

ZmPti1 基因正义和 RNAi 表达载体的构建及其转化玉米的研究

张森燕^{1,2}, 吴忠义², 张秀海², 刘占磊^{1,2}, 王永勤², 黄丛林²

(1. 首都师范大学 生命科学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 构建了 *ZmPti1* 基因的正义表达载体和 RNAi 载体, 以 *bar* 基因为抗性筛选标记, 通过花粉管通道法将构建的两个表达载体分别转化到玉米自交系 178。收获的种子播种于营养钵中, 出苗后, 经 0.1% 的草丁膦筛选得到 40 株草丁膦抗性植株, 进一步用 PCR 鉴定与 PCR-Southern 检测得到 33 株转基因植株, 其中 15 株是转化正义表达载体的转基因植株, 18 株是转化 RNAi 表达载体的转基因植株。并对转化方法和 *ZmPti1* 基因的功能进行了讨论。

关键词: *ZmPti1* 基因; 正义表达载体; RNAi 载体; 花粉管通道法; 转基因植株

中图分类号: S513.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)05-0001-05

Construction of *ZmPti1* Sense and RNAi Expression Vectors and Their Transformation into Maize

ZHANG Sen-yan^{1,2}, WU Zhong-yi², ZHANG Xiu-hai²,
LIU Zhan-lei^{1,2}, WANG Yong-qin², HUANG Cong-lin²

(1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: *ZmPti1* (AY708048) cloned in our lab encodes a maize pti-like kinase. In order to efficiently identify the functions of *ZmPti1* gene, two plant-transformation vectors, pBPC-*ZmPti1*-*bar* (sense expression vector) and pBPC-PtS-GFP-PtAs-*bar* (RNAi vector) were prepared. And promoters used in these two constructs were maize ubiquitin promoter. These two vectors contain herbicide resistance gene (*bar* gene) that can facilitate large scale selection of transformant in farm land. Sense expression and RNAi vectors of *ZmPti1* were delivered into maize inbred lines 178 by pollen tube pathway method respectively, and 33 transformed plants were obtained through glufosinate screening, PCR analysis and PCR-southern identification. Among these transformants, fifteen plants are *ZmPti1* overexpression lines, and 18 plants are *ZmPti1* RNAi lines. Furthermore, the transformation efficiency in our experiment is related to the introducing time. In T₀ generation, overexpression lines are more tolerant to disease stress than that of knockout lines. It indicates that *ZmPti1* is involved in disease resistant signal pathway. The transformants obtained can be used to study the mechanism of defense response for *ZmPti1* in maize. And the results demonstrate that the approach of pollen tube pathway is simple and efficient for maize transformation.

Key words: *ZmPti1* gene; Sense expression vector; RNAi vector; Pollen tube pathway; Transgenic plants

玉米是我国重要的粮食、饲料和能源作物之一, 低温、干旱、病害、土壤的盐碱化等逆境成为玉米产量主要限制因素。研究玉米抗逆机理, 培育优良的玉米品种, 是育种学家和生理学家面临的一个紧迫

任务。蛋白激酶广泛参与了植物对干旱、盐胁迫、脱落酸(ABA)诱导、光诱导等的应答反应^[1-6]。在参与环境胁迫信号的传递方面, 蛋白激酶可以通过多重复杂的信号传递途径对干旱、高盐及低温作出反

收稿日期: 2008-05-08

基金项目: 国家“973”项目(2003CB114302); 北京市科玉米创新平台项目(YZPT02-06)

