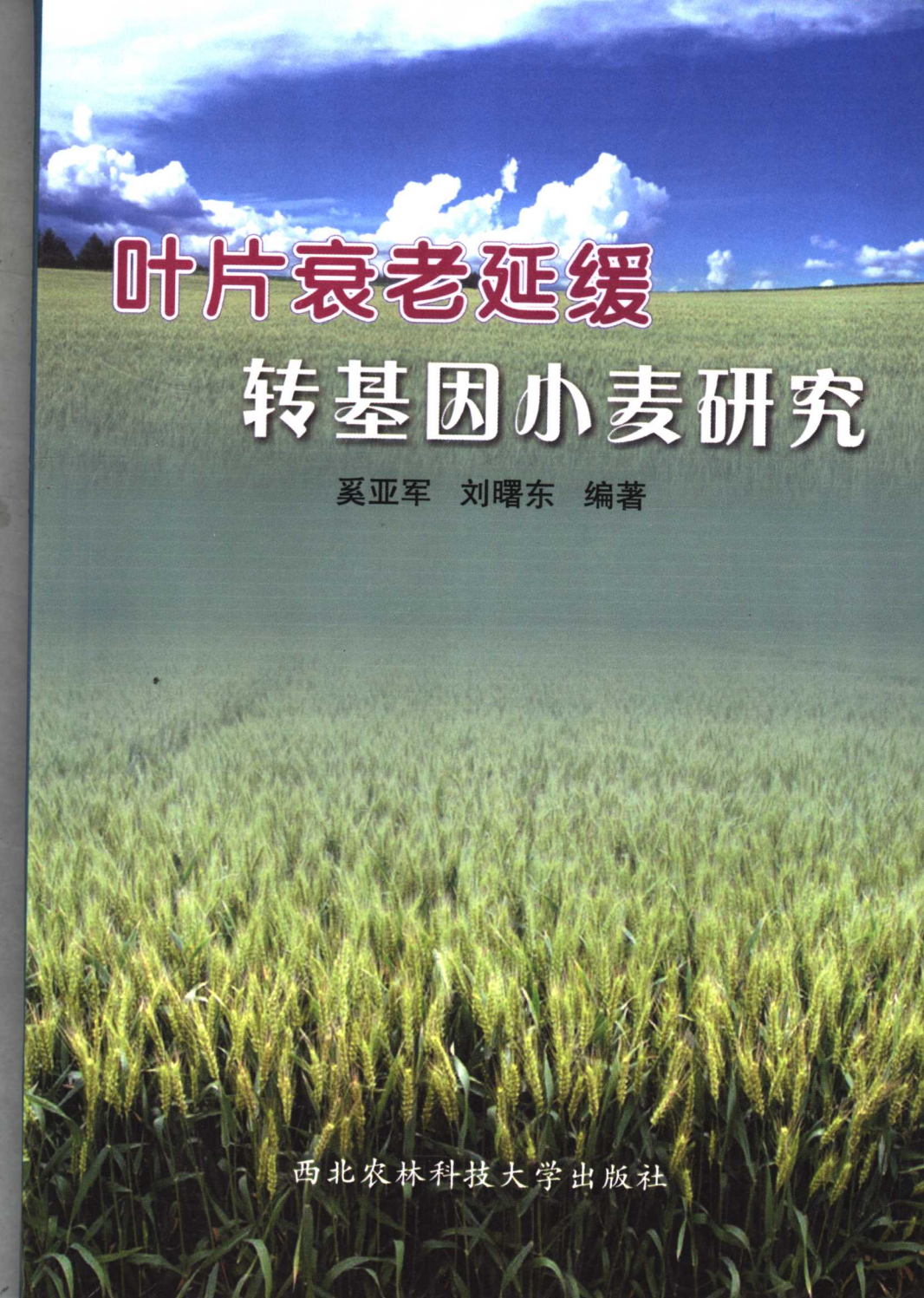




叶片衰老延缓

转基因小麦研究

奚亚军 刘曙东 编著

西北农林科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

叶片衰老延缓转基因小麦研究/奚亚军,刘曙东编著. — 杨凌:西北农林科技大学出版社,2006

ISBN 7-81092-273-4

I. 叶… II. ①奚… ②刘… III. 小麦—外源—遗传工程—研究 IV. S512.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 102580 号

叶片衰老延缓转基因小麦研究

奚亚军 刘曙东 编著

出版发行	西北农林科技大学出版社	
地 址	陕西杨凌杨武路 3 号	邮 编:712100
电 话	总编室:029-87093105	发行部:87093302
电子邮箱	press0809@163.com	
印 刷	西北农林科技大学印刷厂	
版 次	2006 年 9 月第 1 版	
印 次	2006 年 9 月第 1 次	
开 本	850 mm×1168 mm	1/32
印 张	4	
字 数	100 千字	

ISBN 7-81092-273-4/S · 112

定价:8.00 元

本书如有印装质量问题,请与本社联系

前 言

优良品种是提高小麦产量最重要的途径。小麦籽粒干物质主要来源于叶片的光合作用,特别是上三叶(功能叶)的光合作用效率、光合作用时间对籽粒干物质积累尤为重要。如果在不推迟成熟期的前提下,减缓叶片衰老进程,延长叶片功能期,无疑会明显改善小麦后期干物质的积累,增加小麦籽粒产量。采用常规育种方法是根据表现型进行性状改良,但是对叶片衰老这类对环境条件敏感的性状,表现型不能准确的反映基因型,常规育种方法收效较差。