

甜瓜 *CmACO1* 启动子组织特异性表达研究

毛娟¹, 陆璐², 陈佰鸿¹, 褚明宇¹, 赵长增^{1,*}

(¹甘肃农业大学农学院, 兰州 730070; ²西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要: 为进一步明确甜瓜果实软化的分子机理, 构建了 ACC 氧化酶 I 基因 (*CmACO1*) 启动子与 *GUS* 基因融合的植物表达载体, 采用根癌农杆菌介导法转化甜瓜 ‘甘甜一号’。通过卡那霉素抗性和 PCR 检测筛选呈阳性的转化植株, 取不同组织进行 X-Gluc 染色。结果表明, 转化植株的根、茎、叶、花、果实等器官组织经 X-Gluc 染色后, 只在花药组织和成熟果皮中出现蓝色斑点, 其余组织均未检出, 表明甜瓜 *CmACO1* 启动子能够驱动 *GUS* 基因在转基因甜瓜花药和成熟果皮中特异表达。

关键词: 甜瓜; *CmACO1* 启动子; *GUS* 基因; 组织特异性

中图分类号: S 652

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1101-09

Studies on Tissue Specific Regulation of *CmACO1* Promoter in Melon

MAO Juan¹, LU Lu², CHEN Bai-hong¹, CHU Ming-yu¹, and ZHAO Chang-zeng^{1,*}

(¹College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ²College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To provide an important reference for further clarifying the molecular mechanism of fruit softening, *GUS* histochemical staining method was employed to detect tissue specific regulation of the *CmACO1* promoter in melon (*Cucumis melo* L.). The plant expression vector with a fusion gene, *CmACO1* promoter and *GUS* gene was established and melon ‘GT-1’ was transformed by using *Agrobacterium*-mediated transformation system. Then the roots, stems, leaves, flowers, fruits and other organs in transformed plants during different growth stages were dyed with X-Gluc. The transformed plants with Kanamycin resistance and positive detection by PCR were obtained. It showed that some blue spots in the anther tissue and peel organ of the after-ripening fruit in the plants with a fusion gene (*CmACO1* promoter and *GUS* gene) were detected by using X-Gluc dye, while the other organs did not appear blue spots. It showed that *GUS* gene was driven by melon *CmACO1* promoter and expressed specifically in anther tissue and peel organ of the after-ripening fruit.

Key words: melon; *CmACO1* promoter; *GUS* gene; tissue specificity

利用转基因技术控制乙烯合成关键酶基因的表达, 进而抑制乙烯的生物合成, 是一条快速培育耐贮运甜瓜新品种的有效途径 (Barry, 1995; Nonaka et al., 2008)。甜瓜 ACC 氧化酶多基因家族的 3 个成员, *CmACO1*、*CmACO2* 和 *CmACO3* 已经被克隆和鉴定, 其受环境因子、发育阶段以及信号刺激后特异表达 (Thomas & Eric, 1997; Anat et al., 1999; Zheng et al., 2002; Wang et al.,

收稿日期: 2013-01-23; 修回日期: 2013-05-06

基金项目: 甘肃省农牧厅生物技术专项 (GNSW-2004-04)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhaochz@tom.com)

2005; Yuan & Jeffrey, 2010)。陆璐等(2000)从哈密瓜中克隆了 *CmACOI* 基因并对其序列进行了分析。在植物转基因研究中, 选择诱导性或组织特异性表达启动子可提高外源基因表达的效果, 减少能量和物质的消耗, 使外源基因表达的时空特征受到有效调控(卢碧霞等, 2006; 胡廷章等, 2007; 宋江华等, 2008; 柏亚男等, 2009)。有研究表明, 甜瓜 *CmACOI* 基因的启动子在转基因烟草中的表达完全具有组织和时空特异性, 在转 *GUS* 基因的烟草花瓣、花托、花梗、柱头以及 3 d 苗龄的幼苗中有明显表达, 而在其他组织都无表达(Lasserre et al., 1996; Eric, 1997)。但是甜瓜 *CmACOI* 基因的启动子在转基因甜瓜中的表达是否具有组织特异性目前尚不清楚。本研究中利用已克隆出的甜瓜 *CmACOI* 启动子(李文彬等, 2001)构建含 *GUS* 基因的植物表达载体, 通过根癌农杆菌介导法转化甜瓜, 并对转基因植株的不同组织进行 X-Gluc 染色检测, 进一步明确甜瓜 *CmACOI* 启动子的组织特异性表达规律, 为利用 *CmACOI* 特异启动子进行外源基因在转基因植物中的定位表达提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2007—2010 年在甘肃农业大学果树生理与生物技术开放实验室进行。甜瓜‘甘甜一号’(*Cucumis melo* L. ‘GT-1’)由甘肃省农业科学院选育。大肠杆菌 DH5 α 、工程菌农杆菌 EHA105、载体质粒 pBI101.2 和启动子质粒 p*CmACOI*-promoter 均由甘肃农业大学果树生理与生物技术开放实验室保存。*CmACOI* 基因的启动子(李文彬等, 2001)克隆长度为 886 bp。元件中含 BRE、ERE, WUN 等, 能接受多种外界信号刺激。*Taq* DNA 聚合酶、*Hind* III、*Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶均购自华美生物公司, 常规化学试剂为国产分析纯, PCR 引物由北京赛百盛生物技术有限公司合成。

