

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.00919



新模式植物短柄草模式特性研究进展

叶兴国

(中国农业科学院作物科学研究所 / 农业部作物遗传育种重点实验室 / 国家基因资源与遗传改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 短柄草(*Brachypodium distachyon*)是一种广泛分布于温带地区的禾本科植物, 基因组小、染色体少、DNA 重复序列少、植株较矮、生育期短、种子数量多, 与小麦族植物一样具有二倍体、四倍体和六倍体, 且不需要严格的生长条件和栽培措施, 是小麦等早熟禾谷类理想的模式植物。近几年来, 国际上对短柄草开展了较多研究, 而国内对短柄草的研究尚属空白。本文综述了短柄草细胞遗传学、分子生物学、基因组学、组织培养和遗传转化等方面的研究进展, 对今后的研究和应用趋势进行了简要展望, 以促进国内对短柄草模式特性, 以及小麦等植物结构基因组学和功能基因组学的研究。

关键词: 短柄草; 模式植物; 基因组; 分子标记; 组织培养; 遗传转化

Research Outline on Some Related Characteristics of *Brachypodium distachyon* as a New Model Plant Species

YE Xing-Guo

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Agriculture Ministry for Crop Genetics and Breeding / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China)

Abstract: *Brachypodium distachyon*, a monocot grass plant and widely distributed in temperate areas, has been regarded as a new potential model plant species and studied extensively in recent years because of its smaller genome, less chromosomes, shorter plant height, rapid life cycle, higher seed yield, undemanding growth requirements, and different ploidies similar to *Triticum* including diploid, tetraploid, and hexaploid. But, related research on this plant in domestic is just in initial stage. Cytogenetics, molecular genetics, genomics, mapping, tissue culture, and transformation of *Brachypodium distachyon* were reviewed in this paper, and its further investigation and application were briefly prospected at the same time in order to promote its study on the characteristics as model plant and benefit the structural and functional genomics research of some *Pooideae* species such as wheat and barley.

Keywords: *Brachypodium distachyon*; Model plant; Genomics; Molecular markers; Tissue culture; Transformation

模式植物的选择和利用对于植物遗传分析、基因克隆、基因变异和功能基因组等研究极具价值。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)由于其基因组小、染色体少、倍性低、DNA 重复序列少、植株矮小、生育期短、种子数量多、再生性能强、容易转化等优点, 1980 年以来一直作为双子叶植物中首选的模式植物被生物学家广泛利用^[1-2]。水稻(*Oryza sativa*)除具有类似于拟南芥的一些优点外, 其经济价值较高, 逐步成为单子叶植物的模式植物^[3-4], 这些特点显著促

进了水稻基因组研究, 如基因定位、克隆、功能验证和测序等。但是, 水稻需要严格的生长条件, 且生育期较长, 基因组、DNA 序列与普通小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)等温带禾本科植物差异较大, 限制了水稻作为模式植物在单子叶植物中的通用性。近几年来, 短柄草(*Brachypodium distachyon*)越来越引起国内外分子生物学研究者的重视, 对其植物学特性、细胞遗传学特性、分子生物学特性、基因组学发掘、组织培养和遗传转化性能

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA10Z129)

作者简介: 叶兴国(1963–), 宁夏平罗人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物遗传转化研究。Tel: 010-68919765; E-mail: yexg@mail.caas.net.cn

Received(收稿日期): 2007-12-12; Accepted(接受日期): 2008-01-28.

等进行了研究,可望成为禾本科中除水稻之外的另一种模式植物,以获取禾本科基因组中,尤其是麦类植物基因组中所缺少的重要基因共线区信息等。

1 短柄草植物学特性

短柄草是一种广泛分布于温带地区的禾本科植物,与小麦、大麦和燕麦等同属早熟禾亚科,原产于非洲北部、欧洲南部和亚洲中部,包含约10个亚种^[5]。该植物为一年生,自花授粉,植株高度15~20 cm,生育期70~80 d,植株柔弱,叶片小而宽,穗子纺锤型(与小麦、大麦、牧草等植物的穗型类似),短柄,小穗互生于穗轴上(图1),每小穗包括2朵小花,脱节于颖之上,每小花具1枚雌蕊和3枚雄蕊,披针形外稃顶有一直芒或凸尖,内稃脊上具篦齿状睫毛。温室条件下种植密度每平方米300株,每穗收获10~12粒种子,全株可收获80~200粒^[6-7]。与禾谷类作物相似,种子收获后需要1个月左右的休眠期,完成后熟代谢方可发芽;出苗后经过2周左右低温处理即可完成春化作用,春化时间比小麦短2~3周。麦类作物白粉病菌、条锈病菌和稻类作物稻瘟病菌等均能够侵染短柄草植株,引起相应症状^[6-7]。作者最近的分析表明,短柄草籽粒中不含高分子量麦谷蛋白亚基,低分子量麦谷蛋白亚基也很少。



图1 短柄草植株形态

Fig. 1 Morphological characters of *Brachypodium distachyon*

引自 <http://www.brachypodium.org>.

