



工业用丛生竹

分子生物学研究

Study on Molecular Biology of
Industrial Sympodial Bamboo

胡尚连 等 著



科学出版社

工业用丛生竹分子生物学研究

胡尚连等 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书从工业用丛生竹分子生物学角度,较全面地总结了近年来作者在大型丛生竹类木质素相关合成酶基因克隆与调控,纤维素相关合成酶基因克隆、生物信息学分析与组织表达模式,蔗糖合酶和尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因克隆、生物信息学分析与组织表达模式及尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因的遗传转化,MYB 和 WRKY 转录因子的克隆与胁迫诱导表达和慈竹转录组分析等方面的研究成果。

本书可为林学和园林等相关领域的专家、学者、林业科技工作者及相关专业的学生提供理论参考。

图书在版编目(CIP)数据

工业用丛生竹分子生物学研究 / 胡尚连等著. —北京: 科学出版社, 2016.1

ISBN 978-7-03-046718-8

I. ①工… II. ①胡… III. ①竹—分子生物学—研究 IV. ①QS795

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 303748 号

责任编辑: 罗 静 岳漫宇 / 责任校对: 张怡君

责任印制: 张 伟 / 封面设计: 北京图阅盛世文化传媒有限公司

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016 年 1 月第一次印刷 印张: 16 3/4

字数: 397 000

定价: 120.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《工业用丛生竹分子生物学研究》著者名单

主 著 胡尚连 西南科技大学

著 者 (按姓氏汉语拼音排序)

曹 颖 西南科技大学

黄 艳 西南科技大学

刘红梅 西南科技大学

龙治坚 西南科技大学

卢学琴 西南科技大学

徐 刚 西南科技大学

前 言

纤维原料资源是造纸行业生产和发展的基础。50 年来,我国造纸企业大都以麦草和废纸为主要原料,导致我国造纸企业产品档次低,竞争力弱,高档纸品高度依赖进口,同时在制浆造纸过程中,木质素和半纤维素作为主要废液(占造纸工业污染的 80% 以上)排放到外界环境,严重污染环境,且造成大量资源浪费。纤维原料结构不合理是制约我国造纸工业发展的瓶颈。我国森林资源匮乏,森林覆盖率比世界平均水平低 10 个百分点。目前,我国生态现实不允许纸浆原料过度依靠木浆,纸浆造纸用材短缺和价格高的问题日益突出。

我国是世界上竹类资源最丰富的国家,有 500 多种,栽培面积 700 多万 hm^2 ,蓄积及年产量居世界前列。竹材成材期短,单产高,再生能力强,易繁殖,是速生型植物资源和永续利用资源,有利于保护自然资源和生态环境。更重要的是竹属于中长纤维原料,介于针叶木和草类之间,比阔叶木长,纤维细长,交织力好,是造纸的良好原料。世界上较多利用竹子制浆造纸的国家有印度、孟加拉国、泰国和中国等。近年来,国家在西部地区实施的退耕还林和天然林保护工程,为竹浆产业发展提供了条件,四川省已形成以竹浆造纸工业为龙头的产业链。四川一些本土大型丛生竹如慈竹、梁山慈竹等含有丰富的纤维素,适合作造纸原料。而且,这些竹种还具有适应性广、易栽培、栽培面积大、成活率高、轮伐期短、生物量大等特点,对进一步推动我国竹资源的有效利用和造纸业的可持续发展、生态环境的改善和农民增收,都具有十分重要的意义。

应用基础研究是林业科技工作的源头和根本。由于竹子很难开花的特殊生物学特性,采用传统育种方法很难进行遗传改良,限制了竹子遗传改良进程。随着生物技术的长足发展,利用生物技术手段拓宽竹子遗传资源,改良和培育竹子新品种是当前的研究重点。改善竹子品质是其遗传改良的重要目标之一。因此,开展工业用丛生竹类木质素和纤维素基因克隆与调控及笋的不同生长阶段转录组等方面的基础研究,可为通过生物技术手段创制竹子新种质资源奠定基础。目前,竹类木质素、纤维素生物合成和调控方面的研究尚处于起步和探索阶段。尽管竹木质素和纤维素相关合成酶基因相继在慈竹、绿竹、毛竹上及耐寒基因在慈竹上得以克隆,但都未能应用于竹遗传改良。

针对以上提出的问题,本课题组(资源植物研究与利用课题组)自 2003 年以来,在国家青年基金(31400257 和 31400333)、四川省“十一五”和“十二五”重点公关资助项目(2006YZGG-10-07 和 2011YZGG-10)、四川省应用基础研究基金资助项目(05JY029-101 和 2013JY0182)、四川省生物质资源利用与改性工程技术研究中心基金(12zxsk07 和 13zxsk01)和四川主要丛生竹定向培育技术项目(10zx1102)等的资助下,开展了大型丛生竹类木质素相关合成酶基因克隆与调控,纤维素相关合成酶基因克隆、生物信息学分析与组织表达模式,蔗糖合酶和尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因克隆、生物信息学分析与组织表达模式及尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因的遗传转化,MYB

