

月季突变体抑制差减杂交 cDNA 文库构建及分析

谢吉容^{1,2}, 梁国鲁¹, 唐开学³, 张 灏³, 程在全³, 黄兴奇^{3*}

(¹西南大学园林园艺学院, 重庆 400715; ²重庆文理学院生命科学系, 重庆 402168; ³云南省农业科学院, 昆明 650223)

摘要: 为了分析月季花色花香突变机理和揭示花色花香代谢的相关基因, 利用抑制性消减杂交技术分离了月季红花无香突变体‘往日情怀’ (以下简称突变体) 与其野生型金黄色浓香品系‘金银岛’ (以下简称野生型) 之间表达差异 cDNA 片段。分别以突变体作为驱赶子, 野生型为检测子, 以及以野生型作为驱赶子, 突变体为检测子建立了两个差异表达 cDNA 文库 WSSH 和 JSSH, 分别代表在突变体和野生型中特异表达的 cDNA; 再经文库高密度点阵膜的杂交差示筛选分析, 在 WSSH 库中获得特异表达的 27 个阳性克隆, 在 JSSH 文库中得到 25 个阳性克隆。差异表达克隆测序后经 BLAST 比对分析发现 WSSH 文库中含有与红花突变体的花青素积累直接相关的 CHS、DFR、细胞色素 P450 加单氧酶、乙二醛酶、己糖转移因子、MYB1 转录因子、S-腺苷蛋氨酸转移酶、ADR 等花色相关 EST; JSSH 文库中含有与野生型花香形成相关的月季甲基间苯二酚 O-甲基转移酶、转醛醇酶、Acyl-CoA 结合蛋白、钙调素结合蛋白、MYB92 转录因子的 EST 以及导致芽变的 Tyl-copia-like 逆转座子。

关键词: 月季; 抑制性消减杂交; 花色; 花香; 突变体; 差异表达

中图分类号: S 685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 03-0688-07

Construction and Analyses of SSH cDNA Libraries of Rose Floral Color and Scent Mutant

XIE Ji-rong^{1,2}, LIANG Guo-lu¹, TANG Kai-xue³, ZHANG Hao³, CHENG Zai-quan³, and HUANG Xing-qi^{3*}

(¹ College of Horticulture and Gardens, Southwest University, Chongqing 400715, China; ² Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402168, China; ³ Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: In order to analyse molecular mechanism of rose flower and scent metabolism and to explore the genes involved in rose floral color and fragrance metabolism, the suppressive subtraction hybridization (SSH) technique was used. Two differential expressing cDNA libraries were constructed with the cDNAs of the rose color and scent mutant Wangriqinghuai as driver and the cDNAs of its wild type Jinyindao (*Rosa xhybrida*) as tester, vice versa. The cDNA libraries of WSSH indicated the differential expressing cDNA fragments in Wangriqinghuai and JSSH indicated the differential expressing cDNA fragments in Jinyindao. The difference of PCR bands for subtracted sample and non-subtracted sample was obvious. The relevant cDNA fragments expressing differentially between Wangriqinghuai and Jinyindao were revealed and isolated through microarray analysis of the clones in SSH. Twenty-seven positive clones of WSSH and 25 positive clones of JSSH were obtained. After sequencing the clones expressing differentially in two cultivars and blasting their sequences, some ESTs regulating the color of pink mutant, such as CHS, DFR, MYB1, ADR were obtained from WSSH. Some ESTs regulating the floral color and scent of yellow progenitor, such as OOMT, MYB92

收稿日期: 2007 - 01 - 22; 修回日期: 2007 - 04 - 23

基金项目: 云南省科技攻关项目 (2003NG05); 云南省农业科技攻关计划项目 (2006NG34)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xingqih@public.km.yn.cn)

致谢: 昆明杨月季公司和云南省农业科学院花卉研究所李树发副研究员为本研究提供试材。

were also obtained from JSSH. Tyl-copia-like retrotransposon most likely causing bud mutation was also got in this study. This is the first report on rose mutant SSH which would be useful for analysis and isolation of the genes related to rose floral color or scent

