

文章编号: 1001-1498(2003)01-0087-08

# 草坪草的遗传转化研究进展

张俊卫<sup>1</sup>, 包满珠<sup>1</sup>, 孙振元<sup>2</sup>

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** 概述了草坪草遗传转化的方法和发展趋势, 重点介绍了草坪草的植株再生体系和草坪草的遗传转化方法的研究进展。通过愈伤组织培养、悬浮细胞培养、原生质体培养等手段, 对早熟禾属、黑麦草属、结缕草属和剪股颖属的一些物种已建立了较为完善的植株再生体系。在这些再生体系的基础上, 利用电激法、硅碳纤维法、PEG法和基因枪法在上述各属的一些物种上已成功地建立了遗传转化体系并获得了有一定应用前景的转基因植株。

**关键词:** 草坪草; 植株再生; 遗传转化

**中图分类号:** S731.2

**文献标识码:** A

草坪是城市绿化的重要组成部分, 城市的草坪覆盖面积是评价其现代化建设的重要水准之一, 许多大型广场、生态旅游区都把草坪作为其生态环境建设的基调植物, 其使用量逐年上升。尽管草坪草有着极强的生态适应能力, 但随着草坪应用范围的不断扩大, 在实际应用中还存在着一些不足, 如由于暖季型草多用无性繁殖方法建坪, 造成其遗传多样性下降, 抗病、抗虫、抗逆境的能力显著下降, 而且暖季型草在华中一带应用时还存在枯黄期过长的问題, 冷季型草坪草在华中地区又存在越夏难的缺点。传统的遗传改良方法很难兼顾抗性和草坪草品质两个方面, 而用基因工程的方法有可能解决上述仅由少数基因控制的性状, 兼顾抗性和草坪草品质两个方面<sup>[1,2]</sup>。本文拟就草坪草的遗传转化研究进展作一综述。

## 1 植株再生体系的建立

1973年 Atkin<sup>[3]</sup>开始暖季型草坪草的组织培养工作, 当时只诱导出了愈伤组织, 未能再生出植株。自此以后, 许多研究者对草坪草进行了组织培养研究, 已相继建立了大多数草坪草的植株再生体系(见表1)。根据组织培养所用培养基及分化培养时所用材料的不同, 将草坪草的组织培养体系分为3类:

### 1.1 愈伤组织培养

愈伤组织培养的方法与步骤相对较简单, 都需经过外植体(种子、根尖、茎尖或未成熟的花序)→愈伤组织诱导→愈伤组织的分化→绿色小苗再生→生根培养→再生成完整植株等几个过程。

