

小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究

朱晋云¹, 许玉娟¹, 杨丽萍¹, 亢秀丽¹, 孙毅², 杜建忠²(¹ 山西省农业科学院小麦研究所, 临汾 041000; ² 山西省农业科学院生物技术中心, 太原 030031)

摘要:通过对晋麦 47、鲁麦 14、晋阳 345、晋麦 31 等 4 个小麦品种的组织培养再生系统研究, 结果表明, 在 MS 基本培养基中加入 Kao's 有机化合物和 T 维生素后, 小麦幼胚性愈伤组织诱导率提高 31.4% ~ 42.4%, 植株再生能力提高 50% ~ 80%。对幼胚愈伤组织进行低温预处理和在农杆菌转化时添加 AS 处理后, 经 PPT 筛选获得大量正常再生植物, PCR 及 Southern 杂交检测证明其中 28 株再生植株呈阳性, 这些植株明显提高了对 basta 的抗性。

关键词:小麦; 愈伤组织; 农杆菌; 遗传转化

Study of Wheat Tissue Culture Regeneration System and Genetic Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

ZHU Jin-yun¹, XU Yu-juan¹, YANG Li-ping¹, KANG Xiu-li¹, SUN Yi², DU Jian-zhong²(¹ Institute of Wheat Research, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Linfen 041000;² Bioengineering Research Center, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan 030031)

Abstract: Tissue culture regeneration system of wheat varieties Jinmai 47, Lumai 14, Jinyang 345 and Jinmai 31 were studied. The results indicated that when Kao's organic compound and T vitamins were supplemented on MS basic medium, the frequency of embryogenic callus induction increased by 31.4% ~ 42.4%, and frequency of plant regeneration increased by 50% ~ 80%. Wheat culms were pretreated in lower temperature condition and aceto-syringone (AS) were simultaneously put in bacterial liquid medium and culms medium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. PPT selection and further PCR and Southern blot test demonstrated that bar gene has been integrated into plant genome.

Key words: Wheat; Calli; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation

有效的农杆菌介导的小麦转基因技术体系主要取决于两个方面, 一是建立一个好的植物受体系统, 这是实现基因转化的先决条件, 关系到基因转化的成败^[1]。尽管小麦组织培养已获得成功, 然而它与基因转化受体系统的要求还有一定差距。目前小麦幼胚培养使用最广泛的培养基是 MS 培养基, 该培养基对小麦幼胚的愈伤组织诱导率较高, 基本适宜愈伤组织的生长。但是, 在 MS 培养基上形成的愈伤组织, 多为非胚性愈伤组织, 每个幼胚形成的愈伤组织只能分化出 1 ~ 2 个不定芽, 因此, 用于基因转

化不是一个好的受体系统^[2]。二是建立良好的遗传转化系统^[1]。鉴于农杆菌法在多数双子叶植物和少数单子叶植物上的高转化率, 农杆菌介导的小麦高效转化系统的建立备受关注。Cheng 等^[3]通过农杆菌法首次获得小麦转基因植株, 随后夏光敏等^[4]也报道获得农杆菌介导的小麦转基因植株。目前农杆菌介导的小麦转化仍处在建立和优化完善转化系统阶段^[5], 转化效率还有待提高, 转化体系有效性及转化机理等许多问题都有待解决。为此, 我们在筛选优良受体基因型、优化组织培养再生系

统、增强农杆菌浸染小麦能力等方面做了较深入的研究,旨在建立一种有效的农杆菌介导的小麦遗传转化技术体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取经幼胚组织培养筛选反应较好的晋麦 47、鲁麦 14、晋阳 345、晋麦 31 等 4 个小麦主栽培品种或高代品系为试验材料。

