植物学通报 2004, **21** (2): 146~155
Chinese Bulletin of Botany

高羊茅和其他羊茅植株再生与遗传转化研究进展①

吴关庭　胡张华　陈锦清②

(浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所　杭州　310021)

摘要　高羊茅、紫羊茅和草地羊茅均为很重要的多年生冷季型牧草与草坪草，生物技术在其品种改良中具有很大的应用潜力。30年来，三种羊茅的组织培养、胚性培养物的长期保存以及遗传转化等研究取得了较大进展，已建立起多种植株再生体系和遗传转化技术，但作为单子叶植物，这些草种的组织培养和转基因遗传改良也还存在一些问题。本文就以上几方面的内容进行了综述。

关键词　高羊茅，紫羊茅，草地羊茅，组织培养，遗传转化

Advances in Studies on Plant Regeneration and Genetic Transformation of Tall Fescue and Other Fescues

WU Guan-Ting　HU Zhang-Hua　CHEN Jin-Qing②

(*Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences*, Hangzhou　310021)

Abstract　Biotechnology has a great application potential in varietal improvement of tall fescue, red fescue and meadow fescue, which are commonly grown as cool-season perennial forage and turf grasses in the temperate region. During the past thirty years, obvious progresses have been made in fields of tissue culture, long-term preservation of embryogenic cultures and genetic transformation of these fescues. Various regeneration systems have been established and successful transformations by several methods have been achieved. However, some problems also exist in tissue culture and transgenic improvement of the three grasses.

Key words　Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), Red fescue (*Festuca rubra* L.), Meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.), Tissue culture, Genetic transformation

高羊茅、紫羊茅和草地羊茅属于禾本科羊茅属，都是世界温带地区的多年生冷季型草种，既可作为牧草种植，也可用作草坪草。近几年来，高羊茅作为草坪草利用发展很快，我国黑龙江、北京、山东、江苏、武汉、江西等很多地方都已引种栽培（孙本信等，2001）。

①浙江绿洲农业股份有限公司资助。

②通讯作者。Author for correspondence.

作者简介：吴关庭，男，1963年5月出生，副研究员，浙江大学在职博士生，现从事植物基因工程研究。陈锦清，研究员，博士生导师，男，1953年2月出生，浙江省农业科学院首席科学家，留日归国博士，主持完成的利用反义PEP基因技术培育出世界上含油量最高的油菜新品被两院院士评选为2002年度中国十大科技进展新闻。

收稿日期：2003-02-26　接受日期：2003-04-25　责任编辑：孙冬花

紫羊茅是用于高尔夫球场和家庭庭园的主要草坪草之一。在欧洲，紫羊茅仅次于黑麦草，占总草籽生产面积的15%（Altpeter and Xu，2000）。草地羊茅广泛分布于北半球尤其是欧洲，作为牧草栽培，其产量高，可消化性优良（Vallés *et al.*，1993）。因此，高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的遗传改良对发展畜牧业和草坪业具有十分重要的意义。

长期以来，同其他牧草和草坪草一样，高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的新品种培育基本上都是依靠常规育种方法，植物基因工程技术的发展为这些羊茅草种的遗传改良提供了一种很有潜力的手段（Kaul，1990）。作为单子叶植物，高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的离体遗传操作困难，但经过近30年的不懈努力以及随着植物组培技术和转基因技术的不断成熟和完善，这些羊茅的植株再生与遗传转化研究依然取得了较大进展。

1 植株再生体系的建立

高羊茅等羊茅草种的组织培养开始于20世纪70年代初，最初的研究大多只是诱导获得愈伤组织，而未再生出植株（Atkin and Barton，1973；Conger *et al.*，1978）。Dale（1977）首先从高羊茅的分生组织顶端培育出小植株。此后，随着研究的逐步深入，各种植株再生体系相继建立。

