



## 评述与展望

### Review and Progress

# 农杆菌介导的高粱遗传转化研究进展

邵玉涛<sup>✉</sup>, 王振杰<sup>✉</sup>, 贾晋<sup>✉</sup>, 潘建刚<sup>✉</sup>

内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 包头, 014010

<sup>✉</sup> 通讯作者, [syt\\_234@163.com](mailto:syt_234@163.com); <sup>✉</sup> 作者

分子植物育种, 2016年, 第14卷, 第1篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0001

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

邵玉涛等, 2016, 农杆菌介导的高粱遗传转化研究进展, 分子植物育种(online), 14(1): 1001-1006 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0001)

引用格式(英文):

Shao et al., 2016, Progress on *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation in Sorghum, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 14(1): 1001-1006 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0001)

**摘要** 高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)对高温和干旱具有很强的耐受能力, 是干旱、半干旱地区人们理想的谷类作物。通过现代遗传转化的手段提高高粱的产量, 改善其品质显得尤为重要。农杆菌介导的遗传转化是将外源基因转入植物细胞最常用的方法。然而, 从2000年首次报道农杆菌介导的高粱遗传转化以来, 至今成功的例子仍然非常有限。优化影响农杆菌介导的高粱遗传转化的关键参数(筛选适合转化的基因型与外植体, 选择合适的农杆菌株, 建立有效的组织培养和再生体系, 利用高效的选择, 筛选系统), 必将会提高转化效率, 拓宽转化范围, 为进一步开展高粱的遗传转化研究提供科学依据。

**关键词** 农杆菌; 介导遗传转化; 高粱

## Progress on *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation in Sorghum

Shao Yutao<sup>✉</sup>, Wang Zhen-jie<sup>✉</sup>, Jia Jin, Pan Jiangan<sup>✉</sup>

1. College of Mathematics, Physics and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China

<sup>✉</sup> Corresponding author, [syt\\_234@163.com](mailto:syt_234@163.com); <sup>✉</sup> Authors

**Abstract** Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) has strong tolerance for high temperature and drought, so it is an ideal cereal crop in arid and semi-arid areas. It is very important to improve its production and quality by modern means of genetic transformation. *Agrobacterium*-mediated transformation is the most commonly method for transferring the foreign genes into plant cells. The first *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum has been reported in 2000, but up to now the successful examples are still very limited. Many factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum have been investigated and elucidated, which include plant genotype and explant type, suited *Agrobacterium* strain, tissue culture and regeneration condition, and selecting and screening system. Optimization the key parameters of *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum will certainly improve the transformation efficiency, expand the transformation scope and provide a scientific basis for further research on genetic transformation of sorghum.

**Keywords** *Agrobacterium*-mediated; Transformation; Sorghum

### 研究背景

高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)是世界上重要的禾谷类作物之一, 分布于全球六大洲、71个国家, 种植面积达44.4百万公顷, 谷物生产占据了全球禾谷类总量的3.5%, 每年大约提供57.9百万公吨的谷物产量(FAO, 2004, <http://www.fao.org/docrep/008/y5473m/y5473m00.HTM>)。高粱对

高温和干旱具有很强的耐受能力, 是干旱、半干旱地区人们理想的谷类作物。随着全球性的气候变化, 极端温度的出现和水的有效性变化必将使高粱这样的旱地作物得到更高的关注。而随着这些可能的变化, 提高高粱类作物的产量, 改善其品质将显得尤为重要(Gurel et al., 2009)。然而, 由于供体种质中缺乏可利用的有用基因, 以及有性杂交不亲和性使得远缘杂交变得尤为困难, 使得采用传统育种方法对高粱遗传改良受到了限制。

收稿日期: 2016年01月08日

接受日期: 2016年02月06日

发表日期: 2016年02月10日

基金项目: 本研究由上海市科学技术委员会和上海市绿化局(11ZR1436100; 11391901101; F122431)资助



而遗传转化和离体技术可以将农艺上有用的基因导入高粱基因组, 产生新的基因型, 满足了遗传改良的需求(Girijashankar and Swathisree, 2009)。

