

冰草种间杂种蒙农杂种组织培养再生和遗传转化体系的建立

霍秀文^{1,2}, 魏建华³, 徐春波², 米福贵², 云锦凤²

(¹内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018; ²内蒙古农业大学生态环境学院, 呼和浩特 010018;
³北京市农林科学院农业生物技术中心, 北京 100089)

摘要: 以冰草属 (*Agropyron* Gaertn.) 中的 1 个优质种间杂种——“蒙农杂种”冰草 (*A. cristatum* × *A. desertorum* cv. ‘Mengnong’) 为材料, 以幼穗为外植体, 建立了组织培养再生与遗传转化体系。试验中所用诱导愈伤组织的培养基为改良 MS + 2,4-D 2.0~3.0 mg·L⁻¹, 愈伤组织诱导率平均为 83.4%; 分化培养基为 MS (无附加成分), 分化率达 59.6%; 在 1/2MS 培养基上生根后得到完整小植株。在此基础上, 以抗除草剂基因 *bar* 为目标基因, 用基因枪法转化幼穗诱导的愈伤组织, 并对再生植株进行 PCR 和 Southern 鉴定, 以及在含除草剂 (0.5 mg·L⁻¹ 的 Glufosinate) 培养基中可正常生长的结果表明, 外源基因已整合到受体基因组 DNA 中, 转化率为 1.1%。

关键词: 冰草; 植株再生; 遗传转化; *bar* 基因

Plant Regeneration and Genetic Transformation in Wheatgrass (*Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. ‘Mengnong’)

HUO Xiu-wen^{1,2}, WEI Jian-hua³, XU Chun-bo², MI Fu-gui², YUN Jin-feng²

(¹College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; ²College of Ecology and Enviroment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; ³Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forest Sciences, Beijing 100089)

Abstract: Plant regeneration from immature inflorescence through direct callus induction was investigated in the case of a hybrid wheatgrass (*A. cristatum* × *A. desertorum* cv. ‘Mengnong’). Explants were directly cultured on advanced MS solid medium containing 2.0-3.0 mg·L⁻¹ of 2,4-D to induce calli and then transferred to hormone-free MS medium for callus differentiation and 1/2 MS medium for rooting. It was found that the callus induction frequency was 83.4% and plant regeneration frequency was 59.6%. Phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene was transformed into hybrid wheatgrass by particle bombardment. Upon selection with 0.5 mg·L⁻¹ glufosinate, resistant callus were obtained and some transformed plants recovered in vitro. The transgenic wheatgrasses were identified by PCR and Southern analysis of digested genomic DNA, and they could develop normally in the medium containing glufosinate while the untransgenic plants could not. This is the first report on genetic transformation in wheatgrass.

Key words: Wheatgrass (*Agropyron* Gaertn.); Plants regeneration; Genetic transformation; *bar* gene

牧草生物技术研究始于 20 世纪 80 年代后期, 因其应用前景不及农作物而发展滞后。在牧草转基因研究初期, 多集中于少数豆科牧草。禾本科牧草由于组织培养的植株再生频率低而在转基因研究方面进展缓慢。目前可形成再生植株的禾本科牧草和草坪草约有 65 个种, 30 多个属, 此外对 20 多个种建立

了遗传转化体系^[1]。

冰草属 (*Agropyron* Gaertn.) 植物为禾本科牧草, 国外 20 世纪 80 年代开始有组织培养再生植株的研究报道^[1], 但冰草 (*A. cristatum* L. Gaertn.) 遗传转化的研究尚未见到任何相关报道。冰草为寿命较长的多年生疏丛牧草, 广泛分布于干

收稿日期: 2003-06-27

基金项目: 国家转基因植物与产业化研究专项资助项目 (J2002-B-008)

作者简介: 霍秀文 (1968-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 副教授, 博士研究生, 主要从事植物生物技术研究, E-mail: huoxiuwen@sohu.com。云锦凤、米福贵为通讯作者, Tel: 0471-4317724; E-mail: csgrass@public.hh.nm.cn

旱、半干旱草原和荒漠草原, 抗逆性较强, 春季返青早, 秋季枯黄晚, 茎叶柔嫩, 营养丰富, 适口性好, 是西北干旱半干旱地区改良草场以及建立人工草地和生态建设的重要禾本科牧草之一。

