

番茄 ACC 合成酶基因 *Le-ACS6* 启动子的结构分析

林璟瑜^① 樊 荣^① 万小荣^① 常怡雍^② 王宁宁^{①*}

(^① 南开大学生命科学学院植物生物学与生态学系, 天津 300071; ^② “中央研究院”生物农业研究所, 台北 11529.)

* 联系人, E-mail: wangnn@nankai.edu.cn

摘要 乙烯对高等植物的生长发育具有重要的调控作用, 而 *Le-ACS6* 是控制番茄果实发育过程中第 1 系统乙烯合成的关键酶, 其基因表达受乙烯的负反馈调节. 利用 5'系列缺失的 *Le-ACS6* 启动子与报告基因 *LUC* 的融合基因以微粒轰击法瞬时转化番茄果实, 发现 *Le-ACS6* 启动子中 ATG 上游-347 ~ -266 区域可能含有与响应乙烯负调控相关的顺式作用元件. 分别以全长和缺失-347 ~ -266 区域的 *Le-ACS6* 启动子与报告基因 *GUS* 构建融合基因, 利用农杆菌介导的方法稳定转化微型番茄 *Micro-Tom*. 结果表明, -347 ~ -266 区域缺失的 *Le-ACS6* 启动子所驱动的 *GUS* 表达不再受外源乙烯的抑制.

关键词 *Le-ACS6* 启动子 乙烯 微型番茄 *Micro-Tom* 顺式作用元件

气体植物激素乙烯对高等植物体的生长发育具有重要的调控作用, 从种子萌发到各个器官的衰老, 以及植物体对各种环境胁迫, 如机械伤害、寒害、淹水、干旱等的应答反应过程中都有乙烯参与调节. 由于乙烯在果实成熟过程中具有调节作用, 所以又被称为“成熟激素”(ripening hormone)^[1].

乙烯在植物体内的生物合成受到正向(positive)和负向(negative)两方面的反馈调控(feedback regulation), 分别称为自催化(autocatalytic)和自抑制(auto-inhibitive)调节^[2]. 控制乙烯生物合成的关键酶是 ACC 合成酶 (ACC synthase, ACS)^[3]. 目前已知各种因素诱导植物体内乙烯生成都要通过 ACC 合成酶蛋白的重新合成^[4]. ACC 合成酶是由多基因族(multigene family)编码的, 番茄的 ACC 合成酶至少由 8 个基因编码, 分别响应番茄植株在对应如淹水、果实成熟、创伤反应等过程中所需要的乙烯合成反应^[5-10].

根据果实成熟过程中乙烯生成量的变化, McMurchie 等人^[11]首次提出第 1 系统乙烯和第 2 系统乙烯(system 1 和 system 2 ethylene)的观念. 第 1 系统乙烯指具有呼吸跃变的果实在呼吸跃变前(pre-climacteric)所产生的基础水平(basal level)的少量乙烯; 随着果实成熟, 伴随呼吸跃变产生的大量乙烯称为第 2 系统乙烯^[11]. 第 1 系统乙烯和第 2 系统乙烯协调作用共同调控果实的发育和成熟^[12].

目前, 人们普遍认为, *Le-ACS2* 和 *Le-ACS4* 基因的表达是导致番茄果实呼吸跃变和果实成熟过程中

产生大量乙烯(第 2 系统乙烯)的主要原因. 在番茄果实成熟过程, 这两个基因的转录本分别在呼吸跃变前和呼吸跃变过程中迅速累积, 而且可以在成熟绿果(mature-green fruit, MG)中被低量乙烯诱导表达^[6-8,13]. 利用反义(antisense)RNA 技术抑制 *Le-ACS2* 和 *Le-ACS4* 基因的表达将导致转基因番茄果实第 2 系统乙烯合成受阻, 如不经外源乙烯处理则转基因果实无法成熟(ripening)^[14].

与此相反, *Le-ACS1A* 和 *Le-ACS6* 的转录本在呼吸跃变前的绿果中累积但在果实成熟过程中消失, 乙烯或乙烯结构类似物处理能够抑制 *Le-ACS1A* 和 *Le-ACS6* 基因在绿果中的表达, 而乙烯作用抑制剂则可诱导 *Le-ACS6* 在成熟果实中表达, 说明这两个 ACC 合成酶参与了番茄果实发育过程中第 1 系统乙烯的合成^[15,16].

