

研究报告

Research Report

高粱 BTx623 幼胚遗传转化及再生体系的建立

程云伟 邓为 韩少鹏 吕阳 陆业磊 曾弓剑 周超 张德春 沈祥陵*

三峡区域植物遗传与种质创新重点实验室, 三峡大学生物技术研究中心, 三峡大学, 宜昌, 443002

* 通信作者, shenx11982@hotmail.com

摘要 高粱是世界上仅次于小麦、水稻、玉米和大麦的重要作物之一, 虽然高粱基因组已经完成了测序, 但是针对高粱测序品种 BTx623, 高效、稳定的遗传转化和再生体系的缺乏, 阻碍了高粱遗传育种和功能基因组研究发展。本研究以高粱基因组测序品种 BTx623 幼胚为外植体材料, 利用农杆菌介导的方法以抗草铵膦的 *Bar* 基因为筛选标记进行高粱遗传转化。通过筛选愈伤组织对不同浓度草铵膦的适应性, 确定了高粱品种 BTx623 遗传转化中合适的草铵膦浓度为 2.5 mg/L, 并以 BTx623 幼胚为外植体转化材料, 通过农杆菌遗传转化方法, 获得了抗性愈伤组织。并通过在分化培养中添加浓度为 0.006 7 mg/L 的 ZNC, 建立了高粱品种 BTx623 的植株再生体系, 获得了再生植株。因此, 本研究成功获得了抗性愈伤组织和再生植株, 建立了高粱品种 BTx623 遗传转化及再生体系, 对高粱功能基因组研究和遗传育种技术发展具有重要意义。

关键词 高粱, BTx623, 幼胚, 农杆菌转化, 再生体系

Establishment of Sorghum BTx623 Immature Embryos Genetic Transformation and Regeneration System

Cheng Yunwei Deng Wei Han Shaopeng Lv Yang Lu Yelei Zeng Gongjian Zhou Chao Zhang Dechun Shen Xiangling*

Key Laboratory of Three Gorges Regional Plant Genetics & Germplasm Enhancement (CTGU)/ Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang, 443002

* Corresponding author, shenx11982@hotmail.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0017

Abstract Sorghum is one of the world's important crops after wheat, rice, maize, and barley. Although the sorghum genome had been sequenced, the lack of efficient and stable genetic transformation and regeneration system for the sorghum sequencing variety BTx623, it hinders sorghum genetic breeding and functional genome research. In this study, the immature embryos of sorghum genome-sequencing variety BTx623 was used as the explants material, and the bar gene resistant to phosphoglyphosate was used as the screening marker for sorghum genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated method. By screening the adaptability of callus to different concentrations of phosphoglyphosate, the appropriate concentration of phosphoglyphosate in the genetic transformation of sorghum variety BTx623 was determined to be 2.5 mg/L, and BTx623 immature embryo was used as explants to obtain resistant callus. Callus regeneration was obtained by adding ZNC with concentration of 0.006 7 mg/L in differentiation culture. Therefore, this study successfully obtained resistant callus and regenerating plants, and established a genetic transformation and regeneration system of sorghum variety BTx623, which is of great

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 6 月 8 日; 接受日期: 2020 年 6 月 9 日; 发表日期: 2020 年 6 月 16 日

引用格式: 程云伟, 邓为, 韩少鹏, 吕阳, 陆业磊, 曾弓剑, 周超, 张德春, 沈祥陵, 2020, 高粱 BTx623 幼胚遗传转化及再生体系的建立, 分子植物育种(网络版), 18(17): 1-7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0017) (Cheng Y.W., Deng W., Han S.P., Lv Y., Lu Y.L., Zeng G.J., Zhou C., Zhang D.C., and Shen X.L., 2020, Establishment of sorghum BTx623 immature embryos genetic transformation and regeneration system, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(17): 1-7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0017))

significance to the research of functional sorghum genome and the development of genetic breeding technology.

