植物学通报 2001，18（5）：521～530
Chinese Bulletin of Botany

植物抗冻机理研究新进展：抗冻基因表达及其功能①

[1] 邓江明 [2] 简令成

[1]（广东教育学院生物系 广州 510303） [2]（中国科学院植物研究所 北京 100093）

摘要 综述了迄今业已分离和鉴定的低温诱导表达的抗冻基因，以及通过染色体基因制图方法揭示和证实的抗冻性基因。并着重地介绍了这些抗冻基因在提高植物抗冻能力上的功能。这些抗冻基因表达合成的新多肽具有高度的亲水性，起着保护和稳定细胞膜结构的作用，从而防止冰冻伤害、提高植物的抗冻能力。同时还介绍了抗冻基因表达中的某些调节因子，其中尤其值得注意的是，*CBF* 基因似乎有可能作为抗冻基因表达的‘主开关”，以及 Ca^{2+} 作为植物细胞的第二信使在传递低温信号、启动和调节抗冻基因表达中可能的重要作用。这些研究结果，不仅为阐明植物的抗冻机理提供了新的证据，而且为改良农作物的抗寒性提供了新的启示。

关键词 抗冻基因表达，植物耐冻性，基因调节，ABA 调节，Ca^{2+} 调节

Advances of Studies on Plant Freezing-tolerance Mechanism: Freezing Tolerance Gene Expression and Its Function

[1]DENG Jiang-Ming [2]JIAN Ling-Cheng

[1]（*Biology Department*, *Guangdong Education College*, Guangzhou 510303）

[2]（*Institute of Botany*, *The Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093）

Abstract This paper summarizes the recent progress in studies on plant freezing tolerance genes. The expressions of these genes are induced during cold acclimation and some genes have been isolated, characterized and mapped. The paper emphasizes the role of these genes in increasing plant freezing tolerance. A large number of polypeptides encoded by these genes are highly hydrophilic, and so they can stabilize membranes and prevent membranes from freezing injury. The paper also introduces some regulatory factors, especially *CBF* gene as the“ master switch ”and Ca^{2+} as the second messenger, which may play an important role in activating and regulating the expression of freezing tolerance genes. These studies not only contributed new evidence for understanding the mechanism of plant freezing tolerance, but also may provide new ideas for improving the freezing-tolerance of crops.

Key words Expression of freezing tolerance genes, Plant freezing tolerance, Gene regulation, ABA regulation, Ca^{2+} regulation

众所周知，植物抗寒机理的阐明，不仅有着重要的科学理论意义，而且具有重要的应用价值。全球每年因低温寒害造成许多农作物的损失高达数千亿美元。因此，长期以来，已有多种学科，如植物生理学、形态学、遗传育种学、生物化学、生物物理学、细胞生物学及

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-130

① 作者简介 邓江明，女，1956 年生，博士，广东教育学院生物系副教授，2000 年 3 月至 2001 年在美国明尼苏达大学园艺系植物抗性研究室客座教授，从事植物抗寒机理的细胞生物学研究。

收稿日期：2000-09-21 接受日期：2000-10-26 责任编辑：刘 晖

分子生物学等,从多方面对植物抗寒机理进行了广泛的研究。简令成和吴素萱(1965)报道,细胞器膜结构的破坏是植物在低温逆境中造成伤害和死亡的重要原因。Heber(1968)通过菠菜分离叶绿体的冰冻实验,精确地证实冻害首先是破坏叶绿体的膜结构,然后才导致光合磷酸化(ATP 酶)的失活。此后,大量研究结果进一步揭示和证实,低温对细胞膜体系的损伤是造成植物寒害的根本机制,其主要原因是由于冰冻引起的细胞脱水而导致膜的脂双层向六角形 II 相的转变以及膜的破裂(简令成,1983;Steponkus *et al*, 1993a)。由此可见,植物的抗寒力是决定于膜结构的冷稳定性。简令成和董合铸(1980)通过小麦分离原生质体的冰冻测试,证实质膜的冷稳定性与小麦品种的抗寒性成正相关。各种植物在低温锻炼后抗寒力的增强,也是由于这种低温锻炼提高了膜的冷稳定性(简令成,1983;简令成等,1994)。所以,探讨提高膜的冷稳定性的因素是增强植物抗寒力的根本途径(简令成等,1994)。已知膜的稳定性涉及到多种机制:报道最多的是改变脂质成分(Murata *et al*,1992;Steponkus *et al*, 1993a),或在细胞内积累较多的蔗糖和单糖,以及氨基酸(如脯氨酸)等物质(简令成,1986;Strauss and Hauser,1986)。近十余年来,许多研究者们对植物在低温锻炼中基因表达的改变做了大量的探索,发现低温锻炼能诱发不少新蛋白质的合成,并进一步分离出这些冷诱导表达的基因。然而,这些基因表达的产物——合成的新多肽与抗寒性提高究竟有什么关系,如何起作用?曾一度仍然知之很少。可喜的是,近年来,通过对这些新多肽的分析与鉴定,揭示这些新多肽大多具有高度亲水性的特性(Thomashow, 1999)。这表明,它们对膜可能起着保护与稳定作用,从而防止冰冻损伤,提高植物的抗冻性。还有一些研究进一步探索了这种抗冻基因表达的启动和调节因子(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994;Jaglo-Ottosen *et al*, 1998)。这些新的结果,不仅为阐明植物的抗冻机理提供了新的证据,而且为农作物的抗寒育种提供了新的启示。本文特对此作一个简要介绍。

