一种胡萝卜蔗糖转运蛋白基因家族新成员的分离及功能鉴定

张雷^① 刁丰秋^① 杨志攀^① 黄美娟^② 吴乃虎^{①*}

(^①中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080; ^②北京大学生命科学学院, 北京 100871. * 联系人, E-mail: nhwu@public3.bta.net.cn)

摘要 培养基中蔗糖浓度的变化可以调控胡萝卜体细胞胚根的发育进程. 为了分析在此过程中蔗糖的转运与体细胞胚根发育的相关性, 利用 RT-PCR 获得胡萝卜蔗糖转运蛋白基因的探针, 筛选蔗糖调控状态下的胡萝卜体细胞胚的 cDNA 文库, 分离到蔗糖转运蛋白基因家族的一个新成员的全长 cDNA, 命名为 *cSUT* 基因(GenBank 注册号为 AB036758). 对该基因的编码蛋白进行结构分析表明, 其具有典型的 12 个跨膜结构域. 在酵母中的表达分析证明, *cSUT* 基因的编码蛋白有转运蔗糖的功能, 转运活性受 pH 值影响较大, K_m 为 9 mmol/L, 且对蔗糖的运输具有专一性. Northern 杂交结果显示其主要在根部表达, 且在蔗糖调控与解调控的胡萝卜体细胞胚发育的不同时期存在显著表达差异, 推测 *cSUT* 基因与蔗糖的信号转导以及胚根的发育密切相关.

关键词 发育 胡萝卜 蔗糖转运蛋白 RT-PCR cDNA 文库

蔗糖是绿色植物光合作用同化碳的主要转运形式. 它在作为可转运的代谢物的同时, 还在许多不同组织中作为信号控制着特定基因的激活与抑制, 进而影响到植物体的代谢活动及发育状态^[1~3].

在植物体内, 蔗糖的运输依赖于作为蔗糖分子载体的蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUT), 又称蔗糖-H⁺共转运蛋白(sucrose-H⁺ cotransporter, SUC). 这是一类典型的膜结合蛋白质分子, 广泛存在于各种高等植物的组织和细胞中, 能够利用细胞内、外的 H⁺ 浓度梯度, 对蔗糖分子进行过膜转运. 根据氨基酸序列结构与特性分析, 蔗糖转运蛋白属于 MFS(major facilitator superfamily)超家族中的一员. 它们序列高度保守, 是高疏水性蛋白, 含有 12 个跨膜结构域, 中间面向胞质的部分有一个大的环, 将蛋白分为各含 6 个跨膜结构域的两部分. 蔗糖转运蛋白编码基因的分离及其结构与功能的研究, 有助于揭示蔗糖分子参与基因表达、新陈代谢及发育过程调控作用的分子本质.

黄美娟等人^[4]发现, 改变培养基中蔗糖的浓度, 可人为地控制胡萝卜体细胞胚的发育进程. 在含 6% 蔗糖的 MS 培养基中作调控培养时, 胡萝卜体细胞胚的胚根发育受到抑制; 一旦将此种处于调控状态的胡萝卜体细胞胚转移到含 1% 蔗糖的 MS 培养基中做解调控培养时, 胚根的抑制状态便被解除, 并迅速发育成根. 本文利用 RT-PCR 结合 cDNA 文库的筛选技

术, 从调控状态的胡萝卜体细胞胚中, 分离到一个根组织特异的蔗糖转运蛋白基因的 cDNA 全序列, 结构和功能分析证实, 这是一种蔗糖转运蛋白基因家族的新成员. 本研究的目的在于进一步分析蔗糖转运蛋白在蔗糖介导的胡萝卜体细胞胚的调控与解调控培养过程中的作用, 探索蔗糖转运蛋白在植物发育调控中的功能和蔗糖信号转导的分子途径.

1 材料和方法

(i) 植物材料. 胡萝卜(*Daucus carota* L)品种为日本国分大长人参. 胡萝卜体细胞胚的获得及处理按照黄美娟等人^[4]的方法进行.

