

植物谷氨酰胺合成酶基因以及基因表达

印莉萍 刘祥林

林忠平

(首都师范大学生物系 北京 100037) (中科院植物所 北京 100044)

一 引言

谷氨酰胺合成酶(GS)是植物同化氮途径中的关键酶,其在氮代谢中所处地位可与碳代谢中的 Rubisco 相媲美。

氮的同化初始发生在 GS/GOGAT 循环中。在此循环里 GS(EC6. 3. 1. 2)与谷氨酸合成酶(GOGAT; EC1. 4. 1. 14)联合将 NH_4^+ 转给 α -酮戊二酸生成谷氨酸。通过 ATP 供能进一步还原形成谷氨酰胺。氮的来源各异,可以是初级的,如土壤中的硝酸根和氨离子以及根瘤菌的固定氮;也可以是次级的,如绿叶的光呼吸,类苯丙氨酸代谢以及萌发种子氨基酸的再氨基化。通过这个循环产生谷氨酰胺和谷氨酸,可被植物用于所有的其它含氮化合物的转化与合成^[1]。可见 GS/GOGAT 途径是最主要的(如果不是唯一的)将无机氮转化为有机氮的途径。

GS 的分子生物学始于 1983 年^[2]。从蓝细菌 *Anabaena* (glnA) 克隆并完全测序分析了细菌 GS 的结构基因以来,在植物中进行了 GScDNA 和基因组 GSDNA 的克隆,从它们的核苷酸顺序推算出 GS 亚基的一级结构,并用于研究组织、结构、演化和 GS 基因的表达。目前世界上研究 GS 的人日益增多,概括其兴趣在于:

1. GS 是将无机氮转化为有机氮的门户,能否通过调控 GS 基因,在植物体内建立 gln 库,以减少硝态氮还原系统对大量有机能源的消耗。同时减少环境水中硝酸盐的污染。

2. GS 是人们研究除草剂和抗除草剂的重

要靶位点之一。从 GS 基因上下功夫,可能将大大促进新生除草剂和抗除草剂植物的诞生。

3. GS 基因的表达,即有组织器官专一性,又受环境(光、氮 CO_2)和发育因子的影响。故它是分子生物学研究基因专一性表达和时空表达的好模式。

4. GS2 是核基因编码的叶绿体蛋白。虽然与 cab 和 rbcS 有共同之处,都由一个基因家族编码多种同工酶,同受光诱导,但是也有它的独特之处。可能在启动子的调控元件上有差异。因为 rbcS 基因家族的八个成员编码基本相同的八个多肽,而 GS 基因是不同的成员编码不同的多肽。

二 GS 基因的组成

多数研究者认为 GS 是由一个小的基因家族专编码。对拟南芥基因组五条染色体进行 RFLP 图谱分析,发现三种 GSDNA 分布于染色体 3 和 5(5 上有两条)上^[3],大豆(*Glycine max* and *Glycine soja*)的细胞质 GS(GS1)的基因位于染色体 LG9^[1]上。用各种 GScDNA 和基因组 DNA 进行杂交,可产生不同的 GS 基因片段,推测在一个 GS 家族中至少有四个可能是五个不同的成员^[4]。现已鉴定了菜豆的所有成员,分别命名为 gln- α 、gln- β 、gln- γ 和 gln- δ 、gln- α 编码叶和根的细胞质 GS; gln- β 、gln- γ 为根瘤 GS 编码; gln- δ 编码叶绿体 GS^[5]。很多豆科和非豆科植物也鉴定出为 GS2、GS1、GSn 编码的基因。GS2 存在于叶绿体基质中; GS1 存在于细胞质中。GSr 存在于根中。植物 GScDNA 和基因组 GSDNA 克隆见表 1。

