

虎杖查耳酮合酶基因 RNAi 载体的构建及其遗传转化

柳忠玉¹, 赵树进^{2*}

1. 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025

2. 广州军区广州总医院, 广东 广州 510010

摘要: 目的 构建虎杖查耳酮合酶(PcCHS1)基因的 RNA 干扰(RNAi)表达载体, 获得 PcCHS1 表达下调的转基因虎杖植株。方法 根据 GenBank 中已知的 PcCHS1 基因序列(EF090604), 设计相应引物, 克隆 PcCHS1 基因核心保守序列。以 PcCHS1 基因为靶基因, 将长度 574 bp 保守序列片段通过正、反 2 个方向插入表达载体 pYL RNAi 中, 构建 RNAi 表达载体 pYL RNAi-PcCHS1。通过根癌农杆菌介导法将其导入虎杖茎尖组织。对获得的转基因植株, 利用 Northern blotting 检测 PcCHS1 基因表达水平, 并应用 HPLC 法测定虎杖中白藜芦醇苷的量。结果 成功构建 PcCHS1 基因 RNA 干扰表达载体, 获得了 5 株转 PcCHS1 基因干扰载体的阳性植株。转基因虎杖 PcCHS1 基因表达水平显著下调, 并且转基因植株中白藜芦醇苷量均得到显著提高, 其中最高量是对照植株的 3.8 倍($P < 0.05$)。结论 成功获得了干涉 PcCHS1 基因表达下调的转化植株, 抑制 PcCHS1 基因的表达显著增加了转基因虎杖中白藜芦醇苷的量, 为有效利用该基因提高虎杖白藜芦醇苷量奠定基础。

关键词: 虎杖; 查耳酮合酶; 白藜芦醇苷; RNA 干扰; 转基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0412-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.020

Construction of RNA interference vector of *Polygonum cuspidatum* chalcone synthase gene and its genetic transformation

LIU Zhong-yu¹, ZHAO Shu-jin²

1. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

2. General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To construct the RNAi expression vector of *Polygonum cuspidatum* chalcone synthase (PcCHS1) gene, and to obtain the transgenic plants in which PcCHS1 expression was down-regulated. **Methods** According to known sequence (EF090604) of PcCHS1 gene in GenBank, right primers were designed and the conserved sequence was cloned. The conserved fragment (574 bp) targeting at PcCHS1 gene was inserted into the expression vector pYL RNAi in both forward and reverse directions, and RNA interference (RNAi) expression vector pYL RNAi-PcCHS1 was constructed. Using the method of *Agrobacterium*-mediated transformation, the expression vector was used to transform the shoot tips of *P. cuspidatum*, and transgenic plants were obtained. The expression of PcCHS1 was confirmed by Northern blotting and the accumulation of polydatin was detected by HPLC. **Results** RNAi expression vector of PcCHS1 gene was constructed successfully, and five transgenic plants were obtained. Northern blotting analyses indicated that the expression levels of PcCHS1 were significantly down-regulated in the transgenic plants. Polydatin concentration in the transgenic plants was up to 3.8 times higher than that in non-transformed control plants. **Conclusion** Transgenic *P. cuspidatum* plants with down-regulated expression of PcCHS1 gene were obtained successfully. The content of polydatin in the transgenic *P. cuspidatum* was significantly increased by RNAi against PcCHS1. This work might establish an experimental basis for the effective application of PcCHS1 in improving polydatin accumulation in *P. cuspidatum*.

Key words: *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; chalcone synthase; polydatin; RNA interference; transgene

虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 是蓼科多年生草本植物, 根或根茎入药, 是重要的白藜芦醇药源植物之一。白藜芦醇及白藜芦醇苷具有抗肿瘤、抗衰老、保护心血管系统等广泛的生物学功

收稿日期: 2014-09-18

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(10151001002000012); 长江大学博士启动基金项目(801100010122)

作者简介: 柳忠玉(1978—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药生物技术。E-mail: zyliu2004@126.com

*通信作者 赵树进, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物制药。E-mail: gzzsjzhs@163.com

