

河南省新育成 8 个小麦品种(系) 幼胚培养再生性能评价

贾华岚¹, 杜丽璞¹, 胡琳², 王轲¹, 刘宏伟¹, 叶兴国¹

(¹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; ²河南省农业科学院小麦研究所, 郑州 450002)

摘要: 从新育成的小麦品种中筛选组织培养再生能力强的基因型, 对于利用基因工程途径改良小麦具有重要意义。本研究以河南省近几年育成的 8 个小麦品种(系)的幼胚为材料, 研究 3 种生长素 2,4-D、Dicamba、Picloram 对 8 个小麦品种(系)较大幼胚再生的影响, 以及品种间再生能力的差异。结果发现培养基中添加 Dicamba 时, 8 个品种(系)的再生率达 189% 以上, 其中郑麦 1836 和中育 1439 等 6 个品种(系)的再生率超过了 400%; 添加 Picloram 时, 8 个品种(系)的再生率均在 210% 以上, 其中郑麦 1860 和郑麦 5135 等 4 个品种(系)的再生率超过了 470%; 添加 2,4-D 时, 郑麦 7698、郑麦 0856 和郑麦 9023 没有获得再生植株, 郑麦 1860 和郑麦 1836 的再生率低于 60%, 中育 1439 再生率最高, 其次为郑麦 5135 和郑麦 1354。结果表明, 小麦较大幼胚植株再生最适宜的生长素为 Dicamba, 其次为 Picloram, 不同小麦品种(系)适宜的生长素有所不同; 在 8 个小麦品种(系)中, 再生能力最强的基因型为中育 1439, 其次为郑麦 5135、郑麦 5135 和郑麦 1354。

关键词: 小麦; 新品种; 幼胚; 生长素; 植株再生

Evaluation of Plant Regeneration Ability of Immature Embryos from Eight New Wheat Varieties or Lines Developed in Henan Province

JIA Hua-lan¹, DU Li-pu¹, HU Lin², WANG Ke¹, LIU Hong-wei¹, YE Xing-guo¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081; ²Wheat Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Abstract: Wheat is the most widely cultivated cereal crop in the world. But wheat production is being seriously affected by biotic and environmental stresses such as diseases, drought, salt, and high temperature with the global climate change. It is high necessary to improve wheat for biotic and abiotic resistance by genetic engineering technique. Compared with other major crops, wheat modification by transgenic approach is lagging behind in the past two decades. Transformation protocol and genotypes will all influence the development of genetic modified wheat varieties. Screening wheat genotypes with high plant regeneration potential from new released commercial wheat varieties or lines will be great beneficial to the improvement of this crop by genetic engineering strategy. Immature grains of eight new wheat cultivars (Zhengmai 0896, Zhengmai 1354, Zhengmai 1836, Zhengmai 1860, Zhengmai 5135, Zhengmai 7698, Zhengmai 9023, and Zhongyu 1439) released in Henan province recently collected in growth chamber post anthesis for 15-16 days, and their immature embryos of 1.5-2.0 mm in size were isolated and cultured on callus induction medium containing three auxins 2,4-D, dicamba and picloram respectively, after carefully removing the embryonic axis. By investigating total calli, differentiated calli, and regeneration shoots during the tissue culture course, differentiated calli rate and regenerate rate were calculated for each treatment of each wheat variety. The effect of the three auxins 2,4-D, dicamba and picloram on plant regeneration of their larger immature embryos was

收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-01-13 网络出版日期: 2017-06-13

URL: /kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170613.0857.020.html

基金项目: 国家转基因专项(2016ZX08010004); 国家重点研发计划(2016YFD0101602)

第一作者主要从事小麦组织培养和遗传转化研究。E-mail: 903018428@qq.com

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

evaluated, and the regeneration abilities among the varieties were compared. Adding dicamba in callus induction medium can greatly increase the seedling regeneration frequency. Plant regeneration efficiency of all the tested wheat varieties was more than 189%, among which the regeneration efficiency of six varieties such as Zhengmai 1836 and Zhongyu 1439 was over 400%. When picloram was applied in callus initiation medium, plant regeneration efficiency of the eight wheat varieties was more than 210%, among which the regeneration efficiency of four varieties such as Zhengmai 1860 and Zhengmai 5135 was over 1100%. In the condition of 2,4-D used on callus initiation medium, Zhongyu 1439 showed the highest regeneration ability followed by Zhengmai 5135 and Zhengmai 1354, while a regeneration efficiency less than 60% was obtained in Zhengmai 1860 and Zhengmai 1836, and no regeneration shoot was obtained in Zhengmai 7698, Zhengmai 0856 and Zhengmai 9023. Results indicated the optimal auxin for the plant regeneration of larger immature wheat embryos was dicamba followed by picloram, but difference related to genotypes was also detected. In the tested eight wheat varieties, the order of the first four ones on the regeneration potential of immature embryos was Zhongyu 1439, Zhengmai 5135, Zhengmai 5135 and Zhengmai 1354. Thereby, the four new wheat varieties evaluated in this study with high regeneration potential of immature embryos are suggested to be used in wheat transformation or transgenic breeding.