除了果实成熟过程以外, 对于 ACC 合成酶基因表达的负反馈调节在如淹水、伤害、下胚轴生长、营养体生长等多种不同植物生长发育及应答环境刺激过程中都有报告^[17,18], 说明这是一个植物细胞中普遍存在的控制乙烯基础水平的重要机制. 但是, 到目前为止, 乙烯合成的负调控机制还不清楚. 人们在乙烯上调基因包括第 2 系统乙烯 ACC 合成酶基因的启动子区域发现了多个乙烯响应元件(ethylene response element, ERE)^[13,19-24], 但有关响应乙烯负调控以及乙烯合成自抑制的顺式作用元件未见报告.

为深入了解在植物生长发育过程中第 1 系统乙

烯合成的调节机制,本研究克隆了番茄果实发育过程中第1系统乙烯合成的关键ACS编码基因 *Le-ACS6* 的启动子,利用启动子的5'系列缺失(serial deletion)与对番茄果实的瞬时转化(transient transformation)技术,对 *Le-ACS6* 启动子进行结构分析,确定在其ATG上游-347~-266区域内可能存在响应乙烯负调控的重要顺式作用元件(cis-elements).将缺失该区域的 *Le-ACS6* 启动子与报告基因 *GUS* 的融合基因稳定转化微型番茄 Micro-Tom, 所获得的转基因果实中 *GUS* 的表达活性不再表现受果实成熟和外源乙烯负调控的特点.

1 材料与方法

(i) *Le-ACS6::LUC* 融合基因的构建、5'系列缺失与番茄果实的瞬时转化. 以番茄基因组DNA为模板,利用引物 *Le-acs6-7* (5'-ATG TAC ACG CGA TCC CTG AAT A-3')和 *Le-acs6-8* (5'-CCATGG CTA TCT TTG AAA TTA ACC CCA T-3', 下画线处为 *Nco* I 酶切位点)扩增1293 bp的 *Le-ACS6* 基因5'侧翼序列,扩增产物克隆进 pJD 301 载体的 *Pst* I/*Nco* I 位点替代载体原有的 *CaMV* 35S 启动子,构成 *Le-ACS6* 启动子与荧光素酶(luciferase, LUC)的融合基因.

Le-ACS6::LUC 融合基因的5'系列缺失利用 Erase-a-Base System (Promega)进行,缺失后的片段用 Klenow 大片段补平末端后用 T4 连接酶连接形成5'端系列缺失的 *Le-ACS6::LUC* 融合基因载体,缺失位点与长度通过测序确定.

分别将全长或5'端系列缺失的 *Le-ACS6::LUC* 融合基因与 pBI221(35S::*GUS*)混合后利用微粒轰击技术(particle bombardment, BioRad PDS-1000, 1300 psi (1 psi = 6.89476×10^3 Pa), 距离9 cm, 1.0 μ m 金粉粒)共同瞬时转化番茄内果皮(1.5 cm $\times$ 1.5 cm). 转化后的番茄内果皮加或不加 10 μ g/L 外源乙烯处理24 h后测定 LUC 活性,以 *CaMV35S::GUS* 活性作为 *Le-ACS6::LUC* 瞬时转化的内标,以 LUC 活性的相对值(即(LUC 活性/*GUS* 活性) $\times$ 100%)代表 LUC 瞬时转化中的表达水平,以未被 DNA 包被的金粉粒轰击为瞬时转化的负对照. 瞬时转化结果为3~5次独立重复实验(3 $\times$ 3~5 $\times$ 3个样品)的平均结果,由 Microsoft Excel 2000 计算标准误差.

(ii) *Le-ACS6::GUS* 融合基因的构建、目的片段的缺失与微型番茄的稳定转化. 前述的长 1293 bp

的 *Le-ACS6* 启动子片段通过 *Eco*R I/*Nco* I 位点克隆到双元表达载体 pCambia1301 上报告基因 *GUS* 上游,替代原有的 *CaMV* 35S 启动子,构成 *Le-ACS6::GUS* 融合基因,所得构建命名为 F6::*GUS*. 以 F6::*GUS* 为模板,分别利用引物 *Le-acs6-7* 和 *DLe-acs6-2* (5'-TGT CAT TTC GTA AAC TGC AGA TTT T-3')与 *DLe-acs6-1* (5'-GAA AAC TGC AGT TTT CAA GTC TAT G-3')和 *Le-acs6-8* 扩增出 *Le-ACS6* 启动子的-347~-1293片段和+1~-266片段,与 *Eco*R I/*Nco* I 双酶切的 pCambia1301 载体进行三连接反应,获得启动子上缺失-347~-266片段的 *Le-ACS6::GUS* 融合基因,所得构建命名为 D6::*GUS*.