1.1 由胚性愈伤组织再生植株

胚性愈伤组织是谷类作物和草种离体培养中的最基本的再生组织。已有不少研究从高羊茅和紫羊茅的多种外植体诱导获得愈伤组织并再生成株。这些外植体包括成熟种子或成熟胚（Lowe and Conger，1979；Torello *et al.*，1984；1985；Reed and Conger，1985；Dahleen and Eizenga, 1990；Rajoelina *et al.*，1990；Altpeter and Xu，2000；Bai and Qu，2000；2001；钱海丰和薛庆中，2002）、幼胚（Rajoelina *et al.*, 1990；Bai and Qu，2001）、幼穗（Dale and Dalton，1983；Eizenga and Dahleen，1990）以及花梗组织（Kasperbauer *et al.*，1979）等。成熟种子或成熟胚离体操作方便，一年四季随时可以获取，因而是高羊茅等羊茅草种组培外植体的主要选择。高羊茅幼胚的愈伤组织诱导率高于成熟种子（Rajoelina *et al.*，1990；Bai and Qu，2001），但植株再生频率却相对较低（Bai and Qu，2001）。基因型是影响高羊茅和紫羊茅愈伤组织诱导与植株再生的一个很重要的因素，不同品种之间愈伤组织诱导率及其再生频率有显著差异（Torello *et al.*, 1984；Dahleen and Eizenga, 1990；Eizenga and Dahleen，1990；Altpeter and Xu，2000），这种差异有时可达数倍甚至10倍以上（Bai and Qu，2000）。愈伤组织诱导率低的品种，愈伤组织再生频率不一定低（Bai and Qu，2000），而产生愈伤组织最多的基因型也未必再生植株最多（Eizenga and Dahleen，1990）。从高羊茅成熟种子诱导愈伤组织需要较高浓度的植物生长物质2,4-D（Lowe and Conger，1979）。在培养基中添加9 mg·L^{-1} 2,4-D，愈伤组织诱导率较高，在此范围内，愈伤组织诱导率随2,4-D浓度的提高而提高（Bai and Qu，2000；钱海丰和薛庆中，2002）。Bai和Qu（2001）研究表明，细胞分裂素BAP能改善高羊茅愈伤组织质量，显著提高愈伤组织再生能力，由成熟种子诱导可再生愈伤组织的最佳BAP浓度是0.1 mg·L^{-1}。培养基中补充植物生长调节剂TDZ也能提高成熟种子的愈伤组织再生频率。酪蛋白水解物、脯氨酸和肌醇等有机物可促进未成熟胚的愈伤组织诱导，但对成熟种子愈伤组织诱导及这两种外植体来源的愈伤组织的再生没有作用或产生不利影响。简单地将成熟种子纵向切成两半，可使愈伤组织诱导率和

相应的总植株再生频率提高 3~6 倍。

1.2 由胚性悬浮培养物再生植株

胚性悬浮培养物是禾本科植物具全能性原生质体的主要来源（Vasil，1988），同时又可用作遗传转化的直接目标受体。在高羊茅（Dalton，1988a；1988b）、紫羊茅（Zaghmout and Torello，1989；Spangenberg *et al.*，1994a）和草地羊茅（Vallés *et al.*，1993；Wang *et al.*，1993）上，由胚性悬浮培养物再生植株均已取得成功。胚性悬浮培养物的建立一般是通过有选择地将胚性愈伤组织转移到液体培养基中（Zaghmout and Torello，1989；Wang *et al.*，1993；Spangenberg *et al.*，1994a），但也可以将切碎的成熟胚接种于含有高浓度（如 10 $mg \cdot L^{-1}$）2, 4-D 的液体培养基中直接诱导（Dalton，1988a；1988b；Ha *et al.*，1992）。这种直接诱导方法不经愈伤组织阶段，因而可缩短建立胚性细胞悬液所需的时间。试验过程中建立的不同悬浮培养物在生长反应、分散程度、植株再生等方面差异很大（Dalton，1988a；Wang *et al.*，1993）。培养基中添加酪蛋白水解物大大促进培养物的生长，适当的 2, 4-D 浓度对胚性细胞悬液的生长有促进作用，浓度为 4 $mg \cdot L^{-1}$ 时，生长速率最高（Zaghmout and Torello，1989）。用适当大小的筛子预先过滤新诱导的悬液对除去生长较快的非胚性细胞类型至关重要（Zaghmout and Torello，1989）。

