

大豆再生体系的建立及遗传转化的研究进展*

刘北东¹ 朱延明² 杨 谦¹ 杨晓辉³

(1. 哈尔滨工业大学 生命科学与工程系, 哈尔滨 150001; 2. 东北农业大学 生命科学学院, 150030;
3. 齐齐哈尔市土地统征工作站, 161006)

RECENT ADVANCES IN SOYBEAN TISSUE CULTURE AND GENE TRANSFORMATION

Liu Beidong¹ Zhu Yanming² Yang Qian¹ Yang Xiaohui³

(1. Department of Life Science and Engineering, Harbin Inst. of Technology, Harbin 150001;
2. Life Science Collage, Northeast Agriculture University, 150030; 3. Qiqihaer work Station of Land)

中图分类号 S 103.53 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)01-0063-06

大豆作为重要的粮食和油料作物,其再生体系的建立和遗传转化的研究受到了广泛的重视。大豆的再生体系主要包括:不定芽器官发生途径、体细胞胚胎发生途径、原生质体途径、花粉、花药途径;大豆的遗传转化方法主要有载体法和直接转化法两种。本文主要对这些方面的进展情况以及存在的问题进行分析和综述。

1 大豆再生体系的建立

大豆再生体系的研究是大豆遗传转化研究的一个重要组成部分,为提高转化效率、缩短实验周期、解决大豆遗传转化中的嵌合体问题,国内外的研究者对不同途径的大豆的再生体系进行了研究和优化。

1.1 大豆不定芽器官发生途径再生体系

大豆不定芽器官发生体系所用的外植体分别是无菌苗子叶节^[1,2]、未成熟种子的子叶和茎尖^[3,4]、无菌苗上胚轴^[5]等。大豆子叶节不定芽器官发生体系目前已经被公认为较成熟、易行的大豆再生体系。不定芽器官发生系统中,外植体内已存在的分生组

织和有分化潜力的表皮、亚表皮细胞都可作为遗传转化的靶组织。

以子叶节再生系统为代表的大豆不定芽再生体系的优点是: a. 再生时间短,通常1—3个月就可获得生根的再生植株。 b. 外植体容易获得,不受季节限制。 c. 再生过程简单,只需丛生芽分化培养、芽伸长及生根培养3个步骤。 d. 再生频率高。同时子叶节不定芽再生系统也存在外植体较大,再生芽之间的保护作用以及外植体本身抗性对于转化后的筛选工作不利,另外还存在由于不定芽多数为多细胞起源,转化后,一般为嵌合体,纯化、筛选难度较大等缺点。

1.2 大豆体细胞胚胎发生途径再生体系

大豆体细胞胚胎发生再生系统是目前大豆再生系统研究的另一个重要部分,被认为是解决大豆遗传转化中嵌合体问题的最有潜力的再生体系。1983年Christionson等^[6]首先观察到大豆细胞悬浮培养时的体细胞胚胎发生。而后的研究中,Parrott等^[7]首先采用这一体系进行农杆菌介导的遗传转化,但是转化率很低,而且转化植株均为嵌合体。Finer等^[8]对体细胞胚胎发生体系进行了改进,用于遗传转化,

* 收稿日期:2002-09-09

作者简介:刘北东(1972—),男,博士研究生,研究方向微生物与植物基因工程。

采用胚性细胞团作为外植体,由于其位于表面,且能在很多位置形成体细胞胚,因此转化筛选都很容易。采用液体悬浮培养法使胚性细胞团高速增殖,且在筛选时与筛选剂接触充分,使得只有转化部位的细胞可以增殖,因而能进行有效筛选,理论上可以解决嵌合体问题。曲桂芹等^[9]对大豆体细胞胚诱导因素的研究中发现,大豆的基因型、生长素的浓度、外植体的大小、光周期及培养基中的碳源都对大豆体细胞胚的诱导有显著的影响。通常诱导胚胎发生的植物激素为2,4-D,在诱导出体细胞胚后,体细胞胚可以被保持在一种持续扩增状态。当外源生长素降低到一定水平时,初生胚和次生胚将开始组织分化达到子叶型胚阶段。再经过胚的成熟、萌发阶段,而后芽和根开始生长,进而发育成完整的植株。因此,在体细胞胚胎发生再生系统中就需要有一系列的不同的培养基,用以满足体细胞胚不同发育阶段的需要^[10]。体系胞胚胎发生系统存在后代不育、传代时间长(一般大于6个月)、再生植株常出现变异等问题,是影响其用于遗传转化的主要因素,需要进一步研究解决。

