

DOI:10.11686/cyxb2025130

http://cyxb.magtech.com.cn

张世超, 崔国文, 张德鹏, 等. 紫花苜蓿非组培遗传转化体系创建及在耐盐基因功能鉴定与基因编辑中的应用. 草业学报, 2026, 35(3): 223—234.
ZHANG Shi-chao, CUI Guo-wen, ZHANG De-peng, *et al.* Establishment of a tissue culture-free genetic transformation system for alfalfa and its applications in salt-tolerance gene functional characterization and gene editing. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(3): 223—234.

紫花苜蓿非组培遗传转化体系创建及在耐盐基因功能鉴定与基因编辑中的应用

张世超¹, 崔国文², 张德鹏¹, 韩福迎¹, 丁叮¹, 吕向丽¹, 林硕¹, 陈乐然¹, 李吉儒¹, 才华^{1*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学动物科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 针对紫花苜蓿传统遗传转化技术存在的周期长、效率低、基因型依赖性强的技术瓶颈, 本研究创新性地建立了基于发根农杆菌介导的高效非组培遗传转化体系。以‘龙牧 806’苜蓿枝条为材料, 采用优化的节下穿刺浸染法, 构建无需组织培养的高效遗传转化体系。该方法可在 14 d 内获得转基因苜蓿嵌合体, 生根率达 72%~82%, 毛状根遗传转化率达 90.24%~94.59%。在应用验证方面, 本研究取得两项重要突破: 首先, 利用该体系快速鉴定了耐盐基因 *MtRCl2D* 的功能, 获得的转基因苜蓿嵌合体在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下抗氧化酶活性显著提高、活性氧的积累显著下降、离子稳态调节能力增强; 其次, 结合可视化报告基因 *RUBY*, 建立了苜蓿基因编辑 gRNA 快速筛选技术, 编辑效率达到 23.07%。本研究建立的体系大幅缩短了转基因苜蓿嵌合体的获得周期, 提高了转化效率。该技术不仅为紫花苜蓿基因功能研究提供了高效平台, 同时为牧草分子设计育种提供了可靠的技术支撑, 对其他饲草的遗传改良也具有重要参考价值。

关键词: 紫花苜蓿; 非组培转化; 转基因嵌合体; 耐盐基因; gRNA 筛选

Establishment of a tissue culture-free genetic transformation system for alfalfa and its applications in salt-tolerance gene functional characterization and gene editing

ZHANG Shi-chao¹, CUI Guo-wen², ZHANG De-peng¹, HAN Fu-ying¹, DING Ding¹, LYU Xiang-li¹, LIN Shuo¹, CHEN Le-ran¹, LI Ji-ru¹, CAI Hua^{1*}

1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: There are substantial challenges in the genetic improvement of alfalfa (*Medicago sativa*), a globally important forage crop, because of the limitations of conventional transformation methods. These methods are time-consuming, genotype-dependent, and reliant on labor-intensive tissue culture processes. To address these issues, we developed a rapid, tissue culture-free transformation system for alfalfa. This system was developed and optimized using the alfalfa cultivar Longmu 806. The system employs *Agrobacterium rhizogenes*-mediated infection combined with a simple stem-pricking infiltration method. This innovative approach eliminates the need for callus induction and somatic embryogenesis, enabling the generation of transgenic chimeric alfalfa within just 14 days—a dramatic reduction compared with the 3–6 months typically required with traditional protocols. We used this system in two

收稿日期: 2025-04-16; 改回日期: 2025-06-11

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项(2022ZD040120401)资助。

作者简介: 张世超(2000—), 女, 河北邯郸人, 在读硕士。E-mail: zhangsc0217@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: caihua@neau.edu.cn

applications: 1) Rapid functional analysis of the *MsRCI2D* gene, which conferred enhanced salt tolerance in transgenic chimeric plants, as evidenced by increased antioxidant enzyme activities, decreased reactive oxygen species accumulation, and improved ion homeostasis under 200 mmol·L⁻¹ NaCl stress; and 2) Establishment of an efficient guide RNA screening platform using the *RUBY* reporter system, which achieved a 23.07% editing efficiency in transformed roots, providing a robust and visual tool for optimizing CRISPR gRNAs. This breakthrough transformation strategy addresses major bottlenecks in alfalfa genetic engineering—namely genotype dependence and prolonged timelines—and offers a powerful platform for high-throughput gene function studies, abiotic stress tolerance improvement, and precision genome editing. By integrating simplicity, speed, and high efficiency, our system holds transformative potential for both fundamental research and molecular breeding in alfalfa and other recalcitrant forage crops.

Key words: *Medicago sativa*; tissue culture-free transformation; transgenic chimeras; salt tolerance; gRNA screening

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)作为世界上最早栽培且最广泛种植的豆科牧草,被誉为“牧草之王”^[1]。随着畜牧业的快速发展,针对不同地区环境需求培育新品系成为亟待解决的问题^[2]。生物育种技术在苜蓿新品种培育领域已发挥巨大的推动作用^[3]。建立高效、便捷的遗传转化体系,加速苜蓿的基因功能研究和品种改良是扩大苜蓿种质资源的有效途径。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化体系是苜蓿转化的主要方法。该方法需经过复杂的组织培养过程,其转化率较低,具有基因型依赖性,受环境和操作手法的差异,方法的可重复性差^[4]。植物组织培养技术通常依赖外源激素^[5-6],这些激素的使用会引起副作用^[7];在培养过程中加入筛选剂,对植株会造成额外压力^[8]。目前,只有少数基因型能够成功进行遗传转化,这使得直接改良优良底盘品种在实践中具有挑战性^[9]。随着转化体系不断地优化,个别紫花苜蓿品种转化效率得以提高,如‘中苜1号’转化效率最高可达31%^[10];‘WL-525HQL’的转化效率为59.7%~67.9%^[4];‘公农1号’的转化效率可达到50%^[11];‘龙牧’系列苜蓿的转化率约20%^[12]。

毛状根遗传转化体系[由发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)介导]在一些植物中的应用已取得进展^[13-15]。在紫花苜蓿中,且真措等^[16]建立毛状根转化‘无棣苜蓿’的效率可达到98.3%,但该体系需要严格的无菌操作,且转基因苜蓿嵌合体转化周期通常为3~6个月。在大豆(*Glycine max*)中,已成功利用发根农杆菌,无需组织培养途径获得转基因大豆嵌合体和毛状根^[17]。朱健康团队开发的“切割浸泡萌芽(cut-dip-budding, CDB)”技术是一种高效的无需组织培养的转基因技术^[18],在多个植物中成功实现了转化,包括草本植物、块根植物和木本植物,并且在叶肉植物和根蘖型植物中也有很大的应用前景。然而,这两种方法并不适用于苜蓿。对于苜蓿而言,其下胚轴较细,下胚轴注射法和切割的方法都难以操作获得植株。