在黑麦草属(*Lolium*)、羊茅属(*Festuca*)的研究方面, Ahloowalia<sup>[4]</sup>以未成熟的三倍体

收稿日期: 2002-03-10

基金项目: 国家转基因专项、国家863计划资助项目、华中农业大学创新基金资助项目

作者简介: 张俊卫(1972—), 男, 湖北天门人, 讲师。

表 1 已建立植株再生体系的草坪草

外植体来源	草坪草	参考文献
种子胚	二倍体和四倍体黑麦草的杂交种	Ahloowalia <sup>[4]</sup>
	匍匐翦股颖 ( <i>Agrostis stolonifera</i> L.)	Wu <sup>[11]</sup>
	<i>Agrostis palustris</i> Huds.	Krans <sup>[12]</sup>
	紫羊茅 ( <i>Festuca rubra</i> L.)	Zahgmout <sup>[9]</sup>
	细羊茅 ( <i>Festuca rubra</i> var. <i>commutata</i> Caud.)	Torello <sup>[8]</sup>
分生组织	草地早熟禾 ( <i>Poa pratensis</i> L.)	Van Ark <sup>[13]</sup> , Boyd <sup>[18]</sup> , McDonnell <sup>[19]</sup>
	高羊茅 ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	Bai <sup>[10]</sup>
	多年生黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)、紫羊茅 ( <i>Festuca rubra</i> L.)	Dale <sup>[5]</sup>
	紫羊茅 ( <i>Festuca rubra</i> L.)	Lowe <sup>[6]</sup>
	多年生黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)	Greemers-Mblenaar <sup>[7]</sup>
花序	1 年生多花黑麦草 ( <i>L. multiflorum</i> Lam.)	
	草地早熟禾 ( <i>Poa pratensis</i> L.)	Van der Valk <sup>[20]</sup>
	狗牙根 ( <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.)	Ahn <sup>[14,15]</sup> ; Chaudhury <sup>[16]</sup>
悬浮细胞	轻匍匐紫羊茅 ( <i>Festuca rubra</i> var. <i>trichophylla</i> )	Zahgmout <sup>[17]</sup>
	多年生黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)、1 年生多花黑麦草 ( <i>L. multiflorum</i> Lam.)	Dalton <sup>[21]</sup>
	高羊茅 ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	
	结缕草 ( <i>Zoysia japonica</i> Steud.)	Inokuma <sup>[29]</sup>
原生质体	<i>Festuca pratensis</i> Huds.	Wang <sup>[28]</sup>
	<i>Agrostis palustris</i> Huds.	Terakawa <sup>[26]</sup> ; Blanche <sup>[25]</sup>
	草地早熟禾 ( <i>Poa pratensis</i> L.)	Nielsen <sup>[24]</sup> ; Van der Valk <sup>[23]</sup>
	高羊茅 ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	Dalton <sup>[27]</sup>
	多年生黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)	Creemers-Mblenaar <sup>[22]</sup>

杂交种的种子为外植体,建立了黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 的愈伤组织培养和悬浮细胞培养再生体系,在研究过程中观察到来源于种子的愈伤组织是由胚芽产生的,此外还分析了 2,4-D、IAA、椰子乳在愈伤组织诱导、分化、植株再生过程中所起的作用,探讨了由愈伤组织再生的植株在细胞水平上的稳定性;Dale<sup>[5]</sup>以多年生黑麦草、紫羊茅 (*Festuca rubra* L.) 的根尖分生组织, Lowe<sup>[6]</sup>以紫羊茅 (*Festuca rubra* L.) 的根尖、芽尖分生组织为外植体,建立了这些草坪草的再生体系;Greemers-Molenaar<sup>[7]</sup>以未成熟的花序为外植体,获得了多年生黑麦草和 1 年生多花黑麦草 (*Lolium multiflorum* Lam.) 的再生植株;Torello<sup>[8]</sup>分析了生长素类型和浓度对细羊茅 (*Festuca rubra* var. *commutata* Caud.) 愈伤组织生长和分化的影响,指出 2,4-D 对愈伤组织诱导的重要性;Zahgmout<sup>[9]</sup>通过提高培养基中蔗糖浓度,恢复了经过长期培养 (5 a) 的紫羊茅愈伤组织再生成绿色小苗的能力,并降低了白化苗的形成频率;Bai<sup>[10]</sup>2001 年分析了 2,4-D、BA 浓度对高羊茅 (*Festuca arundinacea* L.) 愈伤组织诱导的影响。

相比较而言,对翦股颖属 (*Agrostis*)、早熟禾属 (*Poa*)、狗牙根属 (*Cynodon*) 的愈伤组织研究较少,Wu<sup>[11]</sup>建立了匍匐翦股颖 (*Agrostis stolonifera* L.) 的再生体系后,Krans<sup>[12]</sup>建立了 *Agrostis palustris* Huds. 的植株再生体系,并分析了愈伤组织诱导、维持、绿苗形成对激素和培养环境的要求。Van Ark<sup>[13]</sup>探讨了凝胶化试剂和 ABA 对草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 愈伤组织再生成完整植株的频率的影响,他认为在用 Gelrite 凝胶化的培养基上生长的愈伤组织,再生成植株的频率明显提高,而 ABA 只对芽的分化有较大的影响,但对植株的再生频率没有影响。Ahn<sup>[14,15]</sup>以狗牙根的未成熟花序为外植体,建立了狗牙根 (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) 的愈伤

组织培养体系。Chaudhury<sup>[16]</sup>报道了 BA、花序长度对狗牙根愈伤组织诱导的影响。

### 1.2 悬浮细胞培养

由于在愈伤组织不便于开展遗传转化方面的研究,研究者开始了胚性细胞的悬浮培养,其培养过程较为繁琐,需经外植体(种子、茎尖或根尖)→愈伤组织→愈伤组织的液体悬浮培养→滤膜过滤→胚性悬浮细胞在固体培养基上的植株再生等过程。

