

一氧化氮对采后水蜜桃果实衰老和清除自由基酶系影响

千春录, 刘 瑶, 殷健东, 侯顺超, 林 晨, 顾 林, 金昌海*
(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

摘要:为研究一氧化氮(NO)处理对采后水蜜桃果实衰老和清除自由基相关酶的影响,分别采用0、5、10、20和30 $\mu\text{L/L}$ 的NO气体熏蒸水蜜桃,然后置于20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏10 d。结果表明:10 $\mu\text{L/L}$ 的NO处理可有效地抑制水蜜桃果实软化。对自由基清除酶系影响研究表明,NO处理提高了贮藏期果实超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性,保持了较高抗坏血酸(ASC)含量。因此,适宜浓度(10 $\mu\text{L/L}$)的NO处理能提高桃果实清除自由基酶系能力,抑制膜脂过氧化并保持细胞膜完整性,进而改善贮藏品质。

关键词:桃子,一氧化氮(NO),衰老,清除自由基酶系

Effect of nitric oxide treatment on senescence and enzymes to scavenge free radical of postharvest peach fruit

QIAN Chun-lu, LIU Yao, YIN Jian-dong, HOU Shun-chao, LIN Chen, GU Lin, JIN Chang-hai*

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: Peach fruit were fumigated with 0, 5, 10, 20 and 30 $\mu\text{L/L}$ nitric oxide (NO) respectively, to study the effect of NO on the senescence and enzymes to scavenge free radical of postharvest peach. The results showed 10 $\mu\text{L/L}$ NO treatment could effectively inhibit fruit soften and enhance superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR) activity and ascorbate (ASC) content. In conclusion, NO treatment at proper concentration (10 $\mu\text{L/L}$) could advance the antioxidant capacity, restrain the peroxidation of membrane lipid and maintain the membrane integration, NO treatment could improve the storage quality of peach fruit.

Key words: peach; nitric oxide (NO); senescence; enzymes to scavenge free radical

中图分类号: TS255.36 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2016)21-0329-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.21.055

水蜜桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Yuhualu) 不耐贮藏,在常温下快速后熟软化,极易变质腐烂,导致货架期很短^[1-2]。水蜜桃采后衰老机理和延缓其衰老进程的手段,一直是采后水蜜桃的研究热点。

一氧化氮(NO)是普遍存在于植物体内的一种内源活性分子,它对植物成熟衰老有明显抑制作用^[3]。5和10 $\mu\text{L/L}$ 的NO熏蒸能显著降低5和27 $^{\circ}\text{C}$ 下采后肥城桃果实果胶甲脂酶和内切葡聚糖酶活性,延缓纤维素和果胶降解^[4]。NO处理还可减缓采后绿芦笋叶绿素、 V_c 、总糖、总黄酮含量的下降,延缓木质素、膜透性的增加,提高总抗氧化能力,从而

改善其低温贮藏品质,延长贮藏期^[5]。NO对果实成熟衰老的作用机理较为复杂,大量研究表明NO可抑制乙烯产生^[6]、酚类代谢^[7]、果胶解聚^[8-9]和钙离子流失^[10],同时NO通过直接抑制氧化酶活性或相关信号传导来降低活性氧伤害^[11],也可通过提高果实活性氧清除酶活性来维持活性氧产生和清除的动态平衡^[12]。虽有大量关于NO作用和机理的报道,但NO的保鲜机理还有待进一步研究。本研究以“雨花露”水蜜桃为试材,研究不同浓度的NO处理对其采后衰老的抑制作用及对果实清除自由基酶系的影响,旨在为该品种水蜜桃保鲜贮藏提供新的途径并揭示该处理对自由基清除酶系的作用。

收稿日期: 2016-06-01

作者简介: 千春录(1982-),男,博士,讲师,研究方向:食品科学, E-mail: clqian@yzu.edu.cn。

* 通讯作者: 金昌海(1963-),男,博士,教授,研究方向:食品科学, E-mail: chjin@yzu.edu.cn。

基金项目: 江苏省基础研究计划(自然科学基金)-青年基金项目(BK20140483);江苏省高校自然科学研究面上项目(14KJB210010);中国博士后科学基金面上项目(2014M560451);扬州大学科技创新培育基金项目(2015CXJ077);扬州大学大学生科技创新基金项目(x20158)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

