

## 外源*ipt*对叶片衰老分子调控研究进展(综述)

王晓莺 范树国 张明永 梁承邨

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:** 综述了叶片衰老的分子机理, 并介绍了将外源异戊烯基转移酶(*ipt*, isopentenyl transferase)基因转入植物以获得抗衰老植株的研究进展。

**关键词:** 衰老; 衰老相关基因; 细胞分裂素; 异戊烯基转移酶; 启动子

**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)01-0077-06

### Molecular Genetic Manipulation of Leaf Senescence with *ipt*

WANG Xiao-ying FAN Shu-guo ZHANG Ming-yong LIANG Cheng-ye

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Progress in studies on molecular mechanism of leaf senescence and on retarding senescence by introducing *P<sub>SAG1</sub>-ipt* into plants are reviewed.

**Key words:** Senescence; Senescence-associated gene; Cytokinin; Isopentenyl transferase; Promoter

叶片的衰老是植物体上发生的普遍可见的自然现象。它不是叶片细胞的简单死亡, 而是一种动态的细胞程序性死亡过程(programmed cell death, PCD)。叶片衰老首先表现为占叶片蛋白总量70%的叶绿体被破坏; 蛋白质、膜脂、RNA等大分子物质和叶绿素发生降解, 所形成的氮素等营养物质被运至幼嫩的叶片、发育中的种子和储藏器官中加以利用或储存。其它细胞器如细胞核降解的时间相对较晚, 可能是为了确保营养物再循环利用的顺利完成<sup>[1]</sup>。但在农作物生产上, 某些作物叶片易发生过早衰老, 使植株整体光合作用水平下降, 光合产物减少, 导致作物产量低、品质差。如某些杂交水稻在发育后期叶片和功能的早衰导致结实率低, 空秕率高, 严重影响了杂交稻产量潜力的进一步发挥<sup>[2]</sup>。

#### 1 造成叶片衰老的因素及衰老过程中的相关基因

Yoshida等<sup>[3]</sup>的实验表明, 叶绿体的衰老是由细胞核决定的。另一实验表明, 若对植物施加放线菌酮(一种蛋白质合成抑制剂)或放线菌素D(一种RNA合成抑制剂), 都可在一定程度上延迟叶片的衰老<sup>[4]</sup>。

叶片衰老的启动及进程是由遗传物质控制的, 但同时也受各种内外因子所影响, 如遮阴(shading)、矿物质缺乏、干旱、极端温度、病原体侵染、机械伤害、激素、种子的发育、叶龄等<sup>[1,4]</sup>。在胁迫条件下, 叶片衰老提早发生, 释放水分, 养分被重新利用, 以确保繁殖下一代。在内部因素中, 衰老与叶龄的关系尤为密切。种子发育促使叶片衰老可能是由于种子发育时对氮素的剧烈需求引起

收稿日期: 2000-11-13 接受日期: 2001-03-29  
基金项目: 广东省自然科学基金(990770)资助

的,也可能是营养器官向叶片释放一种“衰老激素”导致其衰老。

植物生长调节物质中的乙烯、脱落酸对衰老有促进作用,而生长素、赤霉素、细胞分裂素可抑制衰老。

以往,叶片衰老的研究仅限于形态解剖、显微结构、亚显微结构、生理生化方面。近年来,随着分子生物技术的迅速发展,使得人们可以从分子水平对叶片衰老进行研究。目前,多采用差异筛选(differential screening)和减扣杂交(subtractive hybridization)等手段来检测绿叶和衰老叶片中的mRNA,并用mRNA来构建cDNA文库。研究发现,叶片衰老过程中,总DNA水平变化较小,而叶片RNA总量下降,特别是rRNA水平剧烈下降<sup>[9]</sup>。与之相反,某些基因则在衰老开始后,表达量反而逐渐升高。据此,与衰老有关的基因被分为衰老下调基因(senescence down-regulated gene, SDG)和衰老相关基因(senescence-associated gene, SAG)。

光合作用的下降和叶绿素丢失是叶片衰老的主要特征,因此与光合作用有关的一些蛋白,如RUBISCO(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶)小亚基、叶绿素a/b结合蛋白等在衰老过程中被丢失,其对应的遗传物质转录丰度也急剧下降<sup>[5,8]</sup>,这一类的基因被称为SDG。

