

细菌性条斑病侵染水稻抗性相关蛋白研究

李东霄^{1,2}, 张国广², 郭立佳², 李敏², 毛倩², 汪卫², 陈亮²

(1. 河南科技学院, 河南 新乡 453003; 2. 厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 水稻细菌性条斑病由 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* 引起, 是目前威胁亚洲稻区水稻生产的重要病害之一。以水稻品种 9311 为研究对象, 通过差异蛋白质组学方法, 研究了病菌侵染 48 h 后水稻叶片的差异表达蛋白质, 通过分析比对、质谱分析以及数据库检索, 从中选择了 7 个上调表达的鉴定蛋白, 包括 4 个水稻 LRK 类基因, 2 个 NBS-LRR 类基因和 1 个 PR-10 基因家族成员基因。并设计相应的 PCR 引物, 从水稻 cDNA 中获得相关基因片段做探针进行 Northern 杂交分析, 结果显示, 上述基因在接种病原菌 12 h 或 48 h 后表达量增加, 表明这些蛋白质参与了抗病反应。

关键词: 细菌性条斑病; 水稻; 蛋白组学; 抗病; Northern 杂交

doi: 10.3969/j.issn.1008-0864.2010.05.11

中图分类号: S435.111.4 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2010)05-0062-06

Studies on Rice Resistance related Proteins in Response to Bacterial Leaf Streak *Xanthomonas Oryzae pv. Oryzae*LIDongxiao², ZHANG Guo-guang², GUO Li-jia², LIMin²,
MAO Qian², WANG Wei², CHEN Liang²

(1. Hehan Institute of Science and Technology, Hehan Xinxiang 453003; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: Rice bacterial leaf streak (BLS) caused by the pathogen *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo) is one of the major diseases in Asia. In this paper, the protein differently expressed after infected for 48 h by BLS was studied with rice 9311 as material through proteomic approach. Based on the result of protein blast fingerprints and data search analysis, seven identified proteins up-regulated were selected including four LRK like genes, two NBS-LRR type genes and one PR-10 gene. Relevant primers were designed to amplify the genes from rice cDNA as probe for Northern blotting. The results showed that the mRNA levels of these genes increased significantly after infected by BLS for 12 h and 48 h, indicating these proteins have participated in disease resistance.

Key words: bacterial leaf streak; rice; proteomics; disease resistance; Northern blotting

水稻细菌性条斑病 (bacterial leaf streak, BLS) 是由病原菌 *Xanthomonas campestris pv. oryzae* (*Xoo*) 引起的细菌性病害。现已成为威胁亚洲热带亚热带地区水稻生产的重要病害。由水稻细菌性条斑病所引起的产量损失通常为 15% ~ 25%, 严重时可达 40% ~ 60%^[1], 培育抗病品种是防治水稻细菌性条斑病害最为经济有效的方法。尽管对细菌性条斑病抗性鉴定、抗源筛选方

面做了大量工作, 但是, 目前还没有发现对细菌性条斑病免疫的品种。因此, 阐明水稻对细菌性条斑病的抗性机理, 分离和克隆细菌性条斑病相关抗性基因, 并进一步明确这些基因的抗病机制, 对培育抗病品种, 控制细菌性条斑病的发生与发展, 减少经济损失具有重要的理论和现实意义。

已有研究结果表明, 水稻细菌性条斑病是典型的数量性状^[2,3]。近年来, 尽管在水稻细菌性

收稿日期: 2010-07-05 修回日期: 2010-08-14

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA10Z432); 国家重大科技专项 (2008ZX08001-001; 2009ZX08009-045B); 教育部重点项目 (重点 01102) 资助。

作者简介: 李东霄, 博士研究生, 主要从事农业生物技术研究。通讯作者: 陈亮, 教授, 博士, 主要从事农业生物技术研究。

Tel: 0592-2186050 E-mail: chenl@xmu.edu.cn

条斑病抗性基因的定位和分子标记辅助育种研究方面已取得一些新的进展^[2-5],但是,获得精确定位和克隆的典型数量抗性基因(QTL)极少,因而限制了对数量抗性基因表达与调控及抗性机理的研究。