随着CRISPR/Cas9基因编辑技术的快速发展,科学家们已开始尝试在苜蓿中进行精准的基因功能验证与育种改良^[19-22]。然而,由于苜蓿的四倍体特性和基因组的复杂性,CRISPR技术在苜蓿中的应用进展较为缓慢,转化效率低是问题的症结所在^[11]。因此,发展一种高效且简便的转化体系对推动苜蓿基因编辑技术的应用至关重要。

本研究提出一种基于苜蓿枝条的无组织培养的毛状根遗传转化方法。通过在苜蓿枝条的节下进行穿刺发根农杆菌,之后直接插入松软土壤中,14 d内即可获得转基因苜蓿嵌合体。这一方法相较于传统方法具有简便、快捷、低错误率和低感染风险的优势,且能大幅缩短转化周期。此方法不仅可用于耐盐基因功能的快速验证,还能作为基因编辑中gRNA有效性的快速鉴定,为苜蓿耐盐基因功能研究和生物育种提供了有力支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苜蓿材料为‘龙牧 806’,种子由实验室保存备用。发根农杆菌菌株 MSU440、DH5 α 大肠杆菌感受态购自上海唯地生物技术有限公司;过表达 *MsRCI2D* 基因植物表达载体 pMDC123-*RCI2D* 由实验室保存;CRISPR/Cas9 基因编辑载体 pGTR、pRGEB31R 由中国科学院青岛能源所付春祥教授馈赠。

1.2 试验方法

1.2.1 穿刺转化及方法优化 菌液制备:活化发根农杆菌 MSU440,涂布在含 50 mg·L⁻¹卡那霉素和 50 mg·L⁻¹链霉素的 LB 固体培养基(NaCl 10 g·L⁻¹、酵母粉 5 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、琼脂 15 g·L⁻¹)上,28 °C 培养约 2 d,菌板表面布满菌落。

材料准备:选择田间种植的‘龙牧 806’苜蓿作为转化材料,选取茎秆紧实、叶片健康、无萎蔫黄化的株系。苜蓿枝条剪成约含两节的段,每节下方保留约 1 cm,剪成 45°斜面并去除多余侧叶,仅保留 1 个侧芽。

穿刺方式优化:设计蘸菌和穿刺转化方式。穿刺位置设置在节上和节下,节下的穿刺位置设置为 0~0.5 cm、0.5~1.0 cm 和 1.0~1.5 cm 这 3 个区间,穿刺次数设置为 1、2、3 和 4 次 4 个组别。每组试验设置 3 个重复,每个重复 5 株。

毛状根培养:穿刺后的苜蓿材料移栽到预先浸润过霍格兰营养液的蛭石与土壤(2:1)混合基质中,26 °C、3000~5000 lx、8 h 黑暗及 16 h 光照的条件下进行培养。培养过程中定期浇灌霍格兰营养液和清水。穿刺后 14 d 内观察到毛状根在切口处生长;20 d 后,计算毛状根生根率:生根植株数/总侵染株数 \times 100%。

1.2.2 转基因毛状根检测及转化率 基因表达检测:利用 *GFP* 报告基因,通过荧光显微镜(ECHO-Revolve, RVL-100-G, 瑞士)观察根中绿色荧光,确认外源基因成功转入苜蓿根部。提取毛状根的基因组 DNA,使用特异性引物(S: ATGAGCCCAGAACGACGC; AS: TCAAATCTCGGTGACGGGC)进行 PCR 检测。

实时定量 RT-PCR(qPCR):提取 PCR 阳性毛状根 RNA,反转录为 cDNA。qPCR 以目的基因 *MsRCI2D* 的特异性引物(F: 5'-ATGAGCCCAGAACGACGC-3'; R: 5'-TCAAATCTCGGTGACGGGC-3')进行定量分析,同时以 *GAPDH* 基因作为内参基因。所有样品均进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

转化率:qPCR 阳性毛状根数量/毛状根总数 \times 100%。

1.3 利用转基因苜蓿嵌合体快速验证基因功能

转基因苜蓿嵌合体和野生型苜蓿通过 1/5 Hoagland 溶液在温室中培养约 2 个月,选择长势一致的植株进行盐胁迫处理。根据每盆植物的吸水量计算,将 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液倒入托盘中进行盐胁迫。分别在处理前、处理后 6 和 12 h 进行根部 RNA 提取。

在盐胁迫处理前及处理后 5 和 10 d,使用叶绿素测定仪(TYS-B 型,浙江)测定苜蓿叶片的相对叶绿素含量。此外,通过电导率仪(米科 EC8.0,浙江)测定叶片在去离子水中浸泡 12 h 后的初始电导率 R_1 ,随后沸水浴 30 min,再次测定电导率 R_2 。计算相对电导率(relative conductivity, REC):(R_1/R_2) \times 100%。

在盐胁迫处理前及处理后的第 5 和 10 天,每个株系、每个时间点分别取 600 mg 毛状根样品,进行 3 次生物学重复。使用苏州科铭生物技术有限公司试剂盒,测定过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子(superoxide radical, OFR)含量,以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性。

将野生型及转基因苜蓿根部于 105 °C 杀青,80 °C 烘干至恒重,研磨后称取 0.05 g 样品,加入一定量的硝化液(1.0 mL 60% 三氯乙酸,5.0 mL 浓硝酸和 0.5 mL 浓硫酸混合而成),于 90 °C 恒温水浴中提取,过滤后待测。钾离子标准溶液的配制:称取 105 °C 烘干 4~6 h 的分析纯 KCl 0.1907 g 溶于去离子水中,定容至 1 L,即得到 100 μ g·mL⁻¹ 的钾离子标准溶液。钠离子标准溶液的配制:称取 105 °C 烘干 4~6 h 的分析纯 NaCl 2.542 g 溶于去离子水中,定容至 1 L,吸取此液 250 mL 定容至 1 L,即得到 250 μ g·mL⁻¹ 的钠离子标准溶液。将钾钠两标准溶液等量混合,吸取混合标准溶液 0, 2, 5, 10, 20 和 40 mL,分别移入 50 mL 容量瓶中,加入 1 mL 硝化液,用去离子水定容,

则获得分别含钾 0, 2, 5, 10, 20 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和含钠 0, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液。用配制好的混合标准溶液在火焰光度计(上海昕瑞仪器, FP6410, 上海)上制作标准曲线后, 对样品进行测定。

1.4 可视化 gRNA 快速筛选鉴定体系建立

1.4.1 Cas9 系统靶位点设计及载体构建 克隆 *MsPALM-1* 基因, 并确定其 PAM 序列为 NGG。根据 gRNA 设计原则, 靶位点序列应符合 5'-20 bp+NGG-3' 的形式, 同时确保 GC 含量不低于 40%, 避免覆盖品种的 SNP 突变位点, 并尽可能选择靠近读码框 5' 端的靶位点。通过在线工具分析 gRNA 目标序列的二级结构, 筛选适合 *MsPALM-1* 基因编辑的靶位点(图 1)。

