

文章编号:1673-5021(2008)04-0093-07

多年生黑麦草转基因育种及其安全性的研究进展

李 雪, 韩烈保, 刘 君

(北京林业大学草坪研究所, 北京 100083)

摘要:多年生黑麦草是适应性很强的牧草和草坪草种, 转基因技术的应用已成为其育种研究的重要途径。为此, 概述了多年生黑麦草组织培养和遗传转化方面的研究进展, 首次探讨了转基因多年生黑麦草的生物安全性。

关键词:多年生黑麦草; 组织培养; 遗传转化; 生物安全

中图分类号:Q789 **文献标识码:**A

多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)成坪速度快, 抗病虫和分蘖能力强, 是常用的牧草草种; 也可形成颜色亮绿、叶片质地细而柔软的优质草坪^[1]。由于其自交不亲和性, 利用生物技术手段改善其生理特性已成为国内外多年生黑麦草育种研究的热点。选取多种外植体, 运用现有的多种外源基因导入途径, 建立起多年生黑麦草植株再生体系和遗传转化体系, 获得转基因植株。转基因多年生黑麦草的安全性评价和监测主要涉及其对人类、动植物、微生物和生态环境构成的危险或潜在风险。

1 组织培养和再生体系的建立

1.1 外植体的选择

1977年, Dale^[2]首先通过茎尖分生组织培养获得了可育的多年生黑麦草再生植株。此后, 以多年生黑麦草的成熟胚^[3~5]、花药^[6~7]、未成熟花序^[4]、成熟种子^[8~9]以及营养分生组织^[10]为外植体获得了绿苗、白化苗及单倍体植株。国内关于多年生黑麦草组织培养的研究始于2003年, 以种子^[11~21]、成熟胚^[19~23]、胚根^[19]、胚轴^[19]、幼穗^[24]、茎尖分生组织^[25]和胚端半粒种子^[26]为外植体, 均获得了再生植株。但胚根和胚轴是不适宜多年生黑麦草愈伤诱导的外植体^[19], 而成熟胚的愈伤诱导率和胚性愈伤诱导率均优于种子^[19~21]。种子的愈伤诱导率与其发芽率无关^[11], 种子纵向劈开后接种可增加愈伤诱导率^[9]。以适宜发育期(1~3 mm)的幼穗为外植体, 愈伤诱导率可达95%^[24]; 以茎尖生长点为外植体, 诱导频率高, 增殖速度快, 试验周期短^[25]。目前, 多年生黑麦草用于遗传转化的再生体系多以成熟胚^[27~30]和种子^[31]为外植体。Newell等^[32]于2005

年报道了利用不含顶端分生组织的幼叶基段获得再生植株。胚性愈伤组织仅在2 mm段的叶基部产生, 而根和绿苗均产生于0~2 mm的叶基段。利用Kumlehn^[33]等建立起的胚珠培养再生植株的高效体系, 离开花粉1d、2d、3d的胚珠平均可再生小苗率分别为38.1%、52%和52.8%。

1.2 悬浮培养体系的建立

多年生黑麦草悬浮细胞培养和原生质体培养^[3,4,7~9,34,35]的报道较多。在含高浓度2,4-D(100 mg/L)的液体培养基中, 所有源于原生质体克隆的品种都可获得白化苗和绿苗^[3]。由未成熟花序得来的致密愈伤组织比成熟胚能够诱导产生更多的悬浮物质, 而随悬浮物质年龄的增大其再生出绿苗的能力降低^[4]。在初期培养基中, 用麦芽糖代替蔗糖、2,4-D代替麦草畏(C₈H₆C₁₂O₃), 培养过程中逐步加大6-BA的浓度, 可极大地提高细胞悬浮物质的再生频率^[5]。1/2 MS液体培养基, 附加6 mg/L 2,4-D、3 g/L 水解酪蛋白和维生素B₅, 可诱导出大量非胚性细胞的悬浮物质和少量胚性细胞。再生培养基为1/2 MS液体培养基时, 附加维生素B₅、ABA(0.5 mg/L)和6-BA(0.5 mg/L), 仅可获得少数绿苗, 白化苗居多^[8]。

