

植物抗冻基因

李璐 王晓军 赵民安*

中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011

The Antifreezing Genes in Plants

LI Lu, WANG Xiao-Jun, ZHAO Min-An*

Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011

摘要 介绍植物抗寒冻基因研究中一些已分离和鉴定出的低温诱导表达基因及其抗寒功能、低温信号转导以及调控方式的研究进展。

关键词 植物抗寒性; 低温诱导表达基因; 低温信号转导; 基因调节; 基因工程

植物在低温下一般会遭到不同程度的伤害。温度又是决定植物地域分布的主要限制因素, 每年由于低温寒害引起的作物损失巨大, 而传统的抗寒育种方法对提高植物抗寒性的作用不大。目前用传统育种方法得到的最耐寒的小麦品种抗寒能力与上世纪早期所研制的品种抗寒能力基本上是一样的^[1]。因此, 长期以来, 人们从生理学、形态学、生物化学、生物物理学等多个方面对植物抗寒机制进行了广泛的研究。特别是近20年来, 采用分子遗传学研究手段, 大量冷诱导表达的基因已分离出来, 并证明这些基因对提高植物的抗寒性有一定的作用。人们还对这些抗寒基因表达的启动和调节因子作了进一步探索, 初步提出低温信号转导以及调控路径的模型, 从而为采用基因工程手段进行植物抗寒育种及有关生理的研究提供了新的启示。本文对这一领域的研究进展作一介绍。

1 已分离和鉴定的冷诱导基因

Weiser^[2]最先提出植物在低温锻炼过程中基因表达会发生改变的观点, 并指出植物的低温适应性可能需要两个条件, 即特异基因的转录激活和在最大抗寒过程中新蛋白质的低温诱导合成。Guy等^[3]最先证实菠菜在低温锻炼中基因表达确实发生了改变。随后, 有人又相继证明低温锻炼可以诱发许多基因表达^[4,5]。迄今为止, 人们已经分离出的冷诱导表达基因列于表1。

在这些基因表达的产物中, 一些已证实是有已知酶活性的蛋白, 它们可能对提高抗寒性有一

表1 植物中已分离鉴定的冷诱导基因

材料	基因	文献
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>fad8</i>	6
	<i>cor15a</i>	4
	<i>cor6.6</i>	7,8
	<i>cor78</i>	9
欧洲油菜 (<i>Brassica napus</i>)	<i>cor47</i>	8
	<i>BN15</i>	10
	<i>BN28</i>	11
苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	<i>hsp90</i>	12
	<i>cas18</i>	13
	<i>cas15</i>	13
大麦 (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>HVA1</i>	14
	<i>PT59</i>	15
	<i>pA086</i>	15
	<i>blt4</i>	5
小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>blt14</i>	16
	<i>cor39</i>	17
	<i>wcs120</i>	18
马铃薯 (<i>Solanum commersonii</i>)	<i>wcs200</i>	19
	<i>pA13</i>	20
菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	<i>cap85</i>	21
	<i>cap160</i>	22

定程度的作用^[5]。如拟南芥的*fad8*基因^[6]和大麦的*blt4*基因^[5], 它们分别编码脂肪酸去饱和酶和一种脂肪迁移蛋白。通过这种脂肪酸去饱和酶或脂肪迁移蛋白改变质膜的组成以提高膜的冷稳定性。

收稿 2003-12-29 修定 2004-04-05

* 通讯作者 (E-mail: deerlyee@hotmail.com, Tel: 0991-3813610)。

还有一些基因, 如菠菜的 *hsp70* 基因^[23]和欧洲油菜的 *hsp90* 基因^[12], 编码一种分子伴侣, 它们可以起稳定蛋白的作用, 从而抵御由冰冻诱导产生的变性现象。此外, 各种编码信号转导和调控蛋白的基因, 包括激活细胞间接分裂的蛋白激酶, Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶和14-3-3蛋白(即色氨酸酪氨酸羟化酶依赖性激活蛋白)等, 在低温胁迫中也同样发挥作用^[5]。它们可能是通过控制冷诱导基因的表达或调节抗冻蛋白的活性而影响植物的抗寒能力。

