

植物抗冷性分子生物学研究进展(综述)

李美茹, 刘鸿先, 王以柔

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

关键词: 植物抗冷性; 膜脂; 冷诱导蛋白; 细胞抗氧化能力; 钙信号系统

中图分类号: Q945.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2000)01-0070-11

ADVANCES IN RESEARCHES ON MOLECULAR BIOLOGY OF PLANT COLD RESISTANCE

LI Mei-ru, LIU Hong-xian, WANG Yi-rou

(*South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China*)

Abstract: In this review, we briefly give an overview of molecular approaches that have been successfully taken in the studies on plant cold tolerance. In particular, we discuss the role of membrane lipid, cellular antioxidative ability, cold regulatory proteins, and calcium messenger system on the regulation of plant cold tolerance. Strategies and perspectives in using molecular biology to improve cold tolerance of plants are outlined.

Key words: Plant cold tolerance; Membrane lipid; Cold regulatory protein; Cellular antioxidative ability; Calcium messenger system

温度是植物生长的必要条件, 然而低温却是限制作物生产的重要因素, 为此, 各国政府及研究部门一直都将植物低温适应性作为一个重要的研究课题。按照低温的不同程度, 植物的低温伤害可分为冷害(chilling injury; 零上低温对植物的伤害)和冻害(freezing injury; 零下低温对植物的伤害)两大类。早期关于植物冷害机理和抗冷机理的研究, 是从比较冷敏感(chilling-sensitive)植物和抗冷(chilling-insensitive)植物或比较未经冷驯化的植物(non-cold-acclimation)和冷驯化(cold-acclimation)植物的实验设计入手, 从水分平衡; 碳水化合物、氨基酸、核酸、蛋白质水平; 细胞壁特性; 原生质膜的结构功能及其稳定性; 细胞器结构功能的完整性; 生长调节物质的作用; 膜脂去饱和和作用等方面进行分析研究。研究结果表明: 植物的抗冷力提高是与可溶性糖、膜磷脂、游离氨基酸、特别是脯氨酸、脱落酸(ABA)、膜脂肪酸的不饱和度的增加或多少有关, 并指出维持膜系统功能结构的稳定性是维持和发展植物抗冷力的基础^[1-9]。但以上实验未能直接论证这些现象与植物抗冷力增加具有因果关系。从80年代以来, 较多的研究工作是关于植物膜保护系统组分和活性与植物冷害, 冷驯化后植物抗冷力变化的关系, 蛋白质在植物冷驯化前后的变化^[10-12]。但这些研究结果也只是停留在描述膜保护系统、冷诱导特异蛋白(cold acclimation induction protein, CAIP; cold regulatory protein,

CORP)的变化与植物抗冷力形成的关系。由于生物工程技术的迅猛发展和向生命科学各领域的渗透,使得研究某一关键物质与植物抗冷性调节的因果关系,特别是研究低温信号如何被转导,进而调节相应的生理变化的研究变得可能,因此,近年来的研究越来越多地采用基因工程技术,根据以前的实验结果和理论,研究某些重要物质或发现新的物质与植物抗冷力调控的关系,现已取得了一些很重要的结果,克隆了一些与调节植物抗冷力密切相关的基因,初步描绘了植物低温信号转导的示意图,这将为进一步揭示植物冷适应性的调控机理、在生产实践中提高植物的抗冷力,找到深入研究的方向。本文对近年来植物抗冷性研究的热点和突出成果作一简述,并对植物抗冷性分子机理作一简单讨论。

1 膜脂与植物抗冷性的关系

细胞膜的流动性和稳定性是细胞乃至整个植物体赖以生存的基础。1973年, Lyons^[2]根据细胞膜结构与抗冷性的关系,提出著名的“膜脂相变冷害”假说。认为温带植物遭受零下低温时,只要降到一定的温度,生物膜首先发生膜脂的物相变化,这时膜脂从液晶相变为凝胶相,膜脂的脂肪酸链由无序排列变为有序,膜的外型和厚度也发生变化,可能使膜发生收缩,出现孔道或龟裂,因而膜的透性增大,膜内可溶性物质、电解质大量向膜外渗漏,破坏了细胞内外的离子平衡,同时膜上结合酶的活力降低,酶促反应失调,表现出呼吸作用下降,能量供应减少,植物体内积累了有毒物质。Lyons认为植物遭受冷害后出现的种种代谢变化都是次生或伴生的,而冷害的原初反应是发生在生物膜的一类脂分子上。当膜脂发生降解时,就会发生组织受害死亡,因此, Lyons将膜脂降解作为冷害不可逆的生理指标。膜脂相变转换温度与膜脂脂肪酸的不饱和程度密切相关。膜脂中所含的脂肪酸饱和度大,膜脂相变温度相应升高;反之,则降低。因此,围绕着不饱和脂肪酸与植物低温的耐性之间是否存在因果关系曾作了大量的研究。主要的结果有^[6]: (1)冷敏感植物与抗冷植物相比,饱和脂肪酸含量要高; (2)在冷驯化过程中,植物细胞不饱和脂肪酸含量升高; (3)与以上实验结果相反,认为植物的抗冷性与不饱和脂肪酸含量无关。

