

· 专题论坛 ·

高粱遗传转化研究进展

刘宣雨^{1,2}, 王青云¹, 刘树君¹, 宋松泉^{1*}

¹中国科学院植物研究所能源植物研发中心, 北京 100093; ²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 高粱(*Sorghum bicolor*)是一种重要的多用途作物, 其遗传转化研究对于高粱的分子育种和分子遗传学基础研究都具有重要意义。该文对高粱遗传转化的方法、标记基因、遗传转化的启动子和受体系统进行了综述, 并提出了今后高粱遗传转化应当集中研究的问题。

关键词 遗传转化, 标记基因, 启动子, 受体系统, 高粱

刘宣雨, 王青云, 刘树君, 宋松泉 (2011). 高粱遗传转化研究进展. 植物学报 46, 216–223.

在世界范围内, 高粱(*Sorghum bicolor*)是继小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和大麦(*Hordeum vulgare*)之后位居第5位的重要谷物(Saballos, 2008)。长期以来, 在亚洲、非洲和美洲的高温少雨地区, 高粱作为一种多用途作物而被广泛种植, 以提供粮食、饲料、燃料、酿酒原料以及工业用淀粉(Liang and Gao, 2001)。随着生物质能源需求的增加, 甜高粱作为粒用高粱的一个变种(杨明等, 2009), 由于其生物学产量和茎秆含糖量较高, 同时兼有耐旱、耐涝、耐贫瘠和耐盐碱等诸多优良特性, 被认为是最具开发潜力的能源植物之一(刘公社等, 2009)。由于有用种质资源的匮乏以及有性杂交不亲和的原因, 采用传统育种方法对高粱进行遗传改良受到了限制(Girijashankar and Swathisree, 2009); 而基因工程通过转入新的基因为高粱的遗传改良提供了一条新的途径(Jogeswar et al., 2007)。此外, 高粱的遗传转化对于进行高粱基因功能分析、创建T-DNA插入突变体库等基础研究也具有重要的意义。尽管高粱被认为是组织培养和遗传转化最为困难的物种之一(Gao et al., 2005a), 近年来国内外仍有一些成功实现高粱遗传转化的报道。本文对近10年来关于高粱遗传转化的研究进行了总结, 以期对高粱、尤其是甜高粱的遗传转化提供参考。

1 高粱的遗传转化方法

目前已成功实现高粱遗传转化并获得转化植株的方法有基因枪法、农杆菌介导法和花粉管通道法。

1.1 基因枪法

基因枪法(biolistic method)又称微粒轰击法(micro-projectile/partical bombardment), 是将外源DNA包被在微小的金粉或钨粉表面, 然后在高压的作用下微粒被高速射入受体细胞或组织, 微粒上的外源DNA进入细胞后, 整合到植物染色体上从而实现基因转化的一种方法(王关林和方宏筠, 2002)。基因枪法具有无宿主限制的优点, 因而最初广泛应用于包括高粱在内的对农杆菌不敏感的禾谷类作物转化中。Casas等(1993)首次采用基因枪轰击高粱幼胚并成功获得了具有除草剂抗性的高粱转化植株。随后也有一些采用基因枪法转化高粱的研究报道(表1)。国内石太渊等(2003)利用基因枪轰击由高粱幼穗诱导的愈伤组织, 将编码Bt杀虫蛋白的基因成功转入高粱。然而基因枪法的缺点在于转化的基因往往多拷贝插入, 从而导致基因沉默和低的转化频率。例如, 在应用基因枪法转化高粱的报道中, Emani等(2002)获得的转化频率为0.18%, Able等(2001)为1%, Zhu等(1998)为0.09%,

收稿日期: 2010-08-30; 接受日期: 2010-12-22

基金项目: 广东省中国科学院全面战略合作项目(No.2009B091300161)和中国科学院植物研究所前沿研究项目(No.110700Q001)

