

草坪草离体再生培养的研究现状及发展前景*

陈智勇, 易自力, 杨立斗

(湖南农业大学 理学院, 中国湖南 长沙 410128)

摘要: 草坪业是近年来我国兴起的一个新产业. 草坪草的品质直接关系到草坪的质量和寿命. 为了适应当前草坪业的需要, 科学工作者不断寻求各种途径选育新品种. 离体再生培养无疑是其中十分有效的手段之一. 主要阐述了草坪草离体再生培养的研究意义和现状, 并展望了离体再生培养应用于草坪草新品种选育的美好前景.

关键词: 草坪; 草坪草; 离体再生培养; 新品种

中图分类号: S812

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2002)S1-0021-04

The Approach and Prospect in Isolated Culture of Turf

CHEN Zhi yong, YI Zi li, YANG Li dou

(Department of Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract: Lawn industry is a developing industry in our country. The attributes of turf play a crucial role in the quality and longevity of the lawn. Scientists having looking for all kinds of means to culture new species for adapting the requirement of turf. Isolated culture is one of the most usefulness ways. The signification and the current approach in isolated culture of turf are discussed, and the prospect of turf isolated culture for the new varieties is displayed.

Key words: lawn; turf; isolated regeneration culture; new varieties

(Life Science Research, 2002, 6(Suppl): 21~ 24)

1 草坪草离体再生培养的研究意义

草坪在人类生活中起保护、改善和美化环境的作用, 是衡量一个国家文明程度和生态环境好坏的重要标志之一^[1]. 近年来, 草坪的作用在我国越来越受到人们的重视, 草坪业的发展遇上了前所未有的机遇, 草的价值、地位和作用正在发生根本性的变化, 它已从单一的经济职能转变为集经济、生态和社会效益于一体的产业, 在保障人们生存和生活方面起到越来越重要的作用.

草坪草从它们对气候的适应情况来分, 主要是两种类型: 暖季型草和冷季型草. 暖季型草主要有: 结缕草属(*Zoysia* Willd) 的细叶结缕草(*Zoysia japonica*)、沟叶结缕草(*Zoysia matrella*), 狗牙根属(*Cynodon* Rich) 的百慕大(*Cynodon dactylon*)、天堂(*Tifton*), 野牛草属(*Buchloe* Engelm) 的野牛草(*Buchloe cactyloides*) 等. 冷季型草主要有: 羊茅属(*Festuca* L) 的高羊茅(*Festuca arundinacea* Schred)、紫羊茅(*Festuca rubra*)、黑麦草属(*Lolium* L) 的意大利黑麦草(*Lolium multorum*)、多年生黑麦草(*Lo-*

* 收稿日期: 2002-04-06; 修回日期: 2002-10-14

作者简介: 陈智勇(1971), 女, 湖南衡阳人, 湖南农业大学理学院硕士研究生, E-mail: zhiyongchen71@163.com

lium perenne)、梯牧草属 (*Phleum* L.) 的猫尾草 (*Phleum pratense* L.), 早熟禾属 (*Poa* L.)、剪股颖属 (*Agrostis* L.) 的一些品种等^[2,3]。

然而, 我国领土辽阔, 位于北纬 3° 59' 到 53° 33', 南北跨度 49° 34', 气候十分复杂. 东半部自北到南可分为寒温带、温带、暖温带、亚热带和热带, 同纬度地区的气候变化也很大^[4], 草种引进时还存在原种地与引进地气候的差异, 许多在原种地四季长青的草坪草, 引种后都有枯黄期. 所以, 获得能适应各种恶劣气候的优良品种一直是人们追求的重要目标. 长期以来, 草坪草的品种选育主要是通过传统的有性杂交和引种驯化技术进行的, 但这种传统的方法所需的育种时间长、费用高, 而且可利用的遗传资源十分有限. 近年来, 现代生物技术的兴起与发展, 为农业育种开辟了许多崭新的途径. 作为生物技术的主要组成部分的植物离体培养技术, 在草坪草中, 已被广泛应用. 通过离体培养技术培育新的品种, 可以大大缩短育种时间, 可以打破种属间的生殖隔阂, 使可利用的遗传资源更加广泛.

