

高粱可溶性酸性转化酶基因(*SAI-1*) PCR 克隆方法

钟海丽, 聂元冬, 王 智, 顿宝庆, 李桂英

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

摘要:可溶性酸性转化酶(SAI)是蔗糖代谢途径中的关键酶,对植物生长发育起着至关重要的调节作用,研究简捷快速克隆可溶性酸性转化酶基因方法,对于育种材料和品种资源的基因分型具有重要意义。本研究通过已知的高粱可溶性酸性转化酶基因序列及高粱基因组中该基因序列片段,设计引物,比较了分段克隆、基因全长克隆、巢式 PCR 克隆等方法克隆高粱 *SAI-1* 基因的效果,结果表明,直接扩增全长,扩增产物极其不稳定且扩增产物纯化、连接,转化后得不到阳性克隆;采用均等分段克隆,前半段扩增产物纯化、连接转化后得不到阳性克隆,但后半段克隆成功;针对高粱基因组信息中 *SAI-1* 基因上游的未知序列部分设计引物,进行单独克隆(635 bp),再单独克隆其其余序列,两段序列拼接后得到 *SAI-1* 基因全长。序列分析发现,*SAI-1* 前段 635 bp 的扩增片段 GC 含量高达 69.6%,而其后 GC 含量急剧下降至 30% 以下,所以推测全长克隆、均等片段克隆以及巢式 PCR 克隆失败的原因可能是 *SAI-1* 基因中 GC 分布不均匀,克隆高粱 *SAI-1* 基因较为适宜的方法为利用 2 对引物进行不均等分段扩增克隆,前段 PCR 退火温度较后段高 1 °C。该方法将其他研究人员提供有益参考。

关键词:高粱;可溶性酸性转化酶;PCR 克隆方法

Modified Method for PCR Cloning of Soluble Acid Invertase Gene in *Sorghum bicolor*

ZHONG Hai-li, NIE Yuan-dong, WANG Zhi, DUN Bao-qing, LI Gui-ying

(The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/ Institute of Crop Sciences,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Soluble acid invertase (SAI) is a key enzyme in sucrose metabolism which takes a pivotal role in sugar sensing and plant development. It is necessary to find a simple method of cloning soluble acid invertase gene for genotyping a large quantity of breeding materials or germplasm. Based on known full-length sequence of *SAI* gene obtained by 5 segments PCRs and assembled in our lab, in order to further find a simpler one, we tried several strategies, i. e. one time cloning for full-length sequence, nested PCR, two even fragments PCR, and two uneven fragments PCR. And only was success achieved in two uneven fragments PCRs with a set of special PCR parameters. Sequence analysis showed bases of GC was strongly unevenly distributed in *SAI-1* gene sequence, with a high GC content (69.6%) in 635 bp PCR product of the first fragment, with highest over 80% in some region of this segment. Except for high GC content, steep change of GC content may be another factor that affects PCR result. The suitable strategy for PCR cloning *SAI-1* gene is through an approach of two uneven segments PCR with an annealing temperature difference.

Key words: *Sorghum bicolor*; soluble acid invertase; gene cloning strategy

收稿日期:2015-02-12 修回日期:2015-04-09 网络出版日期:2015-12-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151209.0904.006.html>