1 业已分离和鉴定的抗冻基因

Weiser (1970) 最先提出低温锻炼可能会引起基因表达改变的设想。Guy 等(1985)首次揭示菠菜在低温锻炼中基因表达确实发生了改变。迄今,大量的研究已经证实,低温锻炼可以诱发许多抗冻基因表达,例如:拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *cor* 基因,又称为 *lti* 或 *rd* 或 *kin* 基因(Thomashow, 1999),其中研究较多的是 *Cor15* (Lin and Thomashow, 1992), *cor6.6* (Kurkela and Franck, 1990, Gilmour *et al*, 1992, Wang *et al*, 1994), *cor78* (Nordin *et al*, 1993;Yamaguchi-Shinozaki Shinozaki, 1993), *cor47* (Gilmour *et al*, 1992);油菜(*Brassica napus*)的 *BN28* (Orr *et al*, 1992)和 *BN15* (Weretilnyk *et al*, 1993),这两个基因分别与拟南芥的 *cor6.6* 和 *cor15* 是同源基因;苜蓿(*Medicago sativa*)的 *cas18* 和 *cas15* (Wolfraim *et al*, 1993;Monroy *et al*, 1993);菠菜(*Spinacia oleracea*)的 *cap* 基因(Guy and Haskell, 1987;1989);马铃薯(*Solanum commersonii*)的 *pA13* (Zhu *et al*, 1993);小麦(*Triticum aestivum*)的 *cor39* (Guo *et al*, 1992), *wcs120* (Houde *et al*, 1992)和 *wcs200* (Ouellet *et al*, 1993);大麦(*Hordeum vulgare*)的 *HVA1* (Hong *et al*, 1988;1992;Sutton *et al*, 1992), PT59 (Cattivelli and Bartels, 1990), *pA086* (Cattivelli and Bartels, 1990), *BLT14* (Dunn *et al*, 1990), *BLT4* (Dunn *et al*, 1991)等。

https://www.cnki.net/kcms/detail/11-2238.Q.20130

这些基因表达的产物——合成的新多肽，在不同的植物中表现出不少共同的特征，例如：(1)这些抗冻基因的表达一般很迅速，例如在拟南芥中，低温处理 12～24 小时内，即可检测出新多肽的合成(Heino *et al*，1990)。(2)这些新合成的多肽在整个低温锻炼过程中一直维持高水平(Cattivelli and Bartels，1989)。(3)在低温锻炼过程中虽然诱发出一些抗冻基因的表达，产生出一些新多肽，并使某些已有的多肽含量增加，另外一些多肽含量降低，然而那些主体多肽的合成在整个低温锻炼期间仍然保持稳定地持续进行，以保证植物在这种低温下仍能维持细胞的基本代谢。这是草本植物在低温锻炼期间为什么能够继续生长的重要的生理生化基础。例如拟南芥在 4℃ 低温下，不仅能继续生长，还能开花结实(Lâng *et al*，1989)。(4)低温诱导抗冻基因表达的研究进一步证明，植物的抗冻性是由多基因控制的，例如不同抗寒性小麦品种在低温锻炼过程中合成的新多肽的种类数量与小麦品种的抗寒性成正相关，品种的抗寒性愈强，低温锻炼中合成的新多肽的种类数量也愈多(潘杰等，1994)。(5)低温诱导合成的新多肽大多具有极强的亲水性，在沸腾的缓冲水溶液中仍保持溶解状态；它们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；还有许多多肽包含一段特殊的区域，能够形成亲水脂性的 α-螺旋。例如：拟南芥的 *cor15* 基因编码一种 15 kD 的新多肽 COR15a。此多肽合成后运送至叶绿体基质片层中加工成成熟的 9.4 kD 的多肽，称为 COR15am。它是高度亲水性的，在沸水中仍保持溶解状态。它富含丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸(占 64%)，一个由 13 种氨基酸组成的序列重复 4 次排列。此多肽的某些区域，包括这些重复序列，可形成亲水脂性 α-螺旋(Lin and Thomashow，1992)。此外，如苜蓿的 *cas15* 基因编码的 15 kD 的新多肽 CAS15 (Monroy *et al*，1993)，小麦 *wcs120* 基因编码的 39 kD 的多肽 WCS120 (Close，1997)，以及，大麦 *HVA1* 基因编码的 22 kD 多肽 *HVA1* (Dure 1993)，也都被证实具有这些方面的特性。

