

草菇基因枪法遗传转化体系的建立

郭丽琼^{1,2} 杨飞芸¹ 熊盛² 林俊芳^{1,2*}

(¹ 华南农业大学食品学院生物工程系, 广州 510640; ² 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要: 草菇菌株 V1308 对潮霉素、卡那霉素、遗传霉素、膦丝菌素的抗性测验结果表明, 该菌株对潮霉素敏感, 而对其它三者不敏感。进一步测定结果显示, 潮霉素的最低筛选浓度在 PDSA 固体培养基上为 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 PDSB 液体培养基中为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以含有 35S 启动子、*gus* 报告基因、潮霉素抗性基因的质粒 pCAMP A1301 为表达载体, 采用基因枪法对草菇菌丝体进行遗传转化。结果表明, 基因枪的最佳轰击参数为: 氦气压力 1 100 Psi, 真空压力 87.88 kPa, 靶距离 6 cm, 轰击次数 1 次。Southern 杂交结果显示, *gus* 基因已整合进 V1308 基因组中。GUS 组织化学检测结果证明, *gus* 基因在 V1308 菌丝体中获得了表达。草菇出菇试验结果显示, 转基因草菇和对照都能正常形成子实体, 子实体组织分离长出的菌丝体经 GUS 组织化学检测, 证明了外源基因 *gus* 能够在转基因草菇的菌丝体中稳定表达。

关键词: 草菇; 基因枪; 遗传转化; *gus* 基因

中图分类号: S 646.1⁺3 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 05-0828-06

The Transformation System for *Volvariella volvacea* by Particle Bombardment

Guo Liqiong^{1,2}, Yang Feiyun¹, Xiong Sheng², and Lin Junfang^{1,2*}

(¹ Department of Bioengineering, College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;
² State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: The resistant test of *Volvariella volvacea* strain V1308 to hygromycin, kanamycin, G418 and PPT showed that the strain was sensitive to the former but resistant to the latter 3 reagents. The lowest selection concentrations of hygromycin for V1308 were $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ on PDSA solid medium and $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in PDSB liquid medium. The expression vector pCAMP A1301, carrying 35S promoter, hygromycin selectable gene and *gus* report gene, was transferred into intact mycelia of V1308 by particle bombardment. The most effective bombardment parameters were 1 100 Psi of helium pressure, 87.88 kPa of vacuum pressure and 6 cm of target-shelf distance. The result of southern blotting indicated that the *gus* gene was integrated into the V1308 genome. GUS histochemical assay confirmed that *gus* had expressed in V1308 mycelia. Cultivation of V1308 showed that both the transformant and the control were able to form normal fruit-bodies. GUS histochemical assay indicated that the exogenous *gus* gene expressed stably in the mycelia derived from the fruit-bodies of transformant.

Key words: *Volvariella volvacea*; Particle bombardment; Genetic transformation; *gus* gene

食用菌遗传转化的研究虽然起步较晚, 但发展迅速。自 1991 年 Challen M P 等最早报道了利用 PEG 法把外源 DNA 导入双孢蘑菇受体菌的原生质体内获得转化子以来, 相继报道了杨树菇 (*Agrocybe aegerita*)、双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、平菇 (*Pleurotus ostreatus*)、香菇 (*Lentinus edodes*)、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 等的遗传转化研究结果^[1-3]。在草菇的遗传转化研究上只有 1998 年 Jia 等报道了以 *tp3^{lac}* 为抗性筛选标记基因, 以 PEG 法建立了草菇遗传转化体

收稿日期: 2005-01-28; 修回日期: 2005-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39960050、30060054 和 30371000); 广东省自然科学基金资助项目 (032239)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: linjf@scau.edu.cn)

系^[4]。本文报道以 35S 为启动子, 潮霉素抗性基因 (*hpt*) 为筛选标记基因, *gus* 为报告基因, 采用基因枪法把外源 *gus* 基因转化进草菇的菌丝体中, 建立了草菇基因枪法遗传转化体系。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、质粒和试剂

