

文章编号:1001-411X(2000)01-0082-04

植物耐寒性的诱导及其与蛋白质的合成、基因表达的关系

陆旺金, 李雪萍, 季作梁

(华南农业大学园艺系, 广东 广州 510642)

摘要:论述了诱导植物耐寒性的几种方法;植物耐寒诱导过程中合成的特异蛋白质及基因表达与耐寒性的关系;植物耐寒诱导的种、品种及器官特异性与蛋白质的合成及基因表达的关系。

关键词:耐寒诱导;蛋白质合成;基因表达

中图分类号:Q 945.78

文献标识码:A

低温是限制植物自然分布和栽培区带的主要因素,是农业生产的主要威胁。植物的耐寒性是植物本身的性状,但是,许多研究表明,植物的耐寒性同时又是可以诱导的,如:冷锻炼(或称低温驯化、低温锻炼)、ABA、热处理、盐分逆境、干旱锻炼及植物生长调节剂等均可提高植物的耐寒性。如果我们可以采取某些措施有目的地提高植物的耐低温能力,对于农业生产将有着非常重要的现实意义。

近年来,诱导植物耐寒性的方法、耐寒诱导过程中合成的蛋白质及基因表达及其与耐寒性的关系方面取得了可喜的进展,本文将概述这些研究的最新进展。

1 植物耐寒性的诱导

1.1 冷锻炼

许多耐冷植物都可以通过冷锻炼提高其耐寒性,冷锻炼还能提高一些冷敏植物如番茄^[1]、玉米^[2]等的耐寒性。生长在20/15℃的番茄幼苗,经2℃锻炼2d或经5℃锻炼5d后,幼苗能耐-3℃的低温,而未经锻炼的幼苗置于2℃下4h后即发生冷害^[1];冷锻炼能提高玉米幼苗的耐冷性,玉米幼苗经14℃锻炼3d,转入5℃,7d后成活率为79%,而未经锻炼的幼苗5℃下,7d仅保持22%的成活率^[2];此外,冷锻炼还能提高荔枝、香蕉及芒果等果实的耐冷性,延长果品低温贮藏期。

1.2 外源 ABA

冷锻炼过程中内源 ABA 含量升高^[2,3],因此外源 ABA 能否提高植物的耐寒性亦引起了人们的注意,这方面有过大量的研究。

75 μmol/L ABA 处理苜蓿幼苗 Anik(耐冷品种)7d, -10℃下3h后,再以2.5℃/h⁻¹升温至20℃,生长2d后观察,其存活率为50%,处理苜蓿14d

后,存活率为100%^[4],虽然冷敏感的苜蓿 Trek 经同样的处理后存活率亦有所提高,但仅从0上升到15%。此外,研究还表明,采用外源 ABA 诱导耐寒性时,并非 ABA 浓度越高越好,如100 μmol/L ABA 处理苜蓿幼苗时,耐冷诱导效果反而不及75 μmol/L ABA 处理的好。

有研究表明,外源 ABA 诱导耐寒性时,需在28℃下培养几小时(>6h),若 ABA 处理后直接置于低温中则诱导效果不好^[5,6]。这主要是因为 ABA 处理后置于室温下有利于蛋白质的合成,而新合成的蛋白质在此后的耐寒中发挥作用。

1.3 热处理

热处理可提高一些冷敏植物如菜豆下胚轴^[7]、南瓜子叶及萌发的南瓜种子等的耐寒性。40℃处理菜豆下胚轴3h,2.5℃下6d后,电解质泄漏比对照少40%,若在处理的同时,加入50 μmol/L CHX(cycloheximide, 环己酰亚胺),则电解质泄漏相差不大^[8];据陆旺金和季作梁^[9]综述,热处理还可提高一些果实如:番茄、芒果、鳄梨、桃、香蕉等果实的耐冷性。热处理提高果实的耐低温能力在果实的低温贮藏中可能会有较为广阔的应用前景。就果实而言,热处理的一般方法是:采用38℃处理2~3d,如经38℃处理48h的芒果,贮于5℃,11d未发生冷害,而未经热处理的芒果则果皮内陷,表现出冷害症状^[10]。

1.4 盐分逆境

高浓度 NaCl 处理可以提高菠菜叶片及离体类囊体、柑桔幼苗、菠菜幼苗、烟草、南瓜子叶和马铃薯幼苗等的耐寒性。如:经100 mmol/L NaCl 处理1d的马铃薯幼苗,其致死温度降低3℃^[11]。