从氨基酸的相似性来说, 虽然这些低温诱导合成的多肽划分为不同的类别, 但它们在不同的植物中却表现出不少共性。如: 具有极强的亲水性, 在沸腾的缓冲溶液中仍保持溶解状态; 具有比较简单的氨基酸组成, 或少数几种氨基酸重复多次排列; 许多还包含一段特殊的区域, 能够形成亲水脂性的 α -螺旋。如拟南芥的 *cor15a* 基因, 它编码一种15 kD的新多肽, 合成后运送至叶绿体基质片层中加工成9.4 kD的成熟多肽, 称为COR15am^[4]。COR15am是高度亲水性的, 在沸水中仍保持溶解状态。它富含Ala、Lys、Glu和Asp残基, 占整个蛋白组成的60%以上, 不含Pro、Met、Trp、Cys、Arg、Gln和His残基, 而且整个COR15am蛋白是由一个由13种氨基酸组成的序列重复4次排列组成。与此类似的是, 大麦的冷相关基因 *HVA1*^[14]编码的产物是一种22 kD的新多肽, 也具有极强的亲水性。它富含Ala、Thr和Lys残基, 占整个蛋白组成的50%以上, 不含Pro、Trp、Cys和Phe残基, 它由一个由11种氨基酸组成的序列重复9次排列组成。

2 抗冻基因产物的功能

植物在低温驯化过程中诱发合成的蛋白在抗寒中的作用可分为3类: (1) 行使酶的作用, 催化合成一些关键渗透调节物质(如脯氨酸合成酶), 或是降解冰冻诱导的变性蛋白, 为新蛋白的合成储备原料(如巯基蛋白酶类); (2) 新合成的蛋白质附着于膜表面或位于膜脂间, 对膜起冷稳定作用(如LEA蛋白等); (3) 作为在信号转导和低温诱导基因表达过程中起调节作用的蛋白质因子(如CBF1等)。下面就目前一些已鉴定的冷诱导基因在抗寒中的功能作介绍。

2.1 拟南芥的COR基因 在拟南芥所有高效表达的

冷相关基因中研究最多的是COR基因, 又称LTI基因、KIN基因、RD基因或ERD基因^[4]。COR基因由4个基因族组成, 每个基因族又是由2个基因一前一后串联组成。其中COR78、COR15和COR6.6家族的偶基因编码新发现的多肽, 而COR47家族的偶基因则编码LEAII类蛋白的类群蛋白。而且Thomashow^[4]和Hughes等^[5]的研究还表明COR15家族的COR15a基因是与其它COR基因相互作用而提高植物抗寒性的。

拟南芥的COR15a基因在低温、干旱及受脱落酸(ABA)诱导的胁迫中都表达^[4]。如前所述, 它编码一种15 kD的多肽, 在输入叶绿体基质片层中后加工成9.4 kD的成熟多肽(COR15am)。为了鉴定COR15a基因是否具有抗冻性, Artus等^[24]构建了一种组成型表达COR15am多肽的转基因植物, 并将这种未经低温驯化的转基因植物与野生型植物的叶绿体的耐冻性进行比较的结果表明, 前者比后者提高了1~2℃。而且COR15am的作用不仅仅限于叶绿体。同样从这种未经低温驯化的转基因植物的叶片中分离出的原生质体, 其忍耐低温限度也由-8~-4℃提高到-9~-5℃。同时, Artus等^[24]用双醋酸荧光素染料检查原生质体存活率的实验表明, COR15a基因的表达可以稳定膜的结构。但这种作用只局限于-8~-4℃, 当温度在-4~-2℃范围内时, 原生质存活率明显下降。而Steponkus等^[25]发现, 在-8~-4℃低温下所造成的膜系统伤害主要是由于形成了六角形II相脂。因此, Artus等^[24]推断COR15a基因的表达可减少膜遇冷时所产生的由脂双层向六角形II相转变的发生率, 但对“膨胀诱发的细胞破裂”很少或几乎没有作用。

目前, 对COR15a基因在提高膜冷稳定性中的具体机制还不清楚。而且由于目前研究^[4]只给出了COR15am简单的氨基酸组成和一级结构, 因而很难分析其是否具有酶活性。这也就为COR15am蛋白的作用机理留下许多假想的空间。COR15am可能是直接作用于叶绿体膜的内膜而增加整个膜系统的冷稳定性。但是如前所述, COR15am是定位在叶绿体基质片层中的^[4], 它如何能减少整个膜系统由脂双层向六角形II相转变的发生率呢? Steponkus等^[26]提出了一种COR15a作用机制的假说。他们推测, 整个膜系统向六角形

II相转变的发生率往往是由最易形成六角形II相形式的膜结构决定的。这种膜称为整个防御系统中“最弱环节”。而叶绿体膜是一种双层膜,它与原生质膜都易遭到LOR-H II形式的损伤。假设叶绿体膜的内膜正是这种“最弱环节”的话,那么定位于叶绿体基质上的COR15am只要通过改变绿体膜内膜的弯曲性,就可以推迟整个冰冻引起的六角形II相的形成,或降低形成六角形II相的温度。当然,COR15am也可能是通过间接作用来提高膜的冷稳定性。例如,它可能通过调节一些与抗冻性有关的蛋白(如参与糖或脂代谢的酶)的活性来增强细胞内保持水分的能力,从而提高膜稳定性。但这些只是一些假想,还需用实验来证明。

