

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00348

人工 microRNAs 对拟南芥 *At1g13770* 和 *At2g23470* 基因的特异沉默

李文超, 赵淑清

山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006

摘要: DUF647 (Domain of unknown function 647) 蛋白家族是在真核生物中广泛存在的、高度保守的蛋白家族。拟南芥中该基因家族共有 6 个成员, 迄今为止拟南芥 DUF647 家族中 4 个成员的功能尚不清楚。文章以拟南芥内源 *MIR319a* 前体为骨架, 构建了敲减 DUF647 家族中 2 个基因 *At1g13770* 和 *At2g23470* 表达的人工 microRNAs (Artificial microRNAs, amiRNAs)。利用 WMD (Web microRNA designer) 平台设计分别靶向 *At1g13770* 和 *At2g23470* 基因的 amiRNAs 序列, 通过重叠 PCR 置换拟南芥 *MIR319a* 前体序列。构建融合 amiRNAs 前体的植物表达载体 pCHF3-amiRNAs, 在农杆菌介导下转化拟南芥。RT-PCR 分析表明, amiRNAs 能够显著抑制 *At1g13770* 和 *At2g23470* 基因的表达, 获得了抑制效果明显的转基因株系。*At2g23470*-amiRNA 转基因植株 *At2g23470* 转录水平的下调导致育性严重下降。文章为进一步研究这两个基因的功能奠定了良好的基础。

关键词: 拟南芥; DUF647 基因家族; 人工 microRNA; 基因沉默

Specific gene silencing of *At1g13770* and *At2g23470* by artificial microRNAs in *Arabidopsis*

LI Wen-Chao, ZHAO Shu-Qing

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: DUF647 (domain of unknown function 647) protein family is found in diverse eukaryotic organisms and highly conserved in eukaryotes. It has 6 members in *Arabidopsis* genome. So far, the function of 4 members of *Arabidopsis* DUF647 family is unknown. In this report, using an endogenous *Arabidopsis MIR319a* precursor as the backbone, we constructed two artificial microRNAs (amiRNAs) to knock down the expression of two DUF647 family genes *At1g13770* and *At2g23470*. Using the WMD (Web microRNA Designer) platform, we designed two amiRNAs targeting *At1g13770* and *At2g23470* genes, respectively. Both amiRNAs sequences were engineered into the *MIR319a* precursor using overlapping PCR and the amiRNAs backbones were transferred into the binary vector pCHF3. The resulting plasmids that harbor

收稿日期: 2011-07-03; 修回日期: 2011-08-03

基金项目: 山西省国际科技合作计划(编号: 2009081005), 山西省留学人员科技活动项目择优资助项目, 山西省回国留学人员科研资助项目(编号: 201003)和太原市科技明星专项(编号: 11014902)资助

作者简介: 李文超, 博士研究生, 专业方向: 植物分子遗传学。E-mail: lwch.001@163.com

通讯作者: 赵淑清, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物分子遗传学。E-mail: shuqing@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2012-1-11 14:35:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120111.1435.001.html>

amiRNAs stem loop fragments were transformed into *Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediated floral dipping. Upon constitutive expression of these two amiRNAs, the target genes were efficiently down-regulated in transgenic line. The decreased level of *At2g23470* transcript in *At2g23470*-amiRNA transgenic plants resulted in severe sterility. This work will facilitate the functional analysis of *At1g13770* and *At2g23470* genes in *Arabidopsis* growth and development.

Keywords: *Arabidopsis*; DUF647 gene family; artificial microRNAs; gene silencing

