

# 柑橘冻害抵抗分子机理研究进展

陈志远<sup>1</sup>, 邸丽俊<sup>2</sup>, 王国栋<sup>3</sup>, 黄新民<sup>2</sup>, 李新生<sup>4</sup>, 蒋景龙<sup>1</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西理工学院 科技处, 陕西 汉中 723000;

3. 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨凌 712100; 4. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001)

**摘要:**低温是柑橘冻害发生的主要因子, 是影响柑橘生产的常发性自然灾害。冻害发生时, 柑橘能产生一定的应激性反应以应对低温伤害。该文综述了植物冻害的信号传导机制、低温驯化及调控途径, 以探讨利用分子生物学理论和转基因技术提高柑橘冻害抵抗的可能性。

**关键词:**柑橘; 冻害; 低温驯化

**中图分类号:**S 666 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0188-04

低温冻害是影响柑橘生产的常发性自然灾害, 极端地区甚至年年发生。提高柑橘的抗寒性是抗寒工作者亟待解决的问题。随着分子生物学理论和转基因技术的快速发展, 寒害研究已经深入到分子水平, 从而促进植物抗寒基因工程的发展。该文对低温胁迫下的植物冻害的生理变化、信号传导机制、低温驯化及调控机制进行了综述, 以探讨植物应对低温胁迫的机理, 旨在为加强柑橘冻害抵抗的育种研究提供理论依据。

## 1 低温胁迫下的生理变化

从细胞水平来看, 冻害发生时首先变化的是细胞膜的流动性和脂肪酸的组分。目前认为细胞膜的流动性变化是植物感应低温变化的第一步<sup>[1]</sup>, 是后续信号传递、应激反应的起始部分。细胞膜流动性变化的同时还会出现多不饱和脂肪酸的迅速增加, 而后的增加又可以加强低温环境下细胞膜的流动性。

低温还会导致光合作用的降低。光合能力的降低是光照和低温协同作用的结果。低温和光密度变化时, 叶片和茎中会积累花青素, 而花青素是一种光合保护物质。PAL (phenyl ammonia lyase) 和 CHS (chalcone synthase) 是参与控制光合保护物质合成的酶。对血橙的研究发现, 短时间的低温储藏, 可以增加果实中的花青素含量, 并提高相关合成基因的转录水平<sup>[2]</sup>。

## 2 植物冻害的信号传导机制

低温信号的感知是信号传递的起始。DAGK

(Diacylglycerol kinase) 是在低温胁迫早期激活的酶, DAGK 途径的激活通常伴随着细胞膜流动性的降低, 而此过程是由低温胁迫直接导致的<sup>[3-4]</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$  是植物非常重要的第二信使。Whalley 等<sup>[5]</sup>利用基因芯片技术分析了有  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高反应的转录基因组, 揭示了各种  $\text{Ca}^{2+}$  调控的启动子元件, 其成果暗示植物信号通过增加胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对各种刺激包括冷刺激做出反应。

另有研究显示 CAX1 也是低温诱导基因。CAX1 是属于植物阳离子交换体 CAXs (CAtion eXchangers) 家族的主要成员之一, 该基因与植物的抗寒能力有关。CAXs 家族成员主要作用是将阳性离子运出胞外以维持胞内合理的离子浓度。CAX1 基因能显著提高植物的低温适应能力, 同时还伴随其它农艺性状的提升。Cheng 等<sup>[6]</sup>和 Catala 等<sup>[7]</sup>研究发现 CAX1 基因在拟南芥中主要起到调节阳离子和激素平衡、提高植物低温适应力的作用; 将拟南芥 CAX1 表达于烟草中, 可以提高烟草的抗寒能力。

$\text{Ca}^{2+}$  信号由胞质内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的波动变化构成, 并在细胞核中得到解读, 而信号解读的过程与  $\text{Ca}^{2+}$  结合转录因子有关<sup>[8-10]</sup>。AtNIG1 (Arabidopsis thaliana NaCl-inducible gene 1) 是最早鉴定的  $\text{Ca}^{2+}$  结合转录因子<sup>[11-12]</sup>, 也是基本的 helix-loop-helix-type 转录因子, 结构中包含 EF-hand 基元。AtNIG1 可以结合 CBFs 转录启动区的卡农 E-box 元件 (canonical E-box element-CANNTG), 而 CBFs 途径是植物低温驯化的最重要组成部分。

