

蓝猪耳研究进展

侯雷平, 李梅兰

(山西农业大学园艺学院, 山西 太谷 030801)

摘 要: 由于特殊的花器官结构和开花习性, 蓝猪耳成为一种理想的适于进行科学研究的观赏花卉。介绍了蓝猪耳组织培养和遗传转化国内外研究的概况, 并详细论述了利用蓝猪耳为材料进行授粉受精机理和花色代谢研究的一些最新成果。

关键词: 蓝猪耳; 组织培养; 遗传转化; 授粉受精; 花色代谢

中图分类号: S681.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2008)05-0088-05

Progress in Research of *Torenia*

HOU Lei-ping, LI Mei-lan

(The College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: *Torenia* is an optical ornamental plant for scientific research because of its specific flower structure and flowering habit. The paper introduced the research progress in tissue culture and genetic transformation of *torenia* around the world and summarized new results in details about fertilization and flower color mechanism using *torenia* as the research material.

Key words: *Torenia*; Tissue culture; Genetic transformation; Fertilization; Flower color mechanism

随着人们生活水平的提高, 对花卉的需求量逐年增加, 目前花卉已成为人们生活中不可缺少的一部分, 因此有关花卉方面的研究也就变得越来越重要。

蓝猪耳 (*Torenia fournieri* Linden) 又名夏堇、虎口仔, 是玄参科蓝猪耳属 (翼萼属) 的一年生草本植物。它原产于印度支那半岛, 主要分布于亚洲、非洲的热带和亚热带地区, 喜欢温暖湿润的气候, 不耐寒, 适宜作为花坛和地被植物用于夏季花卉的栽培, 是一种重要的夏季观花植物。随着近年来育种新技术的应用, 许多新花色、花型和株型的品种产生并受到人们的普遍欢迎。除作为重要的夏季观赏花卉以外, 由于生长期短、容易再生、种子小且数量多、适合热带气候以及具备特殊的裸露胚囊^[1], 蓝猪耳还是一种理想的植物细胞分化、花器官发育和授粉受精研究的模式植物。因此蓝猪耳不仅在园艺生产实

践中占有重要的地位, 而且还具有很高的科研价值。

1 蓝猪耳组织培养研究概况

组织培养技术在花卉生产中的应用不仅为花卉的快繁提供了保证, 而且还在花卉植物的脱毒栽培中发挥作用。在育种中组织培养可使育种的材料微型化, 便于原始材料的保存和有益变异的选择。另外组织培养技术的完善还是生物工程技术中的基本研究手段, 是分子育种技术的关键步骤之一。因为成功的植物基因转化首先依赖于良好的植物受体系统, 而所谓受体系统就是用于转化的外植体通过组织培养途径或其他非组织培养途径, 能高效、稳定地再生无性系, 并能接受外源 DNA 整合, 对转化筛选试剂敏感的再生系统。因此组织培养的技术和方法直接关系到转基因的成败, 是植物基因转化不可缺少的

· 收稿日期: 2008-01-23

项目来源: 山西省自然科学基金项目 (20041091); 中国博士后科学基金项目 (2004036504)

作者简介: 侯雷平 (1963-), 男, 山西垣曲人, 副教授, 主要从事设施园艺教学与研究工作。

步骤,是进行基因转化的先决条件。

早在1973年 Chlyah^[2]就已经开始了蓝猪耳组织培养方面的研究,发现蓝猪耳的表皮层(茎段)可以形成各种组织器官。当联合施用 IAA 和激动素或者单独施用 6-BA 会诱导不定芽的产生,仅使用 IAA 或 NAA 可以诱导不定根的产生。后来 Kamada^[3]和 Tanimoto 等^[4]进一步研究了外植体生理状态、培养基成分、植物激素等对茎段不定芽形成的影响。用生长素和细胞分裂素等处理离体的茎段,发现生长素类可以诱导愈伤组织和根、芽的产生,而细胞分裂素可以诱导芽的形成。当茎段同时采用 NAA 和 6-BA 处理时,可以诱导较高的出芽率。Tanimoto 等^[5]还进行了蓝猪耳离体花芽形成的培养和离体胚培养。在1996年, Hadi 和 Bridgen^[6]提出了蓝猪耳组织培养的优化条件,使得蓝猪耳离体培养条件基本成熟。

