

大豆疫霉根腐病相关 miRNA 的鉴定

郭 娜¹,崔晓霞¹,赵晋铭¹,闫 强²,武晓玲¹,窦道龙²,邢 邯¹

(1. 南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学 植物保护学院,江苏 南京 210095)

摘 要:microRNA (miRNA)是近年来在真核生物中发现的一类具有调控功能的非编码 RNA,通过碱基互补在基因转录和转录后水平调控靶基因的表达,参与调控植物生长发育,并在响应多种生物及非生物胁迫中发挥重要作用。本文利用大豆疫霉菌 2 号生理小种(P6497)接种 8 个栽培大豆品种,通过 Northern blotting 技术,对大豆中的 7 个保守 miRNAs 进行检测。结果发现,有 6 个 miRNAs 在这 8 个大豆栽培品种中都有表达,但在接种病原菌前后没有明显的差异。使用高通量的小分子 RNA 芯片技术检测差异表达的 miRNAs。利用抗性品种 Williams 82 和感病品种 Williams 分别接种 P6497,获得部分与大豆疫霉菌侵染相关的 miRNAs。结果显示,部分 miRNAs 可能参与调控大豆疫霉根腐病抗性。

关键词:栽培大豆;保守 miRNA;Northern blotting;大豆疫霉根腐病
中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 04. 0666

Identification of miRNA Resistant to Phytophthora Root Rot in Soybean

GUO Na¹, CUI Xiao-xia¹, ZHAO Jin-ming¹, YAN Qiang², WU Xiao-ling¹, DOU Dao-long², XING Han¹

(1. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetics and Breeding for Soybean, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China; 2. Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The microRNAs (miRNAs), a type of short (20-24 nucleotides), non-coding RNA molecules, mediate repressive gene expression through RNA silencing at the transcriptional and post-transcriptional level, and play an important role in the regulation of plant growth and development, and defense and response to various abiotic and biotic stresses. *Phytophthora* root and stem rot (PRR) of soybean caused by *Phytophthora sojae* is a destructive disease affecting soybean production regions throughout the world. However, the miRNAs-regulation networks and function in response to PRR are not clear in *Glycine max*. In this paper, seven conserved miRNAs were detected in eight cultivars of pre- and post-inoculation by Northern blotting. The results showed that, six conserved miRNAs were expressed in eight cultivars in pre- and post-inoculation, but there is no significant difference in pre- and post-inoculation. Furthermore, we used microarray to detect miRNA expression pattern. The result showed that some miRNAs play very important roles in response to PRR in *Glycine max*.

Keywords: *Glycine max*; Conserved miRNAs; Northern blotting; *Phytophthora* root and stem rot

由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann, *P. sojae*)引起的大豆疫霉根腐病是大豆生产上的毁灭性病害之一,自 1948 年在美国首次发现该病以来,迄今在世界大豆主产区呈扩大蔓延趋势^[1-3]。目前,大豆疫霉根腐病的发生已经严重威胁我国的大豆生产^[4-5]。国内外关于大豆疫霉根腐病的研究主要集中在病原菌的分离鉴定、抗性资源的筛选及抗病基因的定位等。关于抗性机制的研究主要集中在某些生理生化指标上,而对于抗性基因的克隆、功能鉴定以及抗病基因表达调控的分子机理等方面的研究报道不多,目前仅克隆了 *Rps1k* 基因^[6-8]。目前,部分研究揭示大豆疫霉根腐病相关抗性基因和功能蛋白,使得大豆疫霉根腐病抗性机制研究取得较大进展,但抗性机制比较复杂,并非孤立作用,对其调控网络的研究有限。

microRNA (miRNA)是一类长度为 20~24 个核苷酸,广泛存在于动物、植物等真核生物及少量 DNA 病毒中的一类具有调控功能的非编码小分子 RNA。随着 miRNA 研究方法的不断革新,植物中 miRNA 的研究也在不断深入。目前应用克隆与生物信息学手段已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9]、水稻(*Oryza sativa*)^[10]、玉米(*Zea mays*)^[11]、大豆(*Glycine max*)^[12]、苔藓(*Moss*)^[13]等植物中陆续发现了不同数量和类型的 miRNA。截止 2014 年 9 月,miRNA 数据库 miRBase (<http://www.mirbase.org>) (Release 21: 2014 年 6 月)共收录 223 个物种的 35 828 条 miRNA,其中包括 11 690 条植物成熟 miRNA 序列。