表1 植物 GScDNA 和基因组 GSDNA 克隆

材料	克隆	插入片段 大小(bp)	文库 类型	定位	表达
大豆	pGS19	900	nodule cDNA	cytosol	N>R>L
Glycine max (Soybean)	pGS20	700	nodule cDNA	cytosol	N>R>L
大麦	pcHvGS 6	1540	leaf cDNA	chloroplast	L
Hordeum (Barley)	pcHvGS14	1078	leaf cDNA	chloroplast	L
	vulgare pGS1 ^[6]	1650	leaf cDNA	cytosol	
菜豆	pcGS-1	1452	root cDNA	cytosol(β)	R>N>L
	Phaseolus pvGSR-4	10700	genomic	cytosol(β)	R>N>L
vulgaris	pcGS-1	1353	root cDNA	cytosol(α)	R>L>n
(French bean)	pcPvNGS-01	712	nodule cDNA	cytosol(τ)	N>r, l
	pcGS-1	1448	nodule cDNA	cytosol(τ)	N>r, l
	pvGSN-56	13500	genomic	cytosol(τ)	N>r, l
	pvGSN-57	10100	genomic	cytosol(τ)	N>r, l
	pcGS-1	1510	leaf cDNA	chloroplast	L>N>r
豌豆	pGS341	1373	nodule cDNA	cytosol(GSn)	N? R>L
Pisum sativum (Pea)			root cDNA		
	pGS132	n. d.	cDNA	cytosol(GSn)	N>R
	pGS134	1065	root cDNA	cytosol(GS1)	N>R>L
	pGS299	1434	root cDNA	cytosol(GS1)	N>R>L
	pGS197	1304	leaf cDNA	chloroplast	L>N>R
	pGS185	1540	leaf cDNA	chloroplast	L>N>R
玉米	pMGS1	1485	cell line cDNA	chloroplast	n. d.
Zea mays (Maize)	pMGS2	1595	cell line cDNA	chloroplast	n. d.
水稻	GS8 ^[7]	1111	root cDNA	cytosol	
Oryza sativa (Rice)	GS28 ^[7]	1499	shoot cDNA	cytosol	
	GS38 ^[7]	1585	shoot cDNA	chloroplast	
芥菜	AtgsL1 ^[4]	1548	leaf cDNA	chloroplast	L>R
Arabidopsis thaliana	Atgs1 ^[4]	1351	root cDNA	cytosol	R>S>L
	Atgsr2 ^[4]	1458	root cDNA	cytosol	R>L
(Mustard)	Atgskb ^[4]	1347	root cDNA	cytosol	R=S>L

注:n. d. =not determined. N=nodule, R=root, L=leaf. s=seed,无[]来自于文献[11],小写字母是低检测极限的 GS mRNA 水平或 mRNA 只用敏感的 RNase 保护技术测定。

三 GS 基因的结构和顺式调控元件的分析

1. GS 基因的结构。

已克隆了不少的植物 GS 基因,但做全序分

析的很少。抗 PPT 培养的苜蓿细胞的 GS 基因全序分析^[8]示出,帽位点到 PolyA 位点长度是 3820bp,包括 12 个外显子和 11 个富含 AT 的

90—715bp 的内含子。引物延伸法鉴定在 mRNA5'末端 ATG 起始密码前还有一个大的帽位点 119—120bp 个核苷酸。往上是一个弱的起始位点 50bp 个核苷酸。菜豆 *gln* 基因具多转录起始位点。从三个 GS 基因的测序资料推算的 TATA box(TATAAAT/A)30bp, 主要在帽位点上游。Cock 等^[9]用 *gln*— δ cDNA 做探针, 杂交分离出八个编码 GS2 的基因。限制内切酶图谱说明, 它们全部来源于菜豆核基因的同一个区域。将 *gln*— δ cDNA 和 *gln*— δ 基因组比较得到 GS 基因包括几个内含子。5'端非翻译区包含一个大的内含子 1499bp。内含子和外显子边界与真核生物的同源, 为 GU 和 AG。

GS mRNA 的初级结构: 基于 Northern blot 分析, 估计植物 GS mRNA 大小在 1.4~1.6kb。豌豆和菜豆 GS2 mRNA 比 GS1 mRNA 长

100~200bp。这些观察与表 1 中 cDNA 克隆的全长大小一致。GS1 cDNA 为 1.34—1.45kb, GS2 cDNA (不包括聚 A 尾巴) 为 1.51—1.61kb^[11]

2. GS 基因顺式调控元件的分析

有较多植物 GS cDNA 和基因组 GSDNA 克隆和测序工作已完成, 并确定了 GS 基因转录的起始顺序、编码和非编码顺序。最重要的是确定 GS 基因的顺式调控元件序列。这是研究 GS 基因表达调控的关键。

一般基因的顺式元件包括启动子(TATA box, CAAT box, GC box; 组织专一性表达启动子; 诱导型启动子), 增强子或减弱子, 和聚 A 尾信号或终止子, 植物启动子在转基因植物中的表达见表 2。

