

我国作物转基因方法研究进展

肖建红¹, 任志强^{1,2*}, 杨慧珍³, 卜华虎¹ (1. 山西省农业科学院现代农业研究中心, 山西太原 030031; 2. 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 山西太原 030031; 3. 山西省农业科学院作物科学研究所, 山西太原 030031)

摘要 综述了我国具有自主知识产权的转基因技术的现状, 总结了我国转基因技术研究和推广过程中所存在的问题, 提出了解决问题的对策, 并展望了我国转基因技术今后的研究方向。

关键词 植物; 转化方法; 进展; 知识产权; 问题; 对策

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)33-0008-04

Research Progress of Transgenic Crops in China

XIAO Jian-hong¹, REN Zhi-qiang^{1,2*}, YANG Hui-zhen³ et al (1. Research Center of Modern Agriculture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 2. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan, Shanxi 030031; 3. Institute of Crop Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract This article reviewed the status of transgenic technology with our own intellectual property rights, summarized the problems existing in transgenic technological research and promotion, put forward some countermeasures and prospected the research direction in the transgenic technology in China.

Key words Plant; Transformation method; Progress; Intellectual property rights; Problem; Counterplan

植物基因工程是指通过不同的方法将外源基因导入受体植株中, 使其产生某些特定的表型, 目前世界上利用转基因技术选育出抗除草剂、抗病虫害以及抗非生物逆境等作物品种, 并在多个国家进行推广和种植。自 20 世纪 80 年代植物基因工程诞生以来, 基因转化方法的研究进展、新的功能基因挖掘技术以及诸如 PCR 仪、基因测序分析仪、分子杂交箱、凝胶成像系统等检测设备的出现和不断更新, 为人们进行植物基因工程研究提供了诸多便利条件, 并因此取得了巨大成功和多重效益。植物基因工程的诞生, 得益于各学科理论知识和实验操作技能的飞速发展, 遗传学的进展展示了基因和环境是决定表型性状的主要因素, 基因是第一位的; 物理学的发展, 尤其是制造业技术的发展, 为人们进行基因操作和研究提供了先进的高精密的仪器设备; 分子生物学的诞生为人们整合诸学科知识和技术来为生物技术研究提供了理论保障。

目前, 我国转基因技术和转基因作物种植等方面相对落后, 自主产权的转基因技术、基因等相对较少, 国家也仅开放转基因棉花和番木瓜等作物种植, 三大农作物玉米、水稻、小麦以及主要油料作物大豆、油菜等都没有开放种植。随着转基因技术的不断发展、国际转基因作物种植面积不断扩大, 以及人口、资源和环境之间的矛盾不断深化, 发展转基因技术和推广转基因作物有利于提高我国农作物的产量、降低农药的使用量、降低成本, 促进我国粮食安全。笔者综述了具有我国自主知识产权的转基因技术的现状, 指出了我国转基因技术研究和推广过程中所存在的问题, 并提出了对策, 旨在为发展我国转基因作物提供技术支持。

1 国内拥有自主知识产权的植物转化技术

为了了解我国拥有自主知识产权的植物转化方法, 在中国专利库查询到 182 件与“转化植物”有关的专利, 输入“基因转化方法”, 得到 99 件与“植物基因”有关的专利, 输入“基因转移方法”, 查到 5 件与“植物转化”有关, 共计 288 件^[1]。目前也有多个转化方法未申请专利, 如 20 世纪 70 年代末, 我国科学家 Zhou 等^[2]首次提出的花粉管通道法、杨剑波等^[3]提出的低能离子束介导法等。还有与基因枪法、农杆菌介导、PEP 介导等有关的词条没有查找到。该研究仅对上述申请专利的 288 件专利和未申请专利的 2 件专利作为研究对象, 特别是对花粉管通道法等转化技术的研究进展予以叙述和分析, 寻找缺陷和不足, 并提出一些对策。

290 件专利技术的分布年限为 1978—2015 年, 包括目前仍然有效的专利 77 件(包括花粉管通道法和低能离子束介导法), 授权后失效的专利 49 件, 未授权失效专利 89 件, 公开的 5 件, 正在实质审查的 66 件(表 1)。

