



柱花草

遗传多样性及 转基因育种

研究

蒋昌顺 著



四川大学出版社

国家自然科学基金资助项目 (30160046, 30460087)
热带作物生物技术国家重点实验室开放基金资助项目
华南热带农业大学科技基金资助项目(RNDY0404,RND0407)

柱花草

遗传多样性及 转基因育种

研究

蒋昌顺 著

四川大学出版社



责任编辑:曾 鑫
责任校对:李思莹
封面设计:罗 光
责任印制:杨丽贤

图书在版编目(CIP)数据

柱花草遗传多样性及转基因育种研究 / 蒋昌顺著.
成都:四川大学出版社, 2005.6
ISBN 7-5614-3104-X

I. 柱... II. 蒋... III. 豆科牧草-遗传育种-研究 IV.S542.032

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 065318 号

书名 柱花草遗传多样性及转基因育种研究

作 者	蒋昌顺 著
出 版	四川大学出版社
地 址	成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行	四川大学出版社
印 刷	华西医科大学印刷厂
成品尺寸	185 mm×260 mm
印 张	8.5
字 数	191 千字
版 次	2005 年 9 月第 1 版
印 次	2005 年 9 月第 1 次印刷
定 价	18.00 元

版权所有◆侵权必究

◆读者邮购本书,请与本社发行科
联系。电 话: 85408408/85401670/
85408023 邮政编码: 610065

◆本社图书如有印装质量问题,请
寄回出版社调换。

◆网址: www.scupress.com.cn



蒋昌顺，广西全州人，出生于1967年10月，理学博士，副研究员，曾先后赴美国哥伦比亚国际热带农业中心和英国 St Andrews 大学进修学习。主要从事植物分子遗传学及基因工程的研究。主持和参加国家自然科学基金项目 5 项，参加省部级和国际合作课题 10 余项，已发表专业论文 40 余篇，选育热带牧草新品种 5 个，获得省部级科技进步奖 6 项。

前 言

柱花草是一种优良的热带豆科牧草，原产于中南美洲、北美洲、非洲及东南亚和印度。我国于20世纪60年代初从马来西亚引进柱花草，当时主要作为橡胶种植园的覆盖作物。进入20世纪80年代，许多优良的柱花草种质相继从澳大利亚和哥伦比亚国际热带农业中心引进。目前柱花草已在我国华南热带、亚热带地区被大面积种植和推广，主要用于青饲料、果园覆盖、生产干草粉以及水土保持。

由Stace和Edye编写的目前世界上唯一的柱花草专著《柱花草生物学和农学》于1984年在澳大利亚出版，该书仅从个体和细胞水平研究了柱花草。20世纪80年代，植物分子生物学飞速发展，为柱花草的研究提供了很好的研究手段。1990年，笔者有幸走进了柱花草这个有趣的研究领域，先后从事了柱花草的选育和种质生产、柱花草转基因抗炭疽病育种、柱花草分子标记以及柱花草抗炭疽病机制等的研究，《柱花草遗传多样性及转基因育种研究》就是对这些研究工作的总结。这其中的许多研究工作是本人完成硕士论文和博士论文的重要基础。这些工作分别在中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室、中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所、哥伦比亚国际热带农业中心、四川大学生物技术省重点实验室完成。本人在研究工作中得到了三位恩师的悉心指导，他们是中国热带农业科学院陈守才研究员、哥伦比亚国际热带农业中心植物分子病理学家Segenet Kelemu博士、四川大学生命科学学院张义正教授。本研究得到了国家自然科学基金的资助。在本书的撰写过程中，中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所邹冬梅农艺师给予了大力的支持。在此，笔者表示最诚挚的谢意。

