

# 香蕉泛素结合酶基因与果实成熟关系的研究

王 园<sup>2</sup>, 王甲水<sup>2</sup>, 谢学立<sup>1,2</sup>, 雷晓明<sup>3</sup>, 金志强<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国热带农业科学院海口实验站, 香蕉研究所, 海口 571101; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带生物技术重点开放实验室, 海口 571101; <sup>3</sup>宝鸡职业技术学院, 陕西宝鸡 720213)

**摘 要:** 根据香蕉果实采后早期成熟的抑制缩减杂交文库获得的香蕉泛素结合酶基因片段, 从香蕉 (*Musa acuminata* L. AAA group ‘Brazilian’) 果实中克隆了泛素结合酶基因的 cDNA 全长, 命名为 *MaUCE1*。该 cDNA 全长 890 bp, 编码 152 个氨基酸。BlastX 分析表明, 该基因所推导的氨基酸序列与烟草(BAB40310)、小麦(AAA34310)、拟南芥(L19351)和马铃薯(ABA46759)有较高的一致性(95.39%、95.39%、92.11%和 90.79%), 并且结构域分析发现该序列具有泛素结合酶 E2 的酶活性中心部位和一个与其他真核生物泛素 E2 酶相同, 在泛素 E2 硫酯键形成中具有催化活性, 并在进化上高度保守的半胱氨酸残基。该基因在香蕉根、茎、叶、花、果实中均有表达, 但在花和果实中的表达量较高, 并且在果实成熟后期表达量升高, 与淀粉磷酸化酶活性变化一致, 与淀粉含量的变化呈负相关, 暗示该基因可能参与香蕉果实成熟过程中的分解代谢, 而与果实成熟启动无关。

**关键词:** 香蕉; 泛素结合酶; 基因; 克隆; 表达分析; 实时定量 PCR; 果实成熟

**中图分类号:** S 668.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 05-0705-08

## Studies of The Relationship Between *MaUCE1* and Banana Fruit Ripening

WANG Yuan<sup>2</sup>, WANG Jia-shui<sup>2</sup>, XIE Xue-li<sup>1,2</sup>, LEI Xiao-ming<sup>3</sup>, and JIN Zhi-qiang<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>Haikou Experimental Station, Banana Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, China; <sup>3</sup>Baoji Vocational and Technical College, Baoji, Shaanxi 720213, China)

**Abstract:** A *UCE* gene, encoding ubiquitin conjugating enzyme was isolated from banana fruit (*Musa acuminata* L. AAA group ‘Brazilian’) and designated *MaUCE1*. The full length of *MaUCE1* cDNA is 890 bp encoding 152 amino acids that shared high identities with the *UCE* from *Nicotiana tabacum*, *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana* (95.39%, 95.39%, 92.11% and 90.79%). Amino acid alignment indicated *MaUCE1* exists an enzyme activity site of E2 and a conserved cysteine, which is considered to catalyze formation of thioester bond. RT-PCR analysis showed that *MaUCE1* is ubiquitously expressed in roots, stems, leaves, flowers and fruits, but the expression level is higher in fruit and flower than those of other organs. During the process of banana fruit postharvest ripening, the mRNA accumulation of *MaUCE1* increased in evening of fruit ripening, which is in line with the change of starch phosphorylase activity but negative correlated with change of starch content in this period, suggesting that

**收稿日期:** 2009 - 10 - 19; **修回日期:** 2010 - 04 - 12

**基金项目:** 国家现代农业产业技术体系建设专项项目 (nycytx-33); 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-029); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (ITBBZB0733)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhiqiangjin2001@yahoo.com.cn)

*MaUCE1* might involve in the catabolism during the process of banana ripening, rather than trigger the fruit ripening.

