小麦-长穗偃麦草抗白粉病异代换系中一个新的磷酸丝氨酸氨基转移酶基因的克隆

何道一[①]　王洪刚[②]

(① 淮北煤炭师范学院生物系，淮北 235000；② 山东农业大学农学院，泰安 271000. E-mail: daoyi1h@sohu.com)

摘要　以抗白粉病的小麦-长穗偃麦草异代换系山农 551 为材料，在接种小麦白粉病菌 48 h 制备样品电子显微镜观察，结果表明山农 551 在白粉病菌侵染早期抑制孢子萌发和菌丝生长. 在接种病菌 48 h 后提取 RNA，利用 cDNA RDA 和 RACE 技术克隆 *WRP1* 和 *RPW2* 共 2 个基因. BLAST 分析表明该二基因均是尚未被克隆的新基因. *WRP1* 没有大的 ORF; *RPW2* 的翻译产物含有保守的氨基转移酶结构域，与多种生物的磷酸丝氨酸氨基转移酶有同源序列，可以认为是一新的磷酸丝氨酸氨基转移酶基因. Northern 杂交结果显示在小麦白粉病侵染早期 *RPW2* 在山农 551 的叶片中就开始表达. *RPW2* 探针同山农 551 及其亲本鲁麦 5 号、济南 13 和长穗偃麦草基因组 DNA 进行 Southern 杂交结果显示，探针与鲁麦 5 号和济南 13 无杂交信号，而与山农 551 和长穗偃麦草都有较强的杂交信号，这表明 *RPW2* 来源于长穗偃麦草基因组.

关键词　小麦　长穗偃麦草　白粉病　**cDNA RDA**　磷酸丝氨酸氨基转移酶

小麦白粉病是小麦主要病害之一，它发生范围广，通常能造成 10%以上的减产. 近年来，随着单产水平的提高和采用高产栽培模式，该病害日趋严重，对小麦高产稳产构成严重威胁. 尽管化学药物防治也十分有效，但从食品和环境安全角度培育抗病品种仍是最经济有效的措施[1].

历史上曾培育出许多抗小麦白粉病品种，但由于白粉病菌生理小种变异速度快，抗病品种易丧失抗病性，因此，就要不断地发掘和利用新的抗性资源. 在小麦的近缘野生植物中发现了许多这样的抗病基因资源，有些抗病基因已经通过有性杂交的方法转移到栽培小麦中并培育出抗病品系[2]，并发掘了一些与这些抗病基因位点密切相关的分子标记[3~5]，但是关于这些基因位点的组织结构了解甚少，也没有克隆到与这些位点直接相关的基因. 对这些抗病基因的本质认识将极大地促进对小麦白粉病抗性机制的认识和抗病品种的培育.

多年鉴定结果表明，长穗偃麦草(*Elytrigia elongatum*, 2*n* = 70)对小麦白粉病免疫，通过有性杂交，抗病基因可转移到小麦与长穗偃麦草的杂交后代中. 本实验室从其杂交后代中已筛选出多个具小麦白粉病抗性的异源代换系. 这里我们报道从强抗白粉病异源代换系山农 551 中利用 cDNA RDA 和 RACE 技术克隆到来源长穗偃麦草基因组的一个新的磷酸丝氨酸氨基转移酶基因.

1　材料与方法

(ⅰ) 植物材料和病原菌.　材料为本室构建的抗小麦白粉病小麦-长穗偃麦草代换系 551((济南 13×长穗偃麦草)×鲁麦 5 号)，白粉病菌种为中国农业科学院植物保护研究所提供的 15 号小种. 种子播种在已灭菌的珍珠岩基质中，在温度为 25℃，空气相对湿度为 85%~90%, 2000 Lux 光照条件下培养，发芽后 10 d，将白粉病菌孢子均匀地喷洒在叶片上，以喷洒无菌蒸馏水的材料为对照. 接种病菌的材料为 T(Tracer)组,未接种病菌的材料为 D(Driver)组.

