

竹子组织培养的研究进展及趋势

李蓉^{1,2}, 曾炳山², 何高峰¹, 郭起荣^{1,3}

(1. 江西农业大学, 江西南昌 330045; 2. 中国林业科学院热带林业研究所, 广东广州 510520; 3. 国际竹藤网络中心, 北京 100102)

摘要 论述了二十多年来竹子组织培养的研究进展及发展趋势, 分析了其发展特点, 总结并探讨了研究规律及有待解决的问题, 同时还指出了外植体选择、培养过程中需要注意的一些情况, 为今后竹子组织培养研究提供了重要的理论依据。

关键词 竹子; 组织培养; 研究进展; 趋势

中图分类号 S722.3⁷ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)11-04405-03

Research Advance and Trend of Bamboo Tissue Culture

LI Rong et al (Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

Abstract Research advance and trend of bamboo tissue culture in the last 20 years was discussed. Its develop characteristics were analyzed. And research rules and problems to be addressed were also discussed. Meanwhile, some cases which should be noticed during explant selection and culture were pointed out, which provided important theoretical basis for the future studies of bamboo tissue culture.

Key words Bamboo; Tissue culture; Research advance; Trend

我国现有竹林面积 484.26 万 hm², 分布有 500 余种竹类植物(含变种、变型), 竹产业年产值达 500 多亿元, 竹林面积、竹种数量、竹笋和竹材产量均居世界首位, 素有“竹子王国”之称。竹子是森林资源的重要组成部分, 它适应性强、生长快、产量高、用途广, 并具有良好的经济、社会和生态效益, 受到人们的高度重视。同时, 在加速山区经济发展, 促进农村脱贫致富, 治理调整山区产业结构, 改善生态环境等诸多方面有十分重要的作用。但是, 由于竹类植物开花间隔期长, 且开花期无法预测, 种子获取十分困难。因此, 竹子繁殖主要以埋鞭、埋秆、埋节等传统方法为主, 这些方法具有消耗种竹多、种苗运输不便、劳动强度大、繁殖系数低等缺点。为了寻求新的繁殖途径, 人们开始研究竹类植物的组织培养。竹子组培和细胞培养体系可以克服竹子移栽难、成活率低、劳动量大等缺点, 将成为一个不可缺少的研究手段, 具有很大的发展潜力。

1 竹子组培研究进展

竹子组培研究起步始于 1968 年, 研究进度一直比较缓慢, 到 20 世纪 80 年代国外才比较系统地开展竹子组培研究工作, 把组培方法应用于竹类繁殖, 并认为是快速发展竹类的一条新途径。现在印度、中国台湾、新加坡、马来西亚、泰国、日本、比利时、菲律宾、尼泊尔、苏格兰等国家或地区, 先后对刚竹属(*Phyllostachys*)、牡竹属(*Dendrocalamus*)、麻竹属(*Subgen. Sinocalamus*)、箬竹属(*Sasa*)、泰竹属(*Thysochachys*)和籼竹属(*Bambusa*)等 20 余属 70 多个竹种开展了组培研究。分别以种子的种子胚及胚状茎轴、嫩梢竹枝小段、侧嫩梢顶芽、茎节间组织切段、空心茎休眠芽、幼竹笋叶箨基部小块、花药花序等为外植体, 应用添加了各种不同浓度激素的 MS 或改良 MS 培养基、改良 White^[1]、BM^[2]和 B₃^[3]培养基, 通过固体或液体悬浮培养或原生质体培养等方法, 诱导出愈伤组织或丛芽, 并在多个竹种上培养出小植株, 还对某些种的试管开花进行了研究, 并获得成功^[4]。

1.1 胚培养 胚培养在竹子组培中已经成功得到应用。1968 年, Alexander 等报道成熟种胚离体培养并萌芽为植株^[5];

