



番茄 Sly-MIR167 的抗冷性研究

郭 鹏,张万筠,马红玉,姜 健*

(大连民族学院 环境与资源学院,辽宁大连 116600)

摘要:以番茄为材料,采用 Northern 杂交技术,分析番茄 MIR167(Sly-MIR167)在低温胁迫下的表达模式,以明确 Sly-MIR167 在冷胁迫下的分子调控机制,为基因工程在改良番茄品种中的实际应用提供依据。结果显示:(1)25 ℃下 Sly-MIR167 在番茄根、茎、花瓣、果实、叶片都有表达,4 ℃低温胁迫下的表达量均增加,表明 Sly-MIR167 表达受低温诱导。(2)采用农杆菌侵染构建表达载体并转化番茄获得转基因植株,冷胁迫实验结果显示:转基因植株在冷胁迫处理的生长状况明显优于对照;另外,冷胁迫下 2 个转基因株系(T_2 -5 和 T_2 -19)的最大光化学效率、叶绿素含量下降幅度明显低于野生型;脯氨酸含量高于野生型;MDA 含量低于野生型,表明 Sly-MIR167 能够提高番茄对冷胁迫的耐受性。(3)通过 miRU 在线软件预测 Sly-MIR167 的靶基因为 NF-YA1、NF-YA2,利用 RT-PCR 技术分析其表达下调,证明它们被 MIR167 负调控。

关键词:miRNAs; Sly-MIR167; 克隆; 冷胁迫; 番茄

中图分类号:Q789

文献标志码:A

Cold Tolerance Research of Sly-MIR167 in Tomato

GUO Peng, ZHANG Wanjun, MA Hongyu, JIANG Jian*

(College of Environment and Resources, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China)

Abstract: In this paper, Northern hybridization was used to analyze the Sly-MIR167 expression pattern of tomato under cold stress. The result shows that:(1) Sly-MIR167 constitutively expressed in roots, stems, petals, fruits and leaves of tomato at 25 ℃. However, the expression trends become more greatly at 4 ℃. The result indicated that Sly-MIR167 was induced by low temperature.(2) The 35S : MIR167 expression vector was constructed and transferred into tomato by *Agrobacterium* infection. The cold stress experimental results show that the transgenic lines have better growth index than that of control. Moreover, the chlorophyll content and F_v/F_m of two transgenic lines(T_2 -5 and T_2 -19) decreased significantly lower than that of wild type; more proline content and less MDA content in the transgenic lines than that in the wild type. Sly-MIR167 can obviously improve the cold tolerance of tomato.(3) The expression assay of target gene NF-YA1, NF-YA2 by RT-PCR demonstrated the down-regulation caused by Sly-MIR167. It indicated that NF-YA1 and NF-YA2 were negative regulated. In a word, the research contributes to provide more application prospects in transgenic tomato.

Key words: miRNAs; Sly-MIR167; clone; cold stress; tomato

MicroRNAs(miRNAs)是一类长度约 21~25 个核苷酸,由生物自身基因组转录的内源非编码小

收稿日期:2013-11-20;修改稿收到日期:2014-04-26

基金项目:国家自然科学基金(31170168);辽宁省科技计划(2011209001);新疆科技支疆项目(201191126);中央高校基金项目(DC120101143);博士启动基金

作者简介:郭 鹏(1980—),男,博士,讲师,主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail:gp@dlnu.edu.cn