Keywords *Sorghum bicolor*; BTx623, Immature embryo, *Agrobacterium*-transformation, Regeneration system

高粱(*Sorghum bicolor*)是继小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和大麦(*Hordeum vulgare*)之后的全球第五大谷类作物,并且作为 C4 植物具有很强的光合作用效率和抗逆能力,广泛种植于全球六大洲(Liu and Godwin, 2012)。高粱既是一种优质的饲料作物,也是重要的能源植物,种植面积广且用途广泛,因此高粱的遗传改良具有重要的意义(段霞飞等, 2018)。

近年来,随着国内外基因工程技术的成熟及科技的发展,高粱的遗传转化方法也在不断地改良和优化,转化成功率也在不断提高。在高粱的遗传转化主要有电激法、花粉管道法、基因枪法和农杆菌介导四种方法(邵玉涛等, 2015)。其中农杆菌介导法利用农杆菌天然的侵染过程将外源基因导入植物细胞,具有操作简单和费用低等诸多优点,使其成为植物转化最广泛的方法(彭祥, 2018)。早在 1994 年,Godwin 等第一次成功利用农杆菌介导法,以高粱愈伤组织为材料获得了遗传转化植株(Godwin and Chikwamba, 1994)。Zhao 等利用幼胚作为受体材料,采用农杆菌介导法也成功获得高粱转化植株,平均转化效率达到 2.1% (Zhao et al., 2000)。随后,陆续有人利用该方法也获得了高粱遗传转化植株,但转化率及再生率均较低(朱莉等, 2011)。尽管从第一个研究转基因高粱的工作到现在已经开展二十多年,但高粱的转化成功率仍然远远低于水稻的 50~90% (Hiei and Komari, 2008),玉米的 50% (Ishida et al., 2007)和大麦 14.8% (Ibrahim et al., 2010)。就组织培养和遗传转化而言,高粱已被广泛视为遗传转化和再生较困难的作物(Grootboom et al., 2010)。

影响高粱转化的因素众多,除了农杆菌菌株、培养基、外植体类型和菌液浓度外,另一个主要因素是高粱的基因型(张明洲, 2002)。已经报道可用农杆菌介导法转化的高粱品种基因型包括:P898012、Pioneer 8505、PHI391、Sensako 85/1191、Tx430 等,其中,研究主要集中在 P898012 和 Tx430 这两个品种中(Hiei et al., 2014; 邵玉涛等, 2015)。同时,高粱通过愈伤组织再生成完整植株比较困难,成为了高粱遗传转化的技术瓶颈(Liu et al., 2015; 彭祥, 2018)。研究发现,高粱未成熟胚的愈伤组织诱导和植株再生的成功率差异很大,尤其取决于植物基因型(Do and Zhang, 2015)。因此,即使采用相同的培养和转化条件,不同

基因型的转化效率和再生效率也不同(Do and Zhang, 2015)。虽然高粱品种 BTx623 已经完成了基因组测序,为高粱基因功能的研究提供了帮助 (Paterson et al., 2009)。但目前对 BTx623 的遗传转化和再生体系的研究仍然较少,GirijaShankar 等利用基因枪法轰击 BTx623 的茎尖获得遗传转化植株,Kimberly 等通过转入胚胎发育相关的 Baby Boom 和 Wuschel2 基因可以促进该品种的再生,但其载体构建及遗传转化操作复杂,同时遗传转化率较低,限制了该技术的大规模应用(GirijaShankar et al., 2005; Nelson-Vasilchik et al., 2018)。由于目前高粱基因组序列主要是来自于 BTx623,因此缺乏有效的 BTx623 遗传转化及再生体系,将阻碍高粱基因工程和基因功能组研究的发展。

植物再生体系的建立是利用植物愈伤组织获得遗传转化植株的必要条件。在高粱组织培养中,植物激素、培养基成份和培养过程中酚类物质积累等因素对愈伤组织的诱导率和继代存活率都有很大的影响(张明洲, 2002; Polumahanthi et al., 2015)。智能聪(Zhinengcong, ZNC) 是一种宛氏拟青霉菌株(*Paezilomyces variotii*)的提取物,也是一种高效的植物免疫诱抗剂,能够通过激活植物体内分子免疫系统并调节植物的新陈代谢,从而增强植物抗病和抗逆能力(邱德文等, 2014)。研究表明低浓度的 ZNC 能够促进水稻、玉米等作物植物根系的伸长和生物量的积累,ZNC 在促进植物生长方面与生长素或其类似物具有相似的功能(Lu et al., 2019)。但目前,ZNC 在高粱中的应用研究还未见报道。

