

- 42 Wang H X, Ng T B. Isolation of lilin, a novel arginine-and glutamate-rich protein with potent antifungal and mitogenic activities from lily bulbs. *Life Science*, 2002, 70 (9): 1075~1084
- 43 曾仲奎, 杨育红, 鲍锦库, 周红, 罗亮, 邓俊林. 百合巯基蛋白酶抑制剂的纯化及部分性质研究. *生物化学杂志*, 1996, 12 (2): 182~186
- Zeng Z K, Yang Y H, Bao J K, Zhou H, Luo L, Deng J L. Purification and characterization of a lily cysteine proteinase inhibitor. *Chinese Biochemical Journal*, 1996, 12 (2): 182~186 (in Chinese)
- 44 李灿辉, 王军, 龙维彪. 马铃薯块茎特异蛋白 Patatin研究进展. *马铃薯杂志*, 1998, 3 (12): 179~187
- Li C J, Wang J, Long W B. The advances of the major storage protein of potato tubers, patatin. *Journal of Potato*, 1998, 3 (12): 179~187 (in Chinese)
- 45 马崇坚, 柳俊, 谢从华. 抑制脂氧合酶对马铃薯试管块茎形成及膨大的影响. *园艺学报*, 2003, 30 (3): 291~295
- Ma C J, Liu J, Xie C H. The effects of inhibiting lipoxygenase on microtuber formation and growth of *Solanum tuberosum* L. in vitro. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30 (3): 291~295 (in Chinese)

## 农杆菌介导的 CB F1基因对松南结缕草的遗传转化

王渭霞<sup>1</sup> 朱廷恒<sup>2</sup> 胡张华<sup>3</sup> 陈锦清<sup>3</sup> 玄松南<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>中国水稻研究所, 杭州 310006; <sup>2</sup>浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014; <sup>3</sup>浙江省农业科学院, 杭州 310021)

### **Agrobacterium mediated CB F1 Gene Transformation of Songnan Zoysia Grass**

Wang Weixia<sup>1</sup>, Zhu Tingheng<sup>2</sup>, Hu Zhanghua<sup>3</sup>, Chen Jinqing<sup>3</sup>, and Xuan Songnan<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; <sup>2</sup>Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; <sup>3</sup>Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

关键词: 农杆菌; 结缕草转化; *CBF1*基因

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 05-0953-01

*CBF1* (C-repeat/dehydration-responsive element binding factors 1) 基因为来源于拟南芥的一类与干旱、高盐及低温耐性有关的转录因子基因。松南结缕草 (*Zoysia* sp.) 是本实验室育成的形态特征介于日本结缕草与沟叶结缕草之间的一种中型结缕草, 在长江以南地区广泛种植。作者将 *CBF1*基因转入松南结缕草, 以改良其抗逆性。

取松南结缕草成熟种子经消毒和打破休眠后接种于含  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 的 NB (N6大量、MS微量、B5维生素) 培养基上诱导愈伤组织, 经 NBAA (NB培养基附加 AA 培养基的氨基酸) 培养基继代, 选择胚性愈伤组织为受体, 用含有 *CBF1*基因表达载体 pMENCBF1的农杆菌 LBA4404侵染, 筛选标记基因为 *NPTII* 在筛选培养基 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  巴龙霉素) 上经两轮筛选, 获得的转基因植株利用 *NPTII*基因的特异引物进行 PCR 检测, 阳性植株通过离体叶片法对巴龙霉素抗性进行检测 ( $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  巴龙霉素和  $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  Tween20)。

结果表明, 松南结缕草种子经横切后接种才能发芽并高频率诱导愈伤组织。初生愈伤组织大部分表现为松软棉絮状 (图版, 1), 在 NBAA 继代培养基上会逐渐长出颗粒状、比较松散、颜色鲜艳的胚性愈伤组织。农杆菌侵染的适宜浓度为  $\text{OD}_{600} = 0.8$ , 共培养介质 AAD (AA培养基附加  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D) 优于 YEP培养基。共培养时增加蔗糖和葡萄糖浓度能够提高转化效率, 使转化效率达到 18.0%。抗性愈伤在分化培养基上分化率达 65.0% (图版, 2、3)。200株再生植株经 PCR验证后 187株表现为阳性。阳性植株移栽成活后, 离体叶片抗巴龙霉素检测 (图版, 4) 表明 187株均表现出抗性。



图版说明: 1. 非胚性愈伤; 2. 抗性愈伤组织; 3. 抗性愈伤组织再生出小苗; 4. 转基因植株叶片巴龙霉素离体抗性的检测。

**Explanation of plates:** 1. Non-embryogenic callus; 2. Second select for resistant calli; 3. Regenerated resistant shoots on Fms medium; 4. Paromomycin resistance analysis of transgenic plant leaf in vitro.

收稿日期: 2005-04-01; 修回日期: 2005-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270942) \* 通讯作者 Author for correspondence