



竹子生物技术育种研究进展及发展前景

李雪平^{1*} 高志民¹ 岳永德¹ 高健¹ 蔡春菊¹ 齐浩²

(1. 国际竹藤网络中心 北京 100102; 2. 河北乐亭县林业局 063600)

摘要: 生物技术在竹子育种上有重要意义。从组织培养、分子标记、开花人工诱导和基因工程育种4个方面总结了生物技术在竹子研究中的应用情况,并探讨了将来可能的发展前景。

关键词: 竹子; 育种; 生物技术; 应用研究

The Research Progress of Biotechnology on Bamboo Breeding

Li Xueping; Gao Zhimin; Yue Yongde; Gao Jian; Cai Chunju; Qi Hao

Abstract: Biotechnology is significant to bamboo breeding. The paper summarizes the applications of tissue culture, molecular marker, flower induction and gene engineering to bamboo research and discuss the prospects of development.

Key Words: bamboo; breeding; biotechnology; application research

竹子是一种重要的非木质资源,生长快,用途广,不仅具有良好的经济价值,也是森林生态系统的重要组成部分。世界上有竹类植物70余属,1200余种,而中国就有400多种^[1]。由于竹子开花周期长,获取种子困难,目前竹种的繁殖主要以无性繁殖为主。生物技术是20世纪兴起的一项新技术,在植物育种上得到了广泛应用,但在竹子研究上的应用还不是很深入,主要包括组织培养、分子标记、开花人工诱导和基因工程育种几个方面。但从目前取得的成果看,生物技术在竹子育种上的应用前景非常广阔。

1 竹子生物技术育种研究进展

1.1 组织培养

植物组织培养(plant tissue culture),是利用植物体离体组织、器官或细胞具有的再生能力,在无菌适宜的条件下进行人工培养,使其发育成完整的植株的技术,是植物细胞全能性的表现。1902年, HaberLancdt 提出了离体细胞、器官、组织在无菌条件下培养,能体现整个植物的特性、潜能。1953年 Muir 用烟草的愈伤组织产生了单细胞和小细胞群,并可继代繁殖。1969年, Street 成功地进行了茎尖、叶、花、果实的培养。在此基础上,

又作了许多植物愈伤组织的根原基和苗原基的发生、细胞分化、静止组织的细胞分裂和各类植物次生代谢产品合成的研究。目前,组织培养技术已经得到了广泛应用,包括植物的快速繁殖、培养无病毒植株(分生组织一般不受病毒侵染,故可用茎尖培养产生无病毒植株,如马铃薯)、种质资源保存、药用植物和其它有价值的天然产物的工厂化生产以及育种工作等方面。

由于竹子获取种子困难,主要以无性繁殖为主。组织培养与传统的无性繁殖方法相比,具有成本低、速度快、增殖效率高等优点,而且不受季节限制。目前,组织培养技术在竹子研究上的应用已有多篇报道^[2-5]。国外比较系统地开展竹子组织培养工作始于80年代,而中国90年代才开展此项工作的。印度、中国台湾、新加坡、马来西亚、泰国等国家和地区先后对刚竹属(*Phyllostachys*)、牡竹属(*Demdrocalamus*)、麻竹亚属(*Subgen. Sinocalamus*)、赤竹属(*Sasa*)、秦竹属(*Thysostachys*)和刺竹属(*Bambusa*)等20余属70多个竹种开展了组织培养研究^[6]。以上研究主要通过了3种途径,第1种是以秆芽作为外植体,诱导产生芽和根,形成竹苗的途径,这个途径没有经过脱分化的过程。第2种是以成熟胚、茎尖、幼嫩的小花、再生小植株等为外植体,通过愈伤组织途径,获得再生植株。第3种是以分离

