

文章编号 :1003-8701(2005)06-0034-03

冷地型草坪草组织培养现状及评述

高明¹,杨长海²,谭旭华¹,田子玉¹,刘艳芝¹

(1.吉林省农业科学院,吉林 公主岭 136100; 2.公主岭市种子管理站)

摘要:系统地介绍了若干冷地型草坪草在组织培养研究方面的研究进展,并对具体的研究方法进行评述。

关键词:冷地型草坪草;组织培养;胚性愈伤组织;再生植株

中图分类号: S688.4; Q813.1

文献标识码: A

草坪草大多是禾本科植物,占90%以上。其特性主要有:①地上部分生长点低位,并有坚韧叶鞘的多重保护;②叶多数,一般小型、细长、直立;③多为低矮的丛生型或匍匐茎型,覆盖力强;④对不良环境的适应能力强;⑤繁殖能力较强。此外,禾本科的大多数种类为草本,质地柔软、植株低矮,因此比较适合建植草坪。我国目前利用的禾本科草坪草多集中于草地早熟禾属、羊茅属、狗牙根属、结缕草属、地毯草属、雀稗属、钝叶草属和蜈蚣草属等属。

像其它大多数作物一样,草坪草育种中突破性品种的育成几乎都取决于优良种质资源的反复杂交。草坪草的改良也一直依赖于传统的育种手段,即限于通过有性杂交后基因重组来传递遗传信息。虽然许多性状,如吸引力、持久性、抗逆性以及产量等已得到长足的改进,但其存在的局限性是显而易见的。首先在传统的育种体系中,遗传变异的效应只有在若干年的选择过程才能得到,产生变异的频率很小,幅度很窄。对于控制数量、质量和抗性性状基因的鉴别以及转移这些基因至一个新的遗传背景中的力量是有限的。其次对于大多数性状而言,育种学家不能通过以前的遗传、生理、生化、病理、昆虫学知识和技术预测这些性状的效应是在何种水平上表现。

现代生物技术兴起并迅速发展,特别是以生物技术为核心的遗传工程的兴起和发展为植物品种改良提供了新的强有力的手段。而无论是采用细胞工程还是基因工程方法改良培育作物新品种,其前提都是要利用组织培养技术建立高效的再生系统。相对于其它作物来说,草坪草的组织培养研究起步较晚,并且由于早期大都采用已成熟和分化的组织作外植体,这样的外植体缺少由形成层或类似组织进行二次生长的自然能力,难以脱分化形成愈伤组织,致使草坪草组织培养的研究进展较慢。到了90年代,Dale用一年生黑麦草未成熟胚建立了再生方法,随后,对各种草坪草外植体建立胚性愈伤组织培养的研究取得了可喜的成绩。在这些成功的例子中,多数是选用成熟或未成熟胚和花序幼穗,通过诱导形成胚性愈伤组织,最后分化获得再生植株。

1 几种主要草坪草组织培养的研究现状

建立一个高效的组织培养再生体系,最为关键的是外植体和培养基的选择。草坪草组织培养外植体的选取依草种及品种而异,其大小、年龄、取材部位都会影响胚性愈伤组织的诱导。培养基的选择也依草种及品种不同而异,一般用含高盐营养溶液的培养基,如MS、LS、N6和SH等,其中MS是草坪草最常用的培养基。培养基中需要2,4-D和6-BA等植物激素的存在,以诱导胚性愈伤组织,胚性愈

收稿日期:2005-03-22

作者简介:高明(1977-),男,吉林市人,研究实习员,主要从事作物遗传育种研究。

伤组织可经过器官发生途径和体细胞胚发生途径再生植株。以下介绍几种主要冷地型草坪草的组织培养现状。

2.1 草地早熟禾(*Poa pratensis* L.)

草地早熟禾的组织培养,国内外研究较早,但报道不多。朱根发等以草地早熟禾胚轴及幼穗为外植体,研究了其培养条件和分化能力。研究表明,草地早熟禾成熟胚愈伤组织的胚胎发生能力很差,胚轴也很难诱导出具较高分化能力的愈伤组织,两者均不是理想的外植体。Van 以花序和成熟种子为外植体建立草地早熟禾再生体系,并发现花序比成熟种子更易于形成胚性愈伤组织。Mc Donnell 等人也认为,草地早熟禾成熟胚愈伤组织的植株再生能力很低,而且多数呈器官发生途径,但由于成熟种子同其它外植体相比,虽然其愈伤组织的芽分化频率较低,但易于获取,且不受季节和植株发育时期等因素限制,具备取材方便、操作简单等优点,因此研究者大多还是首选成熟种子。