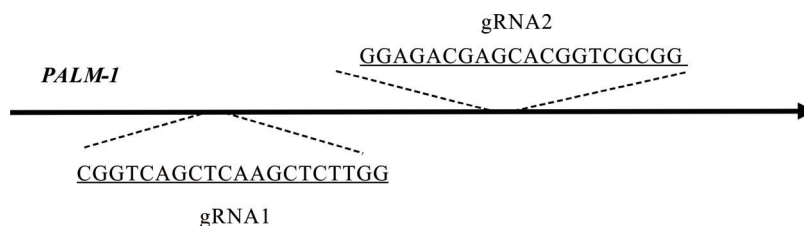


图 1 *MsPALM-1* 基因 gRNA 靶位点位置

Fig. 1 The gRNA target sequence of *MsPALM-1*

以含有 tRNA 和 gRNA 序列的 pGTR 载体作为模板, 设计带靶位点的特异性引物, 并参考付春祥团队^[19,23]的方法进行扩增和连接靶点片段。所设计的引物如下: S-1: GCTAACTCTGGATAACAAAGCACCAGTG, AS-1: GCGGTCTCAGTGCTCGTCTCCTGCACCAGCCGGGAA; S-2: TAGGTCTCATCAAGCTCTTGGGTTTTAGAGCTAGAA, AS-2: GCGGTCTCAGCGGTCTCATTGAGCTGACCGTGCACCAGCCGGGAA; S-3: TAGGTCTCATCAAGCTCTTGGGTTTTAGAGCTAGAA, AS-3: TAGGTCTCAATATAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC。将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取抗性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 并测序验证靶点序列的正确性。

1.4.2 *RUBY* 基因克隆和载体的构建 以 35S:*RUBY* 载体为模板, 根据 35S:*RUBY* 基因的全长序列以及 pRGEB31R-*MsPALM* 载体序列设计同源臂引物(35S:*RUBY*-S: CACATTATTATGGAGAACTCGAGATGGATCATGCGACCCTC; 35S:*RUBY*-AS: CAAATCTATCTCTCTCGACTCGAGTCACTATCACTGGAGGCT), PCR 扩增并回收目的片段。载体 pRGEB31R-*MsPALM* 采用 *Xho* I 进行单酶切, 随后利用无缝克隆技术进行连接、转化、PCR 鉴定、测序。将测序正确的菌液储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备后续试验。

1.4.3 可视化快速筛选鉴定 按照 1.2.2 中的方法, 将含 pRGEB31R-*MsPALM*-35S:*RUBY* 质粒的发根农杆菌通过穿刺方法侵染紫花苜蓿枝条。在毛状根生长后, 通过根的颜色进行可视化筛选: 由于 *RUBY* 基因可使转基因组织呈红色, 因此直接筛选红色毛状根作为阳性样本。

随后, 从红色毛状根中提取基因组 DNA 进行 PCR 检测, 并进一步测序以确认 gRNA 介导的基因编辑是否成功。通过测序峰图分析 gRNA 靶点的突变情况, 并评估基因编辑类型(碱基缺失、插入或替换), 以判断 gRNA 靶点的有效性^[23]。

1.5 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 进行标准差计算、方差分析(ANOVA)和 *T* 检验。 $P < 0.01$ 为差异极显著(**), $0.01 < P < 0.05$ 为差异显著(*), $P > 0.05$ 为差异不显著。所有试验数据来源于 3 次生物学重复和 3 次技术重复计算得到的平均值。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿穿刺法遗传转化体系的建立

2.1.1 穿刺方式的优化 为提高遗传转化效率, 本研究对影响毛状根转化的关键因素进行了系统优化。首先

比较了蘸菌与穿刺两种方法,结果发现,穿刺法处理的苜蓿枝条其毛状根生根率达 100%,而蘸菌的枝条并未长出毛状根,表明穿刺处理对毛状根诱导具有必要性(图 2b)。

进一步探讨穿刺部位对转化效率的影响,结果显示节上穿刺平均根长为 0.41 cm,节下穿刺根长为节上穿刺的 13.85 倍,毛状根数量节上穿刺平均为 0.93 根,节下穿刺平均为 6.27 根,由此可知节下穿刺转化显著提高毛状

