



研究报告

A Letter

棉花硝酸盐高亲和转运蛋白基因 NRT_2 片段克隆及 RNA 干扰表达载体构建

郑丽玲², 张伟¹, 李艳军¹, 马玲玲¹, 魏延宏¹, 张薇¹

1 石河子大学农学院/石河子大学绿洲生态实验室, 石河子, 832003

2 石河子大学生命科学学院, 石河子, 832003

✉ 通讯作者: zhw_agr@shzu.edu.cn 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 102 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0102

收稿日期: 2011 年 07 月 27 日

接受日期: 2011 年 09 月 06 日

发表日期: 2011 年 09 月 19 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

郑丽玲等, 2011, 棉花硝酸盐高亲和转运蛋白基因 NRT_2 片段克隆及 RNA 干扰表达载体构建, 分子植物育种(online) Vol.9 No.102 pp.1735-1740 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0102)

引用格式(英文):

Zheng et al., 2011, Cotton High-affinity Nitrate Transporter gene NRT_2 Cloning and RNA Interference Expression Vector, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.102 pp.1735-1740 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0102)

摘要 以低氮(0.2 mmol/L)胁迫 4 h 的氮高效棉花品种新陆早 12 号为材料, 提取棉花总 RNA, 根据蓖麻和杨树的 NRT_2 基因保守序列设计含酶切位点的特异引物, 用 RT-PCR 技术获得 350 bp 的片段。将此片段以正向和反向插入到中间载体 pUCM-T 的 GUS 内含子序列两端。将正向片段-GUS-反向片段插入 pPZP35S, 通过酶切和 PCR 鉴定, 成功构建 RNAi 载体, 并成功转入农杆菌 GV3101 中, 为研究棉花硝酸盐高亲和转运蛋白基因 NRT_2 的功能奠定一定的基础。

关键词 棉花; NRT_2 基因; RNA 干扰表达载体

Cotton High-affinity Nitrate Transporter Gene NRT_2 Cloning and RNA Interference Expression Vector

Zheng Liling², Zhang Wei¹, Li Yanjun¹, Ma Linlin¹, Wei Yanhong¹, Zhang Wei¹

1. Shihezi University of Agriculture/Shihezi University of Oasis Ecology Laboratory, Shihezi, 832003, P.R. China

2 College of Life Sciences Shihezi University, Shihezi, 832003, P.R. China

✉ Corresponding author, zhw_agr@shzu.edu.cn; Authors

Abstract With low nitrogen (0.2 mmol/L) 4 h nitrogen stress cotton varieties Xinluzao high 12 for the material, total RNA was extracted in cotton, according to Castor and poplar NRT_2 gene sequences with conserved restriction sites of the primers used RT-PCR technique to obtain 350 bp fragment. This fragment in forward and reverse into the intermediate plasmid pUCM-T of the GUS intron ends. The forward fragment-GUS-reverse fragment was inserted into pPZP35S, by restriction enzyme digestion and PCR, results for the successful construction of RNAi vectors, and successfully transferred to Agrobacterium GV3101, in order to study high-affinity nitrate transporter of cotton gene NRT_2 function lay a foundation.

Keywords Cotton; NRT_2 gene; RNA interference expression plasmid

研究背景

氮素是作物生长发育不可缺少的多量元素之一, 是提高作物产量和改善品质的重要营养元素, 在作物生产中具有极其重要的作用。棉花是我国重要的经济作物, 又是需氮量很大的作物, 近年, 随着人们对棉花产量需求的提高, 化学氮肥的施用量也急剧增加, 而氮肥的利用率却不断下降。吕殿青等(1998)研究表明, 我国氮肥的平均利用率仅为 30%~35%。氮肥利用率低不但加大了棉花生产成本, 造成氮肥资源的巨大浪费, 而且还导致地下水

的污染和地表水的富营养化, 对生态环境产生了严重的负面影响, 阻碍了棉花生产健康可持续发展。

高亲和 NO_3^- 转运蛋白(NRT_2)在结构上属于硝酸盐-亚硝酸盐共转运蛋白家族, NRT_2 的 C 端, N 端和亲水结构域都位于胞质一侧, 对于 NRT_2 的研究, Trueman 等(1996)第一次从大麦中克隆了作物。 NRT_2 基因编码的蛋白都呈现相似的结构特征, 分子大小在 54~65 kD。具有 12 个跨膜域。作物吸收的氮素主要是无机态氮, 包括硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)两种。张维理等(1995)植物通过根系吸收,