水蜜桃 江苏省扬州市果园,采收时果实硬度为 33.49 ± 1.06 N;可溶性固形物含量为 $8.62\% \pm 0.73\%$,大小均匀、无机械伤、无病虫害。

NO 和 N_2 扬州正元气体有限公司;乙二胺四乙酸二钠、聚乙烯吡咯烷酮、愈创木酚、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、还原型辅酶 I、还原型辅酶 II、甲硫氨酸、氯化硝基四氮唑蓝、核黄素、2-硫代巴比妥酸、联吡啶均为分析纯(AR) 国药集团化学试剂有限公司;脱氢抗坏血酸、抗坏血酸氧化酶、二硫代硝基苯甲酸均为分析纯(AR) 上海玉博生物科技有限公司。

TA-XT2i 物性测定仪 英国稳定微系统公司; DDS-II 型电导仪 上海精密科学仪器有限公司;分析天平 BSA-124S 北京赛多利斯仪器系统有限公司;台式高速冷冻离心机 5417R Eppendorf 中国有限公司;紫外可见分光光度计 UV-1750 岛津中国有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水蜜桃前处理 水蜜桃采后 2 h 内运至实验室。20 °C 下将桃果放置于密封塑料箱(10 L)中,连续通入 N_2 以充分排出容器中的氧气,然后分别用 0 (对照)、5、10、20、30 $\mu\text{L/L}$ 的 NO(800 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 原气稀释至需要浓度)熏蒸 2 h。每个处理设置 3 个重复,每个重复 30 个果实。处理结束后,所有果实置于温度 20 ± 1 °C、湿度 85% 环境中贮藏。贮藏期间每隔 2 d 取样,测定品质及生理指标。

1.2.2 测定指标及方法

1.2.2.1 果实硬度、丙二醛(MDA)和电导率 按千春录等^[13]的方法。

1.2.2.2 测定指标的方法 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、谷胱甘肽还原酶(GR)、抗坏血酸(ASC)和谷胱甘肽(GSH)按 Qian 等^[14]的方法。

1.3 数据处理

应用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析,差异显著性检验采用 Tukey's 多重比较法。

2 结果与分析

2.1 NO 处理对果实硬度的影响

硬度是桃果成熟和衰老的重要指标^[1-2,13]。如图 1 所示,贮藏 2 d 后,对照桃果实硬度显著下降,贮藏 10 d 后果实已严重软化;NO 处理的果实在室温贮藏 10 d 时,10 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理果实硬度分别是对照的 1.58 ($p < 0.05$) 和 1.29 ($p < 0.05$) 倍,而 5 和 30 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理效果不明显。说明 10 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理能够抑制采后桃果实软化。

2.2 NO 处理对 MDA 和电导率的影响

MDA 是膜脂过氧化作用的主要产物,电导率可反映细胞膜的透性,MDA 含量和电导率都是判断衰

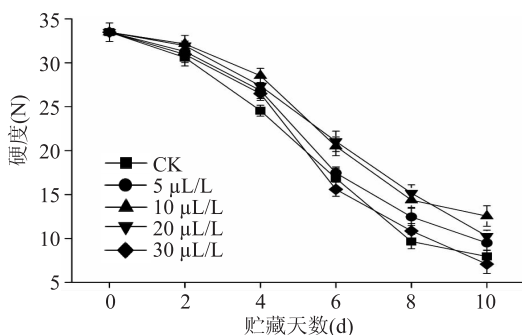


图 1 NO 处理对水蜜桃果实硬度的影响

Fig.1 Effect of NO treatment on the firmness in peach fruit

老程度的重要指标^[13]。贮藏期间水蜜桃 MDA 含量和电导率持续上升,NO 处理可抑制其上升趋势,其中 10 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理果实在整个贮藏期间 MDA 含量和电导率显著 ($p < 0.05$) 低于对照,贮藏到第 10 d 时 MDA 含量分别是对照的 74.42% 和 78.54%,电导率分别是对照的 79.74% 和 85.67%,而 5 和 30 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理果实 MDA 含量和电导率较高,各处理中 30 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理样品 MDA 含量和电导率最高,与对照差异不显著(图 2)。说明 10 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理可抑制膜脂过氧化并维持细胞膜完整性。

