

番木瓜 β -Gal 基因 RNAi 双 T-DNA 植物表达载体的构建及其遗传转化的初步研究

何玮毅^{a,b}, 陈晓静^{a,b*}, 申艳红^{a,b}, 卢秉国^a, 潘东明^{a,c*}

(福建农林大学, a. 园艺学院; b. 园艺植物遗传育种研究所; c. 园艺产品贮运保鲜研究所, 福州 350002)

摘要:克隆了番木瓜(*Carica papaya* L.)果肉的细胞壁水解关键酶 β -半乳糖苷酶(β -GAL)基因保守区,将其反向重复插入载体 pKANNIBAL, 构建 RNAi 中间表达载体 pKAN/RG,将其上的发夹结构取代经改造的载体 pCAMBIA 1300 上 *hpt* II 基因, 构建中间表达载体 p1300⁻/MFRG, 分离单 T-DNA 区段, 与载体 pCAMBIA 2301 构建 RNAi 双 T-DNA 植物表达载体 p2301/TTRG。酶切分析和 PCR 检测表明, p2301/TTRG 已被成功导入农杆菌 EHA 105。通过遗传转化, 初步获得了 *GUS* 染色呈阳性且具 Kan 抗性的番木瓜胚性愈伤组织。

关键词: 番木瓜; β -半乳糖苷酶; RNA 干扰; 双 T-DNA 植物表达载体; 遗传转化

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)06-0556-06

Construction of RNAi Two-T-DNA Plant Expression Vector of β -Gal Gene and the Genetic Transformation of *Carica papaya* L.

HE Wei-yi^{a,b}, CHEN Xiao-jing^{a,b*}, SHEN Yan-hong^{a,b}, LU Bing-guo^a, PAN Dong-ming^{a,c*}

(a. College of Horticulture; b. Institute of Genetics and Breeding in Horticultural Plants; c. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The conserved region of β -Gal gene of papaya (*Carica papaya* L.) pulp was cloned, which encoded a key enzyme of β -galactosidase involved in the cell wall degradation. The RNAi intermediate expression vector of pKAN/RG was constructed containing β -Gal gene in an inverted repeat orientation with the help of pKANNIBAL vector. *hpt* II gene of the modified pCAMBIA 1300 vector was replaced by the hairpin structure of pKAN/RG, which resulted in the formation of intermediate expression vector of p1300⁻/MFRG. Single T-DNA region of p1300⁻/MFRG was isolated and incorporated into the pCAMBIA 2301 vector to produce the RNAi Two-T-DNA plant expression vector of p2301/TTRG. The transformation of p2301/TTRG into *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 was confirmed by restriction enzyme analysis and PCR assay. The embryogenic calli of papaya which had kanamycin resistance and *GUS* expression were obtained by genetic transformation.

Key words: *Carica papaya* L.; β -galactosidase; RNA interference; Two T-DNA plant expression vector; Genetic transformation

番木瓜(*Carica papaya* L.)为呼吸跃变型果实, 采后寿命较短, 不易保鲜^[1]。前人为控制内源乙烯的发生, 延缓果实后熟, 已从番木瓜果实中克隆了 *ACO* 和 *ACS* 基因, 并获得了转反义基因植株^[2-6]。通过抑制与果肉后熟软化相关的细胞壁水解酶基

因的表达, 为选育生理上能正常成熟、具有较长货架期、且适于鲜切(Fresh-cut)加工的番木瓜新品种提供了新思路。

在诸多的细胞壁水解酶中, 番木瓜 β -半乳糖苷酶(β -GAL, EC 3.2.1.23)活性的动态变化与果实

后熟软化密切相关,3 种同工酶^[7]在果实软化过程的不同阶段发挥了重要作用^[8],是番木瓜果肉加速软化、腐败变质的关键细胞壁水解酶^[1,8-10]。最近,在对番木瓜果实发育的 EST 分析^[11]和鲜切番木瓜贮藏过程的 DDRT-PCR 研究^[12]中, β -GAL 的关键性作用又再次得到了证实。研究表明,当番木瓜果实成熟度达到 50% 时 β -GAL 活性急剧上升,同时果肉也开始迅速软化^[7]。本试验分离了果肉中表达丰度最高的 β -Gal 基因保守区,将果肉中该基因家族的保守区作为沉默的靶基因,构建了 RNAi 双 T-DNA 植物表达载体,并通过遗传转化初步获得

