

教学研究

二穗短柄草愈伤组织的诱导及农杆菌介导的遗传转化技术在本科实验教学中的应用

刘艺冉 孙晓菲 门淑珍*

(南开大学生命科学学院植物生物学和生态学系, 天津 300071)

摘要 植物胚性愈伤组织诱导及再分化技术对植物培育及良种品质的选育有重要作用,但在目前高校本科实验教学中缺少相关内容。作者选用二穗短柄草这一单子叶模式植物作为实验材料,将二穗短柄草胚发育观察、愈伤组织诱导与再分化及农杆菌介导的遗传转化融合在一个实验中,并且对该实验做了细致的实践,设计了一整套适合本科实验教学的方案。该实验直观、系统地展示了愈伤组织诱导和农杆菌介导的遗传转化技术,不仅实验结果生动形象,而且能拓宽学生的实验技能和知识领域。该教学实验设计还为愈伤组织诱导及农杆菌介导的遗传转化技术在本科实验课程中的推广提供了有益建议。

关键词 二穗短柄草; 愈伤组织诱导; 农杆菌介导的遗传转化; 实验课程

The Application of Callus Induction and *Agrobacterium*-Mediated Transformation Technology of *Brachypodium distachyon* in the Undergraduate Experimental Course

Liu Yiran, Sun Xiaofei, Men Shuzhen*

(Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The technology of embryogenic callus induction and regeneration plays an important role in plant breeding and selection of improved variety. However, undergraduate experimental courses lack the relevant content. In this project, we choose model monocot plant *Brachypodium distachyon* as experimental material, and integrated phenotype observation of *Brachypodium distachyon*, callus induction and redifferentiation, and *Agrobacterium*-mediated transformation into one project. We did practice in detail, and then designed a series of suitable experimental procedures for undergraduate courses. This experiment included technologies of callus induction and genetic transformation, and was designed to ensure attending students to get positive results, improving their experimental skills, and broaden their knowledge. We furthermore provided valuable suggestions for the popularization of this project in undergraduate experimental course.

Keywords *Brachypodium distachyon*; callus induction; *Agrobacterium*-mediated transformation; experiment course

收稿日期: 2016-08-15 接受日期: 2016-08-31

国家自然科学基金(批准号: 31570247、91417308、31460453)和天津市自然科学基金(批准号: 14JCYBJC41200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

Received: August 15, 2016 Accepted: August 31, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570247, 91417308, 31460453) and the Natural Science Foundation of Tianjin (Grant No.14JCYBJC41200)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2016-10-27 16:41:17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161027.1641.002.html>

单子叶禾谷类作物在植物学研究中应用广泛, 其具有分蘖、穗分化等生物学特性。水稻作为第一个全基因组测序的禾本科植物, 虽然具有基因组小、功能基因组资源广泛等多方面优势^[1-2], 但水稻生长周期长, 对生长环境要求较高^[3], 因此, 我们选择禾本科植物二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)作为实验材料。

二穗短柄草的全基因组测序及基因功能注释已经完成, 而且其具有模式植物必须具备的生物学特性, 如基因组小、序列重复性较低、生长周期短、自花授粉及植株矮小等^[4-6]。二穗短柄草属于早熟禾亚科, 与小麦、大麦等许多重要作物的亲缘关系较近。以上这些生物学特性使二穗短柄草成为研究禾本科植物的模式植物。将这一模式植物用于高校本科生实验课程教学, 可以使学生拓宽视野、开阔思路, 也可以为高校生物学实验课程改革提供素材。二穗短柄草作为模式植物, 建立并掌握其组织培养与再生及遗传转化体系是研究其基因功能的关键。经过前人的不断探索, 二穗短柄草的幼胚是在组织培养和遗传转化中使用最多的外植体。在转化方法方面, 与基因枪法相比, 农杆菌介导的遗传转化方法具有明显的优势, 如不需要昂贵的仪器和耗材^[5]。在本科实验教学中增加此项内容, 一方面可以推动实验课程的更新, 为课程改革提供新思路; 另一方面, 有助于培养学生的综合实验能力, 使学生体会到细胞生物学知识的实用性与先进性。