2　抗冻基因表达在植物抗冻中的功能

已知植物在低温锻炼过程中，由于基因表达的改变，诱发合成许多新蛋白质。这些蛋白质在抗寒中的作用大致可分为三类：1. 行使酶的作用，改变植物的代谢途径，使之进入抗寒锻炼；2. 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；3. 新合成的蛋白质分布于液泡和细胞间隙中，起着阻止冰冻的作用，使细胞液在低温下处于过冷却状态，这类新蛋白质多数为糖蛋白(简令成，1992)。近年来，分离和鉴定的抗冻基因，其表达产物——新合成的多肽，多数属于第二类，它们具有高度的亲水性，对膜起保护和稳定作用，从而防止冰冻损伤，提高植物的抗冻性。

2.1　*cor15a* 基因表达提高植物的抗冻性

Artus 等(1996)对拟南芥 *cor15a* 基因的研究为冷诱导基因的抗冻作用首次提供了直接的证据。如前所述，*cor15a* 编码的一种 15 kD 多肽在输入叶绿体基质片层中后，被加工成 9.4 kD 的成熟多肽。Artus 等(1996)证明，未经低温锻炼的转基因拟南芥植株中 *cor15a* 的表达可以增强体内叶绿体的耐冻性，将其可忍耐的低温限度从 －4～－8℃ 增加到了 －6～－10℃。用双醋酸荧光素染料检查原生质体质膜的半通透性，从而判断原生质体的存活率的实验说明，*cor15a* 的表达可稳定膜的结构。Steponkus 及其同事(Steponkus *et al*，1993b)发现，未经低温锻炼的拟南芥植株，在 －4～－8℃ 低温下膜系统伤害的主要原因是

形成了六角形 II 相脂，而 *cor15a* 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。Steponkus 等（1998）提出一个假设，这个假设的根据是：某些亲水脂 α-螺旋对膜磷脂层内部的弯曲性有很强的作用，并影响到它们形成六角形 II 相。他们推测 COR15am 可以通过改变叶绿体被膜内膜的弯曲性，来推迟冰冻引起的六角形 II 相的形成，或降低形成六角形 II 相的温度。检验一种多肽是否具有改变膜的弯曲性的作用，就看这种多肽是否具有能改变引起膜脂双层向六角形 II 相转变的温度。Steponkus 等（1998）发现 COR15am 可降低包含二油酰基磷脂乙醇胺（dioleoylphosphatidyl-ethanolamine）的人造脂质体膜向六角形 II 相转变的温度，并促使组成叶绿体被膜的脂类混合物质形成脂双层结构。

Steponkus 等提出的这个内部弯曲假说（intrinsic curvature hypothesis）解释了 COR15am 增加植物细胞耐冻性的机制。这个假说也可以解释其他抗冻基因编码的亲水性多肽的作用。它们都有形成亲水脂性 α-螺旋的区域，因此，都可能通过影响膜磷脂层内部的弯曲性，来稳定膜结构以抵抗由于冰冻或其他逆境如干旱、高盐等引起的细胞脱水而造成的膜伤害。

2.2 CRT/DRE-调节子的诱导可增强抗冻性

所有的 *cor* 基因启动子都带有 CRT/DRE 调节元件（c-repeat/ drought responsive element），这个调节元件若与转录活化因子（transcript activator）结合，就能刺激 *cor* 基因的表达。与此调节元件结合的激活蛋白叫做 CBF1（CRT/DRE binding factor）。Jaglo-Ottosen 等（1998）育成功能够超表达 *CBF1* 的拟南芥，使得整套的 *cor* 基因即使没有低温刺激也能够表达。实验结果说明，能够超表达 *CBF1* 的植株的耐冻性比仅仅表达 *cor15a* 植株的耐冻性要强得多。他们通过电解质渗漏实验测定，发现超表达 *CBF1* 的植株耐冻性比仅仅表达 *cor15a* 植株的耐冻性高 3.3℃，*CBF1* 诱导表达还能提高整体植株的冷冻存活率，而仅仅表达 *cor15a* 的却不行。Liu 等（1998）也证明 CRT/DRE-调节子的表达可增强植物的耐冻性。他们筛选出可以超表达 *DREB1A* 的拟南芥。DREB1A 是与 CBF1 同源的转录活化因子。*DREB1A* 与 CRT/DRE 调节子结合便激活 *cor* 基因表达。结果说明 *DREB1A* 表达不仅增强植株的耐冻性，也增强抗旱性。

3 通过染色体基因制图揭示小麦 *Vrn1-Fr1* 区段在抗冻性中的作用

植物耐冻能力是一个数量遗传性状。小麦的几乎所有的染色体都能对耐冻性起作用。现已证实，小麦的第 5 染色体长臂上的一个位点，*Vrn1-Fr1* 区段（the *Vrn1-Fr1* interval）对耐冻性起主要的作用。

Vrn1-Fr1 区段含有 *Vrn1* 基因，这是决定小麦的开花是否需要春化作用的基因（Brule and Fowler，1988）。冬性品种，携带有隐性的 *vrn1* 基因。这些植物的开花需要经过一段时间的低温春化作用。春性品种，携带有显性的 *Vrn1* 基因，它们开花不需要经过春化作用。携带有隐性的 *vrn1* 基因的冬性品种总是比携带有显性的 *Vrn1* 基因的春性品种要耐寒。这说明 *Vrn1* 基因本身就是个耐冻性基因或者它是与一个耐冻性基因紧密相连。Galiba 等（1995）的研究结果证实了是后一种可能性。他们以耐冻性冬性品种小麦‘Cheyenne’第 5 染色体替代春性品种小麦‘Chinese Spring’的第 5 染色体，得到比原来的‘Chinese Spring’