和 WRKY 转录因子的克隆与胁迫诱导表达和慈竹转录组分析等方面的研究,取得了一定进展,相关研究结果总结在本书中。本书的出版得到了生物质材料教育部工程研究中心开放基金(12ZXbk03)的资助。

全书共分 6 章。胡尚连负责全书的统稿,撰写前言和内容简介。胡尚连撰写第一章和第三章,胡尚连、曹颖和卢学琴撰写第二章,胡尚连、曹颖、黄艳、徐刚、龙治坚撰写第四章和第五章,胡尚连、曹颖撰写第六章,刘红梅撰写缩略语和负责全书的编辑工作。感谢本研究室邓小波、黄胜雄、蒋瑶、周建英、李晓瑞、吴晓宇、张丽、周美娟、陈荣、李想、杨传凤、周振华、史世京、郭鹏飞、廖倩硕士研究生对本研究工作的支持。

本课题组的研究仍处于起步阶段,尚待深入系统地开展工业用丛生竹分子生物学与遗传改良方面的研究。由于作者水平有限和经验不足,书中难免有不妥之处,敬请有关专家、学者、科技和生产工作者等批评指正。

在本书出版之际,谨向所有关心、支持本书出版的单位、领导、专家、朋友和同学表示衷心的感谢!

胡尚连
2015 年 1 月

目 录

第一章 竹子分子生物学研究进展.....	1
第一节 分子标记辅助育种研究进展	1
第二节 竹类植物功能基因分离	3
一、细胞壁生物合成相关基因	4
二、光合作用相关基因	5
三、抗逆相关基因	5
四、开花相关基因	6
五、竹类植物开花基因克隆	7
六、竹类植物基因组研究	8
七、竹类植物功能基因组学研究发展前景	10
第二章 木质素相关合成酶基因克隆与转录调控研究	12
第一节 研究背景	12
第二节 植物木质素生物合成酶 4CL 基因的遗传进化分析	13
一、材料和方法	14
二、结果分析	16
三、展望	20
第三节 慈竹木质素关键酶基因克隆、生物信息学与组织表达	20
一、慈竹木质素关键酶 4CL 基因克隆及其生物信息学分析	21
二、慈竹 C3H 基因克隆及其生物信息学分析	27
三、慈竹 CCoAOMT 基因克隆及其生物信息学分析	36
四、慈竹 C4H 基因克隆及其生物信息学分析	45
五、慈竹 COMT 基因克隆及其生物信息学分析	53
六、肉桂酰辅酶 A 还原酶基因克隆及其生物信息学分析	60
七、慈竹木质素关键酶基因组织表达分析	67
第四节 慈竹木质素关键酶 4CL 基因功能验证	69
一、慈竹 4CL 基因 RNAi 表达载体的构建	69
二、pBI-4CL-RNAi 转化烟草的研究	75
第五节 慈竹 4CL 基因农杆菌遗传转化梁山慈竹的研究	83
一、材料与方法	83
二、结果与分析	86
三、讨论与结论	90
第六节 植物木质素生物合成转录调控及生物信息学分析	91

一、材料与方法	91
二、结果与讨论	94
三、结论	100
第三章 纤维素相关合成酶基因研究	102
第一节 研究背景	102
第二节 绿竹与毛竹纤维素合成酶的生物信息学分析	103
一、材料与方法	103
二、结果与分析	104
三、讨论与结论	109
第三节 慈竹纤维素合成酶基因克隆、表达与生物信息学研究	110
一、试验材料	110
二、试验方法	110
三、结果与结论	114
第四章 <i>SuSy</i> 基因研究	136
第一节 研究背景	136
第二节 慈竹 <i>SuSy</i> 基因克隆与生物信息学分析	137
一、试验材料与方法	137
二、结果分析	141
三、讨论与结论	155
第三节 慈竹与梁山慈竹 <i>UGP</i> 基因克隆与生物信息学分析	157
一、试验材料与方法	158
二、结果分析	161
三、讨论与结论	167
第四节 慈竹 <i>SUS</i> 和 <i>UGP</i> 基因的组织表达模式分析	170
一、试验材料与方法	170
二、结果与分析	172
三、讨论与结论	174
第五节 慈竹 <i>BeSUS3</i> 基因和梁山慈竹 <i>DfUGP</i> 基因植物过表达载体的构建	175
一、试验材料及方法	175
二、结果分析	176
三、结论	178
第六节 梁山慈竹 pCAMBIA 1303- <i>DfUGP</i> 质粒转化烟草	178
一、试验材料及方法	178
二、结果分析	181
三、讨论与结论	182
第五章 MYB 和 WRKY 转录因子的克隆与胁迫诱导表达	185
第一节 研究背景	185
第二节 基于慈竹转录组的 2 个 MYB 转录因子的克隆及胁迫诱导表达分析	187
一、材料和方法	187