From <http://www.brachypodium.org>.

2 短柄草细胞遗传学和分子生物学研究

细胞遗传学研究表明^[6-10],短柄草的染色体基数为5条(图2),包含二倍体、四倍体和六倍体3种类型,染色体数分别为10、20和30。第1条染色体最大,着丝粒近中部;第2条染色体次之,着丝粒近端部;第3条染色体短臂长度与第2条染色体几乎相等,着丝粒中部;第4条染色体结构特点与第3条

染色体相同,但其长臂上含有一个5S rDNA主要位点;第5条染色体最小,着丝粒近端部,短臂上含有在短柄草中唯一的45S rDNA主要位点。花粉母细胞减数分裂中期I观察发现,染色体在80%的细胞中形成5个环形二价体(图2),在20%的细胞中形成4个环形二价体和1个棒状二价体,后者均由第5条染色体配对而成,平均每个细胞中的染色体交叉数达9.8以上。

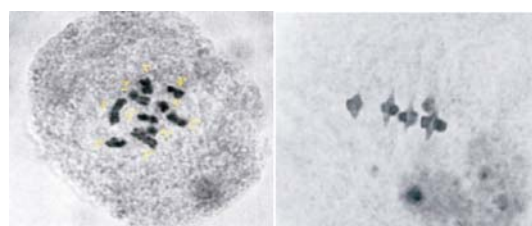


图2 短柄草有丝分裂期染色体组成和减数分裂期染色体构型
Fig. 2 Chromosome composition at mitosis and configuration at meiosis in *Brachypodium distachyon*

引自 Draper 等, 2001. Reprinted from Draper et al., 2001.

分子遗传学研究表明^[6-8,11],二倍体短柄草平均每个细胞中的DNA含量为0.36~0.39 pg,基因组大小约为300 Mbp,大于拟南芥(164 Mbp),小于水稻(441 Mbp)。DNA重复序列12%~15%,低于拟南芥(16%)和水稻(20%)。约35 000个基因在染色体上高密度分布,平均每8~10 kb涵盖一个基因。分别利用短柄草基因组DNA和45S rDNA作为探针进行原位杂交,证明有些生态系多倍体为种间杂交后代,说明该物种和近缘物种间的进化过程复杂。在演化树上 *Brachypodium* 属于一个独立的分枝,是在早熟禾亚科(Pooideae)从稻族(*Oryzeae*)分岔后不久形成,与温带禾草类及麦类植物的亲缘关系比和水稻密切^[6,12-13]。

开发短柄草基因组学资源对于获取温带禾草类植物(如小麦、大麦、黑麦草、柳枝稷等)的遗传信息具有重要意义。国际短柄草协会(International Brachypodium Initiative, IBI)各成员相互合作,从来源于叶片、茎、根、愈伤组织和发育籽粒的5个差异表达的cDNA文库中获得了20 440条EST(Expressed sequence tags)序列,每条EST平均长度650 bp,99.9%的EST序列与SwissProt和GenBank中公布的蛋白质序列和核苷酸序列具有一定相似性,部分EST的系统发生学分析证明短柄草与小麦、大麦的亲缘关系更近,并对EMS诱发短柄草二倍体基因型Bd21-3发生变异的效率进行了评价,大规模创造突变体的工作正在进行之中^[14-15]。大容量DNA插入文库的构建是模式植物结构基因组和功能基因组

研究的基础。Foote 等首先构建了 1 个 *Brachypodium sylvaticum* 的 BAC 文库^[16], 与小麦 BAC 文库比较分析发现, *Brachypodium sylvaticum* 中存在与小麦相似的 *Phl* 位点(控制染色体配对)^[17]。Keller 等对来自 *Brachypodium sylvaticum* 的 371 kb 的 DNA 片段进行测序, 与水稻、小麦中的直向同源区进行比较发现短柄草和小麦具有较高的遗传标记共线性, 水稻在该区段有一个约 220 kb 的倒位, 包含的基因是短柄草的 2 倍, 是小麦的 2.4 倍^[18]。然而, *Brachypodium sylvaticum* 是短柄草的一个多年生变种, 基因组比普通短柄草大^[14,16]。