1990 年, Nadgauda 等获得了印度籼竹、勃氏甜龙竹和牡竹 3 个竹种的幼苗胚芽鞘切段在组培条件下开花所结出的种子^[6]; 1992 年, Woody 等以 *Ostea acuminata* 合子胚诱导出愈伤组织和再生植株^[7]; 1995 年, 张桂和等实现麻竹胚的离体培养和快速繁殖^[8]; 1998 年, 谭宏超等采用不同培养基添加不同种类和浓度的植物激素, 对毛竹、麻竹种子进行诱导进行组培技术研究, 获得了无茵苗^[9]; 2000 年, 谢庆华等对毛竹的初步研究表明用不同方式对毛竹种子进行消毒处理差异显著, 不同的培养基配方对种子的发芽、生根也有差异^[10]; 2006 年, 耿树香等通过对巨龙竹种子和小穗两种外植体愈伤组织诱导培养基和增殖培养基的筛选及防褐化处理试验, 获得了培养基的最优组合, 且在抗褐变方面有一定成效^[11]。

1.2 以芽繁芽 以芽繁芽, 即在无菌条件下, 将外植体的芽接种到培养基, 给以适当的温度和光照, 使其产生丛芽; 然后将其切割分丛进行继代培养, 待苗增殖到一定数量时即可使其生根而长成完整植株。以芽繁芽不仅可以筛选出优良品种; 还可以保持母株特性, 使优良的实生苗无性系通过诱导增生幼芽和生根得到繁殖和推广。1987 年, Banik 用 BAP 处理不同竹的成熟株, 将获得的嫩秆芽和枝芽培养在液体培养基和固体培养基上可形成丛生芽, 据 Banik 报道, 向含 BA 的琼脂培养基加入 NAA 3 个半月后, 能诱导由嫩枝衍生的秆芽所萌发的小植株充沛生根, 由嫩枝衍生的小苗在含有 IBA 的液体培养基中也能生根, 但对由枝芽转化的培养物来说, 生根仍是难题^[12]; 1988 年, Chaturvedi 和 Sharma 在培养基中掺入间苯二酚, 使牡竹处于逆向位置的节外植体诱导生根^[13]; 1991 年, 阙国宁等以牡竹属黄竹和印度籼竹嫩竹带芽的节作外植体, 诱导出愈伤组织并再生植株^[4]; 1998 年, 谢庆华等对方竹的组培研究表明方竹外植体基部节芽和中部节芽均能培养成苗^[14]; 同年, 谭宏超对黄金竹、勃氏甜龙竹 2 个竹种成年竹茎段进行诱导, 结果表明 2 个竹种的外植体均能培养成功^[9]; 1999 年, 陈锐亮等对壮绿竹的茎段培养作了初步研究^[15]; 2002 年, 王光萍等以金镶玉竹等 11 种观赏竹新萌发的嫩芽为材料进行组织培养, 获得了 7 种观赏竹的再生植株^[16]; 2003 年, 张光楚等对 28 年生的撑麻 7 号竹(*B. petvariabilis* McClure × *D. latiflorus* Munro