柱花草的研究还在继续，目前出版本书，其内容一定存在某些缺点和不足，因此，还望广大的同仁和读者批评指正。

蒋昌顺

2005年1月18日于海南

目 录

第 1 章 柱花草研究进展	(1)
1.1 柱花草的重要性	(1)
1.2 柱花草炭疽病	(2)
1.2.1 柱花草炭疽病的主要危害	(2)
1.2.2 柱花草炭疽病病原菌的遗传多态性及流行性研究	(2)
1.3 柱花草抗炭疽育种进展	(4)
1.3.1 收集柱花草种质资源培育抗病品种	(4)
1.3.2 引种选育	(4)
1.3.3 辐射育种	(5)
1.3.4 杂交育种	(5)
1.3.5 细胞工程育种	(5)
1.3.6 转基因抗病育种	(5)
1.4 柱花草生物学研究	(6)
1.4.1 柱花草细胞遗传学研究	(6)
1.4.2 柱花草细胞生物学研究	(7)
1.5 柱花草生物技术研究	(7)
1.5.1 柱花草组织培养	(7)
1.5.2 柱花草的原生质体融合	(7)
1.5.3 柱花草基因克隆	(7)
1.5.4 柱花草遗传转化	(8)
1.5.5 柱花草分类及其分子标记	(8)
参考文献	(9)
第 2 章 柱花草种质对炭疽病病原菌的反应	(14)
2.1 引言	(14)
2.2 材料与方法	(15)
2.2.1 供试材料	(15)
2.2.2 炭疽病病原菌	(16)
2.2.3 植株接种试验	(16)
2.2.4 离体叶片接种试验	(17)

2.3 结果	(17)
2.3.1 不同柱花草种质对 2 种类型病原菌的反应	(17)
2.3.2 不同柱花草种质的离体叶片对胶孢炭疽菌 CATAS100 的反应评价	(19)
2.3.3 感病与抗病柱花草种质感病参数比较	(21)
2.3.4 感病与抗病种质病斑扩展比较	(21)
2.3.5 盆栽植株与离体叶片对胶孢炭疽菌抗性的差异	(21)
2.4 讨论	(23)
2.4.1 柱花草炭疽病原菌的危害	(23)
2.4.2 抗炭疽病柱花草种质	(23)
2.4.3 柱花草的抗炭疽病机制	(23)
2.5 小结	(23)
参考文献	(24)
第 3 章 感病与抗病柱花草遗传多样性的 RAPD 分析	(25)
3.1 引言	(25)
3.2 材料与方法	(26)
3.2.1 供试材料	(26)
3.2.2 主要实验仪器	(26)
3.2.3 RAPD 引物	(27)
3.2.4 化学试剂	(27)
3.2.5 培养基	(27)
3.2.6 酶和 DNA 标准分子量	(27)
3.2.7 菌种和克隆载体	(27)
3.2.8 柱花草 DNA 的提取	(28)
3.2.9 柱花草 RAPD 反应体系的建立	(29)
3.2.10 RAPD 数据分析	(29)
3.2.11 RAPD 特异性片段克隆	(30)
3.3 结果	(32)
3.3.1 柱花草 RAPD 反应体系的建立	(32)
3.3.2 RAPD 多态性分析	(34)
3.3.3 聚类分析	(34)
3.3.4 多重对应分析	(35)
3.3.5 RAPD 特异性片段的克隆及其分析	(38)
3.3.6 SG907-1 的氨基酸序列同源性比较分析	(40)
3.4 讨论	(40)
3.4.1 RAPD 扩增的优缺点及克服缺点的措施	(40)

3.4.2 RAPD 聚类分析可靠性	(42)
3.4.3 SG907-1 的克隆	(42)
3.5 小结	(42)
参考文献	(43)
第 4 章 应用微卫星标记分析柱花草的遗传多样性	(45)
4.1 引言	(45)
4.2 材料与方法	(46)
4.2.1 供试材料	(46)
4.2.2 主要实验仪器	(46)
4.2.3 柱花草 DNA 提取	(46)
4.2.4 SSR 分析	(46)
4.2.5 数据分析	(46)
4.3 结果	(47)
4.3.1 柱花草的微卫星多态性	(47)
4.3.2 品系内的遗传变异	(49)
4.3.3 聚类分析	(50)
4.3.4 抗病与感病柱花草品系在聚类树系图中的分布	(50)
4.4 讨论	(51)
4.4.1 SSR 技术分析的效果及其与 RAPD 结果比较	(51)
4.4.2 柱花草种质的遗传多样性及其应用	(52)
4.4.3 SSR 技术的优点	(52)
4.5 小结	(52)
参考文献	(53)
第 5 章 感病与抗病柱花草遗传多样性的 AFLP 分析	(54)
5.1 引言	(54)
5.2 材料与方法	(56)
5.2.1 供试材料	(56)
5.2.2 化学试剂	(56)
5.2.3 菌种和克隆载体	(57)
5.2.4 主要实验仪器	(57)
5.2.5 柱花草 DNA 提取	(57)
5.2.6 AFLP 反应	(57)
5.2.7 AFLP 特异性片段的克隆	(60)
5.2.8 数据分析	(61)
5.3 结果	(61)
5.3.1 预扩增效果	(61)