*通信作者:姜 健,博士,教授,主要从事植物抗逆研究。E-mail:jjx@dlnu.edu.cn

分子 RNA。植物中 Dicer-like1 (DCL1) 酶剪切 miRNA 初级转录本 (pri-miRNA) 得到 miRNA 前体 (premiRNA), 再由 DCL1 剪切得到 miRNA 成熟体。miRNA 通过与靶基因 mRNA 的完全或部分匹配位点结合, 抑制该靶基因蛋白的合成或指导该 mRNA 的切断, 负调控靶基因的表达^[1-3]。MIR167 是 miRNA 大家族中的一员, 目前对于 MIR167 家族成员的功能研究也主要集中于对植物生长发育的调控。如在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) 及番茄 (*Solanum lycopersicum*) 等植物中控制植物营养生长向生殖生长的转变, 以及幼年期到成年期的阶段转变^[4-11]。拟南芥 MIR167 的超表达引起其靶基因 SPL3 (Squamosa promoter binding protein like 3) SPL 转录因子下调, 与野生型相比, 转基因植株莲座叶大量增多, 顶端优势丧失, 开花时间推迟, 能育性降低^[10]。35S : MIR167 转基因拟南芥中由于过量表达 MIR167 而强烈抑制了 SPL9 与 SPL15 的表达, 植株体型较野生型更小, 莲座叶增多, 第 1 片叶原基与第 2 片叶原基之间的间距增大, 开花延迟, SPL9、SPL15 及其它 SPL 转录因子共同导致这种性状。但关于 MIR167 在冷胁迫下抗逆性表现还未见报道。

相对于 MIR167 在植物生长发育调控功能方面的详尽报道, 其在植物非生物逆境胁迫中的分子调控机制则知之较少。前人研究发现, 在胡杨脱水处理的小分子 RNA 文库中检测到 MIR156 序列, 并发现 MIR167 在脱水胁迫 4 及 6 h 时受抑制^[11]。

番茄在世界各地广泛种植, 也是中国主要的园艺蔬菜之一, 但冷害经常会使产量下降, 造成较大的经济损失。为了研究番茄中 microRNA 在抗逆方面的功能, 本研究以番茄品种‘中蔬 4 号’为材料利用 Northern 杂交技术, 对番茄 MIR167 (Sly-MIR167) 的冷胁迫表达模式进行分析, 同时利用农杆菌侵染的方法获得转基因 35S : MIR167 番茄植株并验证其抗冷性能力。该研究对分析 Sly-MIR167 在冷胁迫下的分子调控机制以及通过基因工程手段改良番茄具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

实验材料为番茄品种‘中蔬 4 号’, 于 2011 年在大连民族学院国家民委重点实验室进行。

1.2 组织及逆境胁迫的表达分析

种子用 50 °C 热水进行表面消毒 10 min。浸种

10 h 后, 将大小基本一致的番茄种子置于铺有滤纸的培养皿中, 将滤纸用水稍微润湿, 上加 1 层湿滤纸, 28 °C 暗中催芽 3~5 d。然后将长至 2 cm 左右的番茄幼苗移入花盆栽培。生长约 2 月后番茄长出第 8 片叶, 取其功能叶, 液氮冷冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。各器官基因表达所用材料须将番茄植株继续培养至开花、结果, 分别取其花瓣和果实, 用液氮冷冻后备用。低温表达所用材料须将番茄植株于 4 °C 分别处理 2、4、8、12、24、48 h 并取其叶片, 用液氮冷冻后备用。分别提取不同处理组织的总 RNA 进行 Northern 杂交分析。用限制性内切酶 *Hind* III 酶切连有 MIR167 片段的 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收目的片段。采用随机引物法, 按 Primer-a-Gene Labeling System 说明书进行探针制备。反应体系为 50 μL, 5× 标记 Buffer (含随机引物) 10.0 μL, dNTP 混合物 2.0 μL, DNA 模板 30.0 μL, BSA 2.0 μL, [α -32P] dCTP (50 μCi, 3 000 Ci/mmol 5.0 μL), DNA 聚合酶 I (Klenow, 5 U/μL) 1.0 μL。混匀后在 25~37 °C 下反应 2 h。

