

甜杨 *PsG6PDH* 基因超表达对提高烟草抗寒冻性的影响

林元震^{1,2}, 张志毅², 郭海³, 林善枝², 张谦²

(1 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642; 2 北京林业大学 林木花卉遗传教育部重点实验室, 北京 100083;

3 水利部 水土保持植物开发管理中心, 北京 100038)

[摘要] **【目的】**研究甜杨葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*PsG6PDH*)基因超表达对烟草抗寒冻性的影响,为烟草的抗寒冻育种提供理论依据。**【方法】**构建甜杨 *PsG6PDH* 基因的植物表达载体 pBG I,采用叶盘转化法转化烟草,对转化烟草植株低温驯化后的形态、生理生化指标进行测定与分析。**【结果】**PCR 检测及 Southern 杂交结果显示,甜杨 *PsG6PDH* 基因已整合到转基因烟草的基因组中。低温试验表明,未经冷驯化的对照烟草较转基因烟草早出现萎蔫,恢复正常生长也较晚;经过冷驯化在接近 0℃处理 24 h 的对照烟草叶片基本萎蔫,而转基因烟草仍然正常。在 0℃及更低温度胁迫下,转基因烟草的相对电导率一直保持在 35%左右,而对照烟草的相对电导率则从 35%上升到 90%;随着胁迫时间的延长,转基因烟草的 SOD、POD 活性升高,而 MDA 含量下降。**【结论】**甜杨 *PsG6PDH* 基因能够提高植物的抗寒冻性,可以作为改良植物抗寒冻性的新的外源基因。

[关键词] 甜杨;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;烟草;抗寒冻性;超表达

[中图分类号] S572.034;Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)03-0125-07

Research on overexpression of *PsG6PDH* gene from *Populus suaveolens* to improve cold and freezing tolerance of tobacco plants

LIN Yuan-zhen^{1,2}, ZHANG Zhi-yi², GUO Hai³, LIN Shan-zhi², ZHANG Qian²

(1 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

2 College of Biological Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3 Plant Materials Center for Soil and Water Conservation, Ministry of Water Resources, Beijing 100038, China)

Abstract: **【Objective】** Effects on tobacco plants by overexpression of *PsG6PDH* gene from *P. suaveolens* were studied in this paper, which might provide theoretical basis for the genetic cold tolerance and freezing resistance in plants. **【Method】** The gene *PsG6PDH* was constructed into binary vector pBI121 and transformed into tobacco plants by leaf disc method, and the indexes of physiology and biochemistry in transgenic lines were determined under low temperature stress. **【Result】** PCR and Southern blotting results verified integration of this gene into the genome of tobacco. Moreover, cold treatment experiments showed that without cold acclimation wild-type tobaccos suffered or resumed from cold injury earlier or later than transgenic lines. After cold acclimation, wild-type tobaccos greatly suffered from cold injury while transgenic lines were normal after 0℃ treatment for 24 h. During 0℃ to even low temperature, the relative leakage data of transgenic lines steadily stayed on approximately 35%, while that of wild-type lines increased from approximately 35% to 90%. In addition, SOD, POD activities were increasing while MDA content was decreasing with the time extending under cold stress. **【Conclusion】** The poplar gene *PsG6PDH* could result

* [收稿日期] 2009-09-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30271093, 30771759)

[作者简介] 林元震(1979—), 男, 福建仙游人, 讲师, 主要从事林木抗逆分子遗传研究。E-mail: yzhlin@scau.edu.cn

in the low-temperature-hardiness of plants and is a new foreign gene in improving the cold and freezing tolerance of transgenic plants.

Key words: *Populus suaveolens*; G6PDH; tobacco; cold and freezing tolerance; overexpression