已经报道的用于高粱遗传转化的方法有四种, 即电穿孔法、基因枪法、花粉管通道法以及农杆菌介导法(Girijashankar and Swathisree, 2009)。然而, 农杆菌介导的遗传转化是将外源基因转入植物细胞的最常用的方法(Verma et al., 2008)。根癌农杆菌 Ti 质粒基因转化系统是一种借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞转移的方法。与其他几种遗传转化方法相比, 农杆菌介导的遗传转化在减少转基因的拷贝数, 降低转基因沉默, 提高基因在转基因植物中的稳定表达方面具有显著的优势(刘宣雨等, 2011)。

Zhao 等(2000)首次报道了农杆菌介导的高粱遗传转化, 该项研究利用幼胚作为受体材料, 从 6 000 多个幼胚中共获得 131 个稳定转化个体, 转化效率平均达到了 2.1%。除了少数重要农艺性状基因, 如赖氨酸 tRNA 合成酶基因 (可提高籽粒中赖氨酸含量) (Lu et al., 2009), 几丁质酶基因 Chi (可提高抗病性) (Indra Arulselvi et al., 2010), 杀虫晶体蛋白基因 *cryIAb*、*CryIC* (可提高对玉米螟和大螟的抗虫性) (张明洲等, 2009; 朱莉等, 2011; Ignacimuthu and Premkumar, 2014) 被用于农杆菌介导的高粱转化, 其他大部分农杆菌介导的高粱转化的研究主要集中在提高转化和再生频率上 (Jeoung et al., 2002; Carvalho et al., 2004; Gao et al., 2005 a, b; Howe et al., 2006; Nguyen et al., 2007; Gurel et al., 2009), 转化效率一般在 2%~8% 之间。

与玉米、水稻等单子叶植物相比, 农杆菌介导的高粱遗传转化的进展还相对缓慢(Hiei et al., 2014)。影响农杆菌介导法转化高粱的因素有很多, 这些因素影响了目标基因能否成功导入植物体, 以及能否成功进行稳定的整合和表达。优化影响高粱遗传转化的关键参数, 无疑会提高转化效率, 拓宽转化范围(Shrawat and Lörz, 2006)。

## 1 筛选适合转化的基因型与外植体

### 1.1 基因型

植物的基因型是影响单子叶植物进行农杆菌介导的遗传转化的一个很重要的因素。一般情况下, 在小麦、玉米、大麦和甘蔗中, 运用基因枪法获得转化成功的模式基因型在农杆菌介导的遗传转化中较为有效。在一些禾谷类作物中也有人运用优良品种(如高粱的 PHI391)用于遗传转化,

但总的转化效率要比模式品种低很多(Cheng et al., 2004)。

已经报道可用于农杆菌介导的高粱转化的基因型包括: 296 B、C2-97、C401、CO25、M35-1、P898012、Pioneer 8505、PHI391、Sensako 85/1191、Tx430、TNS586、APK 1、BABUSH、MN-3025、115、ICS21B、5-27 (表 1), 其中 P898012 和 Tx430 应用的最为广泛(Hiei et al., 2014)。

### 1.2 外植体

一个好的农杆菌遗传转化系统不但需要较高的转化效率, 而且还需要保证转化植株能够有效再生。因此, 选择受体材料十分重要, 受体材料不仅要农杆菌高度敏感, 以期获得更高的转化效率, 而且要保证受体材料能够高效再生。尽管已经有多种外植体被用于高粱转化研究(表 1), 但幼胚被优先作为外植体用于农杆菌介导的高粱转化(Girijashankar and Swathisree, 2009)。研究表明, 适合转化的幼胚的理想大小和年龄分别为 1.0~1.5 mm, 授粉后 9~14 d (Zhao et al., 2000; Nguyen et al., 2007; Gurel et al., 2009; Lu et al., 2009)。此外, 外植体的来源对转化效率也有很重要的影响。Lu 等(2009)发现温室收获的幼胚获得了更高的转化效率, 然而, Zhao 等(2000)却发现野外收获的高粱幼胚比温室收获的幼胚获得了更高的转化效率。Carvalho 等(2004)发现供体植物的生长状态, 外植体的类型是影响农杆菌介导的高粱遗传转化的关键因素, 利用活力强的幼胚作为外植体进行农杆菌浸染, 能够显著提高转化效率。

