

阮春燕, 韦银凤, 姚超, 等. 洋桔梗黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆及其反义表达载体的构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 35-38.

洋桔梗黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆 及其反义表达载体的构建

阮春燕, 韦银凤, 姚超, 陈崇顺

(南京师范大学生命科学学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要:黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是花青素生物合成途径中的关键酶,对花色的形成具有重要作用。以洋桔梗试管苗叶片基因组 DNA 为模板,通过设计分别带有酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba*I 的 1 对特异引物,进行 PCR 扩增,克隆了洋桔梗 *F3H* 基因;对克隆得到的 *F3H* 基因进行测序鉴定,再将该基因反向插入 pBI121 质粒,成功构建了植物反义表达载体 pBI121-*F3H*,为利用植物基因工程技术调控洋桔梗 *F3H* 基因的表达提供了重要基础。

关键词:洋桔梗;黄烷酮 3-羟化酶基因;克隆;反义表达载体构建

中图分类号: Q943.2; S682.1⁺90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0035-04

洋桔梗[*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.]别称草原龙胆,是龙胆科草原龙胆属的观赏植物。洋桔梗株态轻盈潇洒,花形别致可爱,是国际上十分流行的切花和盆花种类之一^[1]。颜色、香味及形态是观赏植物的三大重要性状。随着经济发展和社会进步,人们对花卉尤其是那些在色、香、形方面能够标新立异的新品种的需求越来越强烈。其中,花的颜色具有特别重要的审美价值,分子育种新技术——植物基因工程可定向、高效获得更丰富和奇美的观赏植物新品种。

花青素广泛存在于被子植物中,对花色形成具有重要作用。而黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是

花青素生物合成途径中的关键酶^[2]。研究表明,反义核酸技术主要通过碱基互补原理,利用人工或生物合成特异互补的 DNA 或 RNA 片段(或化学修饰产物)与目的序列核酸结合,通过空间位阻效应或诱导 RNase 活性的降解作用,在复制、转录、剪接、mRNA 转运及翻译等水平上,抑制或封闭目的基因的表达^[3-4]。

目前,*F3H* 基因已经从多种植物的不同器官中克隆得到,如红巴梨成熟果皮^[5]、苹果果皮^[6]、洋桔梗花瓣^[7]、苦荞幼苗^[8]、芜菁块根^[9]、龙眼胚胎^[10]、猕猴桃内果皮^[11]、非洲菊花瓣^[12]、核桃叶片^[13]。Elomaa 等成功运用反义核酸技术调控了非洲菊、金鱼草等植物中花青素生物合成相关酶基因的表达^[14-15],进而改变了花色。

本研究以洋桔梗叶片为试材,提取基因组 DNA,通过设计 1 对特异性引物,进行 PCR 扩增,克隆 *F3H* 基因;对该克隆基因进行 DNA 序列测定、鉴定,再将其反向插入 pBI121 质粒,构建洋桔梗 *F3H* 基因反义表达载体,为利用植物基因工程技术调控洋桔梗 *F3H* 基因的表达,进而改变其花色及创建

收稿日期:2013-04-26

基金项目:国家基础科学人才培养基金(编号:J1103507);江苏高校优势学科建设工程项目。

作者简介:阮春燕(1990—),女,浙江宁波人,本科生,从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: 695206842@qq.com。

通信作者:陈崇顺,博士,主要从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: chenchongshun@njnu.edu.cn。

[3] Magneschi L, Perata P. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen[J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(2): 181-196.

[4] 应存山. 中国稻种资源[M]. 北京:中国农业出版社,1993: 79-80.

[5] 鄂志国, 张丽靖. 水稻盐胁迫应答的分子机制[J]. 杂交水稻, 2010, 25(2): 1-5.

[6] 曲雪萍, 贺道耀, 余叔文. 水稻中 *p5cs* 基因的存在及其在高脯氨酸变异系中的作用[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 49-54.

[7] 潘丽娟, 黄骥, 王州飞, 等. 水稻胆碱单加氧酶基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(1): 8-14.

[8] 王慧中, 卢德赵, 颜美仙, 等. 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因转化水稻(*Oryza sativa* L.)研究[J]. 科技通报, 2002, 18(6): 441-445.

