但当根长出2 cm长时, 茎叶又逐渐转绿(图1-E)。生根过程较短, 不到1个月就可以长出大量而粗壮根系, 呈辐射状展开, 直径大于0.1 cm。不定根生长很快, 30 d左右可达8~10 cm, 每个芽丛的根系可达10~15条。

从培养的各个环节看, 小叶龙竹完成丛生芽诱导后, 根的诱导较容易, 仅需培养3周左右, 平均根长达5~8 cm, 便可以炼苗。但不同的植物生长调节剂水平对根的生长有显著影响, 生根实验结果见表4。随着IBA浓度增加, 根逐渐加粗, 但当IBA浓度超过0.4 mg·L⁻¹, 芽丛的生根率降低, 并逐渐衰退, 主要表现为, 产生的芽无法展叶, 而已展叶的植株体会随着IBA浓度的提高而生长势减弱, 叶片枯黄, 最后萎焉。

因此, 综合生根率、生根量以及根的形态和植株的状态, 从试验中得出小叶龙竹的最适生根培养基为1/2MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.4 mg·L⁻¹。

表3 不同浓度的2,4-D、6-BA和KT对愈伤组织再生能力的影响

Table 3 Effects of different concentration of 2,4-D, 6-BA and KT on regeneration of callus

| 2,4-D/ mg·L ⁻¹ | 6-BA/ mg·L ⁻¹ | KT/ mg·L ⁻¹ | 接种 数/个 | 分化 数/个 | 分化率/ % |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 0.5 | 1.0 | 0.25 | 50 | 12 | 24 |
| 1.0 | 1.0 | 0.50 | 50 | 9 | 18 |
| 2.0 | 2.0 | 1.00 | 50 | 5 | 10 |

表4 不同浓度6-BA、NAA和IBA对再生植株生根的影响

Table 4 Effects of different concentration of 6-BA, NAA and IBA on regenerated plantlet inducing root

| 处理 | 6-BA/mg·L ⁻¹ | NAA/mg·L ⁻¹ | IBA/mg·L ⁻¹ | 20~30 d的生根情况 |
|----|-------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0.5 | 1.0 | 0.1 | 长出5~6条根,长4 cm以上,粗壮结实,呈辐射状生长 |
| 2 | 0.5 | 1.0 | 0.2 | 长出5~8条根,长4 cm以上,粗壮结实,呈辐射状生长 |
| 3 | 0.5 | 1.0 | 0.4 | 长出6~10条根,长可达5 cm以上,粗壮结实,呈辐射状生长 |
| 4 | 0.5 | 1.0 | 0.8 | 长出5~6条根,长可达5 cm以上,幼苗叶片枯黄,最后萎蔫 |

进入炼苗阶段时,挑选苗高达到5 cm以上、生根整齐、苗体健壮的植株移出培养室,不打开瓶盖先放在自然散射光下炼苗2~3 d,待小苗适应温度、光照等的变化后,再逐渐掀开瓶盖,放置3~5 d便可移栽。

为使根系得到较好的发育,生根后的试管苗炼苗7 d左右(图1-F),将其移栽到纯河沙基质中,每周1次用稀释1 000倍的MS培养基大量元素的母液进行叶面喷洒施肥,1个月后移栽成活率可达80%。1个月后将成活健壮的幼苗换盆到红壤:河沙:腐殖土=1:1:1和2:1:0.5基质中的成活率分别是67.30%和54.20%(图1-G)。

