

植物冷害机理及冷驯化的生理与分子学基础

康国章¹, 孙谷畴¹, 王正询²

(1. 中国科学院华南植物研究所, 中国广东 广州 510650; 2. 广州大学 生物系, 中国广东 广州 510405)

摘要:介绍了近几年来植物冷害机理、冷驯化提高植物抗冷性的生理与分子生物学基础及冷信号转导的最新研究进展。

关键词:冷害; 冷驯化; 抗冷性; 生理与分子机制; 冷信号转导

中图分类号: Q945.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2002)S0-0049-07

Recent Progresses of Mechanisms of Cold Injury and Physiological and Molecular Bases of Cold Acclimation on Improving Cold-resistance of Plants

KANG Guo-zhang¹, SUN Gu-chou¹, WANG Zheng-xun²

(1. South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, Guangdong, China;

2. Biological Department, Guangzhou University, Guangzhou 510405, Guangdong, China)

Abstract: Recent progresses of mechanism of cold injury, physiological and molecular bases of cold acclimation and cold signal transduction process in plants were reviewed in this paper.

Key words: cold injury; cold acclimation; cold resistance; physiological and molecular bases; cold signal transduction

(*Life Science Research*, 2002, 6(*Suppl.*): 49 ~ 55)

低温是植物地域分布和产量的主要限制因素,冷害(cold injury)引起的粮食作物大幅度减产是世界范围内普遍存在的问题。因此,研究植物的冷害机理及寻找提高植物抗冷性的方法,一直是科研工作者孜孜不倦的追求。按照低温的不同程度,植物的低温伤害可分为寒害(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。冷驯化(cold acclimation)是低温(高于冷害致伤温度)诱导植物抗冷性增加的过程,对提高植物的抗冷性效果明显。根据冷害的分类,冷驯化也分为寒驯化(喜温植物在

中度低温(10~20℃)下暴露数天后就能适应更低但非冰冻温度环境的过程, chilling acclimation)和冻驯化(在零上几度处理植物,以提高它们忍耐零下温度能力的过程, freezing acclimation)两种^[1]。冷驯化在农业生产中具有重要作用,如越冬植物通过末秋和初冬的低温以适应冬季的严寒,因此对其机理的研究一直是抗冷研究中的热点之一。近些年来,随着转基因技术的迅速发展,尤其是拟南芥作为模式植物在研究中的广泛应用,在冷驯化方面取得了重要发现。本文对近年来植物冷害机理及冷驯化方面研究的热点与突出成果作一

收稿日期:2002-03-15 修回日期:2002-04-28

基金项目:广州市教委重点资助项目(1999-11)

作者简介:康国章(1971-),男,河南洛阳人,中国科学院华南植物研究所博士研究生,从事植物抗逆生理研究, E-mail: sguchou@scib.ac.cn, 通讯联系人。

简述.

1 植物的冷害机理

对零度以上的寒害, Lyons^[2] 根据细胞膜结构与抗冷性的关系, 提出“膜脂相变冷害”假说. 他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, 可使膜收缩, 出现孔道或龟裂, 因而膜透性增大, 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. 他认为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, 就会发生组织受害死亡, 因此, 膜脂降解可作为冷害不可逆的生理指标. 同时他推断, 膜脂相变转换温度与膜脂脂肪酸的不饱和脂肪酸含量密切相关, 膜脂所含的脂肪酸和度膜脂相变温度相应升高, 则易遭寒害; 反之, 则降低.

近年来, 应用生物技术, 使研究植物冷害与膜脂脂肪酸饱和度之间的关系取得了突破性进展. Vigh 等^[3] 研究认为低温首先降低了膜脂的流动性, 进而刺激不饱和脂肪酸基因 des A (desaturated A) 基因的转录, 可使膜脂不饱和度增加, 膜脂流动性增强. Murata 等^[4] 将冷敏感性强的南瓜和抗冷性较强的拟南芥的甘油-3-磷酸酰基转移酶(合成磷酸酰甘油的关键酶)基因分别转入烟草中, 转化株中除磷酸酰甘油组成有大幅度改变外, 其它脂类的脂肪酸组成没有明显变化. 导入南瓜酶基因的烟草, 磷酸酰甘油的饱和脂脂肪酸含量上升, 而顺式不饱和脂肪酸含量由转化前的 64% 下降到 24%, 转化株的冷敏感性增加; 而导入拟南芥基因的烟草, 则不饱和脂肪酸含量上升到 72%, 且其冷敏感性下降. 但也有植物的冷害与不饱和脂肪酸含量无关的报道.

