

基因枪介导小麦遗传转化的几个重要影响因素的研究

黄 萱，徐子勤^{*}，郝建国，李 晶

(西北大学生命科学学院生物技术省级重点实验室，西安 710069)

摘要：用基因枪将携带 *gus-bar* 双标记基因的质粒 pDB1 及携带 *RC24* 几丁质酶基因的质粒 pARN6、pBAB3、pYAO24(pYAO24 还带有 *nptI* 选择标记基因)以 pARN6+pDB1、pBAB3+pDB1 及 pYAO24 三种组合方式转入 8 个小麦品种的未成熟胚盾片组织, 经选择培养获得转基因植株。对基因枪介导小麦遗传转化的主要影响因素, 如基因型、材料、金粒制备和轰击参数进行分析, 发现西农 88 是理想的转基因受体基因型, 开花两周后的小麦幼胚为理想的轰击材料, 制备子弹时合适的金粒含量为 30~50 μg/次, 充分混匀金粒悬浮液可以减少幼胚损伤和提高转化频率。GUS 染色发现以蔗糖为渗透剂所产生的蓝色斑点比以甘露醇为渗透剂所产生的蓝色斑点大。针对载体上的 *nptI* 筛选标记基因, 150 mg/L 的硫酸卡那霉素为较理想的选择剂浓度; 针对载体上的 *bar* 筛选标记基因, PPT 的浓度为 2 mg/L 易出现假阳性植株, 因此应将浓度增加到 3~5 mg/L。

关键词：基因枪方法；遗传转化；小麦；影响因素

中图分类号：Q943

文献标识码：A

文章编号：1000-470X(2004)02-0111-05

Factors Affecting Wheat (*Triticum aestivum L.*) Transformation Mediated by Biolistic Bombardment

HUANG Xuan, XU Zi-Qin^{*}, HAO Jian-Guo, LI Jing

(Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The plasmid pDB1 with *gus-bar* as double marker gene, and the plasmid pARN6, pBAB3, pYAO24 with *RC24* gene encoding rice basic chitinase were co-transferred to immature embryos of 8 wheat genotypes in combination of pDB1+pARN6, pDB1+pBAB3 or pYAO24 via particle bombardment. pYAO24 has *nptI* as selective gene. Transgenic plants were regenerated after selective culture. Factors influencing wheat transformation via particle bombardment, such as genotype, gold particle preparation, parameters of bombardment, were analyzed. It is found that Xinong 88 is a very ideal genotype of genetic transformation, immature embryos two weeks post-pollination were suitable wheat materials of bombardment, 30—50 μg gold particle per bombardment was appropriate, mixing the gold particle suspension thoroughly could reduce the injury to immature embryos and enhance the transformation frequency. GUS histochemical staining revealed that blue spots produced by sucrose as osmoticum were bigger than that of mannitol as osmoticum. 150 mg/L kanamycin was adopted when *nptI* was used as selective gene. It can produce false positive plants easily that the phosphinothricin(PPT) concentration was 2 mg/L when *bar* was used as selective gene. We should enhance the concentration from 2 mg/L to 3—5 mg/L in the future.