利用土壤农杆菌按照 Meissner 等人^[25]的方法分别以 F6::*GUS* 和 D6::*GUS* 稳定转化微型番茄 Micro-Tom (*L. esculentum* Mill, cv. Micro-Tom), 以潮霉素抗性为筛选标记,所获得的抗性植株以 *Le-acs6-7* 和 *GUS-1* (5'-TCGCGATCCAGACTGAATGCC-3')为引物进行核基因组为模板的PCR检测,以 *GUS* 活性检测确定外源基因的表达. 共获得稳定遗传的7株 F6::*GUS* 和5株 D6::*GUS* 转基因番茄植株,其 *GUS* 活性分别呈现与文中报告的相应典型株系的测定结果一致的趋势.

(iii) 转基因植物的 LUC 活性测定、*GUS* 染色和活性测定. 转基因植物的 LUC 活性测定基本按照 Montgomery 等人^[19]的方法,在磷酸缓冲液体系(pH 7.3)中进行,TD-20/20 Luminometer 持续记录光强变化. *GUS* 染色和活性测定分别按照 Blume 等人^[26]的方法和 Jefferson^[27]的方法进行. *GUS* 活性测定在 pH 7.0 磷酸缓冲液体系中进行,反应时间 30 min. 反应中止后在激发波长 365 nm, 发射波长 455 nm 条件下进行荧光测定 (Shimadzu RF-540 荧光分光光度计,日本岛津). 文中所示各活性测定结果为至少3次独立试验测定的平均值,扫描仪记录 *GUS* 染色结果,染色时间 3 h.

2 结果

2.1 *Le-ACS6* 启动子的活性测定

将长 1293 bp 的 *Le-ACS6* 全长启动子与荧光素酶(luciferase, LUC)的融合基因和 pBI221 (*CaMV* 35S::*GUS*)混合后,利用微粒轰击技术(particle bombardment)瞬时转化番茄内果皮,以 *CaMV35S::GUS* 活性作为瞬时转化的内标,未经转化的番茄内果皮为负对照(NC),研究结果(图1)表明,番茄果实发育

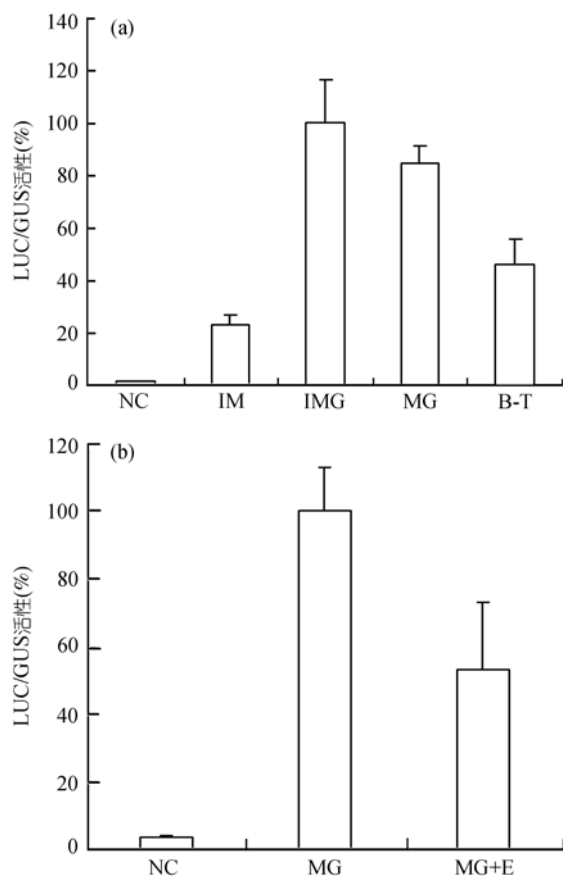


图 1 *Le-ACS6* 启动子在番茄果实中的活性和发育特异性测定

(a) *Le-ACS6* 启动子在果实发育和成熟过程中的活性变化; (b) 10 $\mu\text{g/L}$ 乙烯处理(MG+E)对成熟绿果(MG)中 *Le-ACS6* 启动子活性的影响. NC, 瞬时转化负对照; IM, 未成熟幼果; IMG, 近成熟绿果; MG, 成熟绿果; B-T, 破色期到变色期果实

