

DOI:10.11686/cyxb2023259

http://cyxb.magtech.com.cn

齐雯雯, 马红媛, 李亚晓, 等. 优质牧草新品种选育方法研究进展. 草业学报, 2024, 33(6): 187-202.

QI Wen-wen, MA Hong-yuan, LI Ya-xiao, *et al.* Progress in research on breeding methods to produce new, high-quality forage varieties. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(6): 187-202.

优质牧草新品种选育方法研究进展

齐雯雯^{1,2}, 马红媛^{1*}, 李亚晓¹, 杜艳³, 孙梦丹¹, 武海涛¹

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 吉林 长春 130102; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 作为草食家畜最优良和天然的饲料, 牧草是草食畜牧业发展的基础和保障, 是大食物观下重要的粮食资源。牧草新品种的选育是草业可持续发展的重要基础, 在促进畜产品稳产保供能力提升及草业高质量发展中起着重要作用。随着对优质牧草新品种需求增加, 牧草育种技术从常规育种手段进入分子育种时代, 牧草新品种培育取得重大突破。本研究对国内外近100年来的牧草育种技术进行了系统的综述, 包括驯化育种、杂交育种、诱变育种、倍性育种等常规育种技术, 转基因、分子设计育种等基因工程育种技术, 以及近年来发展起来的基因编辑技术, 同时阐述了不同育种技术取得的成就和存在的问题, 并对今后的牧草育种工作提出了以下展望: 1) 深入挖掘牧草自然资源, 加强种质资源收集利用; 2) 以需求为导向丰富牧草新品种的育种目标, 注重牧草品质的改良和抗性品种培育, 充分发挥牧草的生产、生态和生活等“三生”功能; 3) 将常规育种手段与现代生物技术相结合, 突破牧草育种瓶颈, 加强优质牧草特别是羊草和苜蓿等新品种选育。旨在推动我国进入生物育种新时代, 为牧草种质资源创新和优质牧草新品种选育提供参考, 为建立优质高产人工草地提供技术支持, 从而满足我国畜牧业日益增长的饲草需求。

关键词: 羊草; 苜蓿; 种质资源; 分子育种; 诱变育种; 细胞工程

Progress in research on breeding methods to produce new, high-quality forage varieties

QI Wen-wen^{1,2}, MA Hong-yuan^{1*}, LI Ya-xiao¹, DU Yan³, SUN Meng-dan¹, WU Hai-tao¹

1. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130102, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Abstract: Forage is the best natural feed for herbivorous livestock. Therefore, it is the basis and guarantee for the development of the herbivorous animal husbandry industry, and an important food resource as part of an all-encompassing approach to food. The breeding of new forage varieties is essential for the sustainable development of grass and animal husbandry industries. Forage plays important roles in promoting the stable production and supply of animal products. With the increasing demand for new high-quality forage varieties and the improvement of breeding techniques, forage breeding technology has entered the molecular era, and great breakthroughs have been made in the cultivation of new high-quality forage varieties. In this review, we systematically summarize the forage breeding techniques used in China and abroad in the past 100 years, including conventional breeding techniques (domestication

收稿日期: 2023-07-24; 改回日期: 2023-09-22

基金项目: 中国科学院 A 类战略性先导专项 (XDA28110301), 国家重点研发项目 (2022YFF1300601), 吉林省重点研发项目 (20220203023SF), 国家自然科学基金 (41977424) 和中国科学院创新团队项目 (2023CXTD02) 资助。

作者简介: 齐雯雯 (1993-), 女, 辽宁沈阳人, 在读博士。E-mail: qiwenwen@iga.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: mahongyuan@iga.ac.cn

breeding, cross breeding, mutation breeding, and ploidy breeding) and genetic engineering breeding techniques (transgenic and molecular design breeding). We also discuss the gene editing methods developed in recent years. We describe the achievements made using various breeding techniques, as well as their problems. We also outline the following prospects for future research: 1) In-depth exploration of natural forage resources and strengthening of the collection and utilization of germplasm resources. 2) Advancing the objectives for the breeding of forage species to meet the demands of farmers and livestock producers, paying attention to the improvement of forage quality, the production of disease-resistant and stress-tolerant varieties, and the development of the “productional-living-ecological” function of forage. 3) Combining conventional and modern breeding methods to move past the bottleneck of forage breeding and strengthen the breeding of high-quality forage species, especially *Leymus chinensis* and *Medicago sativa*. The aims of this review are to promote the new era of biological breeding in China and to provide a basis for the innovation of forage germplasm resources and the selection of new, high-quality forage varieties. The overall aims in this field of research are to provide new technologies for the establishment of high-quality and high-productive cultivated grassland, and to meet the growing demand for forage to feed farmed animals in China.

Key words: *Leymus chinensis*; *Medicago sativa*; germplasm resources; molecular breeding; mutation breeding; cell engineering

牧草资源作为农业自然资源的重要组成部分,在草业、畜牧业生产、生态安全中发挥着重要的作用。随着经济发展和人们在饮食结构、环境意识等方面的认知变化,在大农业观和大食物观下,饲草就是粮食的观念逐步得到认识,未来畜牧业产品消费增长与粮食需求刚性增长并存。与国际上其他食品消费大国相比,我国人均肉类蛋白、脂肪摄入量仍处于较低水平,优质饲用牧草的种植成为国家粮食安全和畜牧业高质量发展的重要保障。

目前,我国草地面积约为 $2.65 \times 10^8 \text{ hm}^2$,比第二次全国国土调查的草地面积下降 $0.22 \times 10^8 \text{ hm}^2$,并且草地生产力较低,天然草地实际生产力约为潜在生产力的一半,而人工草地生产力可达天然草地的2.7~12.1倍,但人工草地面积只有 $2.09 \times 10^7 \text{ hm}^2$,仅有天然草地的7.5%,难以满足我国畜牧业对饲用牧草日益增长的需求,因此,加强对天然草地的保护和恢复、扩大建植优质高产的人工草地是发展现代草产业、提升牧草生产力的必由之路^[1-2]。近年来,我国相继发布大力发展草产业和草食畜牧业的相关政策,中央一号文件中曾提出“扩大粮改饲试点,加快建设现代饲草料产业体系”“大力培育现代饲草料产业体系”“持续推动由主要治理盐碱地适应作物向更多选育耐盐碱植物适应盐碱地转变”等内容;《“十四五”林业草原保护发展规划纲要》中提出发展牧草产业、草坪业、草种业,打造优质草种繁育和饲草种植基地,加强优良草种特别是优质乡土草种选育扩繁、储备和推广利用,不断提高草种自给率;提升牧草质量和生产能力,提高机械化作业水平,发展牧草种植基地,到2025年,牧草种植面积达到 $3 \times 10^5 \text{ hm}^2$ 等要求^[3-4]。目前,我国饲草产业发展势头好、发展空间大,面临很大的挑战和机遇,所以如何提高草地生产力和载畜量,维持草畜平衡,扩大人工草地的建设逐渐受到重视。

牧草培育作为饲草产业发展的关键环节,不仅是人工草地建植和生产力提升的有效手段,减轻饲料粮对粮食安全的压力,也是缓解日益增长的饲草需求给天然草地带来的供草压力和恢复过度放牧导致的草地退化的有效途径^[3-5]。截至2020年,以美国和欧洲国家为主的经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development)成员国互认的登记牧草品种达到5000个以上^[6-7],我国草类植物育种起步晚于其他发达国家,截至2022年,我国审定通过的草品种有668个^[8]。随着科学技术的发展,植物育种工作从传统育种发展到分子育种,育种目标从最初的高产到注重牧草的品质和抗逆性,目前国际上已有转基因紫花苜蓿(*Medicago sativa*)品种并投入生产^[8-10]。本研究针对国内外100多年来的育种技术,包括驯化育种、杂交育种、细胞工程育种、诱变育种、基因工程育种等研究进展,对国内外牧草新品种选育方法进行分析(图1),归纳总结传统育种手段和现代生物技术育种手段在牧草种质创新方面的研究进展和面临的挑战,旨在为我国建设人工草地,缓解天然草原的过度消耗,实现生态环境的可持续性,加快牧草种质资源创新进程,促进畜牧业发展提供参考。

