

# The Exploration of High-Frequencies Plant Regeneration and Genetic Transformation System of *Brachypodium distachyon*

Changmei Song

Shanghai Chenshan Plant Science Research Center of Chinese Academy of Sciences, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai  
Email: 470677558@qq.com

Received: Apr. 13<sup>th</sup>, 2020; accepted: May 19<sup>th</sup>, 2020; published: May 26<sup>th</sup>, 2020

---

## Abstract

To explore the rapid propagation system of *Brachypodium distachyon*, a regeneration system of *Brachypodium distachyon* with high efficiency and good repeatability was established in this paper, using tissue culture techniques, and *Brachypodium distachyon* as research material with callus induction and differentiation. And the genetic transformation system of *Brachypodium distachyon* was explored. The results suggest that: (1) Immature embryos of *Brachypodium distachyon* were used as explants; then efficient plant regeneration of *Brachypodium distachyon* was achieved by callus induction and differentiation; (2) Genetic transformation system for *Brachypodium distachyon* immature embryo callus mediated by *Agrobacterium* was explored; (3) GUS staining was carried out on the immature embryo callus of *Brachypodium distachyon*.

## Keywords

*Brachypodium distachyon*, Immature Embryo, Callus, *Agrobacterium*, Genetic Transformation

---

## 短柄草植株高频再生及遗传转化体系的探索

宋昌梅

上海辰山植物园, 中科院上海辰山植物科学研究中心, 上海  
Email: 470677558@qq.com

收稿日期: 2020年4月13日; 录用日期: 2020年5月19日; 发布日期: 2020年5月26日

---

## 摘要

为了探究短柄草的快速繁殖体系, 本文以短柄草为研究材料, 利用组培技术, 通过对短柄草的愈伤组织

的诱导,建立起一套高效、重复性好的短柄草再生系统;同时对短柄草的遗传转化体系进行了探索。研究结果如下:(1)选择种子作为短柄草的外植体,通过愈伤组织的诱导及分化,可以实现短柄草的高效再生;(2)对农杆菌介导的短柄草幼胚愈伤组织遗传转化进行了探索,(3)对短柄草幼胚愈伤组织进行了GUS染色。

## 关键词

短柄草, 幼胚, 愈伤组织, 农杆菌, 遗传转化

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

短柄草(*Brachypodium distachyon*),是禾本科短柄草属一年生草本植物,原产在亚洲中部、非洲以及欧洲南部。植株较弱小,广泛种植于温带地区,在我国主要分布在海南、广东、广西、台湾等地[1]。

植物的组织培养,不受季节限制,因此可全年连续生产,这对于植物实际生产应用具有重要的现实意义。近年来,水稻、玉米、大麦、黑麦、燕麦、小麦等很多禾本科植物的外植体在离体情况下也可以诱导出愈伤组织[2]-[8]。而在遗传转化方面,水稻、高羊茅、玉米、假俭草、甘蔗、小麦等通过组培技术来建立遗传转化体系的报道更是非常多[6] [9] [10] [11] [12] [13]。

人们对短柄草的栽培和种子产量方面做了一些研究[14] [15],此外,细胞遗传学方面的研究表明,短柄草属于二倍体,染色体的基数为5,包括六倍体、四倍体和二倍体三种类型[16] [17] [18]。分子方面的研究则表明,其基因组大小为300 Mbp,在演化树上短柄草属于一个独立的分支,与麦类植物的亲缘关系较近[19] [20] [21]。在短柄草的组织培养及遗传转化方面,也已经有了较多研究[22]-[27]。

然而,利用短柄草愈伤组织诱导来实现植株的高效再生的研究报道非常少,尤其是实验室短柄草愈伤组织的诱导及植株再生相关报道较少,通过本文的研究,不仅可以为短柄草组培快繁体系的建立提供参考,还可以为短柄草的遗传转化体系的建立提供依据。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 试验材料

本文选用的试验材料为短柄草。

### 2.2. 试验方法

#### 2.2.1. 外植体的选择及消毒

采用短柄草种子中的幼胚为外植体,将短柄草的种子用75%乙醇消毒5 min,无菌水清洗3次,20% NaClO消毒5 min,无菌水清洗5次,在超净工作台内,借助显微镜剥取幼胚。