1 实验原理

1.1 胚性愈伤组织诱导及其培养

作为模式植物, 建立起一个稳定的遗传转化体系是必需的工作, 而在这个过程中, 对植物的组织培养等方面特性的了解更是必不可少的。禾本科植物的成熟胚胎、未成熟胚胎和叶片经常被用作诱导产生愈伤组织的外植体^[7]。在二穗短柄草组织培养中, 未成熟胚胎最常用作为外植体。胚性愈伤组织培养过程包括愈伤组织的诱导、形成及愈伤组织的分化。

1.2 农杆菌遗传转化的原理

农杆菌介导的转化法是目前为止二穗短柄草转化最常用到的方法。农杆菌是一种从土壤中筛选得到的革兰氏阴性菌, 根据致病症状和宿主范围大概可以分为五种类型, 其中研究最为透彻也是最多的

便是根癌农杆菌, 其最大的特点是具有Ti质粒^[8], 而Ti质粒可以转移自身的一段DNA序列进入到植物细胞中, 进而整合入植物细胞的基因组。借助农杆菌这一特性, 我们可以先把目的基因转入到农杆菌的Ti质粒中, 再通过农杆菌侵染的方法将目的基因转化并整合到植物的基因组中。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

(1)观察二穗短柄草的表型及胚发育过程。

(2)掌握二穗短柄草胚性愈伤组织诱导和培养技术。

(3)掌握农杆菌介导的遗传转化方法。

2.2 教学重点与难点

(1)教学重点: 二穗短柄草胚性愈伤组织的培养原理及操作。

(2)教学难点: 愈伤组织培养。

2.3 实验材料与设备

(1)实验材料: 生态型为Bd21的二穗短柄草株系, pGII0179-DR5:GFP为本实验室构建, 二穗短柄草转化用到的农杆菌为EHA105。

(2)实验仪器: 超净工作台、倒置荧光显微镜、培养皿等。

2.4 教学安排

2.4.1 学时安排 本实验共分为五个阶段: (1)二穗短柄草表型观察及其胚解剖结构的认识; (2)二穗短柄草胚性愈伤组织的培养; (3)农杆菌介导的遗传转化; (4)抗性愈伤组织的筛选和诱导成苗; (5)综合实验结果展示及讨论。课上56学时, 课前准备2学时, 课后实验结果观察2学时。

2.4.2 课前准备 二穗短柄草幼苗(提前7~9周播种), 实验相关药品配制等。

2.4.3 学生分组 建议实验中每4人为一组。任务与要求: 组员之间协调配合, 共同合作完成实验流程, 共同分析实验结果, 整理实验数据并积极参与讨论。

3 实验步骤

3.1 二穗短柄草的形态观察

二穗短柄草与小麦、大麦、燕麦、水稻、玉米和高粱等粮食作物以及柳枝稷等能源作物关系密切^[9-11]。以上几种作物有许多共同的生物学特性。

成熟的二穗短柄草Bd21种子消毒后, 放置于5 °C的条件下处理2 d, 然后在25 °C、16 h光照条件下培养1周; 将生长7 d的幼苗移栽到土壤中, 转移到22 °C、20 h光照条件的环境中继续生长, 可间隔种植二穗短柄草, 便于学生观察不同时期二穗短柄草的形态。此次主要认识二穗短柄草胚的解剖形态。

3.2 二穗短柄草胚性愈伤组织的诱导及培养

待二穗短柄草生长7~9周时, 收集幼穗, 去掉未成熟颖果的外稃。用70%乙醇(30 s)和1.3%的次氯酸钠(4 min)进行消毒后, 用无菌水冲洗3次。用镊子在显微镜下剥取出二穗短柄草未成熟胚胎, 收集大小在0.3~0.5 mm的未成熟胚胎。

