

文章编号: 1000-5692(2000)04-0436-05

竹子开花人工诱导与逆转研究现状及前景

谢寅峰, 张春霞, 雨龙

(南京林业大学 竹类研究所, 江苏 南京 210037)

摘要: 竹类植物是重要的禾本科经济植物。由于开花周期长且难以预测, 大多数竹种终身一次开花并导致死亡, 具有自然结实率低等独特的开花习性, 使得竹子开花及相关研究受到了很大的限制。通过竹子开花的人工诱导与逆转的研究, 不仅可以人工获取难得的竹子种子, 更为竹种分类鉴定、杂交遗传育种和开花机理等多方面研究工作提供了良好的基础, 其理论意义和应用价值都十分重大。迄今为止, 印度和比利时等国研究人员已在至少 8 个竹种中成功诱导了竹子的试管开花, 成功诱导开花逆转的研究也有了报道。通过已建立的实验模式系统, 对影响诱导试管开花及逆转的因子进行了初步的研究, 并在开花生理和杂交育种等方面进行了研究尝试。可以相信, 随着研究的扩展与深入, 必将为整个竹类植物的研究带来巨大的推动作用。表 1 参 19

关键词: 竹子开花; 诱导; 逆转; 生物学特性; 组织培养; 细胞分裂素

中图分类号: S718.43; Q945.6⁺4 **文献标识码:** A

1 研究进展

1.1 竹子开花的人工诱导

迄今为止, 人工诱导竹子开花成功的报道都是在离体培养的条件下, 通过组织培养的手段(即试管开花)完成的, 试管外诱导成功尚未见报道。早在 1946 年, 就有了菟丝子试管开花的报道^[1], 但直至 80 年代中后期, 随着竹子组织培养技术的发展, 竹子试管开花才引起人们的注意并开始这方面的研究。印度科学家无疑是该领域的先行者。1987 年, Raos 在德里大学首次注意到竹子的试管开花现象。1990 年, 试管开花的研究取得了突破。印度国家化学实验室植物组织培养小组的 Nadgauda 等首次报道了印度刺竹(*Bambusa arundinacea*)、勃氏甜龙竹(*Dendrocalamus brandisii*)和牡竹(*D. strictus*) 3 个竹种试管内人工诱导开花现象^[2]。至今, 印度、比利时、中国、日本等都有了成功诱导试管开花的报道^[2~11], 并已在至少 8 个竹种中获得成功(表 1), 有的报道还获得了有效试管种子。目前, 印度等国科学家正在对引起试管开花的因子及开花模式进行深入的研究。

竹子试管开花诱导是否成功与所选用竹种、外植体类型、培养基成分及培养条件都有直接的关系。从现有资料看, 所用竹种都是组织培养较易进行, 微繁已获成功的丛生竹种, 并且同一竹种不同基因型结果也相差很大。张光楚等对麻竹(*D. latiflorus*)的 20 个无性系在相同培养条件下继代微繁,

收稿日期: 2000-04-17; 修回日期: 2000-08-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39900115)

作者简介: 谢寅峰(1966-), 男, 浙江余杭人, 讲师, 硕士, 从事植物生理生化研究。

唯 17 号无性系诱导了开化, 而且 17 号无性系在其生长的最初阶段就表现出极强的芽分化能力^[3]。所采用的外植体大多是从播种幼苗及其继代培养物中获取, 处于生长的幼龄阶段。如: 有的采用播种幼苗的胚芽鞘切段^[2], 有的采用播种幼苗节继代培养诱导产生的体细胞胚^[4], 也有用花组织作为初始外植体^[3]。在适当培养条件下, 这些外植体首先诱导形成芽丛或小苗, 再诱导产生花芽的分化, 尚未发现从愈伤组织、离体组织器官或胚状体直接诱导出花芽的报道。用成熟组织器官作为外植体诱导试管开花难度较大, 但 Chapman 等在一种刚竹 (*Phyllostachys* sp.)、小佛肚 (*B. ventricosa*) 及 1 种香竹 (*Chusquea* sp.) 等几个竹种中取得了成功, 尽管诱导频率极低^[9]。

