

转反义 *trxs* 基因小麦株系 00T89 分子鉴定及抗穗发芽特性研究 Study on Molecular Identification and Pre-harvest Sprouting Characteristic of the Transgenic Anti-*trxs*-gene Wheat Line 00T89

周苏玫, 尹 钧*, 任江萍, 张 冉

ZHOU Su-Mei, YIN Jun*, REN Jiang-Ping and ZHANG Ran

河南农业大学农学院, 国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002

College of Agriculture, Henan Agricultural University, National Engineering Research Center for Wheat, Zhengzhou 450002, China

摘 要 以皖麦 48 为受体导入反义 *trxs* 基因已获得 00T89 第 4 代(T_4)转基因株系, 对其进行反义基因的 PCR 鉴定、相对定量 RT-PCR 基因表达检测以及抗穗发芽特性研究。结果表明, 18 个 T_4 代转基因株系中, 13 个株系目的基因检测呈阳性; 成熟期籽粒萌发过程中, 8 个株系转录水平上 mRNA 丰度极显著降低 ($P < 0.01$), mRNA 丰度与穗发芽指标呈显著和极显著的相关性 ($r = 0.7181$)。其中 6 个株系在开花后 30d 至成熟后 10d 表现出明显的抗穗发芽特性。与非转基因对照相比, 平均穗开始发芽时间推迟 2.7d ($P < 0.01$), 穗粒发芽率和穗发芽度分别降低 35.5% ($P < 0.01$) 和 47.5% ($P < 0.01$), 成熟后 25d 这些株系又逐渐恢复发芽特性, 无显著差异 ($P > 0.05$)。

关键词 小麦, 转基因株系 00T89, PCR, RT-PCR, 穗发芽抗性

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)03-0438-07

Abstract Pre-harvest sprouting of wheat is caused by a series of enzymes, in which α -amylase plays a key role. Thioredoxin (*trx*) is an important protein capable of reducing S-S to -SH. The authors transferred the anti-*trxs* gene into wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Wanmai 48 in 2000 in order to obtain a transgenic line with low activities of *trx* and α -amylase in wheat seeds to enhance their resistance to pre-harvest sprouting. In this work, a pair of specific anti-*trxs* primers were used in PCR test to validate the transgenic plants in T_4 lines. A pair of primers of a wheat actin gene cDNA and a pair of *trxs* gene primers were used in the reverse transcription PCR test to measure the relative content of *trx* mRNA in the transgenic positive lines. The experiments of pre-harvest sprouting were carried out to test the resistance to pre-harvest sprouting. The results showed that there were 13 positive lines with the anti-*trxs* gene among 18 transgenic lines. In the maturity stage, the 8 relative contents of the *trx* mRNA in the 13 positive lines were reduced evidently ($P < 0.01$). The *trx* mRNA was correlated with the sprouting parameters significantly ($r = 0.7181$). 6 lines with low *trx* mRNA showed stronger resistance to pre-harvest sprouting during the period from 30 days after anthesis to 10 days after maturity. Compared with non-transgenic plant (Wanmai 48, CK), the average sprouting time of these lines was postponed by 2.7 days ($P < 0.01$), the sprouting ratio of seeds on spikes and the spike sprouting degree

Received: December 27, 2005; Accepted: February 6, 2006.

This work was supported by the grants from the National Sciences Foundation of China (No. 30370877), and the Foundation for Conversion of Agricultural Scientific and Technological Achievements (No. 03EFN214100168).

* Corresponding author. Tel: 86-371-63558203; E-mail: xmxxyj@126.com

国家自然科学基金资助项目 (No. 30370877) 和农业科技成果转化资金 (No. 03EFN214100168) 资助。

were reduced by 35.5% ($P < 0.01$) and 47.5% ($P < 0.01$), respectively. However, 25 days after maturity, the sprouting capacity of the positive lines recovered gradually, and no significant differences were found between them ($P > 0.05$). Thus, it can be concluded that the wheat pre-sprouting was controlled effectively in some 00T89 transgenic lines as a result of the expression of anti-*trxs* gene.