收稿日期:1999-07-12

作者简介:陆旺金(1966~),男,副教授,博士

1.5 植物生长调节剂

利用植物生长调节剂提高植物的耐寒性已呈现出良好的苗头。据报道,经表油菜素内酯浸种 24 h 的水稻种子,可以提高水稻幼苗的耐寒性^[12],外源亚精胺处理柑桔离体叶片,可以提高其耐寒力^[13]。

2 植物耐寒性诱导与特异蛋白的合成及基因表达

2.1 冷锻炼及 ABA 诱导的耐寒性与特异蛋白的合成及基因表达

冷锻炼及外源 ABA 诱导植物耐寒性的同时均诱导某些特异蛋白的合成及特异基因的表达。研究表明,外源 ABA、冷驯化均能诱导冷敏感的苜蓿 *Trek* 及耐冷的苜蓿 *Anik* 的特异蛋白的合成,这些合成的蛋白质大部分相似,但其中也有一些是对 ABA 敏感的。耐冷苜蓿的冷诱导效果要好于冷敏感的苜蓿,从耐冷的苜蓿 *Anik* poly(A⁺)RNA 构建的 cDNA 文库中分离出一个 cDNA 克隆 PSM1409, Northern 杂交的实验表明,其基因的表达在转录水平上受冷驯化和外源 ABA 调控,耐冷的品种较冷敏感的品种 cDNA 克隆转录水平高,正好与耐冷苜蓿的冷锻炼效果好于冷敏感的苜蓿相一致,说明冷锻炼及外源 ABA 诱导的耐寒性受基因表达的调控^[4,14]。

msaCIC 是从冷驯化的苜蓿根颈(crowns)中分离出来的一个冷调节基因,它不受 ABA 诱导,耐冷的 cv. *Apica* 比冷敏感的 cv. *CUF-101* 积累的 msaCIC 水平高^[15];同时,用外源 ABA 处理耐冷性不同的苜蓿时发现:与冷驯化相比,ABA 不足以使其达到最大程度的耐寒性,从经过冷驯化的苜蓿幼苗中分离出的 poly(A⁺)RNA,构建 cDNA 文库进行表达,发现 3 个对冷驯化特异(cold-acclimated specific, CAS)的基因表达并不受 ABA 的促进或诱导^[4],说明冷驯化特异基因在耐冷诱导中发挥作用。

冷驯化及外源 ABA(100、333 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)均能诱导玉米幼苗耐寒性^[2]。冷驯化的幼苗 3 种冷驯化响应基因(cold acclimated responsive, car)的转录水平较未经冷驯化的高,而且外源 ABA 也能引起这 3 种基因转录水平的增加,序列分析的研究表明,car333 即是 cat3,它编码玉米线粒体过氧化氢酶 3,此酶是玉米幼苗用以分解玉米线粒体产生的 H₂O₂ 的主要酶,冷驯化过程中, H₂O₂ 的积累可以作为次级信号引发 CAT3 的合成。

低温(5℃)处理油菜幼苗 1 d 便可检测到 hsp90 基因的表达,而且整个冷处理过程中保持高水平,一旦将油菜幼苗转入 20℃, hsp90 mRNA 水平迅速减少

到正常水平,说明冷锻炼过程中 hsp90 起作用^[16]。

2.2 热处理诱导的耐寒性与特异蛋白的合成及基因表达

40℃处理菜豆下胚轴 3 h,可诱导一些新蛋白的产生,CHX 则可抑制这些新蛋白的合成,耐寒性的消失与 HSP70 和 HSP79 的消失具有相关性^[17]; Sabehat 等^[18]以³⁵S-Met 检测番茄果实热处理过程中特异蛋白的合成,发现新合成了 3 种蛋白,相对分子质量分别为 70 000、23 000 和 18 100, Western 杂交证明热处理过程中新合成的 70 000 和 18 100 的蛋白质可以行使分子伴侣的功能,这 2 种蛋白质与耐寒性形成密切相关,令人感兴趣的是:热处理过程中新合成的蛋白在室温下(如 20℃, 4 d)消失,若此时将果实转入低温中,果实的耐冷性亦消失,这充分说明热处理过程中合成的蛋白质与果实耐冷性密切相关。

提取经热处理的鳄梨总 RNA,与编码 hsp70 及 hsp17 家族的 cDNA 杂交表明:经 38℃热处理的 RNA 与编码 hsp70 及 hsp17 家族的 cDNA 杂交水平比经 34 和 36℃处理的高,40℃处理达最高,而未经热处理的鳄梨 RNA 则不能与这些 cDNA 杂交,因而果实不耐冷^[19]。

