

拟南芥 *AtCBF1~3* 基因提高番茄耐寒性研究^①

葛 歌¹, 金新开¹, 沈 辉¹, 李小寒¹,
潘 宇^{1,2}, 李金华^{1,2}, 苏承刚^{1,2}, 张兴国^{1,2}

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400716

摘要: 将拟南芥 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因簇完整地导入番茄基因组, 以期修正番茄 CBF 冷应答系统的遗传缺陷, 提高番茄的耐寒性. 结果显示, 转基因番茄植株中外源 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因能被 4 °C 低温诱导表达, 6 h 后相对表达量均提高大约 200 倍; 低温胁迫下, 转基因番茄的细胞膜透性和丙二醛(MDA)含量的增加量显著低于野生型对照, 而超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性增强幅度显著高于野生型材料, 从而使转基因番茄的耐寒性得到显著提高.

关键词: 番茄; 低温胁迫; *AtCBF1~3* 基因; 耐寒性

中图分类号: Q786; S641.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)09-0034-08

低温是一种重要的非生物胁迫因素, 严重影响不耐寒作物的产量和品质^[1]. 拟南芥等耐寒植物在遇到零上低温时具有冷适应(cold acclimation)机制, 使植株得到冷锻炼而具备耐受零下低温的能力^[2], 其中包括依赖 ABA 的冷信号转导途径和不依赖 ABA 的 CBF 冷应答系统^[3]. 拟南芥 CBF 家族中有 *AtCBF1*、*AtCBF2*、*AtCBF3*、*AtCBF4*、*AtCBF5* 和 *AtCBF6* 等 6 个成员, 但仅 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 受低温诱导表达^[4]. 这 3 个基因在拟南芥基因组中按 *AtCBF1-AtCBF3-AtCBF2* 的结构排列, 是 CBF 冷应答系统的关键节点, 调控着下游众多的冷调节(Cold-regulated, COR)基因的表达, 构成了一个庞大的 CBF 调节组, 在拟南芥的耐寒能力获得中起着十分重要和不可缺失的作用^[4-5]; 其中, *AtCBF2* 除了能激活下游 COR 基因表达外, 还具有抑制 *AtCBF1* 和 *AtCBF3* 表达的特性, 以便拟南芥能以最低水平的转录调控来获得最大程度的耐寒能力^[6-7]. *AtCBF1* 或 *AtCBF3* 在拟南芥中超表达^[8], 将它们单独导入烟草、马铃薯等其他物种中^[9-10], 均能显著提高转基因植物的耐寒性. CBF 冷应答系统已被证实在植物界普遍存在^[4]. 在冷敏植物番茄中, 同样存在 CBF 冷应答系统^[11], 并以 *SlCBF1*、*SlCBF2* 和 *AtCBF3* 基因簇的结构存在, 但只有 *SlCBF1* 能够应答低温, 表明番茄中只存在不完善的 CBF 冷应答系统^[11]. 本研究将拟南芥 *AtCBF1-AtCBF3-AtCBF2* 基因簇整体转入番茄基因组, 分析它们在番茄中的低温诱导表达特性和对番茄耐寒性的影响, 以期修正番茄的 CBF 冷应答系统的遗传缺陷, 提高番茄的冷应答能力和耐寒性, 为培育优异的番茄耐寒育种材料奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材 料

番茄(*Solanum lycopersicum* L.)品种 Ailsa Craig、大肠杆菌菌株 XL1-blue 和根癌农杆菌(*Agrobacte-*

① 收稿日期: 2016-11-21

基金项目: 科技部“863”基金项目(2010AA10060705).

作者简介: 葛 歌(1991-), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜生物技术研究.

通信作者: 张兴国, 研究员, 博士研究生导师.

rium tumefaciens) 菌株 LBA4404 均由西南大学蔬菜实验室提供. 含有拟南芥 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因(均带自身的启动子; 而 *AtCBF1* 和 *AtCBF3* 带自身的终止子, *AtCBF2* 未带)的双元载体 pBK-*AtCBF1*~3(图 1A)由该实验室构建. pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司. 引物(表 1)委托上海生工生物技术有限公司合成.

