

植物耐受低温胁迫研究进展

师秋菊, 李 群

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要:低温是影响植物生长、发育和地理分布的重要因素。在简要介绍低温胁迫对细胞膜和质膜物质影响基础上,综述了 CBF/DREB 转录因子与低温调控相关的基因及影响低温胁迫的相关因素,阐述了与 RNA 结合的耐受低温蛋白和耐受低温有关的酶类等对植物抗冻性有关的植物抗冻蛋白;最后介绍了 DNA 甲基化、MicroRNA、光周期等与抗冷性的关系。

关键词:低温胁迫;抗冻性;生理生化;基因;抗冻蛋白

中图分类号:Q 945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0191-04

非生物胁迫中,低温是限制植物地域分配和生长的一个重要环境因素。冷胁迫会影响植物生长和农作物的产量,导致损失严重。有些物种已经适应温度的季节性变化,在秋季通过调整其新陈代谢,增加它们在冷胁迫下产生耐寒性物质,最大限度地发挥其耐寒性。还有一些是通过分子水平、基因表达调控以及对植物进行冷驯化等方法来提高植物的耐寒能力^[1]。因此,对于植物的抗冷性研究十分重要,通过了解其抗冷的生理生化的表现及其调节机制,并且应用基因工程,将抗冷基因整合到农作物中,增强其抗冷性,从而提高农作物的产量。

1 低温胁迫对植物生理生化的影响

1.1 低温胁迫对细胞膜的影响

细胞膜是生物感受外界胁迫的第一道屏障,在冷胁迫下,细胞质膜的不饱和脂肪酸含量会升高,从而增加质膜的流动性,抵御冷胁迫。有学者通过对高山离子芥的试验,发现质膜上不饱和脂肪酸在植株耐寒上有很重要的作用^[2]。试验也发现,在 25℃ 下,质膜上脂肪酸的含量呈 16:0>18:2>18:3>18:1>18:0 的比例,而在 0℃ 和 -4℃ 时,其它 C18 的脂肪酸含量降低,而 C18:3 反而增加,质膜上脂肪酸的含量呈 18:3>16:0>18:1>18:2>18:0 和 18:3>16:0>18:2>18:1>18:0,

C18:3 的含量比对照组要高 0.8 倍^[2]。也有人在研究 ω -3 脂肪酸脱氢酶中发现,过表达 ω -3 脂肪酸脱氢酶 FAD3 和 FAD7 催化亚麻酸(18:3),易和亚油酸(18:2)的转换。转基因的 OE-FAD 番茄植株表出改变的脂肪酸组成,在叶片和果实 18:3、18:2 比例增加,从而 OE-FAD 的番茄植株更加耐寒^[3]。

1.2 低温胁迫对质膜物质的影响

低温对其质膜上的质子 ATP 酶也有一定的影响,在冷胁迫的情况下,不仅改变激酶结构域的催化活性,而且对其磷酸酶域也有影响,从而影响质膜 H⁺-ATPase 活性^[4]。试验还表明激酶结构域和磷酸酶域的变化,可能是依赖于改变 C-末端的某种酶的特性,质膜 H⁺-ATP 酶可能在适应冷胁迫中发挥了重要作用^[5]。植物内膜线粒体阴离子通道(PIMAC)参与代谢产物运输和线粒体体积变化,并可能在植物温度耐受性中有重要作用^[6]。在拟南芥中 6 个基因家族编码的酰基辅酶 A 结合蛋白(ACBPs)。ACBP1 家族的成员,包含 1 个氨基末端的跨膜结构域,通过转基因拟南芥 ACBP1 过表达的质膜分析发现,ACBP1 过表达使磷脂酰胆碱(PC)的含量减少并且增加磷脂酸(PA)的含量,并伴随着增加冷冻敏感度,acbp1 突变体植株反而使 PC 的积累增加而 PA 减少来加强抗寒性,这也就说明 ACBPs 对于冷调控是通过调节质膜上不同的脂肪酸的含量来调控对冷的敏感性^[7]。

2 相关因素对低温胁迫的响应

2.1 CBF/DREB 转录因子

转录因子(Transcription factor),又称反式作用因子,位于转录起始位点上游 50~5 000 bp 的顺式作用元件(Cis-acting elements)沉默子(Silencer)或增强子(Enhancer)结合并参与调节靶基因转录效率的 1 组蛋白,并能将来自细胞表面的信息传递至核内基因,通过

第一作者简介:师秋菊(1986-),女,硕士,现主要从事植物逆境生理与分子生物学等方面的研究工作。E-mail: 459685022@qq.com.