尽管组成型表达COR15a基因在组织水平(如叶绿体)和细胞水平(如原生质体)上提高植物抗寒性的作用已十分明显,但这种作用效果还较小^[24]。而且,用COR15a单独表达的方法对提高整体植物抗寒性的作用更是不明显^[27]。这是由于抗寒这一生理作用本身就是由多基因作用的结果^[1]。事实上,在低温锻炼过程中拟南芥的多种基因能被激活,而这些被激活的基因中至少应同时含有4种不同族的COR基因^[4,5]。

2.2 菠菜和甘蓝的冷保护蛋白 早在1975年,Volger和Heber^[28]就报道,菠菜和甘蓝在低温锻炼过程中合成一种多肽,它能高效保护分离的类囊体膜在体外免受反复冻融的损伤。这些所谓的冷保护多肽只在经冷驯化的植物中发现,表明它们都是由COR基因编码的。Hinch等^[29]随后的研究表明冷保护多肽在冷冻过程中是通过降低膜的渗透性,而在解冻过程中则是通过增加膜的膨胀性来保护膜免受损伤的。但当时由于分离纯化方法的困难,无法弄清楚在低温锻炼过程中是单个蛋白起作用,还是多个多肽共同作用的结果。

近几年来,在研究菠菜和甘蓝的冷保护蛋白方面有了重大进展。Sieg等^[30]从低温锻炼过的甘蓝中纯化出一种单一的冷保护蛋白,这种蛋白分子量为7 kD,在沸水中仍保持着溶解性,而且推断可能是由一种冷诱导基因COR所编码的(因为这种蛋白只存在于经冷驯化的而不存在于未经冷驯化的植物中)。但由于这种蛋白的氨基酸序列还不清楚,因而无法知道它与上面所说的COR基因所编

码的亲水多肽是否具有同源性。另外,还需要用一些直接证据来证明这种冷保护蛋白是否对保护膜免受冻害有作用。

2.3 编码LEA蛋白基因的功能 胚胎发生后期富集蛋白(LEA)出现在胚发育后期,随种子脱水成熟其含量增加。在干旱、高盐或低温胁迫下,LEA蛋白基因在各种植物的营养器官也被诱导^[14]。陈善福和舒庆尧^[31]推测LEA蛋白可能有以下三方面的作用:(1)作为脱水保护剂。由于LEA蛋白在结构上富含不带电荷的亲水氨基酸,一方面,它们可能像脯氨酸作用一样,通过与细胞内的其它蛋白质发生相互作用,稳定这些蛋白的结构^[32];另一方面,它们可能给细胞内束缚水提供了一个结合衬质,从而使细胞结构在脱水中不致遭受更大的破坏。(2)作为一种调节蛋白^[32]参与植物的渗透调节。(3)通过与核酸结合而调节细胞内其它基因的表达。

大麦的LEA蛋白基因hva1编码一种LEA III类蛋白,尽管目前还没有直接证据证明冷驯化过程中基因hva1的表达有提高抗寒性的作用,但已有证据证明hva1与耐旱性有关。Xu等^[33]报道将HVA1基因转入到水稻中可得到高水平的表达,且其抗旱性和抗盐性明显提高。考虑到耐缺水与耐寒性之间的关系,他们推断hva1基因可能也是一种抗寒基因,它能减少因冰冻诱导的细胞脱水带来的损伤。另外,Imai等^[34]报道马铃薯基因Ie25在酵母中表达对提高细胞的耐寒性和耐盐碱性都有作用。而且,作为对冷敏感植物的马铃薯不经低温锻炼时Ie25表达处于一种极低的水平,而经过低温锻炼后,它几乎完全表达^[35]。以上表明LEA类蛋白基因对提高植物抗寒性可能有作用。

2.4 植物的AFPs 抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)是存在于许多抗冻生物中的高效抗冻生物活性物质。这些蛋白的特性表现为它们都具有“热滞”活性,能降低冰点温度而对熔点温度没有影响,从而导致溶液的熔点和冰点之间出现差值,这种差值就是热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)。由于这种热滞活性导致AFP吸附在冰核表面而抑制冰晶生长。而且,当温度降到溶液冰点以下时,AFP能影响冰晶的形状并抑制重结晶。

鱼类的AFP研究较早,目前鱼类中已发现了包括含糖的抗冻糖蛋白(AFGP)和不含糖的I~IV

型AFP在内的5种AFP^[36]。昆虫中也发现了比鱼类AFP活性更高的不含糖的AFP,也称热滞蛋白(thermal hysteresis protein, THP)。