## 2 选择合适的农杆菌株

常用的农杆菌菌株可分农杆菌碱型(琥珀碱型)、胭脂碱型和章鱼碱型 3 大类, 代表菌株分别为 EHA101/EHA105、C58 和 LBA4404 (刘宣雨等, 2011)。不同的农杆菌株所侵染的宿主范围不同, 因而当它们侵染同一植物时所获得的转化效率也会相差很大。已经报道的成功用于农杆菌介导的单子叶植物遗传转化的菌株主要有三个, 即 LBA4404, C58 和 EHA101, 以及它们的衍生物 (EHA105 从 EHA101, AGL0 和 AGL1 从 EHA101) (Cheng et al., 2004)。成功用于农杆菌介导的高粱转化研究中的农杆菌菌株有 LBA4404、EHA101、EHA102、EHA105、AGL1、NTL4 (表 1)。最近研究表明, 与 LBA4404 相比, AGL1 能够获得更高的转化效率(Wu et al., 2014)。



表 1 农杆菌介导的高粱遗传转化

Table 1 Details of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in sorghum

基因型 Genotype	外植体 Explant	农杆菌株 Strains of <i>Agrobacterium</i>	选择标记基因 Selective marker gene	报告基因 Reporter gene	参考文献 Reference
PHI391, P898012	幼胚 Immature embryos	LBA4404	<i>bar</i>	<i>gus</i>	Zhao et al., 2000
Tx 430, C401, CO25, Wheatland P898012	幼胚 Immature embryos	EHA101, EHA105, AGL1	-	<i>Gus, gfp</i>	Jeoung et al., 2002
P898012	幼胚 Immature embryos	LBA4404	<i>hpt</i>	<i>gus</i>	Carvalho et al., 2004
Tx430, C401	幼胚 Immature embryos	EHA101	-	<i>gfp</i>	Gao et al., 2005a
Pioneer 8505, C401	幼胚 Immature embryos	EHA102	<i>manA</i>	<i>gfp</i>	Gao et al., 2005b
Tx430, C2-97	幼胚 Immature embryos	NTL4	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	Howe et al., 2006
Sensako 85/1191	幼胚 Immature embryos	LBA4404	<i>hpt</i>	<i>gus</i>	Nguyen et al., 2007
296 B	茎尖, 叶 Shoot apices, Leaves	LBA4404, EHA105	-	<i>gus</i>	Verma et al., 2008
C401, 296 B, Tx430, P898012	幼胚 Immature embryos	LBA4404, EHA101	<i>manA</i>	<i>gfp</i>	Gurel et al., 2009
P898012	幼胚 Immature embryos	EHA101	<i>bar</i>	<i>gus</i>	Lu et al., 2009
115, ICS21B, 5-27	幼穗 Immature inflorescence	EHA105	<i>Hpt, npt II</i>	<i>gus</i>	Zhang et al., 2009
TNS586, CO25	幼胚 Immature embryos	LBA4404, EHA105	<i>Bar, hpt</i>	<i>gus</i>	Indra Arulselvi et al., 2010
M 35-1	成熟胚, 幼苗, 叶, 幼穗 Mature embryos, Young seedling, Leaves, Immature inflorescence	LBA4404	<i>hpt</i>	<i>gfp</i>	Shridhar et al., 2010
BABUSH, MN-3025 P898012	幼穗 幼胚 Immature embryos	EHA101, LBA4404	<i>manA</i>	<i>gfp</i>	BABUSH, MN-3025 Gurel et al., 2012
APK 1	茎尖 Shoot apices	LBA4404	<i>hpt</i>	<i>gus</i>	Ignacimuthu et al., 2014
TX430	幼胚 Immature embryos	LBA4404, AGL1	<i>bar, manA</i>	<i>DsRed, yfp</i>	Wu et al., 2014

