

网络出版时间:2013-12-25 11:04

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.028

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.028.html

基因枪法介导的转 *KN2* 基因小麦的获得及鉴定

周 鹏^{1,2}, 池 青^{1,2}, 吕金洋^{1,2}, 刘香利^{1,2}, 赵惠贤^{1,2}

(1 旱区作物逆境分子生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**获得转 *KN2* 基因的小麦植株, 为研究 *KN2* 基因对提高转基因小麦抗寒性的作用, 以及为利用基因工程提高小麦抗逆性奠定基础。**【方法】**以弱冬性小麦品种小偃 22 为供试材料, 通过基因枪法, 用含有 *KN2* 基因的植物表达载体和筛选标记基因 *bar* 共转化小麦幼胚愈伤组织, 经过除草剂(Phosphinothricin, 草丁膦)筛选和愈伤组织分化获得再生植株, 并对得到的再生小麦植株进行 PCR 检测。**【结果】**采用基因枪法共轰击小偃 22 的幼胚愈伤组织 1 680 个, 共获得再生植株 17 株, 移栽到花盆中成活 15 株; 根据目标基因序列设计特异引物, 对成活的小麦植株进行 PCR 检测, 结果表明获得含有 *bar* 基因和 *KN2* 基因的转基因阳性植株分别为 6 株和 4 株, 转化率分别为 0.36% 和 0.24%, *bar* 和 *KN2* 的共转化率为 0.24%。**【结论】***KN2* 基因成功地转入到小麦品种小偃 22 中。

[关键词] 小麦; 基因枪法; 共转化法; *KN2* 基因

[中图分类号] S512.103.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)01-0083-06

Acquisition and identification of transgenic wheat with *KN2* gene by biolistics

ZHOU Peng^{1,2}, CHI Qing^{1,2}, LÜ Jin-yang^{1,2}, LIU Xiang-li^{1,2}, ZHAO Hui-xian^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to obtain transgenic wheat with *KN2* gene, which would improve future investigation for effect of *KN2* on wheat cold resistance. **【Method】**Using the wheat variety Xiaoyan 22 as the acceptor, *KN2* gene and *bar* gene were co-transformed into immature callus by biolistics. After herbicide screening and callus differentiation, the regenerated plants were tested using PCR. **【Result】**1 680 callus of Xiaoyan 22 were bombarded by biolistic particle and 17 regenerated plants were obtained. After being transplanted to flower pots, 15 plants survived. The regenerated plants were tested by PCR with primers based on target gene sequence, and 6 transgenic plants with *bar* gene and 4 transgenic plants with *KN2* gene were identified in the T_0 generation. The transformation frequencies of *bar* gene and *KN2* gene were 0.36% and 0.24%, respectively. The co-transformation frequency was 0.24%. **【Conclusion】**The *KN2* gene was successfully integrated into Xiaoyan 22.

Key words: wheat; biolistic particle; co-transformation; *KN2* gene

近些年来, 由于温室效应的影响, 全球的气候逐渐变暖, 人们忽略了冻害对农作物的影响, 但是全球

[收稿日期] 2013-02-22

[基金项目] 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08002-004)

[作者简介] 周 鹏(1987—), 男, 河南延津人, 在读硕士, 主要从事作物遗传改良的分子基础研究。

E-mail: zhouzhipeng_cool@163.com

[通信作者] 赵惠贤(1965—), 女, 陕西临潼人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物重要性状相关基因及其功能研究。