1.3 转基因番茄的获得

将 Sly-MIR167 片段与载体 pMD18-T 连接。转化大肠杆菌、提取质粒, 进行 PCR 和酶切检测, 筛选出正向插入的阳性克隆, 用 *Xba* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶同时对 pMD18-T-Sly-MIR167 和 pROK II 进行酶切并连接。利用农杆菌介导方法转化番茄。收获 T₁ 种子, 70% 酒精消毒 5 min, 2.6% 次氯酸钠消毒 10 min, 最后用灭菌水冲洗 3~4 次, 将转基因种子转入含卡那霉素的 MS 灭菌培养基中, 置于光照培养箱 (控制温度 25 °C/15 °C (昼/夜), 光照时间为 16 h/8 h (昼/夜)) 培养 2 周, 筛选出具有卡那抗性的转基因番茄。获得的 T₂ 作为后续生理指标检测的材料。

1.4 转基因植株的分子检测

按照 1.2 方法对转基因植株进行 Northern 杂交分析, 提取蛋白质, 制备抗体, 进行 Western 杂交。

1.5 转基因植株的生理检测

为得到纯合的转基因株系, 转化株要自交 3 代以上。取 T₀ 代种子, 表面消毒后播种于含 50 mg/L 卡那霉素固体筛选培养基上, 萌发 2 周后, 统计绿苗和黄苗的分离比例, 绿苗移栽到土壤中, 恒温培养至成熟, 单株收取 T₁ 代种子。T₁ 代种子在含 50 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上进行筛选, 其中转基因植株纯合子不再发生分离, 这些植株所结的 T₂ 代种子即为转基因植株的纯合系。以生长 60 d 的 2

个 T_2 株系和野生型(WT)番茄为材料,采用英国 PPSystems 公司生产的 CIRAS-2 便携式光合作用测定系统,在室温和大气 CO_2 浓度下测定 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 处理下叶片的最大光化学效率(F_v/F_m),光强为 $800\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,每个处理测定 3 株重复。参照赵世杰等^[12]方法测定 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 处理下野生型和转基因番茄叶绿素含量、丙二醛(MDA)、脯氨酸含量,每个处理测定 3 株重复。

1.6 靶基因预测及表达分析

用 miRU 在线软件(<http://bioinfo3.noble.org/miRNA/miRU.htm>)来预测番茄 Sly-MIR167 在拟南芥数据库中的靶基因。半定量 RT-PCR 对靶基因 NF-YA1、NF-YA2 在野生型与转基因株系 T_2 -5、 T_2 -19 中表达进行分析。

2 结果与分析

2.1 Sly-MIR167 的表达分析

为了解 Sly-MIR167 在不同器官中的表达情况,进行了 Northern 杂交分析。结果(图 1)表明, Sly-MIR167 在所有器官中均有表达,属于组成型表达,在叶片中的表达明显强于其他器官,在根中的表达最弱,说明 Sly-MIR167 在叶绿素含量高的组织表达量显著较高。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 Sly-MIR167 在不同器官中的表达明显强于在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 的表达(图 1),表明 Sly-MIR167 的表达受低温诱导。

为了进一步地研究 Sly-MIR167 在低温胁迫处理下不同时间点的表达类型,将番茄植株置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 处理 2、4、8、12、24 和 48 h 后检测 Sly-MIR167 的表达情况。结果表明,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,Sly-MIR167 在叶片中表达逐渐增加,在 4 h 时表达最强,然后逐渐降低(图 2),这进一步证明 Sly-MIR167 受低温诱导表达。