在零下温度下, 结冰首先发生在细胞间隙和细胞壁部分, 这是因为细胞质中含有较多的溶质和非均质的冰晶介质, 如冰核细菌蛋白(ice-nucleating bacterial proteins)等, 使其具有较低的水势和较低的冰点^[5]. 但在结冰时, 由于胞外冰状态的水有更低的水势, 因此, 使细胞质中的水分通过细胞

膜流到胞外, 导致细胞脱水, 并且温度越低流到胞外的水分越多^[6]. 流到胞外的水量取决于胞质内溶液浓度和使胞外结冰所需水势的温度. 因此, 冻害主要是由于细胞脱水造成的伤害. 在这一方面, 干旱、盐渍等相同.

质膜也是冻害的最初伤害部位^[1], 冻害改变质膜的结构和功能^[7,8]. 冻害诱导质膜性质改变主要涉及了膜的 3 个相变: 在黑麦叶片中, 当温度降到 -5 °C 时, 由于脱水使质膜产生内吞囊状小泡而导致质膜内折, 质膜表面积大量减少, 并且这种减少是不可逆的. 在温度回升以后, 由于水势差的作用, 溶化的水又回到细胞质中, 但由于质膜表面积不可逆丢失, 使原生质体在恢复到原来体积时, 原生质体会发生裂解. 质膜的这种相变叫做“膨胀诱导型裂解”(expansion-induced lysis)^[7]. 然而在冷驯化的黑麦叶片中, 质膜不形成内吞小泡而呈外延状, 并在解冻时, 质膜允许原生质体再扩展到原来体积. 在更冷温度下(或更严重脱水), 不同细胞膜紧密附着在一起, 未经冷驯化膜磷脂经历了侧相分离(lateral phase separation). 一些脂类聚集形成六角形对称倒置结构(an inverted structure with hexagonal packing symmetry, HexII). 这些磷脂分子呈圆柱形排列, 头部朝向一个直径为 20 Å 的透明水核(an aqueous core), 它破坏了膜双分子层, 并使质膜变得易溶于水. 在温度回升时, 由于质膜溶于水而失去渗透效应. HexII 相的形成被认为是膜脂双层的相互作用形成的, 这可能涉及到两个或更多双层膜的参与. 因为 HexII 相只在多个堆积的双层膜区域中观察到. 更普遍的是, HexII 相变是在质膜与叶绿体外膜重叠部分产生^[7,8]. 在冷驯化原生质体中, 冻害后的质膜呈“断裂跃变相(fracture-jump lesion)”. 在低温冷冻电子显微镜下, 可以观察到质膜冷冻蚀刻面的位置偏移. 这可能是由于质膜和其它细胞质膜(特别是叶绿体膜)的在一些位点上的融合^[7]. HexII 和断裂相可能通过膜上相同中间结构介质形成的^[8]. 然而还不清楚为什么 HexII 相只在非冷驯化组织的原生质体中出现, 而断裂相只在冷驯化原生质体中产生. 并且至今还不知道这些相变的生理、生化和分子生物学基础. 值得注意的是这些结冰诱导的膜相变主要是在离体的原生质体中观察到发现的, 不可能确切反映整体植株细胞膜在冻害时的变化状况.

