

矮牵牛 PDS 基因的克隆及其在 shRNA 介导的基因沉默中的应用

杨莎*, 张彬*, 韩垚, 杨霞, 李名扬, 郭余龙**

(西南大学园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术中心, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:以矮牵牛(*Petunia hybrida*)自交系‘Mitchell Diploid’(MD)为材料,通过 3’ RACE 和 5’ RACE 获得了其八氢番茄红素脱氢酶基因(*PhPDS*)的 cDNA 序列,进而通过 PCR 扩增出编码区的基因组序列。分析结果显示,*PhPDS*的 cDNA 序列全长 2 182 bp,编码区序列 1 746 bp,编码 582 个氨基酸。推测的蛋白质序列具有类胡萝卜素脱氢酶的保守结构域特征。编码区的基因组序列长 7 609 bp,结构与番茄和拟南芥等 PDS 基因相似,具有 14 个外显子和 13 个内含子。利用博德研究所的小发夹 RNA(shRNA)设计程序设计了两个针对 *PhPDS* 的 shRNA,构建植物表达载体转化矮牵牛后,从其中一个载体的转化子中获得白色愈伤组织和幼枝,对白色幼枝的 RT-PCR 检测表明,其 PDS 基因的 cDNA 累积量减少,表明 shRNA 基因沉默技术能在矮牵牛中应用。以 PDS 基因为靶基因比用花色素合成基因研究基因沉默技术能更快地分析基因沉默的效果,全长序列的获得将有助于 PDS 基因在矮牵牛基因沉默技术研究中的应用。

关键词:矮牵牛;八氢番茄红素脱氢酶基因;基因沉默;shRNA

中图分类号:S 681.6

文献标志码:A

文章编号:0513-353X(2017)02-0315-08

Cloning of *Petunia* PDS Gene and Its Application in shRNA-mediated Gene Silencing

YANG Sha*, ZHANG Bin*, HAN Yao, YANG Xia, LI Mingyang, and GUO Yulong**

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

Abstract: The full-length cDNA sequence of the phytoene desaturase gene (*PDS*) of *Petunia hybrida* was isolated by using 3’ RACE and 5’ RACE. Subsequently, the genomic sequence of the *PhPDS* coding region was obtained by PCR amplification using primers designed according to its cDNA sequence. Sequence analysis indicated that the full-length cDNA of *PhPDS* was 2 182 bp in length, containing a coding sequence (CDS) of 1 746 bp coding for a putative protein of 582 amino acids. The putative *PhPDS* protein is characterized by the two conserved domains of the carotenoids dehydrogenase family. The genomic sequence of *PhPDS* coding region was 7 609 bp, including 14 exons and 13 introns. This structure is similar to that of tomato and *Arabidopsis* PDS genes. Two shRNAs targeted to *PhPDS* were

收稿日期: 2016-11-01; 修回日期: 2017-02-12

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2016D062); 重庆市科委项目(cstc2014yykfB80008)

* 并列第一作者

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

designed using the TRC shRNA design process from Broad Institute, and plant expression vectors (pGSH-pds1 and pGSH-pds2) were constructed using conventional molecular cloning technique. Albino callus and shoots were produced from pGSH-pds1 transformants after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petunia leaf discs. RT-PCR analysis showed that the accumulation of *PDS* mRNA in albino shoots was reduced clearly, which indicating that shRNA technique is applicable to petunia. *CHS* (*chalcone synthase*) is conventionally employed to evaluate gene silencing methods in petunia. However, phenotype caused by the disruption of *PDS* function can be discerned earlier than that of *CHS*. Cloning of petunia *PDS* will facilitate its application in gene silencing research.