#### 2.2.2. 愈伤组织的诱导

外植体消毒后,接种于愈伤组织诱导培养基 CIM (4.4 g/LMS + 5.0 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 2.0 g/L 植物凝胶),将平板放入暗培养箱中,培养温度为25℃,培养2~4周。等愈伤组织成熟后,将愈伤组织切下转入继代培养基 RGM (4.4 g/LMS + 5.0 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 2.0 g/L 植物凝胶),生长4周。愈伤

组织诱导率 = (形成愈伤组织的外植体个数/接种的外植体个数) × 100%。

### 2.2.3. 愈伤组织的分化及植株的再生

将不同来源的愈伤组织转入分化培养基 GSE (4.4 g/LMS + 1.0 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖 + 2.0 g/L 植物凝胶), 约 3~4 周后分化培养基上出现不定芽, 同时将不定芽转入继代培养基 GSE (4.4 g/LMS + 1.0 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖 + 2.0 g/L 植物凝胶) 生长 30 天, 统计分化率, 愈伤组织分化率 = (分化出不定芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数) × 100%。愈伤组织转生根培养基 RTM (4.4 g/LMS + 0.5 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 2.0 g/L 植物凝胶), 4 周后统计生根率。生根率 = (生根的不定芽数/接种的不定芽数) × 100%, 生根的小苗接种于组培瓶中继续培养, 等组培苗长大后, 进行盆栽培养。

### 2.2.4. 愈伤组织的遗传转化

在冰箱中取出农杆菌菌液, 接种于 YEB 培养基中(含有利福平等抗性), 选择生长旺盛、颜色鲜黄的愈伤组织, 将其置于农杆菌菌液中浸染 5~10 分钟, 用吸水纸吸去菌液, 用灭菌的滤纸吸去愈伤组织表面的菌液。上述愈伤组织转移到灭菌干燥滤纸上, 25°C~28°C, 共培养 72 h。

### 2.2.5. 抗性愈伤及植株的筛选

转化 3 周后, 将愈伤组织转移到新的抗性诱导培养基上(Rif, Kan<sup>r</sup>), 2 次继代培养后, 将愈伤组织转移到分化培养基上培养, 等抗性再生绿苗出后, 转移到生根培养基中进行生根筛选, 2~3 周后, 抗性苗会陆续生根。

### 2.2.6. Gus 顺时表达的检测

将转化后的愈伤组织浸入 X-Gluc 溶液, 至于 37°C 培养中 8 小时, 用 95% 乙醇脱色, 观察愈伤颜色变化。

### 2.2.7. 实验数据的处理

本文的实验图片采用数码相机拍照, 数据的处理和分析采用软件 Sigma Plot 8.0。

## 3. 结果

### 3.1. 短柄草外部形态及外植体

如图 1 所示, 本文选取短柄草为研究材料, 短柄草是一年生草本植物, 叶片较小较宽图 1(A), 纺锤型穗子与小麦等植物的相似图 1(B), 柄较短。选取种子的幼胚作为外植体图 1(C), 经过 75% 乙醇和 20% NaClO 消毒后, 接种于愈伤诱导培养基, 进行愈伤组织的诱导。



Figure 1. Explants of *Brachypodium distachyon*  
图 1. 短柄草外植体

### 3.2. 胚型愈伤组织的诱导

如图 2 所示, 幼胚在培养平板上培养一周后, 开始出现淡黄色的颗粒状愈伤组织图 2(A), 将这些愈伤组织切下, 转入继代培养基中继续培养, 如图 2(B)所示, 此时, 会逐渐出现大块黄色颗粒块状愈伤组织。由下图可见, 愈伤组织诱导率较高, 每个幼胚都能长出很多愈伤组织块, 愈伤组织诱导率为 100%。