表 1 所列举转化方法涉及到的植物有大豆、玉米、水稻、棉花、花生、花卉、木本植物等, 申请人涉及科研单位、大专院校和个人等, 尤以各个大学和北京的专利件数较多, 个人申请专利的仅有 2 例。发明人多为老师、科研人员和个人。按转化对象划分这些专利: 植物 50 余件, 大豆 30 件, 水稻 19 件, 等等。后文中提到的各个作物的转化方法件数不包括上述的针对植物为转化对象的绝大多数专利, 只涉及到以该作物作为转化对象的转化方法, 包括花粉管通道法在内。

从受理专利件数上分析, 1979—2002 年每年仅受理 1~4 件, 多数年份为 0 件, 即便是有专利受理的年份中, 多数只发生 1 件受理事件。2003—2010 年呈不间断上升趋势, 最多 2010 年达到 46 件, 随后至 2015 年, 又呈现下降趋势, 2015 年仅有 30 件。

从专利内容上看, 绝大多数专利基本上是对现有植物转化技术的改良, 申请者的目的在于保护转化的材料而不是方

基金项目 山西省重点研发计划(指南)项目(2016. 3D221002-3); 山西省农业科学院种业发展专项。

作者简介 肖建红(1981—), 男, 山西朔州人, 助理研究员, 从事玉米遗传育种及资源创新研究。* 通讯作者, 研究员, 从事玉米遗传研究。

收稿日期 2017-09-29

法本身,所以在转化研究方面被应用的并不是很多。故该研究多以花粉管通道法等几个重点转化方法予以讨论。

表 1 1979—2015 年国内有关植物转基因方法受理专利状态

Table 1 The status of Chinese provisional patents about plant transgene methods from 1979 to 2015

年份 Year	专利件数 Patent count	专利目前状态 The status of Chinese provisional patents at present				
		有效 Valid patents	授权后失效 Invalid patents with authority	未授权失效 Invalid patents without authority	公开 Published patents	实质审查 Substantive examination
1979	1	1				
1991	1			1		
1994	1	1				
1995	1			1		
1997	2		1	1		
1998	1			1		
1999	4		2	2		
2000	1			1		
2001	2		2			
2002	1		1			
2003	5		2	3		
2004	9	2	3	4		
2005	7		3	4		
2006	2		1	1		
2007	14	3	9	2		
2008	18	3	9	6		
2009	10	5	2	3		
2010	46	14	10	22		
2011	45	19	4	17		5
2012	27	16		10		1
2013	37	12		10	2	13
2014	25	1			1	21
2015	30				2	26
总计 Total	290	77	49	89	5	70

2 与专利有关的一些重大科研进展和取得的成就

评价一个品种品质的好坏、产量的高低以及所取得的经济效益,主要取决于该作物在新品种培育方面新思路、新技术的开发。新品种的贡献率可作为一个国家农业生产的整体发展水平的判断指标之一。

常规育种技术虽然对农业生产做出了巨大贡献,但由于其受到育种资源匮乏等影响,发展潜力受限。应用植物转基因技术,可以解决这个难题,尤其是常规育种技术与生物技术的有机结合,使得育种技术和效率达到了事半功倍的效果。

1994 年我国转基因抗虫棉花研发取得突破性进展,1996 年进入产业化,年种植面积在 300 万 hm^2 以上,2013 年最多达到 420 万 hm^2 ,占全国种植面积的 90%;转基因抗病毒番木瓜于 2006 年获得安全证书并进入产业化,可以说是拯救了我国的木瓜产业;转基因抗虫、抗除草剂水稻也于 2009 和 2015 年先后 2 次获得安全证书;转基因抗虫烟草、转基因矮牵牛花、转基因抗病毒番茄、甜椒等的研发也有很大进展。

至今,我国转基因植物新品种的研发和产业化取得了巨大成就,特别是在转基因棉花、转基因水稻、转基因玉米等的新品种研发方面具有世界领先水平,据中国科学院遗传与发育生物学研究所朱桢研究员介绍,我国已具备产业化的转基因作物新品种约有 20 个,但与研发突飞猛进的势头相反,我

