植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (4): 491–496, www.chinbullbotany.com

·专题介绍·

农杆菌介导单子叶植物遗传转化问题与对策

魏开发[1*], 刘逸萍[1], 林子英[1], 杨雅芳[1], 张泽宏[1], 贾文锁[2]

[1] 漳州师范学院生物系, 漳州 363000; [2] 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094

摘要 尽管十几年来农杆菌介导的单子叶植物遗传转化研究取得了较大的进步, 但仍存在着基因型限制、转化率不高和外源基因表达活性低等问题。本文综述了近几年来此项研究在感受态细胞选择与调节、预培养及共培养体系优化、转化子的筛选及外源基因表达调控等方面的主要进展。

关键词 农杆菌, 遗传转化, 单子叶植物

魏开发, 刘逸萍, 林子英, 杨雅芳, 张泽宏, 贾文锁 (2008). **农杆菌介导单子叶植物遗传转化问题与对策**. **植物学通报 25**, 491–496.

单子叶植物中的水稻、玉米和小麦是我国重要的粮食作物, 其产量直接关系到我国的粮食安全。近年来的人口增长和耕地面积锐减, 给育种工作者带来了极大的压力。传统的杂交育种存在周期长、效率低和种间杂交困难等问题, 很难创造新的品系。分子生物学在植物育种上的应用, 为植物种质资源创新, 打破种间杂交障碍, 定向选育优、新、特新品种提供了一个有效的基因操纵平台。在众多基因转化方法中, 农杆菌转化法具有转化机理清楚、外源基因低拷贝整合、能导入大片段外源基因以及不易引起分子间或分子内重排等优势。但由于单子叶植物不是农杆菌的天然寄主, 加之单子叶植物外植体再生能力低下、感受态细胞缺乏和遗传转化不稳定等, 限制了这一方法在禾本科作物上的应用。本文作者结合自己的研究工作就其存在的问题提出了相应的解决策略。

1 感受态细胞的选择与调节

感受态细胞的获得是影响基因工程能否开展并走向实用的关键。在愈伤组织诱导过程中形成的胚性细胞有很强的接受外源 DNA 的能力, 因此是合适的转化受体。而单子叶植物薄壁细胞在发育旺盛期就失去了分化能力, 其受伤区周围细胞发生不同程度的木质化, 缺乏感受态细胞, 加之不同基因型植物形成胚性愈伤的能力相差甚远, 造成单子叶植物感受态系统建立困难, 但是它们的这种潜在能力在适宜条件下也可以表现出来。

基因型对感受态细胞具有决定性作用, 其特异性表现在细胞内源激素水平、细胞壁结构、细胞创伤反应、农杆菌识别和附着位点以及外植体再生能力等方面。如在相同条件下, 玉米 A188 的再生能力显著高于其它品系, 以其为亲本的杂交后代也表现出较高的体细胞再生能力。研究者可选择处于适宜生理状态基因型的相应器官作为外植体, 通过激素和培养基的合理组配来获得和维持受体细胞的最佳感受态状态(魏开发等, 2004; 高武军等, 2005)。

2 预培养及共培养体系的优化

2.1 质粒和菌株的组合

由于单子叶植物不是农杆菌的天然寄主, 农杆菌菌株和质粒的适当组合对于转化的成功非常重要。Ishida 等(1996)选择感染性强的菌株EHA101获得了玉米高效转化系统, 菌株 LBA4404 与超双元载体 pSB131 或 pTOK133 的组合也能有效转化玉米。Hiei 等(1994)用

收稿日期: 2007-12-04; **接受日期**: 2008-01-20
基金项目: 国家自然科学基金(No. 30470160)
* **通讯作者**。E-mail: kaifa-wei@163.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-434

2 种菌株(LBA4404、EHA101)和 2 个双元载体(pIG121Hm、pTOK233)的不同组合转化水稻，实验结果显示，组合 LBA4404/pTOK233 的转化率明显高于其它组合，而超毒力菌株 EHA101 与 pTOK233 组合比普通农杆菌与双元质粒组合的转化率还低。分析不同菌株对水稻愈伤组织的转化频率，发现 EHA105 最好，LBA4404 次之，AGL-1 最差(易自力等，2001)。用 3 种不同菌株(LBA4404、EHA105、AGL-1)与同一种双元载体质粒(pCAMBIA1301)组合转化水稻“中花 11 号”，结果表明，由 EHA101 衍生而来的 EHA105 对受体的敏感性高于 LBA4404(刘巧泉等，1999)。彭昊等(2006)采用 EHA105/pCAMBIA1300 组合实现了水稻高效 RNA 干涉体系的建立。

