

棕榈藤生物技术研究进展*

邹文涛 尹光天 孙冰 李荣生 杨锦昌

(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)

摘要 开展棕榈藤的研究和开发对缓解我国制藤工业原料短缺和维持热带及亚热带生物多样性等具有十分重要的意义。棕榈藤分子生物学及生物技术研究工作的开展相对较晚,但在近几年取得了极大的进展。文章从组织培养、分子标记、花药培养等生物技术方面阐述棕榈藤的研究概况及应用现状,并提出该领域存在的问题及发展方向。

关键词 棕榈藤 生物技术 组织培养 分子标记

中图分类号:S792.11 **文献标识码**:A **文章编号**:1006-4427(2006)04-0100-05

棕榈藤(Rattan)属于棕榈科(Palmae)省藤亚科(Calamoideae)省藤族(Calameae)藤本植物,是热带及亚热带森林中重要的非木质资源,具有很高的开发和利用价值,资源拥有国十分重视棕榈藤的研究和发展^[1]。棕榈藤的去鞘藤茎(藤条)表皮乳白色、柔韧、抗拉强度大,是编织和制作家具的优良材料,与竹家具相比,具有不易发霉,美观素雅等优点,因此长期走俏国际市场^[2]。多种藤种的果实和嫩梢具有很高的营养价值,可供食用^[3]。黄藤(*Daemonorops margaritae*)茎梢含有17种氨基酸,其中必须氨基酸占其总氨基酸含量的35.54%。黄藤属植物的果实还可以萃取药品——“麒麟血竭”,它具有活血止血的作用,开发利用价值很大^[4]。

中国具有发达的制藤工业,藤制品出口占国际市场的10%,每年藤产品贸易总额进出口创汇达2亿多美元,并以每年10%的速度增长^[5]。然而,由于热带、亚热带大面积天然林遭到严重破坏以及人为对天然棕榈藤的过度采收,从而导致了棕榈藤资源生物多样性及野生棕榈藤资源锐减,种子资源缺乏,制约了大规模的人工种植,加上东南亚各产藤国相继颁布了禁止原藤及其半成品出口法令,严重制约了我国制藤工业的发展^[1,6]。随着植物生物技术的发展,尤其是细胞工程和基因工程理论上和实践上的突破,为快速繁殖优良、改良品种及培育新品种提供了一条崭新的途径,也为棕榈藤的生物技术研究提供了物质基础。

1 组织培养技术研究

1.1 研究历史

棕榈藤组培研究始于1982年加拿大IDRC资助的菲律宾棕榈藤研究项目。随后,菲律宾、新加坡、马来西亚和泰国开展了马尼拉藤(*Calamus manillensis*)、玛瑙省藤(*C. manan*)、西加省藤(*C. caesioides*)的组培繁殖研究,开拓了以组织培养方法繁殖优良藤种的途径^{[1]521}。90年代是棕榈藤组培技术获得重大突破的时期,外植体材料、培养基选择及组培快繁的商品化研究均取得较好的进展。1991年中国首次从云南省藤(*C. yunnanensis*)和倒卵果省藤(*C. obovoideus*)的茎尖诱导培养成完整小植株^[7];其后张方秋等^[8]完成了黄藤、白藤(*C. tetradactylus*)和单叶省藤(*C. simplicifolius*)的组培快繁技术研究。此后,在这些研究的基础上,中国的棕榈藤研究迅速发展,中国林科院热带林业研究所和中国科学院云南植物所先后完成了11个藤种的50个家系种苗快繁工艺研究。