(ⅱ) 总RNA提取与测定.　接种病菌后按实验要求不同时间取材于液氮中冷冻，总RNA提取采用异硫氰酸胍法[6]. cDNA-RDA在接种病菌后 48 h取材. RNA纯度和产量用DU-640 蛋白质核酸动力学分析仪(BECKMAN)测定. RNA 完整性用变性胶电泳检测. 总RNA经不含RNA酶的DNA酶(Pharmacia)37℃保温 10 min, 70℃ 10 min灭活.

(ⅲ) 有限第 1 链逆转录与加尾.　有限第 1 链逆转录使用 MBI 公司的逆转录试剂盒，0.5 μg 总 RNA 按试剂盒使用说明进行逆转录，逆转录时间控制在 10 min, 70℃灭活 10 min 逆转录酶. 10 μL 有限合成第 1 链混合物, 40 U TDT(MBI)和 5 mmol/L dATP 37℃保育 15 min, 70℃灭活 TDT 10 min.

(ⅳ) 代表性 cDNA 库的扩增.　以加尾的有限合

成的第 1 链产物作模板, 分别以 P2 和 Pm 作 T 组和 D 组的引物, PCR 扩增的条件是: 94℃预变性 2 min; 94℃, 30 s, 42℃, 30 s, 72℃, 3 min, 25 次循环, 72℃延伸 10 min. P2: 3′-GAGGCCGTATGAATTCT(17)-5′. Pm: 3′-GCGGCCGCT(17)-5′, 5′端生物素标记.

(ⅴ) 杂交、减法与再扩增. T 组和 D 组代表性 cDNA 库的扩增产物经纯化后, 按 1∶20(T∶D)的比例在杂交缓冲液中 68℃杂交 48 h. 杂交混合物经 50 mmol/L EPPS (pH 8.5)配制的链霉生物素蛋白和酚/氯仿(1∶1)反复抽提, 最终得到减法产物. 取 5 μL 减法产物, 以 P2 为引物再经 PCR 扩增, 扩增条件同上, 扩增产物纯化后用于下一轮杂交. 从 2%凝胶上切割经 5 轮杂交、减法和再扩增的产物, 用 Ultrafree-DA (Millipore)回收.

(ⅵ) 序列分析. 回收物与载体 pMD18-T 在 16℃条件下连结 30 min. 转化已制备好的感受态细胞, 采用蓝白斑挑选转化细胞. 挑选出的转化细胞提取质粒经 PCR 进一步确认插入片段. 对挑选的不同细胞系分别经上海生物工程公司和宝生物工程(大连)公司测序. 对已测序列与 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 中的序列经 BLASTn 和 BLASTp 比对分析.

(ⅶ) 基因组DNA 提取与Southern杂交. 按CTAB法[7]分别提取代换系 551, 长穗偃麦草、济南 13 和鲁麦 5 号幼叶基因组DNA; 基因组DNA经*Hin*d Ⅲ酶解过夜, 0.8%琼脂糖凝胶、25 V电泳 12 h; 尼龙膜(Amersham)印迹转移 15 h; ^{32}P-dCTP(福瑞生物工程公司)标记探针, 以cDNA RDA 产物*RPW2* 片段为模板, 采用 PCR 法制备并用 Mircrocon-PCR filter Unites(Millipore)纯化回收探针. 杂交炉(Lab-line)中 65℃旋转杂交过夜.

(ⅷ) RNA Northern 杂交. 分别提取山农 551 未接种病菌、接种病菌后 12, 24 和 48 h 叶片中的总 RNA, 总 RNA 经变性琼脂糖凝胶电泳分离, 按常规方法印迹过夜, 紫外线照射固定; 探针制备同上; 在分子杂交炉(LAB-LINE)中 42℃杂交过夜, 中严谨度洗膜 2 次.