本研究以测序品种高粱品种 BTx623 幼胚为外植体材料,通过农杆菌介导法将抗草铵膦的 bar 基因导入高粱品种 BTx623 基因组中,并通过筛选获得了 BTx623 遗传转化抗性愈伤。通过在再生过程添加 ZNC 促进其愈伤组织的再生,获得了高粱愈伤组织再生植株,初步建立了高粱品种 BTx623 的遗传转化和再生体系,为高粱基因功能组和遗传育种工作的开展奠定基础。

1 结果与分析

1.1 愈伤组织对不同浓度草铵膦的适应性

由于 Bar 基因对草铵膦具有良好的抗性,但目前 BTx623 幼胚诱导的愈伤组织对草铵膦的适应浓度尚不清楚。为了确定转化后草铵膦筛选所需的浓度,

对其进行不同浓度草铵膦的敏感性试验。三次试验结果表明(表 1): 经过 14 d 的培养, 当草铵膦浓度为 0 时, 愈伤组织均能存活; 草铵膦浓度为 0.5 mg/L 和 1.5 mg/L 时的存活率分别为 $(40.00 \pm 5.44)\%$ 和 $(13.99 \pm 5.03)\%$, 当草铵膦浓度大于 2.5 mg/L 时, 愈伤组织均不能正常生长。愈伤组织在不同浓度的草铵膦中生长受到明显抑制, 随着草铵膦浓度增大, 愈伤组织褐化死亡, 存活率逐渐变小。当草铵膦浓度为 2.5 mg/L 和 5 mg/L 时, 愈伤组织不生长或在 5 d 左右就全部停止生长并褐化死亡, 而在浓度为 0.5 mg/L 或者 1.5 mg/L 的时候虽然有少量愈伤存活, 但愈伤多为水渍状, 质量差。因此在转化筛选过程中选择 1.5 mg/L 的草铵膦作为初筛浓度, 选择 2.5 mg/L 的草铵膦作为复筛的最终浓度。

1.2 农杆菌介导转化及抗性愈伤获得

探清高粱愈伤组织对草铵膦的筛选浓度以后, 为了建立 BTx623 遗传转化体系, 将处理好的高粱 BTx623 幼胚用带有 *bar* 基因的农杆菌 AGL1-pE-GAD 浸染液浸染(图 1)。在浸染液中添加表面活性剂 Silwet L-77 和 L-谷氨酰胺(L-Glutamine, L-Gln)以及共培养时添加硝酸银提高转化率。

经过在共培养 3 d(图 1d, 图 1e)和静息培养 10 d(图 1f, 图 1g)之后, 总共获得了 1 827 个愈伤组织, 幼胚的平均诱导率达 $(96.04 \pm 0.53)\%$ 。将幼胚诱导的愈伤组织转移到筛选培养基中, 在草铵膦浓度为 1.5 mg/L 的筛选培养基培养 2 周进行初筛, 然后转移到草铵膦浓度为 2.5 mg/L 的筛选培养基中培养 2 周进行复筛。通过三次试验最终共获得 36 个抗性愈伤, 平均转化率为 $1.94 \pm 0.33\%$ (图 1i, 表 2)。提取抗性愈伤的 DNA 进行 PCR 阳性检测(图 2), 发现抗性愈伤 PCR 扩增条带和阳性对照相一致, 而阴性对照未扩增出条带, 表明转化成功, 证明所获抗性愈伤为阳性转化愈伤。

1.3 抗性愈伤分化及 BTx623 愈伤再生

抗性愈伤的再生是遗传转化的关键步骤, 为了探索高粱品种 BTx623 愈伤组织再生体系, 将获得的 BTx623 抗性愈伤接种在分化培养基上, 经过 2 周的培养, 在分化过程中, 愈伤组织周围随着培养时间的延长会分泌出酚类物质, 使培养基变为褐色, 而且愈伤组织表面会长出很多丛状根, 未能获得再生植株。由于植物免疫诱抗剂 ZNC 在水稻和玉米中具有促进生长和生物量积累及促进吸收营养物质的作用, 因此推测 ZNC 可能会对高粱抗性愈伤的生长和再