二、结果与分析	188
三、讨论与结论	193
第三节 慈竹 WRKY 转录因子的克隆及其胁迫诱导表达	194
一、材料与方法	194
二、结果分析	195
三、讨论与结论	198
第六章 慈竹转录组研究	201
第一节 研究背景	201
第二节 慈竹转录组分析	202
一、试验材料与方法	202
二、总 RNA 样品检测结果	203
三、测序数据质量评估与统计	206
四、组装结果统计	210
五、基因结构分析	213
六、基因的功能注释与表达分析	215
七、与其他物种的比对分析	240
参考文献	244
缩略语	255

第一章 竹子分子生物学研究进展

竹类植物是重要的森林资源，其以速生、再生性强及纤维质量较好的特点，在我国林业生产中占有非常重要的地位，在缓解我国木材供需矛盾和生态环境保护方面发挥了十分重要的作用。以往对竹类植物的研究主要集中在形态学研究、生态环境保护、栽培技术和利用等方面，而有关竹类植物的基因分离及其调控方面的基础性研究十分薄弱。近年来，随着分子生物学基础理论和研究技术手段的飞速发展，竹类植物分子生物学的研究日益引起重视，我国在竹类植物分子标记的研发与利用，功能基因的分离及其生物信息学和表达分析，全基因组测序和转录基因组测序及其分析等方面开展了较为深入的研究，并取得了一定的研究进展。

第一节 分子标记辅助育种研究进展

分子标记辅助育种始于20世纪80年代，是通过利用与目标性状紧密连锁的DNA分子标记对目标性状进行间接选择，并在早代就能够对目标基因的转移进行准确、稳定的选择，从而加速育种进程，提高育种效率，选育抗病、优质、高产的品种。与传统育种相比，分子标记辅助育种在聚合多个育种有利基因和精确鉴定多个目标性状方面，能大大缩短育种周期和降低成本投入。迄今为止，通过分子标记辅助育种选择培育而成的新品种很少，该技术在植物育种工作中还未得到广泛普及与有效利用，其原因在于植物分子标记辅助育种常常涉及多个经济性状的同时改良。因此，针对对人类有应用价值的植物复杂性状的分子育种，科学家需要理解和掌控植物生长、发育规律及其对生物和非生物逆境条件的响应，构建相关性状的遗传网络和包含多个性状的选择指数。

随着分子生物学技术的长足发展，科学家提出了全基因组策略分子标记辅助育种，它是利用全基因组测序和全基因组分子标记对代表性的或者全部遗传资源和育种材料进行分析，充分考虑分子育种中面临的不同基因组和环境因素。这些策略现在越来越基于特定的基因组区域、基因/等位基因、单倍型、连锁不平衡、基因网络和这些因素对特定表型的贡献。大规模高密度的基因型鉴定和全基因组选择是该策略的两个重要组成部分。全基因组策略分子标记辅助育种的基本策略为：①基于种子DNA的基因型鉴定，简化分子标记辅助选择，降低育种成本、增加规模和提高效率；②选择性基因型鉴定和表型鉴定，结合DNA混合池分析，捕获和育种相关的最重要因素；③灵活的基因型鉴定系统，例如，通过测序和芯片进行基因型鉴定，对不同的选择方法进行细化，包括分子标记辅助选择(MAS)、分子标记辅助轮回选择(MARS)和基因组选择(GS)；④结合连锁作图和连锁不平衡作图的方法进行标记-性状关联分析；⑤基于序列的策略进行分子标记研发、等位基因发掘、基因功能研究和分子育种(Xu et al., 2012)。到目前为止，分子标记辅助育种在作物上普遍应用，尤其是在小麦和

水稻中应用最为广泛；分子标记辅助育种多被用于提高作物的抗病性和抗旱性；在利用分子标记辅助育种培育作物品种时，主要是通过基因聚合和渗入将有利基因导入目标品种；分子标记辅助育种主要被用于数量性状改良。另外，连锁图谱构建、目标基因与分子标记的连锁定位及其对育种的影响分析等基础研究工作也很多（袁建霞等，2012）。有资料表明，根据 2010 年 7 月搜寻 FAO-BioDeC 资料库结果显示，有超过 4000 份的生物技术研究资料，其中 912 份与运用分子标记技术有关，912 份中有 650 份是运用在作物上，仅有 262 份与林木方面的研究有关。这进一步表明，林木分子标记辅助育种要比作物滞后。

竹亚科植物染色体数目比较多而且不稳定，散生竹的染色体基本上为 $2n=48$ （李秀兰等，1999），丛生竹则为 $2n=70\pm 2$ （李秀兰等，2001），普遍存在多倍性、非整倍性、混倍性和染色体结构变异等现象。由此看来，竹子基因组的结构和来源十分复杂。到目前为止，我国竹类植物分子标记的研究主要集中在遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱构建、系统进化研究等方面（表 1-1），这些研究为竹类植物分子标记辅助育种奠定了良好的基础，分子标记辅助育种在竹类植物遗传育种上的应用研究鲜见报道，有待于开展。

