

转美洲拟蝶抗冻蛋白基因 (afp) 番茄致死

温度测定及其在生态学上预测^①傅桂荣 田艳艳 陈 瑛 汪清胤 黄永芬^②

(哈尔滨师范大学生物系 哈尔滨)

摘要 将转美洲拟蝶抗冻蛋白基因第四代番茄及对照低温锻炼后,测定其苗期致死温度,发现转基因各组致死温度较未转基因对照明显降低 $1\sim 2^{\circ}\text{C}$ 。说明转 AFP 基因番茄抗寒力增强,为在北方提早育苗,定植,提早上市提供条件,具有明显经济效益。对几年来转基因后代的田间形态学观察,记录的结果进行了有效积温指标的计算,推测转基因番茄可能跨过一个积温带,扩大其栽培范围。

关键词: 转基因番茄 抗冻蛋白基因 致死温度 有效积温

番茄属喜温植株,育苗期对低温敏感,易受伤害。如何增强番茄抗寒性,提早育苗,提早成熟成为人们研究的焦点。1987年加拿大 Davies 等人将 AFP 基因整合到 Ti 质粒上,用叶圆片法转郁金香、烟草、油菜,使油菜获得了一定抗冻能力^[6]。以后 Georges 等人用人工合成 AFP 基因和氯霉素乙酰合成酶的融合基因导入玉米原生质体获得表达^[4]。我们采用花粉管通道法和子房注射法,将整合在 Ti 质粒上的 AFP 基因导入番茄,并通过 D1 代、D2 代田间观察, Southern 杂交分析,同工酶检测及叶绿素、维生素 C 及叶圆游离氨基酸种类及其含量分析,以及 D3 代叶圆组织电导率的测定抗寒生态学、形态学及生理学指标说明, AFP 基因已整合到番茄染色体并表达,证明转基因番茄抗寒能力有所提高。

由沈征言等进行的低温锻炼对番茄幼苗抗寒影响的研究^[1], Culter 等用真空透析法将 AFP 基因导入马铃薯、拟南芥和欧洲油菜,使植物自然结冰温度平均降低 1.8°C ,并证明对转基因植物进行低温锻炼可降低其致死温度。本文通过对转 AFP 基因番茄第四代致死温度测定,说明获得了抗寒性转基因番茄可提早育苗。并通过相应的生态学、气象学生理指标,推测转基因品种在生态学上的新进展。

1. 材料与方法

1.1 材料:以本实验室转 AFP 基因的番茄品种中蔬

四号,经 D1 代、D2 代、D3 代鉴定过的 T-2 T-5 T-7 T-10 T-11 各组种子及未转基因的中蔬四号(对照)为材料,温室播种,取 3~4 片真叶时的幼苗用于本实验。

1.2 方法:

1.2.1 实验材料的低温锻炼 将转基因各组材料各取 10 株幼苗(90 株),置于室外昼、夜锻炼 5 天,保持锻炼温度不低于 2°C ,最高温度不高于 5°C ^[1],注意防止幼苗冻害。

1.2.2 致死温度的测定 对低温锻炼后的幼苗进行测定,由 3°C 开始观察记录各品种死伤情况(叶子萎蔫为冻伤,叶子呈灰绿色,似附有蜡质,叶茎折断为致死),直至测出不同转基因的品系致死温度。(因为夜间温度变化很快,注意及时观察和记录)

1.2.3 转基因番茄有效积温变化的计算

$$\text{有效积温} = \sum T_i - T_0$$

i : 生育期

T : 生育期温度

(包括 3 月 20 日~4 月末温室温度、4 月末~5 月末温床温度、自然气候^③)

T_0 : 番茄的生物学零度。

2 结果与讨论

2.1 低温锻炼后番茄致死温度的变化

对低温锻炼 5 天后的转 AFP 基因各组, T-2 T-5 T-7 T-10 T-11 及未转基因的对照品种中蔬四号致死温度如表 I。

从表 1 中可以看出,对照品种致死温度为 -5°C ,转基因各组致死温度分别为 -5°C 、 -5.5°C 、 -6°C 、

① 国家自然科学基金资助项目

② 通讯作者

③ 由黑龙江省气象台提供气象资料

表 1 番茄致死温度测定结果

品系	温度											
	-4℃		-5℃		-5.5℃		-6℃		-6.5℃		-7℃	
	20'	30'	30'	30'	40'	30'	10'	30'	15'	25'	30'	
中蔬四号	-		+									
T- 7- A				+								
T- 7- B					+							
T- 10- A												
T- 7- C						+						
T- 2- 0								+				
T- 5- 0									+			
T- 10- D										+		
T- 11- A											+	
T- 10- B												+