过程中,从未成熟幼果(immatute, IM)到接近成熟的未成熟绿果(immatute green, IMG) *Le-ACS6* 启动子驱动 LUC 活性迅速增加,到成熟绿果(mature green, MG)期 LUC 表达活性开始下降,待果实发育进入破色期(breaker, B)后, LUC 活性大幅度降低(图 1(a)),而外源 10 $\mu\text{g/L}$ 乙烯处理 24 h 可以显著抑制 MG 果实中的 LUC 活性(图 1(b)),与前人 *Le-ACS6* 基因表达受到果实成熟和乙烯处理抑制的观察一致^[15,16],说明这 1293 bp 的启动子片段中包含了赋予 *Le-ACS6* 基因第 1 系统乙烯 ACC 合成酶表达特性的重要顺式作用元件。

2.2 5'系列缺失对 *Le-ACS6* 启动子活性的影响

分别将全长或 5'端系列缺失的 *Le-ACS6::LUC* 融合基因与 pBI221 (*CaMV* 35S::*GUS*)混合后瞬时转化番茄成熟绿果的内果皮. LUC 活性检测(图 2)表明,

缺失-1293~-960 片段导致 *Le-ACS6* 启动子活性显著下降,但继续缺失-960~-793 片段反而造成 *Le-ACS6* 启动子活性大幅度提高,说明在-960~-793 区域内存在着 *Le-ACS6* 启动子的负调控元件.-793~-347 的系列缺失导致 *Le-ACS6* 启动子活性的急剧下降;继续缺失-347~-266 区域,对 *Le-ACS6* 启动子的活性没有太大影响.对于瞬时转化后的 MG 内果皮用 10 $\mu\text{g/L}$ 乙烯处理 24 h 后再进行 LUC 活性测定,发现从-1293~-347 系列缺失后的启动子,经乙烯处理后的活性变化趋势与未处理的变化趋势基本相同,并且乙烯处理后的活性大都低于相应的未处理组,说明所缺失的-1293~-347 启动子区域内不存在响应乙烯负调控的作用元件.但是继续缺失-347~-266 区域后的 *Le-ACS6* 启动子,经过乙烯处理后活性不但没有下降,反而大幅度提高,表现出乙烯正调控的特点,暗示着 *Le-ACS6* 启动子 5'端-347~-266 区域内可能存在着响应乙烯负调控的顺式作用元件。