DUF647 (Domain of unknown function 647)蛋白家族是在真核生物中广泛存在、高度保守的蛋白家族。在拟南芥中,有6个DUF647蛋白家族成员,分别由*At2g31190*、*At3g45890*、*At1g13770*、*At5g01510*、*At5g49820*和*At2g23470*基因编码。通过T-DNA插入突变、快中子诱变以及EMS诱变筛选获得了拟南芥DUF647家族基因*At3g45890(rus1)*和*At2g31190*的突变体(*rus2/wxr1*)^[1-3]。功能鉴定显示,RUS1通过感觉低通量率的UVB参与拟南芥幼苗的早期形态建成和发育,而RUS2与RUS1共同作用于根UVB感受途径^[1,2]。最新的研究表明,RUS2/WXR1对植物生长素的极向运输和保持根部正常水平的PIN蛋白是必须的。在*wxr1*幼苗中,生长素的极向运输减少。此外,在*wxr1*根部,生长素运输蛋白PIN的水平降低^[3]。不过,*rus2/wxr1*突变体的生长素运输/分配缺陷以及UV高度敏感似乎都是由于细胞调控(可能是蛋白运输)缺陷引起的,因为WXR1是一个质体蛋白,而PIN是一个质膜蛋白。质体蛋白WXR1功能的缺失如何影响到质膜蛋白的水平,只有等得到RUS1/WXR1和其他DUF647蛋白家族成员的生化功能信息才能解答。研究DUF647蛋白家族中其他成员的功能,对于全面理解DUF647家族蛋白的作用非常必要。

MicroRNAs (miRNAs)是由核基因编码、具有典型发夹结构的转录本加工生成、大约21个核苷酸长的小RNAs分子。miRNAs通过序列特异的碱基配对切割靶标mRNA或者抑制其翻译,从而控制靶基因的表达^[4-6]。植物可以利用高度保守的以及种特异的miRNA控制一系列的生物过程^[5]。但天然的植物miRNAs通常以高度的序列互补影响靶基因,因此,天然植物miRNAs影响到的靶基因数目较少^[7]。近年来,人工microRNAs (Artificial microRNAs, amiRNAs)技术发展迅速,先后在拟南芥、水稻、苔藓和衣藻

等植物中得到了成功的应用^[7-11]。简单来说,amiRNAs是通过置换内源miRNAs前体的miRNA/miRNA*为amiRNA/amiRNA*,而保留miRNAs骨架中的碱基配对和错配模式而产生。这样,amiRNAs可以设计成靶向任何一个感兴趣的基因或同时靶向某几个相关的基因。amiRNAs技术最大的优点是特异性高、作用谱广和沉默效应稳定。因此,amiRNAs技术正成为基因功能分析的一种有效手段。

本研究针对拟南芥DUF647家族中另外4个基因功能未知的情况,利用人工microRNAs技术对DUF647家族中其中两个基因*At1g13770*和*At2g23470*进行了特异沉默。以*MIR319a*前体分子作为骨架,替换miRNA序列为amiRNA序列,构建高效表达载体分别沉默*At1g13770*和*At2g23470*基因,旨在得到干扰这两个基因表达的转基因株系,从而为研究这些基因的功能奠定基础,这对于了解DUF647家族基因在拟南芥生长发育中的作用具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)Top10和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)AGL1由本实验室保存。质粒pRS300和双元载体pCHF3由美国Salk研究所郑祖宇博士惠赠。

1.1.2 植物材料与生长条件

本研究所用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)品系均来自Columbia (Col-0)生态型。生长条件:光周期16 h光照/8 h黑暗;光照强度120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度50%~70%;温度22±2。

1.2 方法

1.2.1 人工 microRNA 的分子设计及其克隆

利用 WMD(<http://wmd2.weigelworld.org>)平台设计靶向拟南芥 *At1g13770*、*At2g23470* 基因的 amiRNAs 序列(表 1)及产生这些 amiRNAs 的特异引物、 、 、 (表 2)。另外两个通用引物 A 和 B 与 *MIR319a* 外围的 pRS300 质粒配对, 其序列为:

A: 5'-CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3';
B: 5'-GCGGATAACAATTCACACAGGAAACA
G-3'.

以质粒 pRS300 为模板, 通过重叠 PCR 把质粒 pRS300 中内源 *miR319a* 序列的 20 个核苷酸 miRNA 序列置换为 21 个核苷酸的 amiRNA 序列^[12]。在第一轮的 PCR 中首先扩增出 amiRNAs 前体的 5'臂(片段 a)、中心环(片段 b)和 3'臂(片段 c), 产物 a、b、c 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化。然后以这 3 个片段的 DNA 混合物为模板, 以 A 和 B 为引物扩增覆盖整个前体的片段 d。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化片段 d, 连接至克隆载体 pCR@-Blunt(Invitrogen), 转化感受态 *E. coli* Top10。挑取阳性克隆, 酶切鉴定, 并测序确认。

