

文章编号 : 1000-5854(2017)05-0434-06

# 农杆菌介导的小麦成熟胚愈伤遗传转化研究进展

任卉敏， 房艳秋， 刘玉良， 郑术芝

(河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050024)

**摘要:** 小麦是中国重要的粮食作物之一。传统的育种方法存在周期长、改良慢等缺点, 基因工程育种现已成为小麦遗传改良的研究热点。因此, 小麦成熟胚愈伤组织的遗传转化在小麦遗传改良研究中具有重要意义。农杆菌介导的小麦成熟胚愈伤组织的遗传转化以其自身具有的优势, 得到了广泛的关注。介绍了农杆菌介导的小麦成熟胚愈伤遗传转化体系的各种影响因素, 如小麦愈伤组织的诱导、分化、转化效率、农杆菌菌株和转化载体等, 并对小麦成熟胚愈伤组织遗传转化的发展方向进行了展望。

**关键词:** 农杆菌; 小麦成熟胚; 遗传转化; 影响因素

**中图分类号:** S 512.1      **文献标志码:** A      **doi:** 10.13763/j.cnki.jhebnu.nse.2017.05.012

## Progress in Research on the Genetic Transformation of Wheat Mature Embryo Callus Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

REN Huimin, FANG Yanqiu, LIU Yuliang, ZHENG Shuzhi

(College of Life Science, Hebei Normal University, Hebei Shijiazhuang 050024, China)

**Abstract:** Wheat is one of the significant food crops in China. Since traditional breeding methods have some disadvantages, such as long cycle and slow improvement, genetic engineering breeding has become an important research topic in wheat genetic improvement. Genetic transformation of wheat mature embryo callus is of great significance in the study of genetic improvement of wheat and genetic transformation of wheat mature embryo callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens* has attracted attention widely due to its advantages. In this paper, various influencing factors of the genetic transformation system of wheat mature embryo callus mediated by *A. tumefaciens*, including wheat callus induction, callus differentiation, transformation efficiency, *Agrobacterium* strains and transformation carriers, etc. In addition, we have foreseen the prospect of the future direction of genetic transformation of wheat mature embryo callus.

**Key words:** *Agrobacterium*; wheat mature embryo; genetic transformation; influencing factors

小麦是世界上重要的粮食作物之一, 随着基因工程的发展, 人们越来越多的使用转化外源基因的方法来得到人们预期的性状<sup>[1-5]</sup>。但小麦的遗传转化效率相对于水稻、玉米等作物要低很多, 且转化体系还不成熟。目前, 小麦遗传转化的主要方法为原生质体转化法、基因枪法、花粉管通道法、农杆菌介导法等<sup>[6-12]</sup>, 其中农杆菌介导的遗传转化方法因其相对价格低廉、不受时间严格限制等优点备受人们的关注。

---

收稿日期: 2016-12-10; 修回日期: 2017-03-08

基金项目: 河北省教育厅自然科学研究项目(QN2015254, QN2015190); 河北师范大学科学研究博士基金

作者简介: 任卉敏(1991-), 女, 山西榆次人, 博士研究生, 研究方向为植物胁迫信号转导。

通信作者: 郑术芝(1982-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为植物胁迫信号转导. E-mail: szzheng@hebtu.edu.cn

## 1 农杆菌介导的转化体系研究进展

在小麦的遗传转化的几种方法中,原生质体转化法由于原生质体的培养和再生困难,体系难以建立;基因枪转化体系最为常用,现已建立比较成熟的转化体系,但该方法费用较高,转化率低;花粉管道法的影响因素较多,受时间严格限制,体系也较难建立。随着 Cheng 等<sup>[13]</sup>,夏光敏等<sup>[14]</sup>报道,农杆菌介导的小麦遗传转化有了突破性进展,逐渐成为人们研究的热点<sup>[15]</sup>。现已报道的农杆菌介导的小麦遗传转化受体包括幼胚愈伤、成熟胚愈伤、幼胚、幼穗等。其中,成熟胚由于不受时间的严格限制,个体之间生理状态基本一致,已经越来越多的被用于遗传转化<sup>[6-12]</sup>。

