

# 基因枪转化小麦主要影响因素细述

肖乐乐<sup>1,2</sup>, 杜丽璞<sup>1</sup>, 王 轲<sup>1</sup>, 李小辉<sup>2</sup>, 徐惠君<sup>1</sup>, 晏月明<sup>2</sup>, 叶兴国<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081;

<sup>2</sup>首都师范大学生命科学院, 北京 100048)

**摘要:** 基因枪转化是目前小麦遗传转化的主要技术之一, 高效的基因枪转化系统对于转基因小麦新品种培育、候选基因功能鉴定和功能基因组学研究具有重要意义。本文综述了影响基因枪转化小麦效率的主要因素, 包括基因型、外植体、植物生长调节剂、轰击参数、筛选体系等, 以期为进一步改进小麦基因枪转化技术, 提高基因枪转化小麦的效率提供参考。

**关键词:** 小麦; 基因枪; 遗传转化; 影响因素; 转化效率

## Main Factors Influencing the Efficiency of Biolistic Particle Mediated Transformation in Wheat

XIAO Le-le<sup>1,2</sup>, DU Li-pu<sup>1</sup>, WANG Ke<sup>1</sup>, LI Xiao-hui<sup>2</sup>, XU Hui-jun<sup>1</sup>, YAN Yue-ming<sup>2</sup>, YE Xing-guo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081; <sup>2</sup>College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

**Abstract:** Physical biolistic particle approach is one of the main techniques used for wheat genetic transformation. Efficient biolistic transformation system is benefit to the development of new wheat varieties, identification of candidate genes, and functional genomics study. In this paper, the main factors including genotypes, wheat explants, plant growth regulators, bombardment parameters, selection system, etc, which affected wheat transformation efficiency mediated by biolistic bombardment, were reviewed. The purpose was to provide some useful information for improving the protocol and efficiency of biolistic particle mediated transformation in wheat.

**Key words:** wheat; biolistic particle; genetic transformation; influencing factors; transformation efficiency

小麦是世界上重要的粮食作物之一, 分布范围广, 种植面积大, 关系到经济和社会稳定发展。因此, 培育具有高产、优质、抗病、抗逆等优良性状的小麦品种具有重要意义。在基因水平操控和定向改良方面, 转基因技术明显优于传统育种方式, 是改良植物抗病、抗虫、抗除草剂、抗旱等明显性状的一个有力工具。转基因技术也是鉴定候选目标基因功能的重要手段, 在模式植物拟南芥、烟草和水稻中已被广泛运用。由于未能完全突破 DNA 转入和组织培养的瓶颈, 转基因技术还不能在小麦功能基因组学研究中常规化应用。

基因枪和农杆菌介导法是目前用于小麦遗传转化的两种主要技术。农杆菌介导法虽然具有拷贝数低、遗传稳定性好等优点, 但是受宿主范围的限制, 只有少数几个基因型适于农杆菌转化。而基因枪法借助物理方式(粒子轰击), 将载有目的基因的金(钨)粉颗粒直接导入细胞, 克服了外植体材料种类、物种和基因型差异导致的影响。同时, 基因枪法对载体的要求较低, 通常也更有效率, 因而使用最为广泛。自 1992 年世界上首次报道利用基因枪转化技术获得第一例转基因小麦植株至今<sup>[1]</sup>, 基因枪法介导的小麦遗传转化技术已日趋成熟, 并已逐步实

收稿日期: 2014-02-08      修回日期: 2014-02-28      网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1425.019.html>

基金项目: 国家转基因专项(2011ZX08010-004); 农业部“948”项目(2013-S3)

第一作者主要从事小麦分子育种研究。E-mail: xiaoledyx@163.com; 杜丽璞为共同第一作者

通信作者: 晏月明, 主要从事小麦基因工程研究。E-mail: yanyym@hotmail.com

叶兴国, 主要从事小麦分子育种研究。E-mail: yexinguo@caas.cn

现了程序化,同时获得了一批性状明显改进的转基因小麦新品系<sup>[2-4]</sup>。但是,目前基因枪转化效率依然偏低。本文对影响基因枪转化小麦效率的主要因素进行了比较、归纳,以期为进一步优化基因枪转化小麦参数,提高基因枪转化小麦效率提供参考。

## 1 组织培养环节

与其他谷类作物相同,小麦转化采用的外植体是通过体细胞胚胎发生途径获得的转基因植株,因此组织培养过程中的各个环节及参数都将影响最终的转化效率。

### 1.1 基因型及其外植体

基因枪技术对于基因型及其外植体的种类没有要求,从被转化的细胞获得转基因植株主要取决于被转化细胞在特定培养基上的全能性表现。但是,基因型和外植体种类影响形成胚性愈伤组织的能力,从而在一定程度上决定了最终的转化效率。

研究表明,小麦基因型是影响组织培养植株再生能力最关键的因素,甚至比其他已知的影响因素更为重要,如外植体来源、生长环境、培养基组成等。不同基因型因其产生胚性愈伤组织的能力以及在筛选培养基上再生成苗的能力不同而影响转化效率。小麦是多基因组植物,不同基因型形成体细胞胚胎能力差别很大<sup>[5-10]</sup>。S. Takumi 等<sup>[11]</sup>利用 6 个小麦基因型进行了转化,发现 Akadaruma 和 Norin 12 转化效率最高,分别为 1.4% 和 1.7%, Chinese Spring 和 Haruhikari 次之, Norin 61 和 Skiroganekomugi 没有获得转基因植株。Bobwhite 小麦品种因其易于组织培养和转化,被广泛应用于基因枪转化<sup>[12-20]</sup>, A. Pellegrineschi 等<sup>[12]</sup>对 129 个 Bobwhite 姐妹系进行了转化能力研究,其中 8 个品系的转化率达 60% 以上,综合比较了所有品系愈伤组织诱导率和分化率、假阳性率以及生长周期等方面的差异,认为 Bobwhite SH 9826 是小麦转化的最适基因型。

小麦只有少数几种外植体组织适合组织培养植株再生,包括幼胚(盾片)<sup>[5-6,11-24]</sup>、幼穗<sup>[21-25]</sup>、成熟胚<sup>[26-29]</sup>、花药<sup>[30-33]</sup>、叶基组织<sup>[34-35]</sup>等。小麦成熟胚不受季节、环境条件和植株发育状况等因素的限制,但是植株再生率非常低,因而限制了成熟胚在小麦遗传转化中的应用。幼胚被认为是最理想,也是目前应用最广泛的小麦转基因受体材料,盾片组织通过其上皮和亚上皮组织的增生可产生胚性愈伤组织,盾片及其产生的愈伤组织均易接受基因枪轰击或农杆菌介导转入的外源 DNA,愈伤组织诱导率和