培养基成分对诱导竹子试管开花起着非常关键的作用。所有的报道都采用了 MS 或经过调整的 MS 为基本培养基, 有的添加了有机附加物, 如椰子乳等, 但起关键作用的是植物生长调节物质的种类及比例, 尤其是细胞分裂素。在已经获得成功的培养基中都至少含有一种或多种细胞分裂素类物质, 如: 6-BA, Zip, Ads, ZT, BAP 的单一或不同的混合组合, 缺少细胞分裂素, 诱导就难以取得成功。Mohini 等研究了不同种类细胞分裂素 (6-BA, Zip, Ads, KT, ZT) 对诱导印度刺竹试管开花的效果, 发现当培养基中只加一种细胞分裂素时, BA 是唯一有效的; Zip 与 BA 结合使用, 起到协同增效作用; 而 ZT 与 BA 结合使用则起拮抗作用^[7]。Rao^[8]及 Nadgauda^[2]的研究表明 BAP 单独使用能诱导印度刺竹等竹种开花。可见, BA 及 BAP 是诱导竹子试管开花最重要的 2 种细胞分裂素。此外, 一些研究表明培养基中添加椰子乳对诱导开花也起着促进作用, 这可能与椰子乳中含有玉米素核苷等细胞分裂素类物质或其前体有关。但是否细胞分裂素就是诱导开花的决定因素, 能否在整体条件下起到同样效果, Nadgauda 等用不同浓度的 6-BA 对版纳甜龙竹 (*D. hamiltonii*)、印度刺竹及牡竹 3 个盆栽竹种进行处理, 结果表明是无效的, 进一步的试验尚在进行之中^[6]。

近来研究表明, 培养基 pH 值对诱导试管开花及试管花的发育有一定的影响。诱导成花的最适 pH 值在 5.8 左右, 但花的发育却在较低一些 pH 值下较为有利。Nadgauda 等研究的一个重要发现是: 经过 2 周培养, 当培养基初始 pH 值从 5.6 降至 4.2 时, 花序生长量与培养基 pH 值下降成明显的正相关^[6]。

试管花的发育及能否产生有效种子或结实率的高低, 除了受竹种本身开花生物学特性影响外, 还受培养基成分及培养物理条件的影响。产生有效种子一般必需符合以下条件: ①有活力的配子; ②有效传粉; ③成功的受精作用; ④胚及胚乳得到良好的发育。Nadgauda 等对印度刺竹的试管花与自然花从形态及发育上进行了比较, 发现尽管试管花在外形上要小得多, 约为自然花的 1/4, 但在结构上与自然花没有多大的差别, 具有完整的内稃、外稃、浆片、六枚雄蕊, 雌蕊包括子房、花柱及三裂羽状柱头^[9]。在自然条件下, 雄蕊和雌蕊同时成熟, 内稃、外稃打开利于传粉, 但在组培条件下, 部分试管花内外稃不能打开从而阻碍了传粉的进行, 其花粉生殖力只有 31%, 而自然花为 93%。自然条件下, 花粉发育基本上同步进行, 花药开裂通常在早晨, 历时 3~4 h, 其时间长短取决于大气湿度、温度及光照强度, 一般随大气温度和光照强度的增加而延长, 随大气湿度的增加而下降, 而试管花花粉发育不能同步进行, 电镜扫描显示其花粉壁发育存在不协调性, 因此自然花结实率要高一些, 而试管花结实必需要在同一培养容器内许多花同时开放条件下才易发生。目前, 一些试验正在进行之中, 如通过改变培养基成分、控制光周期、降低培养容器内空气相对湿度及将培养物暴露在正常大气环境条件下等手段以研究对试管花发育及结实的影响。

1.2 竹子开花的人工逆转

竹子开花人工逆转的研究相对较少。Chapman 等研究小组近年来对此进行了一些研究^[6~11]。他们建立了 2 种开花逆转实验模式系统: 一种是通过组织培养的手段, 在试管内进行; 另一种栽种在温室中进行, 所选用模式竹种为神农箭竹 (*Fargesia murielae*), 主要由于该竹种近年来在西欧开花频繁, 并且属于终生一次开花结实死亡类型。研究表明, 开花逆转与环境及营养条件有关。将开花植株置于温室中, 并提供适宜的水分和养料, 能持续开花 4 a 以上, 竹鞭上没有新的枝芽产生, 但靠近衰老部分花序的休眠芽可以发育成新的花芽。如果将开花植株置于较高温度和较低光照强度条件的温室中, 经过 2 个月以后, 可以观察到介于营养芽和生殖芽之间的多种结构类型, 当花序轴上的腋芽转变成营

