

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.1728.010

网络出版时间:2011-10-25 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.1728.010.html>

微弹轰击小麦幼胚愈伤组织的影响因素研究

崔志钢,陈耀锋,周文丽,杨 梅,徐东北,李春莲

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**优化小麦基因枪转化技术体系,为提高小麦基因枪转化效率提供参考。**【方法】**以小偃 22 为材料,采用基因枪法分析小麦幼胚愈伤组织诱导时间、微弹轰击金粉用量及筛选分化培养基类型对基因枪遗传转化频率的影响,并对转化植株进行了检测。**【结果】**在相同条件下,小麦幼胚经过 9 d 的愈伤组织诱导时再生植株率最高,达到 4.24%;同一条件下,金粉用量为 60 μg /枪的再生植株率最高,达到 3.90%;使用 1/2MS 培养基添加 NAA 1.0 mg/L 和 KT 1.0 mg/L 进行转化细胞筛选与分化的效果最好,再生植株率为 3.72%;对转化抗性再生植株的特异 PCR 检测表明,目的基因已整合到小麦染色体组中。**【结论】**小麦幼胚通过 9 d 的愈伤组织诱导,基因枪轰击金粉用量为 60 μg /枪,使用筛选分化培养基 1/2MS+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L 进行转化细胞的筛选与分化,可获得较高的抗性再生植株率。

[关键词] 小麦幼胚;基因枪;愈伤组织;恢复培养;筛选分化;再生植株

[中图分类号] S512.1⁺10.35;Q68

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)12-0139-06

Study on influencing factors of biolistic bombardment in immature embryos of wheat

CUI Zhi-gang, CHEN Yao-feng, ZHOU Wen-li, YANG Mei,

XU Dong-bei, LI Chun-lian

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was on the effect of several factors on regenerative plants rate, optimize wheat genetic transformation system and improve the efficiency of genetic transformation by gene gun. **【Method】** We analysed the effect of induction time of young embryo callus, dosage of gold dust and culture medium of screening and differentiation on regenerative plants rate by single factor experiment. **【Result】** When induction time of young embryo callus was 9 days, regenerative plants rate achieved 4.24%; when dosage of gold dust per gene gun was 60 μg , regenerative plants rate achieved 3.90%; and culture medium of screening and differentiation was 1/2MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+Bialaphos 2.0 mg/L, regenerative plants rate achieved 3.72%. **【Conclusion】** The best optimum conditions of wheat genetic transformation system; Induction time of young embryo callus is 9 days, dosage of gold dust per gene gun 60 μg , and culture medium of screening and differentiation 1/2MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+Bialaphos 2.0 mg/L+sucralose 30 g/L+Ag 5.0 g/L. PCR analysis preliminarily proved the object gene had been integrated into the wheat genome.

Key words: immature embryos of wheat; gene gun; callus; recovery culture; screening and differentia-

* [收稿日期] 2011-05-20

[基金项目] 国家转基因生物新品种培育项目(2008ZX08002003, 2009ZX08002008B); 陕西省 13115 重大科技专项(2009ZDKG-11); 陕西省科技攻关项目(2011K02-01)

[作者简介] 崔志钢(1985—), 男, 内蒙古通辽人, 硕士, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: katieczhg@163.com

[通信作者] 陈耀锋(1956—), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: chenylf3828@126.com

tion; regeneration plants

小麦转基因研究始于 20 世纪 90 年代初期。自从 Vasil 等^[1]首先应用基因枪法将 *Gus/Bar* 基因导入小麦愈伤组织并获得世界上第 1 株转基因小麦以来,小麦转基因研究有了很大的发展。近年来,众多研究者分别从不同的受体、基因、转化方法等方面对小麦基因枪转化法进行了大量研究^[2-5]。

目前,小麦遗传转化受体多为幼胚愈伤组织,愈伤组织生理状态差、整合外源基因频率低、再生难是影响小麦遗传转化效率的重要因素,进一步研究小麦微弹轰击转化体系中的各种因素,提高小麦遗传转化效率,在小麦分子遗传改良研究和应用上具有重要意义^[6-10]。