植株再生率都比较高,目前获得转基因小麦植株的报道基本以幼胚为受体。此外,小麦幼穗的应用也较广泛。F. Delporte 等<sup>[26]</sup>利用成熟胚培养,建立了一套有效的小麦再生系统。F. Altpeter 等<sup>[14]</sup>、A. E. Blechl 等<sup>[36]</sup>、F. Barro 等<sup>[37]</sup>、L. Rooke 等<sup>[38]</sup>将编码高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS, high molecular weight glutenin subunits)的 *1Dx5*、*1Ax1*、*1Dy10* 等基因利用基因枪导入了小麦幼胚或幼穗,经过筛选和再生获得了稳定表达的转基因植株; A. Anand 等<sup>[39]</sup>、M. Janni 等<sup>[40]</sup>、M. Fahim 等<sup>[41]</sup>利用基因枪分别将 *FsTR1101*、几丁质酶、葡聚糖酶等基因转入幼胚,获得的转基因小麦对赤霉病表现一定抗性。D. Patnaik 等<sup>[42]</sup>成功将 *bar* 基因通过基因枪导入成熟胚愈伤组织,获得转基因植株。E. A. Brisibe 等<sup>[30]</sup>利用花药愈伤组织为受体,将 *bar*、*hph* 基因转入了小麦,亦获得了稳定表达外源基因的转基因植株。

### 1.2 外植体的生理状态

小麦受体材料所处的生长环境、发育阶段及其生理状态影响外植体内的内源激素分配,这些内源激素的水平和比例与体细胞胚胎发生密切相关,通过影响植株再生频率影响基因枪转化效率。J. R. Hess 等<sup>[43]</sup>揭示了小麦幼胚内激素的动态变化,随着胚胎的生长将加速失去体细胞形成能力,而且内源生长素和细胞分裂素的比例比其绝对含量可能更加重要。当胚胎处于低浓度的 IAA 和 ABA 或细胞分裂素时,体细胞形成能力延长。大量研究表明<sup>[22-23]</sup>,小麦幼胚取材的最佳时期为开花后 12 ~ 16 d,且取自主穗的受体材料具有相对高的植株再生率和转化率。这可能是因为花后 12 ~ 16 d 的小麦子粒正处于细胞分裂素、生长素和赤霉素剧烈变化的时期,这些内源激素的比例影响幼胚细胞的分裂周期、分化方向和 DNA 复制水平,因而影响植株再生率和转化率。当主穗或整个植株开始衰老,一些衰老相关信号激素的释放可能会阻止上述过程,降低幼胚细胞脱分化形成胚性愈伤组织的能力。在幼胚发育的适宜时期,胚轴开始变得不透明,盾片呈半透明状,直径 0.8 ~ 1.2 mm(不同基因型之间略有不同),盾片组织过小或过大其再生率都会降低。

A. Pellegrineschi 等<sup>[44]</sup>研究了小麦受体植株干旱胁迫和高温胁迫后对转化效率的影响,证明转化效率不仅与受体材料的基因型有关,还与受体材料的生理状态有关,受体植株经过轻微的干燥胁迫(干燥 1 d,湿度为 30% ~ 40%)后有利于提高转化效率,最高可达 6.46%。认为轻微高温或干旱胁迫

促使幼胚细胞处于质壁分离的脱水状态,转到高渗培养基上预培养时可以更快地适应培养环境,增加了胚性愈伤组织的形成。实际操作中,可以通过调控植株生长的环境条件,使小麦幼胚处于适合再生和转化的生理状态。

### 1.3 植物生长调节剂

生长素是诱导植物细胞脱分化产生胚性愈伤组织必需的生长调节剂,小麦组织培养中促进胚胎发生最常用的生长素是2,4-D,其浓度依小麦基因型和外植体的不同而不同,一般低浓度促进愈伤组织形成和胚胎再生,高浓度时抑制愈伤组织的形成,但促进根的形成。绝大多数研究表明<sup>[22,45-47]</sup>,2,4-D诱导小麦幼胚产生愈伤组织的最适浓度为2.0 mg/L,部分研究中使用2.5 mg/L<sup>[46,48]</sup>,少数研究使用1.0 mg/L<sup>[49]</sup>。S. Rasco-Gaunt等<sup>[23]</sup>、F. Barro等<sup>[50]</sup>对比了不同浓度2,4-D、Picloram对小麦幼胚再生率和转化率的影响,认为愈伤组织诱导培养基中加入4 mg/L Picloram有助于提高小麦幼胚再生率和转化率。通常,愈伤组织诱导培养基中加入2,4-D会促进内源乙烯的产生,后者抑制愈伤组织的形成和植株再生,培养基中同时加入10 mg/L硝酸银或硫代硫酸银可抑制乙烯的活性,促进体细胞胚胎的形成<sup>[51-52]</sup>。

小麦愈伤组织分化培养基中加入较高浓度的细胞分裂素(如5 mg/L zeatin或2 mg/L kintin),并搭配低浓度的生长素(如0.1~0.2 mg/L 2,4-D)和压力诱导剂(如8 mg/L CuSO<sub>4</sub>),可一定程度提高植株再生率<sup>[48,53]</sup>。V. S. Fadeev等<sup>[54]</sup>研究了不同植物激素使用不同浓度对小麦幼胚愈伤组织分化和生根效果的影响,认为0.5 mg/L NAA适合诱导根,玉米素、激动素、BAP、TDZ适合诱导再生芽,细胞分裂素间的作用没有显著差别<sup>[22]</sup>。

此外,发现培养基中适宜浓度的铵离子和硝酸根离子能促进植物体细胞胚胎的形成<sup>[55-59]</sup>,理由是铵离子和硝酸根离子的比例可以改变外植体对生长素的敏感度<sup>[58]</sup>。M. S. Greer等<sup>[59]</sup>在培养基中加入高浓度的硝酸铵,可使小麦胚性愈伤形成率和分化率提高了约2倍,改进了轰击后盾片再生植株的潜力,基因枪转化效率提高了约7倍,但其效果在不同基因型间存在明显差异。