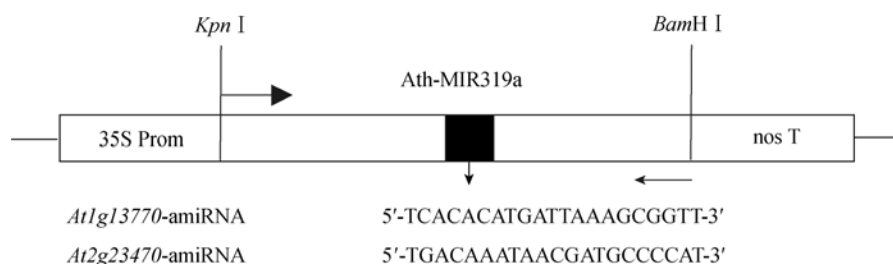
1.2.2 植物表达载体 pCHF3-amiRNAs 的构建

表 1 amiRNA 序列及相应的靶基因

amiRNA 名称	预测的成熟 amiRNA 序列(5'→3')	靶向基因
<i>At1g13770</i> -amiRNA	TCACACATGATTAAGCGGTT	<i>At1g13770</i>
<i>At2g23470</i> -amiRNA	TGACAAATAACGATGCCCCAT	<i>At2g23470</i>

表 2 产生 amiRNA 的引物序列

amiRNA	引物序列(5'→3')			
	I	II	III	IV
<i>At1g13770</i> -amiRNA	GATCACACATGATTAAGCGGTTTCTCTCTTT	GAAACCGCTTAAATCATG	GAACCCGCTTAAATGAT	GATCACACATCATTAA
	TGTATTCC	TGTGATCAAAGAGAATC	GTGTGATCACAGGTCGT	AGCGGGTTCTACATAT
	TGTATTCC	AATGA	GATATG	ATATTCCT
<i>At2g23470</i> -amiRNA	GATGACAAATAACGATGCCCATTCCTCTCTTT	GAATGGGGCATCGTTATT	GAACGGGGCATCGTAAT	GATGACAAATTACGAT
	TGTATTCC	TGTCATCAAAGAGAATC	TTGTCATCACAGGTCGT	GCCCGGTTCTACATAT
	TGTATTCC	AATGA	GATATG	ATATTCCT



*Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切经测序正确的包含 amiRNAs 的质粒 DNA 和 pCHF3 载体, 回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶(Promega)连接, 转化感受态 *E. coli* Top10, 挑选阳性克隆, 提取质粒 DNA, 酶切鉴定。将植物表达载体分别命名为 pCHF3-amiR-*At1g13770* 和 pCHF3-amiR-*At2g23470*。amiRNAs 表达载体的构建如图 1 所示。

1.2.3 拟南芥转基因植株的获得

采用液氮冻融法^[12]将 pCHF3-amiR-*At1g13770* 和 pCHF3-amiR-*At2g23470* 质粒分别转入农杆菌 AGL1, 在含(Amp 50 mg/L, Spec 100 mg/L)抗性的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆, 并用 PCR 法鉴定。

利用农杆菌介导的花苞浸染法^[13]转化野生型拟南芥。将转化后收集的 T₁ 代种子在含有 100 mg/L 卡那霉素的 1/2 MS 固体培养基平板上进行抗性筛选。转基因幼苗具有卡那霉素抗性, 在抗性平板上能够正常生长, 叶片为绿色, 而非转基因幼苗由于

图 1 amiRNAs 表达载体的构建示意图

没有卡那霉素抗性发生黄化。待平板上的绿苗长出 4 片真叶时, 将其转入混有蛭石的营养土中, 覆膜保湿一周, 然后去除塑料膜, 继续培养至成熟, 单株收取种子。

采用 CTAB 法抽提转基因植株 DNA^[14], 根据 *MIR319a* 前体骨架的序列设计引物, 引物序列为: 5'-GGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGA-3' 和 5'-GGATCCCCCATGGCGATGCCTTAAAT-3', PCR 鉴定整合有 amiRNA 表达载体的转基因株系。PCR 扩增程序为: 94 预变性 3 min; 然后 94 变性 30 s, 65 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 延伸 5 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.4 转基因拟南芥植株中目的基因的转录分析