在植物中也存在冷诱导蛋白,它与鱼类和昆虫的AFP有不少类似的性质,认为也是一种抗冻蛋白^[37,38]。它们也具有热滞活性,并且这种热滞活性已经在包括双子叶植物和单子叶植物在内的20多种经低温锻炼的植物细胞液中检测到^[37]。国内还有从雪莲和沙冬青中分离到有一定活性的植物AFP的报道^[39~41],并观察到沙冬青AFP的冰晶类似于鱼类的冰晶形态^[39]。Antikainen和Griffith^[42]在经低温锻炼的黑小麦流动的非原生质体中发现了6种AFP蛋白,它们的分子量有16~35 kD不等。其中4种分子量较大的多肽活性较高;另2条多肽抗冻活性较低。含有二硫键的多肽用DTT处理后,其抗冻性并不消失。这些多肽富含Asp/Asn、Glu/Gln、Ser、Thr、Gly、Ala,均缺少His、Cys的含量达5%以上。这些AFP都是病理蛋白^[37]。Antikainen和Griffith^[42]用N末端氨基酸测序和免疫分析方法已获知其中2个AFP是同内切几丁质酶病原相关的蛋白,2个是同内切 β -1,3-葡聚糖酶病原相关的蛋白,2个是同T甜蛋白病原相关的蛋白。同时Griffith等^[43]和Urrutia等^[38]发现同极区鱼(AFP热滞值:0.5~1.5℃)和昆虫(AFP热滞值:3~6℃)相比,植物AFP活性较低(热滞值通常为0.2~0.5℃)。Griffith和McIntyre^[44]根据抗冻植物抗冻性的研究,提出抗冻植物形成了一种特殊的控制胞外冰晶形成的机制,即抗冻蛋白和冰核聚物质的协同作用。抗冻蛋白降低冰点,减缓冰晶形成的速度;冰核聚物质促进冰晶的形成。这样,在冰冻温度下,通过这两种物质的协同作用调控胞外水结冰的速度和冰晶的形态,从而减缓或避免结冰造成的对细胞的机械损伤及渗透胁迫。

总的来说,抗冻蛋白对提高抗冻植物的抗冻性可能是十分重要的。Urrutia等^[38]结合自己的研究工作,认为AFP在植物中可能具有下列功能:抑制冰重结晶;降低冰晶的生长速度;在某一特定温度下可降低结冰水的百分比;保护膜系统及阻止细胞内冰晶的形成。Antikainen等^[45]根据他们在黑小麦AFP研究中的结果,推测AFP可能主要起两种作用:一种是屏障作用,即避免增长的冰

晶侵入叶表皮及细胞内;第二种是抑制冰的重结晶。

3 抗冻基因表达的调节

3.1 CBF/DREB1转录活化因子调节抗冻基因的表达 对基因表达的最初研究认为,由于低温和干旱胁迫激活一定冷相关基因的启动子,从而表达冷调节基因^[46]。随后,Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki^[47]在拟南芥中发现了COR基因的调节元件CRT/DRE,并首先证实,这个冷调节元件由9 bp组成,并有一段核心保守序列CCGAC。此种调节元件除了对低温作出反应外,还能对干旱、高盐等作出反应而使基因表达。随后,Stockinger等^[48]首次测出结合于CRT/DRE的蛋白的编码序列。这种结合蛋白被称为CBF1,它含有一个AP2/EREBP-DNA结合区域^[49,50]。此外,Liu等^[50]进一步证实,CBF1属于一个基因家族,此基因家族编码3个相关的转录活化因子,分别称为CBF1、CBF2、CBF3或DREB1b、DREB1c和DREB1a。Gilmour等^[49]还发现编码这些转录活化因子的基因都位于拟南芥的第4染色体上,并与它们的靶基因,即由CRT/DRE控制的COR6.6、COR15a、COR47或COR78基因相分离(这几个cor基因分别相应地位于第5、2、1和第5染色体上)。这种含有CRT/DRE调控元件并由CBF/DREB1转录活化因子诱导表达的基因称为CBF调控元。

在正常条件下是观察不到野生型的COR6.6、COR15a、COR47或COR78基因表达的。但Jaglo-Ottosen等^[27]发现在转基因的拟南芥中,由于CBF1/DREB1b或CBF3/DREB1a基因的超表达,不仅使上述含有CRT/DRE调节元件的冷相关基因能在正常温度环境中表达,而且,当给以低温刺激时,这种转基因拟南芥的COR基因的表达水平比野生型的显著增强,其耐寒能力也随之大大增加。

如上所说,CBF/DREB1蛋白既然能在正常温度下诱导含有CRT/DRE的冷调节基因转录,那为什么在正常温度下又观察不到这些COR基因表达呢?研究发现,在放入低温环境后不到15 min,CBF/DREB1开始转录,随后1~2 h由CRT/DRE调控的基因才开始转录,由此可见CBF/DREB1基因本身也是由低温诱导的^[49,50]。因此Gilmour等^[49]提出了一种假说,认为存在一种转录

