

# 小麦芽生长点的基因枪转化技术研究

董福双<sup>1</sup>,张艳敏<sup>1</sup>,杨帆<sup>1</sup>,梁新朝<sup>2</sup>,刘桂如<sup>2</sup>,王海波<sup>1</sup>

(1. 河北省农林科学院 遗传生理研究所,河北省植物转基因中心,河北 石家庄 050051;2. 河北农业大学 农学院,河北 保定 071001)

**摘要:**为建立简易的不依赖组织培养和抗性筛选的小麦转基因技术,以小麦品种石 4185 为对象,以 *gus* 和 *badh/bar* 为外源基因,围绕适于基因枪转化的种子芽生长点受体的制备、基因枪轰击参数的优化等开展了试验,建立了“用解剖刀去除种子根、用镊子把芽鞘掰去、用镊尖扫去包盖生长点的未展开叶、将带生长点的部分与胚乳分离”为特点的受体制备方法;确定 1 100 Psi + 9 cm 为最佳轰击参数组合。对轰击后的小麦芽生长点(70 个 ×3 批)进行 *gus* 基因瞬时表达检测,以受体数统计时,转化率为 22.9% ~ 35.7%;以生长点数统计时,转化率为 5.7% ~ 8.6%。用含 *badh/bar* 的 pABH9 质粒转化 1 000 个受体,发育成了 802 个 T<sub>0</sub> 植株,对 T<sub>0</sub> 植株所结种子长成的穗行喷 200 mg/kg 的 PPT 进行抗性筛选,获得了 105 个抗性株,究其来源为 42 个 T<sub>0</sub> 株,由此计算抗性率为 5.2%。用 PCR 检测 T<sub>1</sub> 植株,6 个呈阳性。初步建立了基因枪法转化小麦种子芽生长点的技术。

**关键词:**小麦;芽生长点;基因枪;转化

**中图分类号:**S512.03 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)05-0001-06

## Research on Shoot Apical Point Transformation of Wheat Germinated Seeds by Particle Bombardment

DONG Fu-shuang<sup>1</sup>, ZHANG Yan-min<sup>1</sup>, YANG Fan<sup>1</sup>, LIANG Xin-chao<sup>2</sup>,  
LIU Gui-ru<sup>2</sup>, WANG Hai-bo<sup>1</sup>

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Plant

Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China;

2. College of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

**Abstract:** In order to set up a simple and easy method for genetic transformation of wheat, which do not depend on tissue culture and resistance selection, experiments of target-preparation of shoot apical point of buds for particle delivery and parameter-optimization of bombardment were conducted with a cultivar of Shi4185 as a recipient, and with *gus*, *badh/bar* as foreign genes. A suitable way was successfully founded to prepare shoot apical point targets from germinated seeds of wheat to bombardment, and the optimum parameters combination was determined as 1 100 Psi + 9 cm. Statistics of *gus* detection of transient expression with 70 ×3 batches indicated that 22.9% - 35.7% of targets and 5.7% - 8.6% of shoot apical points were transformed. With the bombardment of pABH9 containing *badh/bar*, 802/1 000 targets developed to normal plants. 105 resistant T<sub>1</sub> plants were obtained by spraying PPT of 200 ppm to the seedlings of seeds corresponding to 42 T<sub>0</sub> plants with a resistance rate of 5.2%. PCR analysis showed that 6 T<sub>1</sub> plants were positive. Preliminarily, the technique to transform shoot apical point of wheat buds by particle bombardment was established.

**Key words:** Wheat; Shoot apical point; Particle bombardment; Transformation

近十几年来,小麦的转基因研究虽然取得了许多重要进展<sup>[1-4]</sup>,但依然存在着很多问题<sup>[5]</sup>。发展建立简易实用的转基因技术仍然是小麦转基因研究

的重要课题。植物芽生长点是形成地上器官的原始细胞群,以期转化为受体是发展转基因技术的一条重要途径。早在 1988 年 McCabe 等<sup>[6]</sup>就用基因枪法

收稿日期:2009-07-08

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08010-011B)

