

文献综述  
REVIEW

## 小麦花粉管通道法转基因研究进展

刘宝龙<sup>1,2</sup> 张怀刚<sup>1\*</sup>

1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001

2 中国科学院研究生院, 北京, 100039

\* 通信作者, hgzhang@mail.nwipb.ac.cn

### 摘要

自 1983 年我国学者创立花粉管通道法以来, 在多种农作物中得到应用。本文概述了花粉管通道法的转化原理, 重点介绍了小麦花粉管通道法转基因的操作技术和各种影响因素, 转基因后代的遗传变异以及小麦花粉管通道法所取得的成果, 在此基础上, 指出应加强外源 DNA 导入后对受体 DNA 的作用机理研究, 进一步优化各种转化条件, 提高转化效率, 使花粉管通道法在转移外源基因上发挥更大的作用。

### 关键词

花粉管通道法, 小麦, 转基因

## Progress of Transgenic Technique by Pollen Tube Pathway in Wheat

Liu Baolong<sup>1,2</sup> Zhang Huaigang<sup>1\*</sup>

1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001

2 Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039

\*Corresponding author: hgzhang@mail.nwipb.ac.cn

### ABSTRACT

The method of pollen tube pathway was formally established in 1983. Since then, it has been widely used in crop genetic improvement. This paper introduced the principle of transgenic technique by pollen tube pathway, variation and inheritance of the offsprings, and achievements in wheat. Its shortages were also pointed out and research emphasis about pollen tube pathway in the future should be focused on mechanism and optimization of transgenic conditions in order to increase transgenic efficiency.

### KEYWORDS

Pollen tube pathway, Wheat, Transgenic technique

常规有性杂交在 20 世纪大大提高了农作物的产量和品质。随着人口的增长和人们生活水平的不断提高, 人们对产量需求越来越大, 对质量要求越来越高, 同时, 农作物种内抗病基因的单一化使得病虫害也变得越来越严重, 越来越频繁。如何扩大

种质资源, 提高农作物品种的抗性, 增加产量, 改善品质已成为农作物育种工作者的一大难题。远缘杂交是近来提的较多的一种扩大种质资源的途径, 但与种内杂交不同, 远缘杂交存在杂交不亲和、杂种夭折、杂种不育、后代不稳定等特点。常规有性杂交

难以克服远缘杂交不亲和性,一些特殊方法,如多种花粉同时授粉、胚珠离体培养、染色体加倍,也只是提高了远缘杂交的结实率以及远缘杂种的可育性,在育种中应用仍然面临着诸多问题。20世纪70年代兴起的原生质体融合体细胞杂交技术以及后来的植物离体受精技术在一定程度上可以克服杂交不亲和的现象,但都属于染色体水平的基因转移,在转移优良性状的同时,会带入连锁的不良经济性状。花粉管通道法就是在这种情况下产生的,它的出现是为了解决远缘杂交的问题,但随着20世纪80年代基因工程的兴起,花粉管通道法就几乎是与其它的基因导入方法(如基因枪、PEG、质粒法)同等级别的导入方法,并和它们交融在一起,成为品种改良、新品种培育和创造新物种的重要方法。与其它方法相比,花粉管通道法有许多优点:1)直接得到转化种子,无须经过组培,减少了基因型的影响;2)操作简便经济,无需昂贵的仪器和化学药品,育种家可直接在大田工作;3)大量快捷,性状稳定快;4)转化频率高(曾君祉,1998)。5)不仅可以导入供体的总DNA,而且可以导入含目标基因的质粒,甚至可将化学诱变剂导入胚囊。小麦作为世界上重要的粮食作物,总结花粉管通道法转基因在小麦上的研究进展具有重要意义。