将其盾面朝上放置在MSB3+Cu0.6愈伤组织诱导培养基(表1), 25 °C黑暗培养3周。培养2~3 d时, 在无菌条件下切除未成熟胚胎伸出的嫩芽。在第3周时, 把黄色的愈伤组织分成1~3块, 并把其转移到新的MSB3+Cu0.6固体培养基上, 25 °C黑暗培养2周, 丢掉没有产生胚性愈伤组织的胚胎。在第5周, 把黄色的胚性愈伤组织分成4~6个块, 转移到新的MSB3+Cu0.6固体培养基上, 25 °C黑暗培养1周, 丢掉没有产生胚性愈伤组织的胚胎。培养7周后, 就出现了明显的、致密的黄色胚性愈伤组织。将健康的胚性愈伤组织放到新的MSB3+Cu0.6培养基中继续

增殖, 以产生更多可用的胚性愈伤组织。

3.3 农杆菌介导的遗传转化

提前3 d将-80 °C冰箱冻存的带有荧光蛋白报告基因的EHA105(pGII0179-DR5rev:GFP)农杆菌菌株划线到LB固体培养基上(表2, 培养基中加入相应的抗生素), 28 °C培养2 d。在超净台中划取单菌落, 放到装有LB液体培养基的50 mL的灭菌离心管中, 加入相应抗生素, 28 °C条件下, 在摇床中以220 r/min摇2 d。然后按照1:100的比例把摇好的菌液接种到三角瓶中, 每个三角瓶含100 mL的液体LB培养基。220 r/min、28 °C摇过夜。用分光光度计测量菌液的 D_{600} 值, 当 $0.8 \leq D_{600} \leq 1.0$ 时, 5 000 r/min、28 °C离心10 min。将离心后的上清倒掉, 用MSB+AS45液体培养基(表3)重悬菌体, 将菌液摇匀, 调 D_{600} 在0.8~1.0之间。将培养好的胚性愈伤组织夹入放有重悬菌液的离心管中, 轻轻摇晃, 侵染5 min, 在此过程中一直轻轻摇晃离心管, 使胚性愈伤组织和菌液均匀接触。将菌液倒出离心管, 把侵染后的胚性愈伤组织放到灭过菌的滤纸上, 滤纸放在培养皿中, 在超净台中吹干7 min。当胚性愈伤组织干燥后, 将其放到MSB3+AS60固体培养基(表4)上, 每个培养皿大约放50个愈伤组织。在25 °C、黑暗条件下共培养。将共培养2 d的胚性愈伤组织在荧光体式显微镜下进

表1 MSB3+Cu0.6培养基配方

Table 1 Medium component of MSB3+Cu0.6

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSB3+Cu0.6 (100 mL)	Macroelement 10 mL, microelement 1 mL, ferric salts 1 mL, 2,4-D 250 μ L, CuSO ₄ 60 μ L sucrose 3 g, regulate pH to 5.8 by KOH, add 0.8 g agar, add 1 mL M5 after high temperature sterilization

表2 LB培养基配方

Table 2 Medium component of LB

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
LB liquid medium (100 mL)	Yeast extract 0.5 g, NaCl 1 g, peptone 1 g, regulate pH to 7.0 by NaOH
LB solid medium (100 mL)	Add 1.5 g agar in LB liquid medium

表3 MSB+AS45培养基配方

Table 3 Medium component of MSB+AS45

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSB+AS45 (100 mL)	Macroelement 10 mL, microelement 1 mL, ferric salts 1 mL, sucrose 1 g, mannitol 1 g, regulate pH to 5.5 by KOH, store at 4 °C after high temperature sterilization, add AS 150 μ L when use

行观察, 检测是否有绿色荧光蛋白的表达。

3.4 抗性愈伤组织的筛选及再生

将共培养2 d后的愈伤组织转移到MSB3+Cu0.6+H40+T225固体筛选培养基(表5)上, 25 °C、黑暗条件下进行抗性愈伤组织的筛选。每个培养基中放置20个左右的胚性愈伤组织。筛选2周后挑选还存活的胚性愈伤组织转移到新的MSB3+Cu0.6+H30+T225筛选培养基(表6)上, 25 °C、黑暗条件下培养2周。每个培养基中放置20个左右的胚性愈伤组织。4周后, 挑选还存活的胚性愈伤组