草菇菌株 V1308 由福建农业大学谢宝贵博士赠送, 保存在 PDSA 培养基斜面上; 质粒受体菌 DH5 由本实验室保存, 表达载体 pCAMB A1301 来自澳大利亚国际农业分子生物学应用中心。该质粒含有 CaMV 35S 启动子、潮霉素抗性基因 (*hpt*) 和 *gus* 报告基因。卡那霉素 (Kam)、遗传霉素 (G418)、潮霉素 (Hyg)、膦丝菌素 (PPT)、X-gluc、PNPG 购自北京经科公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Promega 公司; 考马斯亮蓝购自 Sigma 公司; 基因枪 Kit 购自 Bio-Rad 公司; Prime-It II Random Primer Labeling Kit 购自美国 Stratagene 公司。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 抗性标记试剂的筛选

按常规方法配制 PDSA 培养基并制成含有卡那霉素等 4 种试剂各 5 种浓度 (表 1) 的平板。每个浓度处理 3 次重复。之后在超净台上每个平板接入 1 块黄豆大小的菌种, 以不含抗性试剂的 PDSA 平板为对照。接种后置于 28 的恒温培养箱中培养, 每隔 12 h 观察 1 次, 记录菌丝的生长情况及生长速度。

1.3 草菇菌株 V1308 对潮霉素的敏感性测验

配制含有 0、45、55、65、75、85 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSA, 平板接种草菇菌种, 并置于 28 的恒温培养箱中培养, 观察菌丝的生长情况。配制含有 0、40、45、50、55、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSB 液体培养基 30 mL 于 100 mL 的三角瓶中, 接入黄豆大小的菌种 5 块, 置于 28 的摇床上培养, 摇床转速为 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 每天观察并记录。

1.4 基因枪转化

质粒 pCAMB A1301 转化感受态细胞 DH5 以及质粒的提取与纯化根据文献 [5] 的方法进行。微弹 (金粉) 的制备按基因枪 Kit 说明书进行, 以不包裹 DNA 的微弹为对照。

草菇外植体的准备: 按常规方法制备 PDSA 平板并接种, 置于 28 恒温箱里培养 1 周。选生长均匀一致的菌丝切割成约 0.5 cm 的方块, 平铺于注有薄层 PDSA 培养基的培养皿中, 铺成面积直径约 6 cm 大小的圆圈 (约有 113 块外植体)。基因枪轰击参数的设定: 氦气压力 1 100 Psi; 真空压 87.88 kPa; 设不同靶距离和轰击次数, 共计 4 个处理 (表 2), 每个处理设 2 次重复。

1.5 转化子的筛选、鉴定及遗传稳定性分析

将轰击后的草菇外植体置于 28 培养箱中培养 2 d 后转入含 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSA 筛选培养基上, 在 28 下进行初步筛选。一周后, 切取新生长的菌丝 (约 1 cm^2 大小), 转入含 75 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSA 筛选培养基中继续筛选。一周后选取可生长的菌丝, 切割成 0.8 mm 厚的薄片转入含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSB 液体培养基中, 于 28 振荡培养, 转速为 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。能在液体选择培养基上生长的菌丝块即认为是假定转化子, 继代培养均采用液体选择培养基。

GUS 组织化学分析: 切取少许假定转化子和非转化子草菇菌丝体于 1.5 mL 的离心管中, 每管加入 200 μL 的固定液 (1% 甲醛, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 0.05% Triton X-100), 于 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇动固定; 30 min 后移去固定液; 用 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液洗涤 3 次, 每次于 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇动 10 min, 用移液器移去用过的缓冲液; 每管加入 200 μL 新鲜配制的 X-gluc 溶液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ X-gluc, 0.1% Triton X-100, 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚铁氰化钾, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氯霉素); 每个样品分 3 管处理, 分别置于 28、32 和 37 的温度条件下温育; 每隔 48 h 制作载玻片, 在倒置显微镜 (Olympus MT-2) 下观察并拍照。

Southern Blotting 检测: 选择 GUS 染色较明显的 8 个草菇转化子进行 Southern Blotting 分子杂交检

测。草菇转化子和对照菌丝的收集和草菇基因组 DNA 的提取按文献 [6, 7] 的方法进行。

gus 基因片段的制备: 先以限制性内切酶 *Bst* E 酶解质粒 pCAMB A1301, 反应条件根据 *Bst* E 酶的说明书进行。酶解 2 h 后加入 1/10 体积的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH 5.2), 2 倍体积的无水乙醇, 静置数分钟, 离心回收已酶解的质粒; 加入 $25.5 \mu\text{L}$ 无菌 ddH₂O, 溶解沉淀。依次加入 Buffer D $3.0 \mu\text{L}$, *Bgl* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1.5 \mu\text{L}$, 混匀后置于 37 °C 恒温下酶解 2 h; 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分离酶解产物; 用凝胶 DNA 提取 Kit 回收 *gus* 基因片段。