我国进行蓝猪耳组织培养的研究较晚。最初佟晓南等^[7]研究了不同激素对比对蓝猪耳叶片再生的影响,发现 6-BA 和 NAA 配合最适于蓝猪耳叶片芽的诱导。后来陶均等^[8]进行蓝猪耳叶片经过愈伤组织再分化芽的研究,发现叶片在 MS + 2,4-D + NAA 的培养基中能形成愈伤组织,愈伤组织再转到含 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基中可以分化芽体。宾金华等^[9]进行蓝猪耳植株诱导愈伤组织的研究,发现光照下带有根的完整植株生长在 MS + NAA 0.15 mg/L + 6-BA 2 mg/L 的培养基上能够诱导出大量的愈伤组织。无菌苗的幼叶在培养基 MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2 mg/L 中不定芽诱导率最高达到 81.3%,在 MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基上有效不定芽数最多。在前人试验结果的基础上,李梅兰等^[10]进行了蓝猪耳再生最佳培养基的筛选,得出 1/2 MS + BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L, MS + BA 1 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L 和 1/2 MS 分别是诱芽、诱愈及生根的最佳培养基。不同外植体诱芽结果显示,根、茎和叶片都可以诱导不定芽的产生,但以叶片诱导的效率为最高,诱导率可达 90.91%。几种再生体系比较的结果表明,蓝猪耳叶片诱芽的再生体系为最佳再生体系。无菌苗叶片接种 6 d 时,叶片就长出了均匀且稀疏的高 1 mm 的小芽,经过继代,一个月就可以切下小苗进行生根,3~5 d 后无菌苗就可以生根,长到一定的大

小就可以移栽,成活非常容易。这样蓝猪耳的再生体系就进一步被优化,可以应用于大批量的生产和科学研究中。

2 蓝猪耳遗传转化研究进展

在花卉植物的育种中,传统上主要采用芽突变体扦插和杂交育种的方法,这些方法难度大,周期长。随着分子生物学技术的逐渐发展,分子育种(转基因)技术在改良植物花色^[11]、花期、采后寿命、花型、株型等方面取得重要的进展^[12],这就为蓝猪耳的品种选育和改良提供了一条新的途径,因此蓝猪耳遗传转化研究就变得非常必要。

目前蓝猪耳遗传转化系统在国外已经比较完善。早在1995年,日本的 Aida^[13]就发表了根癌农杆菌介导的蓝猪耳转化方法,并在2001年正式出版^[14]。现在日本通过遗传转化已经成功地进行了蓝猪耳花期延长、花色改良及抗除草剂等分子育种。Aida^[15]将乙烯合成关键酶 ACC 氧化酶的正义和反义基因分别转入蓝猪耳植物都得到了花期延长的新品种。野生型植物花期平均为 2 d,而正义转基因植物花期平均为 2.7~7.1 d,反义转基因植物为 2.5~2.7 d,经过转化得到的转基因植株花期均比野生型延长。经过后代的遗传性分析,引入的性状可以在后代稳定遗传。

