

王沛文,朱文哲,刘 阳,等. 多毛番茄冷诱导转录因子 CBF1 转化番茄的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):30-35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.010

多毛番茄冷诱导转录因子 CBF1 转化番茄的研究

王沛文^{1,2},朱文哲²,刘 阳³,李景富²,陈宏宇³,陈秀玲^{1,2},王傲雪^{2,3}

(1. 黑龙江省高校寒地蔬菜生物学重点实验室,黑龙江哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 150030;3. 东北农业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:番茄在气温低于 12 ℃ 时即不能正常开花结实,因此番茄生产受到了很大限制。多毛番茄是一种野生番茄,具有耐低温甚至抗冻的特性,短暂遭受 0 ℃ 的低温,仍能正常开花结实。构建了多毛番茄冷诱导转录因子 CBF1 的植物表达载体,并通过农杆菌介导法转入番茄中,获得 8 株转基因阳性植株。转基因植株经冷诱导处理后,丙二醛(MDA)含量和超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)含量均低于非转基因对照,而超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、脯氨酸(Pro)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、抗坏血酸过氧化物酶(ASA)活性和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性则高于非转基因对照,表明转多毛番茄 CBF1 基因(*ShCBF1*)可以提高番茄的抗冷性。

关键词:多毛番茄;CBF1 转录因子;耐冷性;番茄;遗传转化

中图分类号:S641.201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)04-0030-06

番茄是一种重要的蔬菜作物,在世界各地均有栽培,但在生产过程中,经常遭受低温冷害,因而降低了经济效益,影响番茄生产。而多毛番茄是一种野生番茄,属番茄属^[1],相关研究表明,它具有耐低温甚至抗冻的特性^[2]。多毛番茄叶片

表面有厚密的绒毛,而普通番茄不具备此特点,推测多毛番茄表面的绒毛可能在一定程度上提高了其耐冷能力^[3]。然而多毛番茄只有作父本和栽培番茄杂交才能坐果,而且果实结籽率低,转育杂交困难^[4],限制了其作为育种材料的应用。多毛番茄的高耐冷性不仅与膜脂相变程度小、膜结构的调整能快速适应低温、代谢调整等一些生理生化变化有关^[5],同时也受 CBF1 基因的诱导^[6]。

CBF(CRT/DRE binding factor)基因是一种抗冷(冻)转录因子,CBF 基因首先在拟南芥中被克隆出来^[7]。该基因通过调动一系列的冷害相关(COR)基因完成植株的抗冷机制^[8]。对多毛番茄而言,它的 CBF1 基因与普通番茄的 CBF1 基因同源性很高,但是普通番茄为冷敏植物,不具备耐冷性,多毛番茄耐冷性却很强。推其原因,可能是多毛番茄 CBF1

收稿日期:2014-05-23

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31301780);教育部科学技术研究重点项目(编号:211043);黑龙江省博士后基金(编号:LBH-Z12044);黑龙江省高校寒地蔬菜生物学重点实验室开放课题基金(编号:CVB2012-005)。

作者简介:王沛文(1990—),男,内蒙古人,硕士,从事蔬菜分子生物学方面的研究。E-mail:1009934259@qq.com。

通信作者:王傲雪,博士,教授,从事植物分子生物学方面研究。E-mail:wangaoxue@yahoo.com。

参考文献:

- [1] Pu J J, Zhang X, Qi Y X, et al. First record of *Corynespora* leaf fall disease of hevea rubber tree in China[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2007, 2(1): 35-36.
- [2] 张 欣, 蒲金基, 谢艺贤, 等. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病发生情况调查[J]. 植物检疫, 2007, 21(6): 372-373.
- [3] 张 贺, 蒲金基, 张 欣, 等. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病原菌的生物学特性[J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 83-87.
- [4] Qi Y X, Pu J J, Zhang H Q, et al. Detection of *Corynespora cassicola* in hevea rubber tree from China[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2007, 2(1): 153-155.
- [5] Qi Y X, Zhang X, Pu J J, et al. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassicola* from different hosts[J]. Eur J Plant Pathol, 2011, 130(1): 83-95.
- [6] 张 贺, 张 欣, 蒲金基, 等. 巴西橡胶树品系对棒孢霉落叶病的抗病性鉴定[J]. 植物保护, 2008, 34(4): 54-56.
- [7] 陈 照, 蒲金基, 张 欣, 等. 杀菌剂对巴西橡胶棒孢霉落叶病菌的室内毒力测定[J]. 现代农药, 2007, 6(2): 41-43.