E-mail: hxzhao212@nwsuaf.edu.cn

变暖并不意味着不会发生农作物的低温冻害,全球变暖同时伴随着的是极端气候和天气事件发生概率的增加,2008 年的冬季发生在我国大面积的冻害就直接造成国家种植业经济损失 670 亿元^[1]。随着弱冬性小麦种植面积不断扩大,冻害已经成为制约弱冬性小麦种植面积扩大和产量增加的主要自然灾害之一。目前常规的防止小麦低温冻害的措施主要有:选择优良的耐寒品种、控制播种时期和数量、肥水调控、幼苗抗寒锻炼以及采用化学调控技术等^[2]。其中,选择优良的耐寒品种是提高弱冬性小麦生产的最经济有效的途径。然而,利用常规育种方法培育耐寒小麦品种不仅周期长,而且很难使小麦抗寒能力有很大提高。随着功能基因研究的飞速发展,使得利用基因工程技术直接将目标性状基因转入受体小麦进行品种定向改良得以实现,并且将逐渐成为常规育种的一种有效补充途径。目前,对小麦进行定向改良的转基因技术主要包括基因枪法、农杆菌介导法和花粉管通道法。利用这些技术已经成功获得抗病^[3-5]、抗虫^[6-7]、抗逆^[8]、品质改良^[9-10]、产量提高^[11-12]等小麦转基因植株,其中应用较多的是抗病和品质改良。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等与植物的抗冻性密切相关,其中在小麦体内起主要作用的是 SOD 和 APX^[13-14]。目前,通过转基因育种的方法已经成功将一些具有抗冻功能基因转入到植物体内,并且使植物的抗冻性有一定程度提高。Georges 等^[15]将人工合成的黄盖鳉鱼抗冻蛋白基因成功导入到玉米的原生质体内,并且在植物的细胞中获得了表达。Fan 等^[16]将从胡萝卜幼苗中克隆到的一个抗冻蛋白基因(*AFP*)转入到烟草中,发现在 0℃的条件下,转基因烟草受到的冻害明显小于非转基因烟草。Parvanova 等^[17]将拟南芥中脯氨酸合成相关的吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)基因成功转入到烟草中,经过-2℃低温处理 24 h 后,转基因植株存活而对照植株死亡。Mckersie 等^[18]从烟草中克隆了编码 SOD 的 cDNA,并将其转入苜蓿体内,使转基因植株的抗冻性有明显提高。郭北海等^[19]从榆钱菠菜中克隆出编码甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)的 cDNA,并将其转入小麦品种石 90-4185 中;Zhang 等^[20]对上述郭北海等获得的转基因小麦植株进行抗冻性检测,发现转基因植株体的抗冻性明显高于对照植株。*KN2* 基因是从南极鱼中克隆的一个编码超氧化物歧化酶的基因,该基因可能具

有增强生物体抗冻性的功能,但有关 *KN2* 基因提高作物抗寒性的研究尚未见报道。

小偃 22 是西北农林科技大学李璋研究员以小偃 6 号×775-1 的杂种 F₁ 代作母本,小偃 107 作父本,经过复核杂交、系统选育而成的弱冬性小麦品种,该品种具有高产、稳产、优质、抗病等优点,适宜于陕西关中新老灌区水肥条件较好的地块及塬区旱肥地种植,也适宜在黄淮麦区同类生态条件的地区种植。小偃 22 的耐寒能力相对较弱,这成为其北移扩大种植面积的限制条件。本研究采用基因枪介导的共转化法,将 *KN2* 基因和筛选标记基因 *bar* 共转化到弱冬性小麦品种小偃 22 中,通过除草剂筛选,获得含有目的基因 *KN2* 的转基因小麦植株,为进一步研究 *KN2* 基因对提高转基因小麦抗寒性的作用,以及利用基因技术提高小麦抗逆性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和载体质粒

选用黄淮麦区大面积推广的弱冬性小麦品种小偃 22 为供试材料。供试材料于 2011~2012 年度种植在西北农林科技大学小麦试验田,田间正常管理。

共转化所用载体质粒分别为含有目标基因 *KN2* 的载体质粒 *pUBI::KN2* 和含有筛选标记基因 *bar* 的载体质粒 *pUBI::bar*,结构见图 1,均由中国科学院遗传与发育研究所王道文研究员提供。