miRNA 在转录或转录后水平通过与靶 mRNAs 序列部分或者完全匹配识别靶基因,并引起靶基因

收稿日期:2014-10-10
基金项目:南京农业大学青年科技创新基金(KJ2012001);国家自然科学基金(31301340);江苏省自然科学基金(BK20130684);长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT13073)。
第一作者简介:郭娜(1984-),女,博士,讲师,主要从事大豆抗病性研究。E-mail: guona@njau.edu.cn。
通讯作者:邢邯(1963-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传和育种工作。E-mail: hanx@njau.edu.cn。

的降解或抑制其翻译,最终达到抑制特定基因表达的目的。研究发现:miRNA 与其作用靶标 mRNA 的结合程度是不同的,当 miRNA 与其靶标 mRNA 完全或近完全互补时,主要引起 mRNA 的降解从而降低其表达量;当两者不完全互补时,主要通过抑制靶标 mRNA 的翻译起作用。植物 miRNA 主要通过剪切降解的方式调控靶 mRNA。植物 miRNA 不仅调控植物的生长和发育,还与环境有着非常密切的联系,比如干旱、盐渍、营养和病原菌等^[9,14-16]。miRNA 在进化上具有高度保守性^[17]。研究表明,miRNA 能够调控某些抗病途径中的关键靶基因来抵御病菌的入侵。在已知的众多参与植物抗逆过程的 miRNA 中,miR393 是第一个被发现受病原菌侵染负调控的 miRNA,它通过负调控其靶基因生长素受体蛋白(TIR1 和 AFBs)的表达进而响应病原菌胁迫^[18]。目前,生物逆境胁迫(病原菌侵染)相关 miRNA 研究已见报道,但根腐病胁迫相关 miRNA 研究尚少,作用机制仍不明确。

Northern blotting 是检测 miRNA 表达的一种简便可靠的方法,可用于分析不同组织器官、不同发育时期以及不同环境条件下 miRNA 的表达量,该方法被认为是检测 miRNA 的标准方法,常被用来评价其它 miRNA 检测方法的可靠性,这种方法被大量应用于检测 miRNA 的表达上^[19-20]。

本试验利用 Northern blotting 检测大豆疫霉菌接种前后的 8 个大豆栽培品种中 miRNA 的表达情况,并结合小分子 RNA 芯片结果,初步分析受大豆疫霉菌调控的 miRNA,为解析非编码 RNA 与大豆疫霉根腐病抗性机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试品种及接种菌株

根据实验室前期的抗源筛选结果^[21],选择 8 个大豆品种作为供试品种。其中 Williams、Williams 79、Williams 82 和 Harosoy 来源于美国,丰收黄、诱变 31、蒙庆 6 号、淮豆 5 号来源于中国。8 个品种由国家大豆改良中心保存并提供。

接种菌株为大豆疫霉菌 2 号生理小种 P6497,由南京农业大学植物保护学院保存并提供。

1.2 大豆植株的培养

挑选健康的大豆种子,播前先将装满蛭石的花盆置于塑料盒中,盒中加水,利用毛细管作用使盒中的蛭石吸足水分,然后取出花盆备用。按每个品种 3 盆,每盆 13 粒点播,播后用蛭石覆盖。置于 25℃/22℃ 培养 8 d 左右,选择两片真叶刚刚完全展开的长势一致的幼苗用于接种。

1.3 接种方法

1.3.1 下胚轴伤口接种法 用消毒后的刀片在大

豆子叶节下约 1 cm 处划一斜口,在培养 5 d 的菌株菌落外缘割取带有菌丝体的培养基(边长为 3 mm 的方块)嵌入伤口中,每个品种接种 10 株,接菌后在 20~25℃ 下保湿 10 h,然后转入相同温度的温室培养。

1.3.2 离体子叶节法 在直径 9 cm 的培养皿中放置双层滤纸,加 1 mL 灭菌水使之润湿。用锋利的剪刀在大豆幼叶的叶柄部剪取伤口约 5 cm 长的子叶,伤口向里辐射状排列在湿润的滤纸上。取活化培养 5 d、菌龄 5 d 的 1 cm×1 cm 大小的菌丝块倒置于伤口处,测定 5 个子叶;1 个子叶作对照。盖上盖、封口膜密封后,在 25℃ 连续光照培养,3 d 后调查发病情况,感病品种的子叶呈黑褐色水渍状,而抗病品种仅在接种部位有少量坏死。