在衰老期间,部分基因的表达呈上升趋势,这类基因被称为SAG基因。目前,人们从不同植物类群中克隆出大约30多种SAG基因,例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[8]</sup>、石刁柏<sup>[9]</sup>、大麦<sup>[10]</sup>、油菜<sup>[11]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>、萝卜<sup>[13]</sup>和番茄<sup>[14]</sup>。这些SAG又可分为两类:一类称为衰老特异性基因(senescence-specific gene, SSG),它的mRNA只有在叶片衰老时才能检测到;另一类SAG在叶片生长初期就可检测到有低水平表达,衰老开始后表达量迅速上升。目前我们得到的SAG中仅有一小部分表现出高度衰老特异性,如从拟南芥中克隆出的SAG12、SAG13<sup>[8]</sup>和从欧洲油菜(*Brassica napus*)中克隆出的LSC54<sup>[11]</sup>。SAG12和SAG13虽然是衰老特异的,但并不是叶片特异的,它们不仅在衰老的叶片中表达,也在衰老的茎、花瓣、萼片、心皮等器官中表达<sup>[11]</sup>。

这些基因的功能有的已经被证实与衰老细胞内的大分子物质的降解转运有关,如编码核酸酶、蛋白酶、酯酶、谷氨酰胺合成酶等的基因,但还有不少克隆出的基因功能尚不清楚。如Lohman等<sup>[15]</sup>从拟南芥克隆的6个衰老下调基因,其产物含量在衰老期间下降到难以测出。

## 2 人为调控叶片衰老研究现状

叶片的衰老虽然是植物适应外界环境和自身繁殖需要而进化的自然现象,但农作物生产中,早衰现象削弱了作物的增产潜力。因此,调控植物叶片的衰老,使衰老期延迟对提高农作物的产量、质量有重大的意义。

目前延缓衰老的手段主要有两种:一是体外处理,往叶片上喷洒激素如细胞分裂素,或是在作物结实期适当追加氮肥,都可一定程度的延缓衰老。另一种是分子遗传调控,植物自身细胞核基因如何调控衰老进程,其中的分子机制尚不明确。目前控制衰老采用的遗传调控手段都是基于激素生理学。研究最多的是运用转基因手段,增强细胞分裂素在植物体内表达来延缓衰老。也有人利用乙烯的促进衰老功能,通过抑制乙烯的合成,达到延缓叶片衰老的目的。如Oeller等<sup>[16]</sup>和John等<sup>[17]</sup>运用反义RNA技术,将乙烯合成途径的关键酶ACC合成酶和ACC氧化酶的反义基因导入番茄中并成功表达,使植株乙烯生成量减少,成功延缓番茄果实和叶片的衰老。拟南芥中乙烯不敏感的突变体植株(*etr-1*)有叶片衰老缓慢的现象<sup>[18]</sup>,据此有人提出以与乙烯信号转导有关的基因在转基因植株中的表达来延缓叶片衰老的战略。最近有拟南芥油菜素内酯(BR)缺陷型叶片衰老缓慢的报道<sup>[1]</sup>。因

此有可能利用油菜素内酯调控叶片衰老,但这方面的研究还未见报道。

### 3 外源异戊烯基转移酶(*ipt*)对衰老的调控

#### 3.1 *ipt*的作用与应用

细胞分裂素是五大植物生长调节物质之一,具有促进细胞分裂和扩大<sup>[19]</sup>、诱导芽分化、延缓叶片衰老<sup>[20]</sup>、消除顶端优势、促进侧芽生长<sup>[21]</sup>等功能。延迟衰老的机理是细胞分裂素抑制核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、蛋白酶等的活性,能延缓核酸、蛋白质、叶绿体等的降解;其次,细胞分裂素可使营养物质向应用部位移动<sup>[22]</sup>。已有实验证明,叶片衰老过程中叶片细胞分裂素的含量降低,通过施加外源细胞分裂素可延迟叶片的衰老<sup>[23,24]</sup>。细胞分裂素现被广泛用于调控植物叶片的衰老。

目前,植物体内细胞分裂素合成的详细途径尚不明了。曾有报道从烟草的非肿瘤细胞中克隆出具有异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, *ipt*)活性的酶片段<sup>[25]</sup>,但还无法将此酶完全纯化和应用。相反,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中的细胞分裂素合成途径已十分清楚。研究表明,异戊烯基转移酶是细胞分裂素生物合成步骤中的一个关键限速酶,它促使5'-AMP和异戊烯基焦磷酸合成异戊烯基腺苷-5'-磷酸。此物质很快被转化成异戊烯基腺苷[(9R)IP]和异戊烯基腺嘌呤(IP)。(9R)IP和(IP)经过细胞分裂素氧化酶作用分别形成玉米素核苷和玉米素<sup>[26]</sup>。