在花色和花型改良方面, Aida 等^[16,17]利用正、反义基因引入可以使植物的内源基因失活,从而导致花色代谢发生变化的原理,将 *CHS* 和 *DFR* 基因以正义和反义的方式转入蓝猪耳植株中,产生的转基因植株花朵出现了几种性状:有的花冠较野生型颜色变浅,有的颜色比野生型加深,而且花冠和花筒的颜色变化不同步,反义基因整合的植株趋向于颜色全部变浅,而正义基因整合的植株花筒变浅的程度强于花冠变浅的程度,花冠和花筒颜色的对比度增加。另外还伴随产生了一些花瓣为波纹状和斑点状着色模式的新品种^[18],有的花瓣内部颜色较花瓣边缘的颜色更深,有的花瓣深浅颜色呈现斑点状分布,得到了一系列新的花色品种。对转基因植物进行后代遗传分析的结果表明,产生的新性状可以稳定遗传给后代。另外 RNA 干扰(RNAi)技术也已经成功的应用于蓝猪耳的花色改良方面, Fukusaki 等^[19]将 *CHS* mRNA 的编码区和 3'端的

非翻译区分别作为 RNAi 的靶位点,成功的诱导了基因的沉默,使原来的蓝色花分别转变为白色和浅色的花。

我国蓝猪耳遗传转化的研究起步略晚,但已经获得成功,而且转化效率也比较高。陈丙春等^[20]进行根瘤农杆菌介导蓝猪耳遗传转化的研究,发现蓝猪耳转化芽的最适卡那霉素浓度为 400 mg/L,菌液浸染时以稀释 74 倍的菌液浸染叶盘 10 ~ 20 min 为宜;进行共培养时,在含 20 μ mol/L 乙酰丁香酮的固体培养基上共培养 7 ~ 8 d,可获得转化芽诱导率为 27.2%;另外在不同外植体的比较中,茎段作为外植体,其转化芽诱导率要高于叶盘的转化芽诱导率,而且其转化芽比叶盘的转化芽健壮;试验结果还表明,根瘤农杆菌介导的蓝猪耳转化获得了抗性再生植株,转化率为 24.1%。李梅兰等^[21]系统研究了影响根瘤农杆菌介导蓝猪耳转化效果的各方面因素,初步建立了一套高效稳定的蓝猪耳遗传转化系统,研究结果表明,农杆菌侵染叶片外植体效率最高,外植体预培养不利于农杆菌的侵染,乙酰丁香酮能大大提高根瘤农杆菌转化蓝猪耳的效率;另外,菌液浓度、侵染和共培养的时间及再生的途径等均对转化效率有一定的影响,一般以菌液浓度 OD600 值为 0.5 的菌液侵染 5 min 的 GUS 染色外植体百分率最高,染色效果也是该组合最佳;共培养以 25 $^{\circ}$ C 共培养 4 d 即可;比较不同的再生途径,通过诱愈再生体系和直接诱芽再生体系都可以成功地进行外源基因的转化,诱芽和诱愈抗性苗产生的频率分别为 7.33% 和 8.33% (抗性小苗数/外植体数),两者差别不大。由于诱愈途径耗费时间比较长,因此在实践中以叶片诱芽再生途径较为理想。在蓝猪耳的遗传转化研究中,叶片外植体与农杆菌共培养后,经过抗性芽的诱导、根的再生,70 d 左右就可以获得抗性苗。抗性植株经 GUS 染色、PCR 分析和 Southern blot 检测,外源基因已经整合到蓝猪耳基因组中,转化频率为 7% ~ 8%。

3 蓝猪耳在植物授粉受精研究中的应用

由于蓝猪耳再生容易,且在胚囊发育的四核期,胚囊从胚珠的珠孔端伸出形成一个裸露的胚囊。在胚囊发育成熟时,助细胞、卵细胞和大部分中央细胞均暴露在胚珠组织之外,所以是研究

被子植物细胞分化、胚囊发育和受精过程极好的模式植物。Cantrilld 等^[22]以蓝猪耳为材料,在茎间组织表皮细胞的细胞质和内质网部位分别微注射放射性多肽和糖苷,发现细胞质注射的细胞看不到糖苷在细胞间的交换,而注入内质网类似结构的细胞在相邻细胞中可以观察到探针的迅速扩散。这项研究的结果证实,内质网在细胞间物质的交流中发挥作用。

