

文章编号:1007-4961(2008)02-0195-05

梨组培褐化及抗褐措施研究进展

刘 杰¹, 张玉星¹, 董 祯²

(1 河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001; 2 河北女子职业技术学院, 河北 石家庄 050091)

摘要:从褐化的发生机制、影响褐化的因素以及抗褐措施等方面,对近几年在梨组培上的相关研究进展进行了概述,并结合当前研究中存在的问题,对今后梨组培褐化研究的发展提出了展望。

关键词:组织培养;外植体;梨;褐化;防褐措施

中图分类号:S661.2; S603

文献标识码:A

Progress on pear's explants browning and anti-browning measures in the process of tissue culture

LIU Jie¹, ZHANG Yu-xing¹, DONG Zhen²

(1 Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2 Hebei Women's Vocational College, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: The research progress on pear explants browning in tissue culture is reviewed from the aspects of browning mechanism, influencing factors and anti-browning techniques in recent years. Some suggestions for the development of browning research are proposed according to the problems existed in the recent researches.

Key words: tissue culture; explants; pear; browning; anti-browning measures

梨是我国重要的经济树种,也是栽培最为普遍的果树之一,在我国栽培历史悠久。半个多世纪以来,在科研工作者的不懈努力下,我国梨产业和科研水平在整体上都有了较大的发展。随着研究的不断深入,组织培养在梨的种质保存、离体快速繁殖、苗木脱毒、遗传育种等方面所发挥的作用日渐突出,特别是在重组DNA遗传转化,改良梨品种特性等方面显示出其简易、快捷、高效的优点。因此,梨组培快繁技术的研究日渐受到人们的重视^[1]。然而,大部分梨品种因酚类物质含量较高,外植体初代或继代培养过程中褐化十分严重,导致材料大量死亡,从而对梨外植体的脱分化和再分化带来了严重影响,成为制约梨组培技术快速发展的瓶颈^[2-3],因此,如何减轻组培苗褐化的发生已经成为当前梨组培过程中一个亟待解决的问题。本文对近几年在梨外植体褐化问题上的研究作一回顾,并结合存在的问题提出了展望。

1 褐化的发生机制

褐化就是指组培过程中外植体体内的酚类物质在有氧气存在的条件下,被多酚氧化酶氧化形成棕色的醌,再经非酶促聚合形成黑褐色物质^[4],此物质扩散到培养基中抑制其他酶的活性而对外植体产生毒害的现象。在此过程中,酚类物质、多酚氧化酶和氧气共同决定了褐化的发生。鞠志国等^[5]通过研究进一步指出,正常的组织细胞中酚类物质存在于液泡内,酚氧化酶则分布在各种质体或细胞质中,酶和底物通过一系列膜系统实现区域性分布,因此不会发生褐变。只有当细胞受到伤害或老化死亡,正常的膜结构遭到破坏,褐变才会发生。在此过程中,酚类物质和酚氧化酶是褐化发生的两个重要因素。

1.1 酚类物质

酚类物质是碳水化合物代谢的衍生物,也是植物界种类最多,分布最广的次生代谢物质之一,常被

收稿日期:2008-03-18;修改稿收期:2008-04-20

作者简介:刘 杰(1983-),男,河北平山人,在读硕士生,研究方向果树结实生理及分子生物学。

通讯作者:张玉星(1961-),男,河北孟村人,教授,博导,从事果树学研究。

称为多酚类。酚类化合物按组成可分成3类:苯基羧酸(包括邻羟基苯酚、儿茶酚、没食子酸、莽草酸等),苯丙烷衍生物(包括绿原酸、肉桂酸、香豆酸、咖啡酸、单宁、木质素等)和黄烷衍生物(包括花青素、黄酮、芸香苷等)^[6],其中,苯丙烷衍生物与褐变关系最密切,是多酚氧化酶(PPO)的底物^[7]。