基金项目:中国农业科学院科技创新工程

第一作者研究方向为高粱分子育种。E-mail: zhonghaili123456@163.com

通信作者:李桂英,研究方向为能源高粱种质创新与分子育种。E-mail: liguiying@caas.cn

高粱是一种抗逆性强、产量潜力大的高光效 C4 作物,具有粮食、饲料、能源等多种用途,在干旱半干旱中低产地区发挥重要作用^[1-3]。蔗糖代谢是植物最重要的代谢之一,在糖感知和生长发育中发挥重要作用^[4-5],而转化酶(invertase)是蔗糖代谢的关键调节酶^[6-9],是一类家族蛋白,根据其亚细胞定位可以分为细胞壁 Inv、液泡 Inv 和细胞质 Inv;根据其水溶性可分为可溶性 Inv 和不溶性 Inv 两类;根据其最适 pH 可分成酸性 Inv 和中性/碱性 Inv 两类^[6],一般来说,液泡 Inv 通常就是指可溶性酸性转化酶(SAI, soluble acid invertase)。研究表明,不同作物 SAI 的基因数目是不同的。在番茄中,编码 SAI 的基因只有 1 个,为 *TlVI*^[10]。在马铃薯中,编码液泡 Inv 的基因也有 1 个,为 *PA111*^[11]。而在胡萝卜中编码液泡 SAI 的基因有 2 个,为 *SI* 和 *SH*^[12]。在拟南芥中编码 SAI 的基因也有 2 个,分别为 *Atβfruct3* 和 *Atβfruct4*^[13]。本课题组的研究表明,在甜高粱中,编码 SAI 的基因可能只有 1 个,为 *SAI-1*^[14-15]。甜高粱中,SAI 酶活性与蔗糖的相关性高于 NI、SPS 和 SS^[16]。

随着基因工程及分子生物学的发展,基因克隆的方法越来越多样化,基因克隆方法主要有筛选文库克隆、功能克隆、PCR 扩增、定位克隆、差别杂交和减法杂交等多种方法^[17-19]。随着越来越多基因的克隆和植物基因组的测序,使得同源 PCR 克隆成为一种快速、简便克隆植物基因的方法,其在功能标记开发中发挥了重要作用^[20-21]。刘洋^[22]在高粱基因组测序公布之前利用同源 PCR 克隆技术克隆了 *SAI-1* 基因大部分片段。后与高粱基因组比对发现,已克隆 *SAI-1* 基因片段之前恰好是一段序列空白。之后在空白片段两端设计引物,改变 PCR 参数,克隆出这段空白片段^[15],同时采用 RT-PCR 克隆了该基因的 cDNA 全长^[23]。但由于该基因全长是分成 5 段克隆测序后拼接而成,要克隆更多高粱材料的 *SAI-1* 基因,这种方法显然不合适,需要找到一种更为简便的方法,为研究高粱 *SAI-1* 基因优异单体型发掘和分子育种、种质创新提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为甜高粱品种 MN-3466,为本课题组保存。2013 年 5 月于中国农业科学院作物科学研究所昌平试验基地播种。出苗 3 周后剪取植株幼

叶,置于冰盒内带回,于 -80 ℃ 超低温冰箱内保存,用于基因组 DNA 的提取。

KOD-FX DNA 聚合酶购于 TOYOBO 公司, AxyPrep PCR 清洁试剂盒购于 AXYGEn,胶回收试剂盒购于 QIAGEN 公司,零背景快速连接试剂盒、DH5α 大肠杆菌感受态细胞购于天根生化科技(北京)有限公司,质粒提取试剂盒 Axy Prep™ Plasmid Miniprep Kit 购自 AXYGEn 公司,其他试剂均为进口或国产分析纯试剂,引物合成与测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 甜高粱基因组 DNA 的提取

甜高粱叶片基因组 DNA 提取方法采用 CTAB 法,利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测提取 DNA 的质量和浓度。

1.3 PCR 克隆策略及其引物的设计

采用分段克隆(均等分段,不均等分段)、基因全长克隆、巢式 PCR 等克隆方法。根据 GenBank 登记的已克隆的甜高粱 *SAI-1* 基因(GenBank accession no. JX535517)及其在高粱基因组中的位置获得 *SAI-1* 基因序列及其两端序列,并根据该序列设计 2 对全长引物 SAI1-F、SAI1-R 和 SAI2-F、SAI2-R,其中引物 SAI1-F、SAI1-R 所扩增的片段位于引物 SAI2-F、SAI2-R 所扩增的片段内;均等分段克隆:设计 2 对引物即 SAIF-F、SAIF-R 和 SAIL-F、SAIL-R,将 *SAI-1* 基因分为 2 个长度约相等的片段进行扩增,2 个片段间含有 168 bp 的重叠,拼接可得到 *SAI-1* 基因全长。不均等分段克隆:高粱基因组测序已完成,但公布的基因组序列中,*SAI-1* 基因上游有一段未知序列,推测该段较难克隆,根据该未知序列两端序列设计引物 SAIA-F、SAIA-R 扩增该片段,根据 *SAI-1* 基因序列设计引物 SAIP-F、SAIP-R 扩增其后面的已知片段,两片段间有 78 bp 的重叠,拼接可得到 *SAI-1* 基因全长。引物信息见表 1,引物在基因中位置见图 1。