- [8] 刘晓妹. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病菌 MAPK 基因(*CCK1*)和毒素基因(α)克隆与功能鉴定[D]. 海口:海南大学, 2012.
- [9] 漆艳香. 中国巴西橡胶树棒孢霉落叶病病原学研究[D]. 南宁:广西大学, 2010.
- [10] 王延丽, 林春花, 时 涛, 等. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病菌 Hg1 同源基因的克隆和序列分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(3): 424-428.
- [11] Barthe P, Pujade - Renaud V, Breton F, et al. Structural analysis of cassicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassicola*[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 367(1): 89-101.
- [12] 刘晓妹, 蒲金基, 张 欣, 等. 多主棒孢菌调控致病性相关基因 *CCK1* 的克隆及生物信息学分析[J]. 生物技术通报, 2012, (10): 168-172.
- [13] 杜玉梅, 左正宏. 基因功能研究方法的新进展[J]. 生命科学, 2008, 20(4): 589-592.
- [14] Yu J H, Hamari Z, Han K H. A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41: 973-981.
- [15] 许 杨, 涂 追. 丝状真菌基因敲除技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 120-126.

基因下游的耐冷相关基因的分布和普通番茄不同,导致多毛番茄 *CBF1* 基因对下游基因的调控作用强于普通番茄。

在拟南芥中过量表达 *CBF1* 基因,植株的抗寒能力明显提高,不仅能提高 COR 蛋白的含量,而且大幅提高可溶性糖和脯氨酸含量^[9-11]。Hsieh 等将拟南芥的 *CBF1* 基因转入番茄后,使番茄植株的 CAT 活性增强、脯氨酸含量增加,在干旱条件下比野生番茄植株表现更强的抗旱能力^[12]。本研究从具有强抗冷性的野生番茄中克隆得到的 CBF1 转录因子通过农杆菌介导法转入到番茄中,并探讨了转基因植株的抗冷性及生理生化变化,获得了抗寒力增强的番茄新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 多毛番茄 LA1033 来自番茄遗传资源中心(tomato genetic resource center, TGRC),普通番茄 Micro-Tom 由东北农业大学番茄课题组提供。

1.1.2 菌株和质粒 PMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司(大

连)。植物表达载体 p(h+p)由东北农业大学生物工程实验室馈赠,大肠杆菌 DH5α 和农杆菌 EHA105 由东北农业大学番茄课题组提供。

1.1.3 主要试剂 各种限制性内切酶购于大连 TaKaRa 公司,T₄ 连接酶、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Km)购自 Promega 公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自上海生物工程技术有限公司,其他试剂均国产分析纯试剂。

番茄再生体系利用现有的成熟体系,具体如表 1 所示。

1.2 试验方法

1.2.1 引物及 PCR 反应条件 根据笔者所在实验室已经克隆的多毛番茄 LA1033 的 *CBF1* 基因序列(GenBank 登录号 GU129699)设计特异引物,在引物两端添加适当的酶切位点,便于载体构建。引物设计应用 primer 5.0 软件进行,合成由上海生物工程有限公司完成。ShCBF1up 为 5'-GT GGATC-CACCATGAATATCTTCGAAACC-3'(斜体为 *Bam*H I 酶切位点),ShCBF1down 为 5'-GCGGTACCTTAGATGGAATAATTCC-3'(斜体为 *Kpn*I 酶切位点)。

表 1 番茄 Micro-Tom 的再生体系

培养基	成分
无菌苗培养基 A	O + 15 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂(pH = 5.8)
预培养培养基 B	O + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂 + 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA(pH = 5.8)
共培养培养基 C	O + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂 + 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA(pH = 5.8)
芽诱导培养基 D	O + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂 + 2 mg/L Zeatin* + 500 mg/L Cef + 50 mg/L Km(pH = 5.8)
芽伸长培养基 E	O + 15 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂 + 1.0 mg/L Zeatin + 500 mg/L Cef + 50 mg/L Km + 1.0 mg/L GA(pH = 5.8)
生根培养基 F	O + 15 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂 + 2.0 mg/L IBA + 500 mg/L Cef + 50 mg/L Km + 1.0 mg/L GA(pH = 5.8)

注: * 前 2 周用 2 mg/L Zeatin,以后 Zeatin 的浓度减半;O 为 4.3 g/L MS。

以多毛番茄 LA1033 叶片总 RNA 逆转录得到的 cDNA 第一链为模版,引物 ShCBF1up 和 ShCBF1down 进行 PCR 扩增,PCR 体系为 20 μL:含有 2 μL 10 × *Taq* buffer,1.6 μL Mg²⁺(25 mmol/L),0.4 μL dNTP (10 mmol/L),上下游引物各 1 μL (10 μmol/L),0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL),1 μL 模板 cDNA,12.8 μL ddH₂O。反应条件:95 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,35 次循环;最后 72 ℃,保温 10 min,反应产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 ShCBF1 表达载体的构建 将 PCR 扩增得到的 ShCBF1 经胶回收纯化后与 PMD18-T 载体(TaKaRa 公司)连接,利用热激法转化大肠杆菌,涂板后 37 ℃ 倒置培养过夜,挑取白斑进行 PCR 初筛和质粒酶切鉴定,得到含有 *ShCBF1* 基因的阳性克隆。将鉴定为阳性克隆的转化子(PMD-1033CBF1)送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序,以验证目标基因的准确性。

