

# 甜菜碱提高植物抗寒性的机理及其应用

韩冬芳<sup>1,2</sup>, 李雪萍<sup>1\*</sup>, 李 军<sup>1</sup>, 陈维信<sup>1</sup>, 黄培钊<sup>2</sup>, 段继贤<sup>2</sup>

(1. 广东省果蔬保鲜重点实验室, 华南农业大学园艺学院, 广州 510642; 2. 深圳市芭田生态工程股份有限公司, 广东 深圳 518105)

**摘要:** 甜菜碱是植物重要的渗透调节物质, 在低温等逆境条件下, 许多植物细胞中迅速积累甜菜碱以维持细胞的渗透平衡。对近几年来甜菜碱提高植物抗寒性的机理研究及其应用, 包括甜菜碱的生物合成途径、低温胁迫下甜菜碱对植物的保护机理、甜菜碱合成酶基因的转化及外源甜菜碱在植物抗寒中的应用进行了综述。

**关键词:** 甜菜碱; 抗寒性; 植物

中图分类号: Q945.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)02-0210-07

## Mechanism of Improving Cold Resistance of Plant by Glycine Betaine and Its Application

HAN Dong-fang<sup>1,2</sup>, LI Xue-ping<sup>1\*</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, CHEN Wei-xin<sup>1</sup>, HUANG Pei-zhao<sup>2</sup>, DUAN Ji-xian<sup>2</sup>

(1. *Guangdong Key Laboratory for Postharvest Science and Technology, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; China; 2. Shenzhen Batian Ecotypic Engineering Co., Ltd, Shenzhen 518105, China*)

**Abstract:** Glycine betaine is an important osmotic regulator in plants. Many plant cells rapidly accumulate glycine betaine under adverse conditions, including low temperature to maintain an osmotic balance. This article provides an overview of the mechanism of improving cold resistance of plant by glycine betaine and its application, including glycine betaine biosynthesis, its protection mechanism under cold stress, the transformation of glycine betaine synthetase genes, and the effect of exogenous glycine betaine on improving cold resistance of plant.

**Key words:** Glycine betaine; Cold resistance; Plant

温度是决定植物地域分布的主要限制因子,也是栽培条件下影响农作物及园艺作物产量和品质的主要因素。阐明植物的抗寒机理及提高植物抗寒性一直是一个重要的研究课题。植物在长期的演化过程中形成了许多抵抗低温胁迫及其它非生物胁迫的保护机制,其中普遍存在的方式是迅速合成并积累大量可溶性小分子化合物,包括多羟基糖醇、氨基酸、氨基酸衍生物及季铵化合物等<sup>[1]</sup>。在逆境下,这些代谢物的主要功能是作为渗透调节物质保持细胞的含水量,并有效地保护蛋白质和生物膜的结构和功能,从而维持细胞的正常生理功能<sup>[2]</sup>。甜菜碱是其中重要的一类季铵化合物,其化学名称为 N-甲基代氨基酸,在细菌、蓝细菌、藻类、动物和植物中普遍存在<sup>[3]</sup>。高等植物中的甜菜碱

主要有 12 种,最简单也是最早被发现和研究得最多的是甘氨酸甜菜碱(Glycine betaine),简称甜菜碱(Betaine)。甜菜碱与植物的抗逆性关系密切,在低温、干旱、盐等胁迫下,许多植物可通过积累甜菜碱提高抗逆性;通过施用外源甜菜碱也可提高某些植物的抗寒性和抗盐性<sup>[4]</sup>。本文主要综述甜菜碱与植物抗寒性的关系及其在提高植物抗寒性中的应用前景。

### 1 甜菜碱的生物合成途径

目前,已报道 3 种不同的甜菜碱生物合成途径,分别存在植物、大肠杆菌及球形节杆菌中,分别受不同基因的调控<sup>[5]</sup>。高等植物的 28 科中都有甜菜碱分布,特别是禾本科(Gramineae)和藜科

收稿日期:2009-03-12 接受日期:2009-07-16

基金项目:国家自然科学基金-广东省联合基金项目(U0631004); 国家科技支撑计划(2006BAD22B04, 2006BAD30B06); 广东省自然科学基金团队项目(06200670); 农业部科技项目(nycytx-33, nyhyzx07-029, nyhyzx07-030)资助

