

# *alfAFP* 和 *spCEMA* 融合基因表达载体的构建 及其对小麦的遗传转化

张立<sup>1,2</sup> 王建锋<sup>1,3</sup> 王晓杰<sup>1,3</sup> 康振生<sup>1,3\*</sup> 韩德俊<sup>1,2\*</sup>

(西北农林科技大学 1. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室/2. 农学院/3. 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要** 以小麦品种西农 1376 为受体, 利用 Overlapping PCR 的方式构建了防御素基因 *alfAFP* 和抗菌肽基因 *spCEMA* 融合基因的表达载体, 与 pAHC20 共转化幼胚愈伤组织, 获得转基因再生 T<sub>0</sub> 代植株 269 株, 春化后移栽成活 188 株。对叶片基因组 DNA 进行目的基因和 *bar* 基因 PCR 扩增表明其中 7 株是共整合植株, 共整合频率为 0.1%, 初步证明融合基因已成功通过共转化方式导入受体小麦品种中。影响共整合率的因素分析表明, 在使用除草剂 PPT 对 *bar* 基因进行筛选的过程中, 筛选时间的缩短并不会明显降低筛选的效率。

**关键词** 小麦; 转基因; 融合基因; 共转化

中图分类号 S 512 文章编号 1007-4333(2012)05-0015-06 文献标志码 A

## Co-transformation of wheat with fusion genes *alfAFP* and *spCEMA* using biolistics

ZHANG Li<sup>1,2</sup>, WANG Jian-feng<sup>1,3</sup>, WANG Xiao-jie<sup>1,3</sup>, KANG Zhen-shen<sup>1,3\*</sup>, HAN De-jun<sup>1,2\*</sup>

(1. The National Key Laboratory for Arid Regions Crop Adversity Biology/2. College of Agronomy/  
3. College of Plant Protection, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract** Transgenic wheat variety XiNong 1376 containing the plant defensin gene *alfAFP* and antimicrobial peptide gene *spCEMA* fusion gene were obtained using cotransformation with *bar* as a selective marker via biolistics. In total, 269 plantlets were generated through screening, and 188 of which were alive after vernalization. Leaf genome DNA PCR array showed that 7 co-transformed plants were obtained, and the frequency of co-integration was 0.1%. Studies also illustrated that the shortened time of the *bar* gene screening process did not significantly reduce the efficiency of PPT screening.

**Key words** wheat; transgenic; gene fusion; co-transformation

小麦病害一直是严重影响我国小麦产量和品质的主要因素。全世界正式记载的约 200 种小麦病害, 我国发生较重的有 20 余种, 严重威胁我国的小麦生产。选育优良抗性品种是保障小麦生产的重要环节, 然而, 当前我国小麦品种改良主要采用的常规杂交育种途径存在周期长、性状改良不显著和范围窄等缺点<sup>[1]</sup>。基因工程育种作为杂交育种的主要补充手段, 已经在大豆、玉米、棉花和油菜等作物中取

得了巨大成功, 赋予了这些作物本身所不具备的抗病、抗除草剂、抗虫等性状<sup>[2]</sup>。自 1992 年成功获得小麦转基因植株以来<sup>[3]</sup>, 越来越多的研究者投入抗病转基因小麦的研究当中, 并在多种转化手段中取得突破, 获得了一批有价值的抗源育种材料。

良好的抗病基因来源是生物技术提高植物抗病性的前提, 针对当前小麦生产中危害广泛的锈病<sup>[4]</sup>、赤霉病<sup>[5]</sup>、白粉病<sup>[6]</sup>和纹枯病<sup>[7]</sup>等真菌病害, 选用优

收稿日期: 2012-04-17

基金项目: 国家重大专项(2011ZX08002-001); 高等学校学科创新引智计划资助项目(B07049)

第一作者: 张立, 硕士研究生, E-mail: zhangli@nwsuaf.edu.cn

通讯作者: 康振生, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病理学专业研究, E-mail: kanzs@nwsuaf.edu.cn