1.3 愈伤组织的诱导与分化

多年生黑麦草愈伤组织的诱导, 多采用MS基本培养基附加各种植物激素和营养物质。陈季琴^[17]等通过多因素多水平的正交设计试验, 探讨了各培养基组分配置的合理条件。2,4-D和6-BA

收稿日期:2007-11-13; 修回日期:2008-04-14

作者简介:李雪(1981-), 女, 黑龙江人, 北京林业大学在读博士, 主要从事牧草和草坪草的育种工作。

是涉及到的两种主要植物激素,2,4-D在2~10 mg/L范围内均有使用,5 mg/L为使用频率最多的浓度^[11,12,14,18],在此基础上附加0.05 mg/L KT有利于诱导愈伤组织^[12,18]。以茎尖分生组织为外植体,在2,4-D为1 mg/L时愈伤诱导率为95%^[24];以成熟胚为外植体,2,4-D为2~3 mg/L、6-BA为0.1 mg/L时愈伤诱导率可达96.3%^[20]。在3~9 mg/L范围内,2,4-D浓度的升高可明显提高愈伤诱导率,但却降低了其分化率;用dicamb替代2,4-D、蔗糖替代麦芽糖,可以显著提高愈伤诱导率和植株再生率;在愈伤诱导培养基中同时使用2,4-D和NAA,优于单独使用2,4-D^[13]。在继代培养基中,2,4-D的浓度一般都降低^[12]。继代培养时间对愈伤组织的分化率有很大影响,植物凝胶与国产琼脂相比固化效果更好^[14]。附加10 mg/L 2,4-D、500 mg/L 水解酪蛋白、0.5 mg/L 6-BA和0.5 mg/L NAA的N6培养基,愈伤诱导率可达85%^[15,16]。

细胞分裂素、头孢霉素、活性炭、脱落酸和硝酸银对生长2个月的多年生黑麦草愈伤组织分化具有不同程度的影响。在培养基中补充0.1~0.5 mg/L的6-BA,能提高愈伤分化能力^[9]。当培养基中加入60~200 mg/L 头孢霉素改良后,胚性愈伤的数量有所增加;若采用0.5 mg/L 6-BA和激动素(或玉米素)以及2%的活性炭进行改良,则可增加再生植株的数量,但所获得的再生植株均为白化苗^[36]。分化培养基附加1 mg/L 2,4-D和1 mg/L KT,生根培养基为无激素的MS培养基,完成植株再生约需12周,愈伤分化率为70%^[12]。而以附加1 mg/L 6-BA、0.5 mg/L KT的N6培养基为分化培养基,分化率可达77.73%。在大量元素减半的N6培养基中附加30g/L 蔗糖及0.2 mg/L NAA进行生根培养,生根率达100%^[15,16]。水解酪蛋白、脯氨酸和谷氨酰胺浓度的增加,不会促进植株再生率的升高^[13]。在MS培养基中补充0.64 mg/L的铜离子对愈伤的分化无影响,3.2 mg/L则引起中毒反应^[9]。幼穗发育时期,培养基的激素组成明显影响继代培养和植株再生能力^[24];愈伤组织的不同对再生频率及绿苗比率的影响分别为59%和83%^[37]。

1.4 基因型的影响

基因型可影响多年生黑麦草的愈伤诱导率和植株再生能力^[14,17,18,20,24],对愈伤诱导及初期生长状况的影响约为40%,但其对悬浮物质的影响并不明

显。来自同一基因型的悬浮物质通常表现不一,部分悬浮物质能在2年内保持产生绿苗的能力,产生80%~100%的再生苗。若某基因型能够从愈伤组织得到较高的再生频率和绿苗比率,则其在悬浮培养体系中也将有较好的再生表现和较高的再生频率。再生频率和绿苗比率并不相关,但从不同基因型形成绿色植株的能力看,体细胞培养体系和原生质体培养体系的再生频率存在正相关,由此说明这2个体系受某些共同基因的控制^[37]。Bradley等^[39]对13种最近发布的多年生黑麦草栽培品种进行了评价,发现品种Roadrunner的愈伤诱导率和再生频率最高。植株的组织培养技术一般总是针对一种草坪草的一个栽培种或几个栽培种。Salehi等^[38]以4种常见草坪草为实验对象,确立MS附加13 mg/L 2,4-D和1.7 mg/L 6-BA可应用于常见草坪草的组织培养。