CaM (calmodulin) 是真核生物中最为保守的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白之一, 在发育和环境刺激中起着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。CaM 拮抗物可以降低低温调控基因的表达, 说明 CaM 在低温信号传递上发挥着作用。但是在拟南芥中过表达 CaM 基因降低了低温响应基因表达水平, 说明

**第一作者简介:** 陈志远 (1981-), 男, 陕西汉中人, 博士, 讲师, 硕士生导师, 现主要从事蛋白质结构与功能及基因修饰和过表达等与环境因子的关系研究。E-mail: smaller3593@aliyun.com.

**基金项目:** 陕西省科技厅自然科学基金资助项目 (2012JQ3002)。

**收稿日期:** 2013-09-10

CaM 可能起着负向调控的作用。CDPKs (calcium dependent protein kinases) 是植物特有的磷酸化酶,同时也是响应胁迫压力的效应器,在干旱、盐渍、低温等环境胁迫的信号传递中起着非常重要的作用<sup>[13-14]</sup>。

与  $\text{Ca}^{2+}$  相互作用的蛋白还包括 PPases (serine/threonine phosphatases)。AtPP2CA (Arabidopsis protein phosphatase 2C) 的表达需要低温诱导,低温处理 12 h 时表达量最高,而在苜蓿细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  的内流控制 PP2A 的灭活<sup>[15]</sup>。MAPKs (mitogen activated protein kinases) 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinases),其活性的提高也需要低温诱导<sup>[16]</sup>。

### 3 低温驯化及调控途径

短期较冷的环境可以诱发植物明显增强的低温抵抗能力,而此过程称为低温驯化<sup>[17]</sup>。

低温驯化过程可以引起一系列的低温响应基因 CORs (cold-responsive genes) 的变化。CORs 基因也被称为 LTI (low temperature induced)、KIN (cold inducible)、RD (responsive to desiccation)、ERD (early dehydration inducible),在低温耐性和敏感性植物中均有发现。CORs 基因参与多种新陈代谢的调控过程。除低温外,其它环境胁迫如干旱、盐渍等同样会诱导 COR 基因的表达。与冷胁迫有关的蛋白代谢物参与多种过程<sup>[18]</sup>,如信号传导、RNA 加工、翻译、翻译后加工、氧化还原稳态、光合作用、光呼吸作用以及碳、氮、硫、能量的代谢等。

DHNs,也叫 LEA (group 2 late embryogenesis abundant) 蛋白,具有高度保守的亲水基团、甘氨酸富集和煮沸稳定特性。DHNs 直接参与低温驯化过程。小麦中鉴定出 3 个 DHNs 蛋白,分别是 Wcs120 (K6), Wcor410 (SK3) 和 Wcor14,其中 Wcs120 (K6) 和 Wcor14 的启动子区域含有 CBF 识别元件,可以被 CBF 转录因子激活<sup>[19]</sup>。DHNs 的具体功能目前未有定论,推测可能在脱水过程中起稳定细胞结构的作用,在拟南芥中发现其成员 ERD10 (SK3) 和 EDR14 (SK2) 有分子伴侣的作用<sup>[20]</sup>。

AFPs 蛋白是另一个低温响应 COR 基因家族。AFPs 蛋白有很高的胞内浓度,可吸附在冰晶表面,阻止冰晶生长,防止大块冰体形成。AFPs 在保护植物免受冰晶伤害的同时还有抵御病原侵害的作用。

CSDPs 是所用真核生物共有的一类蛋白,能够与核酸结合起 RNA 分子伴侣的作用<sup>[21-23]</sup>。CSDP 突变植物显示正常环境下 CSDP 蛋白并没有明显的作用,但在低温胁迫下 CSDP 的表达会出现明显的差异,推测低温胁迫下 CSDPs 蛋白可以疏松 mRNA 二级结构,在后续的翻译过程中起非常重要的作用。尽管如此,在非胁迫环境下分生组织中 CSDPs 的表达水平很高。

HSPs 主要是响应高温表达的一类分子伴侣,但有

证据显示低温也会诱导 HSPs 的表达,比如在拟南芥中 HSP70 家族中有 4/5 的胞质蛋白和 2 个线粒体蛋白受到低温调控<sup>[24]</sup>。

植物有多种复杂的调控网络途径,这些调控途径控制 COR 基因的表达、转录、翻译、修饰、压力信号的传递等。低温驯化的过程就是由多种复杂的调控机制协同作用的结果。

某些 COR 基因的启动子区域有 2 种与低温诱导有关的保守序列识别元件 CRT 和 DRE。在 COR14A 基因启动子序列中发现的元件称为 C-repeat (CRT),而在 RD29A 基因的启动子区域发现的序列元件称为 dehydration-responsive element (DRE),这 2 个序列元件有相同的核心序列 CCGAC。微阵列技术鉴定出 45 个 CRT/DRE 控制的基因,其中 37 个由低温上游调控,8 个由低温下游调控。