注: *bar*: 双丙氨膦抗性; *gfp*: 绿色荧光蛋白; *gus*:  $\beta$ -葡萄糖苷酶; *hpt*: 潮霉素磷酸转移酶; *npt II*: 新霉素磷酸转移酶; *manA*: 磷酸甘露糖异构酶; *DsRed*: 红色荧光蛋白; *yfp*: 黄色荧光蛋白

Note: *bar*: phosphinothricin acetyl transferase; *gfp*: green fluorescence protein; *gus*:  $\beta$ -glucuronidase; *hpt*: hygromycin phosphotransferase; *nptII*: neomycin phosphotransferase; *manA*: phosphomannose isomerase; *DsRed*: red fluorescence protein; *yfp*: yellow fluorescence protein



### 3 建立有效的组织培养和再生体系

#### 3.1 抗坏死

高粱在组织培养的过程中会频繁地向培养基中释放酚类物质,使得部分植物组织坏死、褐化,不仅会影响植株的再生,也会对用于转化的农杆菌株产生毒害(Gurel et al., 2009; Lu et al., 2009),因此,组织培养的经验对于建立农杆菌介导的遗传转化体系是非常必要的(Saikishore et al., 2011)。Nguyen 等(2007)发现在愈伤组织诱导培养基中添加活性炭能够减少酚类化合物的产生。其他研究发现,在共培养基中添加脯氨酸,天冬氨酸,半胱氨酸和椰子水,能够有效缓解褐化,减少组织坏死,提高幼胚的成活率(Zhao et al., 2000; Carvalho et al., 2004; Pandey et al., 2010)。此外,在培养过程中添加 PVP 或 PVPP 有助于缓解褐化,增加高粱的遗传转化效率,进一步研究发现 PVPP 阻止褐化的效果要优于 PVP (Gurel et al., 2009; Lu et al., 2009)。Wu 等(2014)通过在培养基中添加硫酸铜和 6-苄氨基嘌呤使得转化效率达到了 33.2%。

#### 3.2 受体材料预处理

研究表明,在对受体材料进行农杆菌侵染前进行适当的预处理能够显著提高转化效率。Nguyen 等(2007)发现,在农杆菌侵染前冷处理未成熟种子(从中分离胚外植体)对外植体存活和愈伤形成均有积极的影响。其中,在 4℃预处理未成熟种子一天,显著提高了愈伤组织的形成,减少了频繁继代培养的必要性。Gurel 等(2009)将幼胚做 43℃热处理 3 min 后转为 25℃冷却,进行农杆菌侵染,获得了 8.3%的转化效率;但 4℃冷处理则不利于转化。Gurel 等(2012)采用上述热处理方法对受体材料 P898012 的幼胚进行预处理后,再进行农杆菌侵染能够显著提高转化效率,最高可达 7%。

#### 3.3 Vir 区基因的活化

植物受到损伤后会产生酚类物质,透过农杆菌的细胞膜活化并诱导包括 VirA、VirG 及其他 Vir 区基因的表达。Vir 基因的活化作用于 T-DNA 的加工和转移, T-DNA 进入植物细胞并整合到核 DNA 上(刘宣雨等, 2011)。然而,高粱组织培养过程中产生的酚类物质会造成植物的组织坏死和细胞的程序性死亡,从而抑制农杆菌介导的转化。

因此,在解除酚类物质抑制作用的同时,可以通过添加诱导物来促进 Vir 区基因的活化和表达。高粱中常使用农杆菌 Vir 基因诱导物——乙酰丁香酮(AS)对 Vir 基因进行活化(Cheng et al., 2004)。Zhao 等(2000), Gao 等(2005a)在农杆菌介导的高粱遗传转化研究中,采用 100 μmol/L 的 AS 作为诱导物,获得了较高的转化效率;Jeoung 等(2002)对 9 种不同农杆菌/高粱基因型组合添加了 4 种不同浓度(50~1 000 μmol/L)的 AS,通过比较其绿色荧光蛋白基因(gfp)的瞬时表达情况发现,不同的农杆菌/高粱基因型组合获得最高 gfp 表达效率所需的 AS 浓度也不一样。Shridhar 等(2010)在农杆菌介导的高粱遗传转化研究中,利用 200 μmol/L 的 AS 作为诱导物,最终获得了 4.28%的转化效率。Indra Arulselvi 等(2010)通过比较 3 种不同浓度 AS 对农杆菌介导的高粱遗传转化的影响,发现浓度在 200 μM 时转化效率最高。