织转移到新的MSR26+H20+T225筛选培养基(表7)上, 25 °C、16 h光照条件下培养2周。每个培养基中放置20个左右的胚性愈伤组织。转化后的6周, 选取再生出枝条或者根的胚性愈伤组织转移到试管中的MSR63+Ch7+T112再生培养基(表8)中, 25 °C、16 h光照条件下培养2周。

4 实验结果

4.1 二穗短柄草的认识

通过观察已准备好的实验材料, 了解二穗短柄

表4 MSB3+AS60培养基配方

Table 4 Medium component of MSB3+AS60

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSB3+AS60 (100 mL)	Macroelement 10 mL, microelement 1 mL, ferric salts 1 mL, 2,4-D 250 μ L, sucrose 3 g, regulate pH to 5.8 by KOH, add 0.8 agar, add 1 mL M5 and 200 μ L AS after high temperature setrtilization

表5 MSB3+Cu0.6+H40+T225培养基配方

Table 5 Medium component of MSB3+Cu0.6+H40+T225

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSB3+Cu0.6+H40+T225 (100 mL)	Macroelement 10 mL, microelement 1 mL, ferric salts 1 mL, 2,4-D 250 μ L, sucrose 3 g, 60 μ L CuSO ₄ , regulate pH to 5.8 by KOH, add 0.8 agar, add 1 mL M5, 80 μ L Hyggromycin B, Timentin 70 μ L after high temperature setrtilization

表6 MSB3+Cu0.6+H30+T225培养基配方

Table 6 Medium component of MSB3+Cu0.6+H30+T225

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSB3+Cu0.6+H40+T225 (100 mL)	Macroelement 10 mL, microelement 1 mL, ferric salts 1 mL, 2,4-D 250 μ L, sucrose 3 g, 60 μ L CuSO ₄ , regulate pH to 5.8 by KOH, add 0.8 agar, add 1 mL M5, 60 μ L Hyggromycin B, Timentin 70 μ L after high temperature setrtilization

表7 MSR26+H20+T225培养基配方

Table 7 Medium component of MSR26+H20+T225

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSR26+H20+T225 (100 mL)	Macroelement 10 mL, microelement 1 mL, ferric salts 1 mL, sucrose 3 g, regulate pH to 5.8 by KOH, add 0.8 agar, add 200 μ L kinetin, 1 mL M5 vitamin, 40 μ L Hyggromycin B, 70 μ L Timentin after high temperature setrtilization

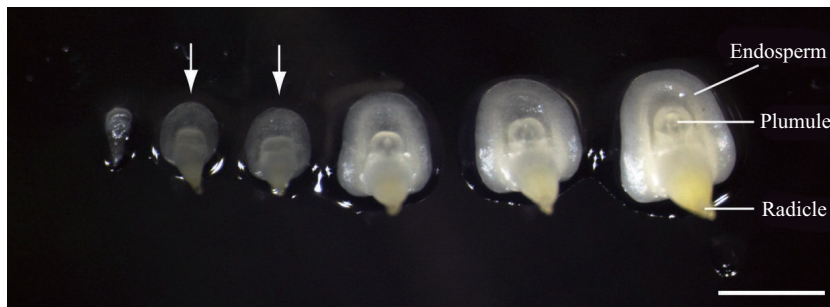
表8 MSR63+Ch7+T112培养基配方

Table 8 Medium component of MSR63+Ch7+T112

培养基 Medium	成分以及pH Moieties and pH
MSR63+Ch7+T112 (100 mL)	Macroelement 4 mL, microelement 4 mL, ferric salts 1 mL, sucrose 1 g, regulate pH to 5.8 by KOH, add 0.8 agar, add 1 mL B5 vitamin, 35 μ L Timentin after high temperature setrtilization 10 mL solid medium per test tube with the 45 angle slant, store at 4 °C



图1 二穗短柄草各生长阶段
Fig.1 Each development stage of *Brachypodium distachyon*



箭头所示即为实验用合适的胚胎。标尺=1 mm。
Arrows are showing the suitable embryo of experiment. Scale bar=1 mm.

