

紫花苜蓿 *UFO* 基因克隆及转化

石欣玥¹, 贾丝俏¹, 李思峰², 孙嘉鑫¹, 韩烈保¹, 晁跃辉¹

(¹ 北京林业大学草业与草原学院, 北京 100083; ² 北京市花木有限公司, 北京 100083)

摘要: 紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是多年生豆科牧草。为研究 *UFO* (Unusual Floral Organs) 基因相关功能, 以紫花苜蓿中苜 1 号为试验材料, 利用 PCR 技术在紫花苜蓿中克隆出 *UFO* 基因。通过 DNA 重组技术成功构建 3302-3flag-*UFO* 植物表达载体, 利用农杆菌介导法对紫花苜蓿进行转基因操作, 最终获得转基因紫花苜蓿。试验中激素浓度配比与植物表达载体的改良, 提高了紫花苜蓿转基因过程中的转化率, 而激素种类与配比则影响抗性愈伤的形成与愈伤组织的玻璃化程度。本试验共获得 67 个抗性愈伤, 最终有 56 个分化成幼嫩紫花苜蓿转基因植株, 炼苗入土获得 17 株转基因植株。遗传转化过程中获得的转基因植株为进一步研究 *UFO* 基因功能提供材料。

关键词: 紫花苜蓿; *UFO* 基因; 转基因; PCR 检测

Cloning and Transformation of *UFO* Gene in *Medicago sativa* L.

SHI Xin-yue¹, JIA Si-qiao¹, LI Si-feng², SUN Jia-xin¹, HAN Lie-bao¹, CHAO Yue-hui¹

(¹ College of Grassland Science of Beijing Forestry University, Beijing 100083; ² Beijing Florascape Company, Beijing 100083)

Abstract: *Medicago sativa* L. is a perennial legume forage. In order to analyze the function of *UFO* gene from *Medicago sativa* L., we isolated the full-length coding sequence by PCR amplification in alfalfa variety 'Zhongmu No.1'. The plant expression vector 3302-3flag-*UFO* was constructed by DNA recombination technology, and transgenic alfalfa was obtained with deployment of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Towns.) Conn mediated transformation method. The transgenic efficiency of alfalfa was improved by changing the ratio of hormone concentrations and improving plant expression vector. The type and ratio of hormones have resulted in a difference on the formation of resistant calli and the degree of vitrification of calli. By taking use of optimal transformation strategy, a total of 67 resistant calli were generated, while 56 young alfalfa regenerated plants were obtained. Finally, 17 mature regenerated plants were obtained for seed propagation. Taking together, this study generated the transgenic plants with *UFO* over-expression vector, which might provide materials for further functional study of *UFO* gene.

Key words: alfalfa; *UFO* gene; transgenesis; PCR detection

高等植物中, 叶片是植物进行光合作用的主要场所, 叶片具有重要的生理功能, 既能够影响植物生物量, 又能够将外界环境刺激进行转化传递到植物其他组织。叶发育的调控机理十分复杂, 决定植物叶发育进程的主要有环境和植物自身两种因素。紫花苜蓿是一种营养价值高、适口性好的多年生豆科

牧草, 在中国分布广泛, 对畜牧业发展具有重要作用, 素有“牧草之王”的美誉。紫花苜蓿根系发达, 能够固土培肥, 在生态修复中同样具有应用价值^[1]。

Unusual Floral Organs (*UFO*) 基因编码一个含有 F-box 的蛋白质, 关于 *UFO* 基因的研究主要集中在花器官的发育和控制上^[2-5]。Ingram 等^[4]研究

收稿日期: 2019-08-28 修回日期: 2019-09-30 网络出版日期: 2019-10-22

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190828001>

第一作者主要从事草地植物分子生物学研究, E-mail: shi_xinyue@163.com

通信作者: 晁跃辉, 研究方向为草地植物遗传育种与生物技术, E-mail: chaoyuehui@bjfu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31672477)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31672477)

