

一种农杆菌介导的糜子高效遗传转化方法

夏启玉¹, 降彦苗^{2*}, 刘亚男², 李海权², 程汝宏², 郭安平¹, 刘国庆^{2**}, 赵 辉^{1**}

1. 中国热带农业科学院三亚研究院/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南三亚 572024; 2. 河北农林科学院谷子研究所, 河北石家庄 050035

摘 要: 糜子 (*Panicum miliaceum* L.) 是我国传统的粮食作物, 截至目前, 针对糜子遗传转化方法的研究仍较少, 本研究旨在建立农杆菌介导的糜子高效遗传转化方法。以糜子品种冀黍 5 号的成熟种子为外植体, 在 CIM 和 MSD 诱导培养基上分别诱导糜子的胚性愈伤, 以其作为转化受体材料, 用含植物表达载体的农杆菌侵染 60 min 并共培养 6 d, 转接至含 0.025 g/L 潮霉素的筛选培养基上筛选出抗性愈伤, 接着在含 0.015 g/L 潮霉素的分化培养基上分化, 最后在含 0.015 g/L 潮霉素的生根培养基上生根成苗, 用载体特异性引物对再生植株进行 PCR 检测, 鉴定其是否为阳性转基因植株。根据多个批次的转化实验统计糜子的抗性再生植株的筛选效率和转化效率。结果表明: CIM 和 MSD 诱导培养基均能诱导出糜子胚性愈伤, 但 CIM 培养基诱导的糜子胚性愈伤效果更好; 糜子胚性愈伤在被农杆菌侵染及与农杆菌共培养后, 经在含潮霉素的培养基上筛选、分化和生根后获得多株抗性再生糜子植株, 3 次试验获得的糜子抗性再生植株的 PCR 鉴定阳性率为 100%, 平均转化效率为 30% 以上。本研究成功建立了农杆菌介导的糜子遗传转化方法, 操作简单, 转化效率高, 成本低廉, 且转化不受季节限制, 能规模化开展, 为糜子的遗传改良提供有效的技术手段。

关键词: 糜子; 农杆菌; 遗传转化; 转化效率

中图分类号: S516 文献标志码: A

An Efficient Genetic Transformation Method for Broomcorn Millet Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

XIA Qiyu¹, XIANG Yanmiao^{2*}, LIU Yanan², LI Haiquan², CHENG Ruhong², GUO Anping¹, LIU Guoqing^{2**}, ZHAO Hui^{1**}

1. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572024, China; 2. Institute of Millet Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050035, China

Abstract: Broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) is a traditional grain crop in China. Currently, there is still limited research on the genetic transformation methods for *P. miliaceum*. This study aimed to establish an efficient genetic transformation method for *P. miliaceum* mediated by *Agrobacterium*. Mature seeds of the millet variety Jishu 5 were used as the explants to induce embryogenic callus of millet on CIM and MSD induction media, respectively. They were used as the transformation receptor materials and infected with *Agrobacterium* containing plant expression vectors for 60 minutes and co-cultured for 6 days. The calli were then transferred to a screening medium containing 0.025 g/L of hygromycin to screen for resistant calli. Then, they differentiated on a differentiation medium containing 0.015 g/L of hygromycin. Finally, they rooted into seedlings on a rooting medium containing 0.015 g/L of hygromycin. PCR detection was performed on the regenerated plants using vector specific primers to identify whether they were positive

收稿日期 2024-07-30; 修回日期 2024-08-16

基金项目 三亚崖州湾科技城科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2022-90); 中央引导地方科技发展资金项目 (No. 226Z6301G); 国家自然科学基金项目 (No. 32241043)。

作者简介 夏启玉 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 作物遗传育种; *同等贡献作者: 降彦苗 (1985—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 糜子育种。 **通信作者 (Corresponding author): 赵 辉 (ZHAO Hui), E-mail: zhaohui@itbb.org.cn; 刘国庆 (LIU Guoqing), E-mail: gliu20026@163.com。

transgenic plants. Based on the multiple batches of transformation experiments, the screening efficiency and transformation efficiency of resistant regenerated plants of broomcorn millet were statistically analyzed. The results showed that both CIM and MSD media could induce embryogenic callus of broomcorn millet, but CIM medium had a better effect on inducing embryogenic callus of broomcorn millet. After being infected by *Agrobacterium* and co-cultured with *Agrobacterium*, the multiple resistant regenerated plants were obtained through screening, differentiation, and rooting on a medium containing hygromycin. The PCR identification positive rate of the resistant regenerated plants obtained from three experiments was 100%, and the average transformation efficiency was over 30%. This study successfully established an *Agrobacterium* mediated genetic transformation method for broomcorn millet, which is simple to operate, efficient, cost-effective, and not limited by seasons. It could be carried out on a large scale, providing an effective technical means for genetic improvement of broomcorn millet.