启动子引物: 上游 5'-gCAAgCTTAACATAAAgAACCCATggTTgTCC-3'; 下游 5'-gCggATCCTTgC TCCAATATCTTAgtCTCTACC-3'。*npt* II 基因引物: 上游 5'-AggCTATTCggCTATgACTgg-3'; 下游 5'-gCggTCCgCCACACCCAgCCg-3'。

基本培养基: MS + 蔗糖 3% + 琼脂 0.64%, pH 6.0, 121 °C 湿热灭菌 30 min。共培养培养基: MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹。抗性不定芽分化培养基: MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + Kan 75 mg · L⁻¹ + Carb 500 mg · L⁻¹。伸长选择培养基: MS + 6-BA 0.05 mg · L⁻¹ + Kan 75 mg · L⁻¹ + Carb 300 mg · L⁻¹。生根选择培养基: 1/2 MS + Kan 25 mg · L⁻¹ + Cef 200 mg · L⁻¹。抗生素和 6-BA 溶液经过滤灭菌后待培养基温度降至 40 °C 时添加。

1.2 载体构建

采用碱裂解法提取含有目的基因的质粒 p*CmACOI*-promoter 和载体 pBI101.2 并且进行纯化, 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 回收 p*CmACOI*-promoter 886 bp 的小片段和 pBI101.2 大片段, 对大片段进行磷酸化后, 将二者进行连接, 并转化大肠杆菌感受态细胞。通过 Kan 筛选, 重组质粒分子量滞后检测, PCR 检测鉴别重组质粒, 以 pBI101.2 空质粒为对照, 重组质粒如图 1 所示。



图 1 表达载体 pCAPG 101.2 T-DNA 结构示意图

Fig. 1 The T-DNA of pCAPG 101.2

1.3 甜瓜遗传转化方法

1.3.1 工程菌的制备

(1) 从新鲜平板上挑取 pCAPG101.2/At.EHA105 工程菌和空白农杆菌 EHA105 单菌落, 接种到 YEP + Rif 25 mg · L⁻¹ + Str 25 mg · L⁻¹ + Kan 50 mg · L⁻¹ 液体培养基中, 28 ℃, 220 r · min⁻¹ 振荡培养 24 h; (2) 取一次摇的菌液, 按 1 : 100 的比例, 转入 20 mL YEP + Rif 25 mg · L⁻¹ + Str 25 mg · L⁻¹ + Kan 50 mg · L⁻¹ 液体培养基中, 28 ℃, 220 r · min⁻¹ 振荡培养 5 ~ 6 h, 至 OD₅₆₀ 为 0.3 ~ 0.5; (3) 在超净工作台上将上述菌液转入无菌离心管中, 用石蜡膜封口; 室温, 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀菌体; (4) 用 MS 液体培养基重悬菌体两遍, 5 000 r · min⁻¹ 室温离心 5 min, 收集菌体; (5) 用 MS 液体培养基稀释菌体至 20 mL, OD₅₆₀ 约为 0.3。

1.3.2 外植体的准备与遗传转化

将去壳的甜瓜种子用 70% 的酒精处理 30 s, 0.1% 的升汞浸泡 6 min 进行表面灭菌, 然后用无菌水漂洗 4 ~ 5 次, 接种于 1/2MS 培养基上诱导发芽。培养条件为 26 ℃, 3 000 lx 光照强度, 16 h/8 h 光周期。选择 5 d 龄无菌苗的子叶作为外植体。每片子叶横切为 2 片, 取近轴端半片接种。切取子叶时注意从距离茎轴约 1 ~ 2 mm 处切, 不要切下其基部的潜伏腋芽。

将切好的外植体直接浸入农杆菌悬浮液中侵染 15 min, 取出吸干多余菌液, 接种于共培养培养基中, 26 ℃ 暗培养。共设 4 个处理: (1) 阴性对照 (未侵染); (2) 阳性对照 1 (未侵染, 但接种于抗性不定芽分化培养基); (3) 阳性对照 2 (EHA105 空菌株侵染, 接种于抗性不定芽分化培养基); (4) pCAPG101.2 / At.EHA105 侵染, 接种于抗性不定芽分化培养基。

共培养 72 h 后, 将各处理的外植体用适量 MS 液体培养基洗涤 4 次, 再用 10 mL 附加有 100 μL Amp (50 mg · L⁻¹) 的 MS 液体培养基浸泡 10 min。取出外植体, 用无菌滤纸吸干多余菌液, 接种于新鲜的抗性不定芽分化培养基, 观察不定芽分化情况, 30 d 后统计不定芽分化数。30 d 后, 切取外植体近轴端诱导出的不定芽, 接种于伸长选择培养基上, 待无根苗生长到 1 ~ 2 cm、3 ~ 4 片叶子时, 小心切下, 接种到生根选择培养基上, 以获得完整植株。