**Key words:** banana; ubiquitin conjugating enzyme; gene; cloning; expression analysis; real-time quantitative PCR; ripening

泛素是含有 76 个氨基酸残基的低分子量蛋白质, 它因广泛存在于各种真核细胞和组织中, 在维持生物的正常生命活动中起着非常重要的作用 (Viestra, 1993)。在泛素化途径中, 泛素与靶蛋白的结合需要 3 种酶的参与, 即 E1、E2、E3。泛素激活酶 E1 (ubiquitin-activating enzymes) 能够利用在泛素 C-末端的甘氨酸羧基与它自身的半胱氨酸巯基间形成高能硫酯键。激活的泛素被转移到 E2 (ubiquitin conjugating enzyme, UCE) 的半胱氨酸巯基上。在某些情况下, 泛素再被转移到泛素蛋白质连接酶 E3 (ubiquitin-protein ligase) 上, 进而与被 E3 所识别的蛋白质底物的赖氨酸  $\epsilon$ -氨基形成异肽键。

细胞内有多种 E2 基因, 大多数 E2 有一个 14~16 kD 的核心, 这一区域可能参与 E2 和 E3 的结合, 调控不同的生命活动 (Pickart, 2001)。高等植物中的 UCE 大部分都参与依赖于泛素途径的胞内蛋白的降解, 水稻中的 RE2 被证明属于这一类, 但通过间接途径参与紫外线损伤的防御和 DNA 的修复 (Peng et al., 2003)。另外, 水稻中的一个 UCE 被证明参与赤霉素 GA 诱导的  $\alpha$ -淀粉酶的表达 (Chen et al., 1995)。Steve 等 (1993) 在番茄中首次发现一个 UCE, 认为它与果实的成熟和叶片的衰老有密切关系。而在拟南芥中, 泛素结合酶基因是以 32 个成员的基因家族形式存在, 可被分为几大亚类, 说明其参与的生命活动途径是复杂多样的 (Andreas et al., 2001)。

Xu 等 (2007) 采用抑制缩减杂交方法分离了在香蕉采后成熟早期差异表达的低丰度 cDNA 序列。BlastX 结果显示, 其中有一个 463 bp 的片段与其他物种的 UCE 基因序列相似。作者推测该基因可能与调控果实成熟衰老过程有关。本研究中通过 RACE 技术, 获得了 *MaUCE1* 全长, 通过研究该基因在果实采后成熟过程中的表达特征及其与果实中淀粉含量及淀粉磷酸化酶活性变化的关系, 探讨 *MaUCE1* 与果实成熟的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

香蕉 (*Musa acuminata* L. AAA group 'Brazilian') 根、茎、叶、花、果实 (开花后 120 d) 均采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所香蕉种植园 (海南文昌)。将采收的根、球茎、叶、花用无菌水清洗并用 0.1% 的次氯酸钠表面消毒, 立即在液氮中冷冻。将采收的香蕉果实切割成单果指, 清洗并表面消毒, 放入 22 °C 恒温箱正常后熟。处理当天即为采后 0 d, 每 2 d 取材测定乙烯释放速率, 同时将样品切割成块并立即用液氮冷冻, 放入 -70 °C 冰箱中保存, 用于 RNA 的提取及相关生理指标的测定。

### 1.2 香蕉根、茎、叶、花、果实 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

按照 Wan 和 Wilkins (1994) 的方法, 从香蕉根、茎、叶、花和采后不同时间的果实中提取总 RNA。每个样品取 4  $\mu$ g RNA, 经 Invitrogen SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第 1 链。

### 1.3 *MaUCE1* cDNA 克隆

根据 SSH 文库所获得的该基因片段设计 5'-RACE 引物: 5'-CGAGTTGGGATTAAGATCACAG-3'