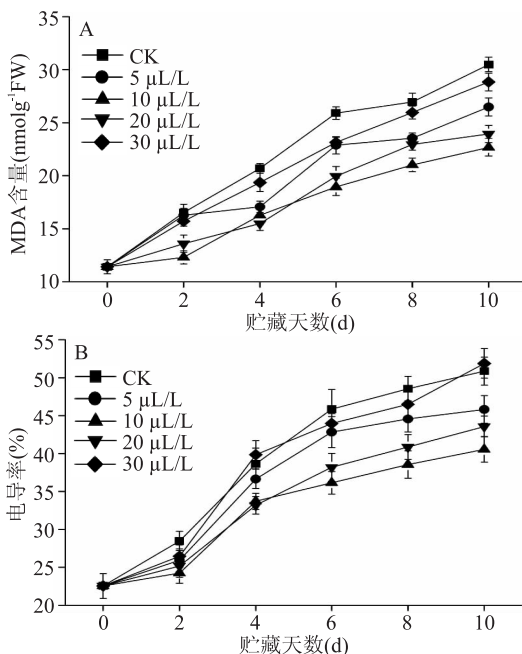


图 2 NO 处理对水蜜桃果实 MDA 含量(A)

和电导率(B)的影响

Fig.2 Effect of NO treatment on the MDA content(A) and electrolyte leakage(B) in peach fruit

2.3 NO 处理对清除自由基酶系的影响

上述 2.1 和 2.2 结果表明,10 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的 NO 处理能够改善水蜜桃的贮藏品质,从保鲜效果(图 1 和 2)和处理经济性方面考虑,10 $\mu\text{L/L}$ 是 NO 处理常温贮藏水蜜桃的最佳浓度,而本实验选择该处理条件,后续研究 NO 处理对桃果清除自由基酶系的影响。

SOD 可直接清除 $O_2^{\cdot -}$,CAT 和 POD 能催化过氧

化物分解^[13-14],这3种酶是植物生物防御系统的关键酶,其中SOD被誉为对氧化胁迫的第一防线^[15]。如图3A所示,桃果实SOD活性在贮藏期呈下降趋势,贮藏4d后变化平缓,差异不显著;NO处理果实SOD活性在贮藏前期上升,而后趋平缓,其活性在贮藏4d时是对照果实的1.35倍,而后也显著($p < 0.05$)高于对照。说明NO处理延缓了水蜜桃SOD活性下降。桃果CAT活性在贮藏初期上升,然后急剧下降,第6d后活性上升;NO处理可维持贮藏后期较高的CAT活性,贮藏到第10d时其CAT活性是对照果实的3.26倍(图3B)。如图3C所示,桃果POD活性在贮藏初期下降而后上升,6d后趋于平缓;NO处理果实POD活性在贮藏前期快速上升而后急剧下降,与对照相比,NO处理可维持贮藏前期较高的POD活性,第2d时其POD活性是对照的3.03倍。

ASC-GSH循环是植物体内重要的抗氧化系统,其中APX能够通过氧化ASC来还原过氧化物,DHAR和MDHAR能够通过氧化GSH来还原被APX氧化后的脱氢抗坏血酸和单脱氢抗坏血酸,而GR能够还原氧化态谷胱甘肽至GSH^[14]。如图4A所示,APX活性在桃果贮藏初期上升,而后呈下降趋势,NO处理能够使APX活性持续升高,贮藏6d后下降,其活性在贮藏4d后显著($p < 0.05$)高于对照,在10d时桃果实APX活性是对照的1.89倍。说明果实在贮藏前期感受到氧化胁迫刺激,进而引起抗氧化能力提高,但不能长期维持,NO处理能让果实维持较高的抗氧化能力。桃果DHAR和MDHAR活性在贮藏期呈先下降后上升趋势,NO处理能够保持其较高的活性(图4B和4C)。说明贮藏前期ASC再生能力较弱,而NO处理能提高ASC再生能力,从而可保持较高的APX活性。GR活性在桃果贮藏期呈现上升趋势,NO处理果实GR活性在贮藏初期急剧上