低温可以使植物受到不同程度的伤害甚至死亡,低温冻害是限制地球上植物分布与生长的重要因素之一。近年来,国内外在运用转基因技术提高植物抗冻性方面开展了大量研究工作,但一些被成功导入植物体内的为数不多的抗冻蛋白基因,多为来源于北极鱼类、昆虫或草本植物的单一基因,并不一定是关键基因;同时,由于动物与植物之间存在亲缘关系远、基因结构差异大等问题,采用北极鱼类及昆虫抗冻基因导入的方法,很难达到遗传改良植物抗冻性的目的^[1-2]。因此,要继续通过基因工程来提高植物(尤其是林木)的抗冻性,必须扩大抗冻基因的来源,特别是要利用高大林木这个大的基因库,而不应该将抗冻基因的选择局限于草本植物或者某些模式植物。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)是磷酸戊糖途径的关键性调控限速酶,其广泛存在于原核生物、动物和植物中。G6PDH的主要功能是为脂肪酸合成、氮还原和谷胱甘肽等生物分子的合成提供 NADPH 还原力,也为核酸合成提供戊糖。此外,它还参与了非生物逆境胁迫的应答反应。因此,其对植物的生长发育起着非常重要的作用^[3-5]。1972 年, Sagisak^[6]首次发现,杨树枝条中的 G6PDH 活性,在入秋和越冬时呈先升高后下降的趋势。Sagisak^[7]在冷藏杨树枝条时,发现枝条中的 G6PDH 活性下降,引起枝条伤害。至今,人们已在苜蓿、黑麦草、大豆、香蕉和毛白杨等植物中发现,低温会引起其 G6PDH 活性的升高^[8]。但目前关于 G6PDH 活性与植物抗寒冻性之间关系的分子机理研究报道尚比较少,在林木的抗寒冻性研究方面尤其如此。

甜杨属青杨派,主要分布在中国大兴安岭东北及漠河寒冷地带,是研究木本植物抗冻性及有关抗冻基因克隆问题的理想材料。前期研究表明,低温锻炼后,甜杨中 G6PDH 活性的增加有助于膜保护性酶 SOD 和 POD 活性的提高,进而可以提高甜杨的抗冻性^[8]。在此基础上,本研究小组以甜杨的无菌苗为材料,分离出了甜杨 G6PDH cDNA 基因 *PsG6PDH*,并进行了基因的结构分析和功能预测。本研究进一步构建了 *PsG6PDH* 植物表达载体,采用叶盘转化法导入烟草,进行了转基因烟草的低温试验、电导率分析和膜保护性酶活性变化测定,并探讨了甜杨

PsG6PDH 基因提高烟草抗寒能力的可能作用机制,以期研究甜杨 *PsG6PDH* 基因在转基因烟草抗寒性中的功能,以及利用基因工程改良有经济价值的农作物和林木的抗寒性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 甜杨 *PsG6PDH* 基因的烟草转化

以 pBI121 为载体,通过重组技术构建甜杨 *PsG6PDH* 基因的植物表达载体 pBG I,利用液氮冻融法^[9]转化农杆菌 LBA4404。采用叶盘法^[10]进行烟草转化,卡那霉素(Km)筛选质量浓度为 100 mg/L。

1.2 转基因烟草的 PCR 检测和 Southern 印迹检测

采用 CTAB 法^[11]提取转基因烟草(TG)和野生型烟草(CK)的基因组总 DNA,以 PFL01 和 PFL02 为引物进行 PCR 扩增,目的基因为 *PsG6PDH*。用 *EcoR* I 酶切烟草基因组 DNA,以目的基因为探针,利用 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit1(Roche)试剂盒对烟草基因组 DNA 酶切产物进行 Southern 印迹检测^[12]。

1.3 转基因烟草的移栽和抗寒性检测

将相同苗龄的野生型烟草和转基因烟草的生根组培苗,移入营养杯(V(土):V(蛭石)=1:1)中培养,培养温度为 26~28℃,光照 16 h/d,光照强度 2 200 lx。培养 2 个月后,选择生长性状一致的野生型烟草和转基因烟草进行低温试验(低温生化培养箱 DP-200)。试验参照 Fan 等^[13]的方法,分 2 个处理:(1)未经 15℃冷驯化,培养温度从 26~28℃直接下降到 4℃;(2)15℃冷驯化(培养温度从 26~28℃直接下降到 15℃)3 d 后,再从 15℃缓慢下降到 -4℃,降温梯度为 0.5℃/h,每下降到所需的处理温度后再保持 24 h。

1.4 电导率的测定

将相同苗龄的野生型烟草和转基因烟草在不同温度(4, 0, -2, -4℃)处理 2 h 后,取相同部位的叶片用打孔器打成小圆片,取 10 个小圆片加入去离子水 5 mL,真空渗透 15 min,室温静置 30 min,测定电导率 S_1 ;然后沸水浴 30 min,冷却后测定电导率 S_2 。每处理重复 3 次。相对电导率 $S = S_1/S_2 \times 100\%$ ^[14]。相对电导率的方差分析参照明道绪^[15]的方法进行,