## 1 花粉管通道法的提出与验证

最早的花粉管通道法可能要追溯到 Pandey (1975)以烟草为材料,将供体品种的花粉经射线杀死后与受体品种的新鲜花粉混合授粉,结果获得了供体花色性状的变异,认为经过照射杀死的花粉其遗传物质可不通过配子融合而发生基因转化。80年代初,我国学者周光宇成功地将外源海岛棉DNA导入陆地棉,培育出抗枯萎病的栽培品种,正式创立了花粉管通道法(周光宇等,1988)。他认为可以利用植物受粉后所形成的天然花粉管通道(花粉管引导组织),经珠心通道将外源DNA携带进入胚囊,转化受精卵或其前后的生殖细胞(精子或卵子),由于它们仍处于未形成细胞壁类似“原生质体”状态,并且正进行活跃的DNA复制、分离和重组,所以很容易将外源DNA片段整合到受体基因组中,以达到遗传转化的目的。随后这一方法被广泛地应用到多种植物上,并且得到的分子水平的验证和明确的基因表达产物。1988年,Luo和Wu首次报道用花粉管通道法将含报告基因的质粒DNA

转入水稻,经Southern杂交和酶学测定证明,得到了外源基因整合并表达的转基因水稻植株。牟红梅等(1999)的实验更加证实了这一观点,她们通过花粉管将抗虫基因、选择标记基因导入小麦中,抗性筛选、PCR和Southern杂交表明,外源基因已转入。侯文胜等(2003)用Western blot方法检测到目的蛋白的表达。与此同时,国内外科学家们还对花粉管导入外源基因的机理进行了研究。龚蓁蓁等(1988)应用缺口翻译法,以 $^3\text{H}$ 标记棉花DNA分子,于棉花授粉后24h从子房顶部注入,在30s到8h之间取样,放射自显影,可以观察到2~4h之间80%以上的胚囊均有 $^3\text{H}$ -DNA;除从珠孔到胚囊间的花粉管通道外,珠心任何其它部分均无自显影斑点,进入胚囊的花粉管内亦无同位素,证明花粉管珠心通道是外源DNA从珠孔到达胚囊的唯一途径。邓德旺等(1999)用激光共聚焦显微镜技术进一步确定外源DNA是经过胎座上传输组织中的花粉管外缝隙、胎座表面、珠孔、珠心通道进入胚囊,直接转化处于融合时期的无壁生殖细胞。

## 2 花粉管通道法转基因在小麦中的应用

### 2.1 供体DNA的制备

在小麦中用花粉管通道法进行转基因的研究时,供体DNA一般是从其它供体植物的叶片中直接提取DNA。为了获得比较合适的DNA浓度,要进行DNA浓度测定。DNA浓度用紫外分光光度计进行浓度的测定,根据260nm处的吸收值计算DNA浓度,同时测定230nm,280nm处的吸收值,一般其比值 $A(260/280) \geq 1.8$ , $A(260/230) \geq 2.0$ 为合格。在小麦中,一般用的DNA浓度为 $300\mu\text{g/ml}$ 左右。对DNA分子量的大小也有一定的考虑,尽量小一些,大了就使得基因转入的难度加大,回到了染色体水平上的杂交,也不能小到连一个完整的基因都没有。测定DNA分子量一般用琼脂凝胶电泳法或聚丙烯酰胺凝胶电泳法。而使DNA从长链变成较短的片段,目前用的方法有超声波法,注射器反复抽提法,也有用射线对DNA进行处理,外源DNA经射线照射后,引起DNA链断裂和碱基对破坏,分子量变小,光吸收值降低(李忠杰等,1995,核农学通报,16(1):1-4)。用于溶解DNA的溶液pH也有一定的讲究,一般pH在7左右为佳,不同品种的最佳pH有一定差异(曲士台等,1990,山东农业科学,2:17-18)。作为供体的DNA,有用植物的总