### 4 利用高效的选择、筛选系统

#### 4.1 选择标记基因

使用选择标记基因可以使转化体在选择压力下被选择出来。已经报道的农杆菌介导的高粱转化中广泛使用的标记基因为除草剂抗性基因(bar) (Zhao et al., 2000; Lu et al., 2009; Indra Arulselvi et al., 2010; Zhu et al., 2011; Wu et al., 2014)。Bar 基因编码草丁膦乙酰转移酶(PAT),可以使转化植株对除草剂草丁膦(PPT)及其类似物,如 Basta、Liberty 和 bialaphos 等产生抗性。利用 bar 基因能够精确筛选除草剂抗性基因,但利用 bar 基因进行选择容易出现逃逸现象,人们担心转基因植株中的 bar 基因能够通过与高粱的野生近缘种进行天然杂交而逃逸到环境中,产生抗除草剂的“超级杂草”(Gao et al., 2005b)。

某些抗生素抗性基因也被用于高粱筛选,如潮霉素磷酸转移酶基因(hpt) (Carvalho et al., 2004; Nguyen et al., 2007; Indra Arulselvi et al., 2010; Shridhar et al., 2010; Ignacimuthu et al., 2014; Zhang et al., 2014),新霉素磷酸转移酶基因(npt II) (Howe et al., 2006; Zhang et al., 2014)。然而,使用抗生素抗性基因也可能带来安全隐患——如果这些基因转移到致病细菌中,会产生让抗生素失效的“超级细菌”,威胁人类的健康。





利用非除草剂抗性和非抗生素抗性的选择标记, 将无疑会减少对环境和生物安全的潜在危害。*manA* 基因可能是一种比较理想的非毒性选择标记基因, 该基因编码磷酸甘露糖异构酶(PMI), 能够将甘露糖-6-磷酸转化成果糖-6-磷酸。转化细胞能够以甘露糖作为碳源而正常生长, 而非转化细胞则由于没有可利用的碳源停止了生长(Gao et al., 2005b)。目前, 已有多项研究利用 *manA* 基因对高粱转化株进行选择, 并取得了良好的效果(Gurel et al., 2009; Gao et al., 2005b; Gurel et al., 2012; Wu et al., 2014)。

#### 4.2 报告基因

报告基因是一类可以非常方便地通过瞬时表达来检测其表达产物的基因, 将其与目的基因相融合, 可以通过报告基因的表达情况来确定转化的目的基因是否得到表达。农杆菌介导的高粱转化中, 应用最为广泛的报告基因为编码 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)的 *gus* 基因(Zhao et al., 2000; Jeoung et al., 2002; Carvalho et al., 2004; Howe et al., 2006; Nguyen et al., 2007; Verma et al., 2008; Lu et al., 2009; Indra Arulselvi et al., 2010; Ignacimuthu et al., 2014; Zhang et al., 2014)。然而, 利用 GUS 作为一个报告系统的最大缺点是它需要一个破坏性的实验, 妨碍了所鉴定转化组织的进一步增殖和再生(Girijashankar and Swathisree, 2009)。

另外一个重要的报告基因 *gfp* (编码绿色荧光蛋白 GFP) 也被成功应用于农杆菌介导的高粱遗传转化研究(Jeoung et al., 2002; Gao et al., 2005a, b; Gurel et al., 2009; Shridhar et al., 2010; Gurel et al., 2012)。该报告系统是一个不具破坏性的可视系统, 有利于所鉴定转化组织的恢复。可见, 在转基因植株的早期检测过程中 GFP 系统要优于 GUS 系统(Girijashankar and Swathisree, 2009)。此外, 另外两种可视报告系统, 即 *DsRed* (编码红色荧光蛋白) 和 *YFP* (编码黄色荧光蛋白) 也被用于农杆菌介导的高粱转化研究中(Wu et al., 2014)。