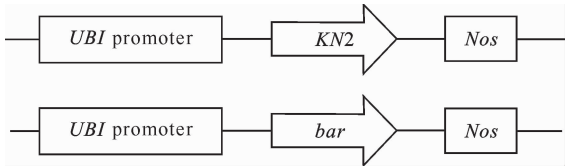


图 1 载体质粒 *pUBI::KN2* 和 *pUBI::bar* 的结构

UBI promoter. 玉米泛素基因启动子;*KN2*. 南极鱼的超氧化物歧化酶基因;*bar*. 筛选标记基因,通过编码膦丝菌素乙酰转移酶来降低膦丝菌素的毒性;*Nos*. 终止子

Fig. 1 Structure of plant expression vector *pUBI::KN2* and *pUBI::bar*

UBI promoter. Maize ubiquitin gene promoter;
KN2. The superoxide dismutase gene of Antarctic fish;
bar. Selective marker gene which encodes phosphinothricin acetyltransferase to reduce the toxicity of phosphinothricin;
Nos. Terminator

1.2 小麦的遗传转化和转基因植株的获得

采收小偃 22 授粉后 10 d 的未成熟种子,用 0.1% 升汞消毒后剥取幼胚,将其盾片朝上接种于 MS 诱导培养基(MS+500 mg/L 酸水解酪蛋白+

2.0 mg/L 2,4-D), 25 ℃暗培养 7 d 后, 将愈伤组织转入高渗培养基 (MS + 0.4 mol/L 甘露醇 + 500 mg/L 酸水解酪蛋白 + 2.0 mg/L 2,4-D) 上高渗培养 6 h, 然后采用 Bio-Rad 公司生产的 PDS-1000/He 型基因枪进行轰击 (金粉浓度为 120 μg/枪, 2 种质粒浓度比为 1 : 1, 均为 1.0 μg/枪, 轰击压力为 7.584 MPa, 真空度为 27~28 Pa, 轰击距离为 9 cm), 轰击后的愈伤组织于高渗培养基上继续培养 16 h, 再转移到 MS 诱导培养基上恢复培养 7 d, 恢复培养后的愈伤组织转移至分化筛选培养基 (MS + 1.5 mg/L KT + 0.05 mg/L NAA + 4.0 mg/L PPT) 上, 25 ℃光照条件下培养, 每 2 周更换 1 次培养基, 将分化出的小苗转移至生根培养基 (1/2MS + 0.2 mg/L NAA), 待苗高为 4~5 cm 时移至春化间春化 40 d, 苗高为 7~8 cm 时将根系发达的分化苗移栽到培养钵 (直径 30 cm, 高度 50 cm) 中, 于温室生长。

1.3 转基因小麦植株的 PCR 检测

取转基因小麦植株幼嫩叶片, 采用 CTAB 法^[21]提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增。根据目的基因序列, 采用 Primer5.0 软件设计引物, *KN2* 基因的上游引物为: 5'-AGCCCCTGTGACGCTGAC-3', 下游引物为: 5'-GCGATGCCGATGACTCCA-3', 扩增片段大小为 396 bp。 *bar* 基因的上游引物为: 5'-

TGCACCATCGTCAACCACTACAT-3', 下游引物为: 5'-GCTGCCAGAAACCCACGTCAT-3', 扩增片段大小为 433 bp。 PCR 扩增体系总体积为 20 μL: 10 × PCR buffer 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 上、下游引物 (稀释成 10 μmol/L) 各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 U (TianGen 公司), 模板 DNA 约 200 ng, 补 ddH₂O 至 20 μL。 *KN2* 扩增程序为: 95 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 30 s, 65 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 45 s, 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min。 *bar* 扩增程序为: 94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 1 min, 56 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 50 s, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min。 以小偃 22 非转基因植株作为阴性对照, 以 ddH₂O 作为空白对照, 将扩增产物用 1.5 % 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 转 *KN2* 基因小麦植株的获得