* 通讯作者。E-mail: sqsong@ibcas.ac.cn

表 1 高粱的遗传转化
Table 1 The genetic transformation of *Sorghum bicolor*

转化方法	基因型	受体材料	农杆菌株	质粒载体	启动子:基因(稳定转化)	参考文献
花粉管通道法	TX622B	-	-	-	PYH15	石太渊等, 2001
花粉管通道法	雄性不育系 A2V4A 及其保持系 A2V4B	-	-	pBI121	35S:uidA, nos:nptII	Wang et al., 2007
基因枪轰击法	P898012	幼胚	-	pPHP620, pPHP687	35S:bar, 35S:uidA	Casas et al., 1993
基因枪轰击法	SRN39	幼穗	-	pPHP620	35S:bar, 35S:uidA	Casas et al., 1997
基因枪轰击法	Tx430	幼胚	-	-	35S:G11(水稻几丁质酶基因), 35S:bar	Zhu et al., 1998
基因枪轰击法	M35-1, SA281, QL41, P898012	幼穗	-	pAHC20	ubi1:uidA, ubi1:gfp	Able et al., 2001
基因枪轰击法 /农杆菌介导法	Tx430, Wheatland	幼胚	-	pUC18	ubi1:gfp	Jeoung et al., 2002
基因枪轰击法	RT×430	幼胚	-	pAHC20	ubi1:bar, act1:uidA	Emani et al., 2002
基因枪轰击法	高粱恢复系 5-27, 115	幼穗	-	pKUB	Bt 蛋白基因, uidA	石太渊等, 2003
基因枪轰击法	214856	幼胚, 芽尖	-	pAHC25, pAct1D-neo	ubi1:bar, ubi1:uidA, act1D:neo	Tadesse et al., 2003
基因枪轰击法	BT×623	芽尖	-	pJS108, pmpIC1cry1Ac	act1:uidA, 35S:bar, mpIC1:cry1Ac	Girijashankar et al., 2005
农杆菌介导法	P898012, PHI391	幼胚	LBA4404	pSB1, pSB11	ubi1:bar, ubi1:uidA	Zhao et al., 2000
农杆菌介导法	保持系622B, 恢复系0-30, 115	幼穗	EHA105	pKUB	cry/Ab, hpt, nptII, uidA	肖军等, 2004
农杆菌介导法	恢复系0-30	幼穗	EHA105	pKUB	cry/Ab, hpt, nptII, uidA	林凤等, 2004
农杆菌介导法	P898012	幼胚	LBA4404	pTOK233	35S:hpt, 35S:uidA, nos:nptII	Carvalho et al., 2004
农杆菌介导法	Tx430, C401, Pioneer 8505	幼胚	EHA101	pZP201	ubi1:gfp, ubi1:tpi(类奇异果甜蛋白)	Gao et al., 2005a
农杆菌介导法	C401, Pioneer 8505	幼胚	EHA102	pZP201	ubi1:gfp, ubi1:pmi(磷酸甘露糖异构酶)	Gao et al., 2005b
农杆菌介导法	RT×430, RT×2737	幼穗	LBA4404	pPB121	nptII, uidA	Huang, 2005
农杆菌介导法	Tx430, C2-97	幼胚	NTL4	pPTN290	35S:nptII, ubi1:uidA	Howe et al., 2006
农杆菌介导法	Sensako 85/1191	幼胚	LBA4404	pCAMBIA1301	35S:hpt, 35S:uidA	Nguyen et al., 2007
农杆菌介导法	恢复系 115, 5-27, 保持系ICS21B	幼穗	EHA105	pKUB	ubi1:cry/Ab, 35S:hpt, nos:nptII, 35S:uidA	张明洲等, 2009
农杆菌介导法	P898012, Tx430, 296B, C401	幼胚	EHA101, LBA4404	pZP202	ubi1:gfp, ubi1:pmi	Gurel et al., 2009
农杆菌介导法	P898012	幼胚	EHA101	pZY101	CZ19 B1:SKRS(高粱赖氨酸tRNA合成酶基因), TC2(修饰过的拟南芥tRNA基因), uidA, 35S:bar	Lu et al., 2009

Casas等(1993, 1997)为0.33%和0.08%。影响基因枪转化频率的理化因素主要有微弹速度、靶距(阻挡板与靶细胞间的距离)、轰击次数、微弹的理化性质、DNA纯度和DNA沉淀剂等。微弹的理化性质主要包括微弹的大小、团聚性及分散性, 这些性质与微弹的化学成分有关(王雷, 2002)。Able等(2001)对影响高粱基因枪转化的参数进行了优化, 认为DNA输送压力为2 200 kPa, 靶距为15 cm, 氦气放气阀旋转1周为最优参数组合。目前通常使用钨粉和金粉作为微弹, 但钨粉与DNA结合时间长会引起DNA降解, 而且钨粉对靶细胞有毒性, 从而减少转化细胞的再生。金粉作为微弹则无上述缺点, 而且其颗粒形状、均一性和惰性等方面均优于钨粉。