和 3'-RACE 引物: ACACCTTGGGATGGAGGAACGTT。根据拼接序列设计 2 条引物克隆该基因全长: 5'引物: 5'-CCGGGGGCTCTTCGTCGTTCCCG-3'; 3'引物: 5'-GGCAAACCAGCAAGGGGAAAA TGT-3'。以香蕉采后正常后熟 14 d 的 RNA 反转录的 cDNA 第 1 链为模板, 利用 RACE 技术克隆 cDNA 的 5'和 3'端, 通过序列比对和拼接得到基因全长序列。再根据拼接序列设计两条引物, 从香蕉果实正常后熟 14 d 的 cDNA 第 1 链模板中克隆该基因全长。

#### 1.4 *MaUCE1* 在香蕉不同器官的表达分析

以香蕉根、茎、叶、花和果实采后 0 d 的 cDNA 为模板, 选用 NCBI 上已登录的香蕉 *MaActin 1* 片段为内参, 采用 RT-PCR 方法对其进行器官特异性表达分析。*MaActin 1* 引物为 P1 (5'-CGAGGCT CAATCAAAGA-3') 和 P2 (5'-ACCAGCAAGGTCCAAAC-3')。

#### 1.5 PCR检测*MaUCE1* 在香蕉采后不同时间的表达

实时定量 PCR 采用 TaRaKa 公司试剂盒, 染料为 SYBR Green, 在吉泰生物科技有限公司 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪上进行。以香蕉 *MaActin 1* 片段为内标。以香蕉果实采后不同成熟阶段的 cDNA 第 1 链为模板, 所用的 *MaActin 1* 引物同上; *MaUCE1* 引物为 P3 (5'-CACACGGGGAGAGAAATGGT GC-3') 和 P4 (5'-GCTAGATATGAGTAAGTCAACAGC-3')。PCR 产物的长度为 152 bp。荧光定量 PCR 的反应程序如下: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 7 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 循环 40 次。每个反应重复 3 次。

#### 1.6 香蕉果实采后乙烯释放速率的测定

选取采后正常后熟 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 d 的香蕉果实, 每个样品 3 个果指, 利用气相色谱仪测定乙烯释放量, 每个样品重复测定 3 次。测定前, 将果实放入密封罐中 3 h, 用 1 mL 注射器抽出气体, 每罐抽 3 针, 用日本岛津 GC17A 型气相色谱仪测定果实乙烯释放量, 计算乙烯释放速率。气相色谱的工作条件为: 火焰离子化检测器 (FID), 载体为 60~80 目  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 柱温 90 °C, 进样温度 100 °C, 载气为  $\text{N}_2$ , 流速为  $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

#### 1.7 果实采后淀粉含量的测定

参照徐昌杰等 (1998) 的方法, 取 0.5 g 香蕉果肉, 用 5 mL 80% 乙醇研磨, 转入离心管离心, 残渣 8 mL 用 80%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  溶液悬浮后在沸水中温浴 10 min, 离心后将上清液转入 25 mL 容量瓶中, 残渣用 80%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  溶液重复提取 2 次, 合并提取液, 定容至 25 mL。取淀粉样品 1.8 mL 加入 0.2 mL  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碘—碘化钾, 摇匀, 于 620 nm 下测定光吸收值。每个样品重复 3 次。

#### 1.8 采后香蕉果实淀粉磷酸化酶活性的测定

淀粉磷酸化酶活性测定参照王岳浩 (1999) 的方法, 测定淀粉磷酸化酶的活性, 酶活性单位 (U) 定义为: 在 30 °C、pH 5.8 条件下, 以 1 mg 酶蛋白在 10 min 内反应生成无机磷的  $\mu\text{g}$  数。用考马斯亮蓝 G-250 法测定酶蛋白。每个样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MaUCE1* cDNA 克隆与序列分析

以 SSH 文库 1 个 463 bp cDNA 片段为基础设计合成了用于 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增的引物。