基因工程技术自 20 世纪 70 年代诞生以来,取得了突飞猛进的发展,在许多领域已获得了举世瞩目的成就,抗虫棉、抗虫玉米、抗除草剂作物等转基因产品都在农业生产中发挥着重要作用。正是由于基因工程能够精确生物性状,因而,应用植物转基因技术改造作物品种已显示出巨大的潜力。

美国威斯康星大学 Gan 和 Amasino 将克隆自拟南芥的衰老叶片特异型启动子 SAG12 和 IPT 基因组成嵌合基因 P_{SAG12} -IPT, 构成自我调控延缓叶片衰老系统。当叶片开始衰老时,衰老叶片特异表达的启动子 P_{SAG12} 被激活并转译出 IPT 基因,促进 CTK 合成,使叶片内源 CTK 的水平提高,从而减缓叶片衰老;而叶片衰老进程受阻,又反过来使衰老叶片特异表达的嵌合基因的表达受到限制,CTK 合成量减少,其结果既能延缓叶片衰老,又避免了 CTK 的过量合成而造成植物形态和发育的异常。

受国家转基因植物研究与产业化开发专项“抗叶片早衰转基

因小麦的选育”项目资助,我们采用植物转基因技术将叶片衰老延缓基因 P_{SAG12} -IPT 导入生产上小麦品种,试图通过调控叶片衰老进程来改善小麦后期的光合功能,延长光合时间,以提高小麦品种的产量。或者直接改良现有小麦品种,最大限度地发挥现有品种的生产潜力,或者为小麦高产育种提供新的种质资源。经过五年多的努力,已建立了较为高效的小麦遗传转化体系,获得了导入叶片衰老延缓基因 P_{SAG12} -IPT 的转基因植株及其株系,初步选育出了叶片衰老进程得到明显改善的转基因小麦新品系,较为系统地研究了转基因小麦的遗传和表达并对其安全性进行了初步评价。现将我们的研究成果归并整理出来,以供广大读者商讨,如有一、二可供同行借鉴之处,即感十分欣慰。