近年来,应用生物技术,使植物耐冷性与膜脂脂肪酸饱和度的关系的研究取得了突破性的进展^[13-15]。下面简单介绍三个方面的重要研究成果,其中一个蓝细菌(*Cyanobacteria*) *des A* (desaturated A)基因与其抗冷性关系的研究结果。Los等^[6]发现蓝细菌(*Synechocystis* PCC6803)的 *des A* 在环境温度由 36℃ 下降到 2℃ 时,该基因的表达在 1 h 内就增加 10 倍,返回 36℃ 后的 30 min 内,其表达又恢复到原来水平。Vigh等^[17]报道刺激 *des A* 表达是由于低温首先降低了膜脂的流动性,刺激 *des A* 的转录,使膜脂不饱和度增加,从而增加膜脂的流动性。Wada等^[18]将抗冷蓝细菌 *Synechocystis* 的 *des A*, 导入不抗冷的蓝细菌 *Anacystis nidulans* 中,后者膜脂脂肪酸的不饱和度增加,相应地其光合作用在 5℃ 下不受明显抑制。

另一项是叶绿体膜上磷脂酰甘油 (phosphatidyl-glycerol; PG) 的脂肪酸(饱和或不饱和)合成差异对植物冷敏感性的影响。在叶绿体中存在着两种酰基酯化酶,即甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase) 和单酰基甘油-3-磷酸转酰酶 (monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase)。前者只负责甘油 C-1 位上的酯化,后者只负责 C-2 位上的酯化^[19], 叶片 PG 分子种 (molecular species) 合成过程中,其 C-1、C-2 位上的转酰基酶分别对脂肪酸具有选择性。

而决定冷敏感植物与抗冷植物叶片 PG 分子种差异的关键是甘油 -3- 磷酸转酰酶在 C-1 位上对酰基载体蛋白 (18:1 和 16:0-acyl carried proteins; ACP) 的选择性。在抗冷植物中, C-1 位转酰酶对 C_{16:0} 和 C_{18:1} 具有同样的选择性, 而在冷敏感植物中, 则主要选择 C_{16:0}; 对于 C-2 位转酰酶, 在抗冷和不抗冷植物中没有选择性差异, 都较易选择 C_{16:0}^[20,21]。拟南芥因含有高比例的顺式不饱和脂肪酸而较抗冷, 而因含低比例不饱和脂肪酸的南瓜则对冷敏感。Murata 等^[22]将南瓜和拟南芥的甘油 -3- 磷酸酰基转移酶基因分别转入烟草, 转化株中除磷酸酰基甘油组成有大幅度改变外, 其他脂类的脂肪酸组成没有明显变化。导入南瓜酶基因的烟草, 磷酸酰基甘油的顺式不饱和脂肪酸含量由转化前的 64% 下降到 24%, 转化株的冷敏感性增加; 而导入拟南芥酶基因的烟草, 则不饱和脂肪酸上升到 72%, 且其冷敏感性下降。

第三个是三烯脂肪酸 (18:3 和 16:3) 在植物抗冷性中作用的研究。来源于一系列三烯脂肪酸合成有缺陷的拟南芥突变体 (*fad*) 对低温的反应。fad7 突变体由于三烯脂肪酸含量的下降, 变得对冷更为敏感, 将能够对 *fad7* 突变起到互补作用的叶绿体 ω -3 脂肪酸去饱和酶的基因导入烟草, 转化株的 18:3 和 16:3 含量升高而相应的 18:2 和 16:2 含量下降, 转化株的抗冷力得到了提高^[23]。

膜脂降解与植物抗冷力关系的证据主要来源于对磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 的研究。PLD 是催化膜脂分解的主要酶之一。冷胁迫增加了由 PLD 介导的膜磷脂的分解^[24,25]。Zhou 等^[26]将编码 PLD 和反义 PLD 的基因分别转入烟草, 转反义 PLD 转化株抗冷力获得提高, 而转 PLD 转化株抗冷力下降。

综上所述, 不饱和脂肪酸特别是某些膜脂中的不饱和脂肪酸分子种 (PG 分子种) 对植物抗冷性的形成无疑具有重要的作用, 而且通过对脂肪酸的去饱和作用或抑制膜脂的降解进行遗传操作已证明可以改变植物的冷敏感性。因此, 膜脂脂肪酸的去饱和作用是调节植物抗冷性的一个重要机制。这将为最终改良植物, 增强植物抗冷性提供了研究方向。

2 细胞抗氧化能力与植物抗冷性的关系

细胞抗氧化能力包括酶促 (如过氧化氢酶 (CAT), 超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化物酶 (POX), 谷胱甘肽还原酶 (GR)) 和非酶促 (还原型谷胱甘肽 (GSH), 抗坏血酸 (AsA), 胡萝卜素 (CAR), 维生素 E, 甘露醇等) 清除活性氧的系统。有研究表明冷敏感植物在冷胁迫 (chilling stress) 条件下, 细胞中活性氧的产生加速, 而清除活性氧的能力下降, 导致活性氧水平的提高^[8,10,18,27-30]。高水平的活性氧可能加速了膜脂过氧化和膜蛋白间的聚合, 从而破坏膜结构功能^[31]。因此, 冷害条件下活性氧所引起的伤害也是冷害的重要原因之一。另一方面, 有研究证明冷驯化提高了细胞内抗氧化酶活性和内源抗氧化剂含量, 相应也削弱了由冷害引起的膜蛋白和膜脂过氧化, 提高了植物的抗冷力^[31-36]。另外, 植物不同的抗冷力也是与其细胞内具有不同水平的抗氧化酶活性和内源抗氧化剂含量相关的^[37,38], 抗冷植物比冷敏感植物具更高水平的抗氧化能力。不同方法如钙浸种、氯化钠、热刺激均能提高植物抗冷力, 可能与提高了植物抗氧化胁迫能力有关^[35-38]。当用氨基三唑 (aminotriazole, 一种 CAT 专一性抑制剂) 抑制 CAT 活性, 则消除了冷驯化提高玉米幼苗抗冷力的效果, 可见 CAT 在玉米苗冷驯化过程中起着很重要的作用^[29]。因此, 细胞的抗氧化能力是与植物的抗冷性呈正相关的。植物遭遇冷胁迫或经历低