以限制性内切酶 *Hind* II 酶解假定草菇转化子和非转化子的总 DNA ($15 \mu\text{g}$), 以限制性内切酶 *Sph* 酶解质粒 pCAMB A1301 (60 pg) 作为阳性对照。配制 0.8% 的 Agrose 胶, 酶解产物全部点样, 并以 20 V 的电压电泳过夜。DNA 从凝胶中转移至尼龙膜的步骤根据文献 [5] 的方法进行。*gus* 基因片段探针的标记、膜的预杂交、杂交、洗膜、放射自显影等方法和步骤均根据 Prime-It II Random Primer Labeling Kit 说明书进行。

草菇转化子的遗传稳定性分析: 按文献 [8, 9] 的方法进行草菇菌种的制作及框式栽培, 待产生子实体后取未开伞的子实体进行组织分离, 对获得的菌丝体进行 GUS 组织化学检测。

2 结果与分析

2.1 抗性标记试剂

抗性标记试剂的筛选结果见表 1。卡那霉素、遗传霉素、膦丝菌素的各处理浓度对 V1308 的菌丝生长几乎没有影响, 生长速度接近对照; 潮霉素对草菇 V1308 的生长速度影响很大, 在 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时菌丝的生长极慢, $100 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时即停止生长, 故选择潮霉素作为草菇的抗性筛选试剂。

表 1 草菇菌株 V1308 在不同试剂浓度平板上的日平均生长速度

Table 1 The average growth rate of V1308 on the plates with different concentration of reagents

卡那霉素 Kanamycin		潮霉素 Hygromycin		遗传霉素 Geneticin		膦丝菌素 Phosphinothricin	
浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	生长速度 Growth rate ($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	生长速度 Growth rate ($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	生长速度 Growth rate ($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	生长速度 Growth rate ($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)
100	0.70	25	0.06	10	1.32	0.5	0.80
200	0.65	50	0.01	20	1.17	1.0	0.75
300	1.00	100	0	30	1.02	1.5	0.58
400	0.95	150	0	40	0.75	2.0	1.05
500	0.85	200	0	50	0.80	2.5	0.70
对照 Control	0.95	对照 Control	0.90	对照 Control	1.42	对照 Control	1.08

2.2 草菇菌株 V1308 对潮霉素的敏感性

V1308 在含 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSA 平板上菌丝停止生长 (图版, 1), 在含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 PDSB 液体培养基中菌丝停止生长。故确定 V1308 在 PDSA 平板上和 PDSB 液体培养基中的最佳筛选浓度分别为 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 不同轰击参数对草菇相对转化率的影响

经基因枪轰击转化的草菇菌丝体 T1、T2、T3 和 T4, 在选择培养基上筛选后获得的假定转化子总数分别为 15、7、6 和 14 个, 平均相对转化率 (转化子数/外植体总数) 分别为 6.64%、3.01%、2.66% 和 6.20% (表 2)。方差分析表明: 靶距离 6 cm 的相对转化率极显著高于 9 cm 和 12 cm 的处理; 而靶距离 6 cm, 轰击次数 1 次与 2 次之间差异不显著。由此可见, 基因枪转化

表 2 不同处理的相对转化率

Table 2 The relative transformation efficiencies of different treatments

处理 代号	靶距离 Target-shelf distance (cm)	轰击次数 Bombardment times	相对转化率 Relative transformation efficiency (%)
T1	6	1	6.64 aA
T4	6	2	6.20 aA
T2	9	1	3.01 bB
T3	12	1	2.66 bB

的最佳参数为靶距离 6 cm、轰击次数 1次（图版，2），其相对转化率最高，为 6.64%。

2.4 草菇菌株 V1308转化子的鉴定

2.4.1 GUS组织化学分析 草菇转化子的菌丝以 X-gluc为底物进行显色反应，在显微镜下可观测到明显的蓝斑或完全染成蓝色的菌丝段（图版，3），这说明了草菇转化子的菌丝里具有 GUS酶的活性，因为只有 GUS酶活性的存在才能将 X-gluc底物水解生成蓝色物质；而非转化子对照没有任何蓝斑出现（图版，4），这说明了草菇不含内源的 *gus*基因。只有外源的 *gus*基因整合进草菇的基因组中时，才能表达出 GUS酶的活性。这个结果表明了外源 *gus*基因已经整合进草菇菌丝的基因组中，并且得到了表达。另外，我们发现 X-gluc的显色反应无论是在 28、32 还是在 37 都可以观测到清晰的蓝点或蓝色菌丝，然而，在 32 时 X-gluc的显色反应要比 28、37 快，故认为草菇菌丝的 GUS染色反应在 32 的温度下效果最好。

