

结缕草生物技术研究进展

贺杰^{1,3}, 孙振元², 魏建华¹, 王宏芝¹, 校现周³, 李瑞芬^{1*}

(1. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100089; 2. 中国林业科学院林业研究所, 北京 100091; 3. 华南热带农业大学, 海南儋州 571737)

摘要: 结缕草属植物具有耐干旱、耐盐和耐践踏等优良特性。最近的研究表明, 基因转移与重组技术在结缕草遗传改良中具有巨大应用潜力; 结缕草遗传连锁图谱构建取得重要进展; 基因克隆和基因资源研究正在展开。结合当前有关结缕草生物技术研究现状, 综述了结缕草基因工程和基因资源方面的研究进展, 讨论了存在的问题并展望其前景。

关键词: 结缕草; 组织培养; 遗传转化; 基因资源

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 470X(2006)01 - 0074 - 06

Advance on the Study of Biotechnology in Zoysiagrass

HE Jie^{1,3}, SUN Zhen-Yuan², WEI Jian-Hua¹, WANG Hong-Zhi¹, Xiao Xian-Zhou³, LI Rui-Fen^{1*}

(1. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. South China University of Tropical Agriculture, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Some species in the genus *Zoysia* possess agronomically useful traits such as drought tolerance, salt tolerance and wear tolerance. Recent studies show that DNA transfer and recombination technology provides great potential for genetic improvement of zoysiagrasses; molecular linkage maps were constructed from *Zoysia japonica* and its hybrids with *Zoysia matrella*; the researches on gene cloning and gene resource are in progress. In this review, we summarized the current knowledge in the study of genetic transformation and gene resource in zoysiagrass, and pointed out some problems and prospects.

Key words: Zoysiagrass (*Zoysia* spp.); Tissue culture; Genetic transformation; Gene resource

结缕草 (*Zoysia* spp.) 是禾本科 (Gramineae) 画眉草亚科 (Chloridoideae) 结缕草属 (*Zoysia*) 多年生暖季型草坪植物, 分布范围较广, 其跨度约为 20 个纬度, 34 个经度, 但主要分布于亚洲, 在非洲等温暖地区亦有分布。我国结缕草资源居世界首位, 结缕草也是我国唯一具有出口创汇能力的草种。我国有该属植物 5 种、2 变种、1 变型^[1], 其中 5 个种已经用于草坪草种质研究和开发利用, 即日本结缕草 (*Z. japonica* Steud.)、中华结缕草 (*Z. sinica* Hance)、大穗结缕草 (*Z. macrostachya* Franch. & Sav.)、沟叶结缕草 [*Z. Matrella* (L.) Merr.] 和细叶结缕草 (*Z. tenuifolia* Willd.)。结缕草具有耐干旱、耐盐、耐践踏、耐瘠薄、耐低修剪等优点^[2], 是一种很有发展潜力的草坪草, 但绿色期较短成为限制其应用的主要障碍。

近 20 年来, 生物技术发展迅速, 为植物遗传改良提供了新的途径。研究人员将生物技术应用于结缕草遗传改良和基因资源研究中, 并取得了重要进展, 延长结缕草绿色期也将成为可能。

1 结缕草再生体系的建立

植株再生体系的建立是遗传转化成功的前提和保障, 而外植体的选择是建立植株再生体系的首要环节。就结缕草而言, 常用的外植体除成熟的种子外, 还有幼穗、幼果、匍匐茎分生组织等。但由于成熟或已分化的外植体缺少较强的二次生长的自然能力^[3], 因此结缕草一般都用胚性愈伤组织、胚性细胞悬浮系及其原生质体来分化再生植株。