作者简介 李蓉(1983-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 毛竹组织培养。

收稿日期 2008-02-18

No.7)的离体快速繁殖技术进行了系统研究,表明KT有促进生长的作用,并发现了较适合增殖培养的培养基,同时解决了试管苗生根时大量死亡的问题^[17];同年,龚力波等以马来西亚甜龙竹的当年生枝条作为外植体进行组培繁殖试验,筛选出了各培养阶段最适宜的培养基配方^[18];潘学峰等报道了马来甜龙竹组培快繁的研究结果,即试管苗茎段在MS+BA 4.0 mg/L的培养基上离体培养,能诱导产生丛生芽^[19];杨本鹏等以龙竹的幼枝节段作为接种外植体,采用从腋芽→丛生芽→完整植株的繁殖途径进行繁殖,获得了成功^[20];2004年,苏海等用带腋芽的茎段作为外植体在马来甜龙竹的组培和快繁研究方面获得了较大成功^[21];杨本鹏等用种子和幼枝成功完成了巨龙竹的组培快繁^[22];张铁等以勃甜龙竹新萌发的嫩枝为外植体诱导丛生芽获得完整植株^[23];2005年,王光萍等对菲白竹等11种观赏竹种分别诱导丛生芽及再生植株,结果表明:外植体经诱导产生丛生芽后,亲缘关系较近的竹种丛生芽增殖培养基有一定相似性;适宜的生根培养基是试管快繁成功的关键,不同竹种丛生芽生根难易差别较大,丛生竹生根率很高,而散生竹则较难生根^[24];2006年,李在留等对巨龙竹幼年竹和成年竹材料进行系统研究,采用正交设计筛选出各阶段的最佳培养基^[25];张春霞等研究了菲白竹的组培微繁技术,获得了其增殖和生根的最佳培养基^[26];顾小平等对小佛肚竹、凤尾竹和孝顺竹幼竹的茎尖和带节茎段的研究获得了愈伤组织及其防褐变的方法^[27];2007年徐强兴等采用当年生枝条半木质化的吊丝球竹茎段进行离体培养,获得再生植株,成活率达90%^[28]。

在“以芽繁芽”过程中还出现试管苗开花、褐变、污染等现象。2001年,张光楚等对麻竹试管苗开花的研究表明细胞分裂素BA、KT在竹子组培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^[29];2003年,宣群等研究表明次氯酸钠能有效抑制从被微生物污染的勃氏甜龙竹组培苗中分离到的3种霉菌^[30]。

由上可知,“以芽繁芽”的成功报道主要集中在丛生竹种,散生竹很少。研究表明,2个竹种在形态结构和遗传特性上差异太大,丛生竹竹秆和枝条上大多具有在适宜的条件下容易萌芽生根长成新植株的隐芽,再生能力强,而散生竹器官再生能力极弱。同时,成熟竹组培难度比幼年竹大,虽然来源于成熟竹的芽外植体通过萌生不定芽的繁殖方式取得了一定进展,但也存在不容易诱导出丛生芽;诱导出丛生芽后苗的长势不好;生根培养时常有大量的苗死亡等问题^[31]。总体来看,种子、幼年竹、成年竹的诱导容易程度为种胚>幼年竹节茎段>成年竹节茎段。

1.3 愈伤组织培养 愈伤组织培养就是通过外植体诱导愈伤组织,其2个主要发展方向,一是诱导再生植株,二是进行悬浮培养获得单个细胞长成的小植株。

1.3.1 诱导再生植株

1.3.1.1 丛生竹再生。1982年Metha等首先报道了在添加2,4-D和BA+PVP的N培养基中,印度箭竹种子成熟胚诱导出愈伤组织和再生植株^[32];1983年Huang等从绿竹属、刚竹属、箬竹属、箭竹属的叶片和嫩茎尖诱导出愈伤组织,对诱导竹愈伤组织的有机条件进行过详尽的研究,发现肌醇(100 mg/L),维生素B(1 mg/L)和烟酸(0.5 mg/L)最适于愈

伤组织生长^[33];1985年,Rao等以杜竹成熟种子,诱导了愈伤组织、胚芽,进而再生植株^[34];1987年,Yeh等以麻竹的种子诱导出愈伤组织和再生植株^[35];同年,Hassan等报道以竹的叶片作为外植体也可获得再生植株^[36];1993年,马艳梅等用麻竹箬片作外植体在含有2,4-D 4~8 mg/L和KT 3 mg/L、蔗糖5%、琼脂0.7%~0.8%的MS基本培养基上诱导出愈伤组织^[37];1995年,Chang和Lan报道了组培再生的吊丝球竹植株,经无激素培养一个月,取其根组织,成堆培养可诱导愈伤组织和再生植株^[38]。