将香蕉采后正常成熟 14 d 的 RNA 反转录的 cDNA 第 1 链作为模板, 进行 PCR 扩增。测序结果表明, 两扩增片段分别为 661 bp 和 603 bp, 两序列拼接后, 通过 ORF Finder 和 GENSCAN 软件分析表明该 cDNA 序列有一个完整的 ORF, 是一个全长基因, 编码 152 个氨基酸。随后, 设计两条引物, 从正常成熟 14 d 的 RNA 反转录的 cDNA 第 1 链模板中克隆到 890 bp 的基因全长。核酸序列比较表明, *MaUCE1* cDNA 与马铃薯 (DQ294271) 和紫花苜蓿 (L06967) 有较高的一致性, 分别为 88.5% 和 82.21%。

## 2.2 *MaUCE1* 推导的氨基酸序列比较与分子进化分析

BlastX 分析表明, *MaUCE1* cDNA 推导的氨基酸序列与烟草 (BAB40310)、小麦 (AAA34310)、拟南芥 (L19351) 和马铃薯 (ABA46759) 有较高的一致性, 分别为 95.39%、95.39%、92.11% 和 90.79%。

用 Scanprosite 对结构域预测并进行多序列比对 (图 1) 发现, *MaUCE1* cDNA 推导的氨基酸序列有一个保守结构域, 即位于氨基酸残基序列 77~92 残基部位的 15 个氨基酸 (FHPNIYADGSICLDIL),

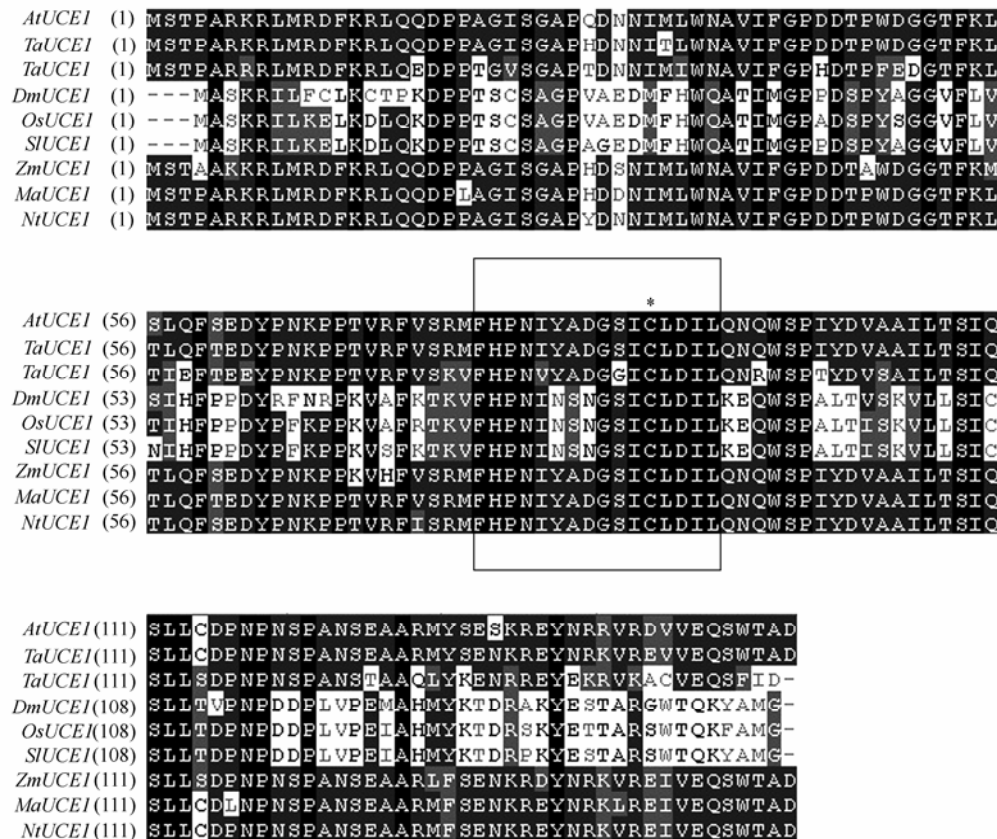


图 1 *MaUCE1* 编码氨基酸序列的多序列比较

划线区域: 酶活性区域; \*: 酶活性中心位点。

Fig. 1 Multiple sequence alignment of *MaUCE1* putative amino acid sequence

Region underlined: Enzyme activity region; \*: Enzyme activity site.