将硝态氮和铵态氮由体外转入体内是氮素代谢的第一步, 它不仅受外界环境的影响, 同时也受植物自身内在因素的影响。研究表明, 作物根系对土壤中 NO_3^- 和 NH_4^+ 的吸收和它们在植株器官、组织中的转运是由位于细胞原生质膜氮素转运蛋白介导来完成的。植物中氮素转运蛋白在改善植物氮胁迫条件下的氮素吸收和利用效率具有重要作用。因此, 利用基因工程克隆棉花硝酸盐高亲和转运蛋白基因, 并通过转基因技术培育棉花氮高效品种, 对减少氮的浪费, 提高氮的利用率具有十分重要的意义。

李加瑞等(2005) RNAi 是指小的双链 RNA (double-stranded RNA) 阻碍生物体内特定基因表达, 使 mRNA 降解, 使特定基因失活细胞表现出缺陷表型的过程。自 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术诞生以来, 该技术得到迅速发展, 为作物品质改良提供了新技术, 已在 Pinto 等(1999)水稻、Abbott 等(2000)小麦, Subramanian 等(2005)大豆等多种作物的品质, 抗逆改良中得到成功应用。

NRT2 基因在水稻等作物中得到较好的利用, 而对于棉花至今还没有相关的研究报道, 利用分子生物学方法克隆棉花硝酸盐高亲和转运蛋白基因片段, 以此为靶基因构建了棉花 *NRT2* 基因的 RNA 干扰表达载体, 为进一步研究该基因的功能奠定一定的基础。

1 结果与分析

1.1 棉花总 RNA 的提取

用 CTAB 法, 提取低氮胁迫处理的棉花根部的总 RNA。经分光光度计测定 $OD_{260}/OD_{280}=1.80\sim 2.00$, $OD_{260}/OD_{280}=2.00\sim 2.35$, 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的两倍(图 1), 说明 mRNA 质量良好, 符合实验所需。

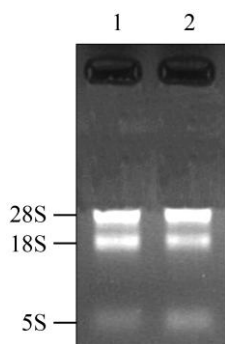


图 1 棉花根部总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

注: 1, 2: 棉花根部总 RNA

Figure 1 Cotton root total RNA agarose gel electrophoresis

Note: 1, 2: Roots of cotton total RNA

1.2 正反向目的片段的克隆与鉴定

将提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 分别用正反向引物扩增目的片段, 扩增产物经凝胶电泳检测, 与预期一致, 获得长约 350 bp 的两条 DNA 片段(图 2)。将正反向片段分别克隆到 pGEM-T 载体上, 各挑取 PCR 鉴定正确的两个阳性克隆进行测序, 测序得到正反向序列大小均为 350 bp, 经 DNAMAN 比对与蓖麻的同源性为 80%, 与杨树的同源性为 79%。

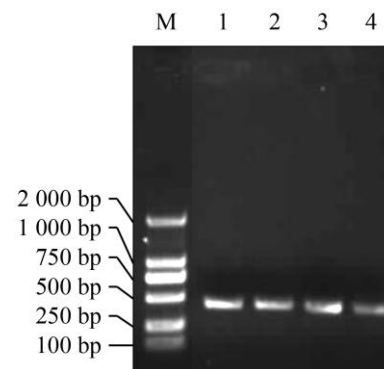


图 2 *NRT2* 正向序列 *NRT2w* 与反向重复序列 *NRT2v* 的扩增产物

注: M: DL2000 marker; 1, 2: 正向序列 *NRT2w* 的扩增产物; 3, 4: 反向重复序列 *NRT2v* 的扩增产物

Figure 2 *NRT2* forward and reverse repeat sequences *NRT2w* and *NRT2v* of amplification products and sequences (Here is the sequence obtained from fragments)