1.3.1.2 散生竹再生。2004年,韩文军等通过对激素种类、温度、光照及褐变抑制剂等影响毛竹愈伤组织褐变因素的研究,找到最大限度避免或减轻毛竹愈伤组织褐变的方法^[39];2005年,周宏等以毛竹春笋为材料进行愈伤组织诱导,分析了不同激素组合、温度及光照对愈伤组织诱导的影响^[40]。

1.3.2 悬浮培养 1988~1990年,Huang等报道了几种竹子的悬浮细胞培养;从白绿竹和凤凰竹的悬浮细胞中分离了原生质体,并探讨了原生质体分离和培养的技术参数^[41-42];1994年,阙国宁等报道以黄竹的竹节及无菌苗根茎为外植体,进行悬浮培养,悬浮培养的细胞和无菌苗叶片经酶解获得高活力的原生质体^[43];2000年,吴益民等对孝顺竹的顶芽和节侧芽外植体进行诱导,获得愈伤组织,并建立悬浮细胞系^[44]。

1.4 原生质体培养

原生质体培养已成为生物工程的重要技术,它有利于建立体细胞杂交体系,它的成功将为生物技术的深入发展奠定基础。与其他草本植物相比,竹子原生质体培养进展较为缓慢,但也取得了一些可喜的成绩。

1975年,Tseng等从箭竹属一个竹种叶片中分离出一种原生质体^[45];1988~1990年,Huang等通过诱导白绿竹、凤凰竹、人面竹和箬竹的原生质体细胞分裂,产生愈伤组织,形成再生植株^[46];1990年,Huang等以培养细胞和减少渗透压调节物质方法,促进原生质体细胞分裂,再生了愈伤组织^[47]。

1.5 花序及花药培养 花序及花药培养即将植物花序、花药等作为外植体进行培养。1986年,Yeh和Chang先后以白绿竹的幼花序,以吊丝球竹的花序及其花序衍生的根组织进行组织培养,再生出植株^[48];1990年,Tsay等对麻竹的花药进行组织培养,获得愈伤组织和再生植株^[49]。

2 竹子组培研究特点

丛生竹组培方法主要集中在以芽繁芽和诱导愈伤组织2个培养方法上,而散生竹组培方法则偏重于诱导愈伤组织,在“以芽繁芽”方面运用得较少,这主要是由2个竹种的生理结构所决定的。在从事竹子离体快速繁殖的同时还要注意:①外植体必须来源于遗传品质好的母株,以保证克隆出来的无性系苗有较好的经济和生长性状;②多品种、多无性系引入试管同时生产,以利于保护遗传多样性和加强竹林抵抗自然灾害的能力;③将竹子组培技术与常规育苗技术相结合,有效地降低育苗成本,同时减少实验室繁殖次数^[50]。

3 研究趋势

3.1 快速大量繁殖 组培育苗具有繁殖快、增殖系数高、花费少、质量好、体积小、便于携带、运输和交流等优点。传统的繁殖方法1粒种子或1个芽一般只能生成1个植株,

而组培技术1个组培芽一年内可繁殖10 000丛苗。因此,组培作为竹子快速繁殖的一种途径应高度受到重视,尤其是对于那些本身开花周期长且实生苗后代分离严重、生长发育势弱,以及经常开花但很难得到可育种子的重要经济竹种,应建立组培快繁的生产体系。

3.2 品种选育与转基因技术 通过利用离体培养组织或细胞与母体的抗逆性的相关性,选择合适的指标,人为设计微环境条件鉴定并选育出具有优良性状的母体植株。目前,依赖于组织培养技术的基因工程已被广泛用于农作物和林木育种^[51-52],因此,可以运用转基因技术将抗性基因(如抗盐碱、抗寒、抗旱、抗病虫害、抗除草剂、抗环境污染等基因)转入植株体内,使植株产生抗性,获得优良特性植株。