发现, *UFO* 基因在拟南芥的花序和分生组织中表达量较高,说明 *UFO* 基因在拟南芥花器官中起到重要的调控作用。*ufo* 突变体中缺少正常的花瓣和雄蕊^[3,6-7]。在以往试验中,对 *UFO* 基因的研究主要集中在拟南芥等模式植物中,在紫花苜蓿中并未进行过相关试验,而 *UFO* 基因对叶片的影响研究同样较少。Lee 等^[3]发现,拟南芥中过量表达 *UFO* 基因还能够导致莲座叶出现叶裂的表型,表明 *UFO* 基因不仅能够影响花器官的发育,还能影响叶片的发育^[8]。复叶作为紫花苜蓿进行光合作用的主要场所,了解控制其发育的相关基因具有重要意义,而对紫花苜蓿复叶的研究较少。因此,本试验从紫花苜蓿中克隆出 *UFO* 基因,构建植物表达载体后转入紫花苜蓿中。经检测,在最终获得的 23 株紫花苜蓿植株中,有 17 株成功转入 *UFO* 基因,为进一步研究 *UFO* 基因对叶片发育的调控机制提供了材料基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选择的草种为紫花苜蓿中苜 1 号,种子播种后选取长势较好的一株进行扦插,以排除由于种子本身造成的性状差异。试验所用农杆菌 EHA105 存于北京林业大学草坪研究所,大肠杆菌 DH5 α 由中美泰和公司购入。从 TAKARA 公司分别购入克隆载体 pMD19-T、RNA 提取与反转录试剂盒。3302Y-3flag 植物表达载体由本实验室改良后保存于超低温冰箱。

1.2 相关引物设计

使用 Primer Premier 5.0 设计引物对 *UFO* 基因的 CDS 区进行扩增,将该对引物命名为 UFO-F 和 UFO-R。PCR 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 10 s, 设定 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 永久^[9]。在构建 3302Y-3flag-*UFO* 基因表达载体(图 1)的过程中选用 3302Y-UFO-F 和 3302Y-UFO-R 2 条引物,最终对大肠杆菌、农杆菌以及获得的转基因植株检测则使用 UFO-Tf 和 UFO-Tr 2 条引物(表 1)。

表 1 遗传转化相关引物

Table 1 Primers used for genetic transformation

引物名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
UFO-F	TTCTATTCTATGTGGAGCAACCTAC
UFO-R	CCTCTCAAAAACACACCTAAATATC
3302Y-UFO-F	GAACACGGGGGACTCTTGACCATGTGGAG CAACCTACCC
3302Y-UFO-R	TCCTTGTAATCCAGATCTACAAAGAAAATA GATGAAGAAG
UFO-Tf	CCCACTATCCTTCGCAAGACCCT
UFO-Tr	CGTATTAAATGTATAATTGCGGGAC

1.3 3302Y-3flag-*UFO* 植物表达载体构建及农杆菌转化

选取长势良好、无病害的紫花苜蓿植株,剪取 80~100 片颜色嫩绿、无缺损的叶片,液氮研磨后进行总 RNA 的提取。将提取的 RNA 进行反转录后用 UFO-F 和 UFO-R 进行 CDS 区扩增。扩增后的片段与 pMD19-T 克隆载体连接,将连接产物转入感受态大肠杆菌后涂布于 LB 固体培养基,挑取单菌落后进行菌体 PCR,对结果进行测序,将测序结果正确的命名为 pMD-*UFO*。而后使用 3302Y-UFO-F 和 3302Y-UFO-R 2 条引物对 pMD-*UFO* 进行扩增,将扩增产物与 3302Y-3flag 载体分别酶切后进行纯化,利用无缝连接酶连接后转入到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,加入 1 mL LB 培养液后摇菌 1h,将摇好的菌液涂布在 50 mol/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上,待长出单菌落后进行挑取。使用 UFO-Tf 和 UFO-Tr 2 条引物对挑取的单克隆菌液进行 PCR 检测,并将菌液和扩增出相应条带的 PCR 产物送到公司进行测序,将测序结果正确的个体命名为 3302Y-3flag-*UFO* 植物表达载体(图 1)。对阳性大肠杆菌进行质粒提取后,通过 CaCl₂ 冻融法^[10]导入到 EHA105 农杆菌感受态中,加入 1 mL YEB 培养液摇菌 4 h 后涂布到含有 50 mol/L 卡那霉素的 YEB 固体培养基中,挑取单菌落后使用引物 UFO-Tf 和 UFO-Tr 进行菌落 PCR 鉴定,取 4 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后,送到北京睿博兴科生物公司进行测序,将测序结果正确的菌液加甘油保存于超低温冰箱中。