1.2 农杆菌介导法

根癌农杆菌Ti质粒转化系统是利用农杆菌的天然侵染过程, 实现外源基因转化的方法。与其它植物转化方法相比, 农杆菌介导法(*Agrobacterium*-mediated transformation)具有费用低、能转移大片段DNA、外源基因拷贝数低并能稳定遗传且转化频率相对较高的优点(张素芝和荣廷昭, 2008)。但是, 由于单子叶植物尤其是禾本科植物不是农杆菌的天然宿主, 最初农杆菌介导转化单子叶植物的研究进展缓慢。随着人们对农杆菌侵染机制的进一步了解和转化技术的不断完善, 农杆菌介导的遗传转化首先在水稻(Chan et al., 1993)和玉米(Ishida et al., 1996)中取得了突破性进展。Zhao等(2000)采用农杆菌介导法将*uidA*基因和*bar*基因成功导入高粱, 在6 175个幼胚中最终获得了131个稳定转化事件, 平均转化频率达2.1%。近年来农杆菌介导法成功转化高粱的报道不断增多, 目前已成为高粱遗传转化的最主要方法(表1)。肖军等(2004)和林凤等(2004)均采用农杆菌转化法, 成功地将杀虫晶体蛋白基因*cryIAb*转入高粱中。同样, 张明洲等(2009)也利用农杆菌侵染高粱幼穗诱导的愈伤组织, 将杀虫晶体蛋白基因*cryIAb*导入高粱, 并获得了1.9%的平均转化频率。

影响农杆菌介导法转化高粱的因素包括农杆菌菌株、Vir区基因的活化、受体材料预处理和培养基成分等。

1.2.1 农杆菌菌株

遗传转化中常用的农杆菌菌株可分为3大类菌系, 即

胭脂碱型(Nop, 代表菌株为C58)、章鱼碱型(Oct, 代表菌株为LBA4404)和农杆菌型又称琥珀碱型(Suc, 代表菌株为EHA101、EHA105)。不同的农杆菌菌株具有不同的宿主范围。高粱遗传转化中常用的农杆菌菌株为LBA4404和EHA105(表1)。

1.2.2 Vir区基因的活化

植物受到损伤后从伤口分泌的酚类物质能诱导农杆菌Vir区基因的表达, 从而使T-DNA进行转移和整合。单子叶植物由于不分泌酚类物质或酚类物质含量低而不能诱导Vir区基因的活化(Smith and Hood, 1995)。因此, 单子叶植物的转化中可以添加酚类物质作为Vir区基因的诱导物。高粱转化中常用的诱导物为乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)。Zhao等(2000)在农杆菌介导的高粱遗传转化条件优化的研究中, 使用100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的AS作为诱导物。Jeoung等(2002)通过比较4种不同浓度的AS(200–1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对9种不同的农杆菌/高粱基因型转化组合的*gfp*瞬时表达的影响, 表明对于不同的农杆菌/高粱基因型组合, 使*gfp*表达频率达到最高的相应AS的浓度不同。肖军等(2004)和林凤等(2004)均报道100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS对促进高粱愈伤组织的遗传转化有非常显著的效果。

1.2.3 受体材料预处理

Gurel等(2009)报道, 将高粱幼胚在农杆菌侵染前进行热处理可以提高绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的瞬时表达频率, 而4°C冷处理及离心处理则不利于转化; 最佳处理组合为将幼胚在43°C热处理3分钟, 然后在25°C冷却, 不经过离心处理即可获得49.1%的愈伤组织GFP瞬时表达频率和8.3%的稳定转化频率。

1.2.4 培养基成分

在农杆菌介导的遗传转化中, 共培养的培养基成分不仅要有利于农杆菌的高效转染, 而且要有利于植物细胞的旺盛生长和分裂状态的维持。目前, 大多数研究中共培养的培养基成分与愈伤组织诱导或不定芽诱导的培养基相同。Carvalho等(2004)报道, 共培养培养基成分显著影响 β -葡萄糖苷酶(β -glucuronidase, GUS)的瞬时表达以及共培养后高粱幼胚的存活率。此外, 在共培养培养基中添加椰子汁, 并且使用高生