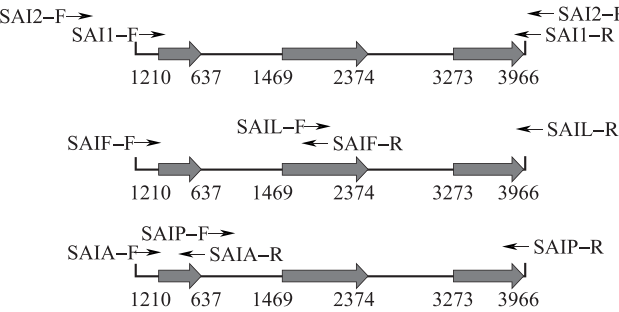
1.4 基因克隆

1.4.1 *SAI-1* 基因全长克隆 用 SAI1-F、SAI1-R 作引物,以甜高粱品种 MN-3466 基因组 DNA 为模板扩增 *SAI-1* 基因全长,PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 4 min,30 个循环,68 ℃ 延伸 10 min。反应的总体积 50 μL,其中 2 × PCR Buffer for KOD FX 25 μL, dNTPs(2 mmol/L) 10 μL, ddH₂O 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1.5 μL, KOD FX 1 μL, DNA 模板 1 μL。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,产物回收参考 QIAGEN 的

表 1 引物序列信息

Table1 Information of primers used

引物名称	用途	引物序列(5'-3')
Primer name	Use	Primer sequence(5'-3')
SAI1-F	全长克隆	CCTCCCATCCTTGATTCTCTT
SAI1-R		GAGGGAAGCGAGGATATGAAT
SAI2-F		TTGCGGTTTGTCTTTCA
SAI2-R		TATGTAGCCTCTTGTCTTGC
SAIF-F		CCTCCCATCCTTGATTCTCTT
SAIF-R		AGTCGATGCACTCCACATCC
SAIL-F	均等分段克隆	ACCCGTCGGACAACACCT
SAIL-R		GTAGCAATCAGAAGAAAG
SAIA-F		CCTCCCATCCTTGATTCTCTT
SAIA-R		TTGGGATCGTTATCCAGTTC
SAIP-F	不均等分段克隆	GTGGAGCAATGCGATGCTGC
SAIP-R		CAGCATCAGATGTCCGTGACC



上:全长克隆;中:均等分段克隆;下:不均等分段克隆;
箭头表示外显子,直线表示内含子

The upper:full-length clone,The middle;two even fragments PCR,
The under;two uneven fragments PCR,Solid arrows denote exons,and
the lines between them represent introns

图 1 不同克隆策略引物位置

Fig.1 Sites that primers located in different clone strategies

QIAEX® Gel Extraction Kit 说明书。回收产物与克隆载体连接,并转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,参考天根零背景快速连接试剂盒说明书。在含 Amp (60 μg/mL)的 LB 琼脂平板培养基上过夜培养,菌落 PCR 鉴定,将 3 个阳性单菌落接种于液体 LB (Amp: 60 μg/mL)培养基中过夜培养,提取质粒测序。

1.4.2 巢式克隆 *SAI-1* 基因 用 SAI2-F、SAI2-R 作引物,以甜高粱 MN-3466 基因组 DNA 为模板扩增 *SAI-1* 基因全长,PCR 扩增程序 94 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s,51 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 5 min,30 个循环,68 ℃ 延伸 10 min。利用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒将 PCR 产物进行纯化,以纯化后的 PCR 产物作为模板,再用第 1 对全长引物即 SAI1-F、SAI1-R 进行二轮 PCR 扩增,PCR 扩增程序、PCR 扩增体系、产物回