[9] 王慧中, 刘俊君, 卢德赵, 等. 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因转化水稻的研究[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 6-10.

[10] 李子银, 张劲松, 陈受宜. 水稻盐胁迫应答基因的克隆、表达及染色体定位[J]. 中国科学: C 辑, 1999, 29(6): 561-570.

[11] Huang W, Ma X, Wang Q, et al. Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(4/5): 451-463.

[12] González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés J M, et al. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(8): 1833-1846.

[13] 张恩平, 张淑红, Cordewener J, 等. 盐胁迫下不同盐敏感型番茄在蛋白质表达上的差异[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 25-28.

[14] 孙公臣, 赵庆雷, 陈峰, 等. 几个水稻品种的耐盐性鉴定试验[J]. 山东农业科学, 2011(6): 24-25, 29.

[15] 时冉冉. 盐胁迫下蚕豆幼苗抗氧化酶动态变化研究[J]. 农业科技通讯, 2009(3): 35-37.

[16] 陈鹭真, 林鹏, 王文卿. 红树植物淹水胁迫响应研究进展[J]. 生态学报, 2006(2): 586-592.

洋桔梗新种质提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 洋桔梗 (*E. grandiflorum* cv. Double Mariachi Pink) 试管苗的叶片取自笔者所在实验室。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α 和 pBI121 质粒为笔者所在实验室保存; pMD18-T 质粒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 主要生化试剂 dNTP、IPTG、X-gal、Amp、Km、DNA 聚合酶、*Bam*H I、*Xba* I 限制性内切酶及 T4-DNA 连接酶等工具酶、质粒小提试剂盒均为宝生物工程(大连)有限公司产品; 植物基因组 DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 洋桔梗基因组 DNA 的提取 称取洋桔梗试管苗叶片 0.1 g 置于研钵, 轻轻加入适量液氮进行研磨, 参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 进行洋桔梗基因组 DNA 的提取。

1.2.2 洋桔梗 *F3H* 基因片段的克隆 以上述提取的洋桔梗基因组 DNA 为模板, 利用根据 NCBI GenBank 数据库中洋桔梗 *F3H* 基因 cDNA 序列(登录号: AB078956.1)所设计的 P1 和 P2 为 1 对特异引物, 进行 PCR 扩增, 以克隆洋桔梗 *F3H* 基因片段。

为方便后续试验操作, 在 2 个引物的 5' 端分别引入了酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba* I, 并外加 3 个保护碱基, 具体序列为(标有下划线的为酶切位点): P1: 5' - TCGCGATCCGAGGTAT TATCGGAGGCAAT - 3'; P2: 5' - CGCTCTAGAGAAAGCAATAGG TAAGACAA - 3'。

PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 55 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。在 PCR 完成后, 取 5 μ L 反应产物, 加样于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 随后参照普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒说明书, 回收 PCR 产物, 送往美吉生物公司进行 DNA 序列测定。

1.2.3 中间载体 pMD18-T-*F3H* 的构建 利用 TA 克隆方法, 以 T4-DNA 为连接酶, 将用 DNA 回收试剂盒回收的 *F3H* 基因 PCR 扩增产物与 pMD18-T 质粒进行连接重组; 再将重组子通过 CaCl_2 法导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG、Amp 的琼脂培养基平板上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜; 挑取白色单菌落, 进行菌落 PCR (PCR 程序与 *F3H* 基因 PCR 克隆相同), 电泳检测; 经菌落 PCR 初步鉴定正确后, 再使用质粒小提试剂盒从大肠杆菌 DH5 α 中提取重组质粒, 进行进一步的酶切检测, 以确认成功构建中间载体 pMD18-T-*F3H*。