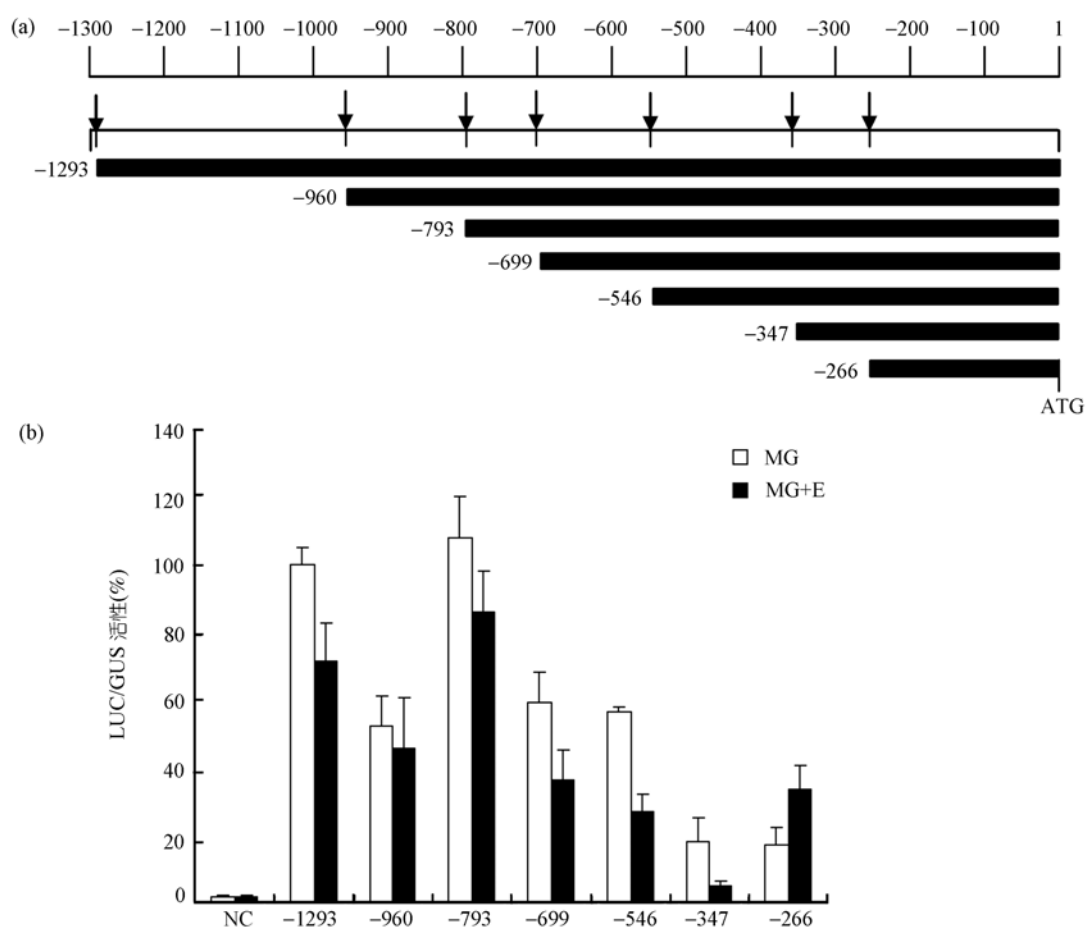
2.3 缺失-347~-266 区域对 *Le-ACS6* 启动子活性的影响

分别在双元载体上构建全长和缺失-347~-266 区域的 *Le-ACS6* 启动子与报告基因 *GUS* 的融合基因 *F6::GUS* 和 *D6::GUS*,并利用土壤农杆菌介导的方法稳定转化微型番茄 Micro-Tom. *GUS* 染色结果(图 3(a))表明, *F6::GUS* 和 *D6::GUS* 在番茄幼果中即有表达,随着果实的发育与成熟, *F6::GUS* 的表达在 IMG-MG 阶段达到最高峰,在果实成熟后的破色到变色期(B-T)活性急剧下降,而 *D6::GUS* 转基因果实中自未成熟到破色期 *GUS* 的活性没有显著变化,不表现受成熟(ripe)抑制的特点.活性测定表明,在近成熟的 *D6::GUS* 转基因绿果中, *GUS* 的活性远远低于相应的 *F6::GUS* 对照,与染色结果非常一致(图 3(b)).

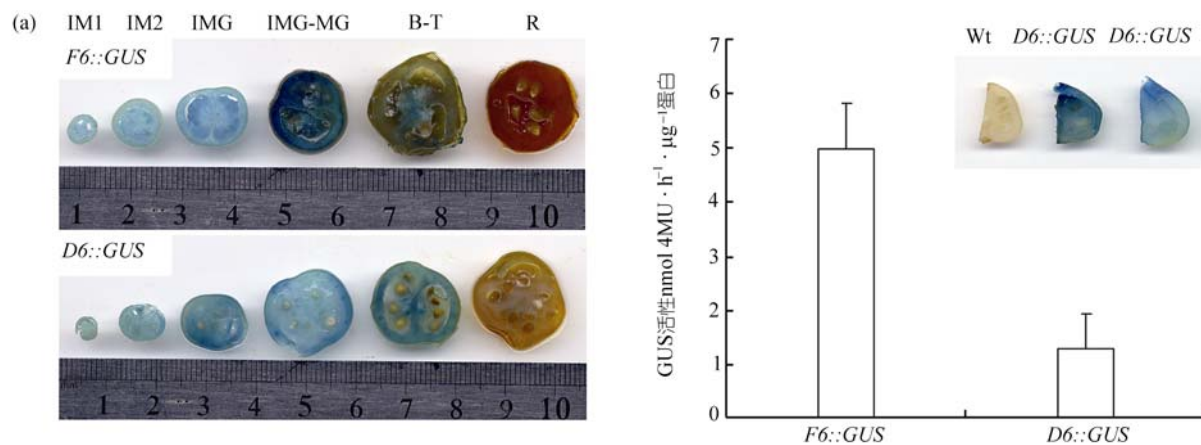
以 10 $\mu\text{g/L}$ 乙烯分别 24 h 处理 *F6::GUS* 和 *D6::GUS* 转基因番茄 MG 果实,发现与未经乙烯处理的对照组相比, *F6::GUS* 转基因番茄果实中 *GUS* 活性明显下降,而 *D6::GUS* 转基因番茄中的 *GUS* 活性则不再受乙烯抑制(图 4)。