表 1 引物

引 物	序列(5'→3')	位 置
P1	CATGAGCGAAACCCTATAGGAACC	位于 T35s 终止子下游
P2	GAATTCAGGGAGTCACGTTATGACC	位于 Pnos 启动子上游
P3	ATCCTTCGCTTAGTCCTGTCCCTGG	位于 <i>AtCBF1</i> 启动子上游
P4	AGTAACTCCAAAGCGACACGTCAC	位于 <i>AtCBF1</i> 的编码区内
P5	GGTGATTATATTCCGACGCTTG	位于 <i>AtCBF3</i> 的编码区上游
P6	GTAATAAAATGGAAATAATAATCTGAG	位于 <i>AtCBF3</i> 的编码区下游
P7	GTCTAGTTTGTGTGGATAACATGG	位于 <i>AtCBF2</i> 内
P8	ATCGCAAGACCGGCAACAGG	位于 Tnos 终止子下游
CBF1-F	CCGACTTTGTTGGATAATATGGCTGAAG	位于 <i>AtCBF1</i> 内
CBF1-R	TTAGTAACTCCAAAGCGACACGTCACC	位于 <i>AtCBF1</i> 内
CBF2-F	CTACGAATCCCGGAATCAACCTGT	位于 <i>AtCBF2</i> 内
CBF2-R	GCGTATAAATAGCCTCCACCAAG	位于 <i>AtCBF2</i> 内
CBF3-F	GGTGATTATATTCCGACGCTTGCGA	位于 <i>AtCBF3</i> 内
CBF3-R	TCACAAACCCACTTACCGGAGTTTCTC	位于 <i>AtCBF3</i> 内
LeELF-α-F	GTGGTCATTGGTCATGTTGACTC	位于 LeELF-α 内
LeELF-α-R	GTTCATCTCAGCAGCTTCCTTCTC	位于 LeELF-α 内

1.2 方 法

1.2.1 农杆菌介导法转化番茄

选取籽粒饱满的番茄种子, 在净化工作台上用 75%酒精浸泡 60 s, 再用 20%新配制的 NaClO 溶液表面消毒 20 min, 无菌水漂洗 5~6 次后, 均匀地播种于 MS^[12]培养基上, 置于(25±2)℃、16 h 光照/8 h 黑暗的培养室内培养约 7 d. 当番茄子叶刚刚展开时, 在滤纸上用灭过菌的解剖刀切取子叶, 置于含有 1 mg/L 吲哚乙酸 (IAA)、1.75 mg/L 玉米素(ZT)、3%蔗糖和 0.6%琼脂的 MS 固体预培养基上, (25±2)℃暗培养 2 d.

双元载体 pBK-CBF1~3 经冻融法^[13]转化根癌农杆菌菌株 LBA4404. 将活化后重悬的农杆菌菌液倒入培养皿中, 侵染番茄子叶外植体 10 min 左右, 外植体经无菌滤纸吸去多余的菌液后, 重新放回到预培养基上, (25±2)℃暗培养 2 d 后, 转移到含有 1 mg/L IAA、1.75 mg/L ZT、75 mg/L 卡那霉素(Kan)、500 mg/L 羧苄青霉素(Cb)、3%蔗糖和 0.6%琼脂的 MS 筛选培养基上, (25±2)℃每天 16 h 光照条件下培养, 每 15 d 换一次筛选培养基直至获得 Kan 抗性试管苗. 切下的试管苗在 50 mg/L Kan、200 mg/L Cb、3%蔗糖和 0.6%琼脂的 MS 生根培养基诱导生根. 生根的 Kan 抗性植株转移到无菌土中炼苗, 并在 (25±2)℃、每天 16 h 光照的育苗室内培养.