讨 论

以小叶龙竹合子胚为外植体,通过在MS、B5和N6这3种基本培养基中添加不同种类及浓度的植物生长调节剂,对小叶龙竹进行愈伤组织培养和植株再生的研究,从而得到小叶龙竹愈伤组织的诱导、增殖、分化、生根各个阶段所需要的最佳培养基和培养条件以及炼苗和移栽的适宜方法。试验显示,淡黄致密的愈伤组织有着较强的植株再生能力,但也有的愈伤组织虽然为淡黄色、结构致密的颗粒状,在分化过程中仅有绿色芽点出现,却不能分化出完整的植株。因此,在试验中还需要利用不同水平的2,4-D、水解酪蛋白、6-BA、KT等进行处理(王海波等1996)。用植物生长调节剂刺激竹类植物愈伤组织朝着所需要的理想状态发展,一方面能使诱导的愈伤组织具有较强的分化能力,同时也是解决竹类植物悬浮细胞培养的关键技术之一。

参考文献

顾小平, 苏梦云, 岳晋军, 吴晓丽(2006). 几种丛生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究. 林业科学研究, 19 (1): 75~78
何巨擘, 程治英, 郭振华, 曾千春(2011). 小叶龙竹的快速繁殖与离体保存. 云南农业大学学报, 26 (3): 359~363

李德珠, 薛纪如(1988). 中国牡竹属的研究(之二). 竹子研究汇刊, 7 (4): 1~19
李德珠, 薛纪如(1989). 中国牡竹属的研究(之二). 竹子研究汇刊, 8 (1): 25~43
李秀兰, 林汝顺, 冯学琳, 祁仲夏, 宋文芹, 陈瑞阳(2001). 中国部分丛生竹类染色体数目报道. 植物分类学报, 39 (5): 433~442
阙国宁, 诸葛强(1994). 黄竹细胞悬浮培养和原生质体分离. 林业科学研究, 7 (1): 44~47
王海波, 魏景芳, 葛亚新, 石西平, 范云六(1996). 小麦愈伤组织状态调控与原生质体培养. 中国农业科学, 29 (6): 8~14
吴益民, 边红武, 王君晖, 黄纯农(2000). 竹子悬浮细胞系的建立和组织培养试管苗移栽观察. 竹子研究汇刊, 19 (1): 52~56
杨汉奇, 孙茂盛(2011). 马来甜龙竹和小叶龙竹花序和果实的补充描述. 植物分类与资源学报, 33 (2): 161~163
杨清, 周承贵, 苏光荣, 许丛恒, 王正良, 郭永杰, 韩蕾(2008). 小叶龙竹的化学成分与制浆性能. 南京林业大学学报(自然科学版), 32 (1): 65~68
姚娜, 岳晋军, 顾小平, 杨凯, 李潞滨(2011). 空竹悬浮细胞系的建立. 核农学报, 25 (1): 43~47
袁金铃, 顾小平, 李潞江, 岳晋军, 姚娜, 郭广平(2009). 孝顺竹愈伤组织诱导及植株再生. 林业科学, 45 (3): 35~41
张光楚, 陈富枢, 王裕霞(1993). 麻竹离体快速繁殖技术的研究. 竹子研究汇刊, 12 (4): 7~15
张敏, 卢义山, 蒋泽平, 黄利斌, 倪竞德(2007). 竹子组织培养研究现状与应用前景. 江苏林业科技, 34 (5): 41~46
张文标, 傅金和, 周光益, 李文珠(2008). 2种广东丛生竹炭性能的研究. 竹子研究汇刊, 27 (1): 46~49
郑郁善, 荣俊冬, 陈礼光, 张玲玲, 夏海涛, 张志欣(2008). 沿海沙地小叶龙竹林凋落物分解及养分归还动态. 福建农林大学学报(自然科学版), 37 (5): 487~490
Jullien F, Tran K, Van T (1994). Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* 'Golden goddess'. Plant Sci, 98: 199~207
Rao IU, Rao IVR, Narang V (1985). Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. Plant Cell Rep, 4: 191~194
Rout GR, Das P (1994). Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. Plant Cell Rep, 13: 683~686
Rout GR, Das P (1997). *In vitro* plant regeneration via callogenesis and organogenesis in *bambusa vulgaris*. Biol Plant, 39 (4): 515~522
Saxena S, Dhawan V (1999). Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 18: 438~443