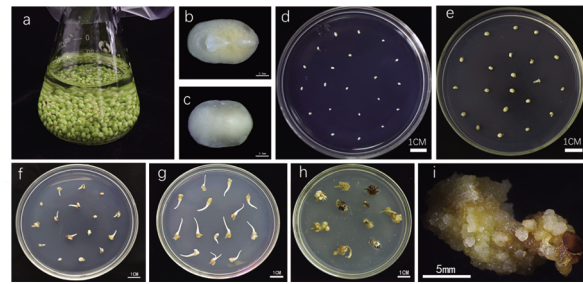


图 1 幼胚的浸染转化和筛选

注: a: 未成熟种子; b, c: 幼胚; d: 浸染 0 天; e: 共培养 3 天; f: 静息 5 天; g: 静息 10 天; h: 筛选 4 周; i: 抗性愈伤

Figure 1 Infection transformation and screening of immature embryos

Note: a: Immature seeds; b, c: Immature embryos; d: 0 days of imprecgnation; e: Co-cultivate for 3 days; f: Resting for 5 days G: Resting for 10 days; H: Screening for 4 weeks; I: Resistant callus

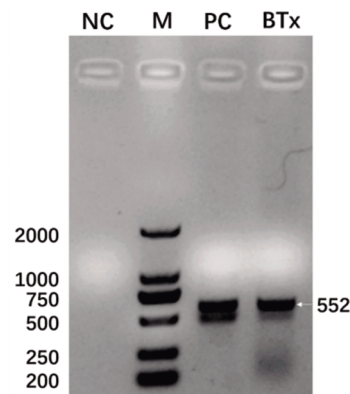


图 2 BTx623 抗性愈伤的 PCR 阳性检测

注: M: DL2 000 marker; BTx: 抗性愈伤 DNA; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照

Figure 2 Positive amplification of BTx623 resistant callus

Note: M: DL2 000 marker; BTx: BTx623 resistant callus DNA; PC: as a positive control; NC: as a negative control

生有促进作用。首先通过在分化培养基中添加不同浓度的 ZNC, 以观察 ZNC 对 BTx623 愈伤组织生长和再生的影响。结果表明, 在未添加 ZNC 的培养基中 BTx623 愈伤组织产生较多丛生根(图 3A); 随着培养基中 ZNC 浓度的增加, 丛状根的产生明显减少, 而在 ZNC 浓度为 0.006 7 mg/L、0.01 mg/L 和 0.02 mg/L 的培养基中, 有明显的绿色芽点产生(图 3A)。但在 ZNC 浓度为 0.01 mg/L 和 0.02 mg/L 的再生培养基上, 愈伤组织绿色芽点会逐渐褐化并死亡。因此, 本研究选择在 ZNC 浓度为 0.0 067 mg/L 的再生培养基中继续再生培养。将愈伤组织放在 ZNC 浓度为 0.006 7 mg/L 的再生培养基中, 经过 21 d 的光照培养, 最终获得了再生植株(图 3B)。

表 1 草铵膦的杀伤性试验

Table 1 Lethal test of phosphoglyphosate

草铵膦浓度(mg/L)	接种数	存活数	存活率(%)
Concentration of glyphosate (mg/L)	Number of Inoculation	Number of survivors	Survival rate (%)
0.0	46	46	100.00±0.00
0.5	45	18	40.00±5.44
1.5	42	6	13.99±5.03
2.5	36	0	0.00±0.00
5.0	41	0	0.00±0.00

表 2 BTx623 的诱导率和转化率

Table 2 Induction rate and transgenic rate of BTx623

批次	接种数	总愈伤数	抗性愈伤数	诱导率	转化率
Batch	Number of Inoculation	Number of callus	Number of resistant callus	Inductionrate	Transformation rate
1	704	671	15	95.31%	2.24%
2	557	536	8	96.23%	1.49%
3	642	620	13	96.57%	2.10%