Zaghmout<sup>[17]</sup>建立了轻匍匐紫羊茅(*Festuca rubra* var. *trichophylla*)的胚性细胞悬浮培养体系,筛选出了适合悬浮培养的最佳培养基,而且得出了 31 μm 滤膜过滤开始分化的悬浮细胞液是至关重要的结论,因为过滤可以去除生长较快的细胞,增加胚性细胞的发生比率。

### 1.3 原生质体培养

从悬浮细胞培养获得的植株在遗传上存在不稳定的现象,同时也不便于进行转基因方面的研究,许多已建立悬浮细胞培养体系的草坪草相继开展了原生质体的悬浮培养工作。原生质体的悬浮培养尽管培养过程非常繁琐,植株再生频率低、再生过程所需时间长(33 周左右),一般要经过外植体(种子、根尖)→愈伤组织→液体培养基上生长→原生质体分离→条件培养基上培养或看护培养→平板接种→原生质体分化→植株分化等过程,但由原生质体再生出的植株在遗传上稳定,而且容易直接基因导入,已成为草坪草转基因研究的关键和前提。

Van der Valk<sup>[23]</sup>建立了草地早熟禾的原生质体悬浮培养体系,但只获得了白化苗;Nielsen<sup>[24]</sup>在此基础上优化了草地早熟禾的原生质体再生体系,省去了繁琐的看护培养,延长了具有再生能力的原生质体的培养时间(可达 10—16 个月),省去了大量制备原生质体的工作。

Blanche<sup>[25]</sup>改进了 *Agrostis palustris* Huds. 的愈伤组织生长和小苗形成的条件,认为贮存的愈伤组织经预悬浮培养后生长速度加快,但形成小苗的频率降低,涂板时原生质体密度和原生质体聚合体直径的大小对小苗的形成频率有较大的影响。Terakawa<sup>[26]</sup>建立了 *Agrostis palustris* Huds. 的原生质体悬浮培养体系,在实验中他发现由种子产生的愈伤组织可分为两种类型,一种是具液泡的松散的非胚胎发生细胞,一种是细胞质丰富的胚发生细胞,而只有后者中才能分离出具有再生能力的原生质体,在培养基的选择方面,他认为条件培养基对原生质体的分裂与植株再生是必需的。

Dalton<sup>[27]</sup>从悬浮培养高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb.)和多年生黑麦草的原生质体中获得了再生植株;Wang<sup>[28]</sup>建立了牛尾草(*Festuca pratensis* Huds.)的原生质体悬浮培养体系,产生了可育的绿色小苗;Inokuma<sup>[29]</sup>以根尖顶端分生组织为外植体,建立了结缕草(*Zoysia japonica* Steud.)的原生质体植株再生体系。

## 2 草坪草的遗传转化方法

Murai 和 Barton 等将外源(细菌)DNA 导入植物细胞,此后植物基因工程得到迅速发展。外源 DNA 导入植物方法的选用与植物种类、植株再生体系与基因导入技术等有关。目前农杆菌(*Agrobacterium* spp.)已成功地用于双子叶植物的遗传转化,但感染单子叶植物的效率低,尤其是禾本科(Gramineae)植物,因而禾本科植物的遗传转化不得不采用其它系统来完成,所有这些系统都是将外源 DNA 导入植物细胞或原生质体,利用细胞的全能性获得转基因植株(见表 2)。

