

网络出版时间:2015-01-05 08:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.02.008

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.008.html

基因枪介导的转 *PYL5* 基因小麦的获得与鉴定

池 青^a, 周 鹏^b, 刘香利^{a,b}, 程绘绘^a, 赵惠贤^{a,b}

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】通过基因枪介导共转化, 获得转拟南芥抗旱基因 *PYL5* 的小麦植株, 为转基因小麦的抗旱功能研究奠定基础。【方法】以小麦品种西农 889、绵阳 19 和宁春 16 为供试材料, 通过基因枪介导法将诱导型启动子 *Rd29A* 启动的 *PYL5* 基因和筛选标记基因 *Bar* 共转化到小麦幼胚愈伤组织中, 经过除草剂 PPT(Phosphinothricin)筛选和愈伤组织分化, 获得再生植株。根据目标基因 *PYL5* 和 *Bar* 基因序列分别设计特异引物, 对移栽成活的小麦 T_0 代再生植株进行基因特异性 PCR 检测。【结果】采用基因枪分别轰击西农 889 的 1800 个、绵阳 19 的 800 个和宁春 16 的 800 个幼胚愈伤组织, 经过筛选和分化分别获得了 9、5 和 14 株小麦再生植株; 对转基因小麦 T_0 代再生植株的基因特异性 PCR 检测结果表明, 西农 889、绵阳 19 和宁春 16 *Bar* 基因的转化率分别为 0.280%、0.500% 和 0.750%, *PYL5* 基因的转化率分别为 0.110%、0.125% 和 0.500%, *Bar* 和 *PYL5* 基因的共转化率分别为 0.110%、0.125% 和 0.500%。【结论】*PYL5* 基因成功转入到了小麦品种西农 889、绵阳 19 和宁春 16 中。

【关键词】 小麦; 基因枪法; 共转化法; *PYL5* 基因

【中图分类号】 S512.1; Q785

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)02-0072-07

Transformation of wheat with *PYL5* gene by biolistic particles and its molecular identification

CHI Qing^a, ZHOU Peng^a, LIU Xiang-li^{a,b},

Cheng Hui-hui^a, ZHAO Hui-xian^{a,b}

(a College of Life Sciences, b State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study was to obtain transgenic wheat with *PYL5* gene based on by biolistic particles. 【Method】Wheat cultivars including Xinong 889, Mianyang 19 and Ningchun 16 were used as acceptors, *PYL5* and *Bar* genes were co-transformed into immature callus by biolistic particles. After herbicide selection (Phosphinothricin, PPT) and callus differentiation, the regenerated plants were obtained. Then, allele specific PCR (AS-PCR) was conducted to analyze T_0 generation of regenerated plants using primers designed according to sequences of target genes. 【Result】1 800 callus of Xinong 889, 800 callus of Mianyang 19 and 800 callus of Ningchun 16 were bombarded by biolistic particles, and 9, 5 and 14 regenerated plants were obtained, respectively. The regenerated plants were tested using allele specific PCR (AS-PCR) and the obtained transformation frequencies of *Bar*, *PYL5* gene for Xinong 889, Mianyang 19 and Ningchun 16 were 0.280%, 0.500%, and 0.750%; 0.110%, 0.125%, 0.500%, respectively. The co-

【收稿日期】 2013-11-01

【基金项目】 转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08002-004); 国家自然科学基金项目(31101205); 西北农林科技大学基本科研业务专项(QN2011111); 国家自然科学基金项目(31471482)

【作者简介】 池 青(1988—), 女, 河南周口人, 在读硕士, 主要从事作物遗传改良的分子基础研究。

E-mail: cq1003270059@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

transformation frequencies of *Bar* and *PYL5* were 0.110%, 0.125% and 0.500%, respectively. 【Conclusion】 *PYL5* gene was successfully transformed into wheat cultivars Xinong 889, Mianyang 19 and Ningchun 16.