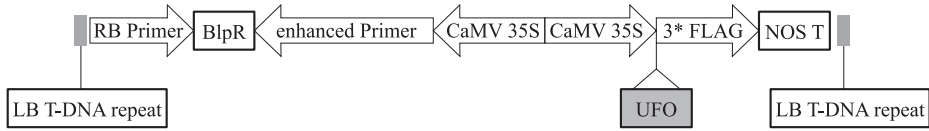


图 1 3302Y-3flag-*UFO* 植物表达载体
Fig.1 Diagram of 3302Y-3flag-*UFO* plant expression vector

1.4 紫花苜蓿的遗传转化过程

将测序结果符合预期的农杆菌在含有 50 mol/L 卡那霉素的培养基中划线活化,将单菌落挑取至 100 mL YEB 培养液中进行培养,以备侵染。将紫花苜蓿修剪至 5 cm 高度,待长出新的幼嫩叶片时开始进行取样,将取得的幼嫩叶片在 50% 次氯酸钠中进行灭菌,20 min 后在超净工作台中用无菌水冲洗 5~10 次。将菌液倒入 50 mL 离心管中,600 r/min 离心 20 min,离心后弃掉上清液,将 Ms-COLQ 培养液加入离心管中并与管内农杆菌充分混匀,待菌液 OD 值处于 0.4~0.6 之间时对叶片进行侵染。将叶片剪开后放入事先备好的无菌锥形瓶中,将菌液倒入,

抽真空 3 min 后,将锥形瓶置于低速摇床中 2 h。将已侵染的叶片置于 Ms-CO 培养基中,24 ℃避光培养 3 d。共培养结束后用头孢水溶液(200 mg/L)将叶片进行冲洗,而后移入 Ms-YD 培养基中培养(光照 16 h/ 黑暗 8 h,温度 24 ℃,光照强度 40 Lux)。6 周后,将抗性愈伤组织转移至 Ms-SY 培养基中,并拆分成直径为 1~2 cm 大小的愈伤组织进行光下生芽培养(光照 16 h/ 黑暗 8 h,温度 24 ℃,光照强度 60 Lux)。生芽培养 2 个月后,将抗性愈伤组织转移至 Ms-SG 培养基中进行生根培养。待外植体根长大于 2 cm 时,将紫花苜蓿幼嫩植株转移至灭菌土中进行培养。遗传转化过程中所用的培养基成分见表 2。

表 2 遗传转化过程的培养基配方

Table 2 A variety of culture medium in genetic transformation experiment

培养基名称	培养基组成成分
Culture medium	Different medium formula
Ms-COLQ	4.43 g MS+30 g/L 蔗糖 +5 mg/L 2, 4-D+1 mg/L KT, pH=5.8
Ms-CO	4.43 g MS+30 g/L 蔗糖 +5 mg/L 2, 4-D+1 mg/L KT+4 g/L 植物凝胶, pH=5.8
Ms-YD	4.43 g MS+30 g/L 蔗糖 +5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L KT+3 mg/L 草铵膦 +700 mg/L 头孢 +4 g/L 植物凝胶, pH=5.8
Ms-SY	4.43 g MS+30 g/L 蔗糖 +7 g/L 琼脂 +2 mg/L 草铵膦 +500mg/L 头孢, pH=5.8
Ms-SG	2.22 g MS+15 g/L 蔗糖 +8 g/L 琼脂 +2 mg/L 草铵膦 +350mg/L 头孢, pH=5.8

1.5 转基因植株检测

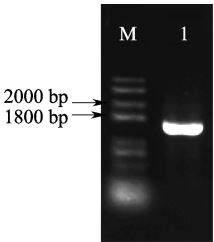
待转基因植株生长 2 个月后,取长势较好的紫花苜蓿叶片,通过 CTAB 法^[11]提取基因组 DNA,选用 UFO-Tf 和 UFO-Tr 引物对转基因植株进行 PCR 鉴定。选取 PCR 产物 4 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测,确认扩增出的条带正确后将 PCR 产物送到北京睿博兴科生物公司测序,将测序结果再次进行比对后,将结果正确的植株标记为转基因植株。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体构建