植物的抗性机制是由不同水平的多个抗性途径交叉、重叠组成,涉及的分子和作用的途径十分复杂。蛋白质是基因表达的产物,是细胞各种代谢和调控途径的主要执行者。蛋白质组学是基因功能研究的重要手段,也是生理学、遗传学和基因组学研究的桥梁^[6]。因此,从蛋白质组学入手研究水稻对细菌性条斑病菌侵染的应答机制,对于发现、鉴定抗性相关基因以及深入揭示水稻应答细菌性条斑病病原菌侵染的抗性机制具有十分重要的意义。

在对细菌性条斑病病原菌侵染后的佳福占和明恢63的差异蛋白质组学研究中,报道了一些与细菌性条斑病抗性密切相关的蛋白^[17]。本研究选取水稻品种9311作为实验材料,以期在这种已完成全基因组测序的水稻品种中,能发现并鉴定出更多的与抗性密切相关的蛋白质。为在蛋白质水平上全面系统地认识病原侵染后植株的抗病特征,比较不同水稻品种间的异同,以及进一步揭示病原菌侵染后抗性基因的表达与调控和抗性机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水稻9311种子由国家杂交水稻研究中心曹孟良研究员惠赠;细菌性条斑病病原菌为南方稻区强毒力菌株“89773-1-1”,由福建农林大学植保学院惠赠。

水稻幼苗的培养及接菌参考相关文献^[27]。对照组用无菌水代替。接菌后2d取样,从处理后的植株上剪下其主茎第4叶位(包括第4叶位)以上的叶片,然后迅速置液氮中冷冻保存,或直接用于提取蛋白质。

1.2 蛋白质提取和双向电泳

蛋白质提取参照Davernal等^[8]和L等^[9]的方法。提取物经低温冷冻真空干燥后于 -80°C 长期保存。亦可将干粉用裂解液裂解。裂解后将上清液分装置于 -80°C 保存或直接用于双向电泳分

离。样品蛋白质的含量测定使用BCA蛋白质浓度测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc),使用方法参照说明书。

第一向电泳使用管状胶条,电泳完成后,将胶条置于12%TCA中浸泡保存,清洗平衡后胶条立即进行第二向SDS-PAGE电泳。胶条的制备及电泳程序的设置参照文献^[9]。

1.3 差异蛋白质点的检测和质谱分析

蛋白质染色采用银染法^[19]。染色后,使用UMAX POWERLOOK III扫描仪在透明模式下进行扫描,获得蛋白质表达图谱。使用ImageMaster 2D Platinum 5.0软件对图谱进行分析,经人工校订后,那些表达量差别大于1.5倍的蛋白质点被认为具有显著性差异,并从胶上切下,以进行下一步的质谱分析。

差异蛋白质点的处理参照Shevdhenko等^[11]和Gharahdagh等^[12]的方法,样品由厦门大学生命科学学院分析测试中心进行分析。质谱仪为REFLEXIM III MAID-TOF(BRUKER)。分析前用标准Malt峰作为外标校正质谱峰,结果由Flex analysis 2.0软件分析,并使用已知的胰蛋白酶自解峰作为内标校正并去除角蛋白污染峰,获得肽质量指纹图谱(Peptide mass fingerprinting, PMF)。

1.4 蛋白质鉴定

获得的PMF通过MASCOT软件分别检索NCBI非MSDB和Swiss-Prot数据库。检索条件设定为:对表观P值及分子质量(MW)未做要求;肽片段分子质量最大容许误差范围为 0.2 Da 不完全裂解位点1个;固定修饰和可变修饰分别选择Carbamidomethyl(C)和Oxidation(O);物种来源选择Oryza sativa。蛋白质的认定主要考虑得分、匹配肽段和匹配肽段覆盖率,同时,还考虑蛋白质的分子质量和等电点等因素。

1.5 Northern杂交分析

1.5.1 水稻植株总RNA的提取 RNA提取试剂为Trizol Reagent(目录编号15596-026, Invitrogen公司),提取方法参照说明书。

1.5.2 引物设计 选取部分鉴定的抗细菌性条斑病密切相关蛋白,根据其蛋白质保守区序列设计引物(表1),通过RT-PCR扩增其保守区基因片段。引物由Invitrogen公司合成。

