

白三叶转基因及其生态适应性研究进展

赵桂琴^{1, 2}, 王锁民³, 任继周³

(1. 兰州大学生命学院, 兰州 730020; 2. 甘肃农业大学草业学院, 兰州 730070; 3. 兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020)

摘要:牧草基因工程是近年来国内国际研究的热点之一, 白三叶作为温带地区优良的豆科牧草, 是人工草地建植的首选草种, 也是各类观赏性草坪和绿地的主要组分。但白三叶的生态幅较窄, 适宜在温暖(适宜生长温度为 19~24℃)湿润、年降雨量 700~1000mm 的地区生长, 对土壤酸碱度的要求比较严, 适宜的土壤 pH 为 6~7, 耐酸性和耐盐碱能力都比较差, 从而限制了其在许多地区的应用。利用转基因手段提高其抗逆性和生态适应性, 培育抗性强、适应性广的白三叶新品种, 对我国尤其是北方畜牧业、草坪业和生态建设都具有重要意义。在提高其对生物胁迫和非生物胁迫的抗性和生态适应性方面, 白三叶的转基因研究已经取得了较大进展。结合国内外白三叶基因工程及生态适应性研究动态, 系统介绍了白三叶转基因研究的主要内容和方法, 在对已有成果进行综合分析的基础上, 就目前白三叶转基因和生态适应性研究中亟待解决的一些问题进行了探讨。

关键词:白三叶; 转基因; 生态适应性

Research progress on genetic transformation and ecological adaptability in white clover

ZHAO Gui-Qin^{1, 2}, WANG Suo-Min³, REN Ji-Zhou³ (1. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730020; 2. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070; 3. College of Pastoral Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 592~598.

Abstract: Forage gene engineering is one of the hotspots attracting both national and international attention recently. As an excellent legume in temperate region, white clover is the first choice in artificial grassland establishment, as well as all kinds of ornamental turf and green land. However, White clover has a narrow ecological amplitude, and only adapts to warm and humid environment. The desirable growth temperature is 19~24℃, with 700~1000mm annual mean precipitation. It has a strict require for soil pH, the appropriate soil pH for white clover is 6~7. The acid and salinity tolerance of white clover is quite weak, which limits its application and extension in many regions, especially in northern China. So it is significant to improve its stress resistance and ecological adaptability by means of gene transformation, breed new cultivars and varieties for animal husbandry, turf industry and ecological construction in northern regions. The genetic transformation of white clover has made great progress in improving its resistance to biotic and abiotic stresses, as well as ecological adaptability. Interest genes including NPTII, WCMV coat protein gene, GUS, Bar, AMV coat protein gene, CryIBa, CYVV coat protein gene, pea albumin 1, 10kDa maize zein seed storage protein gene, potato proteinase inhibitor II and others have been introduced into white clover, transgenic plants have been released. In this paper, the main subjects and methodology in genetic transformation of white clover are reviewed in detail. Some emergent questions are presented and discussed on the base of comprehensive analysis in genetic transformation and ecological adaptability progress.

Key words: white clover; genetic transformation; ecological adaptability

文章编号: 1000-0933(2004)03-0592-07 中图分类号: S541 文献标识码: A

白三叶(*Trifolium repens* L.) 是一种多年生豆科牧草, 是许多温带混播草地的重要组分, 在新西兰、英国、澳大利亚、丹麦、美国及爱尔兰等地白三叶一般与禾本科牧草混播, 为家畜提供优质廉价的饲草。白三叶在耐牧性及竞争力等方面都优于其它豆

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270947)

收稿日期: 2003-09-23; 修订日期: 2003-12-28

作者简介: 赵桂琴(1970~), 女, 甘肃天水人, 博士, 副教授, 主要从事牧草遗传育种和种质资源研究。E-mail: zhaoguiqin@hotmail.com

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30270947)

Received date: 2003-09-23 Accepted date: 2003-12-28

Biography: ZHAO Gui-Qin, Ph. D., Assistant professor, mainly engaged in forage breeding and germplasm. E-mail: zhaoguiqin@hotmail.com