了抗性愈伤组织,为通过转基因植株的一次有性杂交,选育出无选择标记基因的抗软化转基因番木瓜提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

番木瓜品种“漳红”(*Carica papaya* L. ‘Zhanghong’)取自漳州市农业科学研究所。“漳红”番木瓜组培苗的叶片和叶柄所诱导的胚性愈伤组织,用于后续的遗传转化。

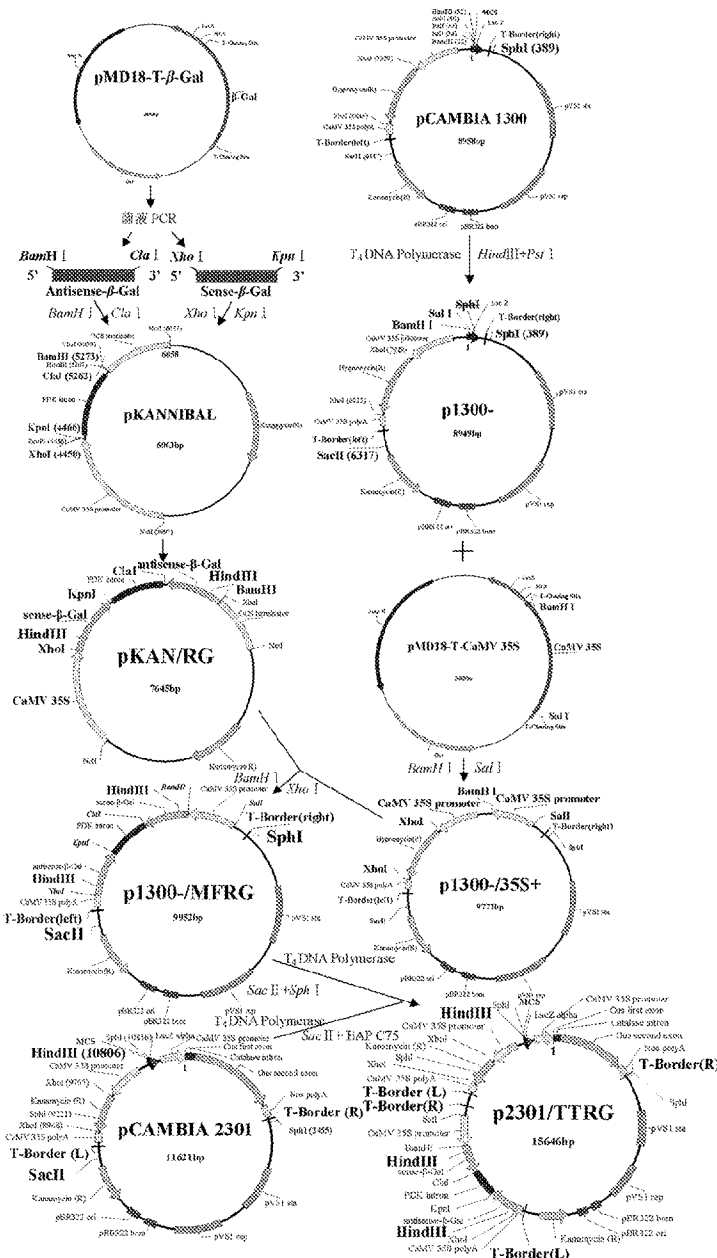


图 1 番木瓜 β -Gal 基因 RNAi 双 T-DNA 植物表达载体的构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of two T-DNA plant expression RNAi vector of papaya β -Gal gene

植物表达载体 pCAMBIA 1300、pCAMBIA 2301 以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA 105 由福建农林大学园艺植物遗传育种研究所提供。载体 pKANNIBAL^[13] 由陈桂信博士提供。

1.2 果肉 RNA 提取及 β -Gal 基因保守区的克隆

选取成熟度为 50% 的番木瓜, 用 TRIZOL 法提取果肉 RAN 并逆转录成 cDNA。根据 β -Gal 基因家族保守区设计引物, 扩增长约 800 bp 的基因片段。上游引物: 5'-GAACGGACAATGAGCCTTTCAAGGC-3'; 下游引物: 5'-CGGAAGAATGCTGATGGACCATG-3'。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s (35 个循环), 72 $^{\circ}$ C 7 min。回收目的条带, 克隆至 pMD18-T 载体, 送交公司测序。