✱ 柱花草遗传多样性及转基因育种研究

5.3.2 引物对筛选	(61)
5.3.3 AFLP 多态性分析	(62)
5.3.4 聚类分析	(63)
5.3.5 主成分分析	(64)
5.3.6 AFLP 特异性片段的克隆及其分析	(66)
5.3.7 AFLP 特异性片段氨基酸序列同源性比较分析	(67)
5.4 讨论	(68)
5.4.1 AFLP 扩增反应特点	(68)
5.4.2 AFLP 分析的效果	(68)
5.4.3 圭亚那柱花草品系的遗传多样性	(70)
5.4.4 AFLP 特性片段的鉴定及其利用	(70)
5.5 小结	(70)
参考文献	(71)
第 6 章 感病与抗病柱花草核 rDNA 的 ITS1 序列分析	(73)
6.1 引言	(73)
6.2 材料与方法	(74)
6.2.1 供试材料	(74)
6.2.2 引物和酶	(74)
6.2.3 菌种和克隆载体	(74)
6.2.4 基因组总 DNA 提取	(74)
6.2.5 ITS1 扩增	(74)
6.2.6 ITS1 片段回收	(74)
6.2.7 连接和转化	(74)
6.2.8 转化子鉴定及克隆测序	(75)
6.2.9 ITS1 序列分析	(75)
6.3 结果	(75)
6.3.1 ITS1 序列长度及变异	(75)
6.3.2 聚类分析	(76)
6.3.3 遗传分化系数	(76)
6.3.4 ITS1 序列的限制性酶切位点分析	(83)
6.4 讨论	(84)
6.4.1 应用 ITS1 分析柱花草种质的变异	(84)
6.4.2 柱花草种子 ITS1 序列比对	(84)
6.4.3 基于 ITS1 的柱花草种子聚类分析	(84)
6.5 小结	(85)
参考文献	(85)

第 7 章 几丁质酶基因转化柱花草并选育抗炭疽病植株的研究	(87)
7.1 引言	(87)
7.2 材料与方法	(88)
7.2.1 研究材料	(88)
7.2.2 大肠杆菌转化	(89)
7.2.3 土壤农杆菌转化	(89)
7.2.4 大肠杆菌质粒制备	(89)
7.2.5 土壤农杆菌质粒制备	(89)
7.2.6 几丁质酶基因植物表达载体的构建	(90)
7.2.7 几丁质酶的体外抑制胶孢炭疽菌活性鉴定	(90)
7.2.8 柱花草组织培养	(90)
7.2.9 卡那霉素抑制分化与再分化的浓度筛选	(91)
7.2.10 水稻几丁质酶基因转化柱花草	(91)
7.2.11 GUS 活性检测	(91)
7.2.12 分子检测	(92)
7.2.13 转基因柱花草植株胶孢炭疽菌接种及发病评价	(92)
7.3 结果	(92)
7.3.1 几丁质酶基因植物表达载体构建	(92)
7.3.2 几丁质酶基因在大肠杆菌中的表达及其在体外的抑直菌活性	(93)
7.3.3 质粒 pCAMBIACH2 转化土壤农杆菌 LBA4404	(93)
7.3.4 柱花草组织培养	(94)
7.3.5 卡那霉素抑制柱花草愈伤组织分化与再分化的浓度	(97)
7.3.6 转化植株的获得	(98)
7.3.7 GUS 活性检测	(98)
7.3.8 NPTII 基因的 PCR 检测	(99)
7.3.9 转化频率	(100)
7.3.10 Southern 杂交分析	(100)
7.3.11 转基因柱花草植株对胶孢炭疽菌侵染的反应	(100)
7.4 讨论	(101)
7.5 小结	(102)
参考文献	(102)
第 8 章 热研 7 号柱花草的选育	(105)
8.1 引言	(105)
8.2 材料与方法	(105)
8.2.1 材料	(105)
8.2.2 方法	(106)