作者简介: 张森燕(1981-), 女, 河南驻马店人, 在读硕士, 主要从事作物耐旱生物学分子机制研究。

通讯作者: 王永勤(1968-), 男, 山西兴县人, 博士, 副研究员, 主要从事蔬菜遗传育种研究。

黄丛林(1969-), 男, 四川仁寿人, 博士, 副研究员, 主要从事植物遗传育种研究。

应,不同传递途径之间存在交叉转导作用^[7-11]。Martin^[12]从番茄中克隆了一个抗病基因 *Pto*,将 *Pto* 基因转化番茄,转基因植株可以抵抗病原菌 *Pseudomonas syringae* 的侵入。*Pto* 是 *R* 基因的一种,其编码的蛋白可以作为一个细胞内受体与病原菌无毒基因编码的 *AvrPto* 相互作用,进而引发植物的抗病性反应。*Pti1* 是一类编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的基因,属于 *Pto* 下游的一个基因,两者在序列上存在相似性,并且 *Pto*-*Pti1* 的相互作用可以引起植物的过敏性反应^[13-16]。过量表达 *Pti1* 的转基因烟草明显提高了对表达 *avrPto* 无毒基因的丁香假单胞杆菌 (*P. syringae tabaci*) 菌株的抵抗能力^[17]。大豆中的 *Pti1* 基因 - *GmPti1* 的表达可以被抗病信号分子水杨酸(SA)和其他伤害所诱导^[18]。以上研究表明, *Pti1* 可能参与了 *Pto* 介导的抗病信号传导途径。

本实验室从玉米中克隆了蛋白激酶 *ZmPti1* 基因,研究表明,水杨酸(SA)、盐、低温、干旱可以诱导 *ZmPti1* 基因表达水平的提高,从而推断 *ZmPti1* 基

因有可能参与了植物细胞内生物胁迫以及盐胁迫的信号传导^[19,20]。为了研究 *ZmPti1* 基因功能,本试验构建了 *ZmPti1* 的正义表达载体和 RNAi 载体,转化玉米获得转基因植株,为进一步研究 *ZmPti1* 基因在玉米抗逆过程中的作用机制提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 基础质粒载体 质粒 pBPC-p5cs-F129A,带有 Ubiquitin 启动子(载体上标记为 Ubi)、氨苄青霉素和 *bar* 基因筛选标记;pGreen0029-*ZmPti1*-GFP,带有 *ZmPti1* 基因和 *GFP* 基因,以上均为北京市农林科学院生物中心花卉遗传育种实验室保存。

1.1.2 植物材料 玉米自交系 178。

1.1.3 试剂 试验所用的各种酶均来自宝生物(TaKaRa)工程(大连)有限公司。Southern 杂交试剂盒 DIG Luminescent Detection Kit 购自 Roche 公司。

1.1.4 PCR 引物序列(表 1)。

表 1 试验所用引物序列

Tab.1 Sequences of primer

引物名称 Name of primer	序列 Sequences	所含酶切位点 Enzyme restriction site
P1	5'-ATAAGGATCCATGCGCCGGTGGTITTTG-3	含 <i>Bam</i> HI 酶切位点
P2	5'-GATAGCCCTGACGATTTCCTTCC-3	含 <i>Stu</i> I 酶切位点
P3	5'-ATAGCCCTATGGTGAGCAAGGGC-3	含 <i>Stu</i> I 酶切位点
P4	5'-ATICTGCA GCCGATTTACTTGACAGCTCG-3	含 <i>Pst</i> I 酶切位点
P5	5'-ATICTGGACGCTGATTTCCTTCC-3	含 <i>Pst</i> I 酶切位点
P6	5'-ATAGGTACCATGCGCCGGTGGTITTTG-3	含 <i>Kpn</i> I 酶切位点
Pbar-upper	5'-ACCTCTAGAATGAGCCAGAACGACGCC-3	
Pbar-lower	5'-CGCGGATCCCTAAATCTCGGTGACGG-3	

1.2 试验方法

1.2.1 试验方法 植物基因组总 DNA 及质粒 DNA 提取,大肠杆菌感受态细胞的制备,DNA 片段的酶切、回收、连接、克隆子的转化与鉴定等参考文献[21]的方法,略加调整。

1.2.2 花粉管通道法转化 选择玉米自交系 178 作为受体,在开花期从受体自交系群体中选择发育正常的植株进行套袋自交^[22]。在授粉后 4~24 h 内进行导入,先将雌穗上的纸袋摘下,用剪刀剪去大约距离穗轴顶端 1~2 cm 的花丝和苞叶,保持花丝切面平齐,并使苞叶内的花丝略高于苞叶。然后用一次性针管在切口处滴注 100 μL 浓度为 500 ng/μL 的质粒溶液,立即重新套上纸袋,记载导入时间及质粒名称。待玉米果穗成熟时,将其分别收获晒干脱粒、备用。