由于仅是五年多的研究成果,加上编者水平所限,书中难免存在错误和疏漏,敬请广大读者、专家批评指正,并致以诚挚的谢意。

编 者

2006 年 6 月

目 录

第一章 小麦转基因及叶片衰老调控研究进展·····	(1)
一、小麦转基因研究·····	(1)
二、小麦叶片衰老及其调控研究·····	(28)
第二章 卡那霉素在转基因小麦后代筛选中的应用研究···	(56)
一、材料与方法·····	(57)
二、结果与分析·····	(58)
三、讨论·····	(61)
第三章 小麦遗传转化中潮霉素适宜筛选浓度的研究·····	(63)
一、材料与方法·····	(64)
二、结果与分析·····	(66)
三、讨论·····	(69)
第四章 花粉管通道法转化小麦影响因素的研究·····	(71)
一、材料与方法·····	(73)
二、结果与分析·····	(74)
三、讨论·····	(78)
第五章 利用花粉管通道法将叶片衰老延缓基因 P_{SAG12} -IPT 导入普通小麦的研究·····	(80)
一、材料与方法·····	(82)
二、结果与分析·····	(84)
三、讨论·····	(89)
第六章 利用农杆菌浸种法将叶片衰老延缓基因 P_{SAG12} -IPT 导入普通小麦的研究·····	(92)
一、材料与方法·····	(94)

二、结果与分析·····	(96)
三、讨论·····	(100)
第七章 P _{SAG12} -IPT 基因在普通小麦中的遗传与表达研究	
·····	(103)
一、材料与方法·····	(105)
二、结果与分析·····	(106)
三、讨论·····	(108)
第八章 转 P _{SAG12} -IPT 基因小麦安全性的初步研究·····	(111)
一、材料与方法·····	(113)
二、结果与分析·····	(114)
三、讨论·····	(117)

第一章 小麦转基因及叶片衰老调控研究进展

奚亚军 刘曙东

(西北农林科技大学农学院)

一、小麦转基因研究

植物转基因技术以其把外源基因主动导入、定向改造植物的优点而日益受到人们的重视,已发展成为一种新的育种手段。迄今为止,全世界培育成功的转基因植物超过 200 种。其中,大豆、玉米、棉花、油菜、马铃薯等作物的一些转基因品种已在生产上大面积推广应用,取得了良好的经济效益。小麦是世界上栽培面积最大的粮食作物,已经成为基因转化的主要对象。但由于小麦组织培养的困难及遗传上的复杂性,转基因研究目前还处于建立和优化转基因体系阶段。加强小麦转基因的研究,推动其生产应用,在农业生产上具有重要意义。

(一)小麦转基因研究的历史

自 1983 年 Zambryski^[1] 利用农杆菌介导法获得第一例转基因烟草以来,人们就开始了小麦、水稻、玉米等主要农作物的转化尝试。但用于双子叶植物的一些转化方法直接移植到单子叶植物尤其是小麦时遇到了困难,一直未能获得转基因小麦。1992

年,美国学者 Vasil 等^[2]以长期培养的胚性愈伤组织为外植体,通过基因枪将 GUS 和 Bar 基因导入小麦品种“Pavon”,获得对除草剂 Basta 具有抗性的再生植株(T_0)及其后代(T_1),从而宣告世界上第一株转基因小麦问世。一年后,同一研究组又对转基因方法进行了优化,以未成熟胚及其愈伤组织为外植体,在 3 个小麦基因型(Pavon, Bobwhite 和 RH770019)上同时获得了成功,并且将获得转基因小麦植株的时间由 15 个月缩短至 7~9 个月^[3]。在这一年,Weeks 等^[1]也以品种“Bobwhite”的未成熟胚为外植体,通过基因枪法获得了转基因小麦植株,从此奠定了小麦转基因研究的工作基础。此后,许多研究者利用基因枪或其他方法转化小麦先后取得了成功。如 1994 年 Becker 等^[5]用基因枪法获得了转 GUS 基因的小麦植株;阎新甫等(1993)^[6]将抗白粉病二棱大麦总 DNA 通过花粉管通道法直接导入小麦感病品种花 76,获得 5 个稳定的抗白粉病株系;1993 年郭光泌等^[7]利用 PEG 法转化小麦原生质体获得转报告基因的小麦植株;同年,王兰岚等^[8]通过激光微束穿刺小麦未成熟胚取得成功;1994 年 He 等^[9]以品种“Hartog”的原生质体为受体,通过电激法获得具有除草剂(PPT)抗性的转基因小麦植株;Cheng 等(1997)^[10]和夏光敏等(1999)^[11]也分别利用农杆菌介导法成功获得转基因小麦。