2 遗传转化

2.1 基因枪转化法

最早就多年生黑麦草进行遗传转化的是Hensgens等^[37]于1993年利用基因枪法成功转化了HPT基因,此后Heleen等^[38]、Spangenberg等^[39]以及Dalton等^[40]分别将HPT、GUS基因通过对悬浮物质的微弹轰击导入多年生黑麦草中。基因枪法一直以来都是广泛应用于禾本科基因转化的重要方法,国内外均已建立起高效的多年生黑麦草基因枪遗传转化体系^[41],其转化频率受基因型、外植体、选择规则和愈伤诱导期长短的影响。对草坪型和牧草型品种的成熟胚得到的愈伤组织进行优化转化,分别得到5.2%和6.6%的转化率。未成熟花序和未成熟胚的愈伤组织也被成功的应用于基因转化,分别得到3.7%和11.42%的转化率^[42]。目前,国内外的研究重点均放在将重要功能性基因导入多年生黑麦草中,从而改善其生理特性。Wu等^[43]于1997年用基因枪法将Lolpl和Lolp2这两个控制黑麦草花粉过敏原的蛋白成功地导入多年生黑麦草中。2004年,Natasha^[44]对于降低这两种蛋白含量的转基因植株的子代进行研究,分析其功能。Takahashi^[45]等利用基因枪法将RCC2基因导入意大利黑麦草,再生植株中有65.5%为转基因植株。离体叶片的生物检测证明,转基因植株对比未转化植株抗锈病能力有所提高。利用基因枪法转化wft1和wft2,转基因植株的果聚糖含量明显提高,并且在分

子水平证明了转基因植株抗冻性的提高^[46]。基因枪法共转化 Bar 基因,获得外源基因正常表达的植株频率为 2.46%^[47];与 P5CS 基因进行共转化,效率为 27.8%^[27]。RC24 基因和 Bar 基因也有利用基因枪法共转化的报道,经 PPT 筛选后共获得 243 株再生植株。其中,18 株含有 RC24 基因,15 株含 Bar 基因,2 株同时含有两种基因^[28]。利用基因枪法转化 DREB1B(CBF1)基因,获得转基因植株 36 株。对转基因植株进行干旱处理,25d 干旱后 3 株有存活迹象,复水后 1 株复生^[29,30]。

2.2 农杆菌介导转化法

自 Posselt 等^[45]等首次利用农杆菌介导技术获得多年生黑麦草转基因植株后,适合于多年生黑麦草遗传转化的农杆菌介导转化体系被纷纷建立起来^[48,50]。2001 年,Xu 等^[51]为黑麦草导入不可翻译的 RgMVCP,以探测 RNA 介导的抗病毒性潜力。转基因株系、病毒菌株、共培养时间均对 RgMV 水平有重大影响。对 RgMV 转录后基因整合和相似的 RgMV-CP 转基因甲基化模式的分析表明,RgMV 对 PTGS 的抑制效果在其中明显不同,揭示出大量组分的存在控制了 PTGS 在黑麦草中的稳定性。该研究拓展到 RNA 介导的病毒抗性,转录后基因沉默,并通过遗传工程改良作物得到具重要农艺性状的多年生黑麦草品种。

在细菌培养和共培养环节加入乙酰丁香酮,侵染前在含有 0.4 mol/L 甘露醇的培养基中预培养均能够提高转化效率。350 mmol/L NaCl 胁迫 10 周后,转基因植株存活而野生型植株死亡。转基因植株的叶片较对照植株含有更高的 Na⁺、K⁺ 和脯氨酸。这些结果证明,OsNHX1 基因被成功地导入多年生黑麦草中并提高了其耐盐性^[52]。Shivendra 等^[53]利用高效农杆菌介导转化体系感染后的胚性愈伤,在 50 mg/L 和 80 mg/L 潮霉素下分别筛选 2 周,而后置于含 25 mg/L 潮霉素的再生培养基中分化,在 2 年内获得了 1000 多株转基因多年生黑麦草植株。刘萍等^[31]利用农杆菌介导转化体系将 BADH 基因导入多年生黑麦草中,通过盆栽试验证明转基因植株的耐盐性得到了提高。Cao 等^[54]使多年生黑麦草的转化效率达到 23.3%。