为加快冰草种质改良, 培育更优良的冰草品种, 笔者在多年冰草种质资源搜集与育种的基础上, 开展了冰草基因工程研究。以冰草属中的1个种间杂种——蒙农杂种冰草为材料, 建立了冰草组织培养再生植株体系, 及冰草遗传转化体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 冰草属植物 本试验选用的冰草材料是由诱导四倍体扁穗冰草 (*A. cristatum* cv. Fairway, $2n=28$) 和天然四倍体沙生冰草 (*A. desertorum*, $2n=28$) 种间杂交育成的, 1984年由美国USDA-ARS注册登记推出, 同年由内蒙古农业大学从美国引入, 经2次单株选择和1次混合选择于1999年经全国牧草品种审定委员会审定, 登记为育成品种, 命名为“蒙农杂种冰草” (*A. cristatum* × *A. desertorum* cv. ‘Mengnong’, $2n=28$)。试验材料取自于内蒙古农业大学牧草种质资源圃, 生长周期为2~5年。

1.1.2 外植体 冰草幼穗(孕穗期)。

1.1.3 重组质粒 pBPI (含 *bar* 基因)。

1.1.4 试剂 酶类(TaKaRa), Glufosinate (FLUKA), DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche)。

1.1.5 基因枪 PDS-1000/He (Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 取孕穗期^[2-5]幼穗, 下部浸入少量附加赤霉素(GA) $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体MS培养基中, 4°C 下培养5~7 d后剥离幼穗, 75%酒精消毒30 s, 再用0.1% HgCl_2 消毒2~4 min, 然后用无菌水冲洗数次。切成2~3 mm小段, 接种在不同的愈伤组织诱导培养基MS和改良MS中, 并分别附加 $0.5\sim 5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, 蔗糖 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂0.7%, pH 5.8。于 $24\sim 26^{\circ}\text{C}$ 暗培养7~14 d后, 观察愈伤组织形成速度和质量(表1)。

改良MS固体培养基^[5]: 大量元素 NH_4NO_3 $956\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1\ 160\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $370\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $96\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 有机元素: 肌醇 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, VB_1 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 烟酸 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, VB_6 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 甘氨酸 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, MS常规铁盐和微量元素。

1.2.2 诱导分化及植株再生 将上述愈伤组织转入分化培养基。分化培养基为MS培养基附加不同浓度的KT ($0, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 与不同浓度的ZT ($1.0, 3.0, 5.0, 10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 并配合使用一定浓度的NAA ($0.5, 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。 26°C 下24 h光照培养, 3周后统计愈伤组织分化情况(表2)。

将分化的小苗转入生根培养基1/2MS上(无附加成分), 1周后生根形成完整小植株。

1.2.3 转化方法 以诱导培养2周的幼穗愈伤组织为受体^[6], 以含有 *bar* 基因的质粒DNA包裹金粉子弹, 采用基因枪轰击法进行转化。轰击参数为氮压1100 Psi, 每枪金粉用量为 $500\ \mu\text{g}$, 质粒DNA用量为 $0.8\ \mu\text{g}$ ^[7,8]。轰击后将愈伤组织转移到相同培养基上恢复培养3~5 d, 然后转移到MS附加Glufosinate ($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基上筛选, 生根培养基为1/2MS附加Glufosinate ($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.2.4 PCR检测转基因植株 以冰草总基因组DNA为模板, 进行转化植株的PCR检测。SDS法小量提取基因组DNA; PCR检测的引物分别对应于 *bar* 基因的上游序列(5'引物)和下游序列(3'引物)。分别为5'-ATTGGATCCATGAGCCCAGAACGACGC-3'和5'-CTTGGTACCTAAATCTCGGTGACGGGC-3'。

反应条件为: 95°C , 7 min; 94°C , 1 min; 55°C , 1 min; 72°C , 1 min; 72°C , 7 min; 35个循环。

