

高等植物对低温胁迫的响应研究

高 媛, 齐晓花, 杨景华, 张明方

(浙江大学 农业与生物技术学院园艺系 园艺植物遗传资源与功能改良 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘 要: 从膜系统成分与耐冷性、细胞内的物质与耐冷性、细胞抗氧化能力与耐冷性、低温胁迫信号传导、逆境蛋白与耐冷性和植物耐冷基因工程等6个方面综述了高等植物对低温胁迫响应机制的研究, 进一步探讨了植物耐冷性的研究方向和存在的问题。

关键词: 高等植物; 低温胁迫; 响应机制

中图分类号: Q 945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)10-0058-04

植物在环境中不断地进行物质和能量的交换, 只有在适应的环境条件下才能正常生长与发育。但是由于各种不利的环境条件, 如: 低温、高温、干旱、盐害或有毒气体的存在, 都能够抑制植物的新陈代谢和生长, 甚至在胁迫严重时会导致植株死亡。低温则是限制植物分布, 农作物产量与质量的重要因素。

按照低温程度和植物受害情况, 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。低温冷害对植物的伤害表现为: 出现坏死斑, 叶片干枯, 阻碍生长, 不易发芽等。关于低温胁迫的研究已经成为研究的热点, 现综合前人的研究, 从几个方面对植物在零上低温逆境下的生理和分子机制作了简要论述。

1 膜系统与植物低温胁迫

细胞膜是植物与外界联系的界面, 而细胞膜的流动性和稳定性则是细胞乃至整个植物体赖以生存的基础。植物对温度逆境的适应之一主要在于生物膜, 特别是质膜和类囊体膜^[1]。1973年, Lyons根据细胞膜结构功能与耐冷性的关系, 提出著名的“膜脂相变冷害”假说。认为温带植物遭受零上低温时, 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。而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类脂分子上。当膜脂发生降解时, 就会发生组织受伤害死亡^[2]。

2 细胞内物质与植物低温胁迫

植物在受到冷害胁迫时, 细胞内的物质会发生急剧变化, 通过可溶物质的积累来适应环境。这是植物在逆境中保护自己的一种基本方法。细胞内的可溶物质主要包括: 甜菜碱、脯氨酸、蔗糖、蜜三糖(棉子糖)、甘露醇等, 这些物质可以阻止由于水分流失引起冰晶的形成, 保护核酸和蛋白质的结构和功能, 消除有毒物质^[3]。

2.1 糖的积累

糖在耐冷锻炼中的积累可提高细胞渗透压, 从而增强保水能力。糖还具有冰冻保护剂的作用, 防止蛋白质在结冰和解冻时发生凝固变性。如果糖在低温下多集中在叶绿体和细胞质膜附近, 则会保护对冰冻敏感类囊体上的偶联因子和质膜ATP酶^[4]。

2.2 氨基酸的变化

脯氨酸具有溶解度高, 在细胞内积累无毒性, 水溶液水势较高等特点。脯氨酸的增加除了自身能降低细胞渗透势外, 它具有的偶极性时期疏水端与蛋白质联结, 而亲水端与水分子结合, 从而使蛋白质通过脯氨酸束缚更多的水分子, 因此可增加蛋白质的可溶性。

2.3 蛋白质的变化

低温条件下, 植物细胞产生自溶水解酶或溶酶体, 释放出水解酶, 加速蛋白质的分解过程, 而无等速的合成, 造成蛋白质匮乏和有毒的水解产物积累。可溶性蛋白之所以与耐冷性密切相关, 是因为其亲水性强, 可显著增强细胞的保护力, 增加束缚水含量和原生质弹性。

细胞内蛋白质构象在低温下的适应性变化也与耐冷力有关。低温能使活性部位的-SH被隐蔽, 从而避免了形成二硫键导致蛋白质凝聚变性。

2.4 内源激素

第一作者简介: 高媛(1982-), 女, 浙江大学农业与生物技术学院园艺系在读硕士, 师从张明方教授, 主要从事西瓜对低温胁迫响应机制的研究。E-mail: gaoyuan_329@126.com.