作者简介:董福双(1979-),女,河北丰南人,硕士,主要从事生物技术研究工作。

通讯作者:王海波(1958-),男,河北满城人,博士,研究员,主要从事转基因、遗传生理及育种研究。

转化大豆茎尖获得了转基因植株。Schrammeijer 等<sup>[7]</sup>在向日葵、Gould 等<sup>[8]</sup>在棉花、Weeks 等<sup>[9]</sup>在苜蓿等双子叶植物上,用农杆菌介导法转化茎尖获得了转基因植株。1991 年 Gould 等<sup>[10]</sup>用玉米茎尖与农杆菌共培养,获得了转化植株及后代。1993 年 Bilang 等<sup>[11]</sup>用微靶基因枪轰击小麦、水稻、高粱的裸露生长点,1994 年赵天永等<sup>[12]</sup>用基因枪轰击玉米、小麦茎尖分生组织,1996 年杜立群等<sup>[13]</sup>用基因枪轰击了小麦幼苗的茎尖生长点,进行了转基因的尝试。2005 年 Razzaq 等<sup>[14]</sup>开展了用玻璃纤维制成的微型刷处理小麦茎尖生长点进行农杆菌介导转化的研究。2006 年 Zhao 等<sup>[15]</sup>、2007 年梁欣欣等<sup>[16]</sup>也以不同方式开展了用农杆菌介导转化小麦茎尖生长点的研究。本研究以转化小麦种子芽生长点为核心,探索了适于基因枪转化的生长点受体的制备和基因枪轰击参数的优化。

## 1 材料和方法

### 1.1 受体的制备

以小麦推广品种石 4185 为对象,选取饱满整齐的种子,常温下用水浸泡 12 h,70%酒精处理 30 s、0.1%升汞消毒 12 min,无菌水冲洗 4~5 遍。然后将种子摆放在高压灭菌过的带有两层滤纸的培养皿中,加适量无菌水,25℃弱光或暗培养条件下萌发 2~3 d。待种子芽长到 0.5~1.5 cm 时,无菌操作去除种子根,并以三种不同的方法去除芽鞘(包括叶片)暴露生长点:(A)以芽鞘与基部间形成的凹槽为基准,从凹陷处水平切除胚芽鞘和叶片;(B)以与盾片顶端相齐为基准,水平切除胚芽鞘和叶片;(C)用镊子掰除胚芽鞘和叶片,并用镊尖将覆盖生长点的未伸展小叶扫除。

每种方法各处理 200 个。将去掉芽鞘、叶片和种子根的胚连同盾片从胚乳上取下制成圆囤状的适于接受基因枪轰击的受体。将受体均分为两组:一组在体式镜下检查生长点的暴露情况、受害情况,统计 3 种处理中生长点的完好率、损伤率及未伸展微型小叶的覆盖率;另一组以生长点朝上的方向摆放于 PM 培养基(河北省农林科学院遗传生理研究所植物转基因中心提供)上,25℃光照条件下培养,测定不同处理的生长点发育成苗的情况,调查统计成苗率。

### 1.2 质粒

质粒 pABH9 由中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜等提供,质粒 pUbiGus 由河北省农林科学院遗传生理研究所植物转基因中心提供(图

1),均保存在 DH5a 菌株中,采用碱法提取、PEG 法纯化。

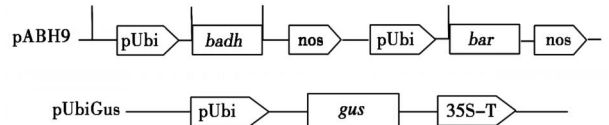


图 1 pABH9 和 pUbiGus 质粒结构简图

Fig. 1 Diagram of pABH9 and pUbiGus

### 1.3 基因枪轰击参数的选择与确定

1.3.1 轰击参数的选择试验 将固体 PM 培养基倒入培养皿内,待凝固后按基因枪的使用方法用不带基因的直径为 1.0  $\mu\text{m}$  的金粉进行模拟轰击。设置 5 种轰击力和轰击距离组合:900 Psi + 6 cm, 1 100 Psi + 6 cm, 1 100 Psi + 9 cm, 1 350 Psi + 6 cm, 1 350 Psi + 9 cm。观察轰击后的金粉打入培养基的情况及分布的情况,评价不同参数组合的轰击效果,选出适宜的组。