因子 ICE, 它是 *CBF/DREB1* 表达的启动子。这种蛋白在正常温度环境中是以非活化状态存在的。当植物面临低温胁迫时, ICE 蛋白或与之相作用的蛋白就被激活, 诱导 *CBF/DREB1* 基因的转录, 随后诱导 *CBF* 调控元的表达。

CBF 调控元的表达可以保护细胞免受低温以及包括干旱在内的其它胁迫的伤害。但 *CBF* 调控元是如何完成这一功能的目前还不是很清楚。迄今只鉴定出 6 种由 *CRT/DRE* 控制的基因 (*KIN1*、*COR6.6/KIN2*、*COR15a*、*COR47/RD17*、*COR78/RD29a* 和 *ERD10*), 并且只直接证明出 *COR15a* 基因的作用机制^[24, 26]。此外还有研究表明, *CBF* 调控元的表达不仅只是提高膜的冷稳定性。例如, 在拟南芥中超表达 *CBF3* 既能提高 *COR* 蛋白的含量, 也能提高脯氨酸(Pro)以及糖类物质的含量^[51]。不少实验表明, 许多植物在低温锻炼过程中 Pro 和糖类物质含量提高可以增强植物的抗寒性。因此可以看出, *CBF/DREB1* 调控蛋白在低温锻炼过程中作为“枢纽开关”调节着多种组分的活性。

3.2 *SFR* 和 *ESKIMO1* 抗冻基因的调节 Warren 等^[52]通过化学诱导基因突变的方法在拟南芥中发现了 7 种冷敏基因——*SFR* 基因。随后 Xin 和 Browse^[53]也通过化学诱导基因突变的方法分离出低温诱导的组成型突变体。他们发现, 一种突变体 *eskimo1(esk1)* 无论经不经过低温锻炼, 其抗寒性都有提高。未经低温锻炼的 *esk1* 突变体中 Pro 的折叠水平是未经低温锻炼的野生型植株的 3.0 倍; 整个可溶性糖的折叠水平是未经低温锻炼的野生型植株的 2 倍; 而编码缺水应激蛋白的冷相关基因 *RAB18* 的转录折叠水平是未经低温锻炼的野生型植株的 3 倍。Pro 和糖以及 *RAB18* 蛋白的增加可能与抗寒能力的增加有关。由于 *esk1* 突变体对所测试的 4 种 *CRT/DRE* 调节的冷相关基因的表达没有影响, 因此 Xin 和 Browse^[53]推断, 必然存在一种平行的或分支的信号通路, 这种通路能激活一系列与低温诱导相关的基因, 并且某一条通路的激活不需要其它组分的支持就会对抗寒性的变化有显而易见的影响。因为 *esk1* 突变体不能超表达由 *CRT/DRE* 调节的冷相关基因, 因此他们推断 *esk1* 突变体可能有一个与 *CBF* 低温诱导通路不同的信号通路。*ESK1* 的作用机制目前还不清楚, 但已有的研究结果证明, *ESK1* 可能是低温锻炼的

负调节元件^[52]。

3.3 低温信号转导 在低温信号传递途径中, Ca^{2+} 是重要的第二信使^[13, 54, 56]。当拟南芥或苜蓿等面临低温胁迫时, 细胞外储存的 Ca^{2+} 流入细胞内使细胞质的 Ca^{2+} 含量水平快速增加。这种 Ca^{2+} 浓度的短暂性增加是诱发抗寒性植物冷适应基因表达和抗寒性提高所必需的^[55, 57, 58]。拟南芥中一些受低温调节的基因, 如 *CRT/DRE* 控制的 *cor6.6* 的完全表达必需依赖于 Ca^{2+} 水平的增加^[13, 54, 56]。Monroy 等^[59]发现当 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA, 或 Ca^{2+} 通道阻断剂如 La^{3+} 抑制了低温诱导的 Ca^{2+} 输入时, 低温诱导的 *cas15* 基因的表达减弱, 同时苜蓿的冷适应能力降低; 而当 Ca^{2+} 离子载体 A_{2318} 促使 Ca^{2+} 迅速流入细胞时, 则细胞不经过低温锻炼在 25℃ 下也可诱导 *cas15* 表达。虽然钙离子的流入和冷适应基因表达的激活之间的具体步骤还不清楚, 但 Monroy 等^[59]已证实此过程与蛋白的磷酸化作用有关。他们发现低温诱导苜蓿 *cas15* 基因表达可被蛋白激酶抑制剂星形孢菌素抑制, 并在 25℃ 下, 也可被蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸诱导。低温引起蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 活性迅速下降的过程也是必需依赖 Ca^{2+} 输入。由以上可以推知, 是低温引发 Ca^{2+} 输入, 导致细胞中 Ca^{2+} 水平增加, 从而抑制了 PP2A 的活性, 使得一个或多个蛋白质发生磷酸化作用, 进而诱导冷调节基因表达, 激活冷适应过程。

