

沙冬青脱水素基因转化紫花苜蓿的研究

聂利珍 郭九峰 孙 杰 孙国琴 刘永志

(内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要: 为获得抗旱性较强的转基因苜蓿植株, 以紫花苜蓿品种中苜 2 号作为基因转化受体, 通过对外植体选择、菌液浓度、选择压确定、侵染时间和共培养时间等因素进行优化, 成功建立了农杆菌介导的遗传转化体系。在此基础上, 将沙冬青脱水素基因通过农杆菌的介导, 转化到中苜 2 号中。试验结果显示, 子叶和下胚轴作为外植体愈伤组织诱导频率最高, 可达 100%; 获得抗性愈伤组织与转基因植株的卡那霉素最佳筛选浓度为 25 mg/L; 外植体与农杆菌的共培养时间以 5 d 为最佳。试验共获得 126 株 T_0 抗性株, PCR 检测 30 株表现为阳性, 表明脱水素基因已转入受体植株中。

关键词: 紫花苜蓿; 遗传转化; 脱水素基因(*AmDHN*)

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0096-06

Research on Transformation of *DHN* Gene from *Ammopiptanthus mongolicus* into Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

NIE Li-zhen, GUO Jiu-feng, SUN Jie, SUN Guo-qin, LIU Yong-zhi

(Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandary Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: In order to obtain transgenic plants of resistant drought, by comparative analysis on the different explant tissues, concentrations of *Agrobacterium* and kanamycin, time of inoculation and coculture, etc, an *Agrobacterium*-mediated transformation for an alfalfa variety Zhongmu No. 2 was established. On the basis of the transformation, *dehydrin* of *Ammopiptanthus mongolicus* was transformed into genome of Zhongmu No. 2 by *A. tumefaciens*-mediated. The results showed that cotyledon and hypocotyl was the best explant for callus induction and transformation. The optimal kanamycin concentration for selection of resistant callus and transgenic plant was 25 mg/L in the selection medium. The explants and bacteria was cocultured for 5 d. One hundred and twenty-six independent resistant plants were obtained, 30 plants were confirmed to be transgenic by PCR amplification of *AmDHN* gene and 35S gene.

Key words: Alfalfa; Genetic transformation; Dehydrin

紫花苜蓿是世界上分布最广的优良牧草, 也是我国种植面积最大的人工牧草^[1], 它不仅是一种重要的饲料作物, 而且在土壤改良、水土保持及生态环境保护方面发挥着重要而积极的作用^[2]。

紫花苜蓿在中国西北地区种植较多, 而西北地区干旱、少雨、严冬的气候特点, 对苜蓿的正常生长发育非常不利, 严重制约苜蓿产业的发展。因此, 通过转基因提高苜蓿的抗寒、耐旱性, 对于克服冬寒、干旱、风蚀等自然条件, 扩大其种植范围, 提高生产

力, 具有举足轻重的意义^[3-5]。以前苜蓿的研究热点主要集中在苜蓿的品种改良、抗病虫^[6-7]等方面。近些年来, 对于苜蓿的抗寒耐旱性研究已经成为国内外的主要攻关方向。随着转基因技术的迅速发展, 利用转基因技术培育苜蓿抗逆性新品种是目前牧草育种中最有效的手段。因此, 转基因技术在苜蓿育种工作中具有广阔的应用前景。

脱水素基因(*Dehydrin*, *DHN*) 广泛存在于各种植物中, 受干旱、寒冷等胁迫因素诱导表达^[8], 脱水

收稿日期: 2012-02-03

基金项目: 内蒙古农牧业科学院科技创新基金项目(2011-CXJJM01); 国家牧草产业技术体系(CARS-35)

作者简介: 聂利珍(1977-), 女, 内蒙古乌兰察布人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物抗逆基因工程研究。