收及克隆方法参考 1.4.1 中 *SAI-1* 基因全长克隆。

1.4.3 均等分段法克隆 *SAI-1* 基因 分别以 SAIF-F、SAIF-R 和 SAIL-F、SAIL-R 作引物,以甜高粱 MN-3466 基因组 DNA 为模板扩增 *SAI-1* 基因前半段及后半段,前半段 PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s,64 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 2 min,30 个循环,68 ℃ 延伸 10 min。后半段 PCR 扩增程序与前半段相同。PCR 扩增体系、产物回收及克隆方法参考 *SAI-1* 基因全长的克隆。

1.4.4 不均等分段克隆 *SAI-1* 基因 用 SAIA-F、SAIA-R 作引物,以甜高粱 MN-3466 基因组 DNA 为模板扩增基因组序列中未知的序列,扩增程序: 94 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 10 s,61 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 30 s,30 个循环,68 ℃ 延伸 10 min。扩增体系参考 1.4.1,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,产物回收参考 AXYGEn 的 AxyPrep PCR 清洁试剂盒说明书。用 SAIP-F、SAIP-R 作引物,以甜高粱 MN-3466 基因组 DNA 为模板扩增基因组中未知片段之后的序列,扩增程序:94 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 3 min30 s,30 个循环,68 ℃ 延伸 10 min。产物回收参考 QIAEX® || Gel Extraction Kit 说明书。克隆方法参考 *SAI-1* 基因全长克隆。

2 结果与分析

2.1 甜高粱幼叶基因组 DNA 的提取

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取基因组 DNA,结果显示带型清晰完整,紫外分光光度计检测浓度显示质量浓度均大于 300 ng/μL,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8 左右。

2.2 *SAI-1* 基因全长克隆

使用全长克隆引物 SAI1-F、SAI1-R 对基因组中 *SAI-1* 基因进行扩增,结果发现 PCR 稳定性较差,调整扩增程序扩增效果仍难于改善,1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示目标条带相对较暗(图 2),胶回收、连接转化后,单菌落鉴定无阳性克隆。之后又设计了几对引物进行克隆仍未获得阳性克隆。

2.3 巢式 PCR 克隆 *SAI-1* 基因全长

用 SAI2-F、SAI2-R 作引物,以甜高粱基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经 PCR 产物纯化后再作为模板,用引物 SAI1-F、SAI1-R 进行 PCR 扩增,即对 *SAI-1* 基因进行巢式 PCR 扩增。1% 琼脂糖凝胶电泳显示引物 SAI2-F、SAI2-R 有扩增条带(图 3),以纯化的产物为模板,用引物 SAI1-F、SAI1-