2.3 其它转化方法的应用

1997 年,Wang 等^[55]用原生质体直接吸入法转化了 npt II、GUS 基因,经 GUS 组织化学染色和 Southern 杂交检测,转入基因在转基因植株的后代

中遗传表达。1998 年,Dalton 等^[56]对黑麦草和其他几种草的细胞悬浮克隆进行硅碳纤维处理,并用潮霉素抗性基因进行转化及筛选,再生出 1 株黑麦草转基因植株。对后代的检测表明,外源基因已作为独立而占主导的等位基因遗传下来,并能高频率的表达潮霉素抗性。

3 转基因多年生黑麦草的安全性

3.1 受体植物多年生黑麦草的安全性

受体植物多年生黑麦草多为栽培种,作为禽畜饲料全世界范围内广泛应用多年,未见有对人及其他生物有毒的报道,不属于世界各地常见自身“杂草化”作物范畴^[57],其演变成成为有害植物的可能性很小。多年生黑麦草为异花授粉植物,不仅同一群体内包含不同基因型的多个个体,个体间的基因型和表现型也不一致。除了与品种特性有关的基因为纯合状态外,其余大量基因处于杂合状态。但多年生黑麦草种间异交率很低,在 0~1 m 范围内仅为 1%,超过 5 m 时不足 0.1%,且仅能与野生多年生黑麦草和羊茅属的杂草杂交^[57]。

在生态系统中,多年生黑麦草与其他动植物和微生物共同存在、互相制约、互相协调发展。若生态环境达到多年生黑麦草生长发育的极端值,或遭受病虫害,其数量和生长面积将会减少;若与其它高大、吸收力强的植物共生,其数量也将减小。部分多年生黑麦草品种内寄生有与其互利共生的内生真菌,若生态环境发生较大幅度变化将会对这种关系产生一定的影响,但不会危害到人类健康和生态环境。

3.2 外源基因的遗传稳定性

外源基因在后代中的遗传多样性通常用转基因植株与非转基因植株杂交,或转基因植株自交结合 Southern 杂交来分析。外源基因一般作为显性基因遗传给后代,遵循孟德尔遗传分离规律。在多拷贝基因中,可能只有一个拷贝具有表达功能或所有表达拷贝整合在受体染色体组中的一个位点。但是,外源基因存在不稳定性,其主要原因可能是在减数分裂配子形成过程中外源基因丢失,外源基因整合到细胞质基因组中而在随后的细胞质分裂过程中逐渐变弱或丢失,外源 DNA 插入引起基因重排丢失,在配子中外源 DNA 诱发隐性的致死或半致死突变,或者外源 DNA 的共抑制效应及甲基化致使基因可遗传失活。

不同转化方法对外源基因的遗传稳定性有明显影响。农杆菌介导的遗传转化后代多呈现孟德尔遗传;而一些直接转化方法,如基因枪法一般随机整合,整合方式、整合位置以及整合拷贝数往往不确定,所以后代遗传方式较复杂。在可育的转基因多年生黑麦草中,报道过与性别有关的基因转化的分子证据^[42],而且曾获得具重要农艺性状的多年生黑麦草品种^[51]。对转基因植株的子代分析表明,父母本对外源基因的遗传无显著差异^[58]。

3.3 安全控制措施

转基因多年生黑麦草应在独立的空地上栽种,隔离距离为300 m以上。试验区域和隔离带外应建有围墙和栅栏,隔离植物采用不能与其发生杂交的植物。转基因植株的运输应采取密封运输措施,由试验人员专人管理,禁止外界人员接触。在其抽穗期立即搭建凉棚与外界隔离,完全封闭试验地,阻止昆虫和动物将花粉带离试验区。试验人员进行花期的观察和套袋时需穿隔离服。种子成熟后及时收获,避免种子成熟脱落,杜绝种子散失。收获物残余应完全烧毁,深沟埋藏。种子应低温密封贮存,专人妥善保管。试验结束后对隔离带植物及试验地外部分植物每季度抽样进行分子检测,看有无“基因污染”现象,防止转基因植物及其基因扩散。试验过程中若出现意外事故,应立即采取可靠有效的措施进行补救和挽回,尽力化解风险,必要时烧毁隔离带。