通讯作者: 张明方, 教授, 博导, 从事蔬菜种质资源创新与分子育种研究。E-mail: mzfzhang@zju.edu.cn.

收稿日期: 2007-06-07

植物在遭受冷害胁迫时,内源激素原来的平衡状态被破坏,反映出促进生长的激素减少,而抑制生长的激素增加。从而导致代谢途径的变化。如ABA和GA在胁迫信号传递以及由胁迫引起的一系列变化中就起极为重要的作用^[5,9]。

3 细胞抗氧化能力与植物低温胁迫

植物在正常生命活动中活性氧的产生是不可避免的,同时植物体内也存在着活性氧清除系统以维持植物的正常生理活动。植物遭受低温胁迫的主要特征是活性氧代谢的失调。细胞内活性氧的大量积累而使细胞受到了氧胁迫,使细胞内活性氧的产生与清除平衡遭到破坏,从而使膜脂中饱和脂肪酸发生过氧化作用,造成膜系统结构和功能的损伤,严重时引起整个细胞膜系统结构的破坏和解体。处于低温下的植物并不是被动受到伤害,而是主动的调节适应。正是对这种逆境的不适应过程,使生物体在长期的进化过程中形成了完善和复杂的酶类[如过氧化氢酶(CAT),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD),谷胱甘肽还原酶(GR)]和非酶类[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]的抗氧化系统来清除活性氧^[7]。但是,抗氧化系统也只在一定的低温范围内起作用,当温度继续下降或低温持续时间延长,活性氧、自由基产生会明显增加,而清除量下降,导致自由基积累,使膜脂过氧化,破坏膜结构功能,造成细胞伤害^[8]。

4 植物低温胁迫信号传导

植物是如何感知外界的温度变化,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^[9]。

4.1 Ca^{2+} 与低温胁迫信号转导

Ca^{2+} 是一个主要的第二信使。低温下,胞外和胞内钙库 Ca^{2+} 通过钙通道进入胞质,引起胞质 Ca^{2+} 浓度增加。胞质中 Ca^{2+} 浓度提高后,通过激活 Ca^{2+} 调节的靶酶,或与 Ca^{2+} 受体蛋白(如CaM)结合,将 Ca^{2+} 浓度变化所蕴含的外界信息表达为生理生化过程,完成信息传递之后, Ca^{2+} 通过细胞中的 Ca^{2+} 跨膜运输系统(如 Ca^{2+} -ATPase、 Ca^{2+} /H⁺ 反向传递体、与电子传递偶联的钙泵等)被迅速泵出胞外或被胞内贮钙体吸收。所以胞质中 Ca^{2+} 浓度又回落到静息态的水平,这时 Ca^{2+} 与受体蛋白分离。通过 Ca^{2+} 在细胞质内的浓度变化,可以把胞外的信息传递到细胞内,调节相应的生理过程,这就是 Ca^{2+} 的信使功能^[10]。

Ca^{2+} 信号系统包括: Ca^{2+} 运载蛋白、CaM(钙调蛋白)、依赖CaM的酶和依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶(CDPK)。胞质 Ca^{2+} 浓度增加介导植物对低温的反应,但如果胞质内 Ca^{2+} 浓度长期居高不下,将会干扰细胞内有磷酸参与

的能量代谢,引起中毒。因此,细胞内精细的钙稳衡机制可将完成应答反应后的 Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} -ATPase、 Ca^{2+} /H⁺ 逆向运输等方式,使胞质内 Ca^{2+} 恢复到静息水平。所以低温胁迫下, Ca^{2+} -ATPase、 Ca^{2+} /H⁺ 活性与植物耐冷性关系密切^[11]。

4.2 蛋白激酶途径在低温信号传导中的作用

可逆性蛋白磷酸化是生物体内广泛存在的调节生物过程如胞内信号传递的一种机制。蛋白激酶催化蛋白质的磷酸化分为3类:蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶;蛋白质酪氨酸激酶和蛋白质组氨酸激酶。越来越多的证据显示,蛋白激酶参与了植物冷信号传导。丝氨酸/苏氨酸激酶家族存在于多个信号转导途径中。最近从模式植物拟南芥中克隆了一些同时受干旱、高盐及低温诱导的编码蛋白激酶的基因,分别编码受体蛋白激酶、促分裂原活化蛋白激酶、核糖体蛋白激酶以及转录调控蛋白激酶^[13]。