Key words: Rose; Suppressive subtraction hybridization; Floral color; Floral scent; Mutant; Differential expression

月季花色花香代谢路径复杂,涉及的相关基因很多。前人曾在许多植物中利用矮牵牛、金鱼草等花卉的花色花香突变体,分离了大部分花色代谢的关键酶和少量的花香代谢基因(O'Reilly et al, 1985; Manuel et al, 1997; David & Vicki, 1999)。但是月季遗传分子基础研究很少,目前NCBI上只登记月季属(*Rosa*) 8 699条核酸序列,其中352个功能基因EST(Expressing Sequence Tag),与花色相关的基因有9个(Tanaka et al, 1995; Kagami & Suzuki, 2005; Ogata et al, 2005);与花香代谢相关基因有12个(Lavid et al, 2002; Shalit et al, 2003; Scalliet et al, 2006a, 2006b)。对于遗传背景研究较少的月季,利用珍贵的自发突变体,比较研究突变体与其野生型在相同环境条件下基因表达的差异可以获取基因功能的信息。作者利用SSH方法对非常特别的月季花色花香突变体‘往日情怀’与其野生型对照品系‘金银岛’表达差异进行了研究,为进一步发掘花色花香调控新基因及获得其全长cDNA提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

月季‘金银岛’(以下简称为野生型)是昆明杨月季公司从法国引进的一个切花品种,金黄色,花香浓郁;其芽变品种‘往日情怀’(以下简称为突变体)粉红色,无香味。两个品种除了突变性状外,遗传背景完全一致。两个供试材料被种植在该公司育种圃的不同垄上。

2006年2月12日,从其枝条上分别采取3期(花蕾已是粉红色或金黄,花蕾未开)、4期(外轮花瓣开放)花朵,摘下其花瓣立即用液氮保存,送云南农业科学院生物所分子生物学重点实验室,供试验研究。

PCR Select™ cDNA Subtraction Kit和 PCR_Select™ Differential Screening Kit均购自CLONTECH公司; mRNA Purification Kit购自上海华舜生物工程有限公司; pMD18-T Vector, DNA Marker DL 2000购自Takara公司; Taq酶、dNTP、巢式PCR引物P1和P2R购自上海生工生物工程有限公司; 250 bp DNA Marker购自Generay Biotech Co. Ltd; 尼龙膜购自Sigma公司; *E. coli* DH5 为本实验室保存; 其它试剂均为Sigma公司和国产分析纯产品。

1.2 总RNA提取和mRNA的纯化

分别取两个供试材料对应的3、4期花瓣,液氮研磨混匀,按照杨传平等(2002)的CTAB多级沉淀法提纯两种月季花瓣材料的总RNA。参照上海华舜mRNA Purification Kit说明进行mRNA的纯化,溶于10 μL DEPC处理的H₂O中。经紫外分光光度计及甲醛变性琼脂糖胶检测, -70℃保存备用。

1.3 抑制性消减杂交及PCR产物的克隆

cDNA的合成、*Rsa* 消化、连接接头、第1次杂交和第2次杂交及PCR反应均参照CLONTECH-PCR_Select™ cDNA Subtraction Kit说明,在Bio-Rad公司的MJR型PCR仪上进行。以突变体作为驱赶子,野生型为检测子,以及以突变体作为检测子,野生型为驱赶子进行两次消减杂交,将两种杂交的第2次PCR产物纯化后分别克隆至pMD18-T载体中,建立两个抑制差减cDNA文库WSSH和JSSH,分别代表在突变体和野生型特异表达的cDNA。

PCR产物与 pMD18-T的连接以及转化 *E. coli* DH5 参照 pMD18-T vector Kit说明书及相关文献 (Havard, 2002) 进行。

1.4 阳性克隆筛选

在蓝白筛选基础上, 进行具有插入片段的阳性克隆鉴定。用巢式 PCR引物扩增插入片段, 克隆片段与 250 bp Marker电泳条带比较, 分析片段有无和大小; PCR扩增体系改为 20 μL (10 \times Buffer 2 μL , 25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 2 μL , 2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTP 2 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Primer 1和 Primer 2R 各 0.8 μL , *Taq*酶 (5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.6 μL , 水 10.6 μL , 模板菌液 1 μL); PCR循环参数改为 94 30 s, 68 30 s, 72 1.5 min, 共 23个循环, 最后 72 延伸 1 min。

