

大豆转化体系的优化和 *Dof 4* 基因转入大豆的研究

杜升伟^{1,2}, 刘业丽², 姚丙晨^{1,2}, 白晨², 苗兴芬¹, 刘春燕², 陈庆山², 胡国华^{1,2}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 研究优化了包括种子消毒方法、生长调节剂用量和抗生素种类在内的影响农杆菌介导大豆子叶节遗传转化效率的多个因素, 并将 *Dof 4* 基因转入绥农 14 中。结果表明: 氯气熏蒸消毒方法对大豆伤害小, 子叶节丛生芽分化率高; 菌液侵染时间和共培养时间控制直接影响长菌和丛生芽状态。芽诱导培养阶段, 当 6-BA 浓度为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IBA 浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 分化率较高, 畸形率和愈伤状况都较轻。最优的抗生素组合为头孢噻肟钠 (Cefotaxime Sodium) $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加羧苄青霉素 (Carbenicillin) $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 大豆; 子叶节; *Dof4*; 农杆菌介导转化

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2010)03-0398-05

Optimization of Soybean Transformation System and Transferring *Dof 4* Gene into Soybean

DU Sheng-wei^{1,2}, LIU Ye-li², YAO Bing-chen^{1,2}, BAI Chen², MIAO Xing-fen¹, LIU Chun-yan², CHEN Qing-shan², HU Guo-hua^{1,2}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030; 2. Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090, Heilongjiang, China)

Abstract: In this paper, some major factors, which played important role in improving the transformation efficiency of soybean, such as the method of sterilizing the seeds, plant hormones, and antibiotics, were optimized. The *Dof 4* was transferred into the soybean cultivar Suinong 14 by Agrobacterium-mediated cotyledonary node transformation. The result showed that, the chlorine suffocating was chosen to seeds sterilize, which did not harm to the seeds and have a higher differentiation rate for multiple shoot. However, duration of Agrobacterium infection and co-culture influenced the contamination and the state of multiple shoot. As for shoot induction, a higher regenerated rate, better callus induction rate, and lower deformity rate were obtained with $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ IBA in this experiment. And the optimum combination of antibiotic and concentration in medium was $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cefotaxime Sodium and $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Carbenicillin.

Key words: Soybean; Cotyledonary node; *Dof 4*; Agrobacterium-mediated transformation

大豆 (*Glycine max* L. Merrill) 是重要的油料和经济作物, 也是我国国民膳食植物蛋白的主要来源。截至 2008 年全球共有 25 个国家和地区种植了 1.25 亿 hm^2 的转基因作物, 其中转基因大豆占全球转基因作物种植面积的 61%。转基因大豆已经被广泛接受, 有着乐观的发展前景。

植物转基因技术作为一种新兴的生物技术手段, 在抗性育种、提高产量和品质以及缩短育种周期等方面有着显著的优势。建立良好的组培再生体系是转基因的先决条件^[1], Hinchee 等^[2]首次用农杆菌介导法获得大豆转基因植株, 随后 Parrot 等^[3]用农

杆菌介导法转化大豆的未成熟子叶, 获得了玉米醇溶蛋白基因和 NPI II 基因的转基因大豆植株。Zhang 等^[4]以 *Bar* 基因作为选择标记基因用除草剂草甘膦筛选活的转化植株。但目前仍然没有稳定高效的大豆遗传转化体系^[5], 使用该方法的效率还比较低。大豆不定芽发生再生体系是目前较为成熟的适合于农杆菌介导大豆遗传转化的再生体系。

该试验以大豆子叶节为外植体研究优化大豆遗传转化再生体系, 并将高油基因 *Dof 4* 转到大豆品种中, 以期获得优质大豆新品种。

收稿日期: 2009-12-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2006AA100104-3); 国家转基因专项资助项目 (2008ZX08004-001-3)。

第一作者简介: 杜升伟 (1984-), 男, 在读硕士, 研究方向为大豆育种与生物技术。E-mail: huanyu2217@163.com。

通讯作者: 陈庆山, 副教授。E-mail: qshchen@sohu.com; 胡国华, 研究员。E-mail: hugh757@vip.163.com。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

