

抗冻蛋白在园艺植物遗传改良中的研究进展

梁秋霞¹, 曹刚强², 押辉远¹

(1. 郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 450052; 2. 郑州大学生物工程系, 450052)

中图分类号: S603 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2006)06-0050-03

低温冻害是园艺植物生产中的严重自然灾害, 直接影响其地域的分布、品质、产量和经济效益。同时由于地理环境的差异, 园艺植物的分布呈现一定的区域性和季节性。低温胁迫使某些起源于热带、亚热带的园艺植物因其冷敏感性而无法在温带以北的地区露地安全越冬, 大大限制了其种植范围, 同时在引种过程中也会造成巨大的经济损失, 因此园艺植物抗冻性的研究已成为该领域的研究热点之一。园艺植物价值高, 具有观赏性和丰厚的经济价值, 前人曾用常规育种方法改良园艺植物的遗传特性, 使之避免冻害损伤以扩大种植范围, 就目前来看, 很难提高其抗冻性。近年来, 随着分子生物学的发展, 动、植物抗寒、抗冻机理的认识不断加深, 基因工程技术已经成为培育抗冻性园艺植物新品种最有效的途径。本文旨在论述抗冻蛋白在园艺植物中的研究进展, 为园艺植物的抗冻遗传改良提供借鉴。

1 抗冻蛋白(AFPs)的特性

1969年 A. L. Devries 在南极 Mcmurdo 海峡的一种鱼(Nototheniid)的血液淋巴中首次发现的一种大分子抗冻剂——抗冻蛋白(antifreeze proteins AFPs), 该蛋白能阻止体液内冰核的形成与生长, 维持体液的非冰冻状态^[1]。抗冻蛋白作为一种特异表达蛋白, 具有三种效应: 热滞效应、重结晶抑制作用、抑制冰晶生长效应。通过这三种效应, AFPs 可以减轻低温、冰冻情况下对生物体的伤害。前人已经在多种耐受冰冻的机体中发现 AFPs 如: 鱼类、昆虫、陆生节肢动物、细菌、真菌和植物。园艺植物抗冻蛋白的研究相对较晚, 目前研究的有关园艺植物抗冻蛋白的热滞活性较低, 其抗冻蛋白的结构还不太清楚。有关推测可能同时具有抗冻和抗病的双重功能, 如胡萝卜 AFPs 与多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的一些成员有很高的同源性。因此, 前人认为抗冻蛋白可能由这些抗病蛋白进化而来。

2 园艺植物冻害

园艺植物冻害的研究与人们的生产生活有密切关系。环境胁迫作用使生活在北部寒冷地带的园艺植物, 不可避免地受冷冻温度的胁迫^[2], 因而抗冻性成为选育寒冷地区园艺植

物新品种的一个重要生理指标。抗冻性就是作物对冻害的抵御能力, 冻害是指温度降低到 0℃以下, 植物体内结冰, 导致细胞受伤甚至死亡的现象。植物体内结冰有两种情况: 胞内结冰和胞外结冰^[3]。胞内结冰是指原生质体和液泡相继结冰, 冰晶破坏原生质体的结构, 使细胞亚单位的有序隔离丧失, 生物大分子结构受损; 胞外结冰指细胞间隙中靠近细胞壁的水分结冰, 导致原生质体过度失水, 蛋白质凝固变性, 同时冰晶可能对原生质膜造成机械损伤。可见, 无论是胞外结冰还是胞内结冰, 都会对园艺植物细胞造成一定的伤害。因此提高园艺植物抗冻能力的一个基本措施就是避免冰晶在体内的形成及阻止冰晶的生长。

在北方, 环境温度如果低于-1.9℃, 园艺植物越冬时仅依靠 AFPs 的热滞效应来降低冰点是难以想象的。尤其是园艺植物 AFPs 的热值点(THA)远远低于鱼类和昆虫 AFPs。因为 AFPs 在昆虫体内的一个重要作用在于通过调整体液或原生质体的状态, 如抑制冰核蛋白活性, 使溶液达到一种过冷态, 从而降低过冷点。这可能暗示着 AFPs 在园艺植物体内的抗冻作用不仅是降低冰点, 更重要的作用是调节原生质溶液的状态, 使过冷点降低。

