

水稻类病变突变体 *lmi* 的鉴定及其基因定位

刘道峰^① 程祝宽^① 刘国庆^① 刘国振^{①②} 王 赞^① 赵显峰^① 朱立煌^{①*}

(^①中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; ^②河北农业大学农学院, 保定 071000. * 联系人, E-mail: lhzhu@genetics.ac.cn)

摘要 水稻类病变突变体 *lmi*(lesion mimic initiation)是从 γ 射线诱变的籼稻品种中粳 3037 的后代中发现的,属于起始型的类病变突变体. 无菌培养、台盼蓝染色及遮光实验表明,该突变体受光照控制细胞自主性死亡. 遗传分析表明,该突变性状由一对隐性基因控制. 利用 *lmi* 和 93-11 杂交的 F₂ 群体对 *lmi* 基因进行初步遗传定位,发现该基因定位于水稻第 8 号染色体着丝粒附近的两个微卫星分子标记 RM547 和 RM331 之间,与两者遗传距离分别为 1.2 和 3.2 cM. 进一步利用这两个标记之间发展的 CAPS 标记 C4135-8, C4135-9 及 C4135-10 对 *lmi* 基因进行精细的遗传定位,结果表明, *lmi* 基因与标记 C4135-10 共分离. 这一结果为克隆 *lmi* 基因奠定了基础.

关键词 水稻 类病变突变体 分子标记 遗传定位

类病变突变体是在没有明显的逆境、损伤或病原物侵染时,在叶片上自发地形成类似病原物侵染后出现坏死斑的一类突变体. 在拟南芥^[1,2]、玉米^[3~5]、大麦^[6]及水稻^[7,8]等植物中均已发现这类突变体的存在. 根据突变体的表型,类病变突变体可以分为两类:扩散型类突变体和起始型类突变体. 在扩散型类病变突变体中,叶片某一点的细胞坏死被外界因素激发后产生进行性扩散,而起始型类病变突变体的细胞坏死在无外界因素激发的条件下在叶片多个部位独立自发地发生^[3,9]. 目前,部分控制类病变性状的基因已被定位或克隆. 植物细胞死亡存在多种途径,通过对类病变突变基因的分析,可揭示涉及各种细胞死亡途径的有关机制. 在拟南芥中, *lsd1* 基因编码一个类似转录因子的蛋白,对细胞死亡和防卫反应起负调控作用^[10]. 大麦的 *mlo* 基因编码一个 60 kD 的跨膜蛋白,在细胞死亡及启动对白粉病的抗性上具有双重负调控功能^[11]. 玉米的 *RP1* 基因编码一个包含 NBS-LRR 的抗病基因^[12]. 以上这些突变体均在不同程度上提高了植物对病原菌的抗性,而玉米 *les22* 基因编码的卟啉脱羧酶,是植物生物合成叶绿素途径中的一个关键酶^[5]. 这些研究结果表明植物细胞死亡这一生命现象的复杂性. 因此,需要克隆更多的此类基因才能全面地了解植物的这一生物现象.

自 20 世纪 70 年代在水稻中第一次报道类病变突变体(sekiguchi lesion, *sl*)以来,已相继发现了近百种类似的突变体. 然而,到目前为止,只有 10 个突变体的相关基因被定位在遗传图谱上. Takahashi 等人^[7]从

93 个类病变突变体中筛选出 3 个对单个稻瘟病菌抗性提高的突变体,即 *cdr1*(cell death and resistance), *cdr2*, *cdr3*. Yin 等人^[8,13]通过对已定位的水稻类病变突变体进行接种白叶枯菌和稻瘟病菌处理,发现 *spl11* 突变体对白叶枯菌和稻瘟病菌具有广谱抗性,并将该基因进行了精细定位. Yamanouchi 等人^[14]克隆到一个编码热激转录因子的细胞死亡基因 *spl7*,表明植物对外界逆境的信号传递受阻也可以造成细胞死亡. 本研究所用的突变体属于起始型类病变突变体,暂命名为 *lmi*(leion mimic inatiation). *lmi* 基因位于水稻第 8 号染色体上,与已报道并定位的水稻类病变突变体位于不同的染色体上,为一个新的起始型类病变突变体, *lmi* 基因的定位与克隆对揭示植物程序化细胞死亡的新途径具有重要意义.

