

杜亚琳. 黄瓜缺铜响应转录因子 *CsSPL7* 的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 88–91.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.023

黄瓜缺铜响应转录因子 *CsSPL7* 的克隆及表达分析

杜亚琳

(农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室/东北农业大学园艺学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:结合黄瓜基因组数据和生物信息学分析,采用同源扩增技术从黄瓜津研 4 号叶片中获得 1 个受缺铜诱导表达的基因,命名为 *CsSPL7*。该基因全长 1 746 bp,编码 582 个氨基酸,与拟南芥 *SPL7* 基因序列相似性为 43%。QRT-PCR 表达分析表明,*CsSPL7* 是 1 个受缺铜诱导表达的基因,在缺铜处理的黄瓜叶片中表达量最高,并且随着铜处理浓度的升高,其表达量逐渐降低。研究结果为下一步分析 *CsSPL7* 在黄瓜缺铜胁迫过程中的功能奠定了基础。

关键词:*CsSPL7* 基因; 黄瓜; 铜; QRT-PCR; 同源克隆

中图分类号: S642.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0088-03

铜(Cu)是植物生长和发育必需的微量元素,许多代谢过程,例如光合作用、线粒体电子传递、呼吸作用、活性氧代谢、细胞壁结构改变以及乙烯反应等,均需要铜作为辅助因子^[1-2]。由于铜在发育过程中的重要意义,铜动态平衡在植物体内处于一种精细调控的状态。植物体内的铜浓度在不同物种以及不同外源铜环境条件下存在一定差异^[3]。

目前,人们通过对植物铜缺失突变体的研究,已经初步明确植物对铜的吸收和积累机制。缺铜胁迫条件下,植物通过调控铜吸收和转运已经获得了精细调控体内铜动态平衡的机制^[4-5]。例如拟南芥通过提高铜的吸收和获取量来应对缺铜胁迫。缺铜胁迫会上调拟南芥铜转运蛋白基因的表达,如 *ZIP2*、*ZIP4*、*FRO3* 等^[6-7]。此外,缺铜胁迫时,在转铜伴侣 *CCH* 基因作用下,衰老过程中铜会在各组织间重新分配^[8]。此外,研究表明,拟南芥 *SPL7* 是植物缺铜反应过程中的一个核心调控因子,在低铜条件下,铜转运蛋白基因(*COPT1*、*COPT2*、*ZIP2*、*YSL2*)、转铜伴侣基因(*CCH*、*CCS*)、*FRO3*、*FRO4*、*FRO5* 和 *FSD1* 在 *spl7* 突变体中也均调控失衡^[9-10]。此外,一些新鉴定出的缺铜响应蛋白同样受到 *SPL7* 的调控^[10]。上述有关植物吸收和积累铜机制研究,暗示 *SPL7* 在植物响应缺铜胁迫过程中的重要调控作用,为深入研究农作物(如黄瓜)铜胁迫的生理与分子机制鉴定了基础。

黄瓜为一种重要的蔬菜作物,在世界范围内广泛栽培。随着工业、农业对含重金属材料的使用,以及排放的化学物质种类、数量的增加,重金属(如铜)污染的土壤面积日益扩大,使环境污染日益严重,造成农作物产量和品质下降、优良品种退化迅速,从而制约农业的发展,进而会威胁生态安全,影响农产品的品质,并通过食物链危及人类健康。尽管人们对植物缺铜响应机制的相关研究取得了较大进展,但是目前人们仍不能清晰阐述铜胁迫条件下植物(如黄瓜)调控铜动态平衡的生理与分子机制。通过基因工程改造植物基因培育高生

物产量的重金属超积累植物是一个可行的途径,要实现这一目标,首先要明确植物对铜的吸收积累机制。因此,探讨黄瓜耐铜胁迫生理与分子机制具有重要的理论和实践意义。本研究拟克隆黄瓜 *CsSPL7* 基因,并对其序列和在缺铜胁迫条件下的表达模式进行分析,从而为后续利用基因工程技术研究该基因的功能及培育耐铜胁迫的黄瓜新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为黄瓜津研 4 号,购自天津科润黄瓜研究所。2015 年春季在东北农业大学园艺实验站人工气候室内常规种植。在苗期,分别取同一植株的叶片(最顶部幼嫩叶片),用液氮冷冻并于 -80 ℃ 保存,用于 RNA 的提取。