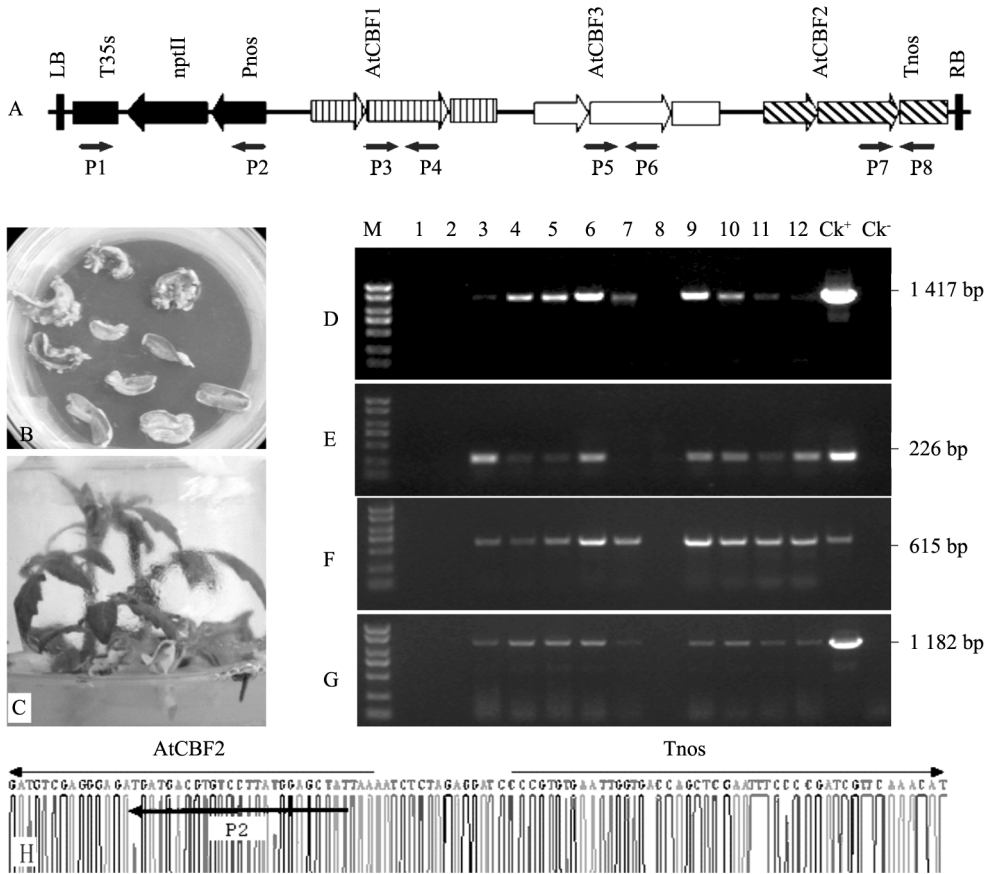
1.2.2 转基因番茄的分子鉴定

用 CTAB 法提取转基因番茄和野生型番茄的 gDNA^[14]. 用 P1 和 P2、P3 和 P4、P5 和 P6、P7 和 P8 等引物对(表 1、图 1A)进行 PCR 扩增, 检测具有卡那霉素抗性的新霉素磷酸转移酶基因 nptII 和 *AtCBF1*~3 基因是否整合进番茄基因组. 将 PCR 阳性的转基因番茄移植到网室内培养留种, 播种后长出的 T1 代植株再经 PCR 扩增鉴定后, 选取形态正常的转基因株系, 自交得到 T2 代, 经 PCR 鉴定出纯合转基因株系, 用于后续的耐寒性和转基因表达水平的检测.

1.2.3 转基因番茄的耐寒性鉴定和理化指标分析

转基因番茄(T2 代)和野生型番茄植株, 在 25℃、16 h 光照和 22℃、8 h 黑暗的光照培养箱内培

养, 待其长到五叶一心时, 选取长势一致的番茄植株在低温光照培养箱中 4 ℃ 处理 0~3 d, 每个时间点每个株系各 3 个植株, 观察转基因的耐寒性. 采用电导仪方法测定叶片组织的相对电导率^[15]. 采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)的含量^[16]. 采用钼酸铵比色法测定过氧化氢酶(CAT)活性. 采用愈创木酚法测定过氧化物酶(POD)活性. 采用邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性. 采用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量^[17].



A: 双元载体 pBK-*AtCBF1~3* 的 T-DNA 结构; B: 番茄子叶外植体产生的 Kan 抗性不定芽; C: Kan 抗性试管苗; D: *AtCBF1* 基因的 PCR 鉴定(P3/P4 引物对); E: *AtCBF2* 基因的 PCR 鉴定(P7/P8 引物对); F: *AtCBF3* 基因的 PCR 鉴定(P5/P6 引物对); G: Pnos-nptII-T35s 基因的 PCR 鉴定(P1/P2 引物对); H: P7 和 P8 引物对的 PCR 扩增产物测序的部分序列. LB 和 RB: T-DNA 左边界和右边界; T35s: CaMV 35S 基因的终止子; nptII: 新霉素磷酸转移酶基因; Pnos: 胭脂碱合成酶基因启动子; *AtCBF1*: *AtCBF1* 基因; *AtCBF2*: *AtCBF2* 基因; *AtCBF3*: *AtCBF3* 基因; Tnos: 胭脂碱合成酶基因终止子; P1~P8: 引物位点; MK: DL2000 分子量标记; 1~12: Kan 抗性株系; CK⁺: 载体 pBK-*AtCBF1~3* 阳性对照; CK⁻: 阴性对照.

图 1 *AtCBF1~3* 基因导入番茄基因组及鉴定

1.2.4 *AtCBF1~3* 转基因表达的定量 RT-PCR 分析

转基因番茄(T2 代)和野生型番茄植株, 在上述光照培养箱内培养至五叶一心的幼苗时, 选取长势一致的植株在低温光照培养箱内 4 ℃ 处理 0~6 h, 取第 4 片真叶, 提取总 RNA, 并反转录成 cDNA. 根据 *AtCBF1~3* cDNA 序列设计 RT-PCR 引物(表 1), 以番茄的 elongation factor 1-alpha (LeELF- α , GenBank 登陆号为 X14449)基因作为内参基因(表 1), 采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行扩增. 10 μ L PCR 体系中含有 5 μ L 的 SYBR Premix Ex Taq, 3 μ L H₂O、1 μ L cDNA、上下游引物各 0.5 μ L; 每个样重复 3 次. PCR 扩增程序为: 95.0 ℃ 3 min; 95.0 ℃ 30 s; 60.0 ℃ 30 s; 72.0 ℃ 30 s; 40 个循环; 95.0 ℃ 5 s. 根据相对定量公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{AtCBF1} - Ct_{Actin}$, $\Delta Ct = Ct_{AtCBF2} - Ct_{Actin}$, $\Delta Ct = Ct_{AtCBF3} - Ct_{Actin}$) 计算, 分析不同样品的目的基因相对表达量. 所有的数据采用 Spass19.0 软件进行数据统计分析, 并用 Excel 作图.