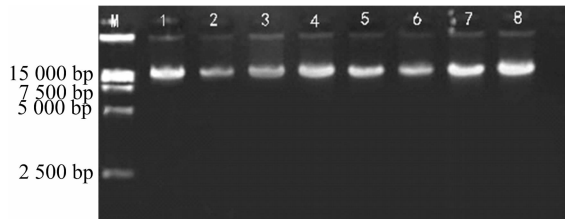
1.2.4 植物反义表达载体 pBI121-*F3H* 的构建 对确认构建成功的中间载体 pMD18-T-*F3H* 进行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切, 回收纯化约 1 500 bp 的 *F3H* 基因片段; 对中间表达载体 pBI121 同样进行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切, 回收纯化大片段(约 2 700 bp); 将上述回收纯化的 2 个片段用 T4-DNA 连接酶进行连接重组, 即将 *F3H* 基因片段反向插入 pBI121 质粒中, 构建成植物反义表达载体 pBI121-*F3H*, 连接反应参照 T4-DNA 连接酶说明书。然后将 pBI121-*F3H* 导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Km 的琼脂培养基平板上

37 $^{\circ}$ C 培养过夜; 挑取单菌落, 进行菌落 PCR (PCR 程序与 *F3H* 基因 PCR 克隆相同), 电泳检测, 以确认成功构建植物反义表达载体 pBI121-*F3H*。

2 结果与分析

2.1 洋桔梗基因组 DNA 的提取

使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取洋桔梗基因组 DNA, 提取结果完全符合后续试验要求(图 1)。

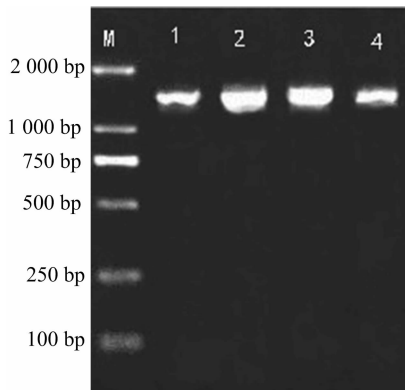


1~8—洋桔梗基因组 DNA; M—DNA marker

图1 洋桔梗基因组 DNA 提取电泳

2.2 *F3H* 基因片段的克隆及其鉴定

以上述提取的洋桔梗 DNA 基因组为模板, 根据洋桔梗 *F3H* 基因 cDNA 序列所设计的 P1 和 P2 为引物, 进行 PCR 扩增, 扩增出了唯一 1 条条带, 大约 1 500 bp(图 2)。回收纯化该扩增产物, 进行 DNA 序列测定, 测序结果可确认 *F3H* 基因片段克隆成功。



1~4—*F3H* 基因的 PCR 产物; M—DNA marker

图2 *F3H* 基因片段 PCR 扩增电泳

2.3 中间载体 pMD18-T-*F3H* 的构建及鉴定

将克隆得到的 *F3H* 基因片段与 pMD18-T 连接重组, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 。挑取白色单菌落, 进行菌落 PCR 鉴定。电泳结果(图 3)显示, 扩增出了 1 500 bp 左右的 *F3H* 片段, 与预期结果相符。该结果初步表明, 重组子已经导入大肠杆菌 DH5 α 中。再将重组子 pMD18-T-*F3H* 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切, 检测结果(图 4)显示, 得到 3 条条带, 从上而下: 第 1 条大小为 4 200 bp 左右, 是重组子 pMD18-T-*F3H*; 第 2 条大小为 2 700 bp 左右, 为 pMD18-T 载体; 第 3 条大小为 1 500 bp 左右, 为 *F3H* 基因。结果表明, 中间载体 pMD18-T-*F3H* 已经构建成功。