国转基因作物产业化步伐相对较慢,目前只有转基因抗虫棉花、抗病毒番木瓜、抗病毒番茄等进入产业化阶段,而且只有转基因棉花和番木瓜种植面积和区域相对较大,合计年播种面积也仅有三四百万公顷。其他转基因作物的种植力度还太小。下面介绍几种常用的植物转化方法。

2.1 花粉管通道法 是由我国科学家 Zhou 等^[2]于 20 世纪 70 年代末提出的一种思路,她提出在常规远缘杂交中存在着 DNA 片段杂交的假设,认为在分子水平上,远缘杂交能够取得成功大多是由于这种 DNA 片段杂交的结果,并明确这是染色体水平以下的遗传分子的杂交。根据这一论述,就为花粉管通道法的诞生创造了理论条件。随后国内外多人采用花粉管通道法转化植物,我国最早在棉花上,随后在水稻、小麦、大豆上用该转化方法得到了转化后代^[4-6]。特别是目前在我国推广应用最广的转基因抗虫棉花就是应用该转化技术得到的。

目前,人们已经利用花粉管道法培育出多个作物品种:导入长穗冰草 DNA 培育出抗旱耐盐小麦新品系济南 18^[7],导入高粱 DNA 选育出抗条锈白粒小麦新品系^[8],导入海藻糖合酶基因玉米自交系中,筛选抗旱种质资源^[9];1995 年,雷勃钧等^[10]用花粉管通道法将野生大豆总 DNA 导入栽培大豆品种,获得优质高蛋白和双大大豆新品系,并用该技术将野生大豆 DNA 直接导入受体栽培“大豆 6296-3”,育成我国第一个利用花粉管通道法获得的大豆品种“黑生 101”,其蛋白质含量超过 45%,产量比标准品种提高 9.8%;刘昭军

等^[11]采用花粉管通道介导法将含有 *bar* 基因的 pPTN140 质粒 DNA 导入 8 个黑龙江省大豆主栽品种(系),经 2 次 Basta 除草剂筛选后,共获得 3 个品种的除草剂抗性植株 8 株。马盾等^[12-13]利用花粉管通道法将 *Bt* 等基因分别导入新疆推广棉花品种,获得了抗虫等的转基因植株,目的基因能够稳定遗传和表达;刘方等^[14]将 *Bt* 基因采用花粉管通道法导入“泗棉 3 号”“辽棉 15”等,获得了抗虫转基因植株及其后代株系。

2.2 低能离子束介导法 该法是由杨剑波等^[3]于 1994 年首次提出的植物转基因方法,他们根据荷能离子流具有射程的可控性和集束性的特点以及低能离子束的溅射可能使植物细胞壁刻蚀变薄并产生局部穿孔的理论发展了这种新的植物转基因方法,并首次应用该法转化水稻,获得了转基因植株及后代株系,证明目的基因可以稳定遗传。

李莉^[15]于 2003 年利用低能离子束介导海藻糖-6-磷酸合成酶转入“豫麦 52 号”,成功获得转基因植株,植株在受干旱胁迫时明显优于对照植株,为培育抗旱耐盐小麦新品种提高亲本材料。裴收伟等^[16]利用离子束介导法将“豫豆 23 号”基因组 DNA 导入小麦品种“中育 5 号”和“淮阴 9628”,获得 114 株高蛋白含量植株以及 16 个稳定遗传的 T₃ 代株系,改良小麦品质。

杨剑波等^[3]利用离子束介导法将 *hPh* 基因成功导入水稻悬浮细胞,获得能够稳定遗传的水稻植株;李红^[17]利用离子束介导法将荧光蛋白 GFP 导入水稻成熟胚,获得转化成功的水稻植株;程备久等^[18]、郑卫红等^[19]、宋道军等^[20]又将离子束介导法成功应用于棉花、烟草、西瓜等植物转基因,并获得转基因植株。