通讯作者: 刘永志(1964-), 男, 内蒙古赤峰人, 研究员, 中国科学院博士后, 主要从事草业科学研究。

素基因表达调控是目前研究的热点之一。因此,克隆研究脱水素基因对提高植物抗逆性具有重要意义。

本研究的目的是在获得紫花苜蓿高频再生体系的基础上,以根癌农杆菌介导将沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)脱水素基因(*AmDHN*)导入紫花苜蓿基因组中,使*AmDHN*在受体植株中表达,从而获得抗逆性较强的转基因植株,同时为利用转基因技术改良苜蓿在抗非生物胁迫中的特性,提供理论依据和试验指导。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料: 试验所用紫花苜蓿品种是再生能力较强的中苜2号的转化受体,种子由中国农科院草原研究所于林清研究员提供。

培养基: ① 1/2 MS 培养基: 含 1/2 MS 培养基的大量元素和微量元素,7.0 g/L 琼脂粉,15 g/L 蔗糖(pH 值 5.8);

② SH 培养基: 30 g/L 蔗糖,7.0 g/L 琼脂粉(pH 值 5.8);

③ 共培养培养基: SH 培养基含 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L KT(pH 值 5.8);

④ 选择培养基: SH 培养基含 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L KT, 300 mg/L Cef, 25 mg/L Kan(pH 值 5.8);

⑤ 分化培养基: SH 培养基含 300 mg/L Cef, 25 mg/L Kan(pH 值 5.8);

⑥ 胚状体形成培养基: SH 培养基, 200 mg/L Cef, 25 mg/L Kan(pH 值 5.8);

⑦ 生根培养基: 1/2 MS 培养基, 150 mg/L Cef, (pH 值 5.8)。

农杆菌菌株和植物表达载体: 农杆菌 LBA4404 和含有脱水素基因的植物表达载体均由本课题组准备和构建。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌介导的紫花苜蓿遗传转化体系的优化 外植体的选择: 选择无菌苗的子叶、下胚轴和真叶 3 种外植体进行愈伤组织诱导试验。将生长 6~7 d 无菌苗的子叶、下胚轴和真叶 3 种外植体,用解剖刀切成 3~4 mm 的小块和小段,放在共培养基上培养,每种分别放置 100 个外植体,设 3 个重复,培养 20 d 观察愈伤组织诱导情况。

卡那霉素(Kana)选择压的确定: 将生长 6~7 d 无菌苗的子叶,用解剖刀切成 3~4 mm 的小块,接到共培养基上,培养基加入 Kana,其浓度分别为 0,

25, 50, 100, 200 mg/L, 每个重复 100 个外植体,设 3 个重复,分别在培养 20 d 时观察生长状态。

侵染菌液最适浓度和侵染时间的确定: 用 OD₆₀₀ 分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 不同浓度的农杆菌菌液侵染子叶 15 min, 10 d 后观察愈伤组织长势情况及细菌生长状况。用 OD₆₀₀ = 0.6 的菌液侵染子叶和下胚轴各 5, 10, 15, 20, 30 min, 20 d 观察愈伤组织长势情况。

共培养时间的确定: 将准备好的子叶浸入制备好的农杆菌菌液中侵染 15 min, OD₆₀₀ = 0.6, 吸干菌液后于(24 ± 1) °C 黑暗中分别共培养 0, 3, 5, 7 d, 再转移到选择培养基上, 20 d 后统计抗性愈伤组织产生频率。各处理均设 3 个重复, 每个重复外植体数为 70 个。

头孢霉素(Cef)浓度的选择: 将 OD₆₀₀ = 0.6 的农杆菌菌液涂在含 0, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L Cef 的 SH 培养基上, 20 d 后观察细菌长势。

1.2.2 农杆菌介导的紫花苜蓿遗传转化 无菌苗培养: 苜蓿种子放入 15 mL PE 管中, 用 70% 的酒精消毒 2 min, 用 10% 次氯酸钠灭菌 35 min 左右, 无菌水冲洗 3~5 次, 最后在无菌水中浸泡 3~4 h, 倒掉水, 把种子放在无菌滤纸上吸干多余的水分, 置 1/2 MS 培养基上, 于 3 000 lx、16 h 光照/8 h 黑暗、(25 ± 1) °C 下萌发。