图2 二穗短柄草的未成熟胚胎
Fig.2 Immature embryos of *Brachypodium distachyon*

草属于禾本科、短柄草属一年生单子叶植物, 植株矮小, 成熟后植株高度为15~20 cm, 生活周期一般为8~11周, 通常在第7片叶长出时开始开花, 每朵小花有1枚雌蕊和3枚雄蕊, 自花授粉(图1)。

4.2 二穗短柄草未成熟胚胎的选取

从已经结实的二穗短柄草植株上选取未成熟的幼穗, 用镊子剥取未成熟胚胎, 胚胎的大小一般在0.3~0.5 mm左右(图2)。图中箭头所示即为合适大小的未成熟胚胎。随着胚胎成熟程度的不同, 胚胎的形态也有所变化。重点掌握二穗短柄草的胚的解剖结构, 由图可知成熟胚由胚芽、胚轴、胚根、胚乳等组成(图2)。

4.3 未成熟胚胎愈伤组织的诱导

将剥取的未成熟胚胎的盾面朝上放置于MSB3+Cu0.6诱导培养基中(图3A)。培养2~3 d可以观察到胚芽的伸长和根毛的发生(图3B)。当培养到第5 d时胚胎已经发生了一些变化, 开始产生胚性愈

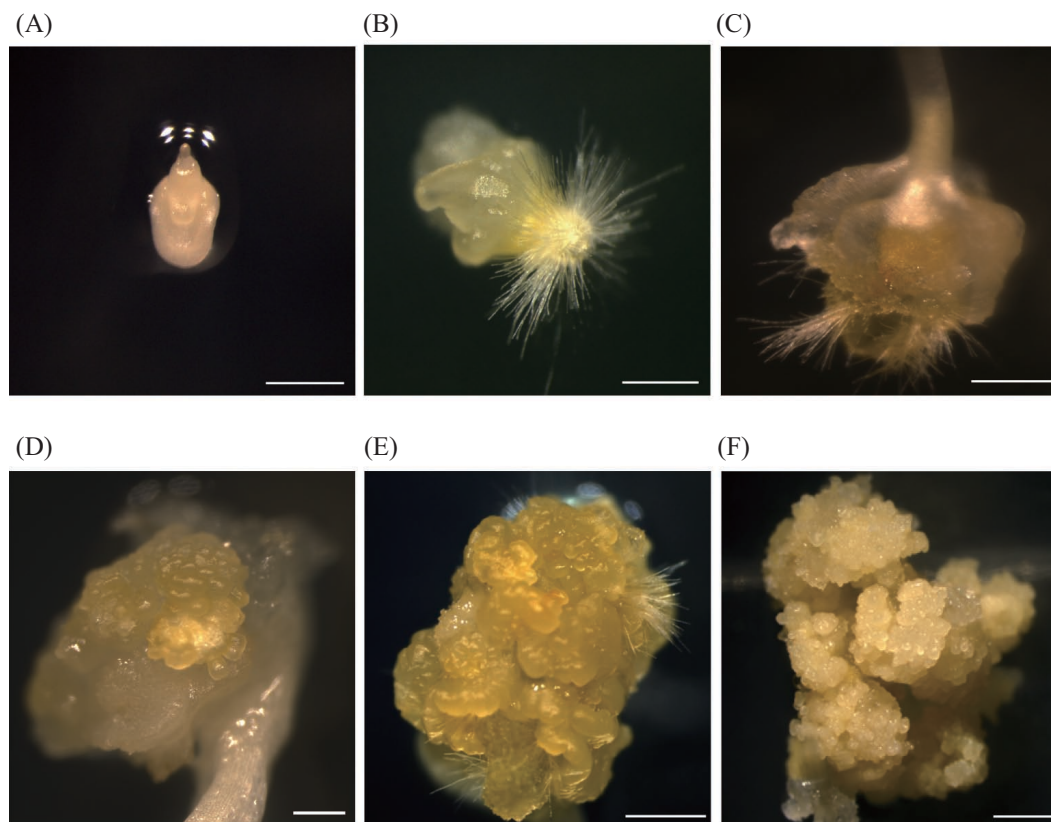
伤组织(图3C)。当培养到第10 d时, 出现了两种不一样的愈伤组织, 一种是白色松散的, 另外一种为黄色致密的(图3D), 实验中所用的愈伤组织即为黄色致密的愈伤组织。培养3周后, 则会出现明显的、致密的黄色胚性愈伤组织(图3E)。将健康的胚性愈伤组织转接到新的MSB3+Cu0.6培养基中继续增殖, 以产生更多可用于农杆菌侵染的胚性愈伤组织(图3F)。