\* 通讯作者 Corresponding author, email: kxp88@scau.edu.cn

(Chenopodiaceae)植物。植物体内甜菜碱是由胆碱经过两步脱氢氧化反应来合成的。第一步是在胆碱单加氧酶(Choline monooxygenase, CMO)催化下,将胆碱氧化为甜菜碱醛;第二步在甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)催化下将甜菜碱醛氧化为甜菜碱。CMO 和 BADH 均由单一核基因编码并存在于叶绿体基质内<sup>[4]</sup>,光诱导下促进甜菜碱合成<sup>[6]</sup>。另有研究报道,甜菜碱不仅在叶片内合成,在根系也有合成<sup>[7]</sup>;而且除光诱导外,脱落酸也可以诱导甜菜碱合成<sup>[8]</sup>。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)等细菌能从外界吸收胆碱经由甜菜碱醛氧化为甘氨酸甜菜碱。从大肠杆菌中已分离到 4 个基因: *betA*、*betB*、*betI* 和 *betT*;它们分别编码胆碱脱氢酶(CDH)、甜菜碱醛脱氢酶、*bet* 操纵子胆碱感应阻遏物、胆碱运转蛋白。*bet* 基因受甜菜碱、温度、渗透、氧气及胆碱等在转录水平上调控;CDH 是一种赖氧、跨膜、与电子传递相关的黄素蛋白,可将胆碱氧化为甜菜碱醛;也可在离体条件下催化甜菜碱醛到甘氨酸甜菜碱的氧化反应,但不能确定活体条件下的情况,因为 CDH 对甜菜碱醛的亲合力低于 BADH<sup>[9]</sup>。另一胆碱氧化酶基因(*COD*)从球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)中分离出来,该酶根本不需要任何协作因子,直接以氧作为原初电子受体,可以催化甜菜碱合成途径中的两个反应,将胆碱氧化为甜菜碱。胆碱氧化酶(COD)只在微生物中发现<sup>[4]</sup>。从土壤菌(*Arthrobacter pascens*)中分离了胆碱氧化酶基因 *codA*<sup>[10]</sup>。Rozwadowski 等<sup>[11]</sup>报道尽管 *codA* 可以催化甜菜碱合成途径中的两个反应,但甜菜碱醛到甜菜碱反应的催化活性还是以 BADH 为主,因为 BADH 对甜菜碱醛的  $K_m$  是 COX 的 1/28 ~ 1/17。

## 2 甜菜碱对低温胁迫下植物的保护作用

甜菜碱广泛存在于生物细胞中<sup>[3,12]</sup>,不带净电荷而且溶解度很高。许多农作物在逆境胁迫下可合成积累甜菜碱<sup>[13-18]</sup>,如甜菜(*Beta vulgaris*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)和高粱(*Sorghum halepense*)。低温可诱发甜菜碱在植物体内的积累。Koster 等<sup>[19]</sup>将黑麦品种‘Puma’在寒冷中培育 4 周,在这期间甜菜碱的含量从 287  $\mu\text{g g}^{-1}$  增加到 1294  $\mu\text{g g}^{-1}$ 。

植物抗寒力的强弱与低温下甜菜碱的增加量呈正相关关系,甜菜碱增加越多的品种抗寒力越强。Kishitani 等<sup>[20]</sup>研究表明,大麦抗寒能力与甜菜碱的积累密切相关;抗寒力强的品种在低温下(5℃)甜菜碱含量比常温增加 5 倍左右,而抗寒力弱的品种仅增加 2 倍。Kamata 等<sup>[21]</sup>研究了 3 个不同抗寒力的小麦品种‘Norster’ (NO)、‘Chihoku-komugi’ (CH)和‘Haruyutaka’ (HA),抗寒力为 NO > CH > HA,抗寒锻炼 2 周后,3 个品种都有甜菜碱积累,以 NO 含量最高,HA 含量最少。Rhodes 等<sup>[22]</sup>研究表明玉米不同品种的抗寒力强弱与甜菜碱的积累速度也是密切相关的。