养枝而不是所预期的小穗时,就能观察到开花结构的转绿现象。开花逆转可以在多种形式和水平上看到:如花序的转绿、花序轴上休眠芽发育成营养枝和茎秆基部的一些芽发育成细嫩的枝条。后一种形式的逆转常在具有细小竹鞭种类开花后再生过程中观察到。

表1 国内外竹子试管开花研究报道

Table 1 A list of reports of bamboo flowering in tissue culture

竹种	外植体及发生方式	结果	培养基	作者、年份
印度刺竹 <i>Bambusa arundinacea</i>	以实生苗的胚芽鞘切段为外植体			
牡竹 <i>Dendrocalamus strictus</i>	诱导芽丛,再切取单个芽丛培养	诱导开花并结实	MS+BAP (0.5)	Nadgauda R S, 1990
甜龙竹 <i>Dendrocalamus brandisi</i>	诱导			
印度刺竹 <i>Bambusa arundinacea</i>	从体细胞胚诱导产生植株,进而	体细胞胚胎发	MS+BA; BAP	Rao I V R, 1990
牡竹 <i>Dendrocalamus strictus</i>	诱导开花	生; 试管开花		
龙头竹 <i>Bambusa vulgaris</i>				
版纳甜龙竹 <i>Dendrocalamus hamiltonii</i>	以播种苗节段为外植体诱导出芽,进而诱导花芽	微繁; 试管开花	MS+BA	Chambers S M, 1991
龙头竹 <i>Bambusa vulgaris</i>	从体细胞胚再生植株带芽茎段培	体细胞胚胎发	1/2MS+IBA (0.25)	
牡竹 <i>Dendrocalamus strictus</i>	养诱导产生花芽	生; 试管开花	+Ads (0.5)+GA ₃ (0.5)	Rout G R, 1994
龙竹 <i>Dendrocalamus giganteus</i>				
麻竹 <i>Dendrocalamus latiflorus</i>	以播种小苗芽为外植体经多次继代培养形成的芽丛中诱导产生花芽	试管开花	MS+BA (2); MS+KT (0.5)+BA (1)	张光楚等, 1993
印度刺竹 <i>Bambusa arundinacea</i>	从实生苗芽继代培养产生的芽进行诱导	试管开花	MS+BA (前期培养); 调整MS+IAA (1.0)	Yoshihito Toda, 1995
绿竹 <i>Bambusa oldhamii</i>	以花组织为外植体诱导产生胚状体,胚状体发育成小苗出现花芽	体细胞胚胎发	MS+Kinitin (2)+2,4-D (3)	Wen Ho-Chang, 1998
印度刺竹 <i>Bambusa arundinacea</i>	实生小苗	试管开花	MS+BA; MS+BA+Zip; MS+BA+Ads; MS+BA+ZT	Nadgauda R S, 1997
印度刺竹 <i>Bambusa arundinacea</i>	实生小苗节段	试管开花	MS+6-BA (2.2 μ m)	Mohini Joshi, 1997

试管内竹子开花逆转的过程与温室中相似。Chapman等以神农箭竹花组织为初始外植体首先诱导出试管花,在含有琼脂的固态培养基中,小花进一步发育,但在液态培养基中经过振荡培养后可以从基部休眠芽或部分花序中看到开花逆转现象。另外,他们还在一种竹草类植物(*Lithachne humilis*)中进行了试验。该竹种比较特殊,主要分布于美洲等地,雌雄异花但同花序,雄花位于花序轴顶端,雌花为不对称花,位于花序轴侧部。在正常情况下,经诱导和培养后花序轴上的腋芽一般发育成雌花,但在液态培养基中腋芽就可以发育成完全的小植株^[6]。