表2 获得转基因植株的草坪草

基因介导方法	草坪草	筛选基因	参考文献
电击融合	牛尾草 ( <i>Agrostis pratensis</i> Huds.)	bar	Asano <sup>[35]</sup>
	小糠草 ( <i>Agrostis alba</i> L.)		Asano <sup>[33]</sup>
	高羊茅 ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	<i>hptII</i> 潮霉素	Ha <sup>[34]</sup> ; Wang <sup>[46]</sup>
基因枪	<i>Agrostis palustris</i> Huds.	<i>hptII</i> 潮霉素	Xiao <sup>[36]</sup>
		bar	Hartman <sup>[40]</sup>
			Zhong <sup>[39]</sup>
	多年生黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)	无	Heleen <sup>[18]</sup> ; Spangenberg <sup>[41]</sup>
	1年生多花黑麦草 ( <i>L. multiflorum</i> Lam.)	<i>hptII</i> 潮霉素	Ye <sup>[42]</sup>
	毒麦 ( <i>Lolium temulentum</i> L.)、多年生黑麦草 ( <i>L. perenne</i> L.)	<i>hptII</i> 潮霉素	Wang <sup>[38]</sup>
	多年生黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)、1年生多花黑麦草 ( <i>L. multiflorum</i> Lam.)、毒麦 ( <i>L. Temulentum</i> L.)	<i>nptII</i> 卡那霉素	Dalton <sup>[43]</sup>
	高羊茅 ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)	<i>hptII</i> 潮霉素	Spangenberg <sup>[45]</sup>
聚乙二醇	草地早熟禾 ( <i>Poa pratensis</i> L.)	bar	马忠华 <sup>[44]</sup>
	结缕草 ( <i>Zoysia japonica</i> Steud.)	<i>hptII</i> 潮霉素	Inokuma <sup>[32]</sup>
硅碳纤维	1年生多花黑麦草 ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.)、多年生黑麦草 ( <i>L. perenne</i> L.)、高羊茅 ( <i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)、匍匐翦股颖 ( <i>Agrostis stolonifera</i> L.)	<i>hptII</i> 潮霉素	Dalton <sup>[43]</sup>

目前,已有一些组织培养体系完善的草坪草建立直接基因转化体系<sup>[30]</sup>,其转化方法主要有:

### 2.1 硅碳纤维介导的直接基因转化

Dalton<sup>[31]</sup>用硅碳纤维介导了多年生黑麦草、高羊茅、匍匐翦股颖和1年生黑麦草的抗潮霉素的转基因植株,但对二倍体多年生黑麦草植株的遗传转化较困难。

### 2.2 PEG介导的直接基因转化

Inokuma<sup>[32]</sup>用PEG法获得了结缕草的抗潮霉素的植株,并用PCR和Southern杂交进行了检验,用Adh 1作为启动子的GUS基因得到了高效表达,其愈伤组织起源于茎尖顶端分生组织。

### 2.3 电击融合法介导的直接基因转化

Asano<sup>[33]</sup>报道了电击融合法介导的*Agrostis palustris* Huds.直接基因转化进展。Ha<sup>[34]</sup>用电击融合法获得了高羊茅的抗潮霉素的转基因植株,而且他认为看护培养是必需的。Asano<sup>[35]</sup>用电击融合获得了抗除草剂的转基因*Agrostis palustris* Huds.植株,通过用Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>替代CaCl<sub>2</sub>,并将电击缓冲液pH值提高到9~10,能有效地提高转化效率(2倍)。

### 2.4 基因枪法介导的直接基因转化

Xiao<sup>[36]</sup>用基因枪法获得了*Agrostis palustris* Huds.抗潮霉素的植株,并建立了高效的潮霉素选择体系。Heleen<sup>[37]</sup>用基因枪法获得了多年生黑麦草稳定的转基因植株(GUS基因能长期表达)。Wang<sup>[38]</sup>用基因枪法获得了抗卡那霉素的多年生黑麦草和1年生黑麦草植株,但转基因植株是二倍体还是四倍体没有说明。Zhong<sup>[39]</sup>,Hartman<sup>[40]</sup>用基因枪法得到了*Agrostis palustris* Huds.的转基因植株。Spangenberg<sup>[41]</sup>用基因枪法获得了抗潮霉素的四倍体多年生黑麦草植株。Ye<sup>[42]</sup>用基因枪法获得了抗潮霉素的1年生黑麦草植株,但转基因植株是四倍体,还是二倍体不详,作者还优化了微弹轰击的参数。Dalton<sup>[43]</sup>用微弹轰击法建立了二倍体多年生黑麦草、1