Note: M: DL2000 marker; 1, 2: Forward sequence of the PCR products *NRT2w*; 3, 4: Inverted repeats *NRT2v* the PCR products

1.3 中间载体的构建

将正向克隆的质粒 pGEM-*NRT2w* 经 *Sac* I 和 *Nco* I 完全双酶切后, 获得约 350 bp 的条带(图 3C, 泳道 1 所示), 回收该片段。pUCM-T 质粒经 *Sac* I 和 *Nco* I 双酶切后, 得到开环的载体骨架(图 3B, 泳道 1 和泳道 2 所示), 大小约为 2 773 bp, 将其回收。正向片段 *NRT2w* 与开环骨架 pUCM-T 连接得到重组子 pUCM-*NRT2A*, 将其转化 DH5 α , 进行 PCR 和酶切检测, 得到 350 bp 的条带(图 3A, 泳道 1 所示; 图 3C, 泳道 3 所示), 进一步经测序进行确认, 说明正义片段已经按正确方向插入到启动子与间隔区之间, 形成了中间载体 pUCM-*NRT2A*。

采用 *Xba* I 和 *Xho* I 分别对 *NRT2v* 的质粒和重组子 pUCM-*NRT2A* 进行双酶切, 前者产生了约 350 bp 目的片段(图 3C, 泳道 2 所示), 后者产生了约 3 100 bp 的开环骨架(图 3C, 泳道 4 所示), 分别将两者回收, 连接重组, 得到干扰载体 pUCM-*NRT2B*,

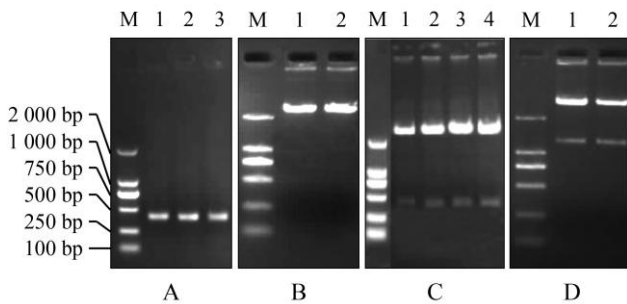


图 3 RNAi 载体 pUCM-NRT₂B 构建中的酶切和 PCR 鉴定
注: M: DL2000 A marker; A: 1: pUCM-NRT₂A 的 PCR; 2, 3: pUCM-NRT₂B 的 PCR; B: 1, 2: *Sac* I 和 *Nco* I 双酶切 pUCM-T; C: 1: *Sac* I 和 *Nco* I 双酶切 pGEM-NRT₂w; 2: *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切 pGEM-NRT₂v; 3: pUCM-NRT₂A 的酶切; 4: pUCM-NRT₂B 的酶切; D: 1, 2: 干扰载体 pUCM-NRT₂B 的酶切

Figure 3 RNAi plasmid pUCM-NRT₂B digestion and PCR identification in the built

Note: M: DL2000 A marker; A: 1: pUCM-NRT₂A of PCR; 2, 3: pUCM-NRT₂B of PCR; B: 1, 2: *Sac* I and *Nco* I double digestion pUCM-T; C: 1: *Sac* I and *Nco* I double digestion pGEM-NRT₂w; 2: *Xba* I and *Xho* I double digestion pGEM-NRT₂v; 3: pUCM-NRT₂A of digestion; 4: pUCM-NRT₂B of digestion

转化 *DH5α*, 进行 PCR 和酶切检测, 分别得到 350 bp 和 1 200 bp 左右的条带(图 3A, 泳道 2 和泳道 3 所示; 图 3D, 泳道 1 和泳道 2 所示), 说明 pUCM-NRT₂B 干扰载体构建成功。

1.4 RNAi 表达载体构建及鉴定

将重组子 pUCM-NRT₂B 和 pPZP35S 分别用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶进行双酶切, 分别回收 pPZP35S 大片段和重组子 pUCM-NRT₂B 的目的片段, 将两者连接, 得到干扰表达载体 pPZP35S-NRT₂B。将构建好的干扰载体通过电击法转入农杆菌 GV3101 中, 对转化菌落提取质粒并以(表 1)中的引物进行 PCR 验证, 分别得到 350 bp 左右的片段(图 4)。PCR 检测结果显示已成功构建了具有 pPZP35S-NRT₂B 表达框架的植物载体(图 5), 构建的 RNAi 载体已进行了烟草叶片转染, 鉴定正在等待之中。