1.4 GUS 组织化学染色

参照王关林和方宏筠 (2002) 的 GUS 组织化学染色法。①取转化植株根、茎、叶、花、果实、种子等器官组织, 放入 X-Gluc 染色液中, 37 ℃ 保温过夜; ②取出材料, 转入 70% 的酒精中脱色 2 ~ 3 次, 至阴性对照材料 (未转化植株) 呈白色; ③肉眼或显微镜下观察染色结果, 白色背景下的蓝色斑点即为 GUS 表达位点。

2 结果与分析

2.1 载体构建

从 Kan 抗性转化平板上随机挑取单重组菌落提取质粒进行电泳滞后检测, 对电泳检测滞后质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 得到了与 p*CmACO1*-promoter 相同的 886 bp 的小片段 (图 2, A), 说明在载体 pBI101.2 的 *GUS* 基因前插入了的目的片段 *CmACO1* 启动子; 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶后, 得到一段 *GUS* 与启动子融合的约 3 000 bp 的片段 (图 2, B), 进一步证实了插入的目的片段的位点正确。用 p*CmACO1*-promoter 的引物做 PCR 检测, 结果如图 2, C 所示, 扩增得到了与预期片段大小相符的条带。以上结果证实了启动子已经与 *GUS* 基因融合, 重组子被命名为 pCAPG101.2。采用冻融法将重组质粒 pCAPG101.2 转化感受态农杆菌 EHA 105。

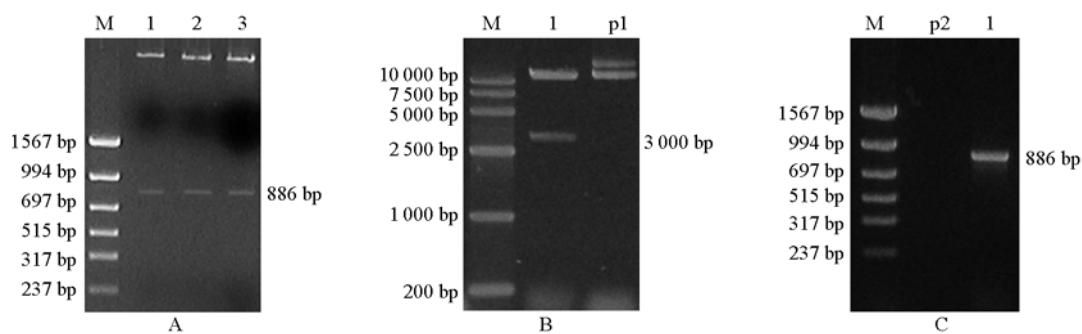


图2 重组质粒 *Bam*H I + *Hind* III 双酶切 (A)、*Eco*R I + *Hind* III 双酶切 (B) 和 PCR (C) 鉴定

M: Marker; 1~3: 重组质粒酶切; p1: pCAPG101.2; p2: pBI101.2.

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid with *Bam*H I + *Hind* III digestion (A), *Eco*R I + *Hind* III digestion (B) and PCR (C)

M: Marker; 1 - 3: Production of recombinant plasmid; p1: pCAPG101.2; p2: pBI101.2.

2.2 转基因甜瓜的获得

2.2.1 Kan 抗性苗的获得

外植体接种 20 d 后, 正常条件下 (阴性对照) 再生甜瓜子叶外植体近轴端伤口处不定芽分化, 分化率为 100% (图 3, A); 阳性对照 1 (未侵染, 但接种于抗性不定芽分化培养基) 没有分化迹象, 外植体膨大不明显, 叶片不生长, 略微发生黄化 (图 3, B); 阳性对照 2 (EHA105 空菌株侵染, 接种于抗性不定芽分化培养基) 略微有分化迹象, 近轴端产生少量愈伤组织, 但没有芽体分化, 叶片