(ii) 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成. 利用酸性酚-异硫氰酸胍法提取胡萝卜体细胞胚的总 RNA. 按照 GIBCO LTI 公司 DNase I 的使用说明去除微量 DNA 后, 再根据 Boehringer Mannheim 公司的 ExpandTM 逆转录酶的操作程序进行单链 cDNA 的合成.

(iii) 胡萝卜 *cSUT* 探针的扩增及克隆. 根据已发表的水稻、拟南芥菜、大车前等植物的 *SUT* cDNA 序列保守区设计一对简并引物:

P1(5'端): 5'-TTGGATCCGTTCAGTTCGGITGGGC-3',

P2(3'端): 5'-CCGAATTCGCCATCCAGTCIGTGTC-3',

其中 I 代表次黄嘌呤, 底下画横线的碱基序列分别为引入的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点. 用调控状态的

胡萝卜体细胞 cDNA 为模板, P1 和 P2 为引物, 在 20 μL 反应体系中进行常规的 PCR 扩增. 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后, 按如下常数进行 PCR 反应: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 次循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物克隆在 pBluescript (SK) 质粒载体上, 用 Sequenase Version 2.0 DNA 测序试剂盒(USB 公司)测定核苷酸序列, 根据同源比较确定为 *SUT* 基因片段.

(iv) 胡萝卜 *cSUT* 基因的分离和序列测定. 取 0.5 g 调控状态的胡萝卜体细胞胚, 用 Quickprep Micro mRNA Purification Kit(Pharmacia 公司)提取 mRNA 并用 TimeSaver cDNA Synthesis Kit(Pharmacia 公司)进行 cDNA 的合成. 合成的 cDNA 与 $\lambda\text{gt}10/\text{EcoR}$ I 臂 (Promega 公司)连接, 并用 Promega 公司生产的包装蛋白进行体外包装. 以 ^{32}P 标记的 *SUT* 基因片段为探针, 对 cDNA 文库进行杂交. 结果在约 3×10^5 pfu 中获得一个阳性克隆. 将其插入片段亚克隆在 pBluescript 载体上, 进行双链核苷酸序列测定.

(v) 基因结构分析、同源性比较. 利用 GENTYX-WIN 3.0 软件对所得的核苷酸序列进行分析和同源性比较. 并通过因特网对其结构进行了 DAS(dense alignment surface)方法及拓扑跨膜预测.

(vi) 胡萝卜 *cSUT* 基因在酵母中的表达. 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) SUSY7/ura3 菌株及 *E. coli* / *S. cerevisiae* 穿梭质粒 112A1NE^[5] 由德国 Tuebingen 大学 ZMBP 实验室的 Frommer 和 Ward 教授馈赠.

将 *cSUT* 基因克隆至 112A1NE 质粒的 *Not* I 位点中, 获得重组质粒 112A1NE-*cSUT*, 与 112A1NE 质粒分别转化酵母 SUSY7/ura3 (转化试剂购自 CLONTECH). 酵母细胞在 50 mL YPD 培养基中培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为 0.5, $1000 \times g$ 离心 5 min, 沉淀用 10 mL 灭菌双蒸水重悬, 离心后, 沉淀加入 200 μL TE/LiAc, 制得酵母感受态细胞. 取 1 μg 112A1NE-*cSUT* 质粒与 112A1NE 质粒, 分别与 100 μg 鲑精 DNA 在 5 mL 离心管中混合, 加入 100 μL 酵母感受态细胞, 涡旋混匀. 加入 600 μL PEG/LiAc 溶液, 200 r/min 涡旋 10 s 后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 加入 70 μL DMSO, 颠倒混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后冰浴, 14000 r/min 离心 5 s, 重悬于 150 μL TE 中. 取不同体积铺于含 2% 葡萄糖的 YNB/-Trp 培养基平板上 (2% 葡萄糖, 0.17% 酵母基本培养基, 0.13% Trp), 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d. 挑取大的克隆, 涂于含 2% 蔗糖的 YNB/-Trp 培养基 (pH 5.5) 平板上,

30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d 后, 从转化 112A1NE-*cSUT* 平板中, 挑取生长较快的克隆, 培养后用于蔗糖吸收实验.