### 1.1 小麦成熟胚愈伤的诱导

目前,小麦成熟胚愈伤的诱导研究主要集中在诱导率、诱导条件对分化率的影响以及诱导出的愈伤质量对转化率的影响等方面。根据已有的文献研究报道可知,小麦成熟胚愈伤的诱导影响因素包括:不同激素浓度和配比、培养基成分、不同小麦基因型、双氧水处理、诱导温度、ABA 的添加以及诱导前对籽粒的各种处理等<sup>[16-18]</sup>。

#### 1.1.1 培养基

##### 1.1.1.1 植物激素

植物激素是植物体内合成的对植物生长发育有显著作用的几类微量有机物质,也被称为植物天然激素或植物内源激素。目前,已知的植物激素有以下几类,即生长素(Auxin)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(CTK)、乙烯(ETH)、油菜素内酯(BR)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、独脚金内酯(SL)、一氧化氮(NO)和多肽(Peptide)等,这些激素在植物体内具有复杂的生理效应<sup>[19]</sup>。

用于小麦成熟胚愈伤诱导的激素主要为生长素和细胞分裂素。组织培养中常用的生长素包括 IAA, IBA, NAA 和 2,4-D 等。IAA, IBA 为天然植物生长素,2,4-D, NAA 是人工合成的类似物。现在应用多使用 2 mg/L 2,4-D, 然而王丽等<sup>[20]</sup>在实验中对材料用 2,4-D 进行预处理,发现当 2,4-D 质量浓度为 10 mg/L 时愈伤诱导效果最好,过高则抑制愈伤分化阶段的分化率。宋运贤等<sup>[21]</sup>发现 2,4-D 质量浓度对小麦幼胚诱导产生的愈伤组织质量也有显著影响,高质量浓度的 2,4-D 能够抑制愈伤组织的分化。周宜君等<sup>[22]</sup>也曾对不同的激素进行比较,除 2,4-D 外, NAA, 6-BA, ZT 等在对愈伤组织的诱导中也有一定的作用,其中 NAA 诱导愈伤组织的效果优于 2,4-D, 而 6-BA 与 2,4-D 相互作用后会抑制 2,4-D 的诱导作用。

综上所述,激素是小麦成熟胚愈伤诱导的主导因素,激素浓度以及不同激素的配比对诱导率、愈伤质量和诱导出愈伤的潜在分化率有着重要的影响。愈伤分化阶段常用的激素为玉米素、激动素和 NAA,一般不使用 2,4-D,这是因为其对愈伤分化有一定的抑制作用<sup>[18]</sup>。

##### 1.1.1.2 基本培养基

根据文献[10-12]可知,培养小麦愈伤的基本培养基主要有 MS 培养基和 MB 培养基。

##### 1.1.1.3 碳源

培养基的碳源一般选择蔗糖,李尚中等<sup>[23]</sup>发现碳源在一定范围内变化对幼胚的诱导率没有明显的影响,但浓度过高则抑制愈伤的诱导。

也有用甘露醇、麦芽糖代替蔗糖作为碳源的报道,其主要目的是调节渗透压<sup>[24]</sup>。

一般较少用葡萄糖,这是因为葡萄糖多为动物或微生物的天然碳源,而植物愈伤组织利用率较低<sup>[25-26]</sup>。

#### 1.1.2 基因型

由于小麦是一种异源六倍体植物,基因组庞大,基因调控复杂且基因型特异性<sup>[27]</sup>,因此难以建立起比较完善的遗传转化体系。另外,不同基因型的小麦成熟胚愈伤组织在培养的过程中,激素配比存在较大的差异<sup>[28-31]</sup>。