Key words: wheat; biolistic particle; co-transformation; *PYL5* gene

小麦是世界上重要的粮食作物之一。目前,世界上小麦播种面积的 70% 分布于干旱和半干旱地区^[1]。在各种非生物胁迫中,干旱已经成为限制小麦产量的主要因素之一^[2]。因此,培育抗旱小麦品种是提高小麦总产量和缓解世界粮食安全问题的的重要途径。

迄今为止,我国小麦育种者通过传统育种方法已经培育出一大批抗旱小麦品种,为提高我国小麦产量做出了重要贡献。但是传统的遗传改良方法育种周期较长,而且很难使小麦抗旱性有很大程度上提高。近年来,随着生物技术的不断发展,利用基因工程方法定向改良小麦的性状已经成为传统育种方法的有效补充。目前,利用植物基因工程改良方法已经成功获得了抗病^[3-5]、抗虫^[6-7]、抗逆^[8]、品质改良^[9-10]、高产量^[11-12]等小麦转基因品种或品系。通过将一些具有抗旱功能的基因转入到植物体内,可使转基因植物的抗旱性有一定程度的提高。Pellegrineschi 等^[13]采用基因枪介导法,将拟南芥的 *DREB1A* 基因导入普通小麦品种 Bobwhite 26 中发现,转基因植株的耐旱性有了明显的提高。Hmida-Sayari 等^[14]从拟南芥中克隆出了 Δ' -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)基因,并通过农杆菌介导法将其转入到马铃薯中,发现在高盐胁迫条件下转基因马铃薯的生长状况明显优于对照,且转基因植株体内的脯氨酸含量有明显的积累。He 等^[15]采用农杆菌介导法,将大肠杆菌胆碱脱氢酶基因(*betA*)转到小麦品种济南 17 号中,发现转基因植株的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性均升高,而丙二醛含量降低,植株根长和生长情况明显优于对照。

脱落酸(ABA)是植物体内最重要的 5 大生长激素之一,有促进气孔关闭、水分吸收及降低叶片伸展率、调节保卫细胞离子通道等重要的生理功能,对于保护植物在逆境中的生长具有至关重要的作用^[16-17]。*PYL5* 基因是从拟南芥中克隆出来的编码 *PYL* 蛋白的基因,*PYL* 蛋白是 ABA 信号转导途径中的 ABA 受体蛋白,它通过与 ABA 的结合来抑制 2C 类丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(PP2C)的活性,使 ABA 信号途径向下传递,进而提高植物的抗旱性^[18-20]。拟南芥 *Rd29A* 启动子是逆境诱导型启动

子,该启动子含有 2 个干旱、低温和高盐响应顺式作用元件,可被干旱、高盐、低温诱导表达,在逆境胁迫的早期,这些顺式作用元件被诱导表达,从而激活靶基因的表达,增强转基因植株的抗逆性^[21]。目前,尚无关于利用 *PYL5* 基因进行小麦遗传转化及提高小麦抗旱性的研究报道。

本研究构建了由 *Rd29A* 驱动的 *PYL5* 植物表达载体;采用基因枪共转化方法,将目标基因 *PYL5* 和筛选标记基因 *Bar* 转入弱冬性小麦品种西农 889、春小麦品种绵阳 19 和宁春 16 的幼胚愈伤组织中,通过除草剂 PPT(Phosphinothricin)筛选和愈伤组织的分化,获得了含有目的基因 *PYL5* 的转基因小麦植株,以期为进一步研究转 *PYL5* 基因小麦的遗传稳定性及转基因小麦的抗旱性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与载体质粒

选用小麦品种西农 889、绵阳 19 和宁春 16 为材料,于 2011—2013 年小麦生长季节将其种植在西北农林科技大学小麦试验田,正常管理。共转化所用载体质粒分别为含有目标基因 *PYL5* 的载体质粒 pRd29A::*PYL5* 和含有筛选标记基因 *Bar* 的载体质粒 pUBI::*Bar*。pRd29A::*PYL5* 和 pUBI::*Bar* 的结构见图 1。

1.2 小麦遗传转化和转基因植株的获得

采集西农 889、绵阳 19 和宁春 16 开花 10 d 后的未成熟种子,利用质量分数 0.1% 升汞和体积分数 75% 乙醇消毒后,剥取幼胚并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)上,25℃ 暗培养 7 d 后转入高渗培养基(MS+0.4 mol/L 甘露醇+500 mg/L 酸水解酪蛋白+2.0 mg/L 2,4-D),25℃ 暗培养 6 h,然后采用 Bio-Rad 公司生产的 PDS-1000/He 型基因枪进行轰击(金粉用量为 120 μ g/枪,含筛选基因 *Bar* 和目标基因 *PYL5*,这 2 种质粒浓度比为 1:1,用量均为 1.0 μ g/枪,轰击压力为 1100 psi,真空度为 27~28 Pa,轰击距离为 9 cm)。将轰击后的愈伤组织置于高渗培养基上 25℃ 继续培养 16 h,再转移到 MS 诱导培养基上恢复培养 2 周。将恢复培