目前,通过各种转化方法导入小麦的基因已超过 20 种,其中一些转基因植株在抗除草剂、改善品质、抗病虫、抗逆能力及雄性不育利用等方面展示出良好的应用前景,小麦转基因研究已取得了长足的进展^[12]。但是也应看到,与其他作物转基因研究相比较,小麦转基因研究还存在较大差距,迄今尚无转基因小麦在生产上试种,小麦转基因技术还不能作为一项成熟技术而普遍应用,世界上也仅有少数实验室取得了成功。

(二)小麦转基因的转化体系研究

植物转化体系是指将外源 DNA 导入植物细胞、筛选并再生出

稳定整合外源基因的植株,并对其进行鉴定的实验操作技术系统。一个完整的转化体系应包括:(1)转化受体系统;(2)含有目的基因和筛选标记基因的载体;(3)转化工具;(4)转化体的筛选和再生系统;(5)转基因植株的鉴定(包括报告基因;PCR 扩增;Southern 杂交;Northern 杂交;Western 杂交;目标性状鉴定等);(6)转基因植株的后代遗传分析等方面。转化体系的选择因植物受体和目的基因的不同而有所差别,具体应根据植物组织培养及再生系统的完备性、对农杆菌的敏感性及目的基因所含基因数目多少等进行确定。

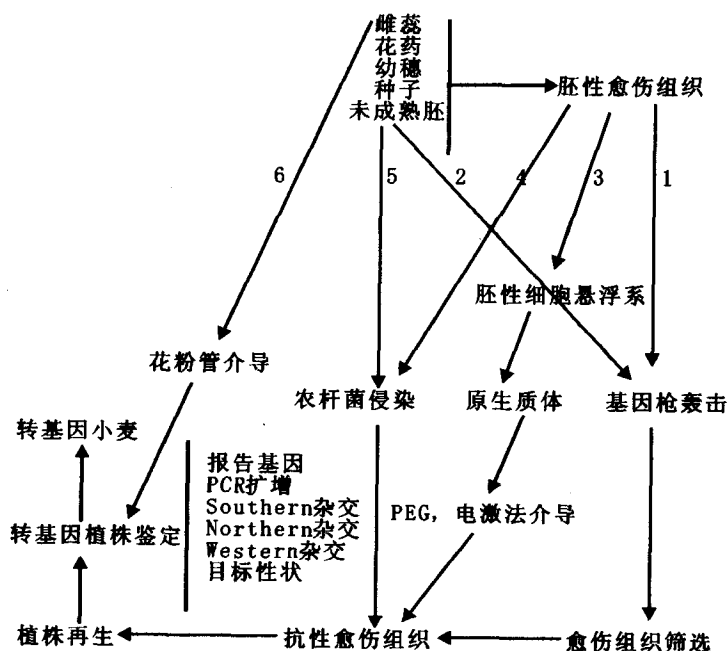


图 1.1 小麦转基因常见转化体系

自 1992 年 Vasil 等利用基因枪转化胚性愈伤组织获得第一例转基因小麦以来,小麦上已发表的转化体系有近十种^[12],其中已为人们普遍接受的转化体系有:(1)胚性愈伤组织—基因枪转化体系;(2)未成熟胚—基因枪转化体系;(3)胚性愈伤组织—原生质体转化体系;(4)胚性愈伤组织—农杆菌转化体系;(5)未成熟胚—农杆菌转化体系;(6)雌蕊—花粉管转化体系等(图 1.1)。根据小麦的转基因成果,在这 6 种转化体系中,以胚性愈伤组织—原生质体转化体系的转化频率最高,雌蕊—花粉管转化体系的转化程序最为简便。但由于小麦组织培养的复杂性及雌蕊—花粉管转化体系在植物转化上存在争议,目前在小麦转基因研究中以胚性愈伤组织—基因枪转化体系和未成熟胚—基因枪转化体系的应用最为普遍,在已报道的转基因小麦中 70% 以上都是采用这两种转化体系获得的^[13]。