半致死温度的计算参照朱根海等^[16]的方法。

1.5 SOD、POD 活性和 MDA 含量的测定

将野生型烟草和转基因烟草于 15℃冷驯化 3 d 后,培养温度直接下降到 4℃处理 1,3,5 d,分别取 0.5 g 叶片,加适量 PVPP,液氮研磨后加入 3.2 mL 提取液(62.5 mmol/L PBS, pH7.8; 0.1 mmol/L EDTA),4℃浸提 1 h 后,于 4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,-25℃保存备用。SOD、POD 活性和 MDA 含量的测定参照 Lin 等^[8]的方法。SOD 活性、POD 活性和 MDA 含量的方差分析参照明道绪^[15]的方法进行。

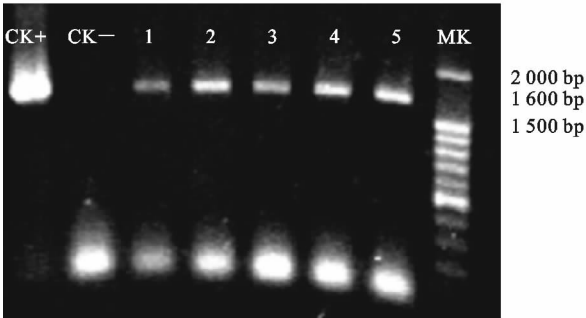


图 1 转 *PsG6PDH* 基因烟草的 PCR 检测
CK+, 阳性对照(pBG I 质粒);CK-, 阴性对照;
1~5. 转基因植株;MK. DNA Maker

Fig. 1 PCR detection of *PsG6PDH* gene transgenic tobaccos
CK+, Positive control (Plasmid pBG I);CK-, Negative control;1-5. Trangenetic plants;MK. DNA Maker

2.2 转基因烟草的抗寒性分析

为了鉴定转基因烟草的抗寒能力,本研究进行

2 结果与分析

2.1 转基因烟草的 PCR 检测和 Southern 印迹检测

将 PCR 产物用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析,结果见图 1。由图 1 可见,转基因烟草均可扩增出大小约 1 600 bp 的片段,与预期 *PsG6PDH* 基因的大小一致,而未转化的对照烟草则没有扩增到此条带,由此可初步证明该基因已整合到烟草基因组 DNA 中。Southern 印迹检测结果(图 2)进一步表明,整合到烟草基因组 DNA 上的确实是甜杨 *PsG6PDH* 基因。

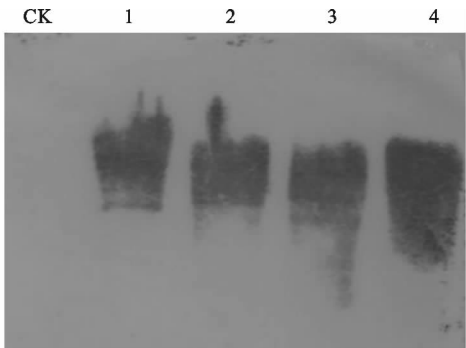


图 2 转 *PsG6PDH* 基因烟草的 Southern 检测
CK. 对照;1~4. 转基因植株

Fig. 2 Southern blotting detection of transgenic tobaccos
CK. Control;1-4. Transgenic plants