将经鉴定的插入片段在 100 bp 以上的克隆用于筛选差异表达阳性克隆, 操作按 PCR Select Differential Screening Kit (Clontech) 说明书进行。阳性克隆判断也依据该说明书的标准。

1.5 阳性克隆片段 DNA 测序及同源序列的检索与比较

阳性克隆采用甘油保菌的方法送北京华大基因测序中心测序。测出的 DNA 序列在经过切除载体和接头序列后在 National Center for Biotechnology Information 核酸数据库 Blastn 和蛋白数据库 Blastx 中进行同源核苷酸和蛋白序列检索。

2 结果与分析

2.1 样品总 RNA 与 mRNA 质量检测结果

突变体和野生型样品总 RNA 提取后分别取 5 μL RNA 样品, 纯化的 mRNA 取 1 μL , 点样于甲醛变性琼脂糖 溴化乙锭凝胶上, 经 4 V $\cdot \text{cm}^{-1}$ 恒压电泳 1 h, 在紫外灯下观测 RNA 条带, 并照相记录 (图 1)。大部分 RNA 集中在 18S 与 28S 区域间, 其完整性较好, 可进一步用于提取 mRNA。纯化的 mRNA 呈现正常弥散的亮带, 说明 poly (A) + RNA 质量良好, 可用于构建文库。

2.2 cDNA 合成以及 cDNA 酶切效果分析

cDNA 合成反应取决于 AMV 逆转录酶的活性, 电泳结果 (图 2) 显示, cDNA 分子大小分布正常, 运用 *Rsa* 酶切后的 cDNA 大小主要在 750 ~ 250 bp 范围, 说明酶切效果好, 适于后续试验。

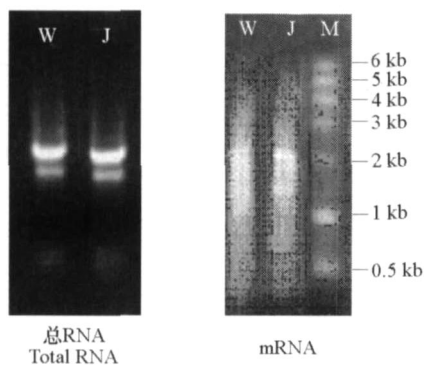


图 1 月季突变体 (W) 和野生型 (J) 花瓣总 RNA 和 mRNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 1 Total RNA and mRNA purified from corolla tissue of rose mutant and its wild type using the formaldehyde denatured agarose gel in electrophoresis

M: RNA marker RL 6000.

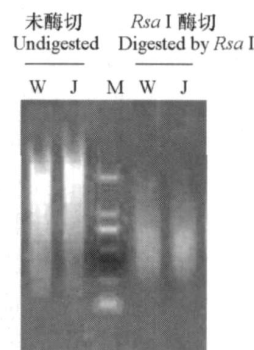


图 2 月季突变体 (W) 和野生型 (J) 花瓣 cDNA 以及其 *Rsa* I 酶解片段电泳图谱

Fig 2 Electrophoretic pattern of cDNA and their fragments

M: DNA marker DL 2000.

2.3 SSH文库消减效率检测

从图 3可知, 正反抑制差减后的第 2次 PCR 产物 1、3 分别比未差减的对照的第 2次 PCR 产物 2、4 分子数量少, 分子量范围窄一些, 说明差减效率高, 可以进行后续试验分析。

2.4 转化阳性菌落检测

根据蓝白筛选原理, 从 WSSH 中随机挑取白色克隆 235 个, 利用 PCR 检测出具有一个插入片段的克隆 213 个, 阳性克隆克隆率 90.63%; 从 JSSH 中随机挑取白色克隆 249 个, 利用 PCR 检测出具有一个插入片段的克隆 221 个, 阳性克隆克隆率 88.75%; 可见“白色的菌落可能并不一定就插入了 NSERT”, 这种菌落通常称之为假阳性菌落, 这种情况是难以避免的。所以在克隆测序前有必要利用 PCR 检测插入片段的有无和大小。