取培养 21 d 的野生型拟南芥 *col*、*At1g13770*-amiRNA 和 *At2g23470*-amiRNA 转基因植株的叶片, 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 目录编号 15596-026) 提取 RNA。用 DNase I (TaKaRa) 去除 DNA 污染。按照 SuperScript III cDNA 第一链合成系统 (Invitrogen, 目录编号 18080-051) 试剂盒说明书进行 RT-PCR。以 *Tublin* 作为内参。RT-PCR 引物序列见表 3。PCR 扩增程序为: 94 预变性 3 min; 然后 94 变性 30 s, 57

复性 30 s, 72 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 延伸 5 min。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

2 结果与分析

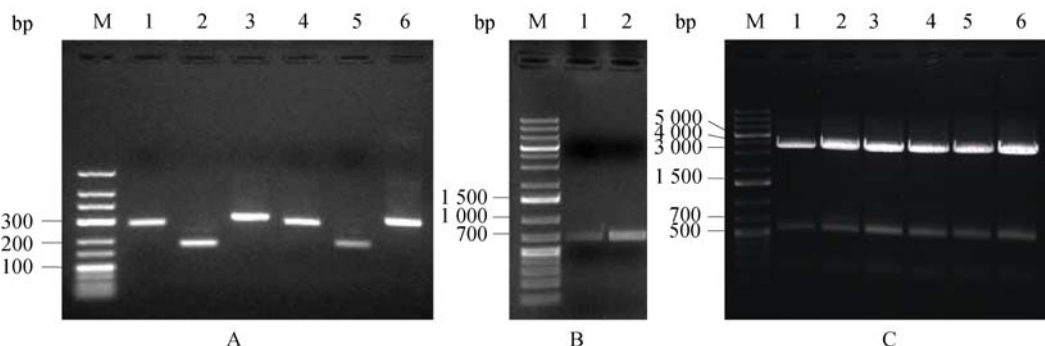
2.1 人工 microRNAs 载体的构建及鉴定

利用重叠 PCR 分别扩增包含 *At1g13770*-amiRNA 和 *At2g23470*-amiRNA 的 amiRNA 前体序列。在第一轮的 PCR 中分别用 *At1g13770*-amiRNA 和 *At2g23470*-amiRNA 特异引物扩增得到了大小为 272 bp、171 bp、298 bp 片段 a、b 和 c (图 2A)。以这 3 个 DNA 片段的混合物作模板, 以 A 和 B 为引物扩增得到了 701 bp 的片段, 其大小与预期相一致 (图 2B)。将纯化后的 PCR 产物 d 克隆到 pCR@-Blunt 载体。提取质粒 DNA, 经过 *EcoRI* 酶切得到大小为 3.5 kb (pCR@-Blunt 载体) 和 551 bp (部分 AMIRNA 前体) 的目的片段 (图 2C)。测序结果表明, 重组质粒含有正确的 *At1g13770*-amiRNA 和 *At2g23470*-amiRNA 序列, 分别命名为 pCR-amiR-*At1g13770* 及 pCR-amiR-*At2g23470*。

对表达载体 pCHF3-amiRNAs 的酶切鉴定有 10.4 kb 的载体 pCHF3 和 468 bp 的 amiRNAs 前体片段 (图 3), 与预期结果完全一致, 表明 pCHF3-amiR-

表 3 RT-PCR 引物序列

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>At1g13770</i>	CAACCATCACTGCCTCCTCT	GAGCCTGAGTGGAAAGCATC
<i>At2g23470</i>	GATCCTAAGGCCAGATTCC	TGTTCTATTGGCTCCAAGG
<i>Tubulin</i>	GAGCCTTACAACGCTACTCTGTCTGTC	ACACCAGACATAGTAGCAGAAATC AAG

图 2 *At1g13770*-amiRNA 和 *At2g23470*-amiRNA 前体片段的 PCR 扩增及其克隆

A: PCR 扩增 a、b 和 c 片段。M: 25~700 bp DNA Marker; 1、2、3 分别为构建 *At1g13770*-amiRNA 的 a、b 和 c 扩增产物; 4、5 和 6 分别为构建 *At2g23470*-amiRNA 的 a、b 和 c 扩增产物。B PCR 扩增 d 片段。M: 1 kb DNA Marker; 1、2 分别为构建 *At1g13770*-amiRNA