1.3.2 轰击参数的确定试验 轰击前 4 h,将制备好的受体按生长点向上方向,摆放于铺有高渗 PM 固体培养基(附加山梨醇和甘露醇各 0.15 mol/L)的培养皿中央直径为 2.5 cm 的圆形范围内(图 2-A),放入 4℃冰箱中备用。根据“轰击参数选择试验”结果,以 *gus* 为报告基因,对受体进行 1 100 Psi + 6 cm、1 100 Psi + 9 cm 两种组合的轰击,每皿放置生长点受体 70 个,3 次重复。轰击后的受体置于 4℃冰箱 24 h(对损伤细胞进行修复),再于 25℃条件下培养 1 d。然后将转化处理后的受体浸入 X-gluc 溶液,37℃保温过夜,无水乙醇脱色,于体式镜下调查生长点被转化的情况,并统计结果。对照为未进行轰击的同样的受体。

### 1.4 目标基因(BADH)转化处理

将制备好的受体按图 2-A 的式样摆放于高渗 PM 固体培养基上,每皿摆放 80 个左右。根据“轰击参数确定试验”结果,选用 1 100 Psi + 9 cm 组合进行 *badh* (+ *bar*) 轰击转化,共轰击 5 皿 1 000 个受体。轰击后的受体在 4℃冰箱中放置 24 h 后,转到正常的 PM 培养基上于 25℃光照条件下恢复培养 10 d,再于 8℃条件下绿体春化 25~30 d,然后移栽于温室。

### 1.5 T<sub>0</sub> 植株所结种子的抗除草剂筛选与 PCR 检测

对由转化处理后的受体发育成的植株(T<sub>0</sub>)在当代不进行任何检测,而是按单株收获种子,分别种成株行,对 T<sub>1</sub> 一叶一心期的幼苗进行 200 mg/kg PPT 喷雾处理,10 d 后调查受害状况。对于具有 PPT 抗性的植株,按柴建芳等<sup>[17]</sup>报道的方法提取基因组 DNA,用外源 *BADH* 基因的 PCR 引物进行分子检测。

上游引物：5-ATTGCCATCTGTGACTTG-3  
下游引物：5-CACTCGCTTGACTCCTC-3  
两引物的可扩增长度为 833 bp。扩增条件为：  
94 5 min；94 45 s，54 45 s，72 1 min，35  
个循环后再接 72 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 三种暴露生长点方法的效果

将萌发出芽的小麦种子，按三种暴露生长点的方法进行处理，制备成适于轰击转化的生长点受体，各取其中的 100 个于体式镜下进行检查，测定不同方法处理对生长点的暴露效果和伤害情况，另 100 个按生长点朝上的方向放到 PM 培养基上于 25 光照条件下培养 7 d，测定不同处理方法的成苗率。结果表明：A 方法可较大限度地防止未伸展叶片对生长点的遮盖，但对生长点的破坏率较高，影响成苗率。B 方法对生长点的伤害率虽比较低，但生长点裸露的效果不好，不利于基因枪转化（未伸展叶的覆盖会阻挡微弹对生长点的转化）。C 方法既可以比较好地暴露生长点又可有效地避免对生长点的伤害，明显地比上述两种处理效果都好。此法中掰芽的做法，操作简便、人为差异小，增强了操作的稳定性。调查结果详见表 1。

表 2 不同轰击力和轰击距离组合后的预试验效果

Tab.2 Effects of different distance and pressure for bombardment	
处理组合 Treatments	轰击效果描述 Results of bombardment
900 Psi + 6 cm	颗粒分布均匀，轰击深度较浅，轰击颗粒基本附于培养基表面
1 100 Psi + 6 cm	颗粒分布均匀，培养基上可见弹坑
1 100 Psi + 9 cm	颗粒分布均匀，培养基上可见弹坑
1 350 Psi + 6 cm	颗粒分布不均匀，大多集中嵌入培养基中；轰击位置偏离中心；培养基飞溅严重
1 350 Psi + 9 cm	颗粒分布不均匀，集中嵌入培养基中，轰击位置严重偏离中心；培养基的飞溅程度较 6 cm 稍轻