温锻炼都是经历一个氧化胁迫的过程^[29]。外源不同程度的氧化胁迫对水稻幼苗抗冷力的影响不同: 轻度氧化胁迫可以诱导提高幼苗的抗冷性, 而深度氧化胁迫则加重冷胁迫伤害的程度(李美茹等未发表资料), 因此, 细胞氧化应激机制很可能是调节植物抗冷性的另一个重要机制^[1]。

由于抗氧化系统是植物细胞重要的防御系统, 人们广泛开展氧自由基与植物抗冷性关系机理的研究, 从这个角度似乎可解释低温下植物受伤害或抗冷植物适应低温的机理。从理论上讲, 提高细胞抗氧化能力, 应能达到提高植物抗冷力的目的, 但至今还缺乏阐明这两者关系的直接实验证据。应用遗传工程技术转抗氧化酶基因或提高抗氧化剂的含量, 使能直接研究抗氧化酶、抗氧化剂与植物抗冷力表达调控的关系。脱毒性活性氧的方法之一是使抗氧化酶或抗氧化剂在自由基形成的部位超表达(over expression), 及时清除活性氧自由基。在抗氧化酶基因上接上某一酶的转运肽序列, 如接上编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基的叶绿体转运肽(chloroplast transit peptide)序列, 引导抗氧化酶在叶绿体中超表达, 叶绿体是细胞产生活性氧的重要部位。Gupta等^[39]报道使外源Cu/Zn SOD在烟草叶绿体中超表达, 从而增加了烟草抵抗低温引发光抑制的能力。但是Van Camp等^[40]发现外源FeSOD在烟草叶绿体中超表达, 对低温引发的光抑制无抗性。Slooten等^[41]也报道MnSOD在叶绿体中超表达, 也不能增加其对低温下光抑制的抵抗能力。Chamngpoll等^[42]将转反义CAT基因导入烟草, 该转化株的CAT活性只有野生型的10%, 发现该转化株增加了对甲基紫精(MV)、盐、O₃的敏感性, 但对冷的敏感性不变。Morita等^[43]将胞质*apx* (*apxa*和*apxb*)基因转入烟草细胞, 获得在胞质中超表达的*apxa*和*apxb*转化株, 冷胁迫时, 转*apxa*转化株的*apxa*的mRNA量不变, 在恢复生长时, *apxa*的mRNA水平下降; 但转*apxb*转化株的*apxb*的mRNA水平在冷胁迫时下降, 而在恢复时则上升。

可见尽管利用基因工程技术转抗氧化酶来提高植物抗冷力已取得令人可喜的效果, 但距通过转抗氧化酶定向操纵植物抗冷性的目标还有相当多的问题需要解答。Foyer等^[34]讨论了抗氧化酶基因的研究进展, 指出在植物中超表达抗氧化酶具有正、中或负的效应, 可见进行这方面研究的复杂性。Gupta等^[39]发现转Cu/Zn SOD基因的转化株, 除SOD活性升高外, 清除H₂O₂的APX活性也升高。Van Camp等^[40]发现外源FeSOD在叶绿体中超表达的烟草转化株对由于MV在光照下产生的O₂⁻有清除作用, 具有保护质膜和光系统II(PS II)的作用; 而转MnSOD株, MnSOD在线粒体定位表达, MnSOD仅保护质膜, 对叶绿体无保护作用, 推测这是由于FeSOD和MnSOD对不同膜具有不同亲和性引起的。转FeSOD株在盐胁迫下, 可能干扰了盐信号传导途径, 因为盐胁迫使对照株的细胞质FeSOD, 叶绿体Cu/Zn SOD, APX, 脱氢抗坏血酸还原酶和GR活性增加, 而转化株则抑制了细胞质和叶绿体中Cu/Zn SOD活性, 从而提高了叶绿体APX同工酶活性, 这可能是由于FeSOD降低叶绿体O₂⁻的含量, 而O₂⁻或O₂⁻反应后的衍生分子是诱导Cu/Zn SOD的信号分子。由于各种抗氧化酶存在细胞中的不同部位, 其作用特性也就有着差异, 其催化反应后的代谢产物又相互制约, 同时各种植物抗氧化胁迫的机制不一定相同, 而不同条件下, 活性氧代谢这个复杂过程的特性也不尽相同, 因此, 应加强对某个生理过程的活性氧特征的研究, 不同抗氧化酶过量表达在清除活性氧中的协同效应, 注意各种抗氧化酶反应后所生成的产物以及细胞对活性氧所形成氧化逆境的应激机制, 从而选择某些关键组分, 利用基因工程技术改良植物抗氧化胁迫能力, 最终达到有效提高