2.3 超声波诱导植物组织基因转移方法 许宁等^[21]根据超声波的空化作用理论于 1990 年首次提出该法,并采用该法将 *CaMV35S-GUS* 基因和 *Pnos-NPTII* 基因导入小麦幼胚形成的愈伤组织中,获得了转化植株。该法于 1997 年被申请国家发明专利^[22](专利号:97111924)。

超声波辅助花粉介导植物转基因方法^[23](ZL201110041484.0)系由山西省农业科学院生物技术研究中心于 21 世纪初发明的一种植物基因转化方法,简称花粉介导法,他们应用该法在玉米、花生、油菜、大豆等作物遗传转化上均获得成功。花粉介导法是从质粒中提取的含目的基因的 DNA 片段为基因供体,以植物的花粉作为受体,在通气和低温状态下,于保证花粉活力为主要目的的等渗溶液(5%~50%蔗糖溶液)中使花粉与外源 DNA 混合,辅助于超声波处理,然后将处理花粉授到待转化植株的柱头上,并在籽粒成熟时予以收获。

近年来经不断探索,超声波介导花粉转化法^[24]逐步发展成为新的实用性强的玉米转基因技术。该法已在谷子^[25]、花生^[26]、油菜^[27]、苹果^[28]等作物上成功获得转基因植株。

南芝润等^[29]采用超声波介导花粉转化方法将 *Cry1Ac* 基因导入玉米自交系材料昌 7-2,对获得的转化后代进行草铵

膦抗性筛选、PCR 鉴定和抗虫分析,筛选出 9 个高抗玉米螟的转基因株系,为玉米抗虫育种提供种质资源。郭天璐等^[30]也利用超声波辅助花粉介导法将花青素基因 *NtAn2* 导入玉米自交系郑 58 中,为非抗性筛选标记转基因提供新的思路。

3 我国转基因技术研究和推广过程中存在的问题

我国的植物转基因研究虽然取得了很大进展,而且一些转基因作物的产业化也赢得了可观的经济效益、社会效益和环境效益,但与发达国家比较仍有很大差距,存在不少问题。从研发方面看,主要问题有:目标性不强,研发单位各自为政,没有一个统一的大方向,导致研发内容多,研发领域广,但真正出来具有使用价值的东西少;我国存在的研产配合乏力问题引发真正有价值的东西无法及时实行产业化,或研发的东西不符合生产需求,导致国外相关技术和产品入侵国内。此外,政策不到位、社会舆论不向好、研发与管理部部门的相互缺少配合和应付也使得我国转基因农产品产业化举步维艰。下面就植物转化技术方面存在的问题予以叙述。

3.1 拥有自主知识产权的专利数目不多,差距明显 单美玉等^[31]曾以转基因玉米所涉专利为例,全球专利件数 3 503 件,按各国拥有的专利件数排队,前 4 位依次为美国、中国、德国和瑞士,但从各国专利数目绝对值来看,美国 2 388 件,中国 460 件,德国 170 件,瑞士 70 件。排在第二位的中国专利数只占美国专利数的 19.3%。涉及苏云金杀虫晶体蛋白的专利,全球共有 6 274 件,国外 5 家公司就占其 70% 以上,涉及 EPSPS 基因的专利有 1 327 项,这 5 家公司约占其 63.4%。就转基因品种专利而言,仅美国孟山都公司就控制全球 50% 以上的转基因抗虫品种和约 70% 的抗草甘膦品种^[32]。虽然上述事例没有涉及到植物转基因方法的研究,但就整体形势而言,我国拥有的转基因方法的专利的绝对数目和其在全球相应专利数目中所占比例基本一致。上述数据足已显现我国在转基因研究方面与世界发达国家间的差距。

3.2 专利内涵不多,质量不高 纵观我国涉植物转基因方法的专利内容,以植物为转化对象的有 50 件,以大豆为转化对象的有 30 件,以水稻为转化对象的有 19 件。有些专利看上去并无什么具体内涵,只是对已有转化方法进行些微改动,但申请了专利保护,结果只能是无效专利;有些专利可以用在大豆上,也可以用在小麦甚至其他作物上,但以各种作物为转化对象分别申请专利,虽然研究团队可能不同,但重复劳动甚至抄袭的现象也的确存在。整体上看,大部分申请专利的转化方法技术含量不高、重复性太大,基本上是对现有转化方法的改良,没有突破农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法等转化方法的技术壁垒。