了 2 个不同的低温处理试验,其结果如图 3,4 所示。

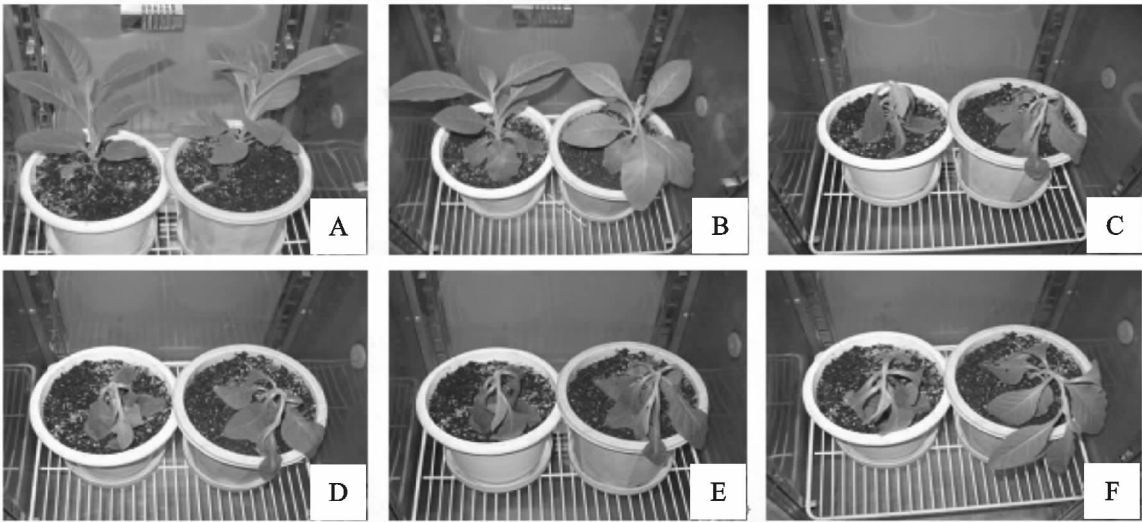


图 3 未经冷驯化的野生型烟草(对照,左)和转基因烟草(右)的低温试验
A. 低温处理前(28℃);B~F. 4℃低温分别处理 12,24,48,72,84 h

Fig. 3 Cold treatment experiment on wild type tobacco (CK,left) and transgenic tobacco (right) without cold-acclimation
A. Before cold treatment(28℃);B-F. Cold treatment at 4℃ for 12,24,48,72,84 h, respectively

由图 3 可以看出,在处理前,转基因烟草植株与对照烟草植株无明显的生长性状差异。低温处理后,未经冷驯化的转基因烟草植株较对照晚受伤害。其中,4℃处理 12 h 时,对照烟草植株基部叶片已表现出比较明显的萎蔫症状,而转基因烟草植株仍保持正常;4℃低温处理 24 h 后,转基因及对照烟草植株均出现萎蔫现象;但 4℃处理 84 h 后,转基因烟草植株已经适应低温并恢复生长,而对照烟草仍处于萎蔫状态。

由图 4 可见,在经过冷驯化的试验中,于 8~1℃持续处理 24 h,对照与转基因烟草均生长正常,表明低温锻炼可以提高烟草的抗寒力;但当温度降至近 0℃或更低温度时,对照烟草开始出现萎蔫症状,并且随着温度的下降,其萎蔫程度更加严重,而转基因烟草仅在-2℃以下才开始出现萎蔫症状,其萎蔫程度也随着温度的下降而加重,但其萎蔫程度较对照轻。