当前大多利用从根癌农杆菌分离出来的*ipt*基因,将此基因构建成自动表达系统后,利用转基因技术导入植物体,使植物体自动提高内源细胞分裂素的浓度来延迟衰老,而不再需要施加外源细胞分裂素。

#### 3.2 *ipt*的表达与调控

有关*ipt*转化初期的研究发现,以原始*ipt*即未更换启动子的*ipt*为外源基因获得的转基因植株中,细胞分裂素浓度明显升高,同时带来相应的形态改变<sup>[26,27]</sup>。Smigocki和Owens<sup>[28,29]</sup>采用CaMV 35S启动子替代*ipt*启动子,从含此嵌合质粒的转化植株中发现,CaMV 35S表现出比*ipt*基因启动子更强的启动*ipt*表达的能力。但无论含哪种启动子,植株都产生了过量细胞分裂素,导致植株矮化丛生,完全失去顶端优势,叶片小而圆,根系不能形成<sup>[29]</sup>,从而导致植株不能正常生长发育。因此,对转入植物体的外源*ipt*如何进行分子表达调控,成为目前的热点研究方向。

为探索植物组织中细胞分裂素过量表达产生的影响,研究者应用了许多组织特异性启动子和可诱导启动子来表达外源*ipt*,但应用最广泛的是热激启动子,并成功获得了许多转化植株<sup>[29,30]</sup>。这些转基因植株能够产生正常的根系,但植株通常矮小,并且有大量腋生芽。激素分析显示,在没有高温刺激时,转基因植株内的激素水平仍高于对照植株的激素水平;一旦施加高温诱导,这个差值则更加显著,但不一定伴随更大的形态变异。在近期的例子中用*hsp70-ipt*转化拟南芥,转化株细胞分裂素过量表达,同时观察到同源盒基因(homeobox genes) *KNA11*和*STM*呈现高表达水平<sup>[31]</sup>。有趣的是,在另一实验中,莴苣中*KNA11*的过量表达引起了细胞分裂素产量的提高<sup>[32]</sup>,其机理尚不明确。

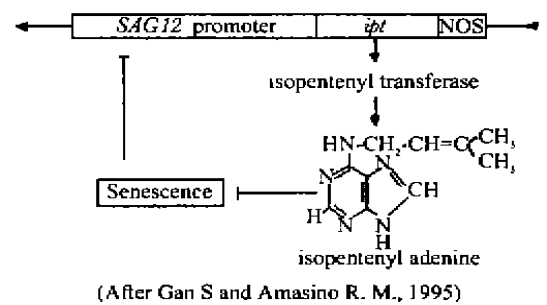
总之,利用热激启动子诱导*ipt*,得到的转化植株即使没有高温诱导,体内的细胞分裂素水平已足以使植株的形态发生改变,同时,这一诱导条件本身对植物的生长不利。Gatz和Lenk<sup>[33]</sup>认为作为一个理想的启动子,如果它所带动的基因合成产物需求量是极低的,那么在诱导者不存在时,目的基因的表达水平应该是零,而在诱导者存在时,其表达水平也不能很高。细胞分裂素作为一种生长调节物质,植物体的需要量是很低的,因此*ipt*在作为外源基因时,它的本底越低越好。即不存在诱

导因子时,启动子的活性应尽可能低。铜诱导启动子的应用使外源*ipt*在烟草中能以较低的水平表达<sup>[6]</sup>。但是,植株对铜这种毒性金属的内部生理反应限制了这一系统的应用。Kunkel等人<sup>[7]</sup>将*ipt*结合四环素诱导启动子转化烟草和莴苣,愈伤组织自身产生细胞分裂素,再生出苗。在不存在诱导因子时,细胞分裂素表达量很低,植株形态与对照相同<sup>[8]</sup>。此外还有光诱导启动子<sup>[27]</sup>、果实特异性启动子<sup>[28]</sup>、伤害诱导启动子等的应用,都获得了相应的抗衰老植株。

上述这些启动子的效果明显好于热激启动子,在延迟衰老的同时,大部分的转基因植株的表型不发生变异。对实验室研究来说,这些启动子的作用无可厚非。但由于它们或者诱导因子自身对植株生长不利,或者诱导因子的施加不便利,大大限制了抗衰老遗传转化工程在农业生产上的应用。