(vii) *cSUT* 酵母转化子的 ^{14}C -蔗糖吸收功能鉴定. *cSUT* 转化的酵母细胞在 20~30 mL 培养基中长至 $A_{600\text{nm}}$ 为 0.9~1.0, 离心收集菌体, 用双蒸水洗 3 次, 重悬于含 25 mmol/L MES[2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid], pH 4.5, 1% (质量体积比) 的 YNB 缓冲液中. 蔗糖吸收实验按照 Cirillo^[6] 的方法进行. 每个反应用 100 μL 细胞悬浮液, 内含湿重 1 mg 的酵母, 加入 1.85×10^4 Bq ^{14}C -蔗糖 (Amersham), 体系中蔗糖终浓度为 0.4 mmol/L. 细胞在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下分别温育 0, 2, 4, 6 和 8 min 后, 转移至装有硝酸纤维素滤膜 (0.8 μm , Millipore) 的抽滤装置中, 内有 10 mL 冰水, 过滤后迅速用 5 mL 冰水漂洗, 并重复 3 次. 最后, 滤膜用液闪仪计数.

测量酵母在不同 pH 时对蔗糖的吸收实验, 细胞的操作与以上相同, 悬浮液为含 25 mmol/L MES 的 YNB, pH 2~8, 反应时间为 2 min. 测定其他糖对蔗糖的竞争实验时, pH 4.5 的缓冲液中先加竞争糖, 30 s 后再加入蔗糖至终浓度为 0.4 mmol/L, 反应时间为 3 min. 测定 K_m 时, 蔗糖浓度依次为: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 11.5, 15 和 19 mmol/L, 反应时间为 1 min.

(viii) 胡萝卜 *cSUT* 基因的表达分析. 取生长 12 周的胡萝卜植株分别提取其叶片、叶柄、根的总 RNA, 以及调控、解调控状态 12, 24, 36 和 48 h 的胡萝卜体细胞胚的总 RNA, 各取 20 μg 进行甲醛电泳分离, 然后转至 Zeta-Probe 滤膜 (Bio-Rad 公司) 上, 用 Primer-a-Gene Labeling System (Promega 公司) 进行放射性同位素 ^{32}P 标记, 杂交和洗膜过程按照 Zeta-Probe 滤膜使用说明书进行.

2 结果

2.1 胡萝卜 *SUT* 基因 cDNA 部分片段的 RT-PCR 扩增及全长 cDNA 的克隆

根据不同植物的 *SUT* 蛋白在结构上相对保守的一段氨基酸序列, 设计并合成了一对简并引物. 其中引入 3 个次黄嘌呤核苷酸 (I), 它可以与 T, C 或 A 3 种碱基配对, 这样在实现了引物简并性设计的同时, 又增加了引物的特异性, 从而提高了扩增的效率. 利用这一对引物, 对反转录合成的调控状态胡萝卜体细胞胚的单链 cDNA 群进行 PCR 扩增. 将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上做电泳分离, 结果呈单一条带, 大

小约 800 bp, 与预测的片段大小一致。

将 PCR 扩增得到的片段用 *EcoR* I / *Bam*H I 双酶切后, 与 pBluescript 噬菌粒载体定向连接, 转化 *E. coli* XLI-Blue 感受态宿主菌。挑选阳性克隆并提取质粒, 利用双脱氧链终止法进行核苷酸序列的测定。将所得序列与已发表的拟南芥和车前草的 *SUT* cDNA 进行序列比较, 同源性均达到 60% 以上, 证明了我们扩

增得到的 cDNA 片段的确实来自胡萝卜的 *SUT* 基因。

以克隆的胡萝卜 *SUT* cDNA 片段为探针, 筛选胡萝卜体细胞胚的 cDNA 文库, 获得一个阳性噬斑。将得到的阳性噬斑扩增培养后, 提取重组 λDNA, 经 *Not* I 酶切, 将得到的插入片段克隆到 pBluescript 噬菌粒载体上, 进行双向核苷酸序列测定, 结果表明插入片段长度为 1796 bp (图 1)。

图 1 胡萝卜 *SUT* 基因 cDNA 的 DNA 序列及推导的氨基酸序列
图中下画线示氨基酸跨膜区, 方框内示起始密码子和终止密码子
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2001-46-14-1190>