(ⅸ) *WRP1* 和*RPW2* 的RACE分析. 根据*WRP1* 和RPW2 已测的序列片段, 用DNA Club软件设计 5′-RACE引物, *RPW2* 的引物为SJ1 和SJ2; *WRP1* 的为 SJ3 和SJ4. RACE的基本步骤按Frohman[8]方法进行, 使用的逆转录酶为SurpScriptTM Ⅱ RNaseH$^-$ (Invitrogen). 94℃预变性 50 s, 扩增共 30 次循环, 每个循环的条件为 94℃, 30 s, 48℃, 50 s, 72℃, 3 min. 根据第 1 次 RACE 结果, 重新设计引物 NS1 和 NS4 对 *RPW2* 和 *WRP1* 分别进行第 2 次 RACE. RACE 产物的回收、测序及分析同上, 所有引物由上海生工合成. 引物序列为:

SJ1: 3′-AGAGTGGGATGAGGCATAGAG-5′;
SJ2: 3′-CTCTATGCCTCATCCCACTCT-5′;
SJ3: 3′-TGGGACTGGCGGAAGTGTC-5′;
SJ4: 3′-GACACTTCCGCCAGTCCCA-5′;
NS1: 3′-CGCCTAATGGAGGTTCATG-5′;
NS4: 3′-CGGGTAACTCCGTTACAACA-5′.

(ⅹ) 电子显微镜样品制备与观察. 白粉病菌接种 48 h, 取叶片于 4%的戊二醛中固定, 再经 1%的锇酸固定; 乙醇梯度脱水; CO_2 临界点干燥仪干燥贴样; IB-5 离子浅射仪镀膜; JEM-1200EX 电子显微镜扫描观察.

2 结果与分析

2.1 异源代换系 551 对白粉病菌孢子萌发和菌丝生长的抑制

经室内和田间接种实验, 山农 551 和长穗偃草对小麦白粉病具有很强的抗性, 按国际小麦种质鉴定的 10 级分类标准, 它们的感病等级为 0. 而山农 551 的亲本济南 13 和鲁麦 5 号都是易感品种, 它们的感病等级分别为 8 和 7. 因此, 山农 551 中这种抗性来自长穗偃麦草. 接种病菌 48 h 后, 制备山农 551 及其不抗病亲本鲁麦 5 号叶片样品进行扫描电子显微镜观察, 结果见图 1. 从图中可看出, 不抗白粉病的亲本鲁麦 5 号叶片上菌丝生长繁茂, 而 551 的叶片上孢子萌发延迟, 菌丝生长缓慢, 长势较弱. 这与抗性接种实验结果相一致, 同时也表明山农 551 对白粉病的抗性发生在病菌侵染早期.

2.2 白粉病侵染早期对异源代换系 551 进行 cDNA-RDA 的结果

经过 4 轮杂交, 减法产物逐步被富集, 结果见图 2. 第 5 轮杂交减法产物 PCR 扩增后经 2%的琼脂糖凝胶电泳, 得到距离上非常邻近的 2 条带(图 3), 它们分别是 333 和 314 bp. 切胶回收并与 T 载体连结, 转化大肠杆菌 DH 5α, 经蓝白斑筛选, 随机挑取单个白色菌落, 分别经上海生物工程公司和宝生物工程(大连)公司测序, 两公司测序结果完全一致, 两片段分别被命名为 *WRP1* 和 *RPW2* (GenBank 登录号: AY211193, AY211194). 用 BLASTn 序列分析平台对 *WRP1* 和 *RPW2* 进行序列同源性分析, 在同源性最高