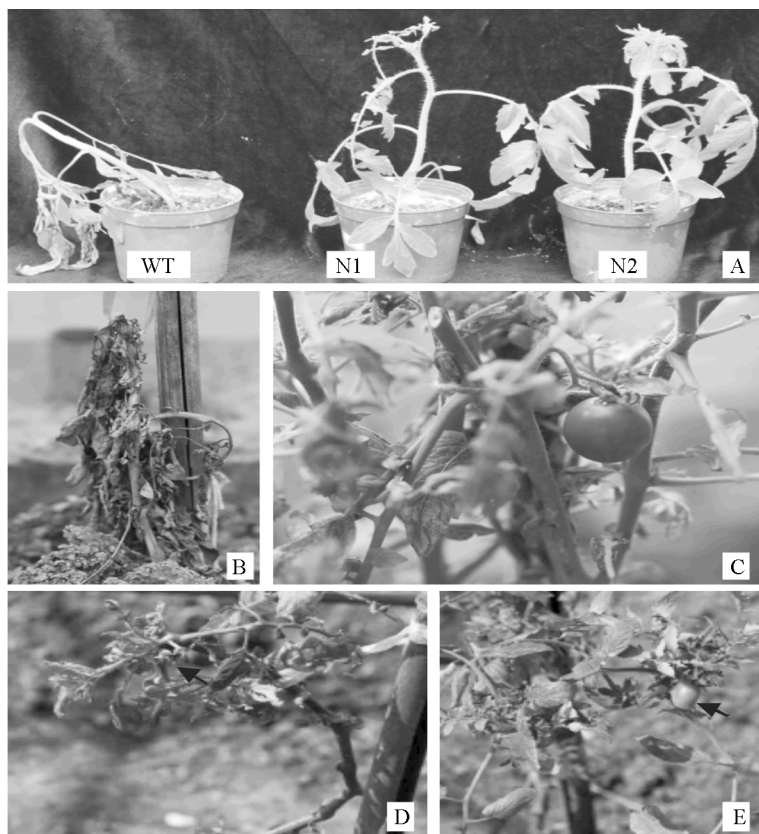
2 结果与分析

2.1 *AtCBF1*~3 基因整合进了番茄基因组

二元载体 pBK-CBF1~3 经冻融法转化根癌农杆菌菌株 LBA4404, 转化番茄子叶外植体后, 4~6 周左右得到 Kan 抗性不定芽(图 1B); 在不加激素的培养基上诱导生根, 形成试管苗(图 1C). 共得到 18 株卡那霉素抗性植株. 提取 gDNA, 经 P3 和 P4、P5 和 P6、P7 和 P8 引物对进行 PCR 扩增检测, 其中 8 株转基因番茄中分别可扩增到目的基因 *AtCBF1*、*AtCBF3* 和 *AtCBF2* 基因的片段, 扩增产物的大小约为 1 417 bp、615 bp、226 bp(图 1D、E、F); 同时, 经 P1 和 P2 引物对也能够扩增出 1 182 bp 大小的 Kan 抗性基因 Pnos-nptII-T35s(图 1G); 均与预期阳性对照的大小一致, 而阴性对照没有扩增出目的条带(图 1D、E、F、G). P7 和 P8 引物对的 PCR 扩增产物经测序鉴定, 含有预期的 *AtCBF2* 基因和 Tnos 终止子(图 1H). 因此, 证实外源基因已经整合到番茄基因组. 在自交 T2 代群体中, 经 PCR 扩增筛选到了 N1 和 N2 两个转基因纯合株系.

2.2 *AtCBF1*~3 基因增强了番茄的耐寒性

25 °C 生长的转基因番茄和野生型材料经 4 °C 低温处理 3 d, 可明显看到野生型植株萎焉, 而转基因番茄虽然叶片下垂, 但植株挺立, 表现出比野生型植株有更强的耐寒性(图 2A). 秋季播种的野生型番茄在 1 月初(室外最低温度为 2 °C 左右)即受冻死亡(图 2B), 而同期播种的转基因番茄虽然下部叶片受冻后枯死, 但顶叶及紧随其下的一些叶片保持翠绿, 果实能够红熟(图 2C), 而且能够越过最寒冷的 2 月(1 °C 左右), 并在 3 月中旬重新开花(图 2D)和 3 月下旬结实(图 2E), 比常规冬季育苗后春季露地普通番茄栽种的开花结实提早 1 月左右. 因此, 整合有拟南芥 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 的转基因番茄的耐寒性得到明显增强. 但该转基因番茄置于 0 °C 低温条件下 1 d



A: 4 °C 低温处理; B: 露地越冬 1 月初 WT 番茄死亡; C: 露地越冬 1 月初转基因番茄果实成熟; D: 露地越冬后 3 月中旬转基因番茄开花; E: 露地越冬后 3 月下旬转基因番茄结实. WT: 野生型番茄; N1: 转基因株系 N1; N2: 转基因株系 N2.