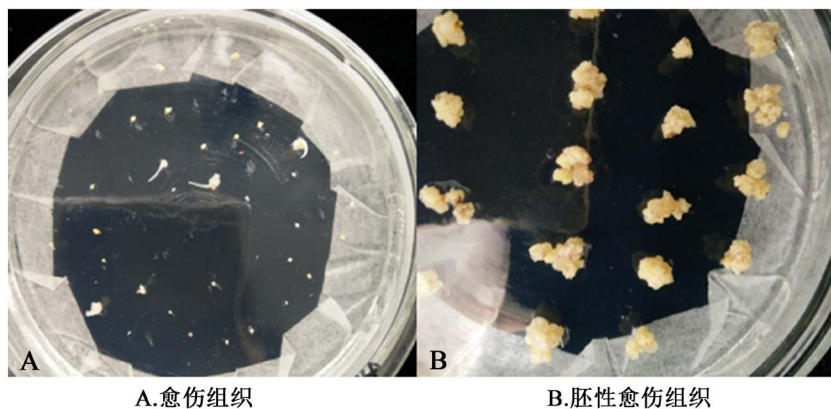


Figure 2. Suspended callus induction  
图 2. 愈伤组织的诱导

### 3.3. 愈伤组织的分化

如图 3 所示, 将黄色致密愈伤组织切下(D), 转入分化培养基 GSE 进行不定芽的诱导, 3 周后开始出现不定芽(E), 每个愈伤组织团可以分化出多个不定芽, 将不定芽切下转入继代培养基继续培养, 不定芽逐渐长出幼嫩细小的叶和茎(F)。由下图可见, 愈伤组织分化率较高, 每团愈伤组织都能分化出多个不定芽, 愈伤组织分化率为 98%, 接近 100%。

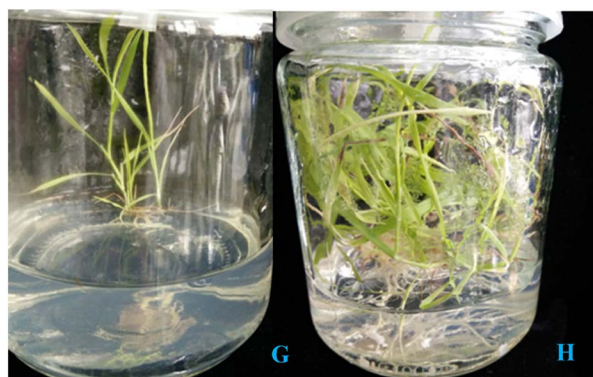


愈伤组织的分化

Figure 3. Callus differentiation  
图 3. 愈伤组织的分化

### 3.4. 植株的再生

如图 4 所示, 该图为不定芽的生根阶段。不定芽在生根培养基上生长 1 周后, 开始长出幼嫩的小根图 4(G), 实现了短柄草植株的再生。再培养一段时间后, 幼苗逐渐长成健壮的植株图 4(H), 则可以移到小盆中进行土栽培养。

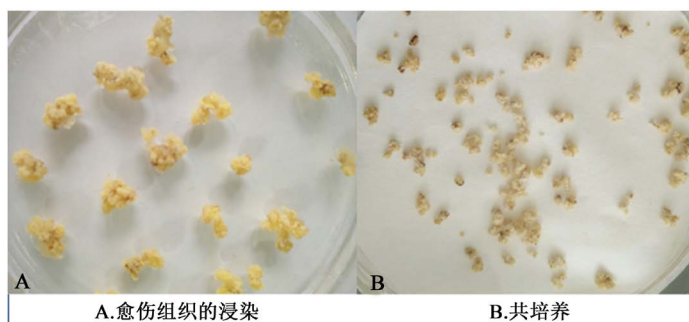


再生苗的生根

**Figure 4.** Plant regeneration of *Brachypodium distachyon***图 4.** 短柄草植株再生

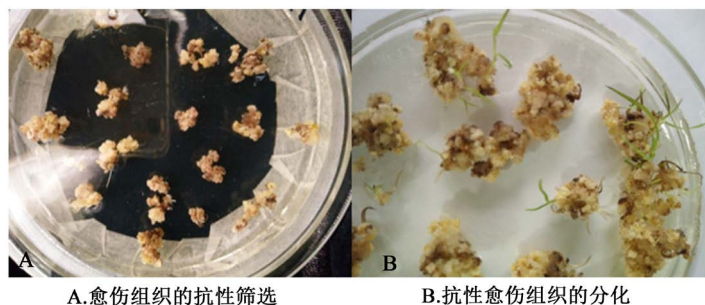
### 3.5. 愈伤组织的浸染及共培养

如图 5 所示，选择结构比较密实的愈伤组织，将愈伤组织在农杆菌菌液中浸染 5 min 后，将其转移到灭菌的干净滤纸上，共培养 2~3 天，将愈伤组织转移到抗性筛选培养基上进行愈伤组织的筛选。