Wallwork 等^[21]利用共聚焦显微镜对蓝猪耳的授粉受精过程进行研究,发现受精过程在授粉后的 12 ~ 16 h 内连续进行,精细胞和卵细胞的高频率融合主要发生在授粉后的 14 h 的时段。精细胞穿过降解的助细胞要花几个小时,而精细胞和各自雌配子的融合同时进行。另外他们还观察了授粉受精过程中胚囊结构和卵细胞、助细胞细胞壁结构的变化。

Tetsuya^[24]研究蓝猪耳花粉管和胚囊离体受精的过程,发现活助细胞的丝状器在花粉管的伸长过程中对花粉管的生长起着准确的指导作用,助细胞可以控制花粉管生长的方向,花粉管只选择完整的、未受精的胚囊,而不会选择胚珠经过热处理或助细胞遭到破坏的那些胚囊,说明花粉管受离体活助细胞丝状器的特异吸引。后来通过蓝猪耳花粉和胚囊离体培养技术的改进,Tetsuya^[25]详细观察了蓝猪耳花粉管进入胚囊的受精过程,当花粉管到达目的胚囊后,就进入到珠孔端,在两个助细胞之间挤出一条通道,然后花粉管顶端破裂,开始爆发式的喷出内含物,喷出的内含物随后快速流入胚囊。花粉管物质的释放马上促使一个助细胞破裂,而另一个助细胞可以存活几天,在花粉管释放物质的起始时,助细胞保持完整,当完全释放后,该助细胞也马上降解以将雄配子转移到雌配子处。Higashiya-ma^[26]对蓝猪耳授粉受精过程中助细胞在花粉管进入过程中的功能进行研究,也得出助细胞是双受精过程中花粉管生长方向的导引者和接受者的结论。这些结果对于研究开花植物的两性生殖过程具有非常重要的意义。

我国利用蓝猪耳为材料进行的授粉受精机理研究也比较多。房克凤等^[27]利用蓝猪耳进行了胚胎发生过程中细胞表面 3 种凝集素受体动态分布的研究。姚成义^[28]等研究了钙和硼对蓝猪耳花粉萌发和花粉管生长的影响。结果表明, Ca^{2+} 主要影响花粉萌发速度和花粉管生长速度,

低 Ca^{2+} 不利于花粉管生长;而高 Ca^{2+} 抑制花粉萌发速度和花粉管生长,在稍高于最适 Ca^{2+} 浓度的条件下,花粉管生长早期呈现波浪形。硼明显影响花粉萌发频率及花粉管形态,花粉管生长必需硼,但不同浓度的硼对花粉管生长速度影响不明显,在高浓度硼条件下生长较长时间,花粉管也同样呈现出波浪形。Han 等^[29]通过对蓝猪耳开花前后受精卵和中央细胞(极核)的行为研究,发现开花前中央细胞和卵细胞有较高的协同渗透,大小达 10 kDa 的分子可以从中央细胞进入到卵细胞,更大的分子不能通过渗透膜。当胚乳成熟后,约是开花后 2 d,这种协同渗透作用减弱,只有小于 3 kDa 的分子可以由中央细胞扩散到卵细胞。受精后初生胚乳细胞和受精卵之间似乎没有协同渗透作用,因为经过微注射的胚囊,有一半小到 521 Da 的分子不能进入到受精卵中。后来袁明等^[30]通过对蓝猪耳活体胚囊的研究,发现中央细胞和初生胚乳细胞中的微丝骨架在细胞核迁移时发生了显著的变化。授粉前,微丝在中央细胞的周质位置呈现短束状随机分布,开花两天后它们组装成截然不同的微丝网络,在这个阶段,次生核(两个极核形成)位于中央细胞中央位置并与短束状的微丝列阵相联系。在授粉发生后不久,分布在珠孔端的微丝发生片断化,此时次生核与卵细胞相邻。受精后初生胚乳细胞核从卵细胞处移开,在初生胚乳细胞中微丝又重组形成清晰的网络结构。用 latrunculin A (LAT-A) 和细胞松弛素 B (cytochalasin B, CB) 破坏微丝骨架得到的试验结果证实,微丝参与了中央细胞中的细胞核迁移运动;在受精过程中微丝骨架的动力学特性在中央细胞和初生胚乳细胞的细胞质重组中起重要作用。陈素红等^[31]成功地分离了蓝猪耳的卵细胞和合子,这为单细胞水平上深入进行高等植物受精机理的研究打下了基础。