2 讨论

RNA 干扰是真核细胞本身固有的生理发展调节机制和对抗外源基因及其侵害的一种自我保护现象, 在利用 RNA 干扰引发的基因沉默当中, 效率要比传统的反义 RNA 诱导的基因沉默高得多, 并且能够稳定表达, 这使得 RNA 干扰技术成为抑制

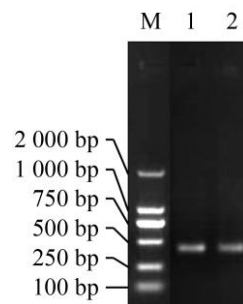


图 4 转化农杆菌的 PCR 验证

注: M: DL2000 marker; 1: 正向序列 NAR₂w 的扩增结果; 2: 反向重复序列 NAR₂v 的扩增结果

Figure 4 Agrobacterium transformation of the PCR verification
Note: M: DL2000 marker; 1: Forward sequence results of amplification NAR₂w; 2: Reverse repeats sequence of amplification NAR₂v results

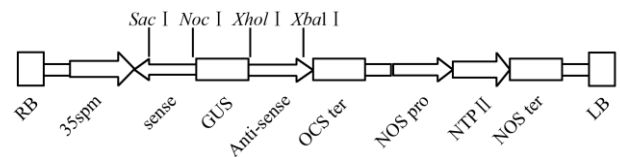


图 5 pPZP35S-NRT₂B 表达框架结构示意图

注: RB: 右边界; 35spm: 35S 启动子; sense: 正向片段; GUS: GUS 内含子; Anti-sense: 反向片段; OCS ter: OCS 终止子; NOS pro: NOS 启动子; NPT II: 新霉素磷酸转移酶基因; NOS ter: NOS 终止子; LB:左边界

Figure 5 pPZP35S-NRT₂B expression framework diagram
Note: RB: Right border; 35S: 35S promoter; sense: Fragment in sense orientation; GUS: GUS intron; Anti-sense: Fragment in anti-sense orientation; OCS ter: OCS terminator; NOS pro: NOS promoter; NPT II: Neomycin phosphotransferase gene; NOS ter: NOS terminator; LB: Left border

基因表达的高效可靠的技术。近年来, 朱见明等(2011) RNAi 技术广泛应用于基因功能的分析验证, 构建合适的载体是 RNAi 的关键, 本研究所构建的 RNA 干扰表达载体是含 GUS 内含子的一种发夹结构, 具有较高的干扰效率, 是目前研究的热点。Napoli 等(1990)利用 RNA 干扰技术证明了 RNAi 对大豆子叶中 IFS 基因的功能作用。李小平等采用 RNA 干扰技术证明了大豆叶片衰老与大豆 LRP 型类受体蛋白激酶基因 *rlpk2* 有关。Hirota 等(2006)利用 RNA 干扰技术表明了豆科植物根瘤素合成基因 *ENOD40* 对根瘤的出现和生长是必需的。

徐海荣等(2007) NO₃ 转运蛋白基因已在水稻, 小麦, 蓖麻, 杨树等植物中获得克隆, 但在棉花中还没报道, 在植物体内的表达具有组织特异性, *NRT*₂

表 1 干扰载体正向与反向重复序列的引物序列

Table 1 Interference plasmid with the forward and reverse primers Sequence

引物名称	引物序列	酶切位点
Primer name	Primers	Restriction sites
Fw1	<u>CGAGCTCCTGGGATGACAGGAGGAGGT</u>	Sac I
Fw2	<u>CCCATGGGTGCCGATGGAGTAGCATTAGAG</u>	Nco I
Fv1	<u>GCTCTAGACTGGGATGACAGGAGGAGGT</u>	Xba I
Fv2	<u>CCCTCGAGTGCCGATGGAGTAGCATTAGAG</u>	Xho II