胚性愈伤组织诱导培养基中 MS 培养基为 MS + 2,4-D 2mg/L + 蔗糖 30g/L;MC 培养基为 MS 大量和微量元素 + Kao's 有机酸 + Kao's 糖和醇 + Kao's 维生素 + T 维生素 + 椰乳 20mg/L + 2,4-D 2mg/L;MD 培养基为 MS 大量和微量元素 + kao's 维生素 + T 维生素 + 水解蛋白物 100mg/L + 椰乳 20mg/L + 2,4-D 2mg/L + 蔗糖 30mg/L;分化培养基为 MS + NAA 0.5mg/L + KT 0.5mg/L + 蔗糖 20g/L;MC + NAA 0.5mg/L + KT 0.5mg/L + 蔗糖 20g/L;MD + NAA 0.5mg/L + KT 0.5mg/L + 蔗糖 20g/L。

Kao's 氨基酸:脯氨酸 (proline)、天冬酰胺 (asparagine)、谷氨酰胺 (glutamine)。

Kao's 有机酸:焦硼丙酮酸 (sodium pyruvate)、苹果酸 (mali acid)、柠檬酸 (citric acid)、延胡索酸 (fumaric acid)。

Kao's 糖和醇:果糖 (fructose)、核糖 (ribose)、木糖 (xylose)、甘露糖 (mannose)、鼠李糖 (rhamnose)、纤维二糖 (cellobiose)、山梨糖醇 (sorbitol)、甘露醇 (mannitol)。

Kao's 维生素:泛酸钙 (calcium pantothenate)、氯化胆碱 (choline chloride)、抗坏血酸 (ascorbic acid)、生物素 (biotin)、叶酸 (folic acid)、维生素 B₂ (riboflavin)、对氨基苯甲酸 (p-aminobenzoic acid)、维生素 B₁₂ (cyanocobalamine)、维生素 D₃ (cholecalciferol)。

T 维生素:烟酸 (nicotinic acid)、维生素 B₆ (pyridoxine)、维生素 B₁ (thiamine)。

转化所用农杆菌菌株为 LBA4404,它携带的 Ti 质粒为 pCAMBAR. CHI. 11,该质粒上含有几丁质酶基因、作为筛选标记的 *bar* 基因和潮霉素抗性基因。质粒结构^[6]见图 1。几丁质酶基因具有降解病原真菌细胞壁和菌丝体中几丁质的功能,在防御病原真菌侵害中具有重要作用,*bar* 选择基因对除草剂 Basta 的有效成分 Phosphinothricin (PPT) 具有抗性,PPT 可以加入培养基中,用于选择转化细胞。

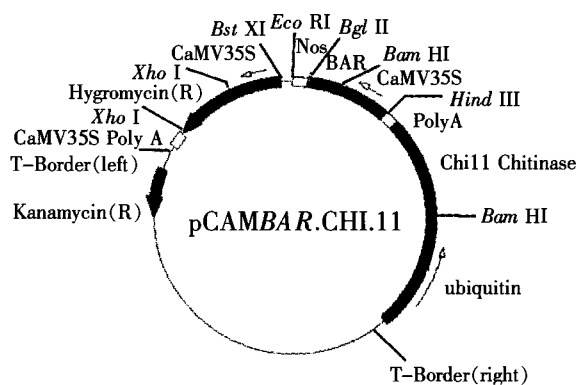


图 1 质粒 pCAMBAR. CHI. 11 物理图谱

Fig. 1 Physical map of plasmid pCAMBAR. CHI. 11

1.2 愈伤组织诱导培养

2003 年 5 月中下旬,从山西省农业科学院小麦研究所试验地采集扬花后 12 ~ 14d 的麦穗,取小麦幼穗中部大小一致的未成熟子粒,将幼胚接种在愈伤组织诱导培养基表面,25℃下暗培养,20d 后转入相同培养基进行继代培养,愈伤组织分化前统计出愈率、胚性愈伤组织诱导率和愈伤组织的生长量。继代 1 次后,随机抽取 10 块愈伤组织转入分化培养基,在 25 ~ 28℃、光强 2000lx 12h/d 条件下分化培养,分化 30d 后统计分化率,分化 60d 后统计出苗率。