表 1 RT-PCR引物
Table 1 Primers used for RT-PCR

蛋白质点 Protein spots	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
1	5'-GCATGGGAAATCCACCTT-3'	5'-CCAAATGTCGTCCAACACAAG-3'
2	5'-GTTTGGGAAGGCTACGATGG-3'	5'-CCAATAGGACAACACCAAAGC-3'
3	5'-CAGGAGGATTTGGAAAGAGTGTA-3'	5'-GCGAAGACATCGGTGAGGG-3'
4	5'-TGGAGAAGGTGGGTTTGGG-3'	5'-CGCAGTATGATAATGCCAAATG-3'
5	5'-TGGTGCATTTGGAACGTATAT-3'	5'-CAAAGCTGTAGACATCCGACT-3'
6	5'-GGGGTTCGGTAAAGTGTA-3'	5'-AAGAAGCATTATGCCATAACCA-3'
7	5'-ATGGCTCCGGTCAGCATCTC-3'	5'-TTAAGCATACTCGGTAGGGTIGAGC-3'

1.5.3 RT-PCR和目的片段测序 反转录试剂为 Ready-To-Go You Prime First Strand Beads(产品编号 27-9264-01, Amersham Biosciences公司), 方法参照说明书。

PCR体系 (20 μ L) 为: 10 \times PCR buffer 2 μ L, TaqDNA polymerase 0.3 μ L (5 U/ μ L), dNTP 0.4 μ L (10 mmol/L), 模板 0.5 μ L, 上游引物各 0.3 μ L (1 μ mol/L), 加 ddH₂O 使终体积至 20 μ L。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

扩增片段由 Invitrogen公司测序。

1.5.4 Northern杂交验证 用同位素³²P标记 RT-PCR得到的基因保守区片段, 并作为 Northern杂交的探针, 提取水稻细菌性条斑病接菌前、接菌

12 h和 48 h的水稻叶片总 RNA, 取同等数量 (10 μ g) 的样品进行 Northern杂交^[13]。

2 结果与分析

2.1 细菌性条斑病病原菌浸染后水稻叶片蛋白质差异表达及鉴定结果

电泳后获得蛋白质表达图谱, 每张图谱大约可检测出 1500个蛋白质点。其中, 选取蛋白质表达变化量差别在 1.5倍以上的蛋白质点, 用于进一步的蛋白质鉴定。差异蛋白质点经胶内酶切、质谱分析, 得到相应蛋白质点的肽质量指纹。经相关数据库检索, 得到了相应差异蛋白质的鉴定结果。从上述结果中, 选取 7个可能参与对病原菌侵染防御作用的鉴定蛋白, 做进一步的 Northern杂交验证 (图 1, 表 2)。

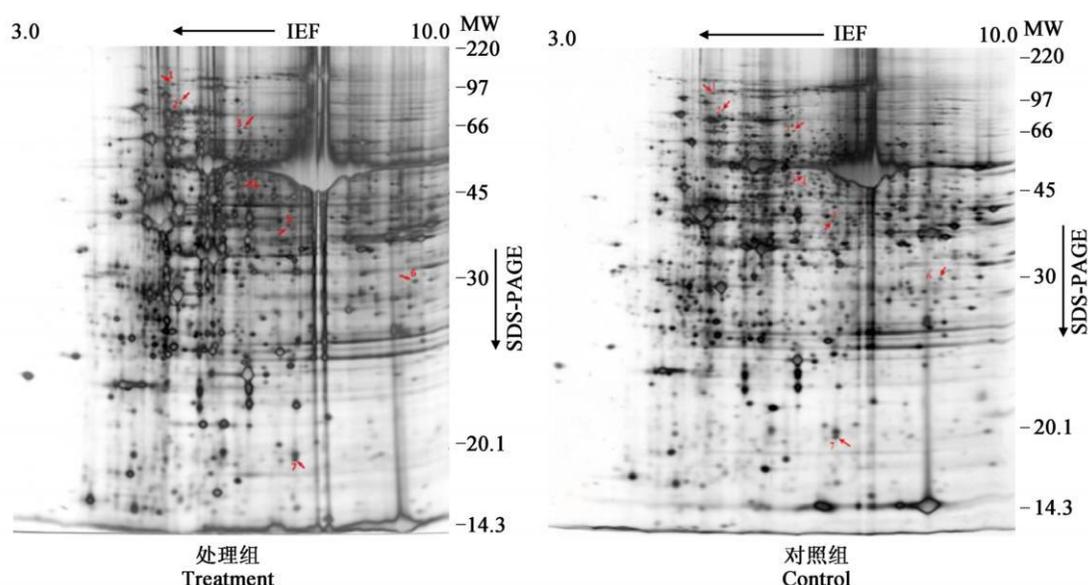


图 1 细菌性条斑病病原菌浸染 2 d 后的水稻叶片蛋白质双向电泳图谱
Fig. 1 The 2-D map of rice leaf proteins at 2 d after Xoo infection