1.1 以成熟胚为外植体再生体系的建立

以成熟种子为外植体, 优点是取材不受季节和

收稿日期: 2005-06-28, 修回日期: 2005-09-15。

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2002AA241061)。

作者简介: 贺杰 (1978 -), 女, 河南周口人, 在读硕士生, 主要从事植物生物技术方面的研究工作。

* 通讯作者 (E-mail: lirufen@yahoo.com.cn)。

时间的限制,缺点是愈伤组织诱导受种子活力状况、附属结构等因素影响。由于结缕草种子存在一定的休眠特性,颖壳等附属结构不利于彻底消毒和激素吸收。目前主要采用除去颖壳消毒后直接接种^[4-8],也有切取胚再接种的^[9]。但由于结缕草种子极小,切取胚比较费工费时,难以操作,一般不采用此方法接种。在以成熟胚为外植体诱导愈伤组织中,用MS^[4-6,9]、LS^[7,8]和N₆^[9,10]基本培养基添加合适浓度激素诱导愈伤组织。Asano等在1989年把无菌幼苗接种在改良的N₆培养基(添加Na₂SO₄·2H₂O、CuSO₄·5H₂O、有机酸、维生素)上首次诱导出愈伤组织并通过原生质体培养获得再生植株^[10],而未改良的N₆培养基不适宜结缕草成熟胚愈伤组织的诱导和分化^[9]。维生素VB₁对LS培养基诱导和继代胚性愈伤组织是必需的^[7,8]。总的来说,MS培养基比较适宜结缕草成熟胚诱导愈伤组织和分化植株。

不同外植体的内源激素不同,诱导愈伤组织时在培养基上添加的外源激素种类和水平不同。建立与优化结缕草组培再生体系显得非常重要,特别是外源生长素与分裂素的比例适合与否,是影响胚性愈伤组织的诱导率及植株再生率的主要因素^[4-9]。

结缕草是禾本科植物中比较难以培养的物种,在由结缕草成熟胚诱导愈伤组织的过程中,经常会出现不同状态的愈伤组织。其中较软、水渍状的愈伤组织容易产生^[11],这类愈伤组织没有再生能力。如何把不具有胚性的愈伤组织变成胚性愈伤组织,是建立结缕草稳定、成熟再生体系的关键。结合我们研究室的工作经验和资料报道,通过:①适当调整诱导培养基中激素的浓度和配比,如1~3 mg/L的2,4-D配比低浓度的6-BA(0.1~0.3 mg/L)^[4,7]、一定浓度的NAA(1.0 mg/L)与2,4-D(3.0 mg/L)组合^[6];②适当增加继代次数^[4];③添加有机成分,如VB₁、肌醇和 α -酮戊二酸^[4,7]等,均可增加胚性愈伤组织的比例。目前,以日本、中华结缕草组培再生体系的建立和优化研究较多,但都没有太大的突破,高频再生愈伤系的获得仍存在一定难度。本研究室通过反复摸索,初步建立与获得了中华结缕草高频再生愈伤系,用于遗传转化研究(另文发表)。

1.2 以幼穗、匍匐茎等为外植体再生体系的建立

大多数草坪草是异花授粉植物,所谓的品种或材料在遗传上是异质体(Heterogeneous)。如果以种子为外植体,不同种子可能代表不同的基因型,但选择幼穗、茎节(包括匍匐茎和根茎)为外植体就可克

服该缺点。

尽管目前日本和韩国研究者利用日本结缕草、沟叶结缕草和中华结缕草的幼穗、幼胚^[12,13]、茎尖^[14]和匍匐茎段^[15]诱导出愈伤组织并再生出植株,但再生率均很低。研究表明结缕草幼穗、幼胚的全能性优于茎尖^[16],茎尖优于匍匐茎段,而匍匐茎段是组培快繁的理想材料。

以幼穗、幼胚、匍匐茎等为外植体诱导愈伤组织,最大的好处是不通过继代扩繁可获得大量同一基因型愈伤组织,为研究结缕草基因型对植株再生的影响提供理想外植体。但取材除受季节和时间的限制、不宜消毒外,结缕草的分布和生殖受地域性影响很大,一般难以获得合适的幼穗和幼胚外植体。据资料分析,到目前为止,结缕草遗传转化的外植体,仍以成熟胚为主。

2 结缕草遗传转化

草坪草的遗传转化方法可分为原生质体转化法和依赖于原生质体转化法。前者包括电激转化法、聚乙二醇(PEG)介导法,后者包括基因枪法、碳化硅介导转化法、农杆菌介导转化法等。但到目前为止,报道的结缕草转化方法主要有原生质体法、基因枪法和农杆菌介导转化法。

2.1 原生质体介导结缕草的遗传转化

原生质体转化法是基于原生质体具有摄取外来物质的特性,通过渗透或电击处理可诱导原生质体摄入外源DNA^[17]。1980年后,由于采用了胚性细胞悬浮系或胚性愈伤组织制备原生质体,各种草坪草原生质体培养及再生植株技术相继成功,使得DNA直接导入原生质体的转化技术能够应用于草坪草。Inokuma等^[18]通过热激和聚乙二醇(PEG)介导法将潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*)和 β -葡萄糖醛酸酶基因(*gus*)(用Adh 1作为启动子)和N-乙酰基转移酶基因(*Pat*)导入日本结缕草原生质体,获得了抗潮霉素的转基因植株,从而开创了草坪草用该转基因法的先例。但由于原生质体培养难度较大,目前运用该法进行遗传转化的研究较少。