8.3 结果与分析	(107)
8.3.1 品种特征特性	(107)
8.3.2 品种比较试验结果	(107)
8.3.3 区域性试验结果	(108)
8.3.4 生产试验结果	(109)
8.3.5 适宜推广区域	(110)
8.3.6 主要用途	(110)
8.3.7 栽培技术要点	(111)
8.4 结论	(111)
参考文献	(111)
第9章 柱花草种子生产研究	(112)
9.1 引言	(112)
9.2 分布地区、种植面积及总产量	(112)
9.3 种子生产的适宜区域	(113)
9.4 主要栽培品种的产量与质量	(114)
9.5 种子生产的栽培管理技术	(115)
9.5.1 育苗	(115)
9.5.2 移栽	(115)
9.5.3 田间管理	(115)
9.5.4 收种	(116)
9.6 价格及经济效益	(116)
9.7 种子生产存在的问题	(117)
9.8 建议	(117)
参考文献	(117)
第10章 柱花草种子超干贮藏研究	(118)
10.1 引言	(118)
10.2 材料与方法	(118)
10.2.1 材料	(119)
10.2.2 研究方法	(119)
10.3 结果	(120)
10.3.1 常温贮藏柱花草种子的最佳含水量	(120)
10.3.2 柱花草种子超干贮藏对活力的影响	(120)
10.3.3 超干贮藏对种子生理生化的影响	(122)
10.4 讨论	(124)
参考文献	(124)

第 1 章 柱花草研究进展

摘 要：根据柱花草的重要性，综述了柱花草的炭疽病危害、炭疽病病原菌的遗传多态性及流行性研究，柱花草的抗炭疽育种、细胞遗传学、细胞生物学，柱花草组织培养、原生质融合、基因克隆、遗传转化，以及柱花草分类及分子标记等方面的研究进展。

关键词：柱花草，炭疽病，抗病育种，生物技术，研究进展

1.1 柱花草的重要性

柱花草属 (*Stylosanthes* spp.) 包括 44 个种和亚种。天然的柱花草属植物分布在中南美洲、北美洲、非洲、东南亚和印度等地。这些种适于生长在北纬 30°至南纬 30°的干旱和低肥力区域，平均生长期为 63 d 至 190 d^[1-3]。我国于 1962 年首次自马来西亚引种柱花草到海南岛，作为橡胶园的覆盖作物^[4]。许多柱花草种是优良的热带豆科牧草，其茎叶产量高，草品质好（干物质中粗蛋白质含量达 15% 以上）（表 1-1）。柱花草耐旱、耐酸性瘦土，广泛用于改良天然草地，作为放牧及制作兽畜所需的干草粉，同时还可用作果园的覆盖作物以及用于保持水土和提高土壤肥力等。

表 1-1 3 种柱花草的营养成分
(占干物质的百分比, %)

Table 1-1 Nutrient content of 3 stylo varieties (Dry matter content, %)

品 种	干物质	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	无氮浸出物	粗灰分	钙	磷
热研 7 号柱花草	21.36	16.86	2.65	32.47	41.72	6.30	1.19	0.18
格拉姆柱花草	22.55	15.50	1.52	27.21	49.77	6.40	1.48	0.23
热研 2 号柱花草	18.49	15.19	1.98	39.33	36.16	6.94	1.32	0.19