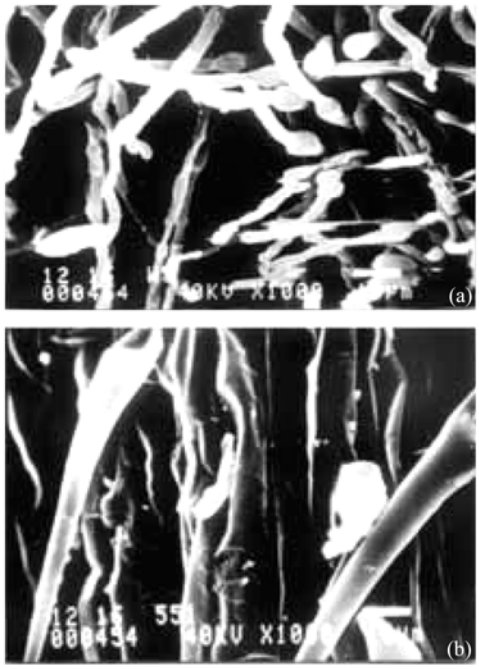

图 1　接种小麦白粉病菌 48 h 后叶片电子显微镜扫描结果
(a) 品种鲁麦 5 号; (b) 异代换系山农 551

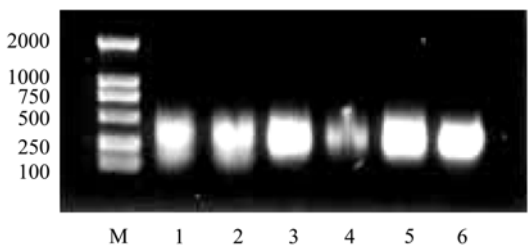

图 2　4 轮杂交减法结果
M 示 Marker(DL 2000, TaKaRa). 1 和 2 为 D 组和 T 组有限逆转录加尾后扩增的结果; 3~6 分别为 1~4 轮杂交减法扩增的结果

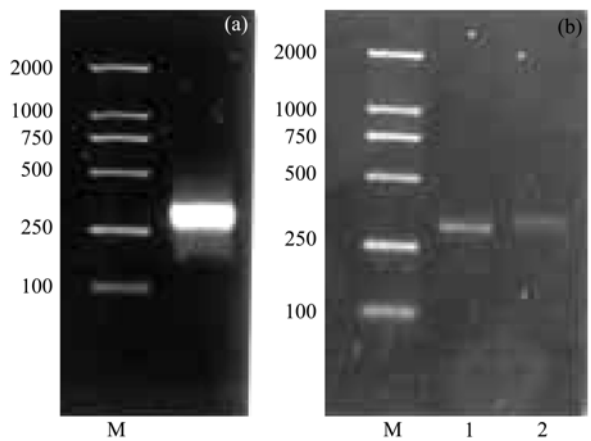

图 3　第 5 轮杂交减法结果
(a) 第 5 轮杂交减法后扩增的结果; (b) 切胶后分别再扩增的结果.1 示 *RPW2* 部分; 2 示 *WRP1* 部分, M 示 Marker(DL 2000, TaKaRa)

的序列中, *WRP1* 只与人的一染色体序列有 21 个碱基相同; *RPW2* 与老鼠 11 号染色体序列有 19 个碱基相同. 这表明 *WRP1* 和 *RPW2* 是尚未克隆的新基因.

2.3　*WRP1* 和 *RPW2* 的 5′-RACE 结果

cDNA RDA 结果是 3′端产物, 根据这个结果设计了系列引物对 *WRP1* 和 *RPW2* 片段进行 5′-RACE. SJ1 和 SJ2 为 *RPW2* 设计, SJ3 和 SJ4 为 *WRP1* 设计. 当使用 SJ2 和 SJ3 进行逆转录并与引物 P2 配对加尾产物进行 RACE, 扩增产物呈弥散状, 长度小于 500 bp, 而以 SJ1 和 SJ4 进行 RACE 时, 扩增产物也呈弥散状, 但长度超过 1000 bp(图 4(a)), 这说明了 *WRP1* 和 *RPW2* 的 cDNA 的方向. 据此在 SJ1 和 SJ4 的上游再设计 2 个引物 NS1 和 NS4, 以该 2 引物与引物 P2 配对对 *RPW2* 和 *WRP1* 进行第 2 次 RACE, 结果见图 4(b). *WRP1* 的 RACE 结果除引物后为 839 bp, 从中未找到大的 ORF, 该产物尚待进一步研究. *RPW2* 的 RACE 结果为 1197 bp(去引物), 编码一磷酸丝氨酸氨基转移酶.