以小偃 22 为转化受体, 共接种 2 000 个幼胚诱导产生愈伤组织, 7 d 后产生的愈伤组织数为 1 943 个, 愈伤诱导率为 97.15 %; 转移至高渗培养基上的愈伤组织数为 1 680 个; 基因枪轰击后的愈伤组织经过恢复培养和筛选分化, 共获得再生植株 17 株, 移栽到培养钵中后成活 15 株, 成活率为 88.2 % (图 2)。

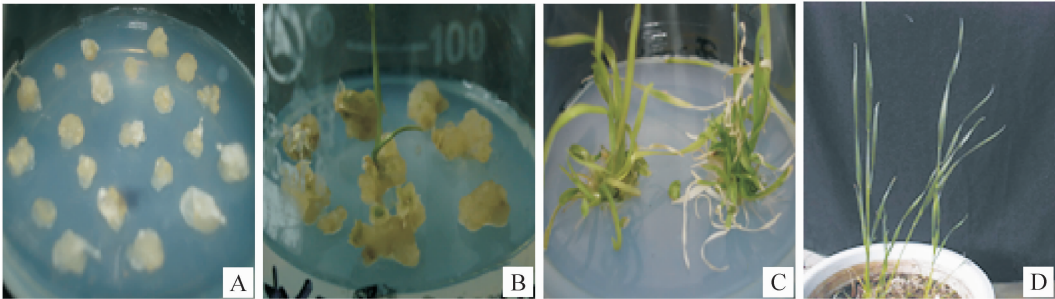


图 2 小偃 22 转 *KN2* 基因的再生植株

A. 诱导的幼胚愈伤组织; B. 分化的胚性愈伤组织; C. 转化植株的再生苗; D. 移栽至培养钵的转化苗

Fig. 2 Transgenic plants of Xiaoyan 22 with *KN2* gene

A. Callus induced from immature embryo; B. Callus differentiation from immature embryo;
C. Regenerated transgenic plants; D. Transgenic plants grown in greenhouse

2.2 转 *KN2* 基因小麦植株的 PCR 鉴定

将再生植株幼苗移栽到培养钵在温室培养, 取转基因小麦植株幼嫩叶片提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。经过多次 PCR 检测, 非转基因植株 (阴性对照) 和 ddH₂O (空白对照) 均没有扩增产物, 15 株再生植株中仅有 6 株 (7 号、10~14 号再生植株) 扩增到与阳性质粒 *pUBI*::*bar* 大小一致的 433 bp 的目标片段 (图 3-A), 表明获得了 6 株转 *bar* 基因

的阳性植株, *bar* 基因转化率为 0.36 % (6/1 680); 15 株再生植株中仅有 4 株 (7 号、11~13 号再生植株) 扩增到与阳性质粒 *pUBI*::*KN2* 大小一致的 396 bp 的目标片段基因 (图 3-B), 表明获得了 4 株转 *KN2* 的阳性植株, *KN2* 的转化率为 0.24 % (4/1 680); 7 号、11~13 号再生植株同时转入了 *bar* 和 *KN2*, 共转化率为 0.24 %。