DNA,也有用含有目标基因的质粒。

## 2.2 基因转移

采用花粉管通道法导入外源 DNA,先于受体开花前 2~3d 去雄,套袋,2~3d 后进行同一品种(受体)的自花授粉,0.5~2h 后对授过粉的柱头进行 DNA 的滴注,这就是花粉管通道法。与其它的 DNA 导入方法相比,有着不可比拟的优越性。刘学春等(2002, 山东农业科学, 2: 19-22)发现,花粉管通道法比针刺法的变异频率高,针刺法的株高、穗粒数和千粒重的变异频率分别为 24.9%、36.3%和 34.31%,而花粉管通道法的变异频率分别为 49.02%、62.28%和 58.47%。黄承彦等(1993, 山东农业科学, 5: 3-5)在对高麦草和簇毛麦 DNA 导入普通小麦的研究中,得出花粉管通道法比注射法的结实率高,但其变异效率没有注射法的高。这可能是因为二者的注射时间的不同,使得外源 DNA 接触的受体细胞处于不同的感受态,从而导致不同的结果。前者是在 0.5~2h 进行注射的,而后者是在 24h 和 48h 后进行的注射。现在普遍用 0.5~2h。0.5~2h 是根据 Picard 的实验,他发现花粉落到柱头上以后大约 40min 就到达了珠心,与卵子相接触。也有人认为应该在 8h 后再进行 DNA 的导入,这是根据精子到达了胚囊后,大约 8h 才进行第一次分裂。因为花粉管通道法的工作量大,时间的控制难以精确;再加上后期的鉴定比较麻烦,所以还没有实验证明哪一个说法更对。就以结实率而言,自花授粉后 8h 是最好的,可达 83.14%(曲士台等,1990, 山东农业科学, 2: 17-18)。但因为一天时间的限制,一般使用 0.5~2h。同时在其它植物上人们还发现,DNA 导入时的温度和湿度对结实率也有影响。

在原有的基因转移方法外,科学家们还在进一步改进花粉管通道法。梁顺祥等(1998)在原有一次 DNA 导入的基础上,进行了第二次的 DNA 导入,结果发现第二次外源 DNA 的导入进一步强化了变异,增加了变异的广泛程度。冀俊丽等(2002)用负压花粉管法将耐盐基因 *HVA1* 转入小麦,发现转化率高达 14.1%。

## 2.3 转基因植株的遗传与变异

DNA 导入后,当代收获为  $D_0$  代种。变异一般  $D_1$  代就会出现,但也有  $D_1$  代与受体表型无明显区别, $D_2$  代才表现出变异的报道(黄承彦等,2000),也发现个别株系到了  $D_4$  代出现变异(刘大愚等,1998,

辽宁农业科学, 4: 11-14)。变异有的来自供体,有的表现为中间型,也有超亲遗传的,更有的出现了双亲都没有的性状。变异的鉴定方法可以分为:1)外形鉴定,如株高、穗长、叶形、穗粒数;2)生理鉴定,如同工酶、光合特性、呼吸强度、抗病性、蛋白电泳;3)分子鉴定,如物种专化性 DNA 重复序列、PCR、RAPD、RFLP。许永财等(1998)在用醇溶蛋白电泳技术鉴定时,变异株系的多数谱带与受体相似,也出现了受体所没有的新谱带,各后代的谱带着色深度、谱带宽度均存在显著差异,其差异的出现与外源 DNA 导入有关。同工酶谱分析也表明:变异后代与受体的谱带有明显差异,出现了供体特有的谱带,有的还出现了供体与受体均不具有的谱带,有的还出现了偏父或偏母以及完全互补型的酶带;酶的活性也发生了很大的变化(刘萍等,2003)。

表现出的变异大部分可以在后代中稳定下来,一般要到  $D_3$ 、 $D_4$  代才能稳定(孔青等,1993;刘大愚等,1998, 辽宁农业科学, 4: 11-14)。刘生祥等(2002)在  $D_3$  代就出了抗条锈且其它性状优良的品系。同时发现,也有变异在后代中消失的。朴铁夫等(2002, 农业与技术, 22(2): 78)在用玉米 DNA 导入小麦中, $D_1$  代发现了有 2 株在小麦的叶节处长出了窟似玉米雌雄穗的组织,4 株在叶腋长出了类似玉米雄蕊的组织,但到了  $D_2$  代这些变异却消失了。孔青等(1992, 1993)也曾发现类似的现象。转基因植株的遗传变异还被应用到计算性状的遗传力、遗传变异系数及性状间的相关系数上。宋云枝等(1997)用花粉管通道法将几种植物总 DNA 片段导入小麦,对变异后代 5 个农艺性状的遗传力、遗传变异系数及性状间的相关系数进行了估算。结果表明:株高的遗传力最大,其次为千粒重和穗长。每穗粒数和每株穗数的遗传力最小。遗传变异系数以每株穗数和千粒重最高。在相关系数方面,株高与每穗粒数、穗长与每穗粒数、都有极显著的遗传型正相关;株高与每穗粒数、穗长与每株穗数、每株穗数与每穗粒数、每株穗数与千粒重 4 对性状存在高度负相关。这与前人用其它方法的研究结果相同。

