

## 小麦的遗传转化

毕瑞明<sup>1,2</sup> 陈立国<sup>1</sup> 后猛<sup>1</sup> 王洪刚<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 山东农业大学农学院, 国家小麦改良中心山东(泰安)分中心, 山东省作物生物学重点实验室, 山东泰安 271018; <sup>2</sup> 菏泽学院生命科学系, 山东菏泽 274015

### Genetic Transformation of Wheat

BI Rui-Ming<sup>1,2</sup>, CHEN Li-Guo<sup>1</sup>, KOU Meng<sup>1</sup>, WANG Hong-Gang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Subcenter of National Wheat Improvement Center, The Key Laboratory of Crop Biology of Shandong, Taian, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>Department of Life Science, Heze College, Heze, Shandong 274015, China

**提要** 概述了小麦遗传转化的发展历史与现状, 分析了几种小麦转化技术的优势和不足, 并对小麦遗传转化中的有关问题作了展望。

**关键词** 遗传转化; 小麦

遗传转化以其将外源基因主动导入、定向改造植物的优点, 可解决常规育种中存在的一些难题, 它打破物种间遗传交流的限制, 给作物育种领域注入了新的活力。迄今为止, 世界范围内培育成功的转基因植物大约有 200 余种, 其中, 棉花、大豆、玉米、油菜、马铃薯等作物的一些转基因品种已在生产中大面积推广应用, 产生了良好的经济效益和社会效益。小麦的遗传转化起步较晚, 近几年进展较快, 在提高小麦产量、改善品质、增加抗逆性和雄性不育中, 展示出良好的应用前景。本文就小麦遗传转化作介绍, 并对此前景作了展望。

#### 1 小麦的遗传转化

**1.1 原生质体转化** 在小麦遗传转化研究早期阶段, 转化多以原生质体为受体进行, 依赖于小麦原生质体的植株再生。原生质体再生植株最早是在 20 世纪 70 年代在烟草中获得的, 后来这项技术逐渐扩展应用于禾谷类作物。Harris 等(1988)首次建立起小麦品种 'Chris' 花药愈伤组织的悬浮系, 从具有高度分化能力的悬浮细胞游离原生质体中, 获得小麦原生质体再生植株。此后, 又从不同小麦品种中相继得到原生质体再生植株或胚状体, 为小麦的原生质体转化打下了基础。

聚乙二醇诱导(PEG-induced)的小麦原生质体遗传转化, 是通过多聚分子 PEG (原生质体融合的化学媒介剂) 在二价阳离子的作用下与裸露的 DNA 形成共沉淀, 诱导外源 DNA 进入原生质体,

进行遗传转化。Lorz 等(1985)用 PEG 法将新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase, NPTII)基因转入小麦原生质体, 获得具有外源基因(NPTII)活性的抗性细胞克隆。郭光沁等(1993)用分别带有葡糖苷酸酶( $\beta$ -glucuronidase, GUS)基因和潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase, HPT)基因的 pBI221 及 pBI222 作为载体, 将小麦品种 '济南 177' 的原生质体悬浮在转化介质中进行转化, 筛选后得到抗性体细胞胚和小块愈伤组织, 进而获得转基因植株。Southern 杂交结果表明, HPT 已稳定整合进转化小麦的基因组中, 转化频率达到  $2 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5}$ 。

电激介导(electroporation-mediated)的小麦原生质体遗传转化, 是由 PEG 直接导入法发展而来的。电激介导转化是借助高强度电脉冲作用, 使原生质体膜产生瞬时可逆穿孔(直径约 4 nm), 导致 DNA 分子穿过小孔进入原生质体。电激转化首先在烟草上获得成功, 随后在谷类作物的转化上也取得了进展。Zhou 等(1993)用含有草丁膦乙酰转移酶(phosphinothricin acetyl transferase)基因(*Bar*)的质粒 pBARGUS, 电激介导转化小麦花药愈伤组织悬浮系的原生质体, 获得 5 块具有草丁膦抗性

