

文章编号: 1673-5021(2006)04-0059-06

农杆菌介导的匍匐翦股颖胚性愈伤组织的转化和转 CBF1 基因植株的获得

王渭霞¹, 朱廷恒², 玄松南^{1,*}

(1. 中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310014)

摘要:以匍匐翦股颖成熟胚诱导的胚性愈伤组织为受体, 利用农杆菌介导的遗传转化方法就不同的菌液浓度、共培养条件和真空处理等对愈伤组织的转化效率进行研究。结果表明, 适宜的农杆菌侵染浓度光密度 OD_{600nm} 为 0.8~1.2, 真空处理加全光照的共培养条件有助于提高转化效率; CBF1 基因是来源于拟南芥的与抗逆相关的转录因子基因, 在匍匐翦股颖中实现了其转化, 通过 PCR 检测, 50 株转基因植株中 32 株扩增出 640bp 的目标片段, 部分转基因植株生长缓慢, 表现出矮化性状。非胁迫条件下, 转基因植株游离脯氨酸含量为对照的 5 倍。断水处理 5d 后, 转基因植株生长基本正常, 脯氨酸含量增加约 2 倍, 比对照植株高 2~3 倍。

关键词: 匍匐翦股颖; CBF1 基因; 组织培养; 遗传转化

中图分类号: S688.4; Q943.2 **文献标识码:** A

匍匐翦股颖 (*Agrostis palustris* Huds) 为禾本科翦股颖属多年生草本植物, 被广泛用于庭院、公园等地的观赏性草坪。匍匐翦股颖匍匐枝上的节虽能生根, 但扎根较浅, 耐旱能力较差。且对高温炎热的夏季适应性差, 易发生叶尖变黄, 从而影响美观、限制了匍匐翦股颖的扩大应用^[1,2]。利用转基因技术, 将目的基因导入胚性愈伤组织获得抗逆性提高的转基因植株是目前改良草坪草包括匍匐翦股颖的重要手段。早期的工作主要是利用基因枪法、电穿孔法等将一些标记基因或报告基因 GUS 等转入匍匐翦股颖中, 后来 chai^[3] 等利用农杆菌介导法实现了标记基因 GFP 向匍匐翦股颖的转化以及 2005 年胡繁荣也利用农杆菌介导法将经过改良的抗虫 Bt 基因 cry1Ab 导入匍匐翦股颖, 获得 9 株再生植株^[4]。这些工作使外源 DNA 整合到匍匐翦股颖基因组中的技术趋于完善。

CBF1 基因是一类与抗逆相关的转录因子基因, 其编码产物能与 CRT/ DRE (普遍存在于冷诱导和脱水诱导基因的启动子中) 特异结合, 从而启动抗逆相关的下游基因的表达^[5,6]。本研究通过农杆菌介导的基因转化方法将来源于拟南芥的 CBF1 基因导入匍匐翦股颖的胚性愈伤组织, 获得了抗旱性提高的转基因植株。

1 材料和 法

1.1 材料

匍匐翦股颖 (*Agrostis palustris* Huds) 的种子

由本实验室 2004 年收集。所用农杆菌菌株为 LBA4404, 含有表达载体 pMENCBF1, 载体见图 1。

1.2 方法

1.2.1 成熟胚愈伤组织的诱导和继代

种子用 70% 酒精浸泡 1.5min, 0.1% 升汞灭菌 10min, 无菌水清洗 5 次, 接种到诱导培养基 MS₂ (表 1), 28℃ 暗培养, 30d 左右将诱导出的愈伤组织转继到 NB₂ 培养基上。经 20d 左右的继代, 挑取颜色鲜黄、质地坚硬、较为松散颗粒状的胚性愈伤组织继代 7d 后准备与农杆菌感染。