柱花草品种如西卡柱花草 (*S. scabra* cv. Seca)、有钩柱花草 (*S. hamata* cv. Verano)、矮柱花草 (*S. humilis* cv. Paterson)、头状柱花草 (*S. capitata*) 及 184 柱花草 (*S. guianensis* cv. 184 - Zhuhuacao) 具有多种用途。在中国华南热带、亚热带地区，柱花草已被用于小农户耕作系统，如利用柱花草制作禽畜所需的干草粉、青饲料，在芒果园、柑橘园中种植柱花草作为绿肥作物，这不仅可以使土壤固氮，还可用于恢复丢荒地，仅广东省累计种植柱花草面积就达 10⁵ hm²。此外，柱花草已被推广种植到广西、

云南、贵州、福建及四川攀枝花的干热河谷地区^[5]。目前在云南的元谋、思茅、盈江等地均有种植。在攀枝花,柱花草已被用于当地的退耕还林还草示范推广项目,在各项目中均表现出很好的长势^[5]。

在澳大利亚北部,柱花草作为牧场养牛的主要青饲料,目前已种植了 100 多万 hm^2 ,而且这个面积正以每年 10 万 hm^2 的速度增加^[6]。在印度尼西亚、马来西亚及菲律宾等东南亚国家,柱花草已在橡胶园、椰子园、油棕园中种植,并用于放牧绵羊和黄牛。在印度,柱花草主要被用于畜牧生产系统,提高土壤肥力,改良土壤结构及恢复丢荒地。在非洲,柱花草与玉米间作^[7]。在南美洲,柱花草与禾本科牧草混播以提高牛肉产量及保持牧草的持续、稳定供给^[8]。所以,柱花草就像我国北方的苜蓿一样重要,它是我国南方主要的牧草资源。

1.2 柱花草炭疽病

1.2.1 柱花草炭疽病的主要危害

柱花草炭疽病 (Stylo anthracnose) 于 1937 年在巴西首次发现^[9]。六十多年来,随着柱花草的种植推广,该病已传播到美洲、澳洲、非洲和亚洲的种植区,成为广为分布的柱花草毁灭性的病害。柱花草炭疽病可造成牧草叶片变黄、坏死脱落,茎和叶柄枯萎,花序败落不结籽,严重的可使幼苗和整个植株死亡,牧草产量和种质产量锐减甚至绝收。1977 年至 1979 年在美国佛罗里达州南部,炭疽病使西卡柱花草干物质减产达 26% ~ 50%^[10]。在哥伦比亚,仅 1980 年至 1981 年,圭亚那柱花草因炭疽病造成的损失就达 64% ~ 100%,并导致营养成分下降^[11]。20 世纪 70 年代,炭疽病摧毁了澳大利亚的矮柱花草和圭亚那柱花草,导致该国 14 个商用品种中的 9 个被迫停止生产^[12],澳大利亚出口圭亚那柱花草种质到南美的巨大市场也因此病在南美地区的危害而失去^[13,14]。在我国,炭疽病造成柱花草产量降低 21% ~ 40%,种质减产 28% ~ 70%,粗蛋白质降低 51.8%,Ca 降低 11.0%,Mg 降低 50%^[15]。仅在 1979 年到 1986 年,在我国华南热带地区,就有 100 多 hm^2 的斯柯菲柱花草和库克柱花草因炭疽病而失收^[16]。柱花草炭疽病主要采用化学防治,通常以 0.1% 的多菌灵喷洒,同时人们也探索利用几丁质酶防治该病的新策略^[17]。

1.2.2 柱花草炭疽病病原菌的遗传多态性及流行性研究

柱花草炭疽病是由胶鬯炭疽菌 (*Collectotrichum gloeosporioides*) 和束状刺盘孢 (*C. damatium*) 引起的,其中前者是最主要的病原体^[10]。在我国广东、海南发现有胶孢炭疽菌和豆炭疽菌 (*C. lindermuthianum*) (表 1-2)^[15]。在广西,主要危害柱花草的是胶孢炭疽菌。由胶孢炭疽菌引起的柱花草炭疽病是柱花草生产上的主要限制因素,该病原菌是一个异源性和复杂性的种,在形态学和致病性方面表现出相当大的变异性,其生理小种具有高度的遗传和致病多样性^[18,19]。在澳大利亚,柱花草胶孢炭疽菌有两种不同的生物类型:A 型和 B 型^[14]。A 型菌病斑呈圆形,不连续分布,边缘暗褐色、清