WSSH 的 235 个和 JSSH 的 249 个重组克隆的插入片段 PCR 扩增部分结果见图 4。结果表明, 93% 以上的克隆均能扩增出有效产物, 插入片段大部分集中在 400 bp 左右, 这说明稍小的片段更容易与载体连接。

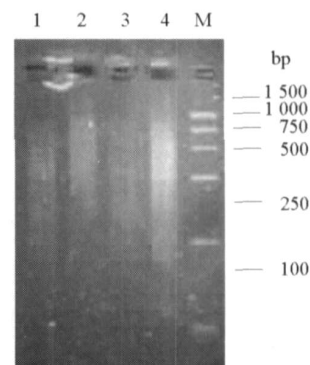


图 3 抑制差减杂交后的第 2 次 PCR 产物分析
M. 250 bp DNA marker; 1. 正向差减杂交后的第 2 次 PCR 产物; 2. 正向未差减杂交后的第 2 次 PCR 产物; 3. 反向差减杂交后的第 2 次 PCR 产物; 4. 反向未差减杂交后的第 2 次 PCR 产物。

Fig. 3 Analysis of second PCR product after SSH
M. 250 bp DNA marker; 1. Secondary subtractive product after forward subtraction; 2. Secondary un-subtractive product after forward subtraction; 3. Secondary subtractive product after reverse subtraction; 4. Secondary un-subtractive product after reverse subtraction

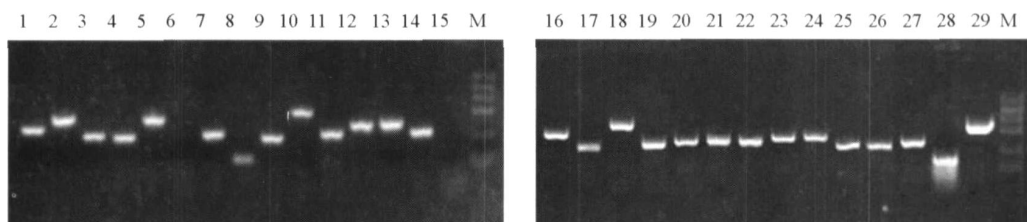


图 4 差减 cDNA 文库外源插入片段的检测

M. 250 bp DNA marker; 1 ~ 29. 随机挑取的克隆。

Fig. 4 Identification of foreign inserted fragments of the subtracted cDNA library WSSH

M. 250 bp DNA marker; 1 - 29. Random picked white clones

2.5 差异表达的阳性克隆筛选以及 EST 序列分析

利用两端特异引物对重组克隆的插入片段进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后点在尼龙膜上。每个产物同时点在 4 张膜的对应位置上, 再与正反向差减后的 dscDNA 和未差减的 dscDNA 探针进行杂交 (图略)。

统计结果分析表明, 在 WSSH 和 JSSH 差异文库中分别得到 27 和 25 个阳性克隆。对正反向文库的差异表达阳性克隆进行测序, 发现文库插入片段多数集中在 200 ~ 500 bp, 片段大小成正态分布, 最多的是 400 bp 左右的片段。证明了 PCR 方法检测插入片段长度的可靠性。

通过在 NCBI 上比对分析 (表 1), 在两个文库中发现许多次生代谢相关基因: WSSH 文库中含有 CHS、细胞色素 P450 加单氧酶、乙二醛酶、MYB1 转录因子、S-腺苷蛋氨酸转移酶、ADR 等花色