R 对其扩增不能产生目标条带。巢式 PCR 未能成功,引物 SAI2-F 和 SAI2-R 扩增的产物可能不是 *SAI-1* 基因片段。

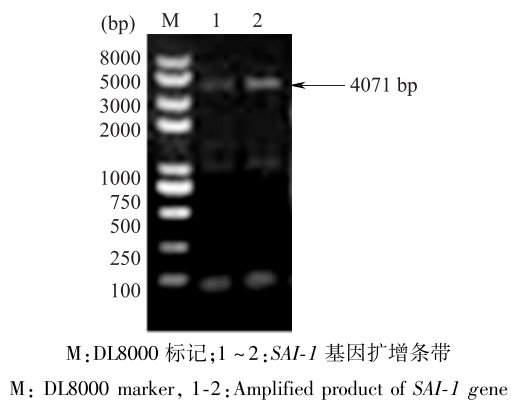


图2 *SAI-1* 基因全长扩增结果

Fig.2 PCR profile with full-length clone primers

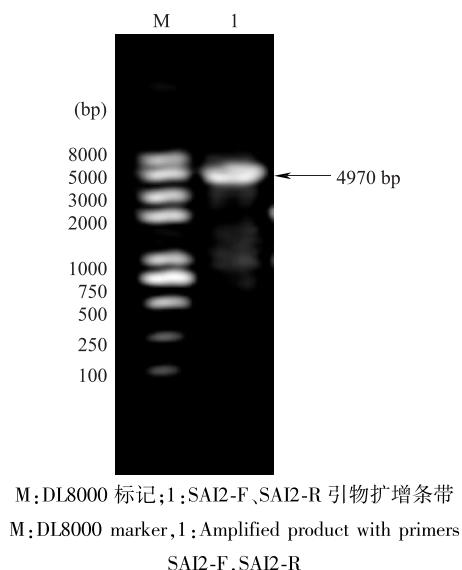


图3 用引物 SAI2-F、SAI2-R 扩增 *SAI-1* 全长

Fig.3 Profile of PCR amplification with primers SAI2-F and SAI2-R

2.4 均等分段克隆 *SAI-1* 基因

分别用 SAIF-F、SAIF-R 和 SAIL-F、SAIL-R 两对引物,以甜高粱 MN-3466 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测均能获得较为单一清晰的条带(图4),但对于 SAIF-F、SAIF-R 扩增产物进行 PCR 产物胶回收并将产物和克隆载体连接克隆后未得到阳性克隆(图5)。虽经多次设计前半段引物对其进行克隆,均未能克隆成功。SAIL-F、SAIL-R 扩增产物进行胶回收并将产物和克隆载体连接克隆后可以得到阳性克隆(图6),挑取阳性菌落过夜培养,提取质粒,送测序,经序列比对,证明该扩增产物为目标序列。