1.3 中间表达载体的构建

参照图 1 的步骤进行中间表达载体构建。对质粒 pCAMBIA 1300 进行 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切, 并用 T₄ DNA Polymerase 补平粘性末端后, 利用 T₄ DNA Ligase 使平末端自连成环, 以去除两个酶切位点间的 *Sph* I 位点。对构建好的中间表达载体进行 *Sph* I 单酶切鉴定, 将其命名为 p1300⁻。

根据 pCAMBIA 1300 的序列 (No. AF234296) 设计一对特异性引物扩增 *hpt* II 基因前 800 bp 左右的 CaMV 35S 启动子, 并在引物的 5' 端分别加入 *Bam* HI 和 *Sal* I 酶切位点 (下划线表示酶切位点, 酶切位点之前为 3 个保护碱基, 下同)。上游引物: 5'-CTC GGATCCAGAGATAGATTTGTAGAGAG-3' (*Bam* HI), 下游引物: 5'-ATAGTCGACCGTATTGCTAGAGCAGC-3' (*Sal* I)。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s (35 个循环), 72 $^{\circ}$ C 7 min。回收目的条带, 克隆至 pMD18-T 载体, 送交公司测序。测序结果登录 GenBank 进行 Blast, 确定无误后, 进行 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切, 回收小片段。将小片段与同样经 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切的质粒 p1300⁻ 连接, 对构建好的中间表达载体进行 *Eco*R V 单酶切鉴定, 将其命名为 p1300⁻/35S⁺。

以 pMD18-T- β -Gal 菌液为模版, 在上下游引物中分别设计不同的酶切位点扩增 β -Gal, 将 β -Gal 以正反两个方向插入 pKANNIBAL 载体上 PDK 内含子的两端, 用于构建发夹状 β -Gal 结构即 RNAi-

β -Gal。正义链上游引物: 5'-CAA CTCGAGGAACG-GACAATGAGCCTTTC-3' (*Xho* I), 正义链下游引物: 5'-GAT GGTACCCGGAAGAATGCTGATGGACCA-3' (*Kpn* I); 反义链上游引物: 5'-AGT GGATCCGAAC-GACAATGAGCCTTTC-3' (*Bam* HI), 反义链下游引物: 5'-ACG ATCGATCGGAAGAATGCTGATGGACCA-3' (*Cla* I)。对构建好的中间表达载体进行 *Hind* III 单酶切鉴定, 将其命名为 pKAN/RG。

对质粒 pKAN/RG 和 p1300⁻/35S⁺ 分别进行 *Bam* HI 和 *Xho* I 双酶切, 前者回收小片段, 后者回收大片段。连接两个片段, 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆, 作 β -Gal 基因的菌液 PCR 检测。对构建好的中间表达载体进行 *Hind* III 单酶切鉴定, 将其命名为 p1300⁻/MFRG。

1.4 p2301/TTRG 的构建

对质粒 p1300⁻/MFRG 分步进行 *Sac* II 和 *Sph* I 单酶切, 并用 T₄ DNA Polymerase 补平粘性末端, 回收小片段, 即 T-DNA 区段。同时, 对质粒 pCAMBIA 2301 进行 *Sac* II 单酶切、T₄ DNA Polymerase 补平粘性末端和 BAP C75 的去磷酸化反应, 回收大片段。将两个片段进行平末端连接, 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆, 进行 β -Gal 基因的菌液 PCR 检测, 对构建好的中间表达载体进行 *Hind* III 单酶切鉴定, 将其命名为 p2301/TTRG。

1.5 农杆菌 EHA 105 的导入

按照崔武等^[14]的方法, 将 p2301/TTRG 导入根瘤农杆菌 EHA 105 感受态细胞, 涂布在含有 Str (100 mg L⁻¹) 和 Kan (100 mg L⁻¹) 的 YEB 固体培养基上筛选阳性克隆。作 β -Gal 基因的菌液 PCR 检测, 提取阳性克隆质粒, *Hind* III 单酶切鉴定 p2301/TTRG。

