

植物体细胞胚发生及在草坪草遗传育种中的应用

梁慧敏¹, 夏 阳¹, 韩烈保²

(1 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014; 2 北京林业大学草坪研究所, 北京 100083)

摘要:综述了草坪草体细胞胚诱导对高频组培再生体系和高效遗传转化体系建立的重要性, 及影响体胚发生的因素, 体胚的发生在遗传育种中的应用。

关键词:草坪草; 体细胞胚胎发生; 遗传育种

中图分类号: Q813

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) S2-0091-06

Plant somatic embryogenesis germination and its application in turfgrasses genetic breeding

LIANG Hui-min¹, XIA Yang¹, HAN Lie-bao²

(1 Genetics and Breeding Institute, Shandong Provincial Academy of Forestry, Jinan 250014, China;

2 Institute of Turfgrass Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Combined with the authors' research work, it was summarized that the important role of somatic embryogenesis induction to establishment of regeneration tissue culture system and gene transformation system, and factors of effect on somatic embryogenesis production, as well as application of somatic embryogenesis germination to turfgrasses genetic breeding.

Key words: turfgrass; somatic embryogenesis; genetic breeding

传统上, 草坪草的改良依据常规育种方案, 现在由于生物技术的发展允许草坪草的一些性状使用来源于其他物种的遗传资料进行改良。一个高效遗传转化体系首先必须有一个有效的离体培养再生系统。建立一个高频组织培养再生体系是草坪草生物技术育种的关键。在进行草坪草细胞培养技术的理论研究、原生质体的培养及原生质体融合、融合后体细胞杂交种的利用和改良品种的应用中都要借助组培技术再生出完整植株; 利用基因工程获得转基因植株亦依赖于转化细胞再生植株的能力; 通过无性系变异筛选突变体培育新品种也取决于培养细胞的再生能力。体细胞胚发生由于其产生的胚状体是两极结构, 再生容易, 具有繁殖效率高、后代稳定性高

及可作为人工种子和转基因材料等优点而倍受人们的关注。它也是草坪草组培中从胚性愈伤组织建立原生质体再生系统、高效再生植株的唯一最重要的途径。所以, 研究离体细胞形态发生特点、探讨影响植物体细胞胚胎发生的因素是建立各种草坪草有效组培再生体系的关键。

1 草坪草体细胞胚发生

1.1 体胚的诱导

从理论上讲, 各种植物的体细胞都具有全能性, 离体培养均可形成再生植株。但事实上有些植物很容易, 有些植物则很难。主要是对这些植物再生植株培养条件还没完全掌握。草坪草也像许多主要的单

收稿日期: 2004-09-18

作者简介: 梁慧敏(1962-), 女, 研究员, 博士。

基金项目: 山东省科技发展计划(011100104)资助项目; 国家 863 计划(编号 2001AA244082)资助项目

子叶作物一样被认为是很难利用组织培养进行体细胞胚胎诱导再生植株的植物,特别是一些暖季型草坪草相关报道很少。随着植物组织和细胞培养技术的不断完善,植物体细胞在离体培养中通过体细胞胚胎发生途径形成再生植株将会成为普遍现象,该发生途径也将成为植物体细胞在离体培养条件下的一个基本发育途径。

不同组织或外植体在离体培养条件下诱导体细胞胚胎发生有相似的过程。体细胞一旦转化为胚性细胞后在形态上很容易和原组织或细胞相区别。

诱导体细胞胚发生途径有2种:一种是直接途径,即从外植体某些部位直接诱导分化出体细胞胚,如山茶子叶培养后,直接从子叶基部的表皮细胞产生体细胞胚。间接途径即可通过脱分化形成愈伤组织后,再从愈伤组织的某些细胞分化出体细胞胚。作者实验室建立的苜蓿、狗牙根和草地早熟禾胚性愈伤组织的诱导就是通过间接途径发生的。这些胚性细胞能否进一步分化和发育,就要看这些细胞能否从周围细胞获得能量、物质和信息,继续分裂和分化,并尽快与周围细胞分开,脱离整体控制,实现胚胎发生的全能性。但这种生理隔离也是相对的,并不意味着它与周围组织在生理上完全隔离开,它们之间既是相互依存的关系,又是相互竞争的关系。因此如果培养条件合适,可以减少胚性细胞之间的竞争,提高体细胞胚诱导的频率。