甜菜碱作为细胞内重要的渗透调节物质,能有效维持低温下蛋白质和生物膜的结构和功能。 $C_4$ 植物玉米易受低温伤害;外施甜菜碱可提高低温下玉米叶片中与  $C_4$ 途径相关的丙酮酸磷酸二激酶的活性及减轻膜脂过氧化程度<sup>[23]</sup>。Coughlan 等<sup>[24]</sup>研究表明,在低温胁迫下,甜菜碱可减轻低温对菠菜叶绿体类囊体的伤害。笔者研究也发现,叶面喷施甜菜碱能提高香蕉幼苗(6 叶 1 心)抗寒力,在 7℃胁迫 24 h,电子显微镜下对照的叶绿体基粒松散,片层排列紊乱,基粒片层解体;而经甜菜碱(10 mmol/L)处理的叶绿体基粒结构较完整,片层排列较整齐(图 1)(待发表)。Chen 等<sup>[25]</sup>对玉蜀黍(*Zea mays*)的研究表明,施用甜菜碱可提高玉蜀黍悬浮培养细胞和幼苗的抗寒力,且抗寒力随着外施甜菜碱浓度(1.0 ~ 2.5 mmol/L)的增加而提高,这主要是因为降低了细胞膜的脂质过氧化程度。Zhao<sup>[26]</sup>等对苜蓿(*Medicago ruthenica*)的研究表明,外施 200 mmol/L 甜菜碱可提高抗寒力,在 -6℃下甜菜碱处理的植株花冠存活率达 67%,而对照的花冠全部死亡,认为甜菜碱是通过保护低温下细胞膜的完整性,而提高了苜蓿的抗寒力。

甜菜碱在叶绿体中含量丰富,在逆境下保护类囊体膜结构,从而保持较高的光合速率<sup>[27-28]</sup>。甜菜碱在极端温度、盐胁迫或 pH 下通过保持光系统 II (PS II)复合体蛋白的稳定性来维持光系统的活性<sup>[29]</sup>。从蓝藻(*Phormidium laminosum*)中分离 PS II 颗粒时,甜菜碱可阻止高温下 9 kDa 的蛋白从膜上洗脱掉,从而抑制放氧活力的下降<sup>[30]</sup>。Mohanty 等研究表明逆境下甜菜碱可稳定叶绿体 PS II 放氧复合体中锰簇的结构。Sakamoto<sup>[31]</sup>等报道转 *codA* 基

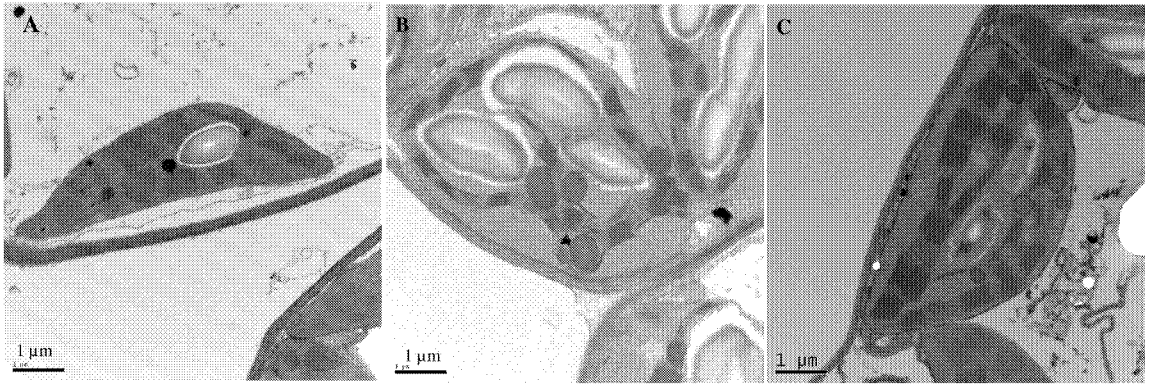


图 1 香蕉叶片叶绿体超微结构

Fig. 1 The ultrastructure of chloroplast in leaves of banana seedling

A: 室温 Room temperature; B: 低温 Low temperature; C: 低温甜菜碱处理 Betaine + low temperature

因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株可在叶绿体内合成并积累甜菜碱,减轻低温对光合作用的抑制。Allard 等<sup>[32]</sup>报道外施 250 mmol/L 甜菜碱可提高小麦品种 Glenlea 和 Fredrick 的抗寒力,低温半致死温度(LT<sub>50</sub>)降低 5℃,减轻低温对光系统 II 反应的抑制,稳定了光系统 II 的电子传递链。