1.2 外植体

1.2.1 外植体的选择 棕榈藤的幼胚、成熟胚、根茎、萌蘖芽、茎尖、甘蓝状幼叶、根尖、绿色幼果都可以作为外植体。常用外植体为幼胚、成熟胚,其次是种子萌发苗的根尖、根尖部分以及2~3个月实生苗的根尖、分蘖^[9-10]。一般植物营养繁殖能力与“幼态”因素有关,植物材料愈幼嫩营养繁殖愈容易。因此,为培养成优良母株的无性系,往往需要在采集前采取根蘖条或萌蘖芽,促使外植体的“幼态化”。有研究表明,棕榈藤外植体再生能力从强到弱的顺序为:幼胚>成熟胚>种子苗根尖>萌蘖芽>茎尖>甘蓝状幼叶>根^{[1]526}。

* 本文是国家“十一五”攻关课题:棕榈藤资源培育与高效利用关键技术与示范。

1.2.2 外植体消毒 外植体表面消毒十分关键,已成为组培成功的制约因子之一。棕榈藤外植体表面消毒由易到难的顺序为:幼胚<成熟胚<萌蘖芽<茎尖<种子萌发幼芽<根尖<叶原基<甘蓝状幼叶,其中幼胚最易,无菌率高达100%,甘蓝状幼叶最难,无菌率仅达33.9%。总之,棕榈藤外植体消毒的时间依材料的性质、成熟度、采集时间及地点不同而异,根据具体情况对待。

1.3 培养基成分

1.3.1 基本培养基 选择合适的培养基是棕榈藤组培成功的重要环节之一。棕榈藤培养所采用的基本培养基有MS及改良MS、Y3、SH、ER、B5、H、White、Nitsch and Nitsch、Hartney and Barker等。Mecedes U. Garcia等(1985)^[11]就多个藤种对基本培养基的反应进行了研究,结果表明:大多数藤种以MS培养基优于其它种类培养基,外植体易于产生愈伤组织。大多数研究人员认为,高盐MS以及改良的MS培养基使用频率较高、效果较好。

1.3.2 激素 庄承纪等^[7]的研究表明,省藤(*C. yunnanensis*)茎尖增殖过程中,MS培养基不添加任何激素茎尖就难以发生增殖,其它藤类组培研究也证实了这一点。在组培的不同阶段,所需的激素种类和浓度不尽相同。经常使用的生长素类有2,4-D、IAA、NAA,细胞分裂素有KT、BA。

由于棕榈藤的特殊的遗传性,决定了其激素种类和配比较常规高。张方秋等^[8]曾以增殖率与增殖量作为棕榈藤芽的增殖力综合评价指标。在添加0.5 mg/L IBA的基础上,单叶省藤的增殖率与单位芽形成数量随BA由1.0 mg/L逐步提高,至8.0 mg/L达到最大增殖率27%,增殖量最多(3.2个芽/块)。如云南省藤、黄藤、长嘴黄藤(*Daemonorops jenkinsiana*)和杖藤(*C. rhabdocladus*),在BA<2.0 mg/L即可增殖;而梅氏省藤(*C. merrillii*)与美丽省藤(*C. ornatus*)胚增殖芽需10 mg/L BA, *Calamus rannulosus*增殖需5~10 mg/L BA+5 mg/L KT, *Daemonorops curanii*增殖需要10 mg/L BA+5 mg/L KT,莫利士藤(*Daemonorops mollis*)增殖需要5 mg/L BA;白藤、倒卵果省藤、短叶省藤(*C. egregius*)、异株藤(*C. dioicus*)等需要4 mg/L BA。以MS为基本培养基,培养省藤茎尖,60 d后观测,结果以BA 2.0 mg/L最好。

激素含量对芽苗的生根培养影响至关重要。曾炳山等^[17]认为,NAA对于诱导单叶省藤、短叶省藤、黄藤芽苗生根最有效。云南省藤、倒卵果省藤与小白藤对0.5~2.0 mg/L IBA更敏感。Azia mohd. Yusoff^[12]从西加省藤愈伤组织诱导的苗在MS+ 1×10^{-8} ~ 1×10^{-7} NAA液体培养基中直接诱导生根,Doreen Goh^[13]在生根培养基添加5.0~15.0 mg/L NAA或IAA,玛瑙省藤牙苗的生根率可达75%,程治英等^[14]研究发现长鞭藤(*Calamus flagellum*)的生根培养基为MS+0.53 mg/L NAA。曾炳山等^[15]研究发现异株藤的生根培养基为1/2MS(大量元素减半)+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA。由于藤种不同,培养所需细胞分裂素与生长素种类和浓度均有很大差异。