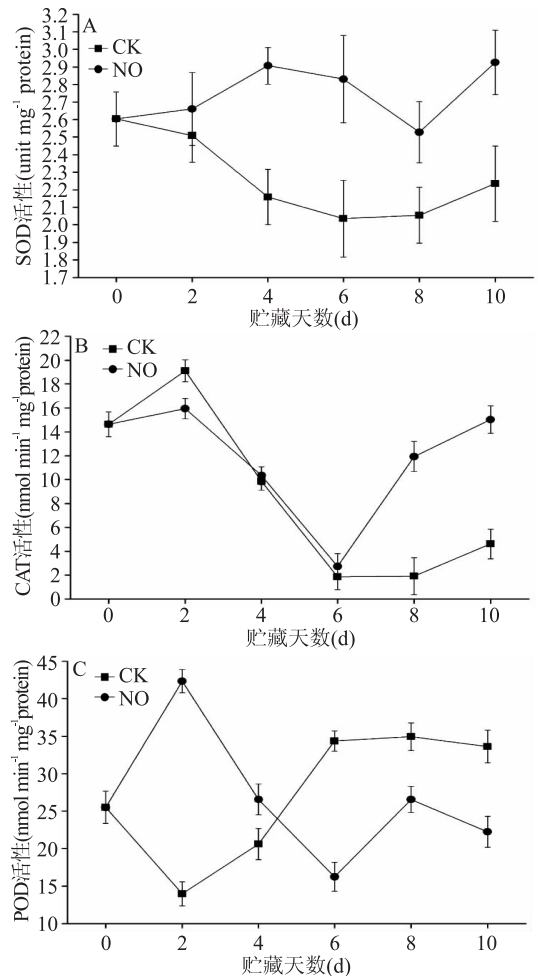


图3 NO处理对水蜜桃果实SOD(A)、CAT(B)和POD(C)活性的影响

Fig.3 Effect of NO treatment on the SOD(A), CAT(B) and POD(C) activity in peach fruit

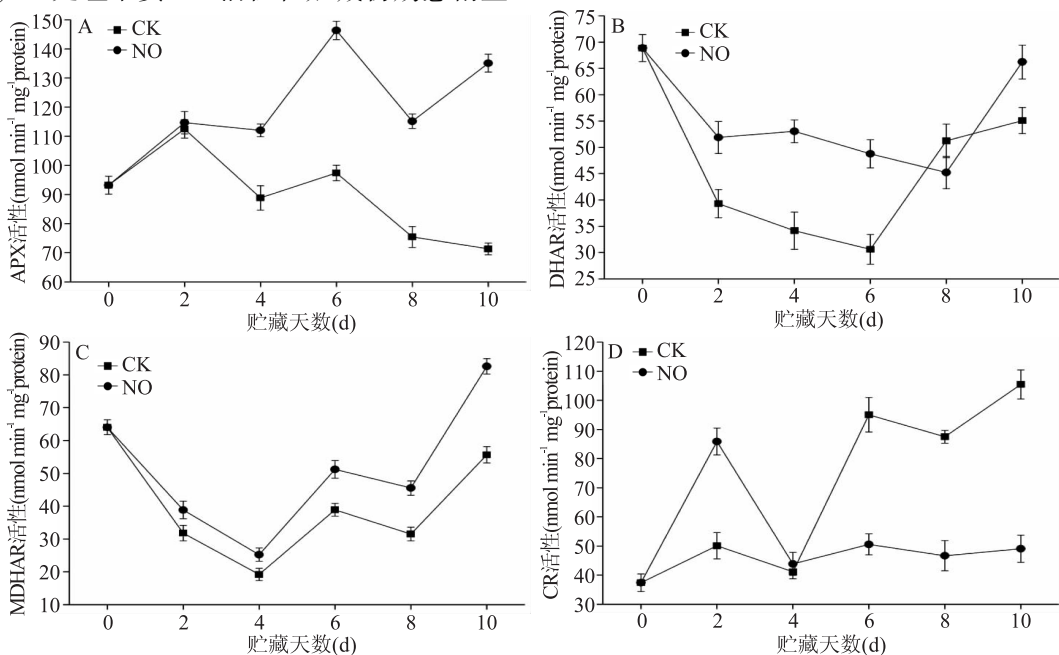


图4 NO处理对水蜜桃果实APX(A)、DHAR(B)、MDHAR(C)和GR(D)活性的影响

Fig.4 Effect of NO treatment on the APX(A), DHAR(B), MDHAR(C) and GR(D) activity in peach fruit

