

# 利用 amiRNA 技术沉默矮牵牛查尔酮合成酶基因

王会平, 遇 玲, 邹世慧, 陈 璟, 郭余龙\*, 李名扬

(西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市花卉工程技术中心, 重庆 400716)

**摘 要:** 转基因介导的基因沉默技术是进行基因功能分析和利用基因工程改良作物的重要手段。在植物中, amiRNA (artificial microRNA) 是具有高度特异性的基因沉默技术。根据 amiRNA 设计的原则设计了用于沉默矮牵牛查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)基因的 amiRNA: amiRchs1, 用拟南芥 miR319a 的前体作为表达 amiRchs1 的骨架, 重叠 PCR 扩增, 将天然 miR319a 序列替换成 amiRchs1, 合成的 DNA 片段置于 35S 启动子之后, 转化导入矮牵牛。转基因植株花色变淡, 花冠出现弥散的白色斑点或不规则的白色斑块, 严重的几乎呈纯白色, 花色素苷含量明显下降, CHS 的 mRNA 含量明显降低, 表明拟南芥 miR319a 的前体作为表达 amiRNA 的骨架在矮牵牛中可行, 且能有效沉默结构基因。

**关键词:** 矮牵牛; 基因沉默; amiRNA; 查尔酮合成酶基因

**中图分类号:** S 685.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 12-2491-08

## Silencing of Chalcone Synthase Genes by Artificial microRNA in Petunia

WANG Hui-ping, YU Ling, ZOU Shi-hui, CHEN Jing, GUO Yu-long\*, and LI Ming-yang

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Transgene-mediated gene silencing is a useful technique for elucidating biological function of genes and modifying crops by genetic engineering. In plants, amiRNAs make an effective tool for specific gene silencing. We designed the amiRchs1 for silencing the petunia chalcone synthase genes according to the amiRNA design principles refined from the structure characters of plant microRNA. We used the precursor for *Arabidopsis* miR319a as backbone for the amiRchs1 expression under the control of 35S promoter, exchanging the natural miR319a sequence with the sequence of amiRchs1 by overlapping PCR. The transgenic petunia plants expressing the amiRchs1 precursor produced flowers with varying amounts of diffused white dots or irregular white patches, and nearly white flowers. Both the contents of anthocyanin and CHS mRNA in corollas of the transgenic plants were reduced significantly. These results showed that the precursor for *Arabidopsis* miR319a can be used to express amiRNA in petunia, and structure genes can be knocked down effectively by the amiRNA technology.

**Key words:** petunia; gene silencing; amiRNA; chalcone synthase gene

收稿日期: 2012-07-12; 修回日期: 2012-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671481)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yulong@swu.edu.cn)

转基因介导的基因沉默技术是反向遗传学研究中验证基因功能的重要手段,同时也用于植物代谢调控、培育抗性品种等基因工程研究。植物中通过遗传操作进行基因沉默最先是通过表达反义 RNA 实现的 (van der Krol et al., 1988); 随后, 超量表达正义链导致共抑制的方法也被用于基因沉默 (Napoli et al., 1990); Chuang 和 Meyerowitz (2000)、Wesley 等 (2001) 将 hpRNAi (hairpin RNAi) 技术应用于植物研究, 并被广泛接受; 这 3 类技术都需要获得稳定的遗传转化植株。另外, 研究者利用植物抵抗病毒侵染的机理, 发明了 VIGS 技术 (Lu et al., 2003) 用于基因沉默研究。以上技术都是通过 siRNA 介导的, 由于构建载体时使用较长的目标基因序列片段, 体内剪切生成 siRNA 的序列难以预测, 通过 siRNA 介导的基因沉默技术容易“脱靶 (off-targets)”, 对与目标基因序列相似的同源基因产生沉默效应, 影响对基因功能的分析。目前在植物研究中运用最广泛的转基因介导的基因沉默技术是 hpRNAi 和 VIGS。除了以上通过 siRNA 介导的基因沉默技术外, de Felippes 等 (2012) 还根据 tasiRNA 生成和作用的机理, 将 MIGS (miRNA-induced gene silencing) 技术用于植物基因沉默; Hiratsu 等 (2003) 还报道了只能用于转录因子基因沉默的 CRES-T (chimeric repressor gene-silencing technology) 技术。这两项技术同样存在“脱靶”问题。