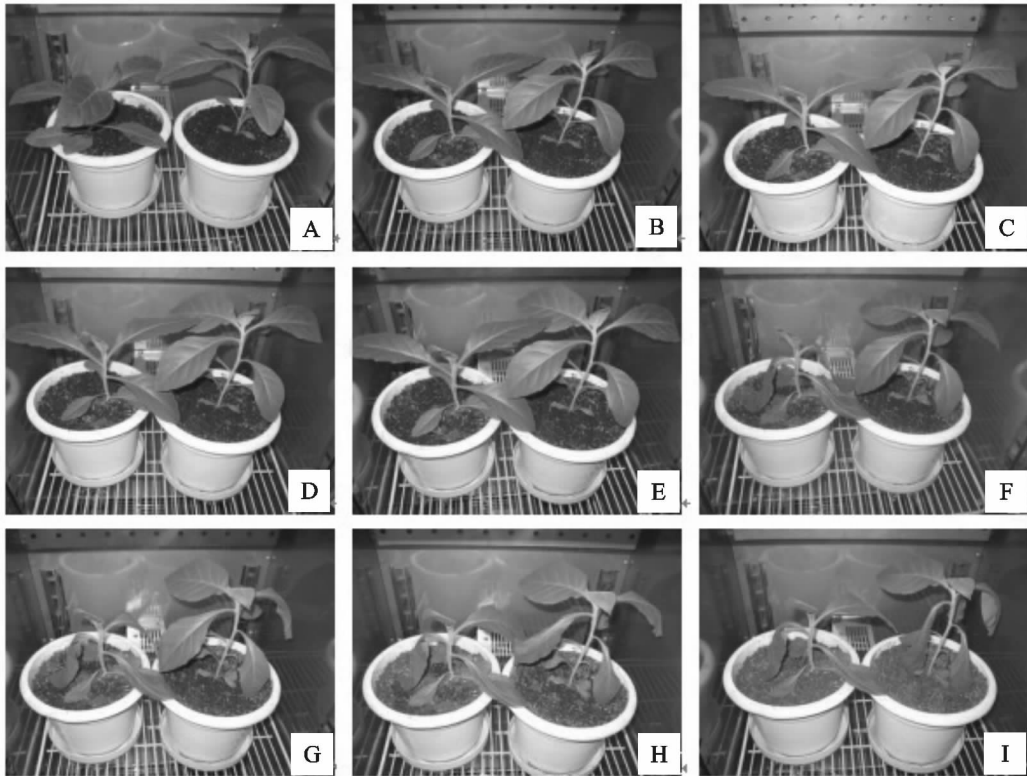


图 4 冷驯化的野生型烟草(对照,左)和转基因烟草(右)的低温试验

A. 低温处理前(15℃);B~I. 在 8,4,2.5~3.5,1~2,0~1,-1~0,-2.5~-1,-4~-3℃低温下分别处理 24 h

Fig. 4 Cold treatment experiments on wild type tobacco(CK,left) and transgenic tobacco(right) with cold-acclimation
A. Before cold treatment (15℃);B~I. Cold treatment for 24 h at 8,4,2.5~3.5,1~2,0~1,-1~0,-2.5~-1,-4~-3℃,respectively

综上可知,无论是否经过低温驯化,转基因烟草都比对照烟草显示出更强的耐低温能力;同时,低温驯化可有效提高烟草的抗寒能力,但对照烟草对低温的耐受程度不如转基因植株明显,这表明 PsG6PDH 的组成型表达的确可以增强转基因烟草的耐低温能力。

2.3 转基因烟草在低温胁迫下相对电导率的变化

当植物受到逆境影响时,细胞膜遭到破坏,膜透性增大,从而使细胞内的电解质外渗,导致植物细胞浸提液的电导率增大。因此,植物组织受低温伤害的程度可通过电导率来表示。由图 5 可以看出,在 28~-4℃,转基因烟草的相对电导率从 5.0%上升

到 40%,而对照烟草的相对电导率则从 5.0%上升到 90%,尤其在 0℃以下时,对照烟草的相对电导率显著升高,而转基因烟草则保持在一个相对稳定的水平。方差分析结果(表 1)表明,不同温度及材料间相对电导率的差异均达极显著水平。对相对电导率配合 Logistic 方程计算半致死温度(LT₅₀),结果见表 2。由表 2 可知,对照烟草的半致死温度(LT₅₀)为-0.167℃,而转基因烟草的 LT₅₀为-3.152℃,远低于对照烟草。这说明在低温胁迫下,转基因烟草细胞膜的受害程度较对照烟草小,其抗低温能力更强。

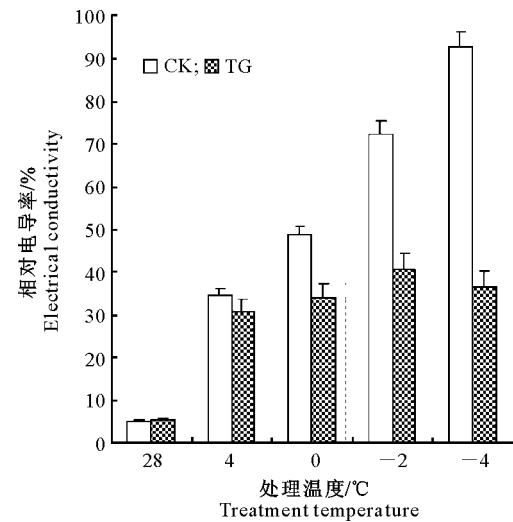


图 5 低温胁迫下转基因烟草与对照烟草相对电导率的变化
Fig. 5 Variation of electrical conductivity of tobaccos under low temperature stress