UFO 基因长度约为 1800 bp,凝胶电泳检测结果显示,扩增出的条带单一且清晰,片段长度正确(图 2)。对大肠杆菌菌液经 PCR 扩增检测,所挑取的 10 个大肠杆菌单菌落中有 6 个菌落能扩增出与目的基因长度相同的片段(图 3)。

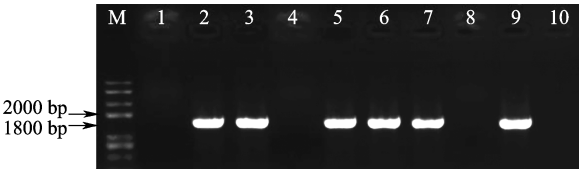
将已进行转化试验的农杆菌进行琼脂糖凝胶电泳检测,成功转入 *UFO* 基因的菌液能够扩增出预期 DNA 条带。结果显示最终有 6 个菌液已成功转入 *UFO* 基因(图 4)。将含有目的基因的农杆菌菌液与 PCR 产物进行测序,条带比对表明 3302Y-3flag-*UFO* 植物表达载体已经成功转入到农杆菌中。



M: DNA marker DL2000 Plus II, the same as below

图 2 PCR 扩增 *UFO* 基因的全长

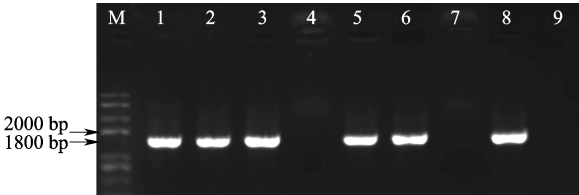
Fig.2 PCR amplification of full-length *UFO* gene



1~10: 3302y-3flag-*UFO*

图 3 *UFO* 基因转大肠杆菌的菌落 PCR 检测

Fig.3 Colony PCR detection of *UFO* gene in *E. coli*



1~9: 3302y-3flag-*UFO*

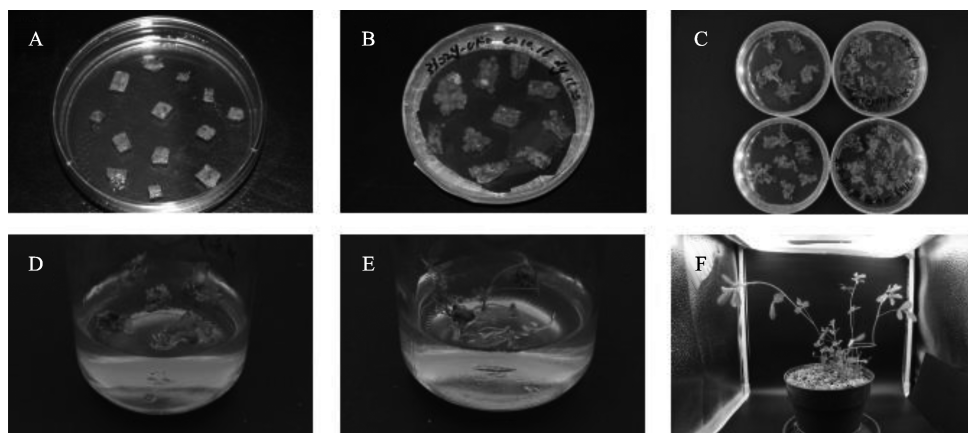
图 4 *UFO* 基因转农杆菌 PCR 检测

Fig.4 Colony PCR detection of *UFO* gene in *Agrobacterium*

2.2 遗传转化过程

将农杆菌侵染后的叶片转移至 Ms-YD 培养基中进行愈伤组织的筛选(图 5)。6 周后将具有草铵膦抗性的 67 个愈伤移入 Ms-SY 诱芽培养基中培养 2 个月,在培养过程中及时将愈伤组织拆分成 1~2 cm,将幼芽及时与原愈伤组织分离,直接移入培