外植体的制备: 选取生长 6~7 d 的无菌苗子叶和下胚轴, 将其子叶切成方形 3~4 mm 小块, 下胚轴切成约 4 mm 长的切段, 放在 1/2 MS 液体培养基中进行预处理, 等收集到足够的外植体时用于转化。

农杆菌侵染菌液的制备: 挑取含脱水素基因的农杆菌在 YEB 固体培养基(含 25 mg/L Rif, 50 mg/L Kana)上划线, 28 °C 培养 36 h 左右进行活化, 挑单克隆接种于 5 mL YEB 液体培养基(含 25 mg/L Rif, 50 mg/L Kana)中, 28 °C, 170 r/min 振荡培养过夜, 再取 0.5 mL 菌液接种于 50 mL YEB 液体培养基中, 28 °C, 170 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 备用。

侵染与培养: 无菌条件下将切好的外植体浸入农杆菌菌液中, 置于摇床上 28 °C, 100 r/min 缓缓摇动侵染 10~15 min, 使外植体与菌液充分接触。用无菌滤纸吸去多余的菌液, 转移至共培养基上, (24 ± 1) °C 进行暗培养。共培养 5 d, 在共培养 3 d 左右, 外植体周围有淡淡的菌落, 用无菌水清洗 3~4 次, 用无菌滤纸吸去多余水分, 然后再转移至共培养基上继续暗培养 2 d 左右, 再用无菌水清洗 3~4 次, 400 mg/L Cef 脱菌处理后, 转移到选择培养基上, 培养条件为(24 ± 1) °C、16 h 光照/8 h 黑暗、光

照强度 1 000 lx,进行抗性愈伤的诱导。14 d 继代 1 次,大约 14 d 形成抗性愈伤组织。将生长旺盛、外观黄绿色、致密的抗性愈伤组织转移到分化培养基上进行分化培养(培养条件为 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、16 h 光照/8 h 黑暗、光照强度 3 000 lx),14 d 后抗性愈伤组织上开始有绿点出现,然后将其转移至胚状体形成培养基上继续培养,14 d 后形成胚状体。

生根培养:将胚状体轻轻取下,直立插到生根培养基中进行生根培养,暂时去掉选择压,等再生植株形成后再加入选择压。

1.2.3 转化植株 PCR 检测鉴定 采用基因组提取试剂盒提取再生植株的 DNA,PCR 扩增 *AmDHN* 基因和 35S 基因片段,所用引物为 *AmDHN*-P1: 5'-GATATGGTGGACCCACTGGT-3' 和 *AmDHN*-P2: 5'-GCATGCATGTGCCTTTTATT-3' 及 35S-P1: 5'-CT-TACGCAGCAGGTCTCATCA-3' 和 35S-P2: 5'-CCAC-CTTCCTTTTCCACTATCTT-3'。以脱水素基因的植物表达载体 pCambia3301 为阳性对照,野生型紫花苜蓿基因组 DNA 为阴性对照。PCR 反应体系为 20 μL ,反应程序为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,分别为 53 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min 10 s,30 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。取 10 μL 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

2 结果与分析

2.1 转化体系的优化

2.1.1 外植体的选择 外植体类型对愈伤组织的诱导有很大的影响,本试验选择子叶、下胚轴和真叶 3 种外植体进行愈伤组织诱导试验。下胚轴 2~3 d 开始出现膨大,第 4 天切口处有少量愈伤组织出现。

子叶在第 4 天开始膨大,真叶在第 6 天开始膨大。下胚轴的愈伤组织颜色为淡黄色,子叶和真叶的愈伤组织为黄绿色。三者相比,子叶的愈伤组织最大而且结构良好,下胚轴次之,真叶愈伤组织不易形成。培养 20 d 后进一步观察表明,子叶和下胚轴产生的愈伤组织最多,愈伤组织诱导率可达 100%;而真叶的愈伤组织诱导率为 85%,结果见表 1,因此,选择子叶和下胚轴作为外植体进行愈伤组织诱导。

表 1 不同的外植体对愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effects of different explants

on callus induction of alfalfa

外植体类型 Explant type	外植体数/个 No. of explant	愈伤组织数/个 No. of callus	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate
子叶 Cotyledon	100	100	100
真叶 Leaf	100	85	85
下胚轴 Hypocotyl	100	100	100