1.2 铜处理

黄瓜植株采用水培方式进行栽培。采用 MGRL 营养液配方[含 1.512 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.257 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.5 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、3.0 mmol/L KNO_3 、67 μmol/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、8.6 μmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10.3 μmol/L $\text{MnSO}_4 \cdot 1.0 \mu\text{mol/L ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30 μmol/L H_3BO_3 、24 nmol/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、130 nmol/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] ,分别添加不同浓度的 CuSO_4 (0、1、5、25、50 μmol/L) 进行处理,3 d 更换 1 次营养液。

1.3 总 RNA 的提取及单链 cDNA 反转录

总 RNA 的提取采用 TRIzol (Invitrogen) 法进行,具体操作参照说明书。随后用 RNase Free DNase I (TaKaRa) 处理总 RNA,以去除残留的基因组 DNA。单链 cDNA 合成采用 MBI 公司的逆转录(RT)试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)进行,具体操作参考试剂盒说明书。

1.4 黄瓜 *CsSPL7* 基因的克隆

根据文献检索结果,选取拟南芥 *SPL7* (AT5G18830) 基因,在 Tair (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站搜索其基因序列,并将其基因序列在黄瓜基因组 (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/genome/cuke.cgi>) 网站中进行比对,获取其在黄瓜中的同源序列,进而以黄瓜基因组中基因同源序列为模

收稿日期:2015-10-19

基金项目:黑龙江省青年科学基金(编号:QC2010089)。

作者简介:杜亚琳(1980—),女,河南郾城人,硕士,实验师,研究方向为园艺作物生物技术。E-mail:duyalin123@163.com。

板,利用 Primer 5.0 设计特异引物(正义引物:5'-AT-GGAAAGTGCATCGATCAAGCATGC-3';反义引物:5'-TTA-CAACTTATCTATCAAGCATCTG-3'),以黄瓜津研 4 号幼嫩叶片 cDNA 为模板,扩增黄瓜 *SPL7* 基因全长 cDNA 序列。扩增产物采用北京百泰克生物技术有限公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收,插入 pGEM-T Easy 载体(美国 Promega 公司),热激转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在氨苄青霉素平板上进行阳性克隆筛选,送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 生物信息学以及荧光定量 PCR(简称 QRT-PCR)分析

将克隆获得的 *CsSPL7* 基因序列在 NCBI 中进行同源比对分析。同时以经不同铜浓度处理的黄瓜津研 4 号叶片为材料,以黄瓜 *CsSPL7* 基因的 cDNA 序列为基础,利用 Primer 5.0 设计特异引物(正义引物:5'-GGGCAACATACTT-GTTTAC-3';反义引物:5'-GTCAAGATACTTTCCACCA-3'),以 β -actin 作为内参,用于黄瓜 *CsSPL7* 基因的 QRT-

PCR 分析。QRT-PCR 反应总体体系为 20 μ L,包括 10 μ L Real Master Mix SYBR Green I[天根生化科技(北京)有限公司]、各 1 μ L 特异引物(20 μ mol/L)、0.5 μ L cDNA 模板、7.5 μ L ddH $_2$ O。实时定量 PCR 所使用仪器为 IQ5 实时定量 PCR 仪(伯乐公司),试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来计算基因相对表达量。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *CsSPL7* 基因的克隆与序列分析