植物抗冷力的目的。

3 低温诱导蛋白质与植物抗冷性的关系

1970年, Weiser^[44]首先提出植物抗冷性诱导过程中基因表达改变的观点, 现已被大量实验所证实^[12]。植物冷诱导基因(*cor*)是一种诱发基因, 只有在特定条件下, *cor*基因才被启动进而控制细胞发展抗冷力。从80年代开始, 植物低温诱导蛋白成为研究热点之一, 大量实验集中于寻找特异的冷驯化蛋白, 研究其性质、结构、氨基酸序列、功能及编码CAIP的基因、基因结构、核苷酸序列等, 试图揭示冷驯化蛋白生理生化作用及其形成的机理, 为利用遗传工程技术改变细胞遗传组成, 培育抗冷新品种提供实验理论基础。王艇和唐振亚^[45]曾归纳和讨论了低温诱导蛋白的性质、结构与功能, 低温诱导基因的表达调控。在低温诱导蛋白中, 其中一些可能直接参与了提高植物抗冷性, 在防止细胞冰冻缺水, 抵御低温下发生的渗透胁迫, 稳定酶结构功能、RNA等重要物质和细胞膜系统中起作用, 另一些是酶类, 在低温逆境下, 协调细胞各生理代谢平衡或提高细胞防御能力以使细胞适应新环境。Volger和Heber^[46]报道菠菜经冷驯化诱导合成的蛋白质具有抗冻作用, 对保护类囊体膜免遭冰冻损伤的效果比其它保护剂(如蔗糖、甘油)高1000倍。苜蓿冷驯化时细胞中蔗糖磷酸合成酶(SPS)和肌醇半乳糖苷合成酶(GS)活性增加, 细胞积累大量的棉子糖低聚糖(RFO)^[47]。GS是RFO合成的关键酶, 菜豆种子遇冷时, GS活性提高, 在冷驯化时, 拟南芥的GS基因表达上升而当恢复常温时, GS转录下降^[48]。Prasad等^[29]从玉米幼苗中分离到3个低温诱导基因, 其中之一是编码线粒体过氧化氢酶3的基因*cat3*。Monroy和Dhindsa^[49]证明冷驯化苜蓿细胞原生质体, 增加了蛋白激酶MSCK1的转录, 而降低另一蛋白激酶MSCK2的转录。Monroy等^[50]又证明冷驯化提高了苜蓿细胞蛋白激酶活性, 而抑制蛋白磷酸酶的活性, 从而改变了细胞蛋白磷酸化水平。

低温诱导基因表达调控的机理很复杂。目前分离鉴定的低温诱导基因有拟南芥的*lti140*、*lti78*、*kini*、*rab18*、*rd29*和*cor15a*, 大麦的*hva1*、*pt59*和*pao86*, 苜蓿的*cas*、*msaci A*和土豆的*ci21*等^[45], 这些低温诱导基因除对低温应答外, 有些还对脱落酸(ABA)、高盐、水分胁迫等作出应答。Wang等^[51]发现冷诱导基因*rd29a*中有一段9-bp重复序列, TACCGACAT, 为脱水应答元件(dehydration-responsive element, DRE)序列, 将这一序列与GUS报告基因连接, 转入苜蓿中, 当转化株于2℃下进行冷驯化时, GUS活性增加。Baker等^[52], Yamaguchi-Shinozaki等^[53]分别分离和分析了拟南芥*cor15a*和*rd29a*的启动子, 发现这些启动子除受冷因子调节外, 也受到干旱、高盐、ABA的调节。Sheen等^[54]分离大麦应答ABA基因*hva1*的启动子, 将其与报告基因绿色荧光蛋白(GFP)融合形成HVA1-SGFP, 获得转HVA1-SGFP玉米原生质体, 当该转化的原生质体分别置于冷、高盐、黑暗条件下或附加ABA时, GFP表达增加, 进一步表明这些胁迫信号是通过蛋白激酶CDPK1和CDPK1a来调控*hva1*的启动子的。

转冷诱导基因或转诱导细胞渗透剂合成的酶基因已被证明能提高植物细胞器或植物的抗冷力。Artus等^[55]将拟南芥冷调节基因*cor15a*转入未经冷驯化的细胞中, 结果证明它增加了未经冷驯化的拟南芥叶绿体、原生质体的抗冷力, 但对提高离体叶片的抗冻能力无效^[56]。甘氨酸甜菜碱(glycine betaine)在细胞中起着无毒渗透保护剂的作用, 它的积累使得许多代谢中的重要酶类在渗透胁迫下保持活性。在叶绿体基质中它由胆碱经两步氧化反应得到, 催化第一步反

应(胆碱被催化为甜菜醛)的酶是胆碱加单氧酶(choline monooxygenase, CMO), 催化第二步反应(甜菜醛被催化为甘氨酸甜菜碱)的是甜菜醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)。Ikuta等^[57]从球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)中分离了胆碱氧化酶(choline oxidase, COD A), 它能直接催化胆碱反应生成甜菜碱。Deshnium等^[58]从该细菌中克隆了该酶基因, 命名为*cod A*, 并将该基因转入蓝细菌(*Synechococcus* sp. PCC7942)的染色体中, 该转化菌积累甜菜碱高达60–80 mmol/L, 且增强了对低温的抵抗能力。Hayashi等^[59]将该基因转入拟南芥中, 使它在叶绿体中定位表达, 积累大量甜菜碱, 并增强了对低温的抵抗能力。