1.2.5 Southern检测转基因植株 用CTAB法大量提取和纯化转化植株基因组DNA^[9,10], 经EcoRI完全消化, 与DIG标记的 *bar* 基因探针杂交, 未转化植株基因组DNA和质粒分别为阴性和阳性对照。

2 结果与分析

2.1 组织培养再生植株

2.1.1 愈伤组织的诱导 不同培养基对蒙农杂种冰草愈伤组织诱导率和愈伤组织质量的影响见表1。

接种7~10 d后观察, MS培养基附加不同浓度的2,4-D均可诱导愈伤组织, 但出愈率较低, 平均为28.5%, 且愈伤组织结构松散、玻璃化; 而在改良MS培养基上, 在幼穗的各部位均诱导出了淡黄色致密的愈伤组织, 诱导率平均达76.6%。

笔者所用的改良MS培养基总离子浓度降低至 $2.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $22.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (MS为 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $45.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 的浓度提高到 $1\ 160\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $8.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (MS培养基为 $170\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)更

利于诱导愈伤组织发生。改良MS培养基中2,4-D的浓度为0.5 mg·L⁻¹时,出愈率为41.1%,部分外植体脱分化不成功,继续长大发育成颖片和稃片;2,4-D的浓度在1.0~5.0 mg·L⁻¹时愈伤组织诱导率差异不大,介于81.3%~86.1%之间,只是愈伤组织致密程度稍有差异。从表中的趋势看,提高2,4-D浓度有利于幼穗脱分化与诱导愈伤组织,但高浓度2,4-D会抑制愈伤组织芽的分化。使用改良MS培养基附加2,4-D(1.0~5.0 mg·L⁻¹)可有效诱导冰草幼穗形成愈伤组织,2,4-D的浓度以2.0~3.0 mg·L⁻¹效果为好。

表1 不同培养基对蒙农杂种冰草幼穗愈伤组织诱导的影响

Table 1 Medium effect on callus initiation from immature inflorescences of *Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Mengnong'

培养基 Medium (mg·L ⁻¹)	接种外植体数 No. of explants	形成愈伤数 No. of callus produced	诱导率(%) Callus initiation frequency	愈伤组织质量 Callus quality
MS+2,4-D0.5	96	23	24.0	松散
MS+2,4-D1.0	96	27	28.1	松散
MS+2,4-D2.0	100	33	33.0	松散
MS+2,4-D3.0	98	34	34.7	松散
MS+2,4-D4.0	102	24	23.5	松散
MS+2,4-D5.0	101	28	27.7	松散
Modified MS+2,4-D0.5	192	79	41.1	较松散
Modified MS+2,4-D1.0	192	156	81.3	较致密
Modified MS+2,4-D2.0	200	167	83.5	致密
Modified MS+2,4-D3.0	196	163	83.2	致密
Modified MS+2,4-D4.0	204	172	84.3	致密
Modified MS+2,4-D5.0	202	174	86.1	致密

叶状不定芽出现。这些芽生长迅速,不久就在同一愈伤组织块上产生了丛生芽(图2-1,2),有的愈伤组织在分化芽的同时也有根的分化。

在不加激素的MS培养基中芽分化率显著高于其它2种培养基,绿芽分化频率高达59.6%。推测可能是冰草内源的细胞分裂素水平较高,也可能是由于除去2,4-D后,胚性愈伤组织进一步发育成完整的成熟胚结构,进而形成完整小植株。本试验中诱导愈伤组织分化的最佳培养基是MS。

2.2 遗传转化

2.2.1 重组质粒 重组质粒pBPI携带*bar*基因,由玉米泛素合成酶基因启动子(Ubi)驱动,3'端连接Nos终止子,结构如图1。

2.2.2 转基因植株的获得 本实验中*bar*基因的筛选剂为Glufosinate。在筛选分化培养基中加入0.5 mg·L⁻¹的Glufosinate可部分抑制转化幼穗愈伤组织的分化。经基因枪轰击后的幼穗愈伤组织接种于愈伤组织诱导培养基中恢复培养3~5 d后,转入

2.1.2 愈伤组织的分化 诱导分化的培养基为MS及MS附加不同浓度的KT和ZT,并配合使用一定浓度的NAA(表2)。结果显示,①在附加不同浓度细胞分裂素KT的试验中,仅有少数愈伤组织可分化成芽,植株再生频率低,平均只有2.8%。与KT配合附加生长素类物质NAA,浓度在0.5~1.0 mg·L⁻¹,芽的分化率略有提高(7.4%)。②MS附加细胞分裂素ZT,芽的分化频率也较低,平均仅为4.4%左右,而且一些愈伤组织只分化根;同样配合使用NAA可略提高芽的分化率(8.2%)。③在无附加成分的MS培养基中,愈伤组织块由淡黄色变为鲜绿色,接着伴随有大量