Key words wheat, transgenic lines 00T89, PCR test, RT-PCR test, pre-harvest sprouting resistance

收获前遇雨或潮湿环境中麦穗发芽的现象是一种世界性的气候灾害,在我国长江流域冬麦区、东北春麦区和黄淮冬麦区常有发生^[1-3]。不仅降低产量而且严重劣化品质和种用价值,使一些容易发生穗发芽的优质小麦品种推广受到限制^[4,5]。近年来关于穗发芽的研究表明, α -淀粉酶活性提高是造成穗发芽的重要原因^[6-8]。Kneen 和 Sandstedt 在 1943 年最早报道从植物种子中发现谷物 α -淀粉酶抑制物。小麦籽粒中存在双功能的 α -淀粉酶/枯草杆菌蛋白酶抑制物(α -amylase / subtilisin inhibitor, ASI)^[9],这种物质主要通过其二硫键与淀粉酶同工酶作用形成复合物使之失活。还原型硫氧还蛋白是一个具有广泛功能的二硫键氧化还原酶。硫氧还蛋白 h(trx h)可还原小麦 α -淀粉酶抑制蛋白的二硫键,从而降低内源 α -淀粉酶抑制蛋白对淀粉酶的抑制作用^[10]。源于蓝色黑鸭草的 *trxs* 基因与 *trxh* 基因同属于硫氧还蛋白基因家族,经过 cDNA 序列比较显示,它们有较高的同源性,其蛋白质表达产物有相同的活性中心和相似的生物活性^[10-13]。利用反义基因技术将 *trxs* 基因的反义链上游插入麦醇溶蛋白启动子导入小麦,以期在种子成熟过程转录,降低 α -淀粉酶活性,抑制穗发芽,关于这方面的研究还少见报道。本课题组自 2000 年开始进行反义 *trxs* 基因导入小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种皖麦 48 中^[14,15],在对转化株系 T₀、T₁、T₂、T₃ 检测的基础上,筛选阳性株系,继续进行遗传稳定性的分子鉴定和抗穗发芽特性研究,为获得性能稳定的抗穗发芽转基因小麦材料提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以小麦 (*Triticum aestivum* L) 品种皖麦 48 号 (CK) 为受体转反义 *trxs* 基因,目前已得到转基因小麦 00T89 第 4 代 (T₄) 18 个株系,来自于同一转基因植株 (T₀),植株性状和生育期一致,分别为 2-1、5-3、93-3、80-2、40-1、13、38-1、38-3、39-1、71、64-4、79-2、79-1、86-1、93-1、94、39-3、97。2003~2004 年在河南农业

大学科教示范园区种植,试验地土质砂壤,肥力均匀。18 个转基因株系和未转基因对照品种分小区种植,随机排列,重复 3 次。小区面积 3m × 10m,每小区 12 行,单粒点播,穴距 5cm。田间统一管理。

小麦越冬前或返青后按单株采集生长幼嫩的中部叶片,约 0.5g,直接装入无菌的 Eppendorf 管中,每小区 60 株,共计 1 140 个样,分次冰盒取回,液氮速冻,置 -80℃ 超低温冰箱贮藏,进行基因组 DNA 分子鉴定。对转反义 *trxs* 基因检测的阳性株系,在开花期各株系选用同一天开花、穗型整齐、大小一致的单茎进行挂牌标记 100 穗,分别于开花后 30d、成熟、成熟后 10d、成熟后 25d 进行取样,每株系 10 穗,冰盒带回进行穗发芽试验。成熟期采收阳性株系及其对照穗子各 3 穗,取中部第一位籽粒 20 粒,灭菌后放入培养皿,25℃ 渍水培育,10h 时取样,速冻后置 -80℃ 低温冰藏,进行 RT-PCR 基因表达鉴定。

1.2 目的基因分子检测

1.2.1 基因组 DNA 的小量提取及质量检测:叶片基因组 DNA 的小量提取采用 CTAB 法。通过紫外吸收光谱测定 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{230} 值,计算 DNA 浓度和纯度, $1.8 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$; $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$ 即可达到试验要求。用 TE 稀释 (150~200ng/ μ L) 后进行分装备用。