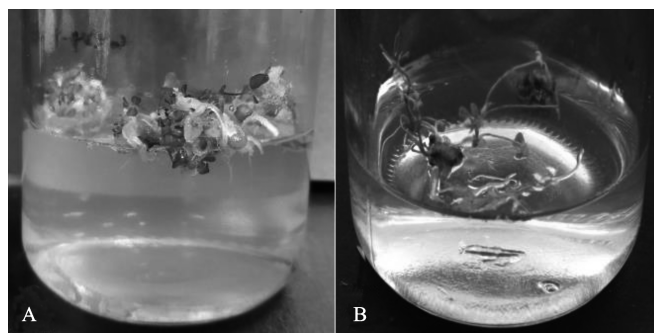
养基中使幼嫩部分直接接触培养基,以此来减弱愈伤组织玻璃化情况(图 6),最终培养瓶中诱导出芽 56 株紫花苜蓿。将产生绿色芽的愈伤组织转移至 Ms-SG 培养基中进行诱根培养。待根长大于 2 cm 时,将幼苗移栽至无菌土中进行培养,2 个月后获得 23 株紫花苜蓿再生植株(图 5)。



A: 在 Ms-CO 培养基中共培养 3 d 的外植体; B: 在 Ms-YD 培养基中培养 5 周后的外植体;
C: 在 Ms-SY 培养基中培养 1 个月后的抗性愈伤组织; D: 在 Ms-SY 培养基中生根培养 2 个月的愈伤组织;
E: 在 Ms-SG 培养基中生根培养 1 个月的幼苗; F: 在土中生长 2 个月的转基因植株
A: The transformed explants were co-cultured on Ms-CO for 3 days, B: The explants were cultured in Ms-YD for 5 weeks,
C: The resistant callus after 1 month growth in Ms-SY medium, D: The resistant callus in Ms-SY sprout culture for 2 months,
E: The callus were rooted in Ms-SG for a months, F: Transgenic plants growing in soil for 2 months

图 5 UFO 遗传转化过程图解

Fig.5 Graphical representation of UFO genetic transformation



A: 直径大于 2 cm 的愈伤组织生芽情况, B: 直径为 1 cm 左右的愈伤组织生芽情况
A: Callus sprouting with diameter larger than 2 cm, B: Callus sprouting with diameter about 1 cm

图 6 转基因植株玻璃化情况

Fig.6 Vitrification of transgenic plants

2.3 转基因鉴定与植株对比

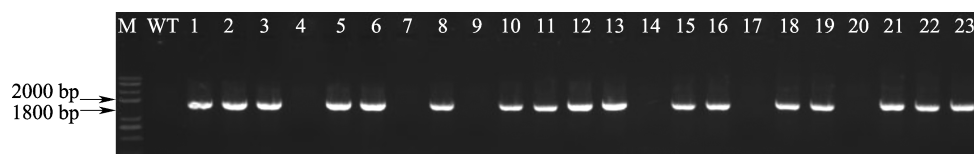
将生长 1 个月的再生紫花苜蓿植株进行 DNA 提取,经 PCR 扩增显示(图 7),23 株紫花苜蓿中有 17 株检测结果呈阳性,测序结果与 UFO 基因序列相符。检测后将样品送到公司进行测序,经过比对后,最终确定获得 17 株转基因植株。

在相同条件下,生长 2 个月的转基因植株与野

生型植株进行对比发现,转基因植株基部分枝较野生型植株更为繁密,且叶片较大(图 8)。

3 讨论

试验过程中发现, UFO 基因的过量表达能够促进紫花苜蓿的分枝增加,与野生型相比,茎更倾向于匍匐生长而非正常的直立生长。野生型植株中复叶



WT: 野生型; 1~23: 转基因植株

WT: Wild type, 1-23: Transgenic plants

图7 *UFO* 基因转基因植株 PCR 检测

Fig.7 PCR detection of *UFO* transgenic plants



图8 *UFO* 转基因植株与野生型植株的表型

Fig.8 Graphical representation of *UFO* transgenic plants in relative to wild type