表 3 gus 瞬时表达检测不同轰击参数组合的转化效果

Tab.3 Effects of different bombardment according to gus transient expression					
处理 Treatments	调查项目 Items	重复 Repeat	重复 Repeat	重复 Repeat	总和 Total (平均 Average)
1 100 Psi + 6 cm	轰击受体数	70	70	70	210
	总转化数	17	10	11	38
	转化率/ %	24.3	14.3	15.7	18.1
	生长点转化数	4	4	3	11
	转化率/ %	5.7	5.7	4.3	5.2
1 100 Psi + 9 cm	轰击受体数	70	70	70	210
	总转化数	25	16	17	58
	转化率/ %	35.7	22.9	24.3	27.6
	生长点转化数	6	4	5	15
	转化率/ %	8.6	5.7	7.1	7.1

2.2.2 轰击参数确定试验的结果 根据轰击参数选择试验结果，选择 1 100 Psi 的轰击力和 6 cm、9 cm 的轰击距离，以 gus 为报告基因进行轰击转化，然后

表 1 不同方法制备生长点受体的效果比较

Tab.1 Comparison of different methods to expose meristem				
制备方法 Treatments	完好生长点率 Normality rate	受害生长点率 Damaged rate	叶片覆盖生长点率 Harbouring rate	成苗率 Seedling rate
A	69	19	12	78
B	51	8	41	89
C	70	11	19	86

2.2 基因枪轰击参数的选择与确定

2.2.1 不同轰击力及轰击距离的作用效果 用基因枪轰击 PM 固体培养基的轰击参数选择试验表明，轰击力对颗粒分布的均匀性及射入深度有较大影响。采用 900 Psi 的轰击强度，金粉颗粒粉分布的均匀性虽比较好，但射入靶体的深度比较浅，即使与 6 cm 的轰击距离结合，多数金粉也仍停留在琼脂培养基的表面。采用 1 100 Psi 的轰击强度，不仅金粉颗粒粉分布的均匀性较好，射入靶体的深度也比较合适。1 100 Psi + 6 cm、1 100 Psi + 9 cm 两种组合，都表现出了较好的效果。而采用 1 350 Psi 的轰击强度，常导致微弹打偏，且使金粉颗粒分布得很不均匀，每次都把琼脂培养基打飞。用 1 350 Psi 的强度轰击时，两种距离相比，6 cm 打飞得较重，9 cm 打偏得较重。从轰击结果来看，轰击力是控制打入深度的主要因素，轰击距离则对打入深度和轰击准确性都有一定影响，但对轰击准确性的影响更重。详细结果见表 2。

用组织化学法进行瞬时表达检测。轰击 2 d 后，将全部被轰击的生长点进行 X-gluc 检测，1 100 Psi + 6 cm 处理的 210 个受体中，共有 38 个受体呈现了蓝

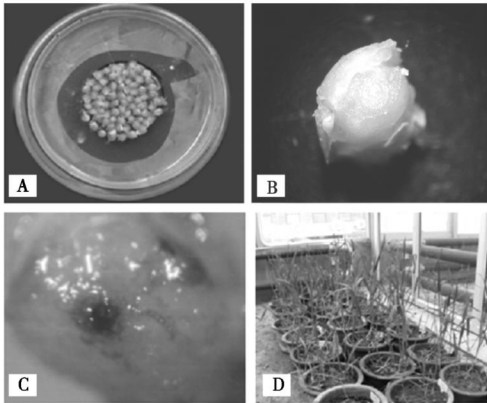
色反应,其中有 11 个蓝色斑点出现在生长点上,而 1 100 Psi + 9 cm处理的 210 个受体中,共有 58 个受体呈现了蓝色反应,其中有 15 个蓝色斑点出现在生长点上。结果详见表 3、图 2。20 个未进行轰击的对照受体均无蓝色反应。比较 1 100 Psi + 9 cm、1 100 Psi + 6 cm 两种处理的差异,前者的总转化率及生长点转化率均表现较高。故本研究认为:基因枪转化小麦种子芽生长点的适宜轰击参数为 1 100 Psi + 9 cm。