能^[1]。白藜芦醇及其糖苷属于次生代谢产物,其大规模的应用受到产地、季节等因素的影响,从而大大限制了其药用价值的推广。如何提高植物中白藜芦醇及其糖苷的量成为许多学者研究的热点。人们不再局限于利用物理或化学方法促进药用成分的生物合成,而是越来越多地转向于利用分子手段干预其生物合成途径,以此提高药用成分的量、改善植物营养价值,例如将白藜芦醇合酶基因转入白杨、油菜、猕猴桃等物种,均能促进白藜芦醇苷的合成^[2-4]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是与靶基因同源双链 RNA 引发,在动植物和真菌中普遍存在序列特异的转录后基因沉默现象^[5]。RNAi 技术已广泛应用于基因功能、基因表达调控机制研究等领域^[6]。RNAi 可以有效的抑制特异基因的表达,因此可用于对药用植物次生代谢产物的生物合成途径进行调控,达到调控天然产物生物合成的目的,例如 RNAi 技术在咖啡、黄连中的成功应用^[7-8]。

白藜芦醇经由苯丙烷类代谢途径合成而来。该途径中,白藜芦醇合酶和查耳酮合酶分别是白藜芦醇生物合成和黄酮代谢途径上的关键酶,白藜芦醇合酶和查耳酮合酶能利用相同的底物(对香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A)合成截然不同的产物,从而形成苯丙烷类代谢途径上的 2 条分支途径^[9]。尽管查耳酮合酶不是白藜芦醇生物合成途径中的关键酶,但它与白藜芦醇合酶竞争共同前体对香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A,间接影响了白藜芦醇代谢流^[9]。本研究利用 RNAi 技术构建虎杖查耳酮合酶基因(PcCHS1)的 RNAi 表达载体,并将其成功导入虎杖基因组中,以期揭示 PcCHS1 基因在白藜芦醇合成中的功能、提高白藜芦醇量提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 植物材料

虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 植株由广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心提供,由该中心杨锦芬副教授鉴定。虎杖试管苗由本课题组培育。根癌农杆菌 EHA105 和潮霉素抗性的双元表达载体 pYL RNAi 由华南农业大学植物基因组学与生物技术重点实验室提供。

1.2 试剂

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体购自 TaRaKa 公司。总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Tiangen

公司。白藜芦醇苷对照品(批号 111575-200801)购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 虎杖叶片总 RNA 的提取及反转录

以野生虎杖叶片为材料,采用 Trizol 法提取总 RNA,用 cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA 备用,严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.2 CHS1 基因正、反义片段的克隆与测序

根据 GenBank 中已知的虎杖查耳酮合酶基因 PcCHS1 序列(EF090604),设计相应引物,克隆 PcCHS1 基因保守序列,以该保守序列为干扰片段,片段长度为 574 bp。并且根据表达载体 pYL RNAi 的限制性内切酶酶切位点,设计引物(P1、P2)扩增正义片段,引物两端分别加上 BamHI 和 HindIII 酶切位点。设计引物(A1、A2)扩增反义片段,引物两端分别加上 MluI 和 PstI 酶切位点。引物序列:P1: 5'-CGGGATCCGACAGACACTCACTTGG-A-3' (BamHI); P2: 5'-CCCAAGCTTGTGATGAG-CAACTGGTAC-3' (HindIII); A1: 5'-CGACGCGTG-ACAGACACTCACTTGG-3' (MluI); A2: 5'-TGCA-CTGCAGGTGATGAGCAACTGGTAC-3' (PstI)。

采用 25 μ L 反应体系,PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 后延伸 5 min。将 PcCHS1 基因正、反义片段的 PCR 产物纯化后分别连接 pMD18-T 载体,将 PCR 验证正确的阳性重组子进行酶切验证并测序。分别将测序正确的重组子命名为 pMD18-T-P 和 pMD18-T-A。

2.3 RNAi 载体 pYL RNAi-PcCHS1 的构建

利用 BamHI 和 HindIII 对分别测序正确的重组克隆质粒 pMD18-T-P 和 pYL RNAi 进行双酶切,用回收的片段进行正义连接,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。选取长出的单菌落做 PCR 检测。检测出的阳性克隆摇菌提取质粒,将提取出的质粒和测序正确的 pMD18-T-A,进行 MluI 和 PstI 双酶切,用回收的片段做反义连接,获得 RNAi 载体 pYL RNAi-PcCHS1。将其转化大肠杆菌,将已转化大肠杆菌的载体 pYL RNAi-PcCHS1 进行菌落 PCR 扩增鉴定和酶切鉴定。