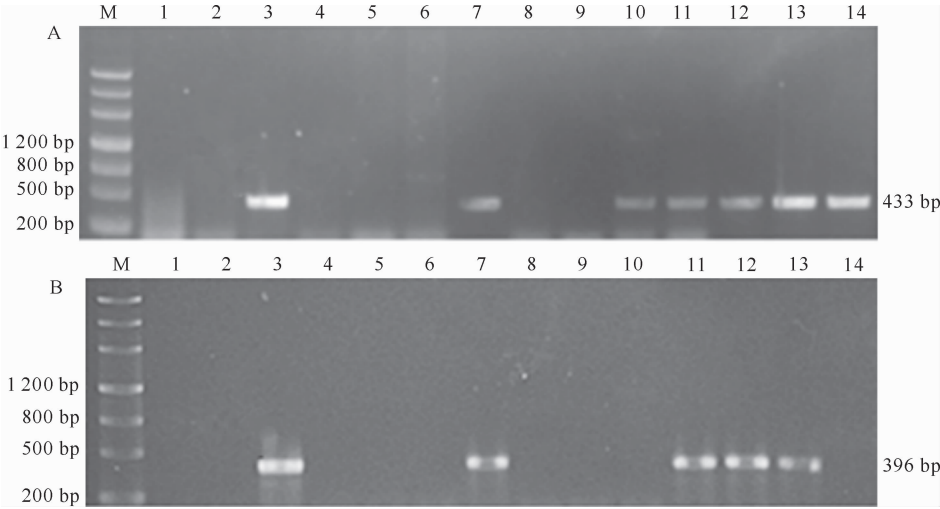


图 3 小偃 22 共转化植株 *bar* 特异 PCR(A)和 *KN2* 特异 PCR(B)检测结果

M. MarkerⅢ;1. ddH₂O;2. 非转基因植株;3. 目标基因质粒;4~14. 再生植株

Fig. 3 PCR results of regenerated Xiaoyan 22 plants with *bar* (A) and *KN2* (B)

M. MarkerⅢ;1. ddH₂O;2. Wild plants;3 Plasmid;4-14. Regenerated plants

3 讨 论

在转基因研究中广泛使用除草剂或者抗生素基因作为筛选标记基因,可以从大量的非转化细胞中筛选出相对较少的转化细胞,进而减轻后续试验的工作量^[22]。但是以此为筛选标记基因获得转基因植株后筛选标记基因的存在就是多余的,甚至是有 害的,并且对筛选标记基因进行安全评估要耗费大量的人力和财力,而且结果还不易被广大消费者接受^[23]。基因枪介导的共转化法由于操作简单,并且通过后代的自交分离能够去除筛选标记基因,因此,该方法成为最常用的获得无筛选标记的转基因植物的方法。应用该方法已经成功获得了水稻^[24]、玉米^[25]和苜蓿^[26]等作物的无筛选标记基因的植株。刘永伟等^[27]采用基因枪共转化的方法成功将病毒复制酶基因 *Nib8* 和 *ERF* 转录因子 *W17* 导入扬麦 12 和扬麦 16 中,扬麦 12 为受体的转化率分别为 1.53%(*Nib8*)、4.87%(*W17*)和 0.42%(*Nib8* + *W17*),扬麦 16 为受体的转化率分别为 2.05%(*Nib8*)、0.86%(*W17*)和 0.20%(*Nib8* + *W17*)。周森平等^[22]同样采用基因枪共转化的方法,将拟南芥 *DREB2A* 基因和 *bar* 基因导入到小麦品种 Alondra 和扬麦 12 中,Alondra 为受体的转化率分别为 2.4%(*bar*)、0.2%(*AtDREB2A*)和 0.1%(*bar* + *AtDREB2A*),扬麦 12 为受体的转化率分别为 2.4%(*bar*)、0.6%(*AtDREB2A*)和 0.2%(*bar* + *AtDREB2A*)。本研究利用基因枪介导的共转化

法,将筛选标记基因 *bar* 与目的基因 *KN2* 转入小麦品种小偃 22 中,旨在获得含有目的基因的转基因植株,通过后代自交分离得到只含有目的基因的转基因植株,*bar* 的转化率为 0.36%,*KN2* 的转化率为 0.24%,*bar* 和 *KN2* 的共转化率为 0.24%。这些转基因小麦研究报道的遗传转化率均不相同,其主要原因之一可能是受体品种不同所致。