活力的幼胚作侵染受体, 以及除去过量的农杆菌可以显著提高共培养后外植体的成活率, 从而对成功转化起重要的促进作用(Carvalho et al., 2004)。

1.3 花粉管通道法

花粉管通道法(pollen-mediated transformation)是指在植物授粉后, 利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道, 将外源DNA导入受精卵细胞, 并进一步被整合到受体细胞的基因组中, 随着受精卵的发育而成为携带目标基因的新个体。采用的具体方法有微注射法、柱头滴加法、花粉粒携带法和子房注入法等(魏俊杰, 2010)。花粉管通道法利用植物的自然生殖过程, 避免了繁琐的离体培养过程, 是一种简便、快捷、经济的转化方法。然而, 该方法产生的后代容易发生大量的性状分离, 而且外源基因的整合机理尚不清楚。利用花粉管通道法对高粱进行转基因的研究相对滞后。石太渊等(2001)利用花粉管通道法将广谱抗病基因PHY157成功地转入高粱。Wang等(2007)将携带有nptII和uidA基因的质粒与花粉一同浸没在蔗糖溶液中, 经过超声波处理后, 将花粉涂抹于高粱雄性不育系的柱头上, 最终经筛选得到了转基因植株。

2 高粱遗传转化的标记基因

转化体的筛选和早期检测是遗传转化过程中的一个重要问题。标记基因可分为选择标记基因(selectable marker gene)和筛选标记基因(screening marker gene), 后者又称为报告基因(reporter gene)。

2.1 选择标记基因

选择标记基因的功能是使转化体在选择压力下(向选择培养基中添加选择剂)被选择出来。在高粱成功转化的报道中, 使用最广泛的选择标记基因为bar基因(表1)。bar基因编码草丁膦乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase, PAT)而使转化体对除草剂草丁膦(phosphinothricin, PPT)及其类似物basta或bialophos产生抗性。但是, 使用bar基因容易导致许多逃逸株的产生。此外, 人们担心bar基因可能会通过花粉转移到高粱的野生近缘植物中, 从而产生抗除草剂的烈性杂草(Gao et al., 2005b)。一些抗生素抗性基因, 如新霉素磷酸转移酶基因(nptII)、潮霉素磷酸

转移酶基因(hpt)等也经常被用于高粱的转化。使用抗生素抗性选择标记基因的主要问题是人们担心这些基因可能会转移到致病菌中, 从而导致医疗上抗生素使用无效(Balter, 1997)。目前由于转基因的生物安全性问题已成为社会关注的焦点, 生物安全性标记基因(biosafety marker gene)的研究将会显得非常重要(李俊等, 2009)。

传统的通过抗生素或者除草剂杀死未转化细胞的选择属于负向选择(negative selection), 而正向选择(positive selection)是通过使转化细胞获得代谢某种特殊底物(未转化前不能利用或者不能高效利用)的能力, 因而最终能够从未转化组织中“脱颖而出”。正向选择可以不考虑抗生素和除草剂带来的隐患, 还可避免负向选择过程中对转化细胞生长不利的酚类化合物的产生, 因而有助于转化效率的提高(Wenck and Hansen, 2005)。甘露糖选择体系(mannose selection system)作为一种正向选择体系近年来被广泛用于高粱转化。manA基因编码的磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, PMI)能够使转化细胞具有将甘露糖-6-磷酸转化成果糖-6-磷酸的能力, 并以此作为碳源(Joersbo et al., 1998)。此外, 对PMI潜在致敏性的评价表明, PMI缺少许多食源性致敏原的特征(Privalle, 2002)。Gao等(2005b)将甘露糖选择体系成功用于高粱转化, 并最终获得了高的转化频率, 平均为2.91%; 同时证明在避免使用抗生素或除草剂的情况下, 该体系可作为进行高粱转化的一种有效筛选方法。Gurel等(2009)也采用甘露糖选择体系, 用农杆菌侵染高粱幼胚最终获得了高达8.3%的转化频率。

2.2 报告基因

利用报告基因可以方便地通过瞬时及稳定表达检测来确定转化的基因能否得到表达(王关林和方宏筠, 2002)。敏感、易检测的报告基因可被用来对影响高粱转化体系的参数进行优化。高粱转化研究中应用最广泛的报告基因为编码GUS的uidA基因(表1)。uidA基因的表达可通过用 β -葡萄糖苷酶的底物X-gluc处理来检测, 但检测过程具有损伤性。近年来高粱转化研究中经常使用编码GFP的gfp基因(表1)。GFP无需添加任何底物、酶和辅助因子等物质, 只需暴露于395 nm的远紫外光或490 nm的蓝光下便可受激而发出绿