晰,中央灰白色,能感染大多数的柱花草品种;B型菌病斑呈多角形、半圆形等不规则分布,褐色,边缘一般不整齐,主要侵染圭亚那柱花草。形态学、病症学、双链RNA结构、限制性片段多态性、随机扩增多态性DNA分析结构表明,两种生物型有明显的遗传差异,并克隆了特异性DNA片段^[18]。由于我国目前推广种植的柱花草主要是圭亚那种,澳大利亚种植的主要是有钩和西卡柱花草,所以危害我国柱花草的主要是B型胶孢炭疽菌,而在澳大利亚主要是A型菌。目前已分别从A型菌和B型菌中鉴定出4个生理小种^[20]。易克贤等在对我国柱花草炭疽病进行广泛调查和病原采样收集的基础上,利用RAPD分子标记技术对43个代表性菌株进行了基因组DNA分析,并对276个国外菌株进行了综合聚类分析。结果表明,所用8个引物的扩增片段大小位于0.3 kb~2.8 kb之间,菌株间呈现显著的DNA多态性。以柱花草起源中心——南美的柱花草炭疽病原菌分类为基础,中国柱花草炭疽病原菌可划分成3大类型,即Ⅱ类、Ⅲ类、Ⅵ类。中国菌株与来自南美的菌株相比,其生物多样性和遗传变异性则相对简单。就中国菌株而言,海南菌株与广西、广东菌株相比多样性较丰富,中国柱花草胶孢炭疽菌正在出现种内遗传分化^[21]。哥伦比亚国际热带农业中心和澳大利亚已对柱花草炭疽病的流行性进行了深入的研究,证明炭疽病的爆发和流行与温度、湿度呈正相关,高温、高湿有利于柱花草炭疽病的发生^[22]。在我国华南热带地区,如广东、广西、海南,台风季节最易发生严重炭疽病^[23]。

表 1-2 不同地区柱花草炭疽菌菌株的培养特征和致病性测定

Table 1-2 Characters and virulence of collectotrich gloeosporioides

菌号	采集地点	培养6d 菌落直径 (cm)	孢子大小 (μm)	培养特征	菌种名称	离体叶致病性		盆栽苗致病性	
						发病率(%)	病情指数	发病率(%)	病情指数
2	白沙 细水 牧场	6.0	14.2×5.6	菌落中间 深灰,边 缘浅灰, 轮纹状排 列不 明 显,产孢 多	胶孢炭疽菌	33.3	15.0	50.0	15.0
4	儋州 宝岛 新村	9.5	14.9×6.1	菌落中间 深灰,边 缘浅灰, 菌丝疏 松,产孢 中等	胶孢炭疽菌	77.3	57.8	75.0	40.0
5	惠来 华湖 镇	8.9	11.5×4.0	菌落中间 深灰,边 缘浅灰, 产孢少	豆炭疽菌	66.7	31.1	100.0	30.0
11	揭西 种畜 场	9.5	16.9×5.0	菌落颜色 浅,菌丝 疏松,产 孢少	胶孢炭疽菌	88.9	44.4	100.0	40.0

续表 1-2

菌号	采集地点	培养 6 d 菌落直径 (cm)	孢子大小 (μm)	培养特征	菌种名称	离体叶致病性		盆栽苗致病性	
						发病率(%)	病情指数	发病率(%)	病情指数
12	东莞种畜场	9.5	16.9×5.0	菌落颜色较深, 菌丝致密, 轮纹状排列明显, 产孢少	胶孢炭疽菌	30.0	16.0	100.0	30.0
15	三亚种畜场	9.1	17.0×5.0	菌落颜色较深, 菌丝致密, 轮纹状排列明显, 产孢多	豆炭疽菌	33.3	15.0	50.0	15.0
19	乐东种畜场	5.9	11.5×4.0	菌落中间深灰, 边缘浅灰, 菌丝致密, 产孢多	胶孢炭疽菌	100.0	35.5	100.0	40.0
20	东方种畜场	6.2	13.0×5.0	菌落中间深灰, 边缘浅灰, 菌丝致密, 产孢多	胶孢炭疽菌	77.8	20.0	100.0	25.0
22	昌江种畜场	6.4	13.5×5.0	菌落中间深灰, 边缘浅灰, 菌丝致密, 产孢多	胶孢炭疽菌	100.0	75.0	100.0	45.0