1.3 大豆原生质体再生体系

1988年卫志明等^[11]报道了大豆原生质体再生系统,获得愈伤组织,诱导成苗,得到了再生植株。在而后的研究中^[12,13]对不同的大豆品种进行了实验,也获得了大豆原生质体再生植株。大豆原生质体再生体系从理论上讲是克服大豆遗传转化嵌合体现象的最有希望的系统,但由于此系统操作复杂,不易掌握,工作量大,不同基因型差异很大,再生效率低,以及相关的遗传转化方法(电击法、脂质体法、PEG法)的转化效果不理想,所以应用并不广泛。

1.4 大豆花粉、花药再生体系

大豆的花粉、花药培养同大豆其他外植体一样,存在获得愈伤组织容易、再生植株困难的问题。以前的研究大多数只获得愈伤组织。在近些年的研究中,叶兴国等^[14]由花粉愈伤组织诱导出胚状体,并发育成根芽齐全的再生植株。赵桂兰等^[15]对大豆花药培养中愈伤组织和胚状体的诱导及萌发成花粉植株进行了大量试验,发现细胞分裂素(TDZ)对胚状体的诱导和萌发起到了主导作用,在诱导产生的愈伤组织中只有0.5—2.0%分化出植株。可见大豆的花药、花粉培养难分化、分化率低是其存在的主要问题,而且未见将此系统用于遗传转化研究的报道。

以遗传转化为目的的大豆再生体系的研究是一

项公认的难题,尤其是体细胞胚胎发生和原生质体再生体系,但是由于其潜在的在遗传转化上的优势,使其成为目前研究的热点。

2 大豆遗传转化的研究进展

目前大豆的遗传转化工作的研究不但在转化的机理、方法和转化条件的优化等方面取得了很大进展,而且还获得了一些高品质、抗病、抗虫、抗除草剂等的大豆转基因材料和品种。以下将按照其不同的转化方法分别予以总结。

2.1 载体法转化大豆研究进展

载体法是指利用细菌、病毒等天然载体,将目的基因转入植物基因组中,使其整合表达,从而获得带有目的基因的转基因植株的方法。目前应用较为广泛的是农杆菌介导法。

2.1.1 农杆菌介导法的基本原理

用于遗传转化的农杆菌有根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)两种,分别带Ti质粒和Ri质粒。Ti质粒的T-DNA转入植物细胞是一个复杂的农杆菌与植物细胞相互作用的过程,其中Vir区基因群起很重要的作用。T-DNA在植物染色体中插入是随机的,但插入位点通常具有转录活跃、富含AT碱基、与T-DNA边界序列有一定程度的同源性等特点。目前Ti质粒载体系统主要有共整合载体和双元载体系统两类。利用农杆菌进行转化的优点在于,农杆菌在双子叶植物及裸子植物中有较广的宿主范围;可以精确地把两个边界序列之间的DNA导入植物细胞,并且导入的基因在大多数情况下是单拷贝整合到植物细胞核的基因组中;允许插入T-DNA中的外源基因片段较大。缺点是用现有的转化方法,在许多单子叶植物上还很难获得成功,而且在双子叶植物及裸子植物中还受菌株特异性、宿主基因型特异性等因素所制约。