* 基金项目:国际竹藤网络中心青年基金“竹子木质素合成调节基因的克隆及功能的初步研究”。

的竹子原生质体为外植体,通过悬浮培养,形成细胞团,但尚无竹子原生质体培养成再生植株的报道。张光楚等^[7]通过以芽繁芽实现了竹子在试管里的大量繁殖。张桂和^[9]用麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)嫩枝叶眠芽的茎尖离体培养形成试管苗,实现了麻竹的离体快速繁殖。对试管苗的生根和移栽技术也作了系统的研究,繁殖的试管苗成苗已应用于生产。王光萍等^[9]以金镶玉竹(*Phyllostachys aureosulcata* f. *spectabilis*)等11种观赏竹为试验材料,采用新萌发的嫩芽,在MS培养基上成功获得7种观赏竹的再生植株,无菌苗移栽成活率达90%以上。阙国宁等^[10]以丛生竹种 *Dendrocalamus membranaceus* 和 *Bambusa arundinacea* 带芽的节为外植体,经愈伤组织诱导,再分化,得到了完整植株。后来又以牡竹属黄竹(*Dendrocalamus membranaceus* Munro)的竹节及无菌苗根颈为外植体,在MS培养基上诱导愈伤组织,然后进行悬浮培养,获得了悬浮细胞系,利用悬浮细胞系和无菌叶片获得大量原生质体,活力可达80%^[4]。吴益民等^[11]曾用2,4-D / NAA/BA和2,4-D / KT 3种生长调节剂组合对孝顺竹(*Bambusa glaucescens*)顶芽和节侧芽外植体进行愈伤组织的诱导,其中由2,4-D诱导的孝顺竹愈伤组织在摇床上暗培养,建立了悬浮细胞系。

组织培养成功的大部分是丛生竹,散生竹的器官再生能力弱,组培比较困难。Internet(<http://202.119.208.18/nlbamboo/>)报道了南京林业大学对具有较高观赏价值的竹类植物如平安竹、菲白竹、菲黄竹、铺地竹、紫竹、金镶玉竹、花秆小佛肚竹、香竹、爬竹等9种竹子的快速繁育技术及相关基础理论进行了研究,使散生竹组织培养技术和扦插繁殖技术获得了新的突破,同时揭示了竹类植物通过先诱导芽,再由芽产生不定根的现象。目前已经成功获得了部分散生竹的组织培养苗。

作为一项新兴技术,人工种子也在生产上获得应用。人工种子的概念是1978年在加拿大举行的第四届国际植物组织、细胞培养会议上首次提出来的,是指通过植物组织培养技术获得具有胚芽、胚根、胚轴等结构的植物胚状体,并且用适当的方法将胚状体包裹起来,用以代替天然种子进行繁殖的一种结构。Internet上曾经报道,1988年Finstrom培育出青皮竹(*Bambusa textilis*)等丛生竹的人工

种子,由藻酸盐胶夹包裹,运输方便。目前国际上已在萝卜、苜蓿、芹菜、花椰菜和莴苣等植物上获得成功。

1.2 分子标记

DNA分子标记技术的研究始于1980年,广泛应用于遗传图谱构建、生物遗传育种、系统学研究、基因定位等方面,主要可分为以分子杂交为基础的分子标记技术,如RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism);以PCR为基础的分子标记技术,如RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、SSR(Simple sequence Repeat);以酶切和PCR为基础的分子标记技术,如AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)。其中,RFLP是第1代分子标记技术,主要特点是结果稳定可靠,但步骤多,周期长,检出的多态性较少。RAPD属于第2代分子标记技术,操作简单,多态性检出率高,但重复性差。AFLP和SSR属于第3代分子标记技术,它具有以上前两代的优点,是目前应用最多的技术。

DNA分子标记技术在竹子研究上的应用主要有种质资源鉴定、遗传多样性分析、种间亲缘关系分析、起源与系统进化研究、竹子分类、遗传图谱构建及重要性状鉴定等几个方面^[12]。Watanabe et al.^[13]和Kobayashi^[14]用RFLP方法对亚洲和世界竹类植物的分类和系统演化进行了研究。吴益民等^[15]以RAPD技术对孝顺竹(*Bambusa glaucescens*)、凤尾竹(*Bambusa glaucescens* var. *riviereorum*)、绿竹(*Bambusa oldhamii* (Munro))和白绿竹(*Bambusa multiplex* (Loureiro) Reaueschell) 4个品种用20种已知序列的引物进行PCR分析,构成RAPD指纹图谱,进行了相似性分析。在分类学研究方面,杨光耀等^[16]采用RAPD技术分析了苦竹类植物中产于日本的大明竹(*Pleiolblastus gramineus* (Bean) Nakai)、长叶苦竹(*Pl. simonii* (Carr.) Nakai)和中国产的苦竹(*Pl. amarus* (Keng) Keng f.)、宜兴苦竹(*Pl. yixingensis* Chu&Chao)、斑苦竹(*Pl. maculata* (McCl.) Chu&Chao)之间的遗传相似性,结果表明苦竹与宜兴苦竹关系密切,而形态分类上将中、日产苦竹分成两类没有得到RAPD分析的支持。随后,他们又用RAPD分子标记探讨了倭竹族(*Shibataea* Nakaiemend keng f.)的属间关系,发现基于形态学研究结果建立的刚竹亚族