2 草坪草离体再生培养的研究现状

2.1 冷季型草的离体再生培养

草坪草中, 冷季型草离体培养起步较早, 在 1975 年, B. S. Ahloowalia 就利用三倍体黑麦草 (*Lolium* sp.) 的幼胚作为外植体, 用 2, 4-D 诱导出了愈伤组织, 并通过愈伤组织分化得到了再生植株^[6]. 1982 年, Johns M. G. K 和 Dale P. J. 仍是利用多花黑麦草 (*L. multiflorum*) 的幼胚作为外植体, 首先诱导出胚性细胞, 然后, 通过将这些胚性细胞悬浮培养得到了原生质体, 这是最早的在草坪草的离体培养中得到原生质体的事例, 但遗憾的是, 这次实验最终的培养结果只是愈伤组织^[5]. 1984 年, William A. Torello 和 A. G. Symington, 将 Youktown II, 一种多年生黑麦草 (*L. perenne* L.) 通过诱导成熟胚脱分化得到愈伤组织, 再诱导愈伤组织脱分化也成功地得到再生植株^[7]. 在 Johns M. G. K. 和 Dale P. J. 的工作基础上, 1989 年, 我国的孙敬三用竹叶兰羊茅 (*Festuca arundinaceus*) 幼穗作为外植体, 诱导得到胚性细胞, 并通过悬浮培养得到原生质体, 而且更进一步, 通过原生质体培养得到了再生植株^[8], 可以说, 他的工作又上了一个新的台阶.

另外, 在生产实践中人们发现, 高羊茅的抗旱

耐热性及耐磨性较强, 对此的研究也相应增多. 陈文品、吴琴生等在 1991 年, 将高羊茅的胚性细胞通过悬浮培养得到了原生质体^[9], 这次的实验没能得到再生植株. 随后, 支月娥、何亚丽等利用高羊茅的幼穗、节外植体诱导出愈伤组织^[10], 并且在这篇报道中, 作者提到了利用热击处理提高诱导率的问题. 为了提高生物产量, 陈文品、曹明树等将四倍体高羊茅和多花黑麦草 F1 杂种用幼胚培养诱导愈伤组织, 最终分化得到了再生植株^[11], 可是, 此种新品种无法结实, 只能无性繁殖, 无很大推广意义.

随着草坪业的发展, 离体再生培养越来越受到重视, 这方面的研究也越来越细致深入. 如: 黑麦草再生体系的建立及不同培养基和激素的影响^[12]. 另外, GUO, Y. D 和 PULLI, S. 通过对猫尾草 (*Phleum pratense* L.) 的小孢子的离体培养, 得到单倍体植株, 并得到了纯合的二倍体苗^[13], 这是首例利用小孢子进行培养并成功得到纯合二倍体苗, 是一个很了不起的突破, 通过这种方式可以得到优良草种的纯合二倍体, 将优秀性状保持, 以避免在遗传过程中出现分离现象, 性状逐渐消失. 另外, 鸭茅属的鸡脚草 (*Dactylis glomerata* L.), 利用成熟胚的诱导培养, 也通过愈伤组织途径得到再生植株^[14].

2.2 暖季型草的离体再生培养

对暖季型草的研究相对于冷季型草来说要少一些, 相关报道见得很少. 国内, 钮友民对引种野生草“华美一号” (*Buchloe cactyloides*) 进行了愈伤组织的诱导 (1996)^[15], 最终未得到再生植株. 另外, 国外 Ashok Ch�udhury 和 Qurongda 对百慕大 (*Cynodon dactylon*) 进行愈伤组织的诱导, 而且得到再生植株^[16].