#### 1.1.3 接种方式

在对小麦成熟胚进行不同的处理时,由于手法的差异造成小麦成熟胚的状态不同、与培养基的接触不同等,从而产生不同的诱导效果。毕瑞明<sup>[7]</sup>在对 27 种小麦的成熟胚进行剥胚法(种子表面消毒后暗培养,待种子表面露白,用镊子撕破种皮,破坏胚芽和胚根,剥出种胚之后接种在诱导培养基上)诱导愈伤组织后发现,各基因型出愈率存在极显著差异,有明显的基因型效应;而胚十字切割法(种子表面消毒后暗培养,待种子表

面露白,用解剖刀在胚上纵横各一刀,创伤面向下接种在诱导培养基上)也同样存在明显的基因型效应。张小红等<sup>[32]</sup>更是对剥胚法、胚十字切割法和整胚法(直接将完整胚盾片向上接种到诱导培养基中)进行比较研究,结果显示,在诱导愈伤组织中,对胚进行适当的切割创伤诱导效果较好,剥胚法效果次之,整胚法效果最差。

李映辉等<sup>[33]</sup>通过比较刮胚法(把种子在无菌滤纸上用解剖刀在胚部轻轻刮数次,使其成碎末状)、胚十字切割法以及胚切伤略带胚乳法(在胚十字切割法的基础上,取胚时略带胚乳)认为,胚切伤略带胚乳法的诱导效果优于胚十字切割法。

#### 1.1.4 其他诱导前处理

目前,常用的处理方式包括低温处理、生长调节剂预处理、渗透胁迫、PEG 处理、金属离子处理等<sup>[16]</sup>。其中,金属离子对小麦成熟胚愈伤组织的形成产生的影响是因为基因型品种不同而存在一定的差异<sup>[34-35]</sup>。

程炜中<sup>[36]</sup>早在 1990 年就发现,成熟胚诱导前用双氧水处理会明显提高愈伤组织诱导率和增值率,但这种效应存在着明显的基因型差异,并且指出细胞质基因型之间的差异大于细胞核基因型之间的差异。

短时间的低温处理对愈伤的诱导率影响不大,这与李尚中等<sup>[23]</sup>的研究结果相一致。此外,如果延长处理幼胚时间(>7 d)则诱导率明显下降。陈军营等<sup>[37]</sup>,王丽等<sup>[20]</sup>也指出低温对小麦成熟胚愈伤组织的影响和小麦品种有关系,品种间差异较大。

### 1.2 愈伤组织的继代和分化

#### 1.2.1 继代时间

愈伤组织的培养分为继代培养和分化培养 2 种方式。为了增殖发育良好的愈伤组织,继代培养是一种较为有效的措施。愈伤组织在外植体上形成后,应在愈伤组织已充分发育、但尚未出现老化现象前,及时从外植体上分离下来,转入继代培养基上进行继代培养。一般情况下,从外植体上分离的愈伤组织须经过 4~6 周的培养才能得到充分的发育。一般实验采用 1~2 周继代 1 次,但是增加继代频率可以减轻愈伤组织的褐化率,周子凡<sup>[38]</sup>的实验结果也证明了这一观点。

#### 1.2.2 分化率与诱导率的关系

分化培养一般是在 MS 培养基中添加一些激素,如 KT,ABA,2,4-D,6-BA,NAA 等,或者是采用一些其他的处理方法,如低温预处理。王军虹等<sup>[39]</sup>的实验结果表明,2,4-D,6-BA,KT 的质量浓度都能显著影响成熟胚愈伤组织的分化率。这 3 者的差别之处在于随着 2,4-D 质量浓度的增加,诱导率增加而分化率降低;而随着 6-BA,KT 质量浓度的增加,在一定质量浓度范围内分化率都有上升的趋势。不同的激素配比会对小麦成熟胚愈伤组织的分化产生不同的影响<sup>[40]</sup>。

李朝炜等<sup>[41]</sup>通过对分化培养基中 KT 与 NAA 质量浓度的不同配比,总结出影响小麦成熟胚愈伤组织分化的 2 个主要因素是基因型和培养基,同时还指出继代培养时间的延长会不同程度地影响小麦成熟胚愈伤的分化。