2.4 转基因烟草低温处理下 SOD、POD 活性和 MDA 含量的变化

当植物受到低温胁迫时,会产生一些破坏植物细胞膜系统的有毒物质,但植物也会通过提高一些

膜保护性酶,如 SOD 和 POD 等的活性来清除这些有毒物质,从而增强其抗寒冻性。

图 6 表明,经过冷驯化的烟草植株,在 4 ℃ 相继处理 1~5 d 后,转基因烟草的 SOD 活性一直呈升高趋势,而对照烟草则表现出先上升后下降的变化趋势。

由图 7 可以看出,转基因烟草与对照烟草的 POD 活性均随处理时间的延长呈上升趋势,但转基因烟草的 POD 活性始终大于对照烟草。

由图 8 可知,对照烟草的 MDA 含量随处理时间延长一直呈上升趋势,而转基因烟草的 MDA 含量在开始时略有上升,而后一直呈下降趋势。

对照烟草和转基因烟草的 SOD、POD 活性和 MDA 含量的方差分析结果见表 3。由表 3 可知,对照烟草和转基因烟草的 SOD、POD 活性和 MDA 含量的差异均达显著水平。上述 SOD、POD 活性和 MDA 含量的变化说明,转基因烟草能通过提高抗氧化酶活性、减少膜脂过氧化产物即 MDA 含量来增强抗寒性。

表 1 低温胁迫下烟草相对电导率的方差分析

Table 1 Variance analysis of electrical conductivity of tobaccos under low temperature stress

变异来源	df	平方和(SS)	均方(MS)	F	F _{0.01}	F _{0.05}
Source of variation		Sum of square	Mean square			
温度 Temperature	4	113.156	28.289	20.086 **	4.22	2.78
材料 Material	1	17.270	17.270	12.262 **	7.82	4.26
误差 Error	24	33.802	1.408			
总变异 Total	29	164.229				

表 2 低温胁迫下转基因烟草与对照烟草的半致死温度(LT₅₀)

Table 2 Calculation of LT₅₀ in tobacco plants under low temperature stress

材料 Material	Logistic 方程参数值 Parameter value			Logistic 方程 Logistic equation	LT ₅₀ /℃
	K	ln a	b		
CK	85.641	0.017	-0.103	y=0.103x+0.017	-0.167
TG	96.266	0.300	-0.095	y=0.095x+0.300	-3.152

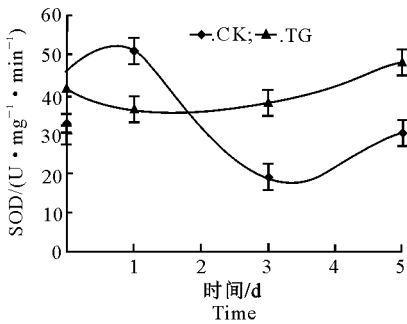


图 6 4 ℃ 低温处理下烟草 SOD 活性的变化
Fig. 6 Change in SOD activity of wild type and transgenic tobaccos during cold treatment at 4 ℃

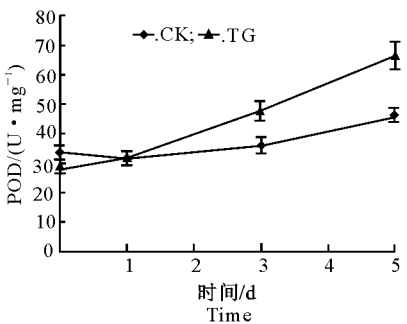


图 7 4 ℃ 低温处理下烟草 POD 活性的变化
Fig. 7 Change in POD activity of wild type and transgenic tobaccos during cold treatment at 4 ℃

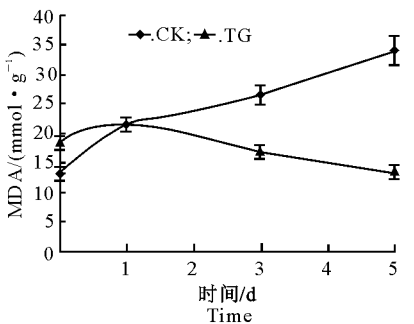


图 8 4 ℃ 低温处理下烟草 MDA 含量的变化
Fig. 8 Change in MDA content of wild type and transgenic tobaccos during cold treatment at 4 ℃

表 3 低温胁迫下烟草 SOD、POD 活性及 MDA 含量的方差分析

Table 3 Variance analysis of SOD, POD activity and MDA content of tobaccos under low temperature stress