1.3 由原生质体再生植株

原生质体可用于直接基因转移和融合，产生转基因植株和体细胞杂种。高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的原生质体植株再生已有不少报道（Dalton，1988a；1988b；Takamizo *et al.*，1990；Ha *et al.*，1992；Vallés *et al.*，1993；Spangenberg *et al.*，1994a）。Wang 等（1993）从草地羊茅胚性悬浮培养物分离原生质体并再生出绿色植株，这些植株部分可育，与对照植株杂交后，获得了能正常发芽的成熟种子，这是牧草和草坪草原生质体再生植株育性的首次报道。高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的原生质体均由胚性悬浮培养物分离，悬浮培养物的培养时间对原生质体的植株再生非常关键（Takamizo *et al.*，1990），原生质体分离应以完全分散的、形成细粒的、快速增长的能再生细胞悬液作为供体材料。观察表明，从高羊茅细胞悬浮培养系分离的原生质体可以分成 4 类，即含有大淀粉粒（5~10 μm）的具液泡原生质体、含有小淀粉粒（2 μm）的具液泡原生质体、只具液泡的原生质体和没有可见液泡的小而细胞质稠密的原生质体（Dalton，1988b）。在三种羊茅的原生质体培养中，许多研究采用了添加看护细胞的琼脂糖包埋法（Takamizo *et al.*，1990；Ha *et al.*，1992；Wang *et al.*，1993；Spangenberg *et al.*，1994a）。在琼脂糖块周围的液体培养基中添加看护细胞对提高原生质体的植板率很有效，而且为原生质体来源的愈伤组织的形成及植株再生所必需。原生质体的植板率（可见细胞团数 / 植板原生质体数）为 10^{-3}~10^{-4}（Wang *et al.*，1993；Spangenberg *et al.*，1994a），高的可达 1.0%（Dalton，1988a；1988b）。原生质体在 AA 培养基中培养，植板率高于 B5 培养基（Takamizo *et al.*，1990）。将原生质体来源的细胞团直接转移到无激素培养基上，再生植株不如先在补充有 2, 4-D 和脯氨酸的培养基上继代一、二次后所再生的植株茁壮（Takamizo *et al.*，1990）。

值得一提的是，将碘乙酰胺失活的高羊茅原生质体与非形态发生的意大利黑麦草原生质体电融合，并再生获得了若干绿色植株（Takamizo *et al.*，1991）。这些植株在习性及叶片和花序形态等方面介于两亲本之间。Southern 杂交分析表明，再生植株含有高羊茅和意大利黑

麦草特异的 DNA 片段。采用上述方法，融合处理前用 10~500 Gy 的 X 射线辐照意大利黑麦草原生质体，得到了高羊茅与意大利黑麦草的属间对称和不对称体细胞杂种植株（Spangenberg *et al.*，1994b），这些植株的体细胞杂种性质通过细胞器组成的 RFLP 分析得到了证实（Spangenberg *et al.*，1995a）。

1.4 由高频再生组织再生植株

高频再生组织从胚性愈伤组织诱导产生（Cho *et al.*，1998；1999），但其本身并不是胚胎发生的，而是器官发生的，大麦的高频再生组织具有与茎尖培养产生的分生组织相似的生理特性和发育特点。这种组织能再生出多个苗，且再生能力可保持很长时间，已用作大麦、小麦、燕麦等作物遗传转化的目标受体（Cho *et al.*，1998；1999）。Cho 等（2000）在补充有 2, 4-D、BAP 和硫酸铜的培养基上，从高羊茅和紫羊茅成熟种子来源的胚性愈伤组织诱导产生高频再生组织，这些组织在形态特征方面与大麦高频再生组织相似，具有多个淡绿色的芽分生组织样的结构。用 4~5 月龄的这种组织作为转化受体，已成功获得了转基因植株 。

1.5 由花药 - 幼穗培养再生单倍体植株

花药培养获得单倍体已成为现代植物育种实践的一个组成部分。Kasperbauer 等（1980）直接用高羊茅花药进行培养，未能获得单倍体植株，但将超出旗叶以上 3 cm 左右的幼穗剪成大约 2.5 cm 长的切段，接种在含 2 mg·L^{-1} 2, 4-D 的诱导培养基上，以幼穗切段作为看护组织，结果五周后由若干花药长出松散的增生细胞团，七周后从这些细胞团再生获得一批绿色小植株。经根和茎尖发育中期细胞检查，再生植株大多具有单倍体染色体数（n = 21）。此后，Rose 等（1987）在草地羊茅上也获得了花培单倍体植株。

2 胚性培养物的长期保存

高羊茅、紫羊茅和草地羊茅属于组织培养难度较大的物种（Vasil，1988）。它们异花授粉，遗传上是杂合的，同一品种内不同的种子可能代表着不同的基因型，因此要建立单一基因型来源的胚性培养物尤其是胚性悬浮培养物十分不易。为保证这些羊茅草种组织培养及遗传转化研究的连续性，人们通过继代和冷冻等方法来长期保存胚性培养物。

2.1 继代保存

继代保存就是将胚性培养物每隔一定时间转移到新鲜培养基上长期保存下去。紫羊茅胚性愈伤组织每 6~8 周继代一次，胚性悬浮培养物每周继代一次，可分别连续保存 5 年和 1 年以上（Zaghmout and Torello，1988；1992）。但是，采用这种方法耗时，费用高，由于污染和遗传变异等原因可能会造成重要遗传材料的丢失。而且，许多研究表明，随着继代保存时间的延长，高羊茅和紫羊茅胚性培养物的植株再生能力下降，白化苗增多（Loweand Conger，1979；Torello *et al.*，1984；Dalton，1988a；Zaghmout and Torello，1988；1992）。为改善长期保存胚性培养物的形态发生能力，人们进行了一些有益探索。Zaghmout 和 Torello（1988）在保存培养基中添加活性炭，让已保存 5 年多的紫羊茅胚性愈伤组织先经历一段预处理培养期，然后再转移到分化培养基上，结果使老化中的胚性愈伤组织的植株再生率得到了提高。据分析，这可能是添加活性炭后，2, 4-D 和其他形态发生抑制剂被活性炭吸附所致。分化前，用 60 mmol·L^{-1} 标准浓度以上的蔗糖进行预处理，也大大增强了长期保存的紫羊茅胚

