

转 *mtlD* 基因旱稻的耐盐性研究

李自超¹ 张新春¹ 张丽¹ 庄炳昌² 张承亮¹ 王国英³ 付永彩¹

(1. 中国农业大学 农业部作物基因组学与遗传改良重点实验室,北京市作物遗传改良实验室,北京 100094;
2. 吉林省农业科学院,吉林 公主岭 136100; 3. 中国农业大学 生物学院,北京 100094)

摘要 利用基因枪转化技术将来源于大肠杆菌的 *mtlD* (1-磷酸甘露醇脱氢酶) 基因导入旱稻。研究结果表明:旱稻愈伤组织的继代时间对抗性愈伤的筛选频率无明显影响;基因枪轰击后愈伤组织的恢复时间(7 d)较长时,潮霉素 B 质量浓度应适当提高。转基因植株及其后代的 PCR, dot blotting, southern blotting 和 northern blotting 检测表明, *mtlD* 基因已整合到旱稻基因组中,并且稳定表达。在含 1.0% (质量分数,下同) NaCl 的 MS 培养基上,转基因植株生长速率明显大于阴性对照;在含 0.75% NaCl 的盆中,转基因植株能够生长。盐分对转基因植株质膜的伤害减轻,Na⁺ 向地上部运输受抑,转基因植株的 Na⁺ 与 K⁺ 比率低于阴性对照。T₁ 代转基因旱稻耐盐和盐敏感以及抗潮霉素 B 和潮霉素 B 敏感的分离比例均大于 3:1,说明基因枪轰击为多拷贝转化。

关键词 旱稻; *mtlD* 基因; 耐盐性; 基因枪转化

中图分类号 S 511.9

文章编号 1007-4333(2004)06-0038-06

文献标识码 A

Expression of *mtlD* gene in transgenic upland rice leads to enhanced salt-tolerance

Li Zichao¹, Zhang Xinchun¹, Zhang Li¹, Zhuang Bingchang²,
Zhang Chengliang¹, Wang Guoying³, Fu Yongcai¹

(1. Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Crop Genetic Improvement of Beijing, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China; 3. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract *Escherichia coli mtlD* (mannitol-1-phosphate dehydrogenase) gene driven by the Actin1 promoter was successfully introduced into upland rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) by microprojectile bombardments. It was proved that short resuming time with low pressure or long resuming time (7 d) with high pressure were proper for selection. And subculture time of calli had no great effect on selection efficiency. PCR, dot blotting, southern blotting and northern blotting analyses showed that *mtlD* gene was integrated into upland rice genome and expressed normally in transgenic plants. Growth rate of transgenic plants were significantly higher than controls on MS medium containing 1% NaCl. Nontransgenic plants died after 35 d. Transgenic plants of T₁ progeny obtained an increasing tolerance against salt stress compared with nontransgenic ones in salinized pots (0.75% NaCl). Transgenic plants had less membrane damage and a low Na⁺ to K⁺ ratio than controls under salt-stress. Ratios of salt-tolerant to salt-sensitive plants and hygromycin-resistant to hygromycin-sensitive plants of T₁ progeny were larger than 3:1. It suggested that multicopies of target gene were transferred into the accepted plant by microprojectile bombardments.

Key words upland rice; *mtlD* gene; salt-tolerance; microprojectile bombardments

全球由于干旱、不合理的灌溉以及化肥的过度使用,使得盐碱地面积正不断增加,给农作物生产造成重大损失。我国的一些水稻种植区由于缺水,已无法延续传统的稻作栽培模式,但是这些地区的盐

收稿日期: 2004-06-29

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-13-10)和 863 项目(2004AA211190)资助