造成上述局面的原因很多,可归纳为:①研发团队众多、配合不力。承担各级科研任务的单位主要是科研单位和高等学校,单位大小不一、数目众多,由于缺少统一的管理措施和监督体系,研发团队之间缺乏自发的相互协调和配合。②企业单位缺少科研力量,或者企业单位的科研力量重点不

是科研,而是对产业化过程的研发,造成科研与生产脱钩,新技术无法快速变成生产力,科研人员又无法及时准确得到生产需求信息,导致研非所用,用非所研,企业因看不到科学技术变成生产力的效益而不愿投资科研,科研因经费紧张无法维持,结果便是无法调动各自的积极性和主动性,更无法相互合作,相互扶持,协力创新,共同进步。这便是我国科研-开发-产销-研发不能紧密衔接的原因之一,即研发进展较快,而开发进度则相对缓慢,直接影响着我国农业生产的快速、稳步发展。③经费来源少、数量有限。科研经费主要来源于国家的资助,虽然国家每年拨付的科研经费数目不小,2005年120多亿,2010年约260亿,但分散到众多的研发单位也是很少,各个单位科研经费仍是处于能够维持状态。④政策保护和鼓励不力。缺少对科研成果有效保护的政策,或者是政策不完善,一些鼓励科研人员与企业联合的政策不够规范和具体。⑤专利权申请门槛较低,审核也不够严谨,结果只看数量,不求质量。

4 建议及对策

4.1 健全和完善国家相关政策及制度的制定 国家应该完善与科研管理和监督有关的政策制度,制度不仅应符合国情,还应具有可操作性。例如,应要求各行业的科研项目指南具有一定的阶段性重点,对于这些重点项目重点扶持、重点资助,政策还应鼓励科研人员积极向上、奋力拼搏、科技创新等,对于有重大贡献者应有重大奖励,同时鼓励科研人员合理流动,充分发挥自己的才能和主动性。政策还应要求科研与成果转化工作的对接,建立市场管理体制。

4.2 提高科研人员福利待遇,创造良好的科研氛围 国家要在考虑提高科研人员福利待遇的同时,以政策方式减轻这些人员的思想压力和社会压力,从而更有利于科研人员充分发挥其主观能动性,更好地开展科研工作。另外,对于科研经费,国家应有合理合法的审核制度和监督制度。建议国家在制定相应财务管理制度时,应该规定对从事科研的单位财务管理能力进行调查,以信用等级来划分,按信用等级拨付项目经费。

4.3 构建攻关团队,集中精力和财力攻关创新 目前我国的转基因重大专项等项目的实施方案很好,指定或选拔学科带头人主持项目,主持人自己组建科研团队,从中央级科研机构到省市级科研单位,符合条件就可以开展,而且这个团队内人人能够通力合作、互通信息、相互帮助、相互促进、相互监督,团队人员既明确了自己的责任又避免了重复劳动带来的人力、物力和财力浪费。各个团队之间由于所负责的重点不同,在合理竞争、互相促进、力求出新的前提下,也避免了项目重复所带来的各种浪费。构建攻关团队,一是可以集中有限的人力、物力和财力,对一些重大科研难题进行科研攻关;二是大家相互监督,杜绝一些科研单位和科研人员的懒、散、慢现象;三是强大团结的科研团队具有一定的竞争实力,可以使我国科研团队通过各种组合或结合参与国际竞争,确保国内科学研究水平立足于世界先进国家前列。