1.3.3 附加成分 附加成分是指在含有一定激素配比的培养基中添加某些营养物质、吸附物质及抗氧化物质。在离体培养条件下,组培产生的内源维生素满足不了自身代谢需要,必须添加外源维生素。Mecedes U. Garcia等^[16]在诱导梅氏省藤、美丽省藤愈伤组织时,在White或Nitsch培养基上外植体形成愈伤组织更快,但要在MS培养基上才开始形成胚。有关棕榈藤的研究表明,甘氨酸低于1.0 mg/L时,短叶省藤的芽减少。棕榈藤植物组培常常使用椰汁并得到满意效果。Mecedes U. Garcia^[17]在诱导梅氏省藤、美丽省藤、莫利士藤、*Daemonorops curanii*与*Calamus rannulosus*胚增殖时添加250 ml/L椰汁获得了良好的效果,在诱导愈伤组织时,经常在MS、HB、W、NN培养基中添加30 g/L的活性炭,利于愈伤组织形成。

1.4 移植技术

棕榈藤组培苗成活率受移栽季节、藤种、移栽基质、组培苗质量等影响。广州地处亚热带,温度与湿度相对较高,一般3~6月移栽比较适宜,小苗成活率均在90%以上。曾炳山等^[18]对黄藤、短叶省藤、单叶省藤、白藤和异株藤组培苗的移植研究表明,试管苗的质量是移栽成活与否的关键,试管苗的苗高对移栽成活影响最大,根长的影响次之。适宜移植的苗木规格为:苗高大于4.0 cm,根长大于4.0 cm,并带须根,介质以珍珠岩为最优,移植的成活率最高、组培苗的根系生长量大、净增根条较多,分别达95.0%、26.1 cm/株、0.8条/株,泥炭土和细沙也是可选基质,移植成活率大于90%。移植后管理同样重要,喷洒有效杀菌剂和施肥,是保证藤苗成活的重要环节,1.25 g/L多菌灵可以有效控制病菌;结合施1.0 MS大量元素液或1 g/L复合肥液作为营养补充液,有利于幼苗移植成活。

1.5 离体保存

离体保存是将植物一部分器官、组织、细胞甚至染色体或核酸片断进行长期保存。随着离体保存技术的发展,藤类植物也开展了种质离体保存,而离体保存的研究国外还未见有报道^[19]。中国林科院热带林业研

究所开展了短叶省藤^[19]、单叶省藤和黄藤^[20]的种质(以离体丛芽作为试验材料)离体保存研究,其结果表明,预定保存模式为:增殖培养2~3代,保存培养15~18个月的循环模式比较科学。其后陈和明等开展了黄藤^[21]、白藤花粉^[22]和单叶省藤保存技术和萌发条件的研究,研究结果表明黄藤花粉、白藤花粉、单叶省藤花粉保存条件为:在45℃烘干箱下分别干燥1~5,2~5,2~4 h,储存容器抽真空,在-20℃以下贮藏,保存190 d后,保存率高达40%左右。

2 分子技术研究

随着同工酶分析和现代分子技术的发展,遗传多样性的研究进入了新的领域。同工酶分析成本低、操作也容易,适用于大量样品的研究,目前在遗传多样性研究中占据重要的位置。Wickneswari^[23]采用9个酶系统对*C. manan*的5个种子来源进行变异研究,发现他们之间有一些变异。杨华等^[24]通过对黄藤和单叶省藤天然种群遗传多样性的RAPD分析,发现两藤种的遗传多样性比较丰富,各种群间的遗传变异非常小,大部分遗传变异来源于群体内,尖峰岭种群遗传多样性最为丰富,可以作为重点保护的种群。