另据杭州植物园柴明良报道, 国外还有采用 PEG 法, 将同时带有抗潮霉素标记基因的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶 (*pat*) 基因共同转化进入结缕草的原生质体. 采用高浓度的潮霉素 (400 mg/L) 进行筛选, 得到一些愈伤组织, 并从这些具抗性的愈伤组织中得到约 100 棵再生植株. 聚合酶链反应和 Southern 杂交分析表明, 所有供试植株含一个或多个引入的对潮霉素具有抗性的基因, 并且一半以上植株含一个或多个引入的 *pat* 基因. 经对 *pat* 转化的结缕草进行除草剂处理, 未出现坏死现象, 证实转基因植株中 *pat* 基因已具功能性表达^[17].

从已有的研究中我们可以看到,对草坪草不同的外植体:节、幼穗、幼胚、成熟胚、花粉粒小孢子进行离体培养,得到愈伤组织或原生质体,再由此得到再生植株,已经有很多成功的范例。尤其, GUO, Y. DI PULLI S. 通过对猫尾草(*Phleum pratense* L.)的小孢子的离体培养,得到单倍体植株,并得到了纯合的二倍体苗。另外,国外利用PEG法从原生质体再生转基因结缕草,并且基因得到功能性表达,使我们人为改造草坪草品质的水平上了一个大的台阶。这表明基因转化在草坪草中是完全可以实现的,这为草的品质改善提供了更加快捷,更加广阔的途径。同时,对培养过程中各种激素、培养基、激素浓度的不同配比也有相当的研究。但非常遗憾,大部分的研究在建立起了再生体系之后没有继续下去,仍然没有解决改良草坪草品质的根本问题。

3 草坪草离体再生培养选育新品种的研究展望

现在,草坪业已经走了产业化的道路,草种的抗性、与杂草的竞争力是任何一种草坪草在 market 立足的根本。利用生物工程,从根本上改良草种,是许多研究人员正在从事的工作。以往的离体再生培养研究很多着重于草坪草的染色体研究、核型分析,或建立原生质体、愈伤组织再生体系,在理论上有非常重大的意义,却没能跟生产实践结合。但这些工作为以后选育新品种的研究奠定了基础。

3.1 利用离体再生系统筛选体细胞无性变异系

我们可以利用组织培养技术、细胞工程技术,借鉴他人的经验得到愈伤组织再生系统、原生质体再生系统。在此基础上,通过抗性实验,诱导这些系统在再生的过程中发生变异,得到新品种。如:冷季型草通过进行抗旱耐热锻炼,筛选出新的品种,使它们在夏季能耐受高温干旱的天气,平安越夏;暖季型草通过进行抗寒锻炼,得到新品种,可以在秋冬季节不枯黄。这些问题如得以解决,那么广大的亚热带地区,华东、华中、四川、贵州等地区,就不会因为处于过渡地带,种冷季型草出现夏季草坪枯黄,种暖季型草出现秋冬季枯黄,草坪青黄不接^[3]。而是可以四季长青,真正起到美化生活,改善城市环境的目的。而且,现在全球气候变暖,华北地区、胶东半岛近几年也出现夏季连续高温,最高温度有超过 38℃,这样本适宜在那些地

区生长的一些冷季型草也同样面临抗旱和耐热的问题。解决冷季型草的抗旱耐热问题,筛选出一个新的品种,将可以在我国的大部分区域得到推广,前景相当可观。同时,也可以用矮壮素、多效唑等试剂对愈伤组织等进行处理,筛选出低矮品种,这样不仅可以抗倒伏,还可以减少刈割费用。

3.2 离体再生系统的建立为体细胞杂交提供可能

离体再生培养得到原生质体后,由于它没有细胞壁,它完全可以像动物细胞那样,在诱导条件下超越性细胞的不亲合障碍,进行各种远源种间细胞杂交。如一些抗性强但株形不好,质地不细致的草种可以跟色泽鲜艳,质地细致的草种杂交,将两者的优势体现出来。