是泛素结合酶 E2I 型的酶活性中心部位, 在物种间较为保守 (Yann et al., 2002)。另外, 在距 N 端的第 88 个残基部位, 存在一个与其他真核生物泛素 E2 相同的, 在泛素 E2 硫酯键形成中具有催化活性, 并在进化上高度保守的氨基酸残基 Cys (C) (Sullivan & Vierstra, 1989)。这个半胱氨酸残基与泛素形成高能硫酯键进而参与将泛素转移到 E3 酶或靶蛋白上的反应 (van Nocker & Vierstra, 1991)。分子进化树分析表明, *MaUCE1* cDNA 推导的氨基酸序列与小麦、毛白杨、烟草、苹果、拟南芥的进化关系较近 (图 2)。

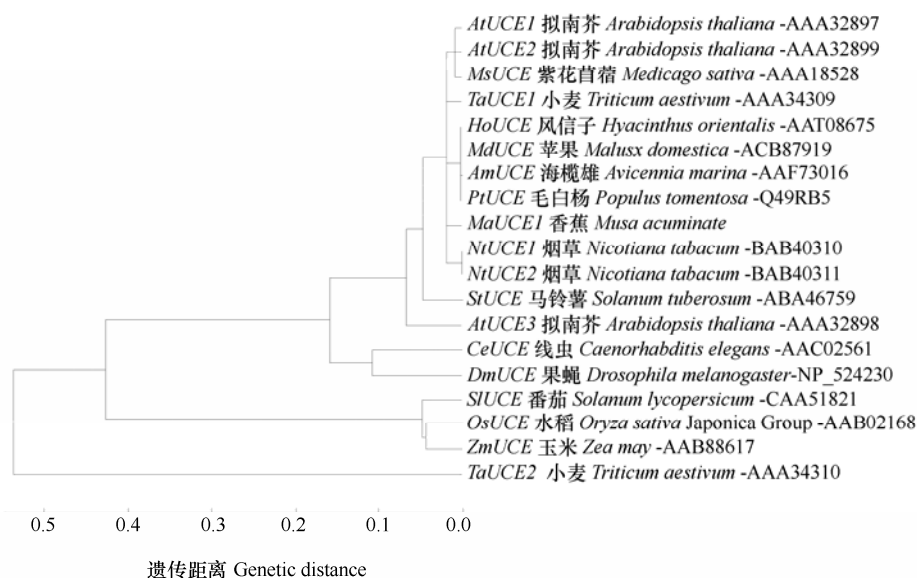


图 2 香蕉与其他生物同源的 UCE 氨基酸序列通过 Clustal W 软件构建系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree generated by Clustal W analysis of UCE amino acid sequences from banana and other organisms

### 2.3 *MaUCE1* 器官特异性表达分析

从图 3 可知, *MaUCE1* 在香蕉根、茎、叶、花、果实中均有表达。其中在花和果实中的表达量较高, 推测 *MaUCE1* 可能在许多不同的生理过程中都起着一定的作用, 与果实的发育和成熟尤为相关。

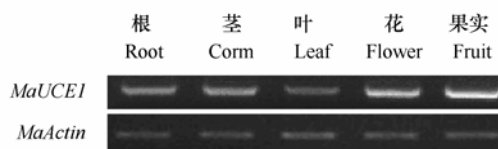


图 3 香蕉 *MaUCE1* 基因组织特异性表达

Fig. 3 Expression of *MaUCE1* in different organs

### 2.4 实时定量PCR检测*MaUCE1* 在香蕉采后不同时间的表达

从图 4 可知, *MaUCE1* 的表达在采后 0 ~ 16 d 总体表现为上升趋势。在 0 ~ 12 d 时表达量变化不明显。随着果实的成熟, 到 14 d 时 *MaUCE1* 的表达量明显增加, 直到采后 16 d 达到顶峰。采后 16 d 时的表达量约为 0 d 时的 2.5 倍。