表2 不同培养基对蒙农杂种冰草幼穗愈伤组织分化的影响

Table 2 The effect of different mediums on differentiation of callus initiated from immature inflorescences of *Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Mengnong'

培养基 Medium (mg·L ⁻¹)	接种愈伤数 No. of callus cultured	分化芽的愈伤数 No. of callus differentiated	分化率(%) Frequency of differentiation (%)
MS+1.0KT	83	4	4.8
MS+3.0KT	72	0	0
MS+5.0KT	92	6	6.5
MS+10.0KT	68	0	0
MS+1.0KT+0.5NAA	81	4	4.9
MS+3.0KT+0.5NAA	95	8	8.4
MS+5.0KT+1.0NAA	87	9	10.3
MS+10.0KT+1.0NAA	98	6	6.1
MS+1.0ZT	84	5	6.0
MS+3.0ZT	65	0	0
MS+5.0ZT	77	4	5.2
MS+10.0ZT	94	6	6.4
MS+1.0ZT+0.5NAA	88	9	10.2
MS+3.0ZT+0.5NAA	67	6	9.0
MS+5.0ZT+1.0NAA	74	4	5.4
MS+10.0ZT+1.0NAA	98	8	8.2
MS	89	53	59.6

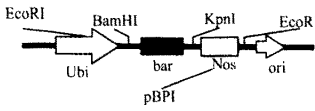
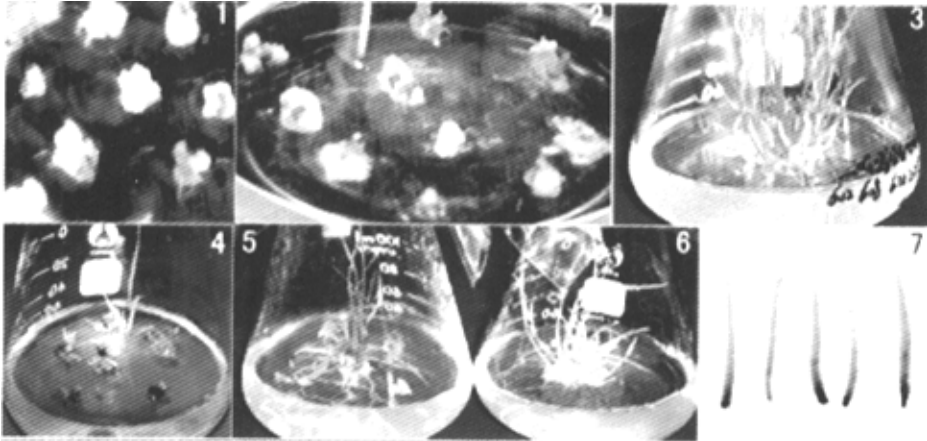


图1 质粒pBPI结构简图

Fig.1 The construction of plasmid pBPI

含 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Glufosinate的分化培养基中诱导分化, 部分愈伤组织可分化成芽, 并再生成完整植株(图2)。

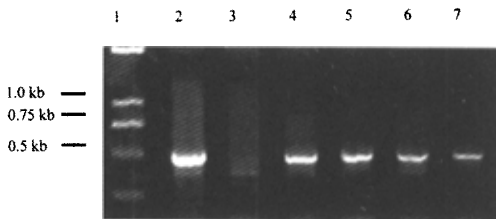
2.2.3 转基因植株的PCR和Southern检测 从转化冰草基因组DNA中经PCR扩增得到约500 bp的特异带(lane 4~7)(图3), 与质粒pBPI扩增结果一



1. 诱导愈伤组织; 2. 诱导愈伤组织分化; 3. 再生植株; 4. 抗性愈伤组织(培养基含Glufosinate); 5. 转基因植株(培养基含Glufosinate); 6. 野生型对照(培养基含Glufosinate); 7. 幼穗外植体
1.Callus induced; 2.Differentiation induced; 3.Regenerated plant; 4.Callus in medium containing Glufosinate; 5.Transgenic plant in medium containing Glufosinate; 6.Wild plant in medium containing Glufosinate; 7.The explants of immature inflorescence