1.2.3 转化植株的抗性筛选和 PCR 检测 将收获的种子播于人工气候室的育苗盘中,培养基质为蛭石。*T₀* 植株长到三叶一心时用浓度为 0.1 % 的草丁膦进行涂抹^[23]。7 d 后,选取草丁膦抗性的植株,用

CTAB 法提取叶片总 DNA,利用 PCR 对目的基因 *bar* 进行检测。扩增体系:PCR 反应总体积 25 μL;95 预变性 5 min;95 变性 30 s,63 退火 30 s,72 延伸 35 s,30 个循环;72 延伸 7 min。取扩增产物 3 μL 于 1 % 的琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 PCR-Southern 检测 取经 PCR 鉴定呈阳性的植株进行 Southern 检测,同时以质粒为模板在相同引物和条件下进行 PCR,扩增产物作为阳性对照;以未转基因的自交系 178 的基因组 DNA 为模板,在相同引物和条件下进行 PCR,扩增产物作为阴性对照。然后分别取 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,Southern blotting 按常规方法进行。探针标记和杂交检测按照 Roche 公司的地高辛试剂盒的方法进行,杂交温度为 65 。

2 结果与分析

2.1 载体的构建

2.1.1 正义表达载体的构建与鉴定 对质粒

pGreen0029-*ZmPti1*-GFP 用 *Bam*H 和 *Kpn* 双酶切, 得到约 1 000 bp 大小的片段, 即 *ZmPti1* 基因的 cDNA 全长, 回收。用 *Bam*H 和 *Kpn* 双酶切质粒 pBPC-p5cs-F129A, 回收约 6 700 bp 的大片段。通过连接, 把 *ZmPti1* 基因连接到经过 *Bam*H 和 *Kpn* 酶切的 pBPC-p5cs-F129A 大片段上, 得到中间载体 pBPC-*ZmPti1*。用 *Kpn* 单酶切 pBPC-p5cs-F129A 载体, 得到含有一个 Ubiquitin 启动子和 *bar* 基因大小为 2 800 bp 的片段, 回收得到片段 a。再将中间载体 pBPC-*ZmPti1* 用 *Kpn* 酶切回收得到片段 b。然后将片段 a 连接到片段 b 上, 构建成 *ZmPti1* 基因正义表达载体 pBPC-*ZmPti1*-*bar* (图 1)。

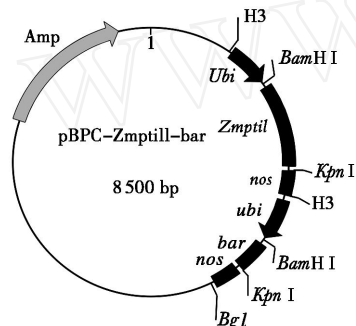
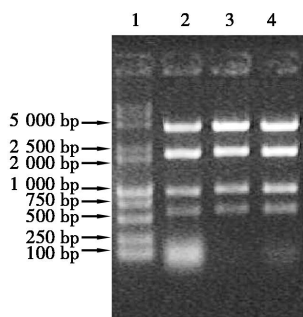


图 1 正义表达载体 pBPC-*ZmPti1*-*bar* 的质粒图谱

Fig. 1 Enzyme restriction sites of pBPC-*ZmPti1*-*bar*

正义表达载体是一个双价载体, 鉴定时, 分别用 *Bam*H 和 *Kpn* 双酶切验证 (图 2)。用双酶切得到的 4 个 DNA 片段, 分别是 1 000 bp 的 *ZmPti1* 基因片段, 含有 nos 和 Ubiquitin 启动子的 2 250 bp 的片段, 大小为 550 bp 的 *bar* 基因片段, 4 700 bp 的载体骨架大片段。最后经测序验证载体构建正确。