冻害是弱冬性小麦种植面积扩大的最大限制因素。超氧化物歧化酶(SOD)能够清除细胞内的活性氧,防止活性氧积累对膜造成的破坏,进而保护细胞的膜系统。本研究采用基因枪法,将南极鱼体内编码超氧化物歧化酶的基因 *KN2* 和筛选标记基因 *bar* 共转化到小麦品种小偃 22 中,通过多次 PCR 检测筛选获得了 4 株同时含有 *KN2* 和 *bar* 基因的转基因小麦;这些转基因小麦的目标基因是否能稳定遗传,以及转基因植株的抗寒性是否比非转基因植株有所提高,还有待对这 4 株转基因植株进行后代追踪检测,进一步通过转 *KN2* 和 *bar* 基因植株后代自交分离剔除 *bar* 基因,最终筛选获得含有 *KN2* 基因的安全转基因小麦植株,进一步研究转 *KN2* 基因的小偃 22 的抗寒性变化。

志谢:感谢中国科学院遗传与发育研究所王道文研究员为本研究提供了载体质粒!

[参考文献]

[1] 郑大伟,李茂松,霍治国. 2008 年南方低温冰雪灾害对农业的影响及对策 [J]. 防灾科技学院学报,2008,10(2):1-4.

- Zheng D W, Li M S, Huo Z G. Effects of 2008 snow disaster in southern China on agriculture and countermeasures [J]. Journal of Institute of Disaster-Prevention Science and Technology, 2008, 10(2): 1-4. (in Chinese)
- [2] 郭传贵. 小麦冻害及防护措施 [J]. 安徽农学通报, 1998, 4(4): 58-59.
- Guo C G. Freeze injury and defensive measures of wheat [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 1998, 4(4): 58-59. (in Chinese)
- [3] 叶兴国, 程红梅, 徐惠君, 等. 转几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶双价基因小麦的获得和鉴定 [J]. 作物学报, 2005, 31(5): 583-586.
- Ye X G, Cheng H M, Xu H J, et al. Development of transgenic wheat plants with chitinase and β -1, 3 glucosylase genes and their resistance to fusarium head blight [J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(5): 583-586. (in Chinese)
- [4] 周森平, 周小青, 张增艳, 等. *TaPIMP1* 过量表达提高转基因小麦纹枯病抗性的研究 [J]. 核农学报, 2011, 25(3): 421-426.
- Zhou M P, Zhou X Q, Zhang Z Y, et al. Over-expression of *TaPIMP1* enhanced resistance to wheat sharp eyespot in transgenic wheat [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2011, 25(3): 421-426. (in Chinese)
- [5] 党 良, 王爱云, 徐惠君, 等. 抗根腐病的转 *GmPGIP3* 基因小麦扬麦 18 的获得与鉴定 [J]. 作物学报, 2012, 38(10): 1833-1838.
- Dang L, Wang A Y, Xu H J, et al. Development and characterization of *GmPGIP3* transgenic Yangmai 18 with enhanced resistance to wheat common root rot [J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(10): 1833-1838. (in Chinese)
- [6] 毕瑞明, 贾海燕, 封德顺, 等. 农杆菌介导抗储粮害虫转基因小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的获得和分析 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(3): 431-437.
- Bi R M, Jia H Y, Feng D S, et al. Transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) with increased resistance to the storage pest obtained by agrobacterium tumefaciens mediated [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(3): 431-437. (in Chinese)
- [7] 张 彦, 喻修道, 唐克轩, 等. 用基因枪法获得转异天南星基因 *aha* 抗蚜虫小麦 [J]. 作物学报, 2012, 38(8): 1538-1543.
- Zhang Y, Yu X D, Tang K X, et al. Generation of aphid resistant transgenic wheat with *aha* from *Arisaema heterophyllum* by particle bombardment [J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(8): 1538-1543. (in Chinese)
- [8] 陈红敏, 陈 明, 魏安智, 等. 抗逆相关基因 *GmAREB* 转基因小麦的获得和鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 749-754.
- Chen H M, Chen M, Wei A Z, et al. Molecular and functional analysis of transgenic wheat transformed with stress-related gene *GmAREB* [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(6): 749-754. (in Chinese)