表 1-1 分子标记在我国竹类植物研究中的应用进展（1998~2014 年）

标记（技术） 类型	竹类植物种类	研究内容	参考文献
RAPD	孝顺竹、凤尾竹、绿竹、白绿竹	遗传多样性分析，构建指纹图谱	吴益民等（1998）
	苦竹类植物	种间遗传相似性分析	杨光耀和赵奇僧（2000）
	雷竹的 19 个栽培类型及 2 个近缘种	对竹类植物种以下等级进行分类	方伟等（2001）
	毛竹与其同属的 2 个近缘种及毛竹种下的 7 个变型或栽培型	遗传关系研究	师丽华等（2002）
	6 个群体 30 丛撑篙竹个体	遗传多样性分析	邢新婷等（2003）
	巨龙竹	遗传多样性分析	李鹏等（2004）
	苦竹及近缘竹（共 17 个竹种）	系统进化分析	
	22 个不同栽培类型的绿竹	遗传多样性分析	余学军等（2005）
	锦竹和其可能的亲本及其他 4 个近缘竹种	遗传关系分析	童子麟（2006）
	四川不同地区慈竹和硬头黄竹	遗传多样性分析	郭晓艺等（2007）
RAPD、ISSR	四川不同地区梁山慈竹	遗传多样性分析	蒋瑶等（2008）
	四川不同地区硬头黄竹	遗传多样性分析	蒋瑶等（2009）
	四川不同地区慈竹	遗传多样性分析	陈其兵等（2009）
ISSR	假毛竹和毛竹正反交杂种	杂种鉴定	娄永峰等（2010a）
SSR	3 个杂交竹种	杂种鉴定	卢江杰等（2009）
	4 个丛生杂种竹，即‘撑麻 7 号’、‘版麻 1 号’、‘青麻 11 号’和‘撑麻青 1 号’	杂种鉴定	吴妙丹等（2009）
	毛竹	部分竹类植物的系统分类学研究	刘贯水（2010）

续表

标记(技术)类型	竹类植物种类	研究内容	参考文献
EST-SSR	毛竹	用于竹子种内或种间的 SSR 标记分析	杨丽等(2011)
	15 个具有代表性的丛生竹种	种间杂种鉴定	Dong 等(2011a)
	毛竹、菲白竹、铺地竹、斑竹、雷竹、紫竹、大叶箬竹、小叶箬竹、茶秆竹、平安竹、大明竹和红秆寒竹	遗传多样性分析	张智俊等(2011)
	慈竹及其变异类型共 9 种	遗传多样性分析	高志民等(2012a)
AFLP	21 个不同产地的绿竹	遗传多样性分析	卢江杰等(2008)
	26 个竹子种类, 其中刚竹属竹种 23 种, 苦竹属竹种 2 种, 唐竹属竹种 1 种	竹子类群系统关系	李潞滨等(2008)
	16 种箬竹和 5 个形态相似的外源竹种	遗传多样性分析	牟少华等(2009)
	6 属 35 种竹, 其中 14 种刚竹属竹种, 11 种苦竹属, 3 种大节竹属, 4 种唐竹属, 1 种业平竹属与 2 种短穗竹属	竹类植物属间亲缘关系	胖铁良(2009)
	筴竹 2 个种群	遗传多样性分析	茹广欣等(2010)
AFLP、ISSR、SRAP	刚竹属和矢竹属 4 个竹种的 12 个变异变型	遗传变异分析	娄永峰等(2011)
AFLP、SRAP	对 9 个哺鸡竹类竹种(含 2 个变型)	遗传关系研究	娄永峰等(2010b)
AFLP、SRAP、ISSR	毛竹	种质资源鉴定	郭起荣等(2010)
ACGM	竹亚科 5 个属(刚竹属、大明竹属、箬竹属、赤竹属、箭竹属) 13 个种	遗传分类研究	董德臻等(2007)
	10 个毛竹不同栽培变种及其 2 个近缘种	遗传多样性分析	郭小勤等(2009)
45S rDNA	散生竹类的毛竹和斑竹, 混生竹类的茶秆竹、日本矮竹、菲白竹和铺地竹及丛生竹类的白绿竹	竹子植物染色体上的定位	徐川梅等(2009)
核糖体 ITS 序列	广义青篱竹属	亲缘关系研究	诸葛强等(2004)
	箬竹属及其相关种	系统进化研究	Song 等(2012)
叶绿体 5S rDNA ITS 序列	刚竹属植物	系统分类研究	李潞滨等(2009)

第二节 竹类植物功能基因分离

竹类植物是十分重要的森林资源, 在我国林业生产中占有十分重要的地位。竹类植物多年生, 具有开花周期长的生物学特性, 难以通过传统育种手段对其进行遗传改良。分子生物学技术的长足发展为竹类植物遗传改良提供了新的契机, 其功能基因的分离和研究日益得到广大科学工作者的重视。目前, 我国竹类植物功能基因分离和研