韩德俊, 副教授, 博士, 主要从事植物抗病遗传专业研究, E-mail: handj@nwsuaf.edu.cn

良的抗真菌外源基因转化小麦为提高其抗性,确保产量和品质提供了可能。本研究所采用的植物防御素基因能表达小型肽物质,在植物中作为极为重要的抗病因子参与植物的防卫反应<sup>[8]</sup>,其产物具有抗真菌谱广的特点。紫花苜蓿抗真菌肽 *alfAFP* (alfalfa antifungal peptide) 基因是来自苜蓿种子的防御素基因,其转基因马铃薯表现出对主要病原真菌 *Verticillium dahliae* 的优良抗性<sup>[9]</sup>。另一类广泛存在的小分子抗菌活性多肽是抗菌肽,其大多在体外有很强的抑菌作用,部分在体内也表现出很好的抑菌效果<sup>[10]</sup>。*spCEMA* 是在具有抑菌活性的阳离子抗菌肽 CEMA 基础上添加信号肽改造而来的,在不降低其强抑菌活性的同时,降低了对植物细胞的毒害作用<sup>[11]</sup>。

由于植物对病原物抗性反应的层次性和复杂性<sup>[12]</sup>,导致转化单个抗病基因的作用存在着局限性。传统的将单个基因构建在一个载体上转化植物的方式需要改变,多基因聚合的研究应运而生并已成为植物基因工程的研究热点。由于生物体内的代谢途径常常是多步反应,提高植物对病原物的抗性必然要求多个酶共同催化,因此,将多个基因转化到同一株植物中协同表达,就显得十分必要<sup>[13]</sup>。然而,传统的多基因转化方式都有各种不足,很难保证各基因间表达量及时空上的一致性。因此利用有自我剪接功能的连接肽进行多基因融合,在同一启动子下以相似的水平表达多个不同蛋白提供了一种解决问题的良好方法<sup>[14-15]</sup>。来自口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus) 的连接肽 2A 序列是一个只编码

16~20 个氨基酸的寡肽,它作为一种融合基因的连接序列用于连接多基因,能够有效地解聚所连接的蛋白而无需特殊酶的参与<sup>[16]</sup>,已成功应用于转基因植株中定性和定量地检测基因的表达<sup>[15]</sup>。与此同时,出于生态安全性的考虑,转基因标记基因在转化后代中应该被剔除。共转化法提供了一种既不增加技术难度,同时又可使后代标记基因自然分离并被剔除的转基因方式。因此,利用共转化法向小麦中导入外源融合基因,既可以实现多基因的转化又可以在后代的自然分离中获得无选择标记的转化植株。

本研究采用具有优良综合农艺性状和组织培养再生性的小麦品种西农 1376 作为转化受体,利用 2A 序列连接 *alfAFP* 和 *spCEMA* 的表达框构建融合表达基因,利用 *bar* 基因作为筛选标记并结合共转化法,以期获得表达融合基因 *alfAFP*:2A:*spCEMA* 并能在后代中剔除筛选标记的转基因植株,为小麦抗病育种创制抗源材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料及载体

小麦受体品种为西农 1376,由西北农林科技大学植物保护学院提供。转化载体 pAHC20、pWMB002 和 pRTL2 由中国农业科学院作物所叶兴国博士惠赠。

目的基因:*alfAFP*、*spCEMA* 由西南大学生物技术研究中心分子生物学实验室裴炎教授提供。

引物序列:根据目的基因已知序列<sup>[9]</sup>设计特异引物,由上海生工生物工程有限公司合成。

AFP2A S	5' ATGGAGAAGAAGTCTCTTGCTGGCT 3'
AFP2A A1	5' AAGCTTAAGAAGGTCAAAATTCAACAGCTGACATCTTTTA 3'
AFP2A A2	5' GGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCAAGCTTAAGA 3'
AFP2A M	5' GTCCAACCCTGGGCCCCGAGAAGAAGTCTCT 3'
SPC-A	5' TTA CT TGGTCAACTTCAAAGCTGGC 3'
Bar1 S	5' CTTCAGCAGGTGGGTGTAGAGCGTG 3'
Bar1 AS	5' CCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCC 3'
A2S2011 S	5' TGAAGCTCGTACATGTGAGAATTTG 3'
A2S2011 AS	5' AGCTCTTACTTGGTCAACTTCAAAG 3'
A2S-S	5' TCCCCGGGATGGAGAAGAAGTCTC 3'
A2S-AS	5' CGCGCTTACTTGGTCAACTTCAAAGC 3'