图 2 转 *AtCBF1*~3 基因番茄的抗寒性表型

即发生萎焉和死亡, 表明拟南芥 *AtCBF1*-*AtCBF3*-*AtCBF2* 基因簇并不能赋予转基因番茄耐冻性.

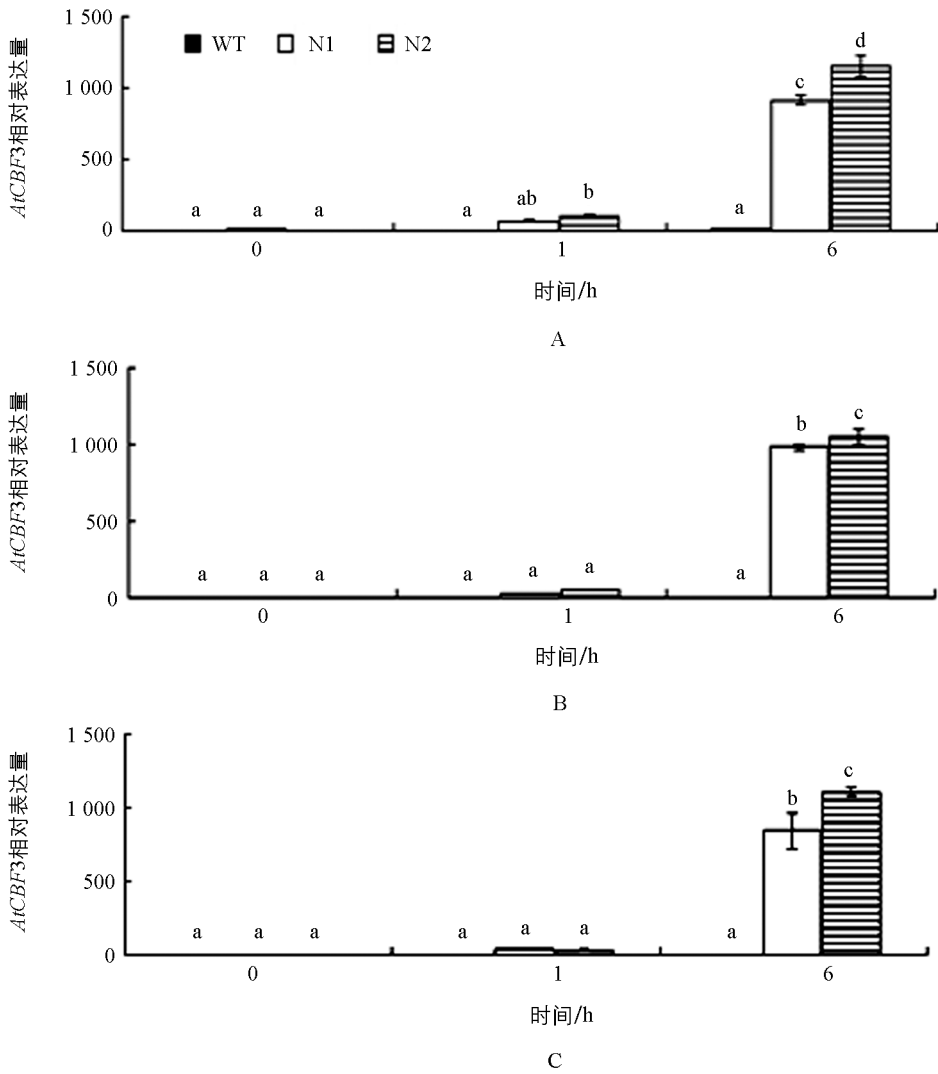
2.3 *AtCBF1*~3 基因在转基因番茄中能受低温诱导表达

转基因番茄在室温生长条件下几乎没有检测到 *AtCBF1*~3 基因的表达, 而这 3 个基因经 4 °C 处理 1 h 时表达量增高, 6 h 达到丰量水平, 其中 *AtCBF1* 在 N1 和 N2 株系分别增加了 83 和 145 倍, *AtCBF2* 分别增加了 200 和 211 倍, *AtCBF3* 分别增加了 410 和 575 倍, 且与野生型材料和转基因材料之间在未经低温处理和 4 °C 1 h 时均存在显著性差异(图 3), 表明拟南芥 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因在番茄中也能感应低温, 受低温诱导表达; 而且 3 个基因的冷诱导表达模式相似(图 3). 因此, 可以推测, 转基因番茄的