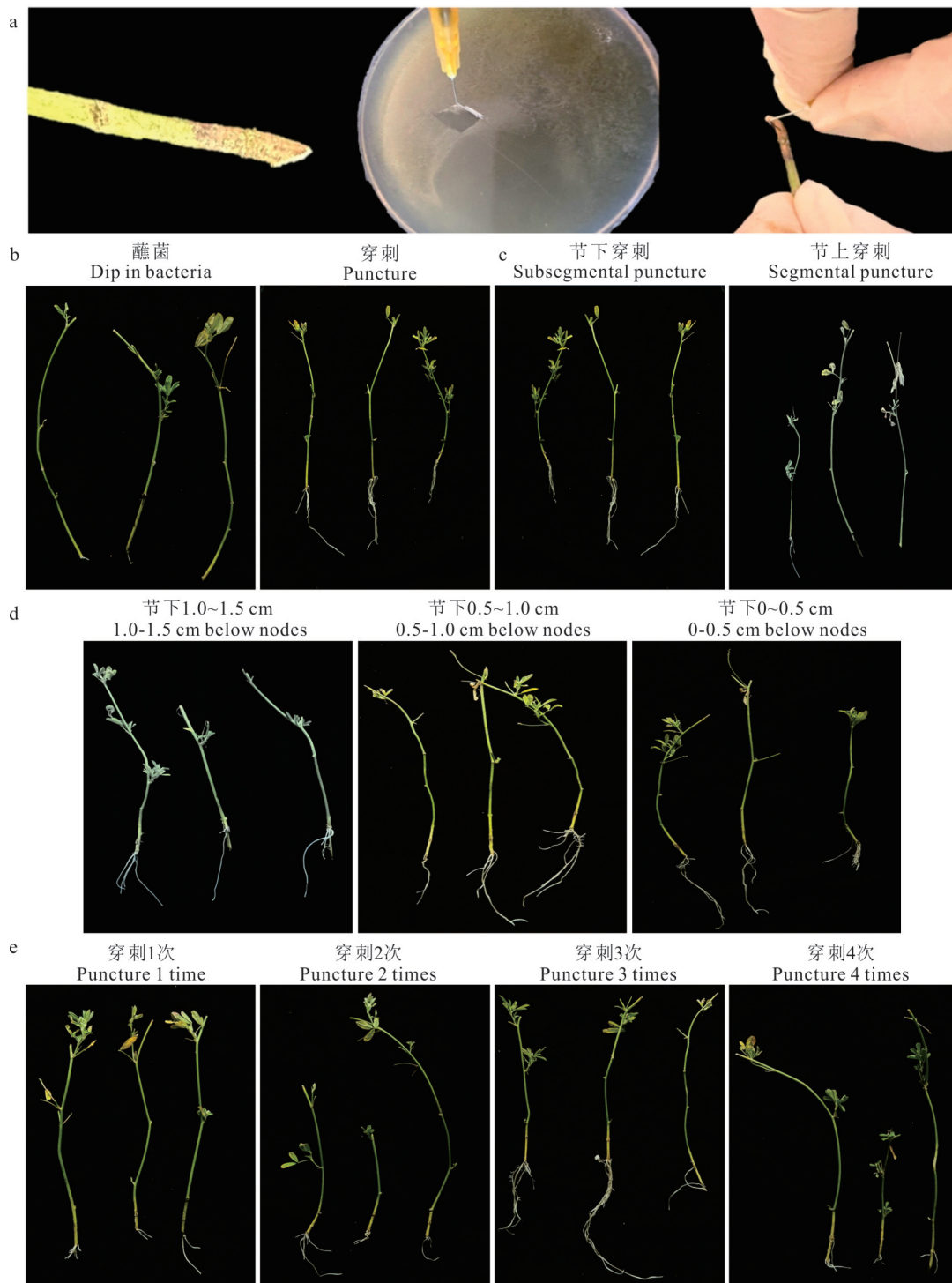


图 2 不同穿刺方式毛状根的生长情况

Fig. 2 Growth of hairy roots in different puncture methods

(a) 穿刺准备及过程 Puncture preparation and procedure; (b) 蘸菌与穿刺转化毛状根 Dip and puncture transformed hairy roots; (c) 节上与节下穿刺 Subsegmental and segmental punctured hairy roots; (d) 节下不同位置穿刺 Different locations of below nodes punctured hairy roots; (e) 节下 0.5~1.0 cm 处穿刺不同次数 Different times of punctured hairy roots from 0.5—1.0 cm below the node.

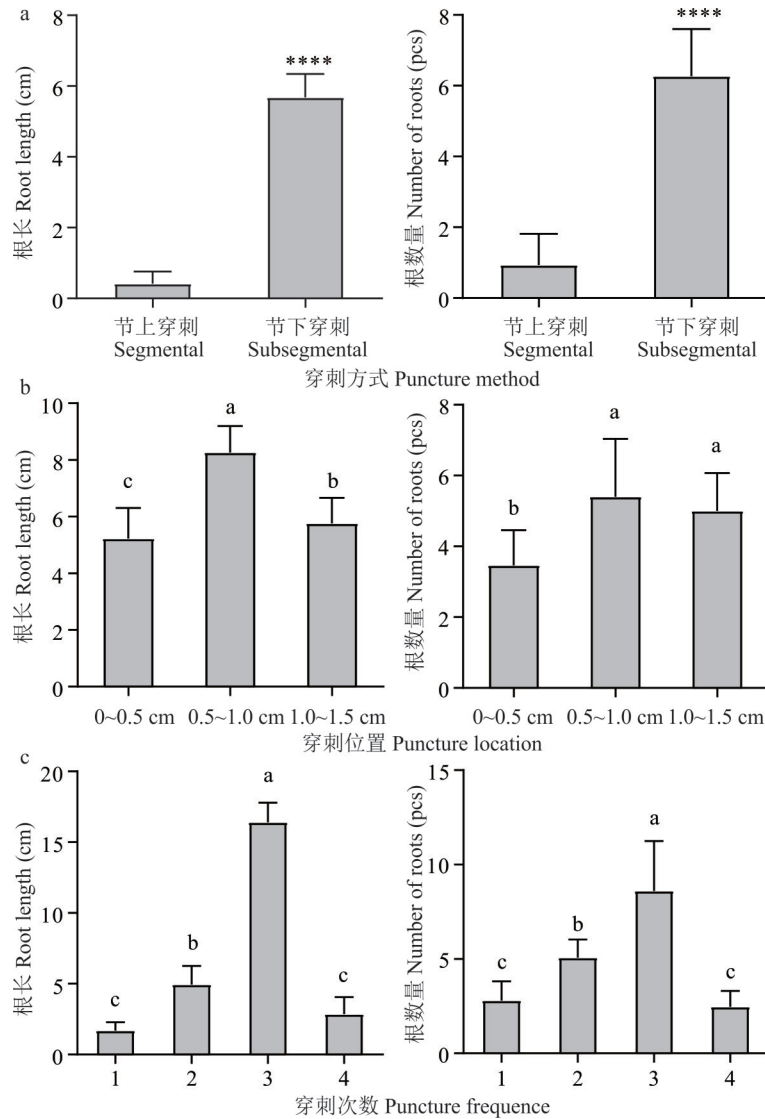


图3 不同转化方式处理14 d后毛状根生长情况

Fig. 3 Statistical comparison of hairy root growth after 14 days of treatment by different transformation methods

(a) 节上与节下穿刺 Statistics on hairy root growth of subsegmental and segmental punctured branches; (b) 不同位置节下穿刺 Below nodes punctured branches at different locations; (c) 节下0.5~1.0 cm处穿刺不同次数 Punctured branches with different number of times from 0.5~1.0 cm below the node. ****: 差异极显著 Extremely significant difference ($P < 0.0001$). 不同小写字母表示不同穿刺位置或不同穿刺次数间差异显著 ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different puncture locations or frequencies.

根的数量和根长 ($P < 0.001$, 图2c和图3a)。在此基础上,对节下不同位置的穿刺效果进行比较,在节下0.5~1.0 cm处穿刺的枝条,其根长分别为0~0.5 cm、1.0~1.5 cm的1.58、1.56倍,根数量分别为0~0.5 cm、1.0~1.5 cm的1.56、1.08倍(图2d和图3b)。

穿刺次数对转化效果的评估影响结果表明,穿刺3次时,毛状根的数量和根长均达到最佳(图2e和图3c),其中毛状根根长约为其他试验组的9.73、3.32、5.76倍,毛状根数量为其他试验组的3.08、1.69、3.48倍。尽管增加穿刺次数可提高发根农杆菌的侵染率,但过多穿刺可能影响枝条的生长,因此需根据苜蓿枝条的粗度进行适当调整。

基于上述结果,确定最佳穿刺转化操作流程如下:使用1 mL注射器的针头,经适当弯曲后刮取发根农杆菌,在苜蓿枝条节下0.5~1.0 cm处进行3次穿刺(图2a)。处理后的枝条移栽至蛭石:土(2:1)的基质中,保持湿润,在适宜光照条件下培养,14 d后可观察到毛状根的产生。培养过程中定期补充水分或霍格兰营养液。

2.1.2 穿刺法遗传转化效率评估 优化的穿刺遗传转化法,毛状根的生根率达82%。由于pMDC123载体携带的GFP报告基因,因此在荧光显微镜下检测根中的荧光信号,结果显示新生毛状根具有明显的绿色荧光(图

4a),表明外源基因成功整合并在根部表达。

此外,利用 *Bar* 基因毛状根进行 PCR 检测,阳性率达到 90.24%(图 4b)。进一步通过 *MsRCI2D* 基因的 qPCR 分析,结果显示,该方法可实现外源基因在毛状根中的超量表达,并在不同株系间表现出表达的差异(图 4c)。