2.3 盐逆境诱导的耐寒性与特异蛋白的合成及基因表达

100 mmol/L NaCl 处理马铃薯幼苗 1 d,致死温度降低 3℃,同时检测到新合成了 9 种蛋白质[其中有 5 种亦可被低温(4℃/2℃)所诱导,7 种可被 40 $\mu\text{mol/L}$ ABA 诱导],而且 NaCl 处理 6 h 后,ABA 含量才升高,在 ABA 含量升高前,耐寒性未有变化,且盐逆境诱导的蛋白质合成是在 ABA 含量升高之后才出现的^[11]。因此他们认为:盐分逆境诱导的耐寒性与 ABA 及 ABA 诱导的蛋白有关。

另外,许多研究表明:不同逆境诱导合成的蛋白质存在某种程度上的相似性,如:100 mmol/L NaCl 处理马铃薯幼苗合成的蛋白质(Mr/PI:27/6.6)^[11],与冷诱导及 ABA 诱导合成的多肽(Mr/PI:25.7/6.7)^[20],表现出惊人的相似,这是否能说明不同逆境诱导的耐寒性存在相同的机制尚需进一步研究。

至于植物生长调节剂提高的耐寒性是否与蛋白质的合成及基因表达有关,目前这方面的报道尚不多见。

2.4 耐寒性诱导的品种及器官特异性与蛋白质合成及基因表达

不同种、同一物种的不同品种及不同器官对冷驯化及外源 ABA 诱导耐寒性的反应不一样。耐冷的物种较不耐冷的物种效果好,冷敏感植物经冷驯

化后耐寒性仅稍有增加;冬小麦与春小麦^[21],苜蓿的2个品种 Anik 与 Trek^[14],仙人掌的3个品种 *Ferocactus viridescens*、*Opuntia ficus-indica* 及 *O. fragilis* 的冷驯化效果不一样^[22],这显示耐寒性诱导在品种上的特异性;耐寒性诱导的器官特异性主要表现在同一株植物的地上部(shoot)与根部的差异,这在小麦^[21]、豌豆^[22]、菠菜^[24,25]等植物上表现最为明显,冷驯化诱导的器官特异性与诱导的特异蛋白的合成及基因表达有关,如 COR85 000(cold-regulated)的积累与低温诱导菠菜的耐寒性有关,低温时仅叶片能积累 COR85 000,而根中则不积累,这正好与低温不能诱导根部的耐寒性相一致^[24];冬小麦冷锻炼4星期后,根的 LT_{50} (半致死温度)仅从 -3°C 降至 -5°C ,而地上部的 LT_{50} 则从 -5°C 降至 -18°C ,这与冷驯化过程中冬小麦地上部相对分子质量为 23 000、18 000 和 17 000 的多肽水平增加,而这些多肽水平与耐寒性发展呈正相关^[21]。

综上所述,虽然目前诱导植物耐寒性的方法很多,对其机理的研究亦深入至分子水平,但目前这些方法仍仅停留在实验室的研究阶段,如何在大田生产中应用这些研究成果提高植物的耐低温能力,对于提高作物产量有着深远的意义。

参考文献:

- [1] 沈征言,李本湘. 低温锻炼对番茄幼苗抗寒性的影响[J]. 北京农业大学学报,1983,9(2):45~50.
- [2] ANDERSON M D, PRASAD T K, MARTIN B A, et al. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance[J]. Plant Physiol, 1994, 105:331~339.
- [3] CHEN H H, LI P M, BRENNER M L. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation[J]. Plant Physiol, 1983, 71:362~365.
- [4] MOHAPATRA S S, POOLE R J, DHINDSA R S. Absciscic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa[J]. Plant Physiol, 1988, 87:468~473.
- [5] ROBERTSON A J, GUSTA L V, REANEY M J T, et al. Protein synthesis in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) cultured cells during the induction of frost tolerance by abscisic acid or low temperature[J]. Plant Physiol, 1987, 84:1331~1336.
- [6] XIN Z, LI P H. Alteration of gene expression associated with abscisic acid-induced chilling tolerance in maize suspension-cultured cells[J]. Plant Physiol, 1993, 101:277~284.
- [7] COLLINS G G, NIE X, SALTVEIT M E. Heat-shock increases chilling tolerance of mung bean hypocotyl tissue[J]. Physiol Plant, 1993, 89:117~124.
- [8] GILMOUR S J, THOMASHOW M F. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Mol Biol, 1991, 17:1233~1240.
- [9] 陆旺金,季作木梁. 热处理减轻果实低温贮藏冷害的分子基础[J]. 生命科学, 1998, 10(5):259~262.
- [10] McCOLLUM T G, D' AQUINO S, McDONALD R E. Heat treatment inhibits mango chilling injury[J]. HortSci, 1993, 28(3):197~198.
- [11] RYU S B, COSTA A, XIN Z, et al. Induction of cold hardiness by salt stress involves synthesis of cold-and abscisic acid-responsive proteins in potato (*Solanum commersonnii* Dun) [J]. Plant Cell Physiol, 1995, 36:1245~1251.
- [12] 王炳奎,曾广文. 表油菜素内酯对水稻幼苗抗冷性的影响[J]. 植物生理学报, 1993, 19(1):38~43.
- [13] 林定波,刘祖棋,张石城. 多胺对柑桔抗寒力的效应[J]. 园艺学报, 1994, 21(3):222~226.
- [14] MOHPATRA S S, WOLFRAIM L, POOLE R J, et al. Molecular cloning and relation to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa[J]. Plant Physiol, 1989, 89:375~380.
- [15] CASTONGUAY Y, LABERGE S, NADEA U, et al. A cold-induced gene from *Medicago sativa* encodes a bimodular protein similar to developmentally regulated proteins[J]. Plant Mol Biol, 1994, 24:799~804.
- [16] KRISHNA P, SACCO M, CHERTTI J F, et al. Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus* [J]. Plant Physiol, 1995, 107:915~923.
- [17] COLLINS G G, NIE X, SALTVEIT M E. Heat-shock proteins and chilling sensitivity of mung bean hypocotyls[J]. J Exp Bot, 1995, 46:795~802.
- [18] SABEHAT A, WEISS D, LURIE S. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit[J]. Plant Physiol, 1996, 110:531~537.
- [19] WOOLF A B, WATKINS C B, BOWEN J H, et al. Reducing external chilling injury in stored 'Hass' avocados with dry heat treatments[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1995, 120(6):1050~1056.
- [20] ZHU B, CHEN T H H, LI P L. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in potato (*Solanum commersonnii*) [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21:729~736.
- [21] ZHOU B L, ARAKAWA K, FUJIKAWA S, et al. Cold-induced alterations in plasma membrane proteins that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hardy winter wheat[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35(2):175~182.
- [22] LOIK M E, NOBEL P S. Exogenous abscisic acid mimics cold acclimation for cacti differing in freezing tolerance[J]. Plant Physiol, 1993, 103:871~876.
- [23] WELBAUM G E, BIAN D, HILL D R, et al. Freezing

- tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress[J]. J Exp Bot, 1997, (48): 643 ~ 654.
- [24] KAZUOKA T, OEDA K. Heat-stable COR (cold-regulated) proteins associated with freezing tolerance in spinach[J]. Plant Cell Physiol, 1992, 33: 1 107 ~ 1 114.
- [25] KAZUOKA T, OEDA K. Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 601 ~ 611.

Freezing-Tolerance Induction and Its Relation to Protein Synthesis and Gene Expression in Plants

LU Wang-jin, LI Xue-ping, JI Zuo-liang

(Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: This paper deals with: Several methods of freezing-tolerance induction; Specific protein synthesis and gene expression and its relation to freezing tolerance; Species, cultivar and organ specificity of freezing induction and its relation to protein synthesis and gene expression.

Key words: freezing-tolerance induction; protein synthesis; gene expression

【责任编辑 柴 焰】

欢迎订阅 2000 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道我校各学校的科研学术论文、研究简报、文献综述等,分为农学、植物保护、生物学、动物科学与医学、农业工程与食品科学、基础科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目录和英文摘要。读者对象是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为中国科学引文数据库固定刊源,并排列在被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》确认为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为国内外多家著名文摘的固定刊源。

国内外公开发行、季刊、大 16 开。每期 94 页,定价 5.00,全年 20.00 元、自办发行,参加高等学校学报联合征订发行。

订阅办法:1. 将订阅款邮汇至:100054 北京右安门外首都医科大学期刊社;2. 银行汇款至:户名:首都医科大学期刊社;开户银行:工商银行北京宣武支行樱桃园分理处,帐号:144659 - 713;3. 订阅款邮汇至:510642 广州五山华南农业大学学报编辑部。

《华南农业大学学报》编委会