1. DL 15 000 kb DNA marker; 2~4. pBPC-*ZmPti1*-*bar* 经 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切。

1. DL 15 000 kb DNA marker; 2~4. Double restriction of pBPC-*ZmPti1*-*bar* by *Bam*H I and *Kpn* I.

图 2 质粒载体 pBPC-*ZmPti1*-*bar* 酶切鉴定

Fig. 2 Restriction identification of pBPC-*ZmPti1*-*bar*

2. 1. 2 RNAi 载体的构建与鉴定 选取 *ZmPti1* 基因编码区 400 bp 的序列作为靶序列构建 RNA 干扰载体。设计正向的上下游引物分别为 P1 和 P2; 反向的上下游引物分别为 P5 和 P6, 以质粒 pGreen0029-*ZmPti1*-GFP 为模板, 分别以 P1 和 P2, P5 和 P6 为上

下游引物, 引入不同酶切位点, 扩增出 400 bp 的片段; 以 pGreen0029-*ZmPti1*-GFP 为模板, P3 和 P4 为上下游引物, 扩增出 750 bp 的片段。再将 3 个片段分别连接到 T 载体上, 测序验证后, 按照相应的酶切位点连接到 pGreen0029 上, 得到中间载体 pGreen0029-*ZmPti1*。用酶 *Bam*H 和 *Kpn* 酶切质粒 pBPC-p5cs-F129A, 回收约 6 700 bp 的大片段 c。再同时将中间载体 pGreen0029-*ZmPti1* 用酶 *Bam*H 和 *Kpn* 酶切, 得到约 1 500 bp 的片段 d。通过连接, 把小片段 d 连接到大片段 c 上, 得到中间载体 pBPC-*ZmPti1*-GFP。用 *Kpn* 单酶切 pBPC-p5cs-F129A 载体, 得到一个含有 Ubiquitin 启动子和 *bar* 基因、大小为 2 800 bp 的片段 a。再将中间载体 pBPC-*ZmPti1*-GFP 用 *Kpn* 酶切回收得到片段 e。然后将片段 a 连接到片段 e 上, 构成 *ZmPti1* 基因的 RNAi 载体 pBPC-PtS-gfp-PtAS-*bar* (图 3)。

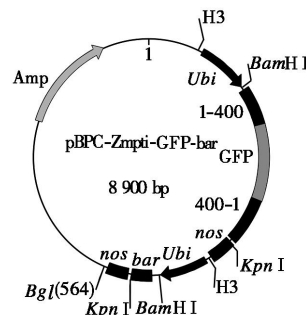
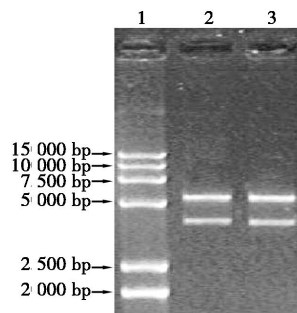


图 3 RNAi 表达载体 pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar* 的质粒图谱

Fig. 3 Enzyme restriction sites of pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar*

RNAi 载体是一个双价载体, 鉴定时, 用 *Bam*H 单酶切验证 (图 4)。酶切得到含有 1-400、GFP、400-1、nos 和 Ubiquitin 启动子大小为 3 800 bp 的小片段, 及大小为 5 200 bp 的大片段。最后经测序验证载体构建正确。



1. DL 15 000 kb DNA marker; 2, 3. pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar* 经 *Bam*H I 酶切。

1. DL 15 000 kb DNA marker; 2, 3. Restriction of pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar* by *Bam*H I.

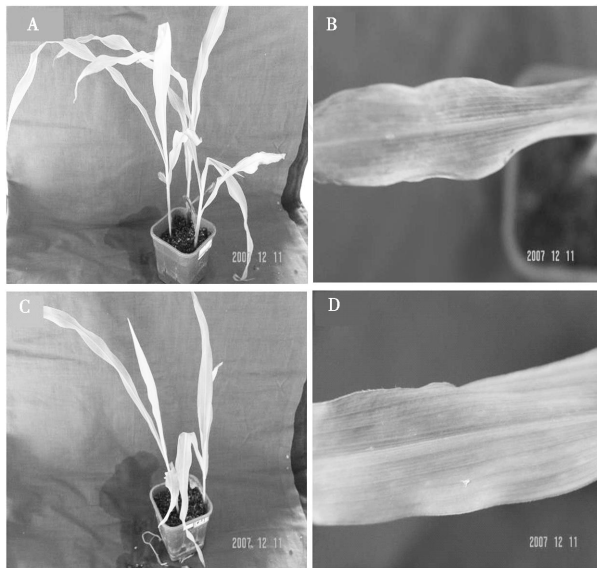
图 4 质粒载体 pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar* 酶切鉴定