## 2.4 转基因效率

花粉管通道法在小麦转基因中的效率,以单一基因作为供体,一般在 0.2%~0.6%;以外源总 DNA、目标性状多个的变异率为 4%~8%,也有人得到了 30%以上的转基因效率。倪建福等(1994, 甘肃农业科技, 7: 10-11)用花粉管通道法将高粱总体 DNA

导入矮秆、红粒、不抗条中 29 号的小麦品种后,在  $D_1$  代存活的 13 株中,发现了 4 株变异株。刘学春等(2002, 山东农业科学, 2: 19-22)对  $D_1$  的性状变异进行分析,发现同一性状的变异频率会由于供体或受体的不同而发生变化,同时还发现同一供体 DNA 引起不同受体的性状变异频率大小位次关系是一致。在分析变异谱的过程中,他们还发现不同供体导入同一小麦受体,同一供体导入不同小麦受体,它们的变异谱不同,且变异范围差别较大,不同的供体 DNA 导入到同一小麦,  $D_1$  代同一性状的变异趋势不同。而刘根齐等(1994)发现:导入种内 DNA 比导入种间或属间外源 DNA,其子代的表型变化更小,稳定更快。这可能是由于种内 DNA 与其受体基因组的遗传差异小于远缘 DNA 的缘故。

### 2.5 外源 DNA 的作用机理

外源 DNA 导入受体后,对受体的作用机理研究较少。杨景成等(2001)发现在雄性不育变异株上花粉母细胞染色体异常比例达到 18%,而受体花粉母细胞染色体异常比例为 0.8%,二者存在明显差异。染色体异常的类型主要有单价体、染色体落后、染色体断片、染色体桥、微核及二分体、四分体异常等。他推测可能是外源 DNA 导入受体后,整合进受体染色体中的 DNA 片段影响其正常的遗传过程而造成的。刘双俊(1997)对新疆大赖草 DNA 片段导入春小麦 761 转化后代的细胞核型分析,发现受体和转化后代的体细胞染色体倍性没有差异。而染色体的结构发生了变化,受体春小麦 761 的第 7 号染色体着丝粒偏高,8,9 号染色体着丝粒依次下偏,而变异株中一个 7,8,9 号染色体几乎在同一水平线上;从 15 号以后,着丝粒依次呈下降趋势。变异株中的另一个着丝粒的下降趋势不明显。并且在这二个变异株中发现 0.5% 的分裂相出现异常染色体片段及不均等分裂现象,而受体春小麦没有这种现象。这种染色体水平的变异,可能表示外源 DNA 同时转入了不止一个基因。在对导入 DNA 的鉴定实验中,RAPD、RFLP 等分子检测手段发现其扩充特异性的 DNA 谱带不只一条,这也说明了外源 DNA 的进入可能同时从染色体的不同部位进入的。外源 DNA 不仅可以插入到核 DNA 中,还可以整合到叶绿体 DNA 中,杨景成等(2000)用  $^{32}P$  标记的  $\gamma$ -DNA 作为探针对受体、变异株系及变异株系与受体的  $F_1$  代的核 DNA 和叶绿体 DNA 进行点杂交,发现变异株系及  $F_1$  代核 DNA 和叶绿体 DNA 点杂交

均呈阳性反应。

### 2.6 转基因小麦新品系

花粉管通道法在过去的二、三十年间已经在小麦育种中取得了优异的成绩,在国内外刊物是以发表了近 100 篇论文,转入普通小麦的外源 DNA 包括种内的,也有来自小麦族的其它属植物,如大赖草、簇毛麦,也有来自玉米、高粱、豌豆等不同族、不同科植物。已经育成了多个新品种(系),如长穗冰草 DNA 导入的抗旱耐盐新品种济南 18 号(黄承彦,2000)、燕麦 DNA 导入的抗条锈品系(刘生祥等,2002)、大麦 DNA 导入出现的抗白粉病变异株系(阎新甫等,1992)、BYDV-GPV 株系缺失复制酶基因导入出现的抗黄矮病毒株系(吴茂森等,2000)、芦苇草 DNA 导入的抗盐新品系(刘志生等,1998)、高粱 DNA 导入的抗条锈白粒新品系(倪建福等,1994, 甘肃农业科技, 7: 10-11)、转入优质亚基的转基因品系(王广金等,2002)、含耐盐基因 *HVA1* 的转基因小麦(冀俊丽等,2002)。杨景成等(2000)将外源  $\gamma$ -DNA 导入到普通小麦中得到了一个雄性不育变异株。