3.3 离体再生系统的建立是外源基因转化的前提

同时,愈伤组织或原生质体可以为外源基因的转入提供受体系统。除前面提到过的PEG法,还可以利用电激法、显微注射法、超声波导入法等将基因转入受体系统,但是,这些方法使用的前提是首先要得到原生质体,原生质体的制备是比较困难的,费时较长。所以在选用受体系统时,最好用愈伤组织。基因枪法可以越过植物细胞细胞壁的障碍,将外源基因直接导入细胞,加上标记基因,可以很快鉴定外源基因是否整合。但利用基因枪法可能出现多拷而导致基因沉默的现象,以致外源基因无法表达。农杆菌转化法是一种生物天然转化法,外源基因多为单拷贝转入,转化后遗传稳定性较强^[6]。因其操作简便、实用,被越来越多的人所接受,而且,在添加酚类物质后,它同样可以侵染单子叶植物,并且在水稻中已有先例。所以,我们完全可以利用农杆菌转化系统,用愈伤组织作为受体,将外源基因转入草坪草中。这样,基因的选择不受种属间的限制,来源广泛。如:我们可以将深海鱼类体内的抗寒基因转入暖季型草种,将苏云金杆菌细胞中提取的BT基因转入草坪草中^[18],可以将几丁质酶基因、抗除草剂基因等转入草坪草中,得到抗虫、抗病,能与杂草竞争的草种,以适应草坪草在国内外日益增长的需要。

总之,草坪草的离体再生培养作为一项技术,可以为草坪草新品种的选育开拓一个美好的前景。由此而生产出的新的优良草种,将更好地适应我国草坪业发展的需要。

参考文献(References):

- [1] 韩烈保. 草坪管理学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1994.
- [2] 胡叔良. 现代草坪学概况及进展[J]. 中国草地, 1994, 6: 57-63.
- [3] 罗伯特. 爱蒙斯. 草坪科学与管理[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [4] 候学煜. 中国自然地理. 植物地理(下册)(中国植被地理)[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [5] 邵立波. 禾本科植物的组织培养及其应用[J]. 广西植物, 1992, 12(1): 41-48.
- [6] AHLQOWALIA S. Regeneration of Ryegrass Plants in Tissue Culture[J]. Crop Science, 1975, 15(4): 449-452.
- [7] WILLIAM A, TORELLO, SYMMGTON A G. Regeneration from Pennial Ryegrass Callus Tissue[J]. Hortscience, 1984, 19(1): 56-57.
- [8] SUN C S. Regeneration of haploid and dhaploid plants from protoplasts of supersweet(sh2 sh2) corn[J]. Plant Cell Rep, 1989, 8: 313-316.
- [9] 陈文品, 吴琴生, 刘大钧. 苇状羊茅原生质体的培养研究[J]. 中国草地, 1991, 3: 75-76.
- [10] 支月娥, 何亚丽, 田龚. 高羊茅组织培养初报[J]. 上海农学院学报, 1998, 16(1): 46-48.
- [11] 陈文品, 曹明树, 张航宇, 等. 四倍体苇状羊茅和多花黑麦草 F1 杂种的幼胚培养及再生植株的形态特征[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(1): 9-12.
- [12] RIM Yongwoo, KM Kiyong, CHOI Keejun *et al.* Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration[J]. Journal of the Korean Society of Grassland Science, 2000, 20(1): 25-30.
- [13] GUO Y D, PULLI S. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy(*Phleum pratense* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(8): 761-767.
- [14] LEE Hyoshin, KWON Yong-shan, *et al.* Plant regeneration from embryogenic suspension culture of orchardgrass(*Dactylis glomerata* L.) [J]. Journal of the Korean Society of Grassland Science, 2000, 20(1): 7-12.
- [15] 钮友民, 柴明良, 钟玮. 野牛草引种及试管繁殖初报[J]. 杭州植物园通讯, 1996, 13(2): 45-46.
- [16] ASHOK Chudhury, QU Rongda. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf type bermudagrass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 60(2): 113-120.
- [17] 柴明良. 草坪草转基因研究进展[J]. 科技通报, 2002, 1: 67-72.
- [18] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.