2.4.2 Southern B lotting检测 草菇转化子和对照基因组 DNA的酶切结果和 Southern B lotting检测结果见图 1。结果表明：（1）草菇基因组 DNA酶解充分，可以转膜；（2）8个草菇转化子的样品中均产生了与 *gus*探针杂交的信号带（1~8泳道），非转化子对照没有任何杂交信号（10泳道），而阳性对照质粒 pCAMP A1301产生了与 GUS探针杂交的信号带（约 3.2 kb），说明这 8个受检样品中 *gus*基因确已整合到受试的基因组中；（3）每个泳道都有 2~3条，最多 5条的杂交信号带，说明利用基因枪法进行草菇转化时，较少有单基因转化的情况，这和利用基因枪法进行其他植物转化的结果一致。

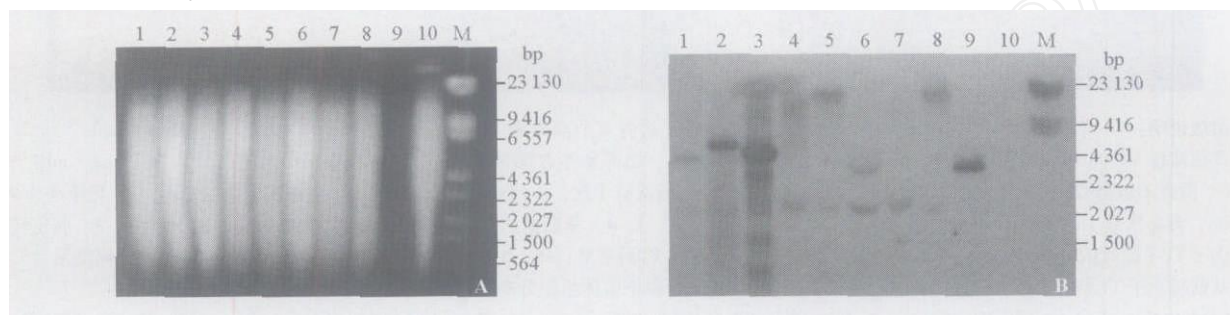


图 1 草菇 V1308基因组 DNA的 Hind III酶解结果（A）和 Southern blotting检测结果（B）

M. DNA Marker; 1~8 分别为 T1-1、T1-6、T1-10、T1-11、T2-3、T3-5、T4-7、T4-9草菇转化子；

9. 质粒 pCAMP A1301; 10. 非转化子对照。

Fig. 1 Digestion of genomic DNA of straw mushroom with Hind III (A) and southern blotting detection results (B)

