

化体系的提供了前提条件。Christiansen 等^[5]利用基因枪法转化短柄草,获得了转基因植株,平均转化率为 5.3%。Olsen 等^[8]首次将黑麦草和拟南芥的开花抑制蛋白基因 LpTFL1、TFL1 转入短柄草基因型 BDR017(4n)和 BDR018(2n)中,使转基因植株的抽穗期延迟达 10 周。但基因枪转化后存在基因整合复杂,拷贝数多,易缺失,遗传稳定性不高以及基因沉默等问题^[9],而农杆菌转化法操作容易、成本低、单拷贝整合率高,而且外源基因在转基因植株后代中比较稳定,因此农杆菌介导法为短柄草遗传转化开辟了一条新途径。

Vogel 等^[3]首次利用农杆菌转化短柄草 14 个基因型,其中有 10 个获得了转基因植株,转化效率为 0.4%~15%。Pocurac 等^[10]利用农杆菌转化二倍体短柄草 BDR 018 的愈伤组织,通过优化预培养时间等条件得到较高的转化效率。Philippe 等^[11]以短柄草 Bd21 作为外植体,农杆菌介导转化后,17%的胚性愈伤组织可以产生转基因植株。

小麦为异源六倍体,基因组庞大,转化效率低,这些特征使其在研究上极其复杂,而短柄草与小麦、大麦和燕麦等重要经济作物同属于早熟禾亚科,且与小麦一样具有二倍体、四倍体和六倍体^[1,2,5,7]。另外 Draper 等^[1]研究证明,小麦锈病

和白粉病以及水稻稻瘟病等都可以侵染某些短柄草,进一步体现了其作为模式植物研究小麦与其病原物互作及相关功能基因的价值。农杆菌介导的部分短柄草遗传转化国外已有报道,但转化效率存在较大差异,而国内关于这方面的报道较少,目前没有关于短柄草 ABR 6 遗传转化方面的研究。本试验利用二倍体短柄草 ABR 6 为材料,在前期高效再生体系的基础上^[12],通过优化诱导培养基类型、潮霉素筛选浓度、农杆菌侵染浓度等参数来建立稳定高效的遗传转化体系,旨在为小麦等禾谷类作物功能基因组研究和品质改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

二倍体短柄草 ABR 6 的种子由美国普渡大学许金荣教授馈赠。

1.2 菌株及植物表达载体

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 AGL1 由美国普渡大学许金荣教授提供,植物表达载体 pCAMBIA1302 来自西北农林科技大学植物与病原互作实验室,其包含潮霉素(Hygromycin, Hpt)基因、mGFP5* 基因、双 CaMV35S 启动子(图 1)。

图 1 pCAMBIA1302 表达载体

Fig. 1 A linear map of the T-DNA region of pCAMBIA 1302

1.3 培养基的选择

选取开花后 14 d 的 ABR 6 种子,先用添加 0.1% triton X-100 的 2%(w/v)次氯酸钠消毒处理 3~4 min,再用无菌水清洗 3 次,然后用镊子挑取种子内未成熟的胚(图 2-A),接种到添加 0.6 mg·L⁻¹ CuSO₄、2.5 mg·L⁻¹ 2,4-D^[7]、30 g·L⁻¹ 麦芽糖和 7.0 g·L⁻¹ 琼脂的五种不同培养基(具体见表 1)中,pH 值 5.8,于 24±2℃暗培养下诱导愈伤组织,30 d 后统计胚性愈伤组织诱导率。

1.4 潮霉素筛选浓度的选择

将胚性愈伤组织转移到含有 0、10、20、40、60 mg·L⁻¹ 潮霉素的培养基上,分别于 15 d 和 30 d 后统计胚性愈伤组织生长状况。

1.5 根癌农杆菌侵染愈伤组织的浓度

用 MG/L 液体培养基培养含有二元载体的农杆菌菌株,离心收集菌体重悬至 LS 培养基中,分别用 OD₆₀₀ 为 0.4、0.6、1.2 的农杆菌菌液侵染胚性愈伤组织,经相同条件的共培养、筛选和分化生根后,统计各浓度下的转化频率。

1.6 转基因植株 DNA 提取及 PCR 检测

取不少于 100 mg 对照植株及转基因植株叶片,经液氮充分研磨后用快速植物基因组试剂盒提取 DNA。PCR 引物根据潮霉素磷酸转移酶基因序列设计。引物序列为,S:5'-TAGGAGGGC-GTGGATATGTC-3; AS: 5'-TACACAGCCA-TCGGTCCAGA-3'。