### 1.2 目的基因融及表达载体的构建

采用 Overlapping PCR 的方式进行连接<sup>[17-18]</sup>。

*alfAFP* 经过 2 次 PCR 延伸反应,删除终止密码子并延伸出 60 bp 的 2A 序列,PCR 反应总体系为:

AFP2A S&AFP2A A1/AFP2A A2 各 2  $\mu$ L, 5 $\times$  PCR buffer 10  $\mu$ L, 25 mol/L dNTP 5  $\mu$ L, 高保真 *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 模板 DNA 0.5 ng, 补水至 50  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 66  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 反应 5 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收, *AlfAFP:2A* 序列大小为 276 bp。采用同样的反应方式, 在 *spCEMA* 5'端删除起始密码子并延伸出 20 bp 的 2A 序列, 回收后用于 Overlapping PCR 反应。Overlapping PCR 反应体系为: A2S-S&A2S-AS 各 2  $\mu$ L, 5 $\times$ PCRbuffer 10  $\mu$ L, 25 mol/L dNTP 5  $\mu$ L, pfu 1  $\mu$ L, 模板 DNA (*alfAFP:2A* 和 *2A:spCEMA* 各 60 ng), 补水至 50  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 66  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 反应 5 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收, 分别连接至酶切后的 pWMB002 和 pRTL2 表达载体上。

### 1.3 西农 1376 转基因植株的获得

采集授粉后 12~14 d 的未成熟种子(盾片直径约 1 mm), 经无菌消毒后挑取幼胚, 接种于 MS 诱导培养基(MS+2,4-D 2 mg/L)上, 24~26  $^{\circ}$ C 黑暗培养 1 周; 挑选质地优良的幼胚愈伤组织, 集中于含 0.4 mol/L 渗透培养基(MS+0.2 mol/L 山梨醇+0.2 mol/L 甘露醇)的培养皿中心, 预处理 4~6 h; 用 PDS1000/He 基因枪进行轰击(psi 1100, 轰击距离 9 cm, 金粉浓度 60  $\mu$ g/枪, 浓度比目的基因载体 pAHC 20 为 3:1), 继续渗透培养 16~18 h, 转入 MS 培养基中恢复培养 2 周; 而后光照分化培养(1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+KT 0.5 mg/L+PPT 3 mg/L)4 周, 待分化成幼苗时转入生根培养基(1/2MS+NAA 0.5 mg/L)中, 培养至根系发达, 株高 6~8 cm; 转移再生植株至春化箱中生长 4 周, 移栽至温室中进行分子鉴定。

### 1.4 转基因植株 PCR 检测

取再生植株幼嫩叶片, 用改良 SDS 法提取 DNA<sup>[19]</sup>, 并进行 PCR 扩增。PCR 反应总体体系为: A2S2011 S&A2S2011 AS 或 Bar1 S&Bar1 AS 各 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mol/L dNTP 0.4  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.3  $\mu$ L, 模板 DNA 0.5 ng, 补水至 25  $\mu$ L。目的基因及 *bar* 基因的 PCR 反应程序均为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 反应 10

min。扩增目的基因片段长度为 372 bp, *bar* 基因 400 bp; 目的基因采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, *bar* 基因检测采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因融合表达载体构建