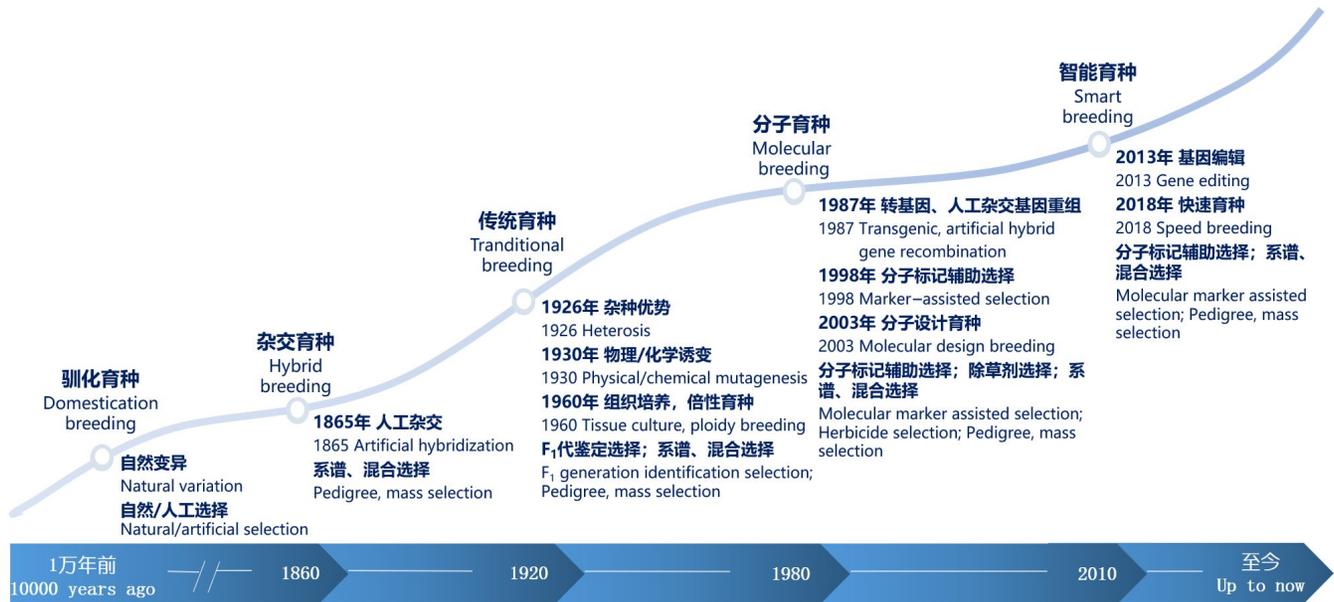


图 1 植物育种关键技术及时间节点

Fig. 1 The key techniques and time nodes of plant breeding in China

1 驯化育种

人工驯化育种始于原始农业阶段,是人类根据经验和观察,选择在野生植物群体中发生自然变异的符合人类需求的植物群体或个体,再经长期人工驯化获得性状改良品种的育种方式。驯化育种除了本地的野生驯化种和地方品种外,外地或国外的野生种质材料和经过认定的品种也会作为遗传材料引入当地进行引种驯化也就是引进品种。驯化育种是牧草育种历史最长并在目前依然占有重要地位的育种方式,国内外大多数牧草品种依然是从大量的野生牧草资源中进行评价、驯化或引种而来^[11],截至 2022 年,我国牧草驯化品种共 417 个,占总培育品种的 62.42%,其中野生栽培品种占 23.81%,引进品种占 28.59%,地方品种占 10.03%(表 1)。然而驯化育种效率常常会受到基因与环境间的相互作用、基因与基因间的相互作用、选种群体的范围等的影响而降低,植物驯化的不确定性和驯化所需的时间大大增加^[12],需要几十年的栽培和选育,工作量很大。同时由引种工作引发的生物入侵问题也需要重视,如引进过程中意外携带的普通杂草、恶性杂草的种子,外来牧草所携带的病虫害等危害不可忽视^[13],如何改进驯化技术手段和加快驯化速度是当前育种工作面临的主要问题。

研究发现传统作物的随机性驯化使得其遗传多样性远低于野生祖先种^[14],野生草类植物种质资源收集和利用依然是牧草育种工作的关键,直至目前我国收集并保存的草类植物野生种质资源材料达 8.9 万份,已经成为全世界草类植物种质资源的保存大国,保存的数量超过美国,仅次于新西兰^[8]。自 21 世纪以来,全球气候变化剧烈,对牧草育种要求更加多样化,野生牧草中有大量适应性、抗逆性强的种质资源还没有被挖掘利用,开发野生牧草资源依然是牧草育种工作的重点。

2 杂交育种

杂交育种阶段始于 19 世纪中叶至 20 世纪初,是指不同品种或物种间杂交获得杂种,使用杂交手段人为定向的创造突变,继而在杂种后代进行选择有利突变材料,以育成符合生产要求的新品种的育种方法^[15-16]。人工驯化育种转换到杂交育种引发了全球第一次农业绿色革命^[17],并且根据杂交亲本间的亲缘关系,杂交育种还可以分为品种间杂交、种间杂交和属间杂交,其中种、属间杂交属于远缘杂交范畴^[18]。杂交能够使亲本之间的基因重组,使不同亲本中控制不同性状的优良基因遗传给同一个后代,或将控制同一性状的不同微效基因累加,获得各性状均超越亲本的后代,也就是杂种优势和超亲效应^[15]。通过孟德尔遗传定律,人们认识到植物变异和进化的原理,并且随着遗传学的发展,产生了正反交、多父本杂交等不同的杂交技术(表 2)。

牧草大多数为杂合、异花授粉植物,杂种1代和2代分离后的群体更容易出现各性状都比较突出的个体,相对于在大量野生群体中选择目标个体的工作来说,杂交育种具有更高的效率和成功率。杂交后代的选择和鉴定也是不可缺少的环节,应用较多的包括单株选择、混合选择和轮回选择。单株选择也被称为纯系选育或系统选育,广泛应用于自花授粉、常异花授粉和无性繁殖植物,如仪登霞等^[19]从中豌4号为母本、草原23号为父本的组合中获得其后代种子,进行连续4代自交使基因型趋于纯合后再进一步选优去劣育成豌豆(*Pisum sativum*)新品种中豌10号。混合选择是从原始品种群体中,按育种目标选择多个个体,将所得的种子混合与原始品种的种子成对种植进行比较鉴定,优于原始品种的混合种就可以作为改良品种加以繁殖和推广,适合于常异花和异花授粉作物品种群体的改良,增加群体内优良基因或基因型的频率,如鄂牧2号白三叶草(*Trifolium repens*),通过多个单株系统选育、混合收种育成综合品种,具有较强的抗旱、抗寒、耐热性^[20]。轮回选择是一种周期性的群体改良方法,它通过将原始亲本材料的杂交后代进行反复的“鉴定—单株选择—再重组杂交”,打破基因连锁,使群体内的优良或增效基因频率逐步增加,来改善群体内目标性状的平均表现,适用于异花授粉作物和能够利用不育系进行杂交繁育的自花授粉和常异花授粉植物^[7],如Casler^[21]研究轮回选择在不芒雀麦(*Bromus inermis*)纤维浓度、产量等选择上的应用;我国通过对引进饲用甜菜(*Beta vulgaris*)育种材料进行有选择的杂交改良,采用轮回选择技术方法选育而成中饲甜201甜菜品种等^[22]。除以上单一选育方法外,目前已育成的牧草品种多以几种选育方法结合的综合品种为主,例如澳大利亚选育的数十个亲本群体杂交所得的“Martlet”多年生黑麦草(*Lolium perenne*),耐牧性和抗病性强^[7];我国经单株选择、混合选择和轮回选择综合培育的东苜1号苜蓿品种,具有抗旱抗寒的特点^[23]。

常规的杂交选育多代后,群体的遗传多样性会减弱,如何充分发挥和固定杂种优势也是杂交育种的重点方向,如远缘杂交技术可以获得杂种优势突出的品种(表2),通过杂交从野生近缘植物中渗入新的性状,其中披碱草(*Elymus dahuricus*)与野大麦(*Hordeum brevisubulatum*)、羊草(*Leymus chinensis*)与灰色赖草(*Leymus cinereus*)等种间杂交研究中,F₁代均表现出较强的杂种优势^[24-25]。但由于多数物种存在种间的生殖隔离,很多牧草没有得到广泛的应用,而且杂种后代之间的近交衰退也会导致杂种优势的退化,造成杂交种需要每年制种,成本较高且工作量大。雄性不育系杂交育种更适合于雌雄同花的自花授粉和异花授粉牧草的杂交育种工作,对于以杂交1代种子作为育种目标的品种是较为理想的利用杂种优势的方式^[26],可以提高大田杂交效率和杂交种子产量,并且对于苜蓿、羊草等无性繁殖牧草不会涉及后代育性恢复的问题,在没有得到保持系之前,可以利用无性繁殖保持和扩繁不育株系。目前,美国在利用不育系培育牧草新品种方面处于领先地位,已有很多苜蓿品种实现了商品化,而我国利用不育系育成的是饲用高粱(*Sorghum bicolor*)品种(表2),对于苜蓿等可以无性繁殖的多年生牧草还未有品种育成,不过已选育出了优良苜蓿品系^[27]。除不育系杂交育种外,无融合生殖也是固定杂种优势的一种有效方法,不同于孤雌生殖和孤雄生殖,其不经过减数分裂和受精过程直接形成胚并产生种子,其后代种子具有母体的全部特征,如果母体为杂种优势明显的突变体且能够进行无融合生殖,该品种扩繁和应用过程中可以避免

表1 我国1987—2022年经全国草品种审定委员会审定通过的牧草品种

Table 1 Forage varieties approved by the National Grass Variety Approval Committee from 1987 to 2022 in China

类别	数量(占比)	物种	数量(占比)
Type	Quantity (proportion)	Species	Quantity (proportion)
育成品种	251(37.58%)	禾本科 Poaceae	121(48.2%)
Improved variety		豆科 Fabaceae	95(37.8%)
		其他科 Other families	35(14.0%)
野生栽培品种	159(23.81%)	禾本科 Poaceae	82(51.6%)
Wild culture variety		豆科 Fabaceae	37(23.3%)
		其他科 Other families	40(25.1%)
引进品种	191(28.59%)	禾本科 Poaceae	99(51.8%)
Introduced variety		豆科 Fabaceae	71(37.2%)
		其他科 Other families	21(11.0%)
地方品种	67(10.03%)	禾本科 Poaceae	16(23.9%)
Local variety		豆科 Fabaceae	39(58.2%)
		其他科 Other families	12(17.9%)

注:数据来源:农业农村部和国家林业和草原局牧草新品种公告1987—2022年。

Note: Data source: Announcement of new forage varieties 1987—2022 by the Ministry of Agriculture and Villages and the State Forestry and Steppe Bureau.