对植物抗冷性分子生物学基础研究的最终目的是通过人为手段进行植物抗冷性的遗传改良, 从而为农业生产服务。*cor*基因是一种诱导型基因, 如果能使*cor*基因在植物整个生活史中都一直产生, 那么植物在突遭冷害时, 就不致因还未产生CORP而死亡。另一方面, 植物的抗冷性是由多个*cor*基因控制的, 只有多个*cor*基因共同协作才能达到增强植物抗冷性的目的。据知在拟南芥和大麦中至少含有25个*cor*基因, 因此, 通过多基因转化技术来提高植物的抗冷性很不切实际。最近Michigan州立大学Thomashow等^[60]专家为进行提高植物抗冻性研究打开了新的研究思路并取得了瞩目的成果。已知*cor*基因(如*cor 15a*, *cor 78*, *cor 6.6*)等带有一个相同的调控元件—CRT/DRE(C-repeat/drought-responsive element)。该调控元件的发现, 表明*cor*基因可被相同的转录因子CBF1(C-repeat/DRE binding factor 1)所启动。将编码CBF1的cDNA置于CaMV35s启动子之下, 转化拟南芥RLD, 得到两个转基因株系A6和B16。A6中只插入单拷贝的DNA, B16则插入多个拷贝的DNA。转化株均表现出积累了高浓度的CBF1转录产物。过量表达CBF1的转化株并不需要低温刺激, 其细胞中均有*cor*基因的表达产物, 特别是COR6.6、COR15a、COR48和COR78的量更多。A6中*cor*转录量约等于冷驯化RLD中的量, 而B16的则少于冷驯化RLD。将*cor15a*的基因转入拟南芥, 得到转化株T8, 仅有COR15a的过量表达。EL50值(即指释出50%组织电解质时的温度)表明未经冷驯化的RLD是-3.9℃, 冷驯化的RLD是-7.6℃, A6为-7.2℃, B16为-5.2℃, T8为-3.8℃。将以上植株在-5℃下处理2 d, A6的成活率最高, 而B16、未经冷驯化的RLD、T8之间无差别。这说明了超表达CBF1的拟南芥, 即使在正常的生长条件下(即并不需要低温刺激), 也能生成COR蛋白, 而且这些植株不需要经历冷驯化, 就具有很高的抗冻性。这方面的研究成果对于实现通过人为手段进行植物抗冷性的遗传改良, 很有实际意义。当然, 对于含有CRT/DRE的*cor*基因是否参与冷驯化过程中所有的生化和生理反应, 还需作进一步的研究。所以, 只有对抗冷基因表达调控的上游事件如低温信号转导、放大, 与抗冷有关的蛋白质转录因子基因的分析研究, 才能定向地操纵植物的抗冷性。

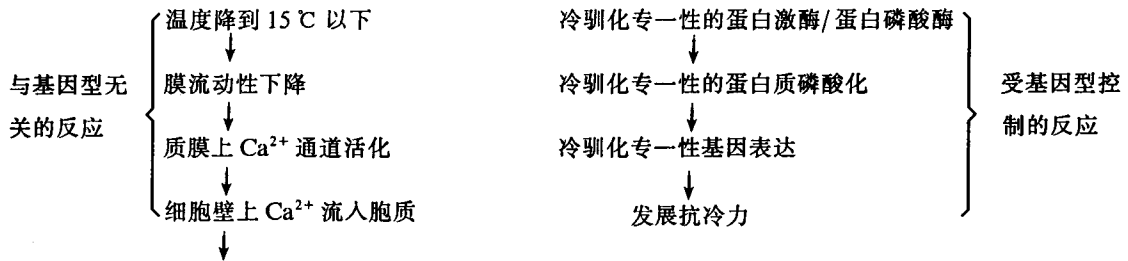
4 植物低温应答机制

植物细胞是如何感知外界温度的变化, 从而产生相应的生理生化反应, 这个问题是研究植物低温生理的一个基本、首要的问题。外界刺激和细胞反应是通过细胞内信使相联系的, 构成刺激—信使—反应偶联。进行植物低温应答机制研究应包括这些内容: 胞内转导低温信号物质的确认, 低温信号在胞内传递的方式以及抗冷力表达的形式。因此, 进行植物低温应答机制的研究首先要解答的问题是细胞转导低温信息物质的确认。1985年, Minorsky^[60]首先提出Ca²⁺是传递低温信息的胞内信使的假说, 随后又证明一些快速的, 非伤害性的冷刺激引起的生

理过程变化,与胞质中 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) 的增加可能有关^[61]。Erlandson 和 Jensen^[62] 应用同位素标记法证明 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 消长与小麦脱驯化和冷驯化有关。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的提高可能是由于冷刺激提高质膜上 Ca^{2+} 通道活性所引起的^[63,64]。氧化胁迫是冷害或冷驯化过程中的重要生理现象^[29]。Price 等^[65] 证明细胞转导氧化胁迫信号是通过 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的作用。某些抗氧化酶活性的调控已被证明与 Ca^{2+} 的介导有关^[65,66]。前面提到的 *hva1* 基因,除受 ABA 诱导外,也受冷等因子的诱导,而其启动子是受控于依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶 CDPK 和 CDPK1。另一方面静息状态下通过 Ca^{2+} 载体增加 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$,也能刺激 HVA1-SGFP 的表达,而与转导胁迫信号无关的启动子 UBI, Ca^{2+} 不能诱导 UBI-SGFP 的表达^[64]。低温诱导基因 *kin* 也受 Ca^{2+} 的调控^[67]。触摸基因 (*tch*) 受触动、风、黑暗、热、冷等因子的正调控,木葡聚糖内转糖基酶 (XETs) 对细胞壁组分改变和细胞形态变化起着重要的调控作用, TCH4 是 XETs 中的一种酶,该酶的重要特点是该酶活性最适反应的温度是 12–18 °C,而且在 0 °C 下,该酶活性仍能保持较高水平,因此,推测该酶在冷驯化植物或抗冷植物于低温环境下生长时起着重要的作用,而该酶活性也是受 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的正调控^[68,69]。可见 Ca^{2+} 与植物低温下发生的生理生化反应密切相关。