更耐寒的、开花更早的‘Chinese Spring’替代系（substitution line），并另外用一个冷敏感春性品种 *Triticum spelta* 的第 5 染色体替代‘Chinese Spring’的第 5 染色体，而得到一个更敏感的、开花更晚的 Chinese Spring 替代系。然后再将这两种替代系杂交，对所产生的后代进行耐冻性分析，并制作基因图谱，发现携带有隐性的 *vrn1* 基因的单重组系（single recombination line），即是冬性型，却是冷敏感的。这说明 *Vrn1* 基因本身并不是个耐冻性基因，它只是与一个耐冻性基因结合在一起，与 *Vrn1* 基因紧密相连的耐冻性基因叫做 *Fr1*（frost resistance gene）。现在，小麦的 *Vrn1-Fr1* 区段的基因图谱已经得到（Galiba *et al*，1995）。

Storlie 等（1998）证实不同冬性小麦耐寒性不同是由于有不同的 *Vrn1-Fr1* 区段。他们以冷敏感的春性品种 Marfed（LT_{50}为 -8.2°C）作为母本，以两个耐冻性不同的冬性品种：‘Suweon 185’（LT_{50}为 -13.6°C）和‘Chugoku 81’（LT_{50}为 -12.7°C）作为父本，分析 5 代回交后代所产生的近等基因系 NILs（near isogenic lines）耐冻性的差异，结果发现，带有冬性 *vrn1-Fr1* 基因的植株的耐冻性比携带有 *Vrn1-fr1* 基因的植株耐冻性强 4°C 多，并且携带有来源于‘Suweon 185’的 *vrn1-Fr1* 位点的后代耐冻性比携带有来源于‘Chugoku 81’的 *vrn1-Fr1* 位点的后代耐冻性强 0.5°C。NILs 之间耐冻性差异 70% ~ 90% 的原因是由于 *Vrn1-Fr1* 区段的不同。从而进一步证实了 *Vrn1-Fr1* 区段对于植物耐冻性的重要作用。

关于 *Vrn1-Fr1* 区段影响耐冻性的机理，Limin 等（1997）报道小麦位于染色体 6A、6B、6C 上的 *wcs120* 基因是受冷冻诱导表达的。此基因在冬性‘Chinese Spring’（‘Cheyenne’5A）替代系中的表达要高于其亲本‘Chinese Spring’。而且，其耐冻性也是前者高于后者。因此，很有可能是 *Vrn1-Fr1* 区段编码一个或多个调节蛋白，这些蛋白可调节冷诱导基因的表达，从而对耐冻性起作用。

其他植物中是否也有 *Vrn1-Fr1* 区段存在？Hayes 等（1993）、Pan 等（1994）和 Van zee 等（1995）证实大麦的第 7 染色体上 21-CM 区域是编码主要的耐冻性及春化作用基因的区域，并且，连接在小麦 *Vrn1-Fr1* 区段上的分子标记 Xwg644 和 Xcdo504，也可连接在大麦的 21-CM 耐冻性基因区域，大麦的春化位点 *Sh2* 也与分子标记 Xwg644 连接。这暗示着大麦的第 7 染色体与小麦的第 5 染色体群是同源的。

4　抗冻基因表达的调节

4.1　CBF/DREB1 转录活化因子调节 *cor* 基因表达

前面已经提到 Jaglo-Ottosen 等（1998）的工作已证明 *cor* 基因的调节元件 CRT/DRE 以及转录活化因子 CBF1 和 DREB1 对 *cor* 基因表达具有很重要的作用。Yamagushi-Shinozaki 等（1994）首先证实，这个冷调节元件由 9bp 组成，其顺序为 TACCGACAT，其核心序列为 5bp，CCGAC。这个调节元件除了对低温反应外，还可对干旱、高盐等作出反应而使基因表达。Stockinger 等（1997）首次分离了编码结合于 CRT/DRE 的蛋白的 cDNA。这种结合蛋白就是 *CBF1*。它的分子量为 24 kD，含有一个 AP2 区域，这是个有 60 个氨基酸的基元（motif）。这种基元在许多植物蛋白中都已发现（Monroy *et al*，1998）。Ohme-Takagi 和 Shinshi（1995）证明 AP2 区域中有一个 DNA 结合区段。Stockinger 等（1997）发现烟草的乙烯反应元件的序列 AGCCGCC 与拟南芥 *cor15a* 和 *cor78* 基因启动子的 CRT/DRE 元件序列 GGCCGAC 和 ATCCGAC 很相似，因此，Stockinger 等（1997）推断 *CBF1* 和 EREBPs（ethylene response

https://www.scientia.ac.cn/kxtb/CN/10.11895/j.issn.0577-7496.1999.12.007

element binding proteins,乙烯反应元件结合蛋白)以及其他含有 AP2 的蛋白都是 DNA 结合蛋白超级家族(super family of DNA binding proteins)的成员。此蛋白可识别顺式作用调节元件,因为顺式作用调节元件都是以 CCG 作为共同的核心序列。有人认为,CCG 核心序列两边的差异可导致结合不同的 AP2 蛋白,从而可成为不同的环境、激素、发育阶段等因子所激活的信号传递途径。