以拟南芥 *SPL7* 在黄瓜基因组中的同源基因序列为参考,设计特异引物,扩增获得 *CsSPL7* 同源基因全长 cDNA 序列。结果成功扩增出 1 条约 1 700 bp 的单一一条带,测序结果表明,扩增片段长度为 1 746 bp,编码 582 个氨基酸(图 1)。对其进行 Blast 分析表明,其与拟南芥 *SPL7* 基因的序列相似性为 43%(图 2)。

```

atggaaagt gatcgat caagcat gcagct agaggatgtttctt gcgatggcgatgtagg
M E S D R S S M Q L E D V S C D G D V G
aaagataat attctttt caacaacaaactg atcaaaaggagtagtgcattggagctt
K D N I L F N N Q T T D Q K E V V H L E S
gacgatggcct ggtt acct ccacogtattgtt cagctcccgatcagcaaaat aatgtagaa
D D G L V I S T V C S A P D Q Q N N V E
agcgggttaacttt agtgggaactgtgaag ctcaagtggatggaggaaaagataatcc
S G L T L V G T G E A Q V D G G K D N S
aaatctctt gctt cgtct attgtgacaacaaagcacatatt catcaatgtgtccaact
K S L A S Y C D N K S T Y S S M C P T I
ggcgcaatattc attcaagctttatgactggaat cctgcagagattccctagaagactt cgg
G R I S F K L Y D W N P A E F P R R L R
ctccaaatatttt gaattgtt gctaat atgctgttgaattggaggat atattcgccct
L Q I F E W L A N M P V E L E G Y I R P
ggttgtataatttt gacttgcattt gcaatg ccgaagtt catgtggataaagttactt
G C I I L T A F V A M P K F M W I K L L
gaagatcccaacacacacgtgcataattttt gtagttgcacgtgggaagacct cttgggg
E D P T I H V H N F V V A R G R P L W G
aggggcaacat actt gttt acttgaacaacatgattttt cagcgt attggaaggggaaagt
R G N I L V Y L N N M I F H A M E G E S
gtaatt gaaaattgagatgg atatgcaggctccaaaactt caact atgtacat cctacttgc
V M K A I E M D M Q A P K L H Y V H P T C
ttcgaggctggaaacc cmatggagttt gttgtt gttggaagttcatt acgacaaccaaa
F E A G K A P M E F V A C G S H L R Q P K
tttagttctctt gttgtt tttt gtttggaaagt atcttgaccacgaccagtt cttt gttt ct
F R S L V S F G K Y L D H D Q S F V L
cctcattgt caaaagaaggt aatgt cttt gtaggtgaccaccagtt gttt caagatattgt
P H C Q K E G N A I W S D H Q K I C
ataccoccat acagaaaacg atatttttggccccgcat tttt gtaggttgaagatcagttca
I P H T E N D I F G P A F V E N Q S
ggcctgt caaatttt attcccat actcatttggagatagtt gaaactt gttt cttgaaatgaaa
G L S N F I P I L I G D S E T C S E M K
gct attcaggagcgggtt gatt atgt ctt gttt gttggaagctact gttt cttcacatgat
A I Q E R L D M S L L V E A T T G S S H D
actt gtagaactt cttc attgtagacaaaaagttatatt cagaactcatt gatggacatatct
T C E A H S S L R Q K V Y S E L M M D I S
tggtt gctc caaaagcctt catc agagcccatg cagcaaat attgaaatt cgtt cacaattt
W L L K K P S S E P M Q Q I M N S S Q I
caaag attcaccgctt gttt taaaattttt gatattg caat gact caactgtt cttt tgggg
Q R F T R L L K F L I C N D S T V I L G
agagt cttggaacat ctttaagattgtt cttt ggaatgtt ggaat caaattt ggggggtt aat
R V L E H L K I V M E N V E S N V G V N
ggctccaattt cttt gattt aaagttttt cgagaagt attt agattacg caggagattgt
G S N Y P D L R P F E K Y L D Y A G D V
ctt caactgaatt cttt cggaagcgtt gcaatt cgggt gctacacctaggattt cttt aaagcca
L Q L N L R K A G N S V L H L G F L K P
aaagggggt catgtttt cttt caaagcagct cggagaataaattt gttt cagttc gctc cttt ggg
K G G H V S Q S S E N K L V S V A P G
act caactgaaatggagc caagagaaaattgt cttttt ccagcagttggcagggtt caatt
T I L K E M E P R E N G H F P A V A G S I
tccactgtt aatgttggaaacaatt acct ctttataaaacgaaaagctcag cggagaaaatcaca
S I G N V E I I P L I N E K L S E K I T
att caagaaacatt caaggaagttc attt gttt cttt caattt cttcagggtt cttt tttt tagactt
I Q E H S R K S C G L Q F S G V L G R R
cagacaacact attt gtagtaaacctt gttt gttt gttt gttt gttt gttt gttt gttt gttt
Q I T L F A V T F V A V C F G V C A A L
gtt catt ctt caaaaagttggcagttt gcaattt caattc cggcagatg cttt gatt agat aag
V H S H K V G E F A I S I R R C L I D K
ttgttaa
L -