表 2 部分上调蛋白的检索鉴定结果
Table 2 Some up regulated proteins identified by database search with peptide mass fingerprints

编号 Spot No	蛋白描述 Protein description	理论分子质量 和等电点 Theoretical MW / pI	匹配肽段数 Matched peptides	序列覆盖率 (%) Sequence coverage (%)	Mowse得分 Probability based Mowse scores	相对蛋白含量 ± SE ^a Relative protein level ± SE ^a
1	预测的抗病蛋白质 Putative disease resistance protein	139 069 / 6.97	10	10	38	1.45 ± 0.08
2	预测的类受体蛋白激酶 Putative receptor like protein kinase	104 567 / 6.25	9	14	59	1.98 ± 0.11
3	预测的受体型蛋白 激酶 IRK1 Putative receptor type protein kinase IRK1	74 938 / 6.37	5	14	45	1.63 ± 0.17
4	预测的受体蛋白激酶 Putative receptor kinase	98 054 / 5.90	7	11	35	1.57 ± 0.16
5	类受体蛋白激酶 Receptor like kinase	74 669 / 8.38	7	12	56	1.74 ± 0.13
6	预测的类受体蛋白激酶 Putative receptor like protein kinase	67 285 / 5.36	7	18	53	1.55 ± 0.07
7	根部特异病程相关蛋白-10 Root specific pathogenesis related protein 10 (PR-10)	17 004 / 4.88	5	29	44	1.65 ± 0.19

a SE 标准差 Standard error

2.2 转录水平的 Northern 杂交分析

提取的植株总 RNA 经反转录合成 cDNA 后, 以此作为反应模板, 扩增出相应的基因片段, 测序后得到基因序列。用同位素 ³²P 标记目的基因片段并作为 Northern 杂交的探针, 分别提取细菌性条斑病菌接种前、接种 12 h 接种 48 h 的水稻叶片总 RNA 进行 Northern 杂交分析, 结果显示接种后上述基因的转录水平在 12 h 或 48 h 后均有不同程度增加 (图 2)。

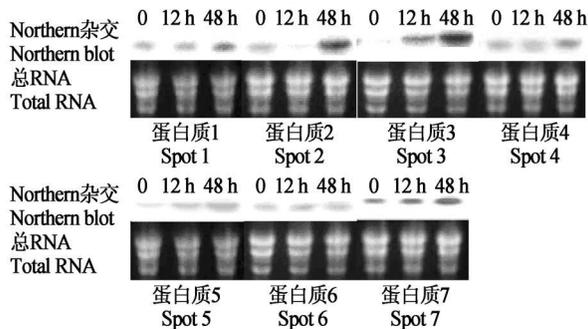


图 2 病原菌侵染后 12 h 和 48 h 的 Northern 杂交检测结果
Fig 2 The result of Northern blot after infection for 12 h and 48 h

3 讨论

当植物受到病原菌侵害时, 通常涉及到植物抗病基因 (resistance gene R) 产物与病原菌无毒基因 (avirulence gene Avr) 产物的相互作用, 启动信号传导途径及激活防卫基因, 引发复杂的防御反应等主要环节。大多数 R 基因产物在蛋白质结构上具有高度的保守性, 存在一些共同的结构域。本研究 7 个蛋白质中有 2 个为参与抗病防御反应信号传导过程的 R 蛋白, 分别为蛋白质 1 (putative disease resistance protein) 和蛋白质 4 (putative receptor kinase)。

R 基因介导的抗病性表现为质量抗性, 大多符合“基因对基因”假说^[14]。尽管有研究者认为水稻细菌性条斑病抗性属于质量性状^[15~17], 但更多的研究者认为它属于典型的数量性状^[2, 3, 18~22]。数量抗病性是建立在植物与特定病原菌亲和性基础上的, 主要由多基因控制, 通常伴随着与环境或遗传背景的广泛互作, 具有数量遗传特性的复杂