科牧草^[1]。在集约化程度较高的人工草地上,白三叶 1a 可以固定 380kg/hm²的氮^[2],为禾草的生长提供养分。白三叶在夏秋季节的生长迟于许多温带禾草,正好与之互补,可以提供比较均衡而有营养的饲草。白三叶在家畜瘤胃中比禾草更易降解,因而消化率和吸收率都比较高。与多年生黑麦草相比,白三叶的粗蛋白含量与可消化碳水化合物含量都比较高^[3],对家畜活重的增加具有重要意义。另外,由于白三叶匍匐生长、扩展能力强、再生速度快等习性,使其成为温带地区观赏性草坪和绿地建植的主要草种,在国内外城镇绿化、水土保持等方面起着不可替代的重要作用。但是白三叶生态幅较窄,性喜温暖湿润的气候,不耐干旱、盐碱和长期积水,耐酸性也较差,限制了其在我国北方和南方一些地区的使用,因此,采用传统育种和转基因育种等手段,改善白三叶的抗旱耐热、耐寒、耐酸、耐盐碱等性状,提高其抗逆性和生态适应性,扩大其在南北方地区的种植面积,提高其与禾草的相互作用及在混播草地上的稳定性,是当前国内外白三叶育种和改良的主要目标。

白三叶是四倍体($2n=4x=32$)异花授粉植物,异交率很高,而且自交不亲和,在许多基因位点上都是杂合的,群体内变异非常大,一般适于培育综合品种。不仅可以将优良的农艺性状积累起来,而且保持了一定程度的杂合性,避免了近交引起的衰退现象^[4]。白三叶可以通过匍匐茎进行无性繁殖,也可通过种子进行有性繁殖。在灌溉或水分充足的地区主要进行无性繁殖;在有季节性干旱的地区,种子的萌发生长对维持白三叶在草丛中的稳定性就显得至关重要。其他育种目标主要包括抗病性、抗虫性、对低磷土壤的耐受性以及品质等方面。白三叶和苜蓿一样,单独青饲容易引起鼓胀病。

白三叶育种已经有 80 多年的历史^[5],在这期间主要是通过严格的选择来提高青草产量。但有些重要的育种目标是难以达到的,如白三叶对病毒性病害的抗性,对其产量、固氮能力、种子生产及稳定性都有非常大的影响。白三叶对苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus)有一定的抗性^[6],但对白三叶花叶病毒(White clover mosaic virus)则高度感染。其他病毒如三叶草黄脉病毒(Clover yellow vein virus)、花生矮化病毒(Peanut stunt virus)等都对白三叶的产量有较为严重的影响。这些育种目标是常规育种很难达到的,因此人们逐渐转向转基因育种,希望通过获得抗病毒转基因植株,提高其对各种生态环境的适应性来减少损失。1993 年,Beck 等人^[7]用白三叶花叶病毒的外壳蛋白基因对烟草进行了遗传转化,获得了抗性植株,为通过转基因手段培育抗病毒白三叶新品种带来了希望。

虫害对白三叶产量和品质的影响也很大,是限制其生态适应性的一个重要因素。白三叶的抗虫性也可以通过转基因手段得到提高,其虫害因各国生态环境不同而异。白三叶在许多地方是引进牧草,近年来建植的白三叶人工草地为一些地方性害虫提供了食物来源。在新西兰,当地 Hepialid moths (*Wiseana* spp.) 和 Scarab beetle (*Costelytra zealandica*) 危害非常严重,由于很难找到抵抗这些病虫害的白三叶种质资源,人们开始寻找能够在转基因植株中表达的抗虫基因^[8],提高其在当地的适应性。目前已经发现许多蛋白酶抑制剂和 Bt 内毒素基因都有这种功能,它们通过破坏昆虫细胞膜透性和抑制外源蛋白质水解来破坏昆虫的正常生长发育,从而达到抗虫的目的。

与其他许多豆科牧草一样,白三叶在可利用磷含量低的土壤上会减产,在混播草地中的稳定性也会随之降低^[9,10]。通过遗传转化可以改变白三叶中磷的转运功能或调解根系结构来增加对磷的吸收利用。还可以用转基因手段来提高白三叶的营养价值。白三叶是放牧家畜良好的蛋白质饲料,但在瘤胃中消化时许多蛋白质都被浪费了。反刍动物单独饲喂白三叶不能给瘤胃提供足够的能量来进行消化。瘤胃微生物需要用饲料消化后产生的氨基酸来首先完成碳的代谢而不是合成微生物蛋白质。而瘤胃中合成的微生物蛋白质又是反刍动物代谢中氨基酸的主要来源,因此,如果微生物没有足够的能量将植物转化成蛋白质,就会造成氮的浪费,而且会降低动物代谢中必须氨基酸的利用率。所以,当反刍动物从日粮中获取了充足的蛋白质,必须氨基酸如甲硫氨酸的含量将会低于动物最佳生长或繁殖所需的水平。在这种情况下,可以通过提高瘤胃中难于降解而在小肠中易于降解吸收的蛋白质含量,或提高饲料中可溶性碳水化合物的含量来改善白三叶的转化效率^[11]。另一种办法是引入多酚(如浓缩单宁)的生物合成基因,浓缩单宁可与蛋白质结合防止鼓胀病的发生^[12]。