表 2 植物启动子在转基因植物中的表达

材料	菜豆 ^[9]	水稻 ^{[10][11]}			大豆 ^[12]	豌豆 ^[13]
克隆	pgGS 1	RGS-8	RGS-28	RGS--38	GS15	pGS2 GS3A
大小(kb)	2.3 0.8	2.0	2.0	1.3	3.5	1.5 1.01
组织专一蛋白	GS2	GSr	GS1	GS2	GS1	GS2 GS1
转基因植物	烟草	烟草			烟草百脉根	烟草
诱导源	光	NO ₃ ⁻	光		氮	光 NH ₄ ⁺
		NH ₄ ⁺	氮		反式因子	HNO ₂ ⁻ glu

5'—非翻译顺序; 在 GS mRNA 中非编码区很少保守性。用引物延伸和核酸酶保护两种方法揭示出菜豆两个转录起始位点—89、+1 和—74、+13。其 TATA box 位于—32(—TATTTTA)。在(—786)—(+43)之间还有两个调节区, 一个是组织专一性表达区, 另一个是光诱导表达区^[9]。水稻 2kbGS 启动片段与报告基因融合, 导入烟草中, 其中 GS7 只在根中表达。GS1 在叶比根中表达高, 叶龄影响与 GS2 相反, 下层叶 GS1 活性最高, 上层叶和未展开叶活性次之, 中层叶最低。外加 NO₃⁻、NH₄⁺, 3—16 小时 GS 活性增强, 而后稳定。GS7 和 GS1 都不受光的影响。证明它包含一个组织专一性表达区和一个 NH₄⁺ 水平反应区^[16]。在转基因

烟草中 GS2 基因 1.3kb 启动子片段在完全成熟的展开叶中具有最高活性。并且光照 24—48 小时活性最高。根有弱的表达。证明它有一个质体发育反应区和一个 NH₄⁺ 水平反应区^[11]。

GS mRNA 的 AUG 起始密码子附近的碱基顺序不同于其它植物 mRNA 的共同顺序(AAGAAUGGC)。然而所有 GS mRNA 在+5 处都有一个 C, 在—3 有一个 A。—3 处 A 的强保守性相同于动物 GS mRNA 的位点。这个替代位点能在转染的动物细胞下游调控翻译高达 20 倍然而植物中的这个核苷酸与动物(62%、80%)相比有较少的保守性。在麦胚系统中,—3 的突变不影响 mRNA 的翻译效果。豌豆 GS2 mRNA5'—非翻译顺序能形成一个发夹结构,

包括翻译起始密码子。

3'-非翻译顺序:几乎所有动物和病毒前体 mRNA 都有 AAUAAA 的 motif,它位于 poly A 位点上游 10-30bp,而 61%的植物基因转录物中缺少这个 motif。GS mRNA 也没有这个顺序,或者是一种变化了顺序,常见的是在聚 A 上游 18-30bp 处有一个 AAUAAU/C。从菜豆已分离出 *gln-γ* 和 *glnδ* cDNA 克隆带有相同顺序,但 poly A 尾巴的精确位点不同。这两个基因的转录物是在不同位点上被聚 A 化的。

反式作用因子的 DNA 结合位点:到目前为止,已经鉴定出了几种 GS2 的反式作用因子的结合位点,GT-1、GBF 和 TGA1a^[28],它们都是结合在启动子上,大豆编码细胞质 GS 的基因的 3.5kb 的启动子片段与 GUS 构成嵌合基因,并引入烟草和豆科植物百脉根。这一外源嵌合基因在两种转基因植物中的表达均具有根的专一性,并且表达的部位限于根的生长区和维管束。外加氨可以增加百脉根根部 GUS 的活性。而烟草根中却看不到这种诱导作用。此外氨处理使得百脉根中 GUS 的分布均一化。所有类型的细胞中都表达 GUS。现已知道,外加氨所引起的表达的增加是由于转录水平的提高。共生固氮明显地调节 GS/GUS 的表达。在侵染区包括未被侵染的细胞和内皮层,由于有氨的流动均有 GS/GUS 的活性。根瘤的外皮层没有 GUS 的表达,可能氨不能从内皮层扩散到外皮层的缘故^[12]。可以判断在豆科植物细胞质 GS 基因的调控区中至少包含两个顺式作用元件,一个是根专一性的;另一个是受 NH_4^+ 活化的元件。在非豆科烟草转基因植物中之所以没有 NH_4^+ 诱导的 GS/GUS 的表达,是因为缺少反式作用因子。