2.2 农杆菌介导结缕草的遗传转化

目前,农杆菌介导的转基因技术已十分有效地应用于双子叶植物的遗传转化。由于单子叶植物不是农杆菌的天然宿主,曾认为农杆菌介导法不适合于单子叶植物,特别是禾本科植物的遗传转化。但随着对农杆菌侵染机理的深入研究和相应技术的提高,农杆菌介导单子叶植物包括禾本科植物的基因

转化已获得成功。据不完全统计,迄今已有7个科20多种单子叶植物利用农杆菌介导法转化成功^[19]。

1998~2001年间,柴明良^[20]通过*A. tumefaciens* LBA4404介导,将*hpt*基因、*bar*基因、*GFP*基因及*gus*基因导入由日本结缕草种子诱导的胚性愈伤组织中,得到了再生植株,这是世界上首例用农杆菌介导法获得草坪草转基因成功的报道。Rahman等^[21]建立了*A. tumefaciens*介导的日本结缕草品种YK-EM2高效转化体系,并确定了*A. tumefaciens*菌株、潮霉素浓度等关键因子的最佳组合。目前研究表明,影响结缕草农杆菌介导转化率的主要因素有两个:一是受体组织的状态(包括再生能力和转化能力);二是促进农杆菌侵染的各种因素^[11,22]。其中酚类物质可以激活农杆菌Ti质粒的*Vir*基因以促进转化,效果最佳的是AS(乙酰丁香酮);而且甜菜碱、去除钙离子及与农杆菌共培养时间、温度能明显提高*Gus*基因瞬时表达水平。钙离子在农杆菌侵染过程中的作用并不十分明确,但*gus*基因瞬时表达证明钙离子的存在抑制转化效率^[22],这可能是由于在农杆菌侵染过程中钙离子参与了植物防御反应而导致的。这些研究标志着结缕草农杆菌转化方法日益成熟。

2.3 基因枪介导结缕草的遗传转化

由于基因枪法既避免了原生质体再生培养的困难,又克服了农杆菌的宿主限制,受体材料广泛,因此问世后得到广泛应用。到目前为止,基因枪法已在多种冷季型(cool-season type)和暖季型(warm-season type)草坪草的基因转化中获得成功^[17]。但目前通过基因枪转化结缕草成功获得转基因植株的报道极少^[23]。

尽管原生质体转化法、基因枪转化法和农杆菌转化法在结缕草遗传转化中都有报道,但都只是处于摸索、建立与优化遗传转化体系。导入的外源基因都是报告或标记筛选基因,导入重要功能基因的研究还有待于开展。其中农杆菌介导转化法具有其很大的优势,不仅操作简单、设备便宜、转化频率高等,且外源基因在植物基因组中插入的片段多为单拷贝,很少出现共抑制现象和外源基因表达沉默,遗传稳定性好。农杆菌介导法很有可能成为结缕草遗传转化的主要方法,将通过基因工程育种培育出抗逆、优质和绿色期延长的结缕草新品系(种)。

2.4 结缕草遗传转化中应注意的问题

结合作者本人工作及实验室的工作,提出以下

问题,以引起注意:

(1) 转化受体的选择:无论是原生质体转化法、农杆菌介导法,还是基因枪法,获得转化再生植株的关键是选择适宜的转化受体,特别是转化受体的状态直接影响转化效果。本实验室采用高频再生胚性愈伤系作为转化受体,在筛选过程中采取多轮逐步加大筛选压的策略;在分化过程中筛选压对植株再生影响较大,采取先无后有,先低后高的措施对提高转化效率有明显作用。

(2) 在遗传转化中基因型是一个非常值得重视的问题:因为由不同基因型获得的转基因植株在分子或表型的差异,是由基因插入造成的,还是由不同基因型引起的,不能解释清楚。目前以建立同一基因型的胚性愈伤系来解决这一问题^[24]。如在选择外植体时,注重外植体基因型的一致性,就可避免在遗传操作中由组培外植体基因型不同而造成的麻烦。