目前,北京林业大学研究开发的转基因草坪草“北林草”系列(包括多年生黑麦草、草地早熟禾、结缕草和高羊茅)以及中国林科院研究的转基因多年生黑麦草已进入安全性评价中间试验阶段。

参考文献(References):

- [1] 鲍维宝,韩烈保,尹淑霞. 多年生黑麦草在北京引种适应性研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(2): 71-73.
Bao Weibao, Han Liebao, Yin Shuxia. Adaptation research on perennial ryegrass varieties in Beijing[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2000, 22(2): 71-73.
- [2] Dale P. Meristem tip culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*[J]. *Plant Sci. Lett.*, 1977, 9: 333-338.
- [3] Dalton S J. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass)[J]. *Plant Physiol.*, 1988, 132: 170-175.
- [4] Creemers-Molenaar J, Vander Valk P, Loeffen J P M. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium perenne* L. [J]. *Plant Science*, 1989, 63: 167-176.
- [5] Altpeter F, Posselt U K. Improved plant regeneration from cell suspensions of commercial cultivars, breeding and inbred lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 156(5,6): 790-796.
- [6] Olesen A, Andersen S B, Due I K. Anther culture response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Plant Breed*, 1988, 101: 60-65.
- [7] Boppenmeier J, Zuchner S, Foroughi Wehr B. Haploid production from barley yellow dwarf virus resistant clones of *Lolium* [J]. *Plant Breed*, 1989, 103: 216-220.
- [8] Zagmout O M F, Torello W A. Somatic embryogenesis from embryogenic suspension cultures of perennial ryegrass [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1990, 26(4): 419-424.
- [9] Bradley D E, Bruneau A H, Qu R. Effects of cultivars, explant, treatment and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass [J]. *International Turfgrass Society Research Journal*, 2001, 9: 152.
- [10] Perez Vicente R, Wen X D, Wang Z. Culture of vegetative and floral meristems in ryegrasses: potential targets for microballistic transformation [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1993, 142: 610-617.
- [11] 徐定炎, 向阳鹏. 种胚处理、不同激素浓度在暗培养条件下对多年生黑麦草愈伤组织诱导的影响[J]. 浙江林业科技, 2003, (3): 16-19.
Xu Dingyan, Xiang Yangpeng. Effect of embryo treatment and different hormone concentration under dark culture on callus induction of *Lolium perenne* [J]. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2003, (3): 16-19.
- [12] 张万军, 王涛. 多年生黑麦草组织培养与植株再生研究[J]. 草地学报, 2003, 11(3): 219-222.
Zhang Wanjun, Wang Tao. A study on the tissue culture and plant regeneration of perennial ryegrass [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2003, 11(3): 219-222.
- [13] 刘文真, 玄松南, 陈惠哲, 朱睦元, 孙宗修. 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.
Liu Wenzhen, Xuan Songnan, Chen Huizhe, Zhu Muyuan, Sun Zongxiu. Factors effecting on tissue culture of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Forest Research*, 2004, 17(1): 95-101.
- [14] 张振霞, 储成才, 席嘉宾, 陈平. 多年生黑麦草种子愈伤组织诱导和植株再生[J]. 草地学报, 2004, 4: 289-293.
Zhang Zhenxia, Chu Chengcai, Xi Jiabin, Chen Ping. Embryogenic callus production and plant regeneration of *Lolium perenne* seed explants for genetic manipulation [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2004, 4: 289-293.
- [15] 冯霞, 孙振元, 韩蕾, 彭镇华. 多年生黑麦草愈伤组织诱导和植株再生[J]. 草业科学, 2004, 10: 23-28.
Feng Xia, Sun Zhenyuan, Han Lei, Peng Zhenhua. Callus induction and plant regeneration of perennial ryegrass [J]. *Pratacultural Science*, 2004, 10: 23-28.
- [16] 冯霞, 孙振元, 韩蕾, 彭镇华. 多年生黑麦草的组织培养与