由于目的基因编码框较小, 本研究采用连续延伸并利用 Overlapping PCR 的方式进行片段连接。如图 1 所示成功获得了片段大小为 457 bp 的 *alfAFP:2A:spCEMA* 全长(包含两侧 *Sma*I 和 *Sac*I 酶切位点)。由于 *alfAFP* 和 *spCEMA* 在 5'端有部分同源性, 导致分别出现大小为 276 bp 的 *alfAFP:2A* 和 181 bp 的 *spCEMA* 扩增片段, 但并未对目的条带的分离构成干扰。测序结果表明 *alfAFP* 和 *spCEMA* 已被准确融合入一个 ORF 内, 后续的表达载体构建及酶切检测(图 2, 3)也显示连接方向正确, 未发生突变。

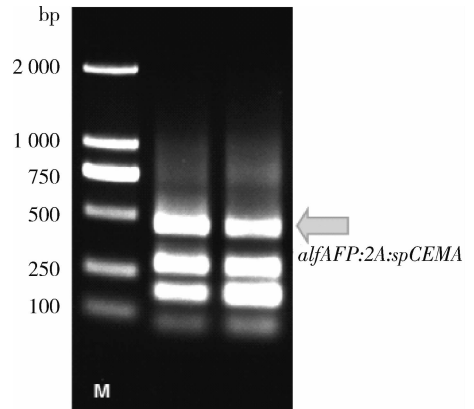


图 1 *alfAFP:2A:spCEMA* Overlapping PCR 反应  
Fig. 1 *alfAFP:2A:spCEMA* overlap extension polymerase chain reaction

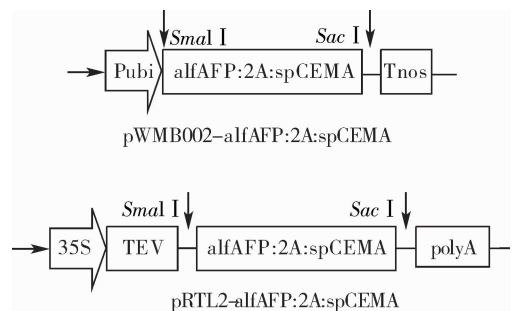


图 2 载体 pWMB002、pRTL2 图谱

Fig. 2 Structure map of vector pWMB002 and pRTL2

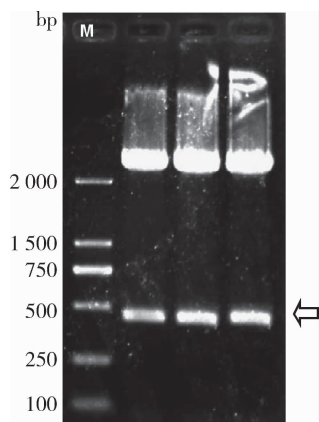
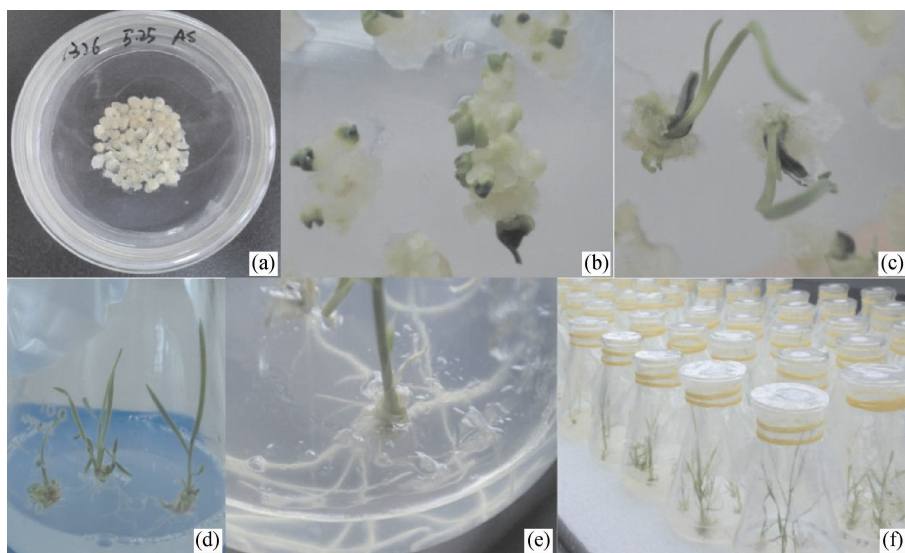