转基因白三叶新品种可以通过开放授粉和综合品种等手段进行培育,将单个显性基因导入白三叶并使其以适当的水平表达,而在其它位点上仍保持其杂种优势和遗传多样性水平。通过改良个别性状获得保持一定杂合程度的转基因白三叶新品种,从根本上提高其生态适应性。

1 白三叶的遗传转化

1.1 转化背景

白三叶遗传转化方面的研究总结于表 1。白三叶的基因型对未分化的愈伤组织、原生质体和悬浮培养的再生性能影响非常大^[13,14],克服这一困难的方法之一是选择再生频率高的基因型。但白三叶种质资源中这种基因型非常稀少,在许多群体中还不足 1%,而且这种基因型一般既没有优良的农艺性状,也不能代表其品种的特征。鉴于此,许多转化体系都采用未成熟的杂合胚或成熟种子的子叶作转化受体^[15]。萌动的种子子叶柄在含有 NAA 和 BAP 的培养基上很容易由单个表皮细胞形成芽。这种转化体系中再生性能似乎与基因型关系不大,而且形成的植株正常可育。另一个优点是再生植株从组培开始 8~9 周即可在土壤中定植,而细胞培养则需 6~9 个月。

表 1 农杆菌介导的白三叶转化举例

载体类型 Vector	培养方法 Culture method	观测结果 Observations	参考文献 Reference
pBin19/A. t. , 菌株 LBA4404, 卡拉霉素选择抗性	外植体用匍匐茎;由愈伤组织形成芽	需要再生频率高的基因型,获得转基因植株需 6~9 个月	[16]
pROK 衍生 pROK-2-CP/A. t. ,菌株 LBA4404, 卡拉霉素选择抗性	同上	同上	[17]
pGA492 衍生 pGO36392/A. t. 菌株 LBA4404,卡拉霉素选择抗性	同上	同上	[18]
pPE64/A. t. , 菌株 LBA4404, 卡拉霉素选择抗性	萌发 3 天的子叶通过器官再生途径形成芽。	大多数品种都适用,8~9 周即可定植,转化率(成苗的转基因植株与处理子叶的百分比)为 1%	[19~21]
TAB10 衍生的 JJ430/A. t. , 菌株 AGL1, 除草剂选择抗性	吸胀种子的子叶通过器官再生途径形成芽。	转化率为 50%	[22]
TAB10 衍生的 CP001/A. t. 菌株 AGL1, 除草剂选择抗性	同上		[23]
pKLX71;35S2 与 AMV4 结合,菌株 AGL1, 卡拉霉素选择抗性	同上		[24]
TAB10/A. t. , 菌株 AGL1, 除草剂选择抗性	同上	7.4%	[25]
pLHWM1/A. t. 菌株 AGL1, 壮观霉素选择抗性	同上	10%	[25]
pKLX71;35S2 与 WCMV4 结合,菌株 AGL1, 卡拉霉素选择抗性	同上	5%	[26]
Pbin19 衍生的 pBincits /A. t. , 菌株 AGL1, 卡拉霉素选择抗性	同上		[27]
PGV1103G/A. t. 菌株 3850,卡拉霉素选择抗性	未成熟胚	10%~20%	[28]
PCGP257/A. t. ,菌株 CZ707, 卡拉霉素选择抗性	未成熟胚	5%	[28]
pKP/A. t 菌株,AGL1, 卡拉霉素选择抗性	吸胀种子的子叶通过器官再生途径形成芽。		[29]
pSTU134/A. t. 菌株 AGL1, 卡拉霉素选择抗性	吸胀种子的子叶通过器官再生途径形成芽。		[29]

农杆菌介导的遗传转化广泛用于白三叶。1987 年 White 和 Greenwood 首次将白三叶品种 WR8 的匍匐茎用含有双元载体的农杆菌进行了转化,用卡拉霉素做选择标记获得了转化体^[16]。这一方法后来被 Ealing 和 Voisey 等人成功用于白三叶外源基因的导入。但是转化率较低,而且组培时间较长。后来又对其进行了改进,即用萌发 3d 的种子直接作转化受体,CaMV35S 作启动子,新霉素磷酸转移酶基因 (nptII) 作选择标记,GUS 作报告基因,通过农杆菌介导对两个品种 Grassland Huia 和 Grassland Tahora 进行了遗传转化^[18,19]。Larkin 等人 1996 年又对这一方法作了部分调整,用吸胀的成熟种子作转化受体,bar 基因作选择标记,通过农杆菌对 Haifa, Grassland Kopa 和 Waverley 等品种进行了转化^[22]。尽管这两种方法在培养基成分、双元载体种类、农杆菌菌株等方面有所不同,但其基本原理都是一样的。