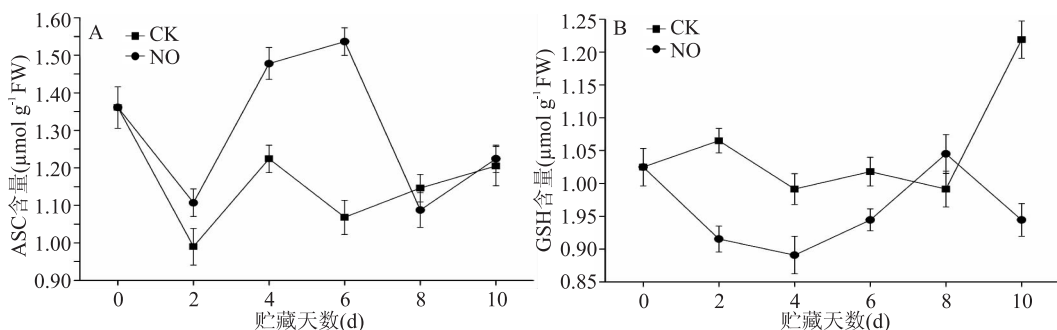


图5 NO处理对水蜜桃果实ASC(A)和GSH(B)含量的影响

Fig.5 Effect of NO treatment on the ASC(A) and GSH(B) content in peach fruit

升而后下降(图4D)。说明桃果在贮藏后期有较强的GSH再生能力,积累GSH来促进ASC再生,而NO处理能使桃果在贮藏前期有较强的GSH再生能力来促进ASC再生。

ASC和GSH是ASC-GSH循环中重要的抗氧化物质,可直接或间接的清除过氧化物,其中 H_2O_2 的清除主要由ASC参与完成^[1-2,14,16]。如图5A所示,桃果实ASC含量在贮藏初期快速下降,而后上升至峰值后再次下降,NO处理可使水蜜桃维持较高的ASC含量。桃果GSH含量在贮藏前期变化并不明显,而贮藏10d时急剧上升,NO处理果实的GSH含量在贮藏初期下降,4d时达到最低值,而后上升,并在10d时下降,其含量是对照的77.48%(图5B)。

3 讨论

NO能够延缓植物衰老^[3,16-17],与1-MCP和热处理相比,低浓度的NO可作为信号分子,能更有效的诱导提高果实采后防御能力^[10]。从NO处理后“雨花露”水蜜桃常温贮藏效果来看,10和20 $\mu\text{L/L}$ 的NO处理可延缓果实软化并抑制膜脂过氧化,其中10 $\mu\text{L/L}$ 的NO处理更适合常温贮藏水蜜桃保鲜贮藏,而5和30 $\mu\text{L/L}$ 的NO处理效果不明显,说明适宜浓度(10 $\mu\text{L/L}$)的NO处理能改善桃果常温贮藏品质。

桃果实在衰老过程中氧化胁迫上升^[16,18],可导致膜脂过氧化和细胞膜透性增加。NO处理能提高植物抗氧化能力,清除活性氧以减缓氧化胁迫^[18-20]。本研究表明,桃果实采后贮藏初期SOD、POD活性下降,而CAT活性上升,NO处理能保持果实较高的SOD活性,并保持贮藏前期高的POD活性,后期高的CAT活性,提高了直接清除活性氧的能力。

ASC-GSH循环是植物体内重要的防御系统,能在各种胁迫中保护细胞^[21]。该循环中 H_2O_2 的直接清除酶是APX,其活性和ASC含量呈正相关,APX和ASC负责植物体内大部分 H_2O_2 的清除^[14,16]。DHAR和MDHAR可维持ASC的还原态,GR可维持GSH的还原态,其活性提高是植物对逆境的一种适应性反应^[14,16]。ASC-GSH循环中APX、MDHAR、DHAR和GR共同作用,通过还原态ASC、GSH的再生来维持APX的活性^[14]。APX可由 H_2O_2 激活,低温胁迫下NO能提高其活性,有助于提高耐冷性^[16,22-23]。本研究表明,在常温贮藏前期,APX活性升高导致ASC