发根农杆菌的Ri质粒在结构上与Ti质粒有许多相似的地方,与根癌农杆菌不同的是发根农杆菌侵染植株产生的发状根,这些发状根有的可以自发地再生植株,有的很难分化形成植株。前一种情况对于遗传转化非常有利,因此,发根农杆菌也是一种很有潜力的转化载体。

2.1.2 农杆菌介导的无标记遗传转化方法

目前的遗传转化载体大多以抗生素抗性基因为选择标记,即在导入目的基因的同时也导入了选择

标记基因。这样就产生了许多问题,如选择标记基因的安全性问题;由于可用的选择标记基因有限,无法进行多基因多次转化等问题。在关于无标记遗传转化方法的研究中, Komari 等^[6]构建的双 T-DNA 的双元载体,将选择标记基因和目的基因分别构建在两个 T-DNA 上,进行共转化。在当代可以用选择标记基因进行筛选,下一代将发生分离,得到无标记的转化体。这种方法简单方便,但存在的问题是要经过有性繁殖,对于那些需要无性繁殖保持优良性状的作物以及繁殖周期长的木本植物显然是不适用的。在其他的研究中,研究者们利用有剪切作用的因子,如玉米的 Ac 转座子等^[17],将选择标记基因构建到这些因子中,在转化后的一段时间里,将选择标记基因自动剪切掉,来得到无标记转化体。这样即解决了多次重复转化的问题,又不需要有性杂交,是一个很有潜力的无标记遗传转化方法。农杆菌介导的无标记遗传转化方法研究已经成为重要的发展方向。

2.1.3 农杆菌介导转化大豆

1984 年王连铮等^[18]报道了根癌农杆菌的 15 个菌系对大豆的致瘤作用,筛选出致瘤效果较好的 7 个菌系,从大豆的 1553 个品种和品系中筛选出 94 个结瘤品种和品系,并获得了愈伤组织,经生化鉴定证明了其中有一部分含有胭脂碱,证明了 Ti 质粒可以作为载体,把胭脂碱基因转移到大豆的基因组中去,并能稳定地保存在基因组中。Hinchee 等^[19]用农杆菌介导的转化方法用含有质粒 pTiT37-SE (含 NPT II 基因)和 pMON9749 (含 GUS 基因)或 pMON894 (含 Glyphosate 抗性基因)的农杆菌感染栽培大豆品种 (Maple Presto、Peking、Dolmat) 的子叶,经组织培养获得的转基因植株中含有 NPT II 基因和 GUS 基因或 Glyphosate 抗性基因,经遗传分析发现该转基因大豆植株后代呈孟德尔式遗传。Parrot 等^[7]用农杆菌介导的转化方法转化大豆的未成熟子叶,获得了表达 β -云扁豆蛋白启动子-15KD 玉米醇溶蛋白基因和 NPT II 基因的转基因大豆植株。王慧中等^[20]用根癌农杆菌感染大豆顶芽,在 75mg/l 卡那霉素的选择培养基上选择出抗性愈伤,并分化出抗性芽,经生化检测其中含有冠瘿碱。傅桂荣等^[21]用含有 GUS-ipt-NOS 融合基因的根癌农杆菌 LBA 4404 转化大豆的萌动种胚,获得转化大豆苗,并对转化苗的根进行了过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶进行了分析,结果表明谱型有明显差异。徐香玲等^[22]用农杆菌 Ti 质粒介导法将 B.t.k. - δ -内毒素基因转入

东北大豆黑农 37、39 等品种,从其胚轴与子叶诱导出芽并再生出植株,经卡那霉素筛选、Opine 检测和 DNA 分子杂交证明了外源基因转入并稳定整合到大豆核基因组中,其种子萌发后植株生长发育正常。