图2 蒙农杂种冰草再生植株及转基因植株

Fig.2 The plant regeneration and transgenic plant of *Agropyron cristatum* x *A. desertorum* cv. 'Mengnong'



1. DNA 分子量标准(DL2000); 2. 阳性对照; 3. 阴性对照, 4~7. 部分转基因植株
1. DNA marker(DL2000); 2. Positive control; 3. Negative control; 4-7. Transgenic plants

图3 转基因冰草PCR检测

Fig.3 PCR analysis of transgenic wheatgrass

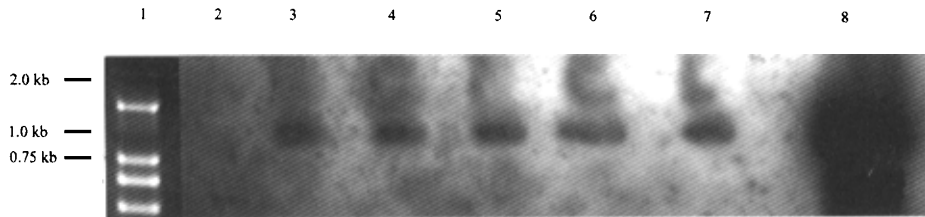
致(lane 2), 阴性对照没有特异性扩增产物(lane 3), 初步表明 *bar* 基因已整合到受体基因组中。pBPI 质粒中 *bar* 基因上游 *Ubi* 启动子中及下游 *Nos* 终止子外各有1个 *EcoRI* 酶切位点(图1)。用 *EcoRI* 可

以切出包含完整 *bar* 基因的DNA片段, 长度约1500 bp。图4中Southern结果显示, 基因组DNA经 *EcoRI* 完全消化产物与DIG标记的 *bar* 探针产生的杂交信号约为1500 bp (lane 3~7), 与质粒pBPI经 *EcoRI* 完全消化后产生的杂交信号片段大小相同(lane 8), 而阴性对照(lane 1)没有杂交信号, 表明确已获得了转 *bar* 基因冰草植株。转基因植株在含 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Glufosinate的培养基中可正常生长(图2-5), 而非转基因野生型对照不能正常生长(图2-6), 证实整合到转基因植株中的 *bar* 基因已表达, 表现出对Glufosinate的抗性。

2.2.4 转基因植株的遗传转化率 将Glufosinate筛选的抗性植株进行PCR检测, 统计产生转基因植株的愈伤组织及抗性愈伤率和遗传转化率。表3结果显示抗性愈伤率为43.9%, 抗性植株比率为24.7%, 而遗传转化率仅为1.1%。同时发现在含Glufosinate

的培养基中分化率降低为 32.5% (相对于表 2 中的分化率 59.6%), 表明 Glufosinate 对分化率有影响。

可见建立组织培养高频再生体系是遗传转化的首要条件。



1. DNA 分子量标准 (DL2000); 2. 阴性对照; 3~7. 部分转基因植株; 8. 阳性对照
1. DNA marker (DL2000); 2. Negative control; 3~7. Transgenic plants; 8. Positive control

图 4 转基因冰草 Southern 检测

Fig. 4 Southern analysis of digested total genomic DNA from transgenic wheatgrass probed with DIG labeled plasmid cDNA

表 3 基因枪轰击蒙农杂种冰草幼穗愈伤组织的遗传转化率

Table 3 Transformation efficiency (T.E) by microprojectile bombardment in *Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Mengnong'

轰击的愈伤组织数	抗性愈伤组织数	分化的愈伤组织数	抗性植株数	产生转基因植株的愈伤数	抗性愈伤率	分化率	抗性植株比率	遗传转化率
No. of bombarded calli (A)	No. of resistant calli (B)	No. of differentiated calli (C)	No. of resistant plants (D)	No. of calli developing transgenic plant (E)	B/A (%)	C/A (%)	D/A (%)	E/A (%)
3 512	1 543	1 143	867	39	43.9	32.5	24.7	1.1