### 1.4 预培养和高渗处理方式

对于基因枪转化中小麦幼胚预培养时间,国内外的研究不尽相同。梁辉等<sup>[60]</sup>认为适宜的预培养时间为3~4 d,J. T. Weeks等<sup>[13]</sup>预培养5 d进行轰

击,F. Altpeter等<sup>[14]</sup>认为预培养5~7 d转化效果最佳,V. S. Fadeev等<sup>[54]</sup>认为预培养14 d适合基因枪转化。S. Takumi等<sup>[61]</sup>发现,小麦幼胚预培养1~9 d进行基因枪转化后,对GUS基因瞬时表达率没有影响,但对稳定转化率产生极显著影响,认为预培养5 d以上效果较好。

基因枪轰击前对预培养的小麦受体材料进行高渗处理可以提高外源基因转化效率,这在许多报道中已得到证实<sup>[22,45,62-64]</sup>,其原因可能在于高渗处理使受体细胞发生可恢复性的质壁分离,易于外源DNA进入细胞,减少微弹穿孔时的细胞质泄漏,减少轰击对细胞的损伤,提高细胞的活性。但是,不同研究者进行高渗处理所用的渗透剂种类、浓度及处理时间各有差异。常用的渗透剂主要有甘露醇、山梨醇、麦芽糖、蔗糖、PEG,或者几种渗透剂的组合<sup>[12,14,22,44-45,48,64-66]</sup>,但以山梨醇、甘露醇、麦芽糖和蔗糖最为常用。S. Rasco-Gaunt等<sup>[22,45]</sup>分析了不同浓度蔗糖、麦芽糖对小麦盾片或幼穗组织转化效果的影响,发现用含9% (0.48 mol/L)蔗糖或9% (0.27 mol/L)麦芽糖对即将转化的小麦盾片组织和幼穗组织进行高渗处理,转化后小麦受体组织的体细胞胚胎发生能力、植株再生能力、瞬时表达率和稳定转化率均得以提高。

另外,J. T. Weeks等<sup>[13]</sup>、A. Pellegrineschi等<sup>[12,44]</sup>、S. Rasco-Gaunt等<sup>[22,45]</sup>将没有进行预培养的小麦新鲜幼胚直接接种到含150 g/L麦芽糖的高渗培养基上,23℃、黑暗条件下处理36~48 h后进行基因枪转化,轰击后经愈伤组织诱导和分化,获得了转基因植株。V. S. Fadeev等<sup>[54]</sup>将小麦幼胚接种在诱导培养基上,于4℃下低温培养1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、9 d、10 d、11 d,发现低温处理2 d以上,幼胚产生胚性愈伤组织的潜力显著提高,说明短时间低温处理有利于胚性愈伤组织的诱导。

## 2 基因枪转化参数

基因枪转化的基本原理是以高压氦气作为动力由可裂膜(rupture disk)控制释放,将携带质粒DNA金粉微粒(microcarries)的载体膜(macrocarrier)加速,载体膜被阻挡网(stopping screen)阻挡后,包裹外源DNA的金属子弹高速穿透细胞,将目标DNA导入靶细胞(图1)。在利用基因枪转化植物细胞时,需要根据物种和外植体优化两个方面的参数:(1)子弹制备参数,包括金粉大小和用量、DNA用量以及金粉的比例、氯化钙和亚精胺的用量等;

(2) 轰击参数,主要包括轰击压力、距离等。这些参数均影响植物组织的受伤程度和再生效果、DNA 转入状况以及最终的转化效率。

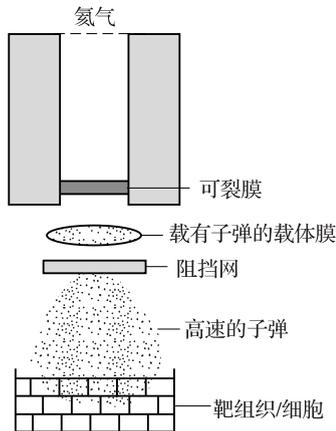


图 1 基因枪转化植物细胞原理简图

Fig. 1 Diagram of the principle of particle gun delivery system

## 2.1 子弹制备参数

**2.1.1 金粉大小和用量** 在子弹制备过程中使用最广泛的微粒是 Bio-Rad 公司生产的直径为  $1.0\ \mu\text{m}$  的金粉颗粒(表 1)。但 S. Rasco-Gaunt 等<sup>[22]</sup>发现  $0.6\ \mu\text{m}$  的金粉相比  $1.0\ \mu\text{m}$  的金粉,对植物细胞的损伤程度小,轰击效果好。认为  $1.0\ \mu\text{m}$  的金粉在子弹制作过程中更容易发生聚丛,对细胞的机械损伤更大。J. A. O'Brien 等<sup>[67]</sup>采用  $40\ \text{nm}$  的金粉颗粒轰击动物细胞,取得了与常规子弹相同的转化效果,显著减少了基因枪轰击造成的组织损伤。由此可见,在保证轰击效果的前提下尽量选用直径较小的金粉颗粒,以减少对生物细胞的机械损伤。

关于单枪金粉用量的选择,在目前的报道中千差万别(表 1)。在最早利用基因枪转化小麦的研究中,J. T. Weeks 等<sup>[13]</sup>使用的单枪金粉用量为  $583\ \mu\text{g}$ , N. S. Nebra 等<sup>[68]</sup>用量为  $500\ \mu\text{g}$ 。安海龙等<sup>[69]</sup>等认为,在  $30\sim 500\ \mu\text{g}$  范围内金粉用量与 GUS 蓝斑数间基本呈线性关系,即金粉用量越高,GUS 蓝斑数越多。M. S. Greer 等<sup>[59]</sup>发现,单枪金粉用量  $1250\ \mu\text{g}$  相比  $625\ \mu\text{g}$  GUS 基因瞬时表达率和稳定表达率均显著提高。D. Becker 等<sup>[70]</sup>比较了单枪金粉用量  $29.2\ \mu\text{g}$  和  $116.6\ \mu\text{g}$  对小麦幼胚转化后 GUS 瞬时表达率和植株再生率的影响,发现瞬时表达率没有显著差异,但植株再生率前者显著高于后者。F. Altpeter 等<sup>[14]</sup>比较了  $30\ \mu\text{g}/\text{枪}$  和  $100\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉用量对小麦幼胚转化效果的影响,发现在瞬时表达方面(GUS 蓝斑