变异来源 Source of variation	SOD						POD						MDA					
	df	SS	MS	F	F _{0.01}	F _{0.05}	df	SS	MS	F	F _{0.01}	F _{0.05}	df	SS	MS	F	F _{0.01}	F _{0.05}
时间 Time	3	9.257	3.086	5.372**	5.01	3.13	3	16.372	5.457	7.944**	5.01	3.13	3	3.146	1.049	4.041*	5.01	3.13
材料 Material	1	2.801	2.801	4.876*	8.18	4.38	1	3.428	3.428	4.990*	8.18	4.38	1	2.126	2.126	8.192**	8.18	4.38
误差 Error	19	10.914	0.574				19	13.053	0.687				19	4.930	0.259			
总变异 Total	23	22.973					23	32.853					23	10.203				

3 讨 论

目前,已从多种植物中克隆分离到 *G6PDH* 基因,但关于其与抗寒冻性之间关系的研究报道还比较少,而且至今未见关于木本植物相关基因克隆的报道。本课题组在前期研究中首次从甜杨中克隆到 *G6PDH* 基因,并发现 *G6PDH* 基因与甜杨的抗冻性密切相关^[8]。Lin 等^[2]采用生物信息学方法对 *PsG6PDH* 进行了结构分析和功能预测,然后进行了原核表达,证明所克隆到的 *PsG6PDH* 是可编码的,而且具有完整的编码框。为了进一步验证甜杨 *PsG6PDH* 基因在抗冻性中的功能和机理,本研究对其进行了烟草转化。由于植物抗寒性机制比较复杂,所以本研究选择表型低温试验、电导率测定和膜保护性酶活性变化来研究其在转基因烟草抗寒性中的功能。

低温直接损伤细胞的膜结构,使膜脂及功能蛋白受到损伤,从而破坏细胞正常的生理生化过程,因此膜结构的稳定性与植物抗寒性直接相关^[7]。POD 和 SOD 等作为内源活性氧的清除剂,能够在低温逆境中清除体内过量的活性氧,从而维持活性氧代谢的平衡,保持膜结构的稳定性,消除或减轻低温造成的伤害,因而在低温逆境中,POD 和 SOD 的活性水平与植物品种的抗寒性强弱有十分密切的关系,并可作为植物抗寒性检测的生理指标^[17]。本研究结果表明,与转美洲拟鲮 AFP 番茄相似^[18],在低温胁迫下,转 *PsG6PDH* 基因烟草的 SOD、POD 活性均高于对照烟草,而且差异显著,因而能有效清除细胞内一些过量的有毒物质(如氧自由基或过氧化物等),维持细胞膜结构的稳定,进而达到保护烟草组织细胞膜免受低温伤害的目的。转 *PsG6PDH* 基因烟草的 MDA 含量变低,表明膜脂过氧化程度下降,细胞膜越趋于正常,转基因烟草受伤害的程度越小。另外,膜透性的变化证实, *PsG6PDH* 基因的表达可维持烟草细胞膜结构的稳定。电导率测定结果

表明,在 0~−4 ℃,对照烟草与转基因烟草之间相对电导率变化的差异非常明显,对照植株从 0 ℃开始相对电导率逐渐增高,而转基因烟草则保持在一个相对稳定的水平,与美洲拟鲮 AFP 转番茄^[19]和胡萝卜 AFP 转烟草^[13]的电导率变化结果相似。同时,半致死温度计算结果表明,转基因烟草的 LT₅₀ 远低于对照烟草。由此可见,低温胁迫下,转基因烟草叶片的相对电导率比对照烟草小得多,即转基因烟草细胞膜在低温逆境下的受害程度较对照烟草轻。上述结果也许正是不论是否经过低温驯化,转基因烟草均较对照烟草表现出更强的抗寒能力的主要原因所在。综上所述, *PsG6PDH* 基因在烟草中的表达,有助于膜保护性酶 SOD 和 POD 活性的提高,可以降低 MDA 含量和电导率,即转基因烟草在生理生化水平上获得了有益的变异,从而达到提高烟草抗寒性的目的,这与前期 *G6PDH* 在甜杨抗冻性中作用机理的研究结果一致^[8]。另外,甜杨 *G6PDH* 基因在 35S 启动子驱动下,可在烟草中稳定持续地表达,且不会影响烟草的表型。

综上所述,甜杨 *PsG6PDH* 的组成型表达,不会影响烟草的表型生长,而且在低温胁迫下可以提高烟草的抗寒能力。因此,其可作为植物抗寒冻遗传改良的新的外源基因。

[参考文献]

[1] Lin S Z,Zhang Z Y,Lin Y Z. Antifreeze proteins and molecular genetic improvement in freezing resistance of plants [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(3): 251-260.