抗病形式。然而, R基因可以充当数量抗性基因座 (Quantitative resistance locus, QRL) 来发挥抗性作用的观点目前也正在被更多学者接受, 这一观点的提出是建立在已定位的部分 QRL与已知的 R基因位于共同位置的现象^[23]。上述两种 R蛋白的作用机制还有待于进一步的研究。根据蛋白质 1和蛋白质 4的序列设计相应的引物, 经 RT-PCR 获得了对应的基因片段, Northern 结果显示, 上述基因在接菌 12 h 和 48 h 后, 转录水平都有所提高, 与蛋白质组学的研究结果相同。

在植物体的防御反应中, 植物类受体蛋白激酶 (receptor like kinases, RLKs) 作为信号传导蛋白可能参与植物体的抗病防御反应。RLKs 具有内在的激酶活性, 是植物许多信号传导途径中的关键组分, 通过胞外结构域与胞外信号分子, 如离子、小分子或多肽等的特异结合来激活胞内激酶域的自磷酸化和互磷酸化活性, 完成跨膜传递信号的功能。越来越多的研究表明, RLK 作为胁迫表达相关基因的一部分参与了植物体应答逆境和与防御相关的过程^[24~29]。然而, 由于 RLKs 还参与了植物生长发育的调节和植物激素的信号传导过程, 以及植物信号传导的复杂性, 因而, 这类蛋白质的确切功能和作用方式, 还需进一步的研究。本研究 7 个蛋白质中有 4 个属于此类蛋白质, 分别为蛋白质 3、蛋白质 4、蛋白质 5 和蛋白质 6。通过对上述蛋白质保守区段的检索比对, 根据其激酶保守区段设计 PCR 引物, 随后通过 RT-PCR 从水稻 cDNA 中获得以上蛋白质相对应的基因片段。所获得的 4 个基因片段长度均在 550~600 bp 之间, 其核苷酸序列与日本晴相应基因序列的同源性均达到 98% 以上。Northern 杂交分析显示, 蛋白质 3 对应基因在接菌 12 h 后没有检测出 mRNA, 在接菌 48 h 后转录水平显著提高, 蛋白质 4 对应基因在 12 h 后转录水平略有下降, 而 48 h 后则显著上升。其他基因在病菌浸染 12 h 和 48 h 后转录水平均有所提高, 与蛋白质组学的研究结果相同。

在植物与病原物互作中, 有大量基因被诱导表达, 它们编码的蛋白质参与了植物对病原物的防卫反应, 这类基因称防卫基因。本研究 7 个蛋白质中蛋白质 7 鉴定为病程相关 (Pathogenesis related, PR) 表达蛋白, 属于 PR-10 蛋白。PR 蛋白具有潜在的抗病原物活性, 过量表达可提高植

物对多种病原物的抗病性^[30]。本试验通过 RT-PCR 同样得到了 PR-10 类似蛋白的基因片段, 而 Northern 杂交分析也显示该基因在水稻受病菌侵染 12 h 和 48 h 后转录水平提高, 与蛋白质组学的研究结果相同。虽然各种 PR 蛋白的具体功能还不是很清楚, 但由本实验结果看, 该鉴定蛋白很可能在对病原菌侵染的防御作用中起着重要作用。

本文通过蛋白质组学技术研究了细菌性条斑病病原菌浸染后水稻叶片的蛋白质差异表达, 从中选取了 7 个可能与抗细菌性条斑病密切相关的鉴定蛋白, 并进而从水稻 cDNA 中获得了这 7 个蛋白质的基因片段。Northern 杂交实验证明了细菌性条斑病病原菌浸染 12 h 和 48 h 后, 上述基因的转录水平显著提高。水稻佳福占^[1]和明恢 63^[7]的差异蛋白质中均发现有与上述 7 个蛋白质相同的蛋白质种类, 但未发现同一种蛋白质, 相关研究正在进行。上述结果为进一步研究相关蛋白的功能、揭示水稻的抗病机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 陈芳育, 黄青云, 张红心, 等. 水稻品种“佳福占”应答细菌性条斑病病原菌侵染的蛋白质组学分析 [J]. 作物学报, 2007, 33(7): 1051-1058
- [2] Tang D Z, Wu W R, Li W M, et al. Mapping of QILs conferring resistance to bacterial leaf streak in rice [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 286-291
- [3] Chen CH, Zheng W, Huang XM, et al. Major QIL conferring resistance to rice bacterial leaf streak [J]. Agric Sci China, 2006, 5(3): 101-105
- [4] 陈志伟, 吴为人, 周元昌, 等. 水稻细菌性条斑病抗性微卫星 (SSR) 标记的筛选及其在标记辅助选择中的应用 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2004, 33(2): 202-205
- [5] 郑景生, 李义珍, 方宜钧. 水稻第 2 染色体上细菌性条斑病抗性 QIL 的检测 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(9): 1923-1925
- [6] Ziv M, de Vienne D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology [J]. Plant Mol Biol, 2000, 44: 575-580
- [7] 黄青云, 林涛, 陈芳育, 等. 双向电泳联用质谱技术研究水稻明恢 63 对细菌性条斑病侵染的应答 [J]. 厦门大学学报, 2006, 45: 86-90
- [8] Danelval C, de Vienne D, Ziv M, et al. The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. Electrophoresis, 1986, 7: 52-54
- [9] Li D X, Wang L J, Yang X P, et al. Proteomic analysis of blue light induced wounding response in *Cucurbita australis* [J]. Plant Mol Biol, 2010, 72: 205-213