1.2 转化过程

1.2.1 实验材料 种子消毒 目前广泛采用的种子消毒方有 3 种,一种是将种子用平纹布包好,放在 4.5% 的次氯酸钠溶液中搅拌 15min,用水冲洗 10~12h 后,取出种子放入培养皿,用 6% 过氧化氢覆盖 5min,用去离子水冲洗 4 次,过夜吸胀后进行切割,再在 26℃、光照 16h 的条件下培养。另一种方法是先用自来水冲洗种子 5min,70% 酒精处理 5min,再用 1.5% 的次氯酸钠搅拌消毒 55~60min,去离子水冲洗 8 次后在 10℃ 下过夜,吸胀后即可进行切割。第 3 种方法是用升汞代替第 2 种方法的次氯酸钠,0.1% 的升汞处理 7~8min 后,再用去离子水冲洗。

外植体准备 白三叶的遗传转化普遍采用子叶作转化受体,既可以直接用吸胀的种子,也可以用萌发 3d 后的种子,在超净工作台上将下胚轴切去,再从两瓣子叶中间切开,将子叶及子叶柄用农杆菌菌液处理。也有人用下胚轴和叶圆片作转化受体。

1.2.2 接种与培养 农杆菌菌株一般采用章鱼碱型的 LBA4404 或 AGL1,它们都含有一个卸甲的 Ti 质粒和双元 T-DNA 载体。处理子叶的农杆菌浓度一般为 3×10^9 cells/ml,处理时间为 20~40min,然后用无菌滤纸除去子叶上多余的菌液,移至固体

培养基上进行共培养。共培养时间一般为 25℃ 下 3d。之后转入相应的分化培养基,经数次继代分化出芽。继代必须及时,培养时间过长会引起材料发生褐变,导致死亡。分化培养基大多采用 MS 系列,根据具体需要选择不同的生长素和细胞分裂素,诱导芽的生成。许多研究都用 BAP 和 NAA,或 BAP 和 Timentin,也有人采用 TDZ 和 NAA。但据报道 TDZ 会导致过多的芽生成,出现非转化体芽的频率增加。抗生素根据选择标记基因而异,目前应用最多的是卡拉霉素(选择标记基因为 nptII),浓度大多为 50~100mg/L。脱菌培养时一般采用羧苄青霉素(carbenicillin)、头孢霉素(cefotaxime)、羧喹吩青霉素(timentin)等脱菌抗生素来抑制农杆菌的生长,浓度一般为 250~500mg/L 左右。此外还可利用福平来抑制其他杂菌的生长,使用浓度一般为 20mg/L。芽生成后即可移至生根培养基上诱导生根,形成幼苗。

2 讨论

2.1 白三叶遗传转化的特点

近年来白三叶遗传转化的一个很明显的特点是采用成熟种子的子叶作转化受体(表 1),子叶柄基部很有利于器官发生,在生长素和细胞分裂素的共同作用下,子叶柄基部的细胞很容易形成芽^[15],能有效降低体细胞无性系变异的发生频率,而且能够加快组培速度,一般情况下幼芽培养 6 周就可生根,8~9 周即可在土壤中定植。

截至目前,农杆菌菌株和双元载体类型对白三叶转化效率的影响方面的报道还比较少,但选择标记基因对转化率的影响已经比较清楚了。用卡拉霉素作选择标记时,转化率一般为 1%~20%,但 Larkin 等人^[22]用 bar 基因和 PPT 除草剂基因作选择标记获得了 50%的转化率,PPT 的选择性非常严格,很快就能抑制非转化体的生长^[22]。卡拉霉素在选择的前两周很容易出现非转化体的芽,因此如果要获得较高的转化率,采用 PPT 较为理想。但如果要在田间检测转基因植株,PPT 的除草剂抗性就不大适用了,因为白三叶是异花授粉牧草,分布比较广泛,除草剂抗性基因很快就会通过授粉转移给野生白三叶群体。

2.2 目的基因拷贝数及其遗传

据 White 报道,用 Southern Hybridization 印迹杂交法对 150 株转基因白三叶进行拷贝数检测,结果表明,66%的植株都是单拷贝的。用 GUS 作目的基因获得的转化株与非转化株杂交 4 代后所得的资料表明,GUS 基因作为单个的显性基因遗传比较稳定^[12]。由于白三叶是异花授粉牧草,所以如何获得一个所有植株全为转化体的群体就显得非常重要。1998 年,Scott 等人用含有单个目的基因、表达水平适当的转基因白三叶与非转化体杂交,将 F₁ 代中含目的基因的个体隔离授粉产生 F₂ 代,F₂ 代中的转基因个体再与非转化体杂交以鉴定目的基因的纯合体,这些纯合体再经过多次杂交产生综合品种^[30]。通过这种方法,群体中每一个体都含有目的基因,同时也保持了其他许多基因位点上的杂种优势和遗传多样性。如果能在目的基因稳定的早期就开始杂交,加快育种进程,那么 5~7a 内就可完成从获得转化体到最后品种商品化的全过程。应该注意的是,不同品种遗传背景不同,对目的基因表达水平的影响也有差异,而且由于白三叶的异花授粉和高度的杂合性,有的品种还会出现隐性致死突变,从而影响目的基因的分离比例,使其发生偏离。