性愈伤组织的植株再生能力，减少了白化苗数，其效果以培养基中补充 120 mmol·L^{-1} 蔗糖的最好。在该浓度下，胚胎发生程度最高，再生绿苗数最多（Zaghmout and Torello，1992）。该研究还表明，预处理生长培养基中添加 135 mmol·L^{-1} 蔗糖，长期保存的胚性悬浮培养物生长最快；悬液团聚体经 135 或 180 mmol·L^{-1} 蔗糖预处理后，植株再生也需要高浓度蔗糖。

2.2 低温保存

低温保存是细胞培养物长期保存的一种可选方法，采用这种方法不必定期转继代保存，也可能不会产生遗传变异（Withers，1985）。鉴于继代保存的多种不足之处，一些研究者对利用液氮低温保存高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的胚性悬浮培养物进行了尝试（Spangenberg *et al.*，1994a；Wang *et al.*，1994）。研究表明，液氮贮藏培养物融化后，40%~70% 的细胞能重新启动生长，并在两个月内重新建立起胚性细胞悬液。从液氮保存 6 个月的高羊茅培养物重新建立的细胞悬液仍保持冰冻前的形态和很高的植株再生频率（82%），而通过每周继代保存同样时间的未冰冻细胞悬液的再生频率较低（28%）。由上述重建的细胞悬液分离原生质体，其产量和植板率与从原先未冰冻培养物分离的原生质体相当，植株再生频率较高（76%）。RAPD 分析证实，低温保存培养物及相应再生植株基本上是遗传稳定的（Wang *et al.*，1994）。研究还发现，高羊茅等羊茅草种胚性悬浮培养物冰冻贮藏前需经低温保护处理，否则，一个冰冻 - 融化循环后，胚性细胞不能存活。在不同低温保护处理之间，胚性细胞融化后生长有显著差异，其中使用低温保护剂 DS（10% DMSO 和 0.5 mol·L^{-1} 山梨醇）的效果要好于 DGS（5% DMSO、10% 甘油和 8% 蔗糖），冰冻前 30 min 添加低温保护剂使草地羊茅胚性悬浮细胞融化后的存活率比就在冰冻前添加低温保护剂提高 18%。此外，冰冻前进行高渗适应性培养也能使低温保存的胚性悬浮培养物融化后存活率提高。在高羊茅上，非高渗适应细胞的融化后存活率为 18%~49%，而高渗适应细胞的融化后存活率则为 43%~71%。在紫羊茅上，非高渗适应细胞融化后几乎不能生长，而高渗适应细胞的融化后存活率达到 25%~42%，表明冰冻前高渗适应处理为紫羊茅低温保存细胞冰冻耐性的产生所必需（Wang *et al.*，1994）。

3 外源基因的遗传转化

3.1 遗传转化概况

高羊茅等羊茅草种的遗传转化开始于 20 世纪 90 年代初，1992 年首先在高羊茅上获得了转基因植株（Ha *et al.*，1992；Wang *et al.*，1992）。自此以后，高羊茅和紫羊茅的遗传转化已有一些报道，最初几年研究者都是以原生质体和胚性悬浮培养物作为受体（Ha *et al.*，1992；Wang *et al.*，1992；Spangenberg *et al.*，1994a；1995b；Dalton *et al.*，1995；1998；Kuai and Morris，1995；1996；Bettany *et al.*，1998；Kuai *et al.*，1999）。近年来，随着植物转基因技术的发展，胚性愈伤组织及由胚性愈伤组织产生的高频再生组织开始在高羊茅和紫羊茅的遗传转化中得到应用（Altpeter and Xu，2000；Cho *et al.*，2000）。原生质体的转化大多采用聚乙二醇（PEG）法（Wang *et al.*，1992；Spangenberg *et al.*，1994a；Dalton *et al.*，1995；Kuai and Morris，1995；1996；Kuai *et al.*，1999；Bettany *et al.*，1998；2002），胚性悬浮细胞、胚性愈伤组织和高频再生组织则用基因枪法转化（Spangenberg *et al.*，1995b；Altpeter and Xu，2000；Cho *et al.*，2000；Wang *et al.*，2001）。Dalton