2.4 RNAi 载体导入农杆菌 EHA105 感受态细胞及介导的遗传转化

用 CaCl₂ 冻融法将 RNAi 载体 pYL RNAi-CHS 导入农杆菌 EHA105 中,用于植物转化。采用农杆菌

介导法转化虎杖茎尖组织, 参照本课题组已经建立的方法^[10]进行。虎杖无菌苗的茎尖组织经过侵染、筛选获得抗性芽, 然后转至根诱导培养基使其长成完整植株。

2.5 转基因虎杖的 PCR 检测

根据载体 pYLRNAi-PcCHS1 上潮霉素基因序列设计引物用于阳性植株的检测。采用 CTAB 法提取转基因虎杖叶片的基因组 DNA, 并以其为模板, 利用潮霉素基因特异引物 HPTf (5'-CGCCGATGG-TTTCTACAA-3') 和 HPTr (5'-GGCGTCGGTTTC-CACTAT-3') 进行 PCR 检测。

2.6 转基因植株的 Northern-blotting 杂交检测

提取虎杖叶片总 RNA, 用甲醛变性凝胶进行电泳, 之后将凝胶中的 RNA 转移至尼龙膜上, 交联 5 min 固定 RNA。以引物 (P1、P2) 扩增的 PcCHS1 基因特异片段作为探针模板, 探针标记、杂交及检测参照本课题组已经建立方法^[11]。

2.7 白藜芦醇苷的测定^[11]

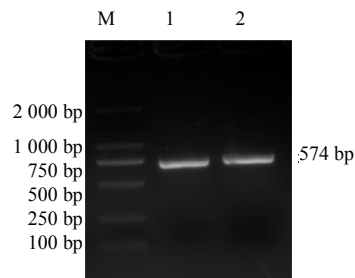
采用 HPLC 法测定转基因和对照植株叶片中白藜芦醇苷的量, 比较分析白藜芦醇苷量差异。取虎杖叶片 0.3 g, 经液氮研磨后, 加入 3 mL 80%甲醇避光浸提 12 h 后, 待测。色谱柱为 SunFireTM C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (25 : 75), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 306 nm, 柱温为 25 °C。测定重复 3 次, 结果数据用 SPSS19 软件进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 正义片段和反义片段的克隆

以 cDNA 为模板, 用引物 (P1、P2) 对正义片

进行 PCR 扩增, 用引物 (A1、A2) 对反义片段进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示扩增条带与预期 574 bp 的片段大小一致, 初步表明已获得这 2 个干扰片段 (图 1)。



M-Marker 1-正义片段的 PCR 产物 2-反义片段的 PCR 产物

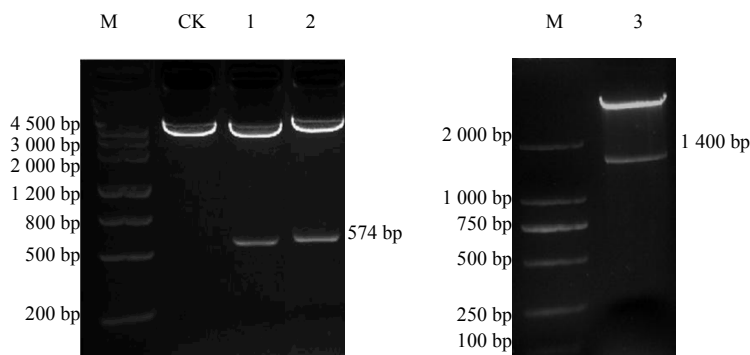
M-Marker 1-PCR products of sense fragment 2-PCR products of anti-sense fragment

图 1 正义反义片段的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of sense and anti-sense fragments