白三叶的许多遗传转化都要求目的基因在整个转基因植株体内都得到表达,而无组织特异性,这种情况下一般采用 1~2 个花椰菜花叶病毒 35S 启动子与目的基因结合。至今只有 3 种组织特异性启动子在转基因白三叶中得到检测。Larkin 等人用大豆 GH3 作启动子,GUS 作目的基因对白三叶进行遗传转化,在转化体的根、茎、叶、芽、花等组织中测定目的基因的表达程度,结果表明,GUS 基因在茎中表达活性最高。芽中的表达仅限于维管组织,根中的表达活性主要在木质部的薄壁组织和侧根的表皮细胞。给转基因植物加入生长素可提高 GUS 基因在根中的表达水平,但并不改变其表达模式^[22]。Pittock 等人用烟草的几丁质酶启动子将 GUS 基因导入白三叶中,目的基因的表达仅限于侧根的分生组织中。转基因植株叶片人为擦破或蚜虫损伤后可诱导目的基因在损伤部位的表达。用根瘤菌接种 2~4h 后也可以检测到其在根的内皮层细胞中的表达。另外,烟草的 RB7 水通道基因只在烟草根中表达,但用它作启动子转化白三叶时发现,它还可以在茎节和花的蜜腺中表达,说明同一个启动子在不同的转基因植物中可以有不同的表达模式^[23]。

2.3 转基因白三叶的应用

至今还没有转基因白三叶新品种商业化的报道,但在抗病和抗虫方面已经取得了较大的进展。Garrett 和 Chu 早在 1997 年就获得了表达苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus)外壳蛋白基因的转基因白三叶植株,目前正在澳大利亚进行田间抗病性的监测与评估,有望在 2005 年进行新品种的商品化生产^[24]。Dudas 和 Roger 也分别获得了抗白三叶花叶病毒(White clover mosaic virus)的转基因白三叶,正在评估其田间抗病性^[17,26]。Voisey 等人已将 Bt 抗虫基因转入白三叶,最初是想通过导入 CryIA/b Bt 基因使白三叶抵抗 Porina moth larvae,但由于目的基因表达水平太低而未能成功。为了克服这一困难,他们又用 CryIB 基因代替了 CryIA/b,并对 CryIB 进行修饰以提高其在白三叶体内的积累。用 CaMV35S 作启动子对白三叶进行转化,将获得的转基因植株饲喂 Porina moth larvae,结果表明转基因植株对其有较强的抗性^[20]。

3 白三叶的生态适应性

白三叶作为一种优良的温带豆科牧草,在人工草地、观赏性草坪和绿地的建植中发挥着举足轻重的作用,是欧洲、澳大利亚、新西兰等国家和地区建植人工草地的主要草种,一般与多年生黑麦草混播,为家畜提供优质全价的饲草。同时也广泛用于各类观赏性草坪和绿地的建植,在城镇绿化和水土保持方面具有重要意义。但其狭窄的生态幅和较弱的抗逆性限制了其进一步的推广应用。白三叶起源于地中海东部地区,我国四川、贵州、云南、广西等地均有野生种分布。在四川,白三叶大多分布于海拔 1000~3000m 的地带。白三叶适宜生长温度为 19~24℃,不耐干旱和长期积水,最适于生长在年降雨量为 700~1000mm 的地区^[37]。白三叶的耐荫性较强,适于在林间或树下生长。但耐盐碱性也比较差,最适宜的土壤 pH 值为 6~7,当 pH 值大于 8 时生长不良,因此北方盐碱地区建坪首先要改土。其耐酸性和耐热性都比鸭茅差,在我国南方酸性土壤上易发生铝中毒而表现不良。但 Smallwood 的研究表明,加拿大的白三叶品种能够在 pH=4.7 的土壤上正常生长^[38]。白三叶对土壤要求不严,但以壤质偏沙土壤为宜。拉丁诺白三叶在地下水位高或排水较差的粘土上也能正常生长。普遍认为白三叶抗寒性较弱,但陈宝书认为,白三叶抗寒性较强,在黑龙江中部和东部有雪覆盖的地方能安全越冬^[39]。为了提高其对不同生态环境的适应性,许多地区都采用引种的手段,引进各种白三叶品种在当地试种,以发现和筛选出适应性好的品种供进一步推广。我国曾引进十多个白三叶品种,在云南、贵州、四川、南京、甘肃、河北等地种植。除个别品种如胡依阿、拉丁诺之外,大多表现欠佳,生产性能低下,难以发挥较大的作用^[37,40,41]。地方品种贵州白三叶只适应当地的自然条件,很难进一步推广到其他地区^[37]。