此外,分化率与诱导率一般情况下并无明显的线性关系,王丽等<sup>[20]</sup>对小麦成熟胚用低温预处理后,虽然对诱导率影响不大,但是却提高了分化率。

### 1.3 小麦成熟胚愈伤的生根

目前生根培养基大多数采用 1/2MS 培养基。很多研究者都发现加入少量的生长素,如 IAA,NAA 等,可以有效促进生根<sup>[31]</sup>。

## 2 农杆菌转化的影响因素

#### 2.1 侵染时间和侵染浓度

不同小麦基因型达到最大转化效率与侵染时间和侵染浓度有关,而与菌株关系不大,并且由于小麦基因型的不同,达到最大转化效率所用的侵染时间和侵染浓度也不尽相同。但浓度大都集中在 OD 值( $\lambda=600$  nm)时,因为此时菌的活力最强,生命力最旺盛,侵染时间为 10~30 min<sup>[42-44]</sup>。

宋成丽等<sup>[42]</sup>选用了 1 种超毒菌株和 1 种温和的菌株,在 OD 值( $\lambda=600$  nm)为 0.6 时,对不同基因型的小麦侵染 20 min 后,均得到最高的转化效率,此研究表明愈伤组织的再生能力与农杆菌菌株的关系不明显。关于侵染时间和侵染浓度,毕瑞明<sup>[43]</sup>、曹乐慧<sup>[44]</sup>也有类似的结论,其分别在 OD 值( $\lambda=600$  nm)为 0.6,0.85

侵染 30 min 时得到了最大的转化效率. 几组试验结果不同的原因可能是由于小麦基因型不同所致.

## 2.2 载体和菌株的选择

### 2.2.1 载体的选择

影响载体选择的主要因素包括:载体上所含的选择标记,启动目的基因的启动子类型和毒性区(virulence region)的种类.

选择标记直接影响着抗性愈伤的筛选率,合适的选择标记不仅可以提高筛选率从而减少工作量,而且对环境的保护和生物种类的多样性的保持方面都有积极的作用. 目前已报道的用于小麦遗传转化的选择标记有除草剂基因、潮霉素基因、卡那霉素基因、GFP 和 GUS 基因等<sup>[6-9]</sup>. 就瞬时表达检测来说,GFP 比 GUS 更加合适. 因为 GFP 比 GUS 更加稳定,对愈伤的伤害也相对较小. 但是这些选择标记都有自己的弊端和一定的局限性,而且针对这些传统的选择标记所展开的争论也是越来越激烈<sup>[45-47]</sup>.

近些年已经研究出一些相对于除草剂、抗生素等选择标记争议较小的遗传选择标记,这些标记包括糖类分解代谢酶相关基因、叶绿素合成酶基因、化合物解毒酶基因、天冬氨酸激酶基因等<sup>[45]</sup>. 这些选择标记相对于传统的选择标记具有较大优势.

启动子对于目的基因的转录效率方面有着重要的作用. 不同的启动子在同一植物中的起始效率不尽相同,同一启动子在不同的植物类型中起始转录效率也存在较大差别. 就 35 S 启动子<sup>[48]</sup>和 UBI 启动子<sup>[49]</sup>来说,前者更适于双子叶植物而后者更适于在单子叶植物中起始转录. 但是,由于影响转录起始的因素较多,究竟选择哪种启动子类型也不能一概而论. 上游元件、待起始的目的基因和启动子的数量都是重要的影响因素.