责任作者:李群(1971-),女,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物逆境生理与分子生物学等方面的研究工作。E-mail: liqun_007@126.com.

基金项目:教育部科学技术研究重点资助项目(209142);新疆维吾尔自治区重大科技专项科技支疆工程资助项目(200840102)。

收稿日期:2012-11-02

它们之间以及和其它相关蛋白之间的相互作用激活或抑制转录^[8]。从蛋白质结构分析,转录因子一般含有4个功能区,即DNA结合域(DNA-binding domain)、转录调控域(Transcription regulation domain)、寡聚化位点(Oligomerization site)以及核定位信(Nuclear localization signal,NLS)。通常这些结构域在结构与功能上是独立分开的DNA结合域,可与特定的DNA序列(一般长8~20 bp)相互作用,使转录因子与靶基因结合起来,而转录调控域决定了它对基因表达起激活还是抑制作用,核定位信号及寡聚化位点则影响转录因子的自身活性^[9]。在拟南芥中,已经证明存在的CBF1、CBF2、CBF3也被称为DREB1b、DREB1c和DREB1a^[10]。CBF转录因子的典型特征是:N端有核定位信号区,C端有酸性激活区,中间有与DNA结合的A结构域。CBF基因受到低温、干旱及高盐等非生物胁迫因子诱导表达,除了CBF4外,其余的CBF基因都不依赖ABA途径。当逆境来临时,CBF转录因子能够识别含有核心序列CCGAC的CRT/DRE元件,与之特异相结合,且激活动子含有CRT/DRE元件下游基因的表达以抵御不良环境^[11]。有试验报道,CBF2负面调节CBF1和CBF3的表达,在冷驯化期间CBFs受到不同时间调节,也就是说明不是唯一的调节,在这项研究中,已经分析了在低温胁迫下CBF在拟南芥的不同组织以及生长发育过程中的表达。用RNA干涉的方法,发现在低温胁迫情况下,未能使CBF1和CBF3的mRNA积累,也发现CBF1和CBF3与CBF2的调节方式不同,CBF1和CBF3同时表达才能在低温胁迫的情况下进行调节,所以低温胁迫下CBF起到重要的调节作用^[12]。

2.2 与低温调控相关的基因

近些年来,在很多种植物中均发现与低温胁迫有关的基因,从而把基因转到模式植物拟南芥并对基因进行分析和抗逆性的研究也多见报道。

SNRK(植物蔗糖非发酵-1相关蛋白激酶)是植物蛋白激酶家族中一个重要基因,在拟南芥、水稻、豆科植物、高粱以及苔藓等基因组中都发现了大量SnRK蛋白激酶,它们广泛参与了植物的生长发育、病虫害防御、ABA和非生物胁迫等各种信号的应答反应。

转基因拟南芥中过量表达TaSnRK2.4加强了耐旱、盐和低温等逆境,从而使生理有明显的改变,包括降低失水率提高了相对含水量,加强了细胞膜的稳定性,提高光合作用的潜力,并显着提高渗透势等方面^[13]。普通小麦SnRK2中基因TaSnRK2.7功能分析表明,在非生物胁迫的情况下能够提高植物低温的耐受性,但是它不受ABA途径的调控^[14]。而小麦中另一个家族的基因TaSnRK2.8过度表达会导致在耐干旱、盐和低温胁迫的情况下耐受性增强,而它的表达却与ABA的调控有着

密切的关系^[15]。

对于很多抗逆性的植物来说,春化是一个很重要的条件,对于其生长发育等方面都有重要作用。VRN是一个常温植物在低温和光照调节中延迟开花的基因。

在小麦和大麦的一些品种中,零上低温加速开花时间,春化后,能够提高植株抗冻性。然而,当植物开始生殖发育后,其抗冻性下降,而且VRN-1是对冷驯化有级联调控的作用,但在长日照的情况下对其它基因的调控是通过COR基因的负调控来实现的^[16]。TaVRN2是小麦中可以调节开花时间和耐受冷胁迫诱导二者相互作用的基因,研究结果表明,TaVRN2不仅可以控制开花时间,还可以提高抗寒的能力,TaVRN2增强抗寒性是通过转基因拟南芥中COR基因表达的上调来实现的^[17]。