耐寒性增强与外源基因 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因受低温诱导后丰量表达有关。

2.4 *AtCBF1~3* 基因表达增强了低温胁迫下番茄细胞膜的稳定性

表 2 表明, 4 ℃ 低温胁迫使野生型番茄和转基因番茄株系 N1、N2 的相对电导率(REC)有不同程度的增加。在 25 ℃ 条件下, 野生型和转基因番茄之间的相对电导率无明显差异, 但在冷胁迫处理 1 d 和 3 d 时, 野生型番茄的相对电导率均显著高于转基因番茄株系 N1 和 N2。这些结果表明, 与野生型番茄相比, 转基因番茄的细胞膜损坏程度较轻, 表明 *AtCBF1~3* 的异源表达提高了转基因番茄细胞膜的稳定性。



A: *AtCBF1* 基因; B: *AtCBF2* 基因; C: *AtCBF3* 基因; 0 h: 室温下或 4 ℃ 低温处理 0 h; 1 h: 低温处理 1 h; 6 h: 低温处理 6 h。采用 Eva Green SMX 试剂和 elongation factor 1-alpha (ELF- α) 为内参基因进行定量 RT-PCR。不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

图 3 *AtCBF1~3* 基因在番茄叶片中的相对表达量

表 2 低温胁迫下番茄叶片的相对电导率

材料	0 d(%)	1 d(%)	3d(%)
WT	26.45 ^a	40.41 ^b	49.91 ^b
N1	22.74 ^a	24.96 ^a	29.06 ^a
N2	21.08 ^a	24.11 ^a	29.31 ^a

注: WT: 野生型番茄; N1 和 N2: 转基因番茄株系; 0 d, 1 d 和 3 d: 4 ℃ 低温处理的天数。小写字母 a, b, c 表示差异显著 ($p < 0.05$)。下表同。

在 25 ℃ 生长条件下, MDA 含量在野生型番茄和转基因番茄之间差异不明显(表 3)。随着低温胁迫时间的延长, 转基因番茄株系 N1 和 N2 的 MDA 含量虽然略有增加, 但与 0 h 相比, 均未出现显著性变化; 而野生型番茄在低温处理 3 d 时, 与 0 h 或与转基因番茄株系之间的 MDA 含量差异达到了显著水平

(表 3). 结果表明, 低温胁迫处理后, 野生型番茄的膜脂质过氧化程度更为严重, 而转基因番茄对低温的适应能力得到增强.

表 3 低温胁迫下番茄叶片的丙二醛(MDA)含量

品种	0 d/(Umol · g ⁻¹)	1 d/(Umol · g ⁻¹)	3 d/(Umol · g ⁻¹)
WT	2.79 ^a	3.34 ^{ab}	6.82 ^c
N1	2.24 ^a	2.78 ^a	3.74 ^{ab}
N2	2.31 ^a	2.66 ^a	3.24 ^{ab}

2.5 *AtCBF1~3* 基因表达增强了低温胁迫下番茄抗氧化酶的活性

当植物受到低温逆境胁迫时, 产生的活性氧作为第二信使诱导了植物体内抗氧化酶(CAT、POD、SOD 等)的活性升高. 抗氧化酶能清除活性氧自由基并使之保持较低水平, 维持细胞膜的稳定性和完整性, 使得植物对低温具有更强的耐受性. 图 4 表明, 在 25 ℃ 正常生长条件下, 转基因番茄(N1、N2)与野生番茄(WT)的过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性无明显差异, 但在 4 ℃ 低温胁迫 3 d 后, 转基因番茄的 CAT、POD 和 SOD 的活性显著高于野生型番茄. 结果表明, 与野生型番茄相比, 低温胁迫下转基因番茄由于 *AtCBF1~3* 的异源表达而使抗氧化酶活性显著性增高, 增强了转基因番茄的耐寒性.