Key words: Biolistic bombardment; Transformation; Wheat; Influencing factors

收稿日期：2003-05-22，修回日期：2003-12-17。

基金项目：陕西省自然科学基金重点项目(2001SM24)资助；陕西高校重点实验室项目(陕教研(2001)29号-2)资助。

作者简介：黄萱(1979—)，女，陕西西安人，汉族，西北大学在读博士研究生(E-mail: huang79xuan@sohu.com)。

* 通讯作者。

小麦是世界上最重要的粮食作物之一,因此,将现代生物技术尤其是植物转基因技术应用于小麦的遗传改良研究有着十分重要的意义。随着 Ubil、Act1、Emu 等单子叶植物高效表达启动子,bar、hpt、npt I、gfp 等选择标记基因和 EHA105、MOG101、ABI、AGI 等高毒性农杆菌菌株的运用,以及对 CaMV35S 组成型表达启动子的改造(上游区插入了 1~2 个增强子),近几年来单子叶植物遗传转化研究取得了可喜进展^[1]。目前,小麦转基因最常用的方法为基因枪法、农杆菌介导法和花粉管道法。但是,由于小麦不是农杆菌的天然宿主及禾谷类植物对农杆菌没有伤反应现象^[2],小麦农杆菌介导的基因转移一直是世界上的一道难题。直到 1997 年 Cheng 等^[3]用农杆菌杆感染小麦幼胚及胚性愈伤组织,首次通过农杆菌介导法获得了可正常发育的小麦转基因植株。近几年,我国学者也作了大量工作^[4~6]。自 Vasil 等^[7]在世界上首次报道利用基因枪转化技术获得小麦转基因植株至今,由基因枪介导的小麦遗传转化作为改良小麦性状、提高小麦抗性的主要手段之一被广为应用,抗生素、抗除草剂基因及不少功能基因被成功转入小麦^[8~13]。但是,其与玉米、水稻等其它禾谷类作物相比,小麦遗传转化研究相对落后,对由基因枪介导小麦遗传转化的重要影响因素缺乏较为系统的分析。故此,我们结合几年来大量的实验,对小麦遗传转化的限制因素如基因型、培养条件、材料、轰击参数、金粒制备等进行了详细的研究,并在此基础上开展了由基因枪介导的小麦遗传转化工作。

1 材料与方法

1.1 材料的准备

本实验选取了 8 个优良的冬小麦(*Triticum aestivum* L.)品种用于转基因实验,包括西农 1376、宝丰 7228、黑小麦、西农 88、盐 2、80101T、甘麦、西农 8727 等。材料种植于西北大学生命科学学院植物园内。在小麦开花受粉后 2 个星期左右,选取约 1.0~1.5 mm 大小、半透明状未成熟胚作为起始外植体。幼嫩种子在超净工作台内用 70% 酒精表面灭菌 60 s,0.1% 升汞+Tween-80 灭菌 10 min,无菌水冲洗 3 次以上;在无菌条件下剥离幼胚,盾片组织向上置于 MS₁ (MS+2,4-D 2 mg/L,不含 MS 有机成分,3% 蔗糖) 培养基上,20℃、黑暗条件预培养 1~3 d。

1.2 质粒的准备

我们实验所用质粒包括 pARN6、pBAB3、

pDB1 和 pYAO24 四种(见表 1)。其中 pARN6、pBAB3 及 pYAO24 都含有水稻碱性几丁质酶的编码基因 RC24,pDB1 上有 bar 基因和 gus 基因。bar 基因编码草丁膦(phosphinothricin, PPT)乙酰转移酶可使 Basta(有效成分 PPT)失活,可作为植物选择标记基因。pYAO24 还有 npt I 基因编码新霉素磷酸转移酶,可失活卡那霉素,是我们实验使用的另一个植物选择标记基因。4 种质粒的宿主细胞均为大肠杆菌,根据王关林等^[14]的方法,小量提取质粒 DNA。

表 1 不同质粒所携带的基因情况
Table 1 Different genes with different plasmids

质粒 Plasmid	功能基因 Functional gene	植物选择标记 Selective marker of plant	细菌选择标记 Selective marker of bacterium
pARN6	RC24		Amp ^r
pBAB3	RC24		Amp ^r
pDB1	gus	bar	Amp ^r
pYAO24	RC24	npt I	Cm ^r

1.3 渗透处理和微弹轰击

预培养的未成熟胚在微弹轰击之前转至含 0.6 mol/L 蔗糖的 MS₁ 培养基,于 20℃ 黑暗条件下进行 5~12 h 高渗处理。将 2 mg 金粒(直径 1 μm)、5 μL 质粒 DNA (1 μg/μL)、20 μL 亚精胺 (0.1 mol/L) 和 50 μL CaCl₂ (2.5 mol/L) 混合,漩涡或超声波处理使之均匀,4 200 r/min 离心 5 s 去上清,沉淀用 250 μL 无水乙醇清洗,并重新悬浮于 240 μL 无水乙醇。将包被有 DNA 的金粒悬浮液涂于微弹承载片,每片 3.5 μL,待干燥后用于基因枪轰击。每次涂液前将悬浮液漩涡处理使之均匀。基因枪型号 PDS1000/He (Biorad),气压采用 1 350 psi 或 1 100 psi。转化材料与金粒承载片之间的距离为 6 cm,金粒承载片与破裂片之间的距离为 2.5 cm。真空度为 27 英寸汞柱。质粒采用 3 个组合: pARN6+pDB1、pBAB3+pDB1 和 pYAO24。