2.4 *F3H* 基因片段序列的测定及分析

2.4.1 *F3H* 基因片段序列的测定 洋桔梗叶片基因组黄烷酮 3-羟化酶(*F3H*) 基因片段测序结果见图 5。

2.4.2 *F3H* 基因片段序列的分析 利用 GenBank 中的 Blast

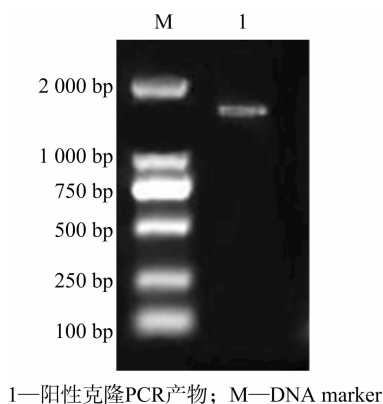
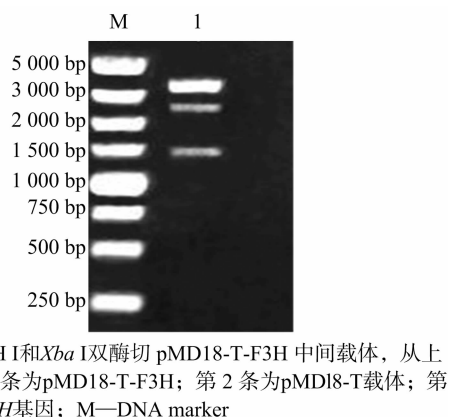


图3 大肠杆菌DH 5α的菌落 PCR 电泳

图4 *Bam*H I和*Xba*I双酶切重组子pMD18-T-*F3H*电泳

```

1   GGATCCGAGG TATTATCGGA GGCAATGGGA CTGGAGAAAAG AGGCTTTAAC CAAGGCATGT
61  GTTGATATGG ATCAGAAAAT AGTGGTGAAT TATTATCCCA AATGTCCACA GCCAGACCTC
121 ACACTTGGTC TTAAGACACA CACAGATCCA GGAACCATAA CCCTTTTGTG GCAAGACCAA
181 GTCGGAGGTC TTCAAGCCAC CAGAGATGGT GGGAACACTT GGATCACTGT TCTTCTGTT
241 GATGGTGCTT TTGTTGTAA CCTTGGTGAC CATGGCCATG TAATCTCTCC TTCTCTCTCC
301 TCTTTTCACT TTGCTACTCT TTTTGTTTTC TTTAGAAATT TCATTTTGAT ACTTTTGGTA
361 GCTTATATTT TTATTACTTC CCCCTCCCAA AAAAAATGTT GTCCCATTTT AACACTATTT
421 AGAAAAAACT AACAACAACA ACAACACTAA GTCATTGCTT TATAGACACC TATCTATGAC
481 AGGGTATGAG AGGTTGGATA TATAAAACCA TATCTATATG TTAGAAGATG TTTCCCGATG
541 ACCCATATGA GAAAGAAATC ATACAATTGT TAATTGAGAG AGAATAATTT CCCATTTCAA
601 CACTATTTAG AAAAACTAA CAACAACAAC ACTAACTCGT TGCTTTATAG ATACCCATCT
661 ATGACAGGGT ATGAGAAGTT GGATGTATAA AACCATATCT ATATGTTAGA AGATGTTGTT
721 TTCCGATGGC CTATATGAGA AAGAAATTAT ACAATTGTTA ATTGAGAGAG AATAATTTCC
781 CATTTCACCA CTATTTAGAA AAAACTAATA ACAACACTAA CTCGTTGCTT TATAGACACA
841 CATCTATGAC AGGGTATGAG AAGTTGGATG TATAAAACCA TATCTATATG TTAGAAGATG
901 TTGTTTCCCG ATGGCGCATA TGAGATATAT ATCATACAAA TATTGATTGA GAGAGTATAT
961 ATATGGTATT TACATTAGAA TTTTACTTAA CAAGACATGC TGTATATCTC AAGAAGAGTA
1021 TATTGTGACT CCAAACTAA GTTGAGAAAAT TTTGTTGAAT AGTATTTGAG CAATGGGAGG
1081 TTCAAGAATG CAGACCACCA AGCAGTGGTG AACTCAAATA GCAGCAGGCT ATCAATTGCC
1141 ACATTCCAGA ATCCGGCGCC AGAGGCGACC GTGTATCCGC TGGCGGTGAG AGAAGGGGAG
1201 ACGCCGGTTC TGGAGGCGCC GATGACATTT GCTGAGATGT ACAGGAGGAA AATGAGCAAG
1261 GACCTGGAGC TGGCTAAGCT GAAGAAGTTG GCAAAGGAGA ATGAGTTGAA ACATGTTGAA
1321 AAGGCCAAGG TTGAGAGCAA GCCTATTGAG GAGATCTTTG CCTAATAATT TGCTATTTCT
1381 TGATTGCGG TTAATCCCT TGTCTTACCT ATTGCTTCTC TAGAGCG