程祝宽等人^[15]报道了该突变体的筛选并对其进行初步的遗传分析,本文对水稻类病变突变体 *lmi* 进行了系统的性状分析和遗传分析,应用 SSR (simple sequence repeats)和 CAPS(cleaved amplification polymorphic sequences)技术并结合水稻序列数据库对 *lmi* 位点进行了精细定位.

1 材料与方法

(i) 试验材料及生长条件. 突变体 *lmi* 是在籼稻品种中粳 3037 经 γ 射线⁶⁰Co 诱变的后代中发现的类病变突变体^[15]. 水稻材料分别在北京、扬州、海南的大田及温室中种植. 为验证在无菌条件下突变体的类病变表型,将突变体种子消毒后种于 MS 固体培

培养基上, 在 28℃, 光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗的培养室中生长, 培养至三叶期后观察坏死斑点的形成情况. 叶片的中部和叶尖部用锡纸遮光, 当该叶片无锡纸处出现坏死斑点后, 观察遮光处及未遮光处坏死斑点形成情况.

(ii) 组织化学分析. 台盼蓝染色按 Bowling 等人^[16]的方法进行.

(iii) 定位群体. 突变体经 1997~2001 年连续自交纯合后分别与 93-11 杂交, 获得 F₂ 群体, 播种后 30 ~ 40 d 选取 F₂ 群体中具有细胞坏死斑点表型的植株构成定位群体.

(iv) 水稻 DNA 的微量提取. 水稻基因组 DNA 的提取按 McCouch 等人^[17]的方法并略加修改. 取 0.1 ~ 0.2 g 叶片用液氮研磨成粉状, 加入 700 μL DNA 提取液(0.1 mol/L Tris (pH 8.0), 0.05 mol/L NaCl, 0.005 mol/L EDTA, 12.5 g/L SDS), 于 65℃ 温箱中静止放置 30 ~ 60 min. 加入 200 μL 5 mol/L KAC, 充分混匀后置冰上 30 min. 再加入 500 μL 氯仿, 混匀, 10000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移到新到离心管中. 加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 轻轻混匀, 12500 r/min 离心 5 min 以沉淀 DNA, 用 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀. 将 DNA 晾干并溶于 100 μL TE, DNA 稀释 5 倍后用于 PCR 反应.

(v) SSR 及 CAPS 分析及新标记的创制. 用已发表公布的 358 个水稻 SSR 标记对突变体和 93-11 进行差异分析. 用有差异的 SSR 对定位群体进行连锁分析. 根据国际水稻测序组织已公布的水稻 PAC 或 BAC 序列设计新的 SSR 标记和 CAPS 标记, 并用 SSRIT 软件寻找 SSR 序列. 用 GENSCAN 软件预测 ORF(opening reading frame).

(vi) 连锁分析. 用 Mapmaker/Exp3.0^[18] 分析作图.

2 结果

2.1 类病变突变体的表型

lmi 迄今已繁殖多代, 通常在播种后 20 ~ 30 d, 当幼苗长至三叶期时, 在第 1 个叶片的叶尖处开始出现褐色坏死斑点, 随着植株的生长, 斑点逐渐扩大, 独立的坏死斑点数目也越来越多, 并从叶尖向叶基部发展, 大约 10 d 左右整个叶片干枯死亡. 在营养生长期, 每个分蘖上仅有新生的 2 个叶片无可见的坏死斑点, 老叶片均出现程度不同的坏死, 到植株抽穗时植株近于干枯并逐渐死亡(图 1(b)).