5 逆境蛋白与植物低温胁迫

随着分子生物学的发展,人们对植物耐冷性的研究不断深入。现已发现,低温下能诱导形成新的蛋白质,称冷响应蛋白。对拟南芥、油菜和菠菜等植物材料的研究显示,低温锻炼能使植物的基因表达发生改变并有新的蛋白质合成^[14-16]。其中一些可能直接参与了提高植物耐冷性,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等重要物质和在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及细胞适应新环境。

5.1 抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)是一种能降低细胞间隙体液冰点的糖蛋白(glycopeptide)。Hincha等^[17]就大白菜的一种抗冻蛋白的特性进行了研究。该叶片中纯化的抗冻蛋白可以保护从未冷驯化的菠菜叶片中分离到的类囊体免受冰融化伤害。序列分析表明该抗冻蛋白虽与脂运输蛋白Wax29有同源性,属于非特化脂运输蛋白类。但其与Wax29在结构和功能上存在不同,Wax29有运输磷脂酰胆碱的脂运输活性,但没有抗冻活性;而抗冻蛋白有抗冻活性没有脂运输活性。另外该抗冻蛋白在未驯化的植物叶片中没有纯化出来,说明其只被冷诱导产生。

5.2 脱水蛋白

脱水蛋白(dehydrins, DHNs)是一种在脱水或低温相关的环境胁迫中,或在种子成熟过程中存在的植物蛋白,其可能的作用机理是维持细胞膜在脱水状态下的稳定性,另外在细胞内信号传导中起重要作用^[10],这类蛋白在低温诱导下的出现有助于提高植物在冰冻时忍受这种胁迫的能力,减少细胞冰冻失水。

5.3 热稳定蛋白和热激蛋白

热稳定蛋白(heat stable protein, HSPs)是从干种子、水胁迫植物、冷驯化植物、盐胁迫植物中分离得到的一类蛋白。这些蛋白作为渗透保护蛋白,脱水伤害修补蛋白和抗冻剂,可与变性蛋白结合,维持其可溶状态而阻止膜与蛋白的脱水伤害^[18]。

热激蛋白(heat shock protein, HSPs)很大的一部分成员属监护蛋白(chaperone, cpn),它们属于5个蛋白家族 cpn60 cpn70 cpn90 cpn100 和小分子量的 cpn 蛋白。其中 cpn60、cpn70 可与变性蛋白结合,维持它们的可溶状态,或者与多种酶结合形成复合体,使酶的失活温度提高 8~15℃^[19]。

由于不同逆境的信号转导过程可能存在一些交叉点,一些诱导蛋白就会同时响应多种途径,如许多低温诱导蛋白不仅能被低温诱导产生,而且也受 ABA、干旱、盐甚至热激等因素的诱导。

6 植物耐冷基因工程

植物的耐冷性是由多基因控制的,只有成簇抗性相关基因的转录激活,才能有效提高作物的耐冷能力。克隆并鉴定调控耐冷基因表达的转录因子成为这一研究领域的热点。转录因子是一类蛋白质。在真核生物中,它直接参与调控特异基因表达或整个基因网络。在植物对生长激素和环境反应过程中,它们是必需和主要的原件之一。一般情况下,它们结合在目标调控基因的启动子区域,通过补充 RNA 聚合酶与其他更多转录因子结合在靶标基因的启动子上,从而激活该基因的表达。这些蛋白通过在植物冷驯化过程中的表达来提高植物耐冷能力。CBFs(C-repeat Binding Factors)就是这样的一类蛋白^[20]。CRT/DRE(C-repeat/Dehydration Responsive Element)是高等植物中抗寒/抗旱基因的一种顺式作用因子,位于 COR 基因的启动子区域。推测 COR 基因的表达受 CRT/DRE 调控元件的调控。CBF 转录因子能够识别 CRT/DRE 元件,调控多个与同类性质有关的基因表达,在提高植物对环境胁迫耐性的分子育种中,改良或增强一个关键转录因子的调控能力,可使植物的耐逆性得到较为综合的改良。