ShCBF1 植物表达载体基于载体 p(h+p)进行构建,首先合成接头 adapter1(5'-CGTACGTGAGCT-3')和 adapter2(5'-CATGGCATGCAC 3'),adapter1 和 adapter2 在 65 ℃ 下孵育 10 min 后,可形成 1 个两端分别是 *Kpn*I 和 *Sac*I 酶切位点的黏性末端的接头。该接头在 T₄ 连接酶的作用下与其他片段进行连接反应。利用 *Kpn*I 和 *Bam*H I 双酶切 PMD-1033CBF1 质粒,得到 *ShCBF1* 基因。用 *Sac*I 和 *Bam*H I 双酶切质粒 p(h+p),回收 10 kb 左右的载体片段。将目的基因、载体片段及合成好的接头用 T₄ 连接酶进行连接、转化大肠杆

菌 DH5α,将转化细胞涂布于含有 Km 抗性的 LB 培养基平板上进行培养,挑取单菌落进行 PCR 初步检测,并做好标记。然后在 PCR 成功的单菌落处再挑 1 次摇菌,提取质粒 DNA,用 *Sac*I 和 *Bam*H I 双酶切质粒。鉴定重组体中 *ShCBF1* 基因片段插入的正确性,将得到的重组质粒命名为 pCAM-hp1033CBF1。冻融法将质粒 pCAMhp1033CBF1 导入农杆菌菌株 EHA105 中,PCR 检测后待用。

1.2.3 农杆菌介导番茄的遗传转化 无菌苗获得:将番茄品种 Micro-Tom 的种子经挑选后,用 70% 无水乙醇浸泡 30 s,然后用 10% 次氯酸钠(NaClO)消毒 15 min,其间不断摇动,再用无菌水清洗 3~4 次后,接种于 1/2MS 培养基上,每瓶 15~20 粒,置于(26 ± 2) ℃ (16 h 光照,8 h 黑暗)培养,光照度 1 600~1 800 lx。待子叶展开时,在无菌条件下切下子叶放在 B 培养基中预培养 24 h,即可用于农杆菌侵染。

农杆菌的培养:挑取 YEP 平板上的单菌落,接种于 10 mL 含相应抗生素的 YEP 液体培养基中,28 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h,菌液长至 D_{600 nm} = 0.5 左右时,按 1:10 的比例稀释菌液,再摇菌进行二次活化,摇约 8~10 h 至菌液 D_{600 nm} = 0.5 左右时,将菌液转入离心管,然后 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,收集细菌细胞,用 2% MSO 液体培养基悬浮沉淀至 D_{600 nm} = 0.5,该菌液作为转化用菌液,对番茄叶片外植体进行侵染。

侵染和共培养:将外植体放入已用 2% MSO 液体培养基悬浮好的菌液侵染预培养 24 h 的子叶 20 min,其间轻轻摇动,浸染完之后将番茄叶盘背面向上放入共培养培养基 C 中

共培养 48 h。

外植体的筛选:外植体筛选利用卡那霉素,筛选压力为 50 mg/L,设对照为未经农杆菌侵染的子叶外植体放置到 D 培养基中,这些子叶应该被卡那霉素杀死。已侵染的并共培养 48 h 的外植体也转移至 D 培养基中培养 2 周。

外植体的继代:每隔 2 周将 D 培养基中的外植体继代 1 次,在此期间叶原基大概在 2 周内就形成了,将形成叶原基的外植体切成小块转移到 E 培养基中,每隔 2 周或间隔更短时间继代 1 次。经过 2~3 周 E 培养基的继代和筛选。3 种类型的继代外植体被区分出来并分别转入不同的培养基:具有 1 cm 长的形状良好的芽的外植体转移至 E 培养基中;致密的、绿色的外植体(有或没有绿色的原基和小的不定芽)转到含 1 mg/L 玉米素的 D 培养基;黑色或棕色的外植体已被卡那杀死,组织疏松的白色的外植体没有分生能力,这 2 种外植体都应丢弃。

生根培养和驯化移栽:当芽长至 2~4 cm 时切离外植体,转到生根培养基 F 中。植株长到 5 cm 可驯化移栽到土中。将转基因植株从三角瓶中取出,用自来水洗掉植株根部的琼脂,然后移栽到装有湿润土壤的营养钵中。再把营养钵放在浅盘中用自来水充分浸透营养钵中的土壤。将浅盘用透明的塑料膜罩上,以保证较高的湿度。5~7 d 后撤掉塑料膜,施水肥,植株长至 10 cm 定植到温室。