1.6 农杆菌介导的液体振荡转化法转化番木瓜胚性愈伤组织

参照 Dhekney 等^[15]的液体振荡转化法, 以改良 MS + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 400 mg L⁻¹ Glu + 60 g L⁻¹ 蔗糖为体胚诱导培养基, 利用含有植物表达载体 p2301/TTRG 的农杆菌 EHA 105 侵染胚性愈伤组织。经液体振荡共培养 3 d, 在含有 500 mg L⁻¹ Carb 的液体体胚诱导培养基中振荡培养 1 个月后, 转移至含 300 mg L⁻¹ Carb 和 100 mg L⁻¹ Kan 的固体体胚诱导培养基上筛选抗性愈伤组织。继续培养 2 个月左右, 采用 Jefferson^[16]的方法, 以未被农杆

菌侵染的胚性愈伤组织作为阴性对照,对部分抗性愈伤组织进行 *GUS* 染色,观察转化效率。

2 结果和分析

2.1 果肉 RNA 的提取及 β -Gal 基因保守区的克隆

所提取的番木瓜果肉 RNA 条带清晰,完整性较好, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为 1.90。PCR 反应扩增出一条特异条带(图 2),为 791 bp。GenBank Blast 表明,除引物部分,该片段与番木瓜 β -Gal 基因 *pPBG II* (No. AF064786)^[17] 的 536~1325 处完全一致。

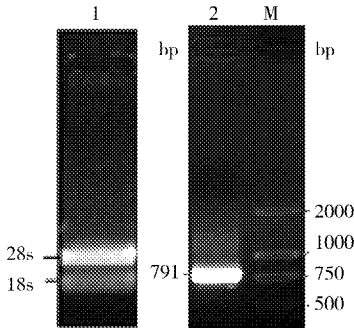


图 2 果肉 RNA 的提取和 β -Gal 基因保守区的克隆
Fig. 2 RNA extraction and cloning of conserved region of β -Gal gene from papaya pulp
M: DL 2000 Marker; 1: RNA; 2: β -Gal.

2.2 p1300⁻ 的构建

电泳结果表明,质粒 p1300⁻ 经 *Sph I* 单酶切后,只形成一条大片段,大小与线性的 pCAMBIA 1300 相近(图 3)。说明 MCS 处的 *Sph I* 位点(图 1)已被去除,获得只剩 RB 旁侧的 *Sph I* 位点,以利于后续步骤中 T-DNA 区段的切除。

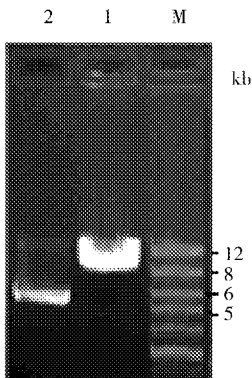


图 3 p1300⁻ 及其 *Sph I* 单酶切
Fig. 3 p1300⁻ digested by *Sph I*

M: Wide range 12000 Marker; 1: p1300⁻/*Sph I*; 2: p1300⁻.

2.3 p1300⁻/35S⁺ 的构建

CaMV 35S 的 PCR 扩增结果显示,存在非特异性条带,但有一条最亮条带与设计的片段大小一致

(图 4: 1), 为 824 bp。GenBank Blast 表明,与 pCAMBIA 1300(No. AF234296) 的 7934~8740 处有 99% 以上的同源性,即为 CaMV 35S 启动子。随后,利用双酶切将 CaMV 35S 引入 p1300⁻,构建出 p1300⁻/35S⁺ 并进行 *EcoR V* 单酶切鉴定。由于 CaMV 35S 启动子靠近 5' 端有 1 个 *EcoR V* 位点, p1300⁻ 上有 2 个(图 1),因此酶切后形成 3 个片段(图 4: 2),通过片段大小判断 35S 启动子插入方向亦正确。

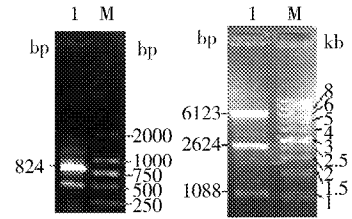


图 4 CaMV 35S 启动子的克隆和 p1300⁻/35S⁺ 的 *EcoRV* 酶切
Fig. 4 Cloning of CaMV 35S promoter and p1300⁻/35S⁺ digested by *EcoRV*
M1: DL 2000 Marker; M2: Wide range 12000 Marker;
1: CaMV 35S; 2: p1300⁻/35S⁺/*EcoRV*.