- [10] Moriz E, Kloegh T N, Vorum H et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight analysis [J]. *Proteomics* 2001, 1: 1359—1363.
- [11] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels [J]. *Anal Chem*, 1996 68: 850—858.
- [12] Ghahrdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity [J]. *Electrophoresis* 1999, 20: 601—605.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual* [M]. (2nd ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 366—489.
- [14] Flor H. Current status of the gene for gene concept [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1971 9: 275—296.
- [15] 何月秋, 文艳华, 黄瑞容, 等. 杂交水稻对细菌性条斑病抗性的遗传研究 [J]. *江西农业大学学报*, 1994 16(1): 62—65.
- [16] 张红生, 陆志强, 朱立宏. 四个籼稻品种对细菌性条斑病的抗性遗传研究 [J]. *中国水稻科学*, 1996 10(4): 193—196.
- [17] 周明华, 许志刚, 粟寒, 等. 两个籼稻品种对水稻细菌性条斑病抗性遗传的研究 [J]. *南京农业大学学报* 1999 22(4): 27—29.
- [18] 种藏文, 王长方, 卢同, 等. 福建省水稻细菌性条斑病菌致病性分化研究 [J]. *福建农业科技*, 1989 5: 2—3.
- [19] 向建国, 任新国, 戴良英. 水稻细菌性条斑病菌致病力分化初步研究 [J]. *湖南农业科学*, 1991 1: 27—28.
- [20] 张晓葵, 杨念军. 稻种资源水稻抗细菌性条斑病的抗性鉴定 [J]. *湖北农业科学*, 1992 3: 33—35.
- [21] 柯昉, 李维明. 水稻细菌性条斑病、白叶枯病的抗性遗传及其若干农艺性状的相关分析 [J]. *福建农业科技*, 1997 4: 4—5.
- [22] 韩庆典, 陈志伟, 邓云, 等. 水稻细菌性条斑病抗性 QIL9B1 S5^a的精细定位 [J]. *作物学报*, 2008 34(4): 1—4.
- [23] Wissler K J, Sun Q, Huibert S H et al. Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad spectrum quantitative disease resistance [J]. *Genetics* 2005 169(4): 2277—2293.
- [24] Thomas C M, Dixon M S, Pamisike M et al. Genetic and molecular analysis of tomato Cf genes for resistance to *Cladosporium fulvum* [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998 353(1374): 1413—1424.
- [25] Song W Y, Wang G L, Chen L L et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa7* [J]. *Science* 1995 270: 1804—1806.
- [26] Wang G L, Wu C, Zeng L et al. Isolation and characterization of rice mutants compromised in *Xa7*-mediated resistance to *X. oryzae py. oryzae* [J]. *Theor Appl Genet*, 2004 108: 379—384.
- [27] Lee S C, Kim J Y, Kim S H et al. Trapping and characterization of cold responsive genes from T-DNA tagging lines in rice [J]. *Plant Sci*, 2004 166: 69—79.
- [28] Jung E H, Jung H W, Lee S C et al. Identification of a novel pathogen induced gene encoding a leucine-rich repeat protein expressed in phloem cells of *Capsicum annuum* [J]. *Biochim Biophys Acta* 2004 1676: 211—222.
- [29] Sasabe M, Naito K. Elicitor responsive lectin-like receptor kinase genes in BY-2 cells [J]. *DNA Seq*, 2007 18(2): 152—159.
- [30] Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase [J]. *Plant Cell* 2003 15: 745—759.