- [9] 喻修道, 徐兆师, 陈 明, 等. 小麦转基因技术研究及其应用 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(8): 1539-1553.
- Yu X D, Xu Z S, Chen M, et al. The progress and application of wheat transformation technology [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(8): 1539-1553. (in Chinese)
- [10] 刘香利, 金伟波, 刘 缙, 等. 高分子量麦谷蛋白亚基基因 *1Bx14* 转化小麦 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(21): 4350-4357.
- Liu X L, Jin W B, Liu J, et al. Transformation of wheat with high molecular weight glutenin subunit gene *1Bx14* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(21): 4350-4357. (in Chinese)
- [11] 王海凤, 韩 冉, 张东武, 等. 基因枪法介导转 *Zma1I* 基因小麦植株的获得和鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(8): 90-94.
- Wang H F, Han R, Zhang D W, et al. Acquisition and identification of wheat with *Zma1I* gene by biolistic particle and molecular identification [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2011, 39(8): 90-94. (in Chinese)
- [12] Hu L, Li Y, Xu W G, et al. Improvement of the photosynthetic characteristics of transgenic wheat plants by transformation with the maize C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene [J]. Plant Breeding, 2012, 131(3): 385-391.
- [13] 康国章, 岳彩凤, 沈丙权, 等. 冻害胁迫下小麦叶片内一些抗冻基因转录水平研究 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(2): 55-59.
- Kang G Z, Yue C F, Shen B Q, et al. Transcript levels of some freezing-tolerant genes in wheat leaves under field freezing stress conditions [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(2): 55-59. (in Chinese)
- [14] 刘艳阳, 李俊周, 陈 磊, 等. 低温胁迫对小麦叶片细胞膜脂过氧化产物及相关酶活性的影响 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(4): 70-73.
- Liu Y Y, Li J Z, Chen L, et al. Effect of low temperature stress on peroxidation product of membrane lipids and activity of related enzymes in wheat seedling leaves [J]. Journal of Triticeae Crops, 2006, 26(4): 70-73. (in Chinese)
- [15] Georges F, Saleem M, Cutler A J. Design and cloning of a synthesis gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells [J]. Gene, 1990, 91(2): 159-165.
- [16] Fan Y, Liu B, Wang H, et al. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants [J]. Plant Cell Rep, 2002, 21: 296-301.
- [17] Parvanova D, Popova A, Zaharieva I, et al. Low temperature tolerance of tobacco plants transformed to accumulate proline, fructans, or glycine betaine: Variable chlorophyll fluorescence evidence [J]. Photosynthetica, 2004, 42(2): 179-185.
- [18] Mckersie B D, Chen Y R, Beus M D, et al. Superoxide dismutase enhance tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Physiol, 1993, 103: 1155-1163.
- [19] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达 [J]. 植物学报, 2000, 42(3): 279-283.
- Guo B H, Zhang Y M, Li H J, et al. Transformation of wheat with a gene encoding for the betain aldehyde dehydrogenase (BADH) [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(3): 279-283. (in