注: Fw2 和 Fv2 分别表示下游引物; Fw1 和 Fv1 分别表示上游引物; Fw1 和 Fw2 用于棉花硝酸盐高亲和和转运蛋基因正向目的片段扩增; Fv1 和 Fv2 用于棉花硝酸盐高亲和和转运蛋基因反向目的片段扩增

Note: Fw2 and Fv2 stand for reverse prime; Fw1 and Fv1 stand for forward primer; Fw1 and Fw2 high affinity for cotton nitrate transporter gene and amplification of the forward fragment; Fv1 and Fv2 high affinity for cotton nitrate transporter protein gene fragment amplified by the reverse

家族成员多具有器官和组织的特异性, 有些基因的表达还受到植物生长和发育状况的影响, 植物中的很多 NO₂⁻ 转运蛋白基因优先在根部表达。杜培粉等(2009)如烟草和拟南芥, 其中烟草的叶片, 叶柄, 芽, 花及种子中只检测到了微量的 NRT₂ 基因的表达, 拟南芥的 NRT₂ 基因在茎中的表达量仅为根部的 1%。高亲和和氮高效基因 NRT 家族不仅具有运输 NO₃⁻, 而且具有运输氨基酸, 氯酸盐的作用。此外 NRT 家族成员还参与作物生长, 发育的调节。

选择适当的片段是 RNAi 载体构建关键因素。魏海燕等(2008)研究表明, 基因片段大小在 23~1 kb 都能得到理想的干扰效果。Wesley 等(2001)还有研究表明, 干扰片段的长度对基因干扰有影响, 干扰片段在 50~500 bp 之间, 随着片段大小的增加, 干扰效率提高。陈新等(2007)基因片段太短构建操作困难, 而且过短的 dsRNA 很难被 DICER 酶识别; 过长的基因片段在构建载体操作中很容易引起片段重组, 并且太长的 dsRNA 结构本身不稳定。因此, 最佳基因片段大小应该在 200~600 bp 左右, 利于转化验证和外源基因在转基因植株中的稳定遗传。所以, 本研究设计选取 350 bp 的干扰片段, 目的是有效抑制靶标基因的表达。

本研究构建了硝酸盐高亲和和转运蛋基因的 RNA 干扰载体, 以正向和反向重复序列插入到中间载体 pUCM-T 的内含子两端, 利用 pPZP35S 作为桥梁载体, 成功构建 RNA 干扰表达载体 pPZP35S-NAR₂B。下一步工作将通过农杆菌介导法将植物表达载体 pPZP35S-NAR₂B 转入到烟草中, 利用 RT-PCR 快速检测其对硝酸盐高亲和和转运蛋基因的的干扰效果, 如得到较好的干扰效果将进一步探索在棉花植株上诱导 RNAi 的条件。

3 材料与方法

3.1 实验材料

3.1.1 植物材料

新陆早 12 号(由石河子大学农学院育种教研室提供)采用水培(霍格兰营养液)方法, 待棉花幼苗长至三叶一心时进行低氮(0.2 mmol/L)胁迫处理 4 h 后取棉花根部, 液氮速冻后于-80℃保存。

3.1.2 菌株和载体

大肠杆菌菌株(*Escherichia coli*) DH5 α , 根瘤农杆菌菌株(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101, 含有 GUS 的内含子序列的中间载体 pUCM-T 由园艺系实验室惠赠, 植物表达载体 pPZP35S 由石河子大学绿洲生态作物分子生物学实验室保存。

3.1.3 试剂

限制性内切酶 Sac I, Nco I, Xba I, Xho I, Taq DNA 聚合酶, T₄DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司, 其他生化试剂均为国产分析纯。

3.1.4 引物设计及合成

根据蓖麻和杨树的 NRT₂ 基因保守序列, 并通过软件分析酶切位点, 设计两对引物(表 1)。

3.2 方法

3.2.1 目的片段的克隆及序列测定

用 CTAB 法提取棉花根部总 RNA, 用 TIAN-Script cDNA 第一链合成试剂盒反转录成 cDNA, 以反转录的 cDNA 为模板, 分别用正反向目的片段的引物, 通过 RT-PCR 方法扩增得到棉花高亲和和硝酸盐转运蛋白基因的正向序列 NRT_{2w} 和反向重复序列 NRT_{2v} 的目的片段, 反应程序: 94℃预变性 4 min;