#### 5 问题及展望

农杆菌介导法能够产生较高的转化效率, 并且能将单拷贝基因插入基因组并进行整合, 是至今用于高粱遗传转化的最有效的方法。然而, 从2000年首次报道农杆菌介导的高粱遗传转化以

来, 至今成功的例子仍然非常有限。目前, 利用农杆菌介导法进行高粱遗传转化所面临的主要问题包括: (1)高粱组织培养过程中产生的酚类物质会造成植物组织的坏死, 严重影响转化植株的再生; (2)对基因型与外植体要求较高, 缺乏成熟的转化方法, 难以建立高效转化的体系; (3)大部分研究主要集中在提高转化和再生频率上, 只有少数农艺性状基因在以农杆菌介导的高粱遗传转化中得以应用。

随着利用农杆菌介导法进行高粱遗传转化的转化策略和转化机制的不断研究与发展, 今后的研究可集中在以下几个方面: (1)不断优化高粱的组织培养和再生体系, 提高转化植株的再生频率; (2)改善转化方法, 对基因型与外植体, 农杆菌株, 以及选择、筛选系统等影响转化的关键参数进行进一步的优化; (3)将更多农艺性状相关基因应用于农杆菌介导的高粱遗传转化, 获得具有高品质、抗病虫害等有益性状的转基因植株。相信通过以上努力, 必将能提高农杆菌介导的高粱遗传转化的效率, 拓宽转化范围, 并极大地促进高粱转基因研究工作的发展。

#### 作者贡献

邵玉涛是本综述的主要撰稿人, 负责完成资料的收集整理以及论文初稿的撰写; 王振杰, 贾晋和潘建刚参与部分资料的收集和论文内容的修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

本研究由内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY152)和内蒙古科技大学创新基金项目(2014QDL008)共同资助。

#### 参考文献

- Carvalho C.H.S., Zehr U.B., Gunaratna N., Anderson J., Kononowicz H.H., Hodges T.K., and Axtell J.D., 2004, Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency, *Genet Mol Biol*, 27(2): 259-269  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000200022>
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X.D. and Armstrong C.L., 2004, Invited Review: Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40(1): 31-45