收稿 2005-12-31 修定 2006-04-03  
资助 农业部农业结构调整重大技术研究专项(04-02-05B)。  
\*通讯作者(E-mail: hgwang@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8242682)。

的转化愈伤组织。He等(1994)通过电激介导获得抗除草剂的绿色转基因植株,但这些植株不能结籽。此项技术用于小麦其它受体进行遗传转化也获得成功。柯遐义等(1997)以春小麦品种‘T2003’的幼胚为受体,应用电激转化将*Bar*转入小麦基因组中,扩大了电激转化小麦的受体材料范围。Sorokin等(2000)则以小麦成熟胚和小孢子为受体,将*NPTII*和*gus*电激导入小麦细胞,获得可育的转基因小麦。电激法方便有效,可用于原生质体转化,也可用于完整细胞转化,并特别适用于瞬时表达的研究(王丽萍和赵洁2003)。梁辉等(2005)用改良的环形电极,将*Bar*和*gus*导入完整的小麦幼胚组织中,经PCR和Southern杂交分析,外源基因已稳定整合到小麦基因组中,转化频率提高到7.5%,高于相同处理条件下基因枪法的转化频率(4.2%)。

脂质体介导(liposome-mediated)的原生质体转化,是用包装有DNA的脂质体与原生质体共保温方法,通过二者脂膜动态结合,外源DNA释放到原生质体中来实现转化的。这种方法最初应用于动物细胞,随后移用于植物原生质体转化。朱祯等(1993)用含*HPT*的大肠杆菌质粒pCGN1055转化小麦原生质体,筛选后的抗性克隆所占的比例为3.8%,转入分化培养基后获得再生白化苗。

以原生质体作为外源基因的受体,有其不可替代的优点:(1)原生质体没有细胞壁,可接纳较大片段的DNA,甚至细胞器;(2)能一次接受大量的DNA;(3)原生质体为完全分散游离的单细胞群体,可以避免产生基因转化的嵌合体;(4)能提供大量一致的靶细胞用于DNA导入;(5)无宿主限制;(6)操作简便等。用于原生质体转化的方法很多,其中脂质体介导转化具有较大的潜力,由于脂质分子的介入,外源DNA导入原生质体的频率可大大提高。但原生质体转化在小麦中的应用,至今还不够理想。原因是此方法需要以原生质体培养为基础,而小麦原生质体的分离和培养难度大,周期长,培养过程中体细胞突变率高,再生植株能力低,即使获得再生植株,也往往不育。同时,从原生质体转化得到的转基因植株,普遍存在着结实率低,外源DNA拷贝数高、片段化、基因重排以及基因表达沉默等问题。这些

不利因素制约了小麦原生质体遗传转化的发展,此种小麦转化系统远未达到预期目的。

**1.2 基因枪轰击法遗传转化** 基因枪轰击(microprojectile bombardment, particle bombardment or biolisties)是将外源基因在Ca<sup>2+</sup>或亚精胺等作用下吸附在重金属金或钨粒子表面(直径1 μm左右),制成DNA微弹后,用基因枪将微弹高速射入植物受体细胞,释放出的DNA分子随机整合到植物基因组中,从而实现遗传转化。

1992年,Vasil等采用基因枪转化法,首次获得了用*gus*和*Bar*转化的抗除草剂Basta的小麦可育转基因植株,从而开创了转基因小麦研究的先河。他们得到的T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>代植株均具有Basta抗性,分子杂交进一步验证外源基因得到整合,并且*Bar*在转化植株后代中的基因分离符合孟德尔遗传规律。1993年,Vasil等再次应用此方法转化小麦幼胚,并对转化和组织培养条件进行优化,在短期内得到了可育的转基因植株,转化频率为1.0%,于是他们认为,基因枪转化是一种快速的遗传转化方法。王小军等(1996)用基因枪将含有CaMV 35S启动子的腈水解酶(nitrilase)基因*Bxn*和筛选标记基因*NPTII*导入小麦幼胚后,以抗性鉴定和Southern杂交分析证明,获得的确是转基因植株,且自交可育,转化频率为1.9%。在随后的几年中,人们又相继以小麦的幼胚、幼穗、盾片以及来源于他们的胚性愈伤组织等为靶组织,用基因枪将具有抗除草剂(Ortiz等1996; Permingeat等2003)、抗病(Chen等1998; Bieri等2000)、抗虫(Altpeter等1999; Stoger等1999)、抗逆(郭北海等2000)、优质(Blechl和Anderson 1996; Barro等1997)、人工雄性不育(傅荣昭等1997)等性状的目的基因导入小麦,转化效率最高可达5.5%(Ortiz等1996),由此小麦基因工程研究进入了一个新的阶段。