Hasterok 等构建了 1 个短柄草的 BAC 文库, 但该文库的覆盖度只有基因组的 2.22 倍, 不能满足基于 BAC 文库绘制物理图谱和利用图位法克隆基因的需要^[19]。加州大学先后构建了 3 个短柄草高覆盖度的 BAC 文库, 总覆盖度为基因组的 19.3 倍, 包含 73 728 个克隆, 平均插入片段 100~105 kb, 叶绿体起源的片段占 2.4%~4.4%, 获得了约 6 万个 BAC 末端序列(BAC end sequences, BES), 约 10% 的 BES 与数据库中已知的 DNA 重复序列具有相似性, 约 40% 的 BES 与 EST 库中的序列有关, 尤其与小麦和玉米的 EST 有关, 其中的 122 个 BESs 与小麦 EST 高度匹配, 同时开发了 285 个具有多态性的 SSLP 标记; 发现约 11.0% 的短柄草基因组由已知的 DNA 重复序列组成, 物种特有的重复序列元件占基因组的 7.4%, 编码区占基因组的 21.2%, 重复序列中的大多数为长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)反转录转座子, 如重复序列 BRES-1(*Brachypodium* repetitive element sequence-1)与小麦中的 Bare-1 反转录转座子非常相近, 系统发生学分析再次揭示短柄草与麦类作物的关系比水稻或玉米更近^[14, 20-22]。

遗传图谱是短柄草与水稻、小麦和能源作物基因组联系的纽带。Luo 等构建了 2 个短柄草(Bd-21)的 BAC 文库, 每个文库的覆盖度是基因组的 10 倍, 初步完成了 Bd-21 指纹图谱绘制, 其中的 26 967 个为 *Hind* III 酶解的 BAC 克隆, 在指纹图谱上占 75%; 包括 705 个重叠群和 1 987 个非重叠群, 重叠群平均大小为 0.47 Mbp^[23]。Bevan 等利用 2 个基因型 Bd21 和 Bd3-1 杂交, 正在创建重组自交系作图群体^[24]。

3 短柄草组织培养研究

3.1 短柄草成熟胚培养

作为功能基因组研究的模式植物, 高效再生体系对于建立分子遗传模式系统至关重要。成熟胚取

材和操作方便, 生理状态一致, 是组织培养和遗传转化理想的外植体, 如水稻成熟胚高频率再生体系和转化体系显著促进了水稻功能基因组学研究, 但多数禾本科植物成熟胚再生能力比较差。Babla 等首次开展了短柄草组织培养研究^[25], 以短柄草 3 个二倍体基因型 B200、B373 和 B377 的成熟种子为材料, 分别接种在 LS、MS、N6 和 R2 附加 1.0~6.0 mg L⁻¹ 2,4-D、3% 蔗糖、0.4% 琼脂糖培养基上诱导愈伤组织, 然后将愈伤组织转移到 MSO 或 N6O 培养基上分化植株。结果表明, 接种后 10~12 d 60% 以上的种子在所有培养基上都可以产生愈伤组织, 但愈伤组织质量差异较大, LS、N6 培养基附加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D 最适合从短柄草成熟胚诱导胚性愈伤组织; 开始产生的愈伤组织富含水分、半透明、不易碎, 然后产生致密、生长较块、淡白色、透明、高度折叠的愈伤组织, 培养 21~28 d 时在其上产生干燥、致密、易碎、淡黄色、颗粒状的胚性愈伤组织; 在 LS 附加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D 培养基上, B200 基因型胚性愈伤组织诱导率最高; 在 N6 附加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂无激素分化培养基上, B200 基因型植株再生率最高。

Vogel 等^[26]利用 LS 附加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、3% 蔗糖、0.2% 植物凝胶培养基对 19 个短柄草基因型的成熟胚进行了愈伤组织诱导研究, 胚性愈伤组织诱导率 0.7%~20.3%(图 3), 以 Bd8-2 最高, 胚性愈伤组织在 LS 附加 0.2 mg L⁻¹ 2,4-D、3% 麦芽糖、0.2% 植物凝胶培养基上绿芽分化率 0~85%, 以 Bd14-2 最高。

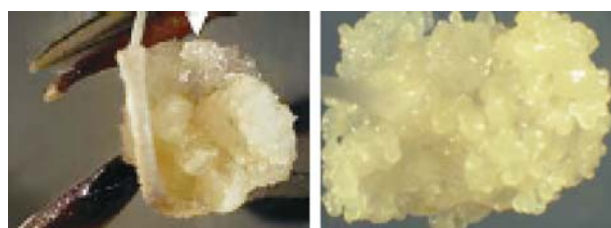


图 3 短柄草成熟胚(左)和未成熟胚(右)来源的胚性愈伤组织
Fig. 3 Embryogenic callus derived from the mature embryos (left) and immature embryos (right) of *Brachypodium distachyon*
引自 Vogel 等, 2001; Christiansen 等, 2005。

Reprinted from Vogel et al., 2006; Christiansen et al., 2005.