利用人工合成的 microRNA (artificial microRNA, 简称 amiRNA) 进行植物基因沉默的研究由 Alvarez 等 (2006)、Niu 等 (2006) 和 Schwab 等 (2006) 最先完成。该技术利用植物体内固有的通过 microRNA 进行基因沉默调控生长发育的系统, 人工设计针对目标基因的 microRNA 序列并合成其前体, 构建表达载体后遗传转化导入植物体内表达, 实现目标基因的沉默。该方法通过 amiRNA 前体剪切后生成的唯一的长度为 21 bp 的 amiRNA 与目标 mRNA 结合, 诱发目标 mRNA 降解或/和翻译抑制。其靶标基因易于预测, 已被用于拟南芥、烟草、水稻、小立碗藓等物种的研究中 (张晓辉 等, 2009)。矮牵牛是最为重要的盆栽和花坛植物之一, 也是观赏植物研究的模式物种。本研究中将 amiRNA 技术用于矮牵牛的基因沉默, 实现对 *CHS* 基因的沉默。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料、菌株与质粒

用于遗传转化的矮牵牛试管苗由华中农业大学包满珠教授惠赠, 其中‘V26’是自交系, 另一个材料是杂种 F<sub>1</sub> 代植株, (编号为‘10V1’)。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 农杆菌 GV3101, 植物表达载体 pCambia2301 均由重庆市花卉工程技术中心保存。载体 pUC18-T 购自大连宝生物公司, pRS300 由 Detlef Weigel 教授惠赠。辅助载体 pMF500 以 pUC18 为基础构建, 含有源自 pSAT6 (Tzfiral et al., 2005) 的 d35S-TL 启动子区和终止子序列, 在 d35S-TL 和终止子序列之间重新设计了与 pRS300 衔接的多克隆位点, 两端设计有方便下一步克隆到 pCambia 载体的酶切位点。试验从 2009 年到 2011 年在西南大学园艺园林学院花卉研究所完成。

### 1.2 引物设计

设计用于构建本试验的 amiRNA 时, WMD 网站 (<http://wmd.weigelworld.org>) 尚不能提供针对矮牵牛基因的 amiRNA 的设计, 因此, 构建 amiRchs1 的引物是根据 amiRNA 设计的原则, 进行人工设计的。设计时首先根据 miRNA 第 1 位是 U、第 10 位是 A 的规律, 利用 EditSeq 软件搜索 CHSJ (X14597) 拼接的 cDNA 序列中具有 TNNNNNNNNA 的区域, 再根据 miRNA 序列的特点筛选、手工设计引物, 并提交 RNACofold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) 计算杂交自由能。

### 1.3 表达载体构建与植物遗传转化

amiRchs1 的前体序列用重叠 PCR 的方法合成, 扩增使用的引物设计 (表 1) 和 ExTaq 酶 (大连宝生物) 按照 WMD 网站推荐的程序进行。回收最后一轮扩增的产物连接到 pMD18-T 上, 用 T3 引物测序, 选择序列正确的质粒命名为 pT-amiRchs1。Pst I 和 BamH I 双酶切 pT-amiRchs1, 回收约 420 bp 长度的目的片段, 连接到辅助载体 pMF500 上, 使目的片段置于 35S 启动子和终止子的控制之下。连接产物测序验证后命名为 pMF-amiRchs1。随后将表达盒用 Sal I 和 EcoR I 切下, 连接到 pCambia2301 上, 酶切、测序验证后命名为 pCMF-amiRchs1 (图 1)。