为正常的3片小叶,而转基因植株的叶形与基部分枝数量则发生改变,由实验结果对比可发现,转基因植株的叶片较大且基部分枝明显增多。Wang等^[12]在试验中发现,苜蓿中的 *SGL* 基因能够调节复叶的发育。在蒺藜苜蓿中,抑制 *SGL* 基因的表达能够有效地促进复叶的发育^[13]。本试验中转基因紫花苜蓿幼嫩时期出现复叶为1片小叶或2片小叶的情况,而野生型紫花苜蓿在同时期均表现为正常的3片小叶,转基因紫花苜蓿的叶片复杂性在一定程度上有所下降,因此推测 *UFO* 基因在复叶的发育过程中可能与 *SGL* 基因起到同样重要的作用。转基因紫花苜蓿的根系生长受到抑制,而细胞分裂素的过量表达会抑制主根与侧根的生长^[14],因此 *UFO* 基因可能在细胞分裂素的合成或运输中起到促进作用,导致转基因植株内源细胞分裂素的含量升高,从而抑制了根系的生长,同时对复叶的发育产生重要影响。在拟南芥的研究中发现,促进根系的生长能够增强植物的抗逆性,并且能够促进植物对营养物质的吸收^[15]。而叶片又是植物进行光合作用、合成有机物的重要场所, *UFO* 基因能够同时影响根系与叶片的发育,因此对 *UFO* 基因功能的相关研究具有重要意义。

在培养过程中,诱导胚性愈伤组织形成再生苗时,出现了不同程度的玻璃化。在诱导初期适量降

低KT的浓度能够有效减少组培苗的玻璃化,在对香石竹^[16]的研究中发现,适当降低细胞分裂素的浓度能够有效地缓解玻璃化程度。在对紫花苜蓿诱导的过程中,适当增加琼脂与蔗糖的浓度同样能够有效减缓玻璃化程度。王庭辉等^[17]对和田苜蓿的玻璃化现象进行研究时发现,蔗糖浓度处于20~25 g/L、琼脂浓度为7 g/L时能够有效降低组培苗的玻璃化现象。而本试验中,在最初的4 g/L植物凝胶的培养基中,玻璃化现象较为严重,而将组培苗转移至7 g/L的培养瓶中后,玻璃化现象能够有所缓解。王艳等^[18]对五莲杨进行玻璃化防治时,琼脂和蔗糖浓度均对植株玻璃化具有重要影响。在诱导过程中,及时将玻璃化的植株重新分割,分成1 cm大小再接种到培养瓶中,同样能够减弱再生苗的玻璃化程度。

选用的本实验室改良载体3302Y-3flag作为植物表达载体,整合目的基因后通过农杆菌介导法,将其转入中苜1号中。除材料选择、激素配比等试验条件外,植物表达载体同样能够影响转基因植株的获得。苏志芳等^[19]在利用pBI121植物表达载体进行转基因试验时,获得4株转基因拟南芥。刘晓静等^[20]同样使用pBI121植物表达载体,在卡那霉素浓度为60 mg/L的情况下抗性愈伤获得率为27%。新疆大叶紫花苜蓿转化过程中使用

pCambia2300 植物表达载体进行转基因试验,转化率为 16%^[21]。紫花苜蓿 MsLEA4-4 的转基因试验中选择 pCambia3301 与目的基因进行重组,最终获得 7 株转基因植株^[22]。虽然不同种类植物中遗传转化过程可能存在一定差异,但植物表达载体的选择能够影响转基因过程^[23-25]。本试验中构建的 3302y-3flag-UFO 表达载体转入紫花苜蓿后,获得 67 个抗性愈伤组织,其中 56 株分化形成幼嫩紫花苜蓿,暂时炼苗入土获得 17 株转基因植株,提高了转基因过程中的转化率。转化试验中获得较多的转基因植株既能够节约成本,又能够较快地获得大量转基因植株,加快进程,这为进一步试验提供了材料基础。

在紫花苜蓿的转化试验中,成功转入 UFO 基因的紫花苜蓿与野生型相比,根系生长受到抑制,复叶的形态发生变化,并且近地处的分枝增加。通过改变激素种类与比例,选择不同于以往试验的植物表达载体,提高了遗传转化效率,获得较多转基因植株,为今后进行紫花苜蓿转基因试验以及 UFO 基因功能的研究提供了材料基础。