数)  $100\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉用量比  $30\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉用量高约  $53\%$ ,但  $100\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉用量影响植株再生,降低了最终的转化率,认为  $30\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉用量比较合适。S. Rasco-Gaunt 等<sup>[22]</sup>对基因枪轰击小麦幼胚的多个参数进行了优化,认为单枪金粉用量以  $29\sim 235\ \mu\text{g}$  为宜, $59\ \mu\text{g}/\text{枪}$  最适,金粉量过低(如  $15\ \mu\text{g}$ )时不能为 DNA 包裹提供足够的表面积,影响转化效率,但金粉量过大会影响转化愈伤组织的再生。然而,A. Perl 等<sup>[64]</sup>采用  $250\ \mu\text{g}/\text{枪}$  的金粉用量,J. P. A. Ortiz 等<sup>[66]</sup>、傅荣昭等<sup>[71]</sup>采用  $200\ \mu\text{g}/\text{枪}$  的金粉用量,也取得了较好的转化结果。梁辉等<sup>[72]</sup>对金粉和 DNA 用量进行了梯度试验,认为  $250\ \mu\text{g}$  金粉/枪时 GUS 基因瞬时表达率提高。夏晓晖等<sup>[73]</sup>发现,在  $100\sim 300\ \mu\text{g}$  范围内,随着金粉用量的增加,转化幼胚中 GUS 基因瞬时表达率亦逐步提高,但继续增加金粉用量反而降低。S. Rasco-Gaunt 等<sup>[22]</sup>的研究结果表明, $120\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉的转化率略高于  $60\ \mu\text{g}/\text{枪}$  金粉的转化率,但差异并不显著。所以,C. Tamás-Nyitrai 等<sup>[21]</sup>转化小麦也采用了  $120\ \mu\text{g}/\text{枪}$  的金粉用量。

表 1 基因枪转化小麦典型研究的主要技术参数

Table 1 Main technical parameters of typical researches on wheat biolistic transformation

金粉用量 ( $\mu\text{g}/\text{枪}$ )	DNA 用量 ( $\text{ng}/\text{枪}$ )	轰击压力 (psi)	转化率 (%)	参考文献
Gold amount	DNA amount	Bombardment pressure	Transformation efficiency	References
ND	ND	900	0 ~ 73.50	[12]
583	7000	1100	0.10 ~ 0.20	[13]
30	ND	ND	1.52	[14]
120	294	ND	ND	[21]
59	294	650	ND	[22]
1250	625	ND	1.70 ~ 12.90	[59]
160	800 ~ 1000	1100	0.88	[60]
250	1000	ND	ND	[64]
500	1670	ND	1.43	[68]
500	833	ND	ND	[69]
29	73	900 ~ 1550	1.14	[70]
100 ~ 400	2000	1300	ND	[73]
59	294	650	2.66	[74]
ND	ND	1300	9.70	[82]

ND: Not determined

**2.1.2 DNA 用量** 在基因枪转化体系中,DNA 用量是影响小麦幼胚转化效率的另一个关键因素。不

同研究者采用的 DNA 用量差别很大,单枪 DNA 用量 73 ~ 7000 ng (表 1)。梁辉等<sup>[72]</sup>对金粉和 DNA 用量进行了梯度试验,认为 DNA 用量 500 ng/枪时 *GUS* 基因瞬间表达率明显提高。夏晓晖等<sup>[73]</sup>发现,在每枪金粉用量为 150  $\mu\text{g}$  的条件下,每枪 DNA 用量 0.5 ~ 2.0  $\mu\text{g}$  范围内,*GUS* 表达值随 DNA 用量的增加逐渐升高,当用量为每枪 3  $\mu\text{g}$  时 *GUS* 表达值反而下降。S. Rasco-Gaunt 等<sup>[22]</sup>发现, DNA 用量 147 ~ 1176 ng/枪时 *GUS* 表达水平没有显著变化,认为 294 ng/枪最为合适。

适宜的 DNA 用量与小麦转化效率密切相关。当金粉用量恒定的情况下,金粉所能附着的 DNA 量有限,过量时多余的 DNA 不能稳定附着在金粉颗粒上,导致金粉聚丛形成团块状。这些团块状态的子弹轰击时穿入细胞的效果较差,而且会大量杀伤细胞。因此,在避免子弹聚丛成团块状的同时,尽可能增加 DNA 用量有助于提高转化效率。

氯化钙和亚精胺是子弹制备过程中不可或缺的成分,可协助 DNA 附着在金粉颗粒上。氯化钙的浓度一般 0.2 ~ 1.5 mol/L,超过 2.0 mol/L 时 *GUS* 瞬时表达率明显下降。亚精胺的浓度通常 8 ~ 16 mmol/L,超过 80 mmol/L 时 *GUS* 瞬时表达率明显下降<sup>[22]</sup>。制备转化小麦幼胚子弹时大多使用的标准用量为氯化钙 1 mol/L,亚精胺 16 mmol/L。

## 2.2 轰击参数

目前,多利用 Bio-Rad 公司的 PDS-1000/He 基因枪转化小麦,大部分参数按照使用说明的标准值设置即可,如可裂膜与载体膜的间距多为 2.5 cm,载体膜与阻挡网的间距多为 0.8 cm,真空度多采用 27 ~ 28 英尺汞柱(91.4 ~ 94.8 kPa)等<sup>[14,22,66]</sup>。

S. Rasco-Gaunt 等<sup>[22]</sup>的研究结果表明,轰击压力 650、900 和 1100 psi 时没有显著差异,采用 1300 或 1550 psi 时 *GUS* 瞬时表达率下降。650 psi 相比 1550 psi,*GUS* 表达蓝点数更均匀,对细胞的损伤程度也较轻。因此,建议采用 650 psi 或 900 psi,轰击强度不超过 1100 psi。闵东红等<sup>[74]</sup>发现,650 psi 和 900 psi 轰击压相比,对 *GUS* 瞬时表达没有明显影响,当用 1100 psi 时 *GUS* 瞬时表达率明显下降。但也有些研究采用 1100 psi 和 1300 psi 轰击压力进行小麦幼胚转化(表 1)。