判断 Ca^{2+} 是否为传导低温信号的胞内信使的直接证据来源于下面的实验。水母发光蛋白 (aequorin) 是 Ca^{2+} 的一种指示剂。1991 年 Knight 等^[70] 将编码脱辅基水母发光蛋白 (apoaequorin) 的基因转入烟草细胞中,当转基因植物浸泡在辅基溶液 (coelenterine) 中时,烟草细胞中有水母发光蛋白的形成。他们利用转基因植株作实验材料,结果表明低温刺激植株,其胞质中 Ca^{2+} 浓度迅速增加;为了进一步研究胞质中增加的 Ca^{2+} 的来源。他们用三种抑制剂:一种是镧 (La^{3+}),为细胞质膜上 Ca^{2+} 通道的抑制剂;一种是钆 (Gd^{3+}),为质膜上拉伸通道的抑制剂;另一种是钌红 (Ruthenium red),为线粒体和内质网膜上 Ca^{2+} 通道的抑制剂。结果发现 La^{3+} 和 Gd^{3+} 取消了冷刺激引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高,而钌红没有这种作用,这表明冷刺激提高胞质中 Ca^{2+} 浓度, Ca^{2+} 来源于细胞壁。Knight 等^[71] 应用基因工程技术使水母发光蛋白在拟南芥的细胞质、液泡、细胞核、内质网中定位表达,发现冷信号刺激胞质 Ca^{2+} 升高, Ca^{2+} 一部分来源于胞外,一部分来源于液泡。抗冷植物拟南芥和冷敏感植物烟草 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 对冷刺激的反应相同,但抗冷植物经冷刺激之后,细胞获得了“冷记忆” (cold memory),从而改变了以后细胞的钙信号的反应程度,而冷敏感植物并不具备此特性。 H_2O_2 也引起了细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化,其变化形式和变化程度与冷刺激信号引起的相同。这说明了外界冷信号传入植物细胞是由 Ca^{2+} 信号所介导的;推测提高植物抗冷力的不同方法 (冷驯化, H_2O_2), 其作用的共同点均是通过 Ca^{2+} 信号所介导。Monroy 等^[72] 以苜蓿细胞为实验材料,用 EGTA 螯合细胞壁中的 Ca^{2+} ,用 La^{3+} 阻塞质膜上 Ca^{2+} 通道,发现冷驯化诱导的抗冷力完全消失,冷驯化专一性基因 *cas 15* 和 *cas 18* 的转录受到强烈地抑制,而采用钌红则未有此效果,说明阻止细胞壁中的 Ca^{2+} 流向胞质,可以阻断冷驯化的作用。钙调素 (CaM) 的抑制剂— W_7 也强烈地抑制冷驯化诱导的抗冷力的形成,这说明 Ca^{2+} 信使系统在苜蓿冷驯化生理过程中起着很重要的调节作用,冷驯化可能通过 Ca^{2+} 或蛋白磷酸化诱导抗冷力的表现。Monroy 和 Dhindsa^[49] 以苜蓿细胞原生质体为实验材料,证明冷驯化 (4–7 °C) 引起 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入胞质。阻止 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入胞质,则抑制 *cas 15* 和 *cas 18* 的转录,常温下 (25 °C) 通过使用 Ca^{2+} 载体 A23187,或钙通道兴奋剂 (calcium channel agonist) Boy K8644,刺激 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入胞质,也同样能特异地诱发 *cas 15* 和 *cas 18* 的转录,

这说明了在冷驯化的初期, 冷驯化信息是通过钙信号传入细胞内, 从而诱导冷调节基因 *cas 15* 和 *cas 18* 的转录, 它们的转录是受 Ca^{2+} 调控。实验进一步表明冷驯化过程中, CaM 量无发生变化, 而蛋白激酶 *MSCK1* 的转录增加, 但另一蛋白激酶 *MSCK2* 转录却下降, 推测 Ca^{2+} 接受冷驯化信息之后, 将信号传给蛋白激酶, 通过调节蛋白磷酸化水平调节苜蓿细胞的抗冷力形成。因此, Monroy 和 Dhindsa^[49] 总结低温信号转导的过程为:



细胞中除了钙信号系统之外, 还有磷脂酰肌醇信号系统, 该信号系统与植物抗冷性调节的关系还未被阐明。Somerville 等^[73] 实验表明冬油菜经冷驯化后, 叶片中磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP_2) 含量增加, 未经冷驯化的冬油菜遭遇冷害, 叶片中 PIP_2 和磷脂酰肌醇磷酸 (PIP) 含量下降。我们^[74] 曾证明冷刺激引起了花生幼苗下胚轴质膜 PIP_2 含量的下降, Kravets 等^[75] 证明冷刺激降低了冬小麦胚芽鞘 PI 和 PIP 的含量, 因此, 推测磷脂酰肌醇信号系统可能与调控植物抗冷性有关。

5 结束语

基因工程技术给生物学研究带来了革命, 它使我们能够直接研究某些物质、基因或生理代谢与调节植物抗冷性的关系。近年来的研究确定了调控植物抗冷力的一些重要基因, 转冷诱导基因、转使膜脂肪酸去饱和酶的基因、转增强细胞合成渗透剂的酶的基因、转外源抗氧化酶基因等均已表明能提高植物的抗冷力, 特别是转抗冷基因的转录因子使植物不需经冷驯化就具有高抗冻性, 为从本质上改变物种的遗传性、培育抗冷新品种成为可能。但是, 以上所讨论的参与调控植物抗冷力的重要物质或基因, 是如何被低温信号所调节, 又是如何调节植物抗冷力的, 至今还不很清楚, 同时植物的抗冷性受到多种特异的数量性基因的调控, 这就为简捷提高植物抗冷性增加了困难。植物低温应答机制的研究为克服以上的困难找到了深入研究的方向, 因为低温信号的转导是植物启动冷驯化和发展抗冷性的首要生理基础, 可望为揭示植物抗冷性机制找到突破口。另外, 植物的抗冷特性有二种: 一种是经冷驯化或其它方法诱导而获得, 另一种是不经以上方法处理, 抗冷植物本身就具备的。通过研究植物冷驯化机理来提高植物抗冷力的方法, 被较多研究者采用。将极区海鱼中的抗冻蛋白基因转入番茄, 其果实的冷藏性得到提高^[76]。现已在多种抗冻植物中发现有抗冻蛋白^[77], 可望在不久的将来应用植物内源抗冻蛋白来改良植物抗冻性及果实耐冷冻贮藏性。因此, 除了深入研究冷诱导基因的表达调控机制, 使冷诱导基因在冷敏感植物中表达以提高其抗冷力之外, 还应加强抗冷力表达的物质基础, 这也是揭示植物抗冷性分子机理的途径之一。