2.4 pKAN/RG 和 p1300⁻/MFRG 的构建

利用双酶切,将 β -Gal 片段以正反两个方向插入载体 pKANNIBAL,构建中间表达载体 pKAN/RG(图 1),同时也引入 2 个 β -Gal 基因上的 *Hind III* 位点。*Hind III* 单酶切结果显示,切出两条片段,大小与理论一致(图 5)。同样利用双酶切,将 pKAN/RG 上的发夹状 β -Gal 结构引入 p1300⁻/35S⁺,构建出 p1300⁻/MFRG(图 1)并进行 *Hind III* 单酶切鉴定。酶切后也形成大小两个片段,小片段与 pKAN/RG 酶切后的小片段大小一致,大片段则更大些(图 5),与理论一致。

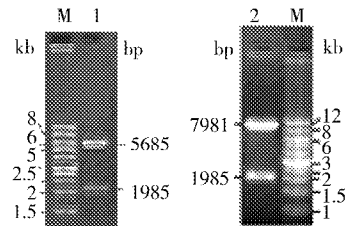


图 5 pKAN/RG 和 p1300⁻/MFRG 的 *Hind III* 单酶切
Fig. 5 *Hind III* digestion of pKAN/RG and p1300⁻/MFRG
M: Wide range 12000 Marker; 1: pKAN/RG/*Hind III*;
2: p1300⁻/MFRG/*Hind III*.

2.5 p2301/TTRG 的构建

分离质粒 p1300⁻/MFRG 的 T-DNA 区段(图 6 中小片段),与开环的 pCAMBIA 2301 连接构建出双

T 载体 p2301/TTRG。由于其上含有 3 个 *Hind* III 位点(图 1), 酶切后应形成 3 条片段, 且小片段应与 p1300⁻/MFRG 和 pKAN/RG 酶切后的小片段大小一致。电泳结果表明, 酶切后形成片段数及其大小与理论一致(图 7: 4)。从片段大小判断, p2301/TTRG 上两段 T-DNA 的连接方式为: 来自 p1300⁻/MFRG 上 T-DNA 的 RB 与 pCAMBIA 2301 的 LB 相连(图 1)。*β-Gal* 基因的菌液 PCR 检测(图 7: 1~3)以及 *Hind* III 单酶切鉴定(图 7: 4)表明, p2301/TTRG 已被成功导入根瘤农杆菌 EHA 105。

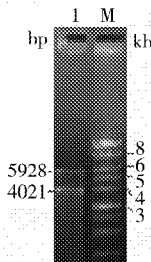


图 6 p1300⁻/MFRG 的 *Sac* II 和 *Sph* I 酶切

Fig. 6 Enzyme digestion of *Sac* II and *Sph* I of p1300⁻/MFRG
M: Wide range 12000 Marker; 1: p1300⁻/MFRG/-II + *Sph* I.

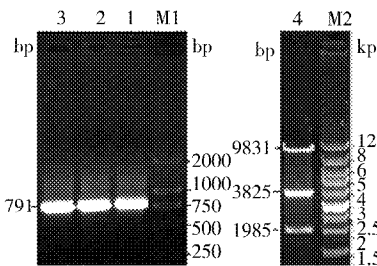


图 7 p2301/TTRG 导入农杆菌 EHA 105 的 *β-Gal* 基因
PCR 检测及其 *Hind* III 单酶切

Fig. 7 Detection of p2301/TTRG in EHA 105 by PCR
assay of *β-Gal* gene and *Hind* III digestion

M1: DL 2000 Marker; M2: Wide range 12000 Marker;
1~3: *β-Gal* 基因的 PCR 检测 PCR assay of *β-Gal* gene;
4: p2301/TTRG/*Hind* III.