GmDREB3 是从大豆中克隆出来的一个与抗逆相关的转录因子基因,该基因的表达产物转录因子通过与 DRE 相互作用,调控下游一系列与植物对干旱、低温和高盐等逆境胁迫有关的抗性基因的表达,从整体上提高植物的抗逆性。

本研究以大面积推广的小麦品种小偃 22 为材料,对基因枪转化小麦体系中的愈伤组织诱导时间、金粉用量、筛选分化培养基等影响因素进行了研究,旨在进一步优化小麦基因枪遗传转化技术,提高小麦遗传转化效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受体材料 供试受体材料为小麦品种小偃 22 的幼胚愈伤组织,小偃 22 种植于西北农林科技大学细胞工程实验室试验田。

1.1.2 载体和引物

GmDREB3 基因的植物表达质粒载体为 *PBI121*,携带筛选标记抗除草剂(*Bar*)基因的质粒载体为 *PAHC20*,均由中国农业科学院马有志研究员提供。试验中该基因的特异引物(扩增产物为 450 bp)为:5' 引物序列 CAGAGGAGCAT-AGCGATTCCAAGTA;3' 引物序列 TCCCGTA-ATCGGATGCGTAACCACT,均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.3 培养基 愈伤组织诱导培养基为:SD₂+2,4-D 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L(pH 5.8);高渗培养基为:MS+山梨醇 0.2 mol/L+甘露醇 0.2 mol/L+Ag 6.0 g/L(pH 5.8);恢复培养基为:SD₂+2,4-D 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag

5.0 g/L(pH 5.8)。

筛选分化培养基有 5 种,分别为:① MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L(pH 5.8);② 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L (pH 5.8);③ MS+NAA 0.1 mg/L+KT 3.0 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L(pH 5.8);④ 1/2MS+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L (pH 5.8);⑤ MS+KT 1.0 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L(pH 5.8)。

生根培养基为:1/2MS+NAA 0.5 mg/L+双丙氨膦 2.0 mg/L+多效唑 4.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L(pH 5.8);壮苗培养基为:1/2MS+双丙氨膦 2.0 mg/L+多效唑 4.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L(pH 5.8)。

以上所有培养基均采用高温高压灭菌;筛选剂双丙氨膦经过滤灭菌,在培养基冷却至 50~60 ℃时加入。

1.2 方法

1.2.1 金粉悬浮液和微弹的制备 (1)金粉悬浮液的制备。称取直径 0.1 μm 的适量金粉于 1.5 mL 的灭菌离心管中,加入 1 mL 体积分数 70%乙醇,涡旋 5 min 后室温静置 15 min,然后室温下 10 000 r/min 离心 30 s,弃上清,重复 3 次,弃上清后使乙醇挥发殆尽。加入适量无菌的 50%甘油重悬金粉微粒,使其质量浓度为 30 μg/μL,于 4 ℃密闭储存备用。

(2)微弹的制备。取 4 ℃保存的 30 μg/μL 金粉,分别按 1,2,4 μL/枪的用量加入;再分别加入 2.5 mol/L CaCl₂ 5 μL、0.1 mol/L 亚精胺 2 μL、1 μg/μL DNA 1 μL;混合后涡旋振荡 5 min,室温静置 10 min,10 000 r/min 离心 30 s,弃上清;用 500 μL 体积分数 70%乙醇洗涤微弹载体及管壁,室温静置 15 min 后,10 000 r/min 离心 30 s,弃上清;加入 1 mL 无水乙醇重悬沉淀,10 000 r/min 离心 30 s,弃上清;按每枪 10 μL 的量加入无水乙醇稀释金粉微弹;于 4 ℃密闭储存备用,使用时吸取 10 μL DNA 微弹悬液,均匀地涂在承载膜上,吹干备用。