(三)小麦转基因的受体系统研究

成功的基因转化首先依赖于良好的植物受体系统的建立。所谓植物基因转化受体系统,是指用于转化的外植体通过组织培养途径或其他非组织培养途径,能高效、稳定的再生无性系,并能接受外源 DNA 整合,对转化选择抗生素敏感的再生系统。小麦基因转化受体系统应具备的条件包括:高效稳定的再生能力;较高的遗传稳定性;具备稳定的外植体来源;对选择性抗生素敏感等。目前,用于小麦基因转化的受体系统主要有原生质体、胚性愈伤组织、未成熟胚、雌蕊等。

1. 原生质体

郭光泌等(1993)^[7]利用 PEG 法,He 等(1994)^[9]利用电激法分别将 GUS 基因和抗除草剂(PPT)基因导入小麦原生质体中,并分化出再生植株。采用原生质体作为受体系统,可直接进行转化,转化频率相对较高。但对于大部分小麦基因型来说,原生质体分

离非常困难且较难再生成完整的植株^[11]。因此,用原生质体作为受体系统在小麦上现在已很少采用。

2. 胚性愈伤组织

利用基因枪、农杆菌介导等方法,一些研究者将外源基因导入了小麦胚性愈伤组织中^[2,10]。胚性愈伤组织是目前小麦转化中最常用的转化受体系统。利用胚性愈伤组织作为转化受体系统可以避免原生质体受体系统的原生质体分离及再生上的困难,虽转化频率不及原生质体受体系统,但与其他受体系统相比较,其转化频率仍较高。目前,诱导小麦胚性愈伤组织的外植体包括未成熟胚(幼胚)、幼穗、花药、成熟胚、幼胚盾片等,其中以幼胚应用最多。用幼胚作外植体容易产生胚性愈伤组织,且其愈伤组织具有较强的植株再生能力,有利于进行遗传操作^[15]。幼穗也是小麦转化中较好的外植体。陈梁鸿等(1999)^[16]在比较幼胚和幼穗诱导的胚性愈伤组织的转化试验中观察到,幼穗的转化效果优于幼胚。另外,一些研究者直接以基因枪轰击小麦幼胚或盾片进行转化,虽然在转化频率上低于胚性愈伤组织,但是其分化和植株再生能力强,比较容易得到转化体^[17,3,1]。

3. 雌蕊

以原生质体、幼胚或胚性愈伤组织等作为转化受体系统,都要经过复杂的细胞及组织培养过程,这样不仅实验周期长,而且在长期的组织培养过程中容易产生变异和造成不育,影响转化效率。为此,一些研究者采用雌蕊作为受体系统进行转化,已在许多植物上获得成功,为植物基因转化避开组织培养途径提供了可能^[18]。1993年曾君祉等^[19]用雌蕊作为受体系统将GUS基因导入了小麦,并对转基因植株进行了基因表达和分子生物学分析,证明利用雌蕊作为转化受体可以获得转基因小麦^[20]。随后,又相继有一些研究者采用该方法在小麦上获得成功^[21,22]。

以雌蕊作为受体避开了组织培养过程,利用植物本身所具有

的有性繁殖过程进行再生,避免了转化体的早期夭亡、不育、不孕等,直接得到转化种子。其缺点是转化后代群体较大,需要有简便、可靠的筛选方法。

(四)小麦遗传转化的目标基因研究

在植物基因工程研究中,一个理想的目标基因应该具备:(1)决定人们希望的目标性状;(2)在植物的一定组织或器官中表达;(3)在植物生长发育的一定时期表达,即表达的时空特异性;(4)不影响植物的生长发育及其他对人类有益性状的正常表达。目前,向小麦中导入的目标基因主要有:报告基因、功能基因和某个物种的部分或全部基因组等。

1. 报告基因

DNA 的转移和它在植物细胞中的表达是一个成功转化体系的基本和相互关联的因素。这些因素可以通过在 DNA 转移 24~48 h 后检测报告基因的瞬间表达来进行估价,并不需要 DNA 在宿主基因组中整合。这不仅节省了时间,而且可以帮助研究者检测转化手段和质粒构建的适用性。原生质体或完整组织中的瞬间表达已被证明对研究基因调控和功能非常有用。