拟南芥作为模式植物,对它的 CBFs 研究比较清楚。研究表明,CBF 是一个家族,已知拟南芥中有 6 个 CBF 基因。与冷有关的 CBF 基因有 3 个,分别为 CBF1、CBF2、CBF3,而且按照 CBF1-CBF3-CBF2 的同向方式排列在 4 号染色体上。CBF 调节途径具有高度保守性。Liu 等用 RD29A 基因启动子的 CRT/DRE 元件和酵母单杂交法,从低温处理的拟南芥 cDNA 文库克隆了 3 个与 CRT/DRE 结合,在低温胁迫下调控报道的 GUS 表达转录因子,分别命名为 DREB1A(等同于 CBF3)、DREB1B(等同于 CBF1)和 DREB1C(等同于 CBF2)。

CBF/DREB 转录因子特异识别结合 CRT/DRE 元件,调控一系列干旱低温应答基因表达,这些基因所编码的产物是植物适应或抵御逆境。将拟南芥移植到低温环境。CBF1、CBF2、CBF3 基因的转录水平在 15 min 内迅速增长,并在 2 h 后 COR 基因的转录水平升高。因此推断 COR 基因的表达过程是一个信号级联放大过程,其中 CBF 的表达较 COR 基因早^[21]。所以,CBF 转录激活因子诱导 COR 基因表达包括两步。第一步是 CBF 的诱导表达,第二步是 COR 的表达。

7 小结

随着分子生物学技术的飞速发展,人们研究植物抗逆性的手段越来越先进和成熟,基因组学方法在植物抗逆性研究中的应用越来越广泛。用 EST(expressed sequence tags)数据库查询得到大量的植物基因组 DNA 的 cDNA 克隆和逆境胁迫下的表达序列,是结构基因组学的任务。通过比较基因组学可阐明抗非生物胁迫的遗传机理,获得大量与抗逆相关的基因。通过功能基因组学研究植物基因功能已逐渐取代了一次鉴定一个基因的方法。此外,一些先进的技术如差异显示技术(DD-PCR)、基于 DNA 芯片技术的 cDNA 微阵列法和蛋白组分析技术等为包括耐冷在内的各种抗逆研究开辟了道路。功能基因组学的研究必将为植物的抗逆遗传工程提供大量的全新基因,将为培育抗性品种奠定基础。

植物的耐冷性为数量性状,受微效多基因控制。耐冷力诱导过程中基因表达的改变既可以发生在转录水平,也受转录后调节控制。鉴于低温诱导基因不一定就是耐冷基因,正如低温诱导蛋白不一定就是抗冻蛋白。因此在低温诱导基因中鉴定更多的耐冷基因,采用基因工程技术提高植物的耐冷能力,是耐冷研究的努力方向。要实现这一目标,首先需要比较低温与非低温条件下植物基因表达的改变状况,进而采用差异显示等技术,分离与低温胁迫相关的基因,并从中鉴定出耐冷基因;将耐冷基因向不耐冷植物进行遗传转化或转移,提高该植物的耐冷性。因此迫切需要筛选更广泛的种质资源,寻找适合植物利用的耐冷基因;同时,还需要继续深入揭示植物自身的耐冷分子机理,利用某些生长调节物质或低温、脱水等胁迫因素,诱导植物耐冷基因的表达,调节和加强植物自身生理代谢保护机制,以达到充分挖掘植物潜在的耐冷能力的目的。

参考文献

- [1] 江福英,李延,翁伯琦.植物低温胁迫及抗性生理[J].福建农业学报,2002,17(3):190-195.
- [2] 李美如,刘鸿先,王以柔.植物抗冷性分子生物学研究进展[J].热带亚热带植物学报,2000,8(1):70-80.
- [3] 透明辉,陈劲枫.植物耐冷性基因工程[J].西北植物学报,2004,24(10):1953-1958.
- [4] Somerville C. Direct tests of the role of membrane lipid composition in

low temperature-induced photo-inhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(2): 6215-6218.