东北地区主栽大豆品种绥农 14 由黑龙江省农科院绥化分院提供。农杆菌 EHA105 含 *Dof* 4 基因由中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜教授惠赠; 抗生素特美汀 (Timentin) 和万古霉素 (Vancomycin) 均由 SIGMA 公司生产, 头孢噻肟钠 (Cefotaxime Sodium) 和羧苄青霉素 (Carbenicillin) 均由 Apollo 公司生产, 筛选剂 PPT 由 SIGMA 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 种子灭菌和萌发 挑选成熟饱满无病的大豆种子, 进行消毒处理。对以下 2 种消毒方法作对比。氯气灭菌: 由 200 mL NaClO 和 4 mL 浓 HCl 反应生成的密闭容器中消毒 6 h。升汞灭菌: 先将大豆种子冲洗 5 ~ 8 次, 然后在 75% 乙醇中浸泡搅拌 1 min 再用无菌水清洗 1 次后转入升汞 (0.1 g 溶于 100 mL 水) 中浸泡消毒 8 min, 然后用无菌水清洗 5 ~ 8 次。将消过毒的种子分散到发芽培养基 (GM) 上, 于 24℃ 条件下暗培养 2 d 催芽生长。每组设 3 次重复, 每次重复接种 500 粒种子, 分化率取 3 次结果的平均值。

1.2.2 工程菌液制备 从 YEP 培养平板 (Str⁺, Rif⁺) 上挑含有 *Dof* 4 基因的农杆菌单菌落接种于 5 mL 含有 50 mg · mL⁻¹ 链霉素和 50 mg · mL⁻¹ 利福平的抗生素的 YEP 液体培养基, 28℃ 200 r · min⁻¹ 振荡过夜培养至 OD₆₀₀ 值为 1.0 ~ 1.2。将农杆菌培养物于 3 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集菌体。重悬于液体共培养基 OD₆₀₀ 值为 0.6。

1.2.3 侵染及共培养 将已经过切口处理 (用蘸有菌液的刀尖进行划切处理) 的外植体置于 30 mL 菌液中侵染 30 min, 侵染完毕后将外植体切口向下, 水

平置于共培养基上 24℃ 暗培养 3 d。

1.2.4 芽诱导和伸长 将共培养后的外植体用液体芽诱导培养基 (SI) 清洗, 后置于灭菌滤纸上吸干菌液, 将外植体子叶下胚轴部分呈 30 ~ 45 度角斜插入固体芽诱导培养基中进行分化, 7 d 后移至选择诱导培养基中培养。2 周后将分化的外植体转移到芽伸长培养基中, 每 2 周继代 1 次。

1.2.5 生根及驯化移栽 将伸长的芽 (3 ~ 5 cm) 切下, 在 1 mg · mL⁻¹ 的吲哚乙酸 (IBA) 浸泡 1 ~ 2 min 斜切口, 然后转移到生根培养基 (RM); 待根长到粗壮后取出将根部的培养基冲洗干净, 转入到土壤、珍珠岩、蛭石 (2: 1: 1) 的混合基质中, 浇透水。移入人工气候室缩短光照时间, 12 h 光照/12h 黑暗, 促进大豆开花结果。

1.2.6 转基因植株的检测 抗性植株大豆叶片 DNA 提取, 通过 PCR 检测法根据 *Dof* 4 基因载体序列设计引物 (Forward: 5' -ACGCACAATCCCAC-TATCC -3', Reverse: 5' -TGCCTGTTAGGGTGTAGG -3'), 于 25 μL 体系中进行 PCR 扩增, 其反应为 94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 终延伸 5 min。

高油性状表达检测利用快速气相色谱分析法^[6], 先用毛细管气相色谱分离经甲酯化的脂肪酸成分^[7], 通过色谱数据工作站 6890, 利用峰面积归一化法, 测得各化学组分在脂肪酸中的百分含量。

2 结果与分析

2.1 种子表面消毒方式的选择

采用 2 种外植体灭菌方法, 升汞消毒法和氯气消毒法。由表 1 可以看出氯气消毒法萌发率较升汞消毒方法高, 对种子伤害程度小。

表 1 不同消毒方法对大豆子叶节丛生芽分化的影响

Table 1 Effect of different sterilization method on the shoot regeneration of soybean cotyledonary node