M. DNA Marker; 1 - 8 Transformant T1-1, T1-6, T1-10, T1-11, T2-3, T3-5, T4-7, T4-9 respectively; 9. Plasmid

pCAMP A1301; 10. Non-transformant control

2.5 草菇转化子的遗传稳定性

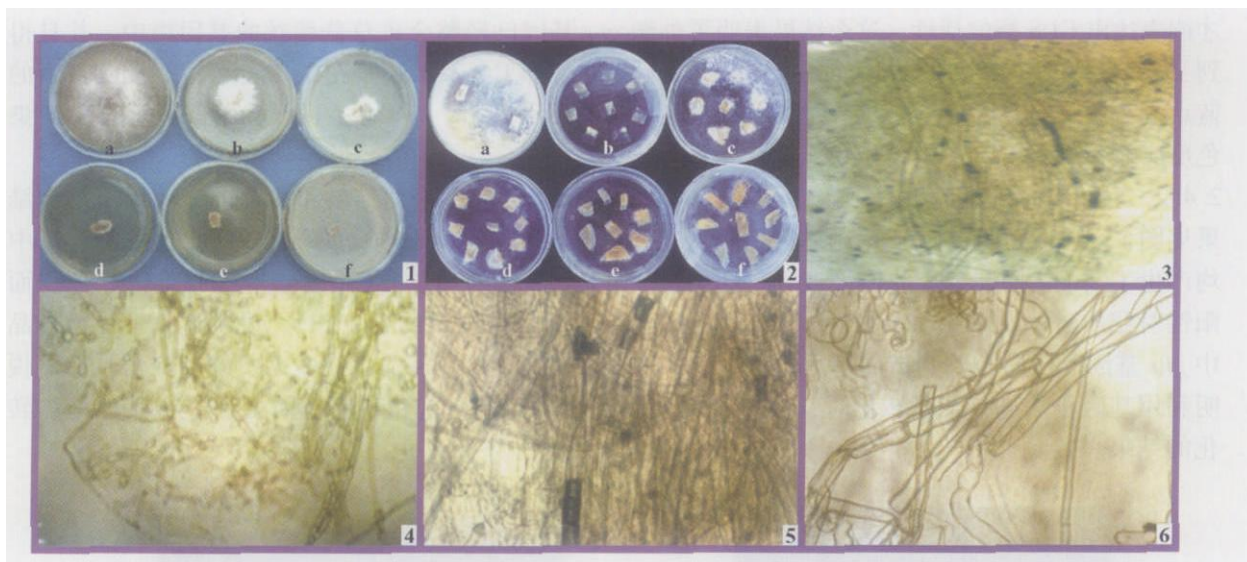
草菇转化子的出菇试验结果表明，转化子和对照一样能正常形成子实体。子实体经组织分离后获得的菌丝体经 GUS显色反应结果表明：转化子的菌丝体在显微镜下可以明显看到 GUS酶与底物 X-gluc水解生成的蓝色物质（图版，5），而非转化子对照没有任何蓝斑出现（图版，6）。这充分说明了外源 *gus*基因已经稳定地整合进了草菇的基因组中，且能在菌丝体中稳定表达。

3 讨论

利用基因枪介导法转化，外植体的选择和制备是关键性步骤之一。本研究中，曾以液体培养基培养的小菌球为外植体，没有筛选到转化子。这可能是由于小菌球的菌丝过于微细，致使基因枪轰击的有效性差。

本研究所获得的草菇转化子 Southern杂交结果显示，8个转化子出现多种杂交带型，这说明 *gus*基因以不同的拷贝数整合在草菇基因组的不同位点中。这一结果与目前绝大多数转基因植物和转基因

丝状真菌的结果^[10~12]相一致。据报道,在植物转化过程中,无论是农杆菌介导还是基因枪转化,都会启动细胞的伤害反应,从而激发宿主中的特异性核酸酶和 DNA 修复酶等宿主基因组的监视系统,以维持基因组的完整性^[13]。尤其是基因枪法,因为通过裸露 DNA 直接转化,外源 DNA 更易受到宿主监视系统的干扰,形成复杂的转基因重排,一般在基因组中会产生 1~20 个转基因拷贝^[13]。本研究的结果与这相类似,在 8 个转基因材料中 *gus* 基因的拷贝数均在 2 个拷贝以上。



图版说明: 1. 草菇菌株 V1308 对潮霉素的敏感性测定 (a~f 培养基的潮霉素含量分别为 0、45、55、65、75、85 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。2. 草菇菌株 V1308 转化子在固体选择培养基上的筛选 (a 对照, 培养基不含潮霉素; b~f 培养基潮霉素的含量均为 75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; b 微弹不包裹 DNA 的轰击对照; c T1, 靶距离为 6 cm, 轰击次数 1 次; d T4, 靶距离为 6 cm, 轰击次数 2 次; e T2, 靶距离为 9 cm, 轰击次数 1 次; f T3, 靶距离为 12 cm, 轰击次数 1 次)。3、4. 草菇菌丝 GUS 活性的组织化学检测 (32× 下染色; 3. 假定转化子 T1-1 菌丝的 GUS 检测结果; 4. 非转化子对照菌丝的 GUS 检测结果)。5、6. 草菇子实体组织分离长出菌丝的 GUS 检测结果 (5. 草菇转化子 T1-1 子实体组织分离长出的菌丝; 6. 非转化子对照子实体组织分离长出的菌丝)。

Explanation of plates: 1. The test of sensitivity of V1308 to the hygromycin (a - f The concentration of hygromycin was 0, 45, 55, 65, 75, 85 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively in the PDSA medium). 2. Screening of transformants of V1308 on the solid selective medium (a PDSA medium without hygromycin b - f Selective medium containing 75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ hygromycin; b Control, bombardment without DNA; c T1, 6 cm of target-shelf distance, bombardment once; d T4, 6 cm of target-shelf distance, bombardment twice; e T2, 9 cm of target-shelf distance, bombardment once; f T3, 12 cm of target-shelf distance, bombardment once). 3 and 4. GUS histochemical assay of straw mushroom mycelia (dying under 32×; 3. Transformant T1-1; 4. Non-transformant control). 5 and 6. GUS histochemical assay of straw mushroom mycelia derived from fruit-bodies (5. Transformant T1-1; 6. Non-transformant control).