3.3 保存竹类种质资源 近年来,由于环境污染、土地开垦日益严重,种质资源逐渐减少甚至消失,尤其是用常规方法保存十分困难的种质,可采用组培进行保存,其优点有:①在较小空间内便可以保存大量种质资源,即所谓“营养体种子”;②具有很高的繁殖系数;③避免外界不利因素的影响;④在隔离昆虫、病原体和病毒条件下保存;⑤不带有已知病原体,有利于国际间物种种质的交换与交流。

3.4 杂交育种 杂交育种不仅有利于预防竹林开花,也有利于改善开花质量,实现可控条件下的有性杂交,培育优良品种。通过研究者对组培苗开花生理研究的报道^[29,53],可获得开花生理的相关知识,但还很少有人在试管里得到成熟种子,这表明试管花可孕率比较低。因此,研究试管花性器官形成及成熟机理,以提高试管花的可孕率是必要的。解决了这些问题,才能解决困扰竹子遗传改良工作的问题,试管苗开花的研究才能进入实用阶段。

4 展望

4.1 产生人工种子 将在组培产生的胚状体包裹在含有养分和具有保护功能的包膜中,并在适宜条件下能够发芽出苗的颗粒体称为植物人工种子。这些人工种子在推广良种与无性系品种、固定杂种优势、脱毒、简化育种程序等方面起着推动作用。目前,人工种子已在一些物种上获得了一些成果^[54],如果将这些成果应用到竹子上将是很大的突破。

4.2 建立体细胞杂交体系 竹子试管开花表明在试管里进行竹子有性杂交工作具有可能性,从而彻底消除竹子开花周期长给竹子杂交育种工作带来的障碍,获得高活力、高收率的原生质体,并实现由原生质体→体细胞杂交→再生植株的成功诱导,可望在不同的种间乃至属间实现原生质体的融合,从而获得具有杂种优势的植株。由于去除了坚硬细胞壁的原生质体易于接受载有外源基因的载体,可以迅速地将某些有用的基因转移到需要改良的竹材上,再通过转化、筛选和克隆获得转基因植株,从而能按照需要增加竹子的新功能或创造出新物种。