杂交带来的负面影响,能够固定杂种优势,但目前其形成机制还未完全解析,在牧草育种方面有待进一步研究^[28]。

综上,目前牧草育成品种的主要方式依然以杂交育种为主,育种技术和体系也较为成熟,但是育种周期长,并且一些草品种更新周期较长,很多品种至今已使用几十年,近交衰退和自交不亲和导致品种退化严重,缺乏针对当前变化生境的新品种的培育^[29]。大多数牧草属于杂合子异花授粉植物,多年生无性繁殖的牧草比例也很大,牧草资源较大的遗传多样性和较低的稳定性的都给传统育种方式带来很大的困难,导致对于野生资源的利用率也很低,杂种优势并没有得到充分的利用。

表 2 国内外牧草杂交育种技术及育成品种

Table 2 Hybrid breeding techniques and varieties of forage at home and abroad

杂交方式 Hybridization method	亲本组合 Parental combination	优势 Advantage	育成品种/品系 Cultivated varieties/ strains
正反交 Reciprocal cross	两个亲本互为父母本杂交。The two varieties/materials were crossed with each other.	能够明确不同亲本个体和杂交组合的配合力。To clarify the combining ability of different parent individuals and hybrid combinations ^[15] .	黄花苜蓿与驯鹿苜蓿杂交组合。 <i>Medicago falcata</i> cv. Hulunbeier & <i>M. sativa</i> cv. AC Caribou ^[30] .
多父本杂交 Multi-parent crossover	多个父本与同一母本杂交。Multiple male parents crossed with the same female parent.	同时可获得多个单交组合的混合后代,分离种类较单交丰富,易于挑选。The mixed progenies of multiple single cross combinations can be obtained, and the separated species are more abundant than single crossing, which is beneficial to selection at the same time.	图牧 2 号紫花苜蓿。 <i>M. sativa</i> cv. Tumu No. 2 ^[31] .
多元杂交 Polycross	两个以上亲本混合杂交。Mixed crossing of more than two parents.	一次性获得多杂交组合的配合力及配合力的遗传特点,将多个亲本的优良性状集成到一个后代。The combining ability and genetic characteristics of multi-hybrid combinations were obtained at one time, and the excellent characters of multiple parents were integrated into one progeny ^[32] .	甘农系列,中兰系列,中苜系列等苜蓿品种。Gannong series, Zhonglan series, Zhongmu series and other alfalfa varieties ^[23] .
远缘杂交 Distant hybridization	不同种、属或亲缘关系更远的物种作为杂交亲本互交。Different species, genera or more closely related species interbreed as hybrid parents.	打破种族隔离,表现出较强的杂种优势,尤其是在抗逆性方面。Break apartheid and show strong heterosis, especially in stress resistance.	南农 1 号羊茅黑麦草、龙牧系列 3 个苜蓿品种。Nannong No. 1 fescue ryegrass ^[23] and three alfalfa varieties of Longmu series ^[33] .
回交 Backcross	杂交后代与其两个亲本之一再次杂交。The hybrid offspring crossed again with one of its two parents.	在纯合品种选育进程方面要优于自交,并且因其核置换理论其后代基本拥有轮回亲本的全部核基因组成。It is better than self-crossing in the breeding process of homozygous varieties, and because of its nuclear replacement theory, its offspring basically have all the nuclear gene composition of recurrent parents.	Caliyerde, Saranac, Iroquois and Apalacheem 抗性苜蓿品种。Resistant alfalfa varieties of Caliyerde, Saranac, Iroquois and Apalacheem ^[34] .
雄性不育系杂交 Male sterile line hybridization	以可遗传的雄性不育系作为母本与具有恢复育性基因的正常父本杂交。Heritable male sterile lines as female parents crossed with normal male parents with restoring fertility genes.	适用于异花授粉植物大田杂交制种,充分利用杂种优势,弥补去雄困难、杂交种获得效率低的缺点,成本低。Suitable for field hybrid seed production of cross-pollinated plants, making full use of heterosis, making up for the difficulties of castration and low efficiency of hybrid seed acquisition, low cost.	Hybriforce-620 苜蓿品种;蜀草 1 号高丹草等。Hybriforce-620 alfalfa ^[35] ; Shucao No. 1 <i>S. bicolor</i> × <i>S. bicolor</i> var. <i>sudanense</i> ^[36] .

3 诱变育种

诱变育种是指在人为的条件下,利用物理、化学等因素诱发生物体产生遗传性的变异,并通过人工选择、鉴定,进而培育成新品种或新种质的育种方式^[15],目前粮农组织(Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency, FAO/IAEA)最新统计突变数据库中已登记了 3405 个诱变植物品种,牧草品种 32 个(<http://mvgs.iaea.org/>)。诱变的突变频率比自发突变要高数百倍,能够诱发各种突变基因^[37],产生自然界稀有的或者用一般常规方法难以获得的牧草新类型、新性状等,可为育种提供宝贵的原始材料,加速育种进

程。大多数牧草属于多年生杂合体,兼具有性和无性繁殖,生长周期长,使用传统的杂交育种需要投入更多的人力物力,但依然很难提高育种效率,而诱变育种可以改善自交不亲和性,育成品种较稳定,能够弥补传统杂交育种手段的不足^[34,38]。根据不同的诱变源可以分为物理诱变和化学诱变。

3.1 物理诱变育种

物理诱变育种是以辐射、航天航空的微重力和真空等物理因素诱发植物突变的育种技术,包括辐射育种和空间育种。辐射育种已具有较长的历史,早在20世纪20年代,Muller等就发现了利用X射线可以诱导果蝇、玉米(*Zea mays*)和大麦(*Hordeum vulgare*)发生突变,辐射源也多种多样,从电离辐射如⁶⁰Co- γ 射线、 α 射线、 β 射线和质子、中子到电磁辐射如紫外线和X射线、激光,再到电子束和离子束注入,如C、N、Ne等,还有宇宙的强辐射^[15]。辐射源不同,诱变效果不同,其中⁶⁰Co- γ 射线在牧草育种当中应用最多(表3),突变频率较高且突变方向不定,可同时诱导多个可遗传的性状突变^[39-40];重离子束诱变的应用较晚,相比⁶⁰Co- γ 等电离、电磁辐射,具有传能线密度大、相对生物学效应高、损伤后修复效应小等优势,突变效率较高,可以在不影响其他性状的同时有效地获得某一个目标性状的较大范围的变异,获得多个新表型^[41];而空间诱变育种是指利用飞船等飞行器将植物种质搭载到宇宙空间,在宇宙的强辐射、微重力和真空等物理特性的作用下发生遗传性状变异,返回后再经地面人为选择,利用有益变异选育出新品种(系)。

物理诱变技术在牧草育种当中的应用要晚于粮食作物,但也已经取得一定成果,国外自20世纪70年代后期就对假俭草(*Eremochloa ophiuroides*)和狗牙根(*Cynodon dactylon*)等牧草进行了辐射诱变试验,发现辐射诱变可以有效改良牧草性状和提高抗逆性^[42-43],我国牧草辐射诱变育种工作虽然与国外相比起步较晚,但在羊草、白三叶等牧草中也育成了具有优质、多抗和综合性状优良的新品种,然而国内外已有应用重离子束辐射诱变培育的粮食作物和花卉品种,但尚未有相应的牧草品种育成的报道^[44-45]。在空间诱变育种方面,国外还集中在作物和蔬菜育种^[7,46],牧草方面我国的航天诱变育种已走在世界前列,已成功培育了发芽率高、品质优良的牧草品种(表3)。

3.2 化学诱变育种

化学诱变育种是以化学诱变剂为诱变源的育种方式,以造成生物基因位点突变的方式来不定向的随机产生突变体,改变植物某些性状育成新品种,具有成本低、操作简单的特点^[47]。自20世纪50年代起,化学诱变技术引起了人们的重视^[48],Nilan等^[49]于1962年利用硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES)处理大麦,使株型和产量性状发生改变,获得了矮秆、抗倒伏和高产的大麦新品种。目前使用的化学诱变剂包括烷化剂、叠氮化合物和碱基类似物等,甲基磺酸乙酯(ethyl methylsulfone, EMS),叠氮化钠(sodium azide, NaN₃)和平阳霉素(pingyangmycin, PYM)在农作物育种中得到普遍应用,其中EMS因其诱变效率高、突变谱广被广泛用于草地植物的突变体库构建和优良草品种的选育并取得了一定进展^[50-51]。秋水仙素也是化学诱变剂的一种,主要用于双单倍体育种,后期陆续发现了功能相似但毒性相对较小的二甲戊乐灵等二硝基苯胺类除草剂并投入应用^[52]。

3.3 诱变育种效率的影响因素

从目前的研究中可以看出,除了不同的辐射源,不同的诱变材料和辐射剂量也会影响突变效果,根据不同物种选择适宜的诱变材料和剂量是诱变中提高突变频率、获得有效突变体的关键。常用的材料包括种子和植物的球根、枝条等无性繁殖器官材料^[53],其中因植物种子具有便于携带、易保存和突变体鉴定筛选方便等优势而被广泛使用;诱变剂量过低达不到突变效果,过高的剂量会致死,导致得不到理想的突变体,所以目前多数研究以半致死剂量为标准^[52]。同时,随着不断地研究发现,单一的诱变剂使用得到的诱变效果不够理想,有研究将不同理化诱变剂复合使用或诱变育种与其他育种技术相结合,可产生累加效应或超累加效应^[54]。将诱变技术与其他育种方式结合也是提高诱变育种应用效率的主要方向,如将离体培养与诱变剂相结合,能够进一步提高突变发生概率,将这种广泛的变异在细胞水平上进行筛选鉴定,从而得到有价值的变异细胞体系,改变分离纯化速度和缩短育种周期,通过此种方法已获得具有一定优良性状和强抗逆性的牧草突变体(表3),但是如何建立完整高效的培养体系还要根据不同品种的特性进一步研究。此外,经过理化诱变剂和离体细胞组织培育的突变材料在M₁代出