在生物技术迅速发展的今天,转基因已成为提高植物抗逆性和生态适应性、改良品质的重要手段。白三叶转基因研究的目的主要是通过基因转移技术,将外源的各种有益基因转入白三叶,使其具备新的特性或品质,从而提高其适应各种生态环境的能力或饲用价值。目前,耐酸性土壤的白三叶转基因植株已经问世,Spangenberg 等人已将细菌的柠檬酸合成酶基因转入白三叶,在其根部分泌更多的柠檬酸来提高其对酸性环境的适应性,收到了良好的效果。转基因白三叶在 pH=4.9,铝浓度为 100μmol/L 的条件下仍能正常生长。在抗旱和耐盐碱方面,美国已将甜菜碱醛脱氢酶基因 BADH 和逆向转运蛋白基因 ANHX5 转入白三叶,从不同的机理入手改善白三叶适应干旱和盐碱的能力^[42]。白三叶的生态适应性将随着生态建设和生物技术的发展而得到进一步的提高。

4 结语

国际上早在 20 世纪 30 年代就已经开始了白三叶栽培育种、抗病性、混播特性等方面的研究,转基因工作也于 20 世纪 80 年代初逐步开展,各种转基因植株陆续问世。国内白三叶研究起步较晚,记者检索了近 20a 来有关白三叶的文献,共检索到 60 篇,其中绝大多数都是白三叶引种、适应性栽培、抗逆性等方面的文章^[37,40,41,43]。截至 2002 年,经我国牧草品种审定委员会审定登记的白三叶品种只有鄂牧 1 号、贵州白三叶、胡依阿、川引拉丁诺 4 个。适应地区均为我国南方的高海拔山地、长江中下游的低湿丘陵、平原地区。北方地区大面积的人工草地和草坪绿地几乎全部采用进口种子,有些由于不能适应当地的生态环境而表现欠佳。国内在白三叶育种和转基因方面的研究报道很少,只有 3 篇^[29,44,45],与国外的差距是显而易见的。这种现状远远不能满足国内迅速增长的畜牧业和草坪业的需要。白三叶作为温带地区混播人工草地和观赏性草坪建植的主要草种,将会随着我国畜牧业、养殖业和城镇绿化的迅速发展而发挥越来越重要的作用,国内白三叶的研究应注重其抗旱性、抗病性、耐盐碱性及持久性等方面的改良,提高其生态适应性,以利其在北方地区的推广和生产。

References:

[1] Fan J W. Study on white clover mixture characteristics. *Pratacultural Science*, 1995, **5**: 13~17.
[2] Rumbaugh W. Nitrogen fixation in pasture. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 1979, **7**: 7~9.
[3] Ulyatt M J. The feeding value of herbage. *Chemistry and biochemistry of herbage*, London: Academic press, 1973. 131~178.

表 2 导入白三叶的启动子或基因一览表

启动子或基因 Promoters/genes	参考文献 Reference
Nos nptII (卡拉霉素抗性)	[16]
CaMV35S WCMV 外壳蛋白	[17]
CaMV35S 豌豆白蛋白 1	[18]
CaMV35S nptII	[19]
CaMV35S gus	[19]
CaMV35S CryIAb	[20]
CaMV35S bar (PPT 抗性)	[22]
GH3 gus	[22]
FB7-1 gus	[23]
CaMV35S AMV 外壳蛋白	[24]
CaMV35S 10k Da 玉米种子醇溶蛋白	[31]
TobRB7 gus	[12]
CaMV35S CryIBa	[32]
CaMV35S 马铃薯蛋白酶抑制剂 II	[33]
CaMV35S 柠檬酸合成酶基因	[34]
CaMV35S CYVV 外壳蛋白	[35]
CaMV35S sacB	[29]
CaMV35S hph	[36]
SAG12 ipt	[36]
ATMYB32 ipt	[36]