4 蓝猪耳在花色代谢研究中的应用

由于蓝猪耳生长期短,开花早,从播种到开花约需两个多月,苗期生长较为迟缓,但一旦植株长到 10 cm 左右就开始迅速生长,只要营养丰富、气候适合,花期可长达数月,而且花朵繁茂,因此很适合进行花器官发育及花色代谢方面的研究^[32]。Ueyama 等^[33]克隆了蓝猪耳编码类黄酮合成相关酶 F3'H 的基因 *F3'H*,该基因的氨基

酸序列与拟南芥和矮牵牛相关基因的氨基酸序列具有较高的同源性。基因转化的结果表明,基因的引入抑制了内源 *FNS II* 基因的表达,使花色素的含量减少,从而产生了淡蓝色和红色品系的品种。Nagira 等^[34]利用蓝猪耳的叶片外植体诱芽,先在正常营养条件和标准光照处理下生长 10 d,然后在黑暗中生长 10 d,接着将叶片移到含 7% 葡萄糖但不含 BA 的培养基中并对其进行正常光照条件处理,6 d 后再生芽开始合成花青素,而且以后花青素含量一直保持上升,但叶绿素含量下降。在这些试验中,无论是光周期发生变化还是糖含量改变(渗透胁迫)都可以诱导花青素的合成,而一旦花青素的合成被起始,叶绿素含量降低,就不能再转回到芽再生的路径,这为花青素合成代谢的研究提供了一个较好的模型。

5 展望

蓝猪耳盛花期较长,花朵繁茂,因此适合地被和花坛的种植,是一种重要的热带花卉。除作为重要的夏季观赏花卉栽培以外,蓝猪耳还是一种理想的植物细胞分化、花器官形成和授粉受精研究的模式植物。相信随着蓝猪耳各方面研究的开展,将推进其他研究的进一步深入。

参考文献:

- [1] Tetsuya H, Kuroiwa H, Kawano S. Guidance in Vitro of the Pollen Tube to the Naked Embryo Sac of *Torenia fournieri* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10:2019 - 2031.
- [2] Chlyah H. Neofomation dirigae a partir de fragment d'organes de *Torenia Fournieri* Lind cultives in vitro [J]. *Biological Plantarum*, 1973, 15: 80 - 87.
- [3] Kamada H and Harada H. Influence of several growth regulators and amino acid on in vitro organogenesis of *Torenia fournieri* Lind [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1979, 114:27 - 36.
- [4] Tanimoto S, Harada H. Effects of IAA, zeatin, ammonium nitrate and sucrose on the initiation and development of floral buds in *torenia* stem segments cultured in vitro [J]. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22:1553 - 1560.
- [5] Tanimoto S, Miyazaki A, Harada H. Regulation by abscisic acid of in vitro flower formation in *torenia* stem segment [J]. *Plant Cell Physiology*, 1985, 26: 675 - 682.
- [6] Hadi MZ, Bridgen MP. Somaclonal variation as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fournieri* 'Compacta Blue' [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 46 (1): 43 - 50.
- [7] 佟晓南,韩玉珍,徐 侠. 蓝猪耳的组织培养和植株再生