Key words: wheat; new varieties; immature embryos; auxin; plant regeneration

小麦是我国最重要的粮食作物之一,其安全生产关系到社会、经济稳定发展和人民安居乐业^[1]。在影响小麦生产的众多因素中,品种改良是增加小麦产量至关重要的环节^[1-2]。常规杂交育种一直是小麦新品种选育的主要方式,生物技术育种尤其基因工程育种是对小麦品种进行遗传改良的潜在途径^[3]。其中,组织培养高频率再生植株是小麦基因工程育种的基础。尽管离体组织培养小麦幼胚、幼穗、花药、成熟胚、原生质体、小孢子等外植体均可获得再生植株^[4-10],但相比之下小麦幼胚再生能力强、再生率最高,因而小麦遗传转化研究中广泛应用幼胚^[3]。影响小麦幼胚再生的因素很多,包括培养基、植物激素、幼胚大小、生理状态和基因型等^[11-14]。研究表明,MS 培养基适宜于小麦多数外植体的组织培养,2,4-D、Dicamba、Picloram 等生长素浓度 2.0 ~ 3.0 mg/L 时再生效果最好^[12],开花后 13 ~ 15 d、体积为 1.0 ~ 1.2 mm 的幼胚最适合进行组织培养^[13-14],小麦母体植株生长的适宜温度条件为 18 ~ 25 °C^[13]。在基因型方面,Bobwhite、Veery5、Fielder、Westonia、CB037 和科农 199 等是国内外开展小麦组织培养和遗传转化常用的小麦品种^[3,15-16]。虽然上述大部分小麦基因型的幼胚再生能力较强,转化效率较高,但农艺性状较差,不能满足转基因育种的需要。因此,需要从最新育成的优良小麦品种中筛选幼胚再生能力强的基因型用于转基因研究。

河南是中国小麦的主产省份,其面积占全国的 19% 以上,产量占全国的 24% 以上,在中国小麦生产中具有举足轻重的作用。河南省育成小麦品种的

覆盖面积较大,如著名的小麦品种 AK58、郑麦 9023、周麦 22 等,不但在河南大面积种植,在江苏、湖北和陕西等地也有较大种植面积,这意味着河南省的小麦品种改良工作极大影响着中国的小麦生产。因此,本研究对河南省新育成的郑麦 7698、郑麦 1354、中育 1439、郑麦 5135 等 8 个小麦新品种(系)进行幼胚为外植体的再生性能评价,筛选出幼胚再生率高的品种进一步用于小麦转基因研究,对于促进转基因小麦新品种培育具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 小麦材料

本试验所用的 7 个小麦品种(系)郑麦 1354、郑麦 5135、郑麦 1836、郑麦 7698、郑麦 0856、郑麦 1860 和郑麦 9023 由河南省农业科学院小麦研究所培育并提供;中育 1439 由中国农业科学院棉花研究所培育,河南省农业科学院小麦研究所提供。这 8 个小麦品种(系)株高适中,农艺性状优良,适应性较强,产量潜力较高,正在黄淮海麦区大面积推广或展现出了较大应用潜力。但它们在抗逆性方面存在隐患,需要利用基因工程途径进行持续改良,以充分发挥在生产中的应用价值。

1.2 小麦材料种植

2015 年 9 月将上述 8 个小麦品种(系)播种于中国农业科学院作物科学研究所北圃场实验地,2015 年 11 月将分蘖期的小麦植株移栽于中国农业科学院作物科学研究所转基因中心植物生长室花盆中,移栽基质为基底泥炭藓,养分供给采用奥绿缓释肥。生长室光照强度为 35000 Lux,白天温度 25 °C,