色荧光(508 nm)。此外,对GFP的观察检测可以随时、重复进行,而且可以在不损伤或破坏细胞的情况下进行。作为一种可视的筛选标记(visual screening marker),*gfp*基因已成功应用于高粱的遗传转化研究中。Jeoung等(2002)通过比较*uidA*和*gfp*在基因枪和农杆菌法中对转基因表达的早期检测效果,证实对于这两种不同的转化方法,*gfp*在转基因瞬时表达分析上均比*uidA*敏感。Gao等(2005a)利用*gfp*进行可视筛选,通过农杆菌介导法成功地将抗病基因*tlp*导入高粱,获得了高达2.5%的平均转化率;同时证明检测高粱转化,选择药剂和底物的使用是没有必要的,因为*gfp*提供了一种有效、可靠且非破坏性的标记来识别转化愈伤、幼苗和植株。Gao等(2005b)在农杆菌介导高粱转化中使用由*pmi*基因和*gfp*基因组成的双标记进行了成功筛选。Gurel等(2009)在研究各种预处理对高粱幼胚转化影响的实验中,通过计算含有表达GFP的细胞的幼胚比例来定量评价不同处理对农杆菌感染后*gfp*瞬时表达的影响。但是,使用*gfp*作为报告基因也有缺陷,即需要使用荧光体式显微镜,而且高浓度的GFP通过干扰器官发生可能会导致转基因植株不育(Jeoung et al., 2002)。

3 高粱遗传转化的启动子

合适的启动子有助于提高转基因的转化频率和表达水平(Hill-Ambroz and Weeks, 2001)。目前,用于高粱遗传转化的启动子可分为组成型启动子(constitutive promoter)和诱导型启动子(inducible promoter)(表1)。

3.1 组成型启动子

用于高粱遗传转化研究的组成型启动子主要有花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子、水稻肌动蛋白基因启动子*actin1*、玉米乙醇脱氢酶基因启动子*adh1*和玉米泛素蛋白基因启动子*ubi1*。有研究将不同启动子与*uidA*或*gfp*连接,通过比较报告基因的瞬时表达来选择最适合高粱的启动子。在Able等(2001)采用基因枪法进行高粱遗传转化的研究中,*ubi1*启动子驱动的*uidA*基因的瞬时表达水平显著高于*actin1*和35S启动子。Jeoung等(2002)通过比较基因枪轰击高粱幼胚诱导的愈伤组织后*uidA*或*gfp*的瞬时表达情况,发现对

于*uidA*各启动子的强度顺序为*ubi1*>CaMV35S>*HBT*;对于*gfp*各启动子的强度顺序为*ubi1*>CaMV35S>*actin1*>*adh1*。Tadesse等(2003)在采用基因枪对高粱幼胚和芽尖2种受体材料进行轰击的实验中,通过比较*uidA*基因的瞬时表达结果,发现在高粱中4种启动子的强度顺序为*ubi1*>*actin1*>*actin1D*>CaMV35S。

3.2 诱导型启动子

利用伤害诱导型启动子(wound-inducible promoter)驱动编码杀虫蛋白的转基因表达,不仅能够节省植物的能量消耗而且能够延缓害虫抗性的出现(De Maagd et al., 1999)。Girijashankar等(2005)采用基因枪法将伤害诱导型启动子*mpiC1*(玉米蛋白酶抑制因子基因启动子)驱动的编码杀虫蛋白的基因*cry1Ac*转入高粱, T₁代转基因高粱植株的受损新鲜叶组织中Cry1Ac蛋白的积累量可达1–8 ng·g⁻¹叶组织。

4 高粱遗传转化受体系统

4.1 愈伤组织再生系统

目前高粱转化中所用受体材料多集中于幼胚或幼穗诱导的愈伤组织(表1)。但是无论何种来源的外植体,试图先通过诱导愈伤组织而建立起来的高粱离体培养再生体系已被证明具有很强的基因型依赖性(Zhong et al., 1998)。粒用高粱遗传转化的成功实例主要限于几个品系如P898012、Tx430和C401等,而一些具有优良农艺性状的品系却由于再生能力低而无法进行遗传转化研究。赵利铭等(2008)利用甜高粱品种考利和M81-E的成熟种子和成熟胚作为外植体,通过愈伤组织再生途径成功地获得了甜高粱的再生植株。刘宣雨等(2010b)利用甜高粱品种凯勒的幼穗进行愈伤组织诱导及再生培养,获得了稳定、高频、高效的再生体系。