4.4 科企联合,协力创新 科企联合,即科研单位与种业企

业的联合。在国内,科研单位主要负责对新品种、新技术的研发,种业企业主要负责新品种推广应用等,同属产业链中的重要组成部分。科企联合的形式有:①可以互派科研人员,针对要解决的问题进行切实的合作研发,经费各自负责;②企业间通过合作或兼并,强大自己的经济实力,向自己的科研团队或现有科研团队提出自己的研发要求,支付相关研发费用;③科研人员(包括企业和事业单位)可以合理流动,选择自己认为可以发挥特长的单位开展工作;④科研单位与企业直接合作,从科研到开发,人人有责、人人负责。科企联合的优势:一是可以缓解科研经费紧张的局面,用更多的经费进行科技研发和创新;二是借鉴相互的优势和相互监督,加速科研和开发进程,使科研成果能够及时转化成生产力,种业企业从中取得更多实惠,而科研单位的经费也因此能得到保证;三是研发和开发的目标明确,符合生产需求,避免了研非所用、用非所研现象的出现;四是增强各自实力,有利于在国际竞争中立于不败之地甚至是优势地位;五是科企联合可使产业链更加合理、快速运转,提升我国产业持续发展的能力和潜力。

4.5 建立科研成果共享平台 重复劳动的重要原因之一是信息互通不够。为解决这个问题,建议政府建立成果共享平台,当然,这也需要人们树立科技成果共享和国内保密的意识。申请项目名称和申报书需要保密的可以只写明进展顺利或无进展等字样。对于可以共享的专利技术,建议根据专利申请者的意愿和专利内容的实质,将发明专利等分成几个等级,如1级为可能具有国际影响的专利,2级为可能具有国内影响的专利,3级为一般普通专利等,否则无法体现专利的真实水平和内涵,也不利于提高大家的积极性和创新意识。对于不同等级的专利应用有不同的保护时限和保护强度。建议考虑设立专门的专利奖励基金,对于有重大国际影响和贡献的专利应给予适当奖励,间接树立科技人员的创新欲望和信心。

5 展望

GMOCcompass 数据统计结果显示,截至2013年全球种植转基因作物面积1.74亿 hm^2 ,近些年还在不断增长,美国种植面积达0.70亿 hm^2 ,巴西0.40亿 hm^2 ,阿根廷0.24亿 hm^2 ,中国仅420万 hm^2 ,我国转基因作物种植面积和品种远远低于其他农业出口大国。转基因大豆种植比率最高达全球大豆种植的79%,转油菜种植的24%,我国开发转基因棉花的种植占我国棉花种植面积的90%。

转基因作物在抗除草剂、抗病虫害、抗逆及品质改良方面都有较高的优势,提供优良的种质资源,良种对我国粮食增产的贡献率为40%,而美国在20世纪就达60%^[33]。基因功能验证、转基因方法开发等均是培育良种服务的。为了解我国转基因技术的发展及成就,能够及时把握技术信息、掌握时代发展命脉,有建设性地引导我国植物转基因技术及其转化产品的产业化的稳步前进,是我国科技工作者所追求的主要目标。

酶活性很高,菌丝营养生长没有结束,不能扭结形成原基,未具备产实的内在条件,即使有合适的外界环境,也不能出菇。具体原因还有待进一步研究。

该研究结果显示,能形成原基的处理组蛋白酶活性都呈现不断上升的趋势,与前人的描述一致^[15]。蛋白酶活性的升高为新物质的合成积累氮源,当积累到一定程度时,诱导原基发生。而不能形成原基的处理组蛋白酶活性无明显变化,一直处于较低水平,说明该处理缺乏诱导蛋白酶应答反应的条件,缺乏物质的转换和积累,菌丝徒长,一直维持在营养生长阶段,因而难以形成原基,这与张乐^[16]的研究结果一致。

研究表明,淀粉酶在食用菌菌丝生长阶段高,在子实体后期降低^[17],说明在栽培前期大部分淀粉类物质被分解利用,在栽培后期则利用较少。该研究发现,5种处理的淀粉酶在前期阶段活性较低,从第9天起能形成原基的处理组淀粉酶活性快速上升。这可能是因为在培养料中的不需要用到淀粉酶起分解作用的小分子物质在菌丝恢复期营养生长阶段被消化完后,需要进一步分解淀粉类大分子物质以满足菌丝体不断成长、扭结和形成原基的营养需求。而瓶子搔菌后正放2和倒扣2淀粉酶活性在整个阶段变化不明显,推测其在第21天未能形成原基可能与淀粉酶活性较低有密切关系。而赵亚东^[17]对秀珍菇胞外酶的研究表明,胞外淀粉酶活性的高低与秀珍菇现蕾的早晚不相关。

参考文献

[1] 莫美华,张倩勉. 巨大口蘑子实体抽提物抑菌活性研究[J]. 食品工业

科技,2009,30(5):151-153.