94℃变性 1 min; 54℃退火 45 s; 72℃延伸 45 s, 25 个循环; 72℃延伸 10 min。将获得的基因片段连接 pGEM-Teasy 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 。经菌液 PCR 鉴定和酶切鉴定正确后, 挑取 2 个阳性克隆, 送上海生工生物工程技术有限公司测序。

3.2.2 棉花 NRT₂ 基因 RNA 干扰载体的构建

用正向克隆的质粒 pGEM-NRT_{2w} 和 pUCM-T 的质粒, 进行 *Sac* I 和 *Nco* I 的双酶切至完全, 电泳后回收正向片段和开环的 pUCM-T 骨架, 采用 T₄DNA 连接酶将两者于 4℃连接过夜, 得到重组子 pUCM-NRT_{2A}, 转化 DH5 α , PCR 鉴定和酶切鉴定筛选阳性克隆。

采用 *Xba* I 和 *Xho* I 分别对重组子 pUCM-NRT_{2A} 和反向克隆的质粒 pGEM-NRT_{2v} 进行完全双酶切, 电泳后回收 pUCM-NRT_{2A} 和反向片段, 采用 T₄DNA 连接酶将两者于 4℃连接过夜, 得到重组子 pUCM-NRT_{2B}, 转化 DH5 α , PCR 鉴定和酶切鉴定筛选阳性克隆, 阳性克隆即为棉花 NRT₂ 基因的 RNA 干扰载体。

3.2.3 RNAi 表达载体在农杆菌中的转化与鉴定

从鉴定无误的大肠杆菌中提取重组子的质粒, 将得到的重组质粒用 *Sac* I 和 *xba* I 双酶切, 切下含正向序列、反向重复序列和内含子间隔序列的目标片段, 并进行回收。再用 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pPZP35S, 回收大片段。将目标片段与回收的 pPZP35S 载体大片段用 T₄DNA 连接酶在 4℃下连接过夜, 转化筛选阳性克隆即得 RNA 干扰载体 pPZP-35S-NRT_{2B}。利用电击法将重组质粒 pPZP35S-NRT_{2B} 转化到农杆菌 GV3101 中, 将菌液涂布于 TYE (20 μ g/mL Rifa+50 μ g/mL Kna) 固体培养基中, 于 28℃条件下培养 2 d, 挑取单菌落进行 PCR 检测。

作者贡献

郑丽玲、张伟和张薇是本研究的主要执行人; 郑丽玲, 张伟完成数据分析, 论文初稿的写作; 李艳军, 马玲玲和魏延宏参与实验设计, 试验结果分析; 张薇是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由石河子大学科学技术研究发展计划“动植物育种专项计划项目”转基因专项子专(2008ZX08005-005)资助。作者感谢石河子大学李艳军老师在本实验过程中的技术支持和有益的建议。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和

修改建议。本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商和测序服务商, 这并非我们为这些试剂供应商和测序服务商的产品和服务提供推荐或背书。