Keywords: petunia; phytoene desaturase gene; gene silencing; shRNA

类胡萝卜素是光合作用过程中的辅助色素,能够猝灭单线态氧从而保护叶绿素不受到伤害(Qin et al., 2007)。八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素合成途径中的关键酶,PDS 基因功能的失活会导致类胡萝卜素不能有效合成,叶绿素在光照条件下会被破坏,使本应呈绿色的组织变成白色,即出现光漂白现象,这为基因功能缺失提供一个肉眼可见的明显表型变化。由于功能失活后表型极易观察,PDS 基因在拟南芥、水稻等模式植物依赖小 RNA 的基因沉默和定点突变技术的研究中都有应用(Montgomery et al., 2008; Zhang et al., 2012; Li et al., 2013; Shan et al., 2013; Ma et al., 2015)。在矮牵牛基因沉默技术的研究中,以前主要以影响花色的查尔酮合成酶基因为靶标(Jorgensen, 1995; Chen et al., 2004; de Paoli et al., 2009; 王会平等, 2012; Kasai et al., 2013)。与用花色基因研究基因沉默技术比较,以 PDS 基因作为靶基因具有表型变化出现更早等优点。矮牵牛 PDS 基因在病毒介导的基因沉默技术(VIGS)研究中有应用(Chen et al., 2004),最近,本实验室也将其用于微小 RNA 诱导的基因沉默技术(MIGS)和 CRISPR/Cas9 定点突变技术研究中(Han et al., 2015; Zhang et al., 2016)。可是,一直没有矮牵牛 PDS 基因的全长 cDNA 序列和基因组序列的报道,这为靶点的设计、次级小 RNA 的分析以及基因组中突变位点的检测造成困难。因此有必要分离其全长 cDNA 序列和基因组序列。

小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 介导的基因沉默技术在哺乳动物基因功能研究中有广泛应用(Paddison et al., 2002; Yu et al., 2002; McIntyre & Fanning, 2006)。该技术具有载体构建的程序简单,生成的小 RNA 构成单一,因而能有效降低脱靶概率等优点。但该技术中的研究应用仅有少量报道(Lu et al., 2004; Wang et al., 2008; Kim & Nam, 2012; Kim et al., 2013),在矮牵牛中尚未见该技术的应用。

本试验旨在克隆矮牵牛 PDS 编码区的全长序列,并以其作为靶基因分析 shRNA 技术在矮牵牛中应用的可行性。利用 RACE 技术结合基因组 DNA PCR 扩增获得 *PhPDS* 全长 cDNA 和编码区的基因组序列。利用博德研究所(Broad Institute)的网站在线设计沉默 *PhPDS* 的 shRNA 并构建相应的载体,以验证小发夹 RNA 介导的基因沉默技术在矮牵牛中的效果。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料、菌株与质粒

试验于 2013 年 9 月至 2016 年 5 月在西南大学花卉研究所进行。矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 自交系 'Mitchell Diploid' (MD) 由新西兰 David Lewis 教授赠送。大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、

植物表达载体 pGreen II 0229 由本实验室保存。pMD19-T 购自宝生物（大连）有限公司。

1.2 矮牵牛 PDS 基因的克隆与序列分析

植物组织总 RNA 的提取用 Invitrogen 的 TRIzol 试剂, cDNA 的合成使用宝生物的 PrimerScript RT Master Mix 试剂盒。RNA 浓度和质量检测用 NanoDrop 2000 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳。RACE 模板的合成和 PCR 扩增使用 Invitrogen 的 L1500-01 GeneRacer™ 试剂盒, 矮牵牛的根、茎、叶和花的总 RNA 按 1:1:1:1 质量比混合后用于 RACE 模板的合成。PCR 引物见表 1。植物基因组 DNA 的提取用 CTAB 法, 扩增 PDS 基因编码区基因组序列使用的 PCR 引物见表 1, 扩增条件据所用引物不同进行调整。序列分析使用 Lasergene 7.0 软件包中的程序。基因结构图的绘制使用 GSDS 2.0 程序 (Hu et al., 2015)。

1.3 PDS 基因的半定量分析

以矮牵牛 (MD) 的根、茎、叶和花的 cDNA 为模板, *ACTIN* 基因为内参 (引物 Actin-SF 和 Actin-SR), 扩增 PDS 基因的引物为 PDS-F1 和 PDS-R1 (表 1)。