4 抗寒基因工程

迄今为止, 植物抗寒基因工程的研究已在以下 4 个方面取得了成果: (1) 鱼类抗冻基因途径; (2) 脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因途径; (3) 超氧化物歧化酶基因途径; (4) 糖类基因途径。以下逐一加以介绍。

4.1 鱼类抗冻基因途径 自 1989 年 Cutler 等^[60]用极地鱼黄盖鲽 AFP 处理植物组织明显改善了马铃薯和拟南芥属等植物的抗寒性以来, 植物转鱼类抗冻基因工程蓬勃发展。Hightower 和 Baden^[61]将 *afa3*、*Spa-afa5* 基因导入烟草和番茄中, 获得转基因植株。*afa3* 和 *Spa-afa5* 是北极比目鱼的 2 种具有序列重复特性的抗冻基因。*afa3* 是人工合成的序列, 含有 3 个重复, 每个重复是富含丙氨酸的 11 个氨基酸。*Spa-afa5* 基因编码截短的葡萄球菌 A 蛋白基因与 *afa5* 基因之间的那段融合基因 (*afa5* 基因是具有 5 个重复的 *afa3* 的衍生物)。转

afa3 基因植株的叶子表达出高稳定态的 mRNA, 但在组织提取物中没有检测到抗冰晶化作用。然而在 *Spa-afa5* 转基因番茄组织中检测到 mRNA 与融合蛋白, 并证明 *Spa-afa5* 融合蛋白具有抗冰晶化作用。

Georges 等^[62] 人工合成了一段黄盖鲮 AFP 基因双链结构, 插入载体 pGCST 中构成与 CAT 嵌合的质粒载体, 采用电激法成功地导入玉米原生质体中, 其表达的蛋白能与 AFP 抗血清特异结合, 说明有 AFP 蛋白序列的表达存在。

总之, AFP 作为高效的抗冻生物活性物质, 其在基因工程上的应用有着十分看好的前景。

4.2 脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因途径 膜脂相变温度与植物抗寒性关系密切。一般具有较高膜脂不饱和度的植物, 其相变温度较低, 从而在较低温度下保持膜流动性, 维持正常的生理功能^[63]。导入脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因后, 其表达产物能使一部分饱和脂肪酸催化成不饱和脂肪酸, 从而提高膜脂不饱和度, 提高植物抗寒能力。

Gibson 和 Arondel^[6] 报道了拟南芥中一个受低温诱导的脂肪酸去饱和酶基因 *fad8*。它编码合成叶绿体 ω -3 去饱和酶, 与另一拟南芥脂肪酸去饱和酶基因 *fad7* 有 75% 的同源性, 两者的叶绿体 ω -3 去饱和酶彼此功能可以互补, 共同催化膜脂中脂肪酸的去饱和。Kodama 等^[64] 将 *fad7* 基因转入烟草中, Fad7 蛋白超表达, 烟草中 $C_{16:2}$ 和 $C_{18:3}$ 不饱和脂肪酸增加, 相应的前体 16:2 和 18:3 减少。将转基因植物在低温 1℃ 下培养数天后转入 25℃ 下培养, 其生长受抑程度明显减轻, 低温引起的缺绿症也减轻许多。

4.3 超氧化物歧化酶基因途径 在植物的组织中存在一些活性氧, 如超氧自由基 (O_2^-) 等。这些活性氧会造成植物细胞脂质过氧化, 破坏细胞正常代谢。此外, 活性氧还可能诱发植物冻害^[65]。为研究超氧化物歧化酶 (SOD) 在耐冻中的作用, 早在 1989 年 Bowler 等^[66] 就把烟草的 Mn-SOD cDNA 导入苜蓿中, 发现转基因植物的 SOD 活性增强。1993 年, McKersie 等^[67] 用根瘤农杆菌介导法, 将烟草的 Mn-SOD cDNA 导入苜蓿中后发现, 转基因植株不仅抗冻性增强, 而且对除莠剂的抗性也增强, 其后代在冻害胁迫后生长比没有转基因植株快得多。他们认为是 Mn-SOD 抑制了超氧自由