基因枪轰击转化与原生质体转化相比,是一种新的变革。基因枪法可以直接轰击那些已完成形态分化的组织或器官,受体范围扩大至完整细胞,来源广泛,胚性愈伤组织、幼胚、成熟胚盾片、茎尖分生组织、幼穗等都可以,这就避免了原生质体培养与再生的障碍,从而摆脱了受体专一性要求,提高了转化效率,加快了育种速

度; 基因枪轰击转化得到的大多数转基因植株表型正常, 同时还保持了高度的可育性。目前, 基因枪轰击转化是小麦遗传转化中应用最多的方法。

基因枪轰击转化体系的建立, 推动和促进了小麦遗传转化的研究和小麦基因工程的发展。但这是一种机械和随机过程, 受诸多因素影响, 如基因枪的种类(涉及轰击时的气压、距离、速度等)、所用的金属粒子种类、DNA 沉淀辅助剂及DNA 的纯度、质粒DNA 和金属粒子之比、每枪粒子用量等, 重复性差, 且对处理的植物材料有一定程度的伤害, 也存在着转化效率不高、转化片段较小(<30 kb)、转化后产生嵌合体、多基因拷贝整合、基因沉默、外源基因在后代中容易丢失(Alvarez等2000; Rooke等2003)以及仪器设备耗材价格昂贵等缺点, 因而其应用受到限制。

**1.3 农杆菌介导的遗传转化** 在植物基因工程的发展中, 研究和应用比较清楚和成功的是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化。它是利用农杆菌Ti质粒(包括Ri质粒)上有一段转移DNA (T-DNA 区)和毒性区(Vir 区)的特性, 农杆菌侵染植物时, T-DNA 在Vir 区的基因产物帮助下插入到植物基因组中, 其携带的基因可在植物基因组中整合和表达。大多数单子叶植物不是农杆菌的天然宿主, 单子叶植物的农杆菌介导转化存在许多困难。农杆菌介导的单子叶植物转化最早是在石刁柏中获得成功的, 之后, 相继在水稻、玉米、大麦、甘蔗等重要经济作物中获得了农杆菌介导的转基因植株。

农杆菌介导的小麦遗传转化一直是世界上研究此项问题中的一道难题。20 世纪90 年代初, Hess 等(1990)、Mooney 等(1991)曾对农杆菌介导转化小麦的可行性进行过尝试性研究, 但未能获得转基因植株。1997 年, Cheng 等用此方法获得了有分子生物学证据的小麦转基因植株, Xia 等(1999)也报道用农杆菌介导获得了转基因小麦。随后, 人们又对影响农杆菌介导小麦遗传转化的因素作了深入广泛的研究, 此方法的转化效率不断提高。小麦基因型、外植体源、预培养时间、侵染和共培养时间、乙酰丁香酮、农杆菌菌株、载体以及筛选剂等影响转化率。Khanna 和 Daggard (2003)报道, 载体结构直接影响转化效