2.3 BADH 基因的导入与检测

选用 1100 Psi + 9 cm 轰击参数组合,以 *badh/bar* 为目的基因进行小麦种子萌芽生长点的基因枪转化,每皿放置受体 80 个左右,共进行 5 批次、1 000 个受体的轰击,经 PM 培养基上培养成苗、绿体春化,移栽成活了 802 个植株(图 2)。

对由 T<sub>0</sub> 植株所结种子长成的一叶一心幼苗(T<sub>1</sub>)进行 200 mg/kg PPT 喷雾处理,获得了 105 个 PPT 抗性植株。这 105 个抗性植株,来源于 42 个 T<sub>0</sub> 单株。用 *BADH* 基因的引物对抗性株进行 PCR 检

测,有 6 株为阳性,来自于 2 个 T<sub>0</sub> 单株,转化率为 0.25 %。详见表 4、图 3。



A. 制备好的小麦芽生长点受体;B. 小麦芽生长点受体的体式镜观察;C. 基因枪转化后的 *gus* 基因瞬时表达组织化学检测;D. 转化处理受体发育成的植株及生长状况。

A. The trimmed shoot tips of wheat buds for bombardment ;B. The metistem of wheat seeds buds stereoscope ;C. Transient expression of *gus* in the shoot tip ; D. T<sub>0</sub> plants in greenhouse.

图 2 制备好的小麦种子生长点受体及转化后的组织化学检测

Fig. 2 The trimmed shoot tip of wheat seeds for bombardment and the chemical detection of transgenic tissue

表 4 转基因 T<sub>1</sub> 麦苗的 PPT 抗性及 PCR 鉴定结果

Tab. 4 Results of PPT resistance selection and PCR detection

批次 Batches	处理的 受体数/个 No. of targets	T <sub>0</sub> 株数 No. of T <sub>0</sub> -plants	PPT 抗性 PPT resistance		T <sub>0</sub> 抗性株率/ % Percentage of resistant corresponding T <sub>0</sub> -plants	PCR 阳性株数 PCR positive plants	
			T <sub>1</sub> 抗性株数 No. of resistant T <sub>1</sub> -plants	对应 T <sub>0</sub> 的株数 No. of corresponding T <sub>0</sub> -plants		阳性株数 PCR positive T <sub>1</sub> -plants	对应 T <sub>0</sub> 株数 No of corresponding T <sub>0</sub> -plants
1	230	195	20	8	4.10	0	0
2	220	176	17	6	3.40	0	0
3	222	178	25	15	8.43	5	1 *
4	113	91	16	6	6.59	0	0
5	215	162	27	7	4.32	1	1 #
合计 Total	1 000	802	105	42	5.23	6	2

注: \*. 穗粒数为 35; #. 穗粒数为 15。  
Note: \*. The grain number of an ear 35; #. The grain number of an ear is 15.

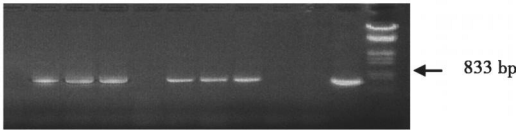


图 3 T<sub>1</sub> 植株的 BADH 扩增结果

Fig. 3 PCR detection of BADH gene in the transgenic T<sub>1</sub> generation

3 讨论

3.1 利用芽生长点做转化受体的优点与长处

以组织和细胞培养为基础的遗传转化,受基因型影响较大,组织培养的难易程度决定着转基因的成败。这使得目前的小麦转基因工作主要集中在易于组织培养与再生、但农艺性状和品质性状较差的