2.1.2 共培养时间的确定 共培养时间过长或过短都会影响转化效率。时间过短,T-DNA 转移不能完成;时间过长,生长旺盛的农杆菌会对与之共培养的植物材料造成伤害,从而很难得到再生植株。本试验设了 0,3,5,7 d 4 个共培养时间,结果见表 2,共培养 3 d 得到的抗性愈伤组织诱导率高于共培养 5 d,分别为 53% 和 50%,而共培养 5 d 的胚状体形成率明显高于 3 d,分别为 49% 和 40%。在试验中发现,共培养 2 d 时在子叶和下胚轴切口处还没有出现农杆菌菌落;3 d 时,整个子叶边缘均有少量菌落出现,此时用无菌水洗 3~4 次,转入新鲜培养基再培养 2 d,此法效果明显优于不用无菌水清洗;共培养 7 d 时,整个子叶几乎全被农杆菌覆盖,子叶枯黄死亡,不能形成愈伤组织。因此,共培养时间选择 5 d 为最佳。

表 2 共培养时间对转化效率的影响

Tab. 2 The effect of co-cultivated time on transformation frequency

共培养时间/d Co-cultivated	外植体数/个 No. of explant	抗性愈伤组织数/个 No. of resistant callus	抗性愈伤组织率/% Rate of resistant callus	胚状体数/个 No. of embryos	胚状体形成率/% Rate of embryos
0	70	51	73	7	13
3	70	37	53	15	40
5	70	35	50	17	49
7	70	0	0	0	0

2.1.3 Kana 选择压的确定 为了确定 Kana 浓度对愈伤组织状态的影响,设置不同的 Kana 浓度梯度。当子叶在不含 Kana 的 SH 培养基上培养时,它的愈伤组织诱导率达 100%。当培养基中 Kana 浓度高于 25 mg/L 时,子叶的愈伤组织诱导率开始明显降低。在含有 25 mg/L 的 Kana 的培养基上培养时,愈伤组织诱导率为 70%。结果见表 3。

表 3 外植体对 Km 的敏感性

Tab. 3 The influence of Km to the callus growth

Km 浓度/(mg/L) Km concentration	外植体个数/个 No. of explants	愈伤组织数/个 No. of callus	愈伤诱导率/% Rate of callus induction
0	100	100	100
25	100	70	70
50	100	42	42
100	100	0	0
200	100	0	0

2.1.4 菌液浓度、侵染时间对转化的影响 当农杆菌 $OD_{600} = 0.6$ 时,其愈伤组织诱导率最高,且农杆菌在选择培养基上基本不生长。用 $OD_{600} = 0.6$ 的菌液侵染子叶和下胚轴各 5、10、15、20、30 min,观察愈伤长势情况发现,对于子叶来说,侵染 15 min 愈伤长势良好,20 min 以上农杆菌因过度生长而无法抑制;对于下胚轴来说,侵染 10 min 愈伤长势良好,15 min 以上在共培养过程中逐渐变黄死亡。

2.1.5 抑菌抗生素的选择 在植物基因转化过程中,对受体材料进行抗生素筛选是十分必要的。在其转化培养中,一个很重要的环节是抑制农杆菌生长,防止细菌过度生长而产生污染。为此,常在培养基中添加对植物细胞无毒害作用的抑菌性抗生素。总的原则是:添加的抑菌素既能有效地抑制细菌的生长,又不影响植物的正常生长。

本试验选用头孢霉素作为抑菌素,试验结果显示,在含有 100 mg/L Cef 的培养基上,农杆菌长势非常强,几乎得不到抑制;200 mg/L Cef 的培养基上,农杆菌生长减弱;300 mg/L Cef 的培养基上,农杆菌生长基本得到抑制,培养基上无菌落出现。因此,本试验选用 300 mg/L Cef 抑制细菌生长。