- [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 255.
- [8] 陶均, 李玲. 蓝猪耳组织培养和植株再生条件研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2004(4): 100 - 105.
- [9] 宾金华, 禹艳红, 肖文娟, 等. 蓝猪耳再生系统的建立[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(4): 291 - 295.
- [10] 李梅兰, 康培婧, 李洪清. 蓝猪耳再生条件优化及不同外植体再生比较[J]. 山西农业大学学报, 2005, 25(1): 34 - 37.
- [11] 李洪清, 李美茹, 潘小平, 等. 花色改造基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 42 - 46.
- [12] 李美茹, 陈金婷, 孙梓健, 等. 花卉分子育种的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 87 - 92.
- [13] Aida R, Shibata M. Agrobacterium-mediated transformation of *Torenia* [J]. *Breeding Science*, 1995, 45: 71 - 74.
- [14] Aida R, Shibata M. Transformation in *torenia*, Vol. 48. in: Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- [15] Aida R, Yoshida T, Ichimura K. Extension of flower longevity in transgenic *torenia* plants incorporating ACC oxidase transgene [J]. *Plant Science*, 1998, 138: 91 - 101.
- [16] Aida R, Yoshida T, Knodo T. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic *torenia* plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene [J]. *Plant Science*, 2000, 160: 49 - 56.
- [17] Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y. Modification of flower color in *torenia* by genetic transformation [J]. *Plant Science*, 2000, 153: 33 - 42.
- [18] Aida R, Kishimoto S, Shibata M. A transgene locus is required for wave-patterned flowers of transgenic *torenia* plants [J]. *Annals of Botany*, 2001, 87: 405 - 409.
- [19] Fukusaki E, Kawasaki K, Kajiyama S. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111(3): 229 - 240.
- [20] 陈丙春, 齐一伯, 唐宇, 等. 根瘤农杆菌介导的蓝猪耳遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 299 - 303.
- [21] 李梅兰, 王小菁, 李洪清. 根瘤农杆菌介导蓝猪耳转化系统的建立[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 105 - 110.
- [22] Cantrill LC, Overa RL, Goodwin PB. Cell-to-cell communication via plant endomembranes [J]. *Cell Biology International*, 1999, 23(10): 653 - 661.
- [23] Wallwork MAB and Sedgley M. Early events in the penetration of the embryo sac in *Torenia fournieri* Lind. [J]. *Annals of Botany*, 2000, 85: 447 - 454.
- [24] Tetsuya H, Kuroiwa H, Kawano S. Guidance in Vitro of the Pollen Tube to the Naked Embryo Sac of *Torenia fournieri* [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 2019 - 2031.
- [25] Tetsuya H, Kuroiwa H, Kawano S. Explosive Discharge of Pollen Tube Contents in *Torenia fournieri* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 11 - 13.
- [26] Higashiyama T. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization [J]. *Journal of Plant Research*, 2002, 115(1118): 149 - 160.
- [27] 房克凤, 孙蒙祥, 周嫦. 烟草与蓝猪耳胚胎发生中细胞表面三种凝集素受体的动态分布[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 463 - 468.
- [28] 姚成义, 赵洁. 钙和硼对蓝猪耳花粉萌发及花粉管生长的影响[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(1): 1 - 7.
- [29] Han YZ, Huang BQ, Zee SY. Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* Lind. before and during fertilization [J]. *Planta*, 2000, 211(1): 158 - 162.
- [30] 袁明, 傅纛, 王凤, 等. 蓝猪耳受精过程中中央细胞和初生胚乳细胞中微丝骨架的组装和细胞核的迁移[J]. 中国科学(C辑), 2002, 32(1): 13 - 22.
- [31] 陈素红, 杨延红, 廖景平, 等. 蓝猪耳卵细胞和合子的分离[J]. 植物生理和分子生物学学报, 2005, 31(4): 383 - 388.
- [32] Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(28): 25797 - 25803.
- [33] Ueyama Y, Suzuki K, Fukuchi - Mizutani M. Molecular and biochemical characterization of *torenia* flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes [J]. *Plant Science*, 2002, 163: 253 - 263.
- [34] Nagira Y, Ozeki Y. A system in which anthocyanin synthesis is induced in regenerated *torenia* shoots [J]. *Journal of Plant Research*, 2004, 117(5): 377 - 383.