1.4 Northern blotting 检测 miRNA 表达

使用 RNAVzol 试剂提取大豆的总 RNA。按照实际说明书进行操作。提取 8 个品种接种前后叶片的总 RNA。使用 50% 去离子甲酰胺溶液溶解总 RNA。利用 4 mol·L⁻¹ LiCl 沉淀小分子 RNA。取富集的小分子 RNA 进行 17% TBE-Urea 凝胶电泳。利用半干转膜仪转膜,并进行紫外交联。使用末端标记对探针进行标记,并进行杂交。使用 SSC 和 SDS 溶液洗膜,之后压磷屏,使用磷屏仪扫描图像。

1.5 探针序列

miR159a(5'-3'):TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA
miR166a(5'-3'):TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
miR167a(5'-3'):TGAAGCTGCCAGCATGATCTA
miR168a(5'-3'):TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA
miR172a(5'-3'):AGAATCTTGATGATGCTGCAT
miR393(5'-3'):TCCAAAGGGATCGCATTGATC
miR398a(5'-3'):TGTGTTCTCAGGTCACCCCTT

2 结果与分析

2.1 抗病性测定

分别使用下胚轴创伤接种方法和子叶节接种方法对 8 个栽培大豆品种(丰收黄、淮豆 5 号、诱变 31、蒙庆 6 号、Williams、Harosoy、Williams 79 及 Williams 82)进行抗病性鉴定。下胚轴创伤接种结果显示:诱变 31、淮豆 5 号、Harosoy 和 Williams 表现为感病,丰收黄、蒙庆 6 号、Williams 79 和 Williams 82 表现为抗病(图 1)。子叶节接种的结果显示:诱变 31、淮豆 5 号、Williams 和 Harosoy 子叶上出现褐色水渍状斑点,丰收黄、蒙庆 6 号、Williams 79 及 Williams 82 仅在接种部位出现坏死。使用这两种方法测定的抗感性是一致的。

2.2 RNA 质量检测

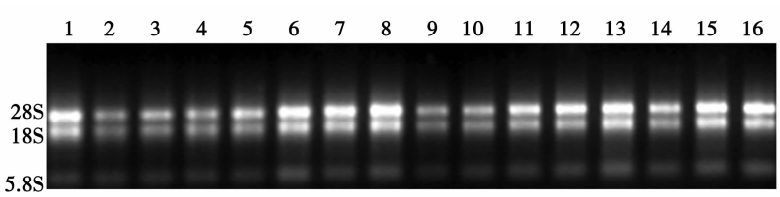
提取到高质量、完整的总 RNA 是有效检测 miRNAs 的保障。下胚轴接种疫霉菌 48 h 后收集叶

片提取总 RNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳。电泳能检测到 3 条清晰的带(28S、18S、5.8S),无明显拖尾,且 28S 亮度基本上为 18S 亮度的 2 倍,表明 RNA 较完整,没有降解(图 2)。



上排从左到右依次为诱变 31、淮豆 5 号、Harosoy、Williams;下排从左到右依次为丰收黄、蒙庆 6 号、Williams 79、Williams 82。
Upper, Youbian 31, Huaidou 5, Harosoy, Williams, respectively from left to right. Below, Fengshouhuang, Mengqing 6, Williams 79, Williams 82, respectively from left to right.

图 1 采用下胚轴创伤接种法接种 P6497 后 3 d 大豆植株的表型症状
Fig. 1 Symptoms of soybeans 72 h post-inoculation using the hypocotyl inoculation method



泳道 1、3、5、7、9、11、13、15 分别为诱变 31、淮豆 5 号、Harosoy、Williams、丰收黄、蒙庆 6 号、Williams 79、Williams 82 接种前的 RNA,泳道 2、4、6、8、10、12、14、16 分别为诱变 31、淮豆 5 号、Harosoy、Williams、丰收黄、蒙庆 6 号、Williams 79、Williams 82 接种后的 RNA。
Lane 1 and 2, Youbian 31 in pre- and post-inoculation; Lane 3 and 4, Huaidou 5 in pre- and post-inoculation; Lane 5 and 6, Harosoy in pre- and post-inoculation; Lane 7 and 8, Williams in pre- and post-inoculation; Lane 9 and 10, Fengshouhuang in pre- and post-inoculation; Lane 11 and 12, Mengqing 6 in pre- and post-inoculation; Lane 13 and 14, Williams 79 in pre- and post-inoculation; Lane 15 and 16, Williams 82 in pre- and post-inoculation.