Prakash等人^[25]采用流式细胞光度法研究棕榈藤细胞核DNA的含量,并且利用RAPD来鉴定是否可能在两种性别植株中存在遗传标记。但未见具体报道。李发根等^[26]以单叶省藤和黄藤为材料,首次进行了棕榈藤基因组DNA的提取和RAPD实验体系优化的研究,建立了重复性强、稳定性好的反应体系和扩增程序,这为棕榈藤分子生物学研究提供了技术支持。杨华等^[27]在利用ISSR技术对黄藤进行分子生物学研究过程中,对影响PCR扩增效果的一些因素如模板DNA浓度、Mg²⁺浓度、dNTPs浓度、TaqDNA聚合酶浓度、引物浓度以及退火温度等指标进行筛选和优化,获得用于黄藤ISSR、PCR分析最适宜的PCR反应条件。

在自然界中,棕榈藤会发生自然杂交,在同时存在*Calamus gamblei*和*C. pseudotenius*的地方,有一些植株表现为这2个种的中间型^[28]。棕榈藤有许多种类几乎是同时开花的,这就有机会对品质好的藤种植株进行人工种间杂交,从中发现杂种优势。因而需要系统地研究各藤种的开花习性和种间、种内的任何不相容的可能性。众多学者建议,通过同时种植一个无性系、种源或种的雄性和另一个无性系、种源或种的雌性植株,大规模生产种内或种间杂交种子。同时指出,棕榈藤植物只有到了开花才能分辨出性别,其种子园只有在植株开花后弃除不需要的植株后才能建立。杨华等^[29]利用RAPD和SCAR标记对单叶省藤进行性别鉴定,获得了一条略大于500 bp的雄性特异片段,利用这两种标记解决了早期鉴定单叶省藤性别难的问题,该成果属于国际领先水平,也为其它棕榈藤种类的性别鉴定提供了有利的参考。

3 棕榈藤发展及展望

3.1 加速棕榈藤种质资源的收集、保存、评价和利用

丰富的种质资源及遗传多样性是品种改良、物种创新及新品种选育的重要物质基础。因此,应当充分利用现有藤种资源,并通过多种渠道有针对性地继续收集新资源,对其进行评价研究^[30]。目前面临的困难主要是不能准确鉴定采集的棕榈藤的种名称及其种质资源的收集、保存、评价所采用的方法。由于东南亚各产藤国相继颁布了禁止原藤及半成品出口法令,导致棕榈藤生物技术研究进展比较缓慢。国内外学者通过检测远缘杂种或体细胞中特异性RAPD标记的有无来鉴定品种的真实性,也可以通过品种(组合)的RAPD指纹档案,来鉴定品种的纯度,为种子质量的检测提供保证。如Castigliane S等(1993)^[31]利用RAPD标记技术对杨树品种进行了分类和鉴别,结果表明用这一技术能有效地区分那些形态学方法无法鉴别的不同种源及无性系。苏晓华等(1995)^[32]成功利用12个引物对柳树(*Salix matsudana*)16个无性系基因组分别进行了检测。因而加快棕榈藤生物技术研究进程,通过选育优良品种,大力开展棕榈藤藤人工林的集约化培育,必将缓解我国制藤业原料短缺的现状。

3.2 重点开展单倍体育种的研究

花药培养技术是迄今为止创造纯合基因型的最有效手段,因此开展棕榈藤花药培养的研究,将为棕榈藤育种研究带来崭新的发展。花药培育的单倍体植株在遗传上非常稳定,不发生性状分离,不存在显性基因掩盖隐性基因的现象,表现型和基因型一致^[33]。所以,花药培养能极早地稳定分离后代,缩短育种年限,提高工作效率^[34]。由于单倍体在突变选择和加速杂合体纯合化过程中的重要作用,导致植株在性状上表现为植株高大、结实率高、抗病性强等特性^[35]。因此,探讨花药培养技术,将为优质商品藤种的选育及棕榈藤单倍体育种奠定良好的基础,对加快棕榈藤资源培育、缓解我国制藤工业原料短缺问题,具有十分重要的现实意义。由于开展藤种单倍体育种研究较少,加之藤种的基因型迄今为止未进行过详细的研究,因此开展此项研究将面临一定的困难。