3.2 短柄草未成熟胚培养

多数禾本科植物虽然成熟胚再生能力比较差, 但未成熟胚再生能力普遍比较高, 如小麦、玉米、大麦、高粱等, 在成熟胚高频率再生体系尚未建立的情况下, 未成熟胚培养具有独特作用。Draper 等^[6]以短柄草一个二倍体基因型 ABR1 为材料, 开花授粉后 14 d 取不同大小的未成熟胚分别接种在 LS 和

N6 附加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D 培养基上诱导愈伤组织, 继代培养 6 周左右转移到 MSO 或 N6O 培养基上分化植株。结果表明, 接种后 10~15 d 在未成熟胚盾片上产生 I 类愈伤组织(黏性、半透明、松软、棉絮状、黄白色), 进一步在起始愈伤组织上产生 II 类胚性愈伤组织(干燥、致密、易碎、乳白色); 长度 0.3~0.7 mm 的未成熟胚体细胞胚胎发生的潜力最大, 大小合适的未成熟胚在 LS 2.5 培养基上胚性愈伤组织诱导率为 45%, 胚性愈伤组织白苗分化率仅为 7%, 而在 N6 2.5 培养基产生的胚性愈伤组织白苗分化率高达 45%。

Christiansen 等^[10]对短柄草中二倍体基因型和四倍体基因型进行了幼胚培养研究, 愈伤组织诱导培养基为 LS 附加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、3%麦芽糖、0.8%琼脂, 愈伤组织分化培养基为 LS 附加 0.2 mg L⁻¹ BAP、3%麦芽糖、0.8%琼脂。结果表明, 接种后 3~4 周产生颗粒状、淡黄色、易碎的胚性愈伤组织; 四倍体基因型 BDR017 和 BDR030 胚性愈伤组织诱导率分别为 67%和 91%, 高于二倍体基因型 BDR001 和 BDR018(51%和 46%); 所有基因型均能获得再生植株, 但再生率受愈伤组织愈龄影响较大, BDR017、BDR030、BDR001 和 BDR018 愈伤组织愈龄 3~6 周时的再生率为 90%~100%, 8 周时的再生率低于 80%, 培养时间越长再生率越低, 如 BDR017、BDR030 愈伤组织培养 16 周时的再生率分别为 30%和 55%。

Vogel 等^[26]对 19 个短柄草基因型的未成熟胚用 LS 附加 2.5 mg L⁻¹ 2, 4-D、3%蔗糖、0.2%植物凝胶培养基进行了愈伤组织诱导研究, 胚性愈伤组织诱导率 0~33.6%(图 3), 以 Bd4-2 最高, 胚性愈伤组织

在 LS 附加 0.2 mg L⁻¹ KT、3%麦芽糖、0.2%植物凝胶培养基上绿芽分化率 0~94.4%, 以 Bd17-2 最高。Philippe 等^[27-28]将短柄草基因型 Bd21(2n)及其变异系 Bd21-3 幼胚(长度小于 0.3 mm)接种在 MSB3 培养基[MS 无机成分添加 M5 有机成分(2.0 mg L⁻¹ 甘氨酸、0.4 mg L⁻¹ 烟酸、0.4 mg L⁻¹ VB1、0.5 mg L⁻¹ VB6、40.0 mg L⁻¹ 半胱氨酸)、4 g L⁻¹ Fe-EDTA、2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、3%蔗糖、0.2%植物凝胶]上诱导愈伤组织, 胚性愈伤组织诱导率分别为 68%和 94%, 表明 Bd21-3 比 Bd21 具有更好的组织培养力。

4 短柄草遗传转化研究

4.1 基因枪介导的短柄草遗传转化

基因枪介导法是禾本科植物主要转化方法之一, 在小麦、玉米、大麦、草坪草等植物中的应用非常成功, 其明显优点是基因型特异性小、操作简单。Draper 等^[6]从短柄草选择了一个六倍体基因型 ABR100, 其未成熟胚在 LS 2.5 培养基上诱导愈伤组织, 相同培养基上继代培养获得胚性愈伤组织, 利用基因枪介导法和 pAGH 载体(包含 35 启动子控制的 *GUS* 报告基因和 *hgh* 选择标记基因)转化胚性愈伤组织; 轰击后 24 h 对愈伤组织进行 X-Gluc 染色检测, *GUS* 基因有较高的瞬间表达率; 轰击后愈伤组织恢复培养 1 周, 然后在 LS 2.5 附加 40.0 mg L⁻¹ 潮霉素培养基上筛选培养 4 周左右, 抗性愈伤组织转移到 LS 附加 0.2 mg L⁻¹ KT、2.5 g L⁻¹ 植物凝胶、30.0 g L⁻¹ 麦芽糖、30.0 mg L⁻¹ 潮霉素培养基上分化植株。对抗性再生植株进行了 PCR 检测和 Southern blotting 检测, 转化率为 3%~7%, 平均转化率为 5%(表 1)。