在小麦的转化中，组合 EHA101/pIG121Hm 相对于 LBA4404/pTOK233 和 GV3101/pPCV6NFHGusInt 是最有效的(Guo et al., 1998)。实验采用了 3 个农杆菌菌株与 2 个质粒的不完全组合转化小麦“农大 146”的幼胚，组合 AGL-1/p3301、EHA105/p3301 和 LBA4404/pTBAaB 的转化效率依次增高(王永勤等，2002)。有研究者利用 EHA105、MOG101 和 LBA4404 转化小麦幼胚，没有获得转基因植株，而利用 C58cI 获得了转基因植株，并认为 ABI 及其衍生菌系适合小麦遗传转化(叶兴国等，2001)。而 Cheng 等(1997)在小麦的转化中只选用普通菌株 C58 和双元载体就获得了成功。本文作者的实验表明，菌株和质粒组合对某一作物不具普遍性优势，转化效果既与菌株和质粒的组合有关，也与不同作物及同一作物不同品种间的敏感性差异有关(未发表资料)。

2.2 信号分子与*Vir*基因的活化

Vir 基因的活化是启动 T-DNA 转移的关键。许多实验证明，大多数单子叶植物酚类诱导物在数量和种类上不足以诱导 *Vir* 基因的活化，甚至会有抑制物的存在，这是单子叶植物难以进行农杆菌转化的主要原因之一。

影响 *Vir* 基因活化的因素包括酚类化合物、单糖分子和 pH 值等。常用的酚类物质有乙酰丁香酮(AS)和羟基乙酰丁香酮(OH-AS)，其中 AS 的效果最好，后来又发现了 2 种特殊化合物，其诱导活性比 AS 高 10-100 倍。有研究表明，多种酚类复合物的诱导活性比单一酚类物质更高，因为其能同时诱导 *Vir* 区多个转录位点的活化(许耀等，1988)。也有实验发现各种酚类物质间没有叠加作用，有的甚至对水稻愈伤组织还有很强的毒害作用(刘巧泉等，1999)。

研究者多将 AS 加在共培养基中，或在浸染液使用前 4-6 小时加入浸染液中，或者在两者中都加入。AS 或 OH-AS 能大大加强 *virG* 的表达，在小麦和大麦转化中是必不可少的。在培养基中加入 200 μmol·L^{-1} AS 能明显促进 T-DNA 的转移(Wu et al., 2003)；在小麦花序组织培养中发现的最适 AS 浓度也是 200 μmol·L^{-1}，并且认为高浓度 AS 有毒害作用，低浓度则没有效果(Amoah et al., 2001)。但在小麦转化实验中，当 AS 浓度达到 50 μmol·L^{-1} 时，就可以有效诱导 T-DNA 转移(刘法庆等，1999)。在作者的研究中发现 AS 对转化率的影响随菌株和外植体不同而异(待发表资料)。

在水稻的转化中，100 μmol·L^{-1} 的 AS 是转化成功的关键(Hiei et al., 1994)。而在玉米和高粱转化的共培养阶段都使用了 100-200 μmol·L^{-1} 的 AS(Ishida et al., 1996; Cheng et al., 1997)。

较低的 pH 值、低于 28°C 的温度、较高的渗透压、适当浓度的冠瘿碱以及一些糖类(如 D-半乳糖酸、D-葡萄糖醛酸、L-阿拉伯糖醛酸)都能有效增强 *Vir* 基因的表达。糖类在不含酚类化合物的情况下效果较明显，但是糖类和 AS 同时存在时却没有明显的协同效应。

Vir 基因活化诱导虽然是实现农杆菌转化的必要条件，但未必是充分条件，可能在植物里还存在着除酚类以外的 *Vir* 基因活化诱导物。有研究者认为，在部分单子叶植物的代谢物中也存在着促进 *Vir* 基因表达的因子。研究表明在不加任何酚类物质的条件下，对预培养 4 天的水稻幼胚进行转化，也可获得较高的稳定转化率(刘巧泉等，1999)。本文作者对玉米转化的研究显示，在 50-250 μmol·L^{-1} 的浓度范围内，随着 AS 浓度的增加，转化率有不同程度的提升(未发表资料)。