参考文献:

- [1] Alden J, Hermann P K. Aspects of the cold-hardiness mechanism in plants [J]. Bot Rev, 1971, 37:37-142.
- [2] Lyons J M. Chilling injury in plants [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1973, 24:445-528.
- [3] Levitt J. Response of Plants to Environmental Stress [M]. 2nd ed. Vol. 1, Academic Press, New York, 1978.
- [4] Graham D, Patterson B D. Responses of plants to low nonfreezing temperatures: proteins metabolism and acclimation [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1982, 33:347-372.
- [5] Li P H, Sakai A. Plant Cold Hardiness and Freezing Stresses [M]. Vol. 2, Academic Press, New York, 1982.
- [6] Steponkus P L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 5:543-548.
- [7] 简令成. 植物抗冷机理研究进展 [J]. 植物学通报, 1992, 9:17-22.
- [8] 何若韞. 植物低温逆境生理 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [9] 沈漫, 王明麻, 黄敏仁. 植物抗冷机理研究进展 [J]. 植物学通报, 1997, 14:1-8.
- [10] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 43:83-116.
- [11] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 细胞氧化应激机制与植物抗冷性机理的研究 [J]. 生命科学, 1996, 8:30-34.
- [12] Guy C L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41:187-223.
- [13] Somerville C. Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:6215-6218.
- [14] Nishida I, Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47:541-568.
- [15] Murata N, Los D A. Membrane fluidity and temperature perception [J]. Plant Physiol, 1997, 115:875-879.
- [16] Los D A, Horvath I, Vigh L et al. The temperature-dependent expression of the desaturase *des A* in *Synechocystis* PCC6803 [J]. FEBS, 1993, 318:57-60.
- [17] Vigh L, Los D A, Horvath I et al. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *des A* gene in *Synechocystis* PCC6803 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:9090-9094.
- [18] Wada H, Gombos Z, Murata N. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation [J]. Nature, 1990, 347:200-203.
- [19] Frenten M, Heinz E, Mekeon A et al. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts [J]. FEBS, 1983, 129:625-628.
- [20] Murata N. Molecular species composition of phosphatidyl-glycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants [J]. Plant Cell Physiol, 1983, 24:81-87.
- [21] Murata N, Yamaya J. Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants [J]. Plant Physiol, 1984, 74:1016-1024.
- [22] Murata N, Ishizaki-Nishizawwa O, Higashi S J et al. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants [J]. Nature, 1992, 356:710-713.
- [23] Kodama H, Hanada T, Horguchi G et al. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturases in transgenic tobacco [J]. Plant Physiol, 1994, 105:601-605.
- [24] Pinhero R G, Paliyath G, Yada R Y et al. Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling and its relation to chilling tolerance of maize seedlings [J]. Plant Physiol, 1997, 114 (supplement):130.
- [25] Ryn B, Dyer J H. Membrane lipid turnover and phospholipase D as potential components in signaling chilling response in castor bean [J]. Plant Physiol, 1994, 104:171-178.
- [26] Zhou H E, Zheng S, Lu F et al. Low temperature tolerance in transgenic tobacco and *Arabidopsis thaliana* expressing sense and antisense phospholipase D gene [J]. Plant Physiol, 1997, 114 (supplement):128.
- [27] 刘鸿先, 王以柔, 郭俊彦. 低温对植物细胞伤害机理的研究 [A]. 中国科学院华南植物研究所集刊 [C], 第五集, 北京: 科学出版社, 1989, 1-8.
- [28] 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 低温下黄瓜幼苗子叶硫氢基(SH)含量变化与膜脂过氧化 [J]. 植物学报, 1991, 33:50-54.
- [29] Prasad T K, Anderson M P, Martin B A et al. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide [J]. Plant Cell, 1994, 6:65-74.
- [30] Prasad T K. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings [J]. Plant Physiol, 1997,