表 1 短柄草遗传转化研究主要信息汇总
Table 1 Summary of main researches reported on the genetic transformation of *Brachypodium distachyon*

基因型 Genotype	组织类型 Target tissue	转化方法 Transformation method	外源基因 Target genes	筛选剂 Selection agent	转化效率 Transformation efficiency (%)	参考文献 Reference
ABR100	IEC	Particle	<i>GUS, hgh</i>	Hygromycin	3.0~7.0	Draper et al. ^[6]
BDR017, BDR018, BDR030	IEC	Particle	<i>GUS, bar</i>	Bialaphos	0~5.3	Christiansen et al. ^[10]
BDR018, BDR030	IEC	Particle	<i>LpTFL1, TFL1, bar</i>	Bialaphos	—	Olsen et al. ^[29]
Bd6-1, Bd10-2, Bd12-1, Bd21	IEC, MEC	<i>Agrobacterium</i> /AGL1	<i>GUS, hgh</i>	Hygromycin	0~4.2	Vogel et al. ^[26,30]
Bd21	IEC	<i>Agrobacterium</i> /AGL1	<i>GFP, hgh</i>	Hygromycin	6~17	Philippe et al. ^[27-28]
Bd21	IEC	<i>Agrobacterium</i> /AGL1	<i>hgh</i>	Hygromycin	55	Silvia et al. ^[31]

Christiansen 等^[10]将短柄草幼胚来源的胚性愈伤组织在 LS 附加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、14%麦芽糖、0.8%琼脂培养基上高渗透压前处理 4 h, 同时制备包

裹 pDM803 质粒 DNA(其上的 *GUS* 报告基因和 *bar* 选择标记基因由 Act1 启动子和 Ubi 启动子控制)的金粉子弹, 利用基因枪轰击靶材料。轰击后的愈伤

组织在高渗透压培养基上处理后 24 h, 然后转移到附加 2~14 mg L⁻¹ bialaphos 筛选培养基上培养。2 d 后取部分愈伤组织进行组织化学染色检测, 剩余愈伤组织每 3 周转一次筛选培养基, 抗性愈伤组织在 LS 附加 0.2 mg L⁻¹ BAP、3% 麦芽糖、0.8% 琼脂、2~14 mg L⁻¹ bialaphos 分化培养基上培养 3 周, 将再生芽转移到 1/2 LS 附加 3% 麦芽糖、0.8% 琼脂、5 mg L⁻¹ bialaphos 培养基上进一步生长。结果表明, *GUS* 基因表达率在不同轰击间和不同基因型间差异明显, 每次轰击的蓝点数 0~6 000 个(图 4), BDR001(2n)、BDR017(4n)、BDR018(2n)、BDR030(4n) 平均每次轰击的蓝点数分别为 0、847、1787 和 1608。PCR 和 Southern blotting 确认 4 个基因型的平均转化率分别为 0、3.8%、5.3% 和 4.1%, BDR017、BDR018、BDR030 最高转化率分别为 11%、9% 和 14%。bialaphos 筛选剂浓度 2~14 mg L⁻¹ 对转化效率没有显著影响, 但筛选时间对转化效率影响较大, 筛选时间以 12 周为宜。

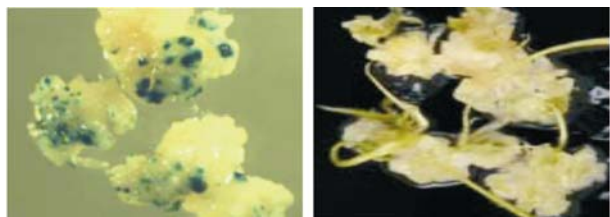


图 4 短柄草胚性愈伤组织转化后 *GUS* 基因瞬时表达(左)和再生情况(右)

Fig. 4 *GUS* transient expression (left) and regeneration (right) from the transformed embryogenic calli of *Brachypodium distachyon*

引自 Christiansen 等, 2005; Philippe 等, 2007。

Reprinted from Christiansen et al., 2005; Philippe et al., 2007.