通常大部分草坪草在较高浓度的生长素和较低浓度的细胞分裂素的固体培养基上就能形成愈伤组织,但是否能诱导出胚性愈伤组织则与外植体的年龄、生理状态、培养基的组成、激素的种类和浓度、培养条件等有关。其中,培养条件是关键,合适的培养条件就是适时附加合适的激素及适量的浓度来达到植物在各生长发育阶段对激素的需要。不同种类植物激素的生理效应有着相互促进或相互抵抗的效果,其影响涉及激素的合成、运输、代谢和效应等各个方面。植物细胞生长和分化的调节往往是多种激素综合作用的结果,而且它们之间相互作用极其复杂。根据我们的实验,狗牙根外植体在2,4-D浓度沿梯度降低到0.2或0.1时,就会产生大量的黄绿色的胚性愈伤组织。但这些胚性愈伤组织连续继代2次就会发生愈伤褐化、胚性消失。此时必须调节激素浓度配比转入合适的培养基中才会重新活化恢复胚

性愈伤组织的潜力。

为了保持高频胚性愈伤组织的再生能力,在愈伤组织继代培养时就要考虑适时把胚性组织和非胚性组织分别转入到不同的培养基,要会识别胚性组织和非胚性组织。从作者的研究看,通常,狗牙根胚性愈伤组织是水状的,带有小的硬核,呈半透明液体。当水状组织被选择继代,单个胚发育,细胞增大,此时可看到黄绿色芽点镶嵌在愈伤组织表层,它们进一步发育就会形成球形胚。变成褐色的狗牙根愈伤组织可保持4个月,不会失去活力,当在合适的胚性愈伤组织增殖培养基中继代培养,就会活化,重新产生体细胞胚,并发育成小植株。但在试验中也发现,过大的愈伤组织(≥ 2 cm)不利于愈伤组织重新活化形成体细胞胚。

1.2 胚状体分化的诱导

目前认为胚状体再生系统是多数植物最为理想的基因转化受体系统。因为绝大多数体细胞胚是起源于单细胞的。从多种植物中都观察到单个胚性细胞,有不均等分裂的二细胞胚和均等分裂的二细胞原胚,多细胞原胚,球形胚直到成熟胚。由于体细胞胚的发生和分裂的不同步,所以在同一块愈伤组织中可观察到多个不同发育时期的体细胞胚^[1]。作者在狗牙根胚状体发生过程中明显观察到这种现象,说明狗牙根体细胞胚的形成是起源于单细胞的,单个胚性细胞具有明显极性,第一次分裂多为不均等分裂,顶细胞继续分裂形成多细胞原胚,基细胞进行少数几次分裂形成胚柄。由于通过激素的作用和外界电刺激等均可影响到体细胞胚发生的能力等,因此人们推测在体细胞胚分化的诱导中,植物激素和外界刺激都是极性分化的诱导因子。

以作者的试验狗牙根为例,将胚性愈伤组织,转接到胚状体形成与再生增殖培养基,大部分愈伤组织表层细胞都会看到黄绿色芽点,有些有绿芽形成,个别愈伤有球形胚形成,还有较坚实的绿块、米黄色粒状的非胚性愈伤组织。胚状体单个出现或聚集成团,成团胚状体有的易于分散,该类胚状体较易再生植株。还有一类成团的胚状体不易分离,此种分化率低。往往是在同一愈伤块上同时存在各个时期的体细胞胚。通常在胚状体增殖形成培养基上分化率较低,而在分化培养基上分化率较高,但也发现有许多胚状体诱导出须根、细根,这些胚状体往往很难再分