相关 EST (Martin & Gerats, 1993; Grotewold et al, 1994; Ktoun et al, 1994; Timothy & Edwina, 1995; Mol et al, 1996; Glover et al, 1998), 这与红花突变体的花青素积累直接相关。JSSH文库中含有月季甲基间苯二酚 O - 甲基转移酶、转醛醇酶、Acyl-CoA 结合蛋白、MYB92 转录因子 (Sablowski et al, 1994; Umari & Strommer, 1997; Guterman et al, 2002; Lavid et al, 2002; Zuker et al, 2002; Shalit et al, 2003) 与野生型的花香形成相关的 EST 以及导致芽变的 Ty1-copia-like 逆转座子 (Tao et al, 2005), 说明抑制性消减文库已经构建成功。

另外, 由于月季分子遗传研究背景少, 序列比对时有 43% 的 EST 没有对应功能的相似序列, 这一些代表已经登陆 GenBank 的未知功能蛋白或未登陆的新基因。因为花色花香代谢存在底物竞争, 亲本突变后, 产生了花青素高而芳香物质减少的红花。这可能与 MYB 类转录因子在两个材料中的表达差异有关, 而引起转录因子表达差异的原因还有待进一步研究。

表 1 差异表达克隆测序与 Blast 比对分析结果

Table 1 Features of some sequenced clones and results of Blast search

克隆号 Clone	片段大小 Size	登录号 Accession number	Score	E 值 E-value	同源性 Identity (%)	同源序列 DNA homology
JSSH0106	530	AF502434	959	0	99	月季间苯二酚 O - 甲基转移酶 OOMT2 <i>Rosa hybrida</i> cultivar orcinol O-methyltransferase (OOMT2) mRNA
JSSH0135	232	AJ489197	337	8e-90	96	Beta nana Ty1-copia-like 反转录转座子 Beta nana Ty1-copia-like retrotransposon partial pol pseudogene
JSSH0179	316	AJ249833	143	3e-31	86	毛地黄 <i>acbp3</i> 基因 <i>Digitalis lanata</i> mRNA for Acyl-CoA binding protein (<i>acbp3</i> gene)
JSSH0194	455	DQ074474	180	2e-42	91	苹果 Myb92 <i>Malus x domestica</i> Myb92 mRNA
JSSH0172	361	AY335817	56	7e-05	81	陆地棉转醛醇酶 <i>Gossypium hirsutum</i> transaldolase mRNA
JSSH0231	323	AF502433	276	6e-153	99	月季间苯二酚 O - 甲基转移酶 OOMT1 <i>Rosa hybrid</i> cultivar orcinol O-methyltransferase (OOMT1) mRNA
JSSH0363	384	D49385	242	4e-61	91	月季 Δ^9 脱饱和酶 <i>Rosa hybrida</i> mRNA for delta-9 desaturase homologue
WSSH0261	581	AB038246	1021	0	99	月季 'Kardinal' CHS <i>Rosa hybrid</i> cultivar 'Kardinal' CHS mRNA for chalcone synthase
WSSH262	591	AF022464	54	5e-04	82	大豆 CYP77A3p <i>Glycine max</i> cytochrome P450 monooxygenase CYP77A3p
WSSH0460	433	AY196776	129	8e-27	85	小金海棠 Myb1 <i>Malus xiaojinensis</i> transcription factor Myb1 mRNA
WSSH0475	506	AJ010423	131	2e-27	83	大豆乙二醛酶 I <i>Glycine max</i> mRNA for glyoxalase I
WSSH0150	538	X696440	119	9e-24	89	大豆 ADR11 <i>Glycine max</i> ADR11 mRNA

3 结论与讨论

利用突变体分析和分离一些与次生代谢相关的基因已成为研究植物次生代谢分子机理的重要手段。分析突变体与亲本遗传差异尽管可以运用 cDNA-AFLP 法 (康俊根等, 2006), 但是如果突变位点没有引起酶切位点改变, 利用该法筛选差异基因的可能性就很小。突变体和亲本表型差异明显, 是基因差异表达的结果, 因而采用差异表达分析方法中最新的抑制性消减杂交法, 分离差异表达基因是非常可行的。