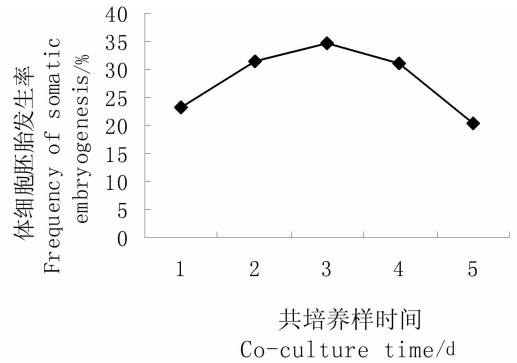
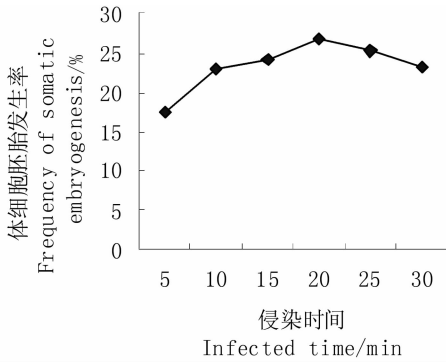
消毒方法 Sterilization	接种种子数 Number of seed/No.	种子萌发率 Seeds germination rate /%	分化率 Rate of dif. /%
升汞消毒方法 HgCl ₂ Sterilization	500	88.3a	62.4a
氯气消毒方法 Chlorine gas sterilization	500	97.7a	76.9b

标有不同字母的数值在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异显著。

Numbers marked with a and b are different notably.

!4# ` az 0 o X y £ ž Ÿ
 o ‡) N.‰t , Ä Å j &' ´ k l n x t J g
 (ý p ü &&° ») N.‰f %4' t , Ä Å ^ « ¾ Å &

b Ñ &! â 0 ú ï T é Ö™i o 7 } Ö™¥ ý p -
 • • (t ! , @©u » !Té Ö™~ !%b!9?Æ; j
 o 7 } \$LÖ!´ k l n x J g (} G &



L &# ` az o X ë 9 | ! " —# \$ p q ´ ¢ , 0 ± ² ## L !# £ ž Ÿ ë 9 | ! " —# \$ p q ´ ¢ , 0 ± ²
 A(5? &# 3//*; ' / %&7%*&, # (4/*;'*- '(# * "4 # # # # A(5?!# 3//*; ' / ; "G, : , &' (# * "4 /&1, *4;9 "/
 # # # # # # # # /&1, *4;9 "/ *#789"5*4*(. (4 ."97*% # # 789"5*4*(. (4 ."97*%

!4\$# r s t u | ! " | C l ³ n , 0 ± ² t † j p Ð ! ^ K ï Â ô Ý ï] (t ; © u » ! ý
 &' Ÿ ¶ ´ ~ o ï] ï h U Ê t ï] (Á ¶ 8 ' : + - Þ w G - 0 - Ö ! y] - ï] % 5 ~ ö ! !
 í » t ý p ! - ¢ ! â 0 ú ï ' : + - ; 0 - ! < í » R : Ñ Ä P ï h g ™ &
 } ! # ' : + - Ç È ' 0 - Ç È | C l m n M v 0 ± ²
 E%*: ! # > / : , *4; * "/ ; "4; *4; 8%("4 "/ ' D2 %&- >D2 "4 ' B* - (//*&4'(%("4 "/ . B"'''.

' : + - Þ w	0 - Þ w	' • (ï ™æ
' : + - g + Q &	0 - g + Q &	^ K ï 2 W L A M U K 7 0 0 27 g	8 2 2 0 7 1 K H 0 0 0 24
84%	%	!!4>	&"
84%	%	>140	\$\$
!49%	%	\$\$4>	!9
84%	%4&	!84\$	' =
84%	%4&	' %4	\$
!49%	%4&	994!	&=
84%	%4!	804%	' "
84%	%4!	>=4!	>!
!49%	%4!	\$ 4%	\$&