[2] Lin Y Z,Lin S Z,Zhang W, et al. Cloning and sequence analysis of a glucose-6-phosphate dehydrogenase gene *PsG6PDH* from freezing-tolerant *Populus suaveolens* [J]. Forestry Studies in China, 2005, 7(1): 1-6.

[3] Copeland L, Turner J F. The biochemistry of plants [M]. New York: Academic Press, 1987: 107-125.

[4] Graeve K, Vonschaewen A, Scheibe R. Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydro-

- genase from potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Plant Journal, 1994, 5: 353-361.
- [5] Dennis D T, Huang Y, Negm F B. Plant metabolism [M]. Harlow: Longman Press, 1997: 105-123.
- [6] Sagisak A S. Decrease of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in xylem of *Populus gelrica* on budding [J]. Plant Physiology, 1972, 50: 750-755.
- [7] Sagisak A S. Transition of metabolism in living poplar bark from growing to wintering stage and vice versa [J]. Plant Physiology, 1974, 54: 544-545.
- [8] Lin S Z, Zhang Z Y, Liu W F, et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens* [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(1): 34-40.
- [9] Dityatkin S Y, Lisovskaya K V, Panzhava N N, et al. Frozen-thawed bacteria as recipients of isolated coliphage DNA [J]. Biochemica et Biophysica Acta, 1972, 281: 319-323.
- [10] Horsch R B, Fry J, Hofmann N, et al. Plant molecular biology manual [M]. Dordrecht: Kluwer Publishers, 1988: 1-9.
- [11] 朱生伟, 史芝文, 徐淑芬, 等. 快速提取烟草 DNA 的方法 [J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(3): 275-278.
- Zhu S W, Shi Z W, Xu S F, et al. Efficient method of tobacco DNA extraction [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1998, 29(3): 275-278. (in Chinese)
- [12] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. Journal of Molecular Biology, 1975, 98: 503-517.
- [13] Fan Y, Liu B, Wang H, et al. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants [J]. Plant Cell Report, 2002, 21: 296-301.
- [14] Cui Q. Plant physiology and biochemistry: A laboratory manual [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1995: 102-109.
- [15] 明道绪. 田间试验与统计分析 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 228-230.
- Ming D X. Field experiments and statistic analyses [M]. Beijing: Science Press, 2005: 228-230. (in Chinese)
- [16] 朱根海, 刘祖祺, 朱培仁. 应用 Logistic 方程确定植物组织低温半致死温度研究 [J]. 南京农业大学学报, 1986, 9(3): 11-16.
- Zhu G H, Liu Z Q, Zhu P R. A study on determination of lethal temperature with logistic function [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1986, 9(3): 11-16. (in Chinese)
- [17] 简令成, 孙龙华, 卫翔云, 等. 从细胞膜系统的稳定性与植物抗寒性关系的研究到抗寒剂的研制 [J]. 植物学通报, 1994, 11(S2): 1-22.
- Jian L C, Sun L H, Wei X Y, et al. From the study of the stability of cellular membrane system in relation with plant cold hardiness to the creation of plant cold-resister [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1994, 11(S2): 1-22. (in Chinese)
- [18] 张 钰, 吴加林, 黄永芬, 等. 转美洲拟鲾抗冻蛋白基因 (AFP) 番茄过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性测定 [J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1998, 14(4): 85-88.
- Zhang Y, Wu J L, Huang Y F, et al. The determination of superoxidase, peroxidase and catalase activities in transgenic tomato [J]. Natural Science Journal of Harbin Normal University, 1998, 14(4): 85-88. (in Chinese)
- [19] 黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鲾抗冻蛋白基因 AFP 导入番茄的研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1997, 13(4): 418-419.
- Huang Y F, Wang Q R, Fu G Y, et al. The research on introducing flounder antigreeze protein gene (AFP) into tomato [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 13(4): 418-419. (in Chinese)