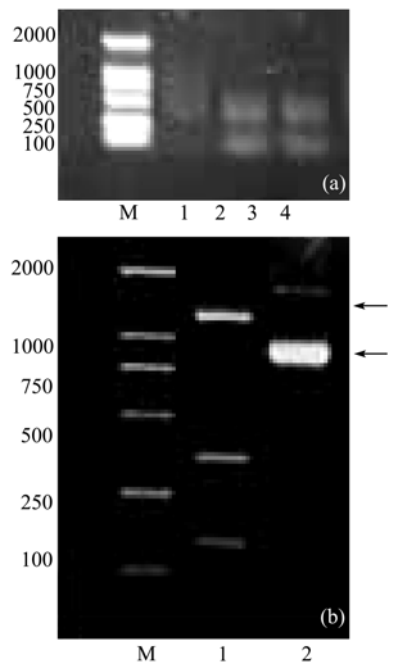

图 4　2 次 RACE 结果
M 示 Marker(DL 2000, TaKaRa) (a) 第 1 次 RACE 结果; 1 和 2 分别示引物 SJ1 和 SJ2 及 P2 对 *RPW2* 的 RACE 结果; 3 和 4 分别示 SJ3 和 SJ4 及 P2 对 *WRP1* 的 RACE 结果. (b) 第 2 轮 RACE 结果, 箭头所指为目标带; 1 *RPW2*, 2 *RPW1*

2.4　*RPW2* 是一新的磷酸丝氨酸转移酶基因

全长 *RPW2* 的翻译产物为 416 个氨基酸残基的多

肽，其序列为：*MAAATTPKSLLRRGGSSLHSAAASFIL-LPTRAARLSCAAVATPAQSSSSPAAAATPFLFPSGGTG-PATLLSVLKRAQAEPVITFLIGFSIMELSQRGKEFDG-GIKVHKPADLRALLAVPDTHEVLFLQGGATSQFAAA-PLNLWSIQSSTGLVLPIDFVVSGSWSDKAFKKCLLV-DGVSVASGKDGKYTSFPPFDAIDVSSQKALSLPLHR-GLGIVCASFDKVFPENDFYKLGILVADGARKKLGTY-VDVSRFGLIYAGANVPPTGVTIAIVRKDLVGSAQPIT-PVMLDYKTHADNASLYNTHECFAIYLCGLVFEDLLA-QGGLAEVEKKASGSAGILYDDIDASFGGHLCPVEKS-VRSLAGVPFTLILYGDFEKQFIAEAAKEGMYQL-KGHRSVGGVRAGPHCADYPPGTSLLAGP*

对 *RPW2* 及其翻译产物进行 BLASTn 和 BLASTp 比对分析，未发现有同样的序列报道，表明 *RPW2* 是一个新的基因序列．比对分析同时还表明其翻译产物的 CCD 结构含有氨基转移酶 v 和 Ser C 的保守结构域，并与许多生物的磷酸丝氨酸转移酶有类似的序列，因此可以认为 *RPW2* 是一个新的磷酸丝氨基转移酶．

2.5 *RPW2* 在白粉病菌侵染早期表达

以 *RPW2* 为模板制备探针，同接种白粉病菌后不同时间提取的 RNA 进行 Northern 杂交，结果见图 5. *RPW2* 从 12 h 就一直有较强的杂交信号，表明从病菌侵染时 RPW2 就稳定表达．

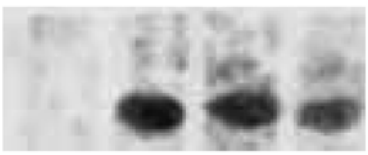

图 5 *RPW2* Northern 杂交结果

1 为未接种白粉病菌材料; 2~4 分别为接种白粉病菌后 12, 24 和 48 h. 每泳道 RNA 量为 20 μg

2.6 *RPW2* 来源于长穗偃麦草基因组

制备的 *RPW2* 放射性探针与济南 13，鲁麦 5 号，代换系 551 和长穗偃麦草基因组 DNA 进行 Southern 杂交，结果见图 6. *RPW2* 与济南 13，鲁麦 5 号无任何杂交信号．*RPW2* 与代换系 551 和长穗偃麦草都有较强的杂交信号，表明 *RPW2* 来自长穗偃麦草基因组．

