

过量表达 *tMEK2* 基因的大岩桐植株对温度胁迫的反应

孙姝兰¹, 温秋香¹, 代建丽¹, 邢 惕², 王小菁^{1,*}

(¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; ²卡尔顿大学生物系, 渥太华 K1S5B6, 加拿大)

摘 要: 构建番茄中 *MAPKK* 基因 *tMEK2* 的过量表达载体并转化到大岩桐中, 通过 PCR 和 Southern blot 鉴定出转基因株系并对其进行抗性分析。结果表明, 转基因植株与对照相比叶片变小, 叶片的叶绿素含量显著增加, 在 4 °C 低温和 40 °C 高温胁迫之后的恢复能力明显比对照增强。

关键词: 大岩桐; *tMEK2*; 过量表达; 温度胁迫; 恢复

中图分类号: S 68

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 02-0375-06

Responses of *Sinningia speciosa* Overexpressing *tMEK2* to Temperature Stresses

SUN Shu-lan¹, WEN Qiu-xiang¹, DAI Jian-li¹, XING Tim², and WANG Xiao-jing^{1,*}

(¹Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; ²Department of Biology, Carleton University, Ottawa K1S5B6, Canada)

Abstract: We constructed a *MAPKK* gene from tomato, *tMEK2* overexpressing construct to transform into *Sinningia speciosa*. Transgenic plants were identified by PCR and Southern blotting analyses, and their resistance to cold and high temperatures was analyzed. The results showed that the *tMEK2* overexpressing plants had smaller leaves, increased contents of chlorophyll in leaves, and better recoveries of plant growth after treatments with cold and high temperatures, compared to control of wild type plants.

Key words: *Sinningia speciosa*; *tMEK2*; overexpression; temperature stress; recovery of growth

大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 为苦苣苔科 (Gesneriaceae) 大岩桐属, 其生长需高温湿润环境 (杨鸿祚和陈少琼, 1990), 因此生产中需要培育耐寒、耐旱性强的新品系。

植物中有许多参与非生物胁迫的信号途径, MAPK 级联信号途径是其中最主要的途径之一 (Sinha et al., 2011)。MAPKs 在植物中参与高盐高渗、干旱、极端温度和各种病原诱导等生物和非生物胁迫反应 (Yu & Tang, 2004)。水稻中的 *DSM1* 是一个 *MAPKKK* 激酶基因, 可以通过活性氧清除途径来介导干旱胁迫反应 (Ning et al., 2010)。通过基因工程的方法, Shou 等 (2004) 在玉米中组成型表达一个烟草中的 *MAPKKK* 基因可以提高转基因玉米对冷冻胁迫的耐受力。在许多植物中

收稿日期: 2011-11-01; 修回日期: 2012-01-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (30900107); 广东省自然科学基金重点项目 (9251063101000002)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangxj@scnu.edu.cn)

都发现 MAPK 途径与低温等胁迫的耐受有关。Teige 等 (2004) 发现拟南芥 *AtMKK2* 与冷、盐胁迫相关。*ANP1* 是拟南芥叶片细胞中激活的一个特异的 *MAPKK* 基因, 转 *NPK1* (*ANP1* 类似物) 烟草表现出对多种逆境的耐受力 (Kovtun et al., 2000)。水稻 *OsMKK6* (*OsMEK1*) 能够介导低温胁迫信号 (Wen et al., 2002)。MAPKs 不仅与低温胁迫反应相关, 在玉米中 *ZmMPK5* 还与低温伤害后的恢复有关 (Berberich et al., 1999)。

Xing 等 (2001) 将番茄中的一个 MAPKK, *tMEK2* 的核心区丝氨酸和苏氨酸定点诱变, 得到永久活化状态的 *tMEK2* 突变。将 *tMEK2* 突变与植物组成型强启动子 *tCUP* 连接导入番茄原生质体进行瞬时表达, 发现 *tMEK2* 突变可诱导下游病原相关基因 *PR1b1*、*PR3*、*Twil* 和伤害诱导基因 *ER5* 的表达。另外, Xing 等发现番茄 *tMEK2* 与植物耐高温有关 (个人通信)。

本研究中构建 *tMEK2* 过量表达载体并转化到大岩桐中, 通过鉴定转基因株系并对其进行抗性分析, 期望得到具有耐寒和耐热等品质的抗性株系, 为培育新的大岩桐的抗性株系提供一种方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料与组织培养条件

供试材料为市售紫色花大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 重瓣品种 ‘巨早’, 2006—2008 年在华南师范大学生命科学院生物园盆栽。