图3 载体酶切检测结果

Fig. 3 Results of vectors after digestion

## 2.2 共转化及抗性植株再生

本研究采用西农 1376 幼胚为受体,幼胚出愈率为 90%,共获得愈伤组织 7 060 块用于基因枪处理。分化阶段经 PPT 筛选 2 轮(共 4 周)至长成小苗,转入无筛选剂并降低硬度的生根培养基(Agar 5 g/L)中至根系发达(图 4)。共获再生植株 269 株,再生率 3.81%。春化箱中培养 4 周后移栽成活 188 株。采用相同处理方式,对另外 7 个基因构建的表达载体进行西农 1376 的转化操作(结果待发表),共转化 19 431 块愈伤组织,其中 *Actin*、*Cab*、*BRi I*、*p87* 的基因枪转化处理采用目的基因载体:pAHC20 为 1:1 的方式进行。统计结果见表 1(*alfAFP:2A:spCEMA* 缩写为 A2S)。



(a)愈伤组织基因枪处理;(b)~(d)愈伤组织分化;(e)再生苗根系;(f)再生群体。

图4 西农 1376 转 *alfAFP:2A:spCEMA* 融合基因再生过程

Fig. 4 Transformation and regeneration of Xinong 1376

表 1 西农 1376 转化再生统计结果

Table 1 Statistics of the regeneration frequency of Xinong 1376

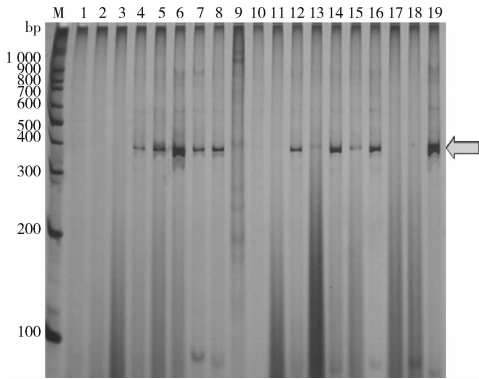
项目	与 pAHC20 共转化						单一载体转化		
	<i>Actin</i>	<i>Cab</i>	<i>BRi I</i>	<i>p87</i>	002-A2S	<i>RTL2-A2S</i>	<i>TaMAPK14</i>	<i>TX17</i>	<i>p1437</i>
处理愈伤组织数/块	2 837	2 614	2 077	2 790	3 232	3 828	2 196	2 969	2 062
再生植株数/块	50	81	68	93	83	186	101	136	48
再生率/%	1.76	3.10	3.27	3.33	2.57	4.86	4.60	4.58	2.33
再生率平均值/%	3.23						3.94		

上述研究结果表明,在相同的转化系统下,共转化的再生频率比单一转化的频率要低,整体再生率在 1.76%~4.86%之间。

## 2.3 再生植株 PCR 检测

取新鲜叶片提取基因组 DNA,分别用目的基因及 *bar* 基因特异引物进行 PCR 扩增检测。检测结

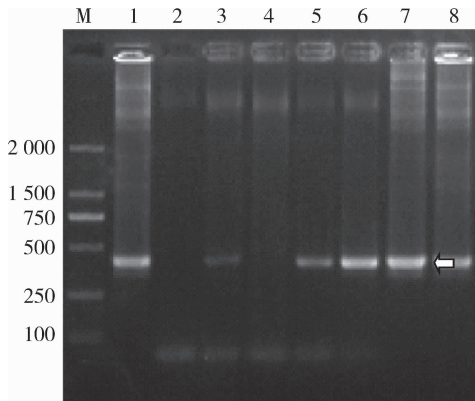
果如图 5~7 所示。其中目的基因检测阳性 57 株, 转化率为 0.81%; *bar* 基因检测阳性植株 11 株, 转化率为 0.16%; 同时含有目的基因及 *bar* 基因的植株为 7 株, 共整合率为 0.10%。