大量研究表明,不同梨品种的组织褐变程度与酚类化合物含量呈显著正相关,并且,引起褐变的水溶性酚类以绿原酸为主,此外还有桂皮酸、香草酸、香豆酸、没食子酸、儿茶酚、咖啡酸等^[4]。及华在梨S4矮化砧外植体的研究上证明,其褐化变化规律受总酚含量变化的影响^[8]。

1.2 酚氧化酶

与梨组织褐变密切相关的酶主要有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、脂氧合酶(LOX)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等。从初次培养和继代培养过程中试管苗的褐变程度和PPO的活性来看,PPO是植物酶促褐变中最重要的酶,其活性的高低是引起培养材料褐变的关键^[6]。

PPO是一种含铜的蛋白,其活性依赖于铜的氧化还原作用。PPO在组织细胞内以两种形式存在,一种以游离态(FPPO)形式存在于细胞质中,一种以结合态(BPPO)形式存在于细胞膜上。其中FPPO具催化活性,可以氧化酚类物质发生褐变。陈国刚研究表明,库尔勒香梨果实褐变指数与多酚氧化酶含量成正相关^[9]。

2 影响褐化的因素

2.1 基因型

褐化的程度与基因型有很大关系,不同的树种和品种,由于多酚氧化酶活性和酚类物质质量上的差异,褐化程度也不同。李焕秀研究了鸭梨、苹果梨、南果梨、苍溪梨和日面红梨5个品种,发现PPO活力存在品种间差异,其中南果梨PPO活性最高,而苍溪梨活性最低^[10];在对苍溪梨和金花梨的研究中证明,苍溪梨的PPO和POD活性、褐化率均高于金花梨^[11]。

2.2 外植体

外植体本身的生理状态不同,接种后褐变的程度也不同。其原因可能是不同生理状态的材料,酚类物质的含量及PPO活性都不同^[12]。一般来说,幼嫩的组织在接种后褐变并不明显,而随着培养材料的年龄和组织木质化程度的提高,褐化加剧^[13]。

Dan hua Yu 和 Carole P 研究了外植体起源与组织褐变的关系,发现生长在避荫处的外植体比生长在全光下的外植体褐变率低,腋生枝上的顶芽比其他部位枝的顶芽褐变率低^[14]。金花梨和苍溪梨茎尖组培过程中,在旺盛生长的4月份所采外植体褐变率为100%,而1、2月份的外植体褐变率仅分别为0和4.5%^[11]。而吴晓霞则认为旺盛时期的外植体分裂能力强,褐变程度低^[12]。关于不同时期材料的褐化程度,不同的研究者结论存在差异,这可能与树种以及供试树体生理状态有关,具体原因还有待进一步研究。

外植体的类型也影响褐化。胚培养较少褐变,而茎尖、叶片等高度分化的组织容易褐变^[11]。外植体越小,切面与体积的比率越大,褐变程度越重,即外植体或培养材料越大,褐变越轻^[15]。

2.3 培养基

培养基pH值的变化可引起酚类与酚氧化酶结合部位的改变^[16],从而影响酶的活性。一般来说,酸性环境不利于褐变的发生。毕阳测定了苹果梨的PPO活性,发现在pH 6.5的情况下活性最强^[17],而程建军认为苹果梨多酚氧化酶的最适pH值为4.6^[16]。黄花梨PPO最适pH为6.0^[18]。巴梨^[19]、安久梨^[20]和鸭梨^[21]等品种的PPO也都在中性或近中性时活性最高。培养基中过高的无机盐浓度会引起植物外植体酚的氧化,加重褐化的发生,但汤绍虎在雪青梨的研究中发现,培养基中不同的无机盐浓度对雪青梨愈伤组织褐化无显著影响^[16],这可能是不同树种和品种之间,耐受盐胁迫的能力不同所致,有待于进一步研究。此外,高浓度的糖、氨态氮、丝氨酸及硼都可以加剧木本植物褐变的发生^[15];细胞分裂素BA或Kin能刺激PPO活性提高,使褐化加剧^[22];与固体培养基相比,液体培养基可以减轻褐化对外植体的伤害程度,原因是外植体溢出的毒害物质可以很快扩散;琼脂含量高,培养基硬度大,褐变率低,随着琼脂用量的减少,褐变加重^[23];用硬度较高的自来水配制的培养基也会加重外植体的褐化^[24]。