在许多关于农杆菌的转化机理研究中发现大豆的一些品种对农杆菌的敏感性远远高于其他品种,存在寄主基因型的特异性^[23,24]。另外,研究发现农杆菌介导效率低的问题可以通过添加乙酰丁香酮诱导 Vir 基因表达或通过选用高毒力的农杆菌菌株来部分解决^[25]。最近的研究中发现,超声波辅助农杆菌转化法 (SAAT),可以显著提高农杆菌介导法对大豆未成熟子叶,胚性细胞悬浮培养物,子叶节的遗传转化效率^[26,27,28]。超声波辅助法主要是通过对外植体进行适当时间的超声波处理,使外植体上制造大量的微小伤口,一方面增加外植体分泌酚类化合物的数量,另一方面增加农杆菌菌液与外植体的接触面积,使菌液能够渗入到组织内,提高转化效率。Donaldson 等^[29]用农杆菌法对几个早熟大豆品种的子叶节和胚性愈伤组织转化研究,再次证实了农杆菌介导的遗传转化存在菌株和寄主基因型的特异性。

在发根农杆菌转化大豆的研究上,徐香玲等^[30]用发根农杆菌 pRiA4b 转化大豆子叶节、胚轴、幼胚和整株,均获得毛状根,并再生出植株,经生化检测发现其中含有冠瘿碱,用 PCR 和 Southern 检测大豆花叶病毒外壳蛋白基因已整合到大豆基因组中。

农杆菌介导大豆遗传转化的影响因素很多,主要受菌株类型、寄主植物对农杆菌的敏感程度、酚类化合物的添加、共培养时间等因素的影响,是一项复杂的系统工作。

2.2 直接转化法转化大豆研究进展

直接转化法即通过物理、化学的方法,直接将外源 DNA 导入植物细胞内,并使其在植物基因组上整合、表达的遗传转化方法。主要包括:基因枪法、花粉管通道法、微注射法、电击和聚乙二醇/电击法、多聚鸟氨酸转化法。其中以基因枪法和花粉管通道法应用范围较广。

2.2.1 基因枪法

基因枪法是利用火药爆炸、高压放电或高压气体为驱动力加速金属粒子,并使其进入带壁细胞的一种方法。根据动力来源的不同大体可以分为火药式、放电式和气动式三种类型。

Christou 等^[31]用基因枪法将 pCMC1021 (含 NPT II 基因)转移到大豆子叶原生质体内,经过原生质体

培养和卡那霉素筛选获得抗卡那霉素的愈伤组织,并在其中检测到 NPT II 酶活性。Mc CABE 等^[32]用 Christou 的方法获得了转(NPT II)基因大豆植株,并开花结实。经 Southern Blot 分析证明转基因大豆植株细胞基因组中含有 5 个以上的 NPT II 基因拷贝。Sato 等^[4]用基因枪法将 GUS 基因转入大豆品种 Fayette 的细胞悬浮系中,经胚胎发生途径获得转基因大豆再生植株,并用组织化学法染色检测到转基因再生植株中有 GUS 基因表达。Hazel 等^[33]用基因枪法将 GUS 基因导入大豆胚性愈伤组织中,得到了转化植株。苏彦辉等^[34]用基因枪法和农杆菌介导法,将苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因(Bt 基因)导入大豆的未成熟子叶中,获得了 3 株经 Southern 检测为阳性的转基因植株。Ponappa 等^[35]用基因枪法将水母绿色荧光蛋白基因(GFP)导入大豆的胚性愈伤组织,建立了稳定的转化体系,获得了转化愈伤组织和转基因植株,经过 PCR 和 Southern 检测证实 GFP 基因已经整合到大豆基因组中。Simmonds 等^[36]用基因枪法将 GUS 基因导入 18 个大豆早熟品种中,获得了多株转基因植株。Reena Philip 等^[37]用基因枪法将牛酪蛋白基因与在种子中特异表达的植物种子血凝素的启动子^[38]构建在一起,转化大豆胚性组织,获得了在种子中特异表达牛酪蛋白的转基因大豆。