究主要集中在细胞壁生物合成相关基因、光合作用相关基因、抗逆相关基因及开花相关基因等方面。

一、细胞壁生物合成相关基因

竹类植物细胞壁直接影响竹材特性,细胞壁的生物合成与调控是其遗传改良的一个重要内容,分子生物学技术的快速发展及其他植物细胞壁生物合成基因的分离和克隆,为从分子水平研究竹类植物细胞壁的生物合成提供了很好的借鉴。目前,我国竹类植物细胞壁生物合成相关基因的研究,主要集中在木质素和纤维素生物合成代谢途径中相关调控基因的分离、克隆与功能验证上。

木质素生物合成代谢途径中相关调控基因分离主要集中在毛竹 (*Phyllostachys edulis*)、绿竹 (*Bambusa oldhamii*)、慈竹 (*Bambusa emeiensis*) 等竹种上。高志民等 (2009a) 采用 RT-PCR 及 RACE 方法从毛竹中克隆了苯丙氨酸裂解酶 (*PAL*) 基因 cDNA 全长 (*PePAL1*), 并对其进行了相关分析和组织特异性表达研究; 杨学文 (2009a) 从 cDNA 文库中分离克隆了编码木质素单体合成途径中几个关键酶的基因, 即香豆酸-3-羟化酶 (*C3H*)、肉桂酰辅酶 A 还原酶 (*CCR*)、肉桂醇脱氢酶 (*CAD*) 的编码基因, 以及阿魏酸-5-羟化酶类似基因 (*F5H-like*), 着重研究了 *C3H*、*F5H-like* 基因的表达模式, 并通过转基因的方法初步研究了 *F5H-like* 基因的可能功能。李雪平等 (2007, 2008) 采用 RT-PCR 及 RACE 方法从绿竹中分别分离了咖啡酸-3-*O*-甲基转移酶 (*COMT*) 基因家族的一个基因 (*BoCOMT1*) 和咖啡酰-CoA-3-*O*-甲基转移酶 (*CCoAOMT*) 家族的一个基因 (*BoCCoAOMT1*), 其中 RT-PCR 结果显示, *BoCOMT1* 在茎中的表达量约为叶中的 2 倍。4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (*4CL*) 是苯丙氨酸途径中的关键酶, 在苯丙氨酸途径中起着重要作用, 是苯丙氨酸途径中联系木质素前体和各个分支反应的纽带。胡尚连等 (2009) 采用 RT-PCR 及 RACE 方法从慈竹中分离了 *4CL* 基因家族的一个基因 (*Na4CL*), 并构建了 RNAi 植物双元表达载体: pBI-*4CL*-RNAi, 采用农杆菌介导技术转化烟草, 已证明可以降低转基因烟草茎秆的木质素含量 (周建英等, 2010); 周美娟等 (2012) 和吴晓宇等 (2012) 采用 RT-PCR 及 RACE 方法分别从慈竹中分离了 *NaC3H*、*NaC4H*、*NaCOMT* 和 *NaCCoAOMT* 基因。

纤维素合成酶基因的分离在毛竹 (*Phyllostachys edulis*)、绿竹 (*Bambusa oldhamii*)、慈竹 (*Bambusa emeiensis*) 和雷竹 (*Phyllostachys praecox*) 等竹种上有见报道。张智俊等 (2010) 根据物种间同源基因设计引物, 对构建好的毛竹笋全长 cDNA 文库进行大规模 PCR 筛选, 成功分离出了一个毛竹纤维素合成酶基因 *PeCesA*, 运用实时荧光定量核酸扩增检测系统 (real-time quantitative PCR detecting system, QPCR) 分析 *PeCesA* 基因的组织表达特异性发现, *PeCesA* 在毛竹根部的表达量最高, 茎部其次, 叶中较少; 在竹笋基部的表达量远远高于竹笋上部, 推测 *PeCesA* 参与了毛竹次生细胞壁中纤维素的生物合成。邓小波 (2011) 采用 RT-PCR 及 RACE 方法在慈竹嫩茎中分离出 2 个编码纤维素合成酶全长基因, 分别命名为 *NaCesA2* 和 *NaCesA3*, 生物信息学分析结果表明, *NaCesA2* 和 *NaCesA3* 与绿竹和毛竹纤维素合成酶 (*CesA*) 基因亲缘关系很近, RT-PCR 分析结果表明, *NaCesA2* 和 *NaCesA3* 基因在幼嫩组织中表达量较高, 推测其可能参与慈竹初生细

胞壁的形成并调节植株生长。杜亮亮等(2010)根据绿竹纤维素合成酶(cellulose synthase)基因的保守区序列设计引物,以雷竹 cDNA 为模板,采用 PCR 方法,成功分离了雷竹 1 个纤维素合成酶基因 *PpCesA1*。Chen 等(2010)从绿竹中分离出 8 个纤维素合成酶基因,即 *BoCesA1*~*BoCesA8*,组织表达分析结果表明,*BoCesA2*、*BoCesA5*、*BoCesA6* 和 *BoCesA7* 可能参与初生细胞壁的沉积,而且与绿竹的生长有密切关系。