1.2.2 小麦幼胚愈伤组织的遗传转化 5 月中旬于田间剪取授粉 14 d 左右的小麦幼穗,剥取幼嫩种

子,于超净工作台上用体积分数 75%乙醇对种子表面消毒 30 s,体积分数 0.1%升汞灭菌 8~10 min,无菌水冲洗 4~5 次。剥取略呈透明状的幼胚,平面向上接种到幼胚愈伤组织诱导培养基(SD₂+2,4-D 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L)上,26 ℃下遮光培养。在直径 9 cm 的培养皿中加入高渗培养基,分别将诱导 3,6,9,12 d 的小麦幼胚愈伤组织按原生长方向紧密摆放于高渗培养基中央直径 3 cm 的范围内,处理 4~6 h。

采用 bia-rod 公司生产的 PDS-1000/He 基因枪轰击小麦幼胚愈伤组织。基因枪轰击参数:轰击压力 7 584.5 kPa,真空度 3.73 kPa,轰击距离(射程)9 cm。每枪金粉用量分别设置为 30,60,120 μg,每枪质粒 DNA 用量为 1.0 μg。采用共转化的方法,将携带 *GmDREB3* 基因的质粒 DNA 和携带筛选标记抗除草剂(*Bar*)基因的质粒 DNA 按质量比 1:1 混合后,进行基因枪轰击。轰击后在原高渗培养基上对幼胚愈伤组织处理 16~18 h,然后转移至恢复培养基上于 24 ℃进行 14 d 的暗恢复培养。

用 5 种不同筛选分化培养基,于 24 ℃、3 000 lx 每天光照 10 h 条件下,筛选分化培养 30 d,记录植株再生情况,按下式计算再生植株率:

再生植株率=(再生植株数/轰击愈伤组织

数)×100%。

待小麦幼胚愈伤组织分化出的再生幼苗生长到 2 cm 左右时,将分化的幼苗转入生根培养基上(24 ℃、3 000 lx 每天光照 10 h)生根;待幼苗伸长到 4~5 cm 时,将其移入壮苗培养基上(24 ℃、3 000 lx 每天光照 10 h)壮苗;待再生苗生长到高 6~8 cm,且根系较好时移入装有营养土的培养钵中(15 ℃、3 000 lx 每天光照 10 h)生长。

1.2.3 转化植株的 PCR 检测 对获得的抗性再生植株,用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA 进行 PCR 检测,以携带目的基因的质粒为阳性对照,以未进行转化的植株 DNA 为阴性对照。扩增条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。经 PCR 扩增后,将扩增产物在 1 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳检测并照相。

2 结果与分析

2.1 幼胚愈伤组织诱导时间对基因枪轰击后再生植株率的影响

表 1 结果表明,在小麦幼胚愈伤组织诱导后 3~9 d,随着愈伤组织诱导时间的增加,基因枪轰击后小麦幼胚愈伤组织再生植株率随之升高,但当诱导时间增加到 12 d 时,再生植株率略有下降。

表 1 幼胚愈伤组织诱导时间对基因枪轰击后再生植株率的影响

Table 1 Effect of induction time of immature embryo callus on regenerative plants rate

诱导时间/d Induction time	轰击愈伤组织数 Immature embryo callus	再生植株数 Regenerative plant	再生植株率/% Regenerative plants rate
3	302	0	0.00
6	305	3	1.00
9	306	13	4.24
12	301	8	2.66

由图 1 可见,诱导 9 d 的小麦幼胚愈伤组织恢复培养后生长状态最佳,为黄豆大小、略呈淡黄色、结构致密(图 1C);愈伤组织生理活性高,再生能力强,较为容易接受和整合外源基因。而其他诱导时间,特别是诱导时间较短的小麦幼胚愈伤组织,经基因枪轰击后再生植株率极低,且愈伤组织多呈黄褐色或青白色(图 1A、B);诱导 12 d 时,愈伤组织呈透明水浸状、质地松软(图 1D),细胞受损严重,难以恢复生长增殖。上述结果表明,在高渗透处理前,小麦幼胚愈伤组织的生长状态和生理状态直接影响着基因枪转化效率的高低,处于幼胚脱分化前期的愈伤组织不宜作为基因枪转化的受体。