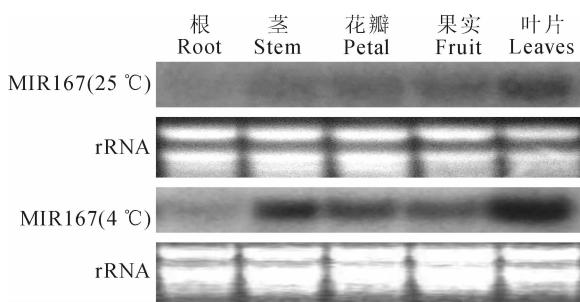


图 1 Sly-MIR167 在不同器官不同温度下的表达

Fig. 1 Expression of Sly-MIR167 in different organs at different temperatures

2.2 转基因番茄的鉴定

为了鉴定 Sly-MIR167 在番茄中的表达状况,随机选取转 Sly-MIR167 植株 4 个 T_1 代株系(T_1 -5、 T_1 -19、 T_1 -21、 T_1 -25)以及野生型植株进行 Northern 和 Western 杂交,检测 Sly-MIR167 在番茄中的表达。结果(图 3)表明,转基因番茄中 Sly-MIR167 基因在转录水平和蛋白水平的表达量都较野生型明显增加,说明 Sly-MIR167 已经插入到番茄染色体中并过量表达。接下来选取表达量最高的 T_1 -5 和 T_1 -19 株系收获 T_2 种子用于其生理功能的研究。

2.3 转基因植株的性状鉴定

为了研究 Sly-MIR167 对植物的抗冷性影响,将转基因番茄和野生型植株低温处理 12 h,对其性状进行观察。结果(图 4)显示:野生型在冷胁迫下出现了明显的萎蔫现象,而转基因番茄表现出相对较强的生长状态。

2.4 转基因番茄生理指标的表现

为了进一步研究 Sly-MIR167 对植物的抗冷性影响,对转基因植株和野生型叶绿素、最大光化学效率、脯氨酸和 MDA 含量进行 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 处理 24 h,结果发现,野生型和转基因株系的叶绿体含量和最大光化学效率都降低,但转基因株系的叶绿素含量和最大光化学效率相对野生型降低较少。其中,野生型叶绿素含量降低了 77%, T_2 -5 降低了 45.7%, T_2 -19 降低了 37%;野生型的最大光化学效率降低了 25%,

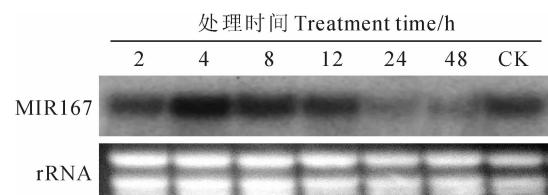


图 2 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 处理下 Sly-MIR167 在番茄叶片不同时间的表达

Fig. 2 Expression of Sly-MIR167 in tomato leaves at different time at $4\text{ }^\circ\text{C}$

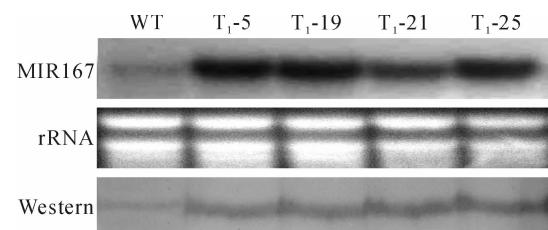


图 3 转 Sly-MIR167 番茄植株的 Northern 和 Western 检测

Fig. 3 Northern and Western hybridization of transgenic Sly-MIR167 tomato plants

T_{2-5} 降低了15%， T_{2-19} 降低了10%。

同样，在常温处理的植株中，转基因植株的MDA含量与野生型相比无明显差别；而冷胁迫处理24 h后，MDA的含量均出现升高趋势，野生型中MDA的含量要高于转基因株系。其中野生型MDA的含量是 T_{2-19} 株系的1.4倍，这说明在冷胁迫条件下转基因植株膜脂过氧化程度较轻。另外，在冷胁迫处理下，转基因番茄植株的脯氨酸含量明

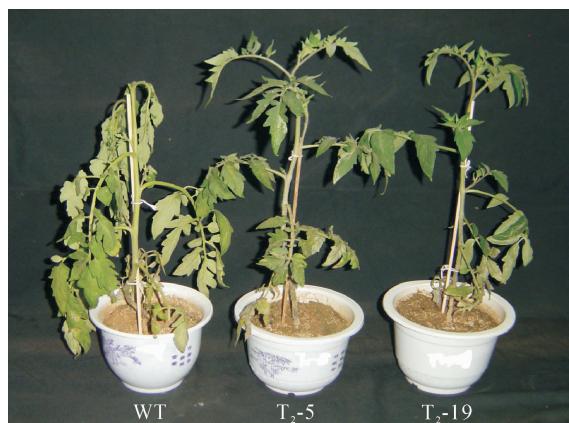


图4 低温胁迫(4°C)12 h后野生型和转基因植株的表型

Fig. 4 Phenotype of WT and transgenic tomato plants after treated at 4°C for 12 h