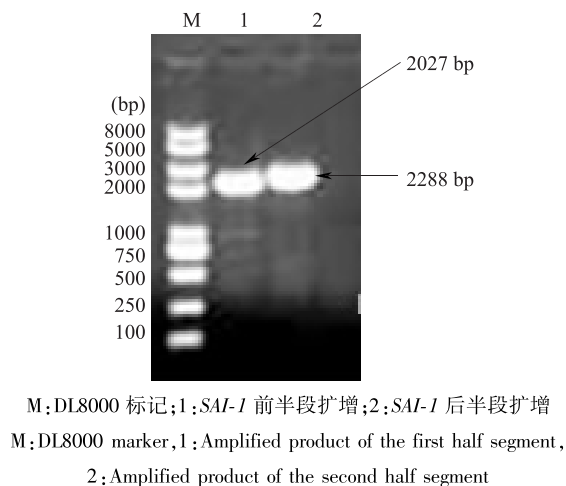


图4 *SAI-1* 基因均段扩增

Fig.4 PCR profile of the two halves of *SAI-1* gene sequence

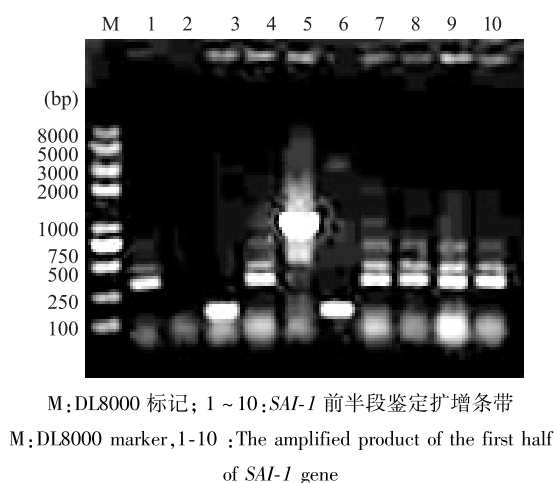


图5 *SAI-1* 前半段克隆鉴定

Fig.5 Profile of PCR of the first half of *SAI-1* gene

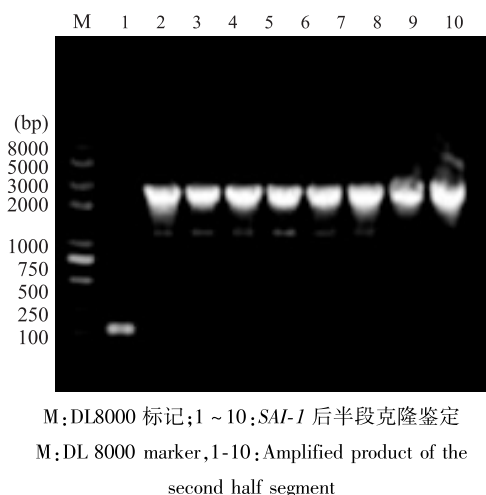


图6 *SAI-1* 后半段克隆鉴定

Fig.6 PCR profile of the second half segment of *SAI-1* gene

2.5 不均分克隆与序列分析

用 SAIA-F 和 SAIA-R 作引物,以甜高粱品种 MN-3466 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可以得到较为单一的条带(图 7),对扩增产物进行 PCR 产物纯化回收,并与克隆载体连接、转化、鉴定(图 8),挑取阳性克隆菌落过夜培养,提取质粒进行测序。利用 SAIP-F、SAIP-R 为引物,以甜高粱品种 MN-3466 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可以获得正确大小的条带,但是有杂带(图 9)。扩增产物进行切胶回收并与克隆载体连接、转化、鉴定(图 10),挑取阳性克隆菌落过夜培养,提取质粒进行测序。测序得到的序列比对验证,克隆结果均为 *SAI-1* 基因序列。