Fig. 4 Restriction identification of pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar*

2. 2 抗除草剂植株的获得

田间转化使用的方法是花粉管通道法, 共转化

植株 78 株,收获 56 穗玉米,得到玉米种子约 1 100 粒。将收获的种子播种于人工气候室。植株长到三叶一心时,用 0.1 % 的草丁膦涂抹心叶。涂抹除草剂 7 d 后,大部分植株叶片涂抹除草剂地方呈黄斑,黄斑的周边呈干枯状向叶片基部蔓延(图 5-A,B);未转基因的对照植株与上述症状相似,14 d 后大部分植株上部叶片干枯,植株生长缓慢。获得 40 株植株生长发育正常,叶片颜色没有黄化、干枯状等症状,表现为草丁膦抗性(图 5-C,D)。将除草剂抗性植株移栽到 30 cm ×30 cm ×30 cm 装有营养土的木箱中,每个木箱栽 4 株,进行后续检测和自交收获种子。



A. 无抗性植株;B. 无抗性植株叶片;
C. 转基因植株;D. 转基因植株叶片。
A. Non-resistance plant;B. Blade of non-resistance plant;
C. Transgenic plants;D. Blade of transgenic plants.

图 5 抗性植株筛选

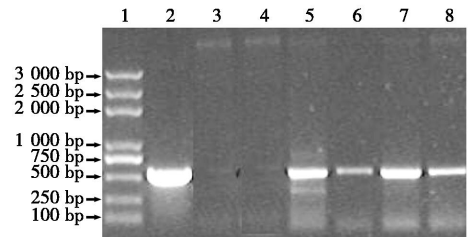
Fig. 5 Screening with glufosinate

2.3 转基因植株的分子检测

2.3.1 PCR 鉴定 对筛选到的 40 株抗性植株进行 PCR 检测。PCR 扩增的引物为 *bar* 基因的上下游引物,扩增产物大小应为 550 bp,其中转质粒 pBK-ZmPti1-*bar* 的阳性植株 15 株,转质粒 pBPC-PtS-GFP-PtAS-*bar* 的阳性植株 18 株,由于篇幅有限,只列出部分检测结果(图 6)。以未转基因的玉米自交系 178 和没有草丁膦抗性的转化植株的基因组 DNA 为模板进行扩增,未扩增出特异性条带。经过 PCR 检测,40 株草丁膦抗性植株中有 33 株是转基因植株。

2.3.2 PCR-Southern 鉴定 为进一步验证目的基因重组到玉米基因组中,对 PCR 鉴定为阳性的 33 个株系进行 PCR-Southern 印迹分析。采用地高辛标记 DNA 探针及检测试剂盒,杂交探针为 *bar* 基因。检测结果与 PCR 鉴定结果一致,33 个株系全部为阳性,而对照植株没有杂交信号,由于篇幅有限,文中

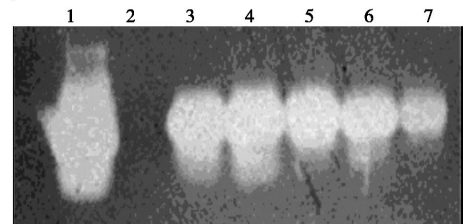
只列出 5 个株系的检测结果(图 7)。证明该基因已经整合到了受体基因组中。



1. DNA marker DL 3000;2. 阳性质粒;
3. 非转基因植株;4. 无抗性植株;5~8. 转基因植株。
1. DNA marker DL3000;2. Plasmid control;3. Non-transgenic control plant;4. Non-resistance control plant;5~8. Transgenic plants.