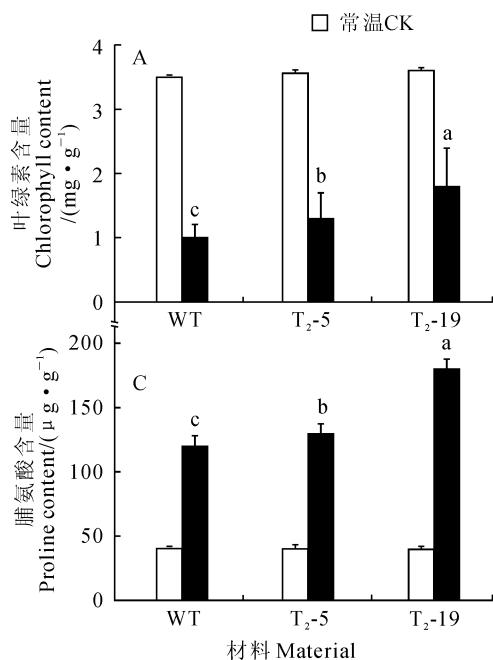


图5 转基因植株不同指标的测定

字母代表同一处理不同材料间0.05水平差异显著性

Fig. 5 Determination of different indicators in transgenic plants

The letters mean significant difference among the materials with the same treatment at 0.05 level

显高于野生型。其中 T_{2-19} 株系的脯氨酸含量是野生型的1.5倍，说明转基因植株渗透调节能力强于野生型(图5)。

2.5 Sly-MIR167 在转基因番茄中靶基因的表达分析

为了进一步揭示其具有耐冷性，将Sly-MIR167成熟体序列提交至miRU在线软件系统预测其靶基因，所预测的靶基因大多为A类核因子YA(一类泛素类转录因子，*NF-YA*)，如*NF-YA1*、*NF-YA2*。同样2个转基因株系中Sly-MIR167成熟体都超量表达了，对预测的靶基因进行分析，发现*NF-YA1*、*NF-YA2*表达都明显下降，说明它们受Sly-MIR167负调控(图6)。

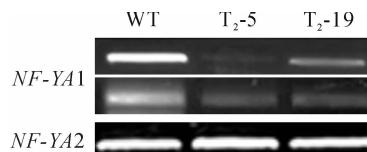


图6 野生型(WT)与Sly-MIR167转基因株系

(T_{2-5} 、 T_{2-19})中Sly-MIR167靶基因表达分析

Fig. 6 Expression analysis of Sly-MIR167 target

genes in the wild type and Sly-MIR167 transgenic plants(T_{2-5} , T_{2-19})

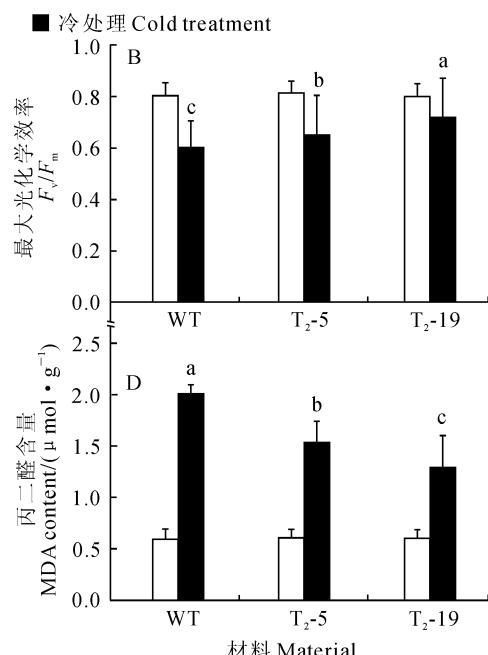


图5 转基因植株不同指标的测定

字母代表同一处理不同材料间0.05水平差异显著性

Fig. 5 Determination of different indicators in transgenic plants

The letters mean significant difference among the materials with the same treatment at 0.05 level