1.3 感染液的制备

从平板上挑选单菌落的农杆菌接入 LB + 100 mg/L 卡那霉素液体培养基中,在 25℃、200 rpm 摇床上培养 24 ~ 28h。经离心回收细菌后重新悬浮于 MD 液体培养基中。在农杆菌液体培养时加乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 0.1mmol/L,并分别在 MD 培养基、感染液和培养基中加入 AS,以探讨添加 AS 的最佳时期。

1.4 转化

2004 年 5 月中下旬,将 4 个品种的幼胚接种在 MC、MD 培养基上,培养 15 ~ 20d 后,待幼胚形成的愈伤组织发育完全后,分 3 种处理:①愈伤组织在 25℃常温下培养,每 25d 继代一次;②放入 4℃冰箱,冷处理 1 个月左右,然后在常温下继代培养;③放入 4℃冰箱,冷处理 2 个月左右,从冰箱中取出。8 月上中旬将 3 种处理的愈伤组织分别转入 MC、MD + 乙酰丁香酮 (AS) 0.1mmol/L 培养基中,培养 5 ~ 7d 开始转化。将幼胚愈伤组织转入工程菌感染液中 0.5 ~ 1.0 h,然后转移到 MD 培养基 + AS 0.1mmol/L,共培养 2d,用含有 0.5g/L 头孢唑林钠

的无菌水冲洗愈伤组织,然后用无菌卫生纸吸干多余的液体,将愈伤组织转入 MD + 500 mg/L carbenicillin + 5 mg/L PPT 培养基进行筛选,筛选出的抗性愈伤组织转入 ME 分化培养基 + 0.5g/L 头孢唑林钠 + PPT^[7]。分别在 PPT 1、2、3mg/L 的 3 个浓度下,通过 6~8 周的选择培养后,转入再生培养基 MD + IAA 1mg/L + ZT 1mg/L,再生成苗。

1.5 分子检测

DNA 提取采用改良 SDS 碱裂解法^[7]。PCR 扩增体系为 25 μ l,扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 45 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1min 45 s,30 次循环。根据质粒 *bar* 基因序列设计引物(其扩增片段为 438 bp):上游:5'-AC-CATCGTCAACCACTACAT-3';下游:5'-AGTCCAGCT-GCCAGAAACCC-3'。

Southern 杂交^[8]取 10 μ l PCR 呈阳性的产物进行,用 PCR 地高辛探针标记试剂盒标记质粒中的 *bar* 作为探针,随机引物法标记分子标记,用 CSPD (为商品名,是一种碱性磷酸酶的化学发光底物 chemiluminescent substrate)法检测。

1.6 除草剂抗性检测

用 2‰ Basta 液点涂转化苗(T_0 代)的叶片,用 2‰ Basta 液喷洒转化种子苗(T_1 代),10d 后检测转化苗对除草剂的抗性。

2 结果与分析

2.1 3 种不同培养基对小麦幼胚胚性愈伤组织的影响

采用 3 种培养基作为小麦幼胚愈伤组织诱导培养基,试验观察发现,MC 和 MD 培养基上生成的愈伤组织质量较好,颜色淡黄,细胞结构紧密,不透明,表面光滑,有大小不一的节状突起,多为胚性愈伤组织。而 MS 培养基上生成的愈伤组织质量较差,多数愈伤组织为灰白色,细胞结构松散,略带透明,表面粗糙^[2]。小麦幼胚在 3 种培养基上出愈率都较高,但胚性愈伤组织诱导率存在着显著差异,MC 培养基上平均胚性愈伤组织诱导率为 87.8%,比 MS 培养基高 42.4%(表 1)。MD 培养基上平均胚性愈伤组织诱导率为 76.8%,比 MS 培养基高 31.4%。