- 114:1369-1376.
- [31] Prasad T K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities [J]. *Plant J*, 1996, 10:1017-1026.
- [32] 曾韶西, 王以柔, 李美茹等. 冷锻炼和 ABA 诱导水稻幼苗提高抗冷性期间膜保护系统的变化 [J]. *热带亚热带植物学报*, 1994, 2(1):44-50.
- [33] Bridger G M, Yang W, Falk D E et al. Cold-acclimation increases tolerance of activated oxygen in winter cereals [J]. *J Plant Physiol*, 1994, 144:235-240.
- [34] Hausl A, Alschner R G. Cold-hardiness-specific glutathione reductase isozymes in red spruce. Thermal dependence of kinetic parameters and possible regulatory mechanisms [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105:215-223.
- [35] Foyer C H, Descourvieres P, Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants [J]. *Plant Cell Environ*, 1994, 17:507-523.
- [36] 王以柔, 曾韶西, 刘鸿先. 冷锻炼对水稻和黄瓜幼苗 SOD、GR 活性及 GSH、AsA 含量的影响 [J]. *植物学报*, 1995, 37:776-780.
- [37] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔等. 钙对水稻幼苗抗冷力的影响 [J]. *植物生理学报*, 1996, 22:379-384.
- [38] 曾韶西, 王以柔, 李美茹. 不同胁迫预处理提高水稻幼苗抗冷性期间膜保护系统的变化比较 [J]. *植物学报*, 1997, 39:308-314.
- [39] Gupta A S, Webb R P, Holaday A S et al. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103:1067-1073.
- [40] Van Camp W, Capián K, Van Montagu M et al. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:1703-1714.
- [41] Slooten L, Capián K, Van Camp W et al. Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:737-750.
- [42] Chamnongpol S, Willekens H, Van Montagu M et al. Analysis of catalase deficiency in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114 (supplement):101.
- [43] Morita S, Kaminaka H, Yokoi H et al. Differential responses of two cytosolic superoxide dismutase genes and two cytosolic ascorbate peroxidase genes in rice to environmental stresses [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114 (supplement):102.
- [44] Weiser C J. Cold resistance and injury in woody plants [J]. *Sci*, 1970, 169:1269-1273.
- [45] 王艇, 唐振亚. 植物冷驯化和热激反应的分子基础 [A]. 刘良式. *植物分子遗传学*[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 499-547.
- [46] Volger H G, Heber U. Cryoprotective leaf proteins [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1975, 412:335-349.
- [47] Nadeau P. Enzymatic control of soluble carbohydrate accumulation in cold hardened alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114 (supplement):130.
- [48] Liu J J, Galvez A F, Krenz D C et al. Galactinol synthase (GS), a key enzyme in biosynthesis of raffinose family oligosaccharides (RFO): a activation of enzyme activity and induction of gene expression by cold and desiccation [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114 (supplement):130.
- [49] Monroy A F, Dhindsa R S. Low temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C [J]. *Plant Cell*, 1995, 7:321-331.
- [50] Monroy A F, Labbe E, Dhindsa R S. Direct and indirect modulation of protein phosphorylation in temperature signal transduction of cold acclimating alfalfa [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114 (supplement):271.
- [51] Wang Y, McKerise B D. Analysis of cold responsive elements in transgenic alfalfa [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114 (supplement):130.
- [52] Baker S S, Wilhelm K S, Thomashow M F. The 5' region of *Arabidopsis thaliana cor 15a* has cis-action elements that confer cold, drought and ABA-regulated gene expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24:701-713.
- [53] Yamaguchi-Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt stress [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:251-264.
- [54] Sheen J. Ca²⁺-dependent protein kinase and stress signal transduction in plants [J]. *Science*, 1996, 274:1900-1902.
- [55] Artus N N, Uemura M, Steponkus P L et al. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana cor 15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:13404-13409.
- [56] 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.

- [57] Ikuta S, Imamura S, Misaki H et al. Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis* [J]. J Biochem, 1997, 82:1741-1749.
- [58] Deshniem P, Gombos Z, Nishiyama Y et al. The action *in vivo* of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 to low temperature [J]. J Bacteriol, 1997, 11:339-344.
- [59] Hayashi H, Mustardy L et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *cod A* gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress [J]. Plant J, 1997, 11:133-142.
- [60] Minorsky P V. An heuristic hypothesis of chilling in plants: a role for calcium as primary physiological transducer of injury [J]. Plant Cell Environ, 1985, 8:75-94.
- [61] Minorsky P V, Spanswick R M. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings [J]. Plant Cell Environ, 1989, 12:137-143.
- [62] Erlandson A G I, Jensen P. Influence of low temperature on regulation of Rb^+ and influx in roots of winter wheat [J]. Physiol Plant, 1989, 75:114-119.
- [63] Jensen P, Erlandson A G I. Changes on Rb^+ and Ca^{2+} in influx in winter wheat roots before, during and after exposure to low temperature and short days [J]. Physiol Plant, 1986, 68:209-305.
- [64] Lewis B D, Karlin-Neumann G, Davis R W et al. Ca^{2+} -activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Physiol, 1997, 114:1327-1334.
- [65] Price A H, Taylor A, Ripley S J et al. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium [J]. Plant Cell, 1994, 6: 65-74.
- [66] 李晓东, 张庭芳. 钙调素对超氧化物歧化酶及乳酸脱氢酶的激活作用 [J]. 生物化学杂志, 1993, 9:381-387.
- [67] Tahtiarju S, Sangwan V, Monroy A F et al. The induction of *kin* gene in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium [J]. Planta, 1997, 203:442-447.
- [68] Poliansky D H, Braam J. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels [J]. Plant Physiol, 1996, 111:1271-1279.
- [69] Purugganan M M, Braam J, Fry S C. The *Arabidopsis* TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. Substrate specificity, pH optimum, and cold tolerance [J]. Plant Physiol, 1997, 115:181-190.
- [70] Knight M R, Campbell A K, Smith S M et al. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium [J]. Nature, 1991, 352:524-526.
- [71] Knight H, Trewavas A J, Knight M R. Cold-calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation [J]. Plant Cell, 1996, 8:489-503.
- [72] Monroy A F, Sahan F, Dhindsa R S. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression evidence for a role of calcium [J]. Plant Physiol, 1993, 102:1227-1234.
- [73] Somerville C. Direct tests of the role membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:6215-6218.
- [74] 李美茹, 陈思学, 李琳等. 盐或低温胁迫对花生幼苗下胚轴 ATP 酶和质膜中 PIP_2 含量的影响 [J]. 西北植物学报, 1996, 16:17-22.
- [75] Kravets S, Bucolove T P, Volovik N V. Phosphatidylinositols changes in winter wheat in response to cold shock [A]. Fifth International Plant Cold Hardiness Seminar (USA) [C], 1996, 170.
- [76] Giffith M, Ewart K U. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods [J]. Biotech Adv, 1995, 13: 375-402.
- [77] 卢存福, 王红, 简令成等. 植物抗冻蛋白研究进展 [J]. 生物化学与生物物理学进展, 1998, 25(3):210-215.