1.2.4 转化植株的 PCR 检测 CTAB 法提取转化获得的番茄幼苗的基因组 DNA,根据 *Npt II* 序列设计引物 *Npt II* up 5' - ACTGGGCACAACAGACAA - 3' 和 *Npt II* down 5' - CCGTA-AAGCACGAGGAA - 3'。以基因组 DNA 模板、*Npt II* 上下游引物进行 PCR 扩增,以未转基因的番茄植株为阴性对照,质粒为阳性对照。

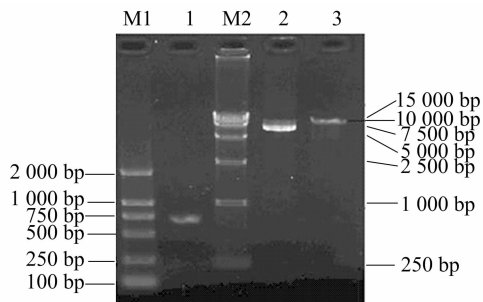
1.2.5 转基因植株的耐低温性检测 低温对植物造成的影响主要是对植物细胞的生理生化特性产生影响,比如细胞的膜脂过氧化作用、细胞抗氧化酶系统以及细胞的脂类物质发生变化等。为了初步检测转基因植株的耐低温性,选取阳性

的转 *ShCBF1* 植株和对照植株的幼苗,置于人工气候室内培养,22~25 ℃、光照 16 h/d,在 6 张真叶时用于低温胁迫处理。将转基因植株株系 TS-1、TS-2 植株和对照植株(CK)在 5 ℃ 条件下处理,分别在处理后 0、24、36、48、96、144 h 取样,测定并分析转基因植株与对照植株间的丙二醛(MDA)含量、超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、脯氨酸(Pro)含量和过氧化氢酶(CAT)活性、抗坏血酸过氧化物酶(ASA)活性和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性等各项指标。测定方法参照朱文哲等的方法(2011),同时比较转基因与为转基因植株的形态特征。

2 结果与分析

2.1 多毛番茄 *CBF1* 基因的 pCAMhp1033 载体构建

用 *Kpn I* 和 *BamH I* 双酶切质粒 PMD-1033CBF1,回收 700 bp 左右的 1033CBF1 基因片段,同时,用 *Sac I* 和 *BamH I* 双酶切质粒 p(h+p),回收 10 kb 左右的载体片段(图 1)。将这 2 个片段与已连接好的 *Kpn I*、*Sac I* 接头一起用 T4 连接酶连接并转化。