2.2 cSUT 蛋白氨基酸序列同源性比较

用 GENTYX 软件对所得的核苷酸序列进行分析,表明其开放可读框为 1545 bp,共编码 514 个氨基酸和一个终止密码子(图 1).将推导的胡萝卜 cSUT 蛋白的氨基酸序列与其他已知的 SUT 的氨基酸序列进行同源性比较后,基因命名为 *cSUT*.比较结果显示,*cSUT* 与双子叶植物的蔗糖转运蛋白的氨基酸序列都有较高的同源性,如与拟南芥菜的 *AtSUC1*,甜菜的 *BvSUT1*,番茄的 *SoLSUT1* 和蚕豆的 *VfSUT1* 编码的氨基酸序列的同源性分别达到 63.4%, 65.8%, 66.5% 和 64.6%.相对来说,与单子叶植物的蔗糖转运蛋白基因的同源性要稍低一些,如与水稻的 *OsSUT1* 的同源性仅为 44.9%.同胡萝卜中已分离的 *DcSUT1* 和 *DcSUT2*^[7] 的同源性,分别为 53.1% 和 98.3%,这说明我们分离的 *cSUT* 基因是胡萝卜蔗糖转运蛋白基因家族的一个新成员.

2.3 胡萝卜 cSUT cDNA 的氨基酸序列分析及结构预测

cSUT 蛋白的分子量为 54.48 ku,等电点为 9.04.在 515 个氨基酸中以疏水性氨基酸为主,共 329 个,占总数的 63.88%;其次是中性氨基酸,有 102 个,占总数的 19.81%;而亲水氨基酸仅有 84 个,占总数的 16.31%.蔗糖转运蛋白是跨膜蛋白,而疏水氨基酸含量高有利于跨膜结构域的形成.已发表的植物蔗糖转运蛋白都含有 12 个跨膜结构域,通过同源性比较,结合因特网进行膜蛋白的 DAS 结构(图 2)和拓扑结构

图 2 *cSUT* 氨基酸序列的“DAS”过膜结构预测
——示严限,-----示松限

推测,证实胡萝卜 *cSUT* 的结构同样具有类似特点.这 12 个结构域的大小范围为 19~23 个氨基酸残基,其中多为高度疏水的 Val, Ile, Leu 和 Phe 残基,使此区域在空间结构上具有非常高的疏水性,形成典型的跨膜结构(图 1 中下画线的氨基酸).前 6 个跨膜结构域与后 6 个跨膜结构域间有 39 个氨基酸残基,含有较多的亲水性的氨基酸.已经推测,蔗糖转运蛋白的前、后 6 个跨膜结构域在空间上又各自组成 2 个大的结构域,它们通过一段面向细胞质的氨基酸序列相连,这段面向细胞质的氨基酸序列在理论上应含有较多的亲水性氨基酸.

2.4 胡萝卜 cSUT 蛋白的功能分析

为了鉴定 *cSUT* 蛋白是否具有转运蔗糖的功能,本实验选用酵母 *SUSY7/ura3*^[5] 作为转化的受体菌株,由于该菌株的蔗糖酶基因已被敲除,因此,在蔗糖作为惟一碳源的培养基中,只有获得外源 *SUT* 基因,并表达出有功能的蔗糖转运蛋白的转化子才能正常生长.实验中,克隆有 *cSUT* 基因的重组质粒 112A1NE-*cSUT* 转化酵母 *SUSY7/ura3* 后,在蔗糖为惟一碳源的固体培养基上,转化子酵母长势良好,而只转入 112A1NE 质粒的对照酵母,在此培养基上则不能正常生长.¹⁴C-蔗糖的吸收实验表明:与对照酵母 112A1NE 菌株相比,含有 112A1NE-*cSUT* 重组质粒的转化子酵母菌株可高速过膜转运蔗糖(图 3).