作者简介: 李自超,教授,博士生导师,主要从事稻种资源和功能基因组学、旱稻抗旱机理和分子育种研究工作, E-mail: lizichao@cau.edu.cn

碱化也不适合其他作物的生长,而发展节水稻作或扩大旱稻生产规模是可行的途径,特别是将耐盐基因转入旱稻中可以有效地解决这一难题。

据报道 *mtlD* (1-磷酸甘露醇脱氢酶) 基因已经被转化到烟草、杨树和拟南芥等植物中,使其耐盐性都有一定的增强^[1~4]。王慧中等已将 *mtlD/gutD* 共价基因转入水稻基因组中^[5]。*Bar* 基因也已被转入旱稻 (*Oryza sativa* L. var. *japonica*) 中^[6,7],但目前还没有将 *mtlD* 等耐盐、耐旱基因转入旱稻的报道。本研究利用基因枪转化技术将 *mtlD* 基因导入旱稻,以期提高旱稻的耐盐、耐旱性,并推动抗旱节水稻作生产的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以旱稻 277、旱稻 297 和旱稻 502 成熟胚诱导的胚性愈伤组织为受体材料。含 *mtlD* 基因的 pMH 质粒 (图 1) 由中国农业大学生物学院王国英教授惠赠。

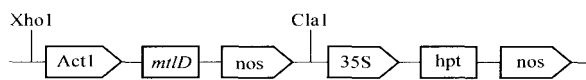


图 1 pMH 质粒结构图谱

Fig. 1 Structure of vector pMH

1.2 试验方法

1) 转化和培养。愈伤组织诱导和继代采用 NB 培养基^[8],略有改动。采用 Bio-Rad 公司的 PSD-1000/He 型气动势基因枪转化,金粉制备及轰击方法参照基因枪操作手册进行。将受体愈伤材料放入含 0.5 mol L^{-1} 甘露醇和山梨醇 (1:1) 的 NB 培养基进行高渗处理 4~6 h,基因枪轰击后继续在高渗培养基中处理 16 h。然后直接转入或在 NB 培养基上恢复 7 d 后转入含不同潮霉素 B (30, 50 和 70 mg L^{-1}) 的 NB 筛选培养基上,记录抗性愈伤克隆数。

旱稻愈伤组织对潮霉素 B 的敏感性试验在不同质量浓度潮霉素 B (0, 10, 30, 50 和 70 mg L^{-1}) 的继代培养基上生长 30 d,检测愈伤组织生长情况^[9]。

对抗性愈伤的筛选,利用具有不同继代时间 (少于 2 个月, 2~3 个月, 大于 3 个月) 的胚性愈伤组织为轰击受体,恢复 7 d 后放于含 50 mg L^{-1} 潮霉素 B 的 NB 培养基上筛选,记录抗性愈伤克隆数,抗性愈伤筛选率 = 抗性克隆数 / 轰击愈伤总数 $\times 100\%$ 。

2) 植株再生。再生转化和未转化植株都转入含

筛选剂的分化培养基中。当绿芽长到 2~3 cm 时,从愈伤上分离出来,转入生根培养基,最后将 T_0 代转基因植株移栽到土壤中待开花结出 T_1 代种子,做进一步分析。

3) 分子检测。从再生的转基因植株和 T_1 代植株的叶片中提取 DNA,进行 PCR 扩增和 southern 杂交。采用 Promega 的总 RNA 提取试剂盒 RNA-gents Total RNA Isolation System Kit 提取斑点杂交呈阳性的再生植株的总 RNA,进行 northern 杂交。

PCR 扩增引物:

5' TCCA TGAAAGCAATTACATTTTGGCG 3'

5' GCAATTATTGCAATTGCTTTTATAAAGC 3'