养后的愈伤组织转移至 MS+PPT 的分化筛选培养基(西农 889:MS +500 mg/L 酸水解酪蛋白+4.0 mg/L KT+0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA +4.0 mg/L PPT+30 g/L 蔗糖+7.0 g/L 琼脂;绵阳 19:MS +500 mg/L 酸水解酪蛋白+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA+5.0 mg/L PPT+30 g/L 蔗糖+7.0 g/L 琼脂;宁春 16:MS+500 mg/L 酸水解酪蛋白+4.0 mg/L KT+0.1 mg/L NAA+1.0

mg/L 6-BA+2.0 mg/L PPT+30 g/L 蔗糖+7.0 g/L 琼脂)上,在温度为 25 ℃、照度为 5 000 lx 的光照条件下培养,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(1/2 MS+0.2 mg/L NAA)中,待苗高为 4~5 cm 时移至春化间(4 ℃)春化 20~40 d,至小苗株高为 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,于温室内生长。

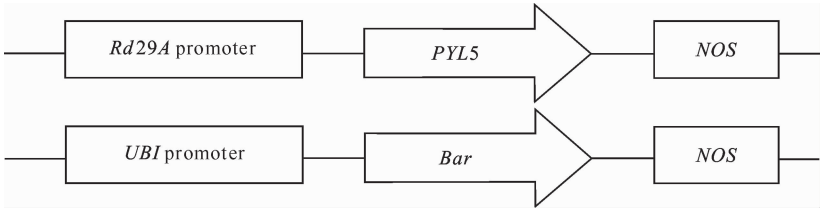


图 1 载体质粒 pRd29A::PYL5 和 pUBI::Bar 的结构

Rd29A promoter. 拟南芥逆境诱导型启动子;*PYL5*. 编码 ABA 信号转导途径中 ABA 受体蛋白的基因;*UBI promoter*. 玉米泛素基因启动子;*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 vector pRd29A::PYL5 and pUBI::Bar
Rd29A promoter. Inducible promoter of *Arabidopsis thaliana*; *PYL5*. Encoding ABA receptor gene in ABA signaling;
UBI promoter. Maize ubiquitin gene promoter; *Bar*. Selected marker gene which encodes phosphinothricin acetyltransferase to reduce the toxicity of phosphinothricin; *NOS*. Terminator

1.3 转基因小麦 T₀ 代植株的基因特异性 PCR (AS-PCR)检测

取转基因植株幼嫩叶片,采用 CTAB 法^[22]提取基因组 DNA,根据 *Rd29A*+*PYL5* 基因序列设计特异引物进行 PCR 扩增。上游引物为:5'-GCAACT-CCAACACGGCTCAG-3',下游引物为:5'-CAT-CAACGATGTAAGACTCCACCA-3';预期扩增片段大小为 500 bp 左右。*Bar* 基因 PCR 扩增检测的上游引物为:5'-TGCACCATCGTCAACCACTA-CAT-3',下游引物为:5'-GCTGCCAGAAAC-CCACGTCAT-3',预期扩增片段长度为 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 μL (TianGen 公司),模板 DNA 约 200 ng,补 ddH₂O 至 20 μL。*Rd29A*+*PYL5* 的扩增程序为:95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。*Bar* 的扩增程序为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 1 min,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。以非转基因植株为阴性对照,ddH₂O 为空白对照,将扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 转基因小麦植株的获得

用含目标基因 *PYL5* 与筛选标记基因 *Bar* 的表达载体对西农 889(1 800 块幼胚愈伤组织)、绵阳 19(800 块幼胚愈伤组织)和宁春 16(800 块幼胚愈伤组织)分别进行共转化。3 个品种部分愈伤组织的诱导和筛选分化结果如图 2 所示,愈伤组织转化和再生植株统计结果见表 1。对基因枪轰击后的西农 889、绵阳 19 和宁春 16 愈伤组织经过恢复培养和筛选分化,分别获得 9、5 和 14 株小麦再生植株(表 1)。