(*Phyllostachydinae* Keng f.)和倭竹亚族(*Shibataeinae*)或唐竹亚族(*Sinobambusinae* Z. P. Wang)和倭竹亚族(*Shibataeinae* Soderstrom & Ellis)的观点没有得到RAPD分析的支持^[17]。

1.3 竹子开花诱导

自然界中的竹子开花周期长,且花期难以预测,开花后即死亡,种子获取困难,而竹子试管苗可提前开花。印度人最早开始了竹子开花诱导方面的研究。1987年,Raos在德里大学首次观察到竹子在人工试管培养下开花的现象^[18]。随后,其他国家如中国、日本等也陆续开展了这方面的研究。到目前为止,有9种竹子可以试管开花,其中3种可以形成种子^[1]。

竹子能否被诱导开花与所选材料、培养基成分及生理年龄等有关。张光楚等^[19]研究了麻竹试管苗的开花现象,开花迟早跟无性系的繁芽能力有关,繁芽能力强的无性系较早开花,繁芽能力弱的无性系较迟开花。细胞分裂素(BA、KT)在竹子组织培养过程中的作用不是完全相同的,BA有利于花芽分化,而KT则有利于营养生长的改善。杜凡^[20]对15年来在云南观察到的开花竹子61种、23属进行开花结实现象和类型分析,指出竹子的开花结实现象可以分为全体成片开花、零星开花;开花至死、开花不死、开花至死与开花不死并存;开花后结实、开花后不结实等类型。结果首次发现,竹子的开花、结实类型与竹种是否为野生种或栽培种密切相关,也与竹子属级的分类群密切相关。采用竹子开花的环境内因说可以较好地解释竹子开花的种种现象,即竹子生长到生理成熟年龄是导致竹子开花的主要内因,环境因素可以在一定程度上提早、延迟或终止竹子开花,但必需在竹子的生理年龄近于成熟时这种影响才起作用^[20]。

开花后能否结实及结实率的高低也是人们需要关注的问题,除了受竹种本身开花生物学特性影响外,还与培养基成分及培养物理条件有关。由于试管花花粉发育不同步,因此结实率较自然界中要低,可以通过改变培养基成分、控制光周期及改变容器内相对湿度等方法达到对试管苗开花及结实的影响。

1.4 遗传转化和基因工程育种

植物的遗传转化是指将外源基因与质粒载体构建成重组DNA,然后通过一定的途径导入受体细

胞,从而获得能使外源基因稳定表达的转基因植株的技术。在植物育种上的应用主要包括以下几个方面:一是改良品质,二是提高抗逆性,包括生物逆境和非生物逆境,三是改善发育状况^[21]。目前,基因工程在农作物育种上已有明显成效,很多农作物通过基因工程获得了优良品种,如大豆、玉米、水稻、马铃薯等。例如在农作物中导入Bt(苏云金芽孢杆菌,*Bacillus thuringiensis*)毒蛋白基因,获得了抗虫转基因的棉花、玉米、水稻、马铃薯等。另外,在树木上还获得了抗虫转基因杨树。田波等^[22]从诱导开花的麻竹幼穗中克隆到一个与开花相关的MADS基因,将其转入拟南芥后,在CaMV35S启动子下表达,转基因拟南芥表现出叶卷曲、植株矮小、开花时间提前、花聚生于花序顶端等性状。但利用基因工程进行竹子育种还几近空白。

2 发展前景及展望

2.1 组织培养的应用

竹子组织培养有广泛的应用前景。一是实现竹子快速、大量繁殖,在竹产业化方面优势明显。二是为科学研究提供实验材料。如用试管苗对竹子抗逆性(抗旱、抗盐、抗病等)生理指标测定,可以方便地进行试验设计,较传统的田间试验大大节约人力、物力和财力,缩短试验时间,还可以减少环境因子的影响。三是进行基因工程育种。组织培养的成功可以使我们将有用的基因导入需要改良的竹子材料中,再经过一系列的筛选,最后获得转基因植株,进而得到功能改良的竹子新品种。