1.4 培养、选择和再生体系

轰击后 16 h,将未成熟胚从高渗培养基转至 MS₁ 培养基,20℃ 暗培养 2 周,随时将长大的胚芽鞘切除。恢复培养 2 周后,将愈伤组织转至 MS₂ (MS₁+PPT 2 mg/L 或 Kan 150 mg/L,不含 MS 有机成分,3% 蔗糖) 培养基进行选择培养。选择培养 2 周后,将愈伤组织转至再生培养基 MS₃ (MS+0.1 mg/L 2,4-D+PPT 2 mg/L 或 kan 150 mg/L,不含 MS 有机成分,3% 蔗糖)。1 个月后挑取带有绿芽的愈伤组织转至 MS 无激素培养基(无有机成分,

3%蔗糖)生根,叶片长至2 cm以上的小植株转至含1/2 MS(MS+PPT 2 mg/L或kan 150 mg/L,不含有机成分,3%蔗糖)无激素培养基的塑料盒中继续培养,再生植株长到6~8 cm高时移至土壤中,并用透明塑料盖覆盖1周加以保护。

1.5 gus 基因瞬间表达

将轰击过pARN6+pDB1和pBAB3+pDB1质粒的未成熟胚转至MS₁培养基1~2 d后,放入5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸(x-gluc)溶液,37℃保温过夜,在实体显微镜下观察蓝色斑点的分布与大小。

2 结果与分析

2.1 基因型对胚性愈伤组织再生植株分蘖、越冬的影响

在进行基因枪轰击后,小麦幼胚能否长出胚性愈伤组织是转基因小麦成苗的关键因素之一。为此,我们对所选的8种不同基因型的冬小麦在轰击后进行分析比较,结果发现8种基因型的幼胚在基因枪轰击后,愈伤组织诱导率几乎为100%,但它们的胚性愈伤组织的数量和质量有显著差异。其中西农1376、西农88、黑小麦的愈伤组织生长最好,愈伤组织体积大,色泽淡黄,上面布满珊瑚状突起,产生的胚性愈伤组织数大约占愈伤组织总数的10%。相比之下甘麦的愈伤组织轰击后幼胚在培养过程中只能长成直径为0.5 cm左右、结构致密、部分色泽暗淡的愈伤组织,其胚性愈伤组织诱导频率也很低,经统计只有西农88的十分之一。宝丰7228、盐2、80101T、西农8727等的愈伤组织虽然也是体积大约1 cm³左右,色泽淡黄,半透明,但产生的胚性愈伤组织并不多,约占总愈伤组织数的5%。

长出绿芽的愈伤组织培养成苗之后,可以明显看出各个基因型分蘖情况的不同。按分蘖强弱排位:西农88>宝丰7228>甘麦>盐2>黑小麦>西农8727>80101T>西农1376。其中西农88的分蘖能力最强,西农1376几乎不分蘖。在实验中,我们发现轰击过的绝大多数基因型的小麦再生苗可以安然越冬,但黑小麦在经过基因枪轰击后越冬能力下降,在所移栽的8株黑小麦中,7株在冬季2月份最冷的时候死亡,仅存活1株。综合结果表明,基因型是决定小麦性状的重要影响因素,在幼胚经过基因枪轰击后,西农88是基因枪介导小麦遗传转化的优良受体。