2.2 金粉用量对基因枪轰击后再生植株率的影响

由表 2 可见,在其他条件相同的情况下,微弹轰击的金粉用量为 60 μg/枪时,再生植株率较高。金粉用量过大会给受体愈伤组织带来更大或不可逆转的损伤,使愈伤组织很难分化或者失去分化为再生植株的能力,而过低的金粉用量会间接地降低外源 DNA 的用量,从而降低基因枪的转化效率。

2.3 筛选分化培养基对基因枪轰击后再生植株率的影响

由表 3 可见,在微弹轰击转化中,筛选分化培养基类型对基因枪轰击后的再生植株率有显著影响。在其他条件相同的情况下,使用筛选分化培养基(1/2 MS+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+双丙

氨磷 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L) 的分化频率显著高于其他 4 个培养基。MS 基本培养基用途最广,具有普适性,但 MS 基本培养基无机盐浓

度较高。本试验发现,降低一半无机盐浓度的 1/2MS基本培养基的筛选分化效果较好,再生植株率提高了 3.72%。

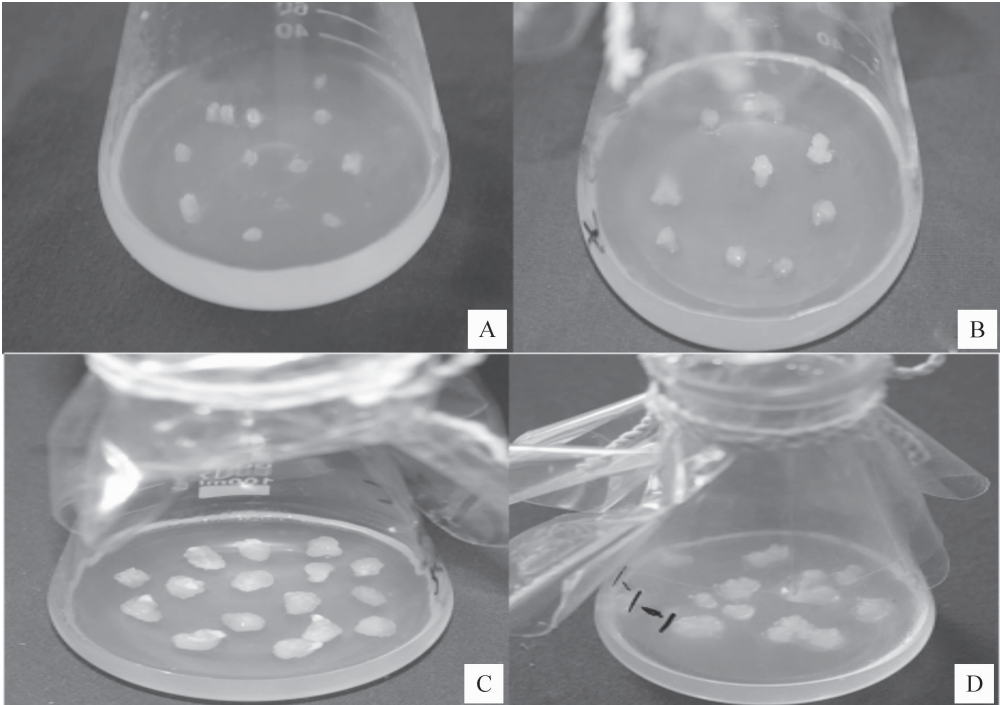


图 1 不同诱导时间的愈伤组织幼胚恢复培养 14 d 后的状态

A. 诱导 3 d; B. 诱导 6 d; C. 诱导 9 d; D. 诱导 12 d

Fig. 1 The immature embryo through different callus induction time and renewal cultivation 14 days