3 讨论

3.1 牧草组织培养再生体系的建立

组织培养再生体系的建立是植物基因转化成功的首要条件。禾本科牧草的组织培养再生相对较难, 主要是适用的外植体较单一, 如幼胚、幼穗、花药、原生质体、悬浮细胞等^[1, 11~16], 这些外植体或取材困难, 或受季节限制不能周年供应。近年来研究者们探索了以盾片、胚轴等为外植体诱导再生植株的途径, 但植株再生频率低, 还需进一步优化完善离体培养条件。

3.2 冰草幼穗的取材时期

本试验以冰草幼穗为外植体诱导植株再生。选择幼穗适当的发育时期取材, 对获得良好的培养结果是非常重要的。一些学者认为孕穗期或护颖原基形成期和小花原基形成期是合适的幼穗外植体取材时期^[2, 4]。一般根据植株外部形态可判断幼穗的发育时期, 但不同生态条件下, 外部形态的判断标准不同。如大田中旗叶展开, 距下部第 1 片叶约 1.0~2.0 cm 时, 剥出的幼穗为 1.0~2.0 cm; 而日光温室中剥出同样大小的幼穗时其形态特征为挑旗; 其它如水肥条件、生育周期等都对形态指标

有影响, 取材时需具体情况具体分析, 不能一概而论。本研究中, 笔者以幼穗大小为取材标准。在冰草幼穗发育的孕穗期, 剥开的幼穗介于 1.0~3.0 cm 为宜, 大于 3.0 cm 诱导的愈伤组织在分化时其颖片和稃片易先分化形成叶芽甚至类小穗而非丛生芽; 小于 1.0 cm 的幼穗在消毒时易受影响失去活力。

3.3 冰草的遗传转化

已用于牧草基因转化并获得转基因植株的方法主要有: 将 DNA 直接转移导入原生质体, 如高羊茅、紫羊茅、匍匐剪股颖、多年生黑麦草和一年生黑麦草^[13, 17, 18]; 硅碳纤维漩涡介导法^[19], 农杆菌介导法^[1, 19, 20], 基因枪轰击法等^[1, 15~17, 21]。迄今为止, 禾本科牧草转基因成功多是采用基因枪法^[1]。本试验以幼穗为外植体建立了冰草组织培养再生体系, 并将除草剂抗性基因 *bar* 用 PDS 1 000/He 基因枪导入了在内蒙古地区有一定面积并具推广前景的优良牧草蒙农杂种冰草, 获得了转基因植株, 初步建立了冰草遗传转化体系, 遗传转化率为 1.1%。

现有有关冰草属植物组织培养再生体系的研究报道, 多集中于麦类植物与冰草属植物杂交种的胚拯救方面^[3, 22], 尚无冰草属植物遗传转化的成功报

道。笔者建立的以幼穗为外植体的冰草组织培养再生体系, 和利用基因枪法将抗除草剂基因 *bar* 导入冰草的转化体系, 为冰草属植物种质的基因工程改良奠定了基础, 也可为其它禾本科牧草的基因转化提供参考。