pCMF-amiRchs1 质粒用电击法转化导入农杆菌 GV3101, 矮牵牛转化以无菌苗叶盘为外植体, 按 Conner 等 (2009) 的程序进行。

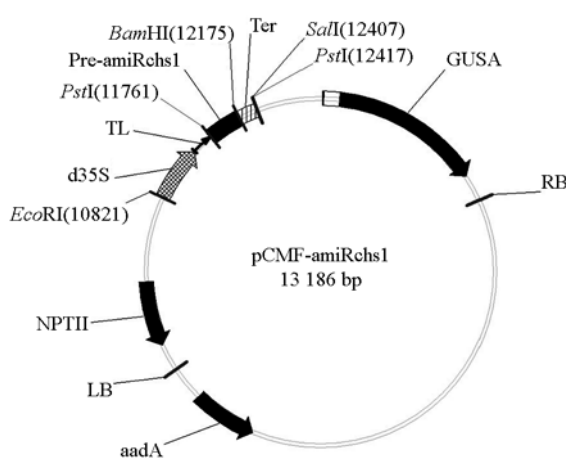


图 1 pCMF-amiRchs1 质粒图谱

Fig. 1 Plasmid used for transformation of petunia

### 1.4 转基因植株的鉴定

用植物总 DNA 提取试剂盒 (北京天根) 提取开花后花色变淡的抗性植株幼叶 DNA 作模板, 利用表达载体上 d35S 启动子区设计的引物 35SF: 5'-ATGACGCACAATCCCCTATCCTTC-3'和合成 amiRchs1 前体时所用的引物 amiRchs1-II (表 1), 对抗性植株进行 PCR 检测。

### 1.5 荧光定量分析

选取花色有变化的 '10V1' 独立转化系两个, 野生型和每个转基因株系各取 5 朵次日即将开放的花蕾, 去花萼和雌蕊, 用 RNApure 植物总 RNA 提取试剂盒 (天根) 分别提取总 RNA, 并根据试剂盒的程序用 DNase I 进行处理。RNA 的浓度和质量用 DU<sup>®</sup>730 (BECKMAN) 分光光度计检测和电泳评价。cDNA 第一链的合成按 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒 (TaKaRa) 的方法合成, 每次反应使用 1 μg 总 RNA。荧光定量分析用 IQ<sup>™</sup>SRBR<sup>®</sup> Green Supermix (BioRad) 在 CFX96 PCR 仪上完成。根据文献合成 PCR 引物并选择扩增条件对内参基因 *UBQ* (Mallona et al., 2010), 目标基因 *CHSA* (AF233638)、*CHSJ* (X14597)、*DFR* (AF233639) (Koseki et al., 2005); *ANI* (AF260919) 和 *JAF13* (AF020545) (Albert et al., 2011) 进行扩增。数据分析根据 Schmittgen 和 Livak (2008) 的方法进行, 即  $\Delta C_T = C_{T, \text{目标基因}} - C_{T, \text{内参基因}}$ , 目标基因的相对表达量 (相对于内参

基因)为 $2^{-\Delta CT}$ ,转基因植株基因表达的变化表示为对照的 $2^{-\Delta CT}$ 记为1时目标基因 $2^{-\Delta CT}$ 的相对值(即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ),基因表达量变化的 $t$ 检验显著性分析时使用各样本的 $2^{-\Delta CT}$ 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 amiRchs1 的设计

由于天然的 miRNA 的靶标基因多为转录调控因子,前人研究 amiRNA 的沉默效果时多以转录因子基因为靶标,因此,在研究 amiRNA 在矮牵牛中应用的效果时,选择了一个表达量高、基因沉默后表型易于观察的结构基因作为靶标。通过对矮牵牛 *CHSJ* (X14597) 推测的 cDNA 序列搜索,选择 543……563 位(基因组序列 2 661……2 681)共 21 bp 序列作为设计的 amiRNA 与之配对的序列,据此根据 pRS300 的序列设计出用于重叠 PCR 扩增合成 amiRchs1 前体片段的引物 amiRchs1- I ~ amiRchs1-IV (表 1)。

表 1 合成 amiRchs1 前体的 PCR 引物序列  
Table 1 PCR primers used to synthesize pre- amiRchs1