(3) 外源功能基因的选择:根据结缕草的利用和分布,因地制宜确定育种目标,选择合适的外源基因,比如针对病虫害,选择几丁质酶基因等;选择CBF/DREB1、eF5-A等类型转录因子转化,不仅可以培育出抗旱、抗寒性增强,还可改变株型、延长绿色期,是比较理想的外源目标基因。同时应用反义抑制或RNAi技术对结缕草绿色期进行表达调控研究,或导入提高光合效率关键酶基因等都有助于创制出新的结缕草种质。

综上所述,结缕草转基因研究还处于转化体系建立和优化阶段,但基因转移和重组技术在结缕草的遗传改良研究中已显示出巨大的应用潜力。

3 生物技术在结缕草基因资源研究方面的应用

由于结缕草具有兼性繁殖、雌蕊先熟和种间杂交可育等生物学特性,导致天然种间杂种的普遍存在和丰富的遗传变异,形态种的确定非常困难^[25-27]。这给育种工作造成一定的困难。生物技术的发展和应用,为结缕草种质资源研究和新品种培育提供了有力的手段。

3.1 在种质资源研究方面的应用

种质资源的评价和筛选研究是种质创新和培育新品种的基础。目前,美国、日本、韩国等都在结缕草种质资源方面加大研究力度。研究者们从形态^[26]、蛋白^[28]和分子^[29-35]3个不同层次对日本、中华、细叶和大穗等不同种、不同种质的结缕草进行

了初步研究。虽然分子标记技术在农作物种质资源方面得到广泛而深入应用,但由于整个草坪业研究水平的滞后以及结缕草等草坪草资源一直得不到足够的重视,分子标记技术很晚才应用在结缕草资源研究上。首先日本学者 Choi Joon Soo 等用 RAPD 技术成功地鉴定出结缕草的 5 个种、58 个生态型^[29];并将从形态上很难区分的中华结缕草与大穗结缕草,用 RAPD (random amplified polymorphism DNA, 随机扩增多态性 DNA) 技术对其进行了成功分析^[30]。Weaver 等用 DAF 法 (DNA amplification fingerprinting, DNA 扩增产物指纹分析) 鉴定了 8 个结缕草品种^[31]。Yaneshita 等用 RFLP 法 (restriction fragment length polymorphism, 限制性内切酶片段长度多态性) 分析,将 5 种结缕草分成 3 组^[32];并采用叶绿素 DNA、细胞核 DNA RFLP 分析将形态上难以区分的材料划归不同种,特别是对大穗结缕草和日本结缕草、日本结缕草和沟叶结缕草以及日本结缕草和中华结缕草间的天然杂种进行了区分^[33]。这些研究解决了结缕草属内不同种、杂交种和品种间存在混乱、亲缘关系不清的问题,为结缕草新品种的培育奠定了基础。

3.2 在结缕草遗传图谱构建等方面的应用

了解结缕草染色体组背景对结缕草遗传图谱构建、基因操作等具有重要作用。最早报道结缕草的染色体数 $2n = 4x = 40$ ^[27],而且基于 RFLP 分析表明,结缕草是异源四倍体^[34]。Ebina 等利用 AFLP (amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 和 Yaneshita 等用 RFLP 技术分别构建了日本结缕草和沟叶结缕草杂交种的分子遗传图谱^[34,35]。2004 年 Cai 等利用无性系自交后代群体构建了日本结缕草 AFLP 遗传图谱^[36]。但报道的连锁群数 (the number of linkage groups) 均不同,而且不符合结缕草染色体数 $n = 20$ 。Cai 等指出,结缕草为异花授粉植物,且染色体数较多,构建高密度连锁图谱比较困难;RFLPs 和 SSRs (simple sequence repeats) 共显性分子标记 (co-dominant marker) 可使该图谱更加精细^[36]。尽管如此,这些分子标记的发展和连锁图谱的构建,对结缕草的分类、分子标记辅助育种和基因克隆等仍具有重要指导意义。

3.3 在基因标记定位和克隆等方面的应用

结缕草属植物具有耐盐性^[37],研究表明,主要是通过叶片上盐腺分泌 Na^+ 和积累可溶性甘氨酸甜菜碱来减轻盐害^[38],定位和克隆结缕草耐盐基因是研究者的期望。根据发展起来的 RFLPs 和 AFLPs