组织培养条件: 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 70%~80%。

诱芽培养基: $\text{MS} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 。继代培养基: $\text{MS} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 。生根培养基: $\text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 。以上培养基均添加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 固体培养基则添加 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8。

1.2 载体构建

含 *tMEK2* 的质粒由加拿大卡尔顿大学 Dr. Tim Xing 惠赠。用如下引物进行 PCR 扩增。5'引物 (添加 *Xba* I 位点): AGTCTAGAATGAAGAAAGGATCTTTTGCACC; 3'引物 (添加 *Sac* I 位点): GAGAGCTCTTATAGCTCAGTAAGTGTTGCCA。产物连接到 pMD T-18 克隆载体上, 经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切之后连接到 pIB1 上, 经 *Eco*R I 和 *Hind*III 双酶切将 p35S 与 *tMEK2* 共同连接到表达载体 pBin19 上。

1.3 根癌农杆菌介导 *tMEK2* 转化大岩桐

取大岩桐幼嫩叶片为外植体, 70%酒精消毒 30 s, 10% NaClO 消毒 10 min 后, 将叶片切成 0.5 cm^2 的方块, 近轴面朝下接种到诱芽培养基上。培养 50 d 后几乎所有外植体都能分化出不定芽。将叶片上分化出的幼芽切下, 转到继代培养基上, 1 周后形成小侧芽, 随着培养时间的延长, 侧芽逐渐长大成为无菌苗。

取无菌苗长势良好的叶片, 将叶片切成 0.5 cm^2 的方块, 近轴面朝下接种到诱芽培养基上。预培养 2 d 后, 用培养至 $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 的含 *tMEK2* 农杆菌 LBA4404 菌株浸染 10 min, 用无菌吸水纸吸去多余菌液。将浸染后的叶片接种在含 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的诱导培养基中 25°C 暗培养 4 d。将共培养后的叶片用无菌水洗 4 次, 无菌吸水纸吸干, 接种于含有 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef 的诱导培养基上进行抗性幼芽的筛选。将分化的抗性幼芽切下, 转入含有 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef 生根培养基上进行生根得到候选转基因植株。待幼苗长至 4~5 cm 高时, 洗去根上附着的培养基, 移入装有蛭石的营养钵中, 用保鲜膜保湿 1 周, 用于分子鉴定和表型分析。

1.4 PCR 检测和 Southern blot 分析

PCR 检测: CTAB 常规方法提取大岩桐基因组 DNA, 使用 1.3 中引物进行 PCR。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min; 55 °C 1 min; 72 °C 2 min; 30 个循环; 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物长度为 1.1 kb。

Southern 杂交: 以 *NPTII* 的引物 Primer 1 (5'-GGTGCCCTGAATGAACTGAC-3') 和 Primer 2 (5'-TAGCCAACGCTATGTCCTGA-3') 进行 PCR 扩增, 以已定量 PCR 回收产物作为探针, 用 DIG 标记试剂盒进行标记。DNA 探针标记的制备、定量与检测方法参照 DIG 标记试剂盒说明书(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II)。以 SDS 法大量提取大岩桐基因组 DNA, 取 20 µg DNA, 用 *HindIII* 在 37 °C 下酶切过夜, 将酶切产物回收并进行 1%琼脂糖胶电泳 12 h。转移到尼龙膜上, 80 °C 烘 2 h 后进行预杂交, 杂交, 于暗室中将尼龙膜置于 X-ray 盒中, 照相记录结果 (Sambrook et al., 1989)。

1.5 叶片生物量和叶绿素含量的测定

依薛应龙 (1985) 的方法测量叶面积。将叶片的右半部分用直径为 1.5 cm 的打孔器在相应部位打孔, 得到 6 片叶圆片, 分 3 份, 称鲜样质量后在烘箱烘干, 再称干样质量。

叶片用直径为 1.5 cm 的打孔器打孔, 得到 6 片叶圆片, 分 3 份, 提取叶绿素, 用分光光度计分别在波长 654 nm 和 663 nm 处测定光吸收值 (A) (Arnon, 1949)。计算叶绿素含量。

1.6 转基因植株抗性分析

对高温的抗性分析: 大岩桐生长适宜温度为 25 ~ 35 °C。将转化 *tMEK2* 大岩桐植株与对照各 20 株放置于光照培养箱中, 40 °C 高温处理 3 d, 其它培养条件不变, 统计近根部的茎部受伤时间 (12 h 统计 1 次), 高温处理 3 d 后转移到 25 °C 下恢复, 统计恢复率。重复 3 次。