2.2 *MsRCI2D* 基因耐盐的快速鉴定

2.2.1 转基因苜蓿嵌合体耐盐性增强

转基因苜蓿嵌合体(D₁、D₂)与野生型(WT)植株在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液中处理 10 d 后,叶绿素含量和叶片的相对电导率如图 5a 和 b 所示。与 WT 相比,5 和 10 d 时转 *MsRCI2D* 基因苜蓿嵌合体叶绿素含量分别是 WT 株系的 1.62、1.64 倍,差异显著($P < 0.01$)。相应的,WT 株系电导率显著高于嵌合体,盐胁迫 5 和 10 d 时分别是嵌合体的 2.14 和 2.03 倍,嵌合体电导率显著降低($P < 0.01$)。尽管转基因嵌合体仅在根部超量表达 *MsRCI2D*,但盐胁迫造成的损伤具有系统性,其耐盐效应可扩展至地上部。

2.2.2 盐胁迫下活性氧积累及抗氧化酶活性的变化

未处理时,各株系间毛状根中 MDA、H₂O₂ 和 OFR 含量的差异不显著(图 5c~e)。然而,在盐胁迫 5 d 后,WT 植株 MDA、H₂O₂、OFR 含量为转基因植株的 2.95、6.14、6.8 倍;盐处理 10 d 时,WT 植株 3 种活性氧的含量为转基因植株的 1.70、2.85、4.40 倍,差异极显著($P < 0.01$)。

进一步测定毛状根中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性(图 5f~i)。在未处理条件下,转基因植株 SOD 活性显著高于 WT($P < 0.05$)。盐胁迫后,4 种抗氧化酶活性均显著上调,尤其是 POD,在盐处理 5 d 时活性达到 WT 的 2.07 倍。CAT、SOD 及 GR 活性在盐处理 10 d 时显著高于 WT($P < 0.05$),分别为 WT 的 1.97、1.79、1.04 倍。由此表明,*MsRCI2D* 通过增强抗氧化酶活性,提高了苜蓿的抗氧化能力,对应地降低了活性氧积累,减轻盐胁迫引起的氧化损伤。

2.2.3 盐胁迫下钠钾离子含量的变化

为探讨 *MsRCI2D* 对离子稳态的调控作用,测定 WT 和转基因株系毛状根中 Na⁺、K⁺ 含量(图 5j~l)。在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下,转基因株系根部 Na⁺ 含量升高,K⁺ 含量降低,Na⁺/K⁺ 显著升高,且均与 WT 形成显著差异($P < 0.01$)。这一结果表明,*MsRCI2D* 的超量表达有助于降低盐胁迫下 Na⁺ 的毒害作用,维持较高的 K⁺ 含量和较低的 Na⁺/K⁺。

2.3 利用 *RUBY* 报告基因建立可视化 gRNA 快速筛选体系

2.3.1 可视化鉴定的准确性

基于 2.1 建立的遗传转化体系,进行了 gRNA 靶点有效性的快速筛选。先利用转化的材料统计了 *RUBY* 可视化筛选鉴定的准确性。50 株转化植株中,有 36 株在切口处长出毛状根,毛状根的生根率为 72%(图 6a)。其中,26 株毛状根呈红色,对其进行 *Bar* 基因 PCR 鉴定(图 6b),PCR 阳性率达到 100%。因此,在无需组织培养的快速遗传转化体系中,*RUBY* 报告基因可实现阳性转基因植株的可视化筛选,避免了 PCR 检测的繁琐操作,并具有较高的检出率和准确性。

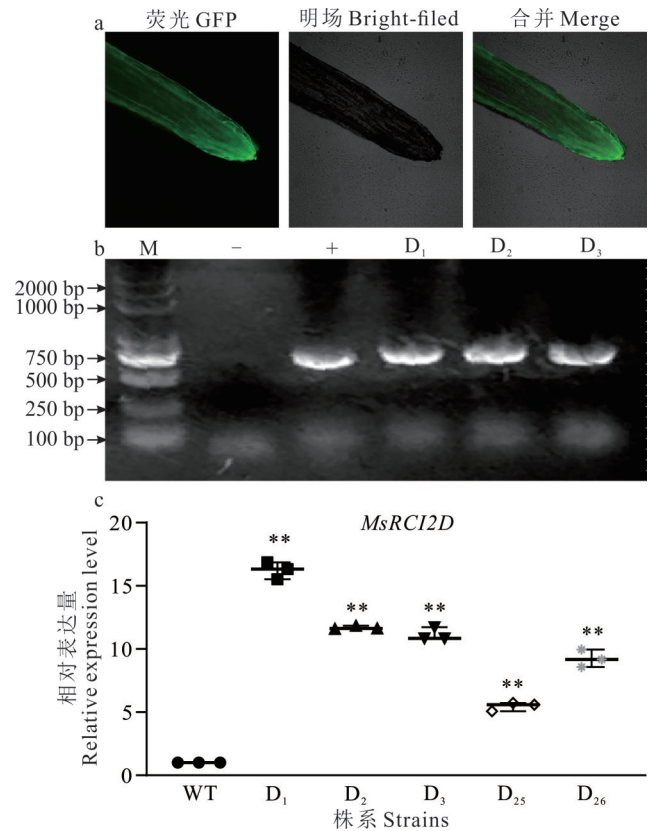


图 4 毛状根阳性苗鉴定

Fig. 4 Identification of hairy root positive seedlings

(a) *MsRCI2D* 基因的毛状根荧光 Fluorescence observation of hairy roots of *MsRCI2D* gene; (b) 毛状根阳性苗 PCR 鉴定 PCR identification of hairy root positive seedlings; (c) 阳性苗实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR of positive seedlings; M: 分子量标记 Trans 2K DNA Marker; -: 阴性对照 Negative control; +: 阳性对照 Positive control; WT: 野生型植株 Wild-type plant; D₁~D₃, D₂₅, D₂₆: *MsRCI2D* 基因不同转化株系 Plants transformed with *MsRCI2D*. **: 差异极显著 Extremely significant difference ($P < 0.01$).