图 3 转基因酵母细胞的蔗糖吸收比较
蔗糖浓度为 0.4mmol/L,缓冲液 pH 4.5,每实验至少 2 次重复,●示转基因酵母 112A1NE-*cSUT* 的蔗糖吸收,◆示对照酵母 112A1NE 的蔗糖吸收

实验表明,培养基的 pH 值会明显地影响 *cSUT* 对蔗糖的转运速率:pH 较低时,转运速度较快,pH 6 时的转运速度只是 pH 2 时的 20%(图 4),这种效应是与 *SUT* 的蔗糖-H⁺共转运机制相一致的.为了测定 *cSUT* 转运蔗糖的底物专一性,在反应中加入了几种单糖和双糖(乳糖、核糖、木糖、果糖和麦芽糖,浓度均为 5 mmol/L)作为可能的竞争底物,与其他的蔗糖转运蛋白的研究结果相似^[8,9],只有麦芽糖对蔗糖转运有抑制作用,说明 *cSUT* 对蔗糖的转运是特异的.

图 4 不同 pH 条件下转基因酵母细胞对蔗糖的吸收
蔗糖浓度为 0.4 mmol/L, 反应时间 2 min, 每实验至少 2 次重复

根据 Lineweaver-Burk 双倒数法, 推导 *cSUT* 的 K_m 值为 9 mmol/L. 说明在较低蔗糖浓度下, *cSUT* 对蔗糖的吸收达不到饱和状态. 这与 *SUT4* 亚族^[10]的蔗糖转运蛋白的 K_m 值类似. 与同源性较高的 *DcSUT2* 相比, *cSUT* 的 K_m 要高十几倍, 这或许是由于两 *SUT* 的某些氨基酸的变化而大大改变了其转运活性的缘故.

2.5 胡萝卜 *cSUT* 基因的表达分析

为了解 *cSUT* 基因在胡萝卜植株中的表达情况, 我们检测了叶、叶柄和根 3 种不同组织中 *cSUT* 基因 mRNA 转录本的表达水平. Northern 杂交结果可以看出(图 5), *cSUT* 基因在根中高效表达, 而在叶与叶柄中只有微量的表达, 说明这个基因的主要转运活性在根中. 另外, 随着培养基中蔗糖浓度的下降, 胡萝卜胚根从调控的发育停滞状态转入解调控的延伸过程, 蔗糖转运蛋白基因的转录水平也相应地发生了显著的变化(图 6). 调控状态下, *cSUT* 的表达量较低, 而解调控 12 h 后, 其表达量则显著提高, 这可能是一种代偿性行为的体现. 随着胚的继续正常发育, 其表达量恢复至一般水平, 并随着胚的发育呈上升趋势, 这也许是生长的正常代谢需求.

图 5 *cSUT* 在胡萝卜中的组织特异性表达
(a) 杂交结果; (b) 总 RNA 电泳图, 1~3 分别示胡萝卜植株的叶、叶柄和根. 生长 12 周的胡萝卜植株, 分成叶、叶柄和根三部分, 提取总 RNA, 转膜(20 mg/样品), 用 ³²P 标记的 *cSUT* 探针杂交

图 6 *cSUT* 在调控与解调控不同时间的体细胞胚中的表达
(a) 杂交结果; (b) 总 RNA 电泳图, 1 示调控状态胚, 2~5 分别示解调控 12, 24, 36 和 48 h 的胚. 收集调控与解调控不同时间的胡萝卜体细胞胚, 提取总 RNA, 转膜(20 μg/样品), 用 ³²P 标记的 *cSUT* 探针杂交