竹类植物的快速生长与其体内蔗糖代谢密切相关,在蔗糖代谢过程中蔗糖合酶基因起到重要的调控作用,Chiu 等(2006)从绿竹中首先分离出 4 个蔗糖合酶基因,即 *BoSus1*~*BoSus4*,它们在不同器官中都表达,但其调控作用不同,它们的表达强度和绿竹的生长速率一致,并提出在绿竹上至少有 4 个编码蔗糖合酶的同源基因,而且在竹子体内各自起的作用不同,对竹子的快速生长起着重要作用。此外,张绍智等(2008)运用 TD-PCR (touchdown PCR) 的方法,从巨龙竹中克隆了一个大小为 474bp 的蔗糖磷酸合成酶基因 *sps* 片段。

二、光合作用相关基因

竹类植物生长速度快,与其他植物相比,单位时间内有效积累的有机物质多,对光能的同化能力很强,这种特性与竹类植物自身的光合作用系统密切相关,可以通过分子生物学手段研究其光合作用系统相关调控功能的基因,对研究竹类植物光合作用系统的分子调控机制及其遗传改良具有十分重要的意义。近年来,我国光合作用相关功能基因的研究主要集中在毛竹(*Phyllostachys edulis*)和绿竹(*Bambusa oldhamii*)上,如捕光叶绿素 a/叶绿素 b 结合蛋白基因是绿色植物光合系统中的重要基因,其编码的蛋白质与色素所形成的蛋白复合体在光化学反应、光保护等方面都起着重要的作用。采用 RT-PCR 技术与 RACE 技术,从绿竹中克隆了叶绿素 a/叶绿素 b 结合蛋白基因(chlorophyll a/b binding protein, *cab*) *cab-BO1*、*cab-BO2* (高志民等, 2007a, 2007b) 和 *cab* 家族的一个基因 *BoLhca4-1*, RT-PCR 检测发现, *BoLhca4-1* 在叶片中的表达量较鞘和茎中要高(李雪平等, 2010); 从毛竹中分离出捕光叶绿素 a/叶绿素 b 结合蛋白基因 *cab-PhE1*、*cab-PhE2*、*cab-PhE3*、*cab-PhE6* 基因(高志民等, 2009b, 2012b)、*cab-PhE11* 基因(刘颖丽等, 2008), 并对其表达进行了分析。从毛竹中分离到 12 个捕光色素结合蛋白基因, 分别属于光系统 II (photosystem II, PS II) 的 *lhcb1*~*lhcb6* 类基因, 其中 *lhcb1*~*lhcb3* 编码的蛋白质属于大量捕光天线, *lhcb4*~*lhcb6* 编码的蛋白质属于微量捕光天线(刘颖丽, 2008)。 *lhca1* 是编码光系统 I (photosystem I, PS I) 复合物中最主要的捕光色素蛋白复合体 I (LHC I) 的基因, 采用 RT-PCR 法, 从毛竹中克隆了捕光叶绿素 a/叶绿素 b 结合蛋白基因 *LhcaPe01* 和 *LhcaPe02*, 从红壳竹和角竹中分别克隆了长度分别为 616bp、613bp 的捕光叶绿素 a/叶绿素 b 结合蛋白基因片段 *LhcaH01* 和 *LhcaJ01* (唐文莉等, 2008a, 2008b)。