化成苗。

1.3 体胚生产及同步化

通常,胚性细胞的分裂是不同步的。这是由于从脱分化形成愈伤组织后,再转移到诱导分化胚性细胞培养基时,细胞的状态和启动分裂不一致,从而存在多样化的原胚细胞群,另外,在某些条件下,体细胞胚发生是有先后或反复进行的,新的胚胎发生中心有可能从原胚细胞群中或从胚体中产生,我们的实验也发现狗牙根和苜蓿愈伤组织在合适的培养基中均能形成大量体胚,但这些体胚的典型表现是其发生和分裂的不同步,以至整个胚发育阶段存在于任何时期,当培养条件不合适时胚将下降或失去萌发力并在分化培养基上不能转化成植株。为了促进胚的产量,抑制额外或次生胚的产生,作者已经设计了一系列实验并取得了明显的效果,但到目前为止还没找到一个合适的配方解决胚生产的不同步。ABA 发现在许多种中有利于胚同步发育而防止次生胚发生 (Ammirato P V. Organizational events during somatic embryogenesis. Plant Tissue and Cell Culture, Inc. New York, 1987. 57-81.), 作者在苜蓿胚诱导中也取得了良好的效果,但在狗牙根中效果不明显,需要进一步的实验。甘露醇,能降低培养基的渗透势,已经发现能增加体细胞胚的数量和一致性^[2,3],也可以作为狗牙根胚同步化的试剂之一,但添加浓度和时间对胚的同步化形成非常重要。

为了揭示体细胞胚发生的实质,应深入研究在离体培养条件下细胞分化过程中基因差别表达与调控的机理,克隆与鉴定相关的基因。为此必须建立较为稳定的、体细胞胚发生频率高的、重复性好的、细胞分裂同步化程度高的并在形态上或生理生化上有明显差异的突变体系,进行体细胞胚发生的分子机制研究,以取得突破性进展,为生物技术辅助育种打下基础,也为“人工种子”新技术在草坪草中的应用打下基础。

2 草坪草体胚的发生与遗传育种

2.1 胚性愈伤组织的诱导在草坪草遗传育种中的应用

Terakawa 等^[4]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。据此认为用胚性愈伤组织作为制备和培养原生质体的起始材料效果更好。由于胚性细胞分散性好,体积小、细胞质浓厚,生长旺盛、生理生化代谢活跃,且易于分化,所以采用其进行遗传育种研究更有实际意义。如原生质体除去了细胞壁可以自发或者诱导融合形成杂种细胞,创造自然界新的种间、属间、科间杂种类型,从而克服远缘杂交不亲和性,创造新品种;另外,原生质体可以作为理想的受体系统进行遗传转化研究,因为它很容易摄取外来的遗传物质并通过转基因创造新品种,缩短育种年限;它也和完整细胞一样具有全能性,在适合的培养条件下能再生出完整植株,同时在细胞或组织的培养过程中有可能出现无性系变异,为进一步选种育种扩大新种质资源奠定基础。

由原生质体再生系统作为草坪草遗传转化虽已获得成功,但通过原生质体再生植株仍很困难,主要是原生质体的悬浮培养过程烦琐,植株再生频率低,再生过程所需时间长,且存在不育、多拷贝基因的整合以及转基因的重排,从而限制了这一方法的应用。

利用组织培养技术、细胞工程技术,借鉴他人的经验得到胚性愈伤组织再生系统,并优化为高效组培再生体系,在此基础上,通过基因转化、诱变选择及抗性实验获得遗传变异新类型,从中选育出新株系培育出新品种,已成为草坪草生物技术辅助育种研究的关键和前提。

已有大量的实验报道说明植物只经过愈伤组织的培养就能发生广泛的变异。如国际水稻研究所从种子愈伤组织产生的 521 个株系(R₂)中发现 46%是正常的,54%是有关叶褐斑病,叶绿素含量、株高,抽穗期,形态变异及高不孕率的变异体,如果测定更多的性状,变异体的百分率甚至更高。在培养的愈伤组织或细胞中,不管是用诱变剂还是不用诱变剂,均可通过选择压力的影响有目的的选择所期望的变异特性。周荣仁等^[5]将烟草叶片外植体直接置入含 0.5% NaCl 诱导愈伤组织培养基,并逐步提高 NaCl 浓度(0.5%~1.5%)选择培养 4 代,获得耐 1.5% 的细胞系,移入不含盐分化培养基再生植株,共获得 55 株幼苗。Yoshida 将水稻愈伤组织放入 1.5% NaCl 培