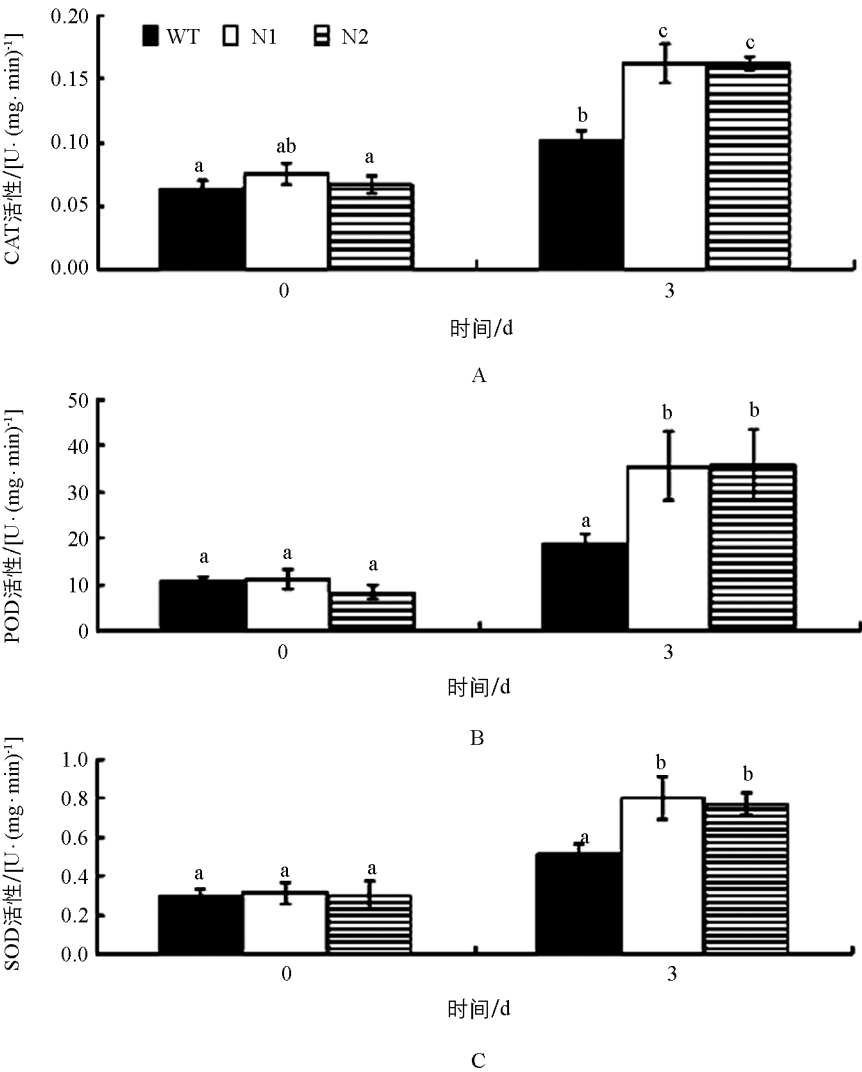


图 4 低温胁迫下番茄叶片抗氧化酶活性

3 讨 论

番茄属于冷敏植株, 缺乏拟南芥那样完善的冷适应机制, 其 CBF 冷应答系统为部分保守, 仅 *SlCBF1* 单个转录激活因子在该系统中发挥冷调控作用^[11]. 本研究成功地将拟南芥 *AtCBF1-AtCBF3-AtCBF2* 基因簇导入番茄基因组(图 1A、D、E、F), 而且 3 个基因均能在转基因番茄中受低温诱导后 6 h 高丰量表达(图 3), 为深入研究 *AtCBF* 基因在番茄中的调控模式和调控的基因网络奠定了基础. 在拟南芥中, *AtCBF1* 和 *AtCBF3* 分别受控于上游 ICE2 和 ICE1 转录因子的调控^[18], 但番茄中仅鉴别到 1 个 *SlICE1* 基因^[19]; 因此, *SlICE1* 如何能同时调控 3 个 *AtCBF* 的表达, 以及 *AtCBF2* 如何参与调控 *AtCBF1* 和 *AtCBF3*, 仍有待研究.

导入拟南芥 *AtCBF1-AtCBF3-AtCBF2* 基因簇的转基因番茄的叶片的电解质渗透率和膜脂过氧化程度显著低于野生型对照(表 2、表 3), CAT、POD、SOD 的活性也显著高于野生型材料(图 4), 表明 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因能够通过提高转基因番茄的活性氧清除能力, 保护细胞膜系统, 从而使转基因番茄比野生型材料具有更强的耐寒性(图 2). 此外, 含有 *AtCBF1-AtCBF3-AtCBF2* 基因簇的转基因番茄并不能耐受 0 °C 左右的低温, 这是由于番茄的起源和进化过程中没有像耐冻的拟南芥那样构建出庞大的 COR 基因家族^[11]. 这些结果与单独导入 CaMV 35S 启动子控制的 *AtCBF1* 基因导入番茄后的结果相一致^[20]. 因此, 番茄的耐寒性改良尚需要导入大量能够增强耐寒性的 COR 基因来实现.

参考文献:

- [1] CHINNUSAMY V, ZHU J, ZHU J K. Gene Regulation during Cold Acclimation in Plants [J]. *Physiol Plant*, 2006, 126(1): 52—61.
- [2] ARTUS N N, UEMURA M, STEPONKUS P L, et al. Constitutive Expression of the Cold-Regulated *Arabidopsis thaliana* COR15 a Gene Affects both Chloroplast and Protoplast Freezing Tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(23): 13404—13409.
- [3] THOMASHOW M. Molecular Basis of Plant Cold Acclimation: Insights Gained from Studying the CBF Cold Response Pathway [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 571—577.
- [4] JAGLO K R, KLEFF S, AMUNDSEN K L, et al. Components of the Arabidopsis C-Repeat/Dehydration-Responsive Element Binding Factor Cold-Response Pathway are Conserved in Brassica napus and other Plant Species [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 910—917.
- [5] KIM Y S, LEE M, LEE J H, et al. The Unified ICE-CBF Pathway Provides a Transcriptional Feedback Control of Freezing Tolerance during Cold Acclimation in Arabidopsis [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 89(1/2): 187—201.
- [6] NOVILLO F, MEDINA J, SALINAS J. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a Different Function than CBF2 in Cold Acclimation and Define Different Gene Classes in the CBF Regulon [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(52): 21002—21007.
- [7] NOVILLO F, ALONSO J M, ECKER J R, 2100. CBF2/DREB1C is a Negative Regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A Expression and Plays a Central Role in Stress Tolerance in Arabidopsis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(11): 3985—3990.
- [8] 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(5360): 104—106.
- [9] PINO M T, SKINNER J S, JEKNI Z, et al. Ectopic AtCBF1 Over-Expression Enhances Freezing Tolerance and Induces Cold Acclimation-Associated Physiological Modifications in Potato [J]. *Plant Cell Environ*, 2008, 31(4): 393—406.
- [10] YANG J S, WANG R, MENG J J, et al. Overexpression of Arabidopsis CBF1 Gene in Transgenic Tobacco Alleviates Photoinhibition of PSII and PSI during Chilling Stress under Low Irradiance [J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167(7): 534—539.
- [11] ZHANG X, FOWLER S G, CHENG H, et al. Freezing-Sensitive Tomato has a Functional CBF Cold Response Pathway, but a CBF Regulon that Differs from that of Freezing-Tolerant Arabidopsis [J]. *Plant J*, 2004, 39(6): 905—19.
- [12] MURASHIGE T, SKOOG F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures [J]. *Physiology Plant*, 1962, 15(3): 473—497.

- [13] CHEN H, NELSON R S, SHERWOOD J L. Enhanced Recovery of Transforms of *Agrobacterium tumefaciens* After Freeze-Thaw Transformation and Drug Selection [J]. Biotechniques, 1994, 16(4): 664—670.
- [14] ROGERS S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh Herbarium and Mummified Plant Tissues [J]. Plant Molecular Biology, 1985, 5(2): 69—76.
- [15] 赵世杰, 史国安, 董新纯. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业科学出版社, 2002.
- [16] 甄伟, 陈溪, 孙思洋, 等. 冷诱导基因的转录因子 CBF1 转换油菜和烟草及抗寒性鉴定 [J]. 自然科学进展, 2000, 10(12): 1104—1108.
- [17] SHI J, FU X Z, PENG T, et al. Spermine Pretreatment Confers Dehydration Tolerance of Citrus in Vitro Plants via Modulation of Antioxidative Capacity and Stomatal Response. Tree physiology, 2010, 30(7): 914—922.
- [18] FURSOVA O V, POGORELKO G V, TARASOV V A. Identification of ICE2, a Gene Involved in Cold Acclimation which Determines Freezing Tolerance in Arabidopsis Thaliana [J]. Gene, 2009, 429(1/2): 98—103.
- [19] MIURA K, SHIBA H, OHTA M, et al. SLICE1 Encoding a MYC-Type Transcription Factor Controls Cold Tolerance in Tomato, *Solanum lycopersicum* [J]. Plant Biotechnology, 2012, 29(3): 253—260.
- [20] HSIEH T H, LEE J T, YANG P T, et al. Heterology Expression of the Arabidopsis C-Repeat/Dehydration Response Element Binding Factor 1 Gene Confers Elevated Tolerance to Chilling and Oxidative Stresses in Transgenic Tomato [J]. Plant Physiol, 2002, 129(3): 1086—1094.

Arabidopsis AtCBF1~3 Genes Can Enhance the Cold Tolerance of Tomato

GE Ge¹, JIN Xin-kai¹, SHEN Hui¹, LI Xiao-han¹,
PAN Yu^{1,2}, LI Jin-hua^{1,2}, SU Cheng-gang^{1,2}, ZHANG Xing-guo^{1,2}

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

Abstract: Tomato, as a kind of cold sensitive plant, whose *CBF* cold response system is part of the conservative, lacks the perfect cold adaptation mechanism as *Arabidopsis*. In order to revise the genetic defect of the *CBF* cold response system of tomato and improve its cold tolerance, the *AtCBF1*, *AtCBF2* and *AtCBF3* gene clusters of *Arabidopsis* were completely transferred into the tomato genome. The result showed that the exogenous *AtCBF1*, *AtCBF2* and *AtCBF3* genes could be induced by low temperature at 4°C in the transgenic tomato plants and their relative expression increased about 200 times in 6 h. Under low temperature stress, the increase in cell membrane permeability and MDA content of the transgenic tomato plants was significantly lower than those of the wild type, while the increment of SOD, POD and CAT activities in them was significantly higher than that of the wild type. Therefore the cold tolerance of the transgenic tomato was significantly improved.

Key words: tomato; low temperature stress; *AtCBF1~3* genes; cold tolerance

责任编辑 欧 宾