还有研究表明甜菜碱诱导与抗寒相关基因的表达。Allard 等<sup>[32]</sup>报道甜菜碱处理诱导了小麦抗寒基因 *wcor410* 和 *wcro413* 的表达;但也有研究指出甜菜碱提高植物抗寒性并没有诱导与抗寒相关基因的表达。Sakamoto 等<sup>[31]</sup>研究表明,转 *codA* 基因植株可在叶绿体内合成积累甜菜碱,并且提高抗寒力;但 Northern 杂交分析表明,转基因植株抗寒力的提高与低温诱导表达的基因无关,认为甜菜碱诱导小麦抗寒力的提高与抗寒锻炼提高小麦抗寒力的生理生化机制相类似。Rajashaker<sup>[33]</sup>等研究表明经抗寒锻炼 4 周后的草莓(*Fragaria ananassa*),甜菜碱含量增加 2 倍,抗冻温度由 -5.8℃ 降到 -17℃,抗寒力大大增加;外施 2 mmol/L 甜菜碱也可提高草莓在低温下的存活率。转 *codA* 基因的番茄(*Lycopersicon esculentum*),可适度增加植株 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量,激活了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的抗寒途径,增强了转基因植株的抗寒性<sup>[34]</sup>。Park 等<sup>[35]</sup>报道,喷施甜菜碱后番茄植株的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量、过氧化氢酶活性及过氧化氢酶基因(*CAT1*)表达量都高于对照。

另外,甜菜碱的这些细胞保护功能可能同它自身的与高分子结构和功能的亲合性有关。江香梅等<sup>[36]</sup>认为,植物体内低浓度的甜菜碱是不足以起到渗透调节作用的,也不可能充当抗氧化剂,甜菜碱此时起稳定膜的结构和蛋白质功能的作用。

Bateman 等<sup>[37]</sup>证明,甜菜碱能够稳定蛋白质的三级结构,阻止或逆转由一些非相容性溶质对蛋白质三级结构的破坏。Nomura 等<sup>[38]</sup>认为,在受到逆境胁迫时,甜菜碱起到一种低分子量的伴侣分子(chaperone)作用,稳定酶蛋白的构象并使酶处于有功能的状态。Coughlan 等<sup>[24]</sup>认为甜菜碱本身是季铵化阳离子,可与膜外蛋白上的羧基阴离子相互作用,从而稳定了低温下细胞膜的结构。

### 3 甜菜碱提高植物抗寒性的应用

#### 3.1 甜菜碱合成酶基因的转化及其应用

从大肠杆菌中分离到甜菜碱合成酶基因(*betA*、*betB*、*betI*、*betT*),从土壤菌中分离的胆碱氧化酶(COX)基因 *codA*,植物的 CMO 和 BADH 也已分离纯化,编码 CMO 和 BADH 的基因也已成功克隆。由于甜菜碱合成途径相对简单,进行遗传操作非常方便,且已证明甜菜碱合成后几乎不再进一步代谢,属于永久性 or 半永久性渗透调节剂,因此,甜菜碱合成酶基因被认为是最重要和最有希望的胁迫抗性基因之一<sup>[39]</sup>。

*codA* 基因和 *betA* 基因在多种植物的叶绿体基质或细胞质中表达,并积累一定量的甘氨酸甜菜碱,起到显著保护细胞的作用。许多农作物如水稻(*Oryza latifolia*)、芥菜(*Brassica juncea*)、拟南芥、烟草(*Nicotiana tabacum*)、番茄<sup>[3,35]</sup>等自身并不能积累甜菜碱,如果利用基因工程技术,把与甜菜碱合成相关的基因转入作物并使之表达合成积累甜菜碱,可能达到增强作物抗寒力的目的。迄今为止,已有不少植物被成功地导入了 *codA* 基因及其它与甜菜碱合成相关的基因,在不同程度上提高了这些植物的耐寒性。将大肠杆菌的合成甜菜碱基因转入烟草