消耗过大而含量降低,后期MDHAR、DHAR活性升高才使ASC得到积累补充,从而使ASC含量呈现下降而后上升趋势。NO处理的桃果实维持高水平的MDHAR、DHAR活性,提高果实中ASC含量,同时GSH消耗过大导致其含量较低。同时NO处理可保持常温贮藏桃果高水平APX活性,进而促进了 H_2O_2 的清除,抑制了膜脂氧化进程和果实衰老。

4 结论

本研究表明,10 $\mu\text{L/L}$ 的NO处理能够有效地延缓“雨花露”水蜜桃果实衰老和提高果实贮藏期SOD、APX、DHAR、MDHAR活性及ASC和GSH的再生能力,使ASC-GSH循环迅速恢复,从而提高果实清除自由基能力,抑制膜脂过氧化,并保持细胞膜完整性。

参考文献

- [1] 千春录,米红波,何志平,等.1-MCP对水蜜桃冷藏品质和氧化还原水平的影响[J].食品科学,2013,34(12):322-326.
- [2] 千春录,米红波,赵宇璇,等.氯化钙和热处理对水蜜桃低温贮藏品质和氧化还原状态的影响[J].中国食品学报,2013,13(2):137-142.
- [3] 任小林,张少颖,于建娜.一氧化氮与植物成熟衰老的关系[J].西北植物学报,2004,24(1):167-171.
- [4] 朱树华,刘孟臣,周杰.一氧化氮熏蒸对采后肥城桃果实细胞壁代谢的影响[J].中国农业科学,2006,39(9):1878-1884.
- [5] 邵明灿,胡花丽,王毓宁,等.基于主成分分析法分析一氧化氮对绿芦笋贮藏品质的影响[J].食品科学,2012,33(20):318-322.
- [6] Zhu S H, Liu M C, Zhou J. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 42: 41-48.
- [7] Zhu S H, Sun L N, Zhou J. Effect of nitric oxide fumigation on phenolic metabolism of postharvest Chinese winter jujube (*Zizyphus jujube* Mill. cv. Dongzao) in relation to fruit quality[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42: 1009-1014.
- [8] Zhang L L, Zhu S H, Chen C B, et al. Metabolism of endogenous nitric oxide during growth and development of apple fruit[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 127: 500-506.
- [9] Zaharah S S, Singh Z. Mode of action of nitric oxide in

(下转第337页)

照组椭圆距离较近,表明气调处理果实整体气味与对照差异不大,具有人们喜爱的蓝莓特有香气。

3 结论

不同气调元件对气体的渗透率不同,进而导致了承载蓝莓的不同气调元件箱体气体成分产生了一定的差异性,与对照组相比,在短期贮藏内不同气调元件对蓝莓好果率、硬度、可溶性固形物以及可滴定酸含量四种品质指标的保鲜效果相似,在贮藏中后期7号气调元件可以使箱内气体成分维持在CO₂ 5.5%~10.5%和O₂ 10.5%~14.9%的含量范围内,能够有效维持果实的好果率、硬度、可溶性固形物和可滴定酸含量,最适宜蓝莓的贮藏,其次为3号(CO₂ 8.7%~19.3%, O₂ 1.4%~7.4%)和6号(CO₂ 9.9%~19.1%, O₂ 3.2%~9.4%)。电子鼻对贮藏60 d的不同处理蓝莓果实挥发性成分分析表明,2号和5号气调元件箱体内蓝莓果实气味与对照组相差较大,而3、6、7号气调元件箱体内蓝莓气味与对照组较为接近。综上所述,便携式塑料气调箱配备7号气调元件更易于蓝莓保鲜。