1.3 柱花草抗炭疽病育种进展

1.3.1 收集柱花草种质资源培育抗病品种

早在 1914 年和 1933 年, 澳大利亚和巴西就分别有矮柱花草和圭亚那柱花草用于草地改良的记载。1963 年澳大利亚开始收集柱花草种质, 20 世纪 70 年代美洲也进行了类似的工作^[24]。1997 年由国际热带农业中心 (CIAT) 在全球范围开展了柱花草种质资源系统收集。仅 1984 年, 该中心共收集柱花草种质 2 961 份, 其中热带美洲 1 941 份, 东南亚 5 份, 热带非洲 36 份, 获得一大批珍贵的抗病种质, 如 CIAT184、CIAT136、CIAT2950 等, 并经中国、秘鲁、巴西等国培育成为重要的适合当地栽培的抗病柱花草品种^[25]。

1.3.2 引种选育^[26]

引种选育是非柱花草起源国家普遍应用且又十分有效的方法。我国于 1962 年首先从

东南亚国家引种巴西苜蓿 (*S. gracil*) 到海南作为橡胶园覆盖作物^[4]。1981年, 广西畜牧研究所从澳大利亚引入格拉姆柱花草 (*Stylosanthes guianensis* cv. Graham), 经试验研究, 在广西等地区生长较好, 成为我国作为引进品种登记的首个柱花草品种^[27]。1982年, 中国热带农业科学院从哥伦比亚国际热带农业中心引入 25 份柱花草材料, 经株行比较试验、品比试验、区域性试验, 于 1991 年选出了抗炭疽病的“CIAT184”柱花草, 并定名为热研 2 号柱花草 (*S. guianensis* cv. Reyan No.2)。该品种的产量、品质、抗病性均优于格拉姆柱花草, 已成为我国华南热带、南亚热带地区柱花草的主栽品种^[28]。之后, 我国分别从哥伦比亚国际热带农业中心、澳大利亚引种大量柱花草种质, 先后选育了有钩柱花草^[27]、热研 5 号柱花草^[29]、热研 7 号柱花草^[30]、热研 10 号柱花草^[31]、热研 14 号西卡柱花草^[32]等新品种, 这些品种成为我国华南热带、亚热带地区主要的柱花草栽培品种。同时, 通过柱花草大田观察、品系比较及接种试验, 保存了一批抗炭疽病的柱花草种质^[32-34]。哥伦比亚、泰国、秘鲁、印度也分别通过引种评价选育了适合当地栽培的抗病的 Capica 柱花草、Khon Kaen 柱花草和 IGFRI-S-1 柱花草^[25]。

1.3.3 辐射育种

Alcantara 等用圭亚那柱花草种质以⁶⁰Co- γ 射线辐射, 剂量采用1万、2万、3万、4万、5万、6万 R。植株的致死剂量为 3.5 万 R, 在此条件下除了叶绿素有变化外, 形态也有变异。用 3.8 万 R 辐射可提高植株抗病力^[35]。梁英彩等人利用⁶⁰Co- γ 射线 8 万 R 处理 184 柱花草种质并育成了抗病新品种 907 柱花草。其鲜草产量比对照 184 柱花草增产 11.7%以上, 种质增产 27.4%, 粗蛋白质含量提高 11%。1996 年 1 月, 经广西农作物品种审定委员会审定通过, 907 柱花草登记为牧草品种^[36]。