2.2 gus 基因瞬间表达分析

在轰击后1~2 d将未成熟胚放入x-gluc溶液

中,隔天观察蓝色斑点的出现情况。发现蓝色斑点出现的面积大小及多少与子弹的制备有直接的关系。本实验室所用金粒Φ1 μm,分别用新制备金粒与上一年制备金粒进行轰击,每组平行作3次,发现用新制备金粒时,即使在制备子弹时不进行超声波处理而只充分涡旋振荡,轰击后幼胚盾片上出现的蓝色斑点数目较多,范围较大,每个斑点的面积相对较小。如果用隔年(上一年)分装好的金粒,即使在制备子弹时再次进行超声波处理,在幼胚盾片上出现的蓝色斑点数目较少,范围较小,每个斑点的面积相对较大(见表2);延长超声波处理时间后,蓝色斑点出现的情况与新制备金粒的轰击效果相同。金粒携带DNA轰击进入盾片,对小麦幼胚的伤害很大,如果金粒沉淀结块,会在小麦幼胚盾片局部造成过大伤害,导致幼胚死亡或不能诱导形成愈伤组织。所以,在使用金粒制备子弹时应充分进行超声波处理,对于隔年金粒的处理时间应该适当延长,保证金粒完全散开,才能达到有效轰击。

表2 不同时间制备的金粒对轰击效果的影响

Table 2 Influence of gold particles prepared in different time on bombardment effect

金粒制备 Gold particles of preparation	蓝斑平均斑点数 Average of number of GUS blue spots	蓝斑散落面积 Surface area of blue spots	大小 Size of blue spots
新制备金粒 Gold partic- les of fresh preparation	7.6	2/3 盾片	小而散
隔年金粒 Gold particles of preparation in last year	2.4	盾片某一局部	大,大 多数集中

2.3 幼胚的选择以及基因枪参数的分析

未成熟胚的发育阶段是体细胞胚发生和植株再生最为关键的因素。根据徐子勤^[15]的报道,在挑取幼胚时只选用形态发育接近完成,盾片组织刚开始积累淀粉的未成熟胚进行基因枪的轰击转化。这时候幼胚的盾片发育适中,在基因枪轰击后不会由于过于幼嫩所受伤害过大而死亡,也不会因盾片细胞发育过老,在轰击时金粒难以进入细胞内部而造成无效轰击。相应轰击材料不同,对基因枪的参数选择也不同。本实验针对小麦幼胚所采用的爆裂压为1300 psi 和 1100 psi,轰击后的小麦幼胚均能诱导出愈伤组织,并且分化成苗。我们在实验中只对小麦幼胚进行了一次轰击,在经x-gluc染色后,瞬间表达明显,平行随机选取3组各10个轰击过的幼胚,有效轰击分别为30%,30%和40%。实验证明对小

麦幼胚进行1次轰击既可达到效果。

2.4 质粒选择以及筛选剂浓度的分析

用pARN6+pDB1、pBAB3+pDB1和pYAO24这3种组合的质粒对小麦幼胚轰击,结果发现再生植株数目有明显差异。用pARN6+pDB1及pBAB3+pDB轰击后,在加入选择剂PPT 2 mg/L的情况下,再生植株的数目很多,初步进行PCR检测后发现,大多数为假阳性,只有少数可扩增出相应条带,说明2 mg/L PPT作为筛选剂浓度效果不佳。但是,用pYAO24轰击后的小麦幼胚在经过kan 150 mg/L浓度的连续选择下,所得的再生植株多为白化苗,只有几株为正常绿苗,经PCR检测后,多为转基因植株,只有极少数为假阳性。由此可以看出,150 mg/L的卡那霉素浓度是有效的筛选浓度。有关转基因小麦的试验和鉴定我们将另文报道。

3 讨论

小麦幼胚在经过基因枪轰击后,组织受到一定损伤,再生能力会大大下降。随着基因型的不同,小麦自身的修复和抵御伤害的能力也有所不同。所以,选择良好基因型的小麦幼胚作为轰击对象是进行基因枪遗传转化的首要条件。只有具有优良基因型的转基因小麦品种才具有广阔的研究价值和生产价值。在我们实验所用的8种小麦基因型中,西农88的表现最为突出。它的再生能力旺盛,分蘖能力强,越冬能力优越,是一种十分优良的实验材料。我们的实验证明,西农88是小麦遗传转化的理想受体基因型。