分离差异表达基因的方法很多, 但基因表达连续分析法 (Serial Analysis of Gene Expression,

SAGE) 具有假阳性率高、需要进行大量的引物筛选工作, 得到的特异 cDNA 片段往往是 3 端的非编码序列以及序列胶分析结果常呈弥散状态等不足之处; 有序差异显示 (Ordered Differential Display, ODD) 具有平端连接效率低, 工作量较大的缺点; 代表性差异分析 (Representational Difference Analysis, RDA) 无法解决低丰度 mRNA 基因的克隆 (王广慧, 2005)。而 SSH 通过单链 Tester cDNA 的消减均等化, 以及两轮抑制性 PCR 使高低丰度的差异表达基因均能有效地进行分离, 并可同时得到多条片段 (Diatchenko et al, 1996); 而且它设计巧妙, 操作简便, 初始 mRNA 只需 1 ~ 2 μ g, 前后只需 3 ~ 4 d, 即可得到 PCR 扩增的差减 cDNA 群体; 通过 T/A 克隆建立 cDNA 文库, 从而方便以后的筛选、鉴定等研究工作, 具有假阳性少, 重复性高等优点, 并能对低丰度 mRNA 进行显示; 这些是其它分离差异表达基因方法所不具备的优势 (Diatchenko et al, 1999)。目前利用 SSH 法对植物材料特别是次生代谢突变体研究以期分离相关的差异表达 cDNA 片段还不多见。

植物花色是由花色素种类、助色素、液泡 pH 值以及花瓣表皮结构等诸多因素决定的一个复杂性状, 花香是由多种挥发性小分子混合形成的使动物产生嗅觉的一个性状, 花色代谢以及某些花香挥发性物质形成都涉及大量基因的协同作用, 因此对花色花香突变分子机理的研究需要选择能够同时对众多基因的表达进行研究的高通量技术。SSH 结合微阵列技术由于具有以上优点, 是该研究的首选技术。但是 SSH 法要求非常好的 RNA 质量和一定的 RNA 总量 (至少 200 μ g), 才能保证低丰度的差异表达基因能被检测。

本研究建立了月季花色花香突变体特异表达基因的正反 SSH 文库。通过对正反向消减文库克隆的测序和对这些基因的进一步表达分析, 已经筛选出新的花色花香代谢调控基因 MYB1、MYB92 转录因子同源的 EST, MYB1、MYB92 转录因子在月季上还没有相关研究。这为下一步克隆其 cDNA 全长和功能分析奠定了基础。

References

- David A S, Vicki L C. 1999. A mutation in the pale aleurone color1 gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. *The Plant Cell*, 11 (1): 5 - 14.
- Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (12): 6025 - 6030.
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, 303 (2): 349 - 380.
- Glover B J, Perez-Rodriguez M, Martin C. 1998. Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related transcription factor. *Development*, 125 (17): 3497 - 3508.
- Grotewold E, Drummond B J, Bowen B, Peterson T. 1994. The myb-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 76 (3): 543 - 553.
- Guterman I, Shalit M, Menda N, Piastun D, Dafny-Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, Weiss D. 2002. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell*, 14 (12): 2325 - 2338.
- Havard J. 2002. Basic DNA and RNA protocols. Sheng Xiao-yu trans. Beijing: Science Press: 179. (in Chinese)
- J. 伍德. 2002. DNA 及 RNA 基本实验技术. 盛小禹译. 北京: 科学出版社: 179.
- Kagami T, Suzuki M. 2005. Molecular and functional analysis of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene of *Rosa hybrida*. *Genes Genet Syst*, 80 (2): 12 - 18.
- Kang Jun-gen, Wang Xiao-wu, Zhang Guo-yu, Zhang Yan-guo, Lou Ping, Fang Zhi-yuan. 2006. Sequential expression of fertility-related genes detected by cDNA-AFLP in different types of cabbage male sterile lines. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 540 - 544. (in Chinese)
- 康俊根, 王晓武, 张国裕, 张延国, 娄平, 方智远. 2006. 利用 cDNA-AFLP 检测甘蓝雄性不育相关基因的时序性表达. *园艺学报*, 33 (3): 540 - 544.