1.2.2 农杆菌的活化和感染菌液的准备

-70℃ 保存的菌株在 YEP (含卡那霉素 100 mg/L、利福平 25 mg/L、链霉素 50 mg/L) 培养基上划线, 28℃ 暗培养 2d 后, 挑取单克隆在 YEP (含相同抗生素) 液体培养基上 28℃、200r/min 过夜摇菌培养。吸取菌液 500μl 加入到新鲜的含 20 mg/L 乙酰丁香酮 (acetosyringone As) 的 30ml YEP 液体培养基中过夜培养。次日用 AAD₁₁ (表 1) 培养基重新悬浮清洗农杆菌一次后, 用适当体积的 AAD₁₁ 培养基调节农杆菌浓度用于感染愈伤组织。

* 通讯作者

收稿日期: 2005-11-04; 修回日期: 2006-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目“应用抗冻基因延长草坪草绿色期的研究”(30279042)

作者简介: 王渭霞 (1974-), 女, 甘肃渭源人, 助理研究员, 硕士。

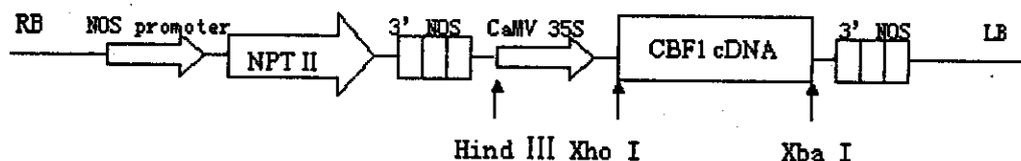


图1 表达载体 pMENCBF1

Figure 1 Map for plasmid pMENCBF1

表1 匍匐剪股颖组织培养和遗传转化所用培养基及成分

Table 1 Media and compositions used for tissue culture and genetic transformation of Zoysia grass

| 培养基 Medium | 培养基成分 Composition |
|-------------------|---|
| MS ₂ | MS大量、MS微量、B5 维生素,肌醇 100mg/L,脯氨酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物各 500mg/L,蔗糖 30g/L,植物凝胶 3.0mg/L, 2,4-D 2mg/L, pH 5.8 |
| NB ₂ | N6 大量、微量、B5 维生素,肌醇 100 mg/L,脯氨酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物各 500mg/L,蔗糖 30g/L, 5g/L 麦芽糖, pH 5.8 |
| AAD ₁₁ | AAD1 培养基附加蔗糖 68.5g/L,葡萄糖 36g/L |
| T ₁₁ | NB ₂ 培养基附加葡萄糖 15g/L, As 20mg/L, pH 5.2 |
| T ₂ | NBAA 培养基附加羧苄青霉素 250 mg/L,头孢霉素 250 mg/L,琼脂粉 8.0g/L, pH 5.8 |
| T ₃ | NBAA 培养基附加头孢霉素 250 mg/L,巴龙霉素 100mg/L,琼脂粉 8.0g/L, pH 5.8 |
| F _{ms} | MS 大量、MS 铁盐、B5 微量, 2,4-D 0.1 mg/L, 6-BA 2mg/L, 肌醇 100 mg/L, 蔗糖 30g/L, 巴龙霉素 50mg/L, 琼脂粉 8.0g/L, pH 5.8 |

1.2.3 胚性愈伤组织的转化

收集胚性愈伤组织与已准备好的农杆菌菌液共培养,对照为在 28℃,缓慢摇动的条件下共培养 30min;处理 1 为 28℃,真空处理 10min 后,缓慢摇动 20min;处理 2 为 28℃,真空处理 20min,缓慢摇动 10min。而后吸掉菌液,用无菌滤纸吸取多余的菌液,将愈伤组织平铺到铺有一层滤纸的固体共培养基 T₁₁(表 1)上,黑暗或全光照、28℃ 共培养 48h。用含有羧苄 500 mg/L、头孢 500 mg/L 的无菌水清洗 2~3 次,直至上清无色后用滤纸吸干,转入延迟培养基 T₂(表 1)上。