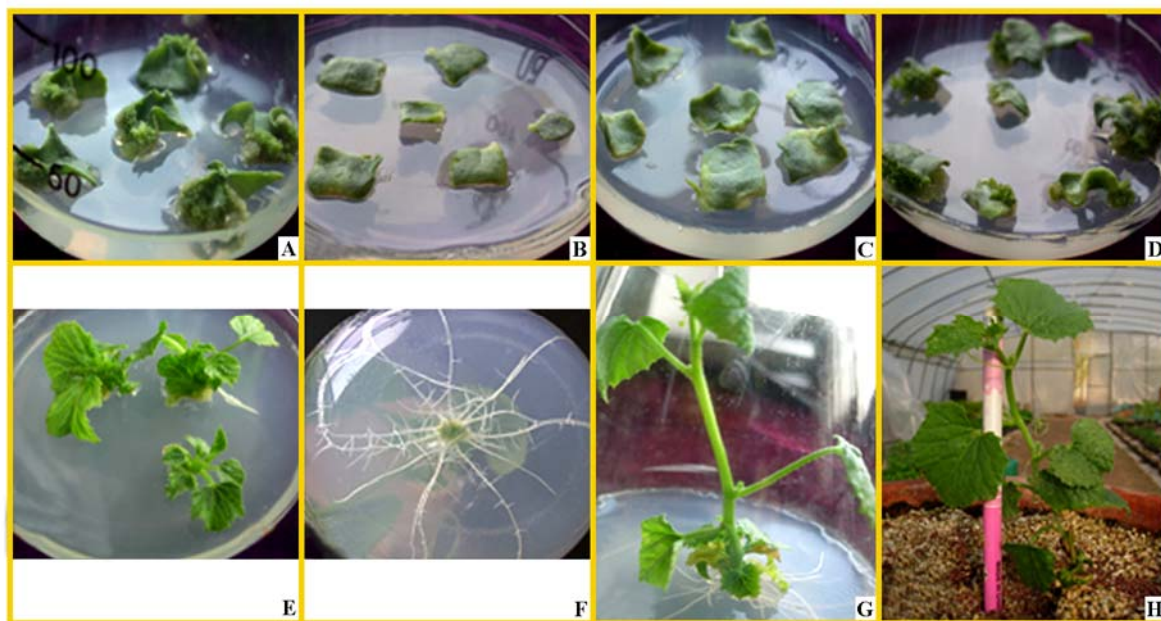


图3 甜瓜抗性苗的获得

A: 阴性对照 (未侵染); B: 阳性对照 1 (未侵染, 接种于 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 抗性不定芽分化培养基); C: 阳性对照 2 (EHA105 菌株侵染); D: pCAPG101.2/At.EHA105 侵染; E: 抗性不定芽伸长; F: 转化植株在无 Cef 培养基上生根; G: 转化植株; H: 转基因植株在温室中。

Fig. 3 The transgene plant of melon 'GT-1' (*Cucumis melo* L.)

A: Negative control (Un-infected); B: Positive control No.1 (Un-infected adventitious buds inoculated on the selection medium with Kan $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C: Positive control No.2 (Infected with EHA105); D: Infected with pCAPG101.2 / At.EHA105; E: Elongation of shoots from adventitious buds; F: Rooting of transgenic plants on free-Cef medium; G: The transgenic plantlet; H: The transgenic plants in the greenhouse.

不黄化（图 3，C）；pCAPG101.2 / At.EHA105 侵染的甜瓜子叶外植体在抗性芽选择分化培养基上开始萌动，部分叶片有芽迹分化，但分化芽体的速度明显慢于阴性对照（图 3，D）；40 d 抗性芽的分化率达 50%，并且畸形芽较多。

将分化良好的抗性芽丛（图 3，E）转接到伸长培养基上进行筛选，30 d 左右获得独立芽，而未转化芽丛在伸长培养基上停止生长，发生枯黄死亡。将抗性苗接种到生根培养基上进行筛选，抗性植株生根（图 3，F、G），但是抗性芽的生根率仅为 1.5%，未转化植株不生根并发生黄化。

2.2.2 转化植株的检测

对脱除农杆菌的抗性苗用 *npt* II 基因片段的引物进行检测，扩增出了目的片段（图 4），而未转化的幼苗没有目的条带，证明 *npt* II 基因已经整合到甜瓜基因组中，由于 *npt* II 基因和基因 *GUS* 基因在载体上是串联的，初步证实目的基因 *GUS* 已进入植株。本研究中共转化 2 000 个外植体，得到再生植株 1 921 个。为了进一步证明目的基因已进入甜瓜基因组中，采用连续 PCR 扩增的方法选择，同时也可以排除 PCR 不稳定造成未转化体的逃逸。在整个甜瓜的生长期进行了多次 PCR 扩增检测，筛选出 14 株一直呈阳性的植株，阳性率为 0.73%。

对获得的转化植株开瓶炼苗后移栽于温室中。转化植株生长势较弱；生育期为 110 d，比非转化试管苗植株的生育期延长了 20 d 左右。

2.3 GUS 组织化学检测

获得的 14 个转化植株，在温室内进行驯化移栽后，有 10 株存活。取其叶、花、茎、根、幼果、成熟果、种子，以未转化植株为对照，进行 GUS 组织化学染色分析。观察不同器官中能够显色的组织（表 1）。

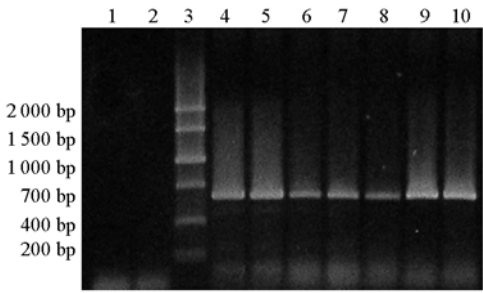


图 4 转基因甜瓜的 *npt* II 基因的 PCR 扩增
1: 未转化对照；2: 空白对照；3: PCR marker；
4 ~ 10: 转化植株。
Fig. 4 PCR identification of transgenic tabacum plants with the primer of *npt* II gene
1: Untransformed control; 2: Blank control; 3: PCR marker;
4 - 10: Transgenic plants.