参考文献

- [1] ANES A, EI HASSAN, DEBERGH P. Embryogenesis and plant development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1987, 10(1): 73-77.
- [2] CHAMBERS S M, HEUCH J H R, PIRRLE A. Micropropagation and in vitro flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1991(27): 45-48.
- [3] RAO I U, RAO I V R, NARANG V. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the *Dendrocalamus strictus* [J]. *Plant Cell Reports*, 1985 (4): 191-194.
- [4] 阙国宁, 诸葛强. 竹子愈伤组织培养与植株再生[J]. *竹子研究汇刊*, 1991, 10(4): 9-11.
- [5] ALEXANDER M P, RAO T C. In vitro culture of bamboo embryos [J]. *Curr Sci*, 1968(37): 415.
- [6] NADGAUDE R S, PARASHARAMI V A, MASERENHAS A F. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos [J]. *Nature*, 1990, 344: 335-336.
- [7] WOODY S H, PHILLIPS G C, WOODS J E, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic explant in Mexico weeping bamboo, *Otatea acuminata* aztecorum [J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 257-261.
- [8] 张桂和, 朱靖杰, 陈汉州. 麻竹胚的离体培养和快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 1995, 31(6): 434-435.
- [9] 谭宏超, 王灵昭, 尹芳, 等. 竹子组织培养技术的初步研究[J]. *林业科技通讯*, 1998(5): 26-27.
- [10] 谢庆华, 邢溪艳, 谭汝学. 毛竹种子组培技术初步研究[J]. *林业科技通讯*, 2000(12): 18-20.
- [11] 耿树香, 普晓兰, 王曙光. 巨龙竹种子、小穗外植体愈伤组织的诱导培养[J]. *西部林业科学*, 2006, 35(4): 78-83.
- [12] BANIK R L. Techniques of bamboo propagation with special reference to pre-rooted and pre-rhizomed branch cuttings and tissue culture [M]. China: Recent Research on Bamboos, IDRC, 1987: 160-169.
- [13] 朱红. 国外竹子组织培养研究的现状与前景[J]. *竹子研究汇刊*, 1992, 11(1): 67-74.
- [14] 谢庆华, 谭宏超, 尹芳, 等. 云南南方竹外植体组织培养成苗技术[J]. *云南林业调查规划设计*, 1998, 23(4): 61-63.
- [15] 陈锐亮, 杨振德. 壮绿竹茎段培养的初步研究[J]. *广西热作科技*, 1999(3): 20-21.
- [16] 王光萍, 丁雨龙. 几种观赏竹种组织培养研究[J]. *竹子研究汇刊*, 2002, 21(2): 5-9.
- [17] 张光楚, 王裕霞. 杂种撑麻 7 号竹的组织培养研究[J]. *林业科学研究*, 2003, 16(3): 245-253.
- [18] 龚力波, 郑思乡, 肖龙骞, 等. 马来西亚甜龙竹的组织培养繁殖试验[J]. *云南林业科技*, 2003(1): 5-7.
- [19] 潘学峰, 庄伟, 关朝优, 等. 马来甜龙竹组培快繁技术研究[J]. *贵州科学*, 2003, 21(4): 81-84.
- [20] 杨本鹏, 管雨梅. 龙竹的组织培养[J]. *热带作物学报*, 2003, 24(3): 82-87.
- [21] 苏海, 钟明, 蔡时可, 等. 马来甜龙竹的组织培养和快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(4): 468.
- [22] 杨本鹏, 张树珍, 辉朝茂, 等. 巨龙竹的组织培养和快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(3): 346.
- [23] 张铁, 万京, 勃氏甜龙竹的组培快繁[J]. *云南民族大学学报: 自然科学版*, 2004, 13(3): 203-206.
- [24] 王光萍, 丁雨龙, 黄敏仁, 等. 观赏竹的试管快繁研究[J]. *林业科学*, 2005, 41(5): 51-56.
- [25] 李在留, 辉朝茂. 珍稀竹种巨龙竹组织培养研究[J]. *林业科学*, 2006, 42(2): 43-49.
- [26] 张春霞, 王福升, 黄月英. 菲白竹组培繁殖技术研究[J]. *林业科技开发*, 2006, 20(5): 31-33.
- [27] 顾小平, 苏梦云, 岳晋军, 等. 几种丛生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究[J]. *林业科学研究*, 2006, 19(1): 75-78.
- [28] 徐强兴, 杨广超. 吊丝球竹的组培快繁技术研究[J]. *广东农业科学*, 2007(2): 42-44.
- [29] 张光楚, 王裕霞. 竹子试管苗开花的初步研究[J]. *竹子研究汇刊*, 2001, 20(1): 1-4.
- [30] 宣群, 邵华, 张玲琪, 等. 勃氏甜竹组培苗污染霉菌的分离鉴定及防治[J]. 2003(1): 19-21.
- [31] 张光楚, 王裕霞. 竹子育种工作现状及前景[J]. *竹子研究汇刊*, 1998, 17(1): 6-9.
- [32] METHA U, RAO I V R, MOHAN RAM H Y. Somatic embryogenesis in bamboo [C]// PROC V. International congress of plant tissue & cell culture. Tokyo: Proc 5th, 1982: 109-110.
- [33] HUANG L C, MURUSHIGE T. Tissue culture investigation of bamboo I. Callus cultures of *bambusa, phyllostachys* and *Sasa* [J]. *Bot Bult Acadmia Sinica*, 1983, 24: 31-52.
- [34] RAO I U, RAO I V R, NARANG V. Somatic embryogenesis and