2.2.2 花粉管通道法

70 年代末期,周光宇等提出用作物总 DNA 作外源基因,通过花粉管对作物进行了基因转移,并用放射自显影的方法,在棉花的花粉管通道和胚囊中看到带有同位素标记的 DNA,证明转化时注入的 DNA 进入了胚囊。随后,这一方法在国内的一些育种单位中开始应用,并观察到相应的变异,但是这些结果都得不到分子水平上的验证和明确的基因表达产物。至今,花粉管通道法已在多种作物中获得成功,并通过 Southern blot 和 Northern blot 鉴定以及对表达产物的检测,证实了目的基因的整合与表达,确定了其在直接转化法中的地位。

雷勃钧等^[39,40,41]用花粉管通道法将外源 DNA 导入大豆,转化后代变异主要表现在成熟期,花色、蛋白质含量、SOD 酶谱和酶活性等方面,证明外源总 DNA 导入获得的后代分离不符合孟德尔分离定律。在以后的研究中用大豆自花授粉后形成的花粉管通道将外源高蛋白野生大豆总 DNA 直接导入栽培大豆获得蛋白质含量比受体高 12.5% 的变异后代,并经 RAPD 分析检测出 DNA 多态性,证明外源 DNA 导

入受体后引起后代基因组的显著变化。进而获得优质高蛋白和双大大豆新品系。许守民等^[42]用花粉管通道法把花生 DNA 导入栽培大豆,获得变异后代。子代的蛋白质含量明显高于双亲,表现出杂种优势。崔岩等^[43]用花粉管通道法将 Bt 基因导入大豆,得到经 PCR 检测成阳性的转基因植株。

在大豆的其他直接遗传转化方法的研究方面,大豆微注射法遗传转化是将目的基因或载体注入大豆的合子期子房^[44]或幼荚^[45],经过分子检测证实目的基因可以整合到大豆的基因组中,并且可以观察到一些农艺性状出现变异。黄健秋等^[46]用 PEG 法分别将外源 GUS 基因和 Bt 基因转入大豆原生质体中,检测到外源基因的稳定表达,并获得了转化植株。南相日等^[47]用多聚鸟氨酸介导外源基因直接转化法转化大豆,是在大豆遗传转化方法上的有益探索。

大豆再生体系的建立与遗传转化目前还很不完善,前面所述的大豆再生体系都存在各自的局限性,体细胞胚胎发生途径和原生质体再生系统是最有潜力的适合于遗传转化的再生体系。但还需进一步完善。大豆不定芽发生再生体系,尤其是子叶节不定芽再生体系,以其简便易行、高效及实验周期短等优点,成为目前普遍应用的较为成熟的大豆遗传转化再生体系。在遗传转化方法上,虽然近年来进行了许多新尝试,发展了农杆菌介导无标记转化法、超声波辅助农杆菌介导法、农杆菌与微激光束结合法、微激光束法、花粉介导法、植物病毒介导法…等。目前最为常用的仍是农杆菌介导法和基因枪法。相信随着人们在大豆体细胞胚胎发生及原生质体途径等再生系统方面的努力和遗传转化方面的探索,将来一定会克服目前大豆遗传转化中存在的转化效率低、转化后代大多是嵌合体等诸多问题,使大豆遗传转化成为一种便捷高效的遗传育种方法。

参 考 文 献

- 1 Trick HN, Dinkins RD, Samtarem ER. Recent advances in soybean transformation[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1997, 3: 9-26.
- 2 刘北东,朱廷明,李海燕,等.大豆子叶节再生影响因素的研究[J].大豆科学,2002,21:88-92.
- 3 Barwale UB, Kems HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986 167: 473-481.
- 4 Sato S, Newell C, Kolacz K. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems [R]. Plant Cell Rep.