三、抗逆相关基因

生物胁迫和非生物胁迫严重影响植物的正常生长发育, 该方面研究也是植物育种领

域的一个重要内容。近年来,我国也开展了竹类植物抗逆胁迫分子生物学方面的研究,这是利用基因工程手段研究和改良竹类植物抗逆性一个很好的切入点。锌指蛋白基因家族对非生物胁迫因子,如低温、干旱等,具有一定的调控效应,在非生物胁迫条件下,植物体内的锌指蛋白可通过与 DNA 或 RNA 结合,或者与 DNA 和 RNA 双向结合来促进或抑制转录,对非生物胁迫做出响应。有研究表明,采用 PCR 方法从毛竹中成功扩增出 1 个长度为 495bp、共编码 164 个氨基酸的 *PeZFP* 基因,生物信息学分析结果表明,*PeZFP* 与其他锌指结构蛋白有较高的同源性,与水稻锌指结构抗逆蛋白 *OSIAP1* 序列相似性高达 87.7%,且其序列 C 端具有典型的 AN1 类型的锌指结构 Cx2-4Cx9-12Cx2Cx4Cx2Hx5 HxC,在 N 端具有典型的 A20 类型锌指蛋白结构,推测此 *PeZFP* 是植物抗逆 *OsIAP1* 类似基因,在功能上与毛竹抗逆性相关(刘志伟等,2010)。从绿竹中分离到 1 个 B-Box 型锌指蛋白基因 *BoBZF* (GenBank: EU606025),其编码的蛋白质具有 2 个 B-Box 结构域,属于 B-Box 型锌指蛋白;组织特异性表达显示 *BoBZF* 为组成型表达,在叶片、叶鞘、幼茎和根中均有表达,其中在叶片的表达丰度较高;在拟南芥中异源表达,转 *BoBZF* 基因植株耐旱性明显提高,表明 *BoBZF* 与植物的抗旱能力有关(江泽慧,2012)。植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有稳定细胞质内 Na^+ 浓度和调节 pH 的功能,对植物的耐盐性具有重要的调节作用。张智俊等(2011)利用 RT-PCR 和 RACE 技术从毛竹中分离出 1 个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因 *PpNHX1*,系统发育分析表明,*PpNHX1* 蛋白与禾本科植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的亲缘关系较近,与质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白亲缘关系较远。半定量 RT-PCR 检测结果发现,在 200mmol/L NaCl 胁迫下,*PpNHX1* 基因在 4h 内的表达量随 NaCl 处理时间的延长持续增强,其中根部的表达增强幅度明显高于茎和叶;但 4h 后,*PpNHX1* 在根与叶中的表达量均有所下降。推断 *PpNHX1* 基因在盐胁迫下的表达调控与毛竹耐盐能力密切相关。 β -1,3-葡聚糖酶是一种植物病程相关蛋白,在植物抵御病害中有重要调节作用。张艳等(2010)利用 RACE 技术,从毛竹基因组 DNA 中分离出一个全长 1693bp,包含两个外显子和一个内含子的 *PheGLU* (GenBank: GU238236) 基因,为进一步鉴定毛竹 β -1,3-葡聚糖酶基因的抗真菌病害能力奠定了基础。

四、开花相关基因

开花遗传调控一直是竹类植物研究中的重点和难点,在很大程度上限制了竹类植物杂交育种的进程。近年来,我国竹类植物开花相关基因的分离主要集中在 *MADS-Box* 基因上,涉及的竹种有麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus*) (陈永燕等,2004;田波等,2005)、绿竹 (*Bambusa oldhamii*) (高志民等,2007c)、早竹 (*Phyllostachys praecox*) (林二培,2009)、毛竹 (*Phyllostachys edulis*) (高志民等,2010b)。在绿竹 (*Bambusa oldhamii*) 上分离得到了一个 *TFL1* 基因(Lu, 2011)、版纳龙竹 (*Dendrocalamus xishuangbannaensis*) 上分离得到了一个 *DxCOI* 基因(崔丽莉等,2010)。这些基因中有些基因的功能得到了验证或推测(表 1-2)。

除上述分离的功能基因外,Yeh 等(2011)从绿竹笋中分离出 1 个 *BohLOLI* 基因,它参与竹的生长和对生物胁迫的应答,尤其是对竹的快速生长可能起到重要调控作用。

表 1-2 中国竹类植物开花基因的克隆（2001~2011 年）

竹种	基因名称与注册号	编码序列 cDNA 全长/bp	编码氨基 酸个数	功能	参考文献
麻竹 (<i>Dendrocalamus latiflorus</i>)	<i>DIMADS18</i> (GenBank: AY599755)	750	249	可能参与麻竹开花 时间的调控	田波等 (2005)
	<i>DIEMF2</i> (GenBank: DQ251440)	1893	630		许红等 (2008)
绿竹 (<i>Bambusa oldha- mii</i>)	<i>BOMADS1</i> (GenBank: EF517293)	723	240	属于 E 类功能基因	高志民等 (2007c)
	<i>TFL1</i> (GenBank: HM641253)	522	173		Lu (2011)
早竹 (<i>Phyllostachys praecox</i>)	<i>PpMADS1</i> (GenBank: EU352648)	774	257	参与花的早期发育	林二培 (2009)
	<i>PpMADS2</i> (GenBank: FJ197198)	579	192	参与花的早期发育, 还与竹子小花的雄 蕊发育有关	林二培 (2009)
毛竹 (<i>Phyllostachys edulis</i>)	<i>PeMADS1</i> (GenBank: EU327784)	723	240	可能参与毛竹由营 养生长转向生殖生 长的发育调控	高志民等 (2010b)
版纳龙竹 (<i>Dendroca- lamus xishuangbanna- ensis</i>)	<i>DxCO1</i> (GenBank: GQ358925)	933	310		崔丽莉等 (2010)

五、竹类植物开花基因克隆

开花是植物从营养生长向生殖生长的转变过程，在这一过程中植物内在的遗传机制，即与调控植物开花相关基因的表达是实现这一转变过程的基础，环境信号则对这些基因的表达起调控作用。以往高等植物成花决定过程的分子生物学研究结果表明，许多相互作用的基因构成一个复杂的动态遗传网络调控系统，共同调控植物花的发育 (David et al., 2012)。根据植物控制开花过程基因调控作用阶段的不同，可将植物开花相关基因分为两大类，即开花决定基因和器官决定基因 (Koornneef et al., 1998)。MADS-Box 基因是一类对植物发育起重要调控作用的转录调控因子 (Megan and Ben, 2011)，不仅对花的形态建成和开花时间起重要调控作用，对胚胎发育、根的形成及果实的发育也有调控作用。例如，拟南芥的 MADS-Box 基因中，SOC1、API、AGL24 等对开花起促进作用，而 FLC 和 SVP 等基因抑制成花转变，并通过抑制成花途径中 SOC1 和 LFY 等基因的表达而抑制开花。有关成花基因克隆和调控方面的研究在模式植物拟南芥上取得了很大成绩，但竹类植物难于开花的生物学特性，使竹类植物在开花基因克隆和调控方面的研究尚处于起步阶段。