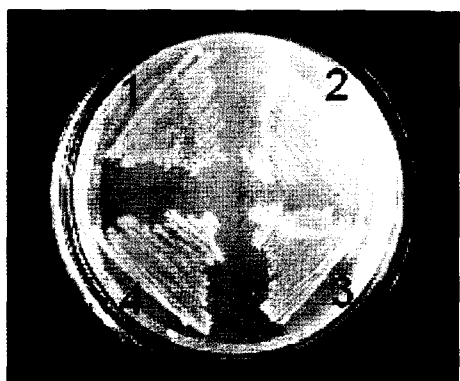


图7 重组子 pHBM720 荧光检测

Fig.7 The fluorescence detection on recombinants pHBM720 and pHBM719

外源基因内部的酶切位点,从而高通量地将外源基因克隆到叶绿体表达载体中。另外,在载体的这2个酶切位点之间引入了1个甘露聚糖酶基因(*man*),这样在构建外源基因叶绿体表达载体时,只要用 *Cpo* I 与 *Asc* I 双酶切去甘露聚糖酶基因即可,减少了载体的自连背景。在引入外源基因、筛选重组子时,可在甘露聚糖酶底物平板上筛选没有水解圈的菌落,从而更有效地寻找重组子。由于在构建的质体表达载体采用环境友好的 *aadA* 基因作为筛选标记,其余均不带有其他任何抗性基因,从而增加其环境与生物安全性。

3.2 载体的优越性 该研究构建的是叶绿体同源片段的单交换表达载体,从理论上讲,单交换表达载体比双交换表达载体更具优越性,这是因为单次交换是一次事件,而双交换是二次事件,单交换的发生概率要比通过双交换的概率大得多,单次交换形式的同源重组方式比通过2次交换形式的同源重组方式具有更高转化效率。并且这一推论已经在该实验室的酵母转化系统以及在大肠杆菌以 *RecA* 蛋白

介导的单交换试验中得到了证实,因为叶绿体系统与原核系统具有很大的相似性,这提示研究者将单交换的同源重组方式引入到质体表达系统中的同时,载体具有通用性。另外,在载体的构建过程中,在 *man* 基因的两端引入 *Cpo* I 和 *Asc* I 2个稀有酶切位点,为便于克隆外源基因,在设计 PCR 引物时,在正反向引物两端分别加上 GTCA 和 CGCGA 的序列,用这对引物扩增出来的产物加上 dTTP 保护碱基,利用 *T₄* DNA Polymerase 3'-5'方向的外切酶活性,在 PCR 产物两端产生的 C 末端 5'GTCA T3' 3'T AGCGC5'恰好可以和经 *Cpo* I 和 *Asc* I 双酶切切下的载体2个黏性末端互补匹配,从而可以将任何感兴趣的外源基因经相同的处理克隆到叶绿体表达载体上,为克隆外源基因带来方便。