中,减轻了低温对转基因植株光合作用的抑制、增强了抗氧化能力,从而提高了转基因植株的抗寒力<sup>[40-41]</sup>。Quan等<sup>[42]</sup>将 *betA* 基因转入玉米,结果在10℃和15℃下转基因植株种子具有较强的萌发力;在低温胁迫下,转基因植株的光合速率较高,细胞膜伤害小。Park等<sup>[34]</sup>将 *codA* 基因转入番茄,转基因植株的叶片和果实中能积累甜菜碱,且在低温胁迫下,植株的各发育阶段转基因植株的抗寒力都强于野生型,产量提高10%~30%。对转 *codA* 基因拟南芥的研究表明,低温胁迫下,转基因植株种子比野生型的萌发力强,且幼苗没有明显的冷害症状<sup>[43]</sup>。

### 3.2 外源甜菜碱的应用

外施甜菜碱可提高植物的抗寒性。Xing等<sup>[8]</sup>报道,叶面喷施10 mmol/L甜菜碱,拟南芥的抗冻温度由-3.1℃降低到-4.5℃,明显提高了抗冻力。番茄自身不能合成积累甜菜碱,叶面喷施1 mmol/L甜菜碱可提高植株不同生长时期的抗寒性<sup>[35]</sup>。李芸瑛等<sup>[44-45]</sup>研究表明,以5 mmol/L甜菜碱根施黄瓜(*Cucumis sativus*)幼苗24 h,低温胁迫(6℃)5 d后,叶片中叶绿素含量的下降减缓,净光合速率和抗氧化酶活性保持较高,减少丙二醛积累,细胞膜保持相对完整,幼苗存活率提高;电镜观察表明,甜菜碱处理的黄瓜幼苗叶绿体膜结构保持完好,而对照的叶绿体基粒破坏严重。苏文潘等<sup>[46]</sup>用2.5~

10 mmol/L的甜菜碱喷施5叶1心的巴西香蕉苗,在7℃处理24 h后,降低了香蕉幼苗叶片细胞膜脂过氧化水平和细胞膜透性增加的程度,减小了SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)活性的下降幅度,并提高了CAT(过氧化氢酶)活性,从而提高香蕉幼苗的抗冷能力,尤以7.5 mmol/L甜菜碱处理的效果最好。黄丽华等<sup>[47]</sup>研究表明甜菜碱浸种能够提高低温胁迫下幼苗脯氨酸含量、蛋白质含量及抗氧化酶的活性,降低丙二醛的积累和相对电导率,提高了玉米幼苗的抗寒力,最适甜菜碱浓度为20 mmol/L。另外,对鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)施用1 mmol/L的外源甜菜碱,低温胁迫下,可增加叶片的相对含水量、叶绿素和蔗糖含量,降低丙二醛和过氧化氢的含量;在生殖生长阶段,可促进花器官的形成,增加柱头对花粉的亲合力,提高花粉萌发率,促进花粉管的伸长,从而增加低温胁迫下鹰嘴豆的产量<sup>[48]</sup>。笔者的研究表明,叶面喷施5~15 mmol/L甜菜碱可提高香蕉幼苗(6叶1心)的抗寒力,降低冷害指数;用5~15 mmol/L甜菜碱浸泡香蕉果实,也可减轻冷害温度(10℃、7℃和5℃)下果实贮藏的冷害症状,均以10 mmol/L甜菜碱处理的效果最好(待发表)。其它植物外施甜菜碱也取得明显的抗寒效果,如苜蓿<sup>[26]</sup>、玉米<sup>[25]</sup>、小麦<sup>[32]</sup>、草莓<sup>[33]</sup>等,但不同植物施用甜菜碱的浓度和方式不同(表1)。

表1 不同植物施用甜菜碱的方式和浓度

Table 1 The methods and concentration of exogenous glycine betaine for different plants

植物 Species	方式 Method	浓度 Concentration (mmol/L)	参考文献 Reference
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	叶面喷施 Leaf spray	10	11
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	叶面喷施 Leaf spray	200	26
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	叶面喷施 Leaf spray	250	32
草莓 <i>Fragaria ananassa</i>	叶面喷施 Leaf spray	2	33
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	叶面喷施 Leaf spray	1	35
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	根施 Root apply	5	44~45
香蕉(幼苗) <i>Musa nana</i> (Seedling)	叶面喷施 Leaf spray	2.5~10	46
玉米 <i>Zea mays</i>	浸种 Seed soaking	20	47
鹰嘴豆 <i>Cicer arietinum</i>	叶面喷施 Leaf spray	1	48
香蕉(果实) <i>Musa nana</i> (Fruit)	浸泡 Immersion	5~15	待发表 Unpublished