1.2.2 PCR 特异性扩增:根据反义 *trxs* 基因序列采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物,特异性引物 P1:5'-GAACCTGTGCTGGATCCAGAGCTG-3'; P2:5'-CCAAGTTCTGTGCCAGCCATGC-3',由上海生物工程公司合成。PCR 的反应体积为 20 μ L,其中 1.0 μ L 模板 DNA、2 μ L 10 × Buffer、1.2 μ L dNTPs (4.0 μ mol/L)、1.0 μ L P1 (4 μ mol/L)、1.0 μ L P2 (4 μ mol/L)、0.2 μ L Taq (5u/ μ L)、13.6 μ L ddH₂O。使用 Thermo-Hybaid9600 型 PCR 仪扩增,采用 Touchdown 程序:94℃ 预变性 4min;94℃ 变性 30s,58℃ 退火 30s,72℃ 延伸 40s,2 个循环;94℃ 变性 30s,56℃ 退火 30s,72℃ 延伸 40s,30 个循环;72℃ 延伸 4min,4℃ 保存。1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3 相对定量 RT-PCR 测定

1.3.1 总 RNA 提取: 每次取 3 粒籽粒, 使用 GTC 法 (异硫氰酸胍法) 制备高纯度 RNA。用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度, 用琼脂糖凝胶电泳分离总 RNA, 确定其完整性。

1.3.2 反转录 (RT): 根据总 RNA 浓度准确调整反转录 RNA 量。反应混合液总体积 20 μ L, 2 μ g 总 RNA, 1.0 μ L dNTPs (10.0mmol/L), 1.0 μ mol/L MLV RTase (200u/ μ L), 4.0 μ L 5 \times RT Buffer, 1.0 μ L oligo (dT)₁₆, 0.4 μ L Rnasin (50u/ μ L), ddH₂O 补足 20 μ L, 混匀。放置于 37 $^{\circ}$ C 2h, 然后 95 $^{\circ}$ C 热变性 5min, 立即使用或于 -37 $^{\circ}$ C 深冻保存。

1.3.3 RT-PCR 特异性扩增: 根据小麦 *actin* 基因 cDNA 序列设计内标 *actin* 基因引物: WAC-F: 5'-GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC-3'; WAC-R: 5'-GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC-3'^[16]。根据小麦硫氧还蛋白基因序列设计特异引物: P3: 5'-GCAGAAGCAAACAAGGATGGG-3'; P4: 5'-ACTGCCA TCGCCAAGAGC-3'。由上海生物工程公司合成。PCR 扩增反应体积为 50 μ L, 其中 5.0 μ L cDNA 模板、5 μ L 10 \times Buffer、4.0 μ L dNTPs (4.0 μ mol/L)、2.0 μ L P3 (4 μ mol/L)、2.0 μ L P4 (4 μ mol/L)、2.0 μ L WAC-F (4 μ mol/L)、2.0 μ L WAC-R (4 μ mol/L)、0.4 μ L Taq (5u/ μ L)、27.6 μ L ddH₂O。同时用不经过反转录的 RNA 样品检验是否有基因组和外源 DNA 污染, 并用混合样品建立最佳反应条件。采用扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 4min, 4 $^{\circ}$ C 保存。1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 内标 *actin* 基因扩增片段长度为 422bp; 目的基因 (*trx*) 扩增片段长度为 343bp。

1.4 穗发芽试验及测定指标

穗发芽参考 Hagemann 等人提出的纸巾穗发芽

法^[17], 并作了改进。各株系分别取 10 穗, 用 0.1% HgCl₂ 浸泡 5min 后用纯净水清洗干净平放在垫上灭菌纸的人工气候箱内, 温度控制在 25 $^{\circ}$ C, 灭菌纱布覆盖, 上面覆保鲜膜保湿, 定时浇水, 每天观察记载, 10d 后剥粒测量计数。

穗发芽参数测定: 穗开始发芽时间 = 各株系 10 穗开始发芽时间的平均值; 穗粒发芽率 (%) = 各株系 10 穗第 10 天穗发芽粒数/穗粒总数 \times 100% 的平均值; 穗发芽度 = 各株系 10 穗第 10 天穗粒发芽的级别数 \times 该级别发芽籽粒数的和的平均值。分级标准以种子外观无发芽迹象时为 1 级; 露白、胚根长 < 2mm 为 2 级; 芽鞘刚露出为 3 级; 胚芽鞘长 1mm 为 4 级; 胚芽鞘长 2~3mm 为 5 级; 胚芽鞘长 4~9mm 为 6 级; 以后每增长 10 mm 增加 1 级。