CBF/DREB 属于 ethylene - responsive element binding factor/APETALA2 (ERF/AP2)-type 转录因子家族。CBFs 可以结合 COR 基因启动子区域的 CRT/DRE cis-elements,诱导 COR 基因表达。CBF/DREB 途径是生产低温响应蛋白最重要的途径之一,调控低温响应转录组中 12% 的基因。CBFs 调控的基因参与磷酸肌醇代谢、转录、渗透物生物合成、ROS 去毒化、膜转运、激素代谢、信号和其它的细胞保护过程<sup>[18,25]</sup>。CBF 同源物在低温耐受型植物和低温敏感型植物中均有发现<sup>[25-26]</sup>。CBF/DREB1 和 DREB2 是结合 DRE/CRT 序列的主要转录因子。CBF/DREB1 参与低温信号过程,而 DREB2 参与渗透压胁迫响应过程。CBF1、CBF2、CBF3 在拟南芥染色体 4 上呈连锁分布,且均对低温做出响应。多种 CBF3 基因过表达的植物可提高其低温耐受力,并导致 COR 基因转录物和蛋白、脯氨酸以及可溶性糖的积累,说明 CBF3 有助于增强低温驯化的作用。CBF2/DREB1C 是一个 CBF1/DREB1B 和 CBF3/DREB1A 的负向调控子,而 CBF3 可以负向调控 CBF2 的表达水平<sup>[27]</sup>。

ICE1 (Inducer of Cbf Expression1) 是 MYC-type basic helix-loop-helix 转录因子,可与 CBF3 启动子区域的 MYC 识别元件结合,诱导低温驯化过程中 CBF3 的表达<sup>[28]</sup>。ICE1 突变体缺乏 CBF3 的低温诱导表达能力,表现出对低温的极度敏感,从而散失了低温驯化能力。ICE1 的持续性过表达可增强 CBF3、CBF2 和 COR 基因的表达,提高转基因拟南芥的低温耐受能力。常温状态下,ICE1 定位于细胞核内持续性表达;但在低温胁迫时 ICE1 才会诱导 CBFs 的表达。低温胁迫能使 ICE1 磷酸化从而活化 ICE1,激活 CBFs 基因的表达。ICE2 是另一个 MYC 类似 bHLH 转录因子,可激活 CBF1 的

表达<sup>[29]</sup>。

此外,MYB15 可与 CBFs 启动子区域的 MYB 识别元件结合,从上游负向调控 CBFs。Myb15 TDNA 缺失突变可增强植物低温驯化过程中 CBFs 的表达和低温耐受能力<sup>[28]</sup>,而过表达 MYB15 降低了植物 CBFs 的表达水平和低温抵抗能力<sup>[28]</sup>。

AHK2(Arabidopsis Histidine Kinase2)和 AHK3 参与 1℃低温信号识别,可以诱导 A 型 ARR(Arabidopsis Response Regulator)基因家族成员的表达,比如 ARR5、ARR6、ARR7、ARR15<sup>[30]</sup>。AHK2 和 AHK3 通过作用于 MYB15,负向调控着 CBF3 的部分靶基因。ARR1 是 B 型 ARR 家族成员,在调控 A 型 ARR 成员中起积极作用。AHP2、AHP3 和 AHP5 可能是 A 型 ARR 成员的上游调控子,但位于 AHK2 和 AHK3 的下游<sup>[31]</sup>。

ZAT 12,一个低温诱导 C2H2 锌指转录因子,也表现出对 CBFs 的负向调控作用<sup>[32]</sup>。ZAT 12 的过表达降低了低温胁迫下 CBFs 的表达。LOS2 是一个双功能烯醇酶,也可能是 CBFs 目标基因的负向调控子,其能与 ZAT 10 启动子区域的 MYC 识别元件结合,对 ZAT 10 起负向调控作用<sup>[33]</sup>。瞬时表达试验显示 ZAT 10 能抑制 RD29A 的表达,而 RD29A 是 CBFs 的一个调控目标基因。