对低温的抗性分析: 将转化 *tMEK2* 大岩桐植株与对照各 20 株放置于光照培养箱中, 关闭加湿器, 其它培养条件不变, 4 °C 低温处理 3 d。参照文献 (Sememuk & Voline, 1986; 王孝宣 等, 1996; 樊治成 等, 1999) 将大岩桐对低温的敏感性分级。0 级: 植株正常; 1 级: 顶部叶片开始萎蔫; 2 级: 距离顶部最近的第 2 对叶片开始萎蔫; 3 级: 基部叶片开始萎蔫。统计至各级所需时间。低温处理 3 d 后转移到 25 °C 下恢复, 统计恢复指标。0 级: 受伤面积 $\geq 4/5$; 1 级: $1/2 \leq$ 受伤面积 $< 4/5$, 受伤斑点数 ≥ 3 个; 2 级: 受伤面积 $< 1/2$, 受伤斑点数 ≥ 3 个; 3 级: $1/2 \leq$ 受伤面积 $< 4/5$, 受伤斑点数 < 3 个; 4 级: 受伤面积 $< 1/2$, 受伤斑点数 < 3 个; 5 级: 叶片基本恢复。重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 PCR 和 Southern blot 鉴定结果

以候选转 *tMEK2* 基因植株的基因组 DNA 为模板, 采用双特异性引物进行扩增, 1 和 3 泳道的候选转基因植物得到了约 1.1 kb 的 DNA 片段, 与已知的 *tMEK2* 片段大小相符, 表明 *tMEK2* 已整合到其基因组中 (图 1)。

NPTII 和 *tMEK2* 共同位于 pBin19 载体的 T-DNA 区。农杆菌介导外源基因转化大岩桐时, 其载体的 T-DNA 区整合到被转化植株中。因此, 提取具有卡那霉素抗性植株的基因组 DNA, 用 *HindIII* 单酶切, 以抗性基因 *NPTII* 为探针进行 Southern blot 杂交鉴定。杂交结果表明, 对照植株没有杂交信号, 而 *tMEK2* 候选转基因植株有杂交信号, 表明其为转基因植株 (图 2)。

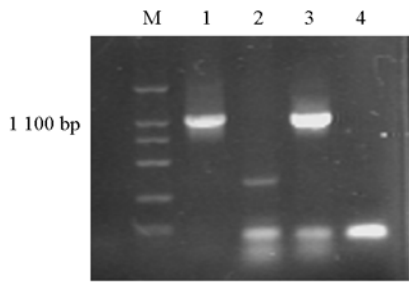


图 1 候选转基因植株的 *tMEK2* 片段扩增
M: DNA marker (DL2000); 1~3: 候选转基因植株。
4: 未转化对照植株。

Fig. 1 PCR amplification of *tMEK2* in candidate transgenic plants
M: DNA marker (DL2000); 1 - 3: Candidate transgenic plants;
4: Untransformed plant (control) .

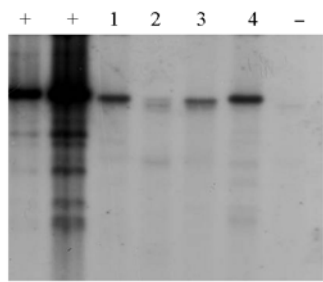


图 2 候选转基因植株的 *NPTII* 基因 Southern blot 鉴定
+: 重组质粒; 1~4: 候选转基因植株;
- : 未转化对照植株。

Fig. 2 Southern blot of candidate transgenic plants
+: Recombination plasmid; 1 - 4: Candidate transgenic plants;
- : Untransformed plant (control) .

2.2 大岩桐转 *tMEK2* 基因植株的表型分析

大岩桐转 *tMEK2* 基因植株与对照相比，其叶片变小，颜色变深，呈深绿色（图 3）。取植株第 2 对叶测定各项指标，发现植株叶面积减小，干质量和鲜质量也明显下降，但是叶片叶绿素含量比对照高 22.53%（表 1）。



图 3 *tMEK2* 转基因植株表型
Fig. 3 The phenotype of *tMEK2* transgenic plants

表 1 大岩桐转 *tMEK2* 基因植株叶片生物量和叶绿素含量
Table 1 Biomass and content of chlorophyll in leaves of *tMEK2* transgenic plants

植株 Plant	叶片面积/ cm ² Leaf area	叶片总鲜质量/ g The total leaf fresh weight	叶片总干质量/ g The total leaf dry weight	叶绿素含量/ (mg · g ⁻¹) Chlorophyll content
对照 Control	190.66 ± 10.38 A	11.73 ± 2.60 A	0.63 ± 0.12 A	0.71 ± 0.024 a
<i>tMEK2</i> 转基因植株 <i>tMEK2</i> transgenic plants	92.95 ± 12.65 B	5.07 ± 2.96 B	0.30 ± 0.18 B	0.87 ± 0.031 b

注：不同大写字母和小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。
Note: The different capital or small letter indicate significance at *P* = 0.01 or 0.05 level.