### 3 有待深入研究的问题

在花粉管通道法小麦转基因取得巨大成绩的同时,我们也发现小麦花粉管通道法转基因的研究大多集中在对后代变异的分析,期望找到有应用价值的变异株系,而对花粉管通道法机理的研究较少,不同实验的结实率和转化率差异太大,各种影响因素还没有得到充分的研究。因此,应加强外源 DNA 导入后对受体 DNA 的作用机理研究,进一步优化各种转化条件,提高转化效率,使花粉管通道法在转移外源基因上发挥更大的作用。

### 致谢

本研究由青海省重大科技招标项目(2001-N-110-02)和中国科学院西北高原生物研究所知识创新工程领域项目(CXLY-2002-6)资助,特此致谢。

### 参考文献

Deng D.W., Guo S.D., and Yang Z.M., 1999, Study on the molecular cytological mechanism of cotton transformation by pollen tube pathway, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scienti-

- a Agricultura Sinica), 32 (6): 113-114 (邓德旺, 郭三堆, 杨志民, 1999, 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究, 中国农业科学, 32 (6): 113-114)
- Gong Z.Z., Shen W.F., Zhou G.Y., Huang J.Q., and Qian S.Y., 1988, Technique of transformation exogenous DNA into plant after pollination-DNA fragments were transferred into embryos via pollen tube, Zhongguo Kexue [Science in China (B)], (6): 611-614 (龚葵葵, 沈慰芬, 周光宇, 黄俊麒, 钱思颖, 1988, 受粉后外源 DNA 导入植株技术 -DNA 通过花粉管通道进入胚囊, 中国科学 B 辑, (6): 611-614)
- Hou W.S., Guo S.D., and Lu M., 2003, Development of transgenic wheat with *Galanthus navius* agglutinin gene (*gna*) via the pollen-tube pathway, Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany), 20 (2): 198-204 (侯文胜, 郭三堆, 路明, 2003, 利用花粉管通道法获得转雪花莲凝集素基因小麦, 植物学通报, 20 (2): 198-204)
- Huang C.Y., Chu X.S., Yang P.P., Shan C.R., Yin Y.F., and Yan T.J., 2000, Using extraneous DNA introduction method to breed drought and saline tolerant wheat variety, Shandong Nongye Kexue (Shandong Agricultural Sciences), 4: 4-6 (黄承彦, 楚秀生, 杨平平, 单承荣, 殷毓芬, 颜挺进, 2000, 外源 DNA 导入技术培育抗旱耐盐小麦新品种, 山东农业科学, 4: 4-6)
- Ji J.L., Sheng C.Z., Shi M., An C.J., Wu X.F., Li D.S., and Du R.Q., 2002, A Study on the transformation of wheat with salt-tolerant gene *HVA1* by method deflating pollen tube, Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops), 22 (2): 10-13 (冀俊丽, 盛长忠, 石明, 安春菊, 吴学锋, 李德森, 杜荣骞, 2002, 通过负压花粉管法将耐盐基因 *HVA1* 转入小麦的研究, 麦类作物学报, 22 (2): 10-13)
- Kong Q., Xu N.Y., and Lin Q., 1993, Preliminary study on the introduction and transformation of exogenous DNA of wheat, Yichuan (Hereditas), 15(5): 19-22 (孔青, 徐乃瑜, 林琼, 1993, 小麦外源 DNA 导入及转化的初步研究, 遗传, 15(5): 19-22)
- Kong Q., Xu N.Y., Lin Q., 1992, A study on the introduction of exogenous DNA and variation of wheat, Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research), 10 (4): 339-344 (孔青, 徐乃瑜, 林琼, 1992, 小麦外源 DNA 导入引起变异的研究, 武汉植物学研究, 10(4): 339-344)
- Liang S.X., Xu Y.C., Chi D.Z., and Huang J.M., 1998, Gliadin analysis with the A-PAGE method on the variant progeny of spring wheat introduced esogenous DNA again and hybridized between two introduced descendants, Qinghai Keji (Qinghai Science and Technology), 5 (2): 9-11 (梁顺祥, 许永财, 迟德钊, 黄居茂, 1998, 春小麦外源 DNA 两次导入和导入后杂交及其后代醇溶蛋白电泳分析, 青海科技, 5 (2): 9-11)