#### 4 结论

柑橘是低温敏感型植物,但依然具有一定的低温冻害抵抗能力。Sahin-Cevik 等<sup>[34]</sup>利用消减杂交技术发现柑橘砧木(*Poncirus trifoliata*)中多达 92 个 cDNA 序列受到冷胁迫的诱导表达。这个研究为基因工程技术改良柑橘品种的抗寒性提供了理论基础。

CBF 家族成员是低温驯化的核心基因,对改良植物的低温耐受性具有重要意义。在柑橘中的研究也有类似发现。枸橼是柑橘的近缘物种,通常作为嫁接柑橘的砧木。Champ 等<sup>[35]</sup>研究了柑橘(*Citrus paradisi*)和枸橼(*Poncirus trifoliata*)中 CBF 基因的表达情况,发现枸橼中的 CBF 基因不仅出现的时间要早,而且表达量要远高于柑橘。不仅如此,将柑橘嫁接在枸橼上,能显著提高柑橘叶片中 CBF 基因的表达量。这说明 CBF 基因的表达量与植物的抗寒能力呈正相关。这从理论上证明提高柑橘中 CBF 基因的表达量从而提高其抗寒性是可行的。

利用转基因技术改良柑橘品种性状技术上已经相当成熟。Aguero 等<sup>[36]</sup>利用柑橘叶片斑点病毒开发了专用于柑橘的转基因技术体系。Miyata 等<sup>[37]</sup>利用 GUS 表达系统在甜橙中试验了 3 种不同的韧皮部特异性启动子(phloem-specific promoters)的转基因表达效率。De Oliveira 等<sup>[38]</sup>将 *citrus* MAP kinase 基因转至目的株

中,获得了抗柑橘溃疡病的品系。

总体而言,柑橘中的抗寒基因研究还甚为有限,研究多集中在其它物种中。尽管如此,其它物种中抗寒基因的研究进步对柑橘的研究有很好的借鉴意义。利用转基因技术改良现有柑橘品种的抗寒性将是柑橘育种的有效手段之一。

#### 参考文献

- [1] Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants[J]. New Phytol, 2008, 179(3): 615-28.
- [2] Crifo T, Petrone G, Lo C L, et al. Short cold storage enhances the anthocyanin contents and level of transcripts related to their biosynthesis in blood oranges[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(1): 476-481.
- [3] Arisz S A, van Wijk R, Roels W, et al. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in Arabidopsis is generated through diacylglycerol kinase[J]. Front Plant Sci, 2013(4): 1.
- [4] Shen Y, Wang T, Li C. Study on real-time wearable monitoring system for human heat and cold stresses[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2013, 30(1): 80-84, 94.
- [5] Whalley H J, Sargeant A W, Steele J F, et al. Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2011, 23(11): 4079-4095.
- [6] Cheng N H, Pittman J K, Zhu J K, et al. The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis  $H^+/Ca^{2+}$  antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2004, 279(4): 2922-2926.
- [7] Catala R, Santos E, Alonso J M, et al. Mutations in the  $Ca^{2+}/H^+$  transporter CAX1 increase CBF/DREB1 expression and the cold-acclimation response in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2003, 15(12): 2940-2951.
- [8] De Falco T A, Bender K W, Snedden W A. Breaking the code:  $Ca^{2+}$  sensors in plant signalling[J]. Biochem J, 2010, 425(1): 27-40.
- [9] Hashimoto K, Kudla J. Calcium decoding mechanisms in plants[J]. Biochimie, 2011, 93(12): 2054-2059.
- [10] Batistic O, Kudla J. Analysis of calcium signaling pathways in plants[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(8): 1283-1293.
- [11] Kim J, Kim H Y. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling[J]. FEBS Lett, 2006, 580(22): 5251-5256.
- [12] Kim M C, Chung W S, Yun D J, et al. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants[J]. Mol Plant, 2009, 2(1): 13-21.
- [13] Asano T, Hayashi N, Kikuchi S, et al. CDPK-mediated abiotic stress signaling[J]. Plant Signal Behav, 2012, 7(7): 817-821.
- [14] Holder A A, Mohd R M A, Green J L. Calcium dependent protein kinase 1 and calcium fluxes in the malaria parasite[J]. Microbes Infect, 2012, 14(10): 825-830.
- [15] Peuthert A, Lawton L, Pflugmacher S. In vivo influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in Alfalfa(*Medicago sativa*)[J]. Toxicon, 2008, 52(1): 84-90.
- [16] Fujiwara Y, Denlinger D L. p38 MAPK is a likely component of the signal transduction pathway triggering rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*[J]. J Exp Biol, 2007, 210(18): 3295-3300.
- [17] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(10): 444-451.
- [18] Lissarre M, Ohta M, Sato A, et al. Cold-responsive gene regulation