等（1998）采用碳化硅纤维法转化高羊茅细胞悬浮培养物，获得了转基因植株。农杆菌介导高羊茅遗传转化近年有所进展，Bettany 等（2003）通过农杆菌介导法转化高羊茅胚性悬浮细胞，获得两个独立转基因株系。

迄今为止，用于转化高羊茅和紫羊茅的外源基因主要是选择基因 *hph*（潮霉素磷酸转移酶基因）和 *bar*（膦丝菌素乙酰转移酶基因）以及报告基因 *gus*（葡糖苷酸酶基因）。虽然 *bar* 基因表达产生的除草剂抗性可兼作一个有益性状利用，但已有文献中真正有意识导入高羊茅的第一个农业上有重要用途的外源基因则是向日葵清蛋白基因 *sfa8*（Wang *et al.*，2001）。该基因在高羊茅植株中表达后，相应的富硫向日葵清蛋白积累到占转基因植株中总可溶性蛋白的 0.2%。

在高羊茅和紫羊茅的遗传转化研究中，转化体大多采用潮霉素筛选，其次是用除草剂膦丝菌素。高羊茅和紫羊茅对潮霉素具有很强的内源抗性（Wang *et al.*，1992）。潮霉素浓度为 150 mg·L^{-1} 时，少量未转化高羊茅细胞团仍能生长（Ha *et al.*，1992），而同为禾本科单子叶植物的水稻，潮霉素筛选浓度通常不超过 50 mg·L^{-1}。另一方面，两种羊茅之间对潮霉素和膦丝菌素的敏感性也有差异。紫羊茅和高羊茅未转化悬浮细胞的潮霉素致死浓度分别为 150 mg·L^{-1} 和 250 mg·L^{-1}（Spangenberg *et al.*，1995b）。用膦丝菌素筛选转化体，紫羊茅上用 50 mg·L^{-1}（Spangenberg *et al.*，1994a），高羊茅上则用 100 mg·L^{-1}（Wang *et al.*，1992）。受体材料同为高羊茅胚性悬浮细胞，不同研究所使用的潮霉素筛选浓度相差很大（Spangenberg *et al.*，1995b；Dalton *et al.*，1998；Wang *et al.*，2001），以膦丝菌素作为选择剂也有类似情况（Wang *et al.*，1992；Kuai *et al.*，1999）。

3.2 遗传转化影响因素

为提高高羊茅和紫羊茅的遗传转化效果，一些研究者从多方面进行了探讨。Spangenberg 等（1995b）用基因枪轰击高羊茅和紫羊茅的胚性悬浮细胞，然后采用两种方式进行转化体的筛选，一种是处理后的胚性悬浮细胞先在潮霉素浓度逐步提高的液体培养基中筛选，然后转至固体培养基上继续筛选，另一种是只在固体培养基上连续筛选。结果表明，采用前一方式可使抗潮霉素愈伤组织的得率比后一方式提高 1 倍。此外，该研究还表明，基因枪轰击前对胚性悬浮细胞进行高渗预处理可导致 *gus* 瞬间表达大量增加。

Dalton 等（1995）也研究比较了不同筛选方式对高羊茅遗传转化效果的影响。简单不连续筛选时，植株再生最多，但导致大量逃逸植株的产生。而采用低浓度潮霉素连续筛选，虽然一些未转化愈伤组织能够存活和生长，但不能再生植株，因而产生的转基因植株数最多且没有逃逸。筛选方式还与转基因拷贝数有关。不连续筛选和低浓度潮霉素连续筛选所产生的转基因植株中，含两个或两个以下转基因拷贝的植株比例很高，分别达 87% 和 88%。高浓度潮霉素连续筛选则有利于多拷贝转基因植株的再生。研究还表明，使用编码具较高比活性的潮霉素磷酸转移酶的质粒，可明显促进转基因植株的产生。

细胞悬浮培养物的培养时间对高羊茅等草种的转基因植株再生至关重要（Dalton *et al.*，1998）。Kuai 和 Morris（1995）研究表明，用于分离原生质体的细胞培养物的继代保存时间和分离前的继代培养时间对 *gus* 基因的瞬间和稳定表达有显著影响。随着悬浮培养物继代保存时间的延长，一方面，正如前面所指出的那样，植株再生能力下降，白苗增多，另一方面，*gus* 基因瞬间表达水平和稳定表达频率逐渐降低。使用从继代培养 3~4 d 的悬浮培养物分