现的突变体表型可能是嵌合体或不可育,突变性状无法稳定遗传给 M_2 代, M_2 和更高世代才是依靠表型筛选突变体的关键时期^[55],总的来说育种周期依然很长,要想得到想要的突变体,还需结合新的技术建立相应的高效突变体筛选体系,提高筛选效率。

表 3 诱变技术在牧草育种工作中的应用

Table 3 Application of mutagenesis technique in forage breeding

诱变技术 Mutagenic technology	诱变源 Mutagenic source	应用 Application	特点 Characteristic
物理诱变 Physical mutagenesis	^{60}Co - γ 射线 ^{60}Co - γ -rays 快中子 Fast neutrons 离子束注入 Ion beam implantation 宇宙的辐射 Cosmic radiation	紫花苜蓿, 羊草等 <i>M. sativa</i> ^[56] , <i>L. chinensis</i> ^[57] , et al. 羊草 <i>L. chinensis</i> ^[58] 紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[59] 紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[60]	突变谱广, 方向不定, 可有效改良单一性状, 提高抗逆性, 打破远缘杂交不亲和性。The mutation spectrum is wide and the direction is uncertain, which can effectively improve the single character, improve the stress resistance and break the distant cross incompatibility.
化学诱变 Chemical mutagenesis	甲基磺酸乙酯 Ethyl methylsulfone (EMS) 硫酸二乙酯 Diethyl sulfate (DES) 叠氮化钠 Sodium azide (NaN_3)	缘毛雀麦, 扁蓿豆, 羊草 <i>Bromus ciliates</i> , <i>Melilotoides ruthenicus</i> ^[61] , <i>L. chinensis</i> ^[62] 大麦 <i>H. vulgare</i> ^[49] 黑麦草 <i>Secale cereale</i> ^[63]	诱发 DNA 点突变, 效率高, 易操作, 但高效低毒诱变剂较少。DNA point mutation can be induced with high efficiency and easy operation, but there are few mutagens with high efficiency and low toxicity.
复合诱变 Compound mutagenesis	盐胁迫 + 组织培养 Salt stress + plant tissue culture NaN_3 + 盐胁迫 + 组织培养 NaN_3 + salt stress + plant tissue culture ^{60}Co - γ 射线 + 甲基磺酸乙酯 ^{60}Co - γ -rays + EMS 快中子 + 盐胁迫 + 组织培养 Fast neutrons + salt stress + plant tissue culture 叠氮化钠 + 紫外线 + 盐/旱胁迫 + 组织培养 NaN_3 + UV + salt/dry stress + plant tissue culture	高羊茅 <i>Festuca elata</i> ^[64] 紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[65] 山豆 <i>Lathyrus quinquenervius</i> ^[66] 红豆草 <i>Onobrychis viciifolia</i> ^[67] 紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[68]	提高突变率, 改变分离纯化速度和缩短育种周期。Increase the mutation rate, change the separation and purification speed and shorten the breeding cycle.

4 倍性育种

植物倍性育种是植物育种的重要研究内容,是通过染色体的倍数性变化使后代性状发生遗传变异进而选育新品种或者育种中间材料的育种方法,属于染色体组工程技术,具有操作较为安全简便、效率高的优势,是植物育种的重要手段。主要包括单倍体和多倍体育种,多倍体包括同源多倍体和三倍体,其中单倍体育种因为能够提高具有特定优良性状的纯合品种的育种效率和成功率从而受到广泛关注。

4.1 单倍体育种

单倍体育种是指利用自然突变或人工诱导的方法获得只具有配子体染色体数目且能够正常生长的植株,进而筛选培育成新品种或育种中间品种的育种技术,对于不同的育种目的可经过染色体复制加倍后形成纯合体。由于牧草大多数为杂合多倍体异花授粉植物,且结实率低,传统的杂交育种需要连续多代且大量的杂交和反复地筛选鉴定才能获得纯合植株,诱变育种也很难获得纯合体,但通过培育单倍体植株进而加倍处理后可获得双单倍体后代,只需要 2 代的时间就可获得纯合体,能够提高筛选效率、缩短选育时间^[69]。除此之外,单倍体植株对于克服远缘杂交不亲和性具有一定成效,并且与诱变技术相结合可以提高诱变成功率,诱变后的单倍体较容易显现出相应的突变表型,能够在早期被筛选出来,对牧草品种选育具有重要应用价值^[15]。

已有研究发现在自然条件下一些植物可以自发形成单倍体,如芸薹属 (*Brassica*) 植物和苜蓿等^[70-71],并且部分物种还可以自然加倍形成双单倍体,但相对来说自然单倍体形成频率很低,难以保存和应用于育种,需要应用

人工诱导技术来提高单倍体发生率,如花药(花粉)或小孢子培养(孤雄生殖)、胚珠或未授粉子房培养(孤雌生殖)、远缘杂交法和辐射或化学药剂诱导法、着丝粒介导法等。目前,牧草中苜蓿和黑麦草等采用人工诱导法已成功获得单倍体植株^[72-73],其利用前景十分广泛,但孤雌生殖、孤雄生殖或远缘杂交等方式均受到植物生育期和组织培养技术等限制,育种效率低,而近些年对植物体内诱导单倍体基因的挖掘和机制解析提供了全新的方法和思路,目前已从紫花苜蓿、黑麦草、小麦(*Triticum aestivum*)等多个植物物种当中挖掘出能够诱导产生单倍体植株的内源基因及多个同源基因^[72],可为饲草作物单倍体育种提供很好的借鉴。

4.2 多倍体育种

多倍体育种是指植物在自然条件下或人工诱导后,通过表型或细胞学鉴定筛选具有2个以上亲本染色体组的后代的育种方法,一般表现为器官巨大、抗逆性强。多倍体材料能够克服一些植物因倍性水平不同导致的远缘杂交不亲和性和不育性,也可作为育种中的桥梁亲本材料,但部分诱导获得的多倍体存在生长慢周期长、矮化和败育等缺陷,因此多倍体育种也适用于以收获营养体为主的无性繁殖植物的种质创新和改良^[15]。由于自然条件下多倍体发生率较低,使得通过物理、化学、生物等人工诱导方法诱导多倍体的技术被认为是促使生物多样性增加的一个有价值的工具,克服了某些属只有一个物种所导致的植物基因库狭窄、经济价值性状低等问题,为育种工作的延续奠定了基础^[74]。

物理方式包括温度激变、机械创伤、电离辐射等诱导染色体加倍;化学方法包括秋水仙碱、富民隆等化学药剂,也是目前最常用的方式;生物技术如植物体细胞杂交是有性杂交的重要补充,在转移由多基因或尚未克隆出的目标基因所控制的性状方面具有极大的潜力。不同品种、种和属间的原生质体可以发生融合,可避免远缘杂交不亲和的障碍^[75-77],还可以得到不同类型的同核体、异核体和胞质杂种^[75]。目前主要应用的体细胞杂交方法为聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)融合法,因其成本低和易获得较多融合体而被广泛地使用。融合方式主要有对称融合、不对称融合和亚原生质体融合^[78],其中对称融合和亚原生质体融合应用较少,而非对称融合可以将亲本之一的部分核基因或只将胞质内容物与另一亲本融合,挑选再生植株中具有优良性状的植株来缩短育种时间^[79]。这种融合方式有利于杂种细胞的筛选和增加种间或属间体细胞杂种植株的可育性,目前在早熟禾(*Poa annua*)和紫花苜蓿等牧草中得到了应用^[80-81]。无论是自然加倍还是人工诱导,多倍体培养效率在种间和种内水平上都有较大差异,筛选合适的品种基因型工作量较大,后代育性和遗传稳定性也是限制多倍体育种发展的主要问题。

5 基因工程育种

基因工程育种是在分子水平上标记鉴定目的基因DNA分子序列,将其重组导入受体细胞或在基因组水平编辑DNA序列,使植物遗传特性得到修饰或改变进而培育新品种的育种方式,主要包括分子标记辅助选择育种、转基因育种和基因编辑育种。与传统育种无法精准定向获得突变相比,转基因育种和基因编辑育种能够更准确高效地创造具有目标性状的突变,大大提高了育种效率和育种周期,以转基因技术、基因编辑技术为代表的农业生物育种技术已成为开启新一轮农业科技革命的“技术之窗”。分子标记辅助选择育种技术在大量野生种质资源和传统育种技术创造的新种质材料的基础上,可以缩短驯化育种、杂交育种、诱变育种等常规育种流程中关键的选择环节的工作效率,并且可以根据突变材料的表型性状标记和挖掘目的基因,是转基因和基因编辑技术的基础。

5.1 分子标记辅助选择育种

分子标记辅助选择育种是指借助分子标记对目标性状的基因型进行选择从而筛选突变材料的育种技术。常用的分子标记技术有限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)等,相对于第一代基于分子杂交的RFLP标记,基于PCR的SSR标记大大减少了基因分型的费用和时间,而SNP标记在基因组中覆盖率更广,已有20多种牧草中大量的SNP标记被开发出来,并构建了高密度分子遗传连锁图谱,从而为分子育种奠定了坚实的基础^[82-83]。目前分子标记在野生牧草种质资源鉴定、牧草育种突变体鉴定和选择方面已经取得一定的进展,可以更直接、快速的