夜间温度 20 ℃,相对湿度为 40%。定期浇水和喷药,保证水分供给和控制白粉病及蚜虫为害。

1.3 小麦幼胚培养和培养基设置

开花 15~16 d 时按小麦品种取未成熟主穗,剥取未成熟子粒,在超净工作台内用 75% 酒精灭菌 1~2 min,15% 次氯酸钠灭菌 8 min,无菌水冲洗 4~5 次。在体式显微镜下小心取出 1.5~2.0 mm 大小的幼胚,用解剖刀切去胚轴,将幼胚的盾片面向上分别接种于愈伤组织诱导培养基 MSD2 (MS + 4% 麦芽糖 + 2.0 mg/L Dicamba + 2.4 g/L Phytigel, pH 5.8)、MSP2 (MS + 4% 麦芽糖 + 2.0 mg/L Picloram, pH 5.8) 和 SD2 (MS + 4% 麦芽糖 + 2.0 mg/L 2,4-D, pH 5.8) 上,在植物生长箱(25 ℃,黑暗)中培养 14 d。然后将愈伤组织转移到分化培养基 MSFH (1/2MS + 2% 蔗糖, pH 5.8),在培养室(23 ℃,光照)中培养 14 d。将再生芽转移到盛有分化培养基 MSFH 的培养盒中,在培养室中继续培养 20 d。完整再生植株移栽到花盆中,在植物生长室生长至结实。

1.4 数据统计和分析

接种后统计接种的幼胚数,培养 7 d 后统计愈伤组织数,分化培养 7 d 后统计分化愈伤组织数和绿芽数,计算愈伤组织分化率和再生率。再生率

(%) = 绿芽点数/接种幼胚数 × 100%,愈伤组织分化率 = 分化愈伤组织数/接种幼胚数 × 100%。

用 SAS 软件对 8 个参试小麦品种(系)的愈伤组织分化率和再生率进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 对 8 个小麦品种(系)幼胚再生性能的影响

郑麦 1354、中育 1439、郑麦 5135 和郑麦 1836 等 8 个参试小麦新品种(系)的幼胚接种在添加 2 mg/L 2,4-D 的愈伤组织诱导培养基上培养后,转移到 MSFH 分化培养基上培养,愈伤组织分化率 0~83.3%,植株再生率 0~780.0%,分别对 8 个品种(系)愈伤组织分化率和植株再生率进行方差分析,发现郑麦 1354、中育 1439、郑麦 5135 在愈伤组织分化率上均与其他品种(系)有极显著差异;在植株再生率上,郑麦 1354 均与其他品种(系)有极显著差异。郑麦 7698、郑麦 0856 和郑麦 9023 再生性能最差,均没有获得再生植株;中育 1439 再生性能最好,其次为郑麦 5135 和郑麦 1354 均较高(表 1)。结果表明,中育 1439、郑麦 5135 和郑麦 1354 的幼胚适合在添加 2.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上诱导愈伤组织和进一步再生植株。

表 1 不同小麦品种(系)在添加 2,4-D 培养基上的再生效果

Table 1 Regeneration status of different wheat varieties on callus induction medium containing 2,4-D

品种(系) Variety (Line)	接种幼胚数 Immature embryos	愈伤组织数 Calli	分化愈伤组织数 Differentiated calli	绿芽数 Regeneration shoots	愈伤组织分化率(%) Differentiated calli rate	植株再生率(%) Regeneration rate
郑麦 1354 Zhengmai 1354	29	29	24	114	82.7aA	393.1bA
中育 1439 Zhongyu 1439	30	30	25	234	83.3aA	780.0aB
郑麦 5135 Zhengmai 5135	29	29	19	119	65.5bA	410.3bB
郑麦 1836 Zhengmai 1836	31	31	9	17	29.0cB	54.8cC
郑麦 7698 Zhengmai 7698	24	24	0	0	0dB	0cC
郑麦 0856 Zhengmai 0856	23	23	0	0	0dB	0cC
郑麦 1860 Zhengmai 1860	37	37	5	9	13.5cdB	24.3cC
郑麦 9023 Zhengmai 9023	22	22	0	0	0dB	0cC

a, b, c, d, e: 在 $P < 0.05$ 水平差异显著。A, B, C, D, E: 在 $P < 0.01$ 水平差异极显著。下同

a, b, c, d, e stand for significant difference at $P < 0.05$, and A, B, C, D, E stand for highly significant difference at $P < 0.01$. The same as below