A. 3 days;B. 6 days;C. 9 days;D. 12 days

表 2 金粉用量对基因枪轰击后再生植株率的影响

Table 2 Effect of dosage of gold dust per gene gun on regenerative plants rate

金粉用量/($\mu\text{g}\cdot\text{枪}^{-1}$) Dosage Of gold dust	轰击愈伤组织数 Immature embryo callus	再生植株数 Regenerative plant	再生植株率/% Regenerative plants rate
30	362	6	1.66
60	385	15	3.90
120	351	4	1.14

表 3 筛选分化培养基类型对基因枪轰击后再生植株率的影响

Table 3 Effect of culture medium of screening and differentiation on regenerative plants rate

筛选分化培养基(编号) Culture medium of screening and differentiation(Number)	轰击愈伤组织数 Immature embryo callus	再生植株数 Regenerative plant	再生植株率/% Regenerative plants rate
①	913	8	0.99
②	876	9	1.03
③	896	12	1.34
④	888	33	3.72
⑤	896	20	2.23

2.4 转化植株的 PCR 检测

对经除草剂筛选且移栽成活、长势良好的再生小麦幼苗,进行目的基因的特异 PCR 检测,结果见图 2。图 2 表明,有 3 株再生植株在 450 bp 处有 1

条与质粒 DNA 扩增产物一致的特异性条带,同时对对照植株未能扩增出特异基因片段,初步表明目的基因已经整合到小麦基因组中。

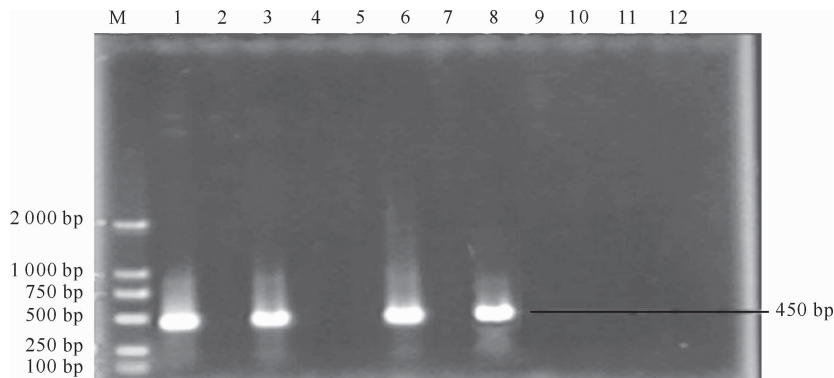


图 2 转化植株目的基因的 PCR 检测

M, DL2000;1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~12. 再生植株

Fig. 2 PCR analysis of *GmDREB3* gene in transgenic plants

M, DL2000;1. Positive control;2. Negative control;3—12. Transgenic plants

3 讨 论

基因枪法介导的植物遗传转化,在禾谷类作物上应用比较广泛^[11]。遗传转化成功的关键包括建立具有高频再生能力的受体系统和较优的转化条件^[12]。影响基因枪法转化小麦幼胚愈伤组织的因素较多,其中愈伤组织诱导时间、金粉用量以及筛选分化培养基成分是影响转化频率的关键因素。本试验表明,小麦幼胚愈伤组织诱导 3~9 d 时,随着愈伤组织诱导时间的增加,金粉微弹轰击后小麦幼胚愈伤组织的再生植株率明显升高,但诱导时间延长到 12 d 时,再生植株率有所下降,可见用于基因枪轰击的最佳诱导时间为 9 d。经过 9 d 诱导的小麦幼胚愈伤组织,经微弹轰击后恢复能力较强;愈伤组织恢复培养后,其大小适宜,略呈淡黄色,结构致密,愈伤组织生理活性高,再生能力强,较为容易接受和整合外源基因。刘伟华等^[13]报道的最佳诱导时间为 5~7 d,本研究与其有一定差异,但该报道中所使用的试验材料与本研究不同,同时其未进行对照试验,最佳诱导时间难以确定。任江萍等^[14]对小麦幼胚愈伤组织轰击转化的研究表明,幼胚最佳诱导时间为 10~15 d,其与本研究结果存在差异的原因,也可能因该报道中所使用的愈伤组织诱导培养基与本研究不同,故导致其诱导时间略长。