鉴定不同生物体之间 DNA 差异,区分种质资源并判断种质间遗传距离,并且对于抗旱和产量等遗传力低的性状、抗病性状等隐性性状、表型鉴定困难花费高的性状和多个抗性基因聚合调控的性状的选择具有显著作用,提高了突变植株的选择效率。

分子标记除了在筛选和鉴定方面提高育种效率外,挖掘控制优良性状表达的优异目的基因是基因工程育种的基础和关键的一步,也是当下研究的热点方向。但由于牧草多为多年生多倍体或杂合体,个体间具有较大的遗传变异,数量性状遗传基础的复杂性和数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)定位的限制性,导致仅使用分子标记在鉴定挖掘多个微效基因控制的数量性状改良中的应用受到诸多限制^[4],抗性性状等隐性性状的目标基因挖掘和相应的分子标记效率较低^[84-85]。而随着分子生物技术和生物信息技术的发展,高通量测序技术平台已建立并日趋完善,转录组学、代谢组学、蛋白组学、表观遗传组学等基因组学应运而生,在牧草领域已有紫花苜蓿、黑麦草、鸭茅(*Dactylis glomerata*)等 18 种饲草进行了全基因组测序^[86],将分子标记、基因定位技术与多组学分析、全基因组关联分析、简单基因组测序、全基因组测序等相结合,目前已陆续在苜蓿和草地早熟禾等多种牧草中鉴定筛选出与耐盐、抗病、休眠等农艺性状相关的基因信息,实现了优良牧草性状调控基因的快速挖掘与鉴定,为后续的基因工程育种工作奠定了基础。

5.2 转基因育种

转基因育种技术就是人为的将外源基因导入目的细胞或生物个体中,并使其能够稳定地表达并遗传,使植物性状发生改变进而培育新品种的一种育种方式。转基因植株能够克服有性杂交的限制获得特异的突变体,应用前景广阔。1985 年, Vasil 在国际草原学大会上首次提出利用遗传转化技术将外源的特定基因导入牧草的可行性,为应用转基因技术改良牧草奠定了理论基础^[87]。随后国外畜牧业发达国家陆续开展了大量的转基因研究,在牧草转基因育种方面的研究深度和广度要强于我国,在 20 世纪初就已建立鸭茅和多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)等牧草的遗传转化体系,并广泛应用^[87-88]。常用的转基因手段包括农杆菌介导法、基因枪法及聚乙烯乙二醇(PEG)介导法等,农杆菌介导法和基因枪法因操作简单、适用广泛和遗传稳定性好等优势被广泛使用^[89]。目前,国内外牧草转基因育种主要集中在增强抗性和提高牧草品质方面,如抗除草剂、耐盐、抗旱、抗病和改良牧草消化性等(表 4),我国紫花苜蓿、百脉根、白三叶、多年生黑麦草等牧草的遗传转化体系也相对成熟^[90],已培育出许多转基因抗性牧草品系,已有部分品系获批田间试验许可^[8],不过目前通过转基因技术育成的抗性牧草品种还鲜有报道。

表 4 基因工程育种技术在牧草育种中的应用

Table 4 Application of genetic engineering breeding technology in forage breeding

基因工程技术 Genetic engineering technology	应用 Application	参考文献 References
分子标记辅助选择育种 Molecular mark assisted breeding	野生牧草种质资源、品种区分鉴定 Differentiation and identification of wild forage germplasm resources and varieties	狗牙根, 紫花苜蓿 <i>C. dactylon</i> ^[93] , <i>M. Sativa</i> ^[94]
	突变体性状、突变植株筛选鉴定 Screening and identification of mutant characters and mutant plants	黑麦草 <i>S. cereale</i> ^[95]
	与基因组学结合进行目的基因挖掘 Target gene mining in combination with genomics	黑麦草, 紫花苜蓿 <i>S. cereale</i> ^[96] , <i>M. sativa</i> ^[97]
转基因育种 Transgenic breeding	抗除草剂 Herbicide resistance	紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[98]
	抗病 Disease resistance	高羊茅 <i>F. elata</i> ^[99]
	耐盐 Salt resistance	紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[8]
	抗旱 Drought resistance	百脉根 <i>Lotus corniculatus</i> ^[8]
	低木质素 Low lignin	黑麦草 <i>S. cereale</i> ^[100]
基因编辑育种 Gene editing breeding	低木质素, 抗旱 Low lignin, drought resistance	紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> ^[101-102]

5.3 基因编辑育种

基因编辑育种是对目标基因进行“编辑”,对特定DNA片段进行敲除、插入或碱基替换从而改变植物性状的一项新育种技术。与转基因相比,基因编辑技术是在植物原有的基因组信息上进行操作,没有外源基因的导入,可在生物体内实现对基因组定点位置的精准修饰和定向改造,对于植物性状改良更直接,并且摆脱了对物种的依赖性,具有高效、稳定和成本低等优势,极大加快了植物功能基因组学和农作物分子设计育种进程。目前第3代基因组编辑技术CRISPR系统被广泛使用,已有研究将基因编辑技术运用在作物和蔬菜育种当中,如水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)等。但目前牧草研究中,除苜蓿、黑麦草和蒙古冰草(*Agropyron mongolicum*)等几种饲草品种外,其他牧草中还少有相关报道^[91-92]。

6 展望

综上所述,国内外牧草育种工作已有较长的历史,育种技术也在不断发展和创新,对于野生资源的收集驯化和人工创建牧草新种质都做了大量的工作,我国虽然起步较发达国家晚,但发展迅速,不过目前为止已选育的牧草品种数量及其推广应用依然难以满足我国日益增长的需求,主要表现在大量的自然牧草资源利用不充分、牧草选育目标单一和育种新技术的应用不成熟等方面,未来建议加强以下几个方面的研究。

6.1 深入挖掘牧草自然资源,加强种质资源收集与利用

我国牧草种质资源丰富,草地饲用植物6704种,隶属246科1545属,已收集入库的为107科692属2105种,其中豆科和禾本科饲用植物最多,分别为1231和1127种^[8]。由于草地退化,自然草资源面临威胁,我国目前牧草资源保存依然采用异地保存,过程中也存在遗传多样性缺失的风险,成功收集保存的种质资源相对较少^[4]。种质资源收集的同时,我国截至2016年共有1.6万多份种质资源进行了抗逆性和品质相关的农艺性状评价,已筛选出高蛋白苜蓿、抗白粉病红三叶(*Trifolium pratense*)和抗褐斑病紫花苜蓿等优异种质553份,然而只对2%的牧草资源进行了遗传评价^[4],对牧草资源的遗传背景缺乏了解,大量野生资源未被评价鉴定,利用率较低,对牧草自然种质资源的挖掘利用还有待加强。

6.2 以需求为导向,丰富牧草新品种选育目标

牧草的抗性育种也是我国目前牧草育种研究的重点,2000—2020年在我国已育成的牧草品种中,具有抗寒品种43个,耐旱品种50个,耐盐品种22个,耐酸品种9个,抗病虫害品种51个,但多集中于杂交育种和诱变育种^[24]。由于牧草主要种植于农牧交错带,其降水、土壤肥力均较农作物种植区域差,所以牧草品种选育的关注点除高产外,还有较高生态适应性,较强的种间竞争、互作能力,较强的盐碱或干旱等非生物胁迫抗性^[103]。但我国目前审定通过的品种大多适用于农田播种,具有突出抗性的牧草品种较少,对于引进品种来说相对较弱,多数牧草依赖进口,需要重视对能够满足多区域、多功能种植需求的牧草品种的选育。

6.3 全面开展牧草育种新技术的研究,突破牧草育种瓶颈,加强优质牧草羊草和苜蓿等新品种的选育

目前通过审定的牧草育成品种仍以驯化育种和常规育种方法为主,周期长、效率低等问题极大阻碍了我国牧草新品种选育工作的发展。羊草被认为是“禾草之王”,生态适应性广,具有营养价值高和高抗性等优良性状,但羊草结实率低、抽穗率低、发芽率低的问题限制了羊草的种植推广,较长的生长周期也限制了育种效率,截至目前我国通过审定登记的羊草品种只有21个,很多品种也没有得到推广种植^[104],具有很大的发展潜力;而“牧草之王”紫花苜蓿作为国内外牧草育种重点关注对象,也面临相同的问题,截至2020年,我国已育成的苜蓿品种共112个,美国2015年一年内审定登记了192个,与我国近30年的品种数量接近,急需提高我国自主研发苜蓿品种的能力和效率。然而牧草的多倍体、杂合体的特性和基因的多效性与连锁性使得具有较大应用价值的新性状的个体通常伴随着其他不良性状,也使得控制目的性状功能基因的挖掘变得困难^[92]。而近年来不断发展的基因工程技术弥补了牧草常规育种的缺陷,金京波等^[4]也曾提出利用全基因组关联分析可能更适合从紫花苜蓿和羊草中挖掘优异基因资源,将表型水平的突变与基因水平的突变相关联建立突变谱,利用转基因和基因编辑技术可以大大降低或避免不良基因的连锁,简化传统育种流程中的复杂程序,加快牧草新品种选育进程。此外,在粮食作物育种中通过调节光周期、培养温度和植物激素的使用等方法进行快速育种能够达到每年3~9代^[105],可大大提高育种

效率,但相关技术在牧草育种中报道较少。因此,构建牧草现代高效育种技术体系,突破基因编辑和分子设计育种的瓶颈,才能推动我国种业顺利进入生物育种时代,为实现我国优质、高产人工草地的建植奠定基础,为满足我国畜牧业对饲用牧草日益增长的需求提供技术支撑。