目前,在双子叶植物基因转化中常用的报告基因仍然多作为小麦遗传转化的目标基因。这些基因主要有^[23]:(1)Cat 基因(chloramphenicol acetyl transferase gene)。这种基因在早期的研究中采用较多,因其活性检测时间较长且需要放射性试剂,现在已很少采用。(2)GUS 基因(β -glucuronidase gene)。该基因由大肠杆菌的 Uid 位点编码,可以快速通过组织化学染色或荧光技术进行检测;GUS 基因是目前小麦遗传转化中应用最为广泛的报告基因和目标基因,并已用于小麦转基因植株的后代遗传分析;然而,用 GUS 基因作为报告基因时,应注意 GUS 表达检测实际上是破坏性的,即检测后的组织已被杀死,不能再继续培养。(3)Luc 基

因(luciferase gene),即萤火虫的荧光素酶基因。该基因为基因活性检测提供了最为灵敏的方法,但由于要进行定量分析,需要使用昂贵的设备,目前的使用还非常有限。另外,人工合成的绿色荧光蛋白基因(SGFP-S65T)也已用于小麦的基因转化^[24]。

2. 功能基因

已经导入小麦并在转基因植株中得到表达的功能基因包括抗除草剂基因、改良小麦加工品质的基因、抗病基因、抗虫基因、雄性不育基因、春化基因、耐盐基因、抗旱基因及提高磷利用率基因等。鉴于春化基因^[25]、耐盐基因^[26]、抗旱基因^[27]及提高磷利用率基因^[28]目前在小麦上仅有及少数成功的报道,这里只对前5种功能基因作以介绍。

(1)抗除草剂基因 抗除草剂基因最早是作为筛选标记基因引入小麦的,包括 Bar、Epsps、Cp4 和 Gox 等,其中以对除草剂 Basta 和 bialaphos 具有抗性的 Bar 基因应用最广而且最为成功^[29,30]。除草剂抗性基因的使用避免了不必要的选择基因的存在,同时可以产生具有农业生产用途的转基因植物。用抗除草剂基因转化的小麦品种用于大田播种,将免去人工去除杂草的麻烦。同时,用抗除草剂的外源基因转化杂交小麦的恢复系或将此基因转育到恢复系,用此恢复系制种,其后代将表现抗除草剂,在杂交小麦田中喷施除草剂,既杀死杂草,又杀死假杂种,将使杂交小麦的纯度大大提高。目前,这种技术已在杂交水稻中得到了初步应用^[31]。

(2)改良小麦加工品质的基因 改良小麦加工品质基因是目前导入小麦较多且较为有效的基因,主要包括高分子量谷蛋白亚基(HMW Glutemin subunit)基因 1Ax1、1Dx5 和 1Dx10,重组高分子量谷蛋白亚基基因及支链淀粉酶基因等^[32,33,34,35,36,37,38]。其中较为成功的如 Barcelo 等(1994)^[39]将 1Ax1 和 1Dx5 亚基基因导入小麦后,转基因植株的面团强度大大增加。Blechl 和 Ander-

son 等(1996)^[10]将 HMW-GS1Dx5 和 1Dx10 亚基基因导入小麦,均获得了稳定表达,转化植株的面筋质量得到了明显改善。

(3)抗病基因 目前导入小麦的抗病基因主要是一些抵抗真菌性病害的基因,如水稻几丁质酶基因^[11,12]、水稻类奇异果甜蛋白基因^[13]、藜芦醇合成酶基因^[14,15]、黑粉菌素抗真菌蛋白基因^[16]及大麦种子核糖滞活蛋白基因(RLP)^[17]等。这些基因通过破坏真菌的细胞壁或干扰其正常生长繁殖从而起到抗病作用。目前,抗真菌性病害基因在提高小麦的抗病性方面已显示出一定的应用潜力。如 Chen 等(1998)^[11]将水稻几丁质酶基因导入小麦,发现转基因植株的赤霉病感染率显著降低。另外,一些抗病毒基因如病毒外壳蛋白基因^[18]、天花粉蛋白基因^[19]及大麦黄矮病病毒复制酶基因^[50,51]等也已成功地导入小麦,以期增强小麦品种抵抗病毒性病害的能力。