通过基因工程手段将甜菜碱合成酶基因转入植物中,促进了植物体内甜菜碱的合成和积累,增强植物的抗寒性,该技术有广阔应用前景。而外源甜菜碱则是一条更安全更直接的方法,使自身不能合成或合成较少甜菜碱植物通过增加甜菜碱含量

来提高抗逆境能力<sup>[49-53]</sup>。Makela等<sup>[50]</sup>研究了叶面喷施<sup>14</sup>C标记甜菜碱对植物球茎甘蓝(*Brassica oleraces*)、大豆(*Glycine max*)、豌豆(*Pisum sativum*)、番茄和春小麦吸收和运输甜菜碱的影响,表明球茎甘蓝在喷施2 h后,根中已检测到甜菜碱,6 h后甜

菜碱已遍布整个植株;17 d 后所有叶片中仍含有甜菜碱。这表明植物可吸收外源甜菜碱,并将其运输到植株的其它器官,通常情况下甜菜碱是不易分解的,在植物体内积累发挥持久效应,从而提高了植物的抗逆性。外施甜菜碱时,同时使用表面活性剂可增加渗透效率<sup>[54]</sup>。糖用甜菜的根中含有大量甜菜碱,达 0.3%~0.7%,甜菜碱可在制糖工艺过程中逐渐富集,二次结晶蔗糖后的废糖蜜中含量达 3%~8%,所以废糖蜜是提取甜菜碱主要原料<sup>[55]</sup>,这大大节约了甜菜碱制备的成本,也使得甜菜碱应用于农业生产成为可能。

## 4 结语

今后对甜菜碱的研究仍主要集中在甜菜碱生理功能和转基因植物方面。向植物中导入与甜菜碱合成相关的基因,可以提高一些重要酶类的活性、提高植物甜菜碱积累水平,进而增强植物的抗寒性。但是从目前已转化成功的植株(如 *codA*、*betA* 及 *betB* 转基因植物)来看,尽管在它们体内都检测到了甜菜碱的积累并在胁迫下具有显著的保护作用,但转基因植物的甜菜碱含量均不超过  $1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ <sup>[56]</sup>;这仅是能自身合成并积累甜菜碱的物种的 1%~10%<sup>[3]</sup>,而且植物的抗寒性为数量性状,受微效多基因控制,因此,通过甜菜碱基因工程来改善植物的抗寒性有一定限度,需要辅以其它的手段,如寻找更有效的抗寒基因或多个基因的联合使用。外施甜菜碱可有效提高植物的抗寒性,但不同物种施用的适用浓度、时间和方式、同一品种的不同生育时期、同一植株的不同部位都不同,需进一步深入研究。甜菜碱提高植物抗寒性的研究应将室内试验与大田实践结合起来,以期能够在农业生产中尽快得到应用。

另外,研究表明微生物体内甜菜碱的信号转导是通过 ABC 转运系统(ATP-binding cassette transporter)实现的<sup>[57]</sup>,植物体内甜菜碱是通过何种信号途径诱导与抗寒有关的生理生化反应过程的,还需要进一步研究探讨。

## 参考文献

[1] Bohnert H J, Jensen R J. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants [J]. Trends Biotechnol, 1996, 14: 89-97.  
 [2] Yancey P H, Clark M E, Hand S C. Living with water stress: evolution of osmolyte systems [J]. Science, 1982, 217: 1214-1222.  
 [3] Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants [J]. Annu Rev Plant Physiol