2.2 不同小麦品种(系)幼胚在添加 Dicamba 培养基上的再生性能比较

郑麦 1354 等 8 个参试小麦新品种(系)的幼胚

在添加 2.0 mg/L Dicamba 的愈伤组织培养基上培养后,转移到分化培养基上培养,愈伤组织分化率 42.9%~89.7%,植株再生率 189.2%~1334.5%,

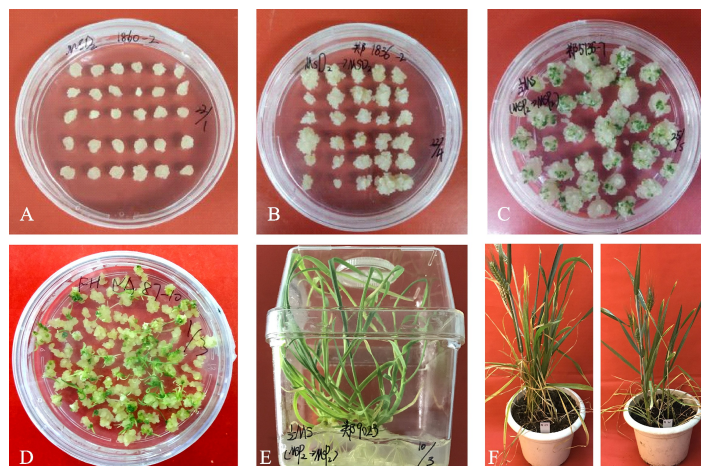
分别对 8 个品种(系)愈伤组织分化和植株再生率进行方差分析,发现中育 1439、郑麦 5135、郑麦 1836、郑麦 1860 在愈伤组织分化率上均与其他品种(系)有极显著差异;在植株再生率上,郑麦 1836 与其他品种(系)均有极显著差异。郑麦 0856 的再生率相对较低,郑麦 1836 和中育 1439 再生率非常高,郑麦 1860、郑麦 5135、郑麦 1354、郑麦 9023 和郑麦

7698 的再生率也较高(表 2,图 1)。将部分小麦再生植株移栽到花盆中,成活后的植株均能正常生长和结实(图 1)。结果表明,这 8 个小麦新品种(系)的幼胚均适合在添加 2.0 mg/L Dicamba 的 MS 培养基上诱导愈伤组织,进一步获得再生植株,其中,郑麦 1836 和中育 1439 最适宜利用 Dicamba 诱导胚性愈伤组织。

表 2 不同小麦品种(系)在添加 Dicamba 培养基上的再生效果

Table 2 Regeneration status of different wheat varieties on callus induction medium containing dicamba

品种(系) Variety(Line)	接种幼胚数 Immature embryos	愈伤组织数 Calli	分化愈伤组织数 Differentiated calli	绿芽数 Regeneration shoots	愈伤组织分化率(%) Differentiated calli rate	植株再生率(%) Regeneration rate
郑麦 1354 Zhengmai 1354	20	20	11	86	55.0cBC	430.0cdCD
中育 1439 Zhongyu 1439	29	29	24	327	82.8abA	1127.6bB
郑麦 5135 Zhengmai 5135	25	25	18	112	72.0bAB	448.0cdCD
郑麦 1836 Zhengmai 1836	29	29	26	387	89.7aA	1334.5aA
郑麦 7698 Zhengmai 7698	37	37	19	125	51.4cBC	338.0deDE
郑麦 0856 Zhengmai 0856	28	28	12	53	42.9cC	189.2eE
郑麦 1860 Zhengmai 1860	50	50	38	266	76.0abA	532.0cC
郑麦 9023 Zhengmai 9023	16	16	8	65	50.0cBC	406.3cCD



A: 郑麦 1860 初始愈伤组织; B: 郑麦 1836 胚性愈伤组织; C: 郑麦 5135 愈伤组织分化; D: 郑麦 1836 愈伤组织分化;

E: 郑麦 9023 再生植株壮苗; F: 郑麦 7698 再生植株移栽; G: 郑麦 9023 再生植株移栽

A: Primary callus of Zhengmai 1860, B: Embryonic callus of Zhengmai 1836, C: Callus differentiation of Zhengmai 5135, D: Callus differentiation of Zhengmai 1836, E: Shoots elongation and rooting from tissue culture of Zhengmai 9023, F: Transplantation of regeneration plants from Zhengmai 7698,

G: Transplantation of regeneration plants from Zhengmai 9023

图 1 不同小麦品种(系)幼胚在添加 Dicamba 培养基上的再生效果

Fig. 1 Regeneration appearance of immature wheat embryos from different wheat varieties cultured on callus induction medium with dicamba