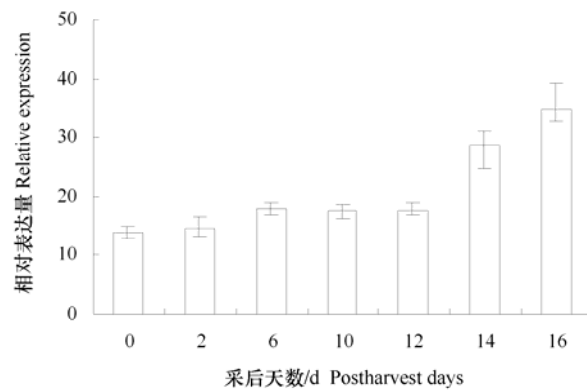


图 4 香蕉采后不同时间 *MaUCE1* 的实时荧光定量相对表达

Fig. 4 Quantitative expression of *MaUCE1* in banana fruit at different ripening stages

## 2.5 香蕉果实采后不同时间的乙烯释放速率

从图 5 可知, 香蕉果实正常成熟条件下, 采后早期乙烯释放速率较低, 变化不明显, 到了采后 10 d 乙烯释放量增加, 表明香蕉果实采后成熟过程中内源乙烯大量合成开始启动。在采后 14 d 乙烯释放量达到峰值, 约为 10 d 时的 10 倍, 14~18 d 一直下降。

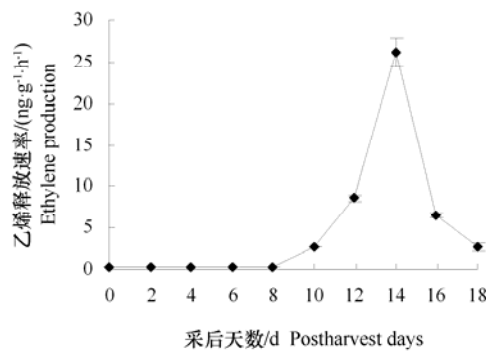


图 5 香蕉果实采后不同时间乙烯释放速率

Fig. 5 Ethylene changes in banana fruit at different ripening stage

## 2.6 香蕉果实采后不同时期果实内淀粉含量

对采后不同时期果实中的淀粉含量测定结果 (图 6) 表明, 淀粉含量在整个果实采后成熟的过程中持续降低, 其中在 12~14 d 这一时期内急剧减少, 直至 16 d 时, 几乎检测不到。

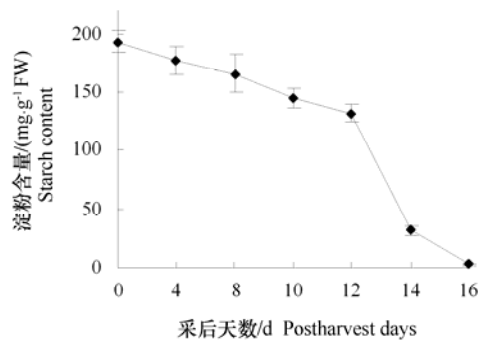


图 6 香蕉果实采后不同时期淀粉含量

Fig. 6 The content of starch in banana fruit at different ripening stage

## 2.7 香蕉果实采后不同时期果实内淀粉磷酸化酶活性

淀粉磷酸化酶活性在采后随着时间的延长缓慢增强, 当采后 12 d 呼吸强度及乙烯释放速率开始增强时, 淀粉磷酸化酶活性急剧增强 (图 7), 与淀粉的降解相一致。