年生黑麦草和毒麦(*L. temulentum* L.)的转基因体系,转基因植株共表达了 GUS 基因和 hpt 基因,PCR 和 Southern 杂交证实植株已转入 hpt 基因,但只有 37%~50%的植株转入了 GUS 基因。马忠华<sup>[44]</sup>用基因枪法建立了草地早熟禾的基因直接转化体系。

### 3 再生植株、转基因植株在遗传上的稳定性

植株细胞、组织、器官在组织培养过程中,由于培养时间过长或生长素(如 2,4-D)等影响,容易产生体细胞变异,变异的细胞不仅影响植株的分化,而且不利于转基因研究。在建立草坪草植株再生体系的早期,研究者就发现培养时间过长的愈伤组织、悬浮培养细胞再生成植株的频率明显下降,经细胞学和分子生物学手段分析,认为与培养过程中的体细胞变异有关。Valles<sup>[33]</sup>用细胞学和分子生物学(RFLP、RAPD)手段分析了从牛尾草(*Festuca pratensis* Huds.)愈伤组织悬浮培养获得的植株与从原生质体获得的植株在遗传上的稳定性和一致性。Humphreys<sup>[34]</sup>分析了由高羊茅悬浮培养再生出的植株与原生质体培养再生出的植株在 PGI(葡萄糖异构酶)位点的稳定性,他认为起源于愈伤组织培养再生出的植株在 PGI 位点的谱带与母株是不同的,而由原生质体再生出的植株在 PGI 位点的谱带与母株是相同的。

### 4 草坪草转基因研究展望

在草坪业迅速发展的同时,出现了一些严重影响草坪业的问题,一是草坪杂草防除问题:草坪杂草不仅影响草坪的美观,而且会降低其使用价值,甚至在控制不力的情况下,由于杂草的严重入侵而取代草坪草;二是干旱地的草坪建植问题:干旱胁迫是干旱、半干旱地区限制草坪草生长的一个主要环境因子,特别是在水比较紧缺的城市地区,草坪灌溉需水在许多城市景观设施中竞争用水的一个重要方面,具有防护功能和美化作用的高速公路、铁路生物护坡上的草坪建植,往往因不具备灌溉条件以及土质、立地条件差等原因造成草坪建植失败。如果能培育耐除草剂和抗干旱剂和抗干旱的草坪草,这些问题均可得到解决,不仅有利于草坪业的发展,而且有利于我国的生态环境建设。

随着现代分子生物学技术的进步,以 bar 基因为代表的耐除草剂基因,以脯氨酸合成酶基因、甜菜碱合成酶、调渗蛋白基因为代表的抗旱基因已被克隆,如能将其转入草坪草基因组,并得到表达,经转基因植株生物安全性测试之后,投入生产应用,必将产生巨大的经济效益和社会效益。此外,也可将抗病虫基因、抗衰老基因转入草坪草,增强草坪草的抗病虫能力,延长草坪草的绿色期,使其在园林绿化中发挥更大的生态效益。

#### 参考文献:

- [1] 何茂泰,于林清. 牧草生物技术的研究与实用化前景[J]. 生物工程进展,1997,17(2):63
- [2] 江玉林,曹致中. 牧草遗传工程研究进展[J]. 国外畜牧学—草原与牧草,1998(2):5-9
- [3] Atkin R K, Barton G E. The establishment of tissue culture of temperate grasses[J]. J Exp Bot, 1973,24:689-699
- [4] Ahloowalia B S. Regeneration of ryegrass plants in tissue culture[J]. Crop Sci,1975,15(4):449-452
- [5] Dale P J. Meristem tip culture in *Lolium*, *Festuca* and *Dactylis*[J]. Plant Sci Lett, 1977,9:333-338
- [6] Lowe K W, Conger B V. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue[J]. Crop Sci,1979,19(3):397-400
- [7] Creemers-Molenaar J, Loffen J P M, P Van der Volk. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence-derived callus of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*[J]. Plant Sci,1988,57:165-172