```

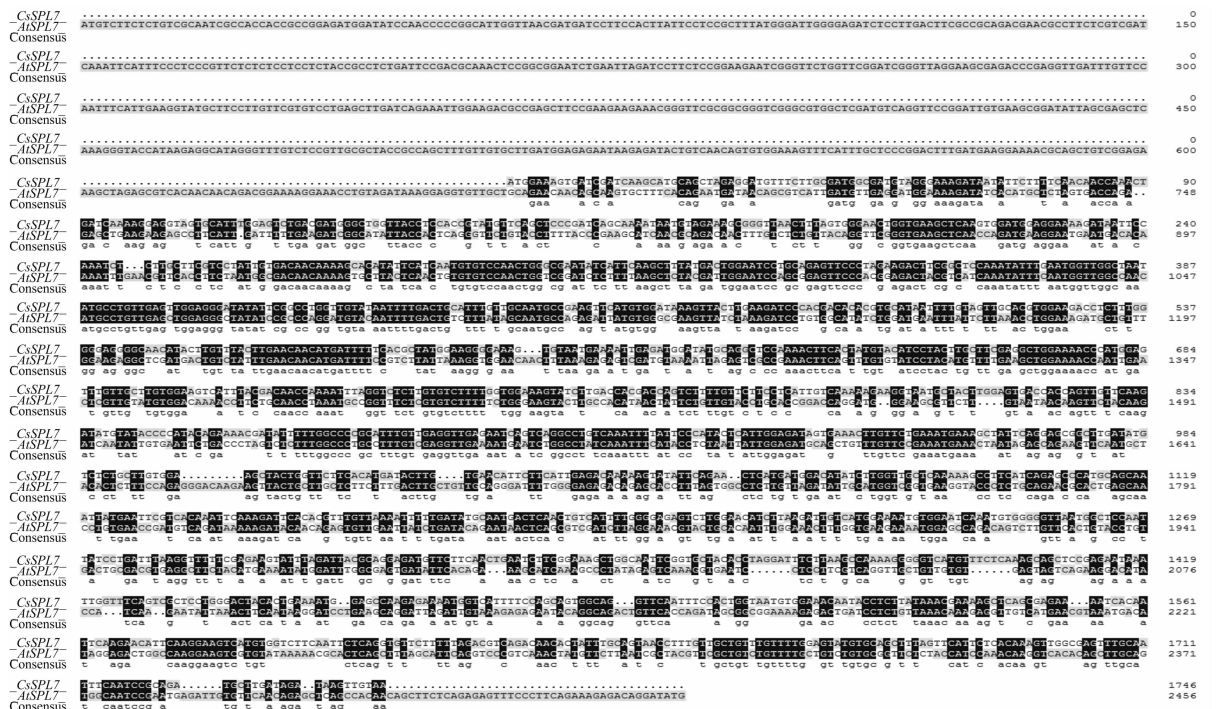
图1 黄瓜 *CsSPL7* 基因的 cDNA 全长序列及其推导的氨基酸序列

2.2 黄瓜 *CsSPL7* 基因的组织表达分析

以 β -actin 作为内参标定,以经不同铜浓度处理的黄瓜津研 4 号叶片为材料,以黄瓜 *CsSPL7* 基因 cDNA 全长序列为模板设计特异引物,利用 QRT-PCR 对 *CsSPL7* 进行表达特征分析。结果表明,*CsSPL7* 在缺铜处理的黄瓜叶片中的相对表达量最高,而随着铜处理浓度的增加,其表达量则逐渐下降(图 3),证明 *CsSPL7* 是 1 个受缺铜诱导表达的基因。

3 讨论

本研究通过生物信息学分析和同源克隆技术,从黄瓜叶片中克隆得到植物缺铜核心调控因子 *SPL7* 的同源基因 *CsSPL7*,并对其序列和表达进行分析。结果表明,*CsSPL7* 是 1 个缺铜诱导表达基因。人们发现从莱茵衣藻铜反应调控转录因子 *CRR1* 启动子区鉴定出来的 GTAC 核心调控元件只是在植



黑色表示基因序列一致部分；灰色表示基因序列不一致部分。右侧数字表示碱基位置；左侧“Consensus”表示一致性
图2 黄瓜 *CsSPL7* 与拟南芥 *AiSPL7* 基因核苷酸序列比较