2.2 转基因小麦 T₀ 代再生植株的 AS-PCR 鉴定

将经过 PPT 筛选的转基因小麦再生植株移栽到温室培养,取嫩叶提取基因组 DNA 进行 AS-PCR 检测。经过多次 AS-PCR 检测,非转基因植株(阴性对照)和 ddH₂O(空白对照)中均没有扩增产物。西农 889 转化得到的 9 株再生植株中有 5 株(A4~A8 再生植株)扩增到与阳性质粒 pUBI::Bar 长度一致的 433 bp 的目标片段(图 3-A 左),表明这 5 株为转 *Bar* 基因的阳性植株,*Bar* 基因转化率为 0.280%(5/1 800);此外,这 9 株再生植株中有 2 株(A4 和 A6)扩增到与阳性质粒 pRd29A::PYL5 长

度一致的 500 bp 左右的目标片段基因(图 3-A 右),表明这 2 株为转 *PYL5* 基因的阳性植株,*PYL5* 的转化率为 0.110%(2/1 800)。因本试验采用 *Bar* 基因抗性进行筛选,得到的转目标基因的阳性植株

均为 *Bar* 基因阳性植株,即共转化率与目标基因的转化率一致。由图 3-A 可知,A4 和 A6 再生植株同时转入了 *PYL5* 和 *Bar* 基因,共转化率为 0.110%。

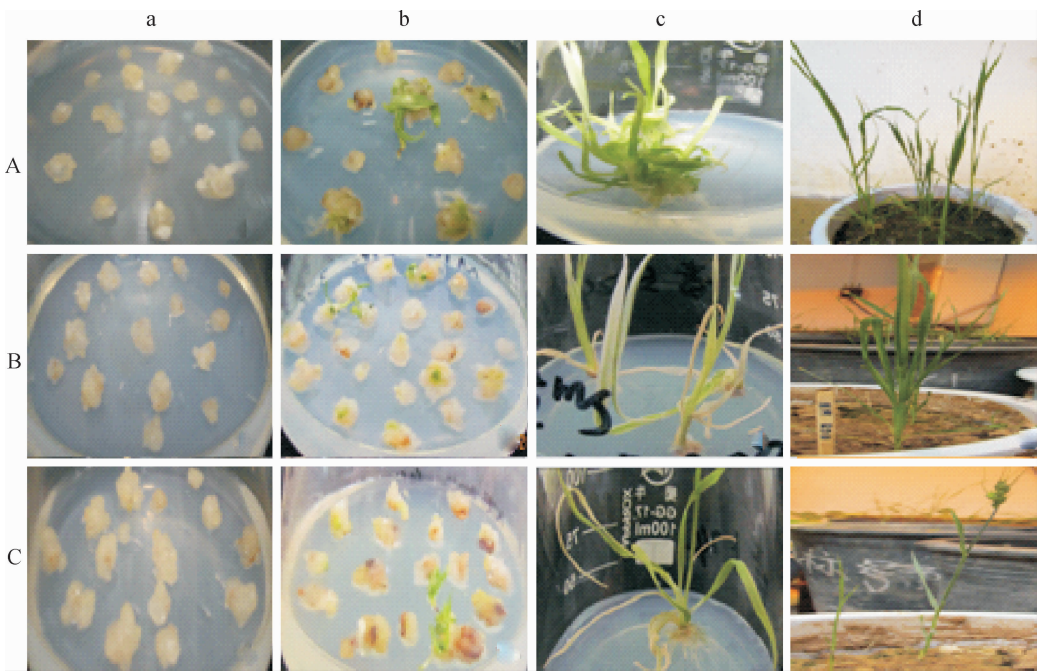


图 2 基因枪转化后小麦受体品种幼胚愈伤组织的分化及生长过程

A. 西农 889;B. 绵阳 19;C. 宁春 16;a. 幼胚诱导产生的愈伤组织;b. 筛选分化培养基中培养的愈伤组织;
c. 生根培养基中培养的幼苗;d. 温室中培养的小麦植株

Fig. 2 Selection differentiation and growth process of wheat immature embryos callus co-transformed by biolistic particles

A. Xinong 889;B. Mianyang 19;C. Ningchun 16;a. Callus induced from immature embryo;b. Callus differentiation from immature embryo;c. Regenerated transgenic plants on rooting media;d. Transgenic plants in greenhouse