反应体系为 2.5 μL 10×Taq buffer,2.0 μL 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂,0.4 μL 10 mmol·L⁻¹

dNTP, 0.3 μL Taq DNA polymerase, 0.5 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 1.0 μL DNA 模板补水至总体积 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测确认扩增产物。

1.7 mGFP5⁺ 的荧光显微镜观察

将 PCR 扩增出条带的转化植株叶片切成 1 cm 左右的小块, 制成玻片后在荧光显微镜下观察是否有绿色荧光蛋白表达。

2 结果与分析

2.1 不同诱导培养基上愈伤组织的出愈率

将未成熟胚接种于 5 种诱导培养基上, 2 周后可形成愈伤组织, 30 d 后致密的淡黄色胚性愈伤组织大量形成(图 2-B)。

表 1 结果表明, 虽然未成熟胚在 5 种培养基上都能诱导出愈伤组织, 但诱导频率不同, 且差异显著, 说明培养基对愈伤组织出愈率有一定的影响。未成熟胚在 LS 培养基上的出愈率最高, 为

76.27%, 显著高于其它诱导培养基, 是转化前预培养的最佳培养基。

2.2 不同潮霉素浓度对胚性愈伤组织的影响

潮霉素(Hpt)是农杆菌介导禾谷类作物遗传转化中最常用的筛选剂之一^[13]。潮霉素浓度过高容易引起胚性愈伤组织褐化死亡, 过低容易产生过多假阳性植株, 不利于筛选。因此, 筛选合适的潮霉素筛选浓度对遗传转化具有重要作用。

表 2 结果表明, 当 Hpt 浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织在 30 d 后仍有高达 75% 成活率, 存活的胚性愈伤组织能继续生长; 浓度为 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织开始大量死亡, 30 d 后成活率降到 44%; 当 Hpt 浓度达到 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织 3~5 d 开始逐渐褐化, 最终死亡(图 2-C 和 2-D); 当浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织生长受到强烈抑制, 绝大多数在 15 d 时就出现褐化死亡, 只有不到 10% 愈伤组织可以存活, 30 d 时几乎所有胚性愈伤组织死亡。因此, 本实验确定以 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 Hpt 筛选的浓度。

表 1 ABR 6 在 5 种不同培养基上的诱导率

Table 1 Induction rate of embryogenic calli of ABR 6 in five types of culture medium

培养基种类 Type of medium	外植体数 Number of explants	愈伤组织出愈率/% Percentage of Callus induction	胚性愈伤组织诱导率/% Percentage of embryogenic calli induction
MS	90	69.67c	62.33b
LS	90	87.01a	76.27a
B5	90	77.00b	65.41b
N6	90	57.34d	51.23c
MB	90	71.33bc	61.07b

同一列数字后的不同小写字母表示差异显著。

Different small letters in the same column mean difference significant at 0.05 levels, respectively.

表 2 不同潮霉素浓度对胚性愈伤组织的影响

Table 2 Effects of different hygromycin concentrations on embryogenic callus

胚性愈伤组织数 Number of embryogenic callus	Hpt 浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Hpt concentration	胚性愈伤组织成活率/% Survival rate of embryogenic callus	
		培养 15 d 15 days culture	培养 30 d 30 days culture
100	0	98	98
100	10	83	75
100	20	64	44
100	40	7	1
100	60	0	0

2.3 根癌农杆菌侵染浓度对转化效率的影响

农杆菌浓度是短柄草转化的关键因素之一。

本实验(表 3)表明, 在 OD_{600} 为 0.4~0.6 之间, 均可以获得转基因植株(图 2-E 和 2-F), 但当农杆

菌 $OD_{600}=0.6$ 时,转基因频率最高,是短柄草转化的最佳浓度。而在 OD_{600} 为 1.2 时,共培养后,

由于带菌量过大,使得大量胚性愈伤组织出现褐化现象,丧失再生能力,因此很难获得转化植株。

表 3 不同农杆菌浓度下 ABR6 的转化频率

Table 3 Transformation frequency of different agrobacterium concentrations

侵染浓度 Infection concentration / OD_{600}	胚性愈伤组织数 No. of embryogenic callus	抗性愈伤组织数 No. of resistant callus	抗性绿苗数 Resistant green shoots	抗性植株数 Resistant plants	T_0 代 PCR 阳性植株数 PCR positive plants of T_0 generation
0.4	100	23	10	5	2
0.6	100	31	8	7	5