此外，可以通过在农杆菌感染培养基中加入表面亲和剂，在共培养基中添加对农杆菌有强烈趋化性的精氨酸物质，以及利用抽气减压促进农杆菌吸附到寄主细胞

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-434

的细胞壁并渗入到细胞内以解决农杆菌难以附着在单子叶植物细胞上的困难。

2.3 感染浓度及时间

在玉米转化中, 将农杆菌感染液的OD_{600}由0.5调至0.9时, 抗性愈伤频率呈下降趋势, 而在OD_{600}达到0.5以前, 农杆菌生长一直较缓慢, 达不到对数生长期, 因而宜采用感染液浓度OD_{600}为0.5, 浸泡时间为5分钟(张艳贞等, 2002)。 有研究发现长时间的菌液浸泡对初始愈伤组织有较大的伤害, 感染时间为15分钟时, 产生抗性愈伤组织且抗性频率较高。而将继代中分离出的Ⅱ型愈伤组织的浸泡时间延长到30分钟, 可以提高抗性愈作的频率。以10^7 mL^{-1}、10^8 mL^{-1}和10^9 mL^{-1} 3种感染浓度侵染小麦愈伤组织, 侵染1小时, 结果表明农杆菌浓度以10^8 mL^{-1}为最好(刘法庆等, 1999)。以OD_{650}为0.7的菌液感染小麦愈伤组织30分钟才获得转基因植株(叶兴国等, 2001), 也有以OD_{600} 1.0*1小时的浓度时间组合转化小麦幼胚愈伤最为有利的报道(王永勤等, 2002)。林拥军等(2002)分别以农杆菌浓度(OD_{600})为0.5、1.0、1.5和2.0四种浓度处理水稻愈伤组织, 结果以1.0 OD_{600}处理获得的抗性愈伤率最高。

2.4 pH对转化率的影响

不同菌种*Vir*基因的诱导效果还与诱导培养基的pH值有关, 培养基的pH是影响T-DNA转移效率的关键因素之一。pH在植物细胞中往往可作为一种信号分子起作用(Jia and Davies, 2007), 它可能参与了T-DNA的转移过程。研究发现pH值改变0.3对多种植物的转化率有明显影响, 通常农杆菌培养时的pH值为7.2, 这时生长旺盛的菌株*Vir*基因处于不活化状态, 而植物组织培养基中pH值常为5.8, 有利于基因活化。大多数研究认为感染时的pH以5.2为宜(Ishida et al., 1996)。在小麦转化中, 对pH 5.2、6.0和6.8三种pH的研究表明, T-DNA转移效率没有明显区别, 说明在pH 5.2-6.8的范围内, T-DNA都可以高效率地转移到受体细胞中(刘法庆等, 1999)。

由于农杆菌和外植体的相互作用触发了愈伤组织的程序性死亡, 并产生大量的活性氧, 致使组织发生过敏性坏死反应。在预培养、共培养和选择培养基中加入抗坏血酸、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)和半胱氨酸等抗氧化剂有利于提高病原菌和寄主之间的相容性, 防止褐变死亡, 从而提高抗性愈伤的存活率。在共培养基中补充400 $mg{\cdot}L^{-1}$ Cys, 可以明显提高GUS瞬时表达率, 转化效率平均达到5.5%(Bronwyn et al., 2002)。

2.5 共培养温度对转化的影响

温度对农杆菌转移T-DNA到受体细胞的影响, 是共培养体系中最具争议的问题。植物细胞可能存在着最易接受农杆菌转化的最适温度, 这与细胞的有丝分裂活动有关(Kudirka et al., 1986)。一般认为农杆菌具有最强侵染力的生长温度并不是其最适生长温度。研究表明, 在32°C下, 农杆菌不能诱导植物形成肿瘤。*virG* 基因的表达需要在28°C以下, 高温不能诱导*virD*基因的表达(Alt-Mörbe et al., 1989), 并且提高温度会使VirA蛋白发生可逆变化(Jin et al., 1993)。有研究者认为在25°C条件下, 外源基因更易插入、整合进植物细胞, 转化更有效(Salas et al., 2001)。19°C、 22°C、25°C、28°C和31°C 5个培养温度下菌株LBA4404对玉米幼胚的转化效率存在显著差异, 最佳温度为25°C(高武军等, 2004)。但早期的实验发现22°C有利于农杆菌的转化(Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996)。在玉米中也发现共培养温度为22°C时抗性筛选频率普遍显著高于25°C时(张艳贞等, 2002)。还有报道指出温度不仅影响*virA*基因, 也影响*virD*和*virB*基因的表达, 在高温条件下, T-DNA复合物的成分不会受到影响, 但复合物的正确组装和稳定性可能是热敏感的, 并通过比较瞬时表达量的高低认为19°C是T-DNA转移的最适温度(Fullner et al., 1996)。国内研究者在水稻转化中发现在19-23°C的温度条件下, 农杆菌具有最高的侵染活性, 产生最高的转化率(林拥军等, 2002), 而小麦中, 在20°C、25°C、30°C和35°C条件下, 发现共培养温度对T-DNA转移效率无明显影响(刘法庆等, 1999)。这些不同实验结果说明, 共培养温度对农杆菌侵染力的影响