3 讨论

山农 551 是从(济南 13×长穗偃麦草)×鲁麦 5 杂交后代中选育的抗小麦白粉病的异源代换系,细胞遗传学鉴定表明它是含有长穗偃麦草的染色体组份，多年的田间和室内接种试验表明山农 551 表现较强的抗小麦白粉病特性，由于济南 13 和鲁麦 5 号对流行小种均表现易感，因此，这种抗性的获得与来源于长穗偃麦草的遗传物质相关．电子显微镜扫描观察结果与接种试验结果相吻合，山农 551 延缓病菌孢子萌发，抑制菌丝生长．这表明来源于长穗偃麦草的遗传物质参与了抗病的早期过程．弄清来源于长穗偃麦草基因组中与抗病相关的基因，对进一步认识植物的抗病的分子机理和充分利用该抗病基因资源都大有裨益．

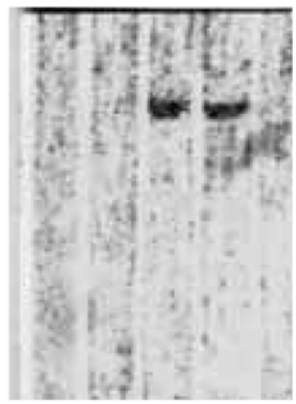

图 6 *RPW2* 与基因组 DNA Southern 杂交结果

1~4 分别为济南 13，鲁麦 5 号，山农 551 和长穗偃麦草

长期进化过程中，植物形成了复杂的抵抗病原生物侵染的防卫机制．首先在植物的表层形成机械性和化学性的防侵染的障碍层．在植物体内部尚存在更为复杂的系统性抗病机制，包括植物R基因与病原毒基因相互识别相互作用而产生的特异性抗性机制和更多类型的尚不清楚的非特异性的抗病机制[9]. 这些机制中都涉及到一系列相关基因的表达，这些基因常与抗病信号分子的产生[10]、抗性化合物的形成[11]、侵染位点细胞程序性死亡以及植物获得系统免疫性有关[12].

R基因介导的植物抗病机制一直是重点研究内容，不仅发现了与病原菌识别相关的植物R基因的蛋白质结构上的一些特征[13,14]，而且对植物的抗病网络及其重要组分和可能的信号分子也有了进一步的认识[15~17]．大麦与其白粉病之间的相互作用被认为是研究禾本科草本植物与病原微生物相互作用的模式系统，通过对这一系统的研究，许多抗性位点的基因被克隆，在基因组中这些位点的基因排列方式及序列的结构特征被揭示[18~20]．然而，植物其他方面的抗病机制了解甚少．近年来诸多的研究结果表明一些与植物代谢相关的酶在抗性的形成过程中有重要

作用[21~23]，这种抗性被定义为“酶抗性”. 与*R*基因介导的抗性相比，酶抗性可能具有更广的抗病谱，这对植物抗病基因工程更为有用.

利用 cDNA RDA 和 RACE 方法，我们克隆了 2 个基因即 *WRP1* 和 *RPW2*. 在 *WRP1* 中没有大的 ORF，它还有待于进一步研究与分析. *RPW2* 的推测的翻译产物具有保守的氨基转移酶结构域，其碱基序列与多种生物的磷酸丝氨酸氨基转移酶基因具有高度的相似性，因此认为它是一个新的磷酸丝氨酸氨基转移酶.