和 *At2g23470*-amiRNA 的 d 扩增产物。C : 重组质粒 pCR-amiR-*At1g13770* 和 pCR-amiR-*At2g23470* 的酶切鉴定。M : 1 kb DNA Marker; 1 ~ 3 : pCR-amiR-*At1g13770* 的酶切产物; 4 ~ 6 : pCR-amiR-*At2g23470* 的酶切产物。

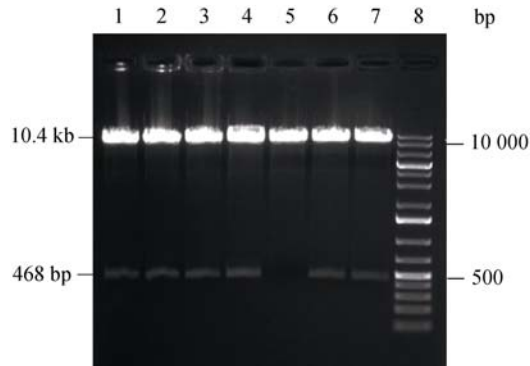


图 3 人工 microRNAs 植物表达载体的酶切鉴定
1 ~ 4: pCHF3-amiR-*At1g13770* 的双酶切产物; 5: pCHF3 载体双酶切结果; 6、7: pCHF3-amiR-*At2g23470* 的双酶切产物; 8: 1 kb DNA Marker。

At1g13770 和 pCHF3-amiR-*At2g23470* 表达载体构建成功。

2.2 转基因拟南芥植株的获得与鉴定

利用农杆菌介导的花苞浸染法, 以 pCHF3-amiR-*At1g13770* 和 pCHF3-amiR-*At2g23470* 分别转化野生型拟南芥, 收获的种子在含有 100 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 培养基上进行抗性筛选, 得到 pCHF3-amiR-

At1g13770 转基因植株 10 株, pCHF3-amiR-*At2g23470* 转基因植株 8 株, 抗性植株转土继续培养。提取这些抗性植株的基因组 DNA, 用 amiRNAs 前体特异性的引物进行 PCR 扩增, 转基因植株检测到 476 bp 的目标条带 (图 4), 说明 amiRNAs 前体已经整合到拟南芥基因组中, 所获得的抗性植株为转化株。

2.3 AmiRNAs 转基因植株 *At1g13770* 和 *At2g23470* 的转录及表型分析

分别提取 *At1g13770*-amiRNA 和 *At2g23470*-amiRNA 转基因植株的总 RNA, 采用 RT-PCR 检测 amiRNAs 分子对目的基因转录水平的影响。结果显示, 与野生型 Col 靶基因的表达水平相比, *At1g13770* 和 *At2g23470* 在转基因植株中的表达水平明显降低, 在有些转基因株系中几乎检测不到靶基因的表达 (图 5)。本研究共筛选到 10 个 *At1g13770* 表达水平下调、8 个 *At2g23470* 表达水平下调的转基因株系。观察转基因植株的表型变化, 发现 *At2g23470*-amiRNA 转基因植株的营养生长和花发育基本正常, 但育性严重下降 (图 6A, 6C)。在我们的实验条件下, 野生型 col-0 一般每个角果可产生 30 粒左右的种子, 而