### 2.2.2 农杆菌菌株的选择

在对小麦的遗传转化中,Cheng<sup>[13]</sup>采用 C58 菌株首次获得了转基因植株,转化效率为 0.14 % ~ 4.3 %. 夏光敏等<sup>[14]</sup>采用 Agl-I 菌株获得了较高的转化效率,转化效率为 3.7 % ~ 5.9 %. 然而,王永勤等<sup>[50]</sup>的研究结果是 LBA4404 菌株转化效果最好,其次为 EHA105,转化效率最低的是 Agl-I,但是王学全等<sup>[51]</sup>的结果却证明 EHA105 比 LBA4404 更容易接受外源质粒,转化能力更好. 不同研究人员所得实验结果不尽一致,其原因可能是由于这些结果是在不同的实验条件下进行的,尤其是转化所用的外植体不同也可能造成很大的差异.

## 2.3 AS 对转化效率的影响

乙酰丁香酮 AS 的加入有时会提高遗传转化效率,比如 Hiei 等<sup>[52]</sup>和 Guo 等<sup>[53]</sup>的研究表明 AS 的加入能够提高转化效率.

王永勤等<sup>[50]</sup>将愈伤分为 2 种类型:I 型愈伤为白色块状,质地较疏松;II 型愈伤为淡黄色粒状,质地致密. 他们发现并不是所有类型的愈伤都对 AS 敏感,在转化 I 型愈伤时加入 AS 对转化率并没有影响. 张志清等<sup>[54]</sup>的实验也证明了这一结果. 另外,不同的农杆菌菌株对 AS 的敏感性也不相同. AS 的加入并不是必须的,要根据外植体的类型、所用侵染菌株而定<sup>[45]</sup>.

## 2.4 其他附加因素

目前已报导的附加转化处理包括超声波破碎、负压处理、低温处理、CaCl<sub>2</sub> 处理、干燥处理、培养基中添加抗氧化剂、使用表面活性剂等<sup>[55-57]</sup>,均能不同程度的提高农杆菌的转化效率.

## 3 总结和展望

成熟胚相对于幼胚来说具有取材方便、不受时间严格限制、个体差异小等优点,作为小麦遗传转化的受体具有广阔的应用前景.

本文中,笔者对农杆菌介导的小麦成熟胚愈伤转化体系的各种影响因素进行总结和对比,为小麦遗传转化奠定了理论基础.