- Kroon J, Souer E, Graaff de A, Xue Y, Mol J, Koes R. 1994. Cloning and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus *Rt* of *Petunia hybrida*: characterization of insertion sequences in two mutant alleles. *Plant J.*, 5 (1): 69 - 80.
- Lavid N, Wang J, and Shalit M, Gutteman I, Bar E, Beuerle T, Weiss D, Menda N, Sharfir S, Zamir D, Adam Z, Vainstein A, Pichersky E, Lewinsohn E. 2002. O-Methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol.*, 129 (4): 1899 - 1907.
- Manuel B, Erich G, Vicki L. 1997. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related myb domain proteins. *The Plant Cell*, 9 (4): 611 - 625.
- Martin C, Gerats T. 1993. Control of pigment biosynthesis genes during petal development. *The Plant Cell*, 5 (10): 1253 - 1264.
- Mol J, Jenkins G I, Schafer E, Weiss D. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit Rev. Plant Sci.*, 15 (3): 525 - 557.
- Ogata J, Kanno Y, Itoh Y, Tsugawa H, Suzuki M. 2005. Plant biochemistry: anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature*, 435 (7043): 75 - 78.
- O'Reilly C, Shepherd N S, Pereira A, Schwarz-Sommer Z, Bertram I, Robertson D S, Peterson P A, Saedler H. 1985. Molecular cloning of the *a7* locus in *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu7*. *EMBO J.*, 4 (5): 877 - 882.
- Sablowski R W, Moyano E, Culianez-Macia F A, Schuch W, Martin C, Bevan M. 1994. Flower-specific myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.*, 13 (1): 128 - 137.
- Scalliet G, Joumou N, Jullien F, Baudino S, Magnard J L, Channeliere S, Vergne P, Dumas C, Bendahmane M, Cock J M, Huguency P. 2006a. Biosynthesis of the major scent components 3, 5-dimethoxytoluene and 1, 3, 5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases. *J Exp Bot.*, 57 (11): 2763 - 2773.
- Scalliet G, Lionnet C, Le Beche M, Dutron L, Magnard J L, Baudino S, Bergougnoux V, Jullien F, Chambrier P, Vergne P, Dumas C, Cock J M, Huguency P. 2006b. Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent. *Plant Physiol.*, 140 (1), 18 - 29.
- Shalit M, Gutteman I, Volpin H, Bar E, Tamari T, Menda N, Adam Z, Zamir D, Vainstein A, Weiss D, Pichersky E, Lewinsohn. 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/Citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol.*, 131 (4): 1868 - 1876.
- Tanaka Y, Fukui Y, Fukuchi Mizutani M, Timothy A H, Higgins E, Kusumi T. 1995. Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Cell Physiol.*, 36 (6): 1023 - 1031.
- Tao N G, Xu J, Cheng Y J, Hong L, Guo W W, Yi H L, Deng X X. 2005. Isolation and characterization of copia-like retrotransposons from 12 sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) cultivar. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47 (12): 1507 - 1515.
- Timothy A H, Edwina C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7 (7): 1071 - 1083.
- Umar A, Strommer J. 1997. Myb26: A MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *The Plant J.*, 12 (6): 1273 - 1284.
- Wang Guang-hui. 2005. Methods of plant gene cloning. *Journal of Qiqihar University*, 21 (3): 92 - 97. (in Chinese)
- 王广慧. 2005. 植物基因的分离方法. *齐齐哈尔大学学报*, 21 (3): 92 - 97.
- Yang Chuan-ping, Jiang Jing, Na Dong-chen, Wei Zhi-gang. 2002. Rapid extracting RNA from stamen tissue of White Birch. *Journal of Northeast Forestry University*, 30 (3): 1 - 4. (in Chinese)
- 杨传平, 姜 静, 那冬辰, 魏志刚. 2002. 白桦花芽 RNA 的快速提取. *东北林业大学学报*, 30 (3): 1 - 4.
- Zucker A, Tzfira T, Ben-Meir H, Ovadis M, Shklaman E, Itzhaki E, Forkmann G, Martens S, Neta-Sharir I, Weiss D, Vainstein A. 2002. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Mol Breeding*, 9 (1): 33 - 41.