1.5 条带分析及数据统计分析

JD801 凝胶成像系统进行图像采集。JD801 分析软件 (3.3 版) 进行条带分析, 采用积分光密度 (IOD) 表示条带亮度 ($OD = -\log(I_2/I_1)$; I_2 为透射光强度, I_1 为人射光强度), 目的基因亮度与内标 *actin* 基因亮度之间的比值表示 mRNA 的丰度。试验数据采用生物学统计软件 SPSS10.0 进行统计分析。

2 结果

2.1 基因组 DNA 目的基因的分子鉴定

根据反义 *trxs* 基因设计的引物 P1、P2 进行叶片基因组 DNA 的 PCR 检测, 未转基因皖麦 48 为阴性对照, 含有反义 *trxs* 基因的质粒为阳性对照, 18 个株系的 PCR 检测结果如图 1 所示。13 个株系 (2-1、5-3、13-38-1、38-3、64-4、79-2、79-1、86-1、93-1、94、39-3、97) 出现了与质粒亮带相同的条带; 以 DL2000 maker 比较, 该条带为预期长度与目的 DNA 片段 474bp 相符合。

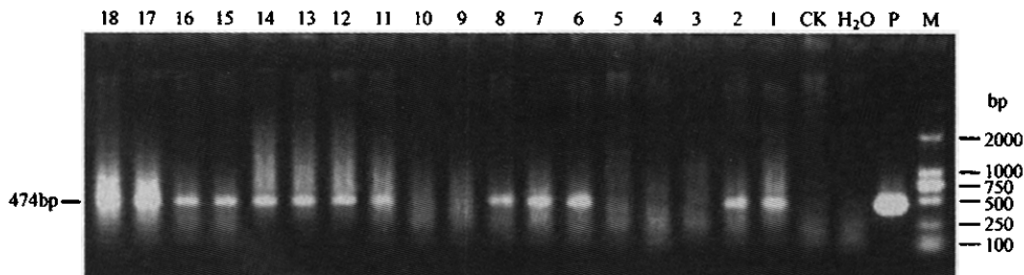


图 1 转基因株系 00T89 T₄ 代的 PCR 检测

Fig.1 PCR analysis of 18 transgenic lines of 00T89 T₄

M: marker (DL2000); P: plasmid; CK: null plant; 1: 2-1; 2: 5-3; 3: 93-3; 4: 80-2; 5: 40-1; 6: 13; 7: 38-1; 8: 38-3; 9: 39-1; 10: 71; 11: 64-4; 12: 79-2; 13: 79-1; 14: 86-1; 15: 93-1; 16: 94; 17: 39-3; 18: 97.

对呈现阳性的 13 个株系,随机选取单株进行 PCR 检测结果如图 2。每个单株均出现了 P1、P2 引物预期扩增的 DNA 片段(474bp),证明反义 *trxs* 基

因转入到了小麦的基因组中并稳定遗传到 13 个转基因株系中,这些株系占 T4 代 18 个株系的 72.2%。

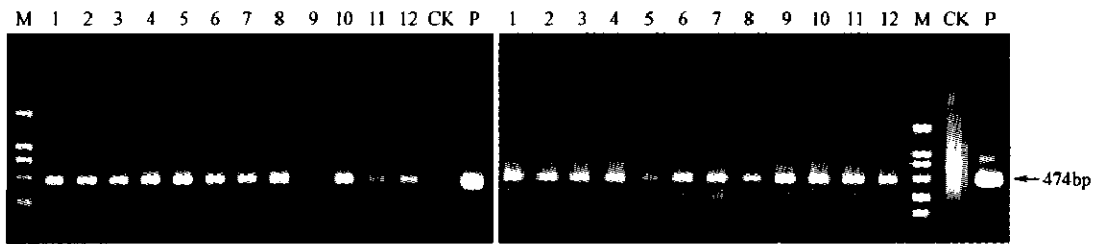


图 2 13 个株系随机植株 PCR 检测

Fig.2 PCR analysis of randomized samples of 13 transgenic lines

M:marker(DL2000);P:plasmid;CK:negative control;1~12:randomized samples.