- 1993, 12: 408-413.
- 5 Wright MS, Williams MH, Pierson RE. Initiation and propagation of *Glycine Max* L. Merr.: Plants from tissue-cultured epicotyls [J]. Plant Cell Tissue Org Cult. 1987, 8: 83-90
 - 6 Christianson ML, Warink DA, Carlson PS. A morphogenetically competent soybean suspension culture [J]. Science. 1983, 222: 632-634.
 - 7 Parrott W. A, Hoffman L. M, Hildebrand D F, et al. Recovery of primary transformants of soybean [R]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 615-617
 - 8 Finer JJ, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1988, 15: 125-136.
 - 9 Parrott, W. A, Williams, E. G, Hildebrand, D. F. et al. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1989, 16: 15-21.
 - 10 曲桂芹, 张贤泽, 霍俊伟. 影响大豆体细胞胚诱导因素的研究 [J]. 植物研究, 2001, 21: 210-215.
 - 11 Wei Zhiming, Xu Zhihong. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.) [R]. Plant Cell Rep. 1988, 7: 348-351.
 - 12 Dhri SK, Dhri S, Widholm JM. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): genotypic differences in culture response [R]. Plant Cell Rep., 1992, 11: 285-289.
 - 13 张贤泽, 小松田隆夫. 大豆原生质体经体细胞胚再生植株 [J]. 中国科学(B辑), 1993, 23: 154-158.
 - 14 叶兴国, 王连铮. 大豆花药培养研究进展 [J]. 大豆科学, 1995, 14: 350-354
 - 15 赵桂兰, 刘艳芝, 尹爱平, 等. 大豆花药培养中胚状体萌发的研究 [J]. (科学通报), 1998, 43: 1512-1516
 - 16 Komai T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers [J]. Plant J, 1996, 10: 165-174.
 - 17 Hiroyasu Ebinuma, Koichi Sugita, Etsuko Matsumaga et al. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene (plant genetic engineering DNA transformation selectable marker ipt gene transposon Ac) [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 2117-2121
 - 18 王连铮, 尹光初, 罗教芬, 等. 大豆致瘤及基因转移研究 [J]. 中国科学(B辑), 1984, 2: 137-141.
 - 19 Hinchey MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer [J]. Bio/Technol. 1988, 6: 915-922
 - 20 王慧中, 徐志彦. Ti质粒在大豆中表达初报 [J]. 浙江农业大学学报, 1995, 21: 217-218.
 - 21 傅桂荣, 许志苍, 郑宝记, 等. 含 ipt 基因根瘤农杆菌转化大豆萌动种胚的同工酶分析 [J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1996, 12: 80-90
 - 22 徐香玲. Ti质粒介导的 B.t.k- δ 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究 [J]. 大豆科学, 1997, 1: 6-11.
 - 23 Bailey MA, Boerma HR, Parrott WA. Inheritance of tumor formation in response to *Agrobacterium tumefaciens* in soybean [J]. Crop Sci. 1994, 34: 514-519.
 - 24 Mauro AO, Pfeiffer TW, Collins GB. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation [J]. Crop Sci. 1995, 35: 1152-1156
 - 25 Delzer B W, Somers D A, Orf J H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II [J]. Crop Sci. 1990, 30: 320-322
 - 26 Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue [R]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 482-488
 - 27 Santarém ER, Trick HN, Essig JS, et al. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression [R]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 752-759.
 - 28 Meurer P. A., Dinkins R. D, Collins G. B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation [R]. Plant Cell Reports 1998, 18: 180-186
 - 29 Donaldson P. A, Simmonds D. H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean [R]. Plant Cell Reports 2000, 19: 478-484.
 - 30 徐香玲, 王毅. Ri质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究 [J]. 大豆科学, 1996, 15: 279-288
 - 31 Christou P, McCabe D. E, Swain W. F. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles [J]. Plant Physiology, 1988, 87: 671-674.
 - 32 McCABE D. E, Swain W. F, Martinell B. J, Christou. P. Stable transformation of soybean (*Glycine max.*) by particle acceleration [J]. Bio/Technology, 1988, 6: 923-926
 - 33 Hazel C. B, Anis M., Wilde H. D, et al. Growth characteristics and transformability of soybean embryonic cultures [R]. Plant cell Reports, 1998, 17: 765-772.
 - 34 苏彦辉, 王慧丽, 俞梅敏, 等. 芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆研究 [J]. 植物学报, 1999, 41: 1046-1051.
 - 35 Ponappa T, Bizozowski A. E, Finer J. J. Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein [R]. Plant Cell Rep. 1999, 19: 6-12
 - 36 Simmonds D. H., Donaldson P. A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes [R]. Plant cell Rep. 2000, 19: 485-490
 - 37 Reena Philip, Douglas W. Damowski, P. Jeffery Maughan, et al. Processing and localization of bovine casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette [J]. Plant Science, 2001, 161: 323-335.
 - 38 Cho M. J., Widholm J. M., Vodkin L. O. Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean [R]. Plant Mol. Biol. Rep. 1995, 13: 255-269.
 - 39 雷勃钧. 外源 DNA 直接导入大豆的研究 [J]. 大豆科学, 1991, 10: 58-63.
 - 40 雷勃钧, 李希臣, 卢翠华, 等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证 [J]. 中国科学(B辑), 1994, 24: 597-602
 - 41 雷勃钧, 卢翠华, 钱华. 导入外源总 DNA 获得优质高蛋白和双高大豆新品系 [J]. 大豆科学, 1995, 14: 203-208.
 - 42 许守民, 苗以农, 常令花, 等. 花生 DNA 导入大豆后代蛋白组合及氨基酸的变异性 [J]. 大豆科学, 1995, 14: 316-319
 - 43 崔岩, 杨庆凯, 曹越平, 等. 利用花粉管通道技术将抗病虫基因导