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-434

与不同作物及其基因型有关。

3 转化子筛选及外源基因表达调控

3.1 转化子筛选

合理的转化子筛选方法对于转基因体系有效性的检测及避免假阳性植株的逃逸都很重要，抗性植株要尽可能来源于胚状体建成途径以减少嵌合体的存在。通常在DNA转移24-28小时后检测报告基因瞬间表达效果以优化各种条件，常用报告基因主要有氯霉素乙酰转移酶基因(*CAT*)、荧光素酶基因(*LUC*)、玉米*R*基因、β-糖醛酸苷酶基因(*GUS*)和绿色荧光蛋白基因(*GFP*)。GFP中荧光蛋白发色团是由自身催化形成的，不需外加底物，因而其检测是非破坏性的。GUS检测方法尽管简单，灵敏度高，但却是破坏性的。玉米素*R*基因调控花青素的生物合成，其检测不需要外加底物，有研究者试图将*C1-R*基因作为衡量基因枪转化效果的早期指标(单丽波等，2000)。

报告基因只能检测瞬间表达效果，大多数研究者认为瞬时表达和稳定表达之间并没有很大的关联性。因此，选择适当的筛选标记基因准确、有效地区分转化与非转化细胞，且不干扰植株再生是转化成功的重要环节。一般是通过导入一个抗生素、药物和除草剂抗性基因来实现，这些基因由一个组成型启动子控制，如CaMV35S、Ubi1和Act1等。转化常用的筛选标记有新霉素磷酸转移酶(NPTII)基因、潮霉素磷酸转移酶(HPT或HPH)基因、BAR及PPT乙酰转移酶(PAT)基因。

NPTII基因产物对一系列含有氨基糖苷键的抗生素有解毒作用，如新霉素(neomycin)、卡那霉素(kanamycin)、G418硫酸盐(geneticin)和巴龙霉素(paramomycin)。卡那霉素在浓度为100 mg·L^{-1}时就能对大多数双子叶植物细胞起到筛选作用，而禾谷类植物则表现出对卡那霉素很高的天然抗性，如在玉米的转化中以200 mg·L^{-1}的卡那霉素筛选时，仍能得到转化株，所以一般采用G418作选择剂，尽管其毒性有滞后的特点，适宜用量为25-50 mg·L^{-1}。HPT或HPH产物对潮霉素有解毒作用，绝大多数植物对潮霉素比对卡那霉素更敏感，因此潮霉素用于禾谷类作物的转化比卡那霉素效果好。潮霉素抗性是产生转基因水稻最常用的方法，也被成功地用于玉米转化。*Bar*和*PAT*基因都编码PPT乙酰基转移酶，表现出抗除草剂PPT活性，PPT可直接加入到培养基或对植株进行喷施，适宜用量为3-5 mg·L^{-1}。除草剂抗性基因的使用具有一定的优越性，可以产生具有农业用途的转基因植物，同时避免了任何不必要的选择标记基因的存在。

抗生素抗性基因的存在和组成型表达对转化体的筛选非常关键，但抗性标记基因存在许多问题，如对植物细胞分化和繁殖的副作用、产物的安全性、对环境的影响以及难以向含有标记基因的转基因植株转入另一个目的基因，因此必须在转基因植株中予以去除，这一点通过共转化或位点特异性重组也许可以做到。关于转基因可能向近源种或野生种逃逸而带来的生态安全问题，我国提出了对小麦、玉米和水稻等6种作物生物安全等级及其安全监控的对策。