2.3 转 *tMEK2* 基因大岩桐植株对高温的抗性分析

转 *tMEK2* 基因植株组培苗经 40 ℃ 高温处理 3 d 后，与对照相比对高温的抗性并没有增强，相反，受伤害率（100%）高于对照（75%）（表 2）。然而，将高温处理 3 d 后的对照和转基因植株转

移到 25 ℃ 下恢复 4 d，恢复率分别为 40%和 50%，说明转 *tMEK2* 基因植株高温处理后的恢复能力比对照好。

表 2 转 *tMEK2* 基因植株受 40 ℃ 高温受害率

Table 2 Percentage of injured plants by 40 ℃ high temperature of *tMEK2* transgenic plants

处理时间/h	对照	转基因植株
Time of treatment	Control	Transgenic plants
0	0	0
24	0 a	10 ± 10 b
48	0 a	10 ± 10 b
72	75 ± 10 a	100 ± 0 b

P = 0.05.

表 3 转 *tMEK2* 基因植株 4 ℃ 低温处理下至各级伤害所需时间

Table 3 Time of *tMEK2* transgenic plants to different injury level under 4 ℃ treatment

伤害级数	对照	转基因植株
Injury level	Control	Transgenic plants
0	0	0
1	43.2 ± 3.4 a	30.0 ± 7.2 b
2	44.4 ± 5.1 a	32.4 ± 4.8 b
3	45.6 ± 5.6 a	36.0 ± 3.5 b

P = 0.05.

2.4 转 *tMEK2* 基因大岩桐植株对低温的抗性分析

将对照和转 *tMEK2* 基因植株组培苗移栽 40 d 后在光照培养箱 4 ℃ 低温下处理 3 d，统计至各级伤害程度所需的时间。结果表明，转基因植株对低温更加敏感，达到 1、2 和 3 级伤害的时间比对照早（表 3）。然而，低温 4 ℃ 处理 3 d 后，将植株转移到 25 ℃ 恢复 4 d 统计恢复率，结果表明 *tMEK2* 转基因植株恢复能力比对照强，恢复到 5 级的植株比例比对照高 15%（表 4）。

表 4 *tMEK2* 转基因植株对低温伤害的恢复能力

Table 4 Recovery ability of *tMEK2* transgenic plants after injured by low temperature

恢复级数 Recovery level	对照 Control		转基因植株 Transgenic plants	
	株数 Plant number	%	株数 Plant number	%
0	30	25.00 ± 3.35 a	22	18.33 ± 5.60 b
1	20	16.67 ± 4.23 a	26	21.67 ± 2.28 b
2	35	29.17 ± 6.73 A	10	8.33 ± 2.15 B
3	0	0 a	4	3.33 ± 0.64 b
4	25	20.83 ± 2.67 a	30	25.00 ± 2.25 a
5	10	8.33 ± 1.92 A	28	23.33 ± 3.16 B

注：大写和小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Note: The different capital or small letter indicate significance at *P* = 0.01 or 0.05 level.

3 讨论

大岩桐的营养生长阶段过长，为了促进其早开花，Zhang 等(2008)在大岩桐中转入黄瓜的 *LEAFY* 同源基因 *CFL*，结果转基因株系在不外施赤霉素的情况下能够促进早开花。目前，无论是农作物还是花卉植物都需要对生物和非生物胁迫的抗性进行改良。

MAPK 信号转导级联途径是植物中普遍的、重要的信号转导途径，它参与植物生物胁迫、非生物胁迫等信号的转导（Tena et al., 2001）。本研究中通过在大岩桐中过量表达 *tMEK2*，发现转基因植株与对照相比其叶面积减小，叶片的叶绿素含量显著增加，并且当受到低温或高温胁迫时转基因植株的恢复能力明显比对照增强。这种对逆境胁迫恢复能力的增强推测可能与转基因植株的生理状态密切相关。Zhang 等（2010）在拟南芥中转入小麦编码蔗糖非酵解相关蛋白激酶的 *TaSnRK2.8* 基因后其抗盐、抗低温等能力增强，而且其叶绿素含量也明显增加，推测与更强的光合效率有关。大岩桐 *tMEK2* 转基因植株经极端温度处理后其恢复能力的增强可能也与叶绿素含量增加导致的光合效率增强有关。大岩桐转 *tMEK2* 基因植株其叶片变小可能也是其抗逆性更强的因素之一。Achard 等（2006）对拟南芥中 *GA* 信号途径中的抑制因子 5 个 *DELLA* 基因中 4 个基因的突变体进行杂交得到 *DELLA* 基因的 4 个突变体进行分析，结果表明 *DELLA* 依赖的拟南芥生长抑制与其在逆境环境下促进生长有关，因此推测大岩桐 *tMEK2* 转基因植株变小可能与经极端温度处理后其恢复能力的增强有关系。另外，*tMEK2* 可以诱导一些抗性基因和伤害诱导基因的表达（Xing et al., 2001），对于一