最近,Gilmour 等(1998),Liu 等(1998)和 Shinwari 等(1998)进一步证实,*CBF1* 是个小基因家族的成员。这个基因家族编码三个相关的转录活化因子。这三个基因,分别被称为 *CBF1*,*CBF2*,*CBF3*,或者也可被称为 *DREB1B*,*DREB1C*,*DREB1A*。它们都位于第 4 染色体上,它们并不与它们的靶基因,即由 CRT/DRE 控制的 *cor6.6*,*cor15a*,*cor47* 或 *cor78* 基因连接在一起。这几个 *cor* 基因分别相应地位于第 5、2、1 和 5 染色体上(Gilmour *et al*, 1998)。与 *CBF1* 相似,CBF2 和 CBF3 也都是转录活化因子,都可促进 *cor* 基因表达,从而提高转基因植株的耐冻性及抗旱性。

4.2 ABA 在调节抗冻基因表达中的作用

Waldman 等(1975)的研究结果揭示,苜蓿幼苗体内赤霉素和脱落酸(GA/ABA)平衡关系的变动调控着抗寒锻炼。Chen 等(1983)观测到,能接受抗寒锻炼的马铃薯种类 *Solanum commersonii* 在低温处理中 ABA 水平出现暂时性提高,并且在温暖的条件下,使用外源 ABA 也能提高 *S. commersonii* 的抗冻性。而不能接受抗寒锻炼的种类 *S. tuberosum* 则不能表现此现象,他们因此提出了一个假设:植物的抗寒锻炼是由 ABA 的作用而激活的。也是在 1983 年,简令成等报道,外源 ABA 对不同抗寒性小麦品种的作用效果不同。对抗寒性强的品种,ABA 提高其抗冻性作用效果好;对抗寒性弱的品种,ABA 的效应低。他们因此推论,ABA 的作用机理是在启动和引发植物固有的抗冻性基因的表达①。

ABA 突变体的研究证实了 ABA 对提高植物抗冻性的重要作用。携带有 ABA 合成损伤的拟南芥突变体 *aba1* 与携带有 ABA 不敏感的突变体 *abi1* 幼苗的耐冻性都比野生型植株差(Heino *et al*, 1990;Mantyla *et al*,1995)。ABA 对 *cor* 基因具有调节作用,*cor* 基因家族的成员 *cor78*, *cor47*, *cor15a*,*cor6.6* 都因外源 ABA 的作用而得到高度表达,进而提高了植物的耐冻性(Gilmour *et al*, 1992;Nording *et al*, 1993)。还有实验指出,被低温诱导的拟南芥 *RAB18* 和 *lti65* 基因,其表达需要依赖于 ABA 的作用。正常植株可因低温刺激而诱导这些基因转录本积累,但 *aba1* 或 *abi1* 突变体植株却不行。ABA 对这些基因的调节表达可能是通过其启动子上的 ABA 反应元件 ABREs 起作用(Lang and Palva, 1992;Nording *et al*, 1993;Welin *et al*, 1994)。

4.3 钙(Ca^{2+})在植物抗冻基因表达中的调节作用

已有许多证据说明,植物在低温锻炼时,低温信号传递途径中,Ca^{2+} 是重要的第二信使(Knight *et al*, 1996;Monroy *et al*, 1993;Monroy and Dhindsa, 1995;Tahtiharju *et al*, 1997)。细胞内游离 Ca^{2+} 离子浓度的增加是 Ca^{2+} 充当第二信使的内在基础。大量的试验证据已经揭示,当植物受到低温、短日照等环境因素刺激时,细胞内的 Ca^{2+} 水平出现短暂

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-130

① 简令成,孙龙华,孙德兰,1983. 脱落酸(ABA)和矮壮素(CCC)对提高小麦抗寒力的作用. 中国植物学会五十年年会学术报告及论文摘要汇编,789

性的迅速提高（Knight *et al*，1991；Bush *et al*，1995；Jian *et al*，1997a；1997b；1999；2000）。业已证实，低温引起细胞内 Ca^{2+} 浓度短暂性增加是诱发抗寒性植物苜蓿、拟南芥和冬小麦冷适应基因表达和抗冻性提高所必需的（Monroy *et al*，1995；Kurkela and Borg-Franck，1992；Jian *et al*，1997b）。大量实验结果指出，用含有 Ca^{2+} 的 CR-4 抗寒剂浸泡水稻种子或浸泡水稻幼苗的根，能够显著地提高水稻秧苗的抗寒力和细胞膜结构的冷稳定性（简令成等，1994）。拟南芥某些受低温调节的基因 如 CRT/DRE 控制的 *cor6.6* 和 *kin1* 的完全表达也必需依赖于这种 Ca^{2+} 水平的增加（Knight *et al*，1996；Monroy *et al*，1993；1995；Tahtiharju *et al*，1997）。简令成等报道，低温等环境因子不仅引起细胞质 Ca^{2+} 水平的升高，而且可能首先引起细胞核内 Ca^{2+} 浓度的迅速增加，这也说明 Ca^{2+} 与冷反应基因表达的密切关系（Jian *et al*，1997a；1997b；1999；2000）。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，同时也减弱低温诱导的 *cas*15 基因表达，并降低苜蓿冷适应的能力 而 Ca^{2+} 离子载体 A_{2318} 可促使 Ca^{2+} 迅速流入细胞，使细胞即使不经低温锻炼，在 25℃ 下也可诱导 *cas*15 表达。至于 Ca^{2+} 输入后，信号如何传递，还知之甚少。Monroy 等（1998）证实，此过程与蛋白磷酸化有关，低温诱导苜蓿 *cas*15 基因表达可被蛋白激酶抑制剂星形孢菌素（staurosporine）抑制，并在 25℃ 下，也可被蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸（okadaic acid）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。综合这些研究，似乎可以推论，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。