3.2 外源基因表达调控

由于菌株来源的限制，为了使Ti质粒更适合单子叶植物遗传转化的需要，必须对质粒进行改进。一种方法是对*virA*和*vir*G双因子调控体系进行遗传改造，使其不依赖诱导物的存在，调控*Vir*基因高水平组成型表达，从而促进外源基因的转移，如利用*virG*的突变体*virG54D*造成*Vir*组成型表达，或构建含双倍*virB*、*virG*的超双元载体以提高菌株毒力。另一种方法是通过构建共整合载体和双元载体、增加超驱动序列、内含子和核基质附着区等来增强对植物细胞的侵染力，提高转化效率，增强外源基因的表达活性。理想的转基因表达要求时序控制、组织和细胞特异性和代间稳定性。调控因子包括启动子、转录和翻译前导序列、3' 非翻译区(3'-UTR)、增强子及其它序列。

在构建外源基因表达载体时，选择适当启动子并将其调控基因或转录因子共转化，也可促进目的基因的表达。通常来自单子叶植物的启动子在单子叶植物中的

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-434

表达效率比在双子叶植物材料中高得多, 如Act1、Ubiquitin和Emu启动子在单子叶植物中的表达效率远高于在双子叶植物中的, 而35S启动子在双子叶植物中的表达则高于在单子叶植物中的。在启动子和报告基因之间插入单子叶植物内含子可提高基因在单子叶植物中的表达效率。另外, 在启动子附近插入增强子也能提高表达效率。

影响外源基因表达水平的因素还包括内含子、密码子偏向性、基因组位置和染色质总体结构等。mRNA和编码蛋白质的稳定性也会影响表达效率, 特定的转基因编码产物在细胞内的定位也很重要。

随着以上遗传转化效率干扰因素的排除, 农杆菌介导的基因操纵将为单子叶植物信号转导(Ren et al., 2007a, 2007b)及功能基因组学研究提供有效的方法, 为生产中急需解决的株型改善、品质改良、产量提高及抗性增强(任慧波等, 2007; 刘静等, 2008)等提供新途径。

4 展望

尽管农杆菌介导的单子叶植物遗传转化取得了长足进步, 但单子叶植物感受态细胞稀少、再生能力弱、转化率低、外源基因表达水平低及实验重复性差的问题依然存在, 限制了这一技术在禾谷类作物遗传改良方面的应用。长期以来, 国内外研究者并未停止就感受态细胞选择与调节、预培养及共培养体系优化、转化子筛选及外源基因表达调控等诸多环节的研究步伐, 遗传转化体系仍在不断演化和发展中。随着新材料、新方法和新技术的引入, 加之诸多研究者对本系统的优化和整合, 我们有理由相信由基因工程育种和杂交育种相结合创造单子叶植物新品种、新类型的时代即将来临。

参考文献

高武军, 孙富丛, 魏开发, 王景雪 (2005). 玉米胚性愈伤组织诱导与分化的影响因素. 华北农学报 **20**, 27-31.

高武军, 魏开发, 孙富丛, 卢龙斗, 王景雪 (2004). 温度对根癌农杆菌转化效率的影响. 华北农学报 **19**, 81-83.

林拥军, 陈浩, 曹应龙, 吴昌银, 华红霞, 文静, 李亚芳 (2002). 农杆菌介导的牡丹江8号高效转基因体系的建立. 作物学报 **28**, 294-300.

刘法庆, 唐克轩, 叶建明 (1999). 农杆菌介导的小麦遗传转化条件的研究. 复旦学报(自然科学版) **37**, 569-572.

刘静, 魏开发, 高志晖, 李冰冰, 任慧波, 胡建芳, 贾文锁 (2008). 干旱胁迫下植物氮素营养与根信号在气孔运动调控中的协同作用. 植物学通报 **25**, 34-40.

刘巧泉, 张景六, 王宗阳 (1999). 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立. 植物生理学报 **24**, 259-271.

彭昊, 翟英, 张芊, 孙大业, 路铁刚 (2006). 水稻高效RNA干涉体系的建立及其功能分析. 中国农业科学 **39**, 1729-1735.

任慧波, 范意娟, 魏开发, 高志晖, 李桂芬, 刘静, 李冰冰, 胡建芳, 贾文锁 (2007). NCED3基因的持续诱导及ABA合成与代谢的协同调控在拟南芥ABA信号积累中的作用. 科学通报 **52**, 59-66.