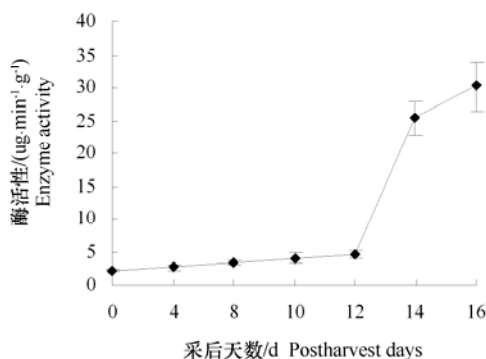


图 7 香蕉果实采后不同时期淀粉磷酸化酶活性

Fig. 7 The activity of starch phosphorylase in banana fruit at different ripening stage

## 3 讨论

*MaUCE1* 是从香蕉采后早期抑制差减文库中筛选得到的基因, 它可能参与香蕉果实采后成熟过程。本研究获得了 *MaUCE1* 基因的全长序列, 通过其推导的氨基酸序列与其他物种 UCE 序列的比对中发现, 该基因具有保守的泛素结合酶活性中心和一个负责与泛素形成高能硫酯键进而参与将泛素转移到 E3 酶或靶蛋白上的半胱氨酸活性关键位点, 说明该基因属于泛素结合酶家族。对各物种中 UCE 同源基因的分子进化关系分析发现, *MaUCE1* 与小麦、烟草、苹果、拟南芥、毛白杨、风信子的进化关系较近, 说明 *MaUCE1* 作为存在于香蕉中的泛素结合酶, 与其他高等植物中的 UCE 可能具有相近的功能: 介导细胞内小的调节蛋白的降解, 与酵母中的 UBC4/UBC5 同源 (Wolfgang & Stefan, 1990)。而距离较远的另外一个进化支中, 玉米、水稻中的 UCE 则被证明参与 UV 损伤的防御和 DNA 的修复, 与酵母中 UBC2/RAD6 功能相近 (Stefan et al., 1987)。

Steve 等 (1993) 克隆到一个番茄的 UCE 基因, 并发现在番茄果实成熟和叶片衰老过程中表达, 但对果实成熟过程中最重要的植物激素乙烯无应答, 所以认为该基因可能参与植物衰老过程的代谢活动 (Stefan et al., 1993)。本研究表明, *MaUCE1* 在果实和花中表达量较高, 推测可能在香蕉生殖器官的发育和衰老中发挥作用。采后基因表达结果证实, 随着果实的成熟, *MaUCE1* 表达量在 14 d 时上升幅度增加, 16 d 达到最大, 基因表达快速增强出现在乙烯跃变之后, 说明它可能参与了内源乙烯诱导的果实成熟过程中的物质代谢。

Chen 等 (1995) 在水稻糊粉粒中发现了一个 UCE 基因, 并证明该基因参与了依赖于赤霉素的  $\alpha$ -淀粉酶基因的表达, 它通过对淀粉酶基因抑制因子的降解来诱导淀粉酶基因的表达, 从而启动对淀粉的降解。淀粉酶的种类较为多样, 其中淀粉磷酸化酶在淀粉的代谢中起着重要的作用, 它的功能多变。Nicole 和 Paul (2004) 研究小麦淀粉磷酸化酶的种类及基因表达时发现, 小麦有 3 种淀粉磷酸化酶 (P1、P2、P3)。P1 和 P2 主要存在于小麦快速生长的器官中, 在器官快速生长时分解淀粉; P3 在成熟叶片及发育的胚乳储藏淀粉积累时强表达, 但在淀粉降解时不扮演角色。从香蕉淀粉磷酸化酶活性的变化趋势可以看出, 它在果实成熟过程中与淀粉的分解有关。淀粉是香蕉中主要的营养成分和贮藏物, 是果实品质形成的重要指标。它的代谢和果实的成熟过程息息相关。伴随着