分子标记,日本学者 Kiyosada^[39] 等对结缕草耐盐数量性状位点 (QTL) 进行了分析,通过同源基因序列分离克隆到细叶结缕草耐盐基因 *BADH* (betaine aldehyde dehydrogenase, 甜菜碱脱氢酶基因) (Genbank 登录号: AB161712),并将耐盐基因 *BADH* 和 *FAD* (fatty acid desaturase, 脂肪酸脱饱和酶基因) 的 RFLPs 分子标记整合到 AFLP 遗传连锁图谱上,为进一步寻找和克隆结缕草耐盐主效基因打下了基础。

日本结缕草和沟叶结缕草在形态和抗寒性等方面差异较大, Makoto 等根据其杂交后代在叶宽、叶长、根茎结节长、秋季叶色和抗寒性等方面的分离情况,对这些性状进行了 QTL 分析,发现叶片宽度是该属植物分类的一个关键指标^[40]。Yaneshita^[41] 根据一个种间杂种 Miyako (*Z. japonica* × *Z. matrella*) RFLP 的连锁图,鉴定出与结缕草冬季叶片色泽有关的数量性状位点。日本结缕草的耐寒性明显优于沟叶结缕草^[36],研究表明,在低温下日本结缕草具有较强的光合能力^[42,43]。最近, Nomura 等从日本结缕草中克隆了一个编码 C_4 循环关键酶 PCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase, 磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶) 的基因,该基因全长 7 kB,该基因在日本结缕草维管束鞘中表达;并克隆了 *ZjPck* 基因的特异性启动子,在 C_3 植物水稻中进行特异性表达研究^[44]。绿色期是制约结缕草广泛应用的限制因素之一,培育冬季保持绿色的结缕草新品种 (系) 是结缕草育种的主要目标。目前许多衰老诱导叶绿素降解基因被克隆,在 Genbank 中查询发现,韩国 Paek 等在日本结缕草中克隆出衰老诱导的叶绿体持绿基因 (senescence-inducible chloroplast stay-green protein gene, SGR) (Genbank 登录号: AY850154)。在此研究基础上可通过基因工程技术反义抑制叶绿素降解基因或过量表达叶绿体持绿基因,进而培育出冬季保持绿色的结缕草新品种 (系)。

4 问题与展望

随着分子生物学和草坪业的发展,最近几年对结缕草生物技术方面的研究取得了重要进展。尽管如此,与其它农作物相比,草坪草生物技术方面的研究比较滞后;与美国、日本、韩国等相比,我国对结缕草生物技术研究基本属于空白,应该加强这方面的研究力度和深度。针对目前结缕草研究现状,提出结缕草生物技术研究方面存在的问题并进行展望。

4.1 建立结缕草稳定、高效再生体系

建立稳定、高效再生体系是结缕草基因工程的前提。虽然结缕草组培再生体系已取得了一定进展,但稳定、高效组培再生体系的获得仍存在一定困难,特别是高频再生愈伤系的保存技术还未获得突破,成为发展稳定、高频再生体系的瓶颈。对于再生能力较高的愈伤系除了采用超低温保存技术外,还可探索愈伤组织与组培苗无性系反复诱导的方式以保持愈伤组织的高频再生能力。

4.2 完善结缕草遗传转化研究

目前已成功将一些标记基因或报告基因,如 *hpt*、*bar*、*gus* 等导入结缕草,特别是农杆菌介导的转化技术在结缕草转基因研究中显示出巨大的优势。如果将耐寒、抗病等重要功能基因导入坪用价值较高的草坪草品种(系)中,有望培育出优质高抗的结缕草新品种(系)。据目前研究报道,利用转录因子来改良植物的抗病性、抗逆性和改变株型,能获得较为理想的效果^[45];而且通过 antisense(反义抑制)或 RNAi 技术抑制叶绿素降解基因,或正义表达新克隆的持绿基因,有可能培育出绿色期延长且坪用价值优良的结缕草新品系(种)。

4.3 加强结缕草基因资源的研究

结缕草是我国的特色资源,携带有抗旱、耐盐和高光效等重要基因。尽管近年来开展了一些种质资源方面的研究工作,但深度和广度不够。挖掘和鉴定具有重要性状的种质资源,并对其进行遗传分析,建立作图群体,是进行基因分离和克隆的前提。分子标记技术(RAPD、RFLP 和 AFLP)已在结缕草种质资源研究上应用,但目前还需发展 SSR、EST-SSR 或 ISSR 标记。利用这些标记在研究结缕草资源的起源进化、基因多样性和遗传图谱等方面具有巨大的优越性^[36]。