4.4 农杆菌介导的遗传转化

侵染二穗短柄草胚性愈伤组织所用农杆菌为EHA105(pGII0179-DR5rev:GFP), 侵染后进行抗性愈伤组织的筛选, 将筛选到的抗性愈伤组织进行GFP荧光观察来鉴定是否转化成功, 若愈伤组织转化成功, 则可观察到有绿色的荧光信号(图4)。只要再让具有荧光的胚性愈伤组织再生成功, 就可以得到转基因二穗短柄草植株。

4.5 愈伤组织的再生

将筛选后依然健康的胚性愈伤组织转接到再



A: 二穗短柄草的未成熟胚, 标尺=0.05 mm; B: 未成熟胚在MSB3+Cu0.6固体培养基中培养2 d时, 标尺=1 mm; C: 培养5 d时, 标尺=1 mm; D: 培养10 d时, 标尺=0.5 mm; E: 培养20 d时, 标尺=1 mm; F: 农杆菌侵染前的愈伤组织, 标尺=0.5 mm。

A: immature embryos of *Brachypodium distachyon*, scale bar=0.05 mm; B: two days immature embryos after culture in MSB3+Cu0.6 solid medium, scale bar=1 mm; C: five days immature embryos after culture in MSB3+Cu0.6 solid medium, scale bar=1 mm; D: ten days immature embryos after culture in MSB3+Cu0.6 solid medium, scale bar=0.5 mm; E: twenty days immature embryos after culture in MSB3+Cu0.6 solid medium, scale bar=1 mm; F: callus for *Agrobacterium*-mediated transformation, scale bar=0.5 mm.

图3 二穗短柄草胚性愈伤组织的诱导

Fig.3 The induction of *Brachypodium distachyon* embryogenic callus

生培养基中, 当愈伤组织在再生培养基中培养1周后, 可以观察到其再生出幼苗(图5A)。将再生的幼苗转移到生根培养基中诱导生根, 4~5 d后幼苗开始生根并长大(图5B)。将已生根的幼苗转接到试管中, 每个试管放1株苗, 培养1周后打开试管的封口塞炼苗2~3 d(图5C), 之后将再生苗移栽到培养基质中, 放到人工气候室培养(图5D)。