根瘤 GS 基因的诱导或加强主要依赖根瘤的发育阶段,而不在于从 N_2 到氨的提供。增强 GS 基因(*glnγ*)^[14]表达所需要的条件是侵染线的发展和将根瘤释放进宿主细胞。很有趣的是确定是否根瘤增强 GS 基因活性和它的宿主在结根瘤阶段同时被激活的其它基因共用一个调

节机制,在转基因植物中大豆豆血红蛋白(*leghaemoglobin*)和根瘤素-23 基因的缺失分析指出,存在着正调控和负调控的顺式元件,它们位于 TATA box 的上游^[5]。豆血红蛋白基因的 DNA-蛋白质相互作用的体外研究鉴定出一个富含 AT 顺序。这个 AT 顺序是与一种根瘤专一细胞核因子相结合的。菜豆中相同的核因子结合到 *gln-γ* 5'端侧翼区的几个位点上,其中两个结合在 240bp 区内。转基因植物 5'缺失分析已经确定了这个 240bp 区域中包含一个正调控元件。虽然这个结合因子的调节功能还没有确定,但可以试探着推测 GS。豆血红蛋白和其它根瘤素的表达可能是协同调节的。

四、GS 基因的表达及调控

GS 基因表达具有时空专一性,它们即在特定的组织中表达,并在特定的发育阶段表达。GS 基因表达调控研究是在不同水平上进行的。1. 基因家族的转录;2. mRNA 的加工;3. 翻译;4. 初生 GS 多肽的亚细胞定位,加工和修饰;5. 八聚体同功酶的组装;6. 全酶的活性修饰;7. 酶的降解。近期研究较多的是 1、3、5。

1. 叶 GS 基因和光的诱导表达:多数植物叶中 GS2 比 GS1 的丰度高些。McNally 等^[15]广泛研究了许多植物,并根据叶中相对 GS1 和 GS2 活性将其分成四类。第一类由一些非叶绿素寄生植物组成,这些植物依赖宿主的营养,无 GS2 活性;第二类的 GS1 和 GS2 活性相等,包括大多数的 C4 植物;第三类主要是 GS2 活性;第四类只有 GS2 活性。后两类多数是 C3 植物。如豌豆^[16]、菜豆、在成熟叶片中有较高的 GS2 同功酶活性,是由较多的 GS2 mRNA 和 43/44kDa 多肽所致。小麦叶片细胞年龄与叶片基部分生组织开始的不同距离成比例^[17],GS1 活性在叶细胞发育的不同时期保持恒定,而 GS2 活性随细胞的成熟猛增。Haba^[18]在研究向日葵时发现,干的和浸湿的种子只有 GS3 存在;两天后 GS1 出现;这与叶中再同化储藏蛋白水解的氨基酸释放的 NH_4^+ 有关。五天后 GS2 出现。GS2 是叶绿体发育、光呼吸及光合作用三者间重要调节酶之一,因此光作为一种重要的调节

因子必然对GS2基因表达有直接或间接影响。采用密度标记、蛋白质合成抑制剂及抗体进行研究发现,GS2活性只与光合作用活跃的组织有关,GS2的合成只被CHI抑制,与林肯霉素无关^[19]。而且GS2活性增加不是由于早合成的处于不活化状态转化为活化状态,而是在绿化过程中,GS2因光诱导而新合成的结果。用蛋白质免疫电泳证明,细胞质内GS2前体(49kDa)先出现,然后叶绿体中44kDa的GS2增加^[20]。说明GS2是在细胞质合成,又由转运肽将它送入叶绿体。