图 6 部分转基因植株的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of partial transgenic plants



1. 阳性质粒对照;2. 非转基因植株;3~7. 转基因植株。
1. Plasmid control;2. Non-transgenic control;3~7. Transgenic plants.

图 7 部分转基因植株的 PCR Southern 鉴定

Fig. 7 PCR-Southern blotting identification of partial transgenic plant

3 讨论

RNAi 技术是将人工合成或载体表达的双链 RNA (siRNA) 导入真核细胞,抑制内源 RNA 进一步合成,高效特异阻断体内特定基因的表达,诱使细胞表现出特定基因缺失表型,获得功能丧失或降低的突变体^[24]。RNAi 技术的关键是设计构建载体,在构建载体时,外显子序列的 dsRNA 能产生特异和高效率的基因抑制作用^[25]。关于 RNAi 载体靶基因序列的选取,Elbashir 等^[26]建议应在基因转录起始位点下游 100 个核苷酸以后,且该段 DNA 的 GC 含量在 40 % ~ 70 % 的范围内。本研究构建的 *ZmPti1* 基因的 RNA 干涉载体,选择该基因的编码区 400 bp 的保守序列作为靶序列,并在目的基因的正向和反向片段之间导入了一个大小为 750 bp 的 *GFP* 基因,可以提高正义和反义 RNA 形成双链 RNA 的效率,有利于产生 siRNA^[26-28]。

在花粉管通道法转化试验中,受体是玉米自交系 178,两种载体共转化了 78 株玉米,收获 56 穗。本试验在夏季进行,授粉时间为上午 10:00,其中有 8 株是在阴雨天进行的授粉,均未收获果穗。由于花粉质量和转化效率都可能受天气的影响,因此花粉管通道法进行玉米转化时,最好选择晴天进行;若

遇阴雨天,可再次授粉以降低天气对转化产生的不良影响。导入时间对转化效率有影响,授粉后 4 h 导入外源基因转化效率较低,8~20 h 转化效率较高。花粉管通道法的优点:导入的基因可以不带筛选标记,不会对环境和人类造成危害;采用该方法选系稳定、速度快,一般在导入后自交 3 代即可稳定;该方法无需昂贵的设备,操作简单,易于推广^[29]。

本试验分别构建了 *ZmPti1* 基因的正义载体和 RNAi 载体,正义表达载体带有 Ubiquitin 启动子和 *ZmPti1* 基因开放阅读框, *bar* 基因作为筛选标记; RNAi 载体带有 Ubiquitin 启动子和 *ZmPti1* 基因的一段序列, *bar* 基因作为筛选标记。花粉管导入法转化玉米,获得转正义载体的 T_0 植株共 15 株,转 RNAi 载体的 T_0 植株中共 18 株。对转基因植株的生长发育进行初步的研究,发现两种转化植株的抗病性存在一定的差异。转正义载体的 T_0 植株发育正常;转 RNAi 载体的 T_0 植株中有 9 株植株的叶片发现较严重的病斑。这一结果提示, *ZmPti1* 基因在玉米中可能与抗病性有关。拟进一步对转基因玉米进行生物和非生物胁迫处理,检测该基因的表达丰度,并检测植株在不同逆境下的生理指标,进一步明确蛋白激酶 *ZmPti1* 在玉米抗逆信号途径中的作用。

在参与环境胁迫信号的传递方面,蛋白激酶可以通过多重复杂的信号传递途径对干旱、高盐及低温作出反应,不同传递途径之间存在交叉转导作用,目前,人们对植物蛋白激酶的功能仍然不甚了解。本研究构建了玉米蛋白激酶 *ZmPti1* 基因的正义载体和 RNAi 载体,并通过花粉管通道的方法将载体转到玉米自交系植株中,并得到经过 PCR-southern 检测的转基因植株, T_0 转基因植株在抗病性方面已表现出差异。

参考文献:

- [1] Tina R. Protein kinases in the plant defence response[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4: 407 - 414.
- [2] Rudrabhatla P, Rajasekharan R. Mutational analysis of stress-responsive peanut dual specificity protein kinase[J]. J Bio Chem, 2003, 278: 17328 - 17335.
- [3] Trojaneck J B, Klimecka M M, Fraser A, et al. Characterization of dual specificity protein kinase from maize seedlings[J]. Acta Biochimica Polonica, 2004, 51: 635 - 647.
- [4] Kim K N, Cheong Y H, Grant J J, et al. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in arabidopsis[J]. Plant Cell, 2003, 15: 411 - 423.
- [5] Boudsocq M, Laurie C. Osmotic signaling in plants multiple pathways mediated by emerging kinase families[J]. Plant Physiol, 2005, 138: 1185 - 1194.
- [6] Syam Prakash S R, Jayabakaran C. Heterologous expression and biochemical characterization of two calcium-dependent protein kinase isoforms CaCPK1 and CaCPK2 from chickpea[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163: 1083 - 1093.
- [7] Sheen J. Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants[J]. Science, 1996, 274: 1900 - 1902.
- [8] Botella J R, Arceca J M, Somodevilla M J, et al. Ca^{2+} -dependent protein kinase and stress signal transduction in plants[J]. Plant Mol Biol, 1996, 30(6): 1129 - 1139.
- [9] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L, encode transcription activators that function in drought, high salt and cold-responsive gene expression[J]. Plant J, 2003, 33(4): 751 - 763.
- [10] Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase[J]. Plant Cell, 2003, 15(3): 745 - 759.
- [11] 杨洪强, 梁小娥. 蛋白激酶与植物逆境信号转导[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(3): 185 - 191.
- [12] Martin G, Brommonschenkel S, Chunwongse J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. Science, 1993, 262: 1432 - 1436.
- [13] Zhou J, Loh Y T, Bressan R A, et al. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response[J]. Cell, 1995, 83: 925 - 935.
- [14] Staswick P. Two expressed soybean genes with high sequence identity to tomato *Pti1* kinase lack autophosphorylation activity[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 383: 233 - 237.
- [15] Hanks S K, Quinn A M, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains[J]. Science, 1988, 241: 42 - 52.
- [16] Sessa G, D'Ascenzo M, Martin G B. The major site of the *Pti1* kinase phosphorylated by the Pto kinase is located in the activation domain and is required for Pto-*Pti1* physical interaction[J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 171 - 178.
- [17] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance genes[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 575 - 607.
- [18] Tian A G, Luo G Z, Wang Y J, et al. Isolation and characterization of a *Pti1* homologue from soybean[J]. J Exp Bot, 2004, 396: 535 - 537.
- [19] Zou H W, Wu Z Y, Yang Q, et al. Gene expression analyses of *ZmPti1*, encoding a maize Pti-like kinase suggest a role in stress signaling[J]. Plant Science, 2006, 171: 99 - 105.
- [20] 肖雪, 张秀海, 杨清, 等. 玉米蛋白激酶在转基因拟南芥中的定位[J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 1 - 4.
- [21] Sambrook J, Russell D W. Molecule Clone: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001: 2 - 110.
- [22] 祁永红. 大豆 DNA 直接导入玉米自交系的研究[J]. 玉米科学, 2000, 8(1): 34 - 36.
- [23] 梁雪莲, 郭平毅, 孙毅, 等. 玉米 3 种非组培转基因方法转化外源 *bar* 基因研究[J]. 作物学报, 2005, 31(12): 1648 - 1653.
- [24] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans* [J]. Plant Cell, 1990, 4: 279 - 289.
- [25] Smith N A, Singh S P, Wang M B, et al. Total silencing by intron spliced hairpin RNAs[J]. Nature, 2000, 407: 319 - 320.
- [26] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188 - 200.
- [27] Wesley S M, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. The Plant Journal, 2001, 27: 581 - 590.
- [28] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Gene Dev, 2002, 16: 948 - 958.
- [29] 祁永红. 花粉管通道法在玉米自交系改良中的应用[J]. 黑龙江农业科学, 2006(3): 17 - 19.