春性品种 Bobwhite、Pavon 等少数基因型中<sup>[18]</sup>。另外,通过组织或细胞培养获得的植株发生无性系变异的几率较大,其中很多变异往往是人们不期望的。还有,利用组织和细胞培养系统进行转化,必须借助抗性筛选才能获得转化子,而此后专门用于抗性筛选的基因便成为不再需要的东西。这种抗性基因的存在不仅会影响进一步的转基因工作,还会降低转基因作物的安全性<sup>[19- 23]</sup>。因此,寻找不依赖于植物组织培养的转化方法,多年来一直是植物转基因研究的一个重点。花粉管通道法、子房注射法等,虽可不依赖组织培养,并在小麦的遗传转化中取得了一定的成功<sup>[24- 26]</sup>。然而利用该系统转化小麦受季节限制太强,只能在短暂的开花期内进行。

利用植物芽生长点为受体,则具有以下优点:

不经过组织培养,可直接发育成植株,无因组织培养导致的体细胞无性系变异,能较好地保持受体植物的遗传特性。对离体培养的条件要求不高、时间短、操作简便,取材上不受季节限制。不存在组织培养中的基因型限制问题。结种子比较容易,可直接对转化处理受体发育成株后所结种子的植株进行检测,不再依赖抗性筛选。

在以芽生长点为受体进行基因枪转化时,应注意以下问题: 制备的芽生长点受体应易于成苗。

制备的芽生长点受体,其受面面积应尽可能地小,以减少非生长点部分的比重。这样即利于尽可能多地摆放受体,又可使有效的轰击面相对增大,可提高轰击转化的效率、节约成本。

用基因枪转化小麦的芽生长点虽然是一种很好的构思,但多年来如何制备出符合上述要求的适于基因枪转化的生长点受体一直困扰着大家。本研究通过刀切、镊子掰等探索了这方面的问题,较好地克服了这一困难。特别是用镊子掰芽、扫叶的做法,既保证了生长点的暴露,又不构成大的伤害,所建立的芽生长点受体制备技术,显示了稳定、简易、可操作性强等特点。按照此种做法虽然去掉了种子根和胚乳,但成苗率依然相当高。

### 3.2 关于形成嵌合体的问题

由于种子芽生长点的发育方向已非常确定,主要是形成植株的地上部分,因此位于芽生长点的细胞基本上无有从单细胞发育成植株的机会,而是走协同发育的途径,故用芽生长点做受体必然会出现嵌合体现象,这就需从转化受体发育成的植株所结的种子中寻找转化植株,而不必对当代植株做过多的鉴定。在本研究中,从 1 000 个用基因枪转化过的小麦种子芽生长点受体中获得了 802 个  $T_0$  植株,对由  $T_0$  植株所结种子形成的穗行( $T_1$  植株)进行喷 PPT 筛选鉴定,得到了 105 个抗性植株。这些植株来自于 42 个  $T_0$  单株。进一步对这些抗性株进行 PCR 检测,只有 6 株是阳性的。此 6 个 PCR 阳性植株,来自于 2 个穗粒数较多的  $T_0$  单株,其中一株结了 35 粒,出了 5 个阳性植株,另一株结了 15 粒,出了 1 个阳性株。其他未获得阳性植株的个体,多为只结了 4~5 粒的  $T_0$  植株。这表明转化事件可能发生在不同的籽粒间,转化后的生长点及由其发育成的麦穗是嵌合体,粒数越多才越有获得转化个体的机会。由此可见,进行生长点转化时,对由生长点发育成的植株,应通过人工措施促其长出大穗,以便使被转化的部位尽可能多地通过发育成籽粒而表现出来。另外,用生长点做转化受体时,应选用尽可能早的时期的芽生长点,越是早期的生长点细胞