1.2.4 抗性愈伤组织的筛选及转基因植株再生

在 T₂ 培养基上黑暗培养 7d 后转到筛选培养基 T₃(表 1)上。经两轮共 40d 的筛选,挑取正常生长的抗性愈伤组织转至分化培养基 F_{ms}(表 1),培养条件为 28℃、16h 光照/8h 黑暗,光照强度 3000~4000lux。再生苗 3~5cm 左右时,在含有 50mg/L 巴龙霉素的 1/2MS 培养基上生根培养。

1.2.5 再生植株的炼苗和移栽

待苗长至 7~10cm 时准备移栽,打开盖子炼苗 7d 后,彻底洗去根部固体培养基,修剪植株高度为 5cm 左右并剪掉发黄的叶片,移栽到装有珍珠岩、泥碳土、桉石按 1:1:1 的比例拌匀(用前要高温灭菌)的小塑料盆中,并用塑料膜包裹保湿。用 1/2MS

营养液浇灌,待 1 周后逐渐去掉塑料膜。

1.2.6 转基因植株的 PCR 分析和抗旱性检测

1.2.6.1 匍匐剪股颖植株叶片少量 DNA 的简易提取方法

剪取移栽成活的转基因植株和组培植株的叶片 5cm 左右,放入 DNA 提取缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、25mmol/L EDTA (pH 8.0)、700mmol/L NaCl、SDS 10g/L、1% PVP、0.2% 巯基乙醇]中研磨成匀浆后,转入 1.5ml 的离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)。振荡约 10min 左右,5000r/min 离心 10min,将上清液转入另一个 1.5ml 的离心管中,加入 1.0μl Rnase(1.0μg/L),静置 5min 后,加入 2/3 体积的异丙醇,混合后静置 5min,5000r/min 离心 10min 去掉上清液。沉淀用 75% 的乙醇冲洗一次后,离心数秒,倒掉乙醇,干燥 DNA。将 DNA 溶于 100μl 去离子水中,备用。

1.2.6.2 转基因植株的 PCR 检测

检测 CBF1 基因所用的 PCR 扩增引物为引物 1:5'gtac tctg atca atga actc 3',引物 2:5'gaaa cgac tate gaat atta 3',两引物间 DNA 片段长度为 640bp。取上述 DNA 样品 5μl,反应总体积 25μl(50 mmol/L dNTP,引物 1 和引物 2 各 1 mmol/L,Pro-mega Taq DNA 合成酶 1U 和 PCR 反应缓冲液)。反应条件为 95℃ 变性 5 min 后,35 个循环的 95℃ 45 s,56℃ 50 s,72℃ 50 s,最后 72℃ 延伸 2min。扩

增 DNA 片断在 1.0% 的琼脂糖胶上电泳, 1 mg/L EB 染色。

1.2.6.3 转基因植株抗旱性检测

剪取移栽成活的转基因植株和组培植株的匍匐茎埋入花盆中, 待其成活后给予断水处理 7d, 而后观察其生长情况。按照李合生等^[7]提供的方法进行脯氨酸含量的测定。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率

匍匐剪股颖的种子在 MS₂ 培养基上 7d 开始萌动, 14d 左右芽长达 2cm 时基部开始出现白色和淡黄色的愈伤组织, 30d 时愈伤组织大小达 2mm 左右, 诱导率可达 95% 以上。经 NB₂ 培养基的继代, 56.8% 左右的愈伤组织表现为白色或分化出芽, 43.2% 的表现出颜色淡黄、质地坚硬、颗粒状堆积的胚性愈伤组织(图 2——图版 1)。

2.2 胚性愈伤组织对巴龙霉素的敏感性

将愈伤组织接种到含有不同浓度(25mg/L、50mg/L、100mg/L、150mg/L)巴龙霉素的 NB₂ 培养基上, 28℃ 暗培养 30d 后观察愈伤组织的生长情况。结果表明, 在巴龙霉素为 50mg/L 时愈伤组织在 30d 内颜色无变化并有新的愈伤长出; 当浓度达 150 mg/L 时愈伤组织在 15d 时表现出发灰、失去光泽, 30 d 不见任何新的愈伤组织生长并逐渐发褐死亡, 表明巴龙霉素在 100 mg/L 便能完全抑制结缕草愈伤组织的生长。