2.4 培养条件

温度影响PPO的活性,进而影响褐化。苹果梨PPO在30℃~50℃具有良好的活性,其中以在40℃下活性最大,低于20℃及高于65℃,PPO活性均有明显降低^[16]。黄花梨PPO的最适温度为25℃,低于15℃或高于50℃时PPO活力显著降低^[19]。光能促进植物组织培养中酚的氧化。高疆生等研究发现暗

处理可以抑制梨的褐化^[25]。高的二氧化碳浓度也会加剧褐变。原因是环境中的 CO₂ 向细胞内扩散,细胞内 CO₃²⁻ 增多,CO₃²⁻ 与细胞膜上的 Ca²⁺ 结合,使有效 Ca²⁺ 减少,导致内膜系统瓦解,酚类物质与 PPO 相互接触,发生褐变^[26]。

3 主要防褐措施

3.1 选择适宜的外植体

晏本菊等研究了苍溪梨、金花梨不同时期的外植体褐变率的变化情况,发现从1月到9月两品种褐变率先升后降,褐变高峰出现在5月份,1月和9月褐变最轻^[11]。一般来说,夏季外植体最容易褐变,春季和秋季外植体褐变较轻。秋季芽进入休眠,不易生长,而春季外植体组织幼嫩,分裂能力强,酚含量低,多酚氧化酶的氧化活性较弱^[11],是进行组培的首选材料^[12]。选择生长旺盛的部位采集外植体如新梢尖端有利于减轻褐化,而使用新梢基部木质化程度高的茎段褐化严重,不易成活^[13]。茎尖作为外植体接种时,以7~15 mm 褐化较轻,成活率高。

3.2 对材料进行预处理

研究表明,对田间母株遮光或短期热处理,然后再采集外植体进行接种,可以减轻褐化^[24]。接种前先用流水冲洗外植体可以冲掉外植体中的部分酚类物质,减轻褐化;低温预处理也可减少组织氧化褐变^[27];李焕秀在苍溪梨上的试验显示,将外植体放入冰水中处理一定时间然后再接种,有利于减轻褐化;低温处理时,结合一些褐变抑制剂溶液共同处理效果较好^[3]。此外,将梨外植体用0.1%的8-羟基喹啉硫酸盐(8-HOS)浸泡12 h后,再常规杀菌,不仅能防止外植体污染,还能抑制外植体褐变^[25]。另外在切割外植体时在抗氧化剂或吸收剂中进行,可

以隔离切面伤口与氧气的接触,相应减轻了褐化的发生。

3.3 选择适宜的培养基和培养条件

在适宜的培养基中,外植体生命力强,对褐化的抵抗能力强。如苍溪梨在 MS + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃ 的培养基中褐化轻,成活率高,而在 MS + 2.0 mg/L BA + 1.0 mg/L IBA 培养基中全部褐变死亡^[3];在新梨7号培养过程中,低盐培养基 AS 防褐效果优于 MS 培养基^[25]。此外,BA、Kin 等激素促进褐化^[23],选用低激素浓度或不含激素的培养基也有利于减轻褐化的发生。

在培养初期,改变培养条件也有利于阻止褐化反应的发生,如暗处理或弱光下培养可减轻新梨7号的褐化^[25];低温抑制酚酶的活性,初期在15℃~20℃下培养,或先在4℃低温下培养一段时间后再转到常温下进行培养可明显的减轻褐化发生;在低pH的液体培养基中培养一段时间后再转入固体培养基正常培养也可以减轻褐化。