(4)抗虫基因 随着农药对环境造成的污染日益加重,向小麦中导入抗虫基因越来越受到人们的重视。现阶段,已导入小麦的抗虫基因主要有豇豆胰蛋白酶基因 CpTI^[22]、雪花莲凝集素基因 Gna^[53,51]、慈菇蛋白酶抑制剂基因 API-A 和 APIB^[21]及小麦胰蛋白酶抑制剂 Cme 等^[55],其中以 Gna 的抗虫效果较好。Stoger 等(1999)^[54]将 Gna 基因导入小麦,发现转基因植株上的麦蚜虫口密度较对照减少了 50%以上。鉴于人们对小麦抗虫品种安全性的顾虑,在选择抗虫基因时必须十分谨慎。

(5)雄性不育基因 在小麦上目前已成功转化的雄性不育基因主要包括烟草花药绒毡层特异性启动了 TA29 与 RNA 酶基因 barnase 嵌合而成的 TA29-barnase 基因及相应的恢复基因 TA29-barstar、反义水稻肌动蛋白基因 anti-actin 与 TA29 嵌合而成的 TA29-antiactin 基因^[56,57,58]。这些基因的导入,使细胞核小麦雄性不育体系的利用成为可能。但是,这类人工设计的雄性不育体系在应用中,不育系种子繁殖和制种都必须利用除草剂除去

一半可育株,这样势必使不育系种子繁殖和制种工作更加复杂,费时费用还增加了降低种子纯度的风险,也不利于繁殖种产量的提高,因而尚未用于杂交小麦实际应用研究中。

3. 部分或全部基因组

植物有些性状是由多个基因控制的,这些基因又与很多重要的农艺性状相关,然而目前人们对那些涉及很多重要农艺性状的特定基因在分子生物学水平上还知之甚少,采用有性杂交方法导入又因存在生殖隔离问题而受到限制,在这种情况下,用整个或部分基因组进行转化就为人们提供了一条途径。

目前,用部分或全部基因组作为转化的目标基因在小麦上已取得一定进展。阎新甫等(1993)^[6]将抗白粉病二棱大麦总 DNA 通过花粉管通道法直接导入小麦感病品种花 76,获得 5 个稳定的抗白粉病株系。柏峰等(1999)^[59]利用浸胚法向小麦导入玉米核 DNA,获得了变异类型丰富的转化后代,并从中筛选出矮秆、优质、早熟的两个新品系。虽然目前有关这方面的报道都缺乏分子生物学上的有力证据支持,但为人们在小麦转化的目标基因选择上提供了有益的启示。

(五)小麦转基因的方法

小麦转基因的方法从总体上分为两大类,一是根癌农杆菌介导的转化,二是没有转化载体的裸露 DNA 的直接转化(direct gene transfer, DGT)。没有转化载体的裸露 DNA 的直接转化方法包括基因枪法、花粉管通道法、显微注射法、激光微束穿刺法、PEG 介导法、电激穿孔法及 DNA 浸泡法等,其中在小麦转化上应用较为广泛的是基因枪法和花粉管通道法。

1. 根癌农杆菌介导法

根癌农杆菌介导的基因转化利用的是一种能够实现 DNA 转移和整合的天然系统。该方法自 1983 年问世以来,因其具有转基

因低拷贝、遗传稳定以及能够转化大片断 DNA 等优点受到人们的极大关注,在已获得的超过 200 种转基因植物中,约 80% 是由根癌农杆菌介导完成的^[60]。根癌农杆菌介导法已成为大多数植物基因转移的首选方法,近年来又广泛用于曾被认为不在农杆菌宿主范围内的单子叶植物的基因转化研究,并取得了明显的进展。目前,根癌农杆菌转化梗稻的技术已经成熟^[61,62],在小麦^[10]、玉米^[63]、大麦^[61]等上也获得了初步成功。