3 讨 论

microRNA 广泛存在于动植物中已是不可辩驳的事实。近几年,有关动植物 microRNA 的研究也是非常普遍。根据 microRNA 特有的功能,研究者发现 microRNA 在动植物生长、发育、成熟以及各种生物或非生物胁迫中都具有举足轻重的调控功能。目前在 30 个不同物种中发现 Sly-MIR167 基因的家族成员,Sly-MIR167 成熟体在不同物种中序列高度保守。植物 microRNA 成熟体序列与靶基因之间具有高度的互补匹配特性,前人研究表明 microRNA 与靶基因相互作用在植物中具有保守性^[12-15]。这意味着 MIR167 在植物生长发育上发挥了重要且保守的功能。但关于 MIR167 在冷胁迫处理下是否起到抗冷作用还有报道。本实验首次对番茄 Sly-MIR167 的抗冷性进行研究。

逆境诱导表达是抗逆基因的典型特征^[16-19]。本实验对 Sly-MIR167 在常温和冷胁迫下表达情况进行研究,结果表明 Sly-MIR167 在所有器官中均有表达,属于组成型表达,在叶片中的表达明显高于其他器官,在根中的表达量最低,说明 Sly-MIR167 在叶绿素含量高的组织表达量较高。4 ℃下 Sly-MIR167 在不同器官中的表达明显高于在 25 ℃的表达,表明 Sly-MIR167 的表达受低温诱导。为了进一步了解 Sly-MIR167 在低温胁迫下的表达趋势,将番茄叶片置于 4 ℃处理 2、4、8、12、24 和 48 h 后进行表达分析。结果表明在不同时间点都有表达,其中 4 h 时表达量最高然后逐渐降低,该结果进一步证明了其受低温诱导表达。

为研究 Sly-MIR167 的抗冷功能,构建其表达载体,在番茄中过量表达该基因,通过 RNA、蛋白质水平上验证该基因表达,选用表达量较高的 T₂-5 和 T₂-19 作为后续生理试验对象。该结果为生理指标

检测的准确性提供了重要的理论基础。

为了从表型上观察 Sly-MIR167 对番茄抗冷能力的影响,对转基因和野生型番茄进行抗冷性试验,试验结果显示,4 ℃低温胁迫 12 h 下造成转基因植株和野生型番茄生长都受到抑制,但转基因植株的生长状况明显优于野生型,证明 Sly-MIR167 的转入提高了番茄的抗冷性。

为了进一步验证 Sly-MIR167 的抗冷性,对 4 ℃处理 24 h 后转基因和野生型番茄的叶绿体含量和最大光化学效率进行比较,结果发现在低温胁迫下转基因的 2 个株系都显示了较高的叶绿素含量和最大光化学效率,其中,T₂-19 株系在冷胁迫下叶绿素含量和最大光化学效率分别是野生型 2.8 和 1.2 倍。说明过量表达 Sly-MIR167 明显减弱了冷胁迫对植物光合机构的损害。同样脯氨酸和 MDA 含量的比较说明过量表达 Sly-MIR167 提高了番茄的渗透调节能力和抗细胞过氧化的能力。Sly-MIR167 最早的研究成果是参与植物发育的调控,推测其可能因这种调控间接地提高了植物的抗逆能力。本研究还通过靶基因预测及表达分析发现 Sly-MIR167 负调控 NF-YA1、NF-YA2 进而达到抗冷的效果。可推测冷胁迫处理下 Sly-MIR167 通过下调靶基因继而影响逆境胁迫相关转录因子 DREB1A/CBF3、DREB2A 的表达,然后 DREB 转录因子上调靶基因 RD29A 的表达使之上调,从而达到抗逆效果^[20-23]。但关于 Sly-MIR167 在冷胁迫下耐冷分子机制的推断及信号转导的网络构建还需进一步的实验研究证明。