- Liu G.Q., Zhang K.T., Lin S.L., Tu E.X., Wu X.Y., Yao C.Q., Li M.S., and Li Z., 1994, Direct transformation of foreign DNA uptake during wheat pollinating and its application in crop breeding, Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica), 21 (6): 463-467 (刘根齐, 张孔恬, 林世兰, 吐尔逊, 吴新元, 姚翠琴, 李明盛, 李芝, 1994, 外源 DNA 直接导入小麦及其在育种上的应用, 遗传学报, 21 (6): 463-467)
- Liu P., Li S.H., Ma H.W., Zhang L.J., Liu S.X., Xu Z.Z., and Xu X., 2003, Analysis of isoenzyme patterns on progenies of wheat with oat (*Avena sativa* L.) exogenous DNA, Ganhan Diqu Nongye Yanjiu (Agricultural Research in the Arid Areas), 20(1): 49-51 (刘萍, 李树华, 马宏伟, 张立杰, 刘生祥, 徐兆楨, 许兴, 2003, 燕麦 DNA 导入普通小麦后代的同工酶谱分析, 干旱地区农业研究, 20 (1): 49-51)
- Liu S.J., 1997, The somatic karyotype of Xinjiang wheat 761 transformed by *Leymus racemosus* (Lam.) tzvel DNA fragments, Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica), 6 (4): 105 (刘双俊, 1997, 新疆大赖草 DNA 片段导入春小麦 761 转化后代的细胞核型分析, 西北农业学报, 6 (4): 105)
- Liu S.X., and Liu P., 2002, Variations in wheat characters arising from incorporation of exogenous DNA and their selection, Xinan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Southwest Agricultural University), 24 (6): 506-508 (刘生祥, 刘萍, 2002, 外源 DNA 导入小麦后的性状变异与选择, 西南农业大学学报, 24 (6): 506-508)
- Liu Z.S., Zhang K.P., and Fu X.Y., 1998, Reed DNA introducing into wheat and salt-resistant transformation screening, Jilin Nongye Kexue, 4: 29-31 (刘志生, 张坤普, 付秀云, 1998, 芦苇草 DNA 导入小麦抗盐性转化体的筛选, 吉林农业科学, 4: 29-31)
- Luo Z.X., and Wu R., 1988, A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway, Plant Mol.Biol. Rep., 7: 69-77
- Mu H.M., Liu S.J., Zhou W.J., Wen Y.X., Zhang W.J., and Wei R.X., 1999, Transformation of wheat with insecticide gene of arrowhead proteinase inhibitor by pollen tube pathway and analysis of transgenic plants, Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica), 26 (6): 634-643 (牟红梅, 刘树俊, 周文娟, 文玉香, 张文俊, 魏荣暄, 1999, 慈姑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, 遗传学报, 26(6): 634-643)
- Pandey K.K., 1975, Sexual transfer of specific genes without gametal fusion, Nature, 256(5515): 310-313
- Song Y.Z., Liu X.C., Chen G., and Wen F.J., 1997, The heritability of some agronomic traits of wheat prtatively transgenic lines derived from exogenous DNA introduction via pollen tube pathway, Shandong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shandong Agricultural University), 28 (4): 408-414 (宋云枝, 刘学春, 陈纲, 温孚江, 1997, 外源 DNA