为验证这一规律性的突变体细胞坏死现象是否

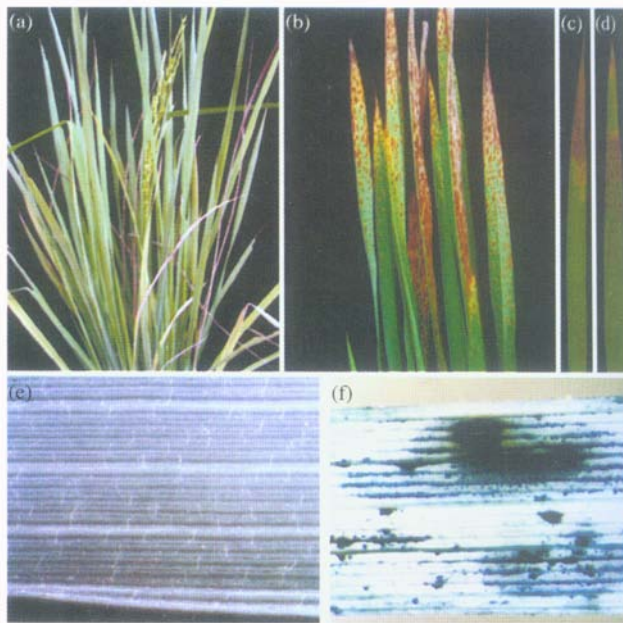


图 1 *lmi* 的表型(a)~(d)及台盼蓝染色后的叶片局部(e), (f) (a) 抽穗期中籼 3037 的叶片; (b) 抽穗期 *lmi* 的叶片; (c) 叶片的中部被遮光 7 d 后的 *lmi* 叶片; (d) 叶片的尖部被遮光 7 d 后的 *lmi* 叶片; (e) 中籼 3037(四叶期, 放大 4 倍); (f) *lmi*(四叶期, 放大 2.5 倍)

由于受外界生物因子的激发而产生, 我们将突变体置于无菌条件下生长. 突变体中坏死斑点出现的时间与温室中种植的突变体无明显差异(结果未显示), 表明突变体的突变表型并不是外界生物因子引起的, 而是突变体的自发性细胞死亡的结果.

将突变体植株上尚未出现坏死斑点的叶片用锡纸遮光处理 7 d, 揭去锡纸观察遮光处及未遮光处坏死斑点的形成情况(图 1(c)和(d)), 可见锡纸遮光处的叶片无坏死斑点的形成, 而叶片的其他部位出现明显的类病变坏死斑点, 二者形成鲜明对比. 实验结果表明, *lmi* 突变体的细胞坏死是一类受光照控制的细胞死亡. 此外, 这一现象也提示突变体的细胞死亡不是扩散性的细胞死亡, 而是起始性的细胞死亡.

2.2 突变体的组织化学分析

台盼蓝染色是检测细胞死亡和细胞膜不可逆性破坏的一种重要的组织学方法^[2]. 图 1(f)显示突变体 *lmi* 叶片上坏死斑点处的细胞有深蓝色着色, 表明该部位的细胞已经死亡或正在死亡的进程中. 而对照组中正常中籼 3037 的叶片上无着色点(图 1(e)). 同时, 在 *lmi* 叶片上, 深蓝色着色点呈散发状独立存在, 表明这种细胞死亡是自发起始的.

2.3 突变体的遗传分析

程祝宽等人^[15]利用该突变体与中粳 3037 杂交, F₁表现正常, 在 F₂代分离群体中, 正常植株和突变植株呈现 3 : 1 分离, 表明该性状可能受隐性单基因控制. 为进一步验证突变体的遗传特性, 用突变体 *lmi* 和正常的水稻品种 93-11 进行杂交, 所有 F₁ 植株均表现正常, 表明该性状是受隐性基因控制的. 在分别含 1628 株和 350 株的 2 个 F₂ 代分离群体中, 正常植株和突变植株的比例均呈现一对基因控制的 3 : 1 分离(表 1), 进一步证明 *lmi* 的类病变性状确实是由单隐性基因控制的.

表 1 杂交后代 F ₂ 群体中正常植株和类病变植株的分离				
杂交组合	正常植株	类病变植株	总数	χ^2 (3 : 1)
<i>lmi</i> /93-11	268	82	350	0.461
93-11/ <i>lmi</i>	1238	390	1628	0.947

2.4 *lmi* 基因的初步定位

用 93-11 × *lmi* 的 F₂ 群体为定位群体, 用分布于 12 条染色体上的 358 对引物, 检测 93-11, *lmi* 及其 F₁ 基因组 DNA 间的扩增差异, 利用有差异的引物分析其在群体中 20 个突变单株的分布情况, 进行基因的染色体初步定位, 其中位于第 8 号染色体着丝粒附近的 SSR 标记 RM331 和 RM547 在 93-11 和 *lmi* 基因组间检测出明显的差异(图 2). 进一步用 RM331 和 RM547 分析 F₂ 群体中 390 株突变体, 分别检测出 25 和 9 个不同的重组事件, 遗传连锁分析表明, *lmi* 位于 2 个 SSR 标记 RM331 和 RM547 之间, 遗传距离分别约为 3.2 和 1.2 cm. 由此, 将 *lmi* 基因定位于水稻第 8 号染色体的短臂着丝粒附近.