Keywords: broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.); *Agrobacterium*; genetic transformation; transformation efficiency

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.01.005

糜子(*Panicum miliaceum* L.),属禾本科黍属,起源于我国的黄河流域,又名黍稷,一年生小粒禾谷类作物,是人类最早驯化的作物之一,具有生育期短、抗旱耐瘠等特点,在干旱环境中具生产优势,主要分布在亚洲和欧洲的半干旱地区^[1-3]。在中国,糜子曾是华北地区的主粮,如今仅在山区和边远地带栽培,年种植面积约 32 万 hm^2 ,产量约 30 万 $\text{t}^{[4]}$ 。目前,全球糜子种质资源有 29 000 余份,我国糜子种质资源库有 9885 份糜子资源^[5-6]。与玉米、水稻等作物相比,糜子驯化水平低,具有许多野生性状,这些性状严重阻碍了糜子的育种进程及品种改良,成为现代糜子遗传改良的重点。目前我国糜子育种方法落后,主要为杂交育种和诱变育种等常规育种方法,分子标记辅助选择育种也很少^[7-8]。现代基因工程技术的发展,为糜子的育种及品种改良提供了一种快速有效的途径。但由于糜子的遗传转化研究发展比较缓慢,严重影响了糜子的转基因育种速度。因此,建立糜子的高效遗传转化方法,对糜子的育种及品种改良尤为重要。

目前常见的植物遗传转化方法为基因枪法和农杆菌法。基因枪法是将包裹了带目的基因的 DNA 溶液的高速微弹直接送入完整的植物组织中,通过细胞和组织培养技术,可再生出植株,选出其中转基因阳性植株即为转基因植株^[9]。其主要优点是不受受体植物范围的限制,但该仪器不易获得,且耗材成本高昂,操作复杂,外源基因插入拷贝数高,影响了基因枪法的广泛应用。农杆菌法是将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区,借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合,然后通过组织培养技术,再生出

转基因植株,具有操作简单,成本低,遗传稳定,转化效率高且外源基因插入拷贝数低等优点,目前在多种植物中广泛应用^[10-16]。本研究以糜子品种冀黍 5 号的成熟种子为外植体,建立农杆菌介导的糜子高效遗传转化方法,为糜子的遗传改良提供了有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

糜子品种为冀黍 5 号。含潮霉素抗性基因(*HPT*)筛选标记的植物表达载体 pRLG103_Predicted 由 Daniel Voytas 实验室提供。大肠杆菌 DH5 α 感受态和农杆菌 AGL1 感受态分别购自北京全式金生物科技股份有限公司和上海唯地生物技术有限公司。植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)购自天根生化科技(北京)有限公司;Taq 酶 MIX 购自北京康为世纪生物科技有限公司;MS 购自 Duchefa Biochemie 公司;植物凝胶购自 Caisson Labs 公司;潮霉素购自 Gold Biotechnology 公司;蛋白胨和酵母粉购自 Oxoid 公司;琼脂糖购自 Biowest 公司;硫酸软骨素钠(软骨素)购自北京璞棠生物科技有限公司生产。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 糜子的胚性愈伤诱导 选取经休眠处理的冀黍 5 号的干燥成熟种子,去除种皮,将约 2 g 种子装入 50 mL 无菌离心管中,用 20 mL 有效浓度为 3%的次氯酸钠溶液和 50 μL 吐温 20 溶液,消毒灭菌处理 20 min,用无菌水清洗多次后将种子接种于胚性愈伤诱导培养基上。接种时注意种子芽点朝上,芽点不直接接触培养基,每皿培养

基接种子约 20 个, 24 ℃ 恒温培养, 湿度为 55%, 培养过程中先以 12 h/12 h 的光/暗培养模式进行光照发芽, 发芽后转为暗培养, 暗培养 28 d 后从芽点处挑取诱导的胚性愈伤组织, 继续暗培养 7 d。使用 2 种胚性愈伤诱导培养基 CIM 和 MSD 进行糜子胚性愈伤诱导。CIM 中含有 MS 干粉 4.4 g/L、蔗糖 30.0 g/L、七水合硫酸锌 0.035 g/L、五水合硫酸铜 0.0006 g/L、激动素 0.0005 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 0.002 g/L 和植物凝胶 9.0 g/L, pH 5.8。MSD 中含有 MS 干粉 4.4 g/L、蔗糖 30.0 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 0.002 g/L 和植物凝胶 9.0 g/L, pH 5.8。