A:短柄草未成熟胚;B:胚性愈伤组织;C和D:筛选过程中褐化的胚性愈伤组织;E和F:再生的转基因植株。

A:immature embryo of *B. distachyon*;B:Embryogenic callus;C and D:Brown embryogenic callus ;E and F:Regeneration of transgenic plants

图 2 转化短柄草的获得过程

Fig. 2 The process of producing transgenic *Brachypodium distachyon*

1:Mark DL2000;2:野生型植株;3~9:转基因植株;10:pCAMBIA 1302 质粒

1:Mark DL2000;2:Wild type plant;3~9:transgenic plants;10:pCAMBIA 1302 plasmid

图 3 Hpt 抗性植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of the Hpt resistant plants

2.4 转基因植株 PCR 检测结果

将获得的 12 株具有潮霉素抗性的再生植株分单株提取 DNA,并进行 PCR 检测。结果(图 3)发现,其中 7 株能特异性地扩增出 845 bp 左右的条带(图 3 中箭头所示),与质粒 DNA 扩增出

A:阴性对照;B:mGFP5* 表达 A:Negative control;B:The expression of mGFP5*

图 4 转化植株绿色荧光蛋白检测

Fig. 4 mGFP5* detection of transgenic *Brachypodium distachyon*

的条带完全相同。因此初步证明这 7 株 ABR 短柄草为潮霉素磷酸转移酶基因的转化植株。

2.5 mGFP5* 的荧光显微镜观察结果

mGFP5* 是野生型绿色荧光蛋白(GFP)经改造后的一个变种。mGFP5* 消除了 GFP 基因中的隐蔽性内含子 V163A、I167T、S175G^[14],可以

避免植物细胞的错误剪接。本实验以未转化植株作为对照(图4-A),将7株PCR呈阳性短柄草T₁代的幼叶,制片后在荧光显微镜(OLYMPUS BX-51)波长为395 nm下观察,发现转基因植株沿着叶脉两侧有绿色荧光蛋白表达(图4-B),而对照没有观察到绿色荧光蛋白表达,再次证实上述植株确为转基因植株。

通过mGFP5*与Hpt的双检测充分证实了上述植株为转基因植株。

3 讨论

新型模式植物短柄草的出现,克服了水稻基因组与小麦基因组遗传距离较远缘^[15]及生活特性差异较大的困难。但农杆菌介导短柄草的遗传转化主要集中在对Bd21的研究上^[16],而不同基因型对遗传转化的敏感性相差巨大,转化条件和转化频率也存在差异。因此建立高效稳定的短柄草ABR 6遗传转化体系具有重要意义。

Hiei等^[17]在水稻和玉米遗传转化研究中认为,培养基组分、农杆菌浓度、筛选标记、载体种类和基因型等是限制农杆菌介导的单子叶植物转化效率的多重因素。胚性愈伤组织的质量是农杆菌转化成功的前提,禾谷类作物玉米、小麦和水稻的愈伤组织除了受基因型和幼胚等多种因素制约外,培养基是影响愈伤组织诱导的另一重要因素。Hiei等^[18]研究还发现,培养基的种类影响了活性细胞的分化速度,影响愈伤组织的诱导率。Ishida等^[18]报道,用LS和N6培养基在玉米未成熟胚转化过程中未得到转基因植株。Fry等^[19]认为,减少接种和共培养培养基中的盐离子浓度对于油菜的转化是至关重要的。Cheng等^[14]研究发现,盐离子浓度减少的培养基增加了农杆菌介导的小麦和玉米转化过程中的T-DNA的转移。1/10 MS培养基使GUS瞬时表达增加了10倍以上,进一步证明培养基对转化效率具有重要的影响作用。Vogel等^[3]也用LS培养基作为转化前的预培养基。Philippe等^[12]则认为,MS改进型培养基MSB3是Bd21转化的最佳预培养基。本试验在不添加任何植物生长调节剂下,发现ABR 6在LS培养基上产生的胚性愈伤组织高达76.27%,明显高于在其它培养基上的诱导率,是转化前最佳预培养基,与Vogel等的结果一致。

Hpt是农杆菌转化和基因枪转化中最常用的筛选剂。转化后的植物细胞具备了潮霉素磷酸转

移酶活性,可以承受一定潮霉素浓度,对胚性愈伤组织转化后生长和分化影响较小,而未转化的植株在此浓度下很快褐化死亡。潮霉素以其筛选时间短、效果显著、假阳性低、基因差异小等优点在玉米和小麦等作物上得到广泛的应用^[20-23],是单子叶植物较为理想的筛选剂。通常情况下,筛选剂浓度应略低于植物组织全部死亡时的浓度,这样才能高效的进行转化筛选。本试验发现,40 mg·L⁻¹潮霉素是筛选的最佳浓度,转化的胚性愈伤组织褐化率达到60%以上,起到了较好的筛选效果。