References

- [1] Wang Z Y, Hopkins A, Mian R. Forage and turf grass biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2001, 20(6):573-619.
- [2] 李立会, 董玉琛, 周荣华, 李秀全, 杨欣明. 小麦×冰草属间杂种F₁的植株再生及其变异. *遗传学报*, 1992, 19(3): 250-258.
Li L H, Dong Y C, Zhou R H, Li X Q, Yang X M. Plant regeneration and variation of a wheat × *Agropyron gaertn* intergeneric hybrid. *Acta Genetica Sinica*, 1992, 19(3): 250-258. (in Chinese)
- [3] 李立会, 杨欣明, 周荣华, 李秀全, 董玉琛. 小麦-冰草异源附加系的创建II. 异源染色体质的检测与培育途径分析. *遗传学报*, 1998, 25(6): 538-544.
Li L H, Yang X M, Zhou R H, Li X Q, Dong Y C. Establishment of wheat-*Agropyron cristatum* alien addition lines. II. Identification of alien chromosomes and analysis of development approaches. *Acta Genetica Sinica*, 1998, 25(6): 538-544. (in Chinese)
- [4] 云锦凤, 米富贵, 杜建材. 冰草茎生长锥分化、幼穗形成及小孢子发育. *中国草地*, 1989, (5): 30-35.
Yun J F, Mi F G, Du J C. The apical cone differentiation and immature inflorescence formation and microspore proliferation in wheatgrass. *Grassland of China*, 1989, (5):30-35. (in Chinese)
- [5] Gyulai G, Janovszky J, Kiss E, Lelik L, Csillag A, Heszky L E. Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordial of the intergeneric hybrid *Agropyron repens* (L.) Beauv. × *Bromus inermis* Leyss. cv. nanus on a modified nutritive medium. *Plant Cell Reports*, 1992, 11:266-269.
- [6] 陈梁鸿, 王新望, 张晓东, 胡道芬, 刘广田. 基因枪转化小麦不同受体的研究. *华北农学报*, 1998, 13(1): 1-5.
Chen L H, Wang X W, Zhang X D, Hu D F, Liu G T. Transformation of different acceptors in wheat following particle bombardment. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1998, 13(1): 1-5. (in Chinese)
- [7] 安海龙, 卫志明. 小麦遗传转化技术研究进展. *细胞生物学杂志*, 2000, 22(4): 194-199.
An H L, Wei Z M. Development of technique for wheat genetic transformation. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2000, 22(4):194-199. (in Chinese)
- [8] 张晓东, 李东梅, 徐文英, 蒋有铨, 胡道芬, 韩立新. 利用基因枪将HMV谷蛋白亚基基因与除草剂Basta抗性基因导入小麦不同外植体获得转基因植株. *遗传*, 1998, 20(增刊): 3-8.
Zhang X D, Li D M, Xu W Y, Jiang Y Y, Hu D F, Han L X. Production of transgenic wheat plant via microprojectile bombardment transferring novel wheat HMV glutenin subunit gene and herbicide resistance gene. *Hereditas*, 1998, 20 (Suppl.):3-8. (in Chinese)
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版). 北京: 科学出版社, 2002.
Wang G L, Fang H J. *Plant Genetic Engineering*(2nd). Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [10] Sambrook J, Russel D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd). Cold Spring Laboratory Press, 2001.
- [11] Spangenberg G, Kalla R, Lidgett A, Sawbridge T, Ong E K, John U. Transgenesis and genomics in molecular breeding of forage plants. *Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference*. Hobart, 2001.
- [12] Yao K, Chen C H, McMullen C R. Regeneration of albino shoots in cultured anthers of intermediate wheatgrass (*Agropyron intermedium* (Host) Beauv.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 26:189-193.
- [13] Spangenberg G, Wang Z Y, Nagel J, Potrykus I. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Science*, 1994, (97): 83-94.
- [14] Wang Z Y, Legris G, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G. Cryopreservation of embryonic cell suspension in *Festuca* and *Lolium* species. *Plant Science*, 1994, (103):93-106.
- [15] Ye X, Wang Z Y, Wu X, Potrykus I, Spangenberg G. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryonic suspension cells. *Plant Cell Reports*, 1997, 16:379-384.
- [16] Spangenberg G, Wang Z Y, Wu X L, Nagel J, Potrykus I. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryonic suspension cells. *Plant Science*, 1995, 108:209-217.
- [17] Wang Z Y, Takamizo T, Iglesias V A, Osusky M, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G. Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio/Technology*, 1992, 10: 691-696.
- [18] Wang Z Y, Valles M P, Montavon P, Potrykus I, Spangenberg G. Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). *Plant Cell Reports*, 1993, 12:95-100.
- [19] 郭振飞, 卢少云. 基因工程在草坪草育种上的应用. *草地学报*, 2002, 10(3): 184-189.
Guo Z F, Lu S Y. Application of genetic engineering in turfgrass breeding. *Acta Agrestia Sinica*, 2002, 10(3): 184-189. (in Chinese)
- [20] 陈玉香, 周道玮. 转基因牧草研究进展. *中国草地*, 2002, 24(3): 59-63.
Chen Y X, Zhou D W. Progress in research on transgenic grass. *Grassland of China*, 2002, 24(3):59-63. (in Chinese)
- [21] Hartman C L, Lee L, Day P R, Tumer N E. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Bio/Technology*, 1994, 12(9):919-923.
- [22] Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Production of embryo-callus-regenerated hybrids between *Triticum aestivum* and *Agropyron cristatum* possessing one B chromosome. *Agronomie*, 1992, 12:551-555.