2.6 番木瓜抗性胚性愈伤组织的获得

番木瓜胚性愈伤组织经含有质粒 p2301/TTRG 的农杆菌 EHA 105 侵染后, 转移至含有 Kan 的固体培养基上, 生长速度明显变慢, 有些愈伤组织则停止生长, 出现白化死亡现象。一部分愈伤组织生长变缓, 仍继续保持活力, 培养 2 个月后期体积略有增加。对部分抗性愈伤组织的 *GUS* 染色结果(图 8)表明, 液体振荡转化法对番木瓜胚性愈伤组织具有较高的转化效率。但是否为双 T-DNA 共转化的结果, 我们将通过进一步的培养, 诱导转基因番木瓜体胚发生加以证实。

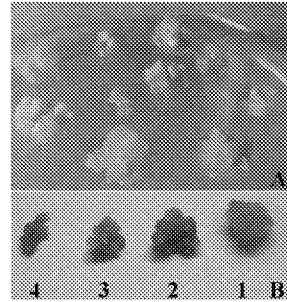


图 8 农杆菌 EHA 105/p2301/TTRG 侵染后的 Kan
抗性胚性愈伤组织及其 *GUS* 染色结果

Fig. 8 The Kan resistance embryogenic calli infected by
EHA 105/p2301/TTRG and detection results by *GUS*

A: Kan 抗性胚性愈伤组织 Embryogenic calli showing Kan resistance;
B: *GUS* 染色 *GUS* staining; 1: 未转化对照 Untransformed control;
2~4: 转化的胚性愈伤组织 Transformed embryogenic calli.

3 讨论

通过反义技术抑制与果实后熟过程中乙烯生物合成、信号转导以及参与细胞壁降解的关键水解酶基因的表达, 已在耐储运果实品种的选育中得到了广泛运用^[2-6]。随着 RNAi 现象的发现^[18], 其远高于反义技术的基因沉默效率受到了人们的重视, 并逐渐被应用于转基因研究^[13]。我们分离了番木瓜果肉迅速软化时表达丰度最高的细胞壁水解关键酶 *β-Gal* 基因的保守区, 并首次将 RNAi 技术运用于番木瓜采后保鲜转基因育种, 拟通过高效抑制该基因家族的表达, 选育抗软化性状更为稳定, 耐贮运且适于鲜切加工的番木瓜新品种。同时, 我们也在进行该基因启动子区域的分离与功能鉴定的工作, 并计划将其替换载体 p2301/TTRG 上 RNAi-*β-Gal* 结构前的 CaMV 35S 启动子, 再次进行遗传转化, 以利于克服由于组成型抑制 *β-Gal* 基因所可能造成的生理紊乱, 确保转基因植株的正常生长发育。初步研究结果显示, 该启动子具有在果肉中特异性表达的活性。

鉴于人们对转基因食品安全性关注程度的日渐升高, 遗传转化中所使用的选择标记基因的剔除, 显得十分有意义。Laurena 等^[4] 曾将 *ACS* 基因反向构建于“共转化”载体, 经由基因枪转化番木瓜, 获得了再生植株^[5]。Neupane 等^[3] 则利用 Cre-lox 系统, 在 *npt* II 基因两端附加了一对正向重复的 loxP 序列, 获得了 3 株转反义 *ACS* 基因番木瓜再生植株。同时, 他们还将噬菌体 P1 Cre 重组酶基因成功地导入番木瓜体胚。然而, 后续还需将转反义 *ACS* 基因与转 Cre 重组酶基因的番木瓜植株进行杂交, 以删除 *npt* II 基因; 以及将筛选出的无选择

标记基因杂交后代再进行一次有性杂交,以删除 Cre 重组酶基因^[19]。至今,未见获得无选择标记基因转基因番木瓜的相关报道。

我们利用 pCAMBIA 系列载体,构建了共转化双 T-DNA/单质粒系统^[19],并经由农杆菌介导进行番木瓜的遗传转化,初步获得了具 Kan 抗性的胚性愈伤组织。理论上,两段 T-DNA 区段发生独立转化事件,从而有望从抗性体胚再生植株中获得选择标记基因与外源基因不连锁的转基因植株。通过转基因植株的一次有性杂交便可使两者发生分离,剔除选择标记基因(*npt II*),选育只含外源基因(RNAi- β -Gal)的无选择标记基因转基因番木瓜。对于生产上采用种子繁殖,且从定植起隔年便能开花结果的番木瓜而言是切实可行的。同时,本研究构建的中间表达载体 p1300/MFRG 是一个不含选择标记基因的单 T-DNA 植物表达载体,其参与的遗传转化将是选育无选择标记基因转基因番木瓜的最直接途径。