1.2.2 农杆菌菌液的制备及活化 从 -80 ℃ 冰箱取出含载体 pRLG103_Predicted (图 1) 的 AGL1

农杆菌菌株, 置于 LB 培养基 (蛋白胨 10.0 g/L、酵母粉 5.0 g/L、氯化钠 10.0 g/L 和琼脂粉 15.0 g/L) 上涂板活化, 24 ℃ 暗培养 3 d, 长出单菌落; 挑取 3 个以上单菌落, 同时置于含 0.05 g/L 的羧苄青霉素和 0.05 g/L 卡那霉素的 LB 培养液中, 于 20 ℃ 以 200 r/min 进行震荡培养 24 h, 离心得到新鲜的农杆菌菌液。将新鲜的农杆菌菌液加至侵染液中, 摇晃进行悬浮处理, 得农杆菌菌悬液, 并用侵染液将农杆菌菌悬液浓度调整到 OD₆₀₀ 值为 0.6, 然后于 20 ℃ 以 100 r/min 低速振荡培养 2~3 h 进行活化, 得活化的农杆菌菌液。侵染液中含有 MS 干粉 2.2 g/L、蔗糖 30 g/L、吗啉乙磺酸 1.0 g/L、乙酰丁香酮 0.04 g/L 和质量体积比为 0.1% 的泊洛沙姆, pH 5.4。

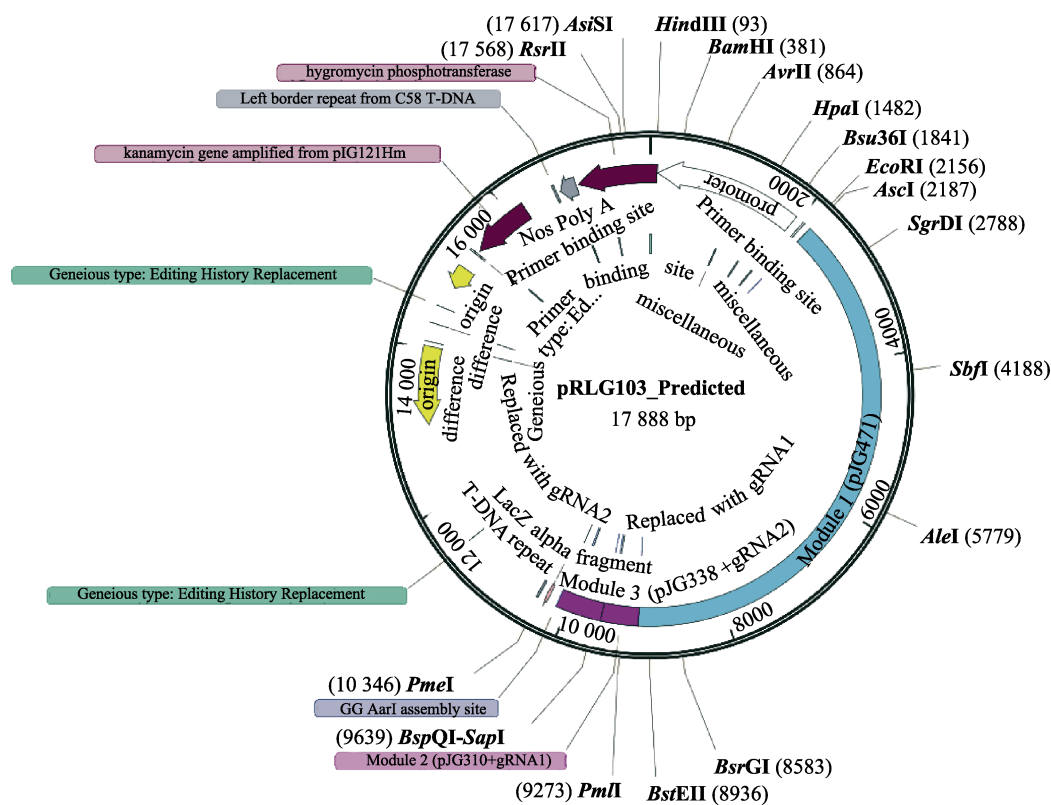


图 1 植物表达载体图谱
Fig. 1 Plant expression vector map

1.2.3 侵染和共培养 将糜子的胚性愈伤诱导组织加至活化农杆菌菌液中, 按每 30 mL 活化农杆菌菌液中加入 60~80 块直径约为 0.5 cm 糜子的胚性愈伤诱导组织的比例添加, 于 20 ℃ 以 120 r/min 轻摇振荡侵染 60 min (振荡侵染采用暗培养), 侵染完成后, 倒掉菌液, 得经侵染的糜子胚性愈伤组织。将经侵染的糜子胚性愈伤组织倒在无菌滤