2.2 相对定量 RT-PCR 的测定

各株系成熟期的籽粒在萌发过程中进行 RNA 反转录,以内标 *actin* 基因为参照,在 *actin* 基因表达量相对一致时,RT-PCR 结果如图 3、4 所示。图中 1~13 号为 DNA 检测的阳性株系,14 号为皖麦 48 对照,15、16 号为 DNA 检测的阴性株系,可以看出转录水平上目的基因的表达量差异较大。密度扫描计算 mRNA 丰度(图 4),多重比较结果显示,株系 5-3、38-1、38-3、64-4、79-1 为一组(A 组),mRNA 转录量最低,平均比对照降低 73.9%;94、39-3、97 为一组(B 组),与对照相比降低 52.5% ($P < 0.01$);2-1、13、79-2、93-1、CK、93-3、80-2 等株系之间差异不显著,株系 86-1 呈现出相对过量转录的现象。由此可见,阴性株系和 30.7% 的阳性株系在转录水平上与对照差异不大,61.5% 的阳性株系 mRNA 丰度极显著降低,说明反义 *trxs* 基因在转录水平上干扰了小麦 *trx* 基因的表达。

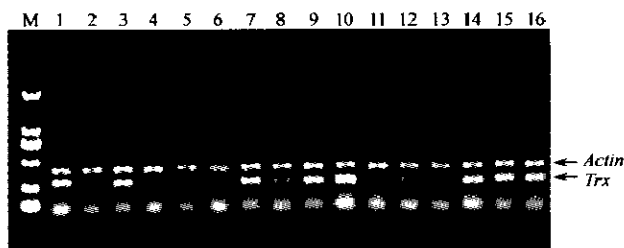


图 3 RT-PCR 产物电泳结果

Fig.3 Electrophoresis analysis of RT-PCR products

M:marker(DL2000);1: 2-1;2:5-3;3:13;4:38-1;5:38-3;6:64-4;7:79-2;8:94;9:93-1;10:86-1;11:79-1;12:39-3;13:97;14:CK;15:93-3;16:80-2.

2.3 阳性株系穗发芽特性的差异性分析

2.3.1 不同株系穗开始发芽时间比较:由图 5 可以看出,开花后 30d,穗平均开始发芽时间为 7d,各株

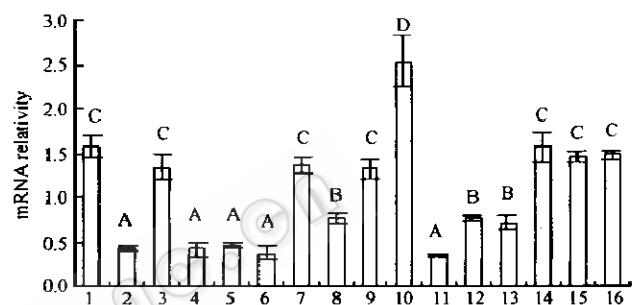


图 4 mRNA 丰度

Fig.4 mRNA relative

(The capital letter A, B, C, D indicated the LSD difference comparison at 0.01 level)1: 2-1;2:5-3;3:13;4:38-1;5:38-3;6:64-4;7:79-2;8:94;9:93-1;10:86-1;11:79-1;12:39-3;13:97;14:CK;15:93-3;16:80-2.

系间的变异系数为 11.62%;成熟后 25d 平均开始发芽的时间缩短为 2.6d,各株系间差异不大。在开花后 30d 至成熟后 10d,株系间变异系数最大,一些阳性株系(5-3、38-1、38-3、64-4、79-1、97)穗开始发芽的时间平均比对照推迟 2.7d ($P < 0.01$),表现出极显著的抗性。其它一些株系与对照相比差异不大。

2.3.2 不同株系穗粒发芽率比较:成熟前后不同株系离体穗保湿 10d 后剥粒,调查穗粒发芽率(图 6)发现,开花后 30d 穗粒的发芽率较低,平均仅 5%,成熟后穗粒发芽率迅速上升,至成熟后 25d 达 31%。株系间的变异系数在开花后 30d 至成熟后 10d 差异较大,平均为 25.7%。在此期间,穗发芽开始较晚的株系(5-3、38-1、38-3、64-4、79-1、97)在穗粒发芽率上明显下降,平均比对照降低 35.5% ($P < 0.01$);其余株系(2-1、13、79-2、86-1、93-1、94、39-3)下降幅度较小。