数越少,这样即使是形成了嵌合体,被转化的部分也会相对提高。

### 参考文献:

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic calls[J]. Bio/ Technology, 1992, 10: 667 - 674.
- [2] Weeks I T, Anders O D, Blechl A E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077 - 1084.
- [3] Cheng M, Fry J, Pang S, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 971 - 980.
- [4] Hu T, Metz S, Chay C, et al. Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glycosylase selection [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 1010 - 1019.
- [5] Vasil I K. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26: 1133 - 1154.
- [6] McCabe D E. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration [J]. Bio/ Technology, 1988, 6: 923 - 926.
- [7] Schrammeijer B. Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium* [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 55 - 60.
- [8] Gould J, Banister S, Hasegawa O, et al. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from shoot apex tissues for transformation [J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 12 - 16.
- [9] Weeks J T, Ye J S, Rommens C M. Development of an in planta for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Transgenic Res, DOI 10. 1007/ s1128 - 007 - 9132 - 9.
- [10] Gould J H, Devey M, Hasegawa O, et al. Transformation of *Zea mays* L., using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex [J]. Plant Physiol. 1991. : 426 - 434.
- [11] Roland B, Zhang S B, Leduc N, et al. Transient gene expression in vegetative shoot apical meristems of wheat after ballistic microtargeting [J]. The Plant Journal, 1993, 4(4): 735 - 744.
- [12] 赵天永, 王国英, 谢友菊. 用基因枪将 *GUS* 基因导入玉米和小麦的茎尖分生组织 (简报) 农业生物技术学报, 1994, 2(2): 93 - 94.
- [13] 杜立群, 李银心, 麻 密, 等. 小麦生长点转化法初报 [J]. 植物学报, 1996, 11(38): 921 - 924.
- [14] Razzaq, 张艳敏, 杨 帆, 等. 小麦茎生长点转化研究初报 [J]. 华北农学报, 2005, 20(2): 17 - 22.
- [15] Zhao T J, Zhao S Y, Chen H M, et al. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling [J].

- Plant Cell Rep, 2006, 25: 1199 - 1204.
- [16] 梁欣欣, 刘录祥, 赵林姝, 等. 农杆菌介导法向小麦茎尖导入 *DREB1A* 基因的研究初报[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(1): 16 - 19.
- [17] 柴建芳, 刘旭, 贾继增. 一种适于 PCR 扩增的小麦基因组 DNA 快速提取法[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 246 - 248.
- [18] 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.
- [19] 张新梅, 徐惠君, 杜莉璞, 等. 共转化法剔除转基因小麦中的 *bar* 基因[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 26 - 30.
- [20] 董文琦, 屈冬玉, 王海波. 消除转基因植物中选择标记的研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 29 - 34.
- [21] McKnight TD, Lillis M T, Simpson R B. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains[J]. Plant Mol Biol, 1987, 8: 439 - 445.
- [22] De Block M, Debrouwer D. Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus[J]. Theor Appl Genet, 1991, 82: 257 - 263.
- [23] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. Plant J, 1996, 10: 165 - 174.
- [24] 成卓敏, 何小源, 陈彩民, 等. 大麦黄矮病毒外壳蛋白基因合成及用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 自然科学进展, 1993, 3(6): 560 - 564.
- [25] 曾君祉, 王东江, 吴有强, 等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 中国科学 B 辑, 1993, 23: 256 - 262.
- [26] 牟红梅, 刘树俊, 周文娟, 等. 慈菇蛋白酶抑制剂通过花粉管途径对小麦的导入及转基因植株分析[J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 634 - 642.

## 《华北农学报》征订启事

《华北农学报》1986 年创刊, 由河北、北京、天津、山西、河南、内蒙古六省市农科院和农学会联合主办的农业学术刊物。本刊立足华北, 面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报, 报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心库)、中国科技核心期刊、中国中文核心期刊及中国农业核心期刊。曾荣获全国优秀科技期刊三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、全国农口学会优秀期刊奖、华北优秀科技期刊奖及河北省优秀期刊奖。作为国家核心期刊, 在全国综合性农业科学类期刊中排名第 3 位。中国学术期刊综合印证年度报告(2008)显示,《华北农学报》影响因子达到 1.126, 被引频次 1806 次。

《华北农学报》国内外公开发行, 国内统一刊号: CN13 - 1101/S, 国际刊号 ISSN1000 - 7091。双月刊, 双月 28 日出版, 国际标准大 16 开本, 240 页, 每期定价 12 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 18 - 10, 国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅, 邮失可补。请写清刊名、份数、收刊人姓名、地址、邮编, 以免误投或无法投递。

欢迎订阅、欢迎投稿。

通信地址: 石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮 编: 050051

电 话: 0311 - 87652166

E-mail: hbnxb @163.com 或 hbnxb @sohu.com