参考文献:

- 郭丽琼, 陈守才, 林俊芳. 食用菌遗传转化研究进展. 食用菌学报, 2001, 8 (4): 47~53
Guo L Q, Chen S C, Lin J F. Research advance in genetic transformation of the edible fungi. Acta Edulis Fungi, 2001, 8 (4): 47~53 (in Chinese)
- Ogawa K, Yamazaki T, Hasebe T, Kajiwara S, Watanabe A, Asada Y, Shishido K. Molecular breeding of the basidiomycete *Coprinus cinereus* strains with high lignin-decolorization and -degradation activities using novel heterologous protein expression vectors. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49 (3): 285~289
- Sun L, Cai H Q, Xu W H, Hu Y H, Gao Y, Lin Z P. Efficient transformation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19: 383
- Jia J H, Buaswell J A, Peberdy J F. Transformation of the edible fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. Mycological Research, 1998, 102 (7): 876~880
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 49~56
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Translated by Jin D Y, Li M F. Beijing: Science Press, 1992. 49~56 (in Chinese)
- 郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 刘瑞瑞. 单酶切 cDNA-AFLP 改良法分离草菇冷诱导基因. 菌物学报, 2004, 23 (2): 241~247

- Guo L Q, Lin J F, Yang L Q, Liu R R. Isolation of cold induced genes by modified cDNA-AFLP with single enzyme digestion from *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 2004, 23 (2): 241 ~ 247 (in Chinese)
- 7 Steaven Harris A laboratory guide USA: Fungal DNA Mini-preparation, 2002 1 ~ 2
- 8 谢宝贵, 郭丽琼, 王家升, 陈 辉. 19个草菇菌株的品比试验. *食用菌*, 1996, (5): 6 ~ 7
- Xie B G, Guo L Q, Wang J S, Chen H. Variety compare of nineteen strains of straw mushroom. *Edible Fungi*, 1996, (5): 6 ~ 7 (in Chinese)
- 9 郑国扬, 廖汉泉. 中国草菇生产. 北京: 中国农业出版社, 2000. 182页
- Zheng G Y, Liao H Q. Cultivation of straw mushroom in China Beijing: China Agricultural Press, 2000. 182p (in Chinese)
- 10 van de Rhee M D, Graca P M A, Huizing H J, Mooibroek H. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* to hygromycin B resistance. *Molecular and General Genetics*, 1996, 250: 252 ~ 258
- 11 van de Rhee M D, Mendes O, Werten M W T, Huizing H J, Mooibroek H. Highly efficient homologous integration via tandem exo⁻1, 3-glucanase genes in the common mushroom, *Agaricus bisporus*. *Current Genetics*, 1996, 30: 166 ~ 173
- 12 Yanai K, Yonekura K, Usami H, Hirayama M, Kajiwara S, Yamazaki M, Shishido K, Adachi T. The integrative transformation of *Pleurotus ostreatus* using bialaphos resistance as a dominant selectable marker. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60 (3): 472 ~ 475
- 13 华志华, 朱雪峰, 林鸿生, 高振宇, 钱 前, 颜美仙, 黄大年. 基因枪转化获得的转基因水稻中外源基因整合与表达规律研究. *遗传学报*, 2001, 28 (11): 1012 ~ 1018
- Hua Z H, Zhu X F, Lin H S, Gao Z Y, Qian Q, Yan M X, Huang D N. Studies of the integration and expression of exogenes in transgenic rice obtained via particle bombardment transformation. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28 (11): 1012 ~ 1018 (in Chinese)