2.2 遗传多样性研究

目前,DNA分子标记技术在竹子研究上的应用刚刚起步,有待于进一步的发展,尤其是在遗传图谱的构建、基因定位和濒危竹种保护方面,DNA分子标记将是一个有力的工具。遗传图谱的构建在竹类植物上还是一个空白,应用分子标记技术构建遗传图谱,进行基因定位将极大地推动竹子的遗传育种工作。在濒危竹种保护方面,分子标记也将会发挥重要作用。物种濒危的一个重要因素就是遗传多样性缺乏,给竹种的收集、保存和保护工作带来很大的困难,利用现代分子标记技术对濒危竹种的遗传多样性进行研究就显得非常必要。



2.3 开花机理研究

由于自然条件的限制,竹子开花的生理及分子机理的研究几乎为空白。人工诱导竹子开花的成功为竹子开花的形态结构、生理生化和分子遗传的研究开辟了一条新途径。通过诱导竹子开花并进行杂交是克服竹子结种困难的一条有效途径,这将为竹子的种子繁殖提供有利的条件。了解竹子开花特性,认识竹子开花机理,就可以人工诱导竹子开花,进行杂交育种,将有可能获得具有杂种优势的竹种,这对于竹类种质资源的保存和有效利用具有重要意义。

总之,随着生物技术的飞速发展,使得开展竹子基因工程育种成为可能。吴益民等^[1]曾提出竹亚科的基因工程育种技术较有效的途径可能为:竹子外植体—愈伤组织—悬浮细胞系—基因转化—愈伤组织—植株再生。如前面所述,竹子的组织培养技术已经有了长足的发展,在组织培养技术的基础上,通过基因工程培育抗逆和抗病虫的竹子新品种将是竹子育种的一个发展方向,前景非常广阔。

参考文献

- 1 江泽慧.世界竹藤.沈阳:辽宁科学技术出版社,2002
- 2 Huang L C and Murashige T. Tissue culture investigation of bamboo. I. Callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. Bot. Bull. Academia Sinica, 1983, 24: 31-52
- 3 Yeh M L and Chang W C. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). Theor Appl Genet, 1986, 73: 161-163
- 4 厥国宁, 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
- 5 Lin C S and Chang W C. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Reports, 1998, 17: 617-620
- 6 卓仁英. 竹子生物技术育种研究进展. 浙江林学院学报, 2003, 20(4): 424-428
- 7 张光楚, 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
- 8 张桂和. 麻竹笋尖培养及离体快繁研究. 海南大学学报, 1997, 15(4): 298-303
- 9 王光萍, 丁雨龙. 几种观赏竹种组织培养研究. 竹子研究汇刊, 2002, 21(2): 5-9
- 10 阙国宁, 诸葛强. 竹子愈伤组织培养与植株再生. 竹子研究汇刊, 1991, 10(4): 79-80

(11-22 本刊略) ■

日本与中国四川的慈竹纤维合作项目

近日,日本臣建筑株式会社董事长吉田善浩一行来到四川省乐至县,就慈竹资源以及慈竹加工项目进行了实地考察,并签订慈竹产品出口日本的协议。

在乐至县有关领导的陪同下,日本客商到该县慈竹纤维加工生产企业,详细了解企业生产经营状况,实地考察慈竹原料生产基地,对该县丰富的慈竹资源以及慈竹加工能力和产品表现出浓厚兴趣。目前,日本客商已计划投资3 000多万元启动慈竹纤维出口生产线建设项目。预计该项目正式投产后,每年可向日本出口慈竹纤维5.5万t,年产值超过2亿元人民币,每年可直接带动农民增收7 000万元以上。

——中国林业信息

国外学者获准国际竹藤网络中心重点实验室开放基金

为促进中国与INBAR其它成员国之间竹藤研究的国际交流与合作,国际竹藤网络中心(ICBR)决定将重点实验室2006年度开放研究基金授予3位申请人。他们来自加纳和尼泊尔。ICBR/INBAR联合遴选专家组通过综合考虑各申请人研究项目及与中心宗旨和目标的相关性,初步选出了3位申请人,并经重点实验室学术委员会审定通过。这3位学者将在近期来华,在该中心开展为期两个月的研究工作。

——国际竹藤网络中心

欢迎赐稿 欢迎订阅