2.3.3 不同株系穗发芽度比较:穗发芽度不仅能反映不同时间穗发芽粒数的多少,也反映出发芽籽粒

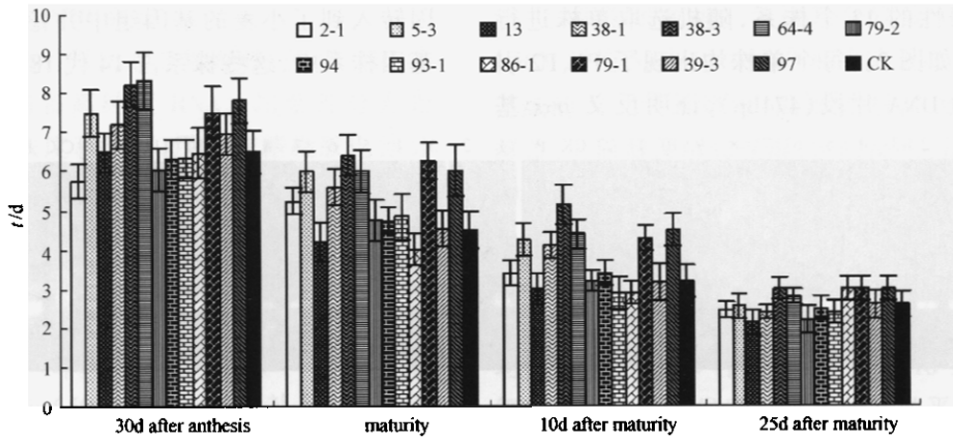


图 5 不同株系穗开始发芽时间
Fig.5 Sprouting time of spikes of different lines

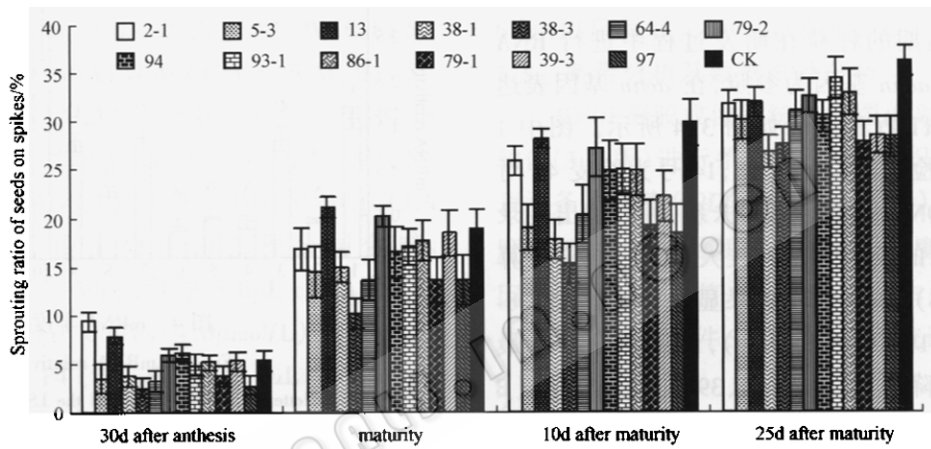


图 6 不同株系穗粒发芽率
Fig.6 Sprouting ratio of seeds on spikes of different lines

生长的快慢,是衡量穗发芽程度的一个综合指标。由图 7 可知,开花后 30d 至成熟后 10d 不同株系间穗发芽度差异最大(37.2%),在此其间,5-3、38-1、38-3、64-4、79-1、97 等 6 个株系穗发芽度平均比对照下降 47.5%,达极显著水平($P < 0.01$);成熟后 25d,株系间差异小,变异系数仅达 6.3%,穗发芽度较低