3.3 加大转基因技术应用和遗传图谱的构建

随着转基因技术在其它植物上的成功应用,棕榈藤转基因技术必将在此研究基础上向前大大发展。棕榈藤属于攀援植物,其攀援器官分两类,一类是叶轴顶端延伸成的具刺纤鞭,另一类是着生在叶鞘的纤鞭。两种纤鞭都着生了反折的短刺或爪状刺,而且叶鞘上通常密披粗刺。棕榈藤带刺的这种特性给育种工作带来很多不便,通过研究了解藤种是否存在控制刺发育的基因,从而使其基因沉默,便可以获得少刺或无刺变种。针对目前藤产量低,通过不断研究筛选,选择出与优质、高产有关的重要性状基因紧密连锁的标记,同时开展重要数量性状分析,将会极大地促进棕榈藤栽培和加工业的快速发展。遗传图谱的构建是研究林木基因组结构和功能的基础,可为控制林木重要经济性状、生物胁迫和非生物胁迫的基因进行数量性状和质量性状的定位,为分子标记辅助选择育种奠定基础,使林木早期选择成为可能。因此,可加强藤种遗传图谱的构建,这是分子遗传学研究中一个具划时代意义的领域。

参考文献

- [1] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002: 425-431, 521-565.
- [2] 许煌灿, 孙清鹏, 尹光天. 棕榈藤的研究进展[J]. 林业科学研究, 2002, 38(2): 135-143.
- [3] Evans T D, Sengdala K. The adoption of rattan cultivation for edible shoot production in Lao PDR and Thailand - From non timber forest product to cash crop[J]. Economic Botany, 2002, 56(2): 147-153.
- [4] 许煌灿, 周再知, 尹光天. 藤茎嫩梢的营养成分分析[J]. 林业科学研究, 1991, 4(4): 459-461.
- [5] 国际竹藤组织, 国际竹藤中方协调领导小组, 国际竹藤网络中心. 国际竹藤组织在中国和世界的发展[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 83-85.
- [6] 许煌灿, 尹光天, 曾炳山. 棕榈藤的研究[M]. 广州: 广东科技出版社, 1994: 231-234.
- [7] 庄承纪, 周建葵. 省藤组织培养的植株再生[J]. 云南植物研究, 1991, 13(1): 97-100.
- [8] 张方秋. 棕榈藤组培技术研究[J]. 林业科学研究, 1993, 6(5): 486-492.
- [9] Padmanabhan D, Iiangovan R. Studies on embryo culture in *Calamus totang* Linn[J]. RIC Bulletin, 1989, 8(1): 1-2.
- [10] Lilian F, Patena C, Roman C, et al. Rattan tissue culture in the Philippines[J]. Newsletter, 1991(12): 11.
- [11] Umali Garcia. Tissue culture of some rattan species[C]//Proceedings of the rattan seminar, Singapore: IPGPI, 1985: 23-31.
- [12] Aziah Mohamed Yusoff. Tissue Culture of Rattans[C]//A Guide to the Cultivation of Rattan. Malaysia: Forest Research Institute, 1992: 149-161.
- [13] Doreen Goh. In Vitro Culture Studies On Rattan[C]//Taxonomy, Ecology, Silviculture, Conservation, Genetic Improvement and Biotechnology. Malaysia: Forest Research Institute, 1996: 173-178.
- [14] 程治英. 棕榈藤繁殖的生物学研究[J]. 林业科技通讯, 1995(295): 32.
- [15] 曾炳山, 刘英, 许煌灿, 等. 异株藤的离体快繁[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 336-337.
- [16] Mercedes U G, Sanches E V. Tissue culture of rattan: Progress and Prognosis[C]//Ramon V V. Rattan. Philippines: International development research center, 1990: 98-100.
- [17] Mercedes U G. Tissue culture of some rattan species[M]. Malaysia: Forest Research Institute, 1985: 20-31.
- [18] 曾炳山, 许煌灿, 刘英, 等. 棕榈藤组培苗移植技术研究[J]. 林业科学研究, 1997, 10(6): 563-569.
- [19] 曾炳山, 许煌灿, 刘英, 等. 短叶省藤种质离体保存研究[J]. 广西植物, 1999, 19(3): 255-259.