许多植物,尤其是C3植物的叶子中,光能提高叶绿体GS水平。在黄化的水稻叶片,GS2活性极低或检测不到,经照光后GS2活性明显增加5—10倍。豌豆黄化苗在照光72小时内GS2mRNA增加了20倍,在饱和红光闪照后GS2mRNA增加4倍^[21]。芥菜中,光照后只有42kDa GS2增加,而39kDa GS1不变。在暗处生长7天的小麦^[22],转入自然光下3小时,GS2活性增加约3倍;72小时增加5倍,达到自然光下绿苗叶片GS2活性水平。Northern杂交表示出mRNA具相同的规律。Peterman等^[4]用GS2-cDNA做探针,与绿叶内1.6kb mRNA专一杂交,照光后1.6kb mRNA增多。用GS2-cDNA探针与黄化叶总RNA杂交,几乎没有mRNA被杂交上。若用GS1-cDNA做探针,可与黄化叶和绿叶的1.4kb mRNA杂交,但杂交量没有差别。这说明,光照后主要是GS2 mRNA增加。

现在已知,GS1的功能是:在种子萌发时储存N-源的转运,在叶片衰老时N-源的转移再利用;GS2的功能是:光呼吸 NH_4^+ , NO_3^- 还原 NH_4^+ ,氨基酸代谢 NH_4^+ 的再同化。

GS基因不仅在转录(GSmRNA)和翻译(GS同功酶)水平上受到环境因子的调控,最近Mack和Tischner^[23]的工作证明,GS亚基的组装方式与GS的活性紧密相关,在甜菜叶片的个体发育过程中,同时存在有GS1和GS2的四聚体和八聚体形式,GS1的八聚体活性高于四聚体,而GS2的异四聚体活性高于同八聚

体,在体外,GS2四聚体的最高活性可以通过外加B-硫基底物得到,或在叶绿体完全成熟的叶片中得到,说明叶发育期间,有着叶绿体还原状态或巯基反应底物(Thiol-reactive substances)量的变化,在衰老叶片中,去掉二硫苏糖醇,叶细胞出现氧化状态,则不再见GS2四聚体的活性。

当用抑制剂PPT(L-phosphinothricin)处理后发现,不同GS同功酶对PPT的反应不一样。0.1mM PPT对GS2的抑制为96.6%;对GS1的抑制为88.4%;对幼根GS的抑制为78.8%;对胚乳GS的抑制为84.4%^[24]。

在GS八聚体同功酶组装水平上的调控,含硫基底物是GS2四聚体的激活剂,而谷氨酸的类似物,如PPT等是GS同功酶的抑制剂。我们可以用激活剂、抑制剂、反义RNA技术,抗除草剂基因如Bar基因的转基因植物来研究GS基因的组织专一性表达。

2. 氮素对GS基因的诱导表达: NH_4^+ 可以直接诱导GS的活性,但是有限度的^[25]。这与 NH_4^+ 的吸收规律相矛盾。Mack G和Tischner, R^[26](1994)指出,细胞中有两个系统与 NH_4^+ 的吸收有关。一是低容纳系统,需要质膜 NH_4^+ 载体(NH_4^+ transporter)和能量,此系统虽然在环境 NH_4^+ 增加的情况下也可以诱导出 NH_4^+ 载体蛋白,但这是有限的(在200~300 μM NH_4^+ 内)。所以低容纳系统是一种饱和吸收 NH_4^+ 系统。另一种为高容纳系统,在高 NH_4^+ 浓度(>1mM NH_4^+)下随 NH_4^+ 浓度的增加也出现线形吸收,其机制是 NH_4^+ 填充了所有表面自由空间(AFS: Apparent Free Space = Water Free Space + Donnan Free Space),而后通过扩散不需要能量进入细胞。进入细胞的 NH_4^+ 扩大了细胞质和液泡中的 NH_4^+ 池。^[16]至此这是一种线型吸收机制。 NH_4^+ 的线性吸收与GS的有限活性是造成 NH_4^+ 毒害的原因所在,为实现高同化 NH_4^+ 的目的,必需对GS基因加以操作改造,Tischer等人^[8]在抗PPT的苜蓿细胞中发现,它是由于一种GS基因扩增了10倍所致,