离的原生质体，其 *gus* 基因瞬间表达水平最高，而使用从继代培养 1 d 和 7 d 的悬浮培养物分离的原生质体，其 *gus* 基因瞬间表达水平还不到其一半。原生质体分离前的继代培养时间对 *gus* 基因瞬间表达的影响与细胞培养物的生长率和蛋白合成速率密切相关。Kuai 和 Morris（1995）还发现，延长细胞壁消化酶消化细胞的时间会对 *gus* 基因的瞬间表达产生抑制作用。培养基的渗透势也是影响高羊茅遗传转化效果的一个重要因素。在一定范围内，随着转化培养基中渗透势的提高，*gus* 基因的瞬间和稳定表达水平增强。同样，原生质体培养基的渗透势对 GUS 阳性细胞团数和转化频率也有显著作用。

采用裸露 DNA 基因转化方法时，大多数研究者使用 1:1 的克分子基因比（molar gene ratio，MGR）进行共转化。Bettany 等（2002）用不同 MGR 的标记基因 *gus* 和选择基因 *hph* 共转化高羊茅原生质体，在再生获得的独立转基因植株中，共转化植株的比例倾向于随着标记基因比例的提高而提高，而共表达植株的比例则以 MGR 为 4:1 时最高。这一研究结果表明，以较高的 MGR 添加非选择性和选择性转基因可能会提高两基因共表达植株的比例。

4 植株再生与遗传转化中存在的主要问题

4.1 胚性愈伤组织诱导频率低

同大多数谷类作物一样，高羊茅和紫羊茅组织培养可诱导产生两类形态上明显不同的愈伤组织，一类是胚性愈伤组织，一般为白色至黄色，致密，外观有颗粒状突起，再生能力强；另一类是非胚性愈伤组织，通常较软而呈水渍状，半透明或淡黄色，易碎，植株再生频率极低（Torello *et al.*，1984；Bai and Qu，2000）。由于作为高羊茅等草种原生质体惟一来源的胚性悬浮培养物的建立以及高频再生组织的产生都有赖于胚性愈伤组织的获得，所以诱导和增殖足够数量的胚性愈伤组织就成为这些羊茅植株再生与遗传转化的首要基础。但在组培实际操作中遇到的一个普遍问题是，以最为常用的成熟种子（胚）作为外植体，诱导获得的愈伤组织中胚性愈伤组织的比例非常低。为此，必须对这些愈伤组织进行继代和改造，促进胚性愈伤组织的产生和增殖，这不仅工作量大，而且延长了获得再生植株和转基因植株所需的时间。

4.2 再生植株白化现象比较严重

再生植株白化现象在禾本科植物组织培养中很普遍，是制约组织培养技术在作物改良中应用的一个主要问题。对高羊茅、紫羊茅和草地羊茅，这一问题显得尤为突出，许多研究中，再生植株白化频率达到 8%~25%（Lowe and Conger，1979；Torello *et al.*，1984；1985；Rajoelina *et al.*，1990；Vallés *et al.*，1993；Wang *et al.*，1993；Kuai *et al.*，1999）。Takamizo 等（1990）再生获得 188 个原生质体来源的高羊茅植株，其中白化苗多达 145 个，占 77.1%。在 Rajoelina 等（1990）的研究中，15% 的高羊茅愈伤组织完全再生白化植株，另有 18% 的愈伤组织同时再生白苗和绿苗。再生植株白化程度与基因型、培养物的培养时间和培养条件等多种因素有关。随着胚性愈伤组织和胚性悬浮培养物继代保存时间的延长，再生植株中白苗的比例升高（Lowe and Conger，1979；Torello *et al.*，1984；Dalton，1988a；Zaghmout and Torello，1988；1992）。

4.3 转基因后代的获得相对比较困难

高羊茅和紫羊茅都是异花授粉的六倍体牧草和草坪草，自交高度不育（Spangenberg *et*

al.，1995b），种子的产生必须通过异交；但在高羊茅离体培养再生植株中，非整倍体的频率很高（60% 左右），花粉育性不同程度下降（Eizenga，1987；Dahleen and Eizenga，1990），这些都给高羊茅和紫羊茅转基因后代的获得带来了困难。事实上，在已有的这两种羊茅的遗传转化研究中，成功获得转基因种子的报道并不多。Bettany 等（2002）对高羊茅转基因植株进行异交，只有不到 20% 的植株产生雄性或雌性来源的种子。他们在另一研究中发现，对通过农杆菌介导获得的两株高羊茅转基因植株进行春化处理，结果未能产生种子（Bettany *et al.*，2003）。Kuai 等（1999）共转化获得 *bar* 基因稳定高效表达的高羊茅转基因植株，但在其异交的两个后代群体中，都没有检测到该转基因的存在。据推测，造成这种现象的原因之一可能是转基因使单倍体花粉丧失了一种重要功能，正如在玉米中所观察到的那样（Zhang *et al.*，1996），从而使得外源基因通过花粉传递的效率非常低。