- 植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 586.
- Feng Xia, Sun Zhenyuan, Han Lei, Peng Zhenhua. Tissue culture and plantlet regeneration of *Lolium perenne* [J]. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40(5): 586.
- [17] 陈季琴, 韩烈保. 正交设计在多年生黑麦草组织培养种的应用[J]. 中国草地, 2005, 26(6): 57-62.
- Chen Jiqin, Han Liebao. Application of orthogonal design to tissue culture of perennial ryegrass[J]. *Grassland of China*, 2005, 26(6): 57-62.
- [18] 杜雪玲, 张振霞, 刘萍, 杨中艺, 符义坤. 2,4-D 和 6-BA 对多年生黑麦草愈伤组织诱导影响的研究[J]. 草原与草坪, 2005, 110(3): 49-51.
- Du Xueling, Zhang Zhenxia, Liu Ping, Yang Zhongyi, Fu Yikun. The effect of 2,4-D and 6-BA on callus induction of perennial ryegrass[J]. *Grassland and Turf*, 2005, 110(3): 49-51.
- [19] 陈季琴, 韩烈保, 杨纯奇, 李雪. 不同外植体对多年生黑麦草愈伤组织诱导的影响[J]. 草原与草坪, 2005, 111(4): 42-46.
- Chen Jiqin, Han Liebao, Yang Chunqi, Li Xue. Effect of different explants on callus induction of perennial ryegrass[J]. *Grassland and Turf*, 2005, 111(4): 42-46.
- [20] 李雪, 韩烈保, 陈季琴. 多年生黑麦草愈伤组织诱导与芽分化的研究[J]. 草业科学, 2005, 22(5): 45-49.
- Li Xue, Han Liebao, Chen Jiqin. Callus induction and bud differentiation of *Lolium perenne*[J]. *Pratacultural Science*, 2005, 22(5): 45-49.
- [21] 李雪, 韩烈保, 曾会明. 多年生黑麦草高频再生体系的建立[J]. 四川草原, 2004, (增刊): 93-96.
- Li Xue, Han Liebao, Zeng Huiming. Constructing the system of high frequency regeneration of *Lolium perenne* [J]. *Journal of Sichuan Grassland*, 2004, (plus): 93-96.
- [22] 林海. 黑麦草成熟胚离体培养技术研究[J]. 河南农业科学, 2005, 9: 69-71.
- Lin Hai. Studies on culture in vitro of mature embryo of ryegrass[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2005, 9: 69-71.
- [23] 蔡能, 易自力, 陈智勇, 刘清波, 蒋建雄. 多年生黑麦草高频再生体系的建立及其优化[J]. 中国草地学报, 2007, 29(4): 45-49.
- Cai Neng, Yi Zili, Chen Zhiyong, Liu Qingbo, Jiang Jianxiong. Establishment and modification of high frequency regeneration system of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2007, 29(4): 45-49.
- [24] 杨爱芳, 何春梅, 王贤丽, 张举仁. 黑麦草幼穗离体培养及植株再生[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 84-90.
- Yang Aifang, He Chunmei, Wang Xianli, Zhang Juren. In vitro culture and plant regeneration from immature ears of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* varieties[J]. *Acta Pratacultural Sinica*, 2004, 13(5): 84-90.
- [25] 姜素云, 胡孝瑞, 晁相蓉, 杨爱芳. 黑麦草高效丛生芽的发生及离体开花的初步研究[J]. 草业学报, 2005, 14(6): 100-106.
- Jiang Suyun, Hu Xiaorui, Yao Xiangrong, Yang Aifang. High efficiency production of multiple shoots and inflorescences induction from the shoot of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*[J]. *Acta Pratacultural Science*, 2005, 14(6): 100-106.
- [26] 陈智勇, 易自力, 蒋建雄, 覃静萍, 刘清波, 蔡能, 唐小艳. 多年生黑麦草遗传转化受体系统的建立[J]. 草原与草坪, 2007, 122(3): 28-32.
- Chen Zhiyong, Yi Zili, Jiang Jianxiong, Tan Jingping, Liu Qingbo, Cai Neng, Tang Xiaoyan. Establishment of the transformation receptor system for *Lolium perenne* [J]. *Grassland and Turf*, 2007, 122(3): 28-32.
- [27] 杨成民, 王宏芝, 孙振元, 魏建华. 利用基因枪共转化法获得转 bar 和 P5CS 基因黑麦草[J]. 草地学报, 2005, 13(1): 34-38.
- Yang Chengmin, Wang Hongzhi, Sun Zhenyuan, Wei Jianhua. Co-transformation of bar and P5CS gene using bombardment on *Lolium perenne* L. [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2005, 13(1): 34-38.
- [28] 张永彦, 徐子勤, 高丽美, 黄萱, 王健. 多年生黑麦草成熟胚再生体系的建立及基因枪转化[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(3): 53-59.
- Zhang Yongyan, Xu Ziqin, Gao Limei, Huang Xuan, Wang Jian. Production of transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues[J]. *Progress in Biotechnology*, 2005, 25(3): 53-59.
- [29] 杨凤萍, 梁荣奇, 张立全, 陈绪清, 张晓东, 王国英, 孙振元. 抗逆调节转录因子 CBF1 基因提高多年生黑麦草的抗旱能力[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 14-18.
- Yang Fengping, Liang Rongqi, Zhang Liquan, Chen Xuqing, Zhang Xiaodong, Wang Guoying, Sun Zhenyuan. Improvement of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) tolerance to drought by gene transferring of stress-inducible transcription factor CBF1 gene[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2006, 21(1): 14-18.
- [30] 杨凤萍, 梁荣奇, 张立全, 张晓东, 孙振元. 抗逆调节转录因子 DREB1B 基因转化多年生黑麦草的研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1309-1315.
- Yang Fengping, Liang Rongqi, Zhang Liquan, Zhang Xiaodong, Sun Zhenyuan. Perennial ryegrass transformed with the adversity-resistant transcription factor DREB1B gene[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(7): 1309-1315.
- [31] 刘萍, 张振霞, 苏乔, 袁剑刚, 席嘉宾, 辛国荣, 杨中艺. 应用农杆菌介导法的多年生黑麦草遗传转化研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(3): 126-128.
- Liu Ping, Zhang Zhenxia, Su Qiao, Yuan Jiangang, Xi Jiabin, Xin Guorong, Yang Zhongyi. Transgenic *Lolium perenne* L. applying *Agrobacterium*-mediated gene transfer[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(3): 126-128.