单丽波, 李义文, 赵铁汉, 梁辉, 欧阳俊闻, 贾双娥, 贾旭 (2000). 利用花色素苷合成调节基因*C1-R*作为基因枪转化效果指示的研究. 遗传学报 **27**, 65-69.

王永勤, 肖兴国, 张爱民 (2002). 农杆菌介导的小麦遗传转化几个影响因素的研究. 遗传学报 **29**, 260-265.

魏开发, 高武军, 孙福丛, 卢龙斗 (2004). 影响玉米胚状体建成关键因素研究进展. 生物技术 **14**, 67-69.

许耀, 贾敬芳, 郑国昌 (1988). 酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植体的高效转化. 科学通报 **33**, 1745-1748.

叶兴国, 徐慧君, 杜丽璞 (2001). 小麦农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测. 中国农业科学 **34**(5), 469-474.

易自力, 曹守云, 王力 (2001). 提高农杆菌转化水稻频率的研究. 遗传学报 **28**, 352-358.

张艳贞, 王罡, 李昌, 胡汉桥, 王军军, 魏松红, 季静 (2002). 农杆菌介导将Bt杀虫蛋白基因导入优良玉米自交系的研究. 遗传 **24**, 35-39.

Alt-Mörbe J, Kühlmann H, Schröder J (1989). Differences in induction of Ti plasmid virulence genes *virG* and *virD*, and continued control of *virD* expression by four external factors. *Mol Plant Microbe Interact* **2**, 301-308.

Amoah BK, Wu H, Sparks C, Jones HD (2001). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *J Exp Bot* **52**, 1135-1142.

Bronwyn RF, Shou HX, Rachel KC, Zhang ZY, Xiang CB (2002). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* **129**, 13-22.

Cheng M, Fry JE, Pang SZ, Zhou HP, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan YC (1997). Genetic transformation of

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-434

w heat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* **115**, 971-980.

Fullner KJ, Lara JC, Nester EW (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* **273**, 1107-1109.

Guo GQ, Maiwald F, Lorenzen P, Steinbiss HH (1998). Factors influencing T-DNA transfer into w heat and barley cells by *Agrobacterium tumefaciens*. *Cereal Res Commun* **1**, 15-22.

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**, 271-282.

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* **4**, 745-750.

Jia W, Davies WJ (2007). Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced ABA signals. *Plant Physiol* **143**, 68-77.

Jin S, Song Y, Pan SQ, Nester EW (1993). Characterisation of a *virG* mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **7**, 555-562.

Kudirka DT, Colburn SM, Hinchee MA, Wright MS (1986). Interactions of *Agrobacterium tumefaciens* w ith soybean leaf explants in tissue culture. *Can J Genet Cytol* **28**, 808-817.

Ren HB, Gao ZH, Chen L, Wei KF, Liu J, Fan YJ, Davies WJ, Jia WS, Zhang JH (2007a). Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under w ater deficit. *J Exp Bot* **58**, 211-219.

Ren HB, Wei KF, Jia WS, Davies WJ, Zhang JH (2007b). Modulation of root signals in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid in drought-affected plants. *J Integr Plant Biol* **49**, 1410-1420.

Salas MG, Park SH, Srivatanakul M, Smith RH (2001). Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Rep* **20**, 701-705.

Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD (2003). Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of w heat. *Plant Cell Rep* **21**, 659-668.

Problems and Solutions in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Genetic Transformation of Monocotyledons

Kaifa Wei[1], Yiping Liu[1], Ziying Lin[1], Yafang Yang[1], Zehong Zhang[1], Wensuo Jia[2]

[1]*Department of Biotechnology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou 363000, China*
[2]*College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China*

Abstract Many transgenic plants have been obtained through the *Agrobacterium*-mediated transformation for monocotyledons. How ever, transformation of monocotyledons plants has been constrained by factors affecting transformation efficiency such as gene type, callus induction and differentiation, and foreign gene expression. This review discusses some technological details and problems, and reviews the progresses, including selection and management of competent cells, optimization of preculture and coculture, selection, foreign gene expression and regulation.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, monocotyledons

Wei KF, Liu YP, Lin ZY, Yang YF, Zhang ZH, Jia WS (2008). Problems and solutions in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of monocotyledons. *Chin Bull Bot* **25**, 491–496.

* Author for correspondence. E-mail: kaifa-w ei@163.com

(责任编辑: 刘慧君)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-434