2.3 菌液浓度对转化效率的影响

过夜培养的农杆菌菌液不经 AAD₁₁ 培养基清洗直接用于感染愈伤组织, 结果发现愈伤组织褐化严重, 转化效率很低。将农杆菌用 AAD₁₁ 培养基清洗后共培养, 愈伤组织未发现明显的褐化。用 AAD₁₁ 培养基调节农杆菌至不同光密度 OD_{600nm} 值 (OD₆₀₀ = 0.3, 0.5, 0.8, 1.2, 1.6), 然后与胚性愈伤

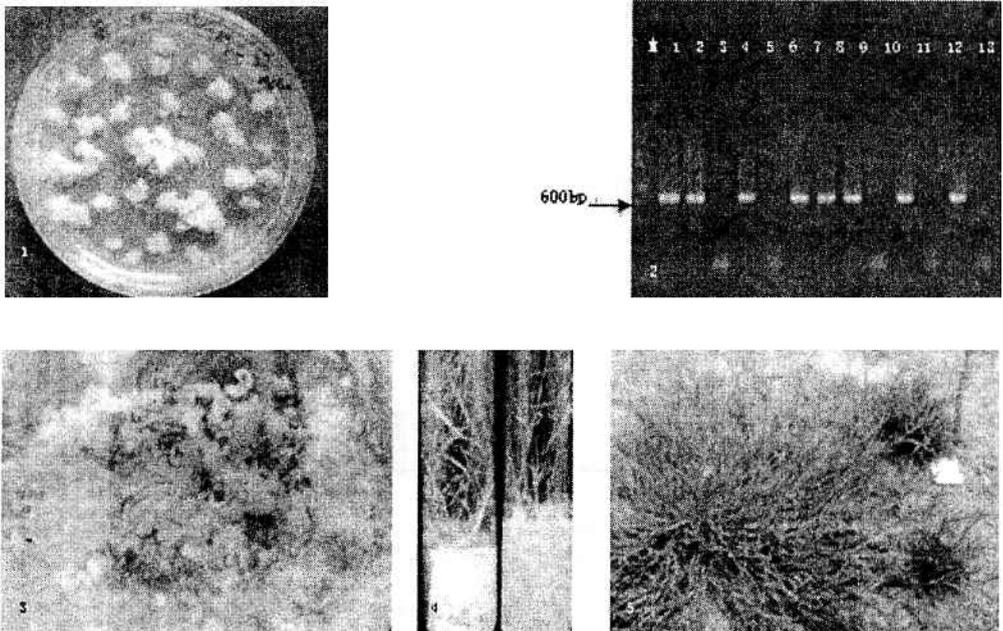


图 2—图版说明:

1. 第一次继代后的剪股颖愈伤组织, 其中黄色的为胚性愈伤组织; 2. 部分转化植株的 CBF1 基因的 PCR 检测 (M: marker, 1~11 为转化植株, 12 为含目的基因的农杆菌, 13 为对照植株); 3. 抗性愈伤组织在分化培养基上再生出小苗; 4. 转基因植株和对照植株在添加 50mg/L 巴龙霉素的生根培养基上; 5. 田间部分转基因植株表现出矮化。

Explanation of plates: 1. Callus from seeds of creeping bentgrass; 2. PCR analysis of transformed plants with primer pairs of CBF1 gene. (M: marker, 1~11: transformed plants, 12: agrobacterium with CBF1 plasmid, 13: non-transformed plants); 3. Resistant calli become green and regenerated resistant shoots on regeneration medium; 4. Transformed shoots and non-transformed shoots on rooting medium with 50mg/L paromomycin; 5. Some transformed creeping bentgrass have dwarf performance.