5　结论与展望

从以上综合的资料中，似可以得出以下几点结论，以及有希望取得的进一步进展：

（1）在植物的低温锻炼过程中确实发生了基因表达的改变，诱发了许多冷诱导蛋白，并已有部分抗冻基因被分离和鉴定。

（2）抗冻基因表达合成的新多肽大多具有高度的亲水性，它能起着保护和稳定细胞膜结构的作用，从而防止冰冻对膜结构的伤害，提高植物的抗冻能力。

（3）通过分子探针和染色体基因制图方法证实了小麦第 5 染色体上 Vrn1-Fr1 区段在抗冻性中的重要作用。人们有可能进一步利用这种 *Vrn1-Fr1* 区段等位基因的变化去改良小麦这种重要农作物的抗冻性。

（4）业已证实，拟南芥 *cor15a* 基因的表达对提高植物抗冻性起着重要作用；并且已经揭示，转录活化因子 *CBF1* 调节着基因的表达水平，从而影响植物的抗冻性。因此，人们有希望通过基因工程进一步利用 *CBF* 基因作为“主开关”（master switch）去激活抗冻基因的表达，进而提高植物的抗冻性，并有可能同时改良这些转基因植物的抗旱性。

（5）Ca^{2+} 在动、植物生长与发育中的重要作用已经得到广泛的证实。植物细胞内 Ca^{2+} 水平的短暂性提高为抗冻基因表达所必需。用适量的 Ca^{2+} 浓度处理植株或细胞，可以提高这些植株或细胞的抗寒性。因此，Ca^{2+} 在植物抗寒研究中的应用及其作用机理可能有着广泛的研究前景。

https://www.scientific.com/doi/10.3724/SP.J.1006.2000.00527

参 考 文 献

简令成,吴素萱, 1965. **植物抗寒性的细胞学研究——小麦越冬过程中细胞结构的变化. 植物学报**, **13**:1 ~ 15

简令成,董合铸, 1980. **小麦原生质体在冰冻化冻中的稳定性与其品种抗寒力的关系. 植物学报**,**22**:17 ~ 21

简令成, 1983. **生物膜与植物寒害和抗寒性的关系. 植物学通报**,**1**:17 ~ 23

简令成, 1986. **植物的寒害与抗寒性. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社**,52 ~ 84

简令成,1992. **植物抗寒机理的研究进展. 植物学通报**,**9**:17 ~ 22

简令成,孙龙华,卫翔云,王红,张红,1994. **从细胞膜系统的稳定性与植物抗寒性关系的研究到抗寒剂的研制. 植物学通报**,11(**特刊**):1 ~ 22

潘杰,简令成,钱迎倩, 1994. **小麦抗寒力诱导过程中特异性蛋白质的合成. 植物学集刊**,**7**:144 ~ 157

Artus N N, Uemura M, Steponkus P L, Gilmour S J, Lin C T, Thomashow M F, 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana COR*15*a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**:1340 ~ 1349

Brule-Babel A L, Fowler D B, 1988. Genetic control of cold hardiness and vernalization requirement in winter wheat. *Crop Sci*, **28**: 879 ~ 884

Bush D S, 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**:95 ~ 122

Cattivelli L, Bartels D, 1989. Cold induced mRNA accumulate with different kinetics in barley coleoptiles. *Planta*, **178**:184 ~ 188

Cattivelli L, Bartels D, 1990. Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. *Plant Physiol*, **93**:1504 ~ 1510

Chen H H, Li P H, Brenner M L, 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol*, **71**:362 ~ 365

Close T J,1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Plant Physiol*, **100**:291 ~ 296

Dunn M A, Hughes M A, Pearce R S, Jack P L, 1990. Molecular characterization of a barley gene induced by cold treatment. *J Exp Bot*, **41**:1405 ~ 1413

Dunn M A, Hughes M A, Zhang L, Pearce R S, Quigley A S, Jack P L, 1991. Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced barley gene, BLT4. *Mol Gen Genet*, **229**:389 ~ 394

Dure L III. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J*, **3**:363 ~ 369

Galiba G, Quarrie S A, Sutka J, Morounov A, Snape J W, 1995. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr*1) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor Appl Genet*, **90**:1174 ~ 1179