表 1 试验中所用引物的序列
Table 1 PCR primers used in this experiment

| 用途说明 Comment | 引物编号 Primer name | 序列 (5'→3') Sequence |
|---|---------------------|---|
| 扩增 cDNA 片段 For a cDNA fragment of <i>PhPDS</i> | PDS-F0 | CCAGATAGGGTGACAGATGA |
| 扩增 <i>PhPDS</i> 的 cDNA 和 5'RACE For a cDNA fragment and 5'RACE | PDS-R0 | GAGCGGCAAACACGAATG |
| 5'RACE | PDS-5R2 | CTGTTCAAAGCGATCAAGAAGCACTG |
| 3'RACE | PDS-3R1 | CCAGATAGGGTGACAGATGAGGTGT |
| 3'RACE | PDS-3R2 | CGAGCTGAACGAGGATGGAAGTG |
| 半定量和扩增基因组 For <i>PhPDS</i> genomic DNA and RT-PCR | PDS-F1 | CCGAAGCTCTTCTCTGCTCCAA |
| 扩增基因组 For <i>PhPDS</i> genomic DNA | PDS-R1 | GGTACTCCGACTAACTTCTCCAAC |
| 扩增基因组和 CDS For <i>PhPDS</i> genomic DNA and CDS | PDS-F2 | TTGCCGCTCCAGGTATAATATCCA |
| 扩增基因组 For <i>PhPDS</i> genomic DNA | PDS-R2 | AAGAAGATTAGCCTTCGACCGTCT |
| 扩增基因组和 CDS | PDS-F3 | TGGTCACAAGCCGATATTGC |
| For <i>PhPDS</i> genomic DNA and CDS | PDS-R3 | CCATTTATTGGAGCAGGAAGAG |
| 扩增基因组和 CDS | PDS-F4 | ATGCCCAAATTGGACTTGTTTC |
| For <i>PhPDS</i> genomic DNA and CDS | PDS-R4 | CTTCCACCTAGAACATCCCTTG |
| 半定量内参 RT-PCR reference gene | Actin-SF | AGATCTGGCATCATACTTCTACA |
| 扩增 U6-26 启动子 U6-26 promoter | Actin-SR | CCMGCAGCTTCCATRCCAATCA |
| 合成 shPDS1 Synthesis of shPDS1 | U6-F | gggtaccTCGTTGAACAACGGAAACTC |
| | U6-R | ggaatTCGGATGTCCCCTAAGGGAC |
| | PDS-sh1F | aattGTCGGAGTACCTGTTATAAATCTCGAGATTATAACAGGTACTCCG ACTTTTTG |
| | PDS-sh1R | gataCAAAAAGTCGGAGTACCTGTTATAAATCTCGAGATTATAACAGG TACTCCGAC |
| 合成 shPDS2 Synthesis of shPDS2 | PDS-sh2F | aattCATGCCGATTGTTGAACATAATCTCGAGATATGTTCAACAATCGGCA TGTTTTTG |
| | PDS-sh2R | gataCAAAAACATGCCGATTGTTGAACATAATCTCGAGATATGTTCAACA ATCGGCATG |
| 抗性基因检测 For <i>PAT</i> gene | PAT-F | CGAGACAAGCACGGTCAACTTCC |
| | PAT-R | AGATTTCGGTGACGGGCAGGA |

1.4 PDS 基因 shRNA 植物表达载体构建与遗传转化

构建植物表达载体时首先利用引物 U6-F 和 U6-R (表 1) 扩增拟南芥的 U6-26 启动子, 将扩增

产物用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切后连接到 pGreen II 0229 多克隆位点, 测序验证后命名为 pGSH-m。PhPDS 基因 shRNA 靶位点选择和引物设计通过网站 <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/seq/search> 在线完成。对程序设计的引物的 5'端碱基序列进行人工修改, 以使其能与本试验使用的表达载体酶切位点匹配(表 1)。设计的 shRNA 的二级结构使用 Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>) 进行预测(图 1)。合成的正、反向寡核苷酸引物加入 50 μ L 的 NEB buffer2 反应体系中(引物终浓度 2 μ mol \cdot L⁻¹)、从 100 $^{\circ}$ C 缓慢退火至室温, 形成两端分别具 *Eco*R I 和 *Bam*H I 粘性末端的寡核苷酸双链, 将其与 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切后的 pGSH-m 载体连接, 得到含有编码 shRNA 的 DNA 序列的植物表达载体 pGSH-pds1 和 pGSH-pds2 (图 2)。pGSH-pds1 和 pGSH-pds2 质粒 DNA 用电击法转化导入农杆菌 GV3101。矮牵牛用叶盘法 (Zhang et al., 2016) 进行转化。