2 冷驯化提高植物抗冷性的生理机制

研究植物抗冷性的生理生化基础是通过比较

冷驯化植株与非冷驯化植株的代谢库或结构上的差异,或不同抗冷品种之间的差异.在冷驯化过程中,发生了一系列生理生化变化,这些变化包括生长速度的减少或停止,组织水分的减少^[11],ABA含量的迅速增加^[9],膜脂组织的变化^[10,11],可溶性物质的积累(可溶性糖、甜菜碱、脯氨酸等)及抗氧化物质含量的增加^[12-17].这一系列的变化使区分那些与抗冷性有关的生化过程和那些仅仅是植物对冷驯化的应激反应变得非常困难.然而通过这些变化可以看出冷驯化可能需要许多细胞生化和代谢上的变化.现在认为冷驯化提高植物抗冷性的主要生理生化基础有:

2.1 冷驯化提高了膜的抗冷性

在所有被研究的植物中,均观察到在冷驯化中膜磷脂组成的变化与细胞膜的稳定性密切相关^[8,11,18].Steponkus等^[19]对此提供了直接证据.当把未经冷驯化黑麦原生质体置入到高渗介质中时,如在冰冻温度下一样,质膜产生了许多内吞状小泡;然而,当未经冷驯化的原生质体预先在单或双不饱和磷脂酰胆碱培养,使磷脂渗入到质膜中,结果显示高渗处理并没有产生内吞小泡;而饱和的磷脂酰胆碱没有诱导这些变化.但在一些植物抗冷力形成过程中,磷脂的变化滞后于抗冷力的发展^[8,20],说明其它一些变化也有助于膜的稳定性.

2.2 冷驯化提高了植物的抗氧化能力

在冷胁迫条件下,细胞中活性氧(O_3 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 等)产生加速,而清除活性氧能力下降,细胞内活性氧含量升高而产生积累^[21-24].高水平的活性氧可加速膜脂过氧化及大分子蛋白质之间的聚合,导致膜结构和功能的破坏与蛋白质的变性^[25].因此,冷害引起活性氧积累是冷害发生的主要原因之一.在正常情况下,植物体内存在着抗氧化酶(SOD、CAT、POX、APX等)和抗氧化剂(GSH、AsA、CAR等)保护系统,以清除细胞产生的活性氧,维持活性氧代谢平衡.研究表现,冷驯化能提高细胞内抗氧化酶活性和抗氧化剂含量,降低膜脂过氧化,增强植物的抗冷力^[25,26].如用氨基三唑(aminotriazole,一种CAT专一性抑制剂)抑制CAT活性,则降低了冷驯化提高玉米幼苗的抗冷效果^[23].可见,CAT在玉米幼苗冷驯化中起着重要作用.

应用生物技术转移抗氧化酶基因或增加抗氧化剂含量以提高植物的抗冷性,已获得了一定成

功.Gutpa等^[27]报道,外源Cu/ZnSOD在烟草叶绿体中超表达可提高烟草抵抗低温引发的光抑制能力.但Van-Camp等^[28]则报道了外源FeSOD在烟草叶绿体中超表达,对低温引发的光抑制无抗性的结论.表明植物抗氧化酶作用的复杂性.

2.3 冷驯化提高了细胞内可溶物的积累

可溶性糖在冷驯化中的积累,并且它的积累是和冷驯化中抗冷力的发展相一致的,这已在许多植物包括拟南芥中得到证明^[21,29].此处,基因方面的证据也有力地支持了可溶性糖在抗冷过程中的作用.例如,拟南芥冷驯化缺失突变体 $sft4$,在响应低温过程中不出现可溶性糖的积累^[30];而在拟南芥抗冷组成型突变体 $esk1$ 中,即使在温暖条件下也有可溶性糖的积累^[31].一些植物在响应低温过程中也出现甜菜碱的积累^[13,15].胆碱氧化酶(choline oxidase)能直接催化胆碱反应生成甜菜碱.拟南芥在正常条件下不积累甜菜碱,但高度表达胆碱氧化酶基因的拟南芥植株积累了大量甜菜碱($1 \mu mol/g$ FW),并增强了对低温和冰冻的抵抗能力^[32].

另外,关于其它一些可溶性质如脯氨酸的抗冷性也有一些证据^[33].但也有关于上述可溶性物质与抗冷无关的报道^[20,34,35].