4.2 直接分化再生系统

直接分化再生系统是指外植体细胞越过脱分化产生愈伤组织阶段而直接分化出不定芽获得再生植株的受体系统。以从高粱幼苗分离得到的芽顶端分生组织(shoot apical meristem)为外植体直接诱导丛生芽的离体培养被认为具有基因型依赖性弱、高效再生以及

遗传稳定性好的优点,因而受到重视而被应用于禾谷类作物的遗传转化中(Sticklen and Oraby, 2005)。Zhong等(1998)以高粱芽顶端分生组织为外植体直接诱导丛生芽,获得了每个外植体可诱导出超过200个芽的高再生效率,同时实验中所用的18个粒用高粱品系也表现出类似的结果。Sai Kishore等(2006)以芽顶端分生组织为外植体直接诱导丛生芽,3个粒用高粱品系均表现出高的诱导频率。Girijashankar等(2005)利用基因枪直接轰击从无菌实生苗上分离的含芽顶端分生组织的外植体,通过直接诱导丛生芽的离体培养途径将抗虫基因*cry1Ac*成功转入粒用高粱。Pandey等(2010)用农杆菌侵染高粱芽顶端分生组织获得了GUS的瞬时表达。刘宣雨等(2010a)以芽顶端分生组织为外植体建立了甜高粱的高频、高效离体培养再生体系,该体系具有外植体来源不受限制、基因型依赖性弱和遗传稳定性好的优点。

4.3 种质系统

种质系统是利用植物自身的生殖过程,以生殖细胞如花粉粒、卵细胞为受体细胞进行基因转化的系统,也称生殖细胞受体系统。目前应用种质系统进行高粱遗传转化的研究主要采用花粉管通道法(石太渊等, 2001; Wang et al., 2007)。该系统的不足之处是转化受到季节的限制,只能在短暂的开花期内进行。

5 结语

高粱作为一种重要的多用途作物,其遗传转化研究却远远落后于其它禾谷类作物。高粱遗传转化面临的困难主要有:(1)组织培养困难,如培养过程中酚类物质积累,再生效率低和基因型依赖性强;(2)缺少高效的转化方法;(3)基因沉默和嵌合体现象。因此,今后高粱的遗传转化研究可集中在以下几个方面。(1)进一步优化转化方法,以提高转化频率。农杆菌介导法容易获得高的转化频率,可以作为首选的转化方法。此外,使用*gfp*作为报告基因,采用甘露糖正向选择体系也可提高高粱的转化频率。通过构建合适的表达载体,在目的基因的一侧或两侧连接基质附着区(matrix attachment regions, MARs)以增强转基因的表达,减少由位置效应引起的转基因沉默(黄慧珍等, 2004)。(2)应加强重要农艺性状相关的基因如改善籽

粒品质、抗生物或非生物胁迫基因的转化研究。已有的高粱转化研究大多是关于筛选标记基因和报告基因的转化,具有优良农艺性状的基因转化较少(表1)。(3)通过共转化(co-transformation)法进行多基因转化,将控制抗病、抗虫及抗逆性状的多种基因转入高粱获得多功能的转基因植株,或者利用多基因控制的代谢途径来实现高粱性状的遗传改良,或者是将标记基因与目的基因共转化同一植株,在后代中获得剔除标记基因的转基因植株,解决转基因植物的安全性问题(燕丽等, 2008)。