- [32] Newell C A, Gray J C. Regeneration from leaf-base explants of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 85(2):233-237.
- [33] Kumlehn J J, Nitzsche W. Plant regeneration from ryegrass ovules cultivated on endosperm-derived feeder cells [J]. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 44(3):235-241.
- [34] Creemers Molenaar J, Loeffen J P M, Zaai M A C M. Isolation, culture and regeneration of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* protoplasts[J]. *Curr. Plant. Sci. Biotech Agric.*, 1988,7:53-54.
- [35] Wang Z Y, Nagel J, Potrykus I. Plants from cell suspension derived protoplasts in *Lolium* species [J]. *Plant Sci.*, 1993, 94:179-193.
- [36] Zagmout O M F, Torello W A. Plant regeneration from callus and protoplasts of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Plant Physiology*, 1992, 140:101-105.
- [37] Olesen A, Storgaard M, Madsen S. Somatic in vitro culture response of *Lolium perenne* L.: Genetic effects and correlations with anther culture [J]. *Euphytica*, 1995, 86(3):199-209.
- [38] Salehi H, Khosh Khui M. Effect of genotype and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration in four important turfgrass genera; A comparative study [J]. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*, 2005, 41(2):157-161.
- [39] Spangenberg G, Wang Z Y, Wu X L. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells [J]. *Plant Science*, 1995, 108:209-217.
- [40] Dalton S J, Bettany A J E. Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plants produced by microprojectile bombardment [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18:721-726.
- [41] 韩烈保, 李雪, 刘君. 一种建立多年生黑麦草高效基因枪转化体系的方法及其应用: 中国, 200510085472. 2 [P]. 2006-01-04.
Han Liebao, Li Xue, Liu Jun. A particle bombardment means and application of construction high frequency transformation system of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.): China patent, 200510085472. 2 [P]. 2006-01-04.
- [42] Altpeter F, Xu J P, Abmed Salahuddin. Generation of large numbers of independently transformed fertile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants of forage and turf-type cultivars [J]. *Molecular Breeding*, 2000, (6):519-528.
- [43] Wu X L, Ye X D, Wang Z Y, Potrykus I, Spangenberg G. Gene transfer to ryegrass: Down-regulation of major pollen allergens in transgenic plants [C]// XV III Int. Grassland Congr. Winnipeg and Saskatoon; 1997, (1):35-36.
- [44] Natasha petrovska, Xinli Wu, Ruino Donato, Zengyu Wang. Transgenic ryegrass (*Lolium* spp.) with down-regulation of main pollen allergens [J]. *Molecular Breeding*, 2004, 14, 489-501.
- [45] Takshashi W, Fujimori M, Miura Y, Komatsu T, Nishizawa Y, Takamizo T. Increased resistance to crown rust disease in transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) expressing the rice chitinase gene [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23(12):811-818.
- [46] Hiroshi Hisano, Akira Kanazawa, Akira Kawakami, Midori Yoshida, Yoshiya Shimamoto, Toshihiko Yomada. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing [J]. *Plant Science*, 2004, 167:861-868.
- [47] 易自力, 陈智勇, 蒋建雄, 苏晶, 储成才. 多年生黑麦草遗传转化体系的建立及其转化植株的获得 [J]. 草业学报, 2006, 15(4):99-103.
Yi Zili, Chen Zhiyong, Jiang Jianxiong, Su Jing, Chu Chengcai. Establishment of a transformation system and acquisition of transgenic plants for *Lolium perenne* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2006, 15(4):99-103.
- [48] Posselt U K, Wang G, Schubert J. Induction of virus resistance by means of agrobacterium-mediated gene transfer in ryegrass [C]// Breeding for a multifunctional agriculture. Proceedings of the 21st meeting of the fodder crops and amenity grasses section of EUCARPIA, Switzerland; Ittinen, 1997 & 1998, 9-12:154-156.
- [49] 马欣荣, 刘华玲, 杨宏. 多年生黑麦草的遗传转化发明专利: 中国, 200510020540. 7 [P]. 2006-02-01.
Ma Xinrong, Liu Hualing, Yang Hong. Invention patent of *Lolium perenne* genetic transformation: China patent, 200510020540. 7 [P]. 2006-02-01.
- [50] 韩烈保, 李雪, 刘君. 一种高效获得多年生黑麦草转基因植株的农杆菌介导转化体系及其应用: 中国, 2005100854570. 3 [P]. 2006-01-04.
Han Liebao, Li Xue, Liu Jun. Construction and application a high frequency system of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.): China patent, 2005100854570. 3 [P]. 2006-01-04.
- [51] Xu J P, Schubert J, Altpeter F. Dissection of RNA-mediated ryegrass mosaic virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Plant Journal*, 2001, 26(3):265-274.
- [52] Yuye Wu, Qijun Chen, Min Chen, Jia Chen, Xuechen Wang. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene [J]. *Plant Science*, 2005, 169:65-73.
- [53] Shivendra Bajaj, Yidong Ran, Jonathan Phillips, Gunaseelan kularajathevan, Sunil Pal, Dan Cohen, Kieran Elborough, Sathish Puthigae. A high throughput *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method for functional genomics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25:651-659.