2.3 Picloram 对不同小麦品种(系)幼胚再生性能的影响

8个参试小麦新品种(系)的幼胚在添加2.0 mg/L Picloram的愈伤组织培养基上培养后,转移到分化培养基上培养,愈伤组织分化率41.4%~93.8%,植株再生率217.2%~912.2%,分别对8个品种(系)的愈伤组织分化率和植株再生率进行方差分析,发现郑麦5135在愈伤组织分化率上均与其他品种(系)有极显著差异;在植株再生率上,郑麦

5135和郑麦1860与其他品种(系)均有极显著差异。其中,郑麦1860和郑麦5135的再生性能非常好,愈伤组织分化率70%以上,植株再生率700%以上;其余6个品种(系)的再生性能也较好,愈伤组织分化率40%以上,植株再生率200%以上,郑麦1836和郑麦0856相对较低(表3)。结果表明,这8个小麦新品种的较大幼胚也非常适合在添加2.0 mg/L Picloram的MS培养基上诱导愈伤组织,进一步获得再生植株。

表3 不同小麦品种(系)在添加Picloram培养基上的再生效果

Table 3 Regeneration status of different genotype calli on medium containing picloram

品种(系) Variety	接种幼胚数 Immature embryos	愈伤组织数 Calli	分化愈伤组织数 Differentiated calli	绿芽数 Regeneration shoots	愈伤组织分化率(%) Differentiated calli rate	植株再生率(%) Regeneration rate
郑麦1354 Zhengmai 1354	24	24	15	89	62.5bcB	370.8bcC
中育1439 Zhongyu 1439	30	30	23	145	76.7bB	483.3bBC
郑麦5135 Zhengmai 5135	32	32	30	246	93.8aA	768.8aAB
郑麦1836 Zhengmai 1836	29	29	12	63	41.4cB	217.2cC
郑麦7698 Zhengmai 7698	47	47	25	162	53.2bcB	344.7bcC
郑麦0856 Zhengmai 0856	30	30	17	80	56.7bcB	266.7bcC
郑麦1860 Zhengmai 1860	41	41	30	374	73.2bcB	912.2aA
郑麦9023 Zhengmai 9023	20	20	10	94	50.0bcB	470.0bBC

3 讨论

别晓敏等^[12]以CB037小麦品种1.0~1.2 mm大小的幼胚为材料,比较了不同生长素适宜浓度对小麦幼胚再生的影响,发现2,4-D和Dicamba诱导较小幼胚的再生效果较好,2,4,5-T和Picloram效果较差。以小麦较小幼胚作为受体材料进行农杆菌转化或基因枪转化,稳定转化效率非常低且不稳定。Y. Ishida等^[17]利用较大的幼胚(1.8~3.0 mm)建立了农杆菌转化小麦模式基因型Fielder稳定、高效转化体系,转化效率高达50%以上。T. Richardson等^[15]、K. Wang等^[16]利用上述转化体系,分别以澳大利亚和中国大面积推广小麦品种的较大幼胚为材料,建立了商业化小麦品种的转化体系,转化率

3%~50%。相比较小的幼胚,较大的幼胚不但再生效率和转化效率较高,而且操作比较方便。但Y. Ishida等^[17]利用小麦较大幼胚建立的农杆菌转化体系受专利保护,其利用范围受到了限制,需要探讨较大幼胚的再生体系。

为了提高大龄小麦幼胚的再生效率,石珍源等^[18]以18个普通小麦基因型和5个硬粒小麦基因型为材料,对其开花授粉后15~17 d的大龄幼胚进行破碎处理,发现培养2 d后破碎处理的再生率(18.2%)显著高于完整胚对照(1.7%),不同基因型大龄幼胚破碎处理后再生率差异显著。本研究以河南省新育成的8个小麦新品种(系)为材料,探讨了3种生长素(2,4-D、Dicamba和Picloram)对不同小麦品种较大幼胚(1.5~2.0 mm)再生性能的影响。