小麦幼胚离体培养 30d 后,3 种培养基上的每个品种(系)都随机抽取 50 块愈伤组织称量其鲜重和干物质质量。MC 培养基上平均愈伤组织鲜重为 184.6mg,比 MS 培养基高 67.2mg(表 1)。MD 培养基上平均胚性愈伤组织鲜重为 165.1mg,比 MS 培养基高 47.7mg。MC 培养基上平均愈伤组织干物质质量为 29.3mg,比 MS 培养基高 7.5mg。MD 培养基上平均胚性愈伤组织干物质质量为 27.9mg,比 MS 培养基高 6.1mg。

表 1 3 种不同培养基对小麦幼胚胚性愈伤组织及继代 1 次后出苗率的影响

Table 1 Effect of three different medium on wheat embryogenic calli

培养基 Medium	材料 Cultivars and lines	出愈率(%) Frequency of callus induction	胚性愈伤组织诱导率(%) Frequency of embryogenic callus induction	培养 30d 后愈伤组 织鲜重(mg/块) Callus fresh weight	培养 30d 后愈伤组织 干物质量(mg/块) Callus dry weight	继代 1 次后每块愈伤 组织分化苗数(个) Number of plant regeneration on per callus
MS	晋麦 47 Jinmai 47	93.0	45.0	109.8	21.2	2.3
	鲁麦 14 Lumai 14	96.6	49.0	110.9	17.9	2.1
	晋阳 345 Jinyang 345	96.0	51.0	132.7	22.9	1.9
	晋麦 31 Jinmai 31	97.5	36.5	116.2	25.3	1.2
	平均 Mean	95.8	45.4	117.4	21.8	1.9
MC	晋麦 47 Jinmai 47	95.5	86.0	203.7	38.3	18.5
	鲁麦 14 Lumai 14	97.0	90.0	170.2	24.3	15.6
	晋阳 345 Jinyang 345	95.0	96.0	175.1	22.3	19.4
	晋麦 31 Jinmai 31	96.0	79.0	189.3	32.2	13.4
	平均 Mean	95.9	87.8	184.6	29.3	16.7
MD	晋麦 47 Jinmai 47	92.0	77.5	179.7	31.2	13.2
	鲁麦 14 Lumai 14	94.5	73.5	165.3	27.6	14.1
	晋阳 345 Jinyang 345	98.0	86.0	146.9	25.4	11.3
	晋麦 31 Jinmai 31	98.0	70.0	168.3	27.3	12.6
	平均 Mean	95.6	76.8	165.1	27.9	12.8

继代 1 次后,从 3 种培养基内各品种(系)随机抽取 10 块愈伤组织转入 ME 分化培养基,进行分化

和出苗。结果表明(表 1),MC 培养基上平均每块愈伤组织分化苗数为 16.7 个,比 MS 培养基多 14.8

个。MD 培养基上平均每块愈伤组织分化苗数为 12.8 个,比 MS 培养基多 10.9 个。MC 和 MD 两种培养基与目前广泛使用的 MS 培养基相比,显著增加了胚性愈伤组织诱导率和出苗率,提高植株再生能力 50% ~ 80%。

2.2 AS 处理与抗性植株再生率

将 4℃ 低温条件下预处理 2 个月的愈伤组织,

经过农杆菌感染液中加 AS、愈伤组织培养基中加 AS、农杆菌感染液中和愈伤组织培养基中都加 AS 3 种处理后,结果表明(表 2),通过在农杆菌感染液中和愈伤组织培养基中都加 AS 处理后,能显著提高抗性植株再生率,最高抗性植株再生率达 3.7%,平均 2.4%。