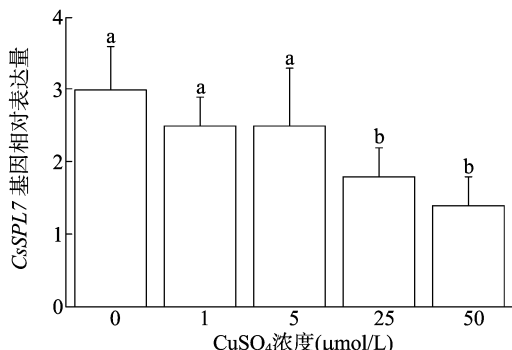


图3 黄瓜 *CsSPL7* 基因在不同铜处理条件下的表达分析结果

物 Cu-microRNAs 和 *FeSOD* 基因启动子中被频繁检测到,暗示其在缺铜胁迫下的铜动态平衡调控过程中可能发挥重要作用^[2]。缺铜胁迫信号通过拟南芥 GTAC 调控元件激活了 miR398b、miR398c 的转录活性,而位于 185 ~ 182 bp 或者 157 ~ 154 bp 的 GTAC 核心调控元件足以调控缺铜胁迫^[9]。后续结果表明,拟南芥转录因子基因 *SPL7* 与莱茵衣藻 *CRR1* 具有高度同源性^[11]。进一步分析表明,*SPL7* 是植物缺铜胁迫下的 1 个保守的核心调控因子。*SPL7* 能够直接与 miR398 启动子区 GATC 调控元件结合^[9],即使是在低铜条件下,启动子区拥有 GTAC 调控元件的植物铜动态平衡相关 Cu-microRNAs 在 *spl7* 突变体中也均不能正常表达。上述有关植物吸收和积累铜机制研究,为深入研究黄瓜 *CsSPL7* 基因的生理与分子机制鉴定了重要基础。

相对于模式植物拟南芥的研究^[9],目前黄瓜耐铜胁迫相关基因分子调控机制的研究尚处在起步阶段,而对黄瓜耐铜胁迫相关基因的分子机制的研究还较少。随着黄瓜及各种园艺作物基因组测序的完成,结合生物信息学分析,加快了不同

种间同源基因的克隆,如以拟南芥相关基因信息来克隆黄瓜中的同源基因。本研究即依托黄瓜基因组序列信息,利用生物信息学分析,在较短时间内获得黄瓜 *CsSPL7* 的全长序列。因此,黄瓜基因组测序实施的完成,在很大程度上促进了黄瓜耐铜相关基因分子调控机制方面的研究。

虽然植物 *SPL7* 家族中的一些基因已有广泛研究,但有一些问题仍然没有解决。例如,除了转运和信号转导以外,植物 *SPL7* 家族(例如 *CsSPL7* 等)是否还有其他功能? 以及作为一种微量元素,同时又作为一种调节信号,黄瓜缺铜信号如何调控黄瓜植株的生长和发育? 由于这些相关分子机制还不清楚,在接下来的工作中,笔者将通过功能互补试验、基因敲除试验等对 *CsSPL7* 的功能进行研究,同时计划对其启动子序列进行克隆与分析,以期能够帮助人们理解黄瓜耐缺铜胁迫的生理与分子机制。

参考文献:

- [1] Pilon M, Abdel - Ghany S E, Cohu C M, et al. Copper cofactor delivery in plant cells[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9 (3): 256 - 263.
- [2] Burkhead J L, Reynolds K A G, Abdel - Ghany S E, et al. Copper homeostasis[J]. New Phytologist, 2009, 182(4): 799 - 816.
- [3] Cohu C M, Pilon M. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability[J]. Physiologia Plantarum, 2007, 129(4): 747 - 755.
- [4] Puig S, Thiele D J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6(2): 171 - 180.
- [5] De Freitas J, Wintz H, Kim J H, et al. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies[J]. BioMetals, 2003, 16(1):

贾晓梅,周悦,崔彬彬,等.北美海棠组织培养中褐变影响因子分析[J].江苏农业科学,2016,44(12):91-93.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.024

北美海棠组织培养中褐变影响因子分析

贾晓梅,周悦,崔彬彬,曹柳青

(保定学院生化系,河北保定 071001)

摘要:为解决北美海棠组培快繁和组织再生中的褐变问题,分析北美海棠组织培养中外植体褐变影响因子。结果表明,茎段、嫩叶、嫩芽3种外植体中,褐变程度最低的为茎段;MS+1.0 mg/L 2,4-D的培养基上外植体褐变程度最低;暗培养下褐化程度低于光照培养;遮光暗处理外植体母株枝条可减轻褐变;低温条件下培养可抑制褐变;4月进行培养时外植体褐化程度最低,随后随月份增加褐变程度加重;培养基中附加聚乙烯吡咯烷酮(PVP)可减轻外植体褐变,而附加柠檬酸(CA)、维生素C以及维生素C预处理外植体均不能明显降低褐变率。