- [20] 曾炳山, 刘英, 许煌灿, 等. 单叶省藤和黄藤种质离体培养保存研究[J]. 中南林学院学报, 2002, 22(3): 24-27.
- [21] 陈和明, 尹光天, 胡哲森, 等. 黄藤花粉低温储藏初探[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(2): 67-69.
- [22] 陈和明, 尹光天, 胡哲森, 等. 白藤花粉采集时间及萌发条件的初步研究[J]. 江苏林业科技, 2004, 31(6): 1-4.
- [23] Aminuddin bin Mohamad. Rattan in Malaysia: conservation status, biodiversity base and the strategic programme[C]. Singapore: IPGRI, 1994: 45-48.
- [24] 杨华, 尹光天, 甘四明, 等. 黄藤遗传多样性的分析[J]. 林业科学研究, 2005, 18(5): 505-509.
- [25] Prakash P, Kumar, Arumuganathan K. Estimation of nuclear DNA content of various bamboo and rattan species[C]. Singapore: IPGRI, 1997: 195-203.
- [26] 李发根, 杨华, 尹光天, 等. 棕榈藤基因组 DNA 提取及 RAPD 反应条件探索[J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 824-828.
- [27] 杨华, 宋绪忠, 尹光天, 等. 黄藤 ISSR 反应体系的条件优化[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 152-155.
- [28] Remuka C. Genetic diversity and conservation of rattans[C]. Singapore: IPGRI, 1994: 39-41.
- [29] Hua YANG, Si-Ming GAN, Guang-Tian YIN Identification of Random Amplified Polymorphic DNA Markers Llinked to Sex Determination in *Calamus simplicifolius* C. F. Wei[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(10): 1249-1253.

- [30] 崔杰. 甜菜生物技术发展现状与未来思考[J]. 中国甜菜糖业, 2003, 2: 26-29.
- [31] Castiglione S, Wang G. RAPD fingerprints for identification and taxonomie of slite poplar (*Populus* spp.) clones[J]. Theor Appl Genet, 1993, 87(1): 54-59.
- [32] 苏晓华, Zsuffal, Lin D. 利用 RAPD 技术估测柳树种及无性系的变异[J]. 林业科学, 1995, 31(3): 211-214.
- [33] 张丽, 王静. 十字花科作物单倍体育种研究进展[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(2): 231-234.
- [34] 刘鸿艳, 郑成木. 花药培养育种研究进展[J]. 热带农业科学, 2001, 89(1): 61-64.
- [35] 李梅芳. 水稻花培育种前景[J]. 作物杂志, 1991(31): 17-18.

Advances of Biotechnology Used in Rattan

Zou Wentao Yin Guangtian Sun Bing Li Rongsheng Yang Jinchang

(The Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, 510520)

Abstract The study and exploitation on rattan is essential to alleviate the shortage of industrial raw materials and sustain biodiversity on tropical and subtropical . Although the research of molecular biology and biotechnology on rattan is relatively late ,great progress have been made in recent years. The advances in biotechnology research on rattan ,including breeding ,tissture culture and anther culture are reviewed in this paper. The exesting problems are proposed and the perspective of this field is also put forward.

Key words rattan, biotechnology, tissture culture, molecular markers