M 为 Marker; 1~17 为再生植株; 18 为阴性对照植株; 19 为阳性对照质粒。

图 5 目的基因 PCR 扩增

Fig. 5 PCR assay of regenerated plants (*alfAFP*:2A:*spCEMA*)



M 为 Marker; 1 为阳性对照质粒; 2 为空白对照; 3~8 为再生植株。

图 6 *bar* 基因检测结果

Fig. 6 PCR assay of regenerated plants(*bar* gene)

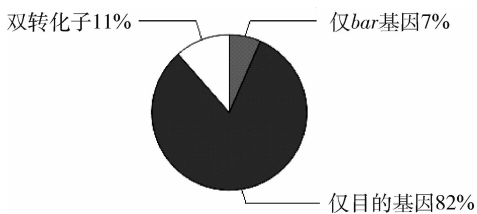


图 7 转化植株检测结果统计

Fig. 7 Statistics of transgenic plants

### 3 讨论

植物防御素和抗菌肽均具有较宽的抗菌谱,并在体外实验中表现出高效的抑真菌活性<sup>[9,20]</sup>。作为小麦抗主要真菌病害遗传转化中可以采用的优良基因来源,本研究采用融合 2 个基因协同表达的方式,通过基因枪法转化获得含目的基因的再生植株。由于基因枪转化在整合方式上的复杂性,基因多拷贝及基因沉默现象难以避免,本研究利用可自我剪接的 2A 序列介导融合基因,可以确保两者在可成功表达时具有时空及表达量上的一致性<sup>[15]</sup>。

*bar* 基因因其对生物体及环境的安全性而被本研究用作共转化的筛选标记,然而 *bar* 基因作为筛选标记时,鉴于 PPT 筛选的毒性机理,提高筛选效率会抑制再生植株的根系发育。与此同时,有研究表明即使在更高浓度的 PPT 下筛选,由于存在交叉保护现象<sup>[21]</sup>、愈伤组织再生植株存在着嵌合体<sup>[22]</sup>以及不同基因型小麦愈伤组织对于 PPT 的敏感性存在显著差异<sup>[23]</sup>等原因,导致其并不能完全避免逃逸现象的发生。采用再生植株中 *bar* 基因所占的比例表示该筛选流程的效率, Prem<sup>[24]</sup> 的报道表明 *bar* 的筛选效率会低至 26%, 本实验室之前针对西农 1376 采用相同转化处理的结果也显示其筛选效率仅为 11.5%<sup>[25]</sup>, 这些都表明过度延长筛选的时间对提高筛选的效率没有帮助。鉴于提升筛选效率与植株生长间的矛盾,本研究在两轮筛选培养致再生群体数量控制在较合理的范围内后,将分化的幼苗转入无筛选剂的生根培养基中,并降低了培养基硬度,结果表明在不添加多效唑等壮苗物质的情况下,生根培养的苗仍强壮且根系发达。两轮筛选起到了合理控制再生群体数量的目的,有效地减少了后续检测的工作量,同时筛选效率保持为 19.3%。

本研究采用的共转化法不增加技术难度,同时可使后代标记基因自然分离,但其较低的共整合率是实际应用中不可避免的问题。在转化质粒浓度一定的前提下,不同的质粒浓度比会影响最终获得共整合转化子的概率, Qin 等的研究表明提高目的基因比标记基因至 1:3 时更有利于获得共整合转化子,在小麦的研究中共整合频率为 0.4%<sup>[26]</sup>; 本研究中目基因比 *bar* 为 1:3 的处理平均再生率为 3.81%, 其他 4 个基因的共转化操作以目的基因:*bar* 基因为 1:1 进行,其平均再生率为 2.83%。本研究共整合频率为 0.10%, 转化率不高的可能原因

是再生植株春化时的培养条件控制不当,导致出现了较高的再生苗移栽死亡率(约30%)。同时,共转化组的平均再生率为3.23%,低于单一载体转化组3.94%的再生率,这也成为共整合频率提高的一个限制因素。Eva等对小麦共转化所获得的50株包含*bar*基因的植株中,32株为共整合植株,频率为64%<sup>[27]</sup>,本研究中含有*bar*基因的植株中有63.6%的共整合植株,其频率与Eva的结果基本一致。