图 2 RNA 电泳检测图
Fig. 2 RNA gel electrophoresis map

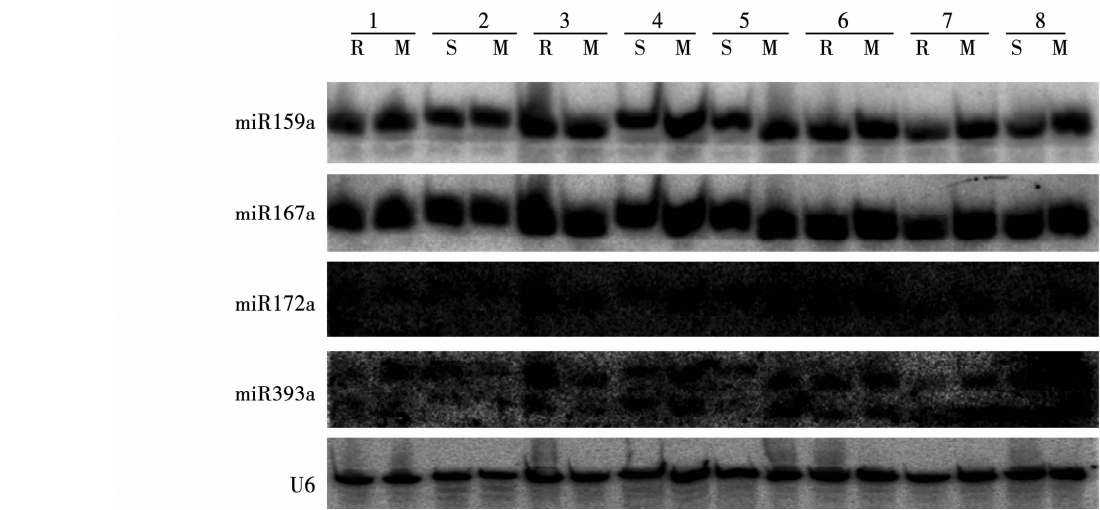
2.3 miRNA 在大豆中的表达

从提取的总 RNA 中沉淀小分子 RNA,进行 Northern Blotting 检测。挑选 7 个保守的 miRNA 进行试验。这些 miRNA 在拟南芥和大豆中高度保守,最多只有 1 个碱基不同。17% TBE-Urea 凝胶每个泳道上上样 20 μg RNA,与 miRNA 探针进行杂交。如图 3 和图 4 所示,miR159a、miR166a、miR167a、miR168a、miR172a、miR393 在接种前后均被检测到,但在接种前后没有明显差异。但 miR393 出现两条带,大小可能为 21 和 22 nt,推测 miR393 可能

还存在新的成员。miR398a 未被检测到。
使用 Northern blotting 方法,没有获得在接种前后有明显差异表达的 miRNA。后来使用小分子 RNA 芯片技术,对抗病品种 Williams 82 和感病品种 Williams 接种前后的差异表达 miRNA 进行了分析。发现,接种大豆疫霉菌 P6497 后,有 42 个大豆中的 miRNAs 受大豆疫霉菌的调控。这 42 个 miRNAs 可分为 25 个家族,miR1507、miR1508、miR1510、miR319、miR396 和 miR482 的表达受大豆疫霉菌的抑制,miR156 和 miR171 的表达受大豆疫霉菌的诱

导。gma-miR319e 在 Williams 82 中上调表达,而在 Williams 中下调表达。gma-miR390a-5p 在抗病品种 Williams 82 中下调表达;gma-miR403 在抗病和感病品种中均呈现下调表达;gma-miR1510a 和 gma-