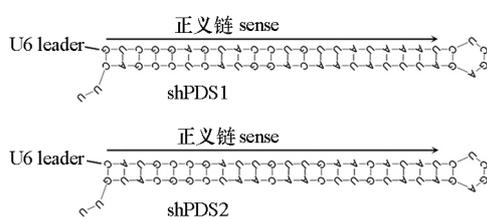


图 1 预测的 shPDS1 和 shPDS2 的二级结构

Fig. 1 Schematic representation of the predicted folding structures of shPDS1 and shPDS2

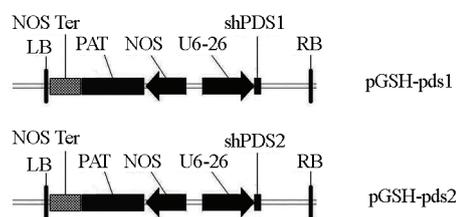


图 2 shPDS1 和 shPDS2 表达载体结构简图

Fig. 2 Schematic representation of the U6::shPDS1 and U6::shPDS2 constructs

1.5 转基因株系的分析

白化抗性芽 DNA 用扩增 BASTA 抗性基因的特异引物 PAT-F 和 PAT-R 进行扩增, 确认外源基因的整合。转基因植株 PDS 基因的表达量变化用 RT-PCR 法进行分析。

2 结果与分析

2.1 矮牵牛 PDS 基因的克隆

根据 GenBank 中登录矮牵牛 *PDS* 基因的部分编码区序列 (AY593974) 设计引物 PDS-F0 和 PDS-R0, 以 'MD' 矮牵牛叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 PDS 基因的约 350 bp 长的片段 (图 3, F), 回收测序后得到片段的序列。据此序列设计 5'RACE 的引物 (PDS-R0 和 PDS-5R2) 与 3'RACE 的引物 (PDS-3R1 和 PDS-3R2), 分别进行两轮巢式 PCR 扩增 (图 3), 得到的目的条带进行测序。测序结果表明, 5'RACE 和 3'RACE 的片段与中间片段具有重叠区, 与预期结果一致。将 3 个片段的序列进行拼接, 得到全长 cDNA 序列, 该序列命名为 *PhPDS* (GenBank 登录号为 KP677483)。根据拼接的序列设计 PCR 引物 (PDS-F1 ~ PDS-F4 和 PDS-R1 ~ PDS-R4), 以基因组 DNA 为模板对 *PhPDS* 的基因组序列分段进行 PCR 扩增, 扩增产物回收测序后进行拼接, 得到 *PhPDS* 编码区的基因组序列 (GenBank 登录号为 KX398952)。最后, 利用引物 PDS-F4 和 PDS-R2, 以 cDNA 为模板扩增 *PhPDS* 的编码区序列, 得到 1 条约 2.0 kb 的条带 (图 3), 测序结果表明其序列与拼接的 cDNA 序列一致。

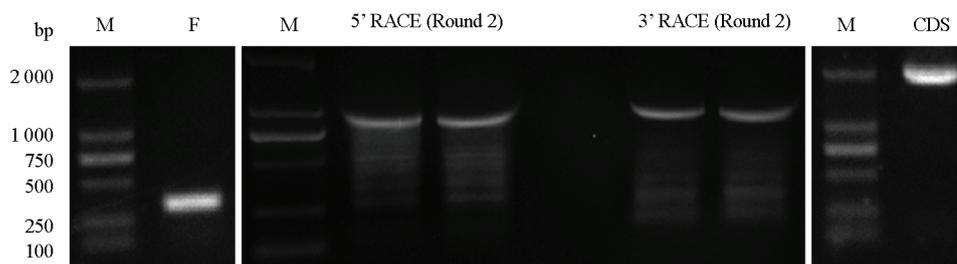


图 3 *PhPDS* 基因片段 (F)、cDNA 末端 (RACE)、编码区序列 (CDS) 的扩增
Fig. 3 Amplification of a cDNA fragment (F), the cDNA ends (RACE) and the coding sequence (CDS) of *PhPDS* from Mitchell Diploid