前人对水稻中其他的类病突变的定位结果^[13,19]如下: *spl6* 定位在第 1 染色体, *spl2* 在第 2 染色体, *spl3* 在第 3 染色体, *spl7* 和 *spl8* 在第 5 染色体, *spl4* 在第 6 染色体, *spl5* 和 *spl9* 在第 7 染色体, *spl10* 在第 10 染色体, *spl1* 和 *spl11* 在第 12 染色体. *lmi* 基因则位于水稻第 8 号染色体, 与上述这些突变基因无等位关系, 而且 *lmi* 的表型是与 Yin 等人^[8]和 Takahashi 等人^[7]所描述的已知的类病变突变体的表型存在明显的差异, 因此, 可以认为是一个新的突变基因.

2.5 *lmi* 基因的精细定位

以 PCR 为基础的分子标记的应用和水稻基因组序列的公布使图位法克隆基因在水稻中变得容易可

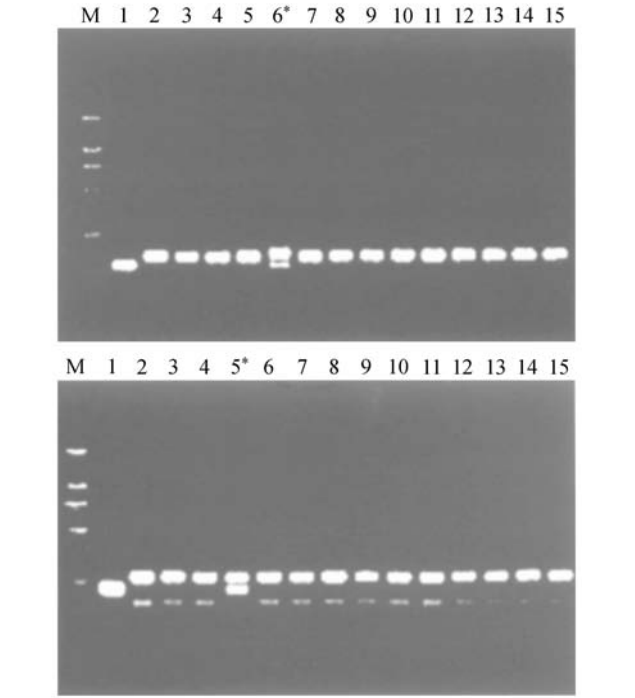


图 2 微卫星标记 RM331 和 RM547 与类病变突变性状的连锁分析
(a) RM331 在亲本间的多态及其在 F₂ 定位群体中的分离; (b) RM547 在亲本间的多态及其在 F₂ 定位群体中的分离. M 示分子量标记, 1 示亲本 93-11, 2 示突变亲本 *lmi*, 3 ~ 15 示 F₂ 代类病变单株(*示交换单株)

行. 为进一步精确定位 *lmi* 基因, 我们扩大定位群体至 5000 多株, 其中含有 1252 株突变体植株, 并运用水稻基因组数据库及相关软件发展的 CAPS(cleaved amplification polymorphic sequences)分子标记对此群体进行分析. 根据 RM331 和 RM547 这两个分子标记在遗传图谱上的位置, 利用 www.genomics.org.cn 和 www.tigr.org 网站水稻数据库的序列查询功能将它们定位到物理图谱上, 两者分别位于两个 PAC 克隆 PAC P0045D08 和 PAC P0035F08 上. 然后利用 GENSCAN(www.genes.mit.edu) 软件对位于 PAC P0045D08 和 P0035F08 之间的 PAC 序列进行在线分析, 在预测基因的 3' 端和预测基因间设计引物, 创制 CAPS 标记. 共设计 10 对 CAPS 标记的引物, 引物在 *lmi* 和 93-11 的基因组 DNA 间的 PCR 产物无差异时, 用限制性内切酶酶切, 其中引物 C4135-8, C4135-9 经酶切后在亲本间可检测出多态性(表 2).

在利用 RM547 和 RM331 分析 *lmi*/93-11 的 F₂ 分离群体中的 1252 株突变单株时, RM547 检测出 26 个交换单株, RM331 检测出 86 个交换单株. 而新创制