3 讨论

我们筛选调控状态下胡萝卜体细胞胚根的 cDNA 文库, 克隆了胡萝卜蔗糖转运蛋白 *cSUT* 基因, 其编码的氨基酸序列与其他蔗糖转运蛋白具有很高的同源性, 都属于 MFS 家族. Northern 分析证明, *cSUT* 基因在根部特异表达, 与具有较高同源性的胡萝卜的另一个蔗糖转运蛋白基因 *DcSUT2* 相似^[7]. *DcSUT2* 也在库组织中高表达, 如正生长的茎、花、发育中的直根和种子. 研究还表明它不仅在直根中韧皮部、而且也在木质部的薄壁组织中表达, 说明 *DcSUT2* 可为发育的双子叶植物提供碳源和能量. 推测 *cSUT* 可能也为薄壁细胞的能量储存供给蔗糖. Northern 分析调控与解调控不同时期的胡萝卜体细胞胚中 *cSUT* 基因的表达结果显示, 解调控前后 *cSUT* 表达变化较大, 这说明蔗糖浓度的降低, 解除了原有的高浓度蔗糖培养下的胁迫状态, 胚细胞迅速进入正常的发育进程, 并首先进行体系的代偿性补偿, 大量吸收蔗糖, 当胚细胞的发育体系达到新的平衡后, 蔗糖的吸收又降至中等水平. 随着胚的解调控时间增长, 胚根不断发育, 代谢所需要的碳源及能量的需求不断增加, 蔗糖转运蛋白的含量也逐渐增多, 以满足细胞对蔗糖吸收的需求. 这一现象揭示, 蔗糖浓度的胞外变化提供了某种信号, 传递至胞内, 从而引起了相关的发育基因的调控变化.

蔗糖作为重要的信号分子, 本身浓度及其所引起的渗透压变化, 都可通过转录和翻译途径调节许多基因的表达, 从而控制植物体的发育进程^[11,12], 并与种子发育、细胞分化及储存活性相关^[3], 我们曾证明 ABA 可能在蔗糖信号转导途径中起中介因子的作用^[13]. 深入研究蔗糖调控的胡萝卜体细胞胚的发育,

不仅可以揭示胚根发育的分子机理, 而且可以阐明蔗糖信号转导的分子机制. 陈春霞等人^[14]通过 mRNA DDRT-PCR 已经证明, 在调控和解调控培养的胡萝卜体细胞胚中, 存在着基因表达差异, 我们应用改进的 cDNA RDA 技术^[15]和 SSH 技术, 结合 cDNA 文库的差别筛选, 已得到了与糖代谢、转录调节和细胞周期调控有关的基因, 这为今后更深入地研究蔗糖信号转导途径奠定了基础.

致谢 本工作为国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 39630040).

参 考 文 献

1 Smeekeens S. Sugar-Induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 49~81

2 Lalonde S, Boles E, Hellmann H, et al. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 1999, 11: 707~726

3 Wobus U, Weber H. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol Chem*, 1999, 380: 937~944

4 黄美娟, 黄绍兴, 朱微, 等. 采用调控培养方法提高胡萝卜体细胞胚活力的研究. *科学通报*, 1993, 38(6): 550~553

5 Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J*, 1992, 11: 4705~4713

6 Cirillo V P. Sugar transport in normal and mutant yeast cells. *Methods Enzymol*, 1969, 174: 617~622

7 Shakya R, Sturm A. Characterization of source- and sink-specific

sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1473~1480

8 Boorer K J, Loo D D F, Frommer W B, et al. Transport mechanism of the cloned potato H⁺/sucrose transporter *StSUT1*. *J Biol Chem*, 1996, 271: 25139~25144

9 Hou J J, Theodolou F, Sauer N, et al. A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an *Arabidopsis* H⁺/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus oocytes*. *J Membr Biol*, 1997, 159: 113~125

10 Eise A, Barker L, Kuhn C, et al. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell*, 2000, 12: 1345 ~ 1355

11 Rook F, Gerrits N, Kortstee A, et al. Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J*, 1998, 15: 253~263

12 Rook F, Weishbeek P J, Smeekeens S C M. The light-controlled *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene ATB2 encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 171~178

13 程玉兰, 刁丰秋, 黄美娟, 等. 蔗糖调控培养对胡萝卜体细胞胚内源 ABA 水平的效应. *植物学报*, 1999, 41: 761~765

14 陈春霞, 黄美娟, 吴乃虎, 等. 不同发育状态下胡萝卜胚根基因的差异表达. *科学通报*, 1996, 41(22): 2085~2088

15 刁丰秋, 张雷, 黄美娟, 等. 利用改进的 cDNA RDA 技术分离胡萝卜体细胞胚根发育相关的基因. *中国科学, C 辑*, 2000, 30(1): 36~43

(2001-01-11 收稿, 2001-03-22 收修改稿)