- [8] Torello W A, Symingto A J, Rufner R. Callus initiation, plant regeneration and evidence of somatic embryogenesis in red fescue[J]. *Crop Sci*, 1984, 24(6): 1037-1040
- [9] Zaghmout O M F, Torello W A. Restoration of regeneration potential of long-term cultures of red fescue (*Festuca rubra*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11(3): 142-145
- [10] Bai Y, Qu R. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue[J]. *Plant Breeding*, 2001, 120(2): 239-242
- [11] Wu L, Antonovics J. Zinc and copper tolerance of *Agrostis stolonifera* in the tissue culture[J]. *Am J Bot*, 1978, 65: 268-271
- [12] Krans J V, Henning V T, Torres K C. Callus induction, maintenance and plantlet regeneration in creeping bentgrass[J]. *Crop Sci*, 1982, 22(6): 1193-1197
- [13] Van Ark H F, Zaai M A, Creemers-Molenaar J, et al. Improvement of the tissue culture response of seed-derived callus culture of *Poa pratensis*: effect of gelling agent and abscisic acid[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 27(3): 275-280
- [14] Ahn B J, Huang F H, King J W. Plant regeneration through somatic embryogenesis in common bermudagrass tissue culture[J]. *Crop Sci*, 1985, 25(6): 1107-1109
- [15] Ahn B J, Huang F H, King J W. Regeneration of bermudagrass cultivars and evidence of somatic embryogenesis[J]. *Crop Sci*, 1987, 27(3): 594-597
- [16] Chaudhury A, Qu R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-benzyl-adenine in callus induction medium[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2000, 60(2): 113-120
- [17] Zaghmout O M F, Torello W A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of red fescue[J]. *Crop Sci*, 1989, 29(3): 815-817
- [18] Boyd L A, Dale P J. Callus production and plant regeneration from mature embryos of *Poa pratensis* [J]. *Plant Breeding*, 1986, 97(3): 246-254
- [19] McDonnell R E, Conger B V. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass[J]. *Crop Sci*, 1984, 24(3): 573-578
- [20] Van der Valk P, Zaai M A, Creemers-Molenaar J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of *Poa pratensis* [J]. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(12): 644-647
- [21] Dalton S J. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne* and *L. multiflorum* [J]. *Plant Tissue and Organ Culture*, 1988, 12(2): 137-140
- [22] Creemers-Molenaar J, van der Valk P, Loefen J P M, et al. Plant regeneration from suspension culture protoplasts of *Lolium perenne* [J]. *Plant Sci*, 1989, 63: 167-176
- [23] Van der Valk P, Zaai M A, Creemers-Molenaar J. Regeneration of albino plantlets from suspension culture derived protoplasts of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*) [J]. *Euphytica*, 1988, 5: 159-176
- [24] Nielsen K A, Larsen E, Knudsen E. Regeneration of protoplast-derived green plants of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(10): 537-540
- [25] Blanche F E C, Krans J V, Coats G E. Improvement in callus and plantlet formation in creeping bentgrass[J]. *Crop Sci*, 1986, 26(6): 1245-1248
- [26] Terakawa T, Sato T, Koike M. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of creeping bentgrass (*Agrostis palustris*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11(9): 457-461
- [27] Dalton S J. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* [J]. *J. Plant Physiol*, 1988, 132: 170-175
- [28] Wang Z Y, Valles M P, Montavon P, et al. Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(2): 95-100
- [29] Inokuma C, Sugiura K, Cho C, et al. Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(12): 737-741
- [30] Chai B, Sticklen M B. Application of biotechnology in turfgrass genetic improvement[J]. *Crop Sci*, 1998, 38(5): 1320-1338
- [31] Dalton S J, Bettany A J E, Timms E, et al. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *A-*