扩增体积为 $25 \mu\text{L}$,扩增程序为: 94°C , 5 min; 94°C , 1 min; 57°C , 1 min; 72°C , 1.5 min; 共 30 个循环;然后 72°C , 10 min, 体积分数为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳。计算转化率 = *mtlD* 基因 PCR 阳性株数 / 轰击愈伤组织数 $\times 100\%$

southern 杂交和 northern 杂交:总 DNA 经 *Xho*—*Cla* 酶切,总 RNA 经甲醛变性电泳,进行 Northern 检测。采用 Amersham Life Science 生产的 ECL 荧光杂交试剂盒进行 southern 杂交和 northern 杂交, *Xho* / *Cla* 酶解 pMH 质粒后,回收的 2.8kb 的含 actin1 启动子、*mtlD* 基因和 nos 终止子的 DNA 片断作为标记探针。

4) 耐盐性检测。 T_1 代转基因旱稻种子剥壳消毒接于 MS + 1.0% NaCl 的培养基上,生长 30 d 后测定单株的生长量,计算单株每天增长的毫克数,以此值表示单株生长速率,同时设不加 NaCl 的对照;阴性对照的处理同阳性材料。 T_1 代转基因植株 4 叶期在含 0.5% (质量分数,下同) 和 0.75% NaCl 盆中进行耐盐性试验^[5],观察盐胁迫下的植株生长状况。从进行 0.5% 的 NaCl 胁迫处理过的 T_1 代转基因植株上取叶片,用 DDS-11A 型电导率仪测定叶片的相对电导率^[10]。0.5% 的 NaCl 胁迫处理过的 T_1 代转基因植株 75 $^\circ\text{C}$ 烘干,叶片和根分别放于 $m(\text{HNO}_3) : m(\text{HClO}_4) = 5 : 1$ 的混合液中煮沸至溶解,测定 Na^+ 和 K^+ 含量。

5) T_1 代转基因旱稻的遗传检测。 T_1 代转基因旱稻预培养正常萌动的种子,放于含 1.0% NaCl 或 50 mg L^{-1} 潮霉素 B 的 MS 培养基上 30 d 后计算存活数 / 死亡数。所有筛选呈阳性的植株再经 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 早稻愈伤组织对潮霉素 B 的敏感性

试验所用 3 个品种的愈伤组织对潮霉素 B 的抗性略有不同,30 mg L⁻¹潮霉素 B 能够大大抑制愈伤组织的生长,50 mg L⁻¹潮霉素 B 则使愈伤组织的生长几乎完全被抑制,但早稻 502 筛选频率较低。

2.2 早稻愈伤组织的继代时间对筛选频率的影响

从表 1 可以看出,除早稻 297 的抗性愈伤筛选频率随培养时间延长减少外,其他 2 个品种的抗性愈伤筛选频率均无明显变化趋势。

表 1 继代时间对抗性愈伤筛选频率的影响

Table 1 Effect of subculture time on selection efficiency

品种	抗性愈伤筛选频率/ %		
	<2 个月	2~3 个月	>3 个月
早稻 277	13.2	18.4	16.7
早稻 297	19.8	19.0	13.4
早稻 502	11.7	9.8	10.5

2.3 基因枪轰击后愈伤组织恢复时间和潮霉素 B 质量浓度对抗性愈伤组织筛选的影响

从表 2 可以看出,基因枪轰击后,3 个早稻品种的愈伤组织直接放于含高质量浓度潮霉素 B (50 和 70 mg L⁻¹) 的 NB 培养基上筛选获得的抗性克隆数大大少于对照,直接放于含 70 mg L⁻¹潮霉素 B 的 NB 培养基上,抗性克隆数接近于 0。放于含 30 mg L⁻¹潮霉素 B 的 NB 培养基上时,2 种筛选方法所得的抗性克隆数与对照相差不大。恢复 7 d 后 3 个质量浓度的潮霉素 B 或者直接放于 30 mg L⁻¹潮霉素 B 对抗性愈伤的筛选都很有效。

表 2 愈伤组织恢复时间和潮霉素 B 质量浓度对抗性愈伤筛选频率的影响

Table 2 Effects of resuming time of calli and concentration of hygB on selection efficiency