表 1 不同小麦品种幼胚愈伤组织的基因枪转化结果

Table 1 Transformation of bombarded callus of different wheat varieties

品种 Cultivar	基因 Gene	轰击愈伤 组织数 Bombarded callus	再生 植株数 Regenerated plants	<i>Bar</i> 基因 <i>Bar</i> gene		<i>PYL5</i> 基因 <i>PYL5</i> gene		共转化率/% Co- trans- formation frequency
				阳性植株数 Positive plants	转化率/% Transfor- mation frequency	阳性植株数 Positive plants	转化率/% Transfor- mation frequency	
西农 889 Xinong 889	<i>PYL5</i> + <i>Bar</i>	1 800	9	5	0.280	2	0.110	0.110
绵阳 19 Mianyang 19	<i>PYL5</i> + <i>Bar</i>	800	5	4	0.500	1	0.125	0.125
宁春 16 Ningchun 16	<i>PYL5</i> + <i>Bar</i>	800	14	6	0.750	4	0.500	0.500

将经过 PPT 筛选的 5 株绵阳 19 再生植株移栽到温室,取样进行 AS-PCR 检测。有 4 株(B4~B7 再生植株)扩增到与阳性质粒 pUBI::*Bar* 长度一致的 433 bp 的目标片段(图 3-B 左),*Bar* 基因转化率为 0.500%(4/800);5 株再生植株中有 1 株(B4 再生植株)扩增到与阳性质粒 pRd29A::*PYL5* 长度一致的 500 bp 左右的目标基因片段(图 3-B 右),*PYL5* 转化率为 0.125%(1/800)。由图 3-B 可知,B4 再生植株同时转入了 *PYL5* 和 *Bar* 基因,共转化率为 0.125%。

经过 PPT 筛选,宁春 16 共得到 14 株再生植株,取样进行 AS-PCR 检测发现,有 6 株(C4~C9 再生植株)扩增到与阳性质粒 pUBI::*Bar* 长度一致的 433 bp 的目标片段(图 3-C 左),表明这 6 株为转 *Bar* 基因的阳性植株,*Bar* 基因转化率为 0.750%(6/800);14 株再生植株中有 4 株(C4、C5、C8 和 C9 再生植株)检测到与阳性质粒 pRd29A::*PYL5* 长度一致的 500 bp 左右的扩增片段(图 3-C 右),表明这 4 株为转 *PYL5* 基因的阳性植株,*PYL5* 转化率为 0.500%(4/800)。由图 3-C 可知,C4、C5、C8 和 C9

再生植株同时转入了 *PYL5* 基因和 *Bar* 基因,共转 化率为 0.500%。

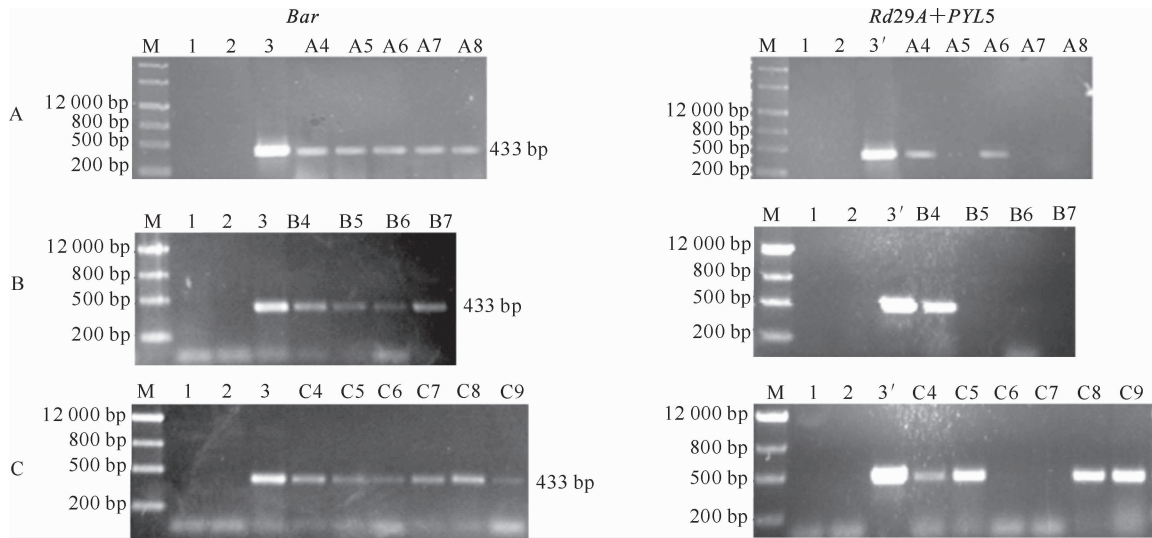


图 3 小麦受体品种共转化获得再生植株的基因特异 PCR(AS-PCR)检测结果

A. 西农 889;B. 绵阳 19;C. 宁春 16; M. MarkerⅢ;1. ddH₂O;2. 非转基因植株;3. 含筛选标记基因质粒 pUBI::Bar;
3'. 含目标基因质粒 pRd29A::PYL5;A4~A8、B4~B7、C4~C9. 各小麦品种转基因后的再生植株