纸上, 吸干多余的菌液, 并在超净台上适当吹干, 约 30 min 后转接到放有无菌滤纸的共培养培养基上, 20 ℃ 暗培养 6 d, 得共培养后糜子胚性愈伤组织。共培养培养基中含有 MS 干粉 2.2 g/L、蔗糖 30.0 g/L、吗啉乙磺酸 1.0 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 0.002 g/L、激动素 0.0005 g/L、乙酰丁香酮 0.04 g/L 和植物凝胶 4.0 g/L, pH 5.4。

1.2.4 抗性愈伤的筛选 将共培养后糜子胚性愈伤组织转移至愈伤筛选培养基上，每皿约 20~30 粒共培养后糜子胚性愈伤组织，24 ℃暗培养 2 周，完成一次继代，转至光照培养 2 周（光照培养是于 24 ℃采用 12 h/12 h 光/暗培养），完成第二次继代，整个共培养筛选过程继代 2 次，每 2 周继代 1 次，共培养筛选总用时 1 个月，得抗性愈伤组织。愈伤筛选培养基中含有 MS 干粉 4.4 g/L、蔗糖 30.0 g/L、七水合硫酸锌 0.035 g/L、五水合硫酸铜 0.0006 g/L、激动素 0.0005 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 0.002 g/L、植物凝胶 9.0 g/L、特美汀 0.5 g/L 和潮霉素 0.025 g/L，pH 5.8。

1.2.5 分化和生根 先从愈伤筛选培养基中将抗性愈伤组织转移至第一阶段分化培养基中，于 24 ℃采用 12 h/12 h 的光/暗培养方式进行光培养 2 周，再转接至第二阶段分化培养基中，24 ℃采用 12 h/12 h 的光/暗培养方式进行光培养 2 周，得苗高约 2 cm 的分化幼苗。将分化幼苗接入生根培养基中，于 24 ℃采用 12 h/12 h 的光/暗培养方式进行生根培养 1~2 周得糜子的抗性再生植株。第一阶段分化培养基中含有 MS 干粉 4.4 g/L、蔗糖 30.0 g/L、MS 微量元素母液（1000×）1.0 mL/L、MS 维生素（1000×）1.0 mL/L、6-苄氨基嘌呤 0.003 g/L、激动素 0.003 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 0.001 g/L、椰子水 5%（V/V）、特美汀 0.5 g/L、潮霉素 0.015 g/L、稀释 5000 倍的软骨素 1.0 mL/L 和植物凝胶 9.0 g/L，pH 5.8。第二阶段分化培养基中含有 MS 干粉 4.4 g/L、蔗糖 20.0 g/L、MS 微量元素母液（1000×）1 mL/L、MS 维生素（1000×）1 mL/L、6-苄氨基嘌呤 0.001 g/L、激动素（KT）0.001 g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 0.0005 g/L、椰子水 5%（V/V）、特美汀 0.5 g/L、潮霉素 0.015 g/L、稀释 5000 倍的软骨素 1.0 mL/L 和植物凝胶 9.0 g/L，pH 5.8。生根培养基中含有 MS 干粉 2.2 g/L、蔗糖 15.0 g/L、MS 微量元素母液（1000×）1.0 mL/L、MS 维生素（1000×）1.0 mL/L、3-吡啶丁酸 0.0005 g/L、特美汀 0.5 g/L、潮霉素 0.015 g/L 和植物凝胶 9.0 g/L，pH 5.8。

1.2.6 抗性再生植株的 PCR 鉴定 糜子的抗性再生植株用水洗掉培养基，移栽到植物培养箱中利用营养土进行栽培，栽培过程中待转基因植株长到 20 cm 高后，剪取叶片提取其基因组 DNA。以上述 DNA 为模板，对抗性再生植株进行了潮霉素抗性基因 *HPT* 和载体特异序列 *M1* 的 PCR 检