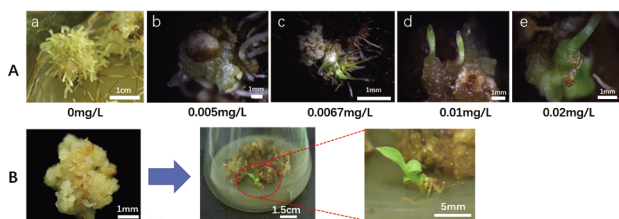


图 3 BTx623 再生体系建立

注: A: 不同浓度 ZNC 对高粱愈伤的影响; B: 高粱 BTx623 再生植株的获得

Figure 3 Establishment of BTx623 regeneration system

Note: A: Effects of different concentrations of ZNC on sorghum callus; B: Obtain of regenerated sorghum BTx623 plant

2 讨论

本研究首先通过高粱品种 BTx623 抗性愈伤对不同浓度草铵膦的适应性试验, 得到草铵膦浓度为 2.5 mg/L 作为最佳筛选浓度。然后, 通过农杆菌介导转化的方法成功获得了 BTx623 的抗性愈伤, 且在再生培养基中添加 ZNC 成功获得了愈伤再生转化植株。通过本研究基本建立了高粱品种 BTx623 的遗传转化再生体系, 为高粱遗传育种和功能基因组学研究提供了技术支持。

由于高粱具有较强的基因型依赖, 不同是基因型具有不同的遗传转化体系。目前, 由于 Tx430 和 P898012 具有较好的再生能力, 因此也是主要的高粱遗传转化材料, 而其他品种的遗传转化及再生较为困难(Do and Zhang, 2015)。由于基因型不同于 Tx430 等其他基因型的高粱, 使得传统的转化及再生方法

并不完全适用于 BTx623。高粱转化中农杆菌感染引起的植物坏死是一种普遍现象, 通常控制的方法是调整侵染时间、农杆菌浓度等方法。在本研究中, 通过在转化过程中添加 L- 半胱氨酸 (L-Cys)、L- 谷氨酰胺(L-Gln)以及硝酸银, 能够提高外植体抗氧化能力, 促进农杆菌转化, 并减少农杆菌引起的植物组织坏死。在愈伤培养及再生阶段, 使用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)代替交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)同样达到了防止褐化的效果, PVP 相比于 PVPP 更易溶于水, 而且用量更少(Do et al., 2016)。而在共培养时, 加入维生素 C 不但能抗氧化减少植物损失, 还有助于减少褐化。之前的研究中, 高粱品种 BTx623 未见有成熟遗传转化体系的建立, 在本研究中, 高粱品种 BTx623 获得了(1.94±0.33)%的转化率。本研究的结果, 也为高粱其他基因型遗传转化体系的建立提供了新的思路。

在本研究中, 当没有添加 ZNC 时, 高粱 BTx623 愈伤组织无法获得再生植株, 愈伤组织周围长出许多丛状根, 其随着培养时间的延长, 最终也未见有胚性芽产生, 说明愈伤组织可能缺乏分化及再生能力。而添加了 ZNC 的培养基, 高粱愈伤组织周围丛状根明显减少, 并产生了绿色的芽点, 说明 ZNC 很可能促进了高粱 BTx623 抗性愈伤的胚性分化, 为其再生提供了可能。植物免疫诱抗剂宛氏拟青霉提取物 ZNC 有着类似生长素的作用, 本研究中 ZNC 的有效浓度为 0.006 7 mg/L, 远低于生长素或其类似物的有效浓度(1~2 mg/L)。由于 ZNC 是一种混合物, 因此推测高粱 BTx623 的分化与再生, 很可能是由 ZNC 中多种

物质共同作用的结果,促进高粱 BTx623 的生长和分化(Lu et al., 2019)。因此,通过添加细菌或真菌的代谢产物和提取物,打破常规激素的限制,将可能是未来植物遗传转化和组织培养的新思路和新尝试。

3 材料与方法

3.1 试验材料

本试验所用高粱 BTx623 种子来源于三峡大学生物技术研究中心,并种植于三峡大学试验田,待其开花前进行套袋,选取开花后 14 d 的未成熟种子作为试验材料。试验农杆菌菌株为 AGL1,所用质粒为 pEGAD (报告基因为 *GFP*, 筛选基因为 *bar*),均由三峡大学生物技术研究中心提供。