总之,Sly-MIR167 是一种受低温胁迫诱导小 RNA,超表达可以提高番茄的抗冷性。随着工作的深入,作者将进一步研究其分子机制以及其它小分子 RNA 在抗冷胁迫中的功能,并为转基因番茄的实践应用提供更多的理论依据。

参考文献:

- [1] BARAKAT A, WALL K P, DILORETO S. Conservation and divergence of microRNAs in *Populus* [J]. *Genomics*, 2007, **21**(8): 481.
- [2] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, **136**(4): 669-687.
- [3] FRANCO-ZORRILLA J M, VALLI A, TODESCO M. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, **138**(4): 750-759.
- [4] HASSON A, PLESSIS A, BLEIN T. Evolution and diverse roles of the cup-shaped cotyledon genes in *Arabidopsis* leaf development [J]. *Plant Cell*, 2011, **23**(3): 54-68.
- [5] VALOCZI A, VARALLVAY E, KAUPPINEN S, et al. Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing

plant tissues[J]. *Plant J.*, 2006, (47): 140—151.

[6] KANTAR M, UNVER T, BUDAR H. Regulation of barley microRNAs upon dehydration stress correlated with target gene[J]. *Funct. Integr. Genomics*, 2010, **10**(4): 493—507.

[7] LEE H, YOO S J, LEE J H. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive microRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**(9): 3 081—3 093.

[8] LI B S, YIN W L, XIA X L. Identification of microRNAs and their targets from *Populus euphratica*[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 2009, **24**(388): 272—277.

[9] LU S, SUN Y, CHIANG V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus*[J]. *Plant J.*, 2008, **55**(1): 131—151.

[10] SCHWAB R, PALATNIK J F, RIESTER M. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. *Dev. Cell*, 2005, **8**(4): 517—527.

[11] SHEN J, XIE K, XIONG L. Global expression profiling of rice microRNAs by one-tube stem-loop reverse transcription quantitative PCR revealed important roles of microRNAs in abiotic stress responses[J]. *Mol. Genet Genomics*, 2010, **284**(6): 477—488.

[12] 赵世杰. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.

[13] SHEKHAWAT U K, SRINIVAS L, GANAPATHI T R. MusaDHN-1, a novel multiple stress-inducible SK(3)-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought- and salt-stress tolerance in banana[J]. *Planta*, 2011, **234**(5): 915—932.

[14] SYLVIA K E, MICHAEL K, JAN P, *et al.* Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin lti30, a cold-induced plant stress protein[J]. *Plant Cell*, 2011, **23**(6): 2 391—2 404.

[15] TOMPA P, BANKI P, BOKOR M, *et al.* Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects[J]. *Biophys. J.*, 2006, **7**(91): 2 243—2 249.

[16] WU G, POETHING R S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by MIR156 and its target SPL3[J]. *Development*, 2006, **133**(18): 3 539—3 547.

[17] WU G, PARK M Y, CONWAY S R, *et al.* The sequential action of MIR156 and MIR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, **138**(4): 750—759.

[18] LEE Y, AHN C, HAN J, *et al.* The nuclear RNase III Drosophila initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, **45**(425): 415—419.

[19] LEE Y, KIM M, HAN J, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA Polymerase II [J]. *EMBO J.*, 2004, **3**(23): 4 051—4 060.

[20] LI B S, YIN W L, XIA X L. Identification of microRNAs and their targets from *Populus euphratica*[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 2009, **4**(388): 272—277.

[21] LIU H H, TIAN X, LI Y J, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. *RNA*, 2008, **68**(14): 836—843.

[22] LIU Q, ZHANG Y C, WANG C Y, *et al.* Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling[J]. *FEBS Letters*, 2009, **2**(583): 723—728.

[23] LUND E, GUTTINGER S, CALADO A, *et al.* Nuclear export of microRNA Precursors[J]. *Science*, 2004, **131**(303): 95—98.