率, 具有双Vir 区基因的载体, 转化效率明显高于仅有一个Vir 区基因的载体, 并且再生培养基中加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚精胺可促进农杆菌侵染后的愈伤组织恢复, 转化率达到3.9%; 35% 的转基因植株为单拷贝插入, 大多数转基因植株符合孟德尔遗传规律。Hu 等(2003)以预培养4 d 的小麦幼胚为外植体, 用农杆菌CP4 (*aroA*:CP4), 以草甘膦为筛选剂, 获得了4.4% 的转化率, 46% 的转基因植株符合孟德尔遗传规律, 67% 为单位点、单拷贝插入。此外, 人们用同样的转化方法相继又得到一些小麦转基因植株(Amoah 等2000; 薛哲勇等2004; 秦余香等2004)。

农杆菌介导的遗传转化, 用的是一种能够实现DNA 转移和整合的天然系统。此方法自1983 年问世以来, 因其具有转基因低拷贝、遗传稳定(Khanna 和 Daggard 2003)、能够转化相对较大片段DNA (Hamilton 等1996; Liu 等1999)以及成本低廉等优点, 受到人们的极大关注。在已获得的约200 种转基因植物中, 约80% 是由此菌介导完成的(王关林和方宏筠2002), 农杆菌介导转化已成为大多数植物遗传转化的首选方法。在小麦的农杆菌介导转化中, 目前仍存在受基因型限制、对组织培养技术依赖性强、转化频率不高以及起始外植体单一等问题。但随着该转化体系的不断发展完善, 以及与其他一些转化方法的联合使用, 农杆菌介导转化技术将会在小麦遗传转化中发挥更大的作用。

**1.4 花粉管通道介导的遗传转化** 用花粉管通道进行遗传转化, 是根据植物远缘杂交理论(周光宇等1979)创建的, 近年来, 在农业分子育种中的应用越来越多。用花粉管通道转化植物的工作主要集中在我国, 其理论基础是认为植物中存在染色体水平以下的DNA 片段杂交。外源DNA 片段在授粉后通过花粉管通道进入胚囊而整合到受精卵基因组中, 然后自然发育成种子。花粉管通道法转化植物, 早期主要采用提取供体总DNA 后进行转化。这种方法简单易行, 但转化后代性状变异复杂, 给筛选工作带来困难; 同时, 转化体只是根据表型变异情况给予确认, 供体基因在转化体中的检测和鉴定较难, 缺少必要的分子生物学证据, 因而此转化方法存在很大争议。1988 年,

Luo 和 Wu 用花粉管通道法将含报告基因的质粒 DNA 转入水稻, Southern 杂交和酶学测定表明, 外源基因在水稻转基因植株中已整合并表达, 从而使花粉管通道法的转化工作像其他直接转化法一样, 完全按照转基因技术的操作进行, 打消了人们对此转化方法的疑虑。

1993 年, 曾君祉等将含报告基因 *gus* 的质粒 pBI121 用花粉管途径转化普通小麦, 在结实的 106 粒种子中, 经点杂交和 Southern 杂交鉴定, 以及组织化学检测, 证实 *gus* 已整合到小麦基因组中, 并能在植物体中表达; 他们的后续研究结果表明, 转基因植株后代连续 4 代的外源基因稳定遗传, 遗传规律与其他转化方法——农杆菌介导转化和基因枪转化所得到的结果相似。不同学者将不同物种的总 DNA 导入小麦, 得到不同的小麦变异株系和新品系, 从而丰富了小麦育种材料 (王立新等 2001; 赵宝存等 2004); 另外, 还有人又将一些外源基因通过花粉管途径导入小麦, 也获得了一批有分子生物学证据的小麦转基因植株 (刘志方等 2001; 侯文胜等 2003; 黄益洪等 2004)。

用花粉管通道法进行转化, 与其他转化方法相比, 有诸多优点: (1) 可直接获得转化种子, 无需经过组织培养过程; (2) 取材方便, 操作简单, 实验成本低廉, 能直接在大田工作, 更适合较大规模的转化; (3) 避免了转基因植株嵌合体 and 体细胞畸变等问题, 也减少了基因型的影响; (4) 每年可获得大批转化种子, 用于转基因后代的遗传学研究和育种, 可为这些工作提供一定数量的群体。此方法已成功应用于我国抗虫棉的育种, 在小麦的遗传转化中也有很大的应用潜力。但此方法也存在易受环境条件影响、重复性差、经验性强、转基因植株后代情况复杂、外源基因整合机制不清楚等缺点, 这些都有待进一步优化和完善。