- [2] 陈德荣,卢玉文,陈雪凤,等. 利用工业废弃物剑麻渣栽培食用菌夏秀玲技术研究[J]. 现代农业科技,2013(15):88-89.
- [3] 李碧琼,陈政明,林俊扬,等. 袋栽金福菇高产栽培技术[J]. 食用菌,2007,29(3):53-54.
- [4] 沈敏,李文生,丁伟华. 杏鲍菇工厂化栽培技术研究与应[J]. 安徽农学通报,2010,16(11):138-139.
- [5] 陈美元. 双孢蘑菇子实体原基与菇蕾蛋白质表达变化分析[J]. 食用菌学报,2012,19(3):15-20.
- [6] SAEKI N, TAKEDA H, TANESAKA E, et al. Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme detection by enzymatic staining on native-PAGE[J]. Mycoscience, 2011, 52(2):132-136.
- [7] 曹春蕾,崔宝凯,秦向敏. 桑木层孔菌液体培养过程中几种胞外酶活性的变化[J]. 菌物学报,2011,30(2):275-280.
- [8] 司静,崔宝凯,贺帅,等. 微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(5):736-741.
- [9] 黄建春,蒋其根,陈珏,等. 大棚栽培金福菇技术[J]. 食用菌,2010,32(5):46-47.
- [10] 王庆武,安秀荣,唐丽娜,等. 金福菇袋栽高产技术[J]. 食用菌,2013(1):39-40.
- [11] 魏要武,莫美华,陈东梅,等. 金属离子对巨大口蘑褐变相关酶活力的影响[J]. 食品科技,2015,40(7):55-59.
- [12] 黄卓烈. 生物化学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [13] YOSHIDA H. Chemistry of lacquer (Urushi); Part 1 [J]. J Chem Soc, 1883, 3:472-486.
- [14] 张国良. 低温处理对阿魏菇菌丝体生理生化及营养积累的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2013.
- [15] 冯作山,邹亚杰,胡清秀. 白灵侧耳栽培过程中胞外酶和呼吸酶活及离子流速的研究[J]. 菌物学报,2014,33(2):341-354.
- [16] 张乐. 低温诱导对阿魏侧耳原基形成相关生理生化影响的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [17] 赵亚东. 不同培养料对秀珍菇生长发育、产量及胞外酶的影响[D]. 南京:南京农业大学,2011.

(上接第11页)

参考文献

- [1] 佰腾专利检索系统. 佰腾专利检索—中国专利库[DB/OL]. (2016-01-23) [2017-08-20]. <http://so.baiten.cn/>.
- [2] ZHOU G Y, WENG J, ZENG Y S, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Methods in enzymology, 1983, 101(6):433-481.
- [3] 杨剑波,吴李君,吴家道,等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株[J]. 科学通报,1994,39(16):1530-1534.
- [4] 段晓岚,陈善葆. 外源 DNA 导入水稻引起性状变异[J]. 中国农业科学,1985,18(3):6-11.
- [5] 黄骏骥,钱思颖,刘桂玲,等. 外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状的变异[J]. 遗传,1981,8(1):56-62.
- [6] 曾君祉,王东江,吴有强,等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 中国科学(B辑),1993,23(3):256-262.
- [7] 黄承彦,楚秀生,杨平平,等. 外源 DNA 导入技术培育抗旱耐盐小麦新品种[J]. 山东农业科学,2000(4):4-6.
- [8] 倪建福,周文麟,王亚馥. 高粱 NDA 导入小麦选育出抗条锈白粒新品系[J]. 甘肃农业科技,1994(7):10-11.
- [9] 董春林,张明义,林忠平,等. 用花粉管通道法将抗旱耐盐基因导入玉米自交系的研究[J]. 山西农业科学,2011,39(5):392-394.
- [10] 雷勃钧,钱华,李希臣,等. 通过直接引入外源 DNA 育成高产、优质、高蛋白大豆新品种黑星 101[J]. 作物学报,2000,26(6):725-730.
- [11] 刘昭军,李铁,刘丽艳,等. 花粉管通道介导的抗除草剂基因(*bar*)对大豆的遗传转化[J]. 大豆科学,2007,27(3):310-314.
- [12] 马盾,黄乐平,黄全生,等. 花粉管通道法在棉花转基因上的应用[J]. 新疆农业科学,2004,41(1):29-30.
- [13] 马盾,黄乐平,周小云,等. 花粉管通道法转基因棉花后代特性的研究[J]. 新疆农业科学,2007,44(S3):105-107.
- [14] 刘方,王坤波,宋国立,等. 花粉管通道法转基因棉花材料的获得[J]. 中国棉花,2008,35(8):16.
- [15] 李莉. 离子束介导海藻糖合成酶基因转入小麦的抗旱性研究[D]. 郑州:郑州大学,2003.
- [16] 农收伟,秦广雅,余增亮,等. 离子束法导入大豆 DNA 小麦的蛋白质含量分析[J]. 中国农学通报,2010,26(18):71-74.