3 园艺植物抗冻生理

园艺植物的抗冻作用是指在环境温度降到冰点以下时植物体细胞内、外, 至少是细胞内不结冰, 避免冰晶在植物体内形成或阻止冰晶生成, 从而减少冻害的伤害。根据前人^[4]的研究推测: 越冬园艺植物通过两种基本途径避免细胞内结冰: 其一, 过冷作用, 它取决于细胞原生质体的胶体性质和降温速率, 在-38℃以下时, 会自动成核而结冰。其二, 诱导胞外结冰, 避免细胞内结冰, 因为胞外结冰不一定致死, 而胞内结冰是致死的^[5]。某些园艺植物的抗冻性有与之相适应的形态结构特征和生理代谢特征。如: 通过增强细胞膜的抗冻性忍受胞外结冰, 细胞内积累一些亲水性物质, 如糖类、可溶性蛋白和游离脯氨酸等, 以增强细胞内保持水分的能力。此外, ATPs 还可以阻断 Ca^{2+} 和 K^{+} 离子通道达到对细胞膜的保护作用。

关于 AFPs 的作用机理, 就目前的研究来看, 由 Raymond 和 Devries^[6]于 1977 年提出的吸附抑制学说比较合理, 他们认为 AFPs 可逆地吸附在冰晶表面, 通过 Kelvin 效应抑制其

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

收稿日期: 2006-08-10

生长。

园艺植物经低温锻炼后,能够获得一定的抗冻能力,是其在长期进化过程中形成的一种适应性,前人^[7,8]研究表明:这些抗冻能力的获得与内质网、核膜上分布的糖蛋白增加量相关,也和质膜的不饱和性相关。目前,利用蛋白质电泳检测技术和基因分离技术分离鉴定冷诱导过程中出现的特异蛋白或基因和抗冻能力的相关性,得到许多冷诱导蛋白,如菠菜的COR140和COR85则只积累于冷诱导处理的叶片和茎中,而不在于根部积累,相应地,叶片和茎的抗冻能力强于根部,即茎、叶细胞50%致死温度低于根5~7℃^[9]。与此同时,一些在转录水平调节的冷诱导蛋白基因(如COR15a, KIN1, COR6, 6, COR47, RD17)在结构上有两个顺式作用元件CRT(TGGCCGAC)、DRE(TACCGACAT)与冷调节信号作用有关^[10]。另外,前人^[11]从玫瑰中得到的DRE结合蛋白DRE1A在拟南芥中能大量的诱导冷诱导基因的表达,并提高了植株的抗冻和抗旱能力。

4 园艺植物的抗冻蛋白基因工程

1998年,英国York大学的Worrall等^[12]发表了胡萝卜(Daucus carota)的AFPs及其基因的论文,标志着第一个园艺植物AFPs基因的发现。并且发现胡萝卜AFPs富含亮氨酸,与多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(polygalacturonase inhibitor proteins PGIPs)家族中的植物LRR(leucine-rich repeat)蛋白有高度的同源性(50%~65%),但胡萝卜AFPs提取液对多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase protein, PG)并没有抑制活性。推测这种新型的抗冻蛋白可能是从PGIP演化而来的。LRR蛋白是与病原菌防御体系相关的蛋白质,是病原体引发的配基的受体蛋白,同时与Q-螺旋、p链的形成有关。AFPs在胡萝卜直根中冷诱导表达,其cDNA为1140bp, DNA为1238bp, 编码332个氨基酸。成熟糖蛋白的分子量为36KD, pI 5.0, 热滞值为0.35℃, 酶切去糖侧链并未影响其活性。1999年Meyer等^[13]的研究有相同的结果。

胡萝卜AFPs及其基因的发现,为园艺植物的抗冻基因工程注入新的活力。在此之前,抗冻蛋白基因工程中的目的基因只来源于鱼类。1987年,Davies等^[14]将抗冻蛋白基因整合在Ti质粒上,用叶圆片法转化郁金香、油菜等,获得了一定的抗冻能力。1989年Cutler等^[15]用真空透析法将冬比目鱼抗冻蛋白基因导入马铃薯、拟南芥和欧洲油菜,使此类植物的自然结冰温度降低1.8℃,证实了转抗冻蛋白基因可提高植物的抗寒性。但是由于远缘基因转移的表达差异较大,从而导致转此类转基因植物的表达不尽人意。

1991年Hightower等^[16]将极区鱼的Caf3-AFPs基因转化并获得转基因番茄。在转基因植物叶片中,Caf3AFAs有高水平的mRNA,但在组织中未检测到重结晶作用的活性。然而他们在含有编码一种融合蛋白(去掉两头的葡萄球菌蛋白A⁺抗冻蛋白)的嵌合基因的番茄组织中,检测到了mRNA和融合蛋白。而且含有融合蛋白的组织中检测到了重结晶抑