- [4] Yun J F. *Forage and fodder breeding*. Beijing: China Agriculture Press, 2000. 123~127.
- [5] Woodfield D R and Caradus J R. Genetic improvement in white clover repressing six decades of plant breeding. *Crop Science*, 1994, **34** : 1205~1213.
- [6] Barnett O W and Gibson P B. Identification and prevalence of white clover viruses and the resistance of *Trifolium* species to these viruses. *Crop Science*, 1975, **15** : 32~37
- [7] Beck D L, Van Dolleweerd C J, Dudas B, *et al.* Coat protein-mediated protection against white clover mosaic virus and potato virus X in tobacco. In: *Proceeding of 17th international Grassland Congress*, Wellington: Palmerston North, 1993. 1173~1174.
- [8] White D W, Biggs D R, Voisey C R, *et al.* Development of plants resistant to insect pests using gene manipulation. In: Baker M J. *Grassland for our world*. Wellington: Springer, 1993. 366~368.
- [9] Bao G Z, Li X L, Fang C S. The effect of soil phosphorus concentration on white clover structure and energy distribution. *Acta Agrestia Sinica*, 2001, **4** : 34~38.
- [10] Wang G, Jiang W L. The relationship of community composition in artificial grassland with soil Nitrogen and Phosphorus. *Acta Agrestia Sinica*, 1995, **1**: 23~27.
- [11] Hancock K R, Ealing P M, White D W. Identification of sulphur-rich proteins which resist rumen degradation and are hydrolysed by intestinal proteases. *Br. J. Nutr.*, 1994, **72** : 855~863.
- [12] White D W. Potential of biotechnology to alter pasture yield and quality. In: Welch S A, Burns D, Prosser C. *Milk composition, production and biotechnology*. CAB International, Wallingford, 1997. 441~454.
- [13] White D W. Plant regeneration from long-term suspension cultures of white clover. *Planta*, 1995, **16** : 1~7.
- [14] Yamada T. Selection of highly-regenerative genotype of white clover and plant regeneration from protoplasts derived from this genotype. *Euphytica*, 1989, **44** : 181~186.
- [15] White D W and Voisey C R. prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover. *Plant Cell Rep.*, 1994, **13** : 303~308.
- [16] White D W and Greenwood D. Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. *Plant Mol. Biol.*, 1987, **8** : 461~469.
- [17] Dudas B, Forster R L, Dolleweerd C J, *et al.* Transformation of white clover with a gene encoding a white clover mosaic virus coat protein gene. In: *Proceeding of 17th international Grassland Congress*. Wellington: Palmerston North, 1993. 1040~1041.
- [18] Ealing P M, Hancock K R, White D W. expression of the pea albumin 1 gene in transgenic white clover and tobacco. *Transgenic Res.*, 1994, **3** : 344~354.
- [19] Voisey C R, White D W, Greenwood D, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.*, 1994a, **13** : 309~314.
- [20] Voisey C R, White D W, McGregor P G, *et al.* Transformation of white clover with Bt. genes. In: *Proceeding of 2nd Canberra Bacillus thuringiensis Meet*, CSIRO, Australia, 1994b. 75~83.
- [21] Voisey C R, Dudas B, Biggs R, *et al.* Transgenic pest and disease resistant white clover plant. In: Spangenberg G ed. *Molecular Breeding for Forage Crops*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 239~250.
- [22] Larkin P J, Gibson J M, Mathesius U, *et al.* Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter-GH3, in root gravitropism and lateral root development. *Transgenic Res.*, 1996, **5** : 325~335.
- [23] Pittock C, Weinman J J, Rolfe B G. the activity of a tobacco basic chitinase promoter in transgenic clover provides insights into plant development and symbiosis. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1997, **24** : 555~561.
- [24] Garrett R G, Chu P W. White clover expressing the coat protein of alfalfa mosaic virus: field trial issues. In: Mclean G D, Gibbs M J eds. *Commercialization of transgenic crops: risk, benefits and trade considerations*. Canberra: Cooperative Research Center for Plant Science and Bureau of Resources Sciences, 1997. 125~136.
- [25] Christiansen P and Gibson M. Transgenic *Trifolium repens* with foliage accumulating the high sulphur protein, sunflower seed albumin. *Transgenic Res.*, 2000, **9**: 103~113.
- [26] Kalla R and Spangenberg G. Molecular breeding of forage legumes for virus resistance. In: Spangenberg G, ed. *Molecular breeding of forage crops*, London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 219~239.
- [27] Duncan R and Carrow R. Molecular breeding for tolerance to abiotic and edaphic stresses in forage and turfgrass. In: Spangenberg G, ed. *Molecular breeding of forage crops*, London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 251~261.
- [28] Zhou J M. Studies on white clover gene transformation mediated by *A. tumefaciens* *Herbivore*, 1996, **1** : 44~47.
- [29] Lepage C, Madsen L, Liggett A, *et al.* Development of transgenic white clover expressing chimeric bacterial levansucrase genes for enhanced tolerance to drought stress. *The 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops*. London: Kluwer Academic

Publishers, 2000. 80~81.