品种	抗性愈伤筛选频率/ %					
	直接筛选质量浓度/ (mg L ⁻¹)			恢复 7 d 后筛选质量浓度/ (mg L ⁻¹)		
	30	50	70	30	50	70
早稻 277	17.5	4.5	0.9	22.5	17.8	16.5
早稻 297	18.6	5.4	0.3	22.6	18.7	17.2
早稻 502	19.4	2.8	0	19.4	15.7	16.1
平均	18.5	4.2	0.4	21.5	17.4	16.6

2.4 抗性植株再生与分子检测

经抗潮霉素 B 筛选获得的抗性愈伤组织预分化后直接接入含有 50 mg L⁻¹的潮霉素 B 的分化培养基上,待第一片叶长出后,转入生根壮苗培养基中。炼苗后移到温室,并结实。

从表 3 可知,3 个品种的抗性愈伤筛选频率、转化频率均有一定的差异,早稻 297 表现最高,而早稻 502 最低。试验共获得 206 棵转化植株。

对获得的 206 棵植株进行 PCR 检测,其中 166 棵植株呈阳性,筛选频率为 80.6%。对 27 株 PCR 检测阳性的材料 PCR-southern 杂交验证全为阳性(图 2-A),25 株斑点杂交结果呈阳性(图 2-B),25 株 southern 杂交结果呈阳性(图 2-C),杂交均在预期的 2.8kb 位置出现杂交信号,说明带有启动子、目的基因 *mtlD* 基因和终止子的完整表达元件的 DNA 片段至少有一个拷贝已整合进早稻基因组中。

表 3 *mtlD* 基因转化频率

Table 3 Transformation efficiency of *mtlD* gene

品种	轰击愈伤组织数	抗性愈伤数	筛选频率/ %	PCR 阳性株系数	转化频率/ %
早稻 297	321	59	18.4	39	12.1
早稻 502	259	31	12.0	19	7.3
早稻 277	302	48	15.9	26	8.6

对 southern 杂交结果呈阳性的植株进行 RNA 斑点杂交(图 2-D),14 个检测植株中 11 个斑点杂交结果呈阳性。对斑点杂交结果呈阳性的植株进行 northern 杂交分析,检测到 10 个呈阳性。