参考文献

- Abbott D.C., Wang M.B., and Waterhouse P.M., 2000, A single copy of a virus-derived transgene-encoding hairp in RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus, *Molecular Plant Pathology*, 1(6): 347-356
- Chen X., Liu Q.Z., Li Y.X., Lv H.Z., Liang Y.Q., Zhang S.G., Shao J.P., and Zhang Y.H., 2007, RNAi expression vector construction of α -farnesene synthase gene from Yali Pear (*Pyrus breschneideri* Rehd), *Shengwu Jishu Tongxun (Lett Biotechnologie)*, 18(5): 786-788 (陈新, 刘庆忠, 李杨昕, 吕慧贞, 梁雅芹, 张士刚, 邵建萍, 张元湖, 2007, 鸭梨一法尼烯合成酶基因双链RNAi表达载体的构建, *生物技术通讯*, 18(5): 786-788)
- Du P.F., Wu L.T., Yao Y.T., Yi F., Ruan Y., and Liu C.L., 2009, Construction of the RNAi Vector of *AtTPS03* gene and *Arabidopsis* Transformation, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(3): 451-455 (杜培粉, 伍林涛, 姚远甄, 尹峰, 阮颖, 刘春林, 2009, *AtTPS03*基因RNA干扰载体的构建及拟南芥转化, *分子植物育种*, 7(3): 451-455)
- Hirota K., Eri K., Robert W.R., and Hiroshi K., 2006, RNAi knock-down of *ENOD40s* leads to significant suppression of nodule formation in *Lotus japonicus*, *Plant Cell Physiol.*, 47(8): 1102-1111
- Li J.R., Zhao W., Li Q.Z., Ye X.G., An B.Y., Li X., and Zhang X.S., 2005, RNA silencing of *Waxy* gene results in low level of Amylose in the seeds of Transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.), *Yichuan Xuebao (Genetics)*, 32(8): 846-854 (李加瑞, 赵伟, 李全梓, 叶兴国, 安宝燕, 李祥, 张宪省, 2005, *Waxy*基因的RNA沉默使转基因小麦种子中直链淀粉含量下降, *遗传学报*, 32(8): 846-854)
- Lv D.Q., Tong Y.A., and Sun B.H., 1998, Study on effect of nitrogen fertilizer use on environment pollution, *Zhiwu Yingyang Yu Feiliao Xuebao (Plant Nutrition and Fertilizer Science)*, 4(1): 8-15 (吕殿青, 同延安, 孙本华, 1998, 氮肥施用对环境污染影响的研究, *植物营养与肥料学报*, 4(1): 8-15)
- Napoli C., Lemieux C., and Jorgensen R., 1990, Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans, *Plant Cell*, 2(4): 279-289
- Pinto Y.M., Kok R.A., and Bandcombe D.C., 1999, Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes, *Nature Biotechnology*, 17(7): 702-707

- Subramanian S., Graham M.Y., Yu O., and Graham T.L., 2005, RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*, *Plant Physiol.*, 137(4): 1345-1353
- Trueman L.J., Richardson A., and Forde B.G., 1996, Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*, *Gene*, 175(1-2): 223-231
- Wei H.Y., Zhang H.C., Hang J., Dai Q.G., Huo Z.Y., Xu K., Zhang S.F., Ma Q., Zhang Q., and Zhang J., 2008, Characteristics of N accumulation and translocation in rice Geno-types with different N use efficiencies, *Zuowuxue Bao (Acta Agronomica Sinica)*, 34(1): 119-125 (魏海燕, 张洪程, 杭杰, 戴其根, 霍中洋, 许轲, 张胜飞, 马群, 张庆, 张军, 2008, 不同氮素利用效率基因型水稻氮素积累与转移的特性, *作物学报*, 2008, 34(1): 119-125)
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., and Waterhouse P.M., 2001, Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants, *Plant J.*, 27(6): 581-590
- Xu H.R., Deng R.L., Cao Y.F., and Xiao K., 2007, Structure, function, expression, and regulation of nitrate transporters in plants, *Caoye Xuebao (Acta Prataculturae Sinica)*, 17(4): 159-165 (徐海荣, 邓若磊, 曹云飞, 肖凯, 2007, 植物 NO₃ 转运蛋白的结构, 功能及基因表达调控, *草业学报*, 17(4): 159-165)
- Zhang W.L., Tian Z.X., Zhang N., and Li X.Q., 1995, Investigation of nitrate pollution in ground water due to nitrogen fertilization in agriculture in north China, *Zhiwu Yingyang Yu Feiliao Xuebao (Plant Nutrition and Fertilizer Science)*, 1(2): 80-87 (张维理, 田哲旭, 张宁, 李晓齐, 1995, 我国北方农用氮肥造成地下水硝酸盐污染的调查, *植物营养与肥料学报*, 1(2): 80-87)
- Zhu J.M., Yan X.B., Shi Y.H., and Wang C.Z., 2011, Cloning of *Medicago sativa* phyochrome B cDNA and establishment of its RNA interference expression vector, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 37(2): 374-379 (朱见明, 严学兵, 史莹华, 王成章, 2011, 紫花苜蓿光敏色素B基因片段克隆及RNA干扰表达载体的构建, *作物学报*, 37(2): 374-379)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>