- 导入小麦变异后代主要性状遗传力和相关性研究, 山东农业大学学报, 28(4): 408-414)
- Wang G.J., Li Z.J., Zhang X.D., Tang F.L., Zhang H.J., and Sun Y., 2002, Production of transgenic wheat line via pollen tube path way transferring wheat HWM glutenin subunit gene, Heilongjiang Nongye Kexue (Heilongjiang Agricultural Sciences), (6): 1-3(王广金, 李忠杰, 张晓东, 唐凤兰, 张宏纪, 孙岩, 2002, 利用花粉管通道法将编码优质 HMW-GS 基因导入小麦进行品质改良的研究, 黑龙江农业科学, (6): 1-3)
- Wu M.C., Tian M.Y., Chen C.C., Zhang W.W., and Cheng Z.M., 2000, Transformation of wheat with defective replicase gene of BYDV-GPV via pollen tube pathway, Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology), 8(2): 125-127(吴茂森, 田苗英, 陈彩层, 张文蔚, 成卓敏, 2000, 通过花粉管途径将 BYDV-GPV 株系缺失复制酶基因导入小麦, 农业生物技术学报, 8(2): 125-127)
- Xu Y.C., Liang S.X., Chi D.Z., and Huang J.M., 1998, Verification of the variant progenies of spring wheat introduced exogenous DNA with the gliadin A-PAGE method, Qinghai Daxue Xuebao (Journal of Qinghai University), 16(6): 26-28(许永财, 梁顺祥, 迟德钊, 黄居茂, 1998, 种子醇溶蛋白电泳技术鉴定外源 DNA 导入春小麦变异后代, 青海大学学报, 16(6): 26-28)
- Yan X.F., Liu W.X., and Hu X.Y., 1991, Preliminary report on the effects of exogenous DNA treatment on seeds and seedling and florals of wheat and induced variation, Henan Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Henanensis), 25(4): 359-365(阎新甫, 刘文轩, 胡学义, 1991, 外源 DNA 处理小麦种苗和颖花及其诱导变异的研究初报, 河南农业大学学报, 25(4): 359-365)
- Yang J.C., Yu Y.J., Liu F.Z., Qi Y.F., and Shen F.F., 2000, Molecular verification on male sterile mutant after injected exogenous  $\lambda$ DNA into wheat, Henongxue Bao (Acta Agriculturae Nucleatae Sinica), 14(6): 371-374, (杨景成, 于元杰, 刘凤珍, 齐延芳, 沈法富, 2000, 外源  $\lambda$ DNA 导入普通小麦雄性不育变异的分子验证, 核农学报, 14(6): 371-374)
- Yang J.C., Yu Y.J., Qi T.F., Shen F.F., and Liu F.Z., 2001, Meiosis observation of the sterile mutant after injection of exogenous DNA into wheat, Henongxue Bao (Acta Agriculturae Nucleatae Sinica), 15(1): 1-5(杨景成, 于元杰, 齐延芳, 沈法富, 刘凤珍, 2001, 外源 DNA 导入普通小麦雄性不育变异体的花粉母细胞减数分裂观察, 核农学报, 15(1): 1-5)
- Zeng J.Z., Wu Y.Q., Wang D.J., Zhang J., Ma Z.R., and Zhou Z.Y., 1998, Genetic expression in progeny of transgenic plants obtained by using pollen-tube pathway (or delivery) method and approach to the transformation mechanism, Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin), 6(3): 561-566(曾君祉, 吴有强, 王东江, 张健, 马峥嵘, 周志勇, 1998, 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨, 科学通报, 6(3): 561-566)
- Zhou G.Y., Weng J., Gong Z.Z., Zeng Y.S., Yang W.X., Shen W.F., Wang Z.F., Tao Q.Z., Huang J.Q., Qian S.Y., Liu G.L., Ying M.C., Xue D.Y., Hong A.H., Xu Y.J., Chen S.B., and Duan X.L., 1988, Molecular breeding of agriculture a technique for introducing exogenous DNA into plants after self pollination, Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 21(3): 1-6(周光宇, 翁坚, 龚蓁蓁, 曾以申, 杨晚霞, 沈蔚芳, 王自芬, 陶全洲, 黄骏麒, 钱思颖, 刘桂铃, 应苗成, 薛达元, 洪爱华, 徐英俊, 陈善葆, 段小岚, 1988, 农业分子育种授粉后外源 DNA 导入植物的技术, 中国农业科学, 21(3): 1-6)