引物名 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	参考文献 Reference
amiRchs1- I	GATGTTGGTACATCATGAGTCGCTCTCTTTTGTATTCC	Schwab et al., 2006
amiRchs1- II	GAGCGACTCATGATGTACCAACATCAAAGAGAATCAATGA	
amiRchs1-III	GAGCAACTCATGATGAACCAACTTCACAGGTCGTGATATG	
amiRchs1-IV	GAAGTTGGTTCATCATGAGTTGCTCTACATATATATTCCT	
amiR_Primer_A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	
amiR_Primer_B	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG	

推测的成熟 amiRNAchs1 序列为 UGUUGGUACAUCAUGAGUCGC,长度为 21 bp;第 1 位为 U,第 10 位为 A;与 amiRchs1\*配对时 5'端的稳定性较 3'端弱;与 *CHSJ* 的 mRNA 的 543……563 位完全配对,ΔG 为  $-36.89\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;与 *CHSA* 的 mRNA 的 469……489 位配对时,3'端有 1 个碱基不配对,1 个 G: U 摆动。

将前体序列提交 Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>) 进行 RNA 折叠分析,结果显示,amiRNAchs1 前体与 miR319 前体序列折叠后的结构一致(图 2)。

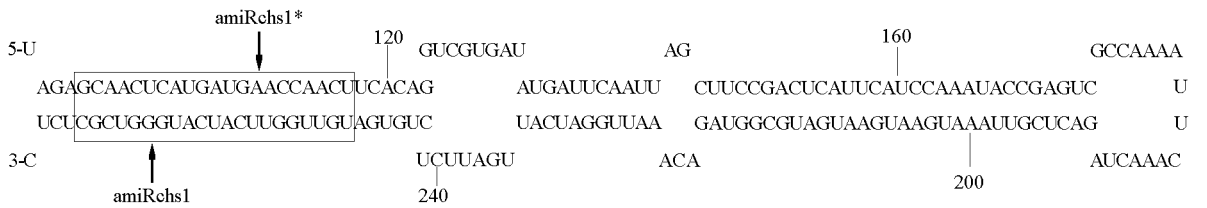


图 2 amiRchs1 前体序列折叠后的结构

方框中为推测的 amiRNAchs1 区域。

Fig. 2 Putative folding structure of pre-amiRchs1  
Putative amiRNAchs1 is highlighted.

## 2.2 转基因矮牵牛植株的花色变化

在含卡那霉素  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 1/2MS 培养基上共获得 18 个生根的 ‘10V1’ 独立转化系。抗性植株移栽田间成活后, 提取开花时花色变化的植株幼叶 DNA, 进行 PCR 检测。检测的 8 个独立转化系抗性植株都扩增出预期的约 500 bp 的条带 (图 3), 水和未转基因的对照没有扩增带。

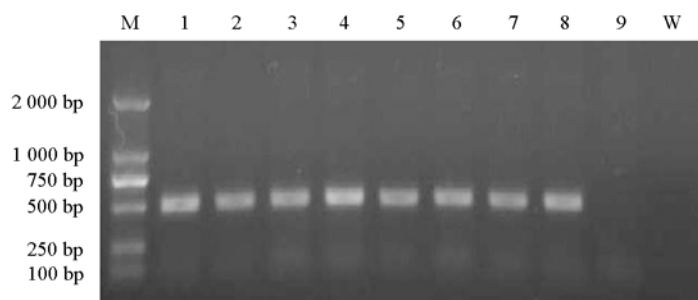


图 3 抗性植株中外源基因整合的 PCR 检测

M: DNA 分子量标记; 1~8: 待检植株; 9: 野生型植株; W: 水对照。

Fig. 3 PCR detection of transgene in putative transgenic plants

M: DNA marker; 1-8: Putative transgenic plants; 9: Wild type plant; W: Water, control.

这些转基因植株开花前的叶片形态、株形与未转基因的对照植株没有明显变异, 开花的时间也无明显的差异。从图 4 可以看出, 转基因植株所开的花呈现程度不同的褪色现象, 不同转基因株系颜色变浅的程度不同, 同一转基因植株不同的花朵褪色的程度也极不一致, 有的花颜色接近未转基



图 4 amiRchs1 转基因植株的花色变化

W: 野生型植株; 1~3: 转基因植株。

Fig. 4 Variable flower pigmentation on amiRchs1 transgenic petunia plants

W: Wild type plant; 1-3: Transgenic plants.