5 讨论

5.1 开设该实验项目的意义

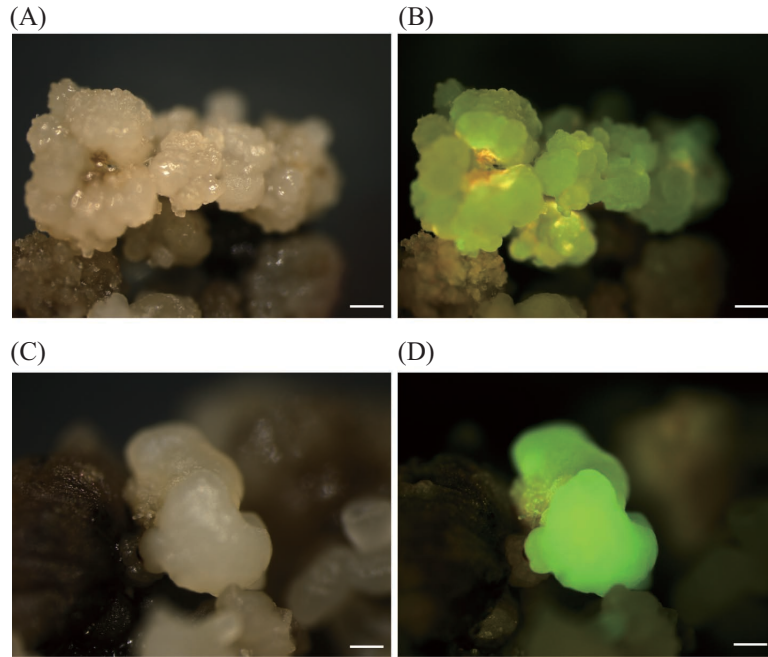
了解并掌握模式植物的形态, 培养条件及研究方法是本科实验教学中的重点, 学生最熟悉的是拟南芥这一模式植物, 对于近几年代表单子叶和谷类的新型模式植物——二穗短柄草却知之甚少。为了紧跟科学发展进展, 拓宽学生视野, 学习并掌握新的实验材料和实验方法, 我们建议在本科教学的实验

课程中安排这一实验项目, 使学生了解二穗短柄草并掌握二穗短柄草胚性愈伤组织的培养及农杆菌介导的遗传转化这一研究方法。该实验课程不仅使学生对愈伤组织的培养有了感性的认识, 而且可以启发学生思考其应用价值。

5.2 实验安排的可行性

该实验项目经过本实验室研究生的反复验证, 实验结果易获得, 且结果真实可靠。本实验室涉及的实验技术有二穗短柄草未成熟种子的消毒、幼胚挑选、胚性愈伤组织诱导、农杆菌介导的遗传转化及荧光显微镜观察等, 很多高校已开展涉及上述部分实验技术的课程, 具备开设本实验项目的技术及设备条件。

本实验项目作为综合实验课程, 建议在一学期内完成所有实验内容, 比较适合作为本科生的科研训练课程。目前, 较多高校的生科院为基地班的学

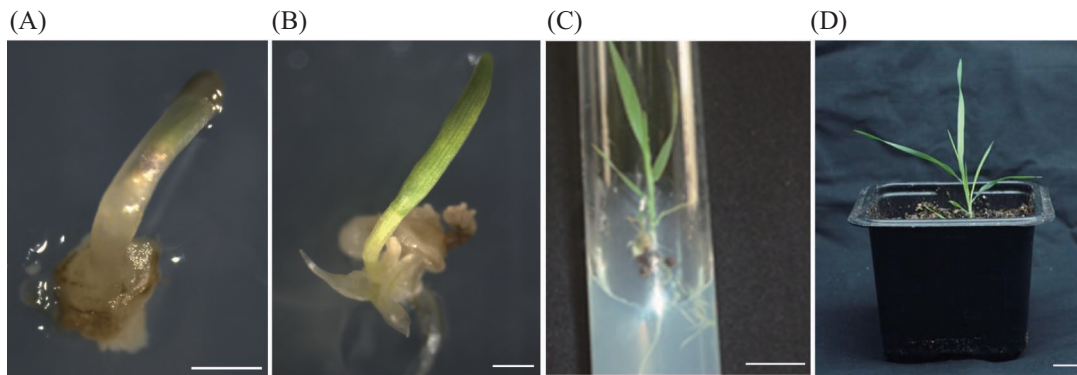


A、C: 筛选到的抗性愈伤组织在显微镜明场中的观察; B、D: 在显微镜下观察抗性愈伤组织中的GFP荧光。标尺=1 mm。

A,C: bright microscopy observation of callus after transformation; B,D: green fluorescent protein observation of callus after transformation under the microscope. Scale bars=1 mm.