测，使用的检测引物见表 1。PCR 检测使用的酶为 *Taq* Mix，反应体系为：无菌水 9.5 μL、引物（10 μmol/L）各 1.0 μL、*Taq* Mix 12.5 μL、DNA 模板 1.0 μL。PCR 扩增程序为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，35 个循环；72 ℃延伸 7 min。PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测。根据不同批次的糜子转化实验统计糜子的抗性再生植株的筛选效率和转化效率。其中，筛选效率=PCR 阳性的抗性再生植株数量/抗性再生植株数量×100%；转化效率=PCR 阳性的抗性再生植株数量/胚性愈伤诱导组织数量×100%。

表 1 糜子抗性再生植株的检测引物			
Tab. 1 Primers for detecting resistant regenerated plants of broomcorn millet			
基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	大小 Size/bp
<i>HPT</i>	HPT-F	GAAGTGCTTGACATTGGGGAGT	472
	HPT-R	AGATGTTGGCGACCTCGTATT	
<i>M1</i>	M1-F	GAAGTGCAGGTCAAACCTTGAC	216
	M1-R	CTCTCTCGTAGTTCCTCTGATC	

2 结果与分析

2.1 糜子的胚性愈伤诱导

为考察添加细胞分裂素和生长素对愈伤组织形成的影响，在愈伤诱导阶段设置了 2 种培养基 CIM 和 MSD。结果表明，CIM 和 MSD 培养基均能诱导糜子胚性愈伤，但 CIM 诱导效率更高（图 2），表明 KT 的添加对糜子愈伤的诱导有促进作用。糜子的胚性愈伤组织致密，非水渍状，其在 CIM 培养基上诱导的不同阶段的状态见图 3。

2.2 抗性愈伤的筛选、分化和生根

糜子胚性愈伤在筛选培养基上暗培养 2 周后，糜子胚性愈伤会发生褐化，将糜子愈伤转至

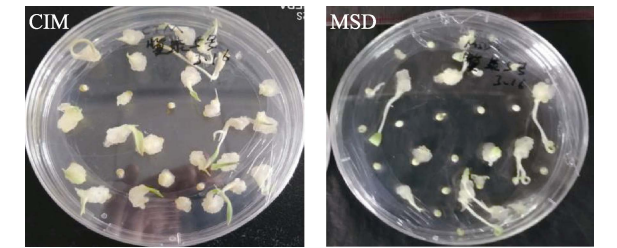


图 2 CIM 和 MSD 培养基诱导的糜子愈伤
Fig. 2 Induction of callus in broomcorn millet by CIM and MSD media



A: 种子诱导发芽; B: 种子诱导胚性愈伤前期;

C: 种子诱导胚性愈伤后期。

A: Seed induced germination; B: Pre stage of seed induced embryogenic callus; C: Late stage of seed induced embryogenic callus.

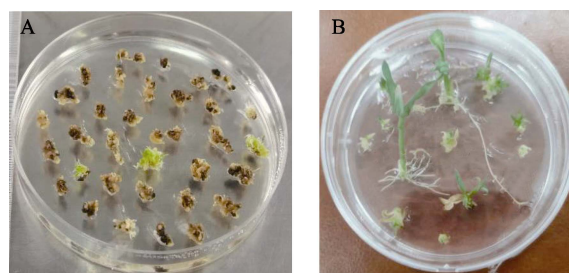
图 3 糜子的胚性愈伤诱导的不同阶段

Fig. 3 Different stages of embryogenic callus induction in broomcorn millet

光培养 2 周, 期间会有抗性愈伤的生长, 抗性愈伤会分化出绿色的组织 (图 4A), 转至分化培养基上继续培养会分化出糜子再生苗。将糜子再生苗幼苗接入生根培养基中进行生根培养 1~2 周, 即为抗性苗 (图 4B)。具体生根培养时间根据幼苗大小决定, 待生根完成后, 得糜子的抗性再生植株, 整个转化周期约为 12~16 周。

2.3 糜子再生苗的 PCR 检测

将糜子的抗性再生植株移栽到植物培养箱培养至约 20 cm 高时进行 PCR 检测, *HPT* 和 *M1* 的检测结果为阳性, 即为抗性转基因苗。多个糜子抗性再生植株的 *HPT* 和 *M1* 的 PCR 检测结果如图 5 所示, 糜子的抗性再生植株都能扩增出目的基因 *HPT* 和 *M1*, 而野生型对照 (CK^-)、DNA 提取对照 ($CK1$) 和空白对照 ($CK2$) 均未扩增出目的条带, 说明这些抗性再生植株均为转基因阳性植株, 目的载体已经成功导入到糜子基因组中。根据 3 个批次的糜子转化实验结果统计糜子的抗



A: 胚性愈伤的筛选后期; B: 抗性胚性愈伤的生根。

A: Late screening of embryogenic callus; B: Rooting of resistant embryogenic callus.