表 2 AS 处理对植株再生率的影响

Table 2 Effect of acetosyringone (AS) treatment on plant regeneration frequency

材料 Cultivars and lines	处理 Treatment	侵染的愈伤组织数(块) Number of infected calli	再生芽数(个) Number of regeneration bud	抗性植株再生率(%) Regeneration frequency
晋麦 47 Jinmai 47	感染液中加 AS	200	0	0
	培养基中加 AS	194	0	0
	感染液中和培养基中都加 AS	315	5	1.6
鲁麦 14 Lumai 14	感染液中加 AS	208	2	1.0
	培养基中加 AS	256	2	0.8
	感染液中和培养基中都加 AS	179	5	2.8
晋阳 345 Jinyang 345	感染液中加 AS	243	0	0
	培养基中加 AS	301	1	0.3
	感染液中和培养基中都加 AS	269	4	1.5
晋麦 31 Jinmai 31	感染液中加 AS	235	2	0.9
	培养基中加 AS	198	1	0.5
	感染液中和培养基中都加 AS	134	5	3.7
平均 Mean	感染液中加 AS	221.5	1	0.5
	培养基中加 AS	237.3	1	0.4
	感染液中和培养基中都加 AS	224.3	4.8	2.4

2.3 愈伤组织的低温处理与抗性植株再生率

将未经低温处理、低温处理 1 个月和低温处理 2 个月的 3 种愈伤组织,经农杆菌感染液中和愈伤组织培养基中都加 AS 处理后,结果表明(表 3),晋

麦 31 低温处理 2 个月的愈伤组织抗性植株再生率最高(3.7%),4 个品种(系)的平均抗性植株再生率为 2.5%。低温处理 1 个月的愈伤组织抗性植株再生率次之,4 个品种(系)的平均抗性植株再生率

表 3 低温处理愈伤组织对植株再生率的影响

Table 3 Effect of low temperature treatment on plant regeneration frequency

材料 Cultivars and lines	处理 Treatment	侵染的愈伤组织数(块) Number of infected calli	再生芽数(个) Number of regeneration bud	抗性植株再生率(%) Regeneration frequency
晋麦 47 Jinmai 47	未经低温处理	231	0	0
	低温处理 1 个月	311	1	0.3
	低温处理 2 个月	315	5	1.6
鲁麦 14 Lumai 14	未经低温处理	203	0	0
	低温处理 1 个月	198	1	0.5
	低温处理 2 个月	179	5	2.8
晋阳 345 Jinyang 345	未经低温处理	198	0	0
	低温处理 1 个月	207	0	0
	低温处理 2 个月	269	5	1.9
晋麦 31 Jinmai 31	未经低温处理	205	0	0
	低温处理 1 个月	167	1	0.6
	低温处理 2 个月	134	5	3.7
平均 Mean	未经低温处理	209.3	0	0
	低温处理 1 个月	220.8	0.8	0.4
	低温处理 2 个月	224.3	5	2.5

为 0.4% (图 2)。未经低温处理的愈伤组织没有获得抗性植株,这可能是由于愈伤组织经过多次继代培养后,原来形成的胚性细胞团逐渐丧失了胚性能力。而低温处理 2 个月的愈伤组织,避免了由于继代培养造成的胚性能力丧失,愈伤组织在低温条件下生长发育减慢,糖分和其他营养物质积累,在 AS 激活农杆菌的条件下,更加容易和农杆菌接合,从而提高侵染能力。从表 3 可知低温处理的愈伤组织明显提高了抗性植株再生率,而且随着低温处理时间的延长,抗性植株再生率逐渐提高。

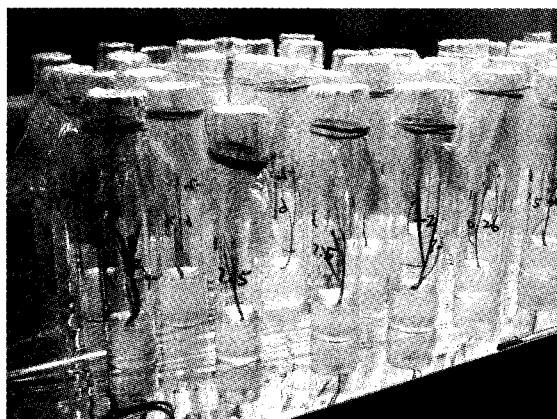
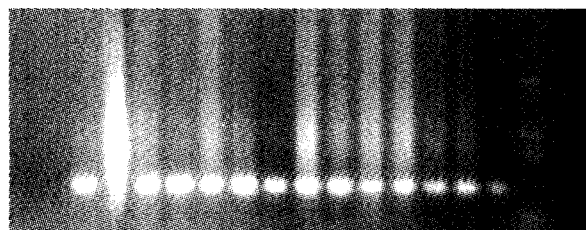