一般来讲,以成熟种子为外植体诱导愈伤组织,在培养基中添加 6-BA 是必需的,不同品种间所需 6-BA 的量不同,因而诱导频率相差也很大;混合使用 2,4-D 和 6-BA 可大幅度提高体细胞胚和植株的再生率。Mc Donnell 还发现麦草畏(dicamba)和毒莠定(picloram)较其他植物激素对草地早熟禾的愈伤组织诱导及再生效果更好,并发现通过降温至 15℃,并对愈伤组织进行 4℃的冷处理可以提高芽的出生率,平时常用的 25℃并不是最适温度。Griffin 的结论是混合使用麦草畏和 6-BA 比单独使用 2,4-D、麦草畏和毒莠定,对早熟禾苗的再生具有更好的效果。

2.2 黑麦草(*Lolium perenne* L.)

国外多年来一直致力于通过组织培养及遗传转化技术对多年生黑麦草进行改良,并获得了转基因植株。在国内,关于多年生黑麦草组织培养和遗传转化的研究报道较少,进展非常缓慢,其原因是国内黑麦草的组织培养不够完善。近年来,许多单位加强了这方面的研究,比较详细的研究是刘文真通过试验建立了一套通过胚性愈伤获得再生植株的高效组织培养系统。以多年生黑麦草成熟种子外植体,在所用的愈伤诱导培养基中,MS 无机盐, B5 有机物, 5 mg/L dicamba、0.2 mg/L BAP、300 mg/L CH、200 mg/L Pro、200 mg/L Gln、30 g/L 麦芽糖和 8 g/L 琼脂的组合效果最好,其愈伤组织分化率高达 84%,总的植株再生率为 49.5%。这一体系的建立将为黑麦草的遗传转化打下坚实的基础。

2.3 高羊茅(*Festuca arundinacea*)

与其它重要的禾本科作物相比,高羊茅的组织培养研究远远落后,迄今尚未见较完整的愈伤组织诱导和分化报道。其难点在于高羊茅共生着一种顶孢霉属(*Acremonium coenophialum*)真菌,诱导时容易污染、出愈时间过长及分化率低等。钱海丰采用去除高羊茅种皮,然后用 75%的酒精浸泡 3 min,再以 0.1%升汞液处理 15 min,随后用无菌水彻底洗去残余升汞,成功地使污染率降低到 1%~5%。除此之外,高羊茅组织培养过程中还存在着愈伤组织分化能力的问题,Garcia 和支月娥的研究结果都仅仅是诱导出愈伤组织。钱海丰通过选择花序为外植体,并进行了一系列的激素调控,使分化率达到 73.3%,这一进展为高羊茅的转基因工作带来了生机。

2.4 翦股颖(*Agrostis stolonifera* L.)

相对于其它冷地型草坪草,翦股颖组织培养再生体系比较成熟,原因是愈伤组织或分生组织再生植株的能力较强。陈智勇建立了一个适用范围较广泛的再生体系:以成熟种子为外植体,诱导愈伤组织培养基是 NB+2,4-D 4 mg/L,愈伤组织分化培养基是 NB+6-BA 2 mg/L,可使愈伤组织诱导率达 78.8%,分化率达 90.7%,生根率达 72.1%。由于翦股颖组织培养再生频率高,可重复性强,因此转基因研究也很深入,例如:利用基因枪法已经将 bar 基因转化匍匐翦股颖的愈伤组织,获得了抗除草剂的转基因植物; Rutgers 大学草坪草生物技术小组在建立了匍匐翦股颖愈伤组织诱导再生植物及高效的遗传转化系统后,将几个具有抗病潜势的基因导入匍匐翦股颖品种 Crenshaw 的愈伤组织,期望能获得抗病的匍匐翦股颖品系,其它多方面转基因研究也都取得了很好的结果。

3 冷地型草坪草组织培养研究评述

3.1 成熟胚诱导胚性愈伤组织高效再生

对于禾本科植物来说,建立高频再生体系是一个难题,其原因是很难获得胚性愈伤组织。虽然幼胚或幼穗比较容易获得胚性愈伤组织,但因为幼胚或幼穗较小,操作难度大,且取材受季节限制,因此作为转基因受体,建立成熟胚诱导胚性愈伤组织再生体系则更为必要。而从成熟胚诱导胚性愈伤组织是很困难的,需要对所用培养基的大量元素、微量元素的多少及激素配比进行大量的摸索,寻找最佳组合,才能使其诱导胚性愈伤组织的潜力得到很好的表达。由于愈伤组织的诱导分化培养研究自始至终伴随着转基因过程,因此,前期工作中确定出成熟胚萌发率 \times 愈伤诱导率 \times 分化率 \times 试管苗移栽成活率最高的培养方案至关重要。