Olsen 等^[29]以 Christiansen 等^[10]报道的组织培养和基因枪转化程序为基础, 利用 pK29 质粒(含 Ubi 启动子控制的 *bar* 基因)与 pAHC27-LpTFL1 质粒或 pAHC27-TFL1 质粒(目标基因由 Ubi 启动子控制)共转化法, 分别将来自多年生黑麦草和拟南芥中的开花抑制蛋白基因 *LpTFL1*、*TFL1* 转入 2 个短柄草基因型 BDR017(4n)、BDR018(2n), 转基因植株的抽穗期延迟达 10 周之多, 首次在短柄草中表达了单子叶植物和双子叶植物来源的基因, 证明了其作为禾本科模式植物的潜力。

4.2 农杆菌介导的短柄草遗传转化

农杆菌介导法是最主要的植物转化方法, 具有转化效率高、转移片段明确、整合拷贝数低等特点。对于模式植物而言, 建立农杆菌介导的遗传转化体

系比建立基因枪介导的遗传转化体系更为重要。1994 年以来, 利用农杆菌介导法在水稻、玉米、小麦、高粱、甘蔗、香蕉、草坪草等单子叶植物上取得了很大进展。Vogel 等^[26,30]利用幼胚来源和成熟胚来源的胚性愈伤组织及 AGL1 菌系和 pOL001 载体(含有 35 启动子控制的 *hgh* 选择标记基因和 Ubi 启动子控制的 *GUS* 报告基因), 首次开展了农杆菌介导转化短柄草的研究。农杆菌在含有适宜抗生素的 MG 固体培养基上培养 2 d, 刮取农杆菌在 LS 添加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、3% 蔗糖、200 μmol L⁻¹ 乙酰丁香酮液体培养基中重悬至 OD 值 0.6 左右, 将胚性愈伤组织放入农杆菌重悬液中感染 5 min, 转移到 LS 添加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、3% 蔗糖、200 μmol L⁻¹ 乙酰丁香酮、0.2% 植物凝胶培养基上共培养 3 d, 再转移到 LS 添加 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D、3% 蔗糖、150 mg L⁻¹ 特美汀、0.2% 植物凝胶培养基上恢复培养 7 d, 然后转移到补充 40 mg L⁻¹ 潮霉素的培养基上筛选培养, 每 2 周继代培养一次, 生长旺盛的抗性愈伤组织转移到 LS 添加 0.2 mg L⁻¹ KT、3% 麦芽糖、150 mg L⁻¹ 特美汀、40 mg L⁻¹ 潮霉素、0.2% 植物凝胶培养基上分化植株。PCR 和 Southern blotting 检测结果表明, 14 个基因型中有 10 个获得了转基因植株, 转化率 0.4%~15.0%, 其中, 以 Bd 17-2 幼胚来源愈伤组织的转化率最高, Bd12-1 是转化成熟胚来源愈伤组织的唯一基因型, 其幼胚来源愈伤组织的转化率为 4.2%, 成熟胚来源愈伤组织的转化率为 13.0%, Bd21 幼胚来源愈伤组织的转化率为 2.5%~4.2%。

Philippe 等^[27-28]将 Bd21 幼胚接种在 MSB3 培养基上诱导愈伤组织, 胚性愈伤组织放入用 MSB 液体培养基(MS 无机成分添加 4 g L⁻¹ Fe-EDTA、1% 甘露醇、1% 蔗糖、45 mg L⁻¹ 乙酰丁香酮)重悬的 AGL1 农杆菌液(含有 pVEC8GFP 载体, GFP 基因由 Ubi 启动子控制, *hgh* 基因由 35 启动子控制)感染 5 min, 弃去菌液后将愈伤组织放在无菌滤纸上干燥处理 7 min, 转移到 MSB3 固体培养基(添加 60 mg L⁻¹ 乙酰丁香酮)上共培养 2 d, 然后转移到 MSB3 固体培养基(添加 225 mg L⁻¹ 特美汀、40 mg L⁻¹ 潮霉素)上筛选 20 d, 再转移到 MSB3 固体培养基(添加 225 mg L⁻¹ 特美汀、20 mg L⁻¹ 潮霉素)上筛选 20 d, 抗性愈伤组织在 MSR26 培养基(MSB3 培养基去除 2,4-D, 添加 0.2 mg L⁻¹ KT、225 mg L⁻¹ 特美汀、20 mg L⁻¹ 潮霉素)上分化植株(图 4), 检测结果表明转化率为 6%~17%。Silvia 等^[31]根据 Philippe 等^[27-28]转化 Bd21 的

程序, 诱导愈伤组织阶段在 MSB3 培养基中增加 CuSO_4 , 累计培养时间延长 1 周, 农杆菌侵染阶段在共培养基中添加葡萄糖和蛋白酶 XIV, 愈伤组织筛选阶段在培养基中增加 CuSO_4 , 筛选时间延长 20 d, 从第二轮筛选开始潮霉素的浓度为 30 mg L^{-1} , 将农杆菌转化 Bd21 的效率提高到了 55%。