图4 抗性愈伤组织GFP荧光观察

Fig.4 Green fluorescent protein observation of transformed callus



A: 胚性愈伤组织开始长出幼苗, 标尺=1 mm; B: 胚性愈伤组织长出的再生幼苗, 标尺=1 mm; C: 再生的植株转移到生根培养基中并生根, 标尺=1 cm; D: 土中正常生长的再生二穗短柄草, 标尺=1 cm。

A: embryonic callus start to generate seeding, scale bar=1 mm; B: embryonic callus generate the regeneration seeding, scale bar=1 mm; C: regeneration plant transfer to rooting medium and generate the root, scale bar=1 cm; D: the normal growth of regeneration *Brachypodium distachyon* in soil, scale bar=1 cm.

图5 胚性愈伤组织的再生

Fig.5 Regeneration of embryonic callus

生开设为期一学期的科研训练课程, 该课程要求本科生利用周末和周一到周五的课余时间, 在教师的指导下开展实验, 在学期末进行结果展示和上交实验报告。本实验项目虽然周期较长, 但是不需要每天占用大量时间, 学生可以利用周末进行耗时的和连续操作的实验部分(例如培养基的配制、未成熟种子的消毒和剥胚接种实验、农杆菌侵染实验等), 其

他时间进行观察, 因此比较适合作为科研训练课程。为了保证实验的顺利进行和获得较好的实验结果, 指导教师可安排学生每隔2周种植一批二穗短柄草, 保证有足够的实验材料, 并进行多次的愈伤组织诱导、农杆菌侵染和抗性愈伤组织的筛选实验。

若需要在有固定课时的实验课教学中开设本实验, 指导教师可根据课时数适当删减实验内容。

例如, 指导教师可以提前种植好二穗短柄草, 实验教学只安排学生在课上进行培养基的配制、二穗短柄草未成熟种子的消毒、幼胚的剥取和接种实验, 要求学生课下每天到实验室观察和记录愈伤组织的诱导情况, 最后撰写和提交实验报告。课时较多时, 可以增加农杆菌介导的遗传转化, 学生课后定期观察愈伤组织的筛选情况, 获得抗性愈伤组织后进行荧光显微镜观察、拍照, 然后完成实验报告。

5.3 本实验的推广与应用

(1)实验条件: 要求具备植物培养、愈伤组织培养及农杆菌培养的基本条件。

(2)教师的要求: 实验教师应熟练掌握胚性愈伤组织培养的基本操作方法, 熟练掌握农杆菌转化的基本操作方法。

(3)可在已开设植物愈伤组织培养和GFP报告基因转化技术相关实验的院校推广。

参考文献 (References)

- 1 Havukkala JJ. Cereal genome analysis using rice as model. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6(6): 711-4.
- 2 Tyagi AK, Mohanty A. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Sci* 2000; 158(1/2): 1-18.
- 3 Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, et al. *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 2001; 127(4): 1539-55.
- 4 Kellogg EA. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol* 2001; 125(3): 1198-205.
- 5 Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* 2009; 4(5): 638-49.
- 6 International Brachypodium Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 2010; 463(7282): 763-8.
- 7 王宏归, 王保莉, 林辰涛, 傅永福. 二穗短柄草B21的形态学观察. *西北农业学报*(Wang honggui, Wang baoli, Lin chentao, Fu yongfu. Morphology of *Brachypodium distachyon*(L.). *Acta A griculturae Boreali-occidentalis Sinica*) 2007; 16(6): 296-300.
- 8 Shi Y, Draper J, Stace C. Ribosomal DNA variation and its phylogenetic implication in the genus *Brachypodium* (*Poaceae*). *Plant Syst Evol* 1993; 188(3/4): 125-38.
- 9 Catalan P, Olmstead RG. Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (*Poaceae*) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Plant Syst Evol* 2000; 220(1/2): 1-19.
- 10 Kellogg EA. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol* 2001; 125(3): 1198-205.
- 11 Caetano-Anolles G. Evolution of genome size in the grasses. *Crop Sci* 2005; 45(5): 1809-16.