- grastis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures[J]. *Plant Sci*,1998,132:31-43
- [32] Inokuma C, Sugiura K, Imaizumi N, et al. Transgenic Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*) plants regenerated from protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*,1998,17(5):334-338
- [33] Asano Y, Ugaki M. Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*,1994,13(5):243-246
- [34] Ha S B, Wu F S, Thorne K. Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea*) plants regenerated from protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*,1992,11(12):601-604
- [35] Asano Y, Ito Y, Fukami M, et al. Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer[J]. *Plant Cell Reports*,1997,16(12):874-878
- [36] Xiao L, Ha S B. Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment[J]. *Plant Cell Reports*,1997,16(12):874-878
- [37] Heleen M, van der Maas, Eliza R, et al. Stable transformation and long-term expression of the *gusA* reporter gene in callus lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) [J]. *Plant Mol Biol*,1994,24(2):401-405
- [38] Wang G R, Binding H, Bosselt U K. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* [J]. *J Plant Physiol*,1997,151:83-90
- [39] Zhong H, Bolyard M G, Srinivasan C, et al. Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris*) from microprojection bombardment of embryogenic callus[J]. *Plant Cell Reports*,1993,12(1):1-6
- [40] Hartman C L, Lee L, Day P R, et al. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris*) by biolistic transformation[J]. *Biotechnology*,1994,12:919-923
- [41] Spangenberg G, Wang Z Y, Wu X, et al. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells[J]. *Plant Sci*,1995,108:209-217
- [42] Ye X, Wang Z Y, Wu X, et al. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells[J]. *Plant Cell Reports*,1997,16(6):379-384
- [43] Dalton S J, Bettany A J E, Timms E, et al. Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* and *Lolium temulentum* plants produced by microprojectile bombardment[J]. *Plant Cell Reports*,1999,18(9):721-726
- [44] 马忠华,张云芒,徐传祥,等.早熟禾的组织培养和基因枪介导的基因转化体系的初步建立[J].*复旦大学学报*,1999,38(5):540-544
- [45] Spangenberg G, Wang Z Y, Wu X L, et al. Transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) and red fescue (*F. rubra*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells[J]. *J Plant Physiol*,1995,145:693-701
- [46] Wang Z Y, Takamizo T, Iglesias V A, et al. Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea*) obtained by direct gene transfer to protoplasts[J]. *Biotechnology*,1992,10:691-696
- [47] Valles M P, Wang Z Y, Montavon P, et al. Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis*) [J]. *Plant Cell Reports*,1993,12(2):101-106
- [48] Humphreys M W, Dalton S J. Stability at the phosphoglucosomerase (PGI/2) locus in *Festuca arundinacea* plants regenerated from cell suspension and protoplast culture[J]. *Genome*,1991,34:59-65

## Advances of Genetic Transformation of Turf Grass

ZHANG Jun-wei<sup>1</sup>, BAO Man-zhu<sup>1</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China;

2. Flower Center, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract :** The advances of techniques of plant regeneration and genetic transformation were reviewed in this paper. Plant regeneration system of the species of genus *Lolium*, *Poa*, *Zoysia*, *Agrostis* and *Festuca* were established by means of solid medium culture, suspension culture, and protoplast suspension culture. Based upon the established regeneration systems, the genetic transformation system of those species were also established by means of silicon carbide fibre, PEG, electroporation and microprojectile bombardment methods.

**Key words :** turf grass species; plant regeneration; genetic transformation

® 学术动态 ®

### 南洋楹组培快繁技术获得成功

南洋楹是世界上著名的速生丰产树种,其生长速度比杉木快 6—7 倍,被称为“植物赛跑家”,原产南洋诸岛,为用材与园林绿化树种。在原产地印度尼西亚良好的立地条件下,4—5 年生林分每公顷蓄积年生长量可达 103—108 m<sup>3</sup>。我国南方引种成功后,现正大力推广种植,经济效益极佳,但种苗缺乏成为主要问题。组培快繁技术是解决这一问题的良好途径。中国林业科学研究院热带林业实验中心组培室的科技人员经过近 2 年的探索,已成功解决南洋楹组培快繁的技术难题,现报道如下:

1. 采用芽苗或 1 年生超级苗的苗芽两种外植体消毒接种均获成功。

2. 通过多因子综合试验,调整 MS 培养基及其它培养基辅助试验,探索出增殖效果稳定的培养基。对接种的外植体采取增加光照强度、延长光照时间及温度控制,配合不同的激素比例,促进其侧芽萌发,30 d 为一个继代周期,增殖系数可达 5 以上。

3. 对培养基的大量元素及激素进行调整,研制出生根效果良好的培养基。经生根培养后的苗木根系粗壮发达。

4. 通过炼苗与温湿条件控制,移植成活率达 90% 以上。

综合以上材料,南洋楹的组培快繁技术已达到工厂化生产要求。

(中国林业科学研究院热带林业实验中心 谌红辉)