图 4 糜子的抗性愈伤的筛选、分化和生根

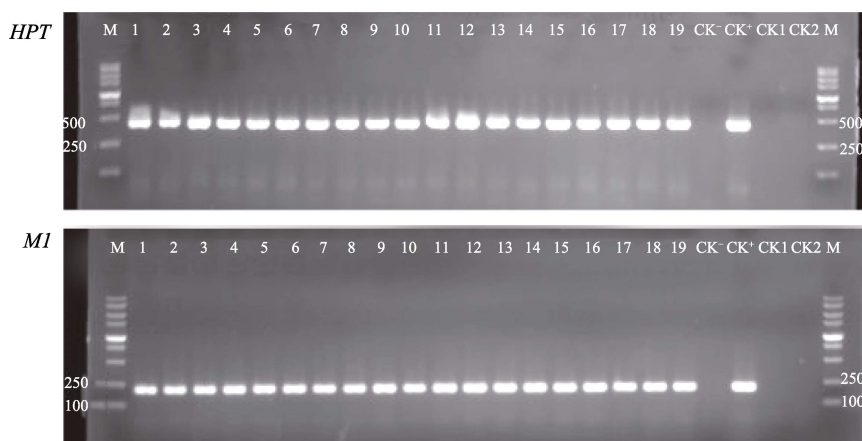
Fig. 4 Screening, differentiation, and rooting of resistant callus in broomcorn millet

性再生植株的筛选效率和转化效率 (表 2), 结果表明, 本方法获得的糜子抗性再生植株的筛选效率为 100%, 平均转化效率约为 30.4%。

3 讨论

糜子是起源于我国的最古老农作物之一, 曾经是我国北方重要栽培作物, 但随着农业生产的发展, 逐渐退出主栽作物地位成为区域特色作物, 主要原因是糜子产量没有大的突破, 品质没有根本提升^[9]。近年来, 膳食结构多样化成为人们追求健康生活的需求, 杂粮倍受重视, 糜子作为药食同源作物展现了新的种植前景^[17]。因此, 改良糜子品质和提高糜子产量对糜子的产业发展具有重要意义。现代基因工程技术的发展为糜子提供了快速有效的转基因育种的途径。

有效的遗传转化对于转基因育种至关重要,



1~19: 19 株冀黍 5 号的抗性再生植株; CK^- : 冀黍 5 号野生型对照; CK^+ : 质粒阳性对照; $CK1$: DNA 提取对照;

$CK2$: 水对照; M: DL5000 DNA marker。

1~19: 19 resistant regenerated plants of Jishu 5; K^- : Wild type control of Jishu 5; K^+ : Plasmid positive control; $CK1$: DNA extraction control; $CK2$: Water control; M: DL5000 DNA marker.

图 5 抗性再生植株的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of resistant regenerated plants

表 2 糜子抗性植株的筛选效率及遗传转化效率
Tab. 2 Screening efficiency and genetic transformation efficiency of resistant plants in broomcorn millet

编号 No.	胚性愈伤数量 Number of embryogenic callus	抗性愈伤数量 Number of resis- tant callus	抗性再生植株数 Number of resis- tant regenerated plants	PCR 阳性的抗性再生植株 数 Number of positive resis- tant regenerated plants detected by PCR	筛选效率 Screening efficiency/%	转化效率 Transformation efficiency/%	平均转化效率 Average trans- formation effi- ciency/%
1	66	26	21	21	100	31.8	
2	70	27	20	20	100	28.5	30.4
3	78	30	24	24	100	30.8	

但目前针对糜子的遗传转化方法仅在近 3 年开始有少量报道。2021 年，申请号为 202111531566.3 的中国发明专利申请公开了一种黍属植物的遗传转化方法，其采用基因枪轰击法获得了糜子的转基因植株^[18]。但该方法可能引起突变、丢失和基因沉默等问题，不利于外源基因在糜子中稳定表达，同时还具有操作复杂、命中率低、转化效率低、育种成本高等缺点。2024 年，研究者成功利用农杆菌介导法获得了糜子的基因编辑植株。LIU 等^[19]利用农杆菌介导法将基因编辑载体导入糜子品种 Hongmi 的基因组中，以潮霉素抗性基因为筛选标记获得了八氢番茄红素脱氢酶（PDS）基因敲除的转基因植株，转基因植株出现白化症状。此外，LU 等^[20]也利用农杆菌介导法将基因编辑载体导入糜子品种 Longmi4 的基因组中，以潮霉素抗性基因为筛选标记获得了 *Pmsd1* 敲除的转基因植株，转基因植株出现明显的矮化症状。虽然上述研究已经通过基因枪法或农杆菌介导法获得了糜子的转基因株系，但由于农杆菌介导的转化法受基因型的限制，不同品系的胚性愈伤诱导能力、农杆菌侵染能力、愈伤脱分化能力均不同，导致不同品系的转化效率也存在较大差异。因此，针对不同品种的糜子的遗传转化方法仍需进行各项条件的摸索。