因的野生型花,有的则几乎变成了白色。褪色并不是均匀一致的,而是呈弥散点状或不规则的斑状,褪色斑点无明显的边界。花器官形态和结构没有明显的变化,花药的颜色变化不明显。

对矮牵牛自交系‘V26’进行转化共获得 10 个独立转化系,其中 6 个株系的花瓣出现明显的褪色现象,花色变化的形式与‘10V1’转基因植株中的情况相似。

对‘10V1’的两个转基因株系的花瓣花色素苷含量进行分析(Weiss & Halevy, 1989)的结果显示,转基因株系花冠管(tube)和花冠裂片(limb)花色素苷含量均较对照降 50%左右。

### 2.3 转基因植株中基因表达的变化

矮牵牛查尔酮合成酶是一个多基因家族,但在自交系‘V30’的花器官或紫外线胁迫的幼苗中只有 *CHSA* 和 *CHSJ* 两个基因是有活性的(Koes et al., 1989)。由于设计的 *amiRchs1* 对 *CHSA* 和 *CHSJ* 这两个基因都可能发挥沉默效应,因此利用荧光定量 PCR 对‘10V1’的两个转基因株系和对照植株花瓣中的 *CHSJ* 和 *CHSA* 进行了分析。同时随机选择了一个花色素苷合成途径的结构基因 *DFR* 和两个调控基因(*ANI* 和 *JAF*)进行定量 PCR 分析。结果显示,两个转基因株系 L4 和 L5 的 *CHSJ* 基因 mRNA 的含量分别为对照的 47.1%和 49.6%(图 5, a), *CHSA* 基因 mRNA 的含量 L4 和 L5 分别为对照的 66.8%和 64.9%,但差异未达到显著水平(图 5, b); *DFR* 基因分别为对照的 57.8%和 58.3%(图 5, c)。 *ANI* 和 *JAF* 基因 mRNA 的含量变化均无明显差异(图略)。

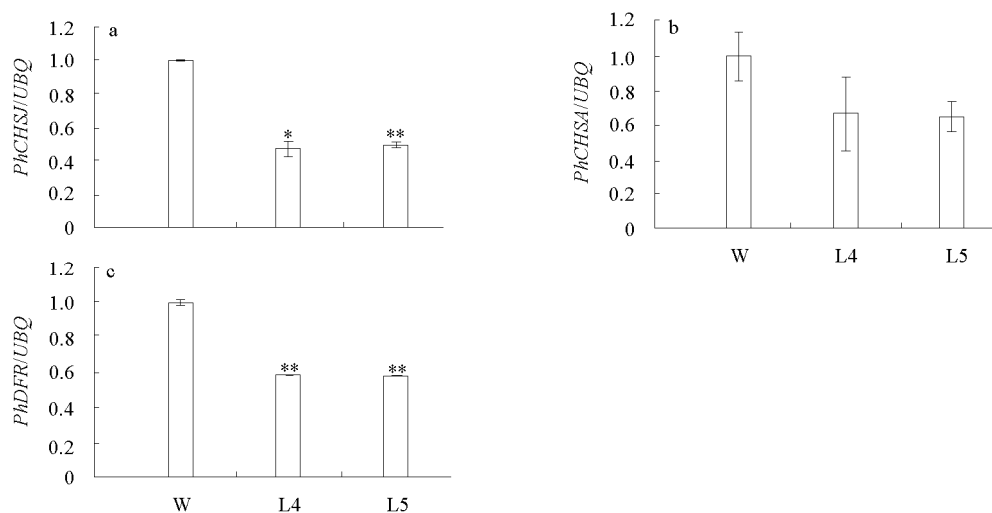


图 5 *amiRchs1* 转基因矮牵牛 *CHSA*, *CHSJ* 和 *DFR* 的荧光定量

W: 野生型; L4 和 L5: 转基因株系; \*: 与野生型对照差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*: 与野生型对照差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Fig. 5 *Petunia* lines overexpressing pre-*amiRchs1* accumulate different levels of *CHSA*, *CHSJ* and *DFR* mRNA in their flower corolla

W: Wild type; L4 and L5: Independent transgenic lines; \*: *t*-test significant at  $P < 0.05$  versus wild type;

\*\**t*-test significant at  $P < 0.01$  versus wild type.