Gilmour S J, Artus N N, Thomashow M F, 1992. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **18**:13 ~ 21

Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, Salazar M P, Houghton J M, Thomashow M F, 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis CBF* family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J*, **16**: 433 ~ 442

Guo W, Ward R W, Thomashow M F, 1992. Characterization of a cold-regulated wheat gene related to *Arabidopsis cor*47. *Plant Physiol*, **100**:915 ~ 922

Guy C L, Haskell D, Neven L, Klein P, Smelser C, 1992. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*, **188**: 265 ~ 270

Guy C L, Haskell D, 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol*, **84**:872 ~ 878

Guy C L, Haskell D, 1989. Preliminary characterization of high molecular mass proteins associated with cold acclimation in spinach. *Plant Physiol Biochem*, **27**:777 ~ 784

Guy C L, Niemi K J, Brambl R, 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 3673 ~ 3677

Hayes P M, Blake T, Chen T H H, Tragoonrung S, Chen F, 1993. Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winterhardiness. *Genome*, **36**: 66 ~ 71

Heber U, 1968. Freezing injury in relation to loss of enzyme activity and protection against freezing. *Cryobiology*, **5**:188 ~ 201

Heino P, Sandman G, Lång V, Nordin K, Palva ET, 1990. Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl*, *Genet*, **79**:801 ~ 806

Hong B, Barg R, Ho T H D, 1992. Developmental and organ-specific expression of ABA- and stress-induced protein in barley. *Plant Mol Biol*, **18**: 663 ~ 674

Hong B, Uknes S, Ho T H D, 1988. Cloning and characterization of a cDNA encoding a mRNA rapidly induced by ABA in barley aleurone layers. *Plant Mol Biol*, **11**:495 ~ 506

Houde M, Danyluk J, LaliberténJ, Rassart E, Dhindsa R S, Sarhan F, 1992. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol*, **99**:1381 ~ 1387

https://www.chinagrid.com/doi/10.3724/cbb-120-134

Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, Schabenberger O, Thomashow M F, 1998. Arabidopsis *CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280**:104 ~ 106

Jian L C, Li P H, Sun L H, Chen T H H, 1997a. Alteration in ultrastructure and subcellular localization of Ca^{2+} in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *Exp Bot*, **48**:1195 ~ 1207

Jian L C, Li J H, Li P H, 1997b. Is Ca^{2+} 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, 69 ~ 71

Jian L C, Li J H, Chen W P, Li P H, Ahlstrand G G, 1999. Cytochemical localization of Calcium and Ca^{2+}-ATPase activity in plant cells under chilling stress: a comparative study between the chilling-sensitive maize and the chilling-insensitive winter wheat. *Plant Cell Physiol*, **40**:1061 ~ 1071

Jian L C, Sun L H, Li J H, Wang H, Sun D L, Li P H, 2000. Ca^{2+}-homeostasis differs between plant species with different cold-tolerance at 4 ℃ chilling. *Acta Bot Sci*, **42**: 358 ~ 366

Knight H, Trewavas A J, Knight M R, 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant cell*, **8**:489 ~ 503

Knight H, Campbell A K, Smith S M, Trewavas A J, 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elictitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, **352**:524 ~ 526

Kurkela S, Franck M, 1990. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol Biol*, **15**: 137 ~ 144

Kurkela S, Borg-Franck M, 1992. Structure and expression of *kin*2, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **19**:689 ~ 692

Lâng V, Heino P, Palva E T, 1989. Low temperature acclimation and treatment with exogenous abscisic acid induce common polypeptides in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynth. *Theor Appl Genet*, **77**:729 ~ 734

Lâng V, Palva E T, 1992. The expression of a rab-relate gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynth. *Plant Mol Biol*, **20**:951 ~ 962

Limin A E, Danyluk J, Chauvin L P, Fowler D B, Sarhan F, 1997. Chromosome mapping in low-temperature induced *Wcs*120 family genes and regulation of cold-tolerance expression in wheat. *Mol Gen Genet*, **253**: 720 ~ 727

Lin C, Thomashow M F, 1992. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene *cor*15 and characterization of the COR15 polypeptide. *Plant Physiol*, **99**:519 ~ 525

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamagucli-Shinozaki K, Shinozaki K, 1998. 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*, **10**:1391 ~ 1406

Mäntyl E, Lâng V, Palva E T, 1995. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **107**:141 ~ 148

Monroy A F, Castonguay Y, Laberge S, Sarhan F, Vezina L P, Dhindsa R S, 1993. A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol*, **102**:873 ~ 879

Monroy A F, Dhindsa R S, 1995. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 ℃. *Plant cell*, **7**:321 ~ 331

Monroy A F, Sangwan V, Dhindsa R S, 1998. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J*, **13**:653 ~ 660

Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I, 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*, **356**:710 ~ 713

Nordin K, Vahala T , Palva E T, 1993. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol*, **21**: 641 ~ 653

Ohme-Takagi M, Shinshi H, 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant cell*, **7**:173 ~ 182