[30] Scott A, Woodfield D, White D W. Allelic composition genetic background effects on transgene expression and inheritance in white clover. *Mol. Breed.*, 1998, **4**: 479~490.

[31] Sharma S B, Hancock K R, Ealing P M. Expression of a sulfur-rich maize seed storage protein, δ -zein, in white clover to improve forage quality. *Mol. Breed.*, 1998, **4**: 435~448.

[32] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, *et al.* Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceeding of National Academic Science of USA*, 1996, **88**: 3324~3328.

[33] Wang G L, Fang H J. *Plant gene engineering*. Beijing: Science Press, 2002. 204~267.

[34] Juan Manuel de la Fuente and Verenice Ramirez-Rodriguez. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, 1997, **276**: 1566~1568.

[35] Xiao X W, Chu P G, Frenkel M J, *et al.* Antibody-mediated improved resistance to CYVV and PVY infections in transgenic white clover plants expressing a single chain variable region antibody. *Molecular Breeding*, 2000, **6**: 421~431.

[36] Ludlow E, Lin Y H, Chalmers J, *et al.* Development of transgenic white clover with delayed leaf senescence. *The 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops*. London: Kluwer Academic Publishers, 2000. 83~84.

[37] Zhang X Q, Pu C L, Zhou S R, *et al.* The selection and cultivation of Ladino white clover. *China Grassland*, 1999, **2**: 21~25.

[38] Smallwood MF, Calvert CM, Bowles DJ eds. *Plant responses to environmental stress*. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd., 1999. 235~267.

[39] Chen B S ed. *Forage cultivation*. Beijing: China Agricultural Press, 2001. 223~227.

[40] Zhong S and Kui J X. The performance of three white clover varieties in Yunnan. *China Grassland*, 1999, **4**: 28~33.

[41] Su D B, Zhou H, Wang P, *et al.* The variation of white clover reproduction in degraded mixed artificial grassland. *Acta Agrestia Sinica*, 1998, **1**: 44~49.

[42] Winicov I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Ann. Bot.*, 1998, **82**: 703~710.

[43] Wu X J, Yang C W, He G M. The primary studies of ABA on drought resistance mechanism of white clover. *Hubei Animal Husbandry and Veterinary*, 1998, **2**: 12~17.

[44] Bao J Y, Li W J, Feng R H, *et al.* The first report of drought-resistant and hot-tolerant white clover breeding. *Acta Agrestia Sinica*, 1997, **1**: 7~11.

[45] Zhang D Y and Li J M. The callus induction and embryonic cell suspension establishment of red and white clover. *China Grassland*, 1999, **1**: 15~18.

参考文献:

[1] 樊江文. 白三叶的混播特性研究. *草业科学*, 1995, **5**: 13~17.

[4] 云锦凤. 牧草及饲料作物育种学. 北京: 农业出版社, 2000. 123~127.

[9] 包国章, 李向林, 房春生, 等. 土壤速效磷浓度对白三叶构型及能量分配的影响. *草地学报*, 2001, **4**: 34~38.

[10] 王刚, 蒋文兰. 人工草地群落组成与土壤中速效氮磷的关系. *草地学报*, 1995, **1**: 23~27.

[28] 周建明. 以农杆菌 (*A. tumerfaciens*) 为载体向白三叶 (*T. repens* L.) 细胞转导外源基因的研究. *草食家畜*, 1996, **1**: 44~47.

[33] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002. 204~267.

[37] 张新全, 蒲朝龙, 周寿荣, 等. 川引拉丁诺白三叶品种选育及栽培利用. *中国草地*, 1999, **2**: 21~25.

[39] 陈宝书主编. 牧草及饲料作物栽培学. 北京: 农业出版社, 2001. 223~227.

[40] 钟声, 奎嘉祥. 三个白三叶品种在云南的生长表现. *中国草地*, 1999, **4**: 28~33.

[41] 苏德毕力格, 周禾, 王培, 等. 退化混播人工草地白三叶繁殖特性的变化. *草地学报*, 1998, **1**: 44~49.

[43] 吴新江, 杨持武, 何光明. 脱落酸对白三叶抗旱作用机理的初步研究. *湖北畜牧兽医*, 1998, **2**: 12~17.

[44] 鲍健寅, 李维俊, 冯蕊华, 等. 抗旱耐热白三叶新品种选育初报. *草地学报*, 1997, **1**: 7~11.

[45] 张德炎, 李建民. 红三叶和白三叶愈伤组织的诱导和胚性细胞悬浮系的建立. *中国草地*, 1999, **1**: 15~18.