2.2 抗性愈伤组织及胚状体的获得

根据转化体系的优化结果,以紫花苜蓿的子叶和下胚轴为外植体进行转化,经农杆菌侵染共培养 5 d 后转移至选择培养基上,约 14 d 形成抗性愈伤组织(图 1-A)。将抗性愈伤组织转入新鲜培养基继续培养 14 d 左右,愈伤组织表面出现绿点,然后在分化培养基继续培养 14 d 左右,逐渐分化出胚状体。试验结果见图 1-B。

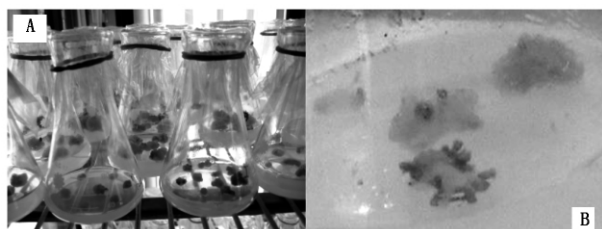


图 1 抗性愈伤组织和胚状体

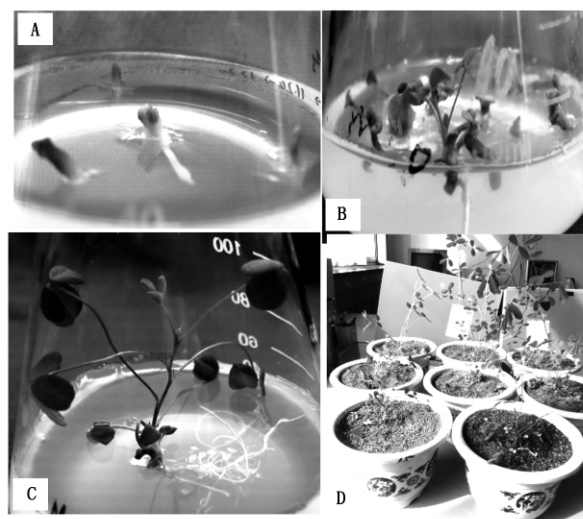
Fig. 1 Resistant Callus and Embryos

2.3 再生植株的获得

将胚状体转移在生根培养基上进行生根培养,暂时去掉选择压,大约 20 d 生出几条健壮的根,约 14 d 发育成完整的抗性再生植株(图 2)。本试验共再生获得 126 棵抗性植株。

2.4 转化植株的分子检测

2.4.1 苜蓿基因组 DNA 提取 用试剂盒提取苜蓿基因组 DNA,取 1 μ L DNA 用于琼脂糖凝胶电泳,结果显示有清晰的条带(图 3)。



A. 胚状体形成根; B, C. 胚状体形成完整植株; D. 移入温室的转化植株。
A. Embryos formed root; B, C. Complete plants; D. Resistant plant grow in greenhouse.

图 2 抗性再生植株

Fig. 2 Resistant regenerated plant

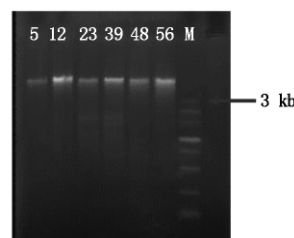
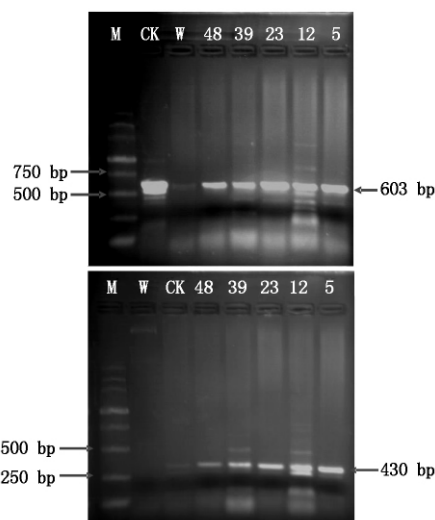


图 3 再生苜蓿基因组 DNA

Fig. 3 DNA of regenerated plant



A. *AmDHN* 引物; B. 35S 引物; 5, 12, 23, 39, 48. 抗性苜蓿植株; W. 野生型苜蓿; CK. 阳性对照; M. DL3000 DNA Marker.
A. *AmDHN* primers; B. 35S primers; 5, 12, 23, 39, 48. Resistant plants; W. Wild-type (non-transgenic) alfalfa; CK. Positive control; M. DL3000 DNA Marker.