魏松红等^[15]认为,金粉用量为 300 μg /枪较为适宜,而瞬时表达率与表达量并不因金粉质量浓度的增加而增加,相反有降低趋势。黄莹等^[16]认为,轰击时的金粉用量应该在细胞所承受的损伤范围之内,并且达到有效轰击为宜。本研究结果表明,微弹轰击时金粉用量为 60 μg /枪时的再生植株率较高。这可能是因为金粉用量越大,金粉颗粒越多,轰击对

细胞造成的损伤程度越大,使受损的细胞不能恢复或恢复速度降低,从而降低了转化率。然而,单位数量金粉微粒包裹的 DNA 量较为有限,过低的金粉用量意味着外源 DNA 的量也很低,从而会导致外源 DNA 整合频率降低。

本研究结果表明,同一诱导时间,使用培养基 1/2MS+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+双丙氨磷 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L 的分化频率最高。这可能是因为 MS 培养基的无机盐浓度较高^[17],高浓度的无机盐对一些基因型培养材料会有一定的抑制作用,有时用 MS 为基本培养基时并不能使培养材料达到最适的生长和发育效果。综上所述,基因枪转化的最优体系是:小麦幼胚通过 9 d 的愈伤组织诱导,基因枪轰击金粉用量为 60 μg /枪,培养基为 1/2MS+KT1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L+双丙氨磷 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+Ag 5.0 g/L。

本研究优化了小麦基因枪转化受体系统,并通过后续筛选程序获得了携带 *GmDREB3* 基因的转基因小麦植株,PCR 检测结果初步证明了目的基因的存在。但外源基因整合到小麦基因组还存在着基因沉默、基因重排、后代分离等现象。因此,还需在转录、翻译等水平进行进一步的验证,以确定外源基因的稳定表达。

[参考文献]

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryo-genic callus [J]. Biotechnology, 1992, 10(7): 667-674.
- [2] 董福双, 张艳敏, 杨帆, 等. 小麦芽生长点的基因枪转化技术研究 [J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 1-6.
Dong F S, Zhang Y M, Yang F, et al. Research on shoot apical