3.2 高粱未成熟种子处理

先将取下的高粱未成熟种子用自来水浸泡 20 min (加入几滴洗洁精),流水冲洗 30 min,然后转入无菌超净工作台,先用 75% 的酒精灭菌 5 min,无菌水洗 2 次;0.1% 升汞 (含 0.1% 吐温 -20) 除菌 30 min,无菌水洗 3 次,无菌水洗 3 次 (每次 5 min 左右) (图 1a)。

3.3 高粱愈伤的不同浓度草铵膦适应性试验

在超净工作台内,将处理后的未成熟种子放在无菌滤纸上,用灭过菌的镊子和解剖针取出高粱幼胚(图 1b, 图 1c),盾片朝上放入诱导培养基中(图 1c)诱导 14 d。将诱导出的愈伤组织接种到含不同浓度草铵膦的培养基上,25℃ 黑暗条件下培养 14 d,观察纪录愈伤组织的生长情况。

3.4 农杆菌的准备

取构建好的农杆菌 AGL1-pEGAD (已于 -80℃ 保存)在含利福平与卡那霉素各 50 mg/L 的固体 LB 培养基平板上划线,于 28℃ 烘箱中培养两天,挑单菌落于 LB 液体培养基(含利福平与卡那霉素各 50 mg/L),进行摇床培养(100 r/min, 28℃),培养 8 h 左右待其生长至 $OD_{600}=0.4\sim 0.7$,4℃,5 000 r/min 离心五分钟,弃上清收集菌体,然后用 5 mL 浸染培养基重新悬浮菌体,之后转入 50 mL 的浸染培养基中重新培养至 $OD_{600}=0.5$ 用于浸染。

3.5 农杆菌浸染、共培养和静息除菌

在超净工作台内,将处理的未成熟种子放在无菌滤纸上,用灭过菌的镊子和解剖针取出高粱幼胚

(图 1b, 图 1c)。将高粱幼胚置于装有液体培养基的 50 mL EP 管中,43℃ 水浴 3 min,25℃ 放置 2 min,接着加入菌液浸染 10 min。取出幼胚,用灭菌的滤纸吸干表面液体,将其盾片朝上放入共培养培养基中(图 1c, 图 1d)。25℃ 黑暗条件下培养 3 d (图 1e)。共培养完后,将幼胚从共培养基中取出,然后用添加头孢的无菌水,震荡清洗 3~5 次,用无菌滤纸吸干水分再将其置于静息培养基中,25℃ 黑暗条件下培养 10 d (图 1f, 图 1g)。

3.6 筛选和分化再生

取出共培养之后的幼胚,将其置于筛选培养基上,25℃ 黑暗条件下培养 14 d。然后在高浓度草铵膦筛选培养基上培养 14 d (图 1h)。筛选步骤完成后,将获得的 BTx623 抗性愈伤接种在继代培养基上。经过 14 d 培养后,取部分抗性愈伤接种到生芽培养基上进行分化培养,在温度为 25℃,光照:黑暗 =16:8 h 条件下再培养 14 d 左右。当芽萌发且长至三片叶或四片叶时,将其移入到生根培养基中进行生根培养,生长条件与生芽相同。

3.7 培养基配方和计算公式

培养基配方在前人研究基础上稍加改变(Do et al., 2016),在愈伤再生阶段的生芽培养基中添加 ZNC 以促进愈伤再生(表 3)。

B5 有机(1000X):肌醇:100 mg/mL;烟酸(b3):1.0 mg/mL;盐酸吡哆(b6):1.0 mg/mL;盐酸硫胺素(b1):10.0 mg/mL。

静息培养基需加入头孢 200 mg/L,筛选培养基和再生培养基用于筛选时需加入草铵膦(2.5mg/L)。

计算公式为:

诱导率=(诱导愈伤数/接种外植体数)×100%

抗性率=(抗性愈伤数/诱导愈伤数)×100%

作者贡献

程云伟是本研究的实验设计者和实验研究的执行人;韩少鹏、吕阳及陆业磊完成数据分析,论文初稿的写作;邓为、周超、张德春参与实验设计,试验结果分析;沈祥陵是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由三峡大学高层次人才科研启动基金(2016GCRC02)资助。ZNC 由山东农业大学丁新华课