Lohman等人<sup>[9]</sup>于1994年从拟南芥中克隆出一组SAG,证明其中的SAG12是高度衰老特异的。Gan和Amasino又将SAG12启动子与*ipt*编码区连接,构建出一个可延缓衰老的自调控系统: $P_{SAG12}$ -*ipt*<sup>[40]</sup>。其工作原理是:当叶片刚开始衰老时,SAG12启动子被活化,*ipt*开始表达,细胞分裂素浓度升高,衰老被抑制;当细胞分裂素浓度达到一定的水平,衰老的症状消失,SAG12启动子不再有活性,*ipt*不再表达,细胞分裂素的浓度也得到控制,从而防止过量的激素对植物的负面影响<sup>[40]</sup>(见下图)。

用根癌农杆菌介导转化法将此系统转入烟草,获得了8个独立的转基因植株<sup>[40]</sup>,并对转化株系T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>代与野生型的形态和生理学特征进行了比较,结果表明转化株系的叶片衰老期及光合速率的下降,比野生型大大延迟;转化株的开花总数和结种数都明显高于野生型,而株高和主茎上叶片数量与野生型相差无几。同时,还比较了 $P_{SAG12}$ -*gus*、 $P_{SAG12}$ -*ipt*共转化株和 $P_{SAG12}$ -*gus*转化株的GUS活性,结果表明,前者的GUS活性的提高明显比后者缓慢,说明 $P_{SAG12}$ -*ipt*自调控系统确实起到了自动调节的作用。 $P_{SAG12}$ -*ipt*自调控系统具有低水平表达、自动调节表达的优点、不需要耗费巨大的人力物力,就可能实现延缓作物衰老,提高产量。



## 4 展望

以往,我国对作物衰老的调控研究,一直局限于宏观调控上。但近几年基于*ipt*的作物遗传育种取得了可喜成绩。付永彩等人利用基因枪法把带有特异衰老基因SAG12启动子的*ipt*导入水稻,经PCR、点杂交以及Southern杂交分析,证明外源基因已整合到水稻基因组中。通过GUS活性、细胞分裂素含量的分析以及T<sub>1</sub>代转基因植株成熟期的形态观察,证明此抑制衰老的自我调节系统在部分转基因水稻中表达,叶片衰老受到明显抑制<sup>[41]</sup>。华中农业大学张启发实验室也公开报道已从四个水稻品种中获得 $P_{SAG12}$ -*ipt*转化阳性植株<sup>[42]</sup>。

虽然能够获得*ipt*的转基因作物,但叶片衰老的分子机制尚不明了,这在很大程度上限制了对叶片衰老的分子调控的研究和应用。对SAG表达调节的研究有助于阐明叶片衰老的分子机制。动力学研究表明,SAG的表达相当复杂,可能存在由多条途径组成的调节网络来控制叶片衰老<sup>[1]</sup>。所以阻断某个途径对衰老的进程没有明显的效用。这方面的研究还有待深入。

目前,*ipt*基因的研究还多集中于烟草、番茄等双子叶植物,在单子叶植物中的研究和应用相对较少。最近研究发现:*ipt*的表达程度与实验中对材料的处理方式和材料的组织部位有很大关系。如