2.2 *PhPDS* 的序列分析

PhPDS 的 cDNA 序列全长 2 182 bp, 其中包括位于 1 ~ 118 bp 的 5'非翻译区 (5'-UTR); 蛋白编码区位于 119 ~ 1 867 bp 之间, 共编码 582 个氨基酸; 3'非翻译区 (3'-UTR) 长 315 bp。以 *PhPDS* cDNA 推测的编码蛋白序列对 NCBI 的蛋白质参考数据库进行 BLASTp 搜索, 结果表明 *PhPDS* 编码蛋白与番茄、烟草、马铃薯和辣椒等茄科植物的 PDS 蛋白的一致性为 92% ~ 93%。分析同时发现, *PhPDS* 蛋白在 N - 端具有一个保守的二核苷酸结合结构域 [NAD(P)-binding Rossmann-like domain, 图 4, A], 该结构域为所有类胡萝卜素脱氢酶共有, 是许多以 NAD 或 NADP 作为辅助因子的脱氢酶的共同特征 (Pecker et al., 1992); 同时在 C - 端也具有类胡萝卜素脱氢酶的共同序列 (Sandmann, 2002)。对克隆的 cDNA 和基因组序列进行比较, 发现矮牵牛 PDS 基因编码区包含 14 个外显子、13 个内含子, 与番茄 (Mann et al., 1994) 和拟南芥等植物 PDS 基因编码区的结构相同, 但内含子比番茄和拟南芥的稍长 (图 4, B)。

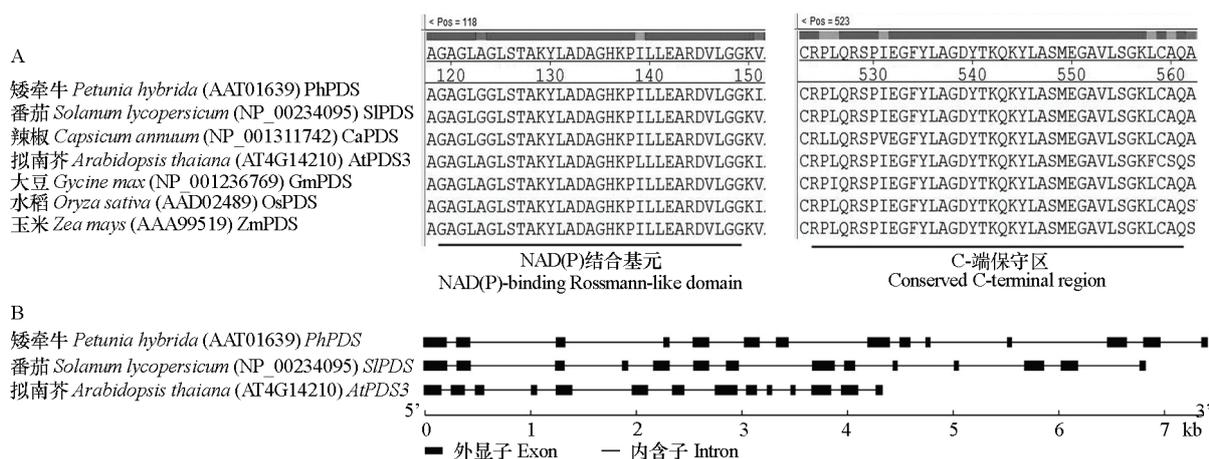


图 4 *PhPDS* 基因的结构特征
Fig. 4 Structure characteristics of *PhPDS*

2.3 *PhPDS* 在矮牵牛不同组织中的表达

以矮牵牛 MD 不同组织的 cDNA 为模板进行半定量 PCR 分析, 结果 (图 5) 显示, *PhPDS* 在茎和叶中表达量较高, 在根和花中表达量低, 表明该基因的表达可能受发育调控。