参考文献

- [1] SVAB Z,HAJDUKIEWITZ P,MALIGA P.Stable transformation of plastids in higher plant[J].Proc Natl Acad Sci,1990,87:8526.
- [2] MALIGA P.Towards plastid transformation in flowering plants [J]. Reviews,1993,11:101-107.
- [3] 张中林,钱凯先,沈桂芳.同质化叶绿体转基因植株的获得[J].生物化学与生物物理学报,2000,32(6):620-626.
- [4] 侯丙凯,陈正华,苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因克隆及油菜叶绿体遗传转化研究[J].遗传,2001,23(1):39-40.
- [5] 侯丙凯,胡赞民,党本元,等.定点整合抗虫基因到油菜叶绿体基因组并获得转基因植株[J].植物生理与分子生物学学报,2002,28(3):187-192.
- [6] 侯丙凯,张中林,周奕华,等.油菜叶绿体定点转化载体的构建及其杀虫性[J].高技术通讯,2000(7):5-11.
- [7] 张中林,张景昱,李秩女,等.油菜叶绿体基因组同源重组片段的克隆及 *phb* 基因定点整合载体的构建[J].植物生理学报,2001,27(3):235-242.
- [8] 龚小松,阎隆飞.高等植物叶绿体 DNA 提纯方法的改进[J].科学通报,1991(36):467-469.
- [9] SAMBROOK J,DAVID W R.Molecular cloning:a laboratory manual [M].3rd ed.New York:Cold Spring Harbor Laboratory,2001.
- [10] 彭秀玲,袁汉英,谢毅,等.基因工程实验技术[M].长沙:湖南科学技术出版社,1997:252-261.
- [44] 吴益民,边红武,王君晖,等.竹子悬浮细胞系的建立和组织培养试管苗移栽观察[J].竹子研究汇刊,2000,19(1):52-55.
- [45] TSENG T C,LIU D F,SHAIO S Y.Isolation of protoplasts from crop plants[J].Bot Bull Acadmia Sinica,1975,16:55-60.
- [46] HUANG L C,HUANG B L,CHEN W L.Tissue culture investigations of bamboo IV.Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices [J].Inviromental and Experimental Botany,1989,29:307-315.
- [47] HUANG L C,HUANG B L,CHEN W L.Tissue culture investigation of bamboo V.Recovery of callus from protoplasts of suspension -cultured bambusa cells [J].Bot Bull Academia Sinica,1990,31:29-34.
- [48] YEH M L,CHANG W C. Plant regeneration through somatic embryogenesis incallus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro)[J].Theor Appl Genet,1986,73:161-163.
- [49] TASY H S,YEH C C,HSU J Y.Embryogenesis and plant regeneration from another culture of bamboo (*Sinocalamus latiflora* McClure)[J].Plant Cen Reports,1990,9:349-351.
- [50] 张光楚,王裕霞,谭源杰,等.丛生竹的组培快繁技术[J].竹子研究汇刊,2004,23(1):13-20.
- [51] 施季森,王晓燕.现代生物技术与21世纪林业可持续发展[J].林业科技开发,2001,15(1):3-6.
- [52] 祝沛平,许琳,张林芝,等.生物技术在竹子研究中的应用前瞻[J].浙江林业科技,2000,20(2):66-69.
- [53] ROUT G R,DAS P.Somatic embryogenesis and in vitro flowing of 3 species of bamboo[J].Plant Cell Reports,1994,13:683-68.
- [54] 王侠礼.植物人工种子的研究概况[J].中国种业,2004(9):41-42.

(上接第4407页)

- regeneration of plants in the bamboo[J].Plant Cell Reports,1985,4:191-194.
- [35] YEH M L,CHANG W C.Plant regeneration via somtic embryogenesis in mature embryo derived callus culture of *Sinocalamus latiflora*(Munro)Ma Cllure[J].Plant Science,1987,51:93-96.
 - [36] HASSAN A E,DEBERGH P.Embryogenesis and plantlet evelopment in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young) McClure [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture,1987,10:73-77.
 - [37] 马艳梅,何远康,何琼英,等.麻竹愈伤组织的诱导培养[J].华南农业大学学报,1993,14(3):131-140.
 - [38] CHANG W C,LAN T H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from roots of Bamboo (*Bambusa beecheyana* Munro var.beecheyana)[J].Plant Physioloy,1995,145:535-538.
 - [39] 韩文军,周宏,何钢.毛竹愈伤组织培养中褐变现象的研究[J].湖南林业科技,2004,31(3):4-5.
 - [40] 周宏,何钢.毛竹愈伤组织培养研究[J].湖南林业科技,2005,32(4):41-42.
 - [41] HUANG L C,CHEN W L,HUANG B L.Tissue culture investigations of bamboo I.Liquid suspension cultures of bambusa. *Phyllostachys* and *Sasa* cells [J].Bot Bull Academia Sinica,1988,29:177-182.
 - [42] HUANG L C,CHEN W L,HUANG B L.Tissue culture investigation of bamboo II.A method for viable protoplast isolation from *Bambusa* cells of liquid suspension culture [J].Bot Bull Academia Sinica,1989,30:49-57.
 - [43] 阙国宁,诸葛强.黄竹细胞悬浮培养和原生质体分离[J].林业科学研究.1994,7(1):44-47.