磷酸丝氨酸氨基转移酶是过氧化物酶体中植物光呼吸代谢途径中的酶类，植物的光呼吸在过氧化物酶体中产生H_2O_2，这是重要的抗病信号分子之一，它能激发植物细胞产生过敏性反应(HR)，进一步诱导细胞程序性死亡、抗菌物质产生和细胞壁加厚等抗病反应[24]. Northern 杂交结果表明*RPW2* 在接种病原菌后 12 h就大量稳定表达，这与植物抗病过程中H_2O_2迸发在时间上也十分吻合，但*RPW2* 与一般的光呼吸途径中的丝氨酸氨基转移酶有何不同? 在抗病过程中确切作用如何? 这些问题都非常值得深入研究.

在植物的野生种中常表现出一些综合的抗逆性状，这种抗病特性很难用 R 基因介导的抗病机制来解释. Southern 杂交结果表明 *RPW2* 来源于长穗偃麦草基因组，据我们所知，这是第一个被克隆的来源于小麦近源野生种基因组的与抗病相关的基因. 它在这种抗病机制中的作用如何是非常有价值的理论问题. *RPW2* 能否有效地应用于麦类作物抗病基因工程还取决于对其功能的最终鉴定.

参 考 文 献

1 刘金元，刘大钧. 小麦白粉病抗性基因研究进展. 植物病理学报, 2000, 30(4): 289~295

2 李振声，容珊，陈漱阳，等. 小麦远缘杂交. 北京：科学出版社，1985. 1~51

3 Ma Z Q, Sorrel M E, Tanksley S D. RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes Pm1, Pm2, Pm3 and Pm4 in wheat. Genome, 1994, 37: 871~875

4 Hartl L, Weiss H, Stephan U, et al. Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L). Theor Appl Genet, 1995, 90: 601~606

5 王心宇，亓增军，马正强，等. 小麦抗白粉病基因 *Pm6* 的 RAPD 标记. 遗传学报, 2000, 27 (12): 1072~1079

6 Clark M S, 主编. 顾红雅，瞿礼嘉，译. 植物分子生物学实验手册. 北京：高等教育出版社. 海德堡：施普林格出版社，1998. 122~124

7 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321~4325

8 Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts by amplification using gene-specific oligonucleotide primer. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 8998~9002

9 Dangl J, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature, 2001, 411: 826~833[DOI]

10 Bolwell G P. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. Curr Opin Plant Biol, 1999, 2: 287~294[DOI]

11 Kolomiets M V, Chen H, Gladon RJ, et al. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. Plant Physiol, 2000, 124: 1121~1130[DOI]

12 Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10922~10926[DOI]

13 Jones D A, Jones J D G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. Adv Bot Res, 1997, 24: 90~166

14 Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance genes. Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol, 1997, 48: 575~607[DOI]

15 Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in Plant-microbe interactions. Science, 1997, 276: 726~733[DOI]

16 Shirasu K, Lahaye T, Tan M W, et al. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. Cell, 1999, 99: 355~366[DOI]

17 Aarts N, Metz M, Holub E, et al. Different requirements for eds1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 10306~10311[DOI]

18 Wei F, Gobelman-Werner K, Morroll S M, et al. The Mla (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination with a 240-kb DNA interval on Chromosome 5S (1HS) of barley. Genetics, 1999, 153: 1929~1948

19 Feuillet C, Keller B. High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 8265~8270[DOI]

20 Halterman D, Zhou F, Wei F, et al. The MLA6 coil-coil, NBS-LRR protein confers *AvrMla6*-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* F. sp. *hordei* in barley and wheat. Plant J, 2001, 25 (3): 335~348[DOI]

21 Wang H, Hao L, Shung C Y, et al. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. Plant Cell, 2003, 15: 3020~3032[DOI]

22 Hao L, Wang H, Sunter G, et al. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. Plant Cell, 2003, 15: 1034~1048[DOI]

23 Kang L, Li J, Zhao T, et al. Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene *NHO1* with bacterial virulence. Proc Acad Sci USA, 2003, 100: 3519~3524[DOI]

24 Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 251~275[DOI]

(2004-10-12 收稿, 2005-01-28 收修改稿)