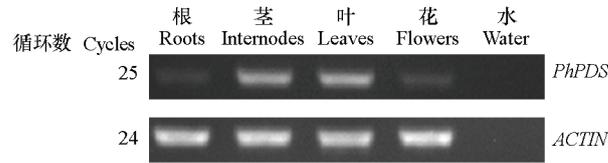


图5 *PhPDS* 基因在不同组织中的表达情况
Fig. 5 Expression of *PhPDS* in different organs

2.4 *PhPDS* 的 shRNA 设计

将 *PhPDS* 的 cDNA 序列提交博德研究所 (Broad Institute) 的 shRNA 设计程序后, 根据返回的结果, 从评分最高 (Intrinsic score = 15.0) 的靶序列中选择了序列 GTCGGAGTACCTGTTATAAAT (*pds1*); 从评分次高 (Intrinsic score = 13.2) 的靶序列中选择了序列 CATGCCGATTGTTGAACATAT (*pds2*)。然后把程序提供的正向引物 5' 末端附加序列 “ccgg” 修改为 “aatt”, 反向引物 5' 末端的附加序列 “aattcaaaaa” 修改为 “gatccaaaa”, 得到用于合成 shRNA DNA 序列的引物 (表 1), 使引物退火后形成的双链 DNA 末端序列能与 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切后的载体末端序列互补。将设计的 shRNA 序列提交 Mfold 进行 RNA 折叠分析, 预测的 shPDS1 和 shPDS2 的二级结构见图 1, 折叠自由能 ΔG 分别为 -1.56×10^5 和 $-1.52 \times 10^5 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.5 转基因矮牵牛的表型变化

pGSH-*pds1* 和 pGSH-*pds2* 分别与约 100 个叶盘外植体进行共培养, 在筛选培养基上培养 6 周后进行统计。从 pGSH-*pds1* 共培养的外植体中长出 327 块抗性愈伤组织, 其中 31 块分化出白色、黄白色的芽 (图 6, A) 或诱导出白色、黄白色愈伤组织 (图 6, B), 将白化芽和愈伤组织继代培养后得到白色或白绿镶嵌的幼枝 (图 6, C)。随机选取 10 个白化抗性系的叶片提取 DNA 进行 PCR 扩增, 均能扩增出 Basta 抗性基因的特异条带 (图 7, A), 野生型幼枝叶片 DNA 不能扩增出该条带, 说明这些白色幼枝中有外源基因存在。取 2 个株系的白色幼枝提取总 RNA, 对其进行 RT-PCR 分析, 结果表明白色幼枝中的 PDS 基因 cDNA 的累积均有下降 (图 7, B), 表明 pGSH-*pds1* 转基因矮牵牛中 PDS 基因的表达受到干扰。

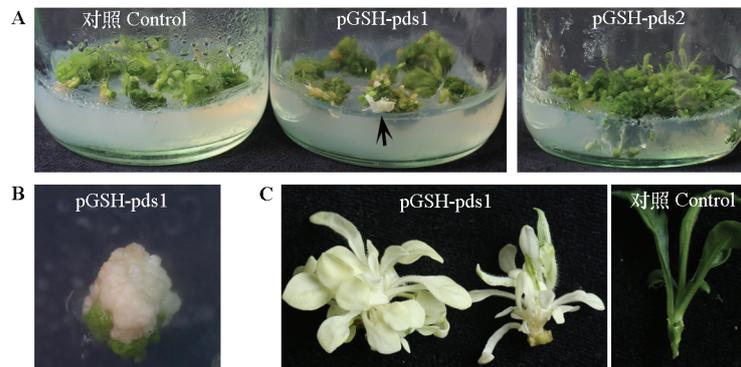


图6 shRNA 介导的矮牵牛 PDS 基因沉默

A、B: pGSH-*pds1* 转化的外植体形成白化芽 (箭头所示) (A) 和白化愈伤组织 (B); C: 白化的 pGSH-*pds1* 幼枝。

Fig. 6 shRNA-mediated PDS gene silencing in petunia

A and B: Albino bud (A, indicated by the arrow) and callus (B) produced from explants transformed with pGSH-*pds1*;
C: Albino pGSH-*pds1* transgenic shoots.