此外,选择标记基因的剔除还有助于采用同样的选择标记基因,重复进行外源基因的遗传转化。如张更林等^[20]以转 *PRSV-CP* 基因穗中红番木瓜作为遗传转化受体材料,由于该转基因植株的基因组中已含有 *npt II* 基因,因此只能利用较为昂贵的 *hpt II*-Hyg 抗生素选择标记系统于新一轮的遗传转化。如此,不仅需重新投入一定的人力物力进行新遗传转化体系的建立与优化工作,也为新基因的继续导入出了难题。采用无选择标记基因转化系统,便可以很好地解决上述问题,从而加速番木瓜的遗传改良进程。

参考文献

- [1] Paull R E, Chen N J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during ripening [J]. Plant Physiol, 1983, 72: 382-385.
- [2] Lin C T, Lin M T, Shaw J F. Cloning and characterization of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1 carboxylate oxidase from papaya fruit [J]. J Agri Food Chem, 1997, 45(2): 526-530.
- [3] Neupane K R, Mukatifa U T, Kato C, et al. Cloning and characterization of fruit expressed ACC synthase and ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.) [J]. Acta Hort, 1998, 461: 329-337.
- [4] Laurena A C, Magdalita P M, Hidalgo M S P, et al. Cloning and molecular characterization of ripening-related ACC synthase from papaya fruit (*Carica papaya* L.) [J]. Acta Hort, 2002, 575: 163-169.
- [5] Magdalita P M, Laurena A C, Yabut-Perez B M, et al. Progress in the development of transgenic papaya: transformation of Solb papaya using ACC synthase antisense construct [J]. Acta Hort, 2002, 575: 171-176.

- [6] Chen Y T, Lee Y R, Yang C Y, et al. A novel papaya ACC oxidase gene (*CP-ACO2*) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence [J]. Plant Sci, 2003, 164: 531-540.
- [7] Ali Z M, Ng S Y, Othman R, et al. Isolation, characterization and significance of papaya β -galactosidases to cell wall modification and fruit softening during ripening [J]. Physiol Plant, 1998, 104: 105-115.
- [8] Lazan H, Ng S Y, Goh L Y, et al. Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening [J]. Plant Physiol Biochem, 2004, 42: 847-853.
- [9] Lazan H, Selamat M K, Ail Z M. β -galactosidase, polygalacturonase and pectin esterase in m differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening [J]. Physiol Plant, 1995, 95: 106-112.
- [10] Karakurt Y, Huber D J. Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya (*Carica papaya*) fruit [J]. Posthav Biol Techn, 2003, 28(2): 219-229.
- [11] Devitt L C, Tim S, Timothy A H, et al. Discovery of genes associated with fruit ripening in *Carica papaya* using expressed sequence tags [J]. Plant Sci, 2006, 170: 356-363.
- [12] Karakurt Y, Huber D J. Characterization of wound-regulated cDNAs and their expression in fresh-cut and intact papaya fruit during low-temperature storage [J]. Posthav Biol Techn, 2007, 44(2): 179-183.
- [13] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. Plant J, 2001, 27(6): 581-590.
- [14] Cui W (崔武), Liu W (刘炜), Wu G Y (吴光耀). Rapid, high efficient transformation of foreign DNA to *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chin J Biotechn (生物工程学报), 1995, 11(4): 350-355. (in Chinese)
- [15] Dhekney S A, Litz R E, Amador D A M, et al. Potential for introducing cold tolerance into papaya by transformation with C-repeat binding factor (*CBF*) genes [J]. In vitro Cell Devel Biol-Plant, 2007, 43(3): 195-202.
- [16] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system [J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5(4): 387-405.
- [17] Othman R, Choo T S, Ali Z M, et al. A full-length beta-galactosidase cDNA sequence (Accession No. AF064786) from ripening papaya (*Carica papaya* L. cv. eksotika) [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 1102.
- [18] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [19] Scutt C P, Elena Z, Peter M. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants [J]. Biochimie, 2002, 84: 1119-1126.
- [20] Zhang G L (张更林), Zhou P (周鹏), Guo A P (郭安平), et al. An initial study of transgenic *Carica papaya* used as a kind of vaccine for anti-tuberculosis [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2003, 25(2): 223-229. (in Chinese)