本研究以糜子品种冀黍 5 号的成熟种子为外植体，采用 CIM 培养基诱导糜子胚性愈伤，以潮霉素抗性基因为筛选标记经过抗性愈伤的筛选、分化和生根获得了糜子的转基因植株。本研究建立的糜子遗传转化方法与上述糜子遗传转化研究^[19-20]中的方法有诸多不同：上述研究中愈伤诱导使用的激素为 2,4-二氯苯氧乙酸或 2,4-二氯苯氧乙酸和 6-苄氨基嘌呤，而本研究使用的激素为 2,4-二氯苯氧乙酸和激动素，有较高的愈伤诱导效率；上述研究中使用的农杆菌均为 EHA105，本研究使用的农杆菌为 AGL1，具有良好的侵染糜子

的效果；本研究在侵染培养液中添加了吗啉乙磺酸和泊洛沙姆，起到稳定侵染液 pH 的作用；LIU 等^[19]在糜子胚性愈伤分化时使用的激素是 6-苄氨基嘌呤，而本研究经过对分化培养基中的激素种类及比例的摸索，发现在分化阶段使用 2 种分化培养基能获得良好的分化效率，阶段一和阶段二培养基均含激素 2,4-二氯苯氧乙酸、激动素和 6-苄氨基嘌呤，只是含量上有变化，同时在分化培养基中添加了椰子水和软骨素，也起到促进愈伤分化的作用。LIU 等^[19]在糜子筛选抗性胚性愈伤时使用的潮霉素浓度为 0.05 g/L，本研究使用的潮霉素浓度为 0.025 g/L，这可能是由于品种差异导致的。本研究建立的冀黍 5 号的遗传转化方法获得的抗性再生植株 PCR 鉴定的阳性率为 100%，平均转化效率 30%以上，而 LIU 等^[19]建立 Hongmi 的遗传转化方法的平均转化效率仅为 16.7%。

本研究建立了糜子品种冀黍 5 号的农杆菌介导的高效遗传转化方法，转化周期为 12~16 周，操作简单，转化效率高，成本低廉，且转化不受季节限制，能规模化开展，为糜子品种的遗传改良提供有效的技术手段。

参考文献

[1] BHAT S, NANDINI C, SRINATHAREDDY S, JAYARAME G. Proso millet (*Panicum miliaceum* L.)-a climate resilient crop for food and nutritional security: a review[J]. Environment Conservation Journal, 2019, 20(3): 113-124.

[2] FLAJŠMAN M, ŠTAJNER N, KOCJAN AČKO D. Genetic diversity and agronomic performance of Slovenian landraces of proso millet (*Panicum miliaceum* L.)[J]. Turkish Journal of Botany, 2019, 43(2): 185-195.

[3] CALAMAI A, MASONI A, MARINI L, DELL'ACQUA M, GANUGI P, BOUKAIL S, BENEDETTELLI S, PALCHETTI E. Evaluation of the agronomic traits of 80 accessions of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) under mediterranean pedoclimatic conditions[J]. Agriculture, 2020, 10(12): 578.