参考文献

- [1]胡雅馨,李京,惠伯棟.蓝莓果实中主要营养及花青素成分的研究[J].食品科学,2006,27(10):600-603.
- [2]邰海燕,徐龙,陈抗君,等.蓝莓采后品质调控和抗氧化研究进展[J].中国食品学报,2013,13(6):1-8.
- [3]朱麟,凌建刚,康孟利,等.不同包装方式对免眼蓝莓保鲜效果的影响[J].食品与发酵工业,2012,38(3):190-193.
- [4]张平,李江阔,张鹏,等.蓝莓塑料箱式气调保鲜技术研究
- [J].保鲜与加工,2010,10(3):9-11.
- [5]邹慧琴,刘勇,林辉,等.电子鼻技术及应用研究进展[J].传感器世界,2011,17(11):5-10.
- [6]张虹艳,丁武.电子鼻对不同温度下生鲜羊奶贮藏时间的判定[J].食品科学,2011,32(16):257-260.
- [7]张鹏,李江阔,陈绍慧.电子鼻对不同贮藏/货架期甜柿判别分析[J].食品与生物技术学报,2015,34(4):390-395.
- [8]Pan Leiqing, Zhang Wei, Zhu Na, et al. Early detection and classification of pathogenic fungal disease in post-harvest strawberry fruit by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Research International, 2014, 62(8): 162-168.
- [9]纪淑娟,张丽萍,卜庆状,等.基于电子鼻技术对冷藏后南果梨货架期间气味的变化分析[J].食品科学,2012,33(7):123-126.
- [10]颜廷才,邵丹,李江阔,等.基于电子鼻和GC-MS评价不同品种葡萄采后品质和挥发性物质的变化[J].现代食品科技,2015,31(11):290-298,270.
- [11]李文生,冯晓元,王宝刚,等.应用自动电位滴定仪测定水果中的可溶性酸[J].食品科学,2009,30(4):247-249.
- [12]Ehlenfeldt M K, Meredith F I, Ballington J R. Unique organic acid profile of rabbiteye vs. highbush blueberries [J]. HortScience, 1994, 29(4): 321-323.
- [13]邹慧琴,刘勇,林辉,等.电子鼻技术及应用研究进展[J].传感器世界,2011(11):6-11.
- [14]曹雪仁,詹浩宇,周益林,等.电子鼻技术在快速检测小麦矮腥黑穗病菌中的应用[J].生物安全学报,2011,20(2):171-174.
- [5] (上接第332页)
- inhibiting ethylene biosynthesis and fruit softening during ripening and cool storage of 'Kensington Pride' mango [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 62(3): 258-266.
- [10]Kang R Y, Zhang L, Jiang L, et al. Effect of postharvest nitric oxide treatment on the proteome of peach fruit during ripening [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 112: 277-289.
- [11]Rümer S, Gupta K J, Kaiser W M. Plant cells oxidize hydroxylamines to NO [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(7): 2065-2072.
- [12]Wu F H, Yang H Q, Chang Y Z, et al. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant capacity in Chinese Bayberry during storage [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135: 106-111.
- [13]千春录,何志平,林菊,等.热处理对黄花梨冷藏品质和活性氧代谢的影响[J].食品科学,2013,34(2):303-306.
- [14]Qian C L, He Z P, Zhao Y Y, et al. Maturity-dependent chilling tolerance regulated by the antioxidative capacity in postharvest cucumber (Cucumis sativus L.) fruits [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93: 626-633.
- [15]Zhu S H, Sun L N, Zhou J. Effect of different nitric oxide application on quality of kiwifruit during 20 °C storage [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45(2): 245-251.
- [16]吴锦程,陈建琴,梁杰,等.外源一氧化氮对低温胁迫下枇杷叶片 AsA-GSH 循环的影响[J].应用生态学报,2009,20(6):1395-1400.
- [17]Zhu S H, Liu M C, Zhou J. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 42: 41-48.
- [18]Jing G Q, Zhou J, Zhu S H. Effects of nitric oxide on mitochondrial oxidative defence in postharvest peach fruits [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96: 1997-2003.
- [19]Del Río L A, Corpas F J, Sandalio L M, et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes [J]. Journal of experimental botany, 2002, 53: 1255-1272.
- [20]Yang H Q, Wu F H, Cheng J Y. Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response [J]. Food Chemistry, 2011, 127: 1237-1242.
- [21]Potters G, De Gara L, Asard H, et al. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40: 537-548.
- [22]罗娅,汤浩茹,张勇.低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响 [J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1405-1410.
- [23]Xiang C, Oliver D J. Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 1998, 10: 1539-1550.