3.4 使用抑制剂和吸附剂

在培养基中加入抗氧化剂和其他抑制剂可有效地减轻梨外植体的酶促褐变。在新梨7号上使用0.4 mg/mL的抗坏血酸(Vc)可有效控制褐变^[25];巯基乙醇(MC)能显著降低雪青梨外植体的褐化^[28];8-羟基喹啉硫酸盐防止金花梨外植体褐变效果明显^[2];抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸氢钠和L-半胱氨酸四种抑制剂对黄花梨PPO有一定的抑制作用^[19];但对苹果梨中多酚氧化酶研究发现,亚硫酸氢钠、维生素C、柠檬酸对PPO活性有抑制作用,而硫酸钠几乎无作用^[16]。各种褐变抑制剂的作用机理和应用范围各不相同,几种常用褐变抑制剂及其作用机理见表1^[7]。

表1 几种常用褐变抑制剂及其作用机理

Table 1 Browning inhibitors and their mechanism

抑制剂 Inhibitor	作用机理 Mechanism	研究者 Researchers
柠檬酸、苹果酸、植酸(PA)、抗坏血酸(Vc)	一定浓度的柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸均能增强还原剂的抑制作用;植酸(PA)分子中众多的羟基产生抗氧化作用,使生色物质的含量下降,或PA与PPO分子中的Cu ²⁺ 结合,从而降低了其活力	刘曼西和于秀芝; Reynolds, Murashige, Sondahl等; Skirvin等; Chaturvedi等; 王敬驹; 陈学森等
卵清蛋白、蛋白质水解产物、L-半胱氨酸	氨基酸能与邻醌发生反应;蛋白质、肽、氨基酸可与Cu ²⁺ 形成稳定的复合物;与醌发生作用,使其重新还原为酚	Mason等; 王敬驹; Chaturvedi等; Davies, R. 和 Pierpoint, W. S. 等
2-巯基苯并噻唑、巯基乙醇(MC)	巯基化合物与邻位醌形成无色物质;巯基乙醇可与PPO活性中心的铜原子键合	Varda kahn

续表 1 Table 1

抑制剂 Inhibitor	作用机理 Mechanism	研究者 Researchers
硫脲、二胺基二硫代甲酸钠、二乙基二硫代氨基甲酸、偏二亚硫酸钠、二硫苏糖醇、EDTA、8-羟基喹啉硫酸盐(8-HQS)	二胺基二硫代甲酸钠是铜的沉淀剂,对各种含铜酶如酪氨酸酶、漆酶和抗坏血酸氧化酶均起抑制作用;硫脲、二乙基二硫代氨基甲酸、EDTA、8-羟基喹啉硫酸盐可与 PPO 活性中心的铜原子键合	李明启和严君灵; Krishnamurth; Mayer, A.M. 等; Laimer MCM, Machadeo AM 等; Read PE, Yang G 等; 汤浩茹等;
亚硫酸氢钠(NaHSO_3)、焦亚硫酸钾、焦亚硫酸钠、氯化钠(NaCl)等	抑制酚类物质的氧化	Marina Macetat; Embs, R.J. 等; 毕阳, 欧阳春光.
氰化钾、叠氮化物	络合 PPO 活性中心的金属原子	Lehihashi 和 Karo
二硫苏糖醇	还原剂,作用与巯基乙醇类似	Marina Macetat
多胺	抑制过氧化酶	I Elhadrami

常用的吸附剂有活性炭(AC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。活性炭具多孔结构,比表面积大,是良好的吸附剂,能够有效吸附培养物分泌到培养基中的酚、醌等有害物质,从而减轻了褐化,保护培养物免受酚、醌等的毒害。试验中活性炭常用浓度为 0.01%~0.1%^[32]。黄霞等发现活性炭可有效地防止香蕉茎尖培养中外植体的褐变^[29]。活性炭也能显著降低雪青梨外植体的褐化^[16]。但是活性炭的吸附是没有选择性的,在吸附酚、醌的同时也会吸附营养物质和激素,影响外植体的正常生长。所以加入活性炭后要相应调高激素的浓度水平,以保证材料能够正常生长。PVP 是酚类物质的专一性吸附剂,能与酚类化合物中的 -OH 结合而吸附它们^[30],同时 PVP 也能通过和酶-底物结合形成复杂的化合物,对多酚氧化酶起一定的抑制作用,使酚不被氧化^[31]。但有些研究者通过试验证明 PVP 没有防止褐变的效果,原因可能是在植物体内存在着不同的酚类物质,而 PVP 也存在不同分子量的类型。