响,发现 Dicamba 诱导较大幼胚的再生效果最好,8 个品种(系)的再生率都在 189% 以上,郑麦 1836 和中育 1439 等 6 个品种(系)的再生率超过了 400%; Picloram 诱导较大幼胚的再生效果也比较好,8 个品种(系)的再生率都在 210% 以上,郑麦 1860 和郑麦 5135 等 4 个品种(系)的再生率超过了 470%; 2,4-D 诱导较大幼胚的再生效果最差,3 个品种(系)没有获得再生植株,郑麦 1860 和郑麦 1836 的再生率低于 60%,中育 1439 再生率最高,其次为郑麦 5135 和郑麦 1354。而在小麦较小幼胚组织培养和遗传转化中普遍采用 2,4-D^[11,12,19],这与较大幼胚适宜的生长素类型(Dicamba)不同,其差异可能与幼胚发育不同阶段的内源激素含量和平衡有关。另外,本研究在幼胚培养起始阶段彻底去除了胚轴,排除了生长点对再生的不利影响,这可能也是导致两项研究结果差异的原因。

在本研究所用的 8 个小麦品种(系)中,再生能力最强的基因型为中育 1439,在不同生长素诱导的情况下均获得了较高的再生率,其次为郑麦 5135、郑麦 5135 和郑麦 1354,认为这几个品种(系)可用于小麦转基因工作。不同小麦品种其组织培养再生能力不同,存在强烈的基因型特异性,这在很大程度上由不同品种的基因型决定^[20-21],也与受体植株的生长环境和生理状态有关^[13,20]。不同小麦品种(系)较大幼胚组织培养再生植株适宜的生长素并不相同,这势必与不同小麦品种较大幼胚的生理状态和内源生长素含量及比例有关,需要摸索优良小麦品种较大幼胚再生适宜的生长素类型,为进一步利用它们进行遗传转化奠定基础。

参考文献

- [1] 何中虎,夏先春,陈新民,等. 中国小麦育种进展与展望[J]. 作物学报,2011,37(2):202-215
- [2] Shewary P R. Wheat [J]. J Exp Bot,2009,60:1537-1553
- [3] 叶兴国,徐惠君,杜丽璞,等. 小麦规模化转基因技术体系构建及其应用[J]. 中国农业科学,2014,47(21):4155-4171
- [4] 李根英,黄承彦,隋新霞,等. 小麦不同外植体的组织培养效
- 果研究[J]. 麦类作物学报,2006,26(1):21-25
- [5] 欧阳俊闻,胡含,庄家骏,等. 小麦花粉植株的诱导及后代观察[J]. 中国科学,1973(1):72-82
- [6] 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
- [7] Yin G X, Wang Y L, She M Y, et al. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat [J]. Agr Sci China,2011,10(1):9-17
- [8] 李欣,刘凌云,杜丽璞,等. 十二个小麦新品种成熟胚再生性能与农杆菌侵染敏感性评价[J]. 中国农业科技导报,2012,14(2):40-46
- [9] Harris R, Wright M, Byrne M, et al. Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 337-340
- [10] Liu W, Zheng M Y, Polle E A, et al. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis [J]. Crop Sci,2002,42:686-692
- [11] 别晓敏,杜丽璞,徐惠君,等. 培养基中 CuSO₄ 和 Fe 盐浓度对小麦胚培养再生效果的影响[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(6):975-981
- [12] 别晓敏,杜丽璞,余茂云,等. 不同生长素类型及组合对小麦幼胚再生效果的影响[J]. 核农学报,2011,25(5):1023-1028
- [13] Wang X M, Wang K, Li J R, et al. Effects of environmental temperature on the regeneration frequency of the immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. J Integr Agr, 2014, 13(4): 722-732
- [14] Zhang W, Wang X M, Fan R, et al. Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos [J]. J Integr Agr,2015,14(1): 11-19
- [15] Richardson T, Thistleton J, Higgins T J, et al. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection [J]. Plant Cell Tiss Org,2014,119:647-659
- [16] Wang K, Liu H Y, Du L P, et al. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties [J]. Plant Biotechnol J,2016, doi:10.1111/pbi.12660
- [17] Ishida Y, Tsunashima M, Hiei Y, et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos [J]. Methods Mol Biol,2015,1223:189-198
- [18] 石珍源,殷桂香,杜丽璞,等. 小麦大龄幼胚再生性能改进与农杆菌转化[J]. 中国农业科学,2011,44(2):225-232
- [19] 邢莉萍,王华忠,蒋正宁,等. 小麦类甜蛋白基因的转化及转基因植株的抗病性分析[J]. 作物学报,2008,34(3):349-354
- [20] Tao L L, Yin G X, Du L P, et al. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Agr Sci China,2011,10(3):317-326
- [21] Yin G X, Wang Y L, She M Y, et al. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat [J]. Agr Sci China,2011,10(1):9-17