3.2 重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 的酶切鉴定

首先对重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 进行菌落 PCR 鉴定, 将鉴定正确的菌液提取质粒 DNA。将阳性重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 用 *Bam* HI 和 *Hind* III 内切酶酶切, 切出大小 574 bp 的正义片段; 将重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 用 *Mlu* I 和 *Pst* I 内切酶酶切, 切出大小 574 bp 的反义片段 (图 2)。将重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 用 *Bam* HI 和 *Mlu* I 内切酶酶切, 切出大小约 1 400 bp 的片段, 符合内含子 (250 bp) 加上正义片段和反义片段长度 (图 2)。以上结果表明目的片段已和 pYLRNAi 载体成功连接。



M-Marker CK-重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 1-*Bam* HI 和 *Hind* III 酶切产物 2-*Mlu* I 和 *Pst* I 酶切产物 3-*Bam* HI 和 *Mlu* I 酶切产物

M-Marker CK-recombinant plasmid pYLRNAi-PcCHS1 1-*Bam* HI and *Hind* III digestion products 2-*Mlu* I and *Pst* I digestion products 3-*Bam* HI and *Mlu* I digestion products

图 2 重组质粒 pYLRNAi-PcCHS1 酶切验证

Fig. 2 Digestion verification of recombinant plasmid pYLRNAi-PcCHS1

3.3 转基因虎杖的 PCR 检测

取从抗性虎杖植株叶片中提取的 DNA 作为扩增模板,用潮霉素基因特异引物 HPTf 和 HPTr 进行 PCR 扩增,电泳结果(图 3)表明,所检测的 5 个株系在约 500 bp 处扩增到潮霉素基因特异片段,而野生虎杖 DNA 样品未见目的带,初步验证这 5 个株系为阳性植株。

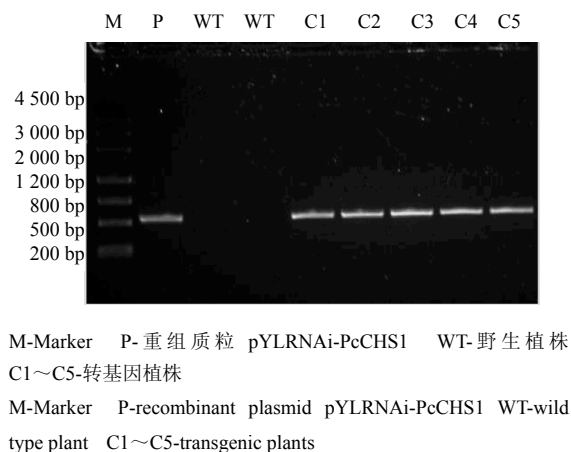


图 3 转基因植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of transgenic plants

3.4 转基因虎杖 Northern-blotting 检测

为了考察 PcCHS1 基因 RNA 干扰效果,进一步取虎杖叶片抽提总 RNA,以 PcCHS1 基因特异片段为探针进行 Northern-blotting 分析。杂交结果显示(图 4),对照植株有较强的杂交信号,而转基因植株的杂交信号明显减弱,说明 PcCHS1 基因表达在转基因虎杖中被抑制。

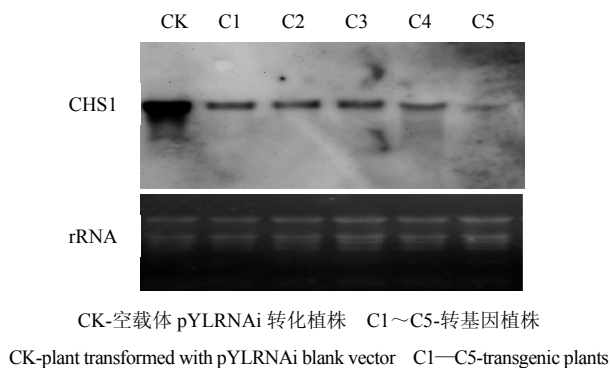
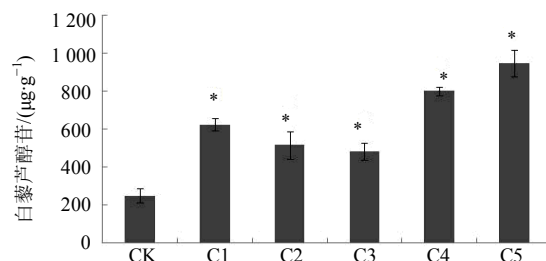