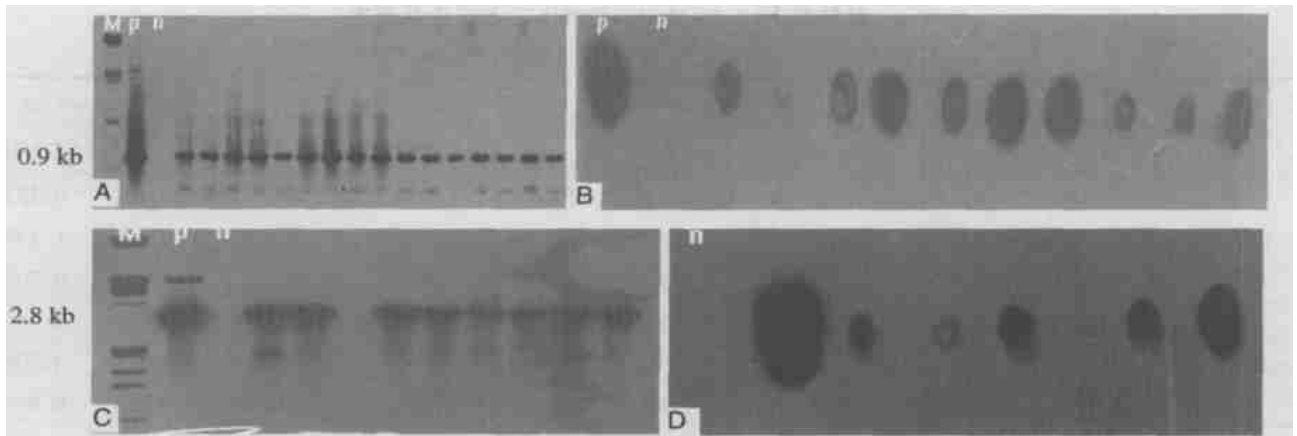
2.5 耐盐性试验

1) T₁ 代转基因早稻的生长速率。从表 4 可以看出,T₁ 代转基因早稻种子放于 1.0% NaCl 的 MS 培养基上能基本正常生长,与在 MS 培养基上生长速率差异不大,而对照在 1.0% NaCl 的 MS 培养基上生长受到抑制,植株最终萎蔫死亡。

表 4 T₁ 代转基因早稻与非转基因早稻生长速率比较

Table 4 Comparison of growth rate between transgenic T₁ progeny and nontransgenic plants g d⁻¹

品种	T ₁ 转基因植株		未转化对照	
	NaCl-MS	MS	NaCl-MS	MS
早稻 277	0.104	0.149	0.041	0.161
早稻 502	0.136	0.172	0.039	0.117



A: T_0 代转基因旱稻的 PCR-southern 杂交; B: T_0 代转基因旱稻的斑点杂交;

C: T_0 代转基因旱稻的 southern 杂交; D: T_0 代转基因旱稻 RNA 斑点杂交

M: *EcoR* + *Hind* ; p: pMH 质粒; n: 未转化对照

图 2 T_0 代转基因旱稻的分子检测

Fig. 2 Molecular test for T_0 transgenic upland rice

2) 转基因植株耐盐性试验。对 3 个 T_1 代旱稻株系(每个株系各设 2 种处理,每种处理各 30 株,各单株 PCR 检测均为阳性)进行耐盐性筛选。在含 0.5% NaCl 盐土中,旱稻 277、旱稻 297 和旱稻 502 分别有 12, 11 和 13 株表现出耐盐性。在含 0.75% NaCl 盐土中, 3 个旱稻株系分别有 10, 11 和 11 株表现出耐盐性。未转化的对照秧苗在含 0.5% NaCl 盐土中生长缓慢, 植株最终萎蔫, 25 d 后死亡, 在含 0.75% NaCl 的盐土中 10 d 后死亡。

2.6 T_1 代转基因旱稻的相对电导率

旱稻 277 的相对电导率介于 0.182 ~ 0.731, 旱稻 502 的相对电导率介于 0.253 ~ 0.716。除了旱稻 502 有 1 株外, 转基因旱稻植株的相对电导率明显低于非转基因植株(表 5), 说明转基因植株膜的损伤程度低于阴性对照。

2.7 T_1 代转基因旱稻植株地上和地下部 Na^+ , K^+ 含量测定

盐胁迫下, 经 Na^+ -ATPase 和 Na^+ - H^+ 反通道蛋白作用可使细胞质中维持较低的 Na^+ 含量^[11,12]。保持 Na^+ 与 K^+ 较低质量比对于耐盐至关重要。由于基因 HAL1 和 HAL3 (halotolerant) 的过量表达, Na^+ 与 K^+ 质量比降低导致耐盐性提高^[13]。

从表 6 可以看出, 转基因植株 Na^+ 含量地上部与地下部均低于非转基因植株。盐胁迫下, K^+ 的吸收明显增加, 除了旱稻 297-2 外, 其余 K^+ 含量地上

表 5 转基因旱稻部分植株叶片的相对电导率

Table 5 Assay of relative electronic conductivity of some transgenic plants

品 种	序 号	相对电导率
转基因旱稻 277	H1	0.443
	H6	0.583
	H20	0.525
	H33	0.423
	-	0.423
CK(旱稻 277)	-	0.727
转基因旱稻 502	H3	0.520
	H9	0.505
	H56	0.343
	H89	0.526
CK(旱稻 502)	-	0.761