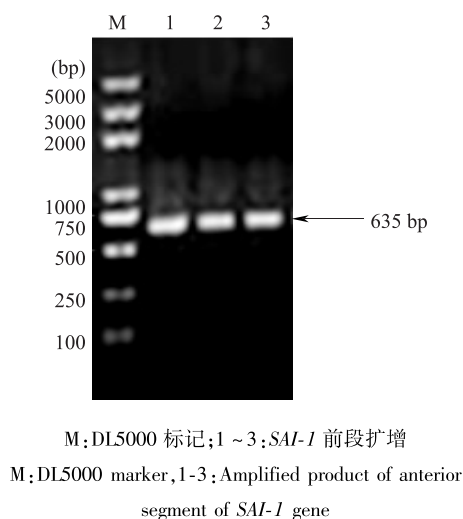


图 7 用 SAIA-F 和 SAIA-R 引物对 *SAI-1* 基因前段扩增

Fig. 7 PCR profile of upstream segment of *SAI-1* gene

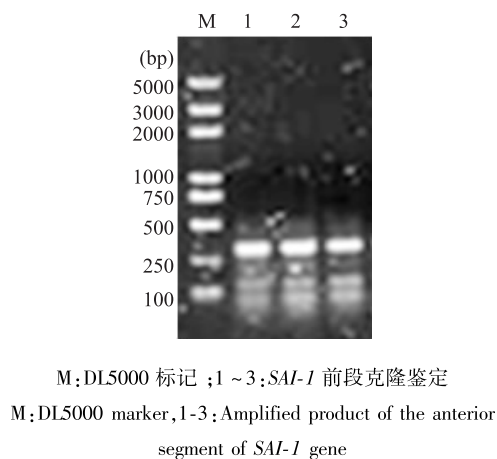


图 8 *SAI-1* 基因前段克隆鉴定

Fig. 8 PCR profile of anterior segment of *SAI-1* gene

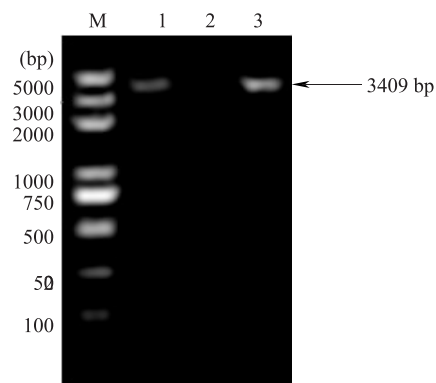


图 9 *SAI-1* 后段扩增

Fig. 9 Profile of posterior segment of *SAI-1* gene

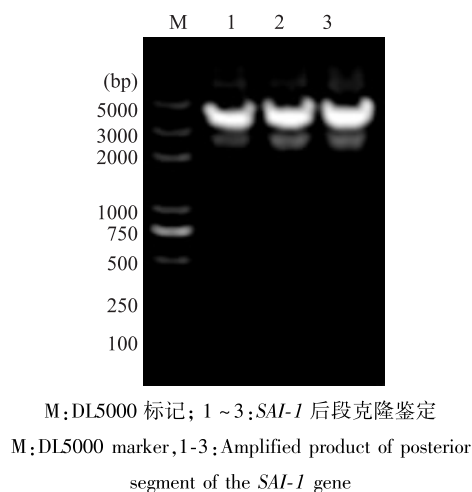


图 10 *SAI-1* 后段克隆鉴定

Fig. 10 Profile of posterior segment of *SAI-1* gene

引物 SAIA-F、SAIA-R 扩增 *SAI-1* 基因所得到的片段长度约为 635 bp,与预测大小一致,而与克隆载体连接、转化后,鉴定发现均为 300 bp 左右,挑 3 个菌落进行培养、提质粒测序,结果均正确。推测有可能是形成了高级结构或者错配。

经测序,用引物 SAIA-F、SAIA-R 扩增克隆的前段序列长 635 bp,用 SAIP-F、SAIP-R 扩增克隆的后段序列长 3408 bp。前段扩增序列 635 bp 的碱基组成为:腺嘌呤 A 13.86%,鸟嘌呤 G 32.28%,胸腺嘧啶 T 16.54%,胞嘧啶 C 37.32%, A + T 30.39%, C + G 69.61%,属于富含 GC 片段。后段扩增片段 3408 bp 的碱基组成为: A 22.68%, G 23.36%, T 24.79%, C 29.17%, GC 合计 52.52%。高粱 *SAI-1* 基因序列全长 3965 bp,其碱基组成为: A 21.19%, G 24.69%, T 23.63%, C 30.49%,其中 C + G 55.18%。

经过与已经公布的高粱基因组序列(GenBank Ac-

cession NC_012873.1) 比对发现,基因组中所缺失的实际片段长 450 bp,位于高粱 MN-3466 *SAI-1* 基因的 545 ~ 994 bp 之间,其 C + G 比例 43.11% 偏低。将两片段序列拼接,得到 *SAI-1* 基因的全长,共 3965 bp,与已经克隆的 *SAI-1* 基因序列 (GenBank Accession JX535516.1) 相似性 99.3%,证明该序列正确。之后,本课题组利用不均等克隆对 136 份高粱材料的 *SAI-1* 基因进行了克隆,进一步证明该方法可行。

为进一步了解克隆的 *SAI-1* 基因 GC 分布,对每 100 bp DNA 序列的 GC 含量进行统计 (图 11)。由图可知,*SAI-1* 基因 GC 的分布不平衡,外显子序列 GC 含量普遍较高,最高处可达 80% 以上,而内含子区,GC 含量普遍较低,最低 30% 以下。一些区段 GC 含量急剧波动,比如 301 ~ 1100 bp,GC 含量从 301 ~ 600 bp 的 73% ~ 81%,急剧降到 601 ~ 1100 bp 的 37% ~ 44%。这种 GC 含量剧烈波动可能是导致克隆较为困难的原因之一。