图 4 转基因植株 Northern blotting 检测

Fig. 4 Northern blotting analysis of transgenic plants

3.5 转基因虎杖白藜芦醇苷的测定

利用 HPLC 法测定转基因虎杖植株叶片中白藜芦醇苷的量(图 5)。结果显示,转基因植株叶片中白藜芦醇苷积累量相比对照植株都显著提高,最高



与 CK 比较: 差异显著, $P < 0.05$ CK-空载体 pYLRLAi 转化植株 C1~C5-转基因植株

CK-plant transformed with pYLRLAi blank vector C1~C5-transgenic plants * $P < 0.05$ vs CK group

图 5 转基因虎杖白藜芦醇苷的测定

Fig. 5 Determination of polydatin in transgenic plants

约为未转化植株中白藜芦醇苷量的 3.8 倍。以上结果初步表明 PcCHS1 转录水平的降低有利于虎杖中白藜芦醇苷的积累,说明 PcCHS1 在虎杖白藜芦醇苷生物合成中起着重要调控作用。

4 讨论

内含子的有无、启动子的强弱和目的片段的大小等会影响 RNA 沉默的效率^[12]。很多研究证明,强组成型启动子下游插入反向重复片段的重组双元载体是导致 RNA 沉默的基本结构。Helliwell 等^[13]研究表明 RNAi 片段长度在 98~853 bp 都能有效地抑制基因的表达,抑制效率可达到 90%。本研究使用的 pYLRLAi 载体具有强组成型 35 S 启动子和内含子(25 bp),实验设计的 PcCHS1 基因干涉片段长度为 574 bp,本研究载体构建均采用了较为理想的实验方案,也达到了较好的沉默效果。

目前对白藜芦醇生物合成途径的调控研究多基于正向调控策略,即通过过量表达关键酶基因白藜芦醇合酶提高目标植物中白藜芦醇或白藜芦醇苷量。例如,来源于中国野生葡萄的白藜芦醇合酶基因在葡萄栽培品种过量表达后,葡萄中白藜芦醇的量提高了 5.5 倍^[14]。苗晓燕等^[15]诱导获得转白藜芦醇合酶基因虎杖毛状根,转基因毛状根白藜芦醇苷的量均得到显著提高,最高量是未转基因毛状根的 5 倍。

而本研究基于反向调控策略,构建 PcCHS1 基因 RNAi 表达载体,并将其导入虎杖基因组中,抑制 PcCHS1 基因的表达,以 PCR 及 Northern blotting 为手段对转基因植株进行了分子检测。野生虎杖中的二苯乙烯类物质主要有白藜芦醇苷和白藜芦醇 2 种,糖基转移酶可促使白藜芦醇迅速转化为白藜芦

醇苷的形式贮存^[15]。相关研究表明,二苯乙烯类物质在虎杖中的存在形式以白藜芦醇苷为主,并且在虎杖的根、茎、叶中白藜芦醇的量都远远低于白藜芦醇苷的量^[16-17]。所以本研究主要针对转基因植株的白藜芦醇苷量进行了检测。结果显示转基因植株中白藜芦醇苷积累量相比未转化植株都显著提高,最高约为未转化植株中白藜芦醇苷量的 3.8 倍。最终确定虎杖中 *PcCHS1* 基因的沉默有利于白藜芦醇苷的积累。同时,也为提高虎杖中白藜芦醇苷量提供一条重要的路线。

查耳酮合酶基因可用于植物的花色修饰,例如运用 RNAi 技术抑制烟草查耳酮合酶基因表达导致花青素量显著降低,造成花色的改变^[18]。采用 RNAi 技术抑制紫色矮牵牛的查耳酮合酶基因表达,同样导致花青素量不同程度的降低,甚至产生白色花朵^[19]。另外,查耳酮合酶基因也可以用于修饰种皮色泽,例如拟南芥查耳酮合酶基因突变后 *tt4* 突变体种皮变成了透明种皮。狄曙玲等^[20]借鉴拟南芥透明种皮的分子生物学研究成果开展了甘蓝型油菜种皮色泽分子机制的研究。最近研究还发现,抑制西红柿查耳酮合酶基因表达,导致总黄酮量减少,当总黄酮量小于 5%,造成了果实体积变小和无籽西红柿^[21]。抑制蒺藜状苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. 查耳酮合酶基因的表达则阻碍苜蓿毛状根根瘤的形成,并影响激素运输^[22]。