5 研究趋势和展望

短柄草植株较小, 适应性强, 不占用太多生长空间, 不象种植水稻那样需要严格的生长条件。生育期短, 籽粒产量较高, 一年可以繁殖 4~5 代, 繁殖系数达 140 左右。未成熟胚和成熟胚愈伤组织诱导率高, 农杆菌介导和基因枪介导的转化体系已经建立, 胚性愈伤组织分化率 90% 以上, 转化效率最高可达 55% 左右。基因组小, 染色体少, DNA 重复序列低, 获得突变体容易, 突变性状容易显现, 具备了模式植物的所有基本特性。尤其, 短柄草基因组序列与黑麦草、小麦、大麦等早熟禾亚科植物高度相似, 很多重要农艺性状与温带禾草类植物相似, 如株型、穗型、粒型、病原菌(锈病、白粉病、赤霉病等)、抗逆性和生长习性等^[31], 含少量低分子量麦谷蛋白亚基, 而不含高分子量麦谷蛋白亚基, 并与小麦一样具有二倍体、四倍体和六倍体, 是小麦等基因组庞大的重要农作物理想的模式植物, 借此来获得目前小麦等早熟禾类植物中尚缺少的遗传信息和基因共线区, 进而对小麦等重要植物进行基因定位、克隆、突变、测序和功能等方面的研究。另外, 还可以在短柄草中模拟鉴定一些与改良小麦等植物有关的抗病基因、抗逆基因、品质基因和生长发育基因的功能。

今后, 短柄草的研究除开发一系列高效实用的二元表达载体、完善高通量农杆菌介导的转化体系外, 将集中在 T-DNA 插入突变体创造、理化诱导突变体创造、EST 序列扩充、高覆盖度 BAC 文库建立和功能基因组研究等方面^[6-7]。目前, 已经开发了短柄草的 20 000 多条 EST 序列^[7,14], 一些实验室正在构建 T-DNA 插入突变体库和 BAC 文库^[7,19,20-22], 以及对侧翼插入位点进行测序^[7]、绘制物理图谱等^[24-25]。预测禾草类植物将是美国未来可再生能源的主要来源, 而对影响这些植物能源相关性状生物学的认识还很少, 迫切需要一种容易操作的温带禾草类模式植物来解决上述问题, 提高禾草类植物的籽粒产量和生物产量, 培育超级能源作物。因此, 美国

农源部资助启动了短柄草基因组打靶测序项目, 将于 2008 年完成^[7](<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/CSP2007/brachypodium.html>)。美国 Joint 基因组研究所计划 2008 年将利用 Shotgun 技术完成短柄草 8 倍基因组测序, 获得 18 万个短柄草 EST 序列(<http://www.brachypodium.org>)。印度政府也资助启动了短柄草功能基因组分析工作^[7]。各国科学家合作, 将在 2008—2009 年间利用定向诱导基因组局部突变技术(targeting induced local lesions in genomes, TILLING)创造足够数量的短柄草突变体^[7,15]。这些研究无疑将促进短柄草作为新模式植物在分子水平上的认识和在小麦等重要作物功能基因组研究中的利用。

References

- [1] Meyerowitz E, Somerville C R. *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994
- [2] Meinke D W, Cherry J M, Dean C, Rounsley S D, Koornneef M. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 1998, 282: 679–682
- [3] Havukkala I J. Cereal genome analysis using rice as a model. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6: 711–714
- [4] Goff S A. Rice as a model for cereal genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2: 86–89
- [5] Tateoka T. Proposition of a new phylogenetic system of *Poaceae*. *J Jpn Bot*, 1957, 32: 275–287
- [6] Draper J, Mur L A J, Jenkins G, Ghosh-Biswas G C, Bablak P, Hasterok R, Routledge A P M. *Brachypodium distachyon*: A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Phys*, 2001, 127: 1539–1555
- [7] Soren K R. *Brachypodium* model plant for temperate grasses, BM62. *Plant Biotechnology*, KVL. (Released in 2006) [2007-11-06] www.kursus.kvl.dk/shares/plgenomics
- [8] Shi Y, Draper J, Stace C. Ribosomal DNA variation and its phylogenetic implication in the genus *Brachypodium* (*Poaceae*). *Plant Syst Evol*, 1993, 188: 125–138
- [9] Hasterok R, Draper J, Jenkins G. Laying the cytotoxic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Chromosome Res*, 2004, 12: 397–403
- [10] Christiansen P, Didion T, Andersen C H, Folling M, Nielsen K K. A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 751–758
- [11] Bennett M D, Bhandol P, Leitch I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses: 807 new estimates. *Ann Bot*, 2000, 86: 859–909
- [12] Kellogg E A. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1198–1205
- [13] Gaut B S. Evolutionary dynamics of grass genomes. *New*