[5] 吴忠义,陈鹏,朱美君. 脱落酸(ABA)受体的研究进展. 植物学通报[J] . 1998, 15(4): 36-40.

[6] 马文月. 植物冷害和抗冷性的研究进展[J] . 安徽农业科学, 2004, 32(5): 1003-1006.

[7] 江福英,李延,翁伯琦. 植物低温胁迫及抗性生理[J] . 福建农业学报, 2002, 17(3): 190-195.

[8] 尚湘莲. 蔬菜低温胁迫与抗冷性研究进展[J] . 长江蔬菜, 2002(51): 18-20.

[9] Murata N, Los D A. Membrane fluidity and temperature perception [J] . Plant Physiol, 1997, 115: 876-879.

[10] 王国莉,郭振飞. 植物耐冷性分子机理的研究进展[J] . 植物学通报, 2003, 20(6): 671-679.

[11] 王艇,苏应娟,刘良式. 植物低温诱导蛋白和低温诱导基因的表达调控[J] . 武汉植物学研究, 1997, 15(1): 80-90.

[12] Martin M L, Busconi L. A nice membrane-bound Calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature[J] . Plant Physiol, 2001, 125: 1442-1449.

[13] Frenten M, Hein Z E, Meke on et al. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate cylintransfense and monoacylglycerol-phosphate cylintransfense from pea and spinach chloroplasts[J] . FEBS, 1983, 129: 625-628.

[14] 刘祖棋,王洪春. 植物耐寒性及防寒技术[M] . 上海: 学术书刊出版社, 1989: 93-115.

[15] Kurkela S, Palva E T. Plant Cell Reports, 1988, 7: 495-498.

[16] Murata N, Ishizaki Nishizawa O, Higashi S, et al. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants[J] . Nature, 1992, 356(23): 710-713.

[17] Hincha D K, Hany B N, Snar A H. Cabbage Cryoprotection is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family[J] . Plant Physiol, 2001, 125: 835-846.

[18] Gilmour S J, Audrey M S, Maite P S. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation[J] . Plant Physiol, 2000, 124: 1854-1865.

[19] Li Q B, Haskell D W, Guy C L. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato[J] . Plant Mol Biol, 1999, 39(1): 21-34.

[20] 张晗,信月芝,郭慧明等. CBF 转录因子及其在植物抗冷反应中的作用[J] . 核农学报, 2006, 20(5): 406-409.

[21] Gilmour S, Sebol A M. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J] . Plant Physiol, 2000, 124: 1854-1860.

The Response Mechanism of Cold Stress in Higher Plants

GAO Yuan, QI Xiao-hua, YANG Jing-hua, ZHANG Ming-fang

(Department of Horticulture Genetic Resources & Functional Improvement for Horticultural Plants, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The response mechanism of cold stress were reviewed from the followed aspects in higher plants: membrane system and cold stress; cellular matter and cold stress; cellular antioxidative ability and cold stress; signal transduction and cold stress; cold regulatory protein and cold stress; genetic engineering and cold stress. The problems and future interest ed research were also discussed here in relation to cold stress in higher plants.

Key words: Higher plant; Cold stress; Response mechanism

农业部主管, 中国农业科学院主办
中央级农业技术期刊, 全国农业核心期刊

农业科技通讯

启迪种业科技研发
开拓种业人员思想
帮助种业公司决策

邮发代号: 2-602
月刊 单价: 6 元 全年: 72 元
全国各地邮局均可订阅

本刊及时报导种植业动态和最新农业成果, 尤其是种业界的新品种, 新技术。侧重大田, 兼顾园艺。本刊技术实用, 信息及时可靠, 是种子经营、农业种植的一本专刊。也是种子经营单位良好的信息发布媒体。

本刊新增设试验研究栏目, 欢迎广大作者踊跃投稿。

地址: 100081 北京中关村南大街 12 号《农业科技通讯》编辑部
电话: 010-68919664 68976831 传真: 010-68919664 E-mail: tongxuna@yahoo.com.cn