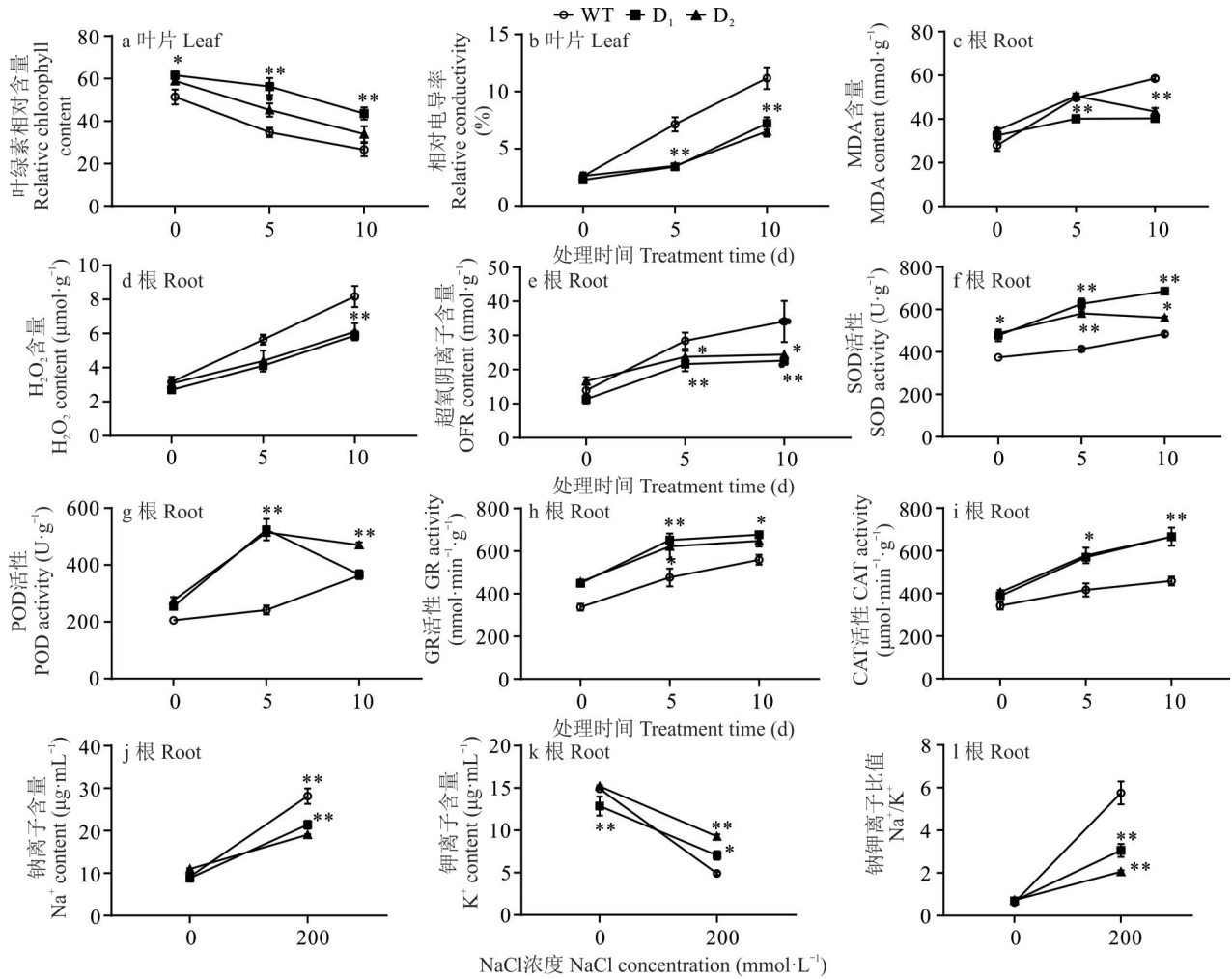


图5 盐胁迫下转 *MsRCI2D* 基因苜蓿嵌合体的表型分析

Fig. 5 Phenotypic analysis of alfalfa chimeras transgenic for the *MsRCI2D* gene under salt stress

D₁, D₂: 不同转 *MsRCI2D* 植株 Different trans-*MsRCI2D* plants; *: 差异显著 Significant difference ($P < 0.05$); **: 差异极显著 Extremely significant difference ($P < 0.01$).

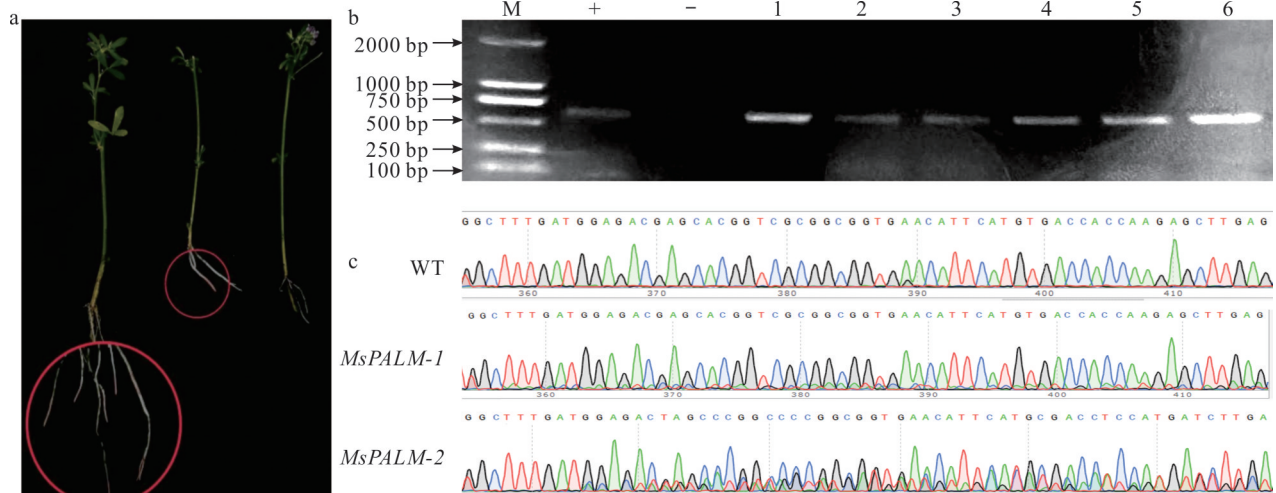


图6 毛状根阳性苗鉴定及 Sanger 测序

Fig. 6 Identification of hairy root positive seedlings and sanger sequencing results

(a) 红色毛状根表型 Red hairy root phenotype; (b) 毛状根阳性鉴定 Hairy root positive identification; (c) Sanger 测序结果 Sanger sequencing results; M: DL2000 Marker; -: 阴性对照 Negative control; WT: 野生型 Wild type; +: 阳性对照 Positive control; 1~6: 阳性苗鉴定 Positive seedling identification; WT: 野生型 Wild type; *MsPALM*-1/2: 阳性毛状根部分测序结果 Positive trichome root sequencing results.

2.3.2 gRNA 有效性的快速鉴定 在确认 26 株转基因阳性毛状根后,对 *MsPALM* 基因编辑的效率进行评估,验证 gRNA 靶点的有效性。测序结果显示,其中 4 个样品检测到双峰信号,即基因编辑效率为 15.38%(图 6c)。由此可见,该可视化转化体系可用于 gRNA 的快速筛选和有效性验证,为基因编辑提供了便捷的筛选策略。

3 讨论

3.1 影响毛状根发生率的因素

毛状根的诱导受多个因素影响,主要包括发根农杆菌菌株的选择和受体植物的结构特性。目前常见的发根农杆菌菌株包括 K599、MSU440、LBA9402 等,不同菌株在不同植物中的诱导效率存在差异。例如,LBA9402 在苜蓿中的诱导效率较高^[24],ATCC15834 在 $OD_{600}=0.6$ 时可有效诱导茶树‘福云 6 号’(*Camellia sinensis*)的毛状根形成^[25],而在番茄(*Solanum lycopersicum*)转化中,Ar Qual 具有最佳转化效率^[26]。本研究采用的 MSU440 是应用广泛的菌株,在苜蓿转基因研究中已有成功报道^[27],但并非发根率最高。因此,筛选不同菌株,也是提升生根率的途径。