**Figure 5.** Callus transformation**图 5.** 愈伤组织的转化

### 3.6. 愈伤组织的抗性筛选及分化

如图 6 所示，将共培养后的愈伤组织转移到抗性平板上进行抗性筛选，2~3 周后，大部分愈伤组织在抗性筛选压力下，逐渐褐化，将鲜亮的愈伤组织继代培养后，转移到分化培养基上进行再生芽体的诱导。3~4 周后，一部分愈伤组织逐渐分化出再生苗(芽)，再将其进行继代培养。

**Figure 6.** Resistant callus differentiation**图 6.** 抗性愈伤组织的分化

### 3.7. 再生苗的生根

如图 7 所示, 将抗性再生幼苗(芽)转移到生根培养基上, 进行生根诱导, 同时生根培养基是含抗性的培养基, 2~3 周后, 植株逐渐生根。



抗性苗的生根

**Figure 7.** Root characteristics in regenerated shoots

**图 7.** 抗性苗的生根

### 3.8. GUS 顺时表达的检测

如图 8 所示, 将共培养后的愈伤组织进行 GUS 染色, 结果中出现无色到深蓝色, 无色的说明 GUS 基因没有在愈伤组织中表达, 深蓝色和浅蓝色说明 GUS 基因在愈伤组织中进行了表达。



愈伤组织GUS染色

**Figure 8.** GUS staining

**图 8.** GUS 染色

## 4. 讨论与结论

目前, 对短柄草的组织培养方面有了一些研究[26] [27], 但研究并不系统, 尤其是短柄草的遗传转化研究不多。生长旺盛、分裂能力强的细胞和组织器官更有利于植物的遗传转化, 故本文选择生长致密的愈伤组织作为转化材料, 来进行农杆菌的转化。农杆菌感染浓度及时间、共培养时间及温度, 以及适当的预培养对转化的成功与否有着很大的影响, 本文在结合文献的基础上, 共培养时间选择 72 h。

此外, 由于不同培养基、不同激素对禾本科植物植株的再生体系以及遗传转化也有较大影响, 故不同培养基的优化实验以及不同激素的优化实验, 包括抗性植株分子方面的检测等, 这些后续实验正在进行中。