显然,植物细胞内存在着多种抗冷机制,冷驯化能通过提高这些机制来增强植物的抗冷性.

3 冷驯化提高植物抗冷性的分子机理

在过去10年中,有关冷驯化研究的主要努力是鉴定冷诱导基因(cold-induced genes)并确定它们在抗冷过程中的作用.通过cDNA文库差示筛选与其它方法,已克隆出许多冷诱导基因,它们编码了丰富多样的冷诱导蛋白(cold-induced proteins):一些是与细胞在低温下主要代谢或胁迫代谢有关的酶蛋白,如苯丙氨酸氨基裂解酶^[36],脂肪酸不饱和酶^[37],磷脂转移酶^[38],翻译起始因子^[39],CAT^[23]等;一些与细胞防脱水蛋白存在序列上的相似性,如LEA蛋白^[40,41],抗冻蛋白(antifreezing proteins)^[42],热激蛋白或分子伴侣等^[43,44];一些参与了细胞内信号转导,如MAP激酶^[45], Ca^{2+} 依赖型蛋白激酶^[46,47]等.

研究这些冷诱导基因与蛋白的主要任务之一是评价它们在抗冷中的作用.现已发现一些冷诱导蛋白与植物的抗冷性无直接关系,它们表达受抑并不影响植物抗冷力的形成.如,苯丙氨酸裂解

酶和苯基苯乙烯酮合成酶,它们与花色苷的合成有关,在冷驯化过程中高水平表达,但缺失二者的拟南芥突变体并不影响细胞抗冷力形成^[36]。

虽已发现许多基因与植物抗冷力密切相关,但迄今为止,只有 *COR15a* 基因研究的较为清晰。转基因研究结果表明,在 *COR15a* 超表达的未经冷驯化转基因植株中,含有 *COR15a* 的原生质体与叶绿体比不含有 *COR15a* 的原生质体与叶绿体更具有抗冻性^[48]。因 *COR15a* 定位于叶绿体基质中,*COR15a* 还被推测在低温下通过改变叶绿体内膜的内折来延缓膜伤害形式 HexII 相位的形成,以保持低温下膜结构与功能的稳定性^[49]。但在植株整体水平上,*COR15a* 基因单独表达的抗冷效果是非常微小的。其它一些植物与抗冷性有关基因(*COR6.6*, *COR47* 和 *COR48*)的单独表达也显示出相同的微小或无抗冻效果^[48,50]。但 *COR15a* 与这些基因的协同表达可明显提高植物抗冷性^[50,51]。据此推测,植物抗冷性是由许多微效基因调控的累积性状,许多基因协同作用才能提高植物抗冷性。

人们对 *COR* 基因协同表达进行了大量研究,发现了它们共同的转录激活因子 CBF,这是近年来植物抗冷分子生物学研究中最重要发现。1994年, Yamaguchi-Skinozaki 和 Skinozaki^[52] 首次在拟南芥 *RD29A* 基因的启动子区域中发现 DRE 元件(dehydration-responsive element)中有一个核心序列 CCGAC, Baker 等^[53] 把它命名为 CRT(C-repeat)。CRT/DRE 存在于许多低温诱导基因的启动子中。人们已从拟南芥中分离鉴定出一种 cDNA,它编码了一种转录激活因子,这种因子能与 CRT/DRE 结合,启动 *COR* 基因表达,故命名为 CBF1(CRT-repeat binding factor)^[54]。随后在拟南芥中又发现了 CBF2 和 CBF3^[55,56]。CBF1 超表达的拟南芥植株在温暖条件下也能诱导启动子区域具有共同 CRT/DRE 核心序列的许多基因表达^[50,51]。电解质渗漏实验结果表明,转基因植株的抗冻性比未经冷驯化的转基因植株提高了 3.3℃,这一抗冻提高效果远远高于 *COR15a* 单基因的超表达;并且 CBF1 超表达是在整株水平上明显提高了植物的抗冻性,而 *COR15a* 单基因超表达不具有此效果^[50]。这些结果显示 CBF1 和 CBF1 介导的冷诱导基因可能在植物抗冷中发挥着重要作用。但也并不能据此完全确定,因为除冷诱导基因外,其它基因的启动子区域也可能包含有 CRT/DRE 核心元件。另