表 3 培养基配方

Table 3 Medium formula

培养基成分	单位	浸染	共培养	静息	筛选	生芽	生根	诱导
Medium composition	Unit	Infection	Cocultivation	Resting	Selection	Budding	Rooting	Induction
MS 粉末	g/L	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43
MS powder								
B5 有机(1000X)	mL/L	1	1	1	1	1	1	1
B5 organics (1000X)								
蔗糖	g/L	68.5	20	30	30	30	30	30
Sugar								
葡萄糖	g/L	36	10	0	0	0	0	0
Glucose								
Vc	mg/L	0	10	0	0	0	0	0
AS	μmol/L	100	100	0	0	0	0	0
MES	g/L	0.5	0.5	0	0	0	0	0
Silwet L-77	mL/L	0.05	0	0	0	0	0	0
L-Gln	μmol/L	100	100	0	0	0	0	0
L-Cys	mg/L	0	200	0	0	0	0	0
AgNO ₃	mg/L	0	0.85	0	0	0	0	0
2,4-D	mg/L	1.5	2	2	1	0	0	2
IAA	mg/L	0	0	0	0	1	0	0
IBA	mg/L	0	0	0	0	0	1	0
6-BA	mg/L	0	0	0.5	0.5	1	0	0
KH ₂ PO ₄	g/L	0	0	1	1	0	0	1
L-Proline	mg/L	0	0.7	1	1	0	0	1
L-Asparagine	g/L	0	0	1	1	0	0	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	0	0	2.5	2.5	0.25	0.25	2.5
PVP	g/L	0	0	1	1	1	1	1
琼脂	g/L	0	8	8	8	8	8	8
Agar								
pH		5.2	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

题组提供。

参考文献

- Do P.T., Zhang Z.Y., 2015, Sorghum transformation: achievements, challenges, and perspectives, In: Azhakanandam K., Silverstone A., Daniell H., Davey M. (eds) Recent Advances in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants. Springer, New York, USA, pp.291-312
- Do P.T., Lee H., Mookkan M., William R.K., and Zhang Z.Y., 2016, Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and *bar* gene as a selectable marker, Plant Cell Reports, 35(10): 2065-2076
- Duan X.F., Wang L., Chen X.M., Wu X.H., Lv J.P., and Pei Z.Y., 2018, Preliminary exploration of transgenic regeneration system establishment of sorghum, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 16(16): 5318-5322 (段霞飞, 王玲, 陈晓木, 吴仙花, 吕建澎, 裴忠有, 2018, 高粱转基因再生体系建立初探, 分子植物育种, 16(16): 5318-5322)
- Girijashankar V., Sharma H.C., Sharma K.K., Swathisree V., Prasad L.S., Bhat B.V., Royer M., Secundo B.S., Narasu M. L., Altosaar I., and Seetharama N., 2005, Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*), Plant cell reports, 24(9): 513-522
- Godwin I., and Chikwamba R., 1994, Transgenic grain sorghum (*Sorghum bicolor*) plants via *Agrobacterium*, In: Henry R.J., and Ronald J.A. (eds.), Improvement of Cereal Quality by Genetic Engineering, Plenum Press, New York, USA, pp. 47-53
- Grootboom A.W., Mkhonza N.L., O'Kennedy M.M., Chakauya E., Kunert K., and Chikwamba R.K., 2010, Biolistic mediated sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) transformation via mannose and bialaphos based selection systems, Internation-