参考文献

- 黄慧珍, 陈士云, 吉万全, 王瑶 (2004). 核基质附着区与转基因表达. 中国生物工程杂志 **24**, 2-6.
- 李俊, 刘翠琼, 尹伟伦, 夏新莉 (2009). 转基因植物中标记基因研究概况. 植物学报 **44**, 497-505.
- 林凤, 石太渊, 赵淑华, 王小光, 苗则彦 (2004). 根癌农杆菌介导的高粱遗传转化体系的研究. 生物技术 **14**, 13-14.
- 刘公社, 周庆源, 宋松泉, 景海春, 谷卫彬, 李晓峰, 苏蔓, Ramachandran S (2009). 能源植物甜高粱种质资源和分子生物学研究进展. 植物学报 **44**, 253-261.
- 刘宣雨, 刘树君, 宋松泉 (2010a). 建立甜高粱(*Sorghum bicolor*)高频、高效再生体系的研究. 中国农业科学 **43**, 4963-4969.
- 刘宣雨, 赵利铭, 刘树君, 宋松泉 (2010b). 甜高粱组织培养的方法及其专用培养基. 中国专利, 200910244634.0. 2010-07-07.
- 石太渊, 杨立国, 王颖, 郑文静, 高连军 (2001). *PHY157* 广谱抗病基因导入高粱及转基因植株的筛选与研究. 杂粮作物 **21**, 12-14.
- 石太渊, 杨立国, 肖军 (2003). 基因枪轰击高粱愈伤组织获得转基因植株. 辽宁农业科学 (6), 9-10.
- 王关林, 方宏筠 (2002). 植物基因工程(第2版). 北京: 科学出版社. pp. 330-478.
- 王雷 (2002). 基因枪转化玉米自交系受体系统的建立及转Bt基因的研究. 硕士学位论文. 长春: 吉林农业大学. pp. 32-33.
- 魏俊杰 (2010). 浅谈花粉管通道法在植物育种中的应用. 安徽农学通报 **16**, 41-53.
- 肖军, 石太渊, 郑秀春, 段有厚 (2004). 根癌农杆菌介导的高粱遗传转化体系的建立. 杂粮作物 **24**, 200-203.
- 燕丽, 崔继哲, 张亮, 于胜楠 (2008). 共转化法及其在植物基

- 因工程中的应用. 生物技术通报 (1), 91–94.
- 杨明, 刘丽娟, 李莉云, 王博, 常金华, 刘国振 (2009). 甜高粱蔗糖积累与茎秆中SPS表达的相关性研究. 中国农业科学 42, 85–92.
- 张明洲, 唐乔, 陈宗伦, 刘军, 崔海瑞, 舒庆尧, 夏英武, Altosaar I (2009). 农杆菌介导Bt基因遗传转化高粱. 生物工程学报 25, 418–423.
- 张素芝, 荣廷昭 (2008). 农杆菌介导的玉米遗传转化系统研究进展. 遗传 30, 1249–1256.
- 赵利铭, 刘树君, 宋松泉 (2008). 甜高粱再生体系的建立. 植物学通报 25, 465–468.
- Able JA, Rathus C, Godwin ID (2001). The investigation of optimal bombardment parameters for transient and stable transgene expression in sorghum. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37, 341–348.
- Balter M (1997). France: transgenic corn ban sparks a furor. *Science* 275, 1063–1063.
- Carvalho CHS, Zehr UB, Gunaratna N, Anderson J, Kononowicz HH, Hodges TK, Axtell JD (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genet Mol Biol* 27, 259–269.
- Casas AM, Kononowicz AK, Haan TG, Zhang LY, Tomes DT, Bressan RA, Hasegawa PM (1997). Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33, 92–100.
- Casas AM, Kononowicz AK, Zehr UB, Tomes DT, Axtell JD, Butler LG, Bressan RA, Hasegawa PM (1993). Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11212–11216.
- Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM (1993). *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol Biol* 22, 491–506.
- De Maagd RA, Bosch D, Stiekema W (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci* 4, 9–13.
- Emani C, Sunilkumar G, Rathore KS (2002). Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Sci* 162, 181–192.
- Gao ZS, Jayaraj J, Muthukrishnan S, Claffin L, Liang GH (2005a). Efficient genetic transformation of sorghum using a visual screening marker. *Genome* 48, 321–333.
- Gao ZS, Xie XJ, Ling Y, Muthukrishnan S, Liang GH (2005b). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotechnol J* 3, 591–599.
- Girijashankar V, Sharma HC, Sharma KK, Swathisree V, Prasad LS, Bhat BV, Royer M, San Secundo B, Narasu ML, Altosaar I, Seetharama N (2005). Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). *Plant Cell Rep* 24, 513–522.
- Girijashankar V, Swathisree V (2009). Genetic transformation of *Sorghum bicolor*. *Physiol Mol Biol Plants* 15, 287–302.
- Gurel S, Gurel E, Kaur R, Wong J, Meng L, Tan HQ, Lemaux PG (2009). Efficient, reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos. *Plant Cell Rep* 28, 429–444.
- Hill-Ambroz KL, Weeks JT (2001). Comparison of constitutive promoters for sorghum transformation. *Cereal Res Commun* 29, 17–24.
- Howe A, Sato S, Dweikat I, Fromm M, Clemente T (2006). Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum. *Plant Cell Rep* 25, 784–791.
- Huang Y (2005). Genetic transformation of sorghum using *Agrobacterium* and immature inflorescences. *Int Sorghum Millets Newsl* 46, 69–72.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14, 745–750.
- Jeoung JM, Krishnaveni S, Muthukrishnan S, Trick HN, Liang GH (2002). Optimization of sorghum transformation parameters using genes for green fluorescent protein and β -glucuronidase as visual markers. *Hereditas* 137, 20–28.
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Guldager SG, Brunstedt J, Okkels FT (1998). Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* 4, 111–117.
- Jogeswar G, Ranadheer D, Anjaiah V, Kavi Kishor PB (2007). High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43, 159–166.
- Liang GH, Gao ZS (2001). Phylogenetic analysis and transformation of sorghum *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Recent Res Dev Plant Biol* 1, 17–33.
- Lu L, Wu XR, Yin XY, Morrard J, Chen XL, Folk WR,