3.5 其他方法

防止褐化最直接的方法是经常转移培养基。新接入的外植体在培养的前几天连续转移到新鲜培养基上 3~5 次,一段时间以后,外植体的切口愈合,酚类物质停止外渗,褐化基本可以消除。在梨、核桃、瑞香、兰花、无花果等的组织培养中都使用了这个方法^[32]。但是红豆杉组织培养中,新鲜培养基对外植体褐化有刺激作用,可能是新鲜培养基中氧气充足,促进了 PPO 活性的提高^[33]。另有研究表明,热激可以影响植物多酚氧化酶类活性,因此研究短时间热激处理对梨组织培养褐化现象的影响应是一个很广阔的领域。此外,应用反义基因技术,将多酚氧化酶基因反向插入植物基因组,得到低褐变率的转基因植株的方法也是可行的。转基因植株由于含有反义

多酚氧化酶基因,其酚酶的合成在转录水平上受到部分或完全抑制,表达量大幅度下降,从而在一定程度上降低了酶促褐变的发生。应用此项技术,已成功培育出了抗褐变马铃薯新品种^[35]。同时研究人员也正在将此技术应用到梨的抗褐变研究中。

4 存在问题及展望

针对园艺植物组织培养过程中的褐变问题,人们已经研究了几十年,积累了大量资料,应用各种措施防止褐化也取得了一定的效果。但是关于梨组培褐化的研究还比较少,进程相对滞后。现有许多梨的防褐措施都是盲目照搬其他园艺植物的做法,并未考虑到梨自身的树种特点和品种特性差异,所以导致在实际应用中存在许多问题,如普遍认为新梢尖端作为外植体,其褐化轻于基部木质化程度高的茎段^[13],但本实验室在梨上的试验得到了相反的结果;液体培养在其他一些树种上有抗褐效果,将其应用在鸭梨上,效果却不明显。可见,仅仅照搬是不能真正解决问题的。另外,有些方法在梨上的效果虽已见报道,但其效果的重现性并不高。如有研究认为,暗培养对梨的褐化有较好的抑制作用^[25],但笔者以鸭梨为试材进行试验,却未能得到相同的结果。还有些方法如低温处理、加入褐化抑制剂和吸附剂等,虽对褐化有一定抑制效果,但会直接影响到外植体的质量和培养基的性质,进而对外植体的后期生长造成抑制^[2]。并且现行的各种防褐措施往往只是基于表面现象,治标不治本,很难从根本上消除褐化对梨组培材料的影响,致使褐变仍然是目前梨组培中一个难以逾越的技术难题。如何在参考其他树种做法的基础上,针对梨自身的褐化特点制定出一套适合于梨各品种的行之有效的防褐措施,是今后梨组培快繁工作的一个重点。与此同时,还要对梨褐

化产生的原因、生理生化机制以及遗传控制途径等方面进行更深入广泛的研究,找到褐化发生的主导因子,才能从根本上防止褐化的发生。

参考文献:

- [1] 徐凌飞,马锋旺,王哲之,等. 梨叶片离体培养和植株再生[J]. 园艺学报,2002,29(4):367-368.
- [2] 汤浩茹,王永清,邓群仙. 用8-羟基喹啉硫酸盐防止梨、苹果外植体褐变[J]. 果树科学,1998,15(2):112-115.
- [3] 李焕秀,乔霓娇. 降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J]. 西南农业大学学报,2001,23(6):524-526.
- [4] 王森,谢碧霞. 梨果肉褐变机理和防褐变技术的研究[J]. 北方果树,2004(5):4-7.
- [5] 鞠志国,朱广廉,曹宗巽. 莱阳茌梨果实褐变与PPO及酚类物质区域化分布的关系[J]. 植物生理学报,1988,14(4):256-261.
- [6] 黄丹莹,江贵波. 植物组织培养褐变产生的因素及对策[J]. 广西轻工业,2006,(5):31-32.
- [7] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [8] 及华,张海新,葛会波. 梨组织培养过程中外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 植物生理学通讯,2006,42(1):63.
- [9] 陈国刚,王祯丽,童军茂. 库尔勒香梨采后果实褐变与多酚氧化酶、酚类物质及细胞膜结构的关系[J]. 中国农学通报,2005,21(8):83-85.
- [10] 李焕秀,王乔春,李春秀. 梨芽和茎尖多酚氧化酶活性和总酚含量的初步研究[J]. 四川农业大学学报,1994,2(2):218-222.
- [11] 晏本菊,李焕秀. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 四川农业大学学报,1998,16(3):310-313.
- [12] 吴晓霞,陈刚,张彪,等. 植物组织培养中褐变的研究进展[J]. 河北林果研究,2002,17(3):284.
- [13] Mulin M. Callus formation from thin cell layers of *Anacardium occidentale* L. [J]. *Silva lusitana*, 1995,3(2):205-211.
- [14] Dan-hua Yu, Carole P Meredith. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1986,111(6):972-975.
- [15] Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养[M]. 阙国宁,郭达初,李金田,译. 北京:中国林业出版社,1998:25-25,141-143.
- [16] 程建军,马莺,杨咏丽,等. 苹果梨中多酚氧化酶酶学特性的研究[J]. 园艺学报,2002,29(3):261-262.
- [17] 毕阳,欧阳春光. 苹果梨多酚氧化酶(PPO)的部分特性[J]. 食品科学,2001,22(12):29-31.
- [18] 罗晓妙,史碧波,曾凡坤. 黄花梨多酚氧化酶特性及防褐变处理[J]. 西昌学院学报,2006,20(4):44-47.
- [19] Tale J N, Lum B S, York G K. Polyphenoloxidase in Barlett pears[J]. *Food Sci*, 1964,29:829-836.
- [20] Halim P H, Montgomery M W. Polyphenoloxidase of d'Anjou pears [J]. *Food Sci*, 1978,43:603-606.
- [21] Zhou Hong-wei, Xen Feng. Polyphenoloxidase from Yali Pear [J]. *Sci. Food Agric*, 1991,57:307-313.
- [22] 陆振鑫,夏镇澳. 戴维逊棉的组织培养与原生质体培养研究[J]. 植物学报,1991,33(2):98-103.
- [23] 崔唐兵,郭勇,张长远. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学,2001(3):16.
- [24] 金坚敏. 水稻幼穗和成熟种子诱导胚状体时的有关因子探讨[J]. 植物学通报,1992,9(2):53-54.
- [25] 高疆生,张卫芳,欧勇慧,等. 影响新梨7号组培快繁因子研究[J]. 北方果树,2003(3):4-6.
- [26] Andrew J Schmidt, James M Lee. Media and environmental effects on phenolics production from tobacco cell cultures[J]. *Biotechnol and Bio-engineering*, 1989,33:1437-1444.
- [27] 刘淑兰,韩碧文. 核桃的离体繁殖[J]. 北京农业大学学报,1986(2):143-148.
- [28] 汤绍虎,孙敏,周启贵,等. 降低“雪青”梨的外植体褐化研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(2):230-233.
- [29] 黄霞,黄学林,高东微. 防止香蕉茎尖培养中外植体褐变的研究[J]. 广西植物,1999,19(1):78-80.
- [30] Loomis W D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles[J]. *Methods in Enzymology*, 1974,31:528-545.
- [31] Loomis W D, Battaile J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes[J]. *Phyto Chemistry*, 1966,5(3):423-438.
- [32] 周俊辉,周家容,曾浩森,等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报,2000,27(增刊):481-486.
- [33] 夏铭,吴绛云,张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J]. 生物技术,1996,6(3):18-20.
- [34] Block R, Lankes C. Measures to prevent tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment[J]. *Gartenbauwissenschaft*, 1996,61(1):11-17.
- [35] Bachan C W. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger printing based on AFLP[J]. *Plant Journal*, 1996,9(5):745-753.

(编辑 郭丽娟)