- 入大豆的研究[R]. 2000年全国大豆转基因工作会议材料.
- 44 岳绍先, 翟文学. 抗 Arazine 基因导入黑龙江大豆品种及其表达和遗传[J]. 中国农业科学, 1996, 29: 78-83.
- 45 张燕君, 赵双宜, 周同度, 等. 牛酪蛋白基因导入大豆的研究[J]. 山东大学学报(自然科学版), 2000, 35: 333-337.
- 46 黄健秋, 卫志明, 许智宏. GUS 基因在大豆未成熟子叶原生质体中的表达[J]. 植物学报, 1992, 34: 26-30.
- 47 南相日. 多聚鸟氨酸介导外源基因的直接转化法[J]. 大豆科学, 2000, 19: 26-29.

免费供种 保价回收 预付回收资金

只需来封信 VCD 影碟机、V8088 话机、照相机和种源免费送给你。

我单位是专业从事中药材种植研究、良种繁育、推广、加工、回收为一体的科研机构, 近年来研究开发出十几个适应大田、室内、阳台及庭院种植的品种, 且好种易管, 南北适宜的名贵中药良种, 最佳种植期春 2-6 月, 秋 8-11 月。人参头, 生长期 50-60 天, 667m² 产成药 1.5-2kg。回收价 50 000 元/kg。泊夫兰从种到收 60 天, 667m² 成药 2-3kg, 回收价 38 500 元/kg。另向种植户提供草红花、冬虫夏草、仙人掌、柴胡、药枣等 80 余种药材。为解决药农后顾之忧, 完成上交和创汇任务, 由我单位免费供种, 负责种植技术, 上门现金回收产品, 产品由我单位回收后(我)一(你)九按利润分成, 签订五年产品法律公证回收合同。

为确保种植成功, 凡合作者我单位将一律赠送 VCD 影碟机、V8088 话机及全套《中药材高产栽培新技术》光碟一套。另外, 本单位面向全国招收驻外业务员授权总代理, 月工资 1800 元。愿合作者速来信联系领取种子, 来信时夹寄你地区土样 2g 于信内, 供化验分析后即寄你地适宜种植品种, 本广告长期有效, 欢迎实地考察。

联系地址 河南省西峡县星火农业经济发展贸易部

联系人 代小红 邮编 474500

电话 0377-4671768 4671659(传真)

营业执照注册号 4113303007075 种子经营许可证 001