- <http://dx.doi.org/10.1079/IVP2003501>
- Gao Z., Jayaraj J., Muthukrishnan S., Claffin L. and Liang G.H., 2005a, Efficient genetic transformation of Sorghum using a visual screening marker, *Genome*, 48(2): 321-333  
<http://dx.doi.org/10.1139/g04-095>
- Gao Z., Xie X., Ling Y., Muthukrishnan S. and Liang G.H., 2005b, Agrobacterium tumefaciens-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotechnol. J.*, 3(6): 591-599  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00150.x>
- Girijashankar V., and Swathisree V., 2009, Genetic transformation of Sorghum bicolor. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(4): 287-302  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12298-009-0033-7>
- Gurel S., Gurel E., Kaur R., Wong J., Meng L., Tan H.Q. and Lemaux P.G., 2009, Efficient, reproducible Agrobacterium-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos, *Plant Cell Rep*, 28(3): 429-444  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-008-0655-1>
- Gurel S., Gurel E., Miller T.I., and Lemaux P. G., 2012, Agrobacterium-mediated transformation of Sorghum bicolor using immature embryos, *Transgenic Plants*, Humana Press, pp: 109-122
- Hiei Y., Ishida Y., and Komari T., 2014, Progress of cereal transformation technology mediated by Agrobacterium tumefaciens, *Frontiers in plant science*, 5: 1-11  
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
- Howe A., Sato S., Dweikat I., Fromm M. and Clemente T., 2006, Rapid and reproducible Agrobacterium-mediated transformation of sorghum, *Plant Cell Rep*, 25(8): 784-791  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-005-0081-6>
- Ignacimuthu S., and Premkumar A., 2014, Development of transgenic Sorghum bicolor (L.) Moench resistant to the Chilo partellus (Swinhoe) through Agrobacterium-mediated transformation, *Mol Biol Genet Eng.*, 2(1): 1-8  
<http://dx.doi.org/10.7243/2053-5767-2-1>
- Indra Arulselvi P., Michael P., Umamaheswari S., and Krishnaveni S., 2010, Agrobacterium-mediated transformation of Sorghum bicolor for disease resistance, *Int. J. Pharma. Bio Sci*, 1(4): 272-281
- Jeoung M.J., Krishnaveni S., Muthukrishnan S., Trick H.N. and Liang G.H., 2002, Optimization of sorghum transformation parameters using genes for green fluorescent protein and  $\beta$ -glucuronidase as visual markers. *Hereditas*, 137: 20-28  
<http://dx.doi.org/10.1034/j.1601-5223.2002.1370104.x>
- Liu X.Y., Wang Q.Y., Liu S.J., and Song S.Q., 2011, Advances in the genetic transformation of Sorghum bicolor, *Zhiwu Xuebao (Chin Bull Bot)*, 46: 216 - 223 (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(2): 216-223)
- Lu L., Wu X., Yin X., Morrand J., Chen X., Folk W.R., and Zhang Z.J., 2009, Development of marker-free transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using standard binary vectors with bar as a selectable marker. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(1): 97-108  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-009-9580-4>
- Nguyen T.V., Thu T.T., Claeys M., and Angenon G., 2007, Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91(2): 155-164  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9228-1>
- Pandey A.K., Bhat B.V., Balakrishna D., and Seetharama N., 2010, Genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(1): 45-53
- Saikishore N., Visarada K.B.R.S., Rao S.V., and Seetharama N., 2011, Progress and prospects for Agrobacterium-mediated genetic transformation in sorghum in comparison to other cereals, *Transgenic Plant Journal*, 5(1): 27-34
- Shrawat A.K. and Lörz H., 2006, Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 575-603.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00209.x>
- Shridhar J., Bhat R.S., Bhat S. and Kuruvinashetti M.S., 2010, Agrobacterium-mediated transformation studies in sorghum using an improved gfp reporter gene, *Journal of SAT Agricultural Research*, 8: 1-5
- Verma A., Nain V., Kumari C., Singh S.K., Narasu M.L., and Kumar P.A., 2008, Tissue specific response of Agrobacterium tumefaciens attachment to *Sorghum bicolor* (L) Moench, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14(4): 307-313  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12298-008-0028-9>
- Wu E., Lenderts B., Glassman K., Berezowska-Kaniewska M., Christensen H., Asmus T., Zhen S., Chu U., Cho M.J., and Zhao Z.Y., 2014, Optimized Agrobacterium-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 50(1): 9-18  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-013-9583-z>
- Zhang M., Tang Q., Chen Z., Liu J., Cui H., Shu Q., Xia Y., and I. Altosaar, 2009, Genetic transformation of Bt gene into sorghum (*Sorghum bicolor* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens, *Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese journal of biotechnology)*, 25(3):



- 418-423 (张明洲, 唐乔, 陈宗伦, 刘军, 崔海瑞, 舒庆尧, 夏英武, I. Altosaar, 2009, 农杆菌介导 Bt 基因遗传转化高粱, 生物工程学报, 25(3): 418-423)
- Zhao Z.Y., Cai T., 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  
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1026507517182>
- Zhu L., Lang Z.H., Li G.Y., He K.L., Yue T.Q., Zhang J., and Huang D.F., 2011, Introduction of Bt cry1Ah gene into sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agric)*, 44(10): 1989-1996 (朱莉, 郎志宏, 李桂英, 何康来, 岳同卿, 张杰, 黄大昉, 2011, 农杆菌介导甜高粱转 Bt cry1Ah 的研究, 中国农业科学, 44(10): 1989-19