- [4] GHIMIRE B K, YU C Y, KIM S H, CHUNG I M. Diversity in accessions of *Panicum miliaceum* L. based on agro-morphological, antioxidative, and genetic traits[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1012.
- [5] 王纶, 王星玉, 乔治军, 温琪汾, 康国帅. 中国黍稷种质资源收集、保护、创新与共享利用[J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(2): 422-427.
WANG L, WANG X Y, QIAO Z J, WEN Q F, KANG G S. Collection, conservation, enhancement, share and utilization of proso millet germplasm resource in China[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(2): 422-427. (in Chinese)
- [6] 曹越, 辛旭霞, 冯智尊, 郭娟, 王晓丹, 曹晓宁, SANTRA D K, 陈凌, 乔治军, 王瑞云. 基于荧光 SSR 的宁夏糜子 DNA 分子身份证的构建[J]. *作物学报*, 2024, 50(11): 2699-2711.
CAO Y, XIN X X, FENG Z Z, GUO J, WANG X D, CAO X N, SANTRA D K, CHEN L, QIAO Z J, WANG R Y. Construction of DNA molecular identity card of Ningxia proso millet based on fluorescent SSR[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(11): 2699-2711. (in Chinese)
- [7] 盘婉向, 刘天鹏, 何继红, 董孔军, 任瑞玉, 张磊, 杨天育. 糜子(*Panicum miliaceum* L.)全基因组 YABBY 基因家族鉴定与高渗溶液胁迫下表达特征[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(5): 1067-1078.
PAN W X, LIU T P, HE J H, DONG K J, REN R Y, ZHANG L, YANG T Y. Genome-wide identification and expression characteristics of the YABBY gene family under hypertonic solution stress in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.)[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(5): 1067-1078. (in Chinese)
- [8] 杨天育. 糜子分子遗传研究进展与展望[J]. *寒旱农业科学*, 2022, 1(1): 32-36.
YANG T Y. Research progress and prospect on molecular genetics of millet (*Panicum miliaceum* L.)[J]. *Journal of Cold-Arid Agricultural Science*, 2022, 1(1): 32-36. (in Chinese)
- [9] 孙婷婷, 胡宝忠. 转基因植物及其安全性研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2007(2): 72-74.
SUN T T, HU B Z. Progress on genetically modified plants and their securities[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2007(2): 72-74. (in Chinese)
- [10] SEGATTO R, JONES T, STRETCH D, ALBIN C, CHAUHAN R D, TAYLOR N J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cassava[J]. *Current Protocols*, 2022, 2(12): e620.
- [11] MOHAMMED S, SAMAD A A, RAHMAT Z. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice: constraints and possible solutions[J]. *Rice Science*, 2019, 26(3): 133-146.
- [12] PURWESTRI Y A, SARI R D K, ANGGRAENI L N, SASONGKO A B. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of rolC::Hd3a-GFP in black rice (*Oryza sativa* L. cv. Cempo Ireng) to promote early flowering[J]. *Procedia Chemistry*, 2015, 14: 469-473.
- [13] JIAO P, JIN S, CHEN N, WANG C, LIU S, QU J, GUAN S, MA Y. Improvement of cold tolerance in maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation of ZmSAMDC gene[J]. *GM Crops & Food*, 2022, 13(1): 131-141.
- [14] TIWARI R, SINGH A K, RAJAM M V. Improved and reliable plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 2023, 26(3): 275-284.
- [15] PRIYANKA S, KUMAR S R, MANOJ P. An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method for foxtail millet (*Setaria italica* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(4): 511-525.
- [16] LI J Q, WANG L H, ZHAN Q W, FAN F F, ZHAO T, WAN H B. Development of a simple and efficient method for *Agrobacterium*-mediated transformation in sorghum[J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2016, 18(1): 134-138.
- [17] 李锦华, 朱新强, 余成群, 沈振西, 王晓力, 李少伟, 张茜, 吴芳. 西藏高海拔河谷农区糜子种植前景展望[J]. *中国草食动物科学*, 2023, 43(4): 54-58.
LI J H, ZHU X Q, YU C Q, SHEN Z X, WANG X L, LI S W, ZHANG Q, WU F. Prospects of millet planting in high altitude valley farming areas of Tibe[J]. *China Herbivore Science*, 2023, 43(4): 54-58. (in Chinese)
- [18] 张薊, 陈梅, 朱健康, 黄娟. 一种黍属植物的遗传转化方法: CN 116262931 A[P]. 2023-06-16.
ZHANG H, CHEN M, ZHU J K, HUANG J. A genetic transformation method for *Panicum* L.: CN 116262931 A[P]. 2023-06-16. (in Chinese)
- [19] LIU Y, CHENG Z, CHEN W, WU C, CHEN J, SUI Y. Establishment of genome - editing system and assembly of a near - complete genome in broomcorn millet[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(8): 1688-1702.
- [20] LU Q, ZHAO H, ZHANG Z, BAI Y, ZHAO H, LIU G, LIU M, ZHENG Y, ZHAO H, GONG H, CHEN L, DENG X, HONG X, LIU T, LI B, LU P, WEN F, WANG L, LI Z, LI H, LI H, ZHANG L, MA W, LIU C, BAI Y, XIN B, CHEN J, E L, LAI J, SONG W. Genomic variation in weedy and cultivated broomcorn millet accessions uncovers the genetic architecture of agronomic trait[J]. *Nature Genetics*, 2024, 56(5): 1006-1017.