- point transformation of wheat germinated seeds by particle bombardment [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2009, 24(5): 1-6. (in Chinese)
- [3] 张晓东, 李冬梅, 徐文英, 等. 用基因枪将除草剂 *Basta* 抗性基因与小麦 HMW 谷蛋白亚基基因导入小麦获得转基因植株 [J]. *华北农学报*, 1995, 10(12): 133-136.
- Zhang X D, Li D M, Xu W Y, et al. Development of transgenic wheat by biolistic bombardment transferring *Basta* resistance gene and novel HMW glutenin subunit genes [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1995, 10(12): 133-136. (in Chinese)
- [4] 陈梁鸿, 王新望, 张晓东, 等. 基因枪转化小麦不同受体的研究 [J]. *华北农学报*, 1998, 13(1): 1-5.
- Chen L H, Wang X W, Zhang X D, et al. Transformation of different acceptors in wheat following particle bombardment [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1998, 13(1): 1-5. (in Chinese)
- [5] 周森平, 余桂红, 孙晓波, 等. 基因枪共转化将拟南芥 *DREB2A* 基因和 *bar* 基因导入小麦 [J]. *江苏农业学报*, 2009, 25(6): 1224-1228.
- Zhou M P, Yu G H, Sun X B, et al. Co-transferring of *At-DREB2A* gene and *bar* gene into wheat through microprojectile bombardment [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 25(6): 1224-1228. (in Chinese)
- [6] 夏晓晖, 陈耀锋, 李春莲, 等. 小麦幼胚基因枪转化的影响因素研究 [J]. *麦类作物学报*, 2006, 26(2): 42-45.
- Xia X H, Chen Y F, Li C L, et al. Effect of factors on GUS transient expression of wheat immature embryo transformed by particle bombardment [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2006, 26(2): 42-45. (in Chinese)
- [7] 曹团武, 朱建楚, 亢福仁, 等. 基因枪转化小麦愈伤组织的影响因素研究 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(7): 66-72.
- Cao T W, Zhu J C, Kang F R, et al. Factors of gene transformation affecting wheat callus [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2005, 33(7): 66-72. (in Chinese)
- [8] 任江萍, 王新国, 尹 钧, 等. 受体生长状态对小麦基因枪转化效率的影响 [J]. *山西农业科学*, 2003, 31(3): 3-6.
- Reng J P, Wang X G, Yin J, et al. Effect of the growth appearance of acceptors on the frequency of wheat transformation by microprojectile bombardment [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2003, 31(3): 3-6. (in Chinese)
- [9] 孙红正, 陈新建, 吕德彬, 等. 基因枪轰击中几个重要参数对小麦基因转化的影响 [J]. *河南农业大学学报*, 2004, 38(2): 123-126.
- Sun H Z, Chen X J, Lü D B, et al. Influence of several key parameters on gene transformation of wheat by particle bombardment [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2004, 38(2): 123-126. (in Chinese)
- [10] 任江萍, 王新国, 尹 钧, 等. 利用基因枪法进行小麦遗传转化影响因素研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2004, 27(3): 1-6.
- Reng J P, Wang X G, Yi J, et al. Study on factors affecting microprojectile bombardment-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2004, 27(4): 1-6. (in Chinese)
- [11] 梁 辉, 赵铁汉, 李良材, 等. 影响基因枪法转化小麦幼胚的几个因素的研究 [J]. *遗传学报*, 1998, 25(5): 443-448.
- Liang H, Zhao T H, Li L C, et al. Studies on some factors affecting transformation of wheat immature embryos by biolistic bombardment [J]. *Acta Gen Sin*, 1998, 25(5): 443-448. (in Chinese)
- [12] 丁莉萍, 高 莹, 李圣纯, 等. 基因枪介导小麦成熟胚遗传转化的影响因素 [J]. *武汉植物学研究*, 2007, 25(3): 217-221.
- Ding L P, Gao Y, Li S C, et al. Study on influencing factors of mature embryos of wheat by particle bombardment [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2007, 25(3): 217-221. (in Chinese)
- [13] 刘伟华, 李文雄, 胡尚连, 等. 小麦组织培养和基因枪轰击影响因素探讨 [J]. *西北植物学报*, 2002, 22(3): 602-610.
- Liu W H, Li W X, Hu S L, et al. Study on influencing factors of tissue culture and biolistic bombardment in wheat [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(3): 602-610. (in Chinese)
- [14] 任江萍, 李 磊, 王新国, 等. 基因枪介导小麦基因转化体系的建立 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2004, 25(3): 38-40.
- Ren J P, Li L, Wang X G, et al. Establishment of a microprojectile bombardment-mediated transformation system for wheat cultivar Yumai 18 [J]. *Journal of Yangzhou University: Agriculture and Life Sciences Edition*, 2004, 25(3): 38-40. (in Chinese)
- [15] 魏松红, 张领兵, 张艳贞, 等. 小麦基因枪高效转化体系的建立 [J]. *吉林农业科学*, 2001, 26(3): 7-11.
- Wei S H, Zhang L B, Zhang Y Z, et al. Establishment of an efficient bombardment transformation system in wheat [J]. *Jilin Agricultural Sciences*, 2001, 26(3): 7-11. (in Chinese)
- [16] 黄 莹, 徐子勤, 郝建国, 等. 基因枪介导小麦遗传转化的几个重要影响因素的研究 [J]. *武汉植物学研究*, 2004, 22(2): 111-115.
- Huang X, Xu Z Q, Hao J G, et al. Factors affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation mediated by biolistic bombardment [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2004, 22(2): 111-115. (in Chinese)
- [17] 陈耀锋, 何凤发, 张志胜, 等. 植物组织与细胞培养 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 48-49.
- Chen Y F, He F F, Zhang Z S, et al. The plant tissue and cell culture [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2007: 48-49. (in Chinese)