本研究中观察到同对照植株相比,转基因虎杖植株的茎秆表皮颜色明显变浅,此形态变异仍然需要继续观察。同时,后续工作将会围绕转基因植株生理表型的变化做深入研究,例如测定转基因植株的总黄酮、花青素、柚皮素等成分的量,更全面地考察查耳酮合酶基因对虎杖次生代谢途径的影响。

目前,关于虎杖代谢网络的调控研究的相关报道还不多,尤其对合成途径中查耳酮合酶基因的功能以及该基因在生物合成途径中的作用知之甚少。本研究的开展为白藜芦醇生物合成途径的深入了解和虎杖资源的深度开发奠定基础。

参考文献

[1] Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, *et al.* Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? [J]. *Mutat Res*, 2008, 658(1/2): 68-94.

[2] Giorcelli A, Sparvoli F, Mattivi F, *et al.* Expression of the

stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides [J]. *Transgenic Res*, 2004, 13(3): 203-214.

[3] Hüsken A, Baumert A, Milkowski C, *et al.* Resveratrol glucoside (piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(8): 1553-1562.

[4] Kobayashi S, Ding C K, Nakamura Y, *et al.* Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside) [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(9): 904-910.

[5] Siomi H, Siomi M C. On the road to reading the RNA-interference code [J]. *Nature*, 2009, 457(22): 396-404.

[6] 陈李森, 赵琳, 郝迪菽, 等. 植物中 RNA 干扰技术的研究与应用 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(10): 122-128.

[7] Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, *et al.* Producing decaffeinated coffee plants [J]. *Nature*, 2003, 423(6942): 823.

[8] Dubouzet J G, Morishige T, Fujii N, *et al.* RNA silencing of scoulerine 9-O methyltransferase expression by double stranded RNA in *Coptis japonica* protoplasts [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(1): 63-70.

[9] Vannozzi A, Dry I B, Fasoli M, *et al.* Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12(1): 130-152.

[10] 柳忠玉, 赵树进. 根癌农杆菌介导的虎杖茎尖转化研究 [J]. 生物技术通报, 2014, 259(2): 79-84.

[11] 柳忠玉, 庄楚雄, 生书晶, 等. 虎杖白藜芦醇合酶基因转化拟南芥的研究 [J]. 华南理工大学学报, 2011, 39(5): 138-142.

[12] Wesley S V, Helliwell C, Smith N A, *et al.* Constructs for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants [J]. *Plant J*, 2001, 27(6): 581-590.

[13] Helliwell C, Waterhouse P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30(4): 289-295.

[14] Fan C H, Pu N, Wang X P, *et al.* Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008, 92(2): 197-206.

[15] 苗晓燕, 于树宏, 沈银柱, 等. 利用基因转化提高虎杖毛状根中活性成分的量 [J]. 药学报, 2007, 42(9): 995-999.

[16] 李世学, 刘建利, 张楠, 等. 处理方法对虎杖不同部

- 位白藜芦醇和虎杖苷量的影响 [J]. 中草药, 2008, 40(3): 469-471.
- [17] Burns J, Yokota T, Ashihara H, *et al.* Plant foods and herbal sources of resveratrol [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(11): 3337-3340.
- [18] Nakatsuka T, Pitaksutheepong C, Yamamura S, *et al.* Induction of differential flower pigmentation patterns by RNAi using promote Rs with distinct tissue-specific activity [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2007, 1(4): 251-257.
- [19] Fukusaki E, Kawasaki K, Kajiyama S, *et al.* Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference [J]. *J Biot*, 2004, 111(3): 229-240.
- [20] 狄曙玲, 刘列钊, 柴友荣, 等. 类黄酮物质及查耳酮合酶在油菜性状改良中的作用 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(18): 21-24.
- [21] Schijlen E, Vos C H, Martens S, *et al.* RNA Interference Silencing of Chalcone Synthase, the first Step in the Flavonoid Biosynthesis Pathway, Leads to Parthenocarpic Tomato Fruits [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(3): 1520-1530.
- [22] Wasson A P, Pellerone F I, Mathesius U, *et al.* Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by Rhizobia [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617-1629.