3 植物抗冻蛋白对植物抗冻性的影响。

3.1 与RNA结合的耐受低温蛋白

GRPs是富含甘氨酸的RNA结合蛋白,其家族在拟南芥和水稻中对其抗冻性有一定的作用。有人研究指出,在6个OsGRPs中,OsGRP1、OsGRP4和OsGRP6被证明有能力增加冷敏感BX04大肠杆菌低温条件下的抗性,这种能力与它们的DNA和RNA的解链能力有一定的关系^[18]。也有人研究认为,水稻基因组有3个基因编码CysCysHisCys(CCHC)型锌酯,含有富含甘氨酸RNA结合蛋白,但其重要性和生理功能仍是未知。在这里,强调OsRZs响应表达模式进行检测,并对OsRZs的生物和细胞功能在低温条件下的情况进行了检测,试验中发现OsRZs表达水平在冷胁迫的情况下上调,而干旱或高盐胁迫没有显著改变其转录水平^[19]。冷诱导RNA结合蛋白(CIRP)是1个核蛋白质,氨基末端RNA识别序列(RRM)和羧基末端结构域包含几个RGG序列,它最主要的特点是在冷胁迫诱导的情况下能过度表达^[20]。

3.2 与耐受低温有关的酶类

众所周知,硫胺素和硫胺素焦磷酸盐(TPP)在人类营养和酶催化反应中起重要作用。植株拟南芥在遭受非生物胁迫条件下,如高光、冷、渗透、盐度、氧化处理、硫胺素和TPP累积的情况下,硫胺素编码合成酶的表达增强,当补充外源性硫胺素,野生型植株的抗氧化性增强^[21]。也有研究表明脱氢酶可提高马铃薯冷胁迫的耐受性,脱氢酶和苔聚糖酶在目标基因产物酶的活性,仍然高于苔聚糖酶报告基因缺失的情况下产生杂交蛋白酶的活性^[22]。还有人研究发现,伊朗春小麦在低温胁迫的情况下,采用蛋白质定量分析发现抗坏血酸(脱氢抗坏血酸还原酶、抗坏血酸过氧化物酶)的利用率增强并且蛋白质的加工效率提高(蛋白酶体亚基、半胱氨酸蛋

白酶)以及对卟啉专一酶的合成加强^[23]。冷胁迫中几丁质酶基因、BiCHT1,从无芒雀麦“Manchar”悬浮细胞分离出来并且 BiCHT1 与已知的黑麦中的抗冻蛋白 CHT9 具有高度的同源性。在大肠杆菌中 BiCHT1 过表达使几丁质酶的活性增加,但这个基因表达的蛋白质并不是通过控制冰晶的减少来抗冷的^[24]。

4 其它因素与抗冻性的关系

4.1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是真核细胞基因组的重要修饰方式之一^[25]。DNA 甲基化通过与转录因子相互作用或通过改变染色质结构来影响基因的表达,从表观遗传水平对生物遗传信息进行调节,在生长发育过程中起着重要的作用,而且植物 DNA 甲基化还参与了环境胁迫下的基因表达调控过程^[26]。采用基于 AFLP 的甲基化敏感扩增多态性的方法对 5℃冷处理 48 h 的水稻 9311 叶片 DNA 胞嘧啶甲基化模式进行了初步研究,发现冷处理 48 h 后 9311 基因组中一些 CCGG 位点发生了重新甲基化或去甲基化,并获得一些与水稻 cDNA 高度同源的甲基化差异片段,其中 CIDM7(Cold-inducing differential methylation)片段在冷胁迫后去甲基化,Northern 杂交证明 CIDM7 在冷胁迫后增强表达^[27]。