组织共培养。结果显示当农杆菌浓度高于 OD_{600} 为 1.2 时,经 2d 固体培养基的共培养会有大量农杆菌长出,经含羧苄和头孢霉素各 500 mg/L 的无菌水冲洗数次,吹干,在延迟培养基上农杆菌依然污染严重。当农杆菌浓度低于 OD_{600} 为 0.5 时,转化效率偏低,仅有 2.5%。农杆菌浓度为 OD_{600} 为 0.8~1.2 时,用经含羧苄和头孢霉素各 500 mg/L 的无菌水冲洗数次,吹干,在延迟培养基上便能完全抑制农杆菌的生长,同时转化效率达 8.3% 左右,转化效率基本维持在一个相对稳定的值,不随菌液浓度的增加而增加。当菌液浓度高于 1.6 时,转化效率反而下降。同时,在随后的选择培养中农杆菌过分生长,难以抑制。

2.4 不同共培养条件对转化效率的影响

液体共培养时利用真空机真空处理可以提高转化效率。没有真空处理的对照液体共培养 30min 转化效率为 5.4%,而真空处理 10min 或 20min 后分别继续液体培养 20min 或 10min 的转化效率为 7.3% 和 7.8%。另外,真空 10min 和液体共培养摇动 20min 处理后,在固体共培养阶段黑暗条件共培养 48h,转化效率为 5.6%;在光照条件下则转化效

率为 7.3%。因此,光照处理有助于农杆菌的侵入,从而提高转化效率。

2.5 转基因植株的 PCR 检测和抗性分析

50 株抗巴龙霉素的植株利用 CBF1 基因的引物进行 PCR 分析,32 株扩增出 640bp 的目的基因片断,而对照没有扩增出这一条带,说明目的基因确实转入匍匐翦股颖基因组中(图 2——图版 2)。部分转基因植株在田间表现出明显的生长缓慢,植株矮化,叶片颜色或浅或深(图 2——图版 5)。剪取转基因植株的匍匐茎移栽成活后,断水处理 5d 后对照植株叶片颜色失绿变暗,并逐渐死亡,而大部分转基因植株生长基本未受影响。但其中 2 株明显矮化的植株对缺水更加敏感,3d 时就表现出明显的受害症状。

在正常生长条件下,部分转基因植株如 B31、B27 叶片内游离脯氨酸含量是对照植株的 5 倍左右,经过 5d 的断水处理转基因植株 B31、B27 叶片内脯氨酸含量大幅度增加,是相同处理对照植株的 2~3 倍左右。B1 为明显生长受抑制的转基因植株,其游离脯氨酸含量与对照相比无明显差异,处理后脯氨酸含量甚至比对照更低,见图 3。

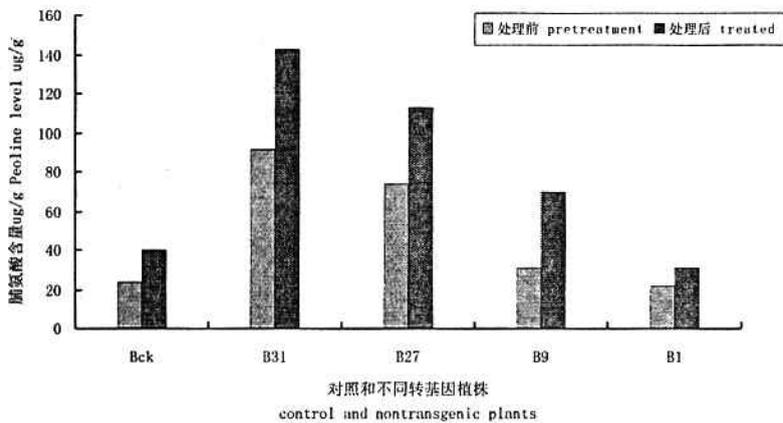


图 3 断水处理 5d 前后对照和转基因植株脯氨酸含量的变化

Fig. 3 The change of Pro levels in the transformed plants and control plants after 5d water deficit