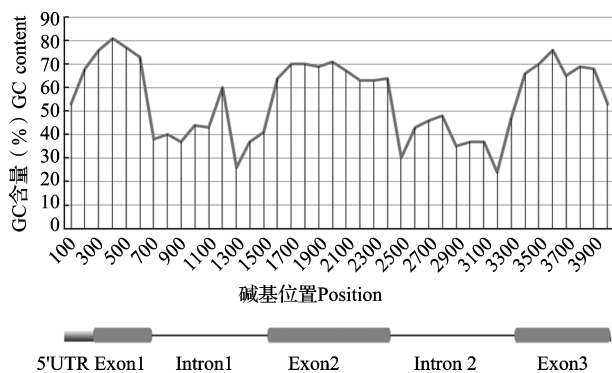


图 11 *SAI-1* 基因序列 GC 含量分布图

Fig. 11 Distribution of GC content of *SAI-1* gene sequence

3 讨论与结论

随着分子生物学、遗传学及生物信息学等学科的发展,基因克隆的方法越来越多样化,基因克隆技术愈加完善。目前基因的识别和克隆主要基于基因组水平、转录组水平和蛋白质水平。基于基因组水平的克隆方法有图位克隆法、转座子标签法、同源序列法等,基于转录组水平的克隆方法主要有减法杂交、mRNA 差异显示等,基于蛋白质水平的克隆方法有功能克隆、酵母单杂交系统等。各种克隆方法各有利弊,应根据具体条件选择合适的克隆方法。目前已克隆的植物可溶性酸性转化酶基因多采用电子克隆的方法,与传统方法相比,具有效率高、技术要求低、操作简单、成本低等特点^[17]。

基因序列扩增克隆是研究基因功能、标记开发

等一系列研究的第一步。虽然各种类型 PCR 技术的基本反应原理都大致相同,但在实践中会遇到难以扩增的 DNA 目标序列,尤其相对于非高 GC 含量 DNA 序列而言,高 GC 含量 DNA 序列的 PCR 扩增更是困难^[24]。对近 50 份高粱属材料重测序的序列^[25]进行人工拼接发现,几乎所有的重测序数据,都不能拼成完整 *SAI-1* 基因序列,在第 1 外显子和第 3 外显子区域高 GC 区未能完整测序。

当遇到难以扩增的情况时,研究者多是不不断改变条件摸索,成功后,论文中往往只描述成功的方法,失败总结较少,使得研究人员,特别是初学者在此环节摸索时间较长。

本研究的 *SAI-1* 基因 GC 分布极不均匀,有的区段 GC 含量高达 80% 以上,而有的区段 GC 含量却不到 30%。随着研究的不断深入,高 GC 序列的克隆已经不再是特别困难的事情,市场上已有不少针对 GC 含量 PCR 的专用试剂盒。本研究中,*SAI-1* 基因前段 635 bp,GC 含量高达 69.6%,其中部分小片段 GC 甚至高达 80% 以上,但经过参数优化,使 PCR 扩增变得比较简单。

通过对各种扩增方法的尝试,本研究认为高 GC 含量虽是造成 PCR 困难的重要原因之一,但 GC 分布的巨大波动性可能是影响 PCR 更重要的因素。在此情况下,分段 PCR 扩增可能是比较理想的选择。通过探索不同 PCR 扩增策略,认为克隆高粱 *SAI-1* 基因较为适宜的方法为利用 2 对引物进行不均等分段扩增克隆,前段 PCR 退火温度较后段高 1 °C,这将为其他研究人员提供有益参考。

参考文献

- [1] 山仑,徐炳成. 论高粱的抗旱性及在旱区农业中的地位[J]. 中国农业科学,2009,42(7):2342-2348
- [2] Gao S J, Wang Y, Li G Y. Sorghum breeding and production in China[M]// He Z H, Bonjean A P A. Cereals in China, Mexico: CIMMYT, 2010:97-108
- [3] Stefaniak T R, Rooney W L. Chapter 6 Breeding sorghum as a bioenergy crop[M]// Bioenergy Feedstocks: Breeding and Genetics, Wiley-Blackwell, 2013:83-116
- [4] Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development[J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(3):235-246
- [5] Ruan Y L. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. Ann Rev Plant Biol, 2014, 65:33-67
- [6] Sturm A, Tang G Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning[J]. Trend Plant Sci, 1999, 4(10):401-407
- [7] Barratt D H P, Derbyshire P, Findlay K, et al. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase[J]. PNAS, 2009, 106(31):13124-13129

(下转 188 页)