图 2 低温处理愈伤组织获得的再生苗
Fig.2 Regeneration seedlings from low temperature treatment

2.4 分子检测结果

获得的抗性植株叶片经 SDS 碱裂解提取并纯化 DNA 后进行 PCR 扩增 (图 3),在 438bp 处有明显的目的条带,对此 PCR 产物进行 Southern 杂交,共检测 69 株,其中 28 株呈阳性,图 4 为品种晋麦 47 的杂交结果。

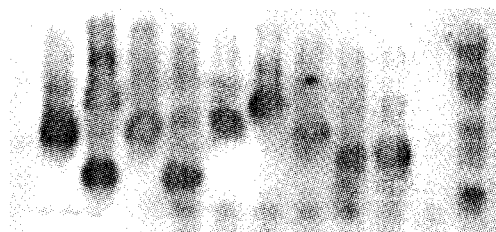


CK P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

图 3 晋麦 47 再生植株 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification result of regeneration plant of Jinmai 47

M: Molecular marker 分子标记; 1 ~ 13: Regeneration plant of Jinmai 47 晋麦 47 再生植株; CK: Negative control 阴性对照; P: Plasmid DNA 质粒 DNA



P 1 2 3 4 5 6 7 8 CK M

图 4 晋麦 47 再生植株 Southern 杂交结果

Fig.4 Southern blot test of the regeneration plants of Jinmai 47

M: Molecular marker 分子标记; 1 ~ 8: Regeneration plant of Jinmai 47 晋麦 47 再生植株; CK: Un-transgenic plant 未转基因对照植株; P: Plasmid DNA 质粒 DNA

2.5 再生植株对除草剂 Basta 的抗性

对再生苗 (T_0 代) 的叶片经 2‰ Basta 液点涂, 转化种子苗 (T_1 代) 经 2‰ Basta 液喷洒后, 转化抗性苗上仅在接触溶液部位造成轻微的伤害, 扩展不大; 而对照则黄斑扩展很大, 先是整株失绿, 然后逐渐枯萎 (图 5)。这是因为 Basta 是内吸式除草剂, 它的有效成分渗入叶脉参与代谢, 抑制了体内谷氨酰胺合成酶的解毒作用, 而致使植株因体内毒素积累而死亡。图 6 为晋麦 47 的转基因植株。



图 5 转基因小麦 (T) 的 PPT 抗性试验结果

Fig.5 PPT resistance of transgenic wheat (T)



图 6 晋麦 47 的转基因植株

Fig.6 Transgenic plant of Jinmai 47

3 讨论

目前小麦再生系统的研究主要集中在筛选受体基因型、植物激素配比和接种方式等方面^[8,9],很少有人研究在组织培养中有机化合物和维生素对小麦幼胚性愈伤组织诱导的影响,本研究的目的是通过在培养基中加入 Kao's 氨基酸、Kao's 有机酸、Kao's 糖和醇、Kao's 维生素和 T 维生素来诱导胚性愈伤组织的发生率,从而提高再生植株的分化率,建立高频的小麦组织培养再生系统^[2]。基本培养基中加入 Kao's 有机化合物和 T 维生素后愈伤组织更加容易吸收和利用这些营养成分,维持细胞的生长和发育。Kao's 氨基酸除了供给愈伤组织氮素营养外,还参与细胞蛋白质的合成,具有抑制早熟萌发和促进未成熟胚发育的作用,能促进胚的分化和增加胚的大小。Kao's 有机酸和 Kao's 糖和醇是碳素的来源和能量物质,包括了愈伤组织细胞更加容易利用的多种糖类型,同时对保持培养基的渗透压也有重要作用。Kao's 维生素和 T 维生素在愈伤组织的生长中起着重要的作用,它们以辅酶的形式参与酶系的活动,参与细胞蛋白质、脂肪、糖代谢等重要生命活动,对愈伤组织的代谢过程和胚的发育有一定的作用^[10]。