在轰击距离方面,大部分报道采用 5.5 cm (样品板位于基因枪样品室的第二隔层)<sup>[14,22,66]</sup>。一般认为,轰击距离增加会降低 *GUS* 瞬时表达率,9 cm 轰击距离其 *GUS* 基因瞬时表达量明显低于 6 cm

的。但 K. V. Indra 等<sup>[75]</sup>则认为,轰击距离 12 cm 比 6 cm 或 9 cm 时金粉分布更均匀,轰击效果更理想。

## 3 筛选策略

### 3.1 筛选标记基因和筛选剂选择

对转化后的小麦幼胚组织进行筛选主要利用 *bar*、*nptII*、*hpt* 等筛选标记基因。*bar* 基因编码的草丁膦乙酰转移酶基因赋予植物细胞对 bialaphos 等(活性成分为 PPT)除草剂的抗性,*npt II* 或 *aphA* 基因编码的新霉素磷酸转移酶基因使植物细胞获得对氨基糖苷类抗生素如卡那霉素(kanamycin)、G418 (geneticin)、巴龙霉素(paromomycin)的抗性,*hpt* 基因编码的潮霉素磷酸转移酶赋予植物细胞潮霉素(hygroscopicin)抗性。J. P. A. Ortiz 等<sup>[66]</sup>比较了分别利用 *hpt* 和 *bar* 作为筛选标记的筛选效果和转化效果,发现利用 *hpt* 基因时的转化率为 5.5%,利用 *bar* 基因时的转化率为 2.6%,认为 *hpt* 基因效果好于 *bar* 基因。B. Witzens 等<sup>[76]</sup>比较了上述 3 种筛选标记的转化效果,得出了相反结论,只从 *bar* 基因和 *aphA* 基因作为筛选标记的转化试验中获得了稳定转化植株,没有从 *hpt* 基因的转化试验中获得转基因植株。N. S. Nehra 等<sup>[68]</sup>比较了 *npt II* 基因与 *bar* 基因作为筛选标记的转化效果,前者转化率为 0.7% ~ 2.5%,后者转化率为 0.1% ~ 1.5%,认为 *npt II* 基因的筛选效果好于 *bar* 基因。H. Zhou 等<sup>[65]</sup>以草甘膦抗性(glyphosate tolerant)基因 *CP4* 和草甘膦氧化还原酶(glyphosate oxidoreductase)编码基因 *GOX* 作为筛选标记,以 2 mmol/L 草甘膦作为筛选剂转化小麦也获得了转基因植株。本实验室<sup>[77]</sup>也曾系统研究了 3 种标记基因对应不同筛选剂筛选小麦转化细胞的效果,表明 *npt II* 筛选标记利用 G418 作为选择剂效果最好,适宜用量为 25 ~ 50 mg/L,而不能用卡那霉素和新霉素进行筛选,原因是小麦细胞对这 2 种抗生素具有很高的天然抗性;*bar* 基因筛选标记可以利用 PPT、bialaphos、glufosinate 等作为选择剂,适宜用量为 3 ~ 5 mg/L;*hpt* 筛选标记对应潮霉素的适宜用量为 30 ~ 50 mg/L。傅荣昭等<sup>[71]</sup>指出,由于受体品种和外植体类型不同,适宜的筛选剂也不尽相同。

另外,有些报道采用磷酸甘露糖异构酶(PMI, phosphomannose isomerase)基因作为筛选标记<sup>[78-80]</sup>,将转化后的小麦靶组织转移到以甘露糖作为唯一碳源的培养基上进行筛选,认为甘露糖的适宜筛选浓度为 5 ~ 10 g/L,转化体可以利用甘露糖作为碳源确

保正常生长,非转化细胞饥饿致死。其中,A. Gadaleta 等<sup>[79]</sup>比较了 *PMI* 基因和 *bar* 基因作为筛选标记基因的筛选效率,前者的筛选效率高达 90.1% (表达筛选标记的植株数/再生植株数),远高于后者的 26.4%。T. Ogawa 等<sup>[48]</sup>以突变的水稻乙酰乳酸合酶(ALS, acetolactate synthase)编码基因作为筛选标记,以 0.25 ~ 1.0 mg/L 双草醚(BS, bispyribac sodium)作为筛选剂,转化小麦新鲜幼胚获得了转基因植株,转化率为 5.6% ~ 16.7%。

### 3.2 筛选强度及时间

筛选强度取决于选择剂浓度和筛选时间。理论上讲,理想的选择剂浓度及筛选时间应该能够使未转化的组织或细胞全部致死,但就小麦而言,在致死筛选强度下,抗性愈伤组织很难再生植株。转化后何时进行筛选应根据外植体类型和愈伤组织状态确定,过早进行筛选,外源基因向基因组上的稳定整合尚未完成;过迟进行筛选,未转化的细胞可能逃逸。

基因枪转化小麦的多数研究采用以预培养 5 ~ 7 d 的幼胚愈伤组织作为受体材料<sup>[11,13-14,36-39,76,81]</sup>,轰击后的靶组织在不含筛选剂的培养基上恢复培养 1 ~ 2 周,然后在含较低浓度筛选剂(如 bialophos 2 ~ 3 mg/L)的培养基上培养 2 ~ 3 周获得抗性愈伤组织,最后在含较高浓度筛选剂(如 bialophos 5 mg/L)的培养基上分化植株。这种筛选方式不能有效抑制未转化细胞的生长,假阳性比例较高。J. T. Weeks 等<sup>[13]</sup>以小麦新鲜幼胚为受体材料,基因枪转化后恢复培养 12 ~ 14 d,然后转移到含高浓度 PPT(5 mg/L)的培养基上筛选转化体。S. Rasco-Gaunt 等<sup>[22,45]</sup>、T. Ogawa 等<sup>[48]</sup>以小麦新鲜幼胚为受体材料,基因枪转化后不经过恢复培养,直接转移到含双草醚的培养基上对转化细胞进行筛选。L. Zhang 等<sup>[81]</sup>将轰击后的小麦愈伤组织(预培养 5 ~ 7 d)经过渗透处理后,直接转移到含 bialophos 5 mg/L 的高压筛选培养基上进行筛选、分化、壮苗、生根,获得了 9.7% 转化率,有效抑制了假阳性植株的产生。认为低浓度筛选剂(bialophos 2 ~ 3 mg/L)对小麦细胞不具有筛选效果,转化后的小麦愈伤组织必须在高浓度筛选剂(bialophos 5 mg/L)进行长时间(2 ~ 3 个月)筛选,获得的抗性愈伤组织在筛选培养基上继代培养 11 个月之久仍然保持较好的再生潜力。