Orr W, Iu B, White T C, Robert L S, Singh J, 1992. Complementary DNA sequence of a low temperature-induced *Brassica napus* gene with homology to the *Arabidopsis thaliana kin*1 gene. *Plant Physiol*, **98**:1532 ~ 1534

Ouellet F, Houde M, Sarhan F, 1993. Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kDa protein induced by cold acclimation in wheat. *Plant Cell Physiol*, **34**:59 ~ 65

Pan A, Hayes P M, Chen F, Chen T H H, Blake T, Wright S, Karsai I, Bedö Z, 1994, Genetic analysis of the components of winterhardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, **89**: 900 ~ 910

Shinwari Z K, Nakasima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 1998. An *Arabidosis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **250**:161 ~ 170

Steponkus P L, Uemura M, Joseph R A, Gilmour S J, Thomashow M F, 1998. Mode of action of the *COR*15*a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:14570 ~ 14575

https://www.scienceonline.com/doi/10.3724/SP.J.1006.000529

Steponkus P L, Uemura M, Webb M S, 1993a. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat—two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: Steponkus P L ed. Advances in Low ~ Temperature Biology. London: JAI Press, 2211 ~ 2312

Steponkus P L, Uemura M, Webb M S, 1993b. Membrane destabilization during freeze-induced dehydration. *Curr Topics Plant Physiol*, **10**:37 ~ 47

Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F, 1997. *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*, **94**:1035 ~ 1040

Storlie E W, Allan R E, Walker-Simmons M K, 1998. Effect of the *Vrn1-Fr1* interval on cold hardiness levels in near-isogenic wheat lines. *Crop Sci*, **38**:483 ~ 488

Strauss G, Hauser H, 1986. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**:2422 ~ 2426

Sutton F, Ding X, Kenefick D G, 1992. Croup 3 LEA gene *HVA1* regulation by cold acclimation and deacclimation in two barley cultivars with varying freeze resistance. *Plant Physiol*, **99**:338 ~ 3340

Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy A F, Dhindsa R S, Borg M, 1997. The induction of *kin* genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta*, **203**:442 ~ 4447

Thomashow M F, 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**:571 ~ 599

Van zee K, Chen F Q, Hayes P M, Close T J, Chen T H H, 1995. Cold-specific induction of a dehydrin gene family member in barley. *Plant Physiol*, **108**:1233 ~ 1239

Waldman M, Rikin A, Dovrat A, Richmond A E, 1975. Hormonal regulation of morphogenesis and cold-resistance. *J Exp Bot*, **26**:853 ~ 859

Wang H, Georges F, Pelcher LE, Saleem M, Cutler AJ, 1994. A 5.3-kilobase genomic fragment from *Arabidopsis thaliama* containing *kin*1 and *cor*6.6. *Plant Physiol*, **104**:291 ~ 292

Welin B , Olson A, Nylander M, Palva E T, 1994. Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **26**:131 ~ 144

Weiser C J, 1970. Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, **169**:1269 ~ 1278

Weretilnyk E, Orr W, White T C, Iu B, Singh J, 1993, Characterization of three related low temperature regulated cDNAs from winter *Brassica napus*. *Plant Physiol*, **101**:171 ~ 177

Wolfraim L A, Langis R, Tyson H, Dhindsa R S, 1993. cDNA sequence, expression and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas*18, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiol*, **101**:1275 ~ 1282

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, **236**:331 ~ 340

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, **6**:251 ~ 264

Zhu B, Chen T H H, Lee S P, Li P H, 1993. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Mol Biol*, **21**:729 ~ 735

欢迎订阅《林业科学》

《林业科学》是中国林学会主办的代表中国林业科技最高水平的学术刊物，创刊于 1955 年。主要刊登林业领域的最新科学研究成果，反映我国林业科技水平及进展，评述学术动向，开展学术讨论。内容包括森林培育、森林生态、林木遗传育种、森林保护、森林经理、野生动物保护与利用、园林植物与观赏园艺、经济林、水土保持与荒漠治理、林业可持续发展、森林工程、木材科学与技术、林产化学加工工程、林业经济及林业宏观决策研究等方面，以学术论文、研究报告、综合评述为主，还有学术问题讨论、研究简报、科技动态、新书评价等栏目。作为我国创办最早的基础性、高科技林业学术期刊及林业科技重点核心期刊，《林业科学》在国内外享有很高的声誉，多年来一直受到广大读者的重视和欢迎。以中文论文为主，同时接收附中文摘要的英文论文，以便更好地宣传中国林业科研成果，促进国际学术交流，为国内外从事林业各个领域研究的科技人员、林业管理干部以及林业高等院校的师生服务。《林业科学》为双月刊，单月 25 日出版，大 16 开本(210 mm × 285 mm)，每期 176 页，定价 22 元，全年 132 元。本刊邮发代号 82 - 6，全国各地邮局均可订阅。国外总发行为中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)，国外邮发代号 BM44。如有需要近年过刊的读者可与本编辑部联系购买。《林业科学》编辑部地址：北京万寿山后中国林学会。邮编：100091。电话：(010)62889820 e-mail：linykx@csf.forestry.ac.cn

https://www.plantphysiol.com/doi/10.1104/pp.104.3.729