3.2 不同基因型的再生能力存在差异

草坪草愈伤组织的诱导和再生与基因型有关,同种草坪草,不同品种间诱导愈伤组织和再生植物的培养基成分可能差异很大,而且有些品种似乎很难获得再生植物。Griffin 的研究结果就表明了这一点,以不同品种的草地早熟禾为材料,同样的再生体系,其再生频率差别很大,有的可达 40%(如 Baron, Fylking, Glade),而有的仅为 1%~5%(如 Adelphi, Amazon, Kenblue, Midningt, Apex)。与暖地型草坪草相比,冷地型草坪草相对较容易诱导胚性愈伤组织并再生植株,尤其是翦股颖的组织培养更容易一些,而暖地型草坪草普遍地再生能力较低。此外,草坪草的生殖方式和品种构成也对组织培养及转基因的应用起到限制作用。如匍匐翦股颖、苇状羊茅和多年生黑麦草为异交育种系统(outcrossing breeding system),栽培品种多为合成品种,由若干个选系组成,最终是一个由遗传上各异的个体组成的群体,组织培养再生或遗传转化其中一个选系仍不能满足商品品种的要求,因此对转基因受体的组织培养体系要求就更高。

参考文献:

- [1] Lee L. Turfgrass biotechnology[J]. Plant Science, 1996, 115(1): 1-8.
- [2] Dale P J. Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*[J]. Z Pflanzenphysiol, 1980, (100): 73-74.
- [3] 朱根发,等.草地早熟禾的组织培养条件和分化能力研究[J].华中农业大学学报,1994,13(2):199-203.
- [4] Van der Valk P, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus of *Poa pratensis* L.(Kentucky bluegrass) [J]. Plant Cell Reports, 1989, (7): 644-647.
- [5] Mc Donnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass [J]. Crop Science, 1984, (24): 573-577.
- [6] Griffin J D, et al. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1995, (14): 721-724.
- [7] Statistic E C. Standing Group on Seeds of the Advisory Committee on Agriculture Product, Health and Safety[M]. Belgium, 1999.
- [8] Wang G R, Binding H, Posselt U k. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplast of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam[J]. J Plant Physiol, 1997, 151: 83-90.
- [9] Dalton S J, et al. Transgenic plants of *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures[J]. Plant Sci, 1998, 132: 31-43.
- [10] 刘文真,等.几种作用因子对多年生黑麦草组织培养影响的研究[J].林业科学研究,2004,17(1):95-101.
- [11] 钱海丰,等.激素对高羊茅愈伤组织诱导及其分化的影响[J].中国草地,2002,24(1):46-49,60.
- [12] Garcia A, et al. Reproductive disturbances and phosphoglucoisomerase instability in *Festuca arundinacea*(tall fescue) plants regenerated from callus and cell suspension cultures[J]. Heredity. 1994, 73: 356-362.
- [13] 支月娥,等.高羊茅组织培养研究初报[J].上海农学院学报,1998,16(1):46-48.
- [14] 陈智勇,等.匍匐翦股颖愈伤组织诱导及其分化的研究[J].园艺学报,2003,30(5):562.
- [15] Warkentin D, et al. Development of transgenic creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) for fungal disease resistance[A]. In: Sticklen MB, Kenna M P(eds). Turfgrass biotechnology-Cell and molecular genetic approaches to turfgrass improvement[C]. Michigan: Ann Arbor Press, 1997, 153-161.
- [17] Liu C N, et al. Prevention of fungal diseases in transgenic bialaphos and glufosinate-resistant creeping bentgrass (*Agrostis palustris* L.)[J]. Weed Sci, 1998, 46: 139-146.
- [18] Belanger F C, et al. Development of improved turfgrass with herbicide resistance and enhanced disease resistance through transformation [A]. In: Clark J M, Kenna M P(eds), Fate and Management of Turfgrass Chemicals[C]. Washington, D C: Oxford University Press, 2000, 325-329.
- [19] 姜健,等.现代草坪科学的研究水平和发展方向[J].吉林农业科学,1997,(3):88-91.