- Zhang ZJ** (2009). Development of marker-free transgenic sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using standard binary vectors with *bar* as a selectable marker. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **99**, 97–108.
- Nguyen TV, Thu TT, Claeys M, Angenon G** (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **91**, 155–164.
- Pandey AK, Bhat BV, Balakrishna D, Seetharama N** (2010). Genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.). *Int J Biotechnol Biochem* **6**, 45–53.
- Privalle LS** (2002). Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system. *Ann N Y Acad Sci* **964**, 129–138.
- Saballos A** (2008). Development and utilization of sorghum as a bioenergy. In: Vermerris W, ed. Genetic Improvement of Bioenergy Crops. New York: Springer. pp. 211–248.
- Sai Kishore N, Visarada K, Lakshmi YA, Pashupatinath E, Rao SV, Seetharama N** (2006). *In vitro* culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. *Plant Cell Rep* **25**, 174–182.
- Smith RH, Hood EE** (1995). Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocots. *Crop Sci* **35**, 301–309.
- Sticklen MB, Oraby HF** (2005). Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **41**, 187–200.
- Tadesse Y, Sági L, Swennen R, Jacobs M** (2003). Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **75**, 1–18.
- Wang WQ, Wang JX, Yang CP, Li YH, Liu L, Xu J** (2007). Pollen-mediated transformation of *Sorghum bicolor* plants. *Biotechnol Appl Biochem* **48**, 79–83.
- Wenck A, Hansen G** (2005). Positive selection. In: Peña L, ed. Transgenic Plants: Methods and Protocols. Totowa: Humana Press Inc. pp. 227–235.
- Zhao ZY, Cai TS, Tagliani L, Miller M, Wang N, Pang H, Rudert M, Schroeder S, Hondred D, Seltzer J, Pierce D** (2000). *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol Biol* **44**, 789–798.
- Zhong H, Wang W, Sticklen MB** (1998). *In vitro* morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: efficient plant regeneration from shoot apices. *J Plant Physiol* **153**, 719–726.
- Zhu H, Muthrukrishnan S, Krishnaveni S, Wilde G, Jeoung JM, Liang GH** (1998). Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. *J Genet Breed* **52**, 243–252.

Advances in the Genetic Transformation of *Sorghum bicolor*

Xuanyu Liu^{1,2}, Qingyun Wang¹, Shujun Liu¹, Songquan Song^{1*}

¹The Research and Development Center for Energy Plants, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Sorghum (*Sorghum bicolor*) is an important crop with multiple purposes. Research into the genetic transformation of sorghum benefits molecular breeding and molecular genetics studies. This paper reviews advances in the methods, marker genes, promoters and receptor systems of the genetic transformation of sorghum. We also give some suggestions for research into the genetic transformation of sorghum.

Key words genetic transformation, marker gene, promoter, receptor system, sorghum

Liu XY, Wang QY, Liu SJ, Song SQ (2011). Advances in the genetic transformation of *Sorghum bicolor*. *Chin Bull Bot* **46**, 216–223.

* Author for correspondence. E-mail: sqsong@ibcas.ac.cn