4.2 MicroRNA 与抗冷的关系

MicroRNA(miRNA)是近年来发现的一类非编码的内源性小分子量 RNA,广泛存在于多个物种中,并且在进化上高度保守,它们在生物体中行使重要的调节功能,已成为当今研究热点。现已发现非编码 RNA 能够参与生命活动的多个步骤:转录、染色体的形成、RNA 的剪切和修饰、miRNA 的稳定和翻译、蛋白质的稳定和转运等^[28]。有试验以拟南芥为研究材料,通过 miRNA 芯片试验,发现了 14 个 miRNA 在受到 3 种胁迫处理时表达量发生变化,其中有 10 个 miRNA 响应高盐信号,4 个响应干旱信号,还有 10 个响应冷信号^[29]。随着全球气候变化,异常低温影响世界的水稻生产,许多基因已被发现是与水稻耐寒特性相关的,研究发现水稻在冷胁迫调节下细胞分裂过程中涉及 OsRAN2 表达的增强,但在盐和干旱胁迫下,没有增加的趋势。冷胁迫的条件下,转基因水稻 OsRAN2 的表达能对维持细胞分裂有重要作用。研究也表明,水稻中 OsRAN2 的机制是通过调节细胞分裂,核内微管蛋白的正常装载促进有丝分裂结束^[30]。

4.3 光周期与植物抗冷的关系

在植物中,低温胁迫下有大量的基因被转录,但是由于生长发育和环境的多变,对于基因转录的影响是未知的。有试验表明,有针对性的对拟南芥在低温情况下昼夜表达进行试验,发现低温胁迫处理后,随着昼夜节律的变化,与耐受低温的基因的表达也出现了周期性的

变化,而后一直处于光照处理,发现表达失调,说明昼夜节律对其有一定的调节作用^[31]。也有人更详尽的发现拟南芥在低温下快速诱导的 CBF1、CBF2 和 CBF3 的表达,编码转录激活后,诱导一系列基因的表达,增加植物的冻结和耐寒性与昼夜节律也有关,它已被证明 CBF3 的转录和某些 CBF 调节基因的调控中,表现出昼夜循环的节律,低温积累 CBF1 和 CBF3 转录在某种程度上依赖昼夜时间的规律^[32]。

5 展望

植物在低温胁迫下的生理生化基础研究清楚,但是深入到蛋白质和分子水平机制上,还需要更深入的研究,而且也很有价值。此外,植物在低温胁迫下与许多因素有关,比如,基因、蛋白质等方面,利用基因工程的手段将其转化到对低温敏感的植物中,从而提高其抗冷特性,对农业生产和环境保护都有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Xin J Z, Browse. Cold comfort farm; the acclimation of plants to freezing temperatures [M]. Plant, Cell and Environment, 2000, 23: 893-902.
- [2] Shi Y L, An L Z, Zhang M X, et al. Regulation of the plasma membrane during exposure to low temperatures in suspension-cultured cells from a cryophyte (*Chorispora bungeana*) [J]. Protoplasma, 2008, 232: 173-181.
- [3] Teresa D M, Luisa H, Joyce C P, et al. Increasing omega-3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile, enhanced resistance to cold stress[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 655-665.
- [4] Wu J M, Zhao Z G, Xing H, et al. Effects of freezing on plasma membrane H⁺-ATPase of the callus from *Chorispora bungeana*[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(2): 229-234.
- [5] Anzu M, Masayuki F, Akari F, et al. Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation[J]. Plant, Cell Physiology, 2009, 50(2): 341-359.
- [6] Maura N L, Mario S, Daniela T, et al. Plant inner membrane anion channel (PIMAC) function in plant mitochondria[J]. Plant, Cell Physiology, 2008, 49(7): 1039-1055.
- [7] Du Z Y, Shi X, Chen Q F, et al. Depletion of the membrane-associated acyl-coenzyme A-binding protein ACEP1 enhances the ability of cold acclimation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2010, 152(3): 1585-1597.
- [8] Riechmann J L, Ratcliffe O J. A genomic perspective on plant transcription factors [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(5): 423-434.
- [9] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(10): 444-451.
- [10] Gilmour S J, Fowler S G, Thomashow M F. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54: 767-781.
- [11] Yang T W, Zhang L J, Zhang T G, et al. Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants[J]. Plant Science, 2005, 169(6): 987-995.
- [12] Novillo F, Medina J, Salinas J. *Arabidopsis* CBF1, CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation, define different gene classes in the CBF regulon[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(52): 21002-21007.