!4># ½ ¢ s 0 Ð ^
 - - ° g » j Ÿ ¶ ´ t g „ Ö ï 7 Ä ! % ° g »
 t Ö Ä Þ w Á ¶ 8 1 2 j , Ä Å µ u » t š 8 ! ‡ "
 Tu æ &' t Ÿ ¶ ´ j o ‡ ° g » t ý À n o ‡ &
 u È ! " Ä ! , ° g » : Ó \$ m W X Y Z ! % % ? | + Q | &
 j [V P ½ » ! 9 % ? | + Q | & % ½ Æ z 9 % ? | + Q | & ; ²
 • ½ » 9 % ? | + Q | & | } ¢ ¢ !! , ° g » : Ó B /
 t Ÿ ¶ ´ ' • (' L ^ 9 \$ d j > 9 d ! u È ! " Ä m W
 X Y Z j [V P ½ » ^ T ~ ° g » : Ó &
 !49# d . / - ' 0 v Ø y - a ^ / 8 f g " i w P
 x p M _
 ³ v ° g » ð ° B / ° n ´ k l n ! x " Ÿ 7 }
 ! p B.0>Tut M ¶ ß & Ä / Y - + • ' L) | - T
 u ¶ ß j Û - • " » n j Ý # ô É t " N . - ! 0 p Q

t Tut = ³ ^ S n j Ý x y ^ / 8 « - " Ñ \$ # &

M 1 2 3 4 5 6

1 k →

M \$ N Q % 8 8 % & \$ S n j Ý % \$ » n j Ý " ç # % \$ \$ » n j Ý " Û
 - • ¶ ß # % ! 9 ! ' \$ - • ¶ ß &
 # # M \$ N Q % 8 8 % © K & \$ H 2 0 0 A K F 27 0 2 3 © © K ! \$ 7 K ! © A K F 27 0 2 3
 " (^ Z © # % © © K \$ \$ 7 K ! © A K F 27 0 2 3 " 67 0 0 0 1 7 A 1 H 0 0 G # % © © K
 > ! 9 ! ' \$ ^ / 8 H 2 0 0 A K H 0 0 G
 L \$ # d . / ! " 0 ^ / 8 M !
 A(5? \$ # > *4' (/ (; % ("4 "/ ' 8 ¾ 4.5*4(; ."97*% 79 H I 0

- Tu ¶ B N. - ÿ « - i ; =³ N. - « - ù 8 †
 † t , • n # e ! ' Â Ð Ù ^ "%%THã » n j Ý ¶
 B Mú Ö « - i , • n # e ! y ¢ Qt Tu B.0> ”
 - Ü / & ' 5 &
 , Ä Ä Ä ß , P- & % B.0> Tu - Ü P , & ¶

ß 5 " B / - Tu ¶ B ^ î à < Â " Ñ > # ! B / Y_&
 A ¶ B " Ñ 9 # & - - B.0> Tu ¥ Ò 8 G Ë G ¼ ½
 n d !³ v µ † q # » - Y_ A < Â J • ! µ • p Ð
 i Ë • p Ð Ù G ! { µ • p Ð ' 0 Ë • p Ð i 0 | •
 p Ð % ó " ¢ \$ # &



L > # B.0> d ^ y ` & > Y_ a - ' # # # # # # # L 9 # B.0> d ^ y ` & > Y_ a - ' # # #

A(5? > # E_ + , (4" 45 & > . " 97*% ' & % . / " & # * - 79 4 / 1 > # # A(5? 9 # E_ + , (4" 45 & > . " 97*% ' & % . / " & # * - 79 4 / 1 >
 } \$ # ! " i w P x p g i] ^ z {
 E % : * \$ # ! " 4 ' 4 ' / % ' 9 % (- . / . " 97*% ' & % . 5 * 4 (; \$: % ' . % 4 - ; " 4 ' & : \$: % ' .