的株系已逐渐恢复发芽能力。

2.4 成熟期籽粒萌发过程中 mRNA 丰度与穗发芽特性的相关性分析

进一步对成熟期阳性株系及其对照在籽粒萌发过程中 mRNA 相对表达量与穗发芽参数进行相关性分析(表 1),可以看出,mRNA 丰度与穗发芽开始时

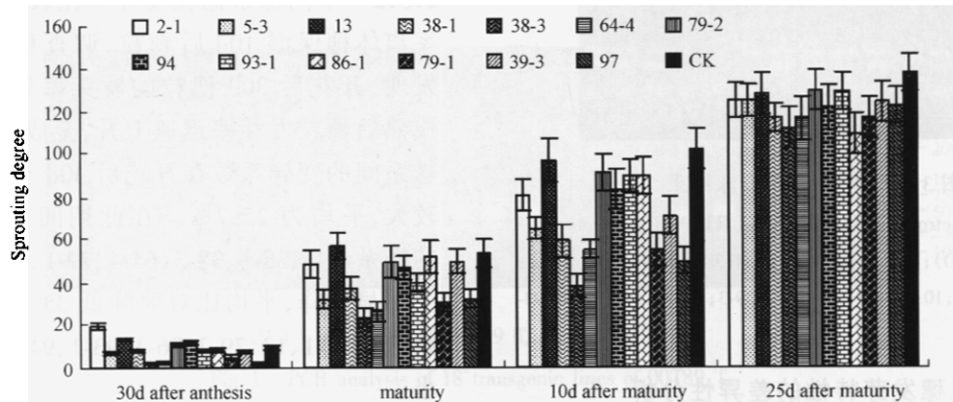


图 7 不同株系穗发芽度
Fig.7 Sprouting degree of different lines

间呈极显著的负相关,与穗粒发芽率和发芽度呈显著和极显著的正相关,穗发芽参数之间的相关性亦达极显著水平。从各个株系来看,mRNA 丰度最低的株系(5-3、38-1、38-3、64-4、79-1)均表现出显著的穗发芽抗性;mRNA 丰度较低的株系(94、39-3、97),97表现出较明显的抗性,94、39-3则没有;与对照相比没有明显差异的株系(2-1、13、79-2、93-1)和过量表达的株系(86-1),不具穗发芽抗性,由此可见,转反义 *trxs* 基因阳性株系在转录水平上对 mRNA 的表达量的抑制,是导致穗发芽阻碍或延缓的直接原因。

表 1 成熟期籽粒 mRNA 丰度与穗发芽指标之间的相关系数
Table 1 Correlation coefficients between the *trxs* mRNA relativity and sprouting parameters at the maturity stage

	mRNA relativity	Sprouting time	Sprouting rate
Sprouting time	-0.7794**		
Sprouting rate	0.6374*	-0.8949**	
Sprouting degree	0.7376**	-0.9389**	0.9334**

Note: $r_{0.05} = 0.5324$; $r_{0.01} = 0.6614$. *, ** indicated that significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

3 讨论

目前在真核生物中获得理想性状物种的一条有效途径是抑制相关基因的表达,反义 RNA 技术在植物基因功能及生理代谢途径中的应用研究已逐渐深入。国外对 *trx h* 生理功能及其机制的研究多见于大麦,并已有转 *trx h* 基因在大麦中过表达调节大麦品质的研究^[18,19]。将 *trxs* 基因的反义链导入小麦,引导与目的基因互补的反义基因的转录,从而得到反义 RNA,表达的 RNA 能够抑制细胞内源性靶基因的表达。但反义 RNA 对靶基因的抑制并不一定总伴随着正义 mRNA 含量的减少。通过 PCR 分子鉴定,转反义 *trxs* 基因的 00T89 第 4 代 18 个株系,呈现阳性的株系有 13 个,占 72.2%。这些株系在转录水平上 mRNA 丰度差异较大,其中有 8 个株系与对照相比 mRNA 丰度呈极显著的降低 ($P < 0.01$),其中又有 6 个株系在穗发芽开始时间、穗粒发芽率和穗发芽度等指标上表现极显著的抗性 ($P < 0.01$)。但与对照相比 mRNA 丰度没有明显差异的株系却没有表现出穗发芽的抗性。由此可见,最终在性状上表现出抗穗发芽特性的转基因株系,基因组 PCR 检测呈阳性,靶基因 mRNA 表达量减少,说明反义 *trxs* 基因的导入能够抑制穗发芽。另一方面,由于存在多种影响因素和限制因子,使得一些阳性株系反义 *trxs* 基因导入并没有导致靶基因 mRNA 丰度减少,即所谓的转基因沉默现象 (transgene silencing)。据