3 讨论

匍匐翦股颖成熟种子在诱导培养基上一般是先发芽随后在基部长出白色的或淡黄色的质地松软的愈伤组织,继代,选取鲜黄色的、质地比较坚硬的、表面干燥的愈伤组织进行转化,此时的愈伤组织为胚性愈伤组织,处于最佳的接受外源 DNA 的状态。实验发现以植物凝胶(phytagel)作为固化剂的培养

基在胚性愈伤组织诱导效率上要优于一般的琼脂粉,这主要与植物凝胶纯度高、所含有害的杂质少有关系,这一结果与在高羊茅、假俭草和黑麦草中的实验结果一致^[8~10]。在与农杆菌共培养阶段,通过不同时间的真空处理发现,真空处理 10~20min 可以明显提高转化效率,这与胡繁荣和柴明良在结缕草中的研究结果一样^[11,12]。真空处理有助于排除组织表面的气泡,使农杆菌易于附着于组织表面,从而

提高了转化效率。Zambre M^[13] 报道光照可以促进农杆菌质粒基因向植物细胞的转化,本实验在此基础上在共培养阶段采用黑暗和光照两种处理,结果发现光照可以提高转化效率。实验所选用的筛选标记基因为 NPT II (新霉素磷酸转移酶)基因,该基因表达的产物可提供对卡那霉素(kanamycin)、巴龙霉素(paromomycin)、G418(geneticin)的抗性。由于禾本科植物本身对卡那霉素具有较高的天然抗性,因此一般选择 G418 或巴龙霉素。本实验选择巴龙霉素作为筛选标记,在抗性愈伤筛选阶段 150mg/L 可以完全抑制匍匐翦股颖愈伤组织的生长,在颜色上表现为发灰失去光泽。在生根阶段 50mg/L 的巴龙霉素可以有效的选择转化植株,对照在此培养基上不能正常生根并在 10d 后叶片失绿,植株死亡。G418 和巴龙霉素易于在以植物凝胶做固化剂的培养基中形成沉淀而失去选择效用,因此在选择培养基中要改用琼脂粉。

获得的 98 株转基因植株经目的基因的 PCR 检测表现为阳性的,与对照相比在田间有不同程度的生长缓慢、植株矮小的表现,其中有 2 株生长严重减缓或受阻。不管是否进行缺水诱导,大部分转基因植株的脯氨酸含量均要比对照高。说明在转基因匍匐翦股颖中,CBF1 基因的表达促进了匍匐翦股颖体内脯氨酸的大量合成,这在过量表达 CBF3 基因的拟南芥植株中也有类似的报道^[14]。通过缺水处理,大部分转基因植株脯氨酸含量增幅明显,抗旱性优于对照。而明显生长受阻的 2 株表现出对缺水的更为敏感,脯氨酸含量与对照相近,这可能与插入拷贝数和插入位置有关,从而影响了整个植株生长代谢的结果。本实验正在进行转基因植株抗逆性的更进一步验证和分析。

参考文献(References):