Fig. 3 Electrophoretogram of allele specific-PCR of regenerated plants from the co-transformation of wheat cultivars

A. Xinong 889;B. Mianyang 19;C. Ningchun 16;M. MarkerⅢ;1. ddH₂O;2. Wild plant;3. Plasmid pUBI::Bar;
3'. Plasmid pRd29A::PYL5;A4—A8,B4—B7,C4—C9. Regenerated wheat plants transformed

3 讨 论

根据启动子的转录模式可以将其分成 3 类:组织特异性启动子、组成型启动子和诱导型启动子^[23]。在植物基因工程改良研究的初期,多采用组成型启动子启动目的基因的高效和非特异性表达,但是这种表达模式不仅会造成植物体内能量的过度消耗,还有可能造成基因沉默现象^[24-25]。因此,现在的研究者多采用组织特异性启动子或诱导型启动子来代替组成型启动子。

目前,已有许多关于诱导型启动子 *Rd29A* 应用在植物转基因研究中的报道,高世庆等^[26]将 *Rd29A* 启动子控制 *GUS* 报告基因的表达载体,通过基因枪介导法转化到小麦的幼胚愈伤组织中,在 PEG 胁迫条件下进行 *GUS* 组织化学染色,证实了 *Rd29A* 启动子能在小麦愈伤组织中诱导 *GUS* 基因表达。李新玲等^[27]从拟南芥基因组中扩增到 *Rd29A* 启动子,并将其与 *GUS* 基因融合构建成双元植物表达载体,采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草品种龙江 851,结果表明,在质量分数 15% PEG 和质量分数 0.5% NaCl 胁迫条件下,转基因烟草的 *GUS* 表达量明显高于非转基因植株。李双等^[28]分别构建了诱导型启动子 *Rd29A* 和组成型启动子 *CaMV35S* 驱动的异戊烯基转移酶基因(*ipt*)的植物表达载体,

用农杆菌介导法转化到烟草中,结果表明,转 *Rd29A* 启动子的植株在 4℃低温诱导条件下,能够很好的调控 *ipt* 基因的表达,与转 *Rd29A-ipt* 植株在常温处理以及对照载体在低温和常温处理之间差异显著,而 *CaMV35S* 诱导的 *ipt* 基因过量表达使植物的生长受到抑制。本研究采用诱导型启动子 *Rd29A* 构建载体进行转基因,目的是减少目标基因过量表达对转基因植株生长造成的不良影响。

目前,淡水资源缺乏已成为世界范围内一个不容忽视的问题,而农业用水量高达淡水资源的 70%,因此通过遗传改良,提高作物抗旱性,对于缓解我国农业用水困境有着极为重要的意义。ABA 作为植物体内的 5 大生长激素之一,在植物生长发育以及响应水分胁迫、盐胁迫中有重要作用^[16]。因此,ABA 信号通路一直是植物科学领域的一大研究热点。本研究转化小麦所用外源目标基因 *PYL5* 是从拟南芥中克隆的 ABA 受体蛋白编码基因,其表达的蛋白通过与 ABA 结合能够抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(PP2C)的活性,PP2C 在 ABA 信号传导中起着负调控的作用,它通过抑制 SNF1(Sucrose-Nonfermenting Kinase1)相关蛋白激酶 2(SnRK2)的活性来抑制 ABA 信号的转导;*PYL5* 基因在植物体内的表达能够使 ABA 信号转导途径顺利进行,产生的 ABA 有促进气孔关闭、水分吸收等