此外,毛状根诱导的成功率与接种方式密切相关。CDB(切割—浸泡—萌发)的转化方法,在草本、块根和木本植物都有成功的报道,但也有局限性^[18]。本试验也尝试了 CDB 的方法(图 3b),但未能成功诱导毛状根。这可能与苜蓿的茎组织结构、激素平衡及伤口愈合机制相关^[28-29]。为了提高毛状根的诱导率,本研究结合穿刺法,可以有效地诱导毛状根,并发现穿刺的操作是毛状根形成的关键因素。而穿刺的位置和穿刺的次数也会影响毛状根的发根率和根长。经试验确定,对于 2 mm 直径的苜蓿枝条,在节下 0.5~1.0 cm 处穿刺 3 次,毛状根的发根率最高。由于苜蓿可扦插,该方法可能适用于其他可扦插繁殖的木本和草本植物,但具体参数需结合不同植物的茎秆结构进一步优化。

3.2 应用毛状根转化体系进行基因功能的快速鉴定

转化体系的效率与精准度直接决定了基因功能研究的深度和应用价值。高效的遗传转化体系可实现对目标基因的定向操作(如沉默、过表达或基因编辑),从而在体内验证基因的生物学功能。植物发根农杆菌介导的遗传转化体系是许多与植物根相关的理论研究的理想系统,通过缩短转化周期,可以加快抗盐碱、抗旱、根瘤和根部相关病害的研究进程^[30-31]。本研究建立的穿刺遗传转化体系,过表达 *MsRCI2D* 基因,获得转基因苜蓿的嵌合体,通过对盐胁迫下苜蓿根中各项生理指标的检测,确定该基因具有增强苜蓿耐盐性的功能,主要表现为抗氧化酶活性升高,活性氧积累减少,离子调控能力增强(图 5)。本试验方法 14 d 内即可得到转化毛状根,利用该转基因嵌合体,进行基因功能研究,大大缩短了试验周期。

3.3 *RUBY* 报告基因在转基因筛选中的应用

RUBY 报告基因是将 *CYP76AD1*、*DODA* 和 *GT* 这 3 个基因偶联一个开放读码框的基因。以酪氨酸为底物,在 *CYP76AD1*、*DODA* 和 *GT* 这 3 种酶的催化下可合成甜菜红素,因此,*RUBY* 是一种可视的报告基因^[32]。与传统 *GUS* 报告基因相比,*RUBY* 具有无需外源底物、无需染色处理、可直接观察阳性植株的优点。此外,生长素响应启动子 *DR5* 介导的 *RUBY* 表达已成功应用于愈伤组织诱导筛选^[32],可在组织培养阶段直接通过颜色筛选转化植株。本研究采用组成型启动子驱动 *RUBY*,以增强显色效果。在转化的毛状根中,红色根的阳性检测率达 100%(图 6a,c),证明 *RUBY* 可作为可靠的可视化筛选标记,免去 PCR 检测,提高了筛选效率,有助于活体快速筛选阳性转化植株。

3.4 可视化 gRNA 快速筛选体系

自 2020 年新疆大叶四倍体基因组重测序后,国内已经有 5 个团队成功实现了紫花苜蓿的基因组编辑,基因编辑的效率也由 1.72% 提升到 49.00%^[33-36]。Zhao 等^[11]和 Wolabu 等^[36]基因编辑的成功案例提示高的遗传转化效率是底盘,而串联多靶点可以有效提升基因编辑的效率。由此可见,gRNA 的选择是决定紫花苜蓿基因编辑成功与否的另一个关键。由于毛状根诱导和生长都较为迅速,因此毛状根体系可作为平台快速验证紫花苜蓿基因编辑 gRNA 的有效性,在筛选中加上可视化的报告基因,也使得筛选工作更为便捷简单。本研究结合无组培毛状根遗传转化和 *RUBY* 报告基因,在 26 株阳性毛状根中获得 4 株基因编辑的毛状根,较为高效地实现了 gRNA 的筛

选和基因编辑载体的验证。后续基因编辑苜蓿植株的获得,可以利用毛状根诱导愈伤组织获得再生植株,也可以用已经构建的Cas9-sgRNA-RUBY载体转化苜蓿的叶片,借助RUBY报告基因的筛选也可以获得稳定的基因编辑苜蓿材料。

4 结论

本研究建立了一套无需组织培养获得转基因苜蓿嵌合体的方法,即苜蓿茎节下0.5~1.0 cm处穿刺发根农杆菌MSU440,14 d后长出毛状根,生根率达72%~82%,毛状根遗传转化率达90.24%~94.59%。利用该体系快速鉴定了耐盐基因*MsRCI2D*的功能,获得的转基因嵌合体在200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下抗氧化酶活性显著提高、活性氧的积累显著下降,离子调控能力增强。结合可视化报告基因RUBY,建立了苜蓿基因编辑gRNA快速筛选技术,编辑效率达到23.07%,为CRISPR/Cas9系统在苜蓿中的应用提供了新策略。

参考文献 References:

- [1] Ma J L, Cheng W Y. The feeding value and high-yield cultivation technology of alfalfa. *Tillage and Cultivation*, 2023, 43(3): 104–107.
马娇丽,程婉莹. 紫花苜蓿饲喂价值及高产栽培技术. *耕作与栽培*, 2023, 43(3): 104–107.
- [2] Guo C Y, Fang Y Y, Yi F Y, *et al.* Current status of protection and utilization of pasture germplasm resources in China. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2024, 45(6): 81–86.
郭呈宇,房永雨,伊风艳,等. 我国牧草种质资源保护与利用现状. *畜牧与饲料科学*, 2024, 45(6): 81–86.
- [3] Cong L L, Danzhencuo, Zhang W Y, *et al.* Research progress of CRISPR/Cas gene editing technology in grasses. *Chinese Journal of Grassland*, 2022, 44(9): 107–120.
丛丽丽,旦真措,张文玉,等. CRISPR/Cas基因编辑技术在草类植物中的研究进展. *中国草地学报*, 2022, 44(9): 107–120.
- [4] Yi D X, Tong Z Y. Optimization of genetic transformation system in alfalfa. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(2): 504–511.
仪登霞,仝宗永. 紫花苜蓿遗传转化体系的优化. *分子植物育种*, 2021, 19(2): 504–511.
- [5] Jiang L. Establishment of plant regeneration system of alfalfa. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
姜柳. 紫花苜蓿植株再生体系的建立. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [6] Yue W N, Xu T Y, Miao J M, *et al.* Screening of reference genes in different tissues and hormone treatments of alfalfa. *Grassland and Turf*, (2024-05-22)[2025-06-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1156.S.20240521.1243.002.html>.
岳炜楠,胥通玉,苗佳敏,等. 紫花苜蓿不同组织及不同激素处理下内参基因的筛选. *草原与草坪*, (2024-05-22)[2025-06-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1156.S.20240521.1243.002.html>.
- [7] Tao Y H, Fang L S, Yue J F, *et al.* Effects of exogenous ABA application on dormancy of terminal buds and its physiological and biochemical characteristics in paulownia. *Scientia Silvae Sinicae*, (2024-08-28)[2025-06-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1908.s.20240828.0929.002.html>.
陶昱含,房丽莎,岳继飞,等. 外源ABA施用对泡桐顶芽休眠及其生理生化特征的影响. *林业科学*, (2024-08-28)[2025-06-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1908.s.20240828.0929.002.html>.
- [8] Luo X W. Establishment of plant genetic transformation selection system based on biuret and its metabolic enzyme. Kunming: Yunnan Normal University, 2023.
罗晓伟. 基于缩二脲及其代谢酶的植物遗传转化筛选系统的建立. 昆明: 云南师范大学, 2023.
- [9] Ye Q Y, Zhou C E, Lin H, *et al.* *Medicago2035*: Genomes, functional genomics, and molecular breeding. *Molecular Plant*, 2025, 18(2): 219–244.
- [10] Wang Z J, Li M X, Zhang W J. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of alfalfa. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(6): 1665–1671.
王之杰,李明序,张万军. 根瘤农杆菌介导的紫花苜蓿遗传转化体系的优化. *草地学报*, 2024, 32(6): 1665–1671.
- [11] Zhao H X, Zhao S Y, Cao Y P, *et al.* Development of a single transcript CRISPR/Cas9 toolkit for efficient genome editing in autotetraploid alfalfa. *The Crop Journal*, 2024, 12(3): 788–795.
- [12] Luo Y Q, Wang X S, Zhang D P, *et al.* Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene *MsPPCK1* from *Medicago sativa* L. increased alkali tolerance of alfalfa by enhancing photosynthetic efficiency and promoting nodule