Plant Mol Biol, 1993, 44: 357-384.  
 [4] Hanson A D, May A M, Grument R. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 3678-3682.  
 [5] Atsushi S, Norio M. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: Current status and implications for enhancement of stress tolerance [J]. J Exp Bot, 2000, 51: 81-88.  
 [6] Jagendorf A T, Takabe T. Inducers of glycine betaine synthesis in barley [J]. Plant Physiol, 2001, 127(4): 1827-1835.  
 [7] Arakawa K, Katayama M, Takabe T. Level of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves and etiolated leaves and roots of barley [J]. Plant Cell Physiol, 1990, 31: 797-803.  
 [8] Xing W B, Rajashekar C B. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Environ Exp Bot, 2001, 46(1): 21-28.  
 [9] Lamark T, Kaasen I, Eshoo M W. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 1991, 5: 1049-1064.  
 [10] Hayashi H A, Mustard Y L, Deshmittm P. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress [J]. Plant J, 1997, 12: 133-142.  
 [11] Rozwadowski K L, Khacharourians G G, Selvaraj G. Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmotic stressing in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1991, 173: 472-478.  
 [12] Csonka L K. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic responses of bacteria to osmotic stress [J]. Microbiol Rev, 1989, 53: 121-147.  
 [13] Weinberg R, Lerner H R, Poljakoff M A. Changes in growth and water soluble solute concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium [J]. Physiol Plant, 1984, 62: 472-480.  
 [14] Yang W J, Rich P J, Axtell J D. Genotypic variation for glycine betaine in *Sorghum* [J]. Crop Sci, 2003, 43: 162-169.  
 [15] Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants [J]. Annu Rev Plant Physiol, 1993, 44: 357-384.  
 [16] Fallon K M, Phillips R. Responses to water stress in adapted carrot cell suspension cultures [J]. J Exp Bot, 1989, 40: 681-687.  
 [17] Mccue R F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application [J]. Tibtechn, 1990, 8: 358-362.  
 [18] Ashraf M, Foolad M R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance [J]. Environ Exp Bot, 2007, 59: 206-216.  
 [19] Koster K L, Lynch D V. Solute accumulation and compartmentation during the acclimation of pumarye [J]. Plant Physiol, 1992, 98(1): 108-113.  
 [20] Kishitan I S, Watanabe K, Yasuda S. Accumulation of glycine betaine during gold-acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants [J]. Plant Cell Environ, 1994, 17 (1): 89-95.