- during cold acclimation in plants[J]. Plant Signal Behav, 2010, 5(8): 948-952.
- [19] Rorat T. Plant dehydrins—tissue location, structure and function[J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(4): 536-556.
- [20] Hanin M, Brini F, Ebel C, et al. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms[J]. Plant Signal Behav, 2011, 6(10): 1503-1509.
- [21] Kim J S, Park S J, Kwak K J, et al. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(2): 506-516.
- [22] Park S J, Kwak K J, Oh T R, et al. Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions[J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50(4): 869-878.
- [23] Taranov V V, Berdnikova M V, Nosov A V, et al. Cold shock domain proteins in the extremophyte *Thellungiella salsuginea* (salt cress): gene structure and differential response to cold[J]. Mol Biol (Mosk), 2010, 44(5): 889-897.
- [24] He L H, Chen J Y, Kuang J F, et al. Expression of three sHSP genes involved in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit[J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(9): 1924-1930.
- [25] Medina J, Catala R, Salinas J. The CBFs: three arabidopsis transcription factors to cold acclimate[J]. Plant Sci, 2011, 180(1): 3-11.
- [26] Pino M T, Skinner J S, Jeknic Z, et al. Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato[J]. Plant Cell Environ, 2008, 31(4): 393-406.
- [27] Novillo F, Medina J, Salinas J. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(52): 21002-21007.
- [28] Zhou M Q, Shen C, Wu L H, et al. CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants[J]. Crit Rev Biotechnol, 2011, 31(2): 186-192.
- [29] Fursova O V, Pogorelko G V, Tarasov V A. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Gene, 2009, 429(1-2): 98-103.
- [30] Jeon J, Kim N Y, Kim S, et al. A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in Arabidopsis[J]. J Biol Chem, 2010, 285(30): 23371-23386.
- [31] Jeon J, Kim J. Arabidopsis response Regulator1 and Arabidopsis histidine phosphotransfer Protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 function in cold signaling[J]. Plant Physiol, 2013, 161(1): 408-424.
- [32] Chandra R A, Singh M, Shah K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants[J]. Plant Physiol Biochem, 2012, 61: 108-114.
- [33] Xie Y, Mao Y, Lai D, et al. H(2) enhances arabidopsis salt tolerance by manipulating ZAT10/12-mediated antioxidant defence and controlling sodium exclusion[J]. PLoS One, 2012, 7(11): 498-450.
- [34] Sahin-Cevik M, Moore G A. Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy Citrus relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf[J]. Plant Mol Biol, 2006, 62(1-2): 83-97.
- [35] Champ K I, Febres V J, Moore G A. The role of CBF transcriptional activators in two Citrus species (*Poncirus* and *Citrus*) with contrasting levels of freezing tolerance[J]. Physiologia Plantarum, 2007, 129: 529-541.
- [36] Aguero J, Ruiz-Ruiz S, Del C V M, et al. Development of viral vectors based on Citrus leaf blotch virus to express foreign proteins or analyze gene function in citrus plants[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2012, 25(10): 1326-1337.
- [37] Miyata L Y, Harakava R, Stipp L C, et al. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters[J]. Plant Cell Rep, 2012, 31(11): 2005-2013.
- [38] De Oliveira M L, Lima S C C, Abe V Y, et al. Increased resistance against citrus canker mediated by a citrus MAP kinase[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2013, 26(10): 1190-1199.

## Review of Molecular Mechanism of Cold Resistance in Citrus

CHEN Zhi-yuan<sup>1</sup>, DI Li-jun<sup>2</sup>, WANG Guo-dong<sup>3</sup>, HUANG Xin-min<sup>2</sup>, LI Xin-sheng<sup>4</sup>, JIANG Jing-long<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Department of Science and Technology, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 3. College of Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 4. Shaanxi Key Laboratory of Bioresources, Hanzhong, Shaanxi 723001)

**Abstract:** Low temperature is a main impact factor for freeze injury of citrus. It is also a frequent natural disaster for citrus production. When cold injury occurs, citrus makes some effective response to resist it. The plant signal transduction mechanism, cold acclimation and regulation pathway during freezing injury were reviewed in this paper. Possibility of improving citrus against cold injury with molecular mechanism of cold resistance and transgenic technology were discussed.

**Key words:** citrus; freeze injury; cold acclimation