3 讨论

Le-ACS6 是第一个被报告参与番茄果实成熟过程中第 1 系统乙烯合成的 ACS 基因^[16],但是人们对于乙烯合成的负反馈调节的分子机制知之甚少,响

图2 5'系列缺失对 *Le-ACS6* 启动子活性的影响

(a) 1293 bp *Le-ACS6* 启动子系列缺失位点示意图; (b) 5'系列缺失的 *Le-ACS6* 启动子在成熟绿果(MG)和 10 $\mu\text{g/L}$ 外源乙烯处理下的成熟绿果(MG+E)中的活性比较

图3 缺失-347~-266区域对 *Le-ACS6* 启动子活性的影响

(a) *F6::GUS* 和 *D6::GUS* 在转基因番茄果实发育过程中活性变化的比较; (b) *F6::GUS* 和 *D6::GUS* 在 IMG-MG 时期转基因番茄果实中的活性比较

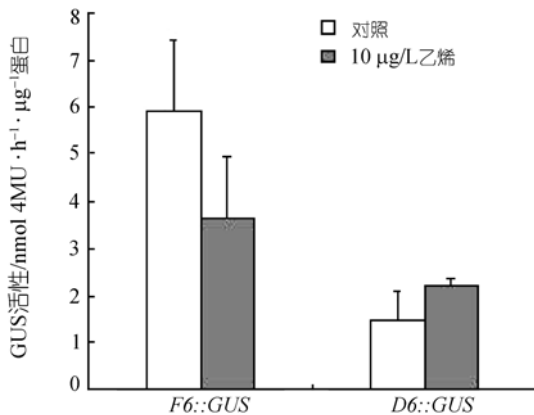


图 4 10 μg/L 乙烯处理对 F6::GUS 和 D6::GUS 转基因番茄 MG 果实中 GUS 活性的影响

应乙烯负调控的顺式作用元件还未见报道。通过对启动子的结构与功能分析来探讨 *Le-ACS6* 基因表达调控的机理, 将为这一研究领域提供有意义的线索。

在前期研究工作中, 我们克隆了约 3 kb 的 *Le-ACS6* 启动子片段, 并证明其中约 1.3 kb 片段具有驱动报告基因 *GUS* 在转基因拟南芥中以乙烯负调控方式表达的活性 [28]。本研究以这条长为 1293 bp 的 *Le-ACS6* 启动子驱动荧光素酶报告基因在番茄内果皮中瞬时表达, 发现 LUC 活性分别受到外源乙烯处理和番茄果实成熟的负调控(图 1), 说明这 1293 bp 的启动子片段中包含了赋予 *Le-ACS6* 基因第 1 系统乙烯 ACC 合成酶表达特性的重要顺式作用元件, 利用这一片段进行启动子结构分析寻找乙烯负调控元件, 可能获得可信的实验结果。

瞬时转化实验结果表明, -347*Le-ACS6*::*LUC* 在 MG 果实中的表达受到乙烯负调控, 而 -266*Le-ACS6*::*LUC* 的表达受到乙烯促进(图 2), 说明 *Le-ACS6* 启动子 5' 端 -347 ~ -266 区域内可能存在着响应乙烯负调控的顺式作用元件。序列分析表明, *Le-ACS6* 启动子起始密码子上游 -103 ~ -98 处存在一个 E4 乙烯响应元件(AWTTCAAA) [29], 这可能是导致乙烯负调控元件缺失后的 -266*Le-ACS6*::*LUC* 基因表达受乙烯上调的原因。缺失 -347 ~ -266 区域的 D6::GUS 稳定转化番茄果实中, *GUS* 的表达也丧失了乙烯负调控特性(图 4), 进一步支持了这种推论。但我们的实验结果无法排除在 *Le-ACS6* 全长启动子中是否还存在着其他顺式作用元件, 控制通过 E4 元件对乙烯的正响应。同时 -347 ~ -266 区域片段的缺失是否会导致 *Le-ACS6* 启动子因结构改变而影响所驱动报告基因