M1—2 000 marker;1—1033CBF1; M2—15 000 marker; 2—双酶切的p(h+p)质粒; 3—p(h+p)原质粒

图1 1033CBF1 片段和 p(h+p) 载体片段酶切回收产物

经 PCR 鉴定和酶切鉴定,均得到预期目的片段,证明植物表达载体 pCAMhp1033CBF1 构建成功(图 2)。

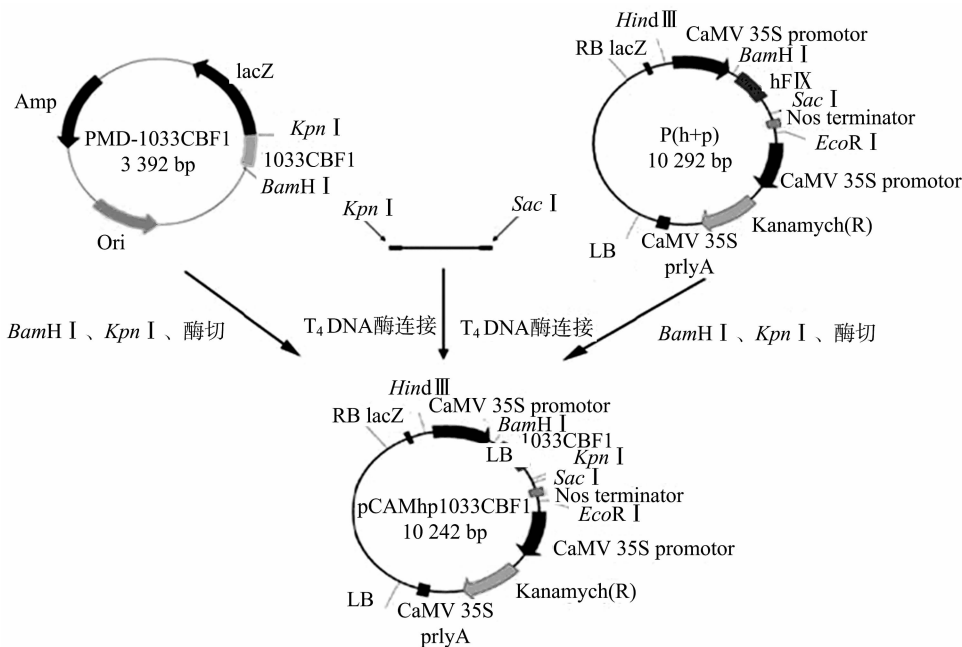


图2 pCAMhp1033CBF1 载体构建示意图

2.2 植物表达载体 pCAMhp1033 转化农杆菌

采用冻融法将已构建好的植物表达载体 pCAMhp1033 导入根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞,涂布在含有 Rif 和 Km 的 YEP 固体平板培养基上,28 ℃ 恒温培养 48 h 后长出菌落,随机挑取菌落进行 *ShCBF1* 基因的 PCR 扩增,电泳结果可以看出,转化的菌落可扩增出约 700 bp 左右特异的目的基因片段(图 3),表明得到了完整的 Ti 质粒表达载体系统。因为直接提取农杆菌质粒进行酶切鉴定比较困难,所以,将提取的 PCR 检测具有目的条带的农杆菌质粒转化入大肠杆菌,再提取大肠杆菌质粒进行酶切鉴定,如图 4 所示,表明 pCAMhp1033 已成功转入农杆菌菌株 EHA105。

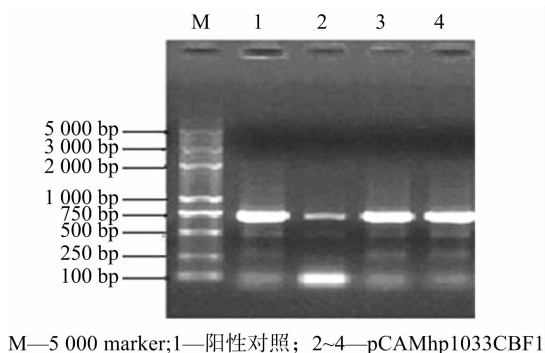
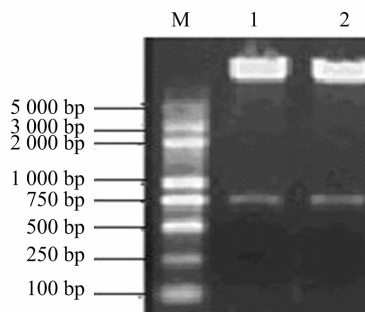


图3 转化农杆菌的 PCR 鉴定



M—5 000 marker; 1~2—pCAMhp1033CBF1质粒双酶切

图4 转化农杆菌的酶切鉴定

2.3 番茄的遗传转化

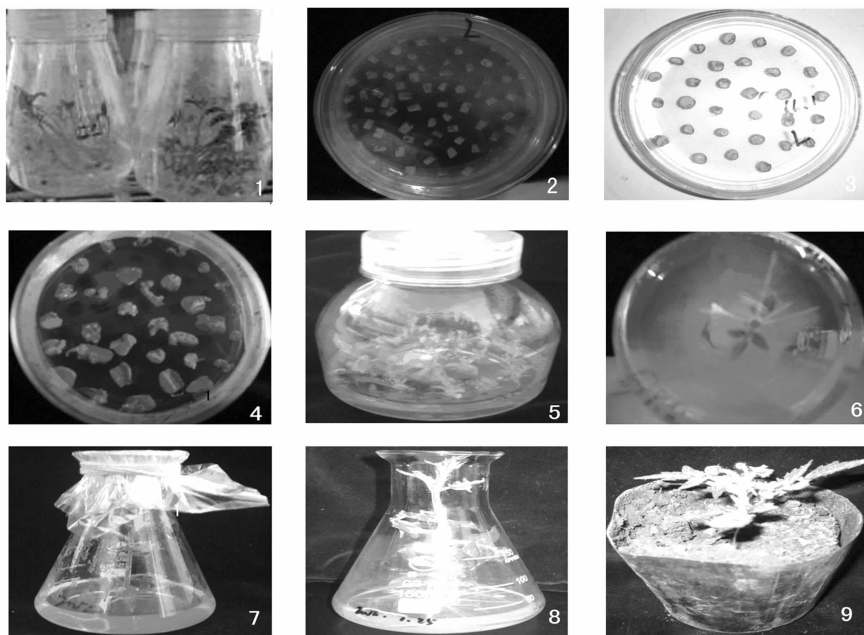
通过对番茄子叶进行遗传转化,最终得到抗性植株 13 株,番茄品种 Micro-Tom 的遗传转化过程见图 5。