## 4 思考与展望

迄今为止,利用基因枪介导法已经将多个外源目标基因转入了小麦,基本建立了基因枪转化小麦

的技术体系<sup>[4,82-83]</sup>。如本课题组以 F. Altpeter 等<sup>[14]</sup>报道的转化程序为基础,将一些抗旱、抗病相关基因转入了不同小麦品种<sup>[84-89]</sup>,培育了抗旱、抗病小麦新种质,拓宽了基因枪转化小麦的受体基因型<sup>[82]</sup>。总体来说,基因枪转化小麦的效率还比较低(0 ~ 5%)<sup>[82-83]</sup>。尽管在一些文献中报道,基因枪转化小麦的效率达 5% ~ 16%<sup>[48,66,78,81]</sup>,甚至高达 60% ~ 70%<sup>[12]</sup>,但这些结果缺乏可重复性。因此,需要进一步优化基因枪转化小麦的影响因素,切实提高小麦转化效率,促进小麦品种改良和功能基因组研究。

根据笔者的经验,再生能力强的小麦品种都可利用基因枪进行转化,但转化效率高与材料生理状态、预培养时间、轰击参数和筛选程序等因素密切相关。多数报道中描述,小麦转化材料供体植株生长的温度条件为 20 ~ 22 °C 白天/15 ~ 18 °C 夜间,光周期条件为 14 ~ 16 h 光照/8 ~ 10 h 黑暗。关于预培养时间,多数研究对幼胚进行 5 ~ 9 d 预培养,少数研究采用新鲜幼胚进行转化。本课题组对新鲜幼胚进行基因枪转化没有获得抗性愈伤组织以及转基因植株,可能刚剥离的幼胚或盾片组织处于适应外界环境的调整期,此时对其进行轰击,造成的伤害不易恢复。如果预培养时间过长,胚性愈伤组织或胚状体已基本形成,获得嵌合体转基因植株的频率较高或难以获得转基因植株。小麦幼胚经过 7 d 预培养,结构比较致密,盾片组织开始进入快速增殖期,处于完成脱分化、启动再分化状态,细胞分裂活跃,不仅对机械伤害有较强的耐受力,而且基因枪轰击后恢复能力强,转化后立即进入细胞旺盛分裂及形成胚状体时期,有利于外源基因整合及转化植株的获得。具体预培养时间应根据基因型和外植体类型来确定。金粉规格一般为直径 1.0 μm,用量多数采用 60 ~ 120 μg/枪, DNA 用量大多采用 0.5 ~ 1.0 μg/枪,轰击压力一般采用 900 psi 或 1100 psi,轰击距离一般为 5.5 cm。单位面积上细胞接受的金粉颗粒数增多,可提高 *GUS* 瞬时表达率,但金粉用量过多会导致细胞损伤程度加重,影响植株再生及外源基因整合和表达。因此,适当的金粉用量是获得转化成功的关键因素之一。一般来说,在避免对细胞造成较大损伤的前提下,尽可能增加金粉用量,有助于提高转化效率。

筛选标记的选用不仅关系到获得转基因植株的效率,也关系到转基因材料的安全性评价和后续产业化进程。目前,小麦基因枪转化体系中大多以 *bar* 基因作为筛选标记, bialophos 作为筛选试剂。来源

于植物的 *PMI*、*ALS* 等筛选标记基因具有利用前景, 需要进一步研究。无论采用哪种筛选标记, 对转化细胞进行及时、有效筛选是获得转基因植株的重要环节。多数研究采用 1~2 周的恢复培养, 然后加入筛选剂, 并逐步提高筛选压力<sup>[13-14, 22]</sup>。一些研究者主张转化后直接对靶标材料进行筛选<sup>[22, 48, 60]</sup>, 尽早抑制非转化细胞生长, 减少假阳性。L. Zhang 等<sup>[81]</sup>对轰击后的小麦愈伤组织直接用高浓度 bialophos (5 mg/L) 进行筛选, 认为低浓度 bialophos (2 mg/L) 没有筛选效果, 不能获得阳性转基因植株。但是, A. Pellegrineschi 等<sup>[44]</sup>基因枪转化后恢复培养 20 d 用高浓度 PPT (5 mg/L) 进行筛选, A. Gadaleta 等<sup>[49]</sup>轰击后恢复培养 3 周用中等浓度 bialophos (3 mg/L) 进行筛选, J. P. A. Ortiz 等<sup>[66]</sup>转化后恢复培养 2 d 用低浓度潮霉素 (25 mg/L) 或 glufosinate (1 mg/L) 进行筛选, 也获得了转基因植株。综合这些报道, 笔者认为转化后可省略恢复培养环节, 直接用中等筛选剂浓度进行筛选, 然后根据材料长势情况提高或保持筛选剂浓度, 同时还应根据所用的小麦基因型确定适宜的筛选剂用量。

在其他植物中, 农杆菌转化效率显著高于基因枪, 原因在于农杆菌分泌到植物细胞中的毒性蛋白 VirD、VirE、VirF、VirB 等对同时进入植物细胞的 T-DNA 具有保护和核定位的作用<sup>[90]</sup>。G. Hansen 等<sup>[91]</sup>根据农杆菌侵染后 T-DNA 在植物细胞中转运的原理, 将农杆菌效应蛋白编码基因 *VirD2*、*VirE2* 构建到植物表达载体上, 利用基因枪轰击植物细胞, 发现转化率有所提高, 提出了 Agrolistic 转化技术。为了进一步提高基因枪转化植物的效率, 需要深入研究基因枪轰击后外源 DNA 在植物细胞中转运和进入细胞核的机理。本课题组结合农杆菌转化和基因枪转化的优点, 设想先用基因枪将线状 T-DNA (二侧含 LB 和 RB) 转入小麦细胞, 然后用农杆菌侵染, 向基因枪轰击的小麦细胞中分泌 Vir 效应蛋白, 保护基因枪轰击的 T-DNA 在小麦细胞中的完整性, 协助 T-DNA 在小麦细胞中的转运和整合, 以此来提高基因枪转化小麦的效率。