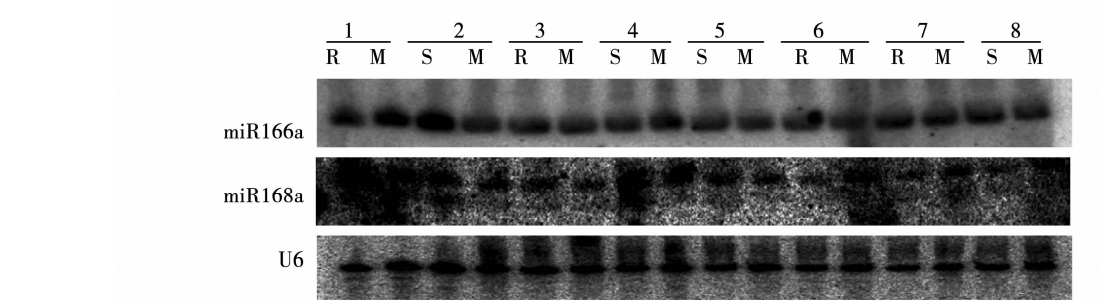
miR1510b 在感病品种 Williams 中下调表达;gma-miR1535 和 gma-miR390b 在抗病品种 Williams 82 和感病品种 Williams 中下调表达。



1:丰收黄;2:诱变 31;3:蒙庆 6 号;4:淮豆 5 号;5:Williams;6:Williams 79;7:Williams 82;8:Harosoy;R 表示抗病,S 表示感病,M 为对照。
U6 is used as a loading control. 1:Fengshouhuang; 2:Youbian 31; 3:Mengqing 6; 4: Huaidou 5; 5: Williams; 6: Williams 79; 7: Williams 82; 8: Harosoy; R: Resistance to P6497; S: Susceptility to P6497; M: CK.

图 3 miR159a、miR167a、miR172a 和 miR393 在 8 个大豆品种中的表达

Fig.3 Expression of conserved miRNAs (miR159a, miR167a, miR172a and miR393) in eight cultivars



1:诱变 31;2:淮豆 5 号;3:丰收黄;4:蒙庆 6 号;5:Williams;6:Harosoy;7:Williams 79;8:Williams 82;R 表示抗病,S 表示感病,M 为对照。
U6 is used as a loading control. 1:Youbian 31; 2: Huaidou 5; 3:Fengshouhuang; 4: Mengqing 6; 5: Williams; 6: Hasosoy; 7:Williams 79; 8: Williams 82; R: Resistance to P6497; S: Susceptility to P6497; M: CK.

图 4 miR166a 和 miR168a 在 8 个大豆品种中的表达

Fig.4 Expression of conserved miRNAs (miR166a and miR168a) in eight cultivars

3 结论与讨论

Northern blotting 是一种鉴定 miRNA 的常用方法。使用该方法对大豆中的 7 个保守 miRNA 进行了检测,发现 6 个 miRNA 表达量比较高,miR159a、miR167a、miR172a、miR166a 和 miR168a 条带单一,大小正确。但是没有发现明显受大豆疫霉菌诱导或抑制的 miRNA。miR398a 未被检测到,或许其表达量在 Northern 杂交能够检测到的水平之下。但是由于 Northern 杂交需要的 RNA 量比较多,且需要使用同位素³²P 杂交,需要的实验条件和场所比较受限

制。后来又运用小分子 RNA 芯片挖掘差异表达 miRNA。

从芯片分析结果可看出,感病品种 Williams 中,受大豆疫霉菌侵染响应的 miRNA 数量最多,其次为耐病品种 Conrad,而在抗病品种 Williams 82 中,受大豆疫霉菌诱导或抑制的 miRNA 数量很少。这可能与不同抗性类型的防御机制相关。已有研究显示,miRNA 是植物基础防御系统中的一个关键元件^[18]。拟南芥中,由鞭毛蛋白多肽诱导的 miR393 负调控 F-box 激素受体,对激素信号的抑制限制了 *P. syringae* 的生长;miR393 缺陷突变体可以部分恢

复非致病性菌株(*P. fluorescens* 或 *E. coli*)的生长。

大豆中已经通过生物信息学和高通量测序的方法预测和鉴定到许多保守的和新的 miRNAs^[12,22]。其中一些受大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的特异性诱导^[12,23],受生物胁迫或非生物胁迫诱导的 miRNA 也有报道^[24]。Subramanian 等发现接种大豆根瘤菌后,miR168 和 miR172 在 3hpi 瞬间上调,12hpi 下降至基础水平。miR159 和 miR393 在 3hpi 显著上调,miR160 和 miR169 则下调。miR160、miR393、miR164、miR168 的靶标分别为 *ARFs*、*TIR1*、*NAC1* 和 *AGO1*。结合这些研究结果,我们推测,miRNA 作为最初信号源,通过参与调控抗病相关信号途径,激活抗病途径关键转录因子,从而合理地调控植物自身的各种抗性机制以抵抗病原菌的侵害。miRNA 直接或间接调控植物抗性基因或蛋白,引起抗病防卫基因的表达,使其表达产物抑制病原菌的生长。部分抗病相关 miRNA 参与大豆的生长发育和大豆疫霉根腐病胁迫响应过程并发挥重要作用,具体调控网络很复杂,需要进一步的深入研究。