生理作用,进而提高植物的抗旱性^[18-19]。本研究采用基因枪介导的共转化方法,成功地将由 *Rd29A* 驱动的拟南芥 *PYL5* 基因转入小麦品种西农 889、绵阳 19 和宁春 16 中,共获得了 7 株转基因 T₀ 代阳性植株(西农 889 有 2 株,绵阳 19 有 1 株,宁春 16 有 4 株)。拟南芥的 *PYL5* 基因能否在转基因小麦的基因组上整合并稳定遗传,以及目标基因能稳定遗传的转基因后代株系的抗旱性如何,都需要进一步研究。本试验结果为研究转 *PYL5* 基因小麦的遗传稳定性及转基因小麦的抗旱性奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 梁新华,徐兆桢,许 兴,等. 小麦抗旱生理研究现状与思考 [J]. 甘肃农业科技,2001(2):24-28.
Liang X H,Xu Z Z,Xu X,et al. Research status and thinking on drought-resistant physiology of wheat [J]. Gansu Agricultural Science and Technology,2001(2):24-28. (in Chinese)
- [2] Boyer J S. Plant productivity and environment [J]. Science, 1982,218(4571):443-448.
- [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 glucanase 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 *Zma1* I 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 *Zma1* I 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] Pellegrineschi A,Reynolds M,Pacheco M,et al. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* *DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions [J]. Genome,2004,47:493-500.
- [14] Hmida-Sayari,Radhia Gargouri-Bouid,Amira Bidani Jaoua, et al. Over- expression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants [J]. Plant Science,2005,169(4): 746-752.
- [15] He C M,Zhang W W,Gao Q,et al. Enhancement of drought resistance and biomass by increasing the amount of glycine betaine in wheat seedlings [J]. Euphytica,2011,177(2):151-167.
- [16] Morillon R,Chrispeels M. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(24): 14138-14143.
- [17] 张 会. 脱落酸在植物抗性生理中的作用 [J]. 安徽农业科学,2013,41(2):490-491,527.

- Zhang H. Role of abscisic acid in plant hardiness physiology [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2013, 41(2): 490-491, 527. (in Chinese)
- [18] 胡 帅, 王芳展, 刘振宁, 等. PYR/PYL/RCAR 蛋白介导植物 ABA 的信号转导 [J]. 遗传, 2012, 34(5): 560-572.
Hu S, Wang F Z, Liu Z N, et al. ABA signaling mediated by PYR/PYL/RCAR in plants [J]. Hereditas, 2012, 34(5): 560-572. (in Chinese)
- [19] Raghavendra A S, Gonugunta V K, Christmann A, et al. ABA perception and signalling [J]. Trends in Plant Sci, 2010, 15(7): 395-401.
- [20] Hubbard K E, Nishimura N, Hitomi K, et al. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions [J]. Genes Dev, 2010, 24(16): 1695-1708.
- [21] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264.
- [22] 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)
- [23] 路 静, 赵华燕, 何奕昆, 等. 高等植物启动子及其应用研究进展 [J]. 自然科学进展, 2004, 14(8): 856-862.
Lu J, Zhao H Y, He Y K, et al. The research progress of higher plant promoter and its application [J]. Progress in Natural Science, 2004, 14(8): 856-862. (in Chinese)
- [24] 郝 林, 曹 军. *CaMV35S* 双启动子显著提高转基因在拟南芥中表达水平的研究 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(6): 517-519.
Hao L, Cao J. A double *CaMV35S* promoter efficiently enhances the level of transgenic expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology Communications, 2000, 36(6): 517-519. (in Chinese)
- [25] Matzke M A, Matzke A J M. How and why do plants inactivate homologous transgenes [J]. Plant Physiol, 1995, 107(3): 679-685.
- [26] 高世庆, 陈 明, 马有志, 等. *Rd29A* 启动子在小麦幼胚愈伤组织中的活性研究 [J]. 作物学报, 2005, 31(2): 150-153.
Gao S Q, Chen M, Ma Y Z, et al. Activity of *Rd29A* promoter in wheat immature embryonic calli [J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 150-153. (in Chinese)
- [27] 李新玲, 杨传平, 曲 敏, 等. *Rd29A* 启动子的克隆及提高烟草抗逆性的研究 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(1): 37-42.
Li X L, Yang C P, Qu M, et al. Study on cloning of *Rd29A* promoter and enhancing stress tolerance of tobacco [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(1): 37-42. (in Chinese)
- [28] 李 双, 石 君, 张秀海, 等. 逆境诱导型启动子 *Rd29A* 诱导 *ipt* 基因转化烟草的研究 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 51-56.
Li S, Shi J, Zhang X H, et al. Studies on stress inducible promoter *Rd29A* induction of *ipt* transgenic tobacco [J]. Molecular Plant Breeding, 2011, 9(1): 51-56. (in Chinese)