欢迎购阅下列新书

- | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 - 1 《英汉生物学词汇》(第二版) 99元 | 1 - 57 《微注射和转基因实验指南》66元 | 1 - 80 《耐盐植物研究》108元 |
| 1 - 7 《PCR技术实验指南》(译) 110元 | 1 - 58 《真核生物转录调控——概念、策略和方法》86元 | 1 - 81 《染色体带: 基因组的图型》32元 |
| 1 - 8 《植物生理与分子生物学》94元 | 1 - 59 《DNA与RNA基本操作技术》52元 | 1 - 82 《生物安全》68元 |
| 1 - 9 《汉英生物学词汇》106元 | 1 - 60 《蛋白质组学: 从序列到功能》50元 | 1 - 83 《生物芯片分析》100元 |
| 1 - 11 《蛋白质结构分析》(译) 46元 | 1 - 62 《植物基因工程》(第2版) 97元 | 1 - 84 《生物信息学: 方法与实践》47元 |
| 1 - 13 《蛋白质电泳实验技术》29元 | 1 - 63 《基因组》55元 | 1 - 85 《生物信息学中的计算机技术》(影印版) 56元 |
| 1 - 14 《分子遗传学》70元 | 1 - 64 《植物数量性状遗传体系》57元 | 1 - 86 《实用生物化学与分子生物学词典》86元 |
| 1 - 17 《植物分子遗传学》(第二版) 88元 | 1 - 65 《体外培养的原理与技术》165元 | 1 - 87 《数量遗传学》38元 |
| 1 - 22 《英汉化学化工词汇》(第四版) 110元 | 1 - 66 《PCR技术实验指南》(第二版)(影印版) 110元 | 1 - 88 《统计遗传学》67元 |
| 1 - 24 《精编分子生物学实验指南》(译) 123元 | 1 - 67 《RNA实验技术手册》75元 | 1 - 89 《探索基因组学、蛋白质组学和生物信息学》(附光盘) 67元 |
| 1 - 25 《植物分子生物学实验指南》(译) 52元 | 1 - 68 《蛋白质化学与蛋白质组学》85元 | 1 - 90 《现代细胞分子生物学技术》166元 |
| 1 - 26 《蛋白质纯化与鉴定实验指南》(译) 52元 | 1 - 69 《蛋白质与蛋白质组学实验指南》(影印版) 110元 | 1 - 91 《现代英汉生物工程词典》75元 |
| 1 - 27 《实用分子生物学方法手册》32元 | 1 - 70 《蛋白质组学: 理论与方法》53元 | 1 - 92 《植物成分功能》111元 |
| 1 - 31 《被子植物有性生殖图谱》96元 | 1 - 71 《分子酶学工程导论》56元 | 1 - 93 《植物分子育种》69元 |
| 1 - 32 《基因工程原理》(第二版) 上册 58元 | 1 - 72 《分子生物学实验室工作汉英图解指南》53元 | 1 - 94 《植物生物化学与分子生物学》(全彩色) 289元 |
| 1 - 33 《基因工程原理》(第二版) 下册 78元 | 1 - 73 《高级分子生物学要义》179元 | 1 - 95 《中国农作物及其野生近缘植物染色体图谱》203元 |
| 1 - 38 《植物生殖遗传学》30元 | 1 - 74 《高级植物分子生物学》85元 | 1 - 96 《中国园林花卉植物染色体图谱》251元 |
| 1 - 39 《蛋白质技术手册》33元 | 1 - 75 《基础生物化学》144元 | 1 - 97 《种子生理研究》124元 |
| 1 - 41 《英汉生物化学及分子生物学词典》88元 | 1 - 76 《基因及其表达》(第二版) 58元 | 1 - 98 《种子植物系统学》111元 |
| 1 - 43 《分子细胞生物学》78元 | 1 - 77 《进化生物技术 - 酶定向分子进化》45元 | 1 - 99 《种子植物形态解剖学导论》(第二版) 57元 |
| 1 - 44 《现代遗传学原理》77元 | 1 - 78 《景观生态学原理及应用》53元 | |
| 1 - 48 《细胞信号转导》(第三版) 55元 | 1 - 79 《抗体技术实验指南》46元 | |
| 1 - 50 《细胞实验指南》(译)(上、下) 244元 | | |
| 1 - 52 《分子克隆实验指南》(第三版) 187元 | | |
| 1 - 53 《生物信息学: 序列与基因组分析》82元 | | |
| 1 - 54 《生物化学技术原理及应用》(第三版) 45元 | | |
| 1 - 56 《分子生物学》89元 | | |

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12号《园艺学报》编辑部, 邮编: 100081。