参考文献 References:

- [1] Shen H H, Zhu Y K, Zhao X, *et al.* Analysis of current grassland resources in China. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(2): 139–154.
沈海花,朱言坤,赵霞,等. 中国草地资源的现状分析. *科学通报*, 2016, 61(2): 139–154.
- [2] Bai W M, Hou L Y, Song S H, *et al.* Optimal formula feed is a key for efficient transformation of forage to animal products in grass-based livestock husbandry. *Chinese Science Bulletin*, 2018, 63(17): 1686–1692.
白文明,侯龙鱼,宋世环,等. 饲草料优化配比是实现草—畜高效转化的关键. *科学通报*, 2018, 63(17): 1686–1692.
- [3] Zheng W, Luan Z H, Zhang H X, *et al.* Developing grass cultivation, the basis of grass husbandry—the present situation of forage cultivation research in China. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2019, 44(6): 111–114.
郑伟,栾志慧,张红香,等. 草畜牧业之根本—我国牧草培育现状分析与发展思考. *东北农业科学*, 2019, 44(6): 111–114.
- [4] Jin J B, Wang T, Cheng Y F, *et al.* Current situation and prospect of forage breeding in China. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2021, 36(6): 660–665.
金京波,王台,程佑发,等. 我国牧草育种现状与展望. *中国科学院院刊*, 2021, 36(6): 660–665.
- [5] Zhou D W. Eating-full and eating-well for sheep feeding on natural grassland. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2004(9): 16–20.
周道玮. 草地放牧的牛羊需要吃饱也需要吃好. *草学*, 2004(9): 16–20.
- [6] Bouton J. The economic benefits of forage improvement in the United States. *Euphytica*, 2007, 154: 263–270.
- [7] Zhang X Q, Ma X, Guo Z H, *et al.* Research advances in breeding of gramineous forage in abroad. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2015(1): 1–7.
张新全,马啸,郭志慧,等. 国外禾本科草育种研究进展. *草业与畜牧*, 2015(1): 1–7.
- [8] Nan Z B, Wang Y R, He J S, *et al.* Achievements, challenges and prospets of herbage seeds industry in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(6): 1–10.
南志标,王彦荣,贺金生,等. 我国草种业的成就、挑战与展望. *草业学报*, 2022, 31(6): 1–10.
- [9] Wang Z Y, Brummer E C. Is genetic engineering ever going to take off in forage, turf and bioenergy crop breeding? *Annals of Botany*, 2012(6): 1317–1325.
- [10] Barros J, Temple S, Dixon R A. Development and commercialization of reduced lignin alfalfa. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 48–54.
- [11] Hanson J, Schultze-Kraft R, Peters M, *et al.* Forage diversity, conservation and use//The impact of the international livestock research institute. UK: CABI, 2020.
- [12] Ma X F, Yan X, Qian C J, *et al.* *De Novo* domestication of crops: principles, progress and challenges—an example from *Agriophyllum squarrosum*. *Journal of Nantong University (Natural Science Edition)*, 2021, 20(2): 19–30.
马小飞,燕霞,钱朝菊,等. 作物的从头驯化:原理、进展与挑战—以野生植物沙米的驯化为例. *南通大学学报(自然科学版)*, 2021, 20(2): 19–30.
- [13] Li X T, Yan X B, Wang C Z, *et al.* Discussion on introduction of pasture and turf-grasses and biological invasion. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2009, 21(12): 86–89, 94.
李晓涛,严学兵,王成章,等. 我国牧草及草坪草引种与生物入侵探讨. *江西农业学报*, 2009, 21(12): 86–89, 94.
- [14] Purugganan M D, Fuller D Q. The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 2009, 457: 843–848.
- [15] Zhang T Z. *Crop breeding general*. Beijing: China Agriculture Press, 2022.
张天真. *作物育种学总论*. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- [16] Lin M. The development course and industrialization countermeasure of agricultural biological breeding technology. *Current Biotechnology*, 2021, 11(4): 405–417.
林敏. 农业生物育种技术的发展历程及产业化对策. *生物技术进展*, 2021, 11(4): 405–417.
- [17] Vasil I K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of schleiden and schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(9): 1423–1440.

- [18] Yang J. Selection of parents of *Medicago* hybridization and analysis of growth superiority in F₁ seedling stage. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
杨婕. 苜蓿杂交亲本选择及其杂种F₁苗期生长优势分析. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [19] Yi D X, Li C, Pang Y Z. Early maturing and high yield pea variety Zhongwan No. 10. China Seed Industry, 2023(1): 113–115.
仪登霞, 李聪, 庞永珍. 早熟、丰产型豌豆品种中豌10号. 中国种业, 2023(1): 113–115.
- [20] Zhang B J, Chen Q Z, Zhou F, *et al.* Development of plant breeding selection technology and its theoretical basis. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008(19): 8050–8051, 8061.
张边江, 陈全战, 周峰, 等. 植物育种选择技术的发展及其理论基础. 安徽农业科学, 2008(19): 8050–8051, 8061.
- [21] Casler M D. Phenotypic recurrent selection methodology for reducing fiber concentration in smooth brome grass. Crop Science, 1999, 39(2): 381–390.
- [22] Wang H Q, Li H X, Guo A H, *et al.* Breeding of a fodder beet variety Zhongsitian201 with high productivity. Sugar Crops of China, 2006(1): 8–11.
王红旗, 李红侠, 郭爱华, 等. 高生产力饲用甜菜—中饲甜201的选育. 中国糖料, 2006(1): 8–11.
- [23] National Grass Variety Approval Committee. China approved and registered grass variety collection 1987–2022. Beijing: China Agriculture Press, 2022.
全国草品种审定委员会. 中国审定登记草品种集1987–2020. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- [24] Li Z Z, Yun J F, Yu Z, *et al.* Studies on cytogenetics of *Elymus dahuricus*, *Hordeum brevisubulatum* and their hybrid F₁ and BC₁. Acta Agrestia Sinica, 2004, 13(4): 269–273.
李造哲, 云锦凤, 于卓, 等. 披碱草和野大麦杂种F₁与BC₁代细胞遗传学研究. 草地学报, 2004, 13(4): 269–273.
- [25] Hou J H, Yun J F. Biological characters of *Leymus chinensis* and *Leymus cinereus* and their hybrid. Acta Agrestia Sinica, 2005, 13(3): 175–179.
侯建华, 云锦凤. 羊草、灰色赖草及其杂种F₁生物学特性. 草地学报, 2005, 13(3): 175–179.
- [26] Jia R, Yu H Z, Xu A K. The research progress of alfalfa male sterile line application. Journal of Grassland and Forage Science, 2013(6): 56–59.
贾瑞, 于洪柱, 徐安凯. 苜蓿雄性不育系应用的研究进展. 草业与畜牧, 2013(6): 56–59.
- [27] Li H, Shi F L, Cui X P, *et al.* Observations on the morphological structure of style and stigma of male sterile line of *Medicago varia* Martin. cv. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol, 2003(6): 671–673.
李红, 石凤翎, 崔秀萍, 等. 苜蓿雄性不育系花柱与柱头形态结构观察研究. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2003(6): 671–673.
- [28] Zhuang L F, Qi Z J. Recent advances in inducing and application of plant chromosome aberrations. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(1): 3–17.
庄丽芳, 齐增军. 植物染色体诱变研究与应用进展. 南京农业大学学报, 2018, 41(1): 3–17.
- [29] Yun J F. Seize the opportunity, renew the idea and speed up the process of grass variety breeding. Grassland and Prataculturae, 2015, 27(1): 1–2.
云锦凤. 抓住机遇, 更新理念, 加快草品种育种进程. 草原与草业, 2015, 27(1): 1–2.
- [30] Yang W G, Li H, Mao X T, *et al.* Preliminary study on intervarietal hybridization between *Medicago falcata* cv. Hulunbeier and *Medicago sativa* and screening. Grassland and Turf, 2015, 35(1): 53–57.
杨伟光, 李红, 毛小桃, 等. 呼伦贝尔黄花苜蓿与紫花苜蓿杂交及优异单株选育研究. 草原与草坪, 2015, 35(1): 53–57.
- [31] Wang X, Li Z P, Sun J J, *et al.* Progress of alfalfa breeding in China. Pratacultural Science, 2014, 31(3): 512–518.
王雪, 李志萍, 孙建军, 等. 中国苜蓿品种的选育与研究. 草业科学, 2014, 31(3): 512–518.
- [32] Wang H, Shi S L, Zhang X Y, *et al.* Determination of general combining ability and estimation of genetic parameters for yield and quality in alfalfa. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(3): 126–134.
王虹, 师尚礼, 张旭业, 等. 紫花苜蓿多元杂交后代产量和品质一般配合力分析及遗传参数的估算. 草业学报, 2016, 25(3): 126–134.
- [33] Li H, Luo X Y, Wang D K. The breeding report of new alfalfa varieties “Longmu 801” and “Longmu 803”. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 1996(1): 3–7.
李红, 罗新义, 王殿魁. “龙牧801号”与“龙牧803号”苜蓿新品种选育报告. 黑龙江畜牧科技, 1996(1): 3–7.
- [34] Yun J F. Grass and feed crop breeding. Beijing: China Agriculture Press, 2001.