- [21] Kamta T, Uemura M. Solute accumulation in wheat seeding during cold accumulation: Contribution to increased freezing tolerance [J]. *Cryoltrters*, 2004, 25(5): 311-322.
- [22] Rhodes D, Pich P J, Brunk D G. Development of two isogenic sweet corn hybrids differing for glycine betaine cotent [J]. *Plant Physiol*, 1989, 91: 1112-1121.
- [23] Krall J B, Edwards G E, Andreo C S. Protection of puruvate, Pi dikinase from maize against cold lability by compatible solutes [J]. *Plant Physiol*, 1989, 89: 280-285.
- [24] Coughlan S J, Heber U. The role of glycine betaine in the protection of spinach thylakoids against freezing stress [J]. *Planta*, 1982, 156(1): 62-69.
- [25] Chen W P, Li P H, Chen T H H. Glycine betaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. [J]. *Plant Cell Environ*, 2000, 23(6): 609-618.
- [26] Zhao Y, Aspinall D, Paleg L G. Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycine betaine against the effects of freezing [J]. *J Plant Physiol*, 1992, 140(5): 541-543.
- [27] Robinson S P, Jones G P. Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress [J]. *J Plant Physiol*, 1986, 13: 659-668.
- [28] Genard H, Lesaos J, Hillard J. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1991, 29: 421-427.
- [29] Mohanty P, Hayashi H, Papageorgiou G C. Stabilization of the manganese-cluster of the oxen-enveloping complex by glycine betaine [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1144: 92-96.
- [30] Constantine S, George C. Stabilization of photosystem II particles isolated from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum* with glycine betaine and glycerol [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1183: 333-338.
- [31] Sakamoto A, Valverde R, Alia L. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *coda* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants [J]. *Plant J*, 2000, 22(5): 449-453.
- [32] Allard F, Houde M, Krol M. Betaine improves freezing tolerance in wheat [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(11): 1194-1202.
- [33] Rajashekar C B, Zhou H, Marcum K B. Glycine betaine accumulation and induction of cold tolerance in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) plants [J]. *Plant Sci*, 1999, 148: 175-183.
- [34] Park E J, Jeknic Z, Sakamoto A. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage [J]. *Plant J*, 2004, 40(4): 474-487.
- [35] Park W J, Jeknic Z, Tony H. Exogenous application of glycine betaine increase chilling tolerance in tomato plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(6): 706-714.
- [36] Jiang X M(江香梅), Huang M R(黄敏仁), Wang M M(王明麻). A review on betaine —— Biosynthesized pathway and genetic engineering in plants [J]. *J Chin Biotechn(中国生物工程杂志)*, 2002, 22(4): 49-56.(in Chinese)
- [37] Batenan J B, Evans G F, Brown P R. Dielectric properties of the system bovine albumin urea: Betaine in aqueous solution [J]. *Phys Med Biol*, 1992, 37: 175-182.
- [38] Nomura M, Hibino T, Takabe T. Transgenically produced glycine betaine protects ribulose-1,5-bisphodphate carboxylase/oxygenase from inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(4): 425-432.
- [39] Lerudulier D, Strom A R, Dandekar A M. Molecular biology of osmoregulation [J]. *Science*, 1984, 224: 1064-1068.
- [40] Kjell O H, Susanne S, Abulum A L. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine [J]. *J Exp Bot*, 2000, 343(51): 177-185.
- [41] Daniela P, Sergei I, Tatyana K, et al. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42: 57-63.
- [42] Quan R, Shang M, Zhang H. Improver chilling tolerance by transformation with *beta* gene for the enhancement of glycine betaine synthesis in maize [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 141-149.
- [43] Alia H H, Chen T H. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis thaliana* during germination and early growth [J]. *Plant Cell Environ*, 1998, 21(2): 232-239.
- [44] Li Y Y(李芸瑛), Liang G L(梁广坚), Li Y H(李永华). Effects of exogenous betaine on cold resistance of cucumber seedlings [J]. *Plant Physiol Commun(植物生理学通讯)*, 2004, 40(6): 673-673. (in Chinese)
- [45] Li Y Y(李芸瑛), Liang G L(梁广坚). Effects of GB on the chloroplast and isozymes of SOD and POD of cucumber seedlings under cold stress [J]. *Biotechnology(生物技术)*, 2005, 15(3): 25-27.(in Chinese)
- [46] Su W P(苏文潘), Li M F(李茂福), Huang H S(黄华孙). Effect of betaine on activities of membrane protective enzymes in banana seedlings under low temperature stress [J]. *Guangxi Agri Sci(广西农业科学)*, 2005, 36(1): 21-23.(in Chinese)
- [47] Huang L H(黄丽华). Effect of exogenous betaine on cold resistance of corn seedlings [J]. *Hubei Agri Sci(湖北农业科学)*, 2006, 45(2): 168-170.(in Chinese)
- [48] Nayyar H, Chander K, Kumar S, et al. Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea [J]. *Agron Sustain Devel*, 2005, 25(3): 381-388.
- [49] Agboma P, Sinclair T, Jokinen K, et al. An evaluation of the effect of exogenous glycine betaine on the growth and yield of soybean [J]. *Field Crops Res*, 1997, 54: 51-64.
- [50] Makela P, Jokinen K, Kontturi M. Foliar application of glycine betaine a novel product from sugarbeet as an approach to increase tomato yield [J]. *Ind Crops Prod*, 1998, 7: 139-148.
- [51] Yang X, Lu C. Photosynthesis is improved by exogenous glycine betaine in salt-stressed maize plants [J]. *Plant Physiol*, 2005, 124: 343-352.
- [52] Makela P, Peltonensaino P, Jokinen K. Uptake and translocation of foliar-applied glycine betaine in crop plants [J]. *Plant Sci*, 1996, 121(2): 221-230.

- [53] Bray E A, Bailey-serres J, Weretilnyk E. Responses to abiotic stress: Biochemistry and molecular biology of plants [J]. *Amer Soc Plant Physiol*, 2000, 34:1158-1203.
- [54] Subbarao G V, Wheeler R M, Levine L H, et al. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply [J]. *J Plant Physiol*, 2001, 158:767-776.
- [55] Man C(满晨), Liu Q S(刘庆生). The preparation and application of betaine [J]. *Chem Sci Techn Market(化工科技市场)*, 2001, 7: 21-22.(in Chinese)
- [56] Mcneil S D, Nuccio M L, Hanson A D. Betaines and related osmoprotectants: Targets for metabolic engineering of stress resistance [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120:945-949.
- [57] Tiemen V H, Marc C A, Bert P M. On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine [J]. *EMBO J*, 2001, 24(20): 7022-7032.