根癌农杆菌转化植物细胞是通过将其体内的 T-DNA 转移到被侵染的植物细胞而实现的。参与该过程的遗传物质基础主要包括位于 Ti 质粒上的被转移的 T-DNA、致毒区 Vir 区及位于农杆菌染色体上的与农杆菌吸附植物细胞壁有关的基因(chv)^[64]。T-DNA 区两个边界为 25 bp 的重复序列,是 T-DNA 加工和整合识别的唯一信号,这两个重复序列之间的任何基因都可被 T-DNA 介导转入植物基因组中,由此得到的用外源目的基因代替天然 T-DNA 区毒性基因的卸甲质粒包括共整合载体和二元载体,是农杆菌介导的农作物性状改造的基础^[66]。T-DNA 在整合时其右边界序列起重要作用,而左端与植物 DNA 结合的部位显示较大的灵活性。Vir 区编码 T-DNA 加工、转移及整合等的功能蛋白。Vir 区至少包括 6 个位点,分别为 VirA、VirB、VirC、VirD、VirE 和 VirG,每一个位点包括 1 到 11 个开放阅读框架,有些菌株还有 VirF 和 VirH 位点^[65]。农杆菌转化中细菌表面的 VirA 蛋白接受植物信号分子,通过 VirG 蛋白的信号传递作用,启动毒性区的其他基因表达,从而完成 T-DNA 从农杆菌到植物细胞的传递过程。研究表明,根癌农杆菌介导的转化过程主要包括:(1)农杆菌吸附在植物敏感细胞上;(2)农杆菌中的 Ti 质粒上 Vir 区基因被激活;(3)T-DNA 切割和 T-DNA 复合物形成;(4)T-DNA 复合物由农杆菌进入植物细胞;(5)T-DNA 整合到植物染色体上并进行表达^[67,68]。

农杆菌是一个生物有机体,其功能受环境及其作用对象的影响比其他转化方法要复杂得多。从现有的研究结果看,影响根癌农杆菌介导植物基因转化的因素主要包括:(1)根癌农杆菌的菌株类型:农杆菌作为植物基因转化的工具,其属性对转化的成功具有决定性的影响。根癌农杆菌依其代谢冠醚碱的种类可分为章鱼碱型(octopine)、胭脂碱型(nopaline)、农杆菌碱型(agropine)或琥珀型(succinamopine)。其中农杆菌碱型菌株对植物细胞侵染能力最强,胭脂碱型菌株更利于吸附于植物细胞^[69]。在进行转化时,应依据菌株特性具体选择。(2)植物基因型及其外植体:农杆菌的侵染性因植物种类而不同,有的甚至局限于某种植物的某一基因型。因此,在转化之前必须对植物的基因型进行选择。在小麦上,Roberta等(1995)^[70]发现,不同基因型对农杆菌吸附在植物表面存在较大差异。来源于植物的不同外植体及同一外植体的不同发育阶段对农杆菌的侵染具有不同的敏感性。一般以分生组织及伴有活跃细胞分裂的外植体如幼叶、幼胚、茎尖、顶端分生组织、小孢子、愈伤组织、悬浮细胞培养物及其组织对农杆菌的侵染最敏感^[71]。(3)再生植株的细胞起源:成功转化的关键是将外源基因导入那些具有再生能力的细胞。农杆菌介导的转化方法主要作用于外植体表层细胞,如果再生细胞起源于深层细胞,则很难得到转化株,即使得到转化株,其转化频率也很低,且转化株表现为嵌合体,这就是所谓“转化”与再生的矛盾。(4)酚类化合物:研究表明^[72],植物受伤细胞分泌的某些酚类化合物对农杆菌 Vir 基因的表达有诱导作用。目前广泛使用乙酰丁香酮、羟基乙酰丁香酮及植物细胞培养物来诱导农杆菌^[73-74]。另外,也发现乙酰丁香酮等酚类化合物可以促进农杆菌在水稻、玉米、小麦、谷子等培养细胞及幼苗上吸附和转移^[75-79]。(5)培养方法:农杆菌介导的植物转化要经过以下几个步骤:外植体接种农杆菌—与农杆菌共培养—外植体在含抑制农杆菌以筛选转化体的药剂培养基上培养等。因此,农杆菌