## 参考文献：

- [1] JIN X,SUN T,WANG X,et al. Wheat CBL-interacting Protein Kinase 25 Negatively Regulates Salt Tolerance in Transgenic Wheat[J]. *Scientific Reports*,2016,6:1-12. doi:10.1038/Srep28884
- [2] BHATI K K,ALOK A,KUMAR A,et al. Silencing of ABCC13 Transporter in Wheat Reveals Its Involvement in Grain Development,Phytic Acid Accumulation and Lateral Root Formation[J]. *The Journal of Experimental Botany*,2016,67(14):4379-4389. doi:10.1093/Jxb/Erw224
- [3] SINGH R P,JHA P N. The Multifarious PGPR *Serratia Marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L)[J]. *The Public Library of Science*,2016,11(6):E0155026. doi:10.1371/Journal. Pone. 0155026
- [4] MONDAL S,SINGHA R P,MASONB E R,et al. Grain Yield, Adaptation and Progress in Breeding for Early-maturing and Heat-tolerant Wheat Lines in South Asia[J]. *Field Crops Research*,2016,192:78-85.
- [5] TOMAR R S S,TIWARI S,VINOD S,et al. Molecular and Morpho-agronomical Characterization of Root Architecture at Seedling and Reproductive Stages for Drought Tolerance in Wheat[J]. *The Public Library of Science*,2016,11(6):E0156528. doi:10.1371/Journal. Pone. 0156528
- [6] 李伟艳.农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化体系的建立及提高转化效率的初步探索[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [7] 毕瑞明.农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化体系的建立及转抗虫基因小麦分析[D].泰安:山东农业大学,2006.
- [8] 郑成成.农杆菌介导东农冬麦1号成熟胚遗传转化体系的建立[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [9] 丁丽萍,陈泠,李圣纯,等.根瘤农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化影响因素的研究[J].麦类作物学报,2007,27(5):761-766.
- [10] 陈国立.农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化体系建设和遗传转化研究[D].泰安:山东农业大学,2007.
- [11] 陈国立,后猛,王玉海,等.农杆菌介导小麦成熟胚愈伤组织的遗传转化研究[J].麦类作物学报,2007,27(2):188-192.
- [12] 后猛.农杆菌介导小麦遗传转化体系的建立及转基因研究[D].泰安:山东农业大学,2008.
- [13] CHENG M,FRY J E,PANG S Z,et al. Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiology*,1997,115(3):971-980.
- [14] 夏光敏,李忠谊,贺晨霞,等.根癌农杆菌介导的小麦转基因植株再生[J].植物生理学报,1999,25:22-28.
- [15] SINGH R K,PRASAD M. Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Genetic Transformation of Graminaceous Crops[J]. *Protoplasma*,2016,253(3):691-707. doi:10.1007/S00709-015-0905-3
- [16] 杨筱.小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2015.
- [17] 吴美金,史文娟,王敏.小麦成熟愈伤组织诱导条件优化的研究[J].安徽农业科学,2008,36(16):6663-6665.
- [18] 郭晓丽.小麦成熟胚愈伤组织诱导研究进展[J].湖北农业科学,2011,50(5):884-890.
- [19] SANTNER A,CALDERON-VILLALOBOS L I A,ESTELLE M. Plant Hormones Are Versatile Chemical Regulators of Plant Growth[J]. *Nature Chemical Biology*,2009,5(5):301-307. doi:10.1038/Nchembio. 165
- [20] 王丽,陈耀锋,张月琴,等.低温与植物生长调节剂预处理对小麦成熟胚培养特性的影响[J].西北植物学报,2013,33(5):1041-1046.
- [21] 宋运贤,向天宜.小麦幼胚再生体系的建立[J].开封教育学院学报,2016,36(2):280-281.
- [22] 周宜君,周生闯,刘玉,等.植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响[J].中央民族大学学报(自然科学版),2007,16(1):23-28.
- [23] 李尚中,李唯,李胜,等.小麦胚性愈伤组织诱导研究[J].甘肃农业大学学报,2004,39(2):136-140.
- [24] 姚明镜,李和平,廖玉才.甘露糖对小麦不同外植体愈伤诱导及生长的影响[J].麦类作物学报,2007,27(1):7-11.
- [25] 周建金,雷伏贵,曹奕翥,等.碳源和6-BA对黄精不定芽生长及多糖累积的影响[J].三明农业科技,2016,131(1):24-29.
- [26] 杨绪清.碳源对黄瓜愈伤组织糖代谢相关酶的调控[D].扬州:扬州大学,2016.
- [27] 杨云霞.小麦农杆菌介导不同遗传转化体系的建立及比较研究[D].北京:中国农业科学院,2005.
- [28] 吕晓依,王竹林,奚亚军,等.小麦遗传转化受体系统建立的研究[J].西北植物学报,2007,27(58):859-863.
- [29] TANG Z X,REN Z L,WU F,et al. The Selection of Transgenic Recipients from New Elite Wheat Cultivars and Study on Its Plant Regeneration System[J]. *Agricultural Sciences in China*,2006,5(6):417-424.
- [30] 张东武,刘辉,赵惠贤.小麦成熟胚组织培养再生体系的优化及高再生率基因型的筛选[J].麦类作物学报,2011,11(5):847-852.