制作用。据报道这种番茄果实可经受冷冻不坏,已申请大田试验。1992年,加拿大Griffith等^[17]第一次明确提出获得植物内源AFPs。他们从经低温锻炼的能够忍受细胞外结冰的冬黑麦(secale cereale)叶片质体中得到并部分纯化了该蛋白;1994年,费云标等^[18]从常绿抗冻园林植物沙冬青(Ammopiptanthus mongolicus)叶片中分离得到了抗冻蛋白。

有关文献报道^[19]美国DNA工程公司在番茄中导入抗冻蛋白基因,降低了细胞内水分的凝固,培育出的耐寒番茄,在-6℃能生存几个小时,果实冷藏后不变形,并认为抗冻蛋白基因有可能应用于所有蔬菜品种改良。

1996年,Sieg等^[20]从冷驯化后的卷心菜Brassicaoleraceae L.叶子中纯化了一个具有低温防护功能的相对分子量为7×103的糖蛋白,这是首次报道的一个单一、纯化的具有抗冻功能的植物蛋白。此后,依次在羽衣甘蓝Brassicaoleraceae^[21]、欧洲云杉Piceaabies^[22]等园艺植物中分离出了抗冻蛋白。

1997年Wallis等人^[23]人工合成PHA-AFP(PHA,植物凝集素)一段基因,并采用农杆菌介导将该基因被转入马铃薯中,用免疫杂交方法检测到了表达产物AFPs。转基因马铃薯的AFP24-1在-4℃温度下电解质渗出率小于3%,而对照为34%,表明其耐冻能力提高了。同年,我国的黄永芬等^[24]将美洲拟蝶抗冻基因整合在Ti质粒上,然后用花粉管道和子房注射方法导入番茄中,获得了杂交带。试验表明:在春季平均气温低于正常年份4.4℃条件下,转基因植株生长优势优于对照组。1998年卢存福等^[25]在高山园林植物唐古特红景天叶片及悬浮培养细胞中获得抗冻蛋白,采用组织培养方法低温诱导其愈伤组织产生抗冻蛋白也获得成功。同年张钰等^[26]同样利用美洲拟蝶抗冻基因转入番茄中。结果表明:番茄植株经低温锻炼,过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶都明显高于对照,表明转基因植株在生理生化水平上获得了有益的变异,且抗寒性增强。

1999年从桃树(Prunuspersica)的树皮中提取到一种脱水蛋白PCA60^[27],这是第一次发现具有脱水素蛋白特性的抗冻蛋白。其富含赖氨酸、甘氨酸,分子量为50ku,具有较强修饰冰晶的能力。同年魏令波^[28]、江勇^[29]等从沙冬青叶片中分离得到的具热稳定性的AFPs,分子质量约为40KD, pI 9.0, 热滞值为0.9℃(20mg/ml),有糖蛋白,也有非糖蛋白。其结构与某些鱼类AFPs的二级结构相似。2001年,尹明安等^[30,31]成功克隆了中国胡萝卜(var. ativus)和英国胡萝卜(var. autumn)的AFP基因,并进行序列对比,在被测的1004个核苷酸中,有35个碱基不同,其中无义突变20个,有义突变28个,按有义突变计,同源率为98.5%;同时构建成植物表达载体pBAF,为农杆菌介导转化番茄、甜椒等作物奠定了实验基础。因此,抗冻蛋白的基因特性研究将为园艺植物利用基因工程进行遗传改良提供一个广阔的前景。

5 展望

前人研究表明,园艺植物的抗冻性可能与其抗病作用有

一定的相关性,因此园艺植物的抗冻蛋白转基因育种对其防止低温冻害有明显的经济效益,并且可以提高其产量和改善产品质量,延长生长季节和栽种范围,同时也会改善某些园艺植物的储藏加工特性。

总之,园艺植物的抗冻蛋白研究具有极其广阔的应用前景。随着现代生物技术的发展,园艺植物的抗冻蛋白(AFPs)的作用机制将会研究的越来越清楚,高活性的 AFPs 将会得到分离和纯化。随着 AFPs 基因在模式植物中的成功表达,利用基因工程提高抗冻蛋白在园艺植物的抗冻性表达将会得到实际应用,并实现抗冻蛋白的规模化生产,应用于生产实践。

参考文献:

- [1] 刘万勃,宋明,张中灵,等.抗冻蛋白的研究进展[J].生物学报,2000,17(4):1-3.
- [2] Andrews C J. How do plants survive ice? [J]. Ann Bot, 1996, 78: 529-536.
- [3] Burke M J, Gusta L V, Quamme H A. Freezing and injury in plants[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1976, 27: 507-528.
- [4] 华泽钊,任禾盛.低温生物医学技术[M].北京:科学出版社,1994,20~69,384~404.
- [5] Levitt J. Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. II [M]. New York: Academic Press, 1980, 228-230.
- [6] Raymond JA, De Vries AL. Absorption in hibernation as a mechanism of freezing resistance in polar fishes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74: 2589-2593.
- [7] 简令成,孙龙华,史国顺.冬小麦幼叶细胞膜蛋白的酶标 ConA 电镜细胞化学研究[J].植物学报,1991,33(9):667-673.
- [8] 简令成,孙龙华,孙德兰.几种植物细胞表面糖蛋白的电镜细胞化学及其与植物抗逆性的关系[J].实验生物学报,1986,19:261-271.
- [9] Kazuoka T, Oeda K. Heat-stable COR(cold-regulated) proteins associated with freezing tolerance in spinach[J]. Plant Cell Physiol, 1992, 33: 1107-1114.
- [10] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-element in a Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature or high-salt stress[J]. Plant Cell, 1994, 6: 251-26.
- [11] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Shinozaki K. 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[J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [12] Worrall D, Elias L, Ashford D, Smallwood M et al. A Carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization[J]. Science, 1998, 282(5386): 115-117.
- [13] Meyer K, et al. A leucine-rich repeat Protein of carrot that exhibits antifreeze activity[J]. FEBS Letters, 1999, 447: 171-178.
- [14] Davies P L, Hew C L, Fletcher G L. Biochemistry of fish an-

tifreeze proteins[J]. FASEB, 1987, 4: 2460-2467.

- [15] Cutler A J, Saleem M, Kendall E, et al. Winter flounder antifreeze protein improves the cold hardness of plant tissues[J]. Plant Physiol, 1989, 135: 351-354.
- [16] Hightower R, Cathy B, Ranela D. Expression of antifreeze proteins in transgenic Plant[J]. Molecular Biology, 1991, 17(5): 1013-1021.
- [17] Griffith M, et al. Antifreeze proteins produced endogenously in winter rye leaves[J]. Plant Physiol, 1992, 100(2): 593-596.
- [18] 费云标,孙龙华,黄涛,等.沙冬青高活性抗冻蛋白的发现[J].植物学报,1994,36(8):649-650.
- [19] Duman JG. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bitter sweet night shade *Solanum dulcamara* [J]. BBA, 1994, 1206: 129-135.
- [20] Sieg F, Schröder W, Schmitt J M, et al. Purification and characterization of a cryoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage[J]. Plant Physiol, 1996, 111: 215-221.
- [21] Huang T, Duman J G. Purification and characterization of thermal hysteresis protein from cold-acclimated kale[J]. Brassica oleracea, 1995, 32: 577-581.
- [22] Sabala I, Egertsdotter U, Fircks H V, et al. Abscisiacid-induced secretion of an antifreeze-like protein in embryonic cell lines of *Picea abies* [J]. Plant Physiol, 1996, 149: 163-170.
- [23] Wallis FG, Wang H, Guerra DJ. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduce selectively release freezing temperatures[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35(3): 323-330.
- [24] 黄永芬,汪清胤,付桂荣,等.美洲拟蝶抗冻基因(AFPs)导入番茄的研究[J].生物化学杂志,1997,13(4):418-422.
- [25] 卢存福,简令成,匡廷云.低温诱导唐古特红景天细胞分泌抗冻蛋白[J].生物化学与生物物理进展,1998,27(5):555-559.
- [26] 张钰,吴加林,黄永芬,等.转美洲拟蝶抗冻蛋白基因(afp)番茄过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧歧化酶活性测定[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,1998,14(4):85-88.
- [27] Michael W, Robert W, Ron B, et al. Peach dehydrin protein Purification, immunolocalization, cryoprotective and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*) [J]. Physiologia Plantarum, 1999, 105: 600-608.
- [28] 魏令波,江勇,舒念红,等.沙冬青叶片热稳定抗冻蛋白特性分析[J].植物学报,1999,41(8):837-841.
- [29] 江勇,魏令波,费云标,等.分离和鉴定沙冬青抗冻蛋白[J].植物学报,1999,41(9):967-971.
- [30] 尹明安,崔鸿文,樊代明,等.胡萝卜 var. sativa Hoffm. Deutschl 抗冻蛋白基因的克隆及测序[J].西北植物学报,2001,21(2):226-231.
- [31] 尹明安,崔鸿文,樊代明,等.胡萝卜抗冻蛋白基因克隆及植物表达载体构建[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29(1):6-10.