- al Journal of Botany, 6(2): 89-94
- Hiei Y., Ishida Y., and Komari T., 2014, Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Frontiers in Plant Science*, 5(628): 1-11
- Hiei Y., and Komari T., 2008, *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed, *Nature protocols*, 3(5): 824-834
- Ibrahim A.S., El-Shihy O.M., and Ashraf H.F., 2010, Highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of elite egyptian barley cultivars, *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 4(3): 403-413
- Ishida Y., Hiei Y., and Komari T., 2007, *Agrobacterium*-mediated transformation of maize, *Nature protocols*, 2(7): 1614-1621
- Liu G.Q., and Godwin I.D., 2012, Highly efficient sorghum transformation, *Plant Cell Reports*, 31(6): 999-1007
- Liu G.Q., Gilding E.K., Godwin I.D., 2015, A robust tissue culture system for sorghum [*Sorghum bicolor*(L.) Moench], *South African Journal of Botany*, 98: 157-160
- Lu C.C., Liu H.F., Jiang D.P., Wang L.L., Jiang Y.K., Tang S.Y., Hou X.W., Han X.Y., Liu Z.G., Zhang M., Chu Z.H., and Ding X.H., 2019, *Paecilomyces variotii* extracts (ZNC) enhance plant immunity and promote plant growth, *Plant and Soil*, 441(1-2): 383-397
- Nelson-Vasilchik K., Hague J., Mookkan M., Zhang Z.J., and Kausch A., 2018, Transformation of recalcitrant sorghum varieties facilitated by baby boom and wuschel2, *Current Protocols in Plant Biology*, 3(4): 1-16
- Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H.B., Wang X. Y., Wicker T., Bharti A.K., Chapman J., Feltus F.A., Gowik U., Grigoriev I.V., Lyons E., Maher C.A., Martis M., Narechania A., Ollilar R.P., Penning W.B., Salamov A.A., Wang Y., Zhang L.F., Carpita N.C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C.T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M.C., Ming R., Peterson D.G., Ware D., Westhoff P., Mayer K.F., Messing J., Rokhsar D.S., 2009, The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses, *Nature*, 457 (7229): 551-556
- Peng X., 2018, Research in establishment of sorghum (*sorghum bicolor* L.Moench) regeneration system and *agrobacterium*-mediated genetic transformation, Thesis for M.S., China Three Gorges University, Supervisor: Zhang D.C., pp.8-14 (彭祥, 2018, 高粱再生体系建立及农杆菌介导的遗传转化研究, 硕士学位论文, 三峡大学, 导师: 张德春, pp.8-14)
- Polumahanthi S., Manin S., Pola S., Dora S.V., and Rao S.N., 2015, Tissue culture, molecular and genetic approaches to sorghum crop improvement, *Indian Journal of Plant Sciences*, 4(2): 97-113
- Qiu D.W., 2014, Progress and prospect of plant immunity inducer, *Zhongguo Nongye Keji Daobao (Journal of Agricultural Science and Technology)*, 16(01): 39-45 (邱德文, 2014, 植物免疫诱抗剂的研究进展与应用前景, 中国农业科技导报, 16(01): 39-45)
- Shao Y.T., Wang Z.J., Jia J., and Pan J.G., 2015, Progress on *agrobacterium*-mediated genetic transformation in sorghum, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 13(12): 2894-2899 (邵玉涛, 王振杰, 贾晋, 潘建刚, 2015, 农杆菌介导的高粱遗传转化研究进展, 分子植物育种, 13(12): 2894-2899)
- Zhang M.Z., 2002, Establishment of transformation system and transfer of *Bt (Bacillus thuringiensis)* insecticidal crystal protein gene to sorghum (*Sorghum bicolor* L.) mediated by *agrobacterium*, Dissertation for Ph.D., Zhejiang University, Supervisor: Xia Y.W., pp.4-8,54 (张明洲, 2002, 农杆菌介导高粱转化体系的建立与 *Bt (Bacillus thuringiensis)* 抗虫基因的导入, 浙江大学, 导师: 夏英武, pp.4-8,54)
- Zhao Z.Y., Cai T.S., Tagliani L., Miller M., Wang N., Pang H., Rudert M., Schroeder S., Hondred D., Seltzer J., and Pierce D., 2000, *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation, *Plant Molecular Biology*, 44(6): 789-798
- Zhu L., Lang Z.H., Li G.Y., and Huang D.F., 2011, Research progress on genetic transformation in sorghum, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 13(1): 1-7 (朱莉, 郎志宏, 李桂英, 黄大昉, 2011, 高粱遗传转化研究进展, 生物技术通报, 13(1): 1-7)