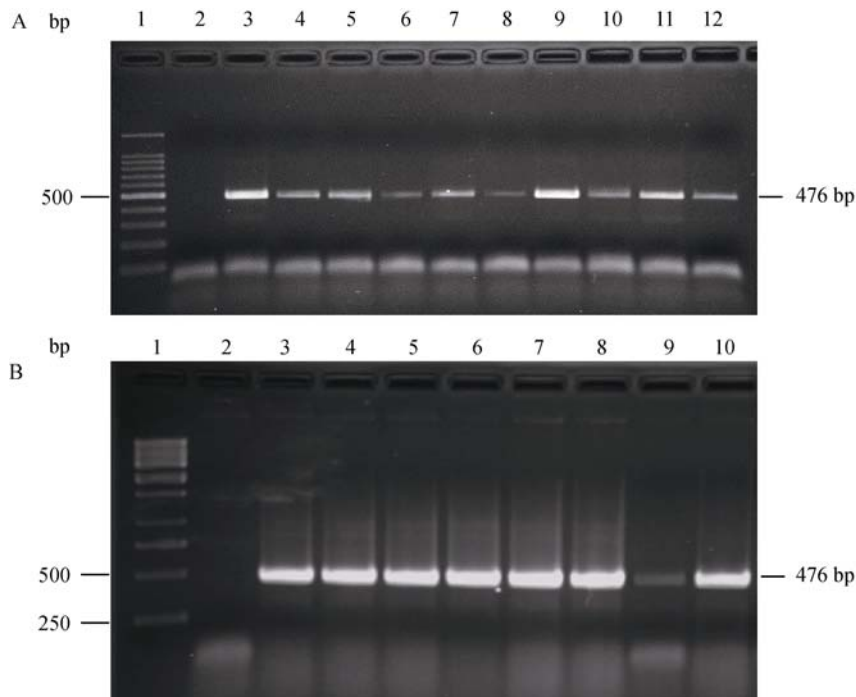


图 4 amiRNAs 转基因拟南芥植株的 PCR 鉴定

A: pCHF3-amiR-*At1g13770* 转基因植株的 PCR 检测。1: 100 bp DNA Marker; 2: 野生型对照; 3~12: *At1g13770*-amiRNA 株系。B: pCHF3-amiR-*At2g23470* 转基因植株的 PCR 检测。1: 1 kb DNA Marker; 2: 野生型对照; 3~10: *At2g23470*-amiRNA 株系。

At2g23470-amiRNA 转基因植株大多数角果不产生种子, 少数角果可产生 7~8 粒种子。*At1g13770*-amiRNA 转基因植株的表型变化不明显(图 6B)。这些对靶基因有明显下调作用的 amiRNAs 转基因株系的获得为进一步深入研究这些基因的功能奠定了良好的基础。

3 讨论

基因沉默是生物界广泛存在的一种现象, 近年来已经发展成为反向遗传学研究的有力工具。在植物系统中, 基因沉默通常通过异源表达双链RNAs^[15]、

病毒载体^[16]或人工miRNAs^[7, 8, 17, 18]而实现。基于人工miRNAs的基因沉默技术由于具有特异性高、稳定性强和沉默效应可预见而备受青睐。已有研究显示, 利用amiRNAs技术对基因的特异沉默在拟南芥、烟草、番茄和水稻等多种高等植物中都取得了成功^[18-20]。本研究利用拟南芥内源MIR319a前体作为骨架, 构建了拟南芥*At1g13770* 和*At2g23470* 基因的人工microRNAs, 实现了对目的基因的特异沉默, 得到了期待的突变体表型。

At1g13770 和 *At2g23470* 是拟南芥 DUF647 基

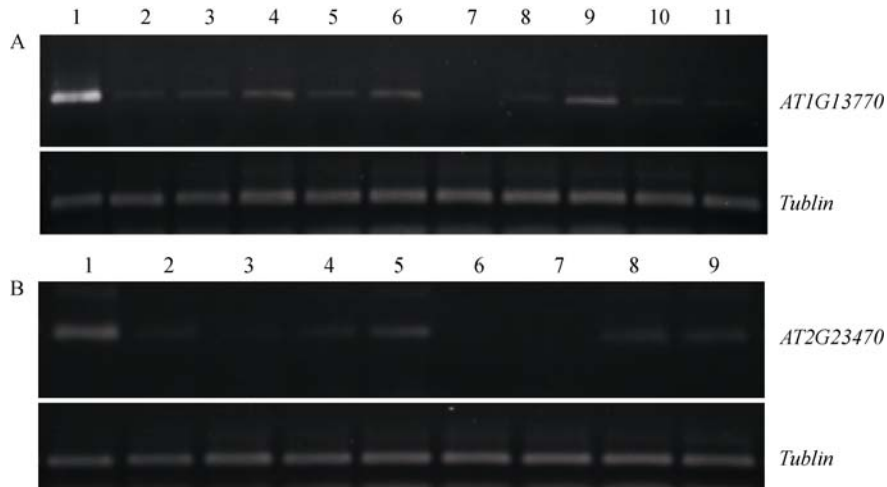


图5 RT-PCR 检测 amiRNAs 转基因植株目的基因表达

A: *At1g13770* 在野生型和 *At1g13770*-amiRNA 表达构建转基因株系中的表达分析。1: 野生型对照; 2~11: *At1g13770*-amiRNA 株系。