基的产生, 从而提高抗寒能力。

4.4 糖类基因途径 糖类与植物抗寒性关系密切。抗寒性强的植物一般积累较多的可溶性糖, 其对防止脱水后的蛋白质变性具有保护作用; 胞间糖类通过影响冰晶生长来减轻寒害, 保护细胞及其内膜系统。Hinch 等^[29] 将细菌焦磷酸酶 (phyrophosphatase) 基因与酵母菌的转化酶 (β -呋喃果糖苷酶) 基因转化到烟草中后发现, 可溶性碳水化合物在转基因植株叶中积累, 其表达细菌焦磷酸酶的植株耐霜力比野生型烟草提高 1.2℃, 而表达酵母菌转化酶基因的烟草植株耐霜力也有所提高。

5 展望

从本文介绍中可以得到以下几个结论, 并引出今后可能取得进一步进展的问题。

(1) 植物在冷驯化过程中基因表达会发生改变, 诱发许多冷诱导蛋白, 并已有部分抗冻基因被分离和鉴定。

(2) 植物在低温驯化过程中诱发合成的蛋白在抗寒中的作用分为 3 类: 一是行使酶的作用, 催化合成一些关键渗透调节物质; 二是新合成的蛋白质组入膜内或附着于膜表面, 对膜起稳定作用; 三是作为在信号转导和低温诱导基因表达过程中起调节作用的蛋白质因子。

(3) 拟南芥的 *COR15a* 基因对其抗冻性有着重要作用, 但目前对其在植物遇寒冻时稳定膜结构的具体机制还不清楚, 需要进一步深入研究; 同时在拟南芥抗冻基因调控方面还有许多不十分清楚之处, 也待进一步研究。

(4) 植物中同样存在 AFPs 蛋白, 推测这些蛋白有以下功能: 降低原生质溶液冰点以尽量避免植物体内形成冰晶; 抑制冰晶的重结晶; 修饰胞外冰晶的生长形态; 调节原生质体的过冷状态, 使过冷点降低等。但其具体作用机制还不很清楚, 有待进一步探讨。

研究植物抗冻基因最大的意义在于采用基因工程手段改变一些非耐寒性植物的抗冻能力。目前, 在抗冻基因工程方面已从鱼类抗冻基因途径、脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因途径、超氧化物歧化酶基因途径、糖类基因途径等 4 个方面取得了一定的进展。其潜在的应用前景是不言而喻的。

参考文献

- 1 Thomashow MF. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv Genet*, 1990, 28: 99~131
- 2 Weiser GJ. Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, 1979, 169: 1269~1278
- 3 Guy CL, Niemi KJ, Brambl R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 3673~3677
- 4 Thomashow MF. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In: Meyerowitz E, Somerville C (eds). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 807~834
- 5 Hughes MA, Dunn MA. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot*, 1996, 47: 291~305
- 6 Gibson S, Arondel V. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1615~1621
- 7 Kurkela S, Borg-Franck M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 137~144
- 8 Gilmour SJ, Artus NN, Thomashow MF. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 13~21
- 9 Nordin K, Vahala T, Palva ET. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 641~653
- 10 Weretilnyk E, Orr W, White TC et al. Characterization of three related low temperature regulated cDNAs from winter *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 1993, 101: 171~177
- 11 Orr W, Iu B, White TC et al. Complementary DNA sequence of a low temperature-induced *Brassica napus* gene with homology to the *Arabidopsis thaliana kin1* gene. *Plant Physiol*, 1992, 98: 1532~1534
- 12 Krishna P, Sacco M, Cherutti JF et al. Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 1995, 107: 915~923
- 13 Monroy AF, Castonguay Y, Laberge S et al. A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol*, 1993, 102: 873~879
- 14 Hong B, Uknes SJ, Ho T-HD. Cloning and characterization of a cDNA encoding a mRNA rapidly induced by ABA in barley aleurone layers. *Plant Mol Biol*, 1988, 11: 495~506
- 15 Cattivelli L, Bartels D. Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. *Plant Physiol*, 1990, 93: 1504~1510
- 16 Dunn MA, Hughes MA, Pearce RS et al. Molecular characterization of a barley gene induced by cold treatment. *J Exp Bot*, 1990, 41: 1405~1413
- 17 Guo W, Ward RW, Thomashow MF. Characterization of a cold-regulated wheat gene related to *Arabidopsis cor47*. *Plant Physiol*, 1992, 100: 915~922
- 18 Houde M, Danyluk J, Laliberté J et al. Cloning and characterization and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1381~1387
- 19 Ouellet F, Houde M, Sarhan F. Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kD a protein induced by cold acclimation in wheat. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34: 59~65
- 20 Zhu B, Chen THH, Li PH. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 729~735
- 21 Guy CL, Haskell D. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol*, 1987, 84: 872~878
- 22 Guy CL, Haskell D. Preliminary characterization of high molecular mass proteins associated with cold acclimation in spinach. *Plant Physiol Biochem*, 1989, 27: 777~784
- 23 Anderson JV, Li QB, Haskell DW et al. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1359~1370
- 24 Artus NN, Uemura M, Steponkus PL et al. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13404~13409
- 25 Steponkus PL, Uemura M, Webb MS. Membrane destabilization during freeze-induced dehydration. *Curr Topics Plant Physiol*, 1993, 10: 37~47
- 26 Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA et al. Mode of action of the *cor15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14570~14575
- 27 Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG et al. *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 1998, 280: 104~106
- 28 Volger HG, Heber U. Cryoprotective leaf proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 412: 335~349
- 29 Hinch DK, Heber U, Schmitt JM. Proteins from frost-hardy leaves protect thylakoids against mechanical freeze-thaw damage *in vitro*. *Planta*, 1990, 180: 416~419
- 30 Sieg F, Schroder W, Schmidt JM et al. Purification and characterization of a cytoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage. *Plant Physiol*, 1996, 111: 215~221
- 31 陈善福, 舒庆尧. 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(5): 555~560
- 32 Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 1990, 2: 503~512
- 33 Xu D, Duan X, Wang B et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, 110: 249~257
- 34 Imai R, Chang L, Ohta A et al. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1996, 170: 243~248
- 35 Cohen A, Plant AL, Moses MS et al. Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-