此外,本研究中含目的基因植株与*bar*基因植株数量比为5:1,其可能的原因是生根培养阶段去除了筛选剂,使经过前期分化筛选的抗性愈伤组织和逃逸愈伤组织获得了一致的分化可能,使植株数量在一定程度上表现出随基因浓度变化的线性相关关系。

### 参 考 文 献

- [1] 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
- [2] Clive J. 2009年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势:第一个十四年1996—2009[J].中国生物工程杂志,2010,30(2):1-22
- [3] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus[J]. Biotech, 1992(10):667-674
- [4] 王存兴,李光武.植物病理学[M].北京:化学工业出版社,2010:126
- [5] 周晓彬,庄世界,鄢又国,等.小麦赤霉病危害及处理策略[J].中国种业,2011(7):64-65
- [6] 李春鑫,许为钢,王根松,等.小麦白粉病抗病新基因*PmHnk*的遗传分析和分子标记定位[J].中国农业科学,2009,42(8):2771-2777
- [7] 徐雍皋,徐敬友.农业植物病理学[M].南京:江苏科技出版社,1996:132-135
- [8] 廖乾生,林福呈,李德葆.植物防御素及其研究进展[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2003,29(1):113-118
- [9] Gao A G, Hakimi S M, Mittanck C A, et al. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(12):1307-1310
- [10] 石强,刘飞鹏.抗菌肽克隆基因的表达和转基因研究现状[J].生物工程进展,2000,20(1):37-40
- [11] 牛国清,裴炎.抗菌肽 CEMA 的改造与人工合成[J].西南农业大学学报,2002,24(4):334-336
- [12] Jonathan D G Jones, Jeffery L Dengl. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444:323-329
- [13] 燕丽萍,夏阳,王太明,等.多基因聚合的研究进展[J].山东林业科技,2007(5):82-85
- [14] 孙鹤,郎志宏,朱莉,等.连接肽在多基因转化中的应用[J].生物技术进展,2011,1(1):21-25
- [15] Claire Halpin, Susan E Cooke, Abdellah Barakate, et al. Self-processing 2A-polyproteins-a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants[J]. The Plant Journal, 1999, 17(4):453-459
- [16] Donnelly M L, Gani D, Flint M, et al. The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins [J]. J Gen Virol January, 1997, 78:13-21
- [17] Jeff Yon, Mike Fried. Precise gene fusion by PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(12):4895
- [18] Yolov A A, Shabarova Z A. Constructing DNA by polymerase recombination[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(13):3983-3986
- [19] Stephen L Dellaporta, Jonathan Wood, James B Hicks. A plant DNA miniprep: Version II [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1(4):19-21
- [20] Scott M G, Hancock R E. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system[J]. Crit Rev Immunol, 2000, 20(5):407-31
- [21] Christou P. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into mature zygotic embryos[J]. Bio Technology, 1991(9):957-962
- [22] 赵永英,海燕,康明辉,等.小麦花药培养材料加倍特性研究[J].河南农业科学,2010(1):47-48,105
- [23] 李鹏,张磊,胡琳,等.小麦遗传转化中优良受体基因型及L-PPT适宜浓度的筛选[J].麦类作物学报,2008,28(2):193-196
- [24] Prem L Bhalla. Genetic engineering of wheat - current challenges and opportunities[J]. TRENDS in Biotechnology, 2006, 24(7):305-311
- [25] 刘丹.益母草脂质转运蛋白基因LTP转化普通小麦[D].杨凌:西北农林科技大学,2011
- [26] Qin Yao, Ling Cong, Guangyuan He, et al. Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency[J]. Mol Biol Rep, 2007, 34:61-67
- [27] Eva Stoger, Sarah Williams, Duncan Keen, et al. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression[J]. Transgenic Research, 1998, 7(6):463-471