从 pGSH-pds2 共培养的外植体中长出 306 块抗性愈伤组织, 但没有发现有白色愈伤组织或芽的形成 (图 6, A), 说明 pGSH-pds2 质粒转化矮牵牛后不能有效降低内源 PDS 基因的表达水平。

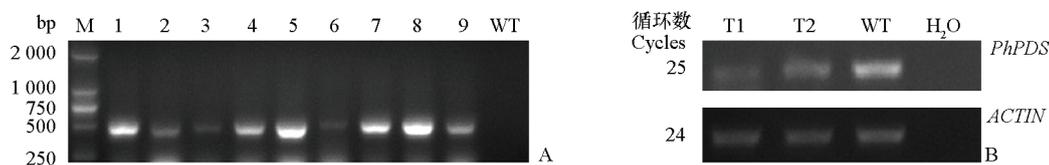


图 7 白化幼枝中 BASTA 抗性基因的 PCR 检测 (A) 和 PhPDS 基因的 RT-PCR 检测 (B)

M: DNA 分子量标记; 1~9: 待检幼枝; T1、T2: 转基因幼枝; WT: 野生型对照。

Fig. 7 PCR detection of the BASTA resistance gene (A) and RT-PCR analysis of PDS mRNA accumulation in albino shoots (B)

M: Marker; 1-9: Putative transgenic shoots; T1 and T2: Albino shoots; WT: Wild type.

3 讨论

本研究中获得了矮牵牛 PDS 基因的全长 cDNA 序列和编码区的基因组序列。分析表明, 该序列与番茄、辣椒、拟南芥、大豆和水稻等已克隆并进行过功能验证的 PDS 基因有很高的同源性, 说明该基因在进化上较为保守, 这与 PDS 基因在植物生命活动过程中发挥重要作用是一致的。序列信息的完善可以更方便地利用该基因作为研究基因沉默和敲除等相关问题的靶标, 为选择基因的不同区段作为靶标区域提供了依据, 同时在研究依赖小 RNA 的基因沉默技术时, 可以方便地分析次级 RNA 的形成等问题。同样, 在研究定点突变或基因组编辑技术时, 选择靶点不再受只有部分序列为已知的限制, 鉴定时在靶点两侧设计 PCR 引物有现成的序列可作参考。

shRNA 介导的基因沉默技术在植物中应用的文献报道中, 选择的靶序列长度为 19 ~ 93 个碱基 (Lu et al., 2004; Wang et al., 2008; Kim & Nam, 2012)。本研究中根据哺乳动物中使用该技术时靶序列设计的算法, 构建了两个靶标序列为 21 nt 的沉默矮牵牛 PDS 基因的 shRNA 载体。初步分析表明, 其中的一个载体 (pGSH-pds1) 发挥了功能, 并且载体的效果与所选用的 shRNA 设计算法对两条靶序列的评分结果一致, 说明这一在哺乳动物细胞建立起来的技术在植物上是可行的, 这为该方法在矮牵牛中的应用奠定了基础。构建的两个载体中预期的靶序列 pds1 和 pds2 明显的差异在其 15 ~ 20 位碱基的构成上, pds1 的 6 个碱基全为 A 或 T, pds2 的含有 1 个 C, 这也是造成 pds1 和 pds2 评分分别为 15.0 和 13.2 的主要因素。靶序列 3'端 AT 含量高, 会增加 shRNA 加工后形成的 siRNA 双链体 (siRNA duplex) 中反义链 5'端的热力学不稳定性, 这将有助于反义 siRNA 链整合到 RISC (RNA-induced silencing complex) 中 (Zhang, 2014), 从而提高基因沉默的效率。这可能是造成 pGSH-pds1 和 pGSH-pds2 基因沉默效果不同的原因。

虽然, 随着 CRISPR/Cas9 等基因组定点突变技术的应用, 依赖小 RNA 的基因沉默技术在基因功能研究中的作用有所变化, 但由于该类技术可实现诱导表达和获得靶标基因具有不同表达水平的转基因株系等特性, 该类技术仍有广泛的用途。ShRNA 载体构建简单, 其在矮牵牛中的成功应用将有助于对矮牵牛基因的功能进行分析。

References

- Chen J C, Jiang C Z, Gookin T E, Hunter D A, Clark D G, Reid M S. 2004. Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Molecular Biology*, 55: 521 - 530.
- de Paoli E, Dorantes-Acosta A, Zhai J, Accerbi M, Jeong D H, Park S, Meyers B C, Jorgensen R A, Green P J. 2009. Distinct extremely abundant siRNAs associated with cosuppression in petunia. *RNA*, 15: 1965 - 1970.