- [31] 陈俊男,邓志英,田纪春. 小麦成熟胚组织培养体系优化及其影响因素的研究[J]. 麦类作物学报,2012,32(2):197-202.
- [32] 张小红,赵雪晶,李波,等. 小麦成熟胚离体培养及植株再生技术优化[J]. 草业学报,2013,22(4):334-339.
- [33] 李映辉,宋娜,王瑜晖,等. 小麦成熟胚培养方法的优化及其在小麦遗传转化中的应用[J]. 麦类作物学报,2013,33(1):6-12.
- [34] 杨筱,孟亚雄,马小乐,等.  $CuSO_4$  和 EDTA-Fe 对小麦成熟胚再生体系的影响[J]. 分子植物育种,2016,14(3):679-686.
- [35] 后猛,崔法,西廷业,等. 金属离子对小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 华北农学报,2008,23:38-42.
- [36] 程炜中. 小麦成熟种子胚愈伤组织的快速诱导研究[J]. 陕西农业科学,1990(3):12-14.
- [37] 陈军营,尹海燕,梁静静,等. 不同预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响[J]. 河南农业科学,2005(1):19-21.
- [38] 周子凡. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及再分化研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [39] 王军虹,郑成成,于晶,等. 冬小麦“东农冬麦 1 号”成熟胚组织培养及再生体系建立[J]. 东北农业大学学报,2015,46(11):8-15.
- [40] 刘君,蒋鲁亚,王君雅,等. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及植株再生体系的优化[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),2016,36(2):59-64.
- [41] 李朝炜,姚彬,苗苗,等. 不同品种小麦成熟胚愈伤组织的诱导与分化[J]. 湖北农业科学,2015,54(13):3179-3182.
- [42] 宋成丽,王翻,徐虹,等. 农杆菌接到的小麦成熟胚转化的影响因素[J]. 麦类作物学报,2012,32(2):209-214.
- [43] 毕瑞明. 农杆菌介导小麦成熟胚愈伤组织转化的主要因子优化[J]. 生物技术,2008,18(2):58-60.
- [44] 曹乐慧. 农杆菌介导的小麦愈伤转化及小麦悬浮细胞系的建立[D]. 武汉:华中农业大学,2015.
- [45] 金鑫鑫. 农杆菌介导的小麦愈伤组织遗传转化及再生体系研究[D]. 济南:山东大学,2012.
- [46] 赵慧茹,谷运红,焦演,等. 农杆菌介导小麦遗传转化的影响因素[J]. 安徽农业科学,2008,36(23):9885-9887.
- [47] 史俊. 水稻强分蘖基因 MT1 启动子的克隆及与 GUS, GFP 融合基因的构建[J]. 安徽农业科学,2010,38(21):11061-11062,11077.
- [48] 王贺. 含 35S 启动子的粟酒裂殖酵母分泌型表达载体的构建及功能鉴定[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [49] 潘阳阳. 通过 Ubi 内含子改造提高单子叶植物外源基因表达[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [50] 王永勤,肖兴国,张爱民. 农杆菌介导的小麦遗传转化几个影响因素的研究[J]. 遗传学报,2002,29(3):260-265.
- [51] 王学全,沈晓,何赞绵,等. 根癌农杆菌 EHA105 和 LBA4404 冻融法转化条件的优化研究[J]. 药物生物技术,2011,18(5):382-386.
- [52] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient Transformation of Rice (*Oryza sativa* L) Mediated by *Agrobacterium* and Sequence Analysis of the Boundaries of the T-DNA[J]. Plant Journal, 1994, 6(2):271-282.
- [53] GUO G M, MAIWALD F, LORENZEN P, et al. Factors Influencing T-DNA Transfer into Wheat and Barley Cells by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Cereal Research Communications, 1998, 26(1):15-22.
- [54] 张志清,郑有良,王丕武,等. 农杆菌介导转化小麦几个影响因素的再研究[J]. 四川农业大学学报,2006,24(1):1-7.
- [55] 于惠敏,夏光敏,侯丙凯. 提高农杆菌介导小麦遗传转化效率的几个因素[J]. 山东大学学报(理学版),2005,40(6):120-124.
- [56] 毕瑞明. 负压处理对农杆菌介导小麦成熟胚转化效率的影响[J]. 生物技术,2008,18(1):47-49.
- [57] 叶兴国,王新敏,王轲,等. 提高植物农杆菌转化效率辅助策略研究进展[J]. 中国农业科学,2012,45(15):3007-3019.

(责任编辑 柴 键)