有关报道,转基因沉默现象与转基因及其启动子的甲基化有关^[20]。对于个别株系过量转录的现象,需要进一步的研究。

为了获得稳定表达的转基因后代,一些分子检测手段可做为基础的选择方法,该方法应与转基因性状表达的筛选结合起来。进行穗发芽试验来测定转基因株系的穗发芽指标具有直观、经济费用低、可靠性好的特点。研究结果表明,鉴定穗发芽抗性的适宜期为开花后 30d 至成熟后 10d,这也是造成小麦穗发芽灾害的主要时期,这与反义 *trxs* 基因上游插入醇溶蛋白的启动子有关。在籽粒成熟过程中,随着醇溶蛋白的积累,反义 *trxs* 基因表达,导致 α -淀粉酶活性降低,表现出抗穗发芽特性,成熟后 25d 以后又逐渐恢复发芽特性。由此可见,转反义 *trxs* 基因并能够稳定表达的株系,成熟前后具有明显的抗穗发芽特性,其后不影响其种用价值,这在生产上具有重要的实践意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Stoy V. Progress and Prospect in Sprouting Research. In 3rd International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals. West View Press, 1983, pp. 3 - 7
- [2] Luo JC (罗家传), Xie FS (谢发顺), Jiang SX (姜书贤) et al. Inquisition of preharvest sprouting resistance in Huang-huai wheat region. *Seed* (种子), 2001, 3: 49 - 50
- [3] Sun GZ (孙果忠), Yan CS (闫长生), Xiao SH (肖世和). The mechanism on wheat pre-harvest sprouting. *Review of China Agricultural Science and Technology* (中国农业科技报道), 2003, 5 (6): 13 - 16
- [4] He ZT (何震天), Chen XL (陈秀兰), Han YP (韩月澎). Progress in study on preharvest sprouting resistance in white wheat. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2000, 20(2): 84 - 87
- [5] Jiang GL (蒋国梁), Chen ZX (陈兆夏), Liu SJ (刘世家) et al. Pre-harvest sprouting in white wheats and its resistant characteristics of cultivars. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1998, 24(6): 793 - 798
- [6] Zhang XS (张新生), Hu HQ (胡汉桥), Yang DG (杨德光). Relationship between pre-harvest sprouting and α -amylase and α -amylase inhibitor of spring wheat. *Journal of Jilin Agricultural University* (吉林农业大学学报), 2003, 25(2): 131 - 133
- [7] Yuan YP (原亚萍), Chen X (陈孝), Xiao SH (肖世和). Advances in the study on wheat pre-harvest sprouting. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2003, 23(3): 136 - 139
- [8] Xue X (薛香), Ru ZG (茹振刚), Ou XQ (欧行奇) et al. Study on pre-harvest sprouting resistance in wheat varieties in henan province. *Journal of Henan Vocation-Technical Teachers College* (河南职业技术师范学院学报), 1999, 27(5): 25 - 27
- [9] Selma AH, Gary MP. Role of proteinaceous α -amylase enzyme inhibitors in preharvest sprouting of wheat grain. *Agric Food Hem*, 1989, 37: 295 - 299

- [10] Lozano RM, Wong JH, Yee BC *et al.* New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. *Planta*, 1996, 200:100 - 106
- [11] Xinming L, Jan N, David H *et al.* Cloning a putative self-incompatibility gene from the pollen of the grass *Phalaris coerulescens*. *The Plant Cell*, 1994, 6:1923 - 1932
- [12] Xinming L, Jan N, David H *et al.* Thioredoxin activity in the C terminus of *Phalaris coerulescens*. *The Plant Journal*, 1995, 8(1): 133 - 138
- [13] Xinming L, Jan N, David H *et al.* A self-fertile mutant of *Phalaris* produces an S protein with reduced thioredoxin activity. *The Plant Journal*, 1996, 10(3):505 - 513
- [14] Yin J(尹钧), Ren JP(任江萍), Song L(宋丽) *et al.* Regeneration culture from bombarded immature embryos of wheats and transgenic plant. *Acta Bot Boreal Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(9):1565 - 1570
- [15] Liu L(刘雷), Yin J(尹钧), Ren JP(任江萍) *et al.* Effects of antisense *trxs* on germination of transgenic wheat seeds. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2004, 30(8):801 - 805
- [16] Niu JS, Zhang LN, Hong DF *et al.* Cloning, characterization and expression of wheat EDR1 (enhanced disease resistance) gene. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(5): 477 - 484
- [17] Hagemann MG, Ciha AJ. Evaluation of methods used in resting winter wheat susceptibility to perharvest sprouting. *Crop Science*, 1984, 24(2):249 - 254
- [18] Myeong JC, Joshua H, Marx WC *et al.* Over expression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch branching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Plant Biology*, 1999, 96(25):14641 - 14646
- [19] Marx C, Wong JH, Buchanan BB. Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta*, 2003, 216:454 - 460
- [20] Han Y, Grierson D. The influence of inverted repeats on the production of small antisense RNAs involved in gene silencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267(5):629 - 633