我们实验所采用的受体材料为开花受粉后2周的幼胚。目前,国内外大多数的文献报道证明幼胚是一种极好的体细胞胚发生材料。但是,也有学者采用幼穗和幼胚愈伤组织等作为轰击材料^[16,17],并获得了转基因植株。

金粒制备质量的好坏直接关系到小麦幼胚在轰击后的成活及转化率。我们在试验过程中发现,只对子弹在使用前进行涡旋振荡的效果比既进行涡旋振荡又进行超声波振荡的效果差很多;已分装好的隔年金粒如不充分进行超声波处理,结果比新制子弹差很多,经GUS染色后,蓝色斑点数量少,斑点大且只出现在局部,这样容易造成嵌合体的形成。与其他研究者所做的GUS染色相比,我们工作中GUS染色所得到的蓝色斑点面积整体偏大,这可能与渗透剂为碳源(蔗糖)有关,如果用甘露醇来处理则会产生小而清晰的蓝色斑点^[18]。总体来说,渗透处理可以增强瞬间表达效果和稳定转化频率。用蔗糖、甘

露醇、葡萄糖或麦芽糖处理后,GUS瞬间表达蓝色斑点明显增加。Altpeter等^[19]和Becker等^[20]认为:采用较低的金粒用量(30 μg)获得抗性植株的频率要明显高于高金粒用量(100 μg);较高的金粒用量对细胞本身伤害也相应高一些,而较低的金粒用量受轰击时的氮压、距离、真空度、金粒的凝聚程度、所用培养系统、筛选方法、筛选剂及筛选剂浓度等多个因子的影响。在这些因子确定的情况下,再确定金粒用量。确切地说,轰击时的金粒用量应该在细胞所承受损伤的范围之内,并且保证达到有效轰击。

在用选择剂进行筛选时,我们发现本实验所采用的PPT浓度略低,为2 mg/L,且从筛选到生根一直为此浓度。由于选择压力过低,造成假阳性植株增多,在筛选、鉴定上造成一定困难,耗费了人力物力。目前大多数实验室在用PPT、Bialaphos等除草剂的有效成分进行筛选时,一般都是进行阶梯式选择。通常是在小麦幼胚刚轰击过后用1 mg/L这样较低的筛选剂浓度进行筛选,以防止小麦幼胚在轰击过后受损部分来不及恢复就在严酷的筛选环境下死亡;生芽时将浓度提至3 mg/L,这时绝大多数的愈伤组织不能生芽;最后,在生根培养基中加入5 mg/L的筛选剂,有结果显示,此浓度的筛选剂对非转基因植株的根生成有明显抑制作用。Bliffeld等^[13]用PPT作为筛选剂时,在筛选和生苗培养时的PPT含量为1 mg/L,而在后来的生根培养时升至3 mg/L,加大PPT的浓度,提高了阳性转基因小麦的比例。Zhang等^[21]用Bialaphos为筛选剂时,在轰击后于放置幼胚的培养基中所加的Bialaphos浓度为1.0~3.0 mg/L或不加筛选剂直接进行培养,并在生芽生根时将筛选剂的浓度提高到5 mg/L。所以,在我们今后的研究实验中,进行PPT的筛选时,浓度应有所增加,并设计合适的梯度,进行更为合理化的筛选。我们实验所用的另一个质粒pYAO24轰击时采用的卡那霉素浓度比较理想。虽然Nehra等^[22]和Bower等^[23]认为卡那霉素作为筛选剂并不适合小麦转化控制。因为它会妨碍愈伤组织在早期阶段的再生能力,并对叶绿素合成有抑制作用。但是,卡那霉素已被广泛应用于双子叶植物转基因植物研究^[24],说明卡那霉素的上述缺点是可以根据浓度、受体基因型、培养条件所克服的。综合我们实验室的T₀代轰击pYAO24质粒的小麦表型与对照无异,甚至在生长状况和结实率上优于对照组,所以,我们认为150 mg/L的硫酸卡那霉素浓度是较理想的筛选剂浓度。