Nh (@ HK	i µ • ^ @ ADF	{ µ • (@ ADF	Ë •) 3KF	0 Ë • QF 23KF	0 • QF 23KF
j Ý ¶ B / 27 Q 23 H @ C	" 4" \$! 4\$"	! % \$ 9	' ! 4> %	> 4" !
- Tu ¶ B Y U @ G K 7 F H @ C	& % \$ 9	! 4%	! " 4%	9 > 4! 9	> 4! =

\$ # f „

& ' : Ñ 7 } t S g] i h (i i g ¶ B (Á
 Tu æ y p ü & & o † Tu æ - • • (D š ~ ü &
 œ • (9 ! , Ä Ä - h t & ' - • š ~ " i ¾ w t <
 i : Ñ t , • n ! 0 0 Tu æ ¥ y p - • • (t }
 ¿ © u » &

~ x y 0 i p à v ¾ 5 Ä j Ö Ä È t k l x y
 M 0 p à ! â 0 Ö •) G Ä È t T é (! ~ o 7 } v
 ¾ 5 ! v Ð t , Ä Ä T é Ö 7 } Y t 7 Ä Ž B N !
 0 0 ! ° » T é Ý ¶ ' o 7 } Ö T M ¥ | 7 } \$ L ! †
 Ö o 7 } T Ä ß & \ i ^ " ~ } ê - = , Ý ¶ ' # !
 â 0 Ö Ä ô Ý Ö • t 4 Í o } &

& ' Ý ¶ ' ; , Ä Ä o 7 } Y ~ q ¢ _ Ä ~ \
 : Ñ 5 o g Ö & Ð , Ä Ä ! ^ Ò 8 , Ä Ä t g „ ! W
 - Ý ¶ ' t ì È ' • ! © x y 7 Á 7 } (") & “ Ä m
 W X Y Z ! % ? ! + ? Q ! & i [V P ½ » ! 9 % ? ! + ? Q ! & o
 , Æ b & % ? ! + ? Q ! & i m W X Y Z & % ? ! + ? Q ! & i 2
 • ½ » 9 % ? ! + ? Q ! / ! , : Ó ! S g] i g (p i
 7 Á • } Û & q 5 + L Ý ¶ ' ' • (¢ • } ^ &

í » p Ð j Â ô Ý i] (Ð Ñ K i 7 Ä & . /
 ¢ ¢ ! : + - y] - Ý ¶ ' i] & - - Ö - ô Ö ý p
 k l , n : h • q g T M ! P ù g M " % o ! o § - a Ü
 « „ 7 } T ! â 0 Ä Ö - " ô Ö P Ò 8 t o p i n #
 ¥ A F & | } " • ! ¶ B o } © ® T M p J £ ! ä % ©
 © Ö " i & M t o } ' ! 0 r y T M p t g „ J _ %
 q ì È ! ¶ B G w " . © £ / 9 F ? 0 Ä & M % - ñ
 / x Ó T = 5 - z D 5 7 } & í g % ñ 6 Y © ý p
 u Ý Ö T M / & B r • ! 9 i í „ i ? ô &

> #] „

~ & ' - • ' p , • \ _ ! Ä µ Q x Ø " t \
 • • } { Û &] i h 7 } U È ' : + - p w ^ & 4 ? !
 + Q ! & ! 0 - p w ^ % & ? ! + Q ! & i • ({ G ! V ö (
 i ! R d Ô ý { ½ & } , t ° g » : Ó ^ m W X Y
 Z ! % ? ! + ? Q ! & a [V P ½ » ! 9 % ? ! + ? Q ! & p
 Ö =³ B.0> t , Ä Ä Q - >> % Ä È p w ' , Ä Ä
 x é Ö T M j - • • (€ Ö ý p & , Ä Ä Ä È p w ^
) N_ % f % ' ' x é Ö T M ! % b \$ % ? Æ Ö W - - • ! |
 } ý ¢ B.0> Tu " - ñ / & ' 5 &