表 2 CAPS 分子标记及其在 93-11 和 *lmi* 基因组中的多态性

CAPS 标记	引物序列 ^{a)}	PCR 产物/bp	酶	多态性
C4135-8	U: 5'-GATCAAAGTACTGCGATGC-3'	93-11: 593	<i>Msp</i> I	93-11: 593, 388, 205
	D: 5'-CGGAAAGAGGAGATCGAGTG-3'	<i>lmi</i> : 593		<i>lmi</i> : 388, 205
C4135-9	U: 5'-CGGGATTCTCTATCGTCTG-3'	93-11: 777	<i>Nla</i> III	93-11: 300, 257, 205, 136, 131, 78, 37, 29
	D: 5'-TCGAGTTCGCTTTGTATCCT-3'	<i>lmi</i> : 777		<i>lmi</i> : 257, 205, 162, 136, 131, 78, 37, 29
C4135-10	U: 5'-TGCCAATCCTGAATACACT-3'	93-11: 518		
	D: 5'-GACAAGTCAATGCCATAGAC-3'	<i>lmi</i> : 无		

a) U 示 5' 引物序列, D 示 3' 引物序列

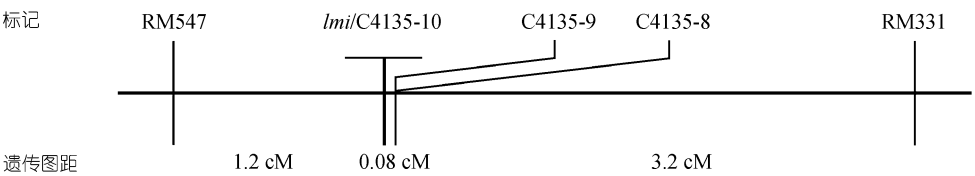


图 3 类病变基因 *lmi* 在水稻第 8 号染色体的部分连锁图

的 CAPS 标记 C4135-8 和 C4135-9 仅检测出 2 个交换单株, C4135-10 则未检测出交换单株. 遗传连锁分析结果表明, *lmi* 位点与标记 C4135-8, C4135-9 相距 0.08 cM, 与 C4135-10 呈现共分离关系(图 3).

3 讨论

在植物中存在大量的隐性遗传或显性遗传的类病变突变体, 其中部分基因已被定位或克隆. 研究表明, 造成坏死病变症状的原因很复杂, 能够引起植物代谢紊乱而破坏细胞内部环境平衡的某个基因突变都可能导致植物细胞坏死症状的发生, 如植物抗病基因的改变^[4]、叶绿素或脂肪酸合成和代谢途径中关键酶的突变^[5,20~24]以及细胞程序化死亡途径的基因调控的缺陷和失控^[10,14,25]等. 另外, 一些异源基因的表达如霍乱菌素、细菌视蛋白等^[26,27]也可以造成类病变坏死的形成. 部分类病变突变体可以产生对病原菌的广谱抗性, 这为进一步研究植物超敏反应的机理及激活机制提供了便利的条件.

相对于其他植物, 水稻中的类病变细胞死亡机制研究较少. Yin 等人^[8]报道了 *spl1-spl11* 的表型以及对白叶枯菌和稻瘟病菌的抗性表现, 11 个突变体均能激活 *PR1* 和 *PBZ1* 基因的表达, 但只有 4 个(*spl1*, *spl5*, *spl9* 和 *spl11*)对稻瘟病菌有抗性, 提示类病变性状并不完全与抗病有关, 但造成细胞死亡的机制可能相似. Takahashi 等人^[7]报道了 3 个对单个稻瘟病菌小种抗性提高的类病变突变体(*cdr1*, *cdr2*, *Cdr3*), 但未进行突变基因的定位, 所以无法与已知的突变体

及本研究中的突变体相比较. Yamanouchi 等人^[14]克隆的 *spl7* 编码的是一个热激转录因子蛋白, 表明植物抗逆信号传递途径的紊乱也可以造成水稻类病变坏死. 本研究中, *lmi* 的表型与玉米中的 *lls1* 突变体和 *les22* 突变体的表型相似, 类病变性状与发育和光照相关. 水稻植株生长到三叶期时, 自身胚乳的营养被耗尽, 植株开始利用外界营养物质并合成生长发育所需的物质, *lmi* 中细胞坏死现象首先出现在水稻特定的发育时期——三叶期, 而在此后的各个发育时期植物均表现出细胞坏死表型, 表明 *lmi* 基因的功能可能从水稻三叶期开始启动. 同时, 该突变体对光周期和光的强弱(在不同的纬度种植: 海南(18° N)、扬州(35° N)、北京(40° N); 在不同时间种植: 夏季, 冬季)不敏感, 而只对光的有无(遮光)敏感, 说明突变体植株上的细胞死亡是一类光诱导性的细胞坏死. 因此, *lmi* 基因鉴定和克隆有助于阐明水稻细胞死亡以及光信号传递机制.