## 参考文献

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Nat Biotechnol, 1992, 10: 667-674
- [2] 赵慧, 张正斌, 徐萍. 转基因小麦目录 [J]. 麦类作物学报, 2005, 25(4): 116-126
- [3] 李根英, 何中虎, 夏先春, 等. 小麦基因转化研究进展 [J]. 麦类作物学报, 2007, 27(5): 923-927
- [4] 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
- [5] Maës O C, Chibbar R N, Caswell K, et al. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat; effects of physical, physiological and genetic factors [J]. Plant Sci, 1996, 121: 75-84
- [6] Bommineni V, Jauhar P. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat [J]. Plant Sci, 1996, 116: 197-203
- [7] Jimenez V M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones [J]. Rev Bras Fisiol Veg, 2001, 13: 196-223
- [8] Eudes F, Acharyl S, Larochel A, et al. A novel method to induce direct somatic embryos, secondary embryogenesis and regeneration of fertile cereal plants [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 73: 147-157
- [9] Li W, Ding C H, Hu Z, et al. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat [J]. Plant Sci, 2003, 164: 1079-1085
- [10] Popelka J C, Xu J P, Altpeter F, et al. Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker free transgenic rye [J]. Transgenic Res, 2003, 12: 587-596
- [11] Takumi S, Shimada T. Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues [J]. Genes Genet Syst, 1997, 72: 63-69
- [12] Pellegrineschi A, Noguera L M, Skovmand B, et al. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants [J]. Genome, 2002, 45: 421-430
- [13] Weeks J T, Anderson O D, Blechl A E. Rapid Production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077-1084
- [14] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, et al. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants [J]. Plant Cell Rep, 1996, 16: 12-17
- [15] Zeller S L, Kalinina O, Brunner S, et al. Transgene × environment interactions in genetically modified wheat [J]. PLoS One, 2010, 5: 1-8
- [16] Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, et al. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 17023-17028
- [17] Cantu D, Pearce S P, Distelfeld A. Effect of the down-regulation of the high grain protein content (GPC) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 492
- [18] Bahrini I, Ogawa T, Kobayashi F, et al. Overexpression of the pathogen-inducible wheat *TaWRKY45* gene confers disease resistance to multiple fungi in transgenic wheat plants [J]. Breed Sci, 2011, 61: 319-326
- [19] Gil-Humanes J, Pistón F, Giménez M J, et al. The introgression of RNAi silencing of  $\gamma$ -gliadins into commercial lines of bread wheat changes the mixing and technological properties of the dough [J]. PLoS One, 2012, 7: e45937
- [20] Real A, Comino I, de Lorenzo L, et al. Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease [J]. PLoS One, 2012, 7: e48365
- [21] Tamás-Nyitrai C, Jones H D, Tamás L. Biolistic- and *Agrobacterium*-mediated transformation protocols for wheat [M]. Methods Mol Biol, 2012, 877: 357-384
- [22] Rasco-Gaunt S, Riley A, Barcelo P, et al. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues [J]. Plant Cell Rep, 1999, 19: 118-127
- [23] Rasco-Gaunt S, Barcelo P. Immature inflorescence culture of cere-

- als; a highly responsive system for regeneration and transformation [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 111: 71-81
- [24] He G Y, Lazzeri P A. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures[J]. *Euphytica*, 2001, 119: 369-376
- [25] Barcelo P, Hagel C, Becker D, et al. Transgenic cereal (*Triticum aestivum*) plants obtained at high-efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue[J]. *Plant J*, 1994, 5: 583-592
- [26] Delporte F, Mostade O, Jacquemin J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, 67: 73-80
- [27] Patnaik D, Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli[J]. *BMC Plant Biol*, 2003, 3: 5
- [28] Parmar S S, Sainger M, Chaudhary D, et al. Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars[J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2012, 18: 177-183
- [29] 陶丽莉, 殷桂香, 叶兴国. 小麦成熟胚组织培养及遗传转化研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2008, 28(3): 713-718
- [30] Brisibe E A, Gajdosova A, Olesen A, et al. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat[J]. *J Exp Bot*, 2000, 51: 187-196
- [31] 韩晓峰, 陶丽莉, 殷桂香, 等. 基因型和环境条件对小麦花药培养效果的影响[J]. *作物学报*, 2010, 36(7): 1209-1215
- [32] 叶兴国, 徐惠君, 徐琼芳, 等. 小麦花药培养力的基因型差异和配合力分析[J]. *中国农业科学*, 1997, 30(6): 49-54
- [33] Belchev I, Tchordadjieva M, Pantchev I, et al. Effect of 5-azacytidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Bulg J Plant Physiol*, 2004, 30: 45-50
- [34] Oard J H, Paige D F, Simmonds J A, et al. Transient gene expression in maize, rice, and wheat cells using an airgun apparatus [J]. *Plant Physiol*, 1990, 92(2): 334-339
- [35] Chugh A, Khurana P. Regeneration via somatic embryogenesis from leaf basal segments and genetic transformation of bread and emmer wheat by particle bombardment[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2003, 74: 151-161
- [36] Blechl A E, Anderson O D. Expression of a novel high-molecular-weight gluten subunit gene in transgenic wheat[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(7): 875-879
- [37] Barro F, Rooke L, Békés F, et al. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 1295-1299
- [38] Rooke L, Bekes F, Fido R, et al. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength [J]. *J Cereal Sci*, 1999, 30: 115-120
- [39] Anand A, Zhou T, Trick H N, et al. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54: 1101-1111
- [40] Janni M, Sella L, Favaron F, et al. The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* [J]. *Mol Plant Microbe In*, 2008, 21: 171-177
- [41] Fahim M, Ayala-Navarrete L, Millar A A, et al. Hairpin RNA derived from viral *NIa* gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants[J]. *Plant Biotechnol J*, 2010, 8: 821-834
- [42] Patnaik D, Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli[J]. *BMC Plant Biol*, 2003, 3: 5-15
- [43] Hess J R, Carman J G. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels [J]. *Crop Sci*, 1998, 38(1): 249-253
- [44] Pellegrineschi A, Brito R M, Velazquez L, et al. The effect of pre-treatment with mild heat and drought stresses on the explant and biolistic transformation frequency of three durum wheat cultivars [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 20: 955-960
- [45] Rasco-Gaunt S, Riley A, Cannell M, et al. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 865-874
- [46] Zhang L, Rybczynski J J, Langenberg W G, et al. An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 241-250
- [47] Sparks C A, Jones H D. Biolistics transformation of wheat [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 478: 71-92
- [48] Ogawa T, Kawahigashi H, Toki S, et al. Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1325-1331
- [49] Gadaleta A, Blechl A E, Nguyen S, et al. Stably expressed D-genome-derived HMW glutenin subunit genes transformed into different durum wheat genotypes change dough mixing properties [J]. *Mol Breeding*, 2008, 22: 267-279
- [50] Barro F, Cannell M E, Lazzeri P A, et al. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 684-695
- [51] Dias J S, Martins M G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes [J]. *Sci Hortic*, 1999, 82: 299-307
- [52] Sahrawat A K, Becker D, Lütticke H, et al. Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 1147-1168
- [53] Pastori G M, Wilkinson M D, Steele S H, et al. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 857-863
- [54] Fadeev V S, Shimshilashvili H R, Gaponenko A K. Induction, regeneration, and biolistic sensitivity of different genotypes of common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genetika*, 2008, 44(9): 1257-1267
- [55] He D G, Yang Y M, Scott K J. The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Sci*, 1989, 64: 251-258
- [56] Jimenez J M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones [J]. *Braz J Plant Physiol*, 2001, 13: 196-223
- [57] Kothari S L, Agarwal K, Kumar S, et al. Inorganic nutrient manipulation for highly improved in vitro plant regeneration in finger millet-*Elusine coracana* (L.) gaertn [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2004, 40: 515-519
- [58] Grimes H D, Hodges T K. The inorganic NO<sub>3</sub>: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Plant Physiol*, 1990, 136: 362-367
- [59] Greer M S, Kovalchuk I, Eudes F. Ammonium nitrate improves direct somatic embryogenesis and biolistic transformation of *Triticum aestivum*. [J]. *N Biotechnol*, 2009, 26: 44-52
- [60] 梁辉, 唐顺学, 张弛, 等. 提高小麦基因枪转化频率的研究 [J]. *遗传学报*, 1999, 26(6): 643-648
- [61] Takumi S, Shimada T. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues; frequency is influenced by culture duration [J]. *Plant Physiol*, 1996, 149: 418-423
- [62] Vain P, Michael D M, Finer J F. Treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(2): 84-88