- [13] Mao X G, Zhang H Y, Tian S J, et al. TaSnRK2. 4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(3): 683-696.
- [14] Zhang H Y, Mao X G, Jing R L, et al. Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) TaSnRK2. 7 gene involved in abiotic stress responses[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(3): 975-88.
- [15] Zhang H Y, Mao X G, Wang C S, et al. Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2. 8 enhances tolerance to drought, salt, low temperature in *Arabidopsis*[J]. Plosone, 2010, 5(12): 16041-16049.
- [16] Taniya D, Stephen P P, Eric J S, et al. Regulation of freezing tolerance, flowering in temperate cereals; the VRN-1 connection[J]. Plant Physiology, 2010, 153(4): 1846-1858.
- [17] Amadou D, Ndjido K, Zahra A, et al. Heterologous expression of wheat VERNALIZATION 2 (TaVRN2) gene in *Arabidopsis* delays flowering and enhances freezing tolerance[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): 8690-8697.
- [18] Joo Y K, Won Y K, Kyung J K, et al. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* during cold adaptation process[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(9): 2317-2325.
- [19] Joo Y K, Won Y K, Kyung J K, et al. Zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein in *Oryza sativa* has an RNA chaperone activity under cold stress conditions[J]. Plant Cell and Environment, 2010, 33(5): 759-768.
- [20] Frederic D L, Tong Z, Corinne W, et al. The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism, acts as a translational repressor[J]. Experimental Cell Research, 2007, 313(20): 4130-4144.
- [21] Meral T-O, Gad M, Luhua S, et al. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2009, 151(1): 421-432.
- [22] Reza M A. Expression of Acyl-lipid $\Delta 1$ 2-desaturase gene in prokaryotic, eukaryotic cells, its effect on cold stress tolerance of potato[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(3): 289-297.
- [23] Sara R, Maria G E, Ghasem K, et al. Proteomic analysis of a spring wheat cultivar in response to prolonged cold stress[J]. Electrophoresis, 2011, 32(14): 1807-1818.
- [24] Toshihide N, Masaya I, Hiroko N, et al. Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in bromegrass cell cultures, its relationship to antifreeze activity[J]. Plant Physiology, 2008, 147(1): 391-401.
- [25] 赵云霄, 叶武威, 王俊娟. DNA甲基化与植物抗逆性研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7): 1479-1489.
- [26] Boyko A, I Kovalchuk T. Transgenerational response to stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Signaling and Behavior, 2010, 5(8): 995-998.
- [27] 华扬, 陈学峰, 熊建华, 等. 水稻冷胁迫诱导的甲基化差异片段 *CIDM7* 的分离和分析[J]. 遗传, 2005, 27(4): 595-600.
- [28] 田鑫. 拟南芥胁迫诱导 microRNA 的分离和功能研究及 microRNA 启动子分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [29] Shen J, Xie K, Xiong L. Global expression profiling of rice microRNAs by one-tube stem-loop reverse transcription quantitative PCR revealed important roles of microRNAs in abiotic stress responses[J]. Molecular Genetics, Genomics, 2010, 284(6): 477-488.
- [30] Chen N, Xu Y Y, Wang X, et al. OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin, maintaining cell division under cold stress[J]. Plant, Cell and Environment, 2011, 34(1): 52-64.
- [31] Zuzanna B, Carmen E, Armin S, et al. Disruption of the *Arabidopsis* circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome[J]. Plant Physiology, 2008, 147(1): 263-279.
- [32] Fowler S G, Cook D, Thomashow M F. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, 3 is gated by the circadian clock[J]. Society, 2005, 137(3): 961-968.

Research Progress of Plant Resistance to Low Temperature Stress

SHI Qiu-ju, LI Qun

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: The low temperatures are one of the important factors affecting plant growth, development and geographic distribution. On the basis of a brief introduction of low-temperature had an important influence on cell physiology and biochemistry, transcription factor CBF/DREB family, relative genes of low temperature stress and some other relative factors were summed up. At the same time, there are many factors to their cold response occurred and SnRK, VRN gene expression. In addition, the antifreeze protein accounted for the proportion of heavy plant cold resistance, especially some protein and RNA-binding, and some cold-related enzymes. The relationship between DNA methylation, MicroRNA, photoperiod and plant freezing tolerance were introduced.

Key words: low temperature stress; freezing tolerance; physiology and biochemistry; gene; antifreeze protein