我国在麻竹、绿竹、早竹、毛竹及版纳龙竹等竹类植物上开展了开花基因克隆方面

的研究(表 1-2)。2004 年,麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)在 GenBank 上首先注册了 18 个含完整编码序列的 *MADS-Box* 基因,其中 *DiMADS18* 在 *CaMV 35S* 启动子控制下于拟南芥中异位表达,结果表明, *DiMADS18* 很可能参与麻竹开花时间的调控(田波等, 2005)。此外,从麻竹茎尖组织中克隆了 *DIEMF2* 基因,其过表达使拟南芥开花时间明显延迟(许红, 2008)。2007~2011 年,从绿竹(*Bambusa oldhamii*)中相继克隆到 6 个与开花有关的基因,即 *BOMADS1*、*BoF2*、*BoF4*、*BoF6*、*BoFCA* 和 *TFL1*。2009 年,从早竹中分离到两个新的 *API/SQUA-like* (*SQUA* 家族类似基因)基因,命名为 *PpMADS1* 和 *PpMADS2*。序列和系统进化分析表明,这两个基因分别属于禾本科 *API/SQUA-like* 基因的 *FUL3* 和 *FUL1* 支系,它们在拟南芥转基因植株中的过表达结果表明,能够通过上调 *API* 基因的表达水平而明显促进拟南芥提早开花。酵母双杂交实验结果表明,这两个基因可能在竹子开花的不同信号途径中起调控作用。*PpMADS1* 和 *PpMADS2* 都参与了花的早期发育,而 *PpMADS2* 还与竹子小花的雄蕊发育有关,可能对早竹花的发育有更重要的作用(林二培, 2009)。2010 年从毛竹中分离到 1 个 *MADS-Box* 基因,命名为 *PeMADS1* (GenBank: EU327784),其具有典型的植物 *MADS-Box* 基因结构,与拟南芥的 E 类功能基因 *AGL6* 编码蛋白的一致性为 57.2%,该基因可能参与毛竹由营养生长转向生殖生长的发育调控(高志民等, 2010b)。此外,从版纳龙竹中克隆出 1 个 *CO-like* 基因,命名为 *DxCO1*,可能对其开花调控有着重要作用(崔丽莉等, 2010)。

综上所述,与拟南芥模式植物比较,竹类植物成花基因的克隆与调控研究还相差甚远,仍有待继续深入开展研究,为竹类植物杂交育种和竹林的可持续生产提供理论依据。

六、竹类植物基因组研究

在植物基因组中,草本植物拟南芥和粮食作物水稻及木本植物杨树都已完成全基因组测序,并绘制出各自的基因组完整图谱。在对人类有重要利用价值的植物中,除水稻和杨树外,竹类植物也是一个有重要应用价值的物种之一,其共有 70 余属,1200 余种,主要分布于热带和亚热带地区。中国是世界上最主要的竹子生产国,共有竹类植物 48 属,近 500 种,主要分布在北纬 40°以南亚热带地区(主要分布在长江以南的浙江、福建、江西和湖南 4 省),竹林面积约 720 万 hm^2 ,其中毛竹(*Phyllostachys pubescens*)分布范围最广、面积最大、经济利用价值最高(江泽慧, 2002),是科学家研究的一个重要经济竹种。已有研究表明,竹类基因组比较大,其 DNA 含量为 2.45~5.3pg,其中温带竹(如刚竹属)DNA 含量较高,为 4.17~5.3pg (Gielis et al., 1997)。一般认为竹子染色体基数为 $x=12$,散生竹为四倍体 ($2n=4x=48$),而丛生竹为六倍体 ($2n=6x=72$)。毛竹为散生竹种,其体细胞染色体数 $2n=48$ (李秀兰等, 1999)。由此看来,毛竹基因组的复杂性要比一些重要丛生竹种(如慈竹等)的简单些,可以毛竹为竹类植物研究的模式植物,开展毛竹基因组研究,无论从基础理论研究还是应用研究上都具有重要意义。

我国科学家于 2007 年在《中国科学》上首次对毛竹基因组的序列构成进行了初步描述,该研究以被测序的玉米(B73)和水稻(日本晴)基因组作为内参,利用流式细胞仪(FCM)获得大小约为 2034Mb 的毛竹基因组,其与玉米基因组大小相仿,远大于水稻基因组。为了明确毛竹基因组是否与玉米基因组一样由大量重复序列组成,进行了毛竹基