黄益洪等^[11]报道长期继代的愈伤组织转化率不高,特别是非胚性愈伤组织转化率更低,而且其分化潜力低也不利于转基因植株的获得。因此提高胚性愈伤组织的发生率和植株的再生能力是遗传转化成功的关键,根据研究,我们认为用于基因转化的受体系统应具有 90% 以上的再生频率,并且每块愈伤组织必须能再生出丛生芽,其芽数量越多越好,这样才能具有获得高频转化的可能性。

目前有许多实验引入 AS,认为它有利于农杆菌附着于愈伤组织上^[12],从而提高转化率。Cheng 等^[13]报道 AS 的浓度大于 50 μmol 时即可有效诱导 T-DNA 的转化,并认为 100 μmol 为最佳。本实验系统研究了 AS 在感染前后不同阶段的作用,结果表

明,AS 无论在预培养基、感染液和共培养基中添加均有利于提高转化率,但 3 个阶段中,感染液中的 AS 最为关键,能显著提高抗性愈伤组织产生频率,以感染液与共培养基中共同添加的效果最佳。

小麦幼胚诱导的愈伤组织生长状态可能影响转化的成功,夏光敏等^[4]采用继代培养半年至两年,生长紧密、略带金黄色的愈伤组织为受体材料,获得了 3.7% ~ 5.9% 的转化频率。但是对于大部分小麦品种来说,继代时间越长,胚性能力丧失越严重。因此,我们对愈伤组织进行 4℃ 低温预处理,避免了由于继代培养造成的胚性能力丧失,愈伤组织在低温条件下生长发育减慢,糖分和其他营养物质积累有助于转化频率的提高。

参考文献

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术.北京:科学出版社,1998:179 ~ 193
- [2] 朱晋云,杨丽萍,许玉娟,等. Kao's 有机化合物和 T 维生素对小麦幼胚性愈伤组织发生的影响.中国农业生态学报,2005,13(4): 44 ~ 47
- [3] Cheng M, Joyee E F, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol, 1997, 115: 971 ~ 980
- [4] 夏光敏,李忠谊,贺晨霞,等.根瘤农杆菌介导的小麦转基因植株再生.植物生理学报,1999,25(1): 22 ~ 28
- [5] 黄益洪,周森平,叶兴国,等.农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究.作物学报,2002,28(4): 510 ~ 515
- [6] 梁雪莲,孙毅,郭平毅,等.农杆菌转化小麦幼胚获得转 *bar* 基因再生植株.华北农学报,2003,18(1): 12 ~ 16
- [7] Wang J X, Sun Y. Transgenic maize plants obtained by Pollen-mediated transformation. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(3): 275 ~ 279
- [8] Mariatis T. Molecular cloning. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] 傅荣昭,孙勇如,贾士荣.植物遗传转化手册.北京:中国科学技术出版社,1994: 134 ~ 135
- [10] 李浚明.植物组织培养教程.北京:中国农业大学出版社,2002: 163 ~ 169
- [11] 黄益洪,周森平,叶兴国,等.农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究.作物学报,2002,28(4): 510 ~ 515
- [12] 杨剑波,许智宏,卫志明,等.影响根瘤农杆菌附着禾谷类作物培养细胞的因素.实验生物学报,1993,26(1): 1 ~ 7
- [13] Cheng M, Fry J E, Pang S, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol, 1997, 115(3): 971 ~ 980