培养基筛选培养,最后获得耐 0.75% NaCl 的突变体^[6]. Croughan 等^[7]将苜蓿愈伤组织接种到含 1% NaCl 的固体培养基上,经 8 个月后选择出一个耐盐的细胞系,发现耐盐细胞系在无盐情况下生长很差,表明其也有趋向耐盐的盐生植物的生长习性.但是,许多试验也证明不同的物种其整株与愈伤组织对盐的耐受性有些是一致的,有些不一致^[8].此外,同一种植物不同部位发生的愈伤组织,其耐盐性也有很大差别^[9].这些结果说明植物整株由于耐盐性并不都能在培养的细胞水平上表达,所以仅从细胞水平上在含盐培养基上进行筛选,不见得能筛选出植物器官与整株所表现出的特性.这也说明植物耐盐性至少存在两种机理,一种是有机整体的机理;另一种是细胞的机理.所以如果整株与细胞耐盐性一致最有可能从细胞水平上筛选出耐盐品系,否则亦然^[10].我们通过“种子植株—愈伤组织—再生植株”3 个水平,采用 NaCl 渐进式胁迫方法,筛选出狗牙根耐 2%~3% NaCl 盐的再生株系.

2.2 草坪草体胚的转基因研究

使用遗传工程技术对草坪草改良,用胚性愈伤组织建起高频组培再生体系进行基因转化是必需的. Harftnam 等^[11]通过基因枪法转化匍匐剪股颖,将抗除草剂 Bar 基因导入胚性愈伤组织或胚性悬浮培养细胞,900 多个植株用除草剂处理,有 55 株是完全抗的. PCR 分析表明转基因植株中存在 bar 编码区而对照没有. Southern 印迹分析证实了 bar 基因进入转基因植株基因组. Northern 印迹分析表明 bar 基因在转基因植株中的转录表达,但对照植株没有. Lee 等^[12]直接把匍匐剪股颖 DNA 侵入胚性悬浮细胞分离的原生质体并用一个营养层体系培养^[13],为原生质体生长发育提供营养并最终再生植株.

利用原生质体转化系统,已相继在高羊茅、紫羊茅、匍匐剪股颖、多年生黑麦草和一年生黑麦草中获得了转基因植株. Horn 等^[14]首次通过原生质体获得 orchardgrass 的转基因植株. Ha 等^[15]采用电渗透法,将质粒 pZ01052 转化到高羊茅的原生质体,用 200 mg/L 潮霉素筛选抗性转化子,得到 $3 \times 10^{-6} \sim 9 \times 10^{-6}$ 的转化频率,经 Southern 杂交分析,证明潮霉素抗性基因 hph 已整合到转基因植物的基因组中. Wang 等^[16]采用 PEG 诱导 DNA 直接转化多年生和一年生黑麦草原生质体,获得了可育的转基因植物.

Kuai^[17]等注意到高羊茅的悬浮细胞生理状况会影响对转基因的表达.

应用基因枪法(Particle gun)作为草坪草遗传转化体系建立的手段也已获得成功. 基因枪不象农杆菌易受宿主限制,对双子叶和单子叶植物都适用,它具有操作简单快速,易控制和受体广泛的优点,它不仅可以用原生质体、叶圆片为靶受体,亦可以用悬浮细胞、茎、种子胚、穗、幼胚、愈伤组织和花粉细胞等几乎所有具有潜在分生能力的组织或细胞作为受体.