```

标有底纹的序列推测为内含子

图5 洋桔梗 *F3H* 基因的碱基序列

工具,对测序结果(全长 1 427 bp)与 NCBI GenBank 上公布的从洋桔梗花瓣黄烷酮 3-羟化酶(*F3H*)基因 mRNA 而来的 cDNA 序列进行比较发现,本研究从洋桔梗叶片基因组扩增出的 *F3H* 基因片段,比从洋桔梗花瓣分离得到的 *F3H* 基因片段的 cDNA 多了 1 段序列,推测是 1 个内含子(图 5 中标有字符底纹的序列)。

利用 DNAMAN 对本研究所获得的上述 *F3H* 基因片段序列进行限制性内切酶酶切位点分析,其主要酶切位点见表 1。

2.5 反义表达载体 pBI121-*F3H* 的构建及鉴定

将重组子 pMD18-T-*F3H* 与质粒 pBI121 分别经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切,用 T4-DNA 连接酶连接、回收、纯化后,转化大肠杆菌 DH5α。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定,电泳结果(图 6)显示,得到 1 条约 1 500 bp 左右的条带。结果表明,*F3H* 基因反义表达载体 pBI121-*F3H* 已经构建成功。

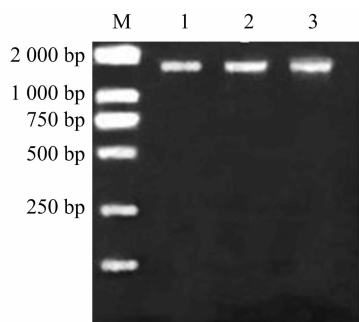
3 结论与讨论

F3H 是花青素生物合成途径中的关键酶。*F3H* 基因已

表 1 *F3H* 基因片段序列进行限制性内切酶酶切位点

限制性内切酶	识别位点	酶切位点数 (个)	酶切位点位置 (bp)
<i>Bam</i> H I	G/GATCC	1	1
<i>Bsc</i> 91 I	GAAGACNN/	1	181
<i>Hpa</i> I	GTT/AAC	1	258
<i>Bal</i> I	TGG/CCA	1	275
<i>Nde</i> I	CA/TATG	2	545, 918
<i>Mfe</i> I	C/AATTG	3	564, 752, 1 133
<i>Ssp</i> I	AAT/ATT	1	941
<i>Bsm</i> I	GAATGCN/	1	1 092
<i>Bbe</i> I	GGCGC/C	2	1 159, 1 219
<i>Ehe</i> I	GGC/GCC	2	1 157, 1 217
<i>Bsp</i> 1407 I	T/GTACA	1	1 238
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	1	1 352
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	1	1 419

经从多种植物的多种不同器官中克隆得到。不同器官包括花瓣、果皮、胚胎、块根、植株叶片等,其中大多数种类试材的取材时间都受到某种程度的限制。本研究试材取自笔者所在的实



M—DNA marker; 1~3—阳性克隆PCR产物

图6 导入反义表达载体 pBI121-*F3H* 的大肠杆菌 DH5 α 菌落 PCR 电泳

实验室增殖保存的洋桔梗试管苗叶片。以该试材提取的基因组 DNA 为模板,进行同源克隆 PCR 扩增,只扩增出 *F3H* 基因唯一 1 条条带;测序后,与从花瓣中 cDNA 所获得的 *F3H* 基因进行序列比对,除了内含子之外,外显子的序列完全相同^[7]。

与众多相关研究通过 cDNA 进行克隆不同的是,本研究选以洋桔梗基因组 DNA 为模板,利用同源克隆的方法,进行 *F3H* 基因的克隆。本研究的目的是为进一步利用植物基因工程技术调控洋桔梗 *F3H* 基因的表达提供重要基础。已有研究表明,在反义核酸技术的应用中,来源于植物基因组的 DNA 转化植物后对内源基因的抑制效果与来源于 mRNA 的 cDNA 相当甚至更明显^[16]。