2.4 再生植株的 PCR 检测

利用 *Npt II* 序列对转基因植株进行 PCR 检测,以质粒为阳性对照,以未转基因植株为阴性对照,扩增结果如图 6 所示。抗性植株有 13 株,8 株表现为阳性。这初步说明 1033CBF1 目的基因整合到 Micro-Tom 的番茄基因组中。

2.5 转基因植株的耐低温性检测

2.5.1 低温胁迫对转化植株的 MDA 和 O_2^- 含量的影响
在非低温胁迫条件下,转基因植株与对照植株之间的MDA、



1—番茄无菌苗; 2—预培养和共培养期; 3—未转化外植体(对照); 4—抗性芽诱导; 5—继代与筛选; 6—生根期; 7—抗性苗; 8—炼苗期; 9—抗性苗定植

图5 番茄的遗传转化过程

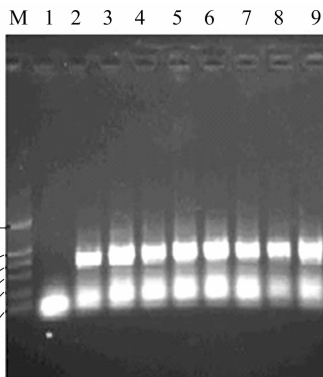
O_2^- 含量无明显差异。随着 5 ℃ 低温胁迫时间延长,转基因植株和对照植株的 MDA、 O_2^- 含量逐渐升高,而对照植株比转基因植株升高趋势快且显著高于转基因植株,转基因株系 TS-1 和 TS-2 之间差异不明显,由此可见转基因植株的细胞膜伤害程度比非转基因植株轻(图 7-A、图 7-B)。

2.5.2 低温胁迫对转化植株的 SOD 和 POD 活性的影响

随着 5 ℃ 低温胁迫时间的延长,转基因植株与对照植株的

SOD 活性在 72 h 时出现了一个峰值,在 0~72 h 之间呈上升趋势,之后下降。而 POD 活性均呈上升趋势,转基因株系 TS-1 和 TS-2 之间无明显差异,且显著高于对照植株(图 7-C、图 7-D)。

2.5.3 低温胁迫对转化植株的脯氨酸(Pro)含量和 CAT 活性的影响
在非低温胁迫条件下,转基因植株与对照植株之间的脯氨酸含量无明显差异。随着 5 ℃ 低温胁迫时间的延