综上所述, 本文通过组织培养, 建立了短柄草的再生体系。同时对短柄草的遗传转化体系进行了初步探索。

## 基金项目

本研究由上海市绿化与市容局(G162418)课题提供资助。

## 参考文献

- [1] Tateoka, T. (1957) Proposition of a New Phylogenic System of Poaceae. *Journal of Japanese Botany*, **32**, 275-287
- [2] Linacero, R. and Vazpuez, A.M. (1986) Somatic Embyogenesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues of Rye (*Secale cereale* L). *Plant Science*, **44**, 219-222. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90094-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90094-4)
- [3] 刘少翔, 王卉, 孙毅. 小麦幼胚的脱分化状态及再生性能研究[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 64-67.
- [4] 赵锦慧, 陈龙, 牛子敬. 玉米成熟胚性愈伤组织的诱导、高频再生及转化的研究[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 423-428.
- [5] 王世玉, 郑用璠, 刘亚, 等. 籼稻成熟胚愈伤组织培养影响因素研究[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(4): 296-330.
- [6] 吴关庭, 胡张华, 郎春秀, 等. 农杆菌介导高羊茅遗传转化体系的建立[J]. 核农学报, 2005, 19(5): 340-346.
- [7] 李晓梅, 王闵霞, 秦廷豪, 等. 根癌农杆菌介导甘蔗遗传转化 Bt(cry1Ab)基因[J]. 生物技术通报, 2013(2): 100-105.
- [8] 张芳, 王舟, 宗俊勤, 等. 农杆菌介导的假俭草遗传转化体系的建立[J]. 草业学报, 2011, 20(2): 184-192.
- [9] 付永彩, 吴茂森, 成卓敏. 小麦不同品种外植体的农杆菌转化方法的研究[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(1): 25-28
- [10] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立[J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271.
- [11] 陶传涛, 丁在松, 李连禄, 石云鹭, 赵明. 农杆菌介导玉米遗传转化体系的优化[J]. 作物杂志, 2008(2): 26-29.
- [12] Draper, J., Mur, L.A.J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R. and Routledge, A.P.M. (2001) *Brachypodium distachyon*: A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiology*, **127**, 1539-1555. <https://doi.org/10.1104/pp.010196>
- [13] Hasterok, R., Draper, J. and Jenkins, G. (2004) Laying the Cytotaxonomic Foundations of a New Model Grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Chromosome Research*, **12**, 397-403. <https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000034130.35983.99>
- [14] Becher, T., Haberland, G. and Kooph, H.U. (1992) Callus Formation and Plant Regeneration in Standard and Microexplants from Seedlings of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Reports*, **11**, 39-43. <https://doi.org/10.1007/BF00231837>
- [15] Chen, H., Xu, G. and Loschke, D.C. (1995) Efficient Callus Formation and Plant Regeneration from Leaves of Oats (*Avena sativa* L). *Plant Cell Reports*, **14**, 393-397. <https://doi.org/10.1007/BF00238604>
- [16] Glens, C., Lorz, H. and Jahne, G. (1998) Establishment of a Highly Efficient Regeneration System from Leaf Base Segments of Oat (*Avena sativa* L.). *Plant Cell Reports*, **17**, 441-445. <https://doi.org/10.1007/s002990050422>
- [17] Christiansen, P., Didion, T., Andersen, C.H., Folling, M. and Nielsen, K.K. (2005) A Rapid and Efficient Transformation Protocol for the Grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Reports*, **23**, 751-758. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0889-5>
- [18] Draper, J., Mur, L.A.J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R. and Routledge, A.P.M. (2001) *Brachypodium distachyon*: A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiology*, **127**, 1539-1555. <https://doi.org/10.1104/pp.010196>
- [19] Kellogg, E.A. (2001) Evolutionary History of the Grasses. *Plant Physiology*, **125**, 1198-1205. <https://doi.org/10.1104/pp.125.3.1198>
- [20] Gaut, B.S. (2002) Evolutionary Dynamics of Grass Genomes. *New Phytologist*, **154**, 15-28. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00352.x>
- [21] Bennett, M.D., Bhandol, P. and Leitch, I.J. (2000) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and Their Modern Uses: 807 New Estimates. *Annals of Botany*, **86**, 859-909. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1253>
- [22] Draper, J., Mur, L.A.J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R. and Routledge, A.P.M. (2001) *Brachypodium distachyon*: A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiology*, **127**, 1539-1555. <https://doi.org/10.1104/pp.010196>
- [23] Vogel, J.P., David, F.G., Oymon, M.L. and Daniel, M.H. (2006) *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Inbred

- 
- Line Development in the Model Grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **84**, 199-211. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9023-9>
- [24] Christiansen, P., Didion, T., Andersen, C.H., Folling, M. and Nielsen, K.K. (2005) A rapid and Efficient Transformation Protocol for the Grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Reports*, **23**, 751-758. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0889-5>
- [25] Bablak, P., Draper, J., Davey, M.R. and Lynch, P.T. (1995) Plant Regeneration and Micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **42**, 97-107. <https://doi.org/10.1007/BF00037687>
- [26] Philippe, V., Barbara, W., Vera, T., Neil, M.K., Silvia, C.A., Magdalena, O., Lesley, J.F., Michael, W.B. and John, W.S. (2007) Agrobacterium-Mediated Transformation of the Temperate Grass *Brachypodium distachyon* (Genotype Bd21) for T-DNA Insertional Mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*, **5**, 221-229.
- [27] 吴雪莉, 刘金星, Klaus K Nielsen, 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]. 草业学报, 19(5): 9-16.