Cheng等^[13]研究发现,农杆菌侵染小麦外植体的浓度不同,GUS瞬时表达和转化频率也不尽相同。农杆菌浓度过低则GUS表达量下降,过高则对愈伤组织伤害较大。Cheng等^[15]研究证明,在不同组织的小麦外植体遗传转化过程中,较高浓度的农杆菌确实可以增加GUS瞬时表达,但这与高频转化效率无直接联系。过高或过低农杆菌的浓度都会降低转化频率,过低侵染的效率较低;而过高造成共培养后带菌量过大,使得大量胚性愈伤组织出现褐化死亡。因此,合适的农杆菌浓度才是高效转化体系的关键所在。本试验发现,农杆菌浓度在 $OD_{600}=0.6$ 时其转化效率最高(可达5%),与Vogel等^[3]的实验结果一致。

本实验以二倍体短柄草ABR 6为材料,通过优化诱导培养基类型、筛选剂浓度、农杆菌浓度等参数,明确了LS培养基是ABR 6胚性愈伤组织的最佳预培养基,最佳Hpt筛选浓度是40 mg·L⁻¹,农杆菌浓度在 $OD_{600}=0.6$ 时,转化效率最高,为5%。转基因植株通过PCR检测和绿色荧光蛋白检测,证实了转基因植株获得成功,成功建立了农杆菌介导的短柄草遗传高效转化体系,这为小麦的功能基因和小麦与病原互作的研究以及小麦品种改良奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Draper J, Mur L A, Jenkins G, et al. *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1539-1555.
- [2] Hasterok R, Draper J, Jenkins G. Laying the cytotoxic foundations of a new model grass *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv[J]. *Chromosome Research*, 2004, 12: 397-403.
- [3] Vogel J P, Garvin D F, Leong O M, et al. Agrobacterium-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2006a, 84: 199.

- [4] Vogel J P, Gu Y Q, Twigg P, *et al.* EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 186-195.
- [5] Christiansen P, Andersen C H, Didion T, *et al.* A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon* [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23: 751-758.
- [6] The International Brachypodium Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* [J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 763-768.
- [7] Bablak P, Draper J, Davey M R, *et al.* Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1995, 42: 97-107.
- [8] Olsen P, Lenk I, Jensen C S, *et al.* Analysis of two heterologous flowering genes in *Brachypodium distachyon* demonstrates its potential as a grass model plant [J]. *Plant Sciences*, 2006, 170: 1020-1025.
- [9] Svitashv S K, Somers D A. Characterization of transgene loci in plants using FISH: A picture is worth a thousand words [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2002, 69: 205-214.
- [10] Daniel I P, Hans T C, Klaus K N. A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L [J]. *Transgenic Research*, 2008, 17: 965-975.
- [11] Philippe V, Barbara W, Vera T, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5: 221-229.
- [12] 董芳, 蔡高磊, 张获, 等. 二穗短柄草幼胚愈伤组织诱导及高频再生体系的建立 [J]. *麦类作物学报*, 2010, 30(6): 1048-1052.
- [13] Cheng M, Lowe B A, Spencer T M, *et al.* Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species [J]. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, 2004, 40: 31-45.
- [14] 赵华, 梁婉琪, 杨永华, 等. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学研究中的应用 [J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(1): 171-178.
- [15] Cheng M, Fry J E, Pang S, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115: 971-980.
- [16] 吴雪莉, 刘金星, Klaus K N, 等. 二穗短柄草幼胚再生体系及农杆菌介导转化的初步研究 [J]. *草业科学*, 2010, 19(5): 9-16.
- [17] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35: 205-218.
- [18] Ishida Y, Saito H, Ohta S, *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 745-750.
- [19] Fry J, Barnason A, Horsch R B. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors [J]. *Plant Cell Report*, 1987, 6: 321-325.
- [20] Gaut B S. Evolutionary dynamics of grass genomes [J]. *New Phytology*. 2002, 154: 15-28.
- [21] Chu C C, Wang C C, Sun C S, *et al.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources [J]. *Science Sinica*, 1975, 18: 659-668.
- [22] Armstrong C L, Rout J R. A novel *Agrobacterium*-mediated plant transformation method [J]. *International Patent Publication WO01/09302 A2*; 2001.
- [23] Pablo J, Ortiz A, Reggiardo M I, *et al.* Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation [J]. *Plant Cell Report*, 1996, 15(12): 877-881.