- [17] 李红. 低能离子束介导水稻转基因体系的研究[D]. 合肥:中国科学院等离子体物理研究所,1999.
- [18] 程备久,田秋元,李展,等. 离子注入法导入外源 DNA 引起陆地棉性状变异的研究[J]. 核农学报,1996,10(3):150-154.
- [19] 郑卫红,王瑜,余增亮. 低能离子束介导外源基因转化烟草的研究[J]. 激光生物学报,2000,9(4):241-245.
- [20] 宋道军,王浩波,杨坤,等. 离子束处理将外源基因导入西瓜研究初报[J]. 中国西瓜甜瓜,2001(2):2-3.
- [21] 许宁,赵南明,章力建,等. 超声诱导基因转移[J]. 生物物理学报,1990,6(2):281.
- [22] 许宁,赵南明,章力建,等. 超声波诱导植物组织基因转移方法: CN97111924.4[P]. 1998-05-06.
- [23] 孙毅,崔贵梅,郝曜山,等. 超声波辅助花粉介导植物转基因方法: CN102127567A[P]. 2011-07-20.
- [24] 孙毅,王景雪,崔贵梅. 超声波处理花粉介导植物基因转化方法: ZL99121152.9[P]. 2006-03-29.
- [25] 王节之,郝晓芳,郑向阳,等. 谷子花粉介导法转几丁质酶基因的研究[J]. 生物技术,2004,14(5):5-6.
- [26] 梁雪莲,郑奕雄,庄东红,等. 花生 CpTI 基因转化——花粉介导法[J]. 花生学报,2006,35(4):1-5.
- [27] 杜春芳,刘惠民,李朋波,等. 花粉介导法获得油菜转基因植株研究[J]. 作物学报,2006,32(5):749-754.
- [28] 曹秋芬,岳新丽,孟玉平,等. 超声波处理对苹果花粉介导转基因的影响[J]. 华北农学报,2005,20(2):16-18.
- [29] 南芝润,惠国强,罗琦,等. 超声波辅助花粉介导法获得转 *BtCry1Ac* 基因玉米的研究[J]. 黑龙江农业科学,2015(9):22-25.
- [30] 郭天璐,张欢欢,杜建中,等. 花粉介导的花青素调节基因 *NtAn2* 转化玉米研究[J]. 山西农业科学,2016,44(4):427-431,435.
- [31] 单美玉,王戴尊,李彩霞,等. 基于专利分析的转基因玉米发展态势分析[J]. 农业图书情报学刊,2015,27(12):5-10.
- [32] 张梦然. 全球转基因农作物发展现状与趋势[J]. 农家参谋(种业大观),2012(5):9-10.
- [33] 毛开云,陈大明,江洪波. 农作物生物育种产业化情况及发展趋势[J]. 生物产业技术,2013(2):51-57.