关键词:北美海棠;褐变;组织培养;PVP;维生素C

中图分类号:S685.990.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0091-03

北美海棠(*Malus micromalus* cv. “American”)为蔷薇科苹果属落叶乔木^[1-2],花、叶、枝条和果实颜色多样,在不同季节中形态多样,观赏价值极高,具有耐寒、抗病等特性,还具有较强的观赏性和长时间的观赏周期,是优秀的园林植物种类^[3],在我国的园林绿化中有非常大的应用潜力。北美海棠主要通过扦插嫁接进行繁殖,虽然操作简单,但是繁殖速度较慢,难以在短期内满足市场需求,对北美海棠进行组织培养则可以加快繁殖速度^[4]。在果树尤其是木本果树的组织培养中,易出现外植体或培养物的褐化、枯死现象,即褐变现象,又称酚污染^[5-6],褐变在北美海棠组织培养过程中也普遍存在。北美海棠接种24 h便开始出现褐变,导致外植体活性明显降低甚至死亡,难以建立组培快繁体系,限制了其组织培养及遗传转化工作的开展。有关褐变的研究在板栗^[7]、芭蕾苹果^[8]、龙眼^[9]、核桃^[10]、中国李^[11]和油桃^[12]等植物上已获得一定结果,但关于北美海棠组培过程还鲜有报道。本试验使

用常规组培方法,比较不同取材时间、不同外植体、不同激素种类与配比、不同培养条件及预处理方法下培养过程中褐化程度的差异,以期找到适合控制褐变的措施,为北美海棠组培快繁和组织再生奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用外植体为北美海棠的嫩芽、嫩叶和茎段,于2015年4月至8月采自生长健壮、无病虫害的北美海棠。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的接种培养 剪取的外植体用20%皂粉水浸泡25 min,自来水冲洗1.0~1.5 h。随后将材料在超净工作台上,用75%乙醇消毒20~30 s,再用0.1% HgCl₂消毒7~8 min,无菌水冲洗5遍,置于无菌干燥滤纸上吸干水分。将枝条切分成0.5~1.0 cm的带芽茎段、不带芽茎段,将叶片切为0.5 cm²,接种至培养基中。以MS培养基为基本培养基,添加蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L,调节pH值为5.8。培养条件为温度(23±2)℃,光照度1 500~2 000 lx,时间12 h/d。

1.2.2 不同外植体及培养基对褐变的影响 以MS为基本培养基,添加不同浓度6-BA、NAA、2,4-D的3种增殖培养基:(1)MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA;(2)MS+1.0 mg/L 2,4-D;(3)MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D。将北美海棠的茎段、嫩芽、嫩叶3种外植体接种在上述3种培养基中,每个处理接种30个外植体,培养7 d后

收稿日期:2016-02-01

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划(编号:15227527);河北省高等学校科学技术研究(编号:Z2013008);保定学院科研基金(编号:2012Z08);保定学院本科教学工程建设项目(编号:20120205);保定学院科研团队(编号:KYTD2013001);保定学院本科教学工程建设项目重点发展学科(编号:Xk20130601)。

作者简介:贾晓梅(1978—),女,河北曲阳人,硕士,副教授,主要从事植物生理和生物技术研究。E-mail:jxmjiang@aliyun.com。

185-197.

- [6] Wintz H, Fox T, Wu Y Y, et al. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(48): 47644-47653.
- [7] Mukherjee I, Campbell N H, Ash J S, et al. Expression profiling of the *Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO)* gene family reveals differential regulation by iron and copper[J]. Planta, 2006, 223(6): 1178-1190.
- [8] Mira H, Martínez N, Peñarrubia L. Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper,

senescence and ozone[J]. Planta, 2002, 214(6): 939-946.

- [9] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, et al. *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2009, 21(1): 347-361.
- [10] Bernal M, Casero D, Singh V, et al. Transcriptome sequencing identifies *SPL7*-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2012, 24(2): 738-761.
- [11] Cardon G, Höhmans S, Klein J, et al. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes[J]. Gene, 1999, 237(1): 91-104.