- Han Y, Zhang B, Qin X, Li M, Guo Y. 2015. Investigation of a miRNA-induced gene silencing technique in *Petunia* reveals alterations in miR173 precursor processing and the accumulation of secondary siRNAs from endogenous genes. *PLoS ONE*, 10 (12): e0144909.
- Hu B, Jin J, Guo A Y, Zhang H, Luo J, Gao G. 2015. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31: 1296 - 1297.
- Jorgensen R A. 1995. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene-expression states. *Science*, 268: 686 - 691.
- Kasai M, Matsumura H, Yoshida K, Terauchi R, Taneda A, Kanazawa A. 2013. Deep sequencing uncovers commonality in small RNA profiles between transgene-induced and naturally occurring RNA silencing of chalcone synthase - A gene in petunia. *BMC Genomics*, 14: 63.
- Kim G B, Bae J H, An C S, Nam Y W. 2013. Single or multiple gene silencing directed by U6 promoter-based shRNA vectors facilitates efficient functional genome analysis in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31: 963 - 977.
- Kim G B, Nam Y W. 2012. Isolation and characterization of *Medicago truncatula* U6 promoters for the construction of small hairpin RNA-mediated gene silencing vectors. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31: 581 - 593.
- Li J, Norville J E, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church G M, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31: 688 - 691.
- Lu S, Shi R, Tsao C C, Yi X, Li L, Chiang V L. 2004. RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. *Nucleic Acids Res*, 32: e171.
- Ma X, Nicole M C, Meteignier L V, Hong N, Wang G, Moffett P. 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66: 919 - 932.
- Mann V, Pecker I, Hirschberg J. 1994. Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (pds) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Molecular Biology*, 24: 429 - 434.
- McIntyre G J, Fanning G C. 2006. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotechnology*, 6: 1.
- Montgomery T A, Yoo S J, Fahlgren N, Gilbert S D, Howell M D, Sullivan C M, Alexander A, Nguyen G, Allen E, Ahn J H, Carrington J C. 2008. AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 20055 - 20062.
- Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, Hannon G J, Conklin D S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development*, 16: 948 - 958.
- Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Sandmann G, Hirschberg J. 1992. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 4962 - 4966.
- Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng X W, Chen Z, Qu L J. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 17: 471 - 482.
- Sandmann G. 2002. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiologia Plantarum*, 116: 431 - 440.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi J J, Qiu J L, Gao C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31: 686 - 688.
- Wang Hui-ping, Yu Ling, Zou Shi-hui, Cheng Jing, Guo Yu-long, Li Ming-yang. 2012. Silencing of chalcone synthase genes by artificial microRNA in petunia. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (12): 2491 - 2498. (in Chinese)
- 王会平, 遇玲, 邹世慧, 陈璟, 郭余龙, 李名扬. 2012. 利用 amiRNA 技术沉默矮牵牛查尔酮合成酶基因. *园艺学报*, 39 (12): 2491 - 2498.
- Wang M B, Helliwell C A, Wu L M, Waterhouse P M, Peacock W J, Dennis E S. 2008. Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants. *RNA*, 14: 903 - 913.
- Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 6047 - 6052.
- Zhang B, Yang X, Yang C, Li M, Guo Y. 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. *Scientific Reports*, 6: 20315.
- Zhang C, Ng D W, Lu J, Chen Z J. 2012. Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 69: 217 - 226.
- Zhang Z J. 2014. Artificial trans-acting small interfering RNA: a tool for plant biology study and crop improvements. *Planta*, 239: 1139 - 1146.