参考文献

- [1] Bouton J. The economic benefits of forage improvement in the United States. *Euphytica*, 2007, 154 (3): 263-270
- [2] Levin J Z, Jennifer C, Fletcher, Chen X M, Elliot M. A genetic screen for modifiers of UFO meristem activity identifies three novel *FUSED FLORAL ORGANS* genes required for early flower development in *Arabidopsis*. *Genetics*, 1998, 149 (2): 579-595
- [3] Lee I, Diana S, Wolfe, Nilsson O, Weigel D A. *LEAFY* co-regulator encoded by *UNUSUAL FLORAL ORGANS*. *Current Biology*, 1997, 7 (2): 95-104
- [4] Ingram G C, Goodrich J, Wilkinson M D, Simon R, Haughn G W, Coen E S. Parallels between *UNUSUAL FLORAL ORGANS* and *FIMBRIATA*, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 1995, 7 (9): 1501-1510
- [5] Samach A, Klenz J E, Kohalmi S E, Risseuw E, George W H, Crosby W L. The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant Journal*, 1999, 20 (4): 433, 445
- [6] Durfee T, Judith L R, Sessions R A, Inouye C, Serikawa K F, eldmann K A, Weigel D, Zambryski P C. The F-box-containing protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (14): 8571-8576
- [7] Wilkinson M D, Haughn G W. *UNUSUAL FLORAL ORGANS* controls meristem identity and organ primordia fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1995, 7 (9): 1485-1499
- [8] Risseuw E, Venglat P, Xiang D Q, Komendant K, Daskalchuk T, Babic V, Crosby W, Datla R. An activated form of *UFO* alters leaf development and produces ectopic floral and inflorescence meristems. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e83807
- [9] 晁跃辉,李珊珊,滕珂,许立新,肖国增,郭涛,韩烈保. 紫花苜蓿 *MsNAP* 基因克隆及烟草转化. *中国草地学报*, 2016, 38 (2): 13-19
- [10] Chao Y H, Li S S, Teng K, Xu L X, Xiao G Z, Guo T, Han L B. Cloning of *MsNAP* gene from *Medicago sativa* L. and transformation to tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Chinese Journal of Grassland*, 2016, 38 (2): 13-19
- [11] Fu K, Liu L, Fan L, Liu T, Chen J. Accumulation of copper in trichoderma reesei transformants, constructed with the modified *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation technique. *Biotechnology Letters*, 2010, 32 (12): 1815-1820
- [12] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasynanski S, Kumar S, Thompson W F. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, 2006, 1 (5): 2320
- [13] Wang H, Chen J H, Wen J Q, Tadege M, Li G M, Liu Y, Mysore K S, Ratet P, Chen R J. Control of compound leaf development by *FLORICAULA/LEAFY* ortholog *SINGLE LEAFLET1* in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 2008, 146 (4): 1759-1772
- [14] Chen J H, Yu J B, Ge L F, Wang H L, Berbel A, Liu Y, Chen Y H, Li G M, Tadege M, Wen J Q, Cosson V, Mysore K S, Ratet P, Madueño F, Bai G H, Chen R J. Control of dissected leaf morphology by a Cys (2) His (2) zinc finger transcription factor in the model legume *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (23): 10754-10759
- [15] Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (4): 1399-1409
- [16] Werner T, Nehnebajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U, Schmölling T. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, 2010, 22: 3905-3920
- [17] 张红,王万新. 香石竹组培中的玻璃化现象及防止. *北方园艺*, 2008 (8): 196-197
- [18] Zhang H, Wang W X. The phenomenon and preventing of vitrification in tissue culture of *Dianthus caryophyllus*. *Northern Horticulture*, 2008 (8): 196-197
- [19] 王庭辉,马晖玲. 和田苜蓿组织培养中玻璃化现象研究. *草原与草坪*, 2012, 32 (5): 58-61, 66
- [20] Wang T H, Ma H L. A improvement method for prevent Hetain alfalfa vitrification phenomenon of tissue culture. *Grassland and Turf*, 2012, 32 (5): 58-61, 66
- [21] 王艳,吴丹,刘立江,韩义,孙涛,王宁,解孝满,董昕,鲁仪增. 五莲杨 (*Populus wulianensis*) 再生体系建立及试管苗玻璃化的防治. *分子植物育种*, 2019 (9): 1-15
- [22] Wang Y, Wu D, Liu L J, Han Y, Sun T, Wang N, Xie X M, Dong X, Lu Y Z. Establishment of generation system for populus wulianensis and control of vitrification of its Test-tube seedlings. *Molecular Plant Breeding*, 2019 (9): 1-15
- [23] 苏志芳,包阿东,李亚珍. 紫花苜蓿 *MsCOL1* 基因植物表达