## 3 讨论

根据 Schwab 等(2006)提出的 *amiRNA* 设计标准,人工设计了针对矮牵牛 *CHSJ* 和 *CHSA* 的 *amiRchs1*,以拟南芥 miR319a 的前体序列(pRS300)为模板合成 *amiRchs1* 前体序列,将其导入矮牵牛后,转基因植株的花色变淡,花色素苷的含量明显下降,荧光定量分析表明查尔酮合成酶基因

完整 mRNA 的含量明显下降,表明以拟南芥 miR319a 的骨架为基础合成的人工 microRNA 前体在矮牵牛中表达后能发挥基因沉默效应。转基因植株与 siRNA 介导的 *CHS* 沉默植株的表型相似: 不同植株、同一植株的不同枝条、不同花朵之间褪色的程度都不一致。但反义抑制或共抑制 *CHS* 的‘V26’植株花色的变化主要表现为花冠上出现白色区域,并呈现数种不同的式样(Napoli et al., 1990),而 amiRchs1 转基因植株主要表现为弥散的白点和不规则的白色斑块。这一差异可能与 siRNA 介导的基因沉默易于产生转移性剪切有关。

设计 amiRchs1 时没有在成熟 miRNA 和目标基因 *CHSJ* 间引入 1 ~ 2 个不配对的碱基,这没有严格遵循 Schwab 等(2006)提出的 amiRNA 设计原则。有研究认为,完全的配对会引起转移性剪切,产生额外的序列难以准确预知的 miRNA,从而引起脱靶问题。不过, Park 等(2009)的试验中, amiRNA 与靶标基因完全配对能够增强基因沉默的效果,且造成脱靶问题的证据不明显。本试验中,将构建的 amiRchs1 植物表达载体导入两个矮牵牛材料‘10V1’和‘V26’后,转基因植株均表现明显的花色变化,但 *CHS* mRNA 降解并不完全,这也说明 amiRchs1 与靶标基因完全配对可能并未导致脱靶问题。miRNA 具有翻译水平抑制目标蛋白形成,以及通过诱发互补序列周围区域甲基化的作用,而我们没有对此进行检测,因此,不能排除 amiRchs1 对 *CHSJ* 和 *CHSA* 产生翻译或/和转录抑制作用,进而抑制花色素苷合成的可能性。

令人感到有些意外的是,本试验中矮牵牛‘10V1’转基因植株的 *DFR* 基因的 mRNA 含量明显下调。van der Krol 等(1990)用 Northern 杂交对反义 RNA 或共抑制技术沉默 *CHS* 的矮牵牛 V26 花冠进行分析表明,其中 *DFR* 和 *CHI* 的 mRNA 水平没有受影响,但 *CHI* 的酶活性下降;对矮牵牛品种‘Red Star’花冠的白色区域的分析显示,其 *CHS* 基因转录后抑制导致 mRNA 含量降低,但包括 *DFR* 在内的其它花色素苷合成途径的结构基因的 mRNA 含量增高(Koseki et al., 2005)。作者认为, *DFR* 与 *CHS* 的序列差异明显,没有明显的同源区段,由“脱靶”引发 *DFR* 沉默的可能性不大。一个可能的原因是 *CHS* 的表达下调后,查尔酮合成的量减少, *DFR* 的底物随之减少,进而诱发 *DFR* 的表达下降,这也可能是在 *CHS* 被沉默的‘V26’花中 *CHI* 的酶活性下降(van der Krol et al., 1990)的原因。当然,试验材料间的差异也是可能的原因之一,具体原因有待进一步研究。