果实的成熟, 在一系列基因的调控下, 淀粉的含量在果实呼吸跃变前后发生剧烈的变化。从本研究结果看出, *MaUCE1* 在果实跃变成熟后期增强表达, 相应地, 淀粉磷酸化酶的活性也逐渐升高, 淀粉含量则迅速下降。根据基因表达和淀粉磷酸化酶活性变化的一致趋势, 推测 *MaUCE1* 可能通过影响果实成熟过程中淀粉酶的活性或含量进而参与对淀粉降解的调控, 在果实衰老的分解代谢中发挥作用。作者将进一步探索该基因在果实成熟过程中的功能, 为阐明果实成熟过程中淀粉代谢调控机制奠定基础。

## References

- Andreas B, Maria N, Thomas P, Frank E. 2001. Ubiquitylation in plants: A postgenomic look at a post-translational modification. *Trends in Plant Science*, 6 (10): 463 - 470.
- Chen Xiong-fong, Wang Bai-yang, Wu R. 1995. A gibberellin-stimulated ubiquitin-conjugation enzyme gene is involved in  $\alpha$ -amylase gene expression in rice aleurone. *Plant Molecular Biology*, 29: 787 - 795.
- Nicole S, Paul Z. 2004. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant Cell Physiol*, 45 (10): 1471 - 1484.
- Peng Ri-he, Yao Quan-hong, Xiong Ai-sheng, Fan Hui-qin, Li Xian, Peng You-liang. 2003. Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) confers rice UV protection through phenylalanine ammonia-lyase gene promoter unit. *Acta Botanica Sinica*, 45 (11): 1351 - 1358.
- Pickart C M. 2001. Mechanism underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70: 503 - 533.
- Stefan J, John P, McGrath, Alexander V. 1987. The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, 329 (6135): 131 - 134.
- Steve P, Julie E, Grierson D. 1993. Sequence of a cloned tomato ubiquitin conjugating enzyme. *Plant Physiology*, 103: 1471 - 1472.
- Sullivan M L, Vierstra R D. 1989. A ubiquitin carrier protein from wheat germ is structurally and functionally similar to the yeast DNA repair enzyme encoded by *RAD6*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9861 - 9865.
- van Nocker S, Vierstra R D. 1991. Cloning and characterization of a 20-kDa ubiquitin carrier protein from wheat that catalyzes multiubiquitin chain formation *in vitro*. *Biochemistry*, 88: 10297 - 10301.
- Vierstra B D. 1993. Protein degradation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 44: 385 - 410.
- Wan C Y, Wilkins T A. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high quality RNA from cotton. *Analytic Biochemistry*, 223 (3): 7 - 12.
- Wang Yue-hao. 1999. Modern plant physiology laboratory manual. Beijing: Science Press: 117 - 118. (in Chinese)
- 王岳浩. 1999. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社: 117 - 118.
- Wolfgang S, Stefan J. 1990. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *The EMBO Journal*, 9 (2): 543 - 550.
- Xu Bi-yu, Su Wei, Liu Ju-hua, Wang Jia-bao, Jin Zhi-qiang. 2007. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Planta*, 226 (2): 529 - 539.
- Xu Chang-jie, Chen Wen-jun, Chen Kun-song, Zhang Shang-long. 1998. A Simple method for determining the content of starch-Iodine colorimetry. *Biotechnology*, 8 (2): 41 - 43. (in Chinese)
- 徐昌杰, 陈文峻, 陈昆松, 张上隆. 1998. 淀粉含量测定的一种简便方法——碘显色法. *生物技术*, 8 (2): 41 - 43.
- Yann S, Martin T, Goncalo N, Pierre D, Pasca K. 2002. Cloning of a cDNA encoding an E2 ubiquitin-conjugation enzyme from *Catharanthus roseus*: Expression analysis in plant organs and in response to hormones in cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366): 149 - 150.