5 结语

高羊茅、紫羊茅和草地羊茅的组织培养与转基因研究取得了较大进展，业已建立起多种植株再生体系和包括农杆菌介导在内的多种遗传转化技术。鉴于这些羊茅草种作为牧草与草坪草的日益显现的重要性以及生物技术在其品种改良中的巨大应用潜力，目前国内外的许多公司和实验室都在开展耐逆、抗病、抗虫、抗除草剂以及品质相关基因的转基因研究。虽然在具体的实践中尚存在一些问题，但随着植物组培技术和遗传转化技术的进一步发展以及研究的不断深入，相信这些问题都能一一得到解决。

参 考 文 献

孙本信, **尹公**, **张绵**, 2001. **草坪植物种植技术**. **北京**: **中国林业出版社**, 78~80

钱海丰, **薛庆中**, 2002. **激素对高羊茅愈伤组织诱导及其分化的影响**. **中国草地**, **24**: 46~49, 60

Altpeter F, Xu J, 2000. Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. *J Plant Physiol*, **157**: 441~448

Atkin R K, Barton G E, 1973. The establishment of tissue cultures of temperate grasses. *J Exp Bot*, **24**: 689~699

Bai Y, Qu R, 2000. An evaluation of callus induction and plant regeneration in twenty-five turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) cultivars. *Grass Forage Sci*, **55**: 326~330

Bai Y, Qu R, 2001. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breeding*, **120**: 239~242

Bettany A J E, Dalton S J, Timms E, Morris P, 1998. Stability of transgene expression during vegetative propagation of protoplast-derived tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants. *J Exp Bot*, **49**: 1797~1804

Bettany A J E, Dalton S J, Timms E, Dhanoa M S, Morris P, 2002. Effect of selectable gene to reporter gene ratio on the frequency of co-transformation and co-expression of *uidA* and *hpt* transgenes in protoplast-derived plants of tall fescue. *Plant Cell Tiss Org*, **68**: 177~186

Bettany A J E, Dalton S J, Timms E, Manderyck B, Dhanoa M S, Morris P, 2003. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). *Plant Cell Rep*, **21**: 437~444

Cho M J, Jiang W, Lemaux P G, 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci*, **138**: 229~244

Cho M J, Jiang W, Lemaux P G, 1999. High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Sci*, **148**: 9~17

Cho M J, Ha C D, Lemaux P G, 2000. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep*, **19**: 1084~1089

Conger B V, Carabia J V, Lowe K W, 1978. Comparison of 2, 4-D and 2, 4, 5-T on callus induction and growth in three *Gramineae* species. *Environ Exp Bot*, **18**: 163~168

Dahleen L S, Eizenga G C, 1990. Meiotic and isozymic characterization of plants regenerated from euploid and selfed monosomic tall fescue embryos. *Theor Appl Genet*, **79**: 39~44

Dale P J, 1977. Meristem tip culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum*, and *Dactylis*. *Plant Sci*, **9**: 333~338

Dale P J, Dalton S J, 1983. Immature inflorescence culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phloem*, and *Dactylis*. *Z Pflanzenphysiol*, **111**: 39~45

Dalton S J, 1988a. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb., *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* LAM. *Plant Cell Tiss Org*, **12**: 137~140

Dalton S J, 1988b. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass). *J Plant Physiol*, **132**: 170~175

Dalton S J, Bettany A J E, Timms E, Morris P, 1995. The effect of selection pressure on transformation frequency and copy number in transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Sci*, **108**: 63~70

Dalton S J, Bettany A J E, Timms E, Morris P, 1998. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures. *Plant Sci*, **132**: 31~43

Eizenga G C, 1987. Cytogenetic and isozymic characterization of anther-panicle culture derived tall fescue aneuploids. *Euphytica*, **36**: 175~179

Eizenga G C, Dahleen L S, 1990. Callus production, regeneration and evalution of plants from cultured inflorescence of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Cell Tiss Org*, **22**: 7~15

Ha S B, Wu F S, Thorne T K, 1992. Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Rep*, **11**: 601~604

Kasperbauer M J, Buckner R C, Bush L P, 1979. Tissue culture of annual ryegrass × tall fescue F_1 hybrids: callus establishment and plant regeneration. *Crop Sci*, **19**: 457~460

Kasperbauer M J, Buckner R C, Springer W D, 1980. Haploid plants by anther-panicle culture of tall fescue. *Crop Sci*, **20**: 103~107