Zhong^[18]等首先应用基因枪法将 AcTI 控制的 gusA 基因导入匍匐剪股颖的愈伤组织,由于在表达质粒上没有选择标记,只能瞬时表达 Gus 活力. Spangenberg 等^[19]在成功地将 DNA 直接导入紫羊茅原生质体后,又用基因枪法将 CaMV35S 控制的基因转化到高羊茅和紫羊茅的悬浮细胞,得到外源基因的表达. 随后,他们又先后用基因枪法转化多年生黑麦草和一年生黑麦草,获得了转基因植物. 但原生质体的制备、悬浮细胞的诱导及维持难度较大. 为此, Cho 等^[20]建立了十分有效的紫羊茅和高羊茅愈伤组织诱导和再生方法,并用基因枪法将 hpt、bar 和 gusA 基因进行共转化(Co-transformation),获得了较高的共表达(Co-expression)频率. 用基因枪法将 bar 基因转化到匍匐剪股颖的愈伤组织,获得了抗除草剂的转基因植物,草地早熟禾的基因枪转化也获得成功. Rongda Qu (Rongda Q U. Hybrid Bermudagrass Improvement by Genetic Transformation. USGA Turfgrass and Environmental Research Summary, 2001: 27.)认为 Bermudagrass 很难进行组织培养,他们经过长期探索和各种方法的试验,最近已经改进体细胞胚和再生体系,找到了一种转化方法,目前从 hygromycin 筛选出 3 株抗性愈伤组织无性系和四株抗除草剂愈伤组织无性系. 张耕耘(2002)通过基因枪法转化狗牙根 TifEagle 品种,共转化 Hyg 抗性基因和 BADH 基因到愈伤组织,它是由水平根颈处诱导产生,分别由水稻 actin 启动子和玉米 Hbiquitin 启动子启动,用 200 mg/L Hyg 筛选和再生,获得了 58 株 Hyg 抗性转基因植株,它们来自于 82 个不同的 Hyg 抗性愈伤无性系,PCR 检测有 26 株转基因无性系含有 BADH 基因, Northern blot 表明一些转基因无性系有正常 BADH 基因的转录物,盆栽耐旱试验表明 5 株转基因无性系比对照更耐旱.

最近, Dalton 等^[21]成功地建立了硅碳纤维旋涡介导的转化草坪草悬浮细胞技术. 这项技术是 Kaeppler 等建立的. 是将质粒 DNA 和长 10~80 μm 、半径 0.6 μm 的硅碳纤维混入悬浮培养细胞, 然后进行旋涡处理, 硅碳纤维起显微注射针的作用, 使 DNA 导入细胞核. Frame 等^[22]用硅碳纤维法得到了可育的转基因玉米. Serik 等^[23]利用硅碳纤维法将 DNA 转入小麦成熟胚细胞, 从这些硅碳纤维处理胚诱导产生的愈伤组织中检测到 Gus 基因的瞬时表达. Dalton 等^[21]将一年生黑麦草、多年生黑麦草、高羊茅和葡萄剪股颖的悬浮细胞分别与硅碳纤维加入到同一支小离心管, 再加入待转化的质粒 DNA, 在旋涡混合器上以最大速度旋涡 1 min, 即完成了转化过程. 用潮霉素筛选转化体再生出植株, 得到了转基因植物. Gus 基因瞬时表达分析表明, 表达频率达 20%~40%; Southern blot、PCR、RT-PCR 等分子检测表明, 转基因植物已整合了外源基因并得到表达, 这种方法虽然目前报道还很少, 但该法的实验操作和需要的设备简单, 是一种很有吸引力的方法.

应用农杆菌介导的 DNA 转移技术以其方便、高效广泛应用于双子叶植物的遗传转化. 该方法具有操作简单、设备便宜、转化效率和工作效率高等优点, 转化插入的片段多为单拷贝, 很少有甲基化和基因沉默现象, 遗传稳定性好. 不足之处是难以用于单子叶植物的转化. 但近年来取得了较大进展, 已成功获得转基因玉米、水稻和小麦等禾谷类单子叶植物. Liang 和 Hwan^[24]首次利用农杆菌感染日本结缕草的愈伤组织, 获得了转基因植物. 最近, Subha (Subha Lakkaraju, Lynne H. Pitcher, Wang X L, et al. *Agrobacterium-mediated Transformation of Turfgrasses*. January, 2001. *Proceedings of the Tenth Anniversary Turfgrass Symposium*.) 等的实验室以农杆菌为介导建立起草坪草基因转化选择方法, 并摸索出一些方法改良转化效率, 证明单子叶也能采用农杆菌进行基因转化. 他们特别建立起一套方案可以高效转化葡萄剪股颖, 采用农杆菌介导直接转基因有几大优势包括稳定整合转基因不会导致宿主或转基因 DNA 重排, 转移基因整合到所希望的基因组转录活动区域, 能够转录大的 DNA 片段, 整合进低拷贝的基因到植物基因组. Subba 等 (Subha Lakkaraju, Lynne H Pitcher, Wang X L, et al. *Agrobacterium-mediated Transformation of Turf-*

grasses. January, 2001. *Proceedings of the Tenth Anniversary Turfgrass Symposium*.) 实验室通过艰苦的努力已经建起了一些草坪草种的组培参数和农杆菌介导的转化参数, 并已在 velvet bentgrass, tall fescue 和 Kentucky bluegrass 不同程度取得成功. 农杆菌高效转化玉米和水稻的成功, 是禾谷类作物遗传转化的里程碑, 在不久的将来, 农杆菌法很可能会取代基因枪法而成为草坪草遗传转化的主要方法.