M—2 000 marker; 1—阴性对照; 2—阳性对照; 3~9—转基因植株

图6 pCAMhp1033CBF1 转化植株的 PCR 检测

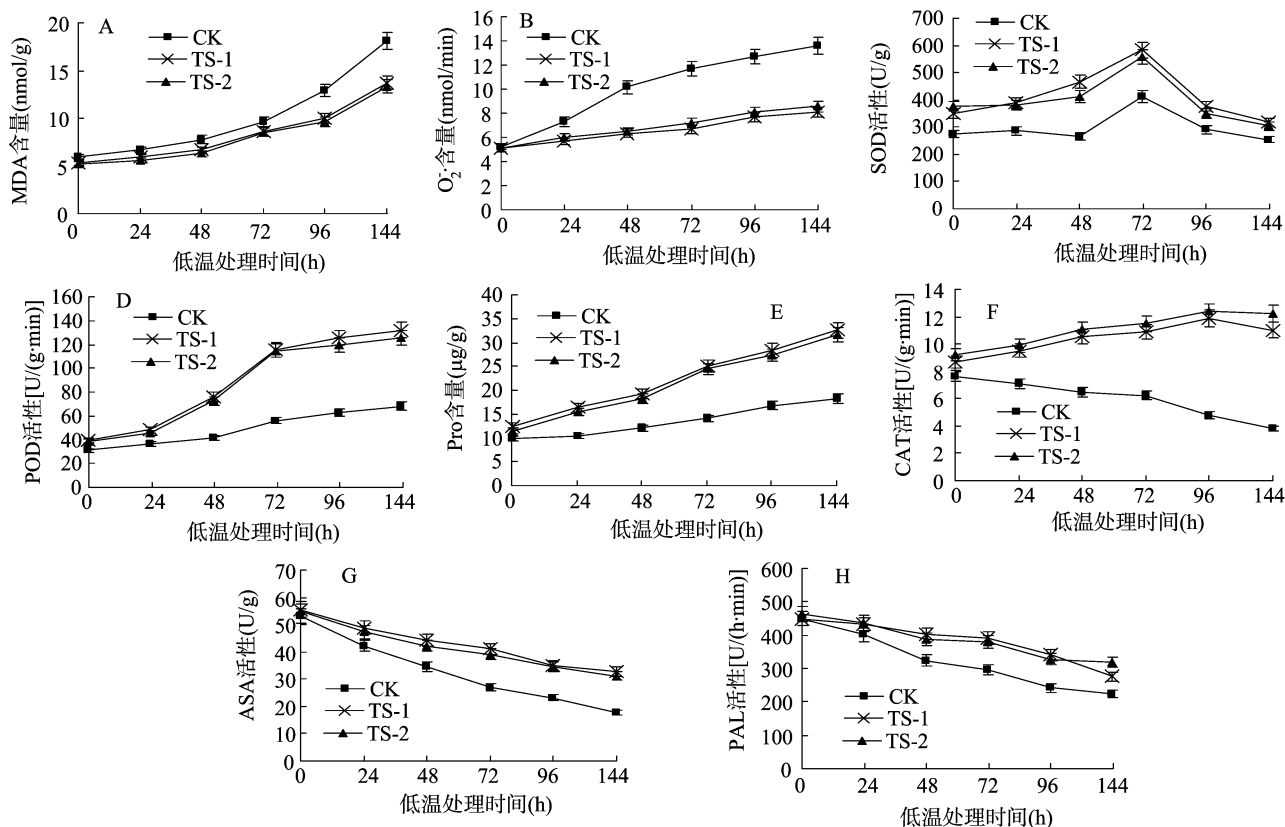


图7 转 *ShCBF1* 番茄的生理生化变化

2.5.5 转基因植株的形态观察 低温胁迫后,转基因植株生长未受影响,而非转基因植株生长受到一定抑制,转基因植株比非转基因植株高,叶色浓绿,而非转基因植株的叶色要明显比转基因植株的浅,呈现淡绿色,且有一定程度的萎蔫(图8)。

3 结论与讨论

番茄是一种极具营养价值和经济价值的世界性蔬菜作物^[13],而冷(冻)害常会严重影响其产量。低温胁迫严重影响着植物的生长发育,番茄在温度低于 12 ℃ 时就不能正常开花结果和生长发育^[14],在 0~12 ℃ 之间,植株表现出冷害,损伤程度受到低温胁迫时间的影响。多毛番茄是一种野生番茄,具有耐低温甚至抗冻的特性。本研究成功构建了多毛番茄的冷诱导转录因子 CBF1 的植物表达载体,并通过农杆菌

介导,转基因植株和对照植株的脯氨酸含量均表现为上升趋势,转基因株系 TS-1 和 TS-2 之间差异不明显,但明显高于对照(图 7-E)。由于研究表明脯氨酸含量与植物抗寒性有很大相关性,说明转基因植株的耐冷性更强。随着 5 ℃ 低温胁迫时间延长,转基因株系 TS-1 和 TS-2 的 CAT 活性呈上升趋势,而对照植株则呈下降趋势(图 7-F)。

2.5.4 低温胁迫对转化植株的 ASA 和 PAL 活性的影响 在非低温胁迫条件下,转基因植株与对照植株之间的 ASA 和 PAL 活性无明显差异。随着 5 ℃ 低温胁迫时间延长,转基因植株和对照植株的 ASA、PAL 活性逐渐下降,转基因株系 TS-1 和 TS-2 之间差异不明显,但明显高于对照(图 7-G、图 7-H)。

介导法获得了番茄的转 *ShCBF1* 植株,丰富了抗寒番茄转基因新种质。

ROS ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$) 是植物体有氧代谢不可避免的产物,会引发生物膜的不饱和脂肪酸发生膜脂过氧化反应,并由此产生对细胞有毒性的脂质过氧化物,在低温胁迫时,植物体自由基增加,使质膜过氧化作用加强,导致膜的损伤和破坏。本研究中转基因植株经冷诱导处理后,丙二醛(MDA)含量和超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)含量均低于非转基因对照,证明了转 *ShCBF1* 基因植株对低温胁迫的耐受性增强,增加了自身的抗寒性。

低温胁迫下,转基因株系中超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、脯氨酸(Pro)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、抗坏血酸过氧化物酶(ASA)活性和苯丙氨酸解