Kaul K, 1990. Potential biotechnological approaches. In: Kasperbauer M J ed. Biotechnology in Tall Fescue Improvement. Boca Raton FL: CRC Press, 13~23

Kuai B K, Morris P, 1995. The physiological state of suspension cultured cells affects the expression of the β-glucuronidase gene following transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea*) protoplasts. *Plant Sci*, **110**: 235~247

Kuai B K, Morris P, 1996. Screening for stable transformants and stability of β-glucuronidase gene expression in suspension cultured cells of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant Cell Rep*, **15**: 804~808

Kuai B K, Dalton S J, Bettany A J E, Morris P, 1999. Regeneration of fertile transgenic tall fescue plants with a stable highly expressed foreign gene. *Plant Cell Tiss Org*, **58**: 149~154

Lowe K W, Conger B V, 1979. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue. *Crop Sci*, **19**: 397~400

Rajoelina S R, Alibert G, Planchon C, 1990. Continuous plant regeneration from established embryogenic cell suspension cultures of Italian ryegrass and tall fescue. *Plant Breeding*, **104**: 265~271

Reed J N, Conger B V, 1985. Meiotic analysis of tall fescue plants regenerated from callus cultures. *Environ Exp Bot*, **25**: 277~284

Rose J B, Dunwell J M, Sunderland N, 1987. Anther culture of *Lolium* temulentum, *Festuca pretensis* and *Lolium* × *Festuca* hybrids. Ⅱ. Anther and pollen development *in vivo* and *in vitro*. *Ann Bot*, **60**: 213~214

Spangenberg G, Wang Z Y, Nagel J, Potrykus I, 1994a. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Sci*, **97**: 83~94

Spangenberg G, Vallés M P, Wang Z Y, Montavon P, Nagel J, Potrykus I, 1994b. Asymmetric somatic hybridization between tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and irradiated Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) protoplasts. *Theor Appl Genet*, **88**: 509~519

Spangenberg G, Wang Z Y, Legris G, Montavon P, Takamizo T, Pérez-Vicente R, Vallés M P, Nagel J, Potrykus I, 1995a. Intergeneric symmetric and asymmetric somatic hybridization in *Festuca* and *Lolium*. *Euphytica*, **85**: 235~245

Spangenberg G, Wang Z Y, Wu X L, Nagel J, Iglesias V A, Potrykus I, 1995b. Transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) and red fescue (*F. rubra*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *J Plant Physiol*, **145**: 693~701

Takamizo T, Suginobu K, Ohsugi R, 1990. Plant regeneration from suspension culture derived protoplasts of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) of a single genotype. *Plant Sci*, **72**: 125~131

Takamizo T, Spangenberg G, Suginobu K, Potrykus I, 1991. Intergeneric somatic hybridization in Gramineae: somatic hybrid plants between tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Mol Gen Genet*, **231**: 1~6

Torello W A, Symington A G, Rufner R, 1984. Callus initiation, plant regeneration, and evidence of somatic embryogenesis in red fescue. *Crop Sci*, **24**: 1037~1040

Torello W A, Rufner R, Symington A G, 1985. The ontogeny of somatic embryos from long-term callus cultures of red fescue. *HortScience*, **20**: 938~942

Vallés M P, Wang Z Y, Montavon P, Potrykus I, Spangenberg G, 1993. Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). *Plant Cell Rep*, **12**: 101~106

Vasil I K, 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology*, **6**: 397~402

Wang Z Y, Takamizo T, Iglesias V A, Osusky M, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G, 1992. Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio/Technology*, **10**: 691~696

Wang Z Y, Vallés M P, Montavon P, Potrykus I, Spangenberg G, 1993. Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). *Plant Cell Rep*, **12**: 95~100

Wang Z Y, Legris G, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G, 1994. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions in *Festuca* and *Lolium* species. *Plant Sci*, **103**: 93~106

Wang Z Y, Ye X D, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G, 2001. Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants. *Plant Cell Rep*, **20**: 213~219

Withers L A, 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: Kartha K K ed. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Boca Raton FL: CRC Press, 243~267

Zaghmout O M F, Torello W A, 1988. Enhanced regeneration in long-term callus cultures of red fescue by pretreatment with activated charcoal. *HortScience*, **23**: 615~616

Zaghmout O M F, Torello W A, 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of red fescue. *Crop Sci*, **29**: 815~817

Zaghmout O M F, Torello W A, 1992. Restoration of regeneration potential of long-term cultures of red fescue (*Festuca rubra* L.) by elevated sucrose levels. *Plant Cell Rep*, **11**: 142~145

Zhang S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen M, 1996. Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (*uidA*) and selected (*bar*) transgenes in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, **92**: 752~761