- development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 214: 108764.
- [13] Huo X Y, Schnabel E, Hughes K, *et al.* RNAi phenotypes and the localization of a protein: : GUS fusion imply a role for *Medicago truncatula* PIN genes in nodulation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2006, 25: 156–165.
- [14] Kavitha T K, Sergey I, Bruna B, *et al.* Knockdown of *CELL DIVISION CYCLE16* reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1155–1166.
- [15] Zhang H L, Cao Y P, Zhang H, *et al.* Efficient generation of CRISPR/Cas9-mediated homozygous/biallelic *Medicago truncatula* mutants using a hairy root system. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 294.
- [16] Danzhencuo, Guo Y H, Li C, *et al.* Developing a hairy root transformation system for alfalfa. *Chinese Journal of Grassland*, 2024, 46(6): 95–102.
旦真措, 郭雨寒, 李聪, 等. 紫花苜蓿毛状根高效转化体系的建立. *中国草地学报*, 2024, 46(6): 95–102.
- [17] Chen J X, Mei H, Huang C X, *et al.* A highly efficient method to generate chimeric soybean plant with transgenic hairy roots. *Chinese Bulletin of Botany*, 2024, 59(1): 89–98.
陈佳欣, 梅浩, 黄彩翔, 等. 利用转基因毛状根高效培育大豆嵌合植株的方法. *植物学报*, 2024, 59(1): 89–98.
- [18] Cao X S, Xie H T, Song M L, *et al.* Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *The Innovation*, 2023, 4(1): 100345.
- [19] Xie K B, Minkenberg B, Yang Y N. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3570–3575.
- [20] Zhu F G, Ye Q Y, Chen H, *et al.* Multigene editing reveals that *MtCEP1/2/12* redundantly control lateral root and nodule number in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(10): 3661–3676.
- [21] Meng Y Y, Hou Y L, Wang H, *et al.* Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(2): 371–374.
- [22] Luciano P, Philippe B, Sabrina D, *et al.* QTL analysis for grazing tolerance, autumn dormancy and growth habit offers prospects for marker-assisted selection in lucerne. *Euphytica*, 2021, 217(8): 171.
- [23] Zhao L J. Development and optimization of highly efficient genetic transformation and genome editing system for alfalfa (*Medicago sativa* L.). Yinchuan: Ningxia University, 2022.
赵丽娟. 紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.) 高效遗传转化与基因组编辑体系的建立与优化. 银川: 宁夏大学, 2022.
- [24] Crane C, Wright E, Dixon R A, *et al.* Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta*, 2006, 223(6): 1344–1354.
- [25] Lin C R, Zhang D M, Zhang W J, *et al.* Induction of hairy roots of tea plant by three kinds of *Agrobacterium rhizogenes*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(3): 509–516.
林彩容, 张冬敏, 张文静, 等. 3种农杆菌对茶树状根诱导的影响. *西北植物学报*, 2021, 41(3): 509–516.
- [26] Bian H H, Zhao W C, Wei J W. Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains on induction rate and positive rate of hairy roots. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(24): 8237–8244.
边慧慧, 赵文超, 魏婧薇, 等. 不同发根农杆菌菌株对番茄毛状根诱导率及阳性率的影响. *分子植物育种*, 2022, 20(24): 8237–8244.
- [27] Tao N, Li M X, Guo H C. Optimization of sweet potato genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(10): 175–183.
陶娜, 李茂兴, 郭华春. 发根农杆菌介导的甘薯遗传转化体系优化. *生物技术通报*, 2023, 39(10): 175–183.
- [28] Liu F, Wang Y X, Chen A P, *et al.* Callus induction and differentiation of Xinjiang *Medicago falcata* L. *Acta Agrestia Sinica*, 2012, 20(4): 741–746.
刘芳, 王玉祥, 陈爱萍, 等. 新疆野生黄花苜蓿愈伤诱导及分化的研究. *草地学报*, 2012, 20(4): 741–746.
- [29] Ren Z M, Liu C, Li S S, *et al.* Effects calli differentiation of alfalfa and endogenous hormones levels under endogenous hormones and ⁶⁰Co-γ radiation. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(7): 2162–2169.
任忠敏, 刘畅, 李珊珊, 等. 外源激素和⁶⁰Co-γ辐射对苜蓿愈伤组织分化及内源激素水平的影响. *草地学报*, 2023, 31(7): 2162–2169.
- [30] Ding Y L, Kalo P, Yendrek C R, *et al.* Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 2008, 20(10): 2681–2695.
- [31] Zhao E H, Xie J P, Zhang Y J, *et al.* Establishment and application of hairy root transformation system of alfalfa. *Chinese*

Journal of Grassland, 2022, 44(1): 1–9.

赵恩华, 谢建平, 张钰靖, 等. 紫花苜蓿毛状根转化体系的建立及应用. 中国草地学报, 2022, 44(1): 1–9.

- [32] Polturak G, Breitel D, Grossman N, *et al.* Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytologist*, 2016, 210(1): 269–283.
- [33] Chen H T, Zeng Y, Yang Y Z, *et al.* Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2494.
- [34] Yi X F, Wang C C, Yuan X Q, *et al.* Exploring an economic and highly efficient genetic transformation and genome-editing system for radish through developmental regulators and visible reporter. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2024, 120(4): 1682–1692.
- [35] Ye Q Y, Meng X Z, Chen H, *et al.* Construction of genic male sterility system by CRISPR/Cas9 editing from model legume to alfalfa. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(4): 613–615.
- [36] Wolabu T W, Mahmood K, Jerez I T, *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of alfalfa *FLOWERING LOCUS Ta1 (MsFTa1)* leads to delayed flowering time with improved forage biomass yield and quality. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(7): 1383–1392.