**1.5 离子束介导的遗传转化** 低能离子在生命科学中的应用, 最先是在我国兴起的。离子束介导转化是 20 世纪 80 年代末提出的一种新的转基因方法, 是我国拥有自主知识产权的一项高新技术。离子注入技术已应用于生物改良、生命起源和进化以及环境辐射生物学效应等多个理论和应用研究领域。其中, 在植物遗传转化、创造新种质资

源中的成果尤为突出, 并且用离子束介导转化已获得了高蛋白和抗病的小麦、高光效水稻以及棉花新品系等。

离子束介导转化是用低能离子束注入植物组织后, 对植物细胞产生刻蚀, 受刻蚀后的细胞壁产生局部穿孔, 细胞膜透性发生变化, 从而可为外源 DNA 进入细胞提供多个可自动修复的微通道。另外, 带正电的离子在微通道内积累, 则有助于带负电的外源 DNA 进入细胞。同时, 离子注入对靶细胞 DNA 造成一定损伤, 由损伤诱导的修复作用可为外源 DNA 在受体基因组上的整合和重组提供便利条件 (Yu 等 1993)。2000 年, 吴丽芳等以携带报告基因 *gus* 和潮霉素抗性基因 *hyg* (R) 的质粒为供体, 进行了离子束介导小麦遗传转化的研究, 他们获得的分子生物学证据表明, 外源基因已整合到小麦基因组中, 从而首次证明离子束介导小麦遗传转化的可行性。苏明杰等 (2003) 用离子注入法, 将大豆总 DNA 导入 ‘新麦 9 号’ 籽粒种胚的结果表明, 处理后当代后熟植株籽粒中蛋白质含量发生明显变化, 得到了一批高蛋白的变异材料, 说明用离子束介导法可对小麦种子进行直接转化。苕收伟等 (2004) 用低能离子束将大豆总 DNA 分别导入 2 个小麦品种 ‘中育 5 号’ 和 ‘淮阴 9628’ 中, 也获得一些高蛋白株系。这样, 用这一新的技术可得到一些小麦转基因植株或变异株系, 从而大大丰富了小麦育种资源。

离子束介导技术转移活性裸露的 DNA 大分子, 可获得带有目的性状的转化后代, 这可能是未来远缘物种间遗传物质交流的一种简便、有效的方法, 但还待进一步完善。离子注入装置需要在真空下进行, 而真空的脱水作用和真空会导致伤害, 引起细胞或组织存活率降低, 从而影响转化效率。

**1.6 其它方法的遗传转化** 碳化硅纤维介导转化 (Serik 等 1996)、农杆菌处理花器官转化 (何道一等 2003) 和整体转化 (王宏芝等 2004) 等转化方法在小麦的遗传转化中也有一定的应用。

## 2 展望

从转化策略来说, 有三点: 一是建立小麦基因靶位操作体系, 二是构建大片段 DNA 转入小麦

细胞并稳定表达的体系, 三是无筛选标记的小麦遗传转化。在植物体内引入某些 DNA 序列, 然后通过同源重组向植物基因组的特定位点导入目的基因, 这方面的工作在拟南芥 (Vergunst 等 1998)、烟草 (Bayer 和 Hess 2005) 中已经开展, 而小麦的基因靶位操作体系有待建立。向小麦体内转入大片段 DNA, 可能会成为小麦分子育种中的一个新方向。小麦的一些重要经济性状, 如高产、优质、抗病、抗虫、抗逆等, 常常是由多基因控制的数量性状, 这些基因成簇排布, 定位在较大 DNA 片段甚至不同的染色体上。这些性状的改造需要一个能将大片段 DNA 转入植物细胞并稳定表达的体系。双元细菌人工染色体 (BiBAC, 能够携带 150 kb 的基因片段) (Hamilton 1997) 和具转化功能的人工染色体 (TAC, 能够携带 40~80 kb 的 DNA 片段) (Liu 等 1999) 的构建, 对突破常规植物基因工程中外源基因片段的限制 (小于 30 kb) 很重要。目前, 大片段 DNA 导入的研究还仅限于烟草 (Hamilton 等 1996)、拟南芥 (Liu 等 1999) 等少数几种植物, 若能够实现向小麦等禾谷类作物中转入大片段 DNA, 则将对这些重要粮食作物的遗传改良产生深远的影响。