参考文献

- [1] 卜云萍, 李明春, 胡国武, 等. 大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36(1): 103-108. (Bu Y P, Li C M, Hu G W, et al. The study of comparing the transformation system of Agrobacterium-mediated and regeneration system of cotyledon nod of soybean culture[J]. Acta Scientiarum Naturallum (Universitatis Nankaiensis), 2003, 36(1): 103-108.)
- [2] Hinchee M A W, Connor Ward D V, Hewell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, 19:91-99.
- [3] Parrott W A, Williams E G, Hilbrand D P, et al. Effect of genotype somatic embryogenesis form immature cotyledons of soybean [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 16(1):15-21.
- [4] Zhang Z Y, Xing A Q. The use of glufosinate as a selective agent in Agrobacterium mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1999, 56: 37-46.
- [5] 李桂兰, 乔亚科, 杨少辉, 等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化的研究[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 170-176. (Li G L, Qiao Y K, Yang S H, et al. Study of the Agrobacterium-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 170-176.)
- [6] 张颖君, 高慧敏, 蒋春志, 等. 大豆种子脂肪酸含量的快速测定[J]. 大豆科学, 2008, 27(5): 859-862. (Zhang Y J, Gao H M, Jiang C Z. et al. Fast analysis on fatty acids of soybean seed by gas chromatograph[J]. Soybean Science, 2008, 27(5): 859-862.)
- [7] 徐杰, 胡国华, 张大勇. 大豆籽粒发育过程中脂肪酸组分的累积动态[J]. 作物学报, 2006, 32(11): 1759-1763. (Xu J, Hu G H, Zhang D Y. Dynamic accumulation of fatty acids in grain maturing process of soybean[J]. Acta Agronomy Sinica, 2006, 32(11): 1759-1763.)
- [8] 王萍, 高世庆, 郭永来, 等. 利用农杆菌介导将抗逆相关基因 *GmDREB* 导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(1): 47-51. (Wang P, Gao S Q, Guo Y L, et al. Transformation of stress resistance related gene *GmDREB* into soybean via Agrobacterium-mediation[J]. Soybean Science, 2008, 27(1): 47-51.)
- [9] 王萍, 吴颖, 季静, 等. 抗生素对大豆愈伤组织的诱导和生长的影响[J]. 遗传, 2001, 23(4): 321-324 (Wang P, Wu Y, Ji J, et al. Effect of antibiotics on induction of callus and callus growth in soybean[J]. Hereditas, 2001, 23(4):321-324.)

关于召开“第三届植物分子育种国际会议”的通知

一 会议时间和地点

会议时间:2010年9月5日报到,2010年9月6-9日:开会。

会议地点:北京国际会议中心(北京市朝阳区北辰东路8号)。

二 会议主题报告

作物育种在粮食安全中的作用;应用植物基因组学;植物重要基因/代谢途径的发掘及功能研究;表观遗传学;转基因新技术、产品及市场;作物种质资源及遗传多样性;植物分子育种新技术;植物分子育种的新理论和新概念;植物分子育种的生物信息学技术及分析工具

三 主要分会

应用植物基因组学;植物重要基因/代谢途径的发掘及功能研究;水稻分子育种;小麦分子育种;玉米分子育种;棉花和油料作物分子育种;分子植物育种技术平台;作物种质资源及遗传多样性;植物分子育种的生物信息学技术及分析工具

四 报名与注册

1 报名

报名参会人员需在 ICPMB 网站上填写个人详细报名信息。

2 会议注册费

	2010年5月31日前交费	2010年7月31日前交费	2010年7月31日后交费
普通代表	2000元	2200元	2500元
厂商代表	3000元	3300元	3600元
学生代表	1800元	2000元	2400元

五 论文征集

1 会议形式:会议以大会报告、分会场报告和墙报的形式进行广泛的学术交流

2 注册后您会收到一封确认函和一份回执表,请您填写回执表,然后与您的摘要一并回复到以下邮箱,并在电邮的主题注明:您的名字-回执,例:“李静怡-回执”

李静怡 博士 电子邮件:icpmb3@gmail.com

详情请登录会议网站 <http://icpmb.thegsr.org>

六 联系方式

1 关于学术安排、赞助和展览:

联系人:Dr. Judy Lee (国外)/ 孙勇 女士 (国内) 单位:中国农业科学院作物科学研究所 地址:北京市海淀区中关村南大街12号 邮政编码:100081 电话:010-8210-6697 传真:010-8210-8559 电子邮件:icpmb3@gmail.com

2 关于报名注册和付款:

联系人:黄奕 单位:中国国际科技会议中心 地址:北京市海淀区中关村南大街1号 北京友谊宾馆苏园写字楼15单元4层411室 邮政编码:100873 电话:010-6894 8708 传真:010-6894 9229 电子邮件:huangyi@cicst.org.cn