表 1 转化植株不同器官 GUS 组织化学染色结果

Table 1 The result of GUS histochemical stain in different tissues of transgenic plants

| 株系 Lines No. | 叶片 Leaf | 花 Flower | 茎 Stem | 根 Root | 幼果果皮 Skin of immature fruit | 幼果果肉 Flesh of immature fruit | 成熟果果皮 Skin of mature fruit | 成熟果果肉 Flesh of mature fruit | 种子 Seed |
|-----------------|------------|-------------|-----------|-----------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------|
| 1 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 2 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 3 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 6 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 7 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 8 | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 10 | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 对照 Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

注：“+”表示 X-Gluc 染色后呈蓝色，“-”表示 X-Gluc 染色后无蓝色。

Note: “+” means blue color stained by X-Gluc, “-” means no color stained by X-Gluc.

如表 1 和图 5 所示, 经 GUS 组织化学检测后, 90%转化植株的花药和 80%甜瓜阳性转化植株的成熟果皮被 X-Gluc 染成蓝色, 而对照 (未转化植株) 与其他器官组织均未出现蓝色, 说明甜瓜 *CmACO1* 基因的启动子能够调控 *GUS* 基因在转基因甜瓜的花药和成熟果实的果皮组织中表达, 而在叶、茎、根、幼果中不能调控表达。