参考文献:

- [1] 董厚德, 宫丽君. 中国结缕草生态学及其资源开发与应用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2001.
- [2] 刘建秀, 贺善安, 刘永东. 华东地区暖地型草坪草特征特性及其经济价值 [J]. 中国草地, 1997(4): 62-66, 78.
- [3] Lee L. Turfgrass biotechnology [J]. *Plant Sci*, 1996, 115(1): 1-8.
- [4] 李瑞芬, 张敬原, 赵茂林. 结缕草愈伤组织诱导及植株再生 [J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 355-357.
- [5] Chai M L, Lee J M, Kim D H. High efficiency of plant regeneration from seed-derived callus of zoysiagrass cv. Zenith [J]. *Kor Turfgrass Sci*, 1998, 12(4): 195-202.
- [6] Rim Y W, Kim K Y, Choi G J. Callus induction and plant regeneration from seeds of *Zoysia japonica* Steud [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 2001, 21(2): 49-52.
- [7] Asano Y, Katsumoto H, Inokuma C, Kaneko S, Ito Y, Fujiie A. Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud [J]. *Plant Physiol*, 1996, 149(3-4): 413-417.
- [8] Inokuma C, Sugiura K, Cho C, Okawara R, Kaneko S. Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15(12): 737-741.
- [9] AL-Khayri, Huang F H, Thompson L F, King J W. Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus [J]. *Crop Sci*, 1989, 29: 1324-1325.
- [10] Asano Y. Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8(3): 141-143.
- [11] Toyama Koichi, Bae C H, Seo M S, Song I J, Lim Y P, Song P S, Lee H Y. Overcoming of barriers to transformation in monocot plants [J]. *J Plant Biotech*, 2002, 4(4): 135-141.
- [12] Noh H Y, Park G H, Choi J S, Ahn B J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) [J]. *In Vitro*, 1992, 28: 3.
- [13] Noh H Y, Choi J S, Ahn B J. Plant regeneration through somatic embryogenesis in zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 1995, 36(4): 582-587.
- [14] Yoo Y K, Kim K S. Effects of plant growth regulators on callus formation and organogenesis from shoot tip cultures of five turfgrass species [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 1991, 32(2): 237-246.
- [15] 柴明良, 钮友民, 郭达初. 结缕草试管增殖与筛选 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(3): 205.
- [16] 玄松南, 陈惠哲, 傅亚萍, 陈红青, 孙宗修. 两种草坪草愈伤组织的诱导及其分化研究 [J]. 浙江农业学报, 1997, 9(6): 295-299.
- [17] Chai B L, Mariam B S. Application of biotechnology in turfgrass genetic improvement [J]. *Crop Sci*, 1998, 38: 1320-1338.
- [18] Inokuma C, Sugiura K, Imaizumi N, Cho C. Transgenic Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) plants regenerated from protoplasts [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17(5): 334-338.
- [19] Gould J, Devery M, Hasegawa O, Ulian E C, Peterson G, Smith R H. Transformation of *Zea mays* L., using *Agrobacterium tumefaciens* and shoot apex [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 426-434.
- [20] Chai M L, Kim D H. *Agrobacterium*-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*) [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 2000, 41(5): 455-458.
- [21] Rahman S M L, Ebina M, Nakagawa H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transformation of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) [A]. Pant & Animal Genome VIII Conference. 2000, January 9-12 [C]. <http://www.intl-pag.org/8/abstracts/pag8824.html>.
- [22] Toyama K, Bae C H, Kang J G, Lim Y P, Adachi T, Riu K Z, Song P S, Lee H Y. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass

- Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Mol cells*, 2003, 16 (1): 19-27.
- [23] Ahn B J, Lee E A. Particle bombardment-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*). Annual Meeting of Korean Society of Plant Tissue Culture and Joint Workshop for Plant Biotechnology between Korea and Israel [C]. Seoul: Seoul National University Press, 1998. 35.
- [24] Li L, Qu R. Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(6): 403-407.
- [25] Hongkue, Hyon Y, Do Y. Studies on interspecific hybridization in Korean awngrass (*Zoysia* spp.) [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 1985, 26(2): 169-178.
- [26] Choi J S, Ahn B J, Yang G M. Distribution of native zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) in the south and west coastal regions of Korea and classification using morphological characteristics [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 1997, 38(4): 399-407.
- [27] Forbes I J. Chromosome number and hybrids in *Zoysia* [J]. *J Agron*, 1952, 44: 147-151.
- [28] Weng R X, Chen Y C, Liao T C. Study on esterase isoenzymes of *Zoysia* spp. [J]. *Grassl China*, 1996, 1: 56-66.
- [29] Choi J S, Yang G M. PCR conditions for effective identification of Korean native zoysiagrass (*Zoysia* spp.) species by DNA polymorphism [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 1996, 37(1): 166-170.
- [30] Choi J S, Ahn B J, Yang G M. Classification of zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) native to the southwest coastal regions of Korea using RAPDs [J]. *J Kor Soci Hort Sci*, 1997, 38(6): 789-795.
- [31] Callahan L M, Weaver K, Caetano-Anollés G, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA fingerprinting of turfgrasses [J]. *Int Turfgrass Soc Res J*, 1993: 761-767.
- [32] Yaneshita M. Genetic characterization of zoysiagrasses by RFLP nuclear DNA [J]. *Int Turfgrass Soc Res J*, 1993, 7: 786-794.
- [33] Yaneshita M, Nagasawa R, Engelke M C. Genetic variation and interspecific hybridization among nature all populations of zoysiagrasses detected by RFLP analyses of chloroplast and nuclear DNA [J]. *Genes and Genetic Sys*, 1997, 72(4): 173-179.
- [34] Yaneshita M, Kaneko S, Sasakuma T. Allotetraploidy of *Zoysia* species with $2n = 40$ based on a RFLP genetic map [J]. *Theor Appl Genet*. 1999, 98 (5): 751-756.
- [35] Ebina M, Kobayashi M, Kasuga S, Araya H, Nakagawa H. An AFLP based genome map of zoysiagrass [A]. Plant and Animal Genome VII Conference. 1999, Jan. 17-21 [C]. <http://www.intl-pag.org/7/abstracts/pag7654.html>.
- [36] Cai H, Inoue M, Yuyama N, Nakayama S. An AFLP-based linkage map of zoysiagrass (*Zoysia japonica*) [J]. *Plant Breeding*, 2004, 123(6): 543-548.
- [37] Marcum K B, Sharon J, Anderson, Engelke M C. Salt gland ion secretion: A salinity tolerance mechanism among five zoysiagrass species [J]. *Crop Sci*, 1998, 38: 806-810.
- [38] Marcum K B. Salinity tolerance mechanisms of grasses in the subfamily chloridoideae [J]. *Crop Sci*, 1999, 39: 1153-1160.
- [39] Kiyosada H, Masumi E, Hideki O, Sugita S I. Cloning and linkage analysis of salt tolerance gene in zoysiagrass [A]. Plant and Animal Genome VII Conference. 1999, Jan. 17-21 [C]. <http://www.intl-pag.org/7/abstracts/pag7083.html>.
- [40] Makoto K, Yoshiro T, Masumi E, Nakagawa H. QTL analysis in zoysiagrass: Morphological and physiological characteristics [A]. Plant and Animal Genome VIII Conference. 2000, Jan. 17-21 [C]. <http://www.intl-pag.org/8/abstracts/pag8823.html>.
- [41] Yaneshita M, Kaneko S, Sasakuma T. Genetic analysis of the winter leaf-colour of *Zoysia* spp. facilitated by molecular markers [J]. *Int Turfgrass Soc Res J*, 1997, 8: 401-411.
- [42] Matsuba K, Imaizumi N, Kaneko S, Sanejima M, Ohsugi R. Photosynthetic responses to temperature of phosphoenolpyruvate carboxykinase type C₄ species differing in cold sensitivity [J]. *Plant Cell Environ*, 1997, 20(2): 268-274.
- [43] Okawara R, Kaneko S. Effect of low growth temperature on photosynthetic O₂ evolution and chlorophyll fluorescence in zoysiagrasses [J]. *Grassland Sci*, 1997, 12: 294-298.
- [44] Nomura M, Higuchi T, Ishida Y, Ohta S, Komari T, Imaizumi N, Tokutomi M, Matsuoka M, Tajima S. Differential expression pattern of C₄ bundle sheath expression genes in rice, a C₃ plant [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 754-761.
- [45] 杨致荣, 王兴春, 李西明, 杨长登. 高等植物转录因子的研究进展 [J]. *遗传*, 2004, 26(3): 403-408.