本研究克隆的是洋桔梗 *F3H* 基因的片段,非全长序列。Smith 等将 PG cDNA 5' 端的 730 bp 片段反向插入,接上 CaMV 35S 启动子和 *Nos* 基因 3' 末端,构建了一个反义融合基因,将其转入农杆菌,转化番茄茎段,在转基因叶中和果实中都发现了反义 PG RNA,其 PG 酶活性只有正常株的 10%^[17]。而 Sheehy 等用全长的 PG cDNA 进行上述同样的试验,测定结果表明,在果实成熟的各个阶段 PG RNA 和 PG 酶的水平也大大降低^[18]。余义勋等用香石竹基因组 ACC 氧化酶基因 DNA 片段(非全长基因)构建反义表达载体,转化香石竹,结果表明,反义基因能有效抑制内源同源基因的表达^[16]。

本研究以周年可取的洋桔梗试管苗叶片为试材,提取基因组 DNA,通过设计 1 对特异性引物,进行 PCR 扩增,克隆了 *F3H* 基因,再将其反向插入 pBI121 质粒,成功构建了洋桔梗 *F3H* 基因反义表达载体,为利用植物基因工程技术调控洋桔梗 *F3H* 基因的表达,并改变了花色。同时,本研究结果为创建洋桔梗新种质提供了技术贮备。

参考文献:

- [1] 桂敏,莫锡君,吴旻,等. 洋桔梗切花栽培管理技术[J]. 中国种业,2005(8):53-54.
- [2] 张龙,李卫华,姜淑梅,等. 花色素苷生物合成与分子调控研究

进展[J]. 园艺学报,2008,35(6):909-916.

- [3] Yacyszyn M D, Stanley T, Crooke M D. The concept and application of antisense oligonucleotides[J]. Diseases of the Colon & Rectum, 2001,44(9):1241-1243.
- [4] 郑晓飞. RNA 实验技术手册:分子克隆实验指南系列[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [5] 吴少华,张大生. 红巴梨果实花青素生成相关基因 *f3h* 全长片段的克隆[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2002,31(3):361-365.
- [6] Kim S H, Lee J R, Hong S T, et al. Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin[J]. Plant Science,2003,165(2):201-203.
- [7] Noda N, Kanno Y, Kato N, et al. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) [J]. Physiologia Plantarum,2004,122:305-313.
- [8] 张华玲,黄元射,杨春贤,等. 苦葵黄烷酮 3-羟化酶基因 *F3H* 的克隆及序列分析[J]. 西北植物学报,2010,30(3):447-452.
- [9] 许志茹,崔国新,李春雷,等. 茼蒿黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆、序列分析及表达[J]. 分子植物育种,2008,6(4):787-792.
- [10] 章希娟,许鸿川,游向荣,等. 龙眼胚胎 *F3H* 基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 园艺学报,2008,35(11):1581-1586.
- [11] 杨红丽,王彦昌,姜正旺,等. ‘红阳’猕猴桃 cDNA 文库构建及 *F3H* 基因的表达初探[J]. 遗传,2009,31(12):1265-1272.
- [12] 彭江,李鹏,宋锋,等. 非洲菊 *F3H* 基因的克隆及反义表达载体的构建[J]. 西南大学学报:自然科学版,2010,32(6):95-98.
- [13] 许锋,李琳玲,程华,等. 核桃黄烷酮 3-羟化酶基因 cDNA 3' 端的克隆与序列分析[J]. 西北农业学报,2010,19(1):151-157.
- [14] Elomaa P, Hnkanen J, Puska R, et al. *Agrobacterium* - mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to gerbera hybrid inhibits flower pigmentation[J]. Bio-Technology,1993,11:508-511.
- [15] Aida R, Yoshida K, Kondo T, et al. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene[J]. Plant Science,2000,160(1):49-56.
- [16] 余义勋,包满珠. 不同结构的外源 *ACO* 基因导入香石竹对瓶插寿命的影响[J]. 生物工程学报,2004,5(4):704-707.
- [17] Smith C S, Waston C F, Ray J. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes [J]. Nature, 1988,334(25):724-726.
- [18] Sheehy R E, Kramer M, Hiatt W R. Advances in applying antisense RNA technology to controlling fruit maturation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988,85:8805.