Eckes 等人^[27]通过构建CaMV-35S和GS cDNA的重组体,在苜蓿细胞中得到高达20倍的表达,可见通过基因工程手段达到高同化 NH_4^+ 是有希望的,不过 NH_4^+ 的同化不仅与GS有关,与氨同化有关的酶包括GDH(谷氨酸脱氢酶)、AS(天冬酰胺合成酶)、NR(硝酸还原酶)、NIR(亚硝酸还原酶)、GOGAT(谷氨酸合成酶)和GS。曾有人认为GDH是同化氨的初始酶,但植物GDH对氨的高 K_m 值(10—80mM)表明只有在高浓度 NH_4^+ 情况下GDH才起作用,GDH可能只限制在谷氨酸的代谢中;AS是催化谷氨酰胺和天冬氨酸合成天冬酰胺,在 NH_4^+ 超量情况下AS的催化效率高达86%,所以AS具有很强的解毒功能^[28];植物体内NR和NIR活性很高^[3],因此进入体内的 NO_3^- 很容易被还原,但要合成氨基酸则必需经GS/GOGAT的同化。氨的初始同化发生在GS/GOGAT循环中,它承担着氮代谢即无机氮转化为有机氮的中心作用^[1]。有意思的是,人们发现作为GS2的光激活子的反作用因子同时也是AS1的抑制子,因此GS/GOGAT、或AS的高效率和控制NR活性的协调统一成为人们研究高同化氨的目标。随着高科技的发展,用基因操作改进植物GS/GOGAT途径,达到高同化氨是完全可能的^[1]。

参考文献

1. Hircl B, Miao G-H, and Verma D P S. 1993, In: Control of Plant Gene Expression, CRC Press, Inc. :443—454.
2. Tumer, N. E, Robinson, S. J, & Haselkorn, R. 1983 Nature 306:337—342.
3. Naw. H. G, Giraudat. J, Boer, B. D, et al. 1989 The Plant Cell 1:699—705.
4. Peterman. T. K. & Goodman. H. M. 1991; Mol Gen Genet 230:145—154.
5. Forde. B. G, & Gullimore. J. V. 1989; Oxford surveys of plant molecular and cell biology, Vol, 6, ed. Milfin, (247—296)Oxford University Press.

6. Stroman. P. Baima. S, & Casadoro. G. 1990 Plant Mol Biol 15:161—163.
7. Sakamoto. A. Ogawa. M, Masumura. T, et al. 1989 Plant Mol Biol. 13:611—614.
8. Tischer. E, Dassarma. S, & Goodman. H. H. 1986; Mol Gen Genet 203:221—229.
9. Cock. J. K. Hemon. P, & Cullimore. J. V. 1992; Plant Mol Biol 18:1141—1149.
10. Kozaki. A, Sakamoto. A, Tanaka. K, et al. 1991; Plant Cell Physiol 32:353—358
11. Kozaki. a, Sakamoto, A, & takeba. G. 1992; Plant Cell Physiol, 33:233—238
12. Miao. G. H. Hircl. B, Marsolier, M, C, et al. 1991; The Plant Cell 3:11—22
13. Edwards. J. W, Walker. E. L. & Coruzzi. G. M. 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:3459—3463.
14. Cai. X. Y. Henry. R. L. Takemoto. L. T, et al 1992; Plant Physiol (Communication) 98:402—405.
15. McNally. S, & Hircl. B, 1983; Physiol Veg 21:761—774.
16. Cock. J. M, Brock, I, W, Watson. A. T. et al, 1991; Plant Mol Biol 17:761—771.
17. Tobin A. K, Sumar, N, Patel M, et al. 1985; Planta 163:544—548.
18. Haba. P. D, Cabello. P & Maldonado. J. M. 1992; Planta. 186:577—581.
19. Hircl. B, Vidat, J, & Gadsl. P. 1982; Planta. 155:17—33.
20. Tingey. S. V. & Coruzzi. G. M. 1987; Plant Physiol. 84:366—373.
21. Edwards. J. W, & Coruzzi. G. M. 1989; The Plant Cell 1: 241—248.
22. 印莉萍, 柴小清, 刘祥林等, 1994; 植物学报 36(8):597—602.
23. Mack. G and Tischner. R. 1994; Planta 194:353—359.
24. 印莉萍, 刘祥林, 吴晓强等, 1993; 首都师范大学学报 自然科学版 生物专刊, 14(4):33—40.
25. 印莉萍, 黄勤妮, 柴小清等, 1995; 植物学报 (已接收).
26. Mack. G and Tischner. R. 1994; J Plant Physiol. 144:351—357.
27. Eckes. P, Schmitt. P, Daub. W, et al. , 1989; Mol Gen Genet. 217:263—268.
28. Tjaden G and Coruzzi G M. 1993; In: Control of Plant Gene Expression. CRC Press, Inc. :459—470.