表达的特异性也有待于后续实验检验。我们在研究过程中还发现: -699 ~ -539 区域的缺失, 也赋予 *Le-ACS6* 启动子不受果实成熟抑制的特性, 但不影响乙烯对 *Le-ACS6* 启动子的负调控(未发表), 说明 *Le-ACS6* 启动子中可能存在多个与 -347 ~ -266 区域协同作用的元件, 共同调控 *Le-ACS6* 作为第一系统乙烯 ACC 合成酶基因的表达特性。

总之, 我们的研究结果表明, 在 *Le-ACS6* 启动子中 ATG 上游的 -347 ~ -266 区域中可能存在与响应乙烯负调控相关的顺式作用元件, 但该顺式元件的序列与精细定位及功能还需要更进一步的研究工作进行确定。

参 考 文 献

- 1 Abeles F B, Morgan P W, Saltveit Jr M E. Ethylene in Plant Biology. 2nd ed. New York: Academic Press, 1992
- 2 Kende H. Ethylene biosynthesis. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1993, 44: 283—307[DOI]
- 3 Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35: 155—189
- 4 Kende H. Enzymes of ethylene biosynthesis. Plant Physiol, 1989, 91: 1—4
- 5 Straeten D V D, Wiemeersch L V, Goodman H M, et al. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate synthase in tomato. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 4859—4863[DOI]
- 6 Olson D C, White J A, Edelman L, et al. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 5340—5344[DOI]
- 7 Rottmann W H, Peter G F, Oeller P W, et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. J Mol Biol, 1991, 222: 937—961[DOI]
- 8 Yip W K, Moore T, Yang S F. Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2475—2479[DOI]
- 9 Oetiker J H, Olson D C, Shiu O Y, et al. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Mol Biol, 1997, 34: 275—286[DOI]
- 10 Shiu O Y, Oetiker J H, Yip W K, et al. The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 10334—10339[DOI]
- 11 McMurichie E J, McGlasson W B, Eaks I L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. Nature, 1972, 237: 235—236
- 12 Oetiker J H, Yang S F. The role of ethylene in fruit ripening. Acta Hort, 1995, 398: 167—178
- 13 Lincoln J E, Campbell A D, Oetiker J, et al. LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). J Biol Chem, 1993, 268: 19422—19430
- 14 Oeller P W, Min Wong L, Taylor L P, et al. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 1991, 254:

- 437—439[DOI]
- 15 Barry C S, Llop Tous B M, Grierson D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol*, 2000, 123: 979—986[DOI]
- 16 Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1295—1305[DOI]
- 17 Nakajima N, Mori H, Yamazaki KI, et al. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31: 1021—1029
- 18 Kim J H, Kim W T, Kang B G, et al. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA by ethylene in mung bean hypocotyls: Involvement of both protein phosphorylation and dephosphorylation in ethylene signaling. *Plant J*, 1997, 11: 399—405[DOI]
- 19 Montgomery J, Goldman S, Deikman J, et al. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5939—5943[DOI]
- 20 Deikman J, Xu R, Kneissl M L, et al. Separation of *cis* elements responsive to ethylene, fruit development, and ripening in the 5'-flanking region of the ripening-related *E8* gene. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 1001—1011[DOI]
- 21 Itzhaki H, Maxson J, Woodson W. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (*GST1*) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8925—8929[DOI]
- 22 Chen Y F, Etheridge N, Schaller G E. Ethylene signal transduction. *Ann Bot*, 2005, 95: 901—915[DOI]
- 23 Klee H J. Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 135: 660—667[DOI]
- 24 Stepanova A N, Alonso J M. Ethylene signaling pathway. *Science's STKE*, 2005, 276: cm3
- 25 Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, et al. A new model system for tomato genetics. *Plant J*, 1997, 12(6): 1465—1472[DOI]
- 26 Blume B, Grierson D. Expression of ACC oxidase promoter-gus fusions in tomato and *Nicotiana glauca* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J*, 1997, 12: 731—746[DOI]
- 27 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387—405
- 28 樊荣, 万小荣, 张文涛, 等. LE-ACS6 启动子在 LE-ACS6::GUS 转基因拟南芥中的特异性. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(3): 351—358
- 29 Xu R, Goldman S, Coupe S, et al. Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative *cis*-elements. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(6): 1117—1127[DOI]