部/ 地下部均高于阴性对照。盐胁迫下, 地上部和地下部 K^+ 与 Na^+ 质量比明显大于阴性对照。

2.8 T_1 代转基因旱稻的遗传分析

NaCl 和潮霉素 B 筛选表现阳性的单株经 PCR 检测均为阳性, T_1 代转基因旱稻耐盐和盐敏感分离比例介于 4.2 : 1 ~ 11.0 : 1 之间, 抗潮霉素 B 和潮霉素 B 敏感分离比例介于 3.5 : 1 ~ 17.0 : 1 之间, 以上 2 种检测的结果比例均大于 3 : 1, 说明基因枪轰击方法基本上是多拷贝转化。

表 6 盐胁迫下(0.5% NaCl)植株 K⁺/Na⁺含量测定Table 6 Contents of K⁺ and Na⁺ under 0.5% NaCl

品种	编号	w(Na ⁺)/%			w(K ⁺)/%			w(K ⁺)/w(Na ⁺)	
		L1	R1	L1/R1	L2	R2	L2/R2	L2/L1	R2/R1
旱稻 277	1	0.868 9	1.397 1	0.621 9	2.916 7	1.008 2	2.893 0	3.356 8	0.721 6
	2	0.507 9	1.030 0	0.493 1	3.210 4	1.492 0	2.151 7	6.320 9	1.448 5
	CK1	1.504 2	1.351 0	1.113 4	2.093 1	0.957 3	2.186 5	1.371 5	0.708 5
旱稻 297	3	0.493 9	0.905 9	0.545 2	2.584 5	1.039 5	2.486 3	5.232 8	1.448 5
	4	0.891 0	0.909 8	0.979 3	2.663 3	1.210 7	2.199 8	2.989 1	1.3307
	CK2	1.592 9	1.390 9	1.145 2	2.186 6	1.330 1	1.643 9	1.372 7	0.956 3
旱稻 502	5	0.878 5	0.911 3	0.964 0	2.479 2	0.964 2	2.571 3	2.822 1	1.058 0
	CK3	2.357 9	1.505 0	1.566 7	2.260 5	1.251 4	1.806 4	0.958 7	0.831 5

注:L—叶片;R—根;CK1—旱稻 277 非转基因植株;CK2—旱稻 297 非转基因植株;CK3—旱稻 502 非转基因植株。

表 7 T₁代转基因旱稻耐盐性和潮霉素 B 抗性遗传分析Table 7 Salt-tolerance and hyg analyses of T₁ progeny

品种	检测株数	检测方法	分离比例
旱稻 277	28	1.0% NaCl	6.0 1
	48		11.0 1
	44	50 mg L ⁻¹ 潮霉素 B	4.5 1
	98		9.9 1
旱稻 297	52	1.0% NaCl	6.4 1
	62		6.7 1
	121	50 mg L ⁻¹ 潮霉素 B	9.1 1
	58		17.0 1
旱稻 502	62	1.0% NaCl	4.2 1
	35		7.8 1
	48	50 mg mL ⁻¹ 潮霉素 B	15.0 1
	36		3.5 1

3 讨论

在转化后的筛选过程中,合适的筛选压力是至关重要的,过低的筛选量不能抑制未转化细胞,达不到筛选的效果;筛选压力过高,可能影响已转化细胞生长,降低转化效率。轰击后的恢复时间应根据愈伤组织的生长状态而定,如果愈伤组织恢复时间过长,愈伤组织长得太大将不利于生长。试验结果表明,直接以较低的筛选压立即筛选或恢复一周后以较高的筛选压力进行筛选都可行。

当质膜的选择透性因逆境伤害而明显改变或丧失时,细胞内的物质(尤其是电解质)大量外渗,从而引起组织浸泡液的电导率发生变化,通过测定外渗液电导率的变化反映出质膜的伤害程度和所测定材料抗逆性的大小^[14]。T₁代转基因植株电导率低于