说明: 空白: 正常 “-”: 伤害 “+”: 死亡
表中分钟数为该温度下作用的时间, 后一分钟数是前一分钟的继续

7℃。通过致死温度数据可以看出, 转 AFP 基因番茄的品系的致死温度较对照降低 1- 2℃ (其中 T- 11- A, T- 10- B 尤为明显)。此结果表明, 转基因品系的抗寒能力提高了, 在实际生产中, 可以提早移出温室, 顺利度过无霜期, 提早上市, 具有很大的经济效益。

本实验测定转基因番茄品系致死温度之前进行 5 天的低温锻炼, 是根据 Adrian. J. Cutler 的报导^[3], 番茄在低温锻炼后, 会产生可溶性蛋白。这种蛋白质可以与植物细胞间隙内游离水份作用, 使水结冰点降低^[2], 结冰时形成的冰晶形状对植物组织伤害减小^[5], 减少对组织膜的损伤, 缓解结冰速度, 起到抗低温作用。本实验转美洲拟鲈 AFP 基因的番茄, 经低温诱导后会致抗冻蛋白基因的表达, 增加可溶性蛋白的含量, 使转基因番茄的抗寒性增强。上述实验结果也正说明这一点。

2. 2 转基因番茄有效积温变化及其在生态学预测

根据蔬菜气象学, 生态学的积温指标, 以及几年来对转基因番茄 D1 代、D2 代、D3 代的田间观察结果, 计算番茄有效积温的变化, 结果见表 2

表 2 对照及转基因各组有效积温的变化

	t(天数)	T ₀	Σ T _i - T ₀ (有效积温)	ΔΣ
对照品系	3月 20日~ 8月 16日	8℃	1099.5	194.9
转基因品系	3月 20日~ 8月 9日	8℃	904.6	

从表 2 中可以看出, 转 AFP 基因番茄所需的有效积温低于对照近 200, 说明转基因品系生育期所需的有效积温因 AFP 基因导入表达而降低, 可在比哈尔滨更冷的地区完成生育期。参照黑龙江省农作物品种生态区划图规定的积温范围, 转基因品系可能跨过一个积温带。同时, 本实验室以前对 D1 代、D2 代进行的田间观察在形态学上有显著的区别, 特别是转基因品系在 1992 年和 1993 年中, 果实成熟期最早可提前 8 天, 平均提前 3- 4 天。这些实验数据也说明转基因品系生育期可以提前, 提早成熟。

该转基因品系有效积温下降, 可扩大栽培范围, 由 I 积温带北移至 II 积温带。但是, 若得出肯定结论仍需做大量工作, 进一步计算生育期各阶段的有效积温, 而且需在相应的积温带做栽培、观察、测量等工作, 有待进一步研究。

参考文献

1. 沈征言等: 低温锻炼对番茄幼苗抗寒性的影响 北京农业大学学报 1983 9 (2):
2. 黄永芬等: 美洲拟鲈抗冻蛋白 (afp) 基因导入番茄的研究 1993 年 中国生物化学学会第三次基因结构、克隆与调控学术研究会论文集 P159
3. Adrian. J. C et al. J Plant physiol 1989 135 351- 354
4. Fawzy Georges, et al., Design and choing of a synthetic gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells Agrical Report 6 29- 35 1991
5. Peter. L. Davies and Choy I. How Biochemistry of fish antifreeze protein V 104 1990 May
6. Peter. L. Davies et al., Antifreeze protein genes of the winter flounder J. Biol. Chem., 259(14): 9241- 9247(1984)

定稿时间: 1997 年 11 月
(邮编 150080)

李景富, 1943 年生, 1967 年毕业于东北农学院园艺专业, 现任东北农业大学教授, 黑龙江省重点学科——蔬菜学带头人, 硕士、博士研究生导师, 蔬菜园艺系主任, 兼任黑龙江省园艺学会常务理事等职务。1992 年荣获国务院政府特殊津贴, 同年被授予国家级有突出贡献中青年专家称号, 1995 年被授予黑龙江省有突出贡献中青年专家称号及哈尔滨市有突出贡献人称号。

李景富长期从事蔬菜教学、科研、推广工作, 发表学术论文 30 余篇, 参加编写国家统编教材 2 部和主编专业著作 3 本, 并为黑龙江省 30 多个市县讲课和科技咨询指导, 培训人员达一万多人次。科研成果显著, 先后选育出东农 701 702 703 704 705 706 707 等十余个优良番茄新品种, 已推广到黑龙江省五十多个市、县和全国 14 个省市, 创经济效益达 7 亿多元。并有多项研究成果获奖: 其中获国家科技进步三等奖 2 项, 黑龙江省科技进步一等奖 1 项, 二等奖 1 项, 国家轻工业部三等奖 1 项, 黑龙江省农业科技进步奖 3 项, 哈尔滨市重大效益奖 1 项, 黑龙江省省长特别奖 1 项。为黑龙江省及我国高级蔬菜人才培养和菜篮子工程建设做出了突出贡献。