Chinese)

[20] Zhang X Y,Liang C,Wang G P,et al. The protection of wheat plasma membrance under cold stress by glycine betain over-production [J]. *Biologia Plant Rum*,2010,54(1):83-88.

[21] 王 敏,那冬晨,姬虎太,等. 快速小量提取小麦叶片 DNA 的一种简易方法 [J]. *安徽农业科学*,2009,37(35):17384-17385.

Wang M,Na D C,ji H T,et al. A simple and quick method of extracting genomic DNA from wheat leaf [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*,2009,37(35):17384-17385. (in Chinese)

[22] 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 J of Agr Sci*,2009,25(6):1224-1228. (in Chinese)

[23] 李晓兵,陈彩艳,翟文学. 培育具有安全选择标记或无选择标记的转基因植物 [J]. *遗传*,2003,25(3):345-349.

Li X B,Chen C Y,Zhai W X. Breeding transgenic plants with safe or no selective markers [J]. *Hereditas*,2003,25(3):345-349. (in Chinese)

[24] 于恒秀,陆美芳,陈秀花,等. 不同转化方法培育无抗性选择标记转基因水稻效率的比较 [J]. *中国水稻科学*,2009,23(2):120-126.

Yu H X,Lu M F,Chen X H,et al. Comparison on efficiency of generating selectable marker-free transgenic rice by different transformation methods [J]. *Chinese Journal of Rice Science*,2009,23(2):120-126. (in Chinese)

[25] Shiva P N,Bhojaraja R,Shivbachan S K,et al. Marker-free transgenic corn plant production through co-bombardment [J]. *Plant Cell*,2009,28:1655-1668.

[26] Ferradini N,Nicolia A,Capomaccio S,et al. Assessment of simple marker-free genetic transformation techniques in alfalfa [J]. *Plant Cell*,2011,30(11):1991-2000.

[27] 刘永伟,徐兆师,杜丽璞,等. 病毒复制酶基因 *Nib8* 和 *ERF* 转录因子 *W17* 基因枪法共转化小麦 [J]. *作物学报*,2007,33(9):1548-1552.

Liu Y W,Xu Z S,Du L P,et al. Co-transferring of virus replicase gene *Nib8* and *ERF* gene *W17* into wheat through micro-projectile bombardment [J]. *Acta Agronomica Sinica*,2007,33(9):1548-1552. (in Chinese)

(上接第 82 页)

[16] 宋 雯,陈志军,朱智伟,等. 南方 6 省稻米总汞含量调查及其膳食暴露评估 [J]. *农业环境科学学报*,2011,30(5):817-823.

Song W,Chen Z J,Zhu Z W,et al. Survey and dietary exposure assessment of total mercury in milled rice farmed in 6 provinces of southern China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*,2011,30(5):817-823. (in Chinese)

[17] Kimanya M E,Meulenaer B D,Baert K,et al. Exposure of infants to fumonisins in maize-based complementary foods in rural Tanzania [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*,2009,53(5):667-674.

[18] 王李伟,刘 弘. 食品中化学污染物的风险评估及应用 [J]. *上海预防医学*,2008,20(1):26-28.

Wang L W,Liu H. Risk assessment and its application for chemical contaminants in food [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*,2008,20(1):26-28. (in Chinese)

[19] WHO/FAO. Food safety risk analysis: A guide for national food safety authorities [J]. *Food and Nutrition Paper*,2006,87:1-102.

[20] Spadaro D,Garibaldi A,Gullino M L. Occurrence of patulin and its dietary intake through pear,peach,and apricot juices in Italy [J]. *Food Additives and Contaminants: Part B*,2008,1(2):134-139.

[21] Sun G,Wang S,Hu X,et al. Co-contamination of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in food and human dietary exposure in three areas of China [J]. *Food Additives and Contaminants: Part A*,2011,28(4):461-470.

[22] 徐华珠,孙桂菊,王少康,等. 市售花生、玉米中黄曲霉毒素与伏马菌素污染水平调查 [J]. *环境与职业医学*,2006,23(3):217-219.

Xu H Z,Sun G J,Wang S K,et al. Determination of aflatoxins and fumonisins in the corn and peanut on sale [J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*,2006,23(3):217-219. (in Chinese)

[23] 孙桂菊,王少康,王加生,等. 伏马菌素 B₁ 和黄曲霉毒素 B₁ 对大鼠的联合毒性 [J]. *毒理学杂志*,2005,19(3):186.

Sun G J,Wang S K,Wang J S,et al. The combined toxicity of two kinds of mycotoxin in Sprague-Dawley rats [J]. *Journal of Health Toxicology*,2005,19(3):186. (in Chinese)

[24] 罗 祎,陈冬东,唐英章,等. 论食品安全暴露评估模拟模型 [J]. *食品科技*,2007,32(2):21-24.

Luo Y,Chen D D,Tang Y Z,et al. Methodology of food safety exposure assessment simulation model [J]. *Food Science and Technology*,2007,32(2):21-24. (in Chinese)