参考文献:

- [1] 叶兴国,徐惠君,杜丽璞,辛志勇.小麦遗传转化几个因素的研究[J].中国农业科学,2001,34(2):128—132.
- [2] 徐子勤.重要禾谷类植物转基因研究[J].生物工程进展,2001,21(1):59—774.
- [3] Cheng M,Fry J E,Pang S,Zhou H,Hironaka C M,Duncan D R,Conner T W,Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiol*,1997,115(3):971—980.
- [4] Xia G M,Li Z Y,He C X,Chen H M. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*,1999,25(1):22—28.
- [5] 叶兴国,Shirley Sato,徐惠君,杜丽璞.农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测[J].中国农业科学,2001,34(5):469—474.
- [6] 黄益洪,周森平,叶兴国,唐克轩,程红梅,陆维忠.农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究[J].作物学报,2002,28(4):510—515.
- [7] Vasil V,Castillo A M,Fromm M E,Vasil I K. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. *Bio/Tech*,1992,10:667—674.
- [8] Barro F,Rooke L,Bekes F,Gras P,Tatham A S,Fido R,Lazzeri P A,Shewry P R,Barcelo P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties[J]. *Nat Biotechnol*,1997,15:1 295—1 299.
- [9] Blechl A E,Anderson O D. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat[J]. *Nat Biotechnol*,1996,14:875—879.
- [10] Karunaratne S,Sohn A,Mouradov A,Scott J,Steinbi H,Scott K J. Transformation of wheat with the gene encoding the coat protein of barley yellow mosaic virus[J]. *Aust J Plant Physiol*,1996,23:429—435.
- [11] Altpeter F,Vasil V,Srivastava V,Vasil I K. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1A×1 gene into wheat[J]. *Nat Biotechnol*,1996,14:1 155—1 159.
- [12] Chen W P,Gu X,Liang G H,Muthukrishnan S,Chen P D,Liu D J,Giu B S. Introduction and constitutive expression of rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the *bar* gene as a selectable marker [J]. *Theor Appl Genet*,1998,97:1 296—1 306.
- [13] Bliffeld M,Mundy J,Potrykus I,Futterer J. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease[J]. *Theor Appl Genet*,1999,98:1 079—1 086.
- [14] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998.506—507.
- [15] 徐子勤,Becker D,LÖRz H.通过卡那霉素选择体系再生可育小麦转基因植株[J].自然科学进展,2001,11(5):486—491.
- [16] 陈梁鸿,王新望,张晓东,张文俊,胡道芬.小麦编码高分子量谷蛋白亚基基因的转化[J].作物学报,1999,25:437—440.
- [17] Vasil V,Srivastava V,Castillo A M,Fromm M E,Vasil I K. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos[J]. *Bio/Technology*,1993,11:1 553—1 558.
- [18] 徐子勤,Becker D,LÖRz H.质粒DNA物理形态和其他因素对获得可育转基因小麦的影响[J].实验生物学报,2001,9(34):183—189.
- [19] Altpeter F,Vasil V,Srivastava V,StÖger E,Vasil I K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plant[J]. *Plant Cell Rep*,1996,16:12—17.
- [20] Becher D,Brettschneider R,LÖRz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue[J]. *Plant J*,1994,5:299—307.
- [21] Zhang L,Rybezynski J J,Langenber W G,Mitra A,French R. An efficient wheat transformation procedure transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration[J]. *Plant Cell Rep*,2000,19:241—250.
- [22] Nehra N,Chibbar R N,Leung N,Caswell K,Mallard C,Steinhauer L,Baga M,Kartha K K. Self-fertile transgenic wheat plant regenerated from isolated scutellum tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs[J]. *Plant J*,1994,5:285—297.
- [23] Bower R,Birch R G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment [J]. *Plant J*,1992,2(3):409—416.
- [24] De Block M,De Brouwer D,Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants[J]. *Plant Physiol*,1989,91:694—701.