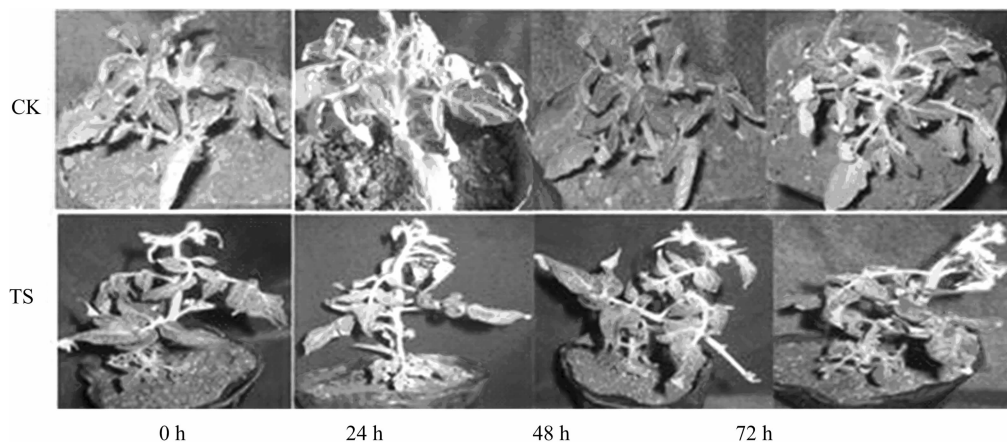


图8 5 °C低温胁迫对转基因番茄植株叶片的影响

氨酶(PAL)活性则高于非转基因对照。SOD 主要的功能是清除 $O_2^{\cdot -}$, 产生 H_2O_2 ^[15-17]。而 CAT 能够在低温胁迫过程中清除 SOD 产生的 H_2O_2 ^[18], 维持体内活性氧代谢平衡, 保护膜结构, 从而使植物能在一定程度上忍耐、减缓或抵抗低温胁迫。低温胁迫时间的延长诱导 POD 酶活性的增强, 从而抵御低温下氧自由基的伤害。适当的维持体内膜保护酶活性和 $O_2^{\cdot -}$ 含量的平衡关系。由于冷诱导基因 *CBF1* 主要受冷诱导表达, 因此, 在冷胁迫下植株内 SOD 活性增减可能是 *CBF1* 基因在低温逆境诱导下超量表达, 在一定程度上使得其自身有效清除体内超氧离子的能力增强。

此外, 在低温胁迫条件下, 自由基的不断积累会破坏 ASA 和 PAL 对活性氧的毒害防御作用。而转基因植株可能其本身耐冷基因 *CBF1* 受冷诱导后超量表达, 增强了其耐冷机能。使转基因植株的 ASA 和 PAL 活性显著高于对照植株。冷胁迫后生理生化指标的测定和植株形态观察充分表明了转 *ShCBF1* 基因可以提高番茄的抗冷性。

参考文献:

- [1] Dolstra O, Venema J H, Groot P J, et al. Low - temperature - related growth and photosynthetic performance of alloplasmic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with chloroplasts from *L. hirsutum* Humb. & Bonpl. [J]. Euphytica, 2002, 124(3): 407 - 421.
- [2] Patterson B D, Smillie R M. Chilling resistance in *Lycopersicon hirsutum* Humb. & Bonpl, a wild tomato with a wide altitudinal distribution [J]. Plant Physiology, 1978, 5: 609 - 617.
- [3] Foolad M R, Lin G Y. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. [J]. Euphytica, 2001, 122: 105 - 111.
- [4] 褚亚峰, 李文丽, 王 富. 多毛番茄主要生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(16): 161 - 164.
- [5] 朱文哲, 李景富, 王傲雪. 低温胁迫对多毛番茄幼苗生理生化特性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(4): 57 - 61.
- [6] Li Z J, Zhang L L, Li J F, et al. Isolation and functional characterization of the *ShCBF1* gene encoding a CRT/DRE - binding factor from the wild tomato species *Solanum habrochaites* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 74: 294 - 303.
- [7] 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 - 1040.

- [8] Thomashow M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 571 - 599.
- [9] Gilmour S J, Sebolt A M, Everard J D, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. Plant Physiology, 2000, 124: 1854 - 1865.
- [10] Jaglo - Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, et al. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance [J]. Science, 1998, 280: 104 - 106.
- [11] Zhang L L, Li Z J, Li J F, et al. Ectopic overexpression of *SsCBF1*, a CRT/DRE - binding factor from the nightshade plant *Solanum lycopersicon*, confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e61310.
- [12] Hsieh T H, Lee J T, Charng Y Y, et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 618 - 626.
- [13] 张治平, 於丙军, 汪良驹, 等. 低温下 ALA 对番茄光合色素和抗氧化酶活性的影响 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 222 - 224.
- [14] Hu W H, Zhou Y D, Du Y S, et al. Differential response of photosynthesis in greenhouse and field ecotypes of tomato to long - term chilling under low light [J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163: 1238 - 1246.
- [15] 陈 倩, 陶功胜, 谢寅峰, 等. 高氯酸钾胁迫对水稻幼苗光合作用及保护酶活性的影响 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4): 715 - 721.
- [16] Bowler C, van Montagu M, Inzé D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 43: 83 - 116.
- [17] 赵秋月, 张广臣. 番茄对碱性盐胁迫的响应机制 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 139 - 142.
- [18] Miyake C, Asada K. Ferredoxin - dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids [J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 539 - 549.