- induced genes of tomato. *Plant Physiol*, 1991, 97:1367~1374
- 36 Deng G, Andrew DW, Laursen RA. Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecinspittosis*. *FEBS Lett*, 1997, 402:17~20
- 37 Griffith M, Antikainen M, Hon W-C et al. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiol Plant*, 1997, 100: 327~332
- 38 Urrutia ME, Duman JG, Knight CA. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1121: 199~206
- 39 费云标, 孙龙华, 黄涛等. 沙冬青高活性抗冻蛋白的发现. *植物学报*, 1994, 36:649~650
- 40 费云标, 孙龙华, 黄涛等. 分离和检出雪莲抗冻蛋白. *生物化学杂志*, 1993, 增刊:100~101
- 41 陈廷超, 张极震, 费云标等. 差示扫描量热法直接测定抗冻蛋白质溶液的热滞效应. *生物物理学报*, 1995, 11:309~313
- 42 Antikainen M, Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol Plant*, 1997, 99: 423~432
- 43 Griffith M, Ala P, Yang DSC et al. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol*, 1992, 100: 593~596
- 44 Griffith M, McIntyre HCH. The interrelationship of growth and frost tolerance in winter rye. *Physiol Plant*, 1993, 187: 335~344
- 45 Antikainen M, Griffith M, Zhang J et al. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crown, and root by tissue printing. *Plant Physiol*, 1996, 110(3):845~857
- 46 Thomashow MF. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50:571~599
- 47 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6:251~264
- 48 Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:1035~1040
- 49 Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J*, 1998, 16:433~442
- 50 Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391~1406
- 51 Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP et al. Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1854~1865
- 52 Warren G, Mckown R, Marin A et al. Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1011~1019
- 53 Xin Z, Browse J. *Eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7799~7804
- 54 Knight H, Trewas AJ, Knight MR. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 1996, 8: 489~503
- 55 Monroy AF, Dhindsa RS. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell*, 1995, 7: 321~331
- 56 Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy AF et al. The induction of *kin* genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role calcium. *Planta*, 1997, 203: 442~447
- 57 Kurkela S, Borg-Franck M. Structure and expression of *kin2*, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1992, 19:689~692
- 58 Jian LC, Li JH, Li PH. Is Ca²⁺ homeostasis essential in the cold acclimation of winter wheat seedlings? In: Bold Z (ed). *Cereal Adaptation to Low Temperature Stress in Controlled Environments*. Martonvasar, Hungary: Agr Res Inst Hungarian Acad Sci, 1997. 69~71
- 59 Monroy AF, Sangwan V, Dhindsa RS. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J*, 1998, 13: 653~660
- 60 Cutlet AJ, Saleem M, Kendall E et al. Winter flounder antifreeze protein improves the cold hardness of plant tissues. *J Plant Physiol*, 1989, 135:351~354
- 61 Hightower R, Baden C. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 1013~1021
- 62 Georges F, Saleem M, Cutler AJ. Design and cloning of a synthetic gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells. *Gene*, 1990, 91:159~165
- 63 王毅, 杨宏福, 李树德. 园艺植物冷害和抗冷性的研究. *园艺学报*, 1994, 21(3): 239~244
- 64 Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi J et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1177~1185
- 65 简成令. 植物抗寒机理的研究进展. *植物学通报*, 1992, 9: 17~22
- 66 Bowler C, Alliotte T, Loose MD et al. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana glauca*. *EMBO J*, 1989, 8:31~38
- 67 McKersie BD, Chen Y, Beus M et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1155~1163