外,一些实验也报道了细胞内存在着多条冷信号转导途径(ABA、ESK1、CFT等)^[31,57,58], CBF-COR 只是冷驯化信号转导途径中的一条。

4 植物的冷信号转导

植物细胞如何察觉外界温度的变化,从而产生相应的生理生化反应,这是研究植物低温生理的一个基本和首要问题。冷信号转导涉及了察觉低温信号的感应子(sensors)和诱发与植物抗冷性有关的生化反应和基因表达所需的转导器(transducers)。近年来,随着生物技术的迅速发展,冷信号转导研究也取得了突破性进展。

以往人们根据低温下细胞质中钙浓度($[Ca^{2+}]_{cyt}$)的上升,推测 Ca^{2+} 参与了植物细胞对低温的响应。随着研究的深入,越来越多的证据显示 Ca^{2+} 参与了植物细胞对低温信号的感应,是转导低温信号的第二信使。这些概括证据如下:1)细胞质中 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升与低温几乎同时发生^[59];2)引起 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升的温度与冷驯化的温度一致^[60];3) Ca^{2+} 通道抑制剂 La^{3+} 或螯合剂 EGTA 抑制了 *COR* 基因在低温下的表达,而 Ca^{2+} 通道离子 A_{23187} 在温暖条件下刺激了胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升,诱导了 *COR* 基因的表达^[59]。但低温如何激活 Ca^{2+} 通道,引起胞质中 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升的?这一直是冷信号研究的关键问题之一。最近 Orver 等^[61]提出了他们的观点,认为低温首先使膜的流动性减弱,这种减弱信息可以通过细胞骨架(如肌动蛋白)传递给 Ca^{2+} 通道,刺激质膜上 Ca^{2+} 通道的打开,使胞外 Ca^{2+} 进入胞内,引起胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升。但一些植物细胞在低温下升高的 Ca^{2+} 不是来自于胞外,而是来自于胞内的 Ca^{2+} 贮器,因此它们在低温下 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升可能与质膜 Ca^{2+} 通道打开的机理有所不同。对此, Kratsch 和 Wise^[62]认为叶绿体对低温非常敏感,低温能改变叶绿体内 PSII 的还原状态,使其产生高水平的活性氧(ROS),随后 ROS 激活内质网、液泡和线粒体等 Ca^{2+} 贮器,促进贮藏 Ca^{2+} 释放到细胞质中。

有关 Ca^{2+} 流如何转导冷信号给冷响应基因使其表达的研究也取得了一定进展,认为这涉及了蛋白质的磷酸化和去磷酸化反应:1)用冈田酸(蛋白磷酸激酶的阻止剂)处理可使拟南芥 *COR15a* 基因在常温下转录量增加,而用星形孢素(蛋白激酶的阻止剂)处理, *COR15a* 即使在低

温下的表达量也低于正常水平^[63]; 2) 蛋白磷酸激酶 2A 在低温下活性的下降依赖于 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的上升^[63], Ca^{2+} 依赖型蛋白激酶在低温下的激活依赖于 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高^[47]; 3) 抑制蛋白磷酸激酶活性的温度阈值、提高蛋白过磷酸化的温度阈值及诱导 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升的低温阈值相吻合^[63]; 4) 蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶 II 上含有识别 3 种 CBF 蛋白的潜在位点^[64]. 这样可推断, 低温可引起胞内 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上升, 通过抑制蛋白磷酸激酶(如蛋白磷酸激酶 2A) 的活性, 提高蛋白激酶的活性, 引起一个或更多的蛋白质磷酸化反应, 将冷信号转递到细胞核中的 DNA 区域, 诱导 CBF 等转录激活子基因的表达, 进而引起众多冷响应基因的表达.