- [54] Cao M X, Huang J Q, He Y L, Liu C L, Jiang W Z, Wei Z M. Transformation of recalcitrant turfgrass cultivars through improvement of tissue culture and selection regime [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, 85(3): 307-316.
- [55] 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]. *Journal of Plant Physiology*, 1997, 151: 83-90.
- [56] Dalton S J, Bettany A J E, Timms E, Morris P. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures[J]. *Plant Sci.*, 1998, 321: 31-43.
- [57] 曾北危. 转基因生物安全[M]. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2004: 152-205.
- Zeng Beiwei. Biosafety of GMO[M]. First edition. Beijing: *Chemical Industry Press*, 2004: 152-205.
- [58] Bettany A J E, Dalton S J, Timms E, Manderyck B, Dhanoa M S, Morris P. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* Schreb. and *Lolium multiflorum* (Lam.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(5): 437-444.

Review on Transgenic Breeding and Biosafety of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

LI Xue, HAN Lie-bao, LIU Jun

(*Turfgrass Institute of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China*)

Abstract: Perennial ryegrass is a pasture and turfgrass species holding strong adaptability. The applications of transgenic technology had already been an important approach on its breeding. The research progress in tissue culture and genetic transformation of perennial ryegrass were reviewed. The biosafety of perennial ryegrass was discussed for the first time.

Key words: Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.); Tissue culture; Genetic transformation; Biosafety