水稻基因组数据库的公布和相关分子生物学软件的发展极大地推进了在水稻中利用图位法分离基因的进程, 缩短了从遗传定位到物理定位的时间. 在本研究中, 类病变突变体 *lmi* 首先被定位在水稻第 8 染色体短臂着丝点附近的 SSR 标记 RM331 和 RM547 之间, 遗传距离为 3.2 和 1.2 cM. 随后, 我们直接在 2 个标记之间的基因组序列上发展新的分子标记, 找到了与 *lmi* 基因位点紧密连锁的 CAPS 标记. 目前, 我们已经构建了覆盖 *lmi* 位点的 PAC 克隆群, 为最终

克隆 *Imi* 基因奠定了坚实的分子基础.

致谢 本工作为中国科学院知识创新工程(批准号: KXCX2-1-02-01)和国家自然科学基金(批准号: 39880020)资助项目.

参 考 文 献

1

Greenberg J T, Ausubel F M. *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J*, 1993, 4(2): 327~341

2

Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, et al. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 1994, 77: 565 ~ 577

3

Johal G S, Hulbert S, Briggs S P. Disease lesion mimic mutations of maize: A model for cell death in plants. *BioEssays*, 1995, 17: 685 ~ 692

4

Hu G, Richter T E, Hulbat S H, et al. Disease lesion mimicry caused by mutations in the rust resistance gene *rpl*. *Plant Cell*, 1996, 8: 1367 ~ 1376

5

Hu G, Yalpani N, Briggs S P, et al. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell*, 1998, 10: 1095 ~ 1105

6

Wolter M, Hollricher K, Salamini F, et al. The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype. *Mol Gen Genet*, 1993, 239(1~2): 122~128

7

Takahashi A, Kawasaki T, Henmi K, et al. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J*, 1999, 17: 535 ~ 545

8

Yin Z, Chen J, Zeng L, et al. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13: 869 ~ 876

9

Dangl J L, Dietrich R A, Richberg M H. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 1996, 8: 1793~1807

10

Dietrich R A, Richberg M H, Schmidt R. et al. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 1997, 88: 685 ~ 694

11

Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al. The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 1997, 88: 695~705

12

Collins N, Drake J, Ayliffe M, et al. Molecular characterization of the maize *Rp1-D* rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell*, 1999, 11(7): 1365 ~ 1376

13

Zeng L, Yin Z, Chen J, et al. Fine genetic mapping and physical delimitation of the lesion mimic gene *Spl11* to a 160 kb DNA segment of the rice genome. *Mol Gen Genet*, 2002, 268(2): 253 ~ 261

14

Yamanouchi U, Yano M, Lin H, et al. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7530 ~ 7535

15

Cheng Z K, Gu M H. Morphology and inheritance of a new rice leaf death mutant. *Chinese Rice Research Newsletter*, 1998, 6(3): 2

16

Bowling S A, Clarke J D, Liu Y, et al. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 1997, 9(9): 1573 ~ 1584

17

Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L). *Mol Gen Genet*, 1996, 252(5): 597~ 607

18

Lincoln S, Daly M, Lander E S. Construction genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. In: Whitehead Institute Technical Report. 2nd ed. Cambridge: Whitehead Institute. 1992

19

Kinoshita T. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups: IV current linkage mps. *Rice Genetics Newsletter*, 1993, 10: 17 ~ 33

20

Gray J, Close P S, Briggs S P, et al. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize. *Cell*, 1997, 89: 25 ~ 31

21

Molina A, Volrath S, Guyer D, et al. Inhibition of protoporphyrinogen oxidase expression in *Arabidopsis* causes a lesion-mimic phenotype that induces systemic acquired resistance. *Plant J*, 1999, 17: 667 ~ 678

22

Mach J M, Castillo A R, Hoogstraten R, et al. The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 771~776

23

Ishikawa A, Okamoto H, Iwasaki Y, et al. A deficiency of coproporphyrinogen III oxidase causes lesion formation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001,27(2): 89~99

24

Mou Z, He Y, Dai Y, et al. Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell*, 2000, 12(3): 405 ~ 418

25

Brodersen P, Petersen M, Pike H M, et al. Knockout of *Arabidopsis* ACCELERATED-CELL-DEATH11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes and Development*, 2002, 16: 490~502

26

Beffa R, Szell M, Meuwly P, et al. Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J*, 1995, 14: 5753 ~ 5761

27

Mittler R, Shulaev V, Lam E. Coordinated activation of programmed cell death and difense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant cell*, 1995, 7: 29 ~ 42

(2002-12-16 收稿, 2003-02-20 收修改稿)