从转化技术来说, 小麦转化技术已形成了以基因枪转化为主, 花粉管通道转化次之, 其它转化技术均有进展的状况。利用基因枪转化虽然能很方便地获得小麦转化体, 但对大片段 DNA 的转化却显得无能为力。随着农杆菌转化体系的不断完善以及一些新思路的提出, 采用农杆菌介导转化与其他转化技术相结合的方法, 将会促进农杆菌介导转化在小麦遗传转化中发挥更大的作用。农杆菌与细菌人工染色体的联合应用 (Liu 等 1999), 可赋予其转化大片段 DNA 的功能, 因而将能够改良小麦的一些数量性状; 采用农杆菌 T-DNA 转移和整合原理与基因枪技术相结合创建的“农杆菌法” (agroclistic) (Hansen 等 1996), 可将 *virD1*、*virD2* 基因连同 T-DNA 上的目的基因一同打入植物细胞, 这种技术集中了农杆菌转化中精确切割转移和低拷贝整合等特性以及基因枪法中无宿主范围限制的优点, 是一种有发展前途的新思路。超声波辅助农杆菌介导法 (sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation, SAAT) (邱

树毅等 1999), 可通过超声波在受体细胞上产生微孔来帮助农杆菌附着和 T-DNA 转移; 还有农杆菌与病毒结合的农感染 (agroinfection) 法, 此方法由农杆菌介导病毒基因转移, 但并不引起病毒在植物基因组中整合 (李桂兰 2004); 更有农杆菌整株感染 (Clough 等 1998) 等转化技术对小麦的遗传转化也将有很大的帮助。

总之, 在今后一段时间内, 小麦基因靶位操作体系的建立, 离体再生技术的完善, 无筛选标记的小麦遗传转化, 各种转化方法综合应用以建立一个较理想的转化体系, 以及将大片段 DNA 导入小麦的研究, 都将是今后小麦遗传转化研究中的几个重要方面。

尽管小麦已可以成功转化, 获得了一批转基因小麦, 并在小麦遗传改良中展示出良好的应用前景, 但与其它作物相比, 仍存在较大差距。迄今, 尚无转基因小麦在生产中试种, 小麦遗传转化技术还不能作为一项常规技术而普遍应用, 其在育种中的应用也才刚刚起步。相信随着分子生物学的进展和小麦转化技术的日臻完善, 今后将会发现更多的优良基因并转移到小麦中, 从而丰富小麦的基因库, 转基因小麦不久也定会走向生产应用。

## 参考文献

- 苁收伟, 程玉红, 秦广雍, 苏明杰 (2004). 离子束辅助大豆基因群导入小麦的研究. 华北农学报, 9 (1): 5~7
- 傅荣昭, 曹光诚, 马江生, 李文彬, 孙勇加, 陈占宽, 易明林, 鄧玉宝, 林作辑 (1997). 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报. 遗传学报, 24 (4): 358~361
- 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 杜立群, 李银心, 张劲松, 陈受宜, 朱至清 (2000). 甜菜碱脱氢酶 (BADH) 基因转化小麦及其表达. 植物学报, 42 (3): 297~283
- 郭光沁, 许智宏, 卫志明, 陈惠民 (1993). 用 PEG 法向小麦原生质体导入外源基因获得转基因植株. 科学通报, 38 (13): 1227~1231
- 何道一, 李中存, 王洪刚 (2003). 农杆菌介导的小麦活体转化. 中国农业科学, 36 (12): 1437~1441
- 侯文胜, 郭三堆, 路明 (2003). 利用花粉管通道法将 *cryIa* 基因导入小麦. 作物学报, 29 (6): 806~809
- 黄益洪, 刘春光, 马鸿翔, 刘根齐, 周森平, 孙勇如, 余桂红, 陆维忠 (2004). 小麦花粉管途径转化及高效筛选体系的建立. 分子植物育种, 2 (6): 777~782
- 柯遐义, 黄粤, 石和平 (1997). 利用电激法转化小麦幼胚的研究.