现在还不清楚蛋白磷酸激酶是如何启动 CBF、CFT 及 ESKI 等途径的? 对于 CBF 的诱导, Gilmour 等^[55] 提出了 ICE 盒子假说. 他们设想胞内存在一个未知的转录激活子 ICE, 并认为 CBF 基因的启动子中存在一个低温调节元件 ICE 盒子, 转录激活子 ICE 能识别此种 ICE 盒子. 在较温暖的环境条件下, 转录激活因子 ICE 处于不活跃状态; 但当植物在低温环境下, 低温信号转导途径被激活, 引起转录激活因子 ICE 或相关蛋白发生变化, 促使转录激活因子 ICE 诱导 CBF 基因的表达, 合成 CBF 蛋白. CBF 蛋白与 COR 基因启动子中的 CRT/DRE 元件结合, 引起 COR 基因的表达, 从而提高植物的抗冷性.

其它关于 ABA、细胞膜、可溶物的积累等参与低温信号转导也有一些证据^[65-67]. 可见, 植物的冷信号转导是一个非常复杂的过程.

5 结语

在过去 10 年中, 生物技术向生命科学领域的深层渗透, 给植物抗冷研究带来了迅猛发展, 使认识和揭示植物的抗冷机理向前迈了一大步. 但仍有许多问题有待于进一步研究. 现在还不清楚哪些基因和生化过程对发展植物的抗冷力是必需的, 哪些是细胞对低温的一般化响应, 而对提高植物抗冷力来说是不需的; 除了一些 COR 基因的诱导外, 其它与抗冷有关的生理生化过程, 如 ABA 含量的增加、可溶物的合成、膜脂的改变等许多方面机理均不清楚. 现今, 随着几种拟南芥突变体系的分离及更新生物技术(如基因芯片等)应用, 使解决上述问题变得可能. 如通过基因芯片技术可以比较抗冷突变体的表达图形与野生拟南芥的表

达模型, 鉴定出提高植物抗冷力所需的基因或蛋白; 用拟南芥已知基因的信息, 可对抗冷基因进行图谱定位, 鉴定出信号转导级联反应的许多步骤. 可以相信, 随着分子生物学的发展, 人们对植物抗冷机理的认识将更加深入, 最终达到减轻农作物、花卉和果木的低温伤害目的.

参考文献 (References):

- [1] LEVITT J. Responses of Plants to Environmental Stresses[M]. New York: Academic Press, 1980.
- [2] LYONS J M. Chilling injury in plants[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1973, 24: 445-528.
- [3] VIGHI L, LOS D A, HORVIT H, et al. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *des* gene in *Synechocystis* PCC6803[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 9090-9094.
- [4] MURATA N, ISHIZAKI-NISHIZAWA O, HIGASHI S J, et al. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants[J]. Nature, 1992, 356: 710-713.
- [5] BRUSH R A, GRIFFITH M, MLYNAIKZ A. Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Secale cereale*) leaves[J]. Plant Physiol, 1994, 104: 725-735.
- [6] GUY C L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41: 187-223.
- [7] WEBB M S, UEMURA M, STEPONKUS P L. A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance[J]. Plant Physiol, 1994, 104: 467-478.
- [8] UEMURA M, JOSEPH R A, STEPONKUS P L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions[J]. Plant Physiol, 1995, 109: 15-30.
- [9] CHEN H H, BRENNER M L, LI P H. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation[J]. Plant Physiol, 1983, 71: 362-365.
- [10] LYNCH D V, STEPONKUS P L. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma)[J]. Plant Physiol, 1987, 83: 761-767.
- [11] UEMURA M, STEPONKUS P L. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance[J]. Plant Physiol, 1994, 104: 479-496.
- [12] KOSTER K L, LYNCH D V. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye[J]. Plant Physiol, 1992, 98: 108-113.
- [13] KISHITANI S, WATANABE K, YASUDA S, et al. Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants[J]. Plant Cell Environ, 1994, 17: 89-95.
- [14] MURELLI C, RIZZA F, ALBINI F M, et al. Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley[J]. Physiol