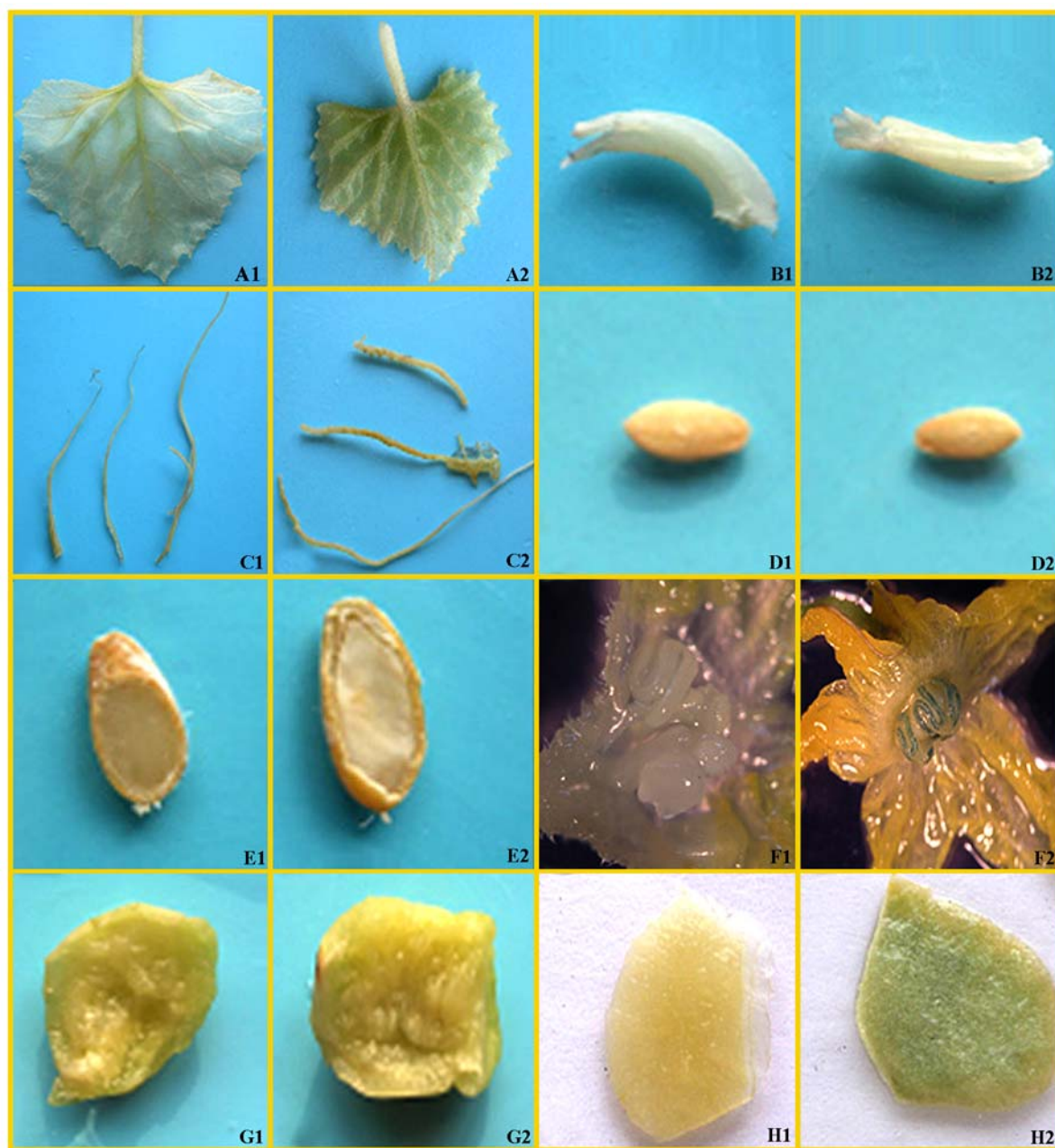


图 5 GUS 组织化学检测

A1 ~ H1: 未转化植株; A2 ~ H2: 转化植株。

A: 叶片; B: 茎; C: 根; D: 种子; E: 种仁; F: 花; G: 未成熟果实; H: 成熟果实。

Fig. 5 Histochemical GUS assay

A1 - H1: Untransgenic plants; A2 - H2: Transgenic plants.

A: Leaf; B: Stem; C: Root; D: Seed; E: Seed; F: Flower; G: Immature fruit; H: Mature fruit.

3 讨论

甜瓜是典型的呼吸跃变型果实, 调控果实的乙烯代谢途径, 尤其是克隆果实软化相关基因是提高果实耐贮性的一项有效措施 (Guis et al., 1997; Bower et al., 2002; Daniel & Islam, 2006; Mehmet & Geza, 2010), 现已从多种植物中克隆出了 ACC 氧化酶基因和 ACC 合成酶基因 (Kende, 1993; Mathooko, 1996), 并获得了转基因植株 (Castellano & Vioque, 2002; Higgins et al., 2006; Shan & Goodwin, 2006; Daniel et al., 2009; Hao et al., 2011), 同时开展了乙烯受体与成熟调控方面的研究 (魏绍冲 等, 2004; 朱海生 等, 2008)。甜瓜 ACC 氧化酶基因表达具有器官特异性和时空特异性, 其中 *CmACO1* 在果实后熟和逆境中迅速表达, *CmACO2* 仅在黄化下胚轴中低水平表达, *CmACO3* 在开花时特异表达, 且不受环境刺激诱导, *CmACO1* 是在成熟果实中唯一伴随着氧化酶活性高峰而出现转录高水平的基因 (Lasserre et al., 1996)。本研究在 *GUS* 基因前插入甜瓜 ACC 氧化酶基因的启动子, 驱动 *GUS* 表达, 通过组织化学检测分析融合基因的时空表达模式。结果发现甜瓜 *CmACO1* 基因的启动子能够调控 *GUS* 基因在甜瓜的花药和成熟果皮组织中表达, 具有组织特异性。而 Eric (1997) 研究 *CmACO1* 启动子在转 *GUS* 基因烟草中, 甜瓜 *GUS* 基因启动子在烟草的柱头、花瓣、花托、花梗以及 F₁ 代 3 d 龄的幼苗中都有较高的表达量, 本试验结果与其不一致。可能是由于甜瓜与烟草属于不同科的植物, 自身的器官建造、生长发育途径和目标产物表达的差异所致。

近几年, 在转基因植株中大多数使用组成型的 35S 启动子, 这样容易使基因表达, 但基因表达的时空特异性不明显。组织特异性表达不仅能使目的基因的表达产物在特定器官或组织部位积累, 增加区域表达量, 还可以避免植物营养的浪费。目前已对大豆、甜瓜、烟草、拟南芥等多种植物营养器官和生殖器官中表达的特异性启动子进行了研究 (财音青格乐 等, 2005; 郭庆勋 等, 2006; 宋扬 等, 2007)。Rotino 等 (1997) 将子房特异性表达启动子 *DefH9* 与 *IaaM* 基因融合, 将其导入茄子和烟草中, 单性结实株率达 50%, 且坐果率达 90%。*GUS* 基因是利用转化植物细胞所产生的 β -葡萄糖苷酶的水解产物与 X-Gluc 发生显色反应的原理, 具有操作简单、方便和灵敏的特点, 被作为报告基因广泛应用于植物转基因研究中 (Wang et al., 2005; 杨宇 等, 2011)。本试验中首次将 *CmACO1* 启动子驱动的 *GUS* 基因导入甜瓜中, 对 PCR 检测呈阳性的转基因植株, 经 *GUS* 染色后 80% 以上植株其组织表现出了特异性。说明 *GUS* 染色组织特异性强, 能够应用于甜瓜基因表达的研究中。

在植物乙烯代谢的研究中大多数研究是针对整个果实的, 对于果实不同组织之间乙烯产生的动态研究甚少。在 ACC 调控果实成熟的过程, 乙烯首先在果实的哪个部位产生还没有形成统一的共识。猕猴桃果实 ACC 氧化酶基因在果实不同组织中的表达以中柱组织 (内果皮以内的果芯组织) 的表达量最高, 内果皮次之 (徐忠传, 2001)。本研究中发现甜瓜 ‘甘甜一号’ 中 *CmACO1* 启动子驱动的 *GUS* 基因, 在果实成熟期 (在植株上未采摘之前), *GUS* 基因首先在果皮中表达, 而在果肉中未检测到表达, 说明甜瓜果实成熟过程中, 果皮中 *GUS* 基因的表达, 促进了乙烯的生物合成与果皮的成熟老化, 使果实的硬度和贮运性降低。