图 4 抗性植株的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of the resistant regenerated alfalfa plants

2.4.2 转化植株的 PCR 检测 提取抗性再生苜蓿植株的 DNA 后,分别以 *AmDHN* 基因和 35S 部分基

因序列为引物,以含有 *AmDHN* 基因的植物表达载体为阳性对照,野生型紫花苜蓿基因组 DNA 为阴性对照,PCR 检测结果表明,野生型苜蓿植株没有扩增出预期产物,而获得的抗性再生植株中均扩增出一条约 603 bp 和 430 bp 特异片段(图 4),说明 *AmDHN* 基因已被整合在紫花苜蓿基因组中。

3 结论与讨论

3.1 外植体对转化的影响

对于紫花苜蓿不同外植体的基因转化研究已有很多报道,但得到的结论不太一致,原因可能是除了单纯的外植体这一影响因素以外,紫花苜蓿不同基因型也是影响转化的一个极其重要的因素^[9]。另外,植物材料的敏感性也受其生理状态和发育阶段控制^[10],要得到转基因植株,植物细胞是否具有分化能力也是关键因素之一。子叶、子叶节、下胚轴、真叶都可作为外植体再生出植株^[11],但是从本实验中可以看出,用子叶和下胚轴作外植体,有许多优点:操作简便、愈伤组织诱导时间短、诱导频率高、胚状体分化能力强。因此,子叶和下胚轴是苜蓿组织培养和遗传转化首选的外植体,这与大部分研究者所得的结论基本一致^[12-13]。

3.2 共培养时间对转化的影响

农杆菌和外植体共培养是整个转化过程中非常重要的环节,因为农杆菌的附着、T-DNA 的转移及整合都会在共培养期间完成,因此,共培养技术条件的掌握是转化的关键。农杆菌完成侵染和外源基因整合及表达的过程需要足够的共培养时间,但共培养时间亦不宜过长,否则农杆菌过度生长,会抑制外植体生长,并增加以后抑菌的难度。本试验适宜的共培养时间是 5 d。

3.3 抑菌抗生素对转化的影响

在植物基因转化过程中,对受体材料进行抗生素筛选是十分必要的。在其转化培养中,一个很重要的环节是抑制农杆菌生长,防止细菌过度生长而产生污染。为此,常在培养基中添加对植物细胞无毒害作用的抑菌性抗生素。总的原则是:添加的抑菌素既能有效地抑制细菌的生长,又不影响植物的正常生长。

添加哪一种或多大浓度的抑菌素根据不同植物、不同外植体以及不同的农杆菌菌株而定。因此,不同研究者在苜蓿的转化试验中选用了不同的抑菌素。有研究表明,氯霉素(Chloramphenicol)对 GV3101 菌株虽有很好的抑制效果,但对植物却有很强的伤害作用。常用的抑菌抗生素有羧苄青霉素

(Carb) 和头孢霉素(Cef)等。黄剑^[14]研究结果认为,添加 400 mg/L Cef 可以有效地除去农杆菌 LBA4404,并且对紫花苜蓿的生长影响不大。王国良^[15]研究采用了以上 2 种抗菌素对农杆菌菌株进行敏感性试验,结果发现,当 Cef 浓度为 400 mg/L 时,农杆菌菌株 LBA4404 的生长基本上完全受到抑制,这说明 Cef 可以有效地抑制农杆菌 LBA4404 的生长,所以在共培养后的脱菌培养中选择 300 mg/L 的 Cef 来去除农杆菌。

本试验用于侵染的农杆菌菌株为 LBA4404,基于许多研究者的试验结果,选用 Cef 作为抑菌抗生素,浓度设为 300 mg/L 来抑制农杆菌的生长。另外,在本研究中,为了更好地抑制农杆菌的过度增殖,采用含有 400 mg/L Cef 无菌水和液体培养基充分洗涤共培养后的外植体。