- 武汉植物学研究, 15 (2): 103~107
- 李桂兰(2004). 小麦遗传转化技术研究进展. 河北科技师范学院学报, 18 (2): 36~40
- 梁辉, 吴方盛, 王道文, 孙东发, 贾旭(2005). 环形电极介导的小麦基因转化. 遗传学报, 32 (1): 66~71
- 刘志方, 陈惠云, 夏光敏, 陈永喆, 陈惠民(2001). 利用花粉管通道途径获得转基因小麦. 山东大学学报(理学版), 36 (1): 84~89
- 秦余香, 赵双宜, 支大英, 夏光敏, 陈惠民(2004). 根瘤农杆菌介导大麦*Mlo*反义基因转化小麦. 山东大学学报(理学版), 39 (5): 102~111
- 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华(1999). 超声波在生物工程中的应用. 生物工程进展, 19 (3): 45~48
- 苏明杰, 赵传奇, 秦广雍(2003). 离子束介导外源基因群转移小麦的研究. 中州大学学报, 20 (2): 119~121
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社, 360~368
- 王宏芝, 魏建华, 李瑞芬(2004). 农杆菌介导的小麦生殖器官的整体转化. 中国农业科技导报, 6 (3): 22~26
- 王丽萍, 赵洁(2003). 电激转化GFP基因在小麦合子和早期原胚中的高频表达. 植物学报, 45 (2): 200~204
- 王立新, 孟荣华, 郭仁俊, 徐民新, 孙志民, 张润飞, 孙家柱(2001). 应用花粉管通道法进行小麦抗白粉病基因的研究初报. 农业生物技术学报, 9 (3): 265~268
- 王小军, 刘玉乐, Yong H, 田波(1996). 可育的抗除草剂溴腈转基因小麦. 植物学报, 38 (12): 942~948
- 吴丽芳, 李红, 宋道君, 冯慧云, 余增亮(2000). 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转*GUS*基因植株. 遗传学报, 27 (11): 982~991
- 薛哲勇, 贺晨霞, 孙松, 夏光敏(2004). 农杆菌介导的胆碱脱氢酶基因(*betA*)转化小麦及影响转化效率的因素. 山东大学学报(理学版), 39 (3): 104~110
- 曾君祉, 王东江, 吴有强, 张健, 周文娟, 朱小平, 徐乃正(1993). 用花粉管途径获得小麦转基因植株. 中国科学(B辑), 23 (3): 256~262
- 赵宝存, 葛荣朝, 沈银柱, 黄占景(2004). 小麦T型细胞质雄性不育保持系线粒体DNA片段转化不育系的初步研究. 华北农学报, 19 (4): 21~23
- 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬(1979). 远缘杂交的分子基础. 遗传学报, 6 (4): 405~413
- 朱楨, 孙宝林, 刘春明, 肖桂芳, 李向辉(1993). 转化脂介导小麦原生质体转化及转基因白化苗的再生. 生物工程学报, 4: 320~323
- Altpeter F, Diaz I, McAuslane H, Gaddour K, Carbonero P, Vasil IK (1999). Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor Cme. *Mol Breed*, 5: 53~63
- Alvarez ML, Guelman S, Halford NG, Lustig S, Reggiardo MI, Ryabushkina N, Schewry P, Stein J, Vallejos RH (2000). Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theor Appl Genet*, 100: 319~327
- Amoah BK, Wu H, Sparks C, Jones HD (2000). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *J Exp Bot*, 52: 1135~1142
- Barro F, Rooke L, BékéF (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat Biotechnol*, 15: 1295~1299
- Bayer M, Hess D (2005). Restoring full pollen fertility in transgenic male-sterile tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by Cre-mediated site-specific recombination. *Mol Breed*, 15: 193~203
- Bieri S, Potrkus I, Fütterer J (2000). Expression of active barely seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat. *Theor Appl Genet*, 100 (5): 755~763
- Blechl AE, Anderson OD (1996). Expression of a novel high molecular weight glutenin subunit in transgenic wheat. *Nat Biotechnol*, 14: 875~879
- Chen WP, Gu X, Liang GH, Muthukrishnan S, Chen PD, Liu DJ, Gill BS (1998). Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the *bar* gene as a selectable marker. *Theor Appl Genet*, 97: 1296~1306
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 115: 971~980
- Clough SJ, Bent AF, Dip F (1998). A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735~743
- Hamilton CM (1997). A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene*, 200: 107~116
- Hamilton CM, Frary A, Lewis C (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9975~9979
- Hansen G, Shillito RD, Chilton MD (1996). "Agroclistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated *in planta*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14978~14983
- Harris R, Wright M, Byrne M (1988). Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep*, 7: 337~340
- He DG, Mouradov A, Yang YM (1994). Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) through electroporation of protoplasts. *Plant Cell Rep*, 14: 192~196
- Hess D, Dressier K, Nimmricher R (1990). Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*, 72: 233~244