References

- Anat K, Leah S, Naama K, Ronald S. 1999. Expression of ACC oxidase genes differs among sex genotypes and sex phases in cucumber. *Plant Molecular Biology*, (41): 517 - 528.
- Bai Ya-nan, Wu Mao-sen, He Chen-yang. 2009. Molecular cloning and activity analysis of a rice gene promoter OsBTF3p. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (3): 862 - 868. (in Chinese)

- 柏亚男, 吴茂森, 何晨阳. 2009. 水稻基因启动子 OsBTF3p 的克隆和启动活性分析. 中国农业科学, 42 (3): 862 - 868.
- Barry J. 1995. Differential expression two 1-amino-cyclopropane-carboxylic acid oxidase genes in broccoli after harvest. Plant Physiology, 110: 651 - 657.
- Bower J, Holdford P, Latché A, Pech J C. 2002. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of the melon. Postharvest Biology Technology, 26: 135 - 146.
- Caiyin Qing-ge-le, Li Ming-chun, Cai Yi, Zhao Yue-ju, Xing Lai-jun. 2005. Isolation and structural analysis of the seed-specific promoter from soybean. Scientia Agricultura Sinica, 38 (3): 454 - 461. (in Chinese)
- 财音青格乐, 李明春, 蔡 易, 赵月菊, 邢来君. 2005. 大豆种子特异性启动子的分离及结构分析. 中国农业科学, 38 (3): 454 - 461.
- Castellano J M, Vioque B. 2002. Characterisation of the ACC oxidase activity in transgenic auxin overproducing tomato during ripening. Plant Growth Regulation, 38: 203 - 208.
- Daniel M Q, Islam E S. 2006. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. Plant Molecular Biology, 161: 675 - 685.
- Daniel R, Gallie J G, Juifen C. 2009. Tissue-specific expression of the ethylene biosynthetic machinery regulates root growth in maize. Plant Molecular Biology, 69: 195 - 211.
- Eric L. 1997. Differential activation of two ACC oxidase gene promoters from melon during plant development and in response to pathogen attack. Molecular Genetic and Genomics, 256: 211 - 222.
- Guis M, Botondi R, Ben A M, Ayub R, Bouzayen M, Pech J C, Latche A. 1997. Ripening-associated biochemical traits of can-taloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. Journal of the American Society for Horticultural Science, 122 (6): 748 - 751.
- Guo Qing-xun, Qin Zhi-wei, Ding Guo-hua, Zhou Xiu-yan. 2006. Construction of reverse sense expression vectors of ACC synthase gene by fruit specificity promoter (E8) in oriental melon. Chinese Agricultural Science Bulletin, 22 (1): 32 - 37. (in Chinese)
- 郭庆勋, 秦智伟, 丁国华, 周秀艳. 2006. 果实特异启动子调控薄皮甜瓜 ACC 合成酶反义基因植物表达载体的构建. 农业生物技术科学, 22 (1): 32 - 37.
- Hao J F, Niu Y D, Yang B J. 2011. Transformation of a marker-free and vector-free antisense ACC oxidase gene cassette into melon via the pollen-tube pathway. Biotechnology Letter, 33: 55 - 61.
- Higgins J D, Newbury H J, Barbara D J. 2006. The production of marker-free genetically engineered broccoli with sense and antisense ACC synthase 1 and ACC oxidases 1 and 2 to extend shelf-life. Molecular Breeding, 17: 7 - 20.
- Hu Ting-zhang, Luo Kai, Gan Li-ping, Shi Ru-jie. 2007. Classification and application of the plant gene promoters. Hubei Agricultural Sciences, 46 (1): 149 - 152. (in Chinese)
- 胡廷章, 罗 凯, 甘丽萍, 石汝杰. 2007. 植物基因启动子的类型及其应用. 湖北农业科学, 46 (1): 149 - 152.
- Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 44: 283 - 307.
- Lasserre E, Bouquin T, Hernandez J A, Bull J, Pech J C, Balagué C. 1996. Structure and expression of three gene encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). Molecular Genetic and Genomics, 251: 81 - 90.
- Li Wen-bin, Lu Lu, Zheng Xue-qin. 2001. Cloning and sequencing of responsive element of 5' non-translated region of ACC oxidase from melon. Chinese Journal of Tropical Crops, (2): 56 - 62. (in Chinese)
- 李文彬, 陆 璐, 郑学勤. 2001. 甜瓜 ACC 氧化酶前导元件的克隆与序列分析. 热带作物学报, (2): 56 - 62.
- Lu Bi-xia, Ma Shou-cai, Zhang Gai-sheng, Xia Mian, Xin Li. 2006. Specific expression of exogenous genes regulated by *AtSTP3* promoter of *Arabidopsis thaliana*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 26 (6): 1087 - 1092. (in Chinese)
- 卢碧霞, 马守才, 张改生, 夏 勉, 辛 莉. 2006. *AtSTP3* 启动子控制的外源基因在转基因水稻中的特异表达研究. 西北植物学报, 26 (6): 1087 - 1092.
- Lu Lu, Wang Ming, Zheng Xue-qin, Li Xiao-juan. 2000. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding ACC oxidase from Hami melon fruit. Acta Horticulturae Sinica, 27 (1): 32 - 36. (in Chinese)
- 陆 璐, 王 鸣, 郑学勤, 李小娟. 2000. 哈密瓜ACC氧化酶cDNA克隆及其序列分析. 园艺学报, 27 (1): 32 - 36.
- Mathooko F M. 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. Postharvest Biology Technology, 7: 1 - 26.
- Mehmet K, Geza H. 2010. Characterization of an expansion gene and its ripening-specific promoter fragments from sour cherry (*Prunus cerasus* L.)

- cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 1073 – 1084.
- Nonaka S, Yuhashi K I, Takada K, Sugawara M, Minamisawa K, Ezura H. 2008. Ethylene production in plants during transformation suppresses vir gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *New Phytologist*, 178: 647 – 656.
- Rotino G L, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol*, (13): 1398 – 1401.
- Shan X C, Goodwin P H. 2006. Silencing an ACC oxidase gene affects the susceptible host response of *Nicotiana benthamiana* to infection by *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Cell Reprt*, 25: 241 – 247.
- Song Jiang-hua, Zhu Ye-peng, Yu Xiao-lin, Xiang Xun, Cao Jia-shu. 2008. Effect of the antisense *BcMF12* driven by the BcA9 promoter on gene silencing in *Brassica campestris* L. ssp. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (5): 1410 – 1415. (in Chinese)
- 宋江华, 朱熠鹏, 余小林, 向 珣, 曹家树. 2008. BcA9 启动子调控的反义 *BcMF12* 对白菜基因沉默的效果. *中国农业科学*, 41 (5): 1410 – 1415.
- Song Yang, Zhou Jun-hui, Zhang Yong-qiang. 2007. Research on plant tissue-specific promoters. *Biotechnology Bulletin*, (6): 21 – 24. (in Chinese)
- 宋 扬, 周军会, 张永强. 2007. 植物组织特异性启动子研究. *生物技术通报*, (6): 21 – 24.
- Thomas B, Eric L. 1997. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways. *Plant Molecular Biology*, (35): 1029 – 1035.
- Wang A Q, Yang L T, Wang Z Z, Wei Y T. 2005. Expression of ACC oxidase gene from sugarcane induced by hormones and environmental force. *Agricultural Sciences in China*, 4 (8): 609 – 613.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. *Plant gene engineering*. 2nd. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程. 第 2 版. 北京: 科学出版社.
- Wang N N, Shi M C, Li N. 2005. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of *Arabidopsis* ACC synthase genes *AtACS4*, *AtACS5*, and *AtACS7* induced by hormones and stresses. *Journal of Experimental Botany*, 56 (413): 909 – 920.
- Wei Shao-chong, Chen Kun-song, Luo Yun-bo. 2004. Ethylene receptor and its regulation in ripening fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (4): 543 – 548. (in Chinese)
- 魏绍冲, 陈昆松, 罗云波. 2004. 乙烯受体与果实成熟调控. *园艺学报*, 31 (4): 543 – 548.
- Xu Zhong-chuan. 2001. Study on the differences for the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid xidase in different tissues of ripening kiwi fruit. *Journal of China University of Science and Technology*, 31 (2): 235 – 240. (in Chinese)
- 徐忠传. 2001. 成熟猕猴桃果实不同组织中 ACC 氧化酶基因的表达差异研究. *中国科学技术大学学报*, 31 (2): 235 – 240.
- Yang Yu, Li Jiang-jiang, Wang Xiang, Qiu Guan-zhou. 2011. Progresses on reporter gene and its application. *Life Science Research*, 15 (3): 277 – 282. (in Chinese)
- 杨 宇, 李江江, 王 项, 邱冠周. 2011. 报告基因及其应用研究进展. *生命科学研究*, 15 (3): 277 – 282.
- Yuan S H, Jeffrey F D. 2010. Differential responses of the promoters from nearly identical paralogs of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) ACC oxidase to biotic and abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 232: 873 – 886.
- Zheng X Y, Wolff D W, Crosby K M. 2002. Genetics of ethylene biosynthesis and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of ACC oxidase and synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet*, 105: 397 – 403.
- Zhu Hai-sheng, Pan Dong-ming, Wen Qing-fang, Lin Yi-zhang. 2008. Transformation of antisense ethylene reportor *FaEtr2* gene in strawberrry. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (11): 1587 – 1594. (in Chinese)
- 朱海生, 潘东明, 温庆放, 林义章. 2008. 反义乙烯受体 *FaEtr2* 基因对草莓的转化. *园艺学报*, 35 (11): 1587 – 1594.