紫花苜蓿组织培养与遗传转化一直以来是一个难题。国内虽然有许多实验室相继开展了相关工作,但转化频率比较低且结果重复性差。这主要是由于紫花苜蓿组织培养困难、分化率低、重复性差及不同品种间基因型差异大等,制约了苜蓿转基因研究的进一步开展。为了建立高效的苜蓿再生体系,本实验室借鉴了前人的研究结果,在一些方面进行了改进。首先,选择了子叶和下胚轴作为外植体。其次,外源生长素和细胞分裂素是细胞离体培养所必需的激素。合适的浓度及二者之间适宜的配比,是控制组织培养过程中细胞脱分化和形态建成的关键^[16]。因此,根据实际情况,分别选择了 1 mg/L 2,4-D 和 0.1 mg/L KT 作为愈伤组织诱导的最佳浓度。在本研究中采用的程序使苜蓿再生植株时间大大缩短,从无菌苗准备到转基因植株获得的整个过程大约只需要 80 d,而前人大部分研究结果认为至少需要 90~120 d^[17-18]。

参考文献:

- [1] 罗志成. 北方旱地农业研究的进展与思考[J]. 干旱地区农业研究, 1994, 12(1): 4-13.
- [2] 黄文惠, 刘自学. 概论苜蓿的分布和发展[M]//耿华珠. 中国苜蓿. 北京: 中国农业出版社, 1995: 2-7.
- [3] 于林青. 3 种苜蓿形态特征及变异分析[J]. 草原与草坪, 2008, 128(3): 29-33.
- [4] 王勇, 刘学义. 我国苜蓿研究现状、存在问题及对策[J]. 内蒙古农业科技, 2004(6): 6-7.
- [5] 张丽君, 白占雄, 关文斌, 等. 我国苜蓿属植物栽培品种的地理分布[J]. 华北农学报, 2005, 20(S1): 25-28.
- [6] Hill K K, Jans-Eagan N, Halk E L et al. The development of virus-resistant alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Bio/

- Technology ,1991 9: 373 – 377.
- [7] Thomas J C ,Wasmann C C ,Echt C. Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa(*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Cell Reports ,1994 ,14: 31 – 36.
- [8] Close T J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins [J]. Physiol Plant , 1996 97: 795 – 803.
- [9] Deborah A Samac ,Sandra Austin-Phillips. Alfalfa(*Medicago sativa* L.) [J]. Methods in Molecular Biology , 2006 343: 301 – 312.
- [10] Shinozaki K ,Yarnaguchi S. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways [J]. Curr Opin Plant Biol 2000(3) : 217.
- [11] Zhou J M ,Tang X Y ,Martin G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes [J]. EMBO J ,1997(16) : 3207 – 3218.
- [12] Ohme-Takagi M , Shinshi H. Ethylene-inducible DNAbinding proteins that interact with allethylene-responsive element [J]. Plant Cell ,1995(7) : 173 – 182.
- [13] Leubnermetzger G ,Petrucelli L ,Waldvogel R ,et al. Ethylene-responsive element bindingprotein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1 ,3-glucanase during tobacco seed germination [J]. Plant Mol Biol ,1998(38) : 785 – 795.
- [14] 黄 剑. 紫花苜蓿高频再生体系的建立及农杆菌介导的甜菜碱脱氢酶基因的转化研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学 2002.
- [15] 王国良. 农杆菌介导的紫花苜蓿 *BAAMDHN* 基因高效转化体系的优化和转基因植株的检测 [D]. 兰州: 甘肃农业大学 2004.
- [16] 张万军,王 涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因子的研究 [J]. 中国农业科学 2002 , 35(12) : 1579 – 1583.
- [17] 刘艳芝,王玉民,黄学林. 苜蓿组织培养体细胞胚发生体系的建立 [J]. 草业科学 2005 23(1) : 34 – 36.
- [18] Chabaud M ,Larsonneau C ,Marmouget C ,et al. Transformation of barrel medic(*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tum faciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene [J]. Plant Cell Rep ,1996 ,15: 305 – 310.