## References

- Albert N W, Lewis D H, Zhang H, Schwinn K, Jameson P E, Davies K M. 2011. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *Plant J*, 65 (5): 771 - 784.
- Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y. 2006. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 18: 1134 - 1151.
- Chuang C F, Meyerowitz E M. 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 97: 4985 - 4990.
- Conner A J, Albert N W, Deroles S C. 2009. Transformation and regeneration of *petunia*/Gerats T, Strommer J. *Petunia: Evolutionary, developmental and physiological genetics*. New York: Springer: 157 - 178.
- de Felippes F F, Wang J W, Weigel D. 2012. MIGS: miRNA-induced gene silencing. *The Plant Journal*, 70 (3): 541 - 547.
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, Ohme-Takagi M. 2003. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J*, 34: 733 - 739.
- Koes R E, Spelt C E, Mol J N M. 1989. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): Differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Molecular Biology*, 12: 213 - 225.
- Koseki M, Goto K, Masuta C, Kanazawa A. 2005. The star-type color pattern in *Petunia hybrida* ‘Red Star’ flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA. *Plant Cell Physiol*, 46: 1879 - 1883.
- Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, Malcuit I, Baulcombe D C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30: 296 - 303.

- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. BMC Plant Biology, 10: 4 - 14.
- Napoli C, Lemieux C, 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: 279 - 289.
- Niu Q W, Lin S S, Reyes J L, Chen K C, Wu H W, Yeh S D, Chua N H. 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. Nat Biotechnol, 24: 1420 - 1428.
- Park W, Zhai J, Lee J Y. 2009. Highly efficient gene silencing using perfect complementary artificial miRNA targeting *API* or heteromeric artificial miRNA targeting *API* and *CAL* genes. Plant Cell Rep, 28: 469 - 480.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3 (6): 1101 - 1108.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 18 (5): 1121 - 1133.
- Tzfira I T, Tian G W, Lacroix B, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, Krichevsky A, Taylor T, Vainstein A, Citovs ky V. 2005. pSAT vectors: A modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. Plant Molecular Biology, 57: 503 - 516.
- van der Krol A R, Lenting P E, Veenstra J, van der Meer I M, Koes R E, Gerats A G M, Mol J N M, Stuitje A R. 1988. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. Nature, 333: 866 - 869.
- van der Krol A R, Mur L A, de Lange P, Gerats A G M, Mol J N M, Stuitje A R. 1990. Antisense chalcone synthase genes in petunia: Visualization of variable transgene expression. Mol Gen Genet, 220: 204 - 212.
- Weiss D, Halevy A H. 1989. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *Peiuniu hybrida*. Planta, 179: 89 - 96.
- Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M B, Rouse D T, Liu Q, Gooding P, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M. 2001. Construct design for efficient, effective and high through put gene silencing in plants. Plant J, 27: 581 - 590.
- Zhang Xiao-hui, Zou Zhe, Zhang Yu-yang, Li Han-xia, Ye Zhi-biao. 2009. The technological innovation of gene silencing in plants from the antisenseRNA to artificial microRNA. Progress in Natural Science, 19: 1029 - 1037. (in Chinese)
- 张晓辉, 邹 哲, 张余洋, 李汉霞, 叶志彪. 2009. 从反义 RNA 到人工 miRNA 的植物基因沉默技术革新. 自然科学进展, 19: 1029 - 1037.

## 征 订

## 欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于 1962 年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、CSCD 中国科学引文数据库等多家重要数据库收录。《园艺学报》荣获第三届国家期刊奖及中国科技信息研究所“中国精品科技期刊”、武汉大学中国科学评价研究中心“中国权威学术期刊”、中国期刊协会和中国出版科学研究所“新中国 60 年有影响力的期刊”等称号。

根据“中国学术期刊影响因子年报(2011 版)”,《园艺学报》复合总被引频次为 11 630,期刊综合总被引频次 5 317,复合影响因子 1.780,期刊综合影响因子 1.124。

《园艺学报》为月刊,每月 25 日出版。每期定价 40 元,全年 480 元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82 - 471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码:100081;电话:(010) 82109523。E-mail: yuanyixuebao@126.com。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。