- Hu T, Metz S, Chay C, Zhou HP, Biest N, Chen G, Cheng M, Feng X, Radionenko M, Lu F et al (2003). *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep*, 21: 1010~1019
- Khanna HK, Daggard GE (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep*, 21: 429~463
- Liu YG, Shirano Y, Fukaki H (1999). Complementation of mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6535~6540
- Lorz H, Baker B, Schell J (1985). Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol Gen Gene*, 199 (2): 178~182
- Luo ZX, Wu R (1988). A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol Biol Rep*, 6 (3): 165~174
- Mooney PA, Goodwin PB, Dennis ES, Llewellyn DJ (1991). *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 25: 209~218
- Ortiz JPA, Reggiardo MI, Ravizzini RA, Altabe SG, Cervigni GDL, Spitteler MA, Morata MM, Elias FE, Vallejos RH (1996). Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep*, 15: 877~881
- Permingeat HR, Alvarez ML, Cervigni GDL, Ravizzini RA, Vallejos RH (2003). Stable wheat transformation obtained without selectable markers. *Plant Mol Biol*, 52: 415~419
- Rooke L, Steele SH, Barcelo P, Shewry PR, Lazzeri PA (2003). Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. *Euphytica*, 129: 301~309
- Serik O, Ainur I, Murar K, Tstsuo M, Masaki I (1996). Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) mature embryos. *Plant Cell Rep*, 16: 133~135
- Sorokin AP, Ke XY, Chen DF, Elliott MC (2000). Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci*, 156: 227~233
- Stoger E, Williams S, Christou P, Down RE, Gatehouse JA (1999). Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Mol Breed*, 5: 65~73
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, 10: 667~674
- Vasil V, Srivastava V, Castillo AM (1993). Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology*, 11: 1553~1558
- Vergunst AC, Jansen LET, Hooykaas PJJ (1998). Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *Nucleic Acids Res*, 26 (11): 2729~2734
- Xia GM, Li ZY, He CX, Chen HM, Brettell R (1999). Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiol Sin*, 25 (1): 22~28
- Yu ZL, Yang JB, Wu YJ (1993). Transferring *GUS* gene into intact rice cells by low energy ion beam. *Nucl Instrum Meth B*, 80: 1328~1331
- Zhou H, Stiff CM, Konzak CF (1993). Stably transformed callus of wheat by electroporation-induced direct gene transfer. *Plant Cell Rep*, 12 (11): 612~616