- [1] 郭伟经,陈平,刘艾. 南亚热带匍匐翦股颖草坪建植与管理技术[J]. 农业与技术, 2004, 24(2): 111-114.
Guo Weijing, Chen Ping, Liu Ai. Turf establishment and maintenance of creeping bentgrass in south subtropical China[J]. *Agriculture & Technology*, 2004, 24(2): 111-114.
- [2] 吕世海. 北方干冷气候区匍匐翦股颖草坪的栽培与管理[J]. 中国草地, 1996, (5): 21-23.
Lv Shihai. Establishment and management of creeping bentgrass lawn in arid and cold region of northern China[J]. *Grassland of China*, 1996, (5): 21-23.
- [3] Ming Liang Chai, Kalaiselvi Senthil, Suk Yoen Mo, Young Soo Chung. Embryogenic callus induction and agrobacterium-mediated transformation in bentgrass (*Agrostis* spp) [J]. *J Kor Soc Hort Sci.*, 2000, 41(5): 450-454.
- [4] 胡繁荣. 农杆菌介导获得转基因抗虫匍匐翦股颖植株[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 262-263.
Hu Fanrong. Obtaining insect resistant transgenic plants of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(2): 262-263.
- [5] Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nat Biotech*, 1999, 17: 287-291.
- [6] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035-1104.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术: 实验 53 脯氨酸的测定 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 258-260.
Li Hesheng. A principles and techniques of plant physiological biochemical experiment; Experiment 53 proline analysis [M]. Beijing: High Education Press, 2001. 258-260.
- [8] 余桂红, 马鸿翔, 余建明, 杨飞武, 陆维忠. 草坪型高羊茅成熟种子胚性愈伤组织诱导及植株再生[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(1): 38-43.
Yu Guihong, Ma Hongxiang, She Jiangming, Yang Feiwu, LU Weizhong. Callus induction and plantlet regeneration from mature seeds of turf type tall fescue [J]. *Jiangsu J of Agr Sci*, 2004, 20(1): 38-43.
- [9] 马生健, 曾富华, 蓝海婷, 吴志华, 卢向阳. 假俭草的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 62.
Ma Shengjian, Zeng Fuhua, Lan Haiting, Wu Zhiwu, Lu Xiangyang. Tissue culture and plantlet regeneration of common centipedegrass [J]. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40(1): 62.
- [10] 张振霞, 储成才, 席嘉宾, 陈平. 多年生黑麦草种子愈伤组织诱导和植株再生[J]. 草地学报, 2004, 12(4): 289-293.
Zhang Zhenxia, Chu Chengcai, Xi Jiabin, Chen Ping. Embryogenic callus production and plant regeneration of *Lolium perenne* seed explants for genetic manipulation [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2004, 12(4): 289-293.
- [11] 胡繁荣, 夏英武. 结缕草农杆菌介导遗传转化影响因素的研究[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1): 24-27.
Hu Fanrong, Xia Yingwu. Effects of factors on agrobacterium-mediated transformation of Japanese lawngress (*Zoysia japonica* Steud) [J]. *Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica*, 2004, 13(1): 24-27.
- [12] Ming Liang Chai, Doo Hwan Kim. Agrobacterium-mediated transformation of Korean Lawngress (*Zoysia japonica*) [J]. *J Kor Soc Hort Sci*, 2000, 41(5): 455-458.
- [13] Zambre M, Terryn N, Clereq J D. Light strongly promoters

gene transfer from agrobacterium tumefaciens to plant cells [J]. *Planta*, 2003, 216: 580-586.

[14] Gilmour S J, A M Sebolt, P Salazar, J D Everard, M F Thomashow. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcrip-

tional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1854-1865.

Agrobacterium-mediated Transformation of Embryogenic Callus of Creeping Grass and Obtaining CBF1 Transgenic Plants

WANG Wei-xia¹, ZHU Ting-heng², XUAN Song-nan¹

(1. China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;

2. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The assistant method of agrobacterium-mediated transformable efficiency which includes different bacterium concentration, co-culture and vacuum, was explored with the embryogenic callus induced from seeds of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds). The results showed that the OD_{600nm} of bacterium concentration 0.8~1.2 was fit for the transformation, vacuum treatment and whole light-shine to co-culture benefited the transformable frequency. The CBF1 gene was a transcriptional activator induced by stress especially low temperature. 50 transgenic CBF1 creeping bentgrass were obtained and PCR analysis revealed the presence of CBF1 fragment of the expected size (620bp) in the 32 transformed plants. some transformed plants had a "dwarf" phenotype. Under no stress growth conditions, the free Pro levels in the CBF1-expressing plants were approximately 5-fold higher than they were in the control plants, The Pro levels in the CBF1-expressing plants increased further (approximately 2-fold) upon 5d water deficit and were 2- to 3-fold higher than those found in the control plants.

Key words: Creeping bentgrass; CBF1 gene; Tissue culture; Genetic transformation

【责任编辑 胡卉芳】