培养基中加入少量的NAA会使细胞分裂素的产量有很大提高, 而施加BA则对细胞分裂素的产量没什么影响<sup>[20]</sup>。其中机理还在探索之中。

随着分子生物学技术迅猛发展和转基因技术的不断完善, 对衰老进行分子遗传调控的研究将不断深入, 并将成功应用到农作物生产中。

#### 参考文献:

- [1] Gan S, Amasino R M. Making sense of senescence [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 313-319.
- [2] 段俊、梁承邨、黄毓文. 杂交水稻开花结实期间叶片衰老 [J]. *植物生理学报*, 1997, 23(2): 139-144.
- [3] Yoshida Y. Nuclear control of chloroplast activity in *Elodea* leaf cells [J]. *Protoplasma*, 1961, 54: 476-492.
- [4] 沈成国, 张福锁, 毛达如. 植物叶片衰老过程中基因的表达与调控 [J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(4): 304-312.
- [5] Bate N J, Rothstein S J, Thompson J E. Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence [J]. *J Exp Bot*, 1991, 42: 801-811.
- [6] Hensel L L, Grbic V, Baumgarten D A, et al. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 553-564.
- [7] Jiang C Z, Rodermel S R, Shibles R M. Photosynthesis, rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves [J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 105-112.
- [8] Clouse S D. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development [J]. *Plant J*, 1996, 10: 1-8.
- [9] King G A, Davies K M, Stewart R J, et al. Similarities in gene expression during the postharvest-induced senescence of spears and the natural foliar senescence of asparagus plant [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 125-128.
- [10] Becker W, Apel K. Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence [J]. *Planta*, 1993, 189: 74-79.
- [11] Buchanan-Wollaston V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 839-846.
- [12] Smart C M, Hosken S E, Thomas H, et al. The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs [J]. *Physiol Plant*, 1995, 93: 673-682.
- [13] Azurri Y, Watanabe A. Evidence for a senescence-associated gene induced by darkness [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 577-583.
- [14] Davies K M, Grierson D. Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene [J]. *Planta*, 1989, 179: 73-80.
- [15] Lohman K N, Gan S, John M C, et al. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiol Plant*, 1994, 92: 322-328.
- [16] Oeller P W, Wong L M, Taylor L P, et al. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA [J]. *Sci*, 1991, 254: 437-439.
- [17] John J, Drake R, Farrell A, et al. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis [J]. *Plant J*, 1995, 7: 483-490.
- [18] Grbic V, Bleecker A B. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 1995, 8: 595-602.
- [19] Skoog F, Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* [J]. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118-131.
- [20] Richmond A E, Lang A. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves [J]. *Sci*, 1957, 125: 650-651.
- [21] Sachs T, Thimann K V. Release of lateral buds from apical dominance [J]. *Nature*, 1964, 201: 939-940.
- [22] 潘瑞炽, 董愚得. 植物生理学 [M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1995, 203.
- [23] Singh S, Letham D S, Palni L M S. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinin in relation to sequential leaf senescence of tobacco [J]. *Physiol Plant*, 1992, 86: 388-397.
- [24] Hen C M, Melitz D K. Cytokinin biosynthesis in a cell free system from cytokinin autotrophic tobacco tissue culture [J]. *FEBS Lett*.

- 1979, 107: 15-20.
- [25] Akiyoshi D E, Klee H, Amasino R M, et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 5994-5998.
- [26] Smigocki A C, Owens L D. Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 5131-5135.
- [27] Beinsberger S E I, Valcke R L M, Deblaere R Y, et al. Effects of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA *ipt* gene in *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SRI plant cells [J]. Plant Cell Physiol, 1991, 32: 489-496.
- [28] Smigocki A C, Owens L D. Cytokinin-to-auxin ratios and morphology of shoots and tissues transformed by a chimeric isopentenyl transferase gene [J]. Plant Physiol, 1989, 91: 808-811.
- [29] Schmulling T, Beinsberger S, De Greef J, et al. Construction of a heat-inducible chimeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue [J]. FEBS Lett, 1989, 249: 401-406.
- [30] Medford J I, Horgan R, El-Sawi Z, et al. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene [J]. Plant Cell, 1987, 1: 403-413.
- [31] Smart C M, Scofield S R, Bevan M W, et al. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium* [J]. Plant Cell, 1991, 3: 647-656.
- [32] Van Loven K, Beinsberger S E I, Valcke R L M, et al. Morphometric analysis of the growth of *P. maritima* transgenic tobacco plants [J]. J Exp Bot, 1993, 44: 1671-1678.
- [33] Rupp H M, Frank M, Werner T, et al. Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem [J]. Plant J, 1999, 18: 557-563.
- [34] Frugis G, Giannino D, Mele G, et al. Are homeobox knotted-like genes and cytokinins the leaf architects? [J]. Plant Physiol, 1999, 119: 371-374.
- [35] Gatz C, Lenk I. Promoters that respond to chemical inducers [J]. Trends in Plant Sci, 1998, 3: 352-358.
- [36] McKenzie M J, Mett V, Reynolds P H S, et al. Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter [J]. Plant Physiol, 1998, 116: 969-977.
- [37] Kunkel T, Niu Q W, Chan Y S, et al. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 916-919.
- [38] Redig P, Schmulling T, Van Onckelen H. Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Plant Physiol, 1996, 122: 141-148.
- [39] Martineau B, Houck C M, Sheehy R E, et al. Fruit-specific expression of the *A. tumefaciens* isopentenyl transferase gene in tomato: effects on fruit ripening and defense-related gene expression in leaves [J]. Plant J, 1994, 5: 11-19.
- [40] Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin [J]. Sci, 1995, 270: 1986-1988.
- [41] 付永彩, 丁月云, 刘新仿. 抑制衰老的嵌合基因在水稻中的转化 [J]. 科学通报, 1998, 43: 1963-1967.
- [42] 曹孟良. 农杆菌介导的水稻高效遗传转化体系的建立 [J]. 湖南农业大学学报, 1999, 25: 349-356.