致谢:非常感谢中国科学院微生物研究所郭惠珊研究员和冯镭博士提供的实验帮助以及南京农业大学植物保护学院的王源超教授提供的大豆疫霉菌株。

参考文献

[1] Kaufmann M J, Gerdemann J W. Root and stem rot of soybeans caused by *Phytophthora* f. sp. *sojae*[J]. *Phytopathology*, 1958, 48: 201-208.

[2] Hildebrand A A. A root and stalk rot of soybean caused by *Phytophthora megasperma* Drechsler var. *sojae*[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1959, 37: 927-937.

[3] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫病的发现及初步研究[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(4):298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1991, 21(4):298.)

[4] 朱振东, 王化波, 王晓鸣, 等. 中国大豆疫霉菌分布及毒力多样性研究[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(7):793-799. (Zhu Z D, Wang H B, Wang X M, et al. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae* in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(7):793-799.)

[5] 陈庆河, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病病原鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(2): 112-116. (Chen Q H, Weng Q X, Wang Y C, et al. Identification and sequencing of ribosomal DNA-ITS of *Phytophthora sojae* in Fujian[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(2):112-116.)

[6] Bhattacharyya M K, Narayanan N N, Gao H, et al. Identification of a large cluster of coiled coil-nucleotide binding site-leucine rich repeat-type genes from the *Rps1k* region containing *Phytophthora* resistance genes in soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 75-86.

[7] Kasuga T, Salimath S S, Shi J, et al. High resolution genetic and physical mapping of molecular markers linked to the *Phytophthora* resistance gene *Rps1-k* in soybean[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1997, 10: 1035-1044.

[8] Gao H, Bhattacharyya M. The soybean *Phytophthora* resistance locus *Rps1-k* encompasses coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat-like genes and repetitive sequences[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 29.

[9] Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 2001-2019.

[10] Sunkar R, Girke T, Jain P K, et al. Cloning and characterization of microRNAs from rice[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1397-1411.

[11] Zhang B, Pan X, Anderson T A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets[J]. *FEBS Letter*, 2006, 580: 3753-3762.

[12] Zhang B, Pan X, Stellwag E J. Identification of soybean microRNAs and their targets[J]. *Planta*, 2008, 229: 161-182.

[13] Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, et al. Cloning and characterization of microRNAs from moss [J]. *Plant Journal*, 2005, 43: 837-848.

[14] Zhang W, Gao S, Zhou X, et al. Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 75: 93-105.

[15] Zhang X, Zou Z, Gong P, et al. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato[J]. *Biotechnol Letter*, 2011, 33: 403-409.

[16] Zhu C, Ding Y, Liu H. MiR398 and plant stress responses[J]. *Physiol Plant*, 2011, 143(1):1-9.

[17] Zhang B, Pan X, Cannon C H, et al. Conservation and divergence of plant microRNA genes[J]. *Plant Journal*, 2006, 46: 243-259.

[18] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling[J]. *Science*, 2006, 312: 436-439.

[19] Zeiner G M, Norman K L, Thomson J M, et al. *Toxoplasma gondii* infection specifically increases the levels of key host microRNAs [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e8742.

[20] Zeng Y, Cullen B R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells [J]. *RNA*, 2003, 9: 112-123.

[21] 孙石. 大豆疫霉根腐病抗性的遗传分析及基因鉴定和分子作图 [D]. 南京:南京农业大学, 2008:43-55. (Sun S. Genetic analysis and molecular marker of resistance to *phytophthora sojae* in soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008: 43-55.)

[22] Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 160.

[23] Wang Y, Li P, Cao X, et al. Identification and expression analysis of miRNAs from nitrogen-fixing soybean nodules[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378: 799-803.

[24] Kulcheski F R, de Oliveira L F, Molina L G, et al. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 307.