- Phytol*, 2002, 154: 15–28
- [14] Vogel J P, Gu Y Q, Twigg P, Lazo G R, Chingcuanco D, Hayden D M, Donze T, Vivian-Lindsay A, Stamova B, Coleman-Derr D. EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 186–195
- [15] Vogel J P, Gu Y Q, Hayden D M, Lazo G R, Hill T A, Huo N, Tobias C M, Anderson O D, Laudencia-Chingcuanco D, Nieu R. Developing *Brachypodium* resources and methods: EST sequencing, SSLP markers, improved *Agrobacterium*-mediated transformation and EMS mutagenesis. (Released in 2007) [Visited in 2008] <http://www.brachypodium.org>
- [16] Foote T N, Griffiths S, Allouis S, Moore G. Construction and analysis of a BAC library in the grass *Brachypodium sylvaticum*: Its use as a tool to bridge the gap between rice and wheat in elucidating gene content. *Funct Integr Genomics*, 2004, 4: 26–33
- [17] Griffiths S, Sharp R, Foote T N, Bertin L, Wanous M, Reader S. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploidy wheat. *Nature*, 439: 749–752
- [18] Keller B, Knobel P, Bossolini E, Wicker T. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: Implications for wheat genomics and, grass genome annotation. (Released in 2007) [2008-01-12] <http://www.brachypodium.org>
- [19] Hasterok R, Marasek A, Donnison I S, Armstead I, Thomas A, King I P, Wolny E, Idziak D, Draper J, Jenkins G. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. *Genetics*, 2006, 173: 349–362
- [20] Huo N, Gu Y, Lazo G, Vogel J, Coleman-Derr D, Luo M C, Thilmony R, Garvin D, Anderson O. Construction and characterization of two BAC libraries from *Brachypodium distachyon*, a new model for grass genomics. *Genome*, 2006, 49: 1099–1108
- [21] Gu Y Q, Huo N, Lazo G R, Vogel J, Luo M C, Ma Y, Dvorak J, Hill T, Coleman-Derr D, Hayden D, You F, Anderson O D. Towards *Brachypodium* genomics: Analysis of 60 000 BAC end sequences and sequence comparison with cereal crops. (Released in 2007) [2008-01-13] <http://www.brachypodium.org>
- [22] Huo N, Lazo G, Vogel J P, You F, Ma Y, Hayden D, Coleman-Derr D, Hill T, Dvorak J, Anderson O, Luo M C, Gu Y. The nuclear genome of *Brachypodium distachyon*: analysis of BAC end sequences. *Funct Integr Genomics*, 2008, 8: 135–147
- [23] Luo M C, Ma Y, Huo N, Vogel J, Lazo G R, Hill T, Coleman-Derr D, Hayden D, Dvorak J, Anderson O, You F, Hu Y, Wang C X, Gu Y Q. Construction of physical map for *Brachypodium distachyon*. (Released in 2007) [2008-01-13] <http://www.brachypodium.org>
- [24] Bevan M, McKenzie N, Trick M, Snape J, Mockler T, Vogel J, Garvin D. Developing a genetic map of *Brachypodium distachyon* Bd21. (Released in 2007) [Visited in 2008] <http://www.brachypodium.org>
- [25] Bablak P, Draper J, Davey M R, Lynch P T. Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1995, 42: 97–107
- [26] Vogel J P, David F G, Oymon M L, Daniel M H. *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 84: 199–211
- [27] Philippe V, Barbara W, Vera T, Neil M, Lesley J F, Michael W B, John W S. Transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (Line Bd21) using the green fluorescent protein (GFP) as a screenable marker. (Released in 2007) [2007-12-10] <http://www.jic.ac.uk/staff/philippe-vain/brachypodium.htm>
- [28] Philippe V, Barbara W, Vera T, Neil M K, Silvia C A, Magdalena O, Lesley J F, Michael W B, John W S. *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5: 221–229
- [29] Olsen P, Lenk I, Jensen C S, Petersen K, Andersen C H, Didion T, Nielsen K K. Analysis of two heterologous flowering genes in *Brachypodium distachyon* demonstrates its potential as a grass model plan. *Plant Sci*, 2006, 170: 1020–1025
- [30] Vogel J P, Leong O M. *Agrobacterium*-mediated transformation of the model grass *Brachypodium distachyon* (abstract). *In Vitro Cell Dev Biol*, 2004, 40: 29A
- [31] Silvia C A, Barbara W, Vera T, Michael W B, John S, Philippe V. High-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* (line Bd21) for functional genomics. (Released in 2007) [2007-12-10] <http://www.jic.ac.uk/staff/philippe-vain/brachypodium.htm>