- 云锦凤. 牧草及饲料作物育种学. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [35] Jin X P, Chen C J, Yang Z K, *et al.* Research progress of male sterile line of *Medicago sativa*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(6): 16–19.
金学平, 陈彩锦, 杨治科, 等. 紫花苜蓿雄性不育系研究进展. 安徽农业科学, 2019, 47(6): 16–19.
- [36] Zhu Y Q, Li X Y, Xu W Z, *et al.* Standardized cultivation techniques of a new variety of gaodan grass, Shuca No. 1. Sichuan Agricultural Science and Technology, 2021(6): 32–33.
朱永群, 李祥艳, 许文志, 等. 蜀草1号高丹草新品种标准化栽培技术. 四川农业科技, 2021(6): 32–33.
- [37] Ahloowalia B S, Maluszynski M. Induced mutations—a new paradigm in plant breeding. Euphytica, 2001, 118(2): 167–173.
- [38] Han W B, Zhang Y X, Tang F L, *et al.* Research advances in pasture mutation breeding in China. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(1): 62–66.
韩微波, 张月学, 唐凤兰, 等. 我国牧草诱变育种研究进展. 核农学报, 2010, 24(1): 62–66.
- [39] Wang X L, Li H, Yang W G, *et al.* The research progress of radiation mutation breeding of forage and turfgrass in China. Feed Review, 2015(8): 13–15.
王晓龙, 李红, 杨伟光, 等. 我国牧草及草坪草辐射诱变育种研究进展. 饲料博览, 2015(8): 13–15.
- [40] Beyaz R, Yildiz M. The use of gamma irradiation in plant mutation breeding//Plant engineering. Croatia: InTech, 2017.
- [41] Liu R Y, Jin W J, Qu Y, *et al.* Application of heavy ion beam irradiation mutagenesis technology in plant breeding. Guangxi Sciences, 2020, 27(1): 20–26.
刘瑞媛, 金文杰, 曲颖, 等. 重离子束辐射诱变技术在植物育种中的应用. 广西科学, 2020, 27(1): 20–26.
- [42] Powell J B, Burton G W, Young J R. Mutations induced in vegetatively propagated turf bermudagrasses by gamma radiation 1. Crop Science, 1974, 14(2): 327–330.
- [43] Broertjes C, Roest S, Bokelmann G. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. using *in vivo* and *in vitro* adventitious bud techniques. Euphytica, 1976, 25(1): 11–19.
- [44] Xie H M, Hao J F, Wei Z Q, *et al.* Improvement of herbage by heavy ion beams. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2004(1): 61–64.
颜红梅, 郝冀方, 卫增泉, 等. 重离子束对牧草的改良. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004(1): 61–64.
- [45] Erika O K, Shibata S, Magori S, *et al.* Phenotypic characterization of novel, root-regulated hypernodulation mutants of *Lotus japonicus*. England: Oxford University Press, 2007.
- [46] Zhang L, Zhang H X, Zhou D W. Analyzation of forage breeding research between China and foreign regions. Soils and Crops, 2018, 7(3): 324–330.
张亮, 张红香, 周道玮. 中国与国外饲草育种研究现状分析. 土壤与作物, 2018, 7(3): 324–330.
- [47] Bai H Y, Yang W, Wu B. Study on EMS mutagenic treatment of sorghum seeds. China Seed Industry, 2018(3): 57–59.
白鸿雁, 杨伟, 武攀. 高粱种子EMS诱变处理的研究. 中国种业, 2018(3): 57–59.
- [48] Dollinger E J, Singleton W R. Cytogenetic analysis of a spontaneous premeiotic mutation in maize. Particle Systems Characterization, 1954, 19(5): 269–276.
- [49] Nilan R A, Muir C E. Registration of Luther Barley¹ (Reg. No. 92). Crop Science, 1967, 7(3): 278.
- [50] Qi X L, Xu Z B, Pei H C, *et al.* Construction and functional evaluation of an EMS-induced mutant population in barley. Journal of Triticeae Crops, 2012, 32(5): 846–852.
齐新丽, 徐智斌, 裴洪翠, 等. 大麦EMS突变群体的创建及功能评价. 麦类作物学报, 2012, 32(5): 846–852.
- [51] Zhang Y, Shi F L, Zhao H X. Study on the seed germination of the *Bromus inermis* L. seed mutation induced by EMS. Seed, 2018, 37(12): 70–72.
张玥, 石凤翎, 赵海霞. EMS处理对无芒雀麦种子萌发的研究. 种子, 2018, 37(12): 70–72.
- [52] Wang J, Fu B Z. Research progress on chromosome doubling of grass based on bibliometric analysis. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(3): 413–424.
王晶, 伏兵哲. 基于文献计量分析的禾本科牧草染色体加倍研究进展. 草地学报, 2021, 29(3): 413–424.
- [53] Zhang F S, Wang Q. Research progresses in the plant breeding of radiation mutation. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2020, 48(6): 39–49, 32.
张丰收, 王青. 植物辐射诱变育种的研究进展. 河南师范大学学报(自然科学版), 2020, 48(6): 39–49, 32.
- [54] Cheng Y H, Zhao R X, Dong K H. Research progress on selection of herbage salt-tolerant mutant. Pratacultural Science, 2008 (11): 28–35.

- 程钰宏, 赵瑞雪, 董宽虎. 牧草耐盐突变体筛选的研究进展. 草业科学, 2008(11): 28—35.
- [55] Dong W K, Lu X P, Jiang H Y, *et al.* EMS mutagenesis and drought tolerant evaluation of *Loium perenne* L. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(10): 1889—1897.
董文科, 路旭平, 姜寒玉, 等. 多年生黑麦草EMS诱变与耐旱性评价. 核农学报, 2018, 32(10): 1889—1897.
- [56] Li H, Li B, Yang Z, *et al.* Effect of ^{60}Co - γ ray radiation on seedling growth and activity of two antioxidant enzymes in alfalfa seedlings. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26(1): 216—221.
李红, 李波, 杨翌, 等. ^{60}Co - γ 射线辐射对苜蓿幼苗生长和两种抗氧化酶活性的影响. 草地学报, 2018, 26(1): 216—221.
- [57] Han W B, Liu J L, Zhu R F, *et al.* Breeding of a new *Leymus chinensis* variety Jingmu 3 by ^{60}Co - γ mutagenesis. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(1): 111—113.
韩微波, 刘杰淋, 朱瑞芬, 等. ^{60}Co - γ 射线诱变处理选育羊草新品种菁牧3号. 黑龙江畜牧兽医, 2019(1): 111—113.
- [58] Pan D F, Zhang Y X, Shen Z B, *et al.* Effects of fast neutron irradiation on seed germination and seedling growth of *Leymus chinensis*, *Bromus inermis* and *Elymus sibiricus*. Pratacultural Science, 2012, 29(8): 1240—1244.
潘多锋, 张月学, 申忠宝, 等. 快中子辐射对3种禾草种子萌发及幼苗生长的影响. 草业科学, 2012, 29(8): 1240—1244.
- [59] Zhang J J, Jin X, Mao P H, *et al.* Preliminary study on argon ion implantation mediated *Glycyrrhiza uralensis* genome DNA transformation into Agonguin alfafa. Seed, 2008(4): 57—59.
张建军, 金湘, 毛培宏, 等. 氩离子注入介导甘草总DNA在阿尔冈金紫花苜蓿中转化的初步研究. 种子, 2008(4): 57—59.
- [60] Yang H S, Chang G Z, Zhou X H. Performance of Hangmu No. 1 alfalfa in the Lanzhou region. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(9): 138—145.
杨红善, 常根柱, 周学辉. 航天诱变航苜1号紫花苜蓿兰州品种比较试验. 草业学报, 2015, 24(9): 138—145.
- [61] Qiao Y, Shi F L, Xiong M, *et al.* Effect of EMS mutagenesis on seed germination of *Bromus ciliatus* L. and *Medicago ruthenica* (L.) Sojak. cv. Zhilixing. Seed, 2016, 35(3): 98—100.
乔雨, 石凤翎, 熊梅, 等. EMS诱变对缘毛雀麦和直立型扁蓿豆种子萌发的影响. 种子, 2016, 35(3): 98—100.
- [62] Zang H, Wu Z N, Kong L Q, *et al.* Effect of ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis on seed germination and seedling growth of *Leymus chinensis*. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(17): 5765—5769.
臧辉, 武自念, 孔令琪, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变对羊草种子萌发及幼苗生长的影响. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5765—5769.
- [63] Li J Q, Wang L H, Zhan Q W, *et al.* In vitro mutation induction by NaN_3 in ryegrass variety “Blue Heaven” and RAPD analysis for its variation. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(1): 276—281.
李杰勤, 王丽华, 詹秋文, 等. 蓝天堂黑麦草的 NaN_3 诱变及其RAPD分析. 草业学报, 2013, 22(1): 276—281.
- [64] Han X G, Xue Z Y, Zhi D Y, *et al.* High-efficiency inducement and salt-tolerant mutant selection of embryonic calli of *Festuca arandinaea*. Acta Prataculturae Sinica, 2005(6): 112—118.
韩晓光, 薛哲勇, 支大英, 等. 高羊茅胚性愈伤组织的高效诱导及其耐盐突变体筛选. 草业学报, 2005(6): 112—118.
- [65] Li B, Wu T T. Effects of NaN_3 mutagenesis and saline-alkali stress on growth and physiological characteristics of alfalfa callus. Agricultural Research in the Arid Areas, 2019, 37(2): 130—135, 143.
李波, 邬婷婷. NaN_3 诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织生长和生理特性的影响. 干旱地区农业研究, 2019, 37(2): 130—135, 143.
- [66] Qin X C, Wang F, Wang X J, *et al.* Effect of combined treatment of ^{60}Co - γ and EMS on antioxidase activity and ODAP content in *Lathyrus sativus*. Chinese Journal of Applied Ecology, 2000(6): 957—958.
覃新程, 王飞, 王晓娟, 等. ^{60}Co - γ 射线与EMS复合处理对山豆抗氧化酶活力及ODAP含量的影响. 应用生态学报, 2000(6): 957—958.
- [67] Gu Z P, Zheng G C. Selection for salt-tolerant callus of sainfoin by radiation of fast neutron and culture on medium containing salt. Chinese Journal of Biotechnology, 1991, 7(1): 72—76.
谷祝平, 郑国锡. 快中子辐射诱变和盐培养基选择红豆草耐盐愈伤组织变异系的研究. 生物工程学报, 1991, 7(1): 72—76.
- [68] Li B, Lin H, Wu T T, *et al.* Effects of NaN_3 and UV combined mutagenesis on the growth of alfalfa callus under drought and salt stress. Agricultural Research in the Arid Areas, 2018, 36(4): 187—192.
李波, 林浩, 邬婷婷, 等. NaN_3 和紫外线复合诱变对苜蓿愈伤组织在干旱和盐胁迫下生长的影响. 干旱地区农业研究, 2018, 36(4): 187—192.
- [69] Prigge V, Xu X, Li L, *et al.* New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled

- haploid technology in maize. *Genetics*, 2012, 190(2): 781–793.
- [70] Thompson K. Homozygous diploid lines from naturally occurring haploids. Germany: Konradin Industrieverlag GmbH, 1974.
- [71] Stanford E H, Clement W M. Cytology and crossing behavior of a haploid alfalfa plant. *Agronomy Journal*, 1958, 50(10): 589–592.
- [72] Ma R, Guo Y D, Pulli S. Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale*). *Plant Cell*, 2004, 76(2): 147–157.
- [73] Wang N, Jiang T, Wang B X, *et al.* Advances in haploid breeding technology and its application in alfalfa and other legume forages. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(6): 756–763.
王娜, 姜腾, 王彬锡, 等. 单倍体育种技术研究进展及其在苜蓿等豆科牧草中的应用. *植物学报*, 2022, 57(6): 756–763.
- [74] Ferraz M E, Fonsêca A, Pedrosa-Harand A. Multiple and independent rearrangements revealed by comparative cytogenetic mapping in the dysploid leptostachyus group (*Phaseolus* L., Leguminosae). *Chromosome Research*, 2020, 28 (3/4): 395–405.
- [75] Guo Y, Mizukami Y, Yamada T. Genetic characterization of androgenic progeny derived from *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* cultivars. *New Phytologist*, 2005, 166(2): 455–464.
- [76] Niu K J, Ma H L. Research progress in protoplast culture and fusion technologies of gramineous forage and turfgrass plants. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, 24(4): 738–746.
牛奎举, 马晖玲. 禾本科牧草及草坪草原原生质体培养与融合技术研究进展. *草地学报*, 2016, 24(4): 738–746.
- [77] Xia G. Progress of chromosome engineering mediated by asymmetric somatic hybridization. *Journal of Genetics*, 2009, 36(9): 547–556.
- [78] Dai X M, Huang T D, Sun A H, *et al.* Advances in plant protoplast fusion and its application in breeding. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(8): 1516–1521.
戴雪梅, 黄天带, 孙爱花, 等. 植物原生质体融合研究进展及其在育种中的应用. *热带作物学报*, 2012, 33(8): 1516–1521.
- [79] Cai Y, Xiang F, Zhi D, *et al.* Genotyping of somatic hybrids between *Festuca arundinacea* Schreb. and *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(10): 1809–1819.
- [80] Li Y Z, Shi S L. Protoplasts culture and asymmetric somatic hybridization between *Medicago sativa* and *Lotus corniculatus*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(1): 40–48.
李玉珠, 师尚礼. 紫花苜蓿与百脉根原生质体培养及不对称体细胞杂交. *核农学报*, 2015, 29(1): 40–48.
- [81] Zhao X Q, Ma H L, Zhou W H, *et al.* Protoplasts culture and fusion from callus of *Poa pratensis* L. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(4): 737–743.
赵小强, 马晖玲, 周万海, 等. 草地早熟禾原生质体培养与融合. *核农学报*, 2010, 24(4): 737–743.
- [82] Zhou X, Xia Y, Ren X, *et al.* Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 351.
- [83] Fang C, Han J G. Outline to genetic linkage maps construction of pastures. *Acta Agrestia Sinica*, 2006(3): 287–291.
方程, 韩建国. 牧草遗传连锁图谱构建研究概述. *草地学报*, 2006(3): 287–291.
- [84] Bagge M, Xia X, Lübberstedt T. Functional markers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(2): 211–216.
- [85] Koebner R, Summers R. The impact of molecular markers on the wheat breeding paradigm. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2002, 7(2B): 695–702.
- [86] Jin J B, Liang C Z. Research advances in forage grass genomics. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(6): 732–741.
金京波, 梁承志. 饲草基因组学研究进展. *植物学报*, 2022, 57(6): 732–741.
- [87] Xu C B, Wang Y, Zhao L X, *et al.* Research progress of forage germplasm resources innovation in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(5): 809–815.
徐春波, 王勇, 赵来喜, 等. 我国牧草种质资源创新研究进展. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(5): 809–815.
- [88] Horn M, Shillito R, Conger B, *et al.* Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(7): 469–472.
- [89] Li M F, Xu C T. Research progress of transgenic forage grass. *China Animal Industry*, 2012, 357(6): 59–60.
李明福, 徐传涛. 转基因牧草研究进展. *中国畜牧业*, 2012, 357(6): 59–60.
- [90] Liu Z P, Zhou Q, Liu W X, *et al.* Some scientific issues of forage breeding in China. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(12):

184–193.

刘志鹏, 周强, 刘文献, 等. 中国牧草育种中的若干科学问题. 草业学报, 2021, 30(12): 184–193.

- [91] Yu H, Lin T, Meng X, *et al.* A route to *De novo* domestication of wild allotetraploid rice. *Cell*, 2021, 184: 1156–1170, 1114.
- [92] Deng X, Li T, Cao X F. Application and prospect of gene editing in forage grass breeding. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(2): 233–240.
邓娴, 李彤, 曹晓风. 基因编辑在饲草育种中的应用与展望. 植物学报, 2023, 58(2): 233–240.
- [93] Zheng Y H, Liu J X, Chen S Y. RAPD analysis of merit selections of *Cynodon dactylon* in China. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2005(2): 6–9.
郑玉红, 刘建秀, 陈树元. 中国狗牙根(*Cynodon dactylon*)优良选系的RAPD分析. 植物资源与环境学报, 2005(2): 6–9.
- [94] Mao P S, Zhang T, Yang Q C. Study on the verification of alfalfa cultivars by RAPD molecular markers. *Acta Agrestia Sinica*, 2007(2): 124–128.
毛培胜, 张涛, 杨青川. 紫花苜蓿品种鉴定的RAPD分子标记技术研究. 草地学报, 2007(2): 124–128.
- [95] Mi F G, Barre P, Qu L J, *et al.* Quantitative trait loci of lamina length in perennial ryegrass. *Acta Agrestia Sinica*, 2004(4): 303–307, 321.
米福贵, Barre Philippe, 瞿礼嘉, 等. 多年生黑麦草叶片长度数量性状位点(QTLs)研究. 草地学报, 2004(4): 303–307, 321.
- [96] Daniel F, Elisabeth V, Daniel G, *et al.* Ultralong oxford nanopore reads enable the development of a reference-grade perennial ryegrass genome assembly. *Genome Biology and Evolution*, 2021, 13(8): evab159.
- [97] He F, Wei C, Zhang Y, *et al.* Genome-wide association analysis coupled with transcriptome analysis reveals candidate genes related to salt stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2022(12): 3407.
- [98] Zhou X L, Yang Q C, Wang P Q, *et al.* Recent progresses in the studies of transfer genes in alfalfa. *Journal of Chongqing University (Natural Science Edition)*, 2005(4): 126–130.
周兴龙, 杨青川, 王凭青, 等. 苜蓿转基因研究进展. 重庆大学学报(自然科学版), 2005(4): 126–130.
- [99] Dong S, Tredway L P, Shew H D, *et al.* Resistance of transgenic tall fescue to two major fungal diseases. *Plant Science*, 2007, 173(5): 501–509.
- [100] Bao Y, Zhao R, Li F, *et al.* Simultaneous expression of *Spinacia oleracea* Chloroplast Choline Monoxygenase (CMO) and Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) genes contribute to dwarfism in transgenic *Lolium perenne*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29(2): 379–388.
- [101] Singer S D, Burton Hughes K, Subedi U, *et al.* The CRISPR/Cas9-mediated modulation of *Squamosa Promoter-Binding Protein-Like 8* in alfalfa leads to distinct phenotypic outcomes. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 3203.
- [102] Zheng L, Wen J, Liu J, *et al.* From model to alfalfa: gene editing to obtain semidwarf and prostrate growth habits. *The Crop Journal*, 2022, 10(4): 932–941.
- [103] Annicchiarico P, Barrett B, Brummer E C, *et al.* Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2015, 34(1/2/3): 327–380.
- [104] Liu G S, Wang D L, Shi F L, *et al.* Review of study on germplasm resources of *Leymus chinensis* and its inspirations. *Chinese Journal of Grassland*, 2022, 44(4): 1–9.
刘公社, 王德利, 石凤翎, 等. 羊草种质资源研究历程及启示. 中国草地学报, 2022, 44(4): 1–9.
- [105] Wanga M A, Shimelis H, Mashilo J, *et al.* Opportunities and challenges of speed breeding: A review. *Plant Breeding*, 2021, 140(2): 185–194.