- 载体的构建及拟南芥转化. 安徽农业科学, 2014, 42(6): 1610-1611, 1668
- Su Z F, Bao A D, Li Y Z. Construction of plant expression vector of *MsCOL1* gene from alfalfa (*Medicago sativa* L.) and transformation of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(6): 1610-1611, 1668
- [20] 刘晓静, 郝凤, 张德罡, 毛娟, 于铁峰. 抗冻基因 *CBF₂* 表达载体构建及转化紫花苜蓿的研究. 草业学报, 2011, 20(2): 193-200
- Liu X J, Hao F, Zhang D G, Mao J, Yu T F. Construction of antifreeze gene *CBF₂* expression vector and transformation into alfalfa callus. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 20(2): 193-200
- [21] 张丽, 甘晓燕, 石磊, 陈虞超, 聂峰杰, 宋玉霞. 新疆大叶紫花苜蓿 *BADH* 基因转化体系的研究. 草地学报, 2014, 22(2): 359-365.
- Zhang L, Gan X Y, Shi L, Chen Y C, Nie F J, Song Y X. Transformation system of *Medicago sativa* Xinjiang Daye with betaine aldehyde dehydrogenase gene. Acta Agrectir Sinica, 2014, 22(2): 359-365
- [22] 贾会丽, 王学敏, 郭继承, 高洪文, 吴欣明, 刘建宁, 石永红, 董宽虎, 王运琦. 紫花苜蓿 *MsLEA4-4* 基因的克隆、表达分析及遗传转化. 草业学报, 2017, 26(12): 108-116
- Jia H L, Wang X M, Guo J C, Gao H W, Wu X M, Liu J N, Shi Y H, Dong K H, Wang Y Q. Cloning and expression analysis of *MsLEA4-4* from *Medicago sativa*. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(12): 108-116
- [23] 张兴, 周丽, 乔亚蕊, 徐蕊, 岳思君, 杨淑娟, 姚新灵, 杨立明, 郑蕊. 枸杞 *Lb14-3-3c* 基因克隆及转化马铃薯的研究. 植物遗传资源学报, 2019, 20(6): 1523-1534
- Zhang X, Zhou L, Qiao Y R, Xu R, Yue S J, Yang S J, Yao X L, Yang L M, Zheng R. Clone and transformation into potato (*Solanum tuberosum*) of *Lb14-3-3c* gene from wolfberry (*Lycium barbarum*). Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(6): 1523-1534
- [24] 付亚娟, 侯荟玲, 乔洁, 耿晓进, 王聪艳, 侯晓强. 大花杓兰钙依赖蛋白激酶基因克隆及植物表达载体构建. 植物遗传资源学报, 2019, 20(6): 1613-1620
- Fu Y J, Hou H L, Qiao J, Geng X J, Wang C Y, Hou X Q. Cloning and expressing vector construction of Calcium-Dependent protein kinase gene in cypripedium macranthum. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(6): 1613-1620
- [25] 毕惠惠, 贺亚伟, 毛伟伟, 翟俊鹏, 罗肖艳, 陈树林, 程西永, 许海霞. 小麦 *TaCIPK8* 基因的表达分析及其与 TaCBLs 的互作. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 296-304
- Bi H H, He Y W, Mao W W, Zhai J P, Luo X Y, Chen S L, Cheng X Y, Xu H X. Expression analysis of *TaCIPK8* and its interaction with TaCBLs in wheat. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 296-304