阴性对照,说明转基因旱稻的质膜的损伤小于对照。

盐胁迫下,K⁺的吸收使细胞积累更多的K⁺,从而维持较低的Na⁺与K⁺质量比^[11]。本试验中转基因植株Na⁺与K⁺质量比低于阴性对照,说明*mtlD*基因在旱稻中的表达提高了旱稻的耐盐性。

本试验中,盐胁迫下,转基因植株的生长受到不同程度的阻碍。*mtlD*基因的表达可能会影响转基因植株的正常生长,转基因植株的耐盐性是以植株的生长和生产量为代价的^[15]。为了解决这一问题,希望获得只有在盐胁迫时才合成高水平的渗透调节物质的转基因植株。盐诱导型启动子和组织特异型启动子的使用可以提高外源基因的表达水平。任何有利用价值的耐盐性转基因作物在盐碱地条件下都应比对照具有更高的生产量。盐胁迫下,如何提高转基因作物的生产量还有待解决。

参 考 文 献

- [1] Tarczynske M C, Jensen R G, Bohnert H J. Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2600 ~ 2604
- [2] 刘俊君, 彭学贤, 王海云, 等. 转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性 [J]. 生物工程学报, 1996, 12 (2): 206 ~ 210
- [3] 刘凤华, 孙仲序, 崔德才, 等. 细菌 *mtlD* 基因的克隆及在转基因八里庄杨中的表达 [J]. 遗传学报, 2000, 27 (5): 428 ~ 433
- [4] Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, et al. Slinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco [J]. Plant Cell Envir, 1997, 20: 609 ~ 616

- [5] 王慧中, 黄大年, 鲁瑞芳, 等. 转 *mtlD/gutD* 双价基因水稻的耐盐性[J]. 科学通报, 2000, 45(7): 724~728
- [6] 于志华, 陈敏勇, 顾红雅, 等. 抗除草剂旱稻转基因植株的获得[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1996, 32(4): 499~503
- [7] 腊红桂, 王化琪. 抗除草剂基因导入旱稻 (*Oryza sativa*) 栽培品种[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 227~232
- [8] 郑宏红, 何锬洁, 戴顺洪, 等. 提高水稻基因枪转化效率的研究[J]. 生物工程学报, 1996, 12(增): 111~115
- [9] 郑宏红, 戴顺洪, 何锬洁, 等. 籼稻基因枪转化的研究[J]. 遗传学报, 1996, 23(4): 286~292
- [10] 李银心, 常凤启, 杜立群, 等. 转 *BADH* 基因豆瓣菜的耐盐性[J]. 植物学报, 2000, 42(5): 480~484
- [11] Haro R, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport [J]. FEBS Lett, 1991, 291: 189~191
- [12] Wieland J, Nitsche A M, Strayle J, et al. The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane[J]. EMBO J, 1995, 14: 3870~3882
- [13] Ferrando A, Kron S J, Rios G, et al. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3 [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15: 5470~5481
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 2000. 261~263
- [15] Kasuga M, Liu Qiang, Miura Setsuko, et al. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. Nature Biotechnol, 1999, 17: 287~291

(上接第 33 页)

参 考 文 献

- [1] 王长生, 王遵义, 苏成贵, 等. 保护性耕作技术的发展现状[J]. 农业机械学报, 2004, 35(1): 167~169
- [2] 李宝筏. 农业机械学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003. 36~58
- [3] 胡宗武. 工程振动分析基础[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1985. 92~104
- [4] A 卢里耶, A A 格罗姆勃切夫斯基. 农业机械的设计和计算[M]. 北京: 中国农业机械出版社, 1983. 41~230
- [5] 杨叔子, 杨克冲. 机械工程控制基础[M]. 第4版. 武汉: 华中科技大学出版社, 2002. 111~132
- [6] 孙亮. MATLAB 语言与控制系统仿真[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 2001. 119~136