参考文献:

- [1] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] NADEL B L, ALTMAN A, ZIV M. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension: II. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronous cell cultures [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1989, 20: 119~124.
- [3] NADEL B L, ALTMAN A, ZIV M. Regulation of large scale embryogenesis in celery [J]. *Acta Hort*, 1990, 280: 75~85.
- [4] TERAOKAWA T, SATO T, KOIKE M. Plant regeneration from protoplasts isolate from embryogenic suspension cultures of creeping bentgrass (*Agrostis palustris*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11(9): 457~461.
- [5] 周荣仁, 余叔文. 利用组织培养研究植物耐盐机理与筛选耐盐突变体的进展 [J]. *植物生理学通讯*, 1989, (5): 11~19.
- [6] 林栖凤, 李冠一. 植物耐盐性研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2000, 20: 20~25.
- [7] CROUGHAN T P, et al. Selection of a NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells [J]. *Crop Sci*, 1978, 18: 959~963.
- [8] 成 静, 何远康, 严小龙, 等. 水稻在“种子植株-愈伤组织-再生植株”系统中的耐盐性研究 [J]. *华南农业大学学报*, 1998, 19(1): 24~29.
- [9] 王小军, 鲍文奎. 八倍体小黑麦耐盐细胞系产生的遗传机制 [J]. *植物学报*, 1998, 40(4): 330~336.
- [10] ZHAO K J, BAO W K. Preliminary research on the mechanism of the origin of salt-tolerant somaclonal variant in octoploid triticale. *Sci Agric Sin*, 1993, 26(5): 25~31.
- [11] HARTMAN C L, LEE, DAY P R, et al. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation [J]. *Bio/Technology*, 1994, 12: 919~923.
- [12] LEE L, LARMORE C L, DAY P R, et al. Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplasts [J]. *Crop Sci*, 1996, 36: 401~406.

- [13] RHODES C A, LOWE K S, RUBY K L. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures [J]. *Bio/Technology*, 1988, 6: 56 – 60.
- [14] HORN M E, SHILLITO R D, CONGER B V, et al. Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts [J]. *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 469 – 472.
- [15] HA S B, WU F S, THORNE T K. Transgenic turf-type tall fescue, plants regenerated from protoplasts [J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11: 601 – 604.
- [16] WANG G R, BINDING H, POSSELT U K. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L and *Lolium multiflorum* Lam [J]. *J Plant Physiol*, 1997, 151: 83 – 90.
- [17] KUAI B, MORRIS P. The physiological state of suspension cultured cells affects the expression of the β -glucuronidase gene following transformation of tall fescue protoplasts [J]. *Plant Sci*. 1995, 110: 235 – 247.
- [18] ZHONG H, BOLYARD M G, SRINIVASAN C, et al. Transgenic plants of turfgrass from microprojectile bombardment of embryogenic callus [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 13: 1 – 6.
- [19] SPANGENBERG G, WANG Z Y, WU X L, et al. Transgenic tall fescue and red fescue plant from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cell [J]. *J Plant Physiol*, 1995, 145: 693 – 700.
- [20] CHO M J, HA C D, LEMAUX P G. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 1 084 – 1 089.
- [21] DALTON S H, BETTANY A J E, TIMMS E, et al. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicaon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures [J]. *Plant Sci*, 1998, 132: 31 – 43.
- [22] FRAME B R, DRAYTON P R, BAGNALL S V, et al. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation [J]. *Plant J*, 1994, 6: 941 – 948.
- [23] SERIK O, AINUR I, MURAT K, et al. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) mature embryo [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16: 133 – 136.
- [24] LIANG C M, HWAN K D. Agrobacterium-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*) [J]. *J Korean Society Horticultural Science*, 2000, 41: 455 – 458.

【责任编辑 柴 焰】