1.3.4 杂交育种

柱花草为自花授粉植物, 杂交育种有一定难度, 但研究者通过杂交手段选育了下列几个抗病品种: Amiga 有钩柱花草, 为有钩柱花草与矮柱花草杂交的异源四倍体, 1990 年在澳大利亚进行品种登记; Bahia 柱花草, 为粗糙柱花草 Q10042 与 CPI93116 杂交的第五代, 抗炭疽病 A 型; 尼斯夫柱花草, 是从一个西卡柱花草遗传变异群落中育出的, 抗分离 A 型; Feira 柱花草, 为粗糙柱花草 Q10042 与 CPI55860 的杂交第五代, 抗分离 A, B 型。但至今尚未有关于圭亚那柱花草杂交品种的报道^[25]。

1.3.5 细胞工程育种

Miles 等从体细胞变异和体细胞融合所得的愈伤组织中培育了抗炭疽病柱花草种质^[37]。另外, 通过圭亚那柱花草细胞悬浮液对胶孢炭疽菌的反应, 进行细胞悬浮液培养, 也获得了抗炭疽病柱花草植株^[38]。

1.3.6 转基因抗病育种

目前, 哥伦比亚国际热带农业中心、澳大利亚以及我国正在从事柱花草转基因抗炭疽病育种研究。柱花草的再生体系及遗传转化体系也已建立^[39-41]。构建高效的抗病基

因表达载体及外源基因在转化柱花草中能持续稳定表达，是柱花草抗病的关键。

1.4 柱花草生物学研究

1.4.1 柱花草细胞遗传学研究

澳大利亚热带牧草专家 Cameron 对柱花草的染色体数目及其同工酶进行了研究。柱花草属的基本染色体数是 $X = 10$ ，不同种的染色体数目不同，有二倍体、四倍体、多倍体之分（表 1-3），并且柱花草醇脱氢酶同工酶出现的条带数量与其染色体倍性水平成正相关（图 1-1）^[42]。

表 1-3 部分柱花草种的染色体数目
Table 1-3 Chromosome number of stylosanthes

种 名	染色体 数目 ($2n$)	种 名	染色体 数目 ($2n$)
<i>S. viscosa</i> Sw.	20	<i>S. hamata</i> (L.) Taub.	20
<i>S. humilis</i> H.B.K	20	<i>S. calcicola</i> small	20
<i>S. guianensis</i> (Aubl.) Sw.	20	<i>S. macrocar</i> Blake	20
<i>S. guianensis</i> var. <i>guianensis</i>	20	<i>S. fruticosa</i> (Retz.)	40
<i>S. guianensis</i> var. <i>gracilis</i> Kunth Vog.	20	<i>S. sp. aff. Scabra</i>	40
<i>S. guianensis</i> var. <i>intermedia</i> (Vog.) Hassler	20	<i>S. scabra</i> Vog.	40
<i>S. guianensis</i> var. <i>robusta</i>	20	<i>S. subsericea</i> Blake	40
<i>S. montevidensis</i> Vog.	20	<i>S. sundaica</i> Taub	40
<i>S. leiocarpa</i> Vog.	20	<i>S. capitata</i> Vog.	40
<i>S. angustifolia</i> Vog.	20	<i>S. erecta</i> Beauv.	60
<i>S. biflora</i> (L.) BSP	20		

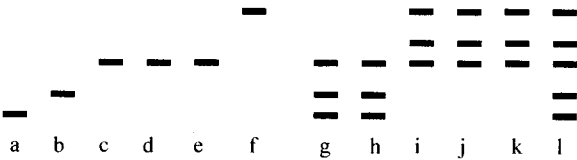


图 1-1 部分柱花草二倍体和多倍体种的醇脱氢酶同工酶淀粉胶电泳图

Fig. 1-1 ADH isozymes separated by starch gel electrophoresis

- (a) *S. hamata* ($2n$)

(b) *S. viscosa* Brazil ($2n$)

(c) *S. viscosa* Mexico ($2n$)

(d) *S. humilis* ($2n$)

(e) *S. guianensis* ($2n$)

(f) *S. macrocarpa* ($2n$)
- (g) *S. sp. Nov.* ($4n$)

(h) *S. subsericea* ($4n$)

(i) *S. scabra* ($4n$)

(j) *S. sp. aff. scabra* ($4n$)

(k) *S. fruticosa* ($4n$)

(l) *S. erecta* ($6n$)