些病原菌的生物胁迫或者伤害 *tMEK2* 是否有作用还需要进一步的研究。

References

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd N P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311 (5757): 91 – 94.
- Arnon D I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1 – 15.
- Berberich T, Sano H, Kusano T. 1999. Involvement of a MAP kinase, *ZmMPK5*, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Mol Gen Genet*, 262: 534 – 542.
- Fan Zhi-cheng, Jia Hong-yu, Guo Hong-yun, Yang Liang. 1999. Studies on the physiological criteria for cold tolerance evaluation in *Cucurbita pepo* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (5): 309 – 313. (in Chinese)
- 樊治成, 贾洪玉, 郭洪芸, 杨 梁. 1999. 西葫芦耐冷性生理指标研究. *园艺学报*, 26 (5): 309 – 313.
- Kovtun Y, Chiu W L, Tena G, Sheen J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS USA*, 97 (6): 2940 – 2945.
- Ning J, Li X, Hicks L M, Xiong L. 2010. A Raf-like MAPKKK gene *DSM1* mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol*, 152: 876 – 90.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sememuk P, Voline H E. 1986. A comparison of effect of ABA and antitranspirant on chilling injury of coleus, cucumber and dieffenbachia. *J Amer Hort Sci*, 11 (6): 866 – 868.
- Shou H, Bordallo P, Fan J B, Yeakley J M, Bibikova M, Sheen J, Wang K. 2004. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *PNAS USA*, 101 (9): 3298 – 3303.
- Sinha A K, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N. 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav*, 6 (2): 196 – 203.
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl J L, Hirt H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 15: 141 – 152.
- Tena G, Asai T, Chiu W L, Sheen J. 2001. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (5): 392 – 400.
- Wang Xiao-xuan, Li Shu-de, Dong Hui-rong, Gao Zhen-hua, Dai Shan-shu. 1996. Effect of low temperature stress on several properties of tomato during seedling and florescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 23 (4): 349 – 354. (in Chinese)
- 王孝宣, 李树德, 东惠茹, 高振华, 戴善书. 1996. 低温胁迫对番茄苗期和花期若干性状的影响. *园艺学报*, 23 (4): 349 – 354.
- Wen J Q, Oono K, Imai R. 2002. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiol*, 129 (4): 1880 – 1891.
- Xing T, Malik K, Martin T, Miki B L. 2001. Activation of tomato PR and wound-related genes by a mutagenized, MAP kinase kinase through divergent pathways. *Plant Mol Biol*, 46 (1): 109 – 120.
- Xue Ying-long. 1985. *Plant physiology laboratory manual*. Shanghai Scientific and Technical Publishers. (in Chinese)
- 薛应龙. 1985. *植物生理实验手册*, 上海科技出版社.
- Yang Hong-zuo, Chen Shao-qiong. 1990. Tissue culture propagation and cultivation technology of *Sinningia speciosa*. *Journal of Guangdong Landscape Architecture*, (1): 31 – 32. (in Chinese)
- 杨鸿祚, 陈少琼. 1990. 大岩桐组培繁殖与栽培技术. *广东园林*, (1): 31 – 32.
- Yu S, Tang K X. 2004. MAP kinase cascades responding to environmental stress in plants. *Acta Bot Sinica*, 46 (2): 127 – 136.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R. 2010. Overexpression of a common wheat gene *TaSnRK2.8* enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 5 (12): e16041.
- Zhang M Z, Ye D, Wang L L, Pang J L, Zhang Y H, Zheng K, Bian H W, Han N, Pan J W, Wang J H, Zhu M Y. 2008. Overexpression of the cucumber *LEAFY* homolog *CFL* and hormone treatments alter flower development in gloxinia (*Sinningia speciosa*). *Plant Mol Biol*, 67: 419 – 427.