- [63] Iglesias V A, Gisel A, Bilanz R, et al. Transient expression of visible marker genes in meristem cells of wheat embryos after ballistic micro-targeting[J]. *Planta*, 1994, 192: 84-91
- [64] Perl A, Kless H, Blumenthal A, et al. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization[J]. *Mol Gen Genet*, 1992, 235: 279-284
- [65] Zhou H, Arrowsmith J W, Fromm M E, et al. Glyphosate-tolerant *CP4* and *GOX* genes as a selectable marker in wheat transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 1995, 15: 159-163
- [66] Ortiz J P A, Reggiardo M I, Ravizzini R A, et al. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 877-881
- [67] O'Brien J A, Lummis S C R. Nano-biolytics: a method of biolytic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nano-meter-sized projectiles [J]. *BMC Biotechnol*, 2011, DOI: 10.1186/1472-6750-11-66
- [68] Nehra N S, Chibbar R N, Leung N, et al. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs [J]. *Plant J*, 1994, 5: 285-297
- [69] 安海龙, 卫志明, 黄健秋. 基因枪法转化小麦的金粉用量及转基因植株表型特征分析[J]. *植物生理学报*, 2001, 27(1): 21-27
- [70] Becker D, Bretschneider R, Lörz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue [J]. *Plant J*, 1994, 5(2): 299-307
- [71] 傅荣昭, 曹光诚, 马江生, 等. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报[J]. *遗传学报*, 1997, 24(4): 358-361
- [72] 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
- [73] 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(3): 42-45
- [74] 闵东红, 何莎, 张彦, 等. 基因枪转化小麦主要轰击参数的优化[J]. *作物学报*, 2013, 39(1): 60-67
- [75] Indra K V, Vimla V. Transformation of wheat via particle bombardment[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 318: 273-283
- [76] Witzens B, Brettell R I S, Murray F R, et al. Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment[J]. *Aust J Plant Physiol*, 1998, 25: 39-44
- [77] 叶兴国, 徐惠君, 杜丽璞, 等. 小麦遗传转化几个因素的研究[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(2): 128-134
- [78] Wright M, Dawson J, Dunder E, et al. Efficient biolytic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker[J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 429-436
- [79] Gadaletta A, Giancaspro A, Blechl A, et al. Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation[J]. *J Cereal Sci*, 2006, 43: 31-37
- [80] Stoykova P, Stoeva-Popova P. *PMI* (*manA*) as a nonantibiotic selectable marker gene in plant biotechnology[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2011, 105: 141-148
- [81] Zhang L, Rybczynski J J, Langenberg W G, et al. An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 241-250
- [82] 叶兴国, 陈明, 杜丽璞, 等. 小麦转基因方法及其评述[J]. *遗传*, 2011, 33(5): 422-430
- [83] Li J R, Ye X G, An B Y, et al. Genetic transformation of wheat: current status and future prospects [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2012, 6: 183-193
- [84] Gao S Q, Chen M, Xia L Q, et al. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, *GhDREB*, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat[J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 301-311
- [85] 张双喜, 徐兆师, 张改生, 等. 转 *W16* 小麦抗旱新品系的创制及抗旱生理机制分析[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(24): 4971-4979
- [86] Rong W, Qi L, Wang A Y, et al. The ERF transcription factor *TaERF3* promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat [J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, doi:10.1111/pbi.12153
- [87] Zhang Z Y, Liu X, Wang X D, et al. An R2R3 MYB transcription factor in wheat, *TaPIMP1*, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought stresses through regulation of defense- and stress-related genes[J]. *New Phytol*, 2012, 196: 1155-1170
- [88] Li Z, Zhou M P, Zhang Z Y, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Funct Integr Genomic*, 2011, 11: 63-70
- [89] Chen M, Sun L Y, Wu H Y, et al. Durable field resistance to wheat yellow mosaic virus in transgenic wheat containing the antisense virus polymerase gene[J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, doi: 10.1111/pbi.12151
- [90] Ziemiencowicz A, Merkle T, Schoumacher F, et al. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins[J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 369-383
- [91] Hansen G, Chilton M D. "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T-strands generated *in planta* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 14978-14983