2 研究意义及前景

竹类植物作为重要的禾本科经济植物,以其用途广、繁殖快、资源丰富和经济效益、社会效益、生态效益显著而越来越受到世界各国的重视。然而竹子开花周期长且难以预测,大多数竹种终身一次开花并导致死亡,有效结实率低。这些特性不仅给竹种分类鉴定、杂交遗传育种和开花机理等研究工作带来了困难,竹种的大面积开花枯死还导致了严重的经济损失和生态环境的破坏。因此,竹子开花的人工诱导与逆转的研究,不仅具有较强的理论价值,其现实意义和应用前景也十分广阔。

竹子开花的奇特现象一直受到许多研究者的注意。几十年来,中国和日本等国的研究人员对部分竹种尤其是刚竹属竹种的开花生物学特征及开花周期性问题进行了一定的研究和探索^[11~13]。在开花

生理方面, 上田和吴贯明等对糖氮比与竹子开花的关系进行了研究^[16~17]; 折谷和熊文愈等分别对桂竹 (*Phyllostachys bambusoides*) 和雅竹 (*P. vivax*) 开花过程中内源激素的变化作过测定^[18, 19], 但这些研究都是在整体条件下进行的。由于自然条件下有性繁殖系统的缺乏及难以建立可控的实验系统, 使之局限于少数竹种且难以深入。竹子开花生理及调控机理的研究几乎仍为空白^[9]。然而通过近年来建立的开花人工诱导与逆转的模式系统, 为竹子开花形态发育、生理生化和分子遗传等方面的研究提供了良好的基础, 并已取得了一些初步成果。如植物生长调节物质的种类及其比例在诱导竹子开花中所起的作用; J. Gielis 等通过开花逆转与环境及营养条件关系的研究, 提出了竹子开花的自由基理论^[11]。他们发现竹子开花后叶片中超氧歧化酶和过氧化物酶活力呈现升高, 而过氧化氢酶活力出现下降, 经过人工逆转后则出现相反趋势。这些保护酶活力的变化表明了开花后植物内防御能力的下降及自由基含量的上升, 从而加速竹子的发育及衰老。这可以用来解释为何在逆境条件下 (强光照、干旱和营养不良等) 可以加速一些竹子的开花发育及衰老, 而在适宜的环境条件下又可以诱导逆转。现代分子生物学观点及已有研究表明, 植物开花是由其内部基因控制的, 温度、光照和水分等环境因子可以在一定程度上影响基因的表达及调控从而影响开花, 然而外界条件又是如何影响内部因子目前尚不清楚。J. Gielis 等的自由基理论也许为今后研究竹子开花的内外因子间生理联系的研究提供了一些线索, 这方面的研究也是今后竹子成花调控机理研究的一个重要方面。随着现代生物学技术的发展, 尤其是分子生物学技术在开花研究中的应用, 对竹子开花机理的研究也必将深入到分子水平, 如通过人工诱导开花及开花突变体, 采用基因标签 (包括内源、外源转座子标签和 T-DNA 标签)、染色体步行法及差示筛选法等分子生物学技术, 鉴别和克隆与竹子花的分化和发育有关的问题异型基因, 了解这些调控基因及其下游目标基因的调控作用等。这方面有许多的工作有待完成, 其最终目标是要达到竹子开花人工调控的目的。

由于大多数竹种开花周期长, 近缘竹种同时开花机率甚小, 再加上普遍存在花粉败育和自然授粉率低等因素, 期望通过在自然条件下进行有性杂交选育新品种几乎不太可能。竹子试管诱导开花的成功, 标志着竹子有性杂交工作可以在试管里进行, 尽管这方面的尝试目前尚未获得成功, 仍使得竹子育种工作前景诱人。此外, 以竹子开花人工诱导与逆转研究为基础, 为竹子分类学和竹子开花致死机理等方面研究也带来了美好的前景。目前, 竹子开花人工诱导与逆转的研究, 还局限于少量的丛生竹种, 所取外植体也以幼龄态为主, 实验模式系统尚待进一步完善, 但随着研究的扩展与深入, 必将为整个竹类植物的研究带来巨大的推动作用。

参考文献:

- [1] Luo S W. Cultivation of excised stem tip of dodder in vivo [J]. *Amer J Bot*, 1946, 33: 295-298.
- [2] Nadgauda R S, Parasharami V A, Mascarenhas A F. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos [J]. *Nature*, 1990, 344 (6 264): 335-336.
- [3] 张光楚, 陈富枢, 王裕霞. 麻竹离体快速繁殖技术的研究 [J]. 竹类文摘, 1993, 6 (1): 1-7.
- [4] Rout G R, Das P. Somatic embryogenesis and in vitro flowering of 3 species of bamboo [J]. *Plant Cell Rep*, 1994, 13: 683-686.
- [5] Wen H C, Chin C W, Wen H C, et al. In vitro flowering of albino bamboo regenerants derived from an eleven-year old embryogenic cell line [J]. *Acta Hort*, 1998, 461: 433-438.
- [6] Chapman G. *The bamboos*. London: Academic Press, 1997. 163-177.
- [7] Mohini J, Nadgauda R S, Joshi M. Cytokinins and in vitro induction of flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd [J]. *Cur Sci*, 1997, 73 (6): 523-526.
- [8] Rao I V R, Rao U L. Mass propagation of bamboos from somatic embryos and their successful transfer to the forest [J]. *Bamboos Cur Res*, 1990, 167-172.
- [9] Nadgauda R S, John C K, Parasharami V A, et al. A comparison of in vitro with in vivo flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea* [J]. *Plant Cell Tis & Org Cult*, 1997, 48 (3): 181-188.
- [10] Chambers S M, Heuchj H R, Pirrie A. Micropropagation and in vitro flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* [J]. *Plant Cell Tis & Org Cult*, 1991, 27 (1): 45-48.
- [11] Gielis J, Goetghebeur P, Debergh P, et al. Physiological aspects and experimental reversion of flowering in *Fargesia murielae* [J]. *Syst & Geogr Plants*, 1999, 68 (1-2): 147-158.

- [12] Daniel H J. Why bamboos wait so long to flower[J]. *Ann Rev Ecol Syst*, 1976, 7: 347-391.
- [13] Kawamura S. On the periodical flowering of the bamboo[J]. *Jap J Bot*, 1927, 3: 335-349.
- [14] 张文燕, 马乃训. 竹类植物花期生物学特性[J]. *林业科学研究*, 1989, 2(6): 596-600.
- [15] 吴贯明. 刚竹属竹种的生殖[J]. *南京林业大学学报*, 1988, 12(1): 60-67.
- [16] Ueda K. Studies on the physiology of bamboo[J]. *Bull Kyoto Univ Forest*, 1960, 30: 167-170.
- [17] 吴贯明. 雅竹开花过程中体内生长调节物质和营养物质的测定[J]. *南林科技*, 1975(2): 28-31.
- [18] Oritani T. Studies on nitrogen metabolism in crop plant[J]. *Crop Sci Jap*, 1971, 40: 34-39.
- [19] 熊文愈. 雅竹开花和更新问题的调查和研究. *南京林产工业学院学报*, 1979, 3(1): 14-21.

Current situation and prospects of study on artificial induction and reversion of bamboo flowering

XIE Yin-feng, ZHANG Chun-xia, DING Yu-long

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Bamboo is a versatile species with great economic value. But it normally has a long flowering cycle and the cycle is unpredictable, most species flower and produce seeds only once then die in its lifetime, this peculiarity has hampered the study of flowering behavior and many other aspects in bamboo. The study of artificial induction and reversion of bamboo flowering not only provides a possibility to acquire bamboo seeds annually, but also an attempt at the cross breeding, typology, and investigating of flowering mechanism in bamboo. So far, bamboo flowering in tissue culture has been induced successfully in more than eight species based on published reports from India, Belgium, China, Japan etc, and artificial reversion of bamboo flowering been reported. Based on the model systems of the induction and reversion of bamboo flowering, the actor of influencing induction and reversion of bamboo flowering in tissue culture has been studied, the attempt in hybridization, investigating of flowering mechanism are in progress. It is no doubt that the bamboo research will make great progress with the advance in the study of bamboo flowering.

Key words: bamboo flowering; induction; reversion; biological characteristic; tissue culture; cytokinins