B: *At2g23470* 在野生型和 *At2g23470*-amiRNA 表达构建转基因株系中的表达分析。1: 野生型对照; 2~9: *At2g23470*-amiRNA 株系。



图6 amiRNAs 转基因植株的表型分析

A :野生型对照(左)和 *At1g13770*-amiRNA 转基因植株(右)的表型; B :野生型对照(左)和 *At2g23470*-amiRNA 转基因植株(右)的表型; C :野生型对照(左)和 *At2g23470*-amiRNA 转基因植株(右)的角果。标尺=1 cm。

因家族中两个重要的成员。其中 *At1g13770* 基因在水稻和苔藓中都有相应的同源基因, 它们之间表现出高度的进化枝^[2,3]。而且 *At1g13770* 基因也是动物家系中的直系同源基因^[3]。而 *At2g23470* 只在苔藓中有同源基因, 在水稻中似乎已经丢失。目前这两个在进化中处于不同地位的基因的功能尚不清楚。AtGenExpress注释显示, *At2g23470* 在花瓣分化和扩展阶段表达, 表达部位在雄蕊和茎^[2], 提示 *At2g23470* 的功能可能与育性有关, *At2g23470* 功能的缺失有可能导致雄性不育。本研究利用人工miRNAs技术对拟南芥 *At1g13770* 和 *At2g23470* 进行了特异沉默。研究结果显示 *At2g23470*-amiRNA转基因植株的育性比野生型大幅降低, 支持 *At2g23470* 的功能与育性相关的观点。

DUF647 蛋白广泛存在于植物^[22-25]、动物和一些真菌中。在拟南芥中, 共有 6 个 DUF647 蛋白家族成员, 虽然都这 6 个成员都包含未知功能结构域 647, 但它们之间的序列相似性很低, 最高的仅为 33.8%, 最低的只有 18.1%。研究显示, 突变拟南芥 DUF647 蛋白家族基因 *RUS1* 和 *RUS2* 导致幼苗对 UVB 光的高度敏感。*RUS1* 与 *RUS2* 通过 DUF647 结构域相互作用, 共同作用于根 UVB 感受途径, 参与拟南芥幼苗的早期形态建成和发育^[1-2]。但 Ge 等^[3]认为介导对 UVB 光的应答不可能是 *RUS2/WXR1* 的主要功能。理由如下: 第一, 他们的实验并不能证实 *wxr1(wxr1* 是 *rus2* 的等位基因)根对 UVB 的高度敏感, 即使在完全黑暗的条件下, *wxr1* 的根也比野生型的短; 第二, 提高生长素移动到根的条件, 比如提高温度或过量表达 PIN1, 可以恢复 *wxr1* 突变体根的生长; 第三, *wxr1* 突变增强了受体三突变体 *tir1 afb2 afb3* 的强胚胎表型, 表明对胚胎形成有贡献。因此推测 *rus2/wxr1* 突变体的生长素运输/分配缺陷以及 UV 高度敏感似乎都是由于细胞调控(可能是蛋白运输)缺陷引起的。蛋白组学研究表明 *WXR1* 定位于叶绿体外膜^[26, 27], 对于一个叶绿体蛋白功能的缺失如何影响到其它膜蛋白的水平目前还没有一个清楚的模型。是否 *At1g13770* 和 *At2g23470* 也在细胞内吞和蛋白运输中发挥作用, 还有待于我们进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Tong HY, Leasure CD, Hou XW, Yuen GG, Briggs W, He ZH. Role of root UV-B sensing in *Arabidopsis* early seedling development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 21039–21044. DOI
- [2] Leasure CD, Tong HY, Yuen GG, Hou XW, Sun XF, He ZH. ROOT UV-B SENSITIVE2 acts with ROOT UV-B SENSITIVE1 in a root ultraviolet B-sensing pathway. *Plant Physiol*, 2009, 150(4): 1902–1915. DOI
- [3] Ge L, Peer W, Robert S, Swarup R, Ye S, Prigge M, Cohen JD, Friml J, Murphy A, Tang D, Estelle M. *Arabidopsis* ROOT UVB SENSITIVE2/WEAK AUXIN RESPONSE1 is required for polar auxin transport. *Plant Cell*, 2010, 22(6): 1749–1761. DOI
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. DOI
- [5] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 669–687. DOI
- [6] 毛颖波, 薛学义, 陈晓亚. 植物小RNA与RNA干扰: 生物学功能与应用前景. 中国科学(C辑:生命科学), 2009, 39(1): 31–43. DOI
- [7] Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1121–1133. DOI
- [8] Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D, Hervé P. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1829. DOI
- [9] Khraiweh B, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: An alternative to targeted gene knock-outs. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 684–693. DOI
- [10] Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, Weigel D, Baulcombe D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2009, 58(1): 165–174. DOI
- [11] Zhao T, Wang W, Bai X, Qi YJ. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J*, 2009, 58(1): 157–164. DOI
- [12] Höfgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res*, 1988, 16(20): 9877. DOI
- [13] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis*

- thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743. [DOI](#)
- [14] Zhao SQ, Li XF, Guo JB. Expression of the Pathogenesis-related gene promoter-GUS reporter fusion in *Arabidopsis*. *Acta Bot Sin*, 2003, 46(8): 982–987. [DOI](#)
- [15] Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*, 2001, 27(6): 581–590. [DOI](#)
- [16] Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 2003, 30(4): 296–303. [DOI](#)
- [17] Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1134–1151. [DOI](#)
- [18] Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1420–1428. [DOI](#)
- [19] Qu J, Ye J, Fang RX. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol*, 2007, 81(12): 6690–6699. [DOI](#)
- [20] Ossowski S, Schwab R, Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J*, 2008, 53(4): 674–690. [DOI](#)
- [21] Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 501–506 [DOI](#)
- [22] Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang SP, Colbert M, Sun WL, Chen LL, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, 296(5565): 92–100. [DOI](#)
- [23] Yu J, Hu SN, Wang J, Wong GKS, Li SG, Liu B, Deng YJ, Dai L, Zhou Y, Zhang XQ, Cao ML, Liu J, Sun JD, Tang JB, Chen YJ, Huang XB, Lin W, Ye C, Tong W, Cong LJ, Geng JN, Han YJ, Li L, Li W, Hu GQ, Huang XG, Li WJ, Li J, Liu ZW, Li L, Liu JP, Qi QH, Liu JS, Li L, Li T, Wang XG, Lu H, Wu TT, Zhu M, Ni PX, Han H, Dong W, Ren XY, Feng XL, Cui P, Li XR, Wang H, Xu X, Zhai WX, Xu Z, Zhang JS, He SJ, Zhang JG, Xu JC, Zhang KL, Zheng XW, Dong JH, Zeng WY, Tao L, Ye J, Tan J, Ren XD, Chen XW, He J, Liu DF, Tian W, Tian CG, Xia HA, Bao QY, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao WM, Li P, Chen W, Wang XD, Zhang Y, Hu J, Wang JF, Liu S, Yang J, Zhang GY, Xiong YQ, Li ZJ, Mao L, Zhou CS, Zhu Z, Chen RS, Hao BL, Zheng WM, Chen SY, Guo W, Li GJ, Liu SQ, Tao M, Wang J, Zhu LH, Yuan LP, Yang HM. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296(5565): 79–92. [DOI](#)
- [24] Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang LX, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, 2008, 319(5859): 64–69. [DOI](#)
- [25] Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li DH, Meyer T, Muller R, Ploetz L, Radenbaugh A, Singh S, Swing V, Tissier C, Zhang PF, Huala E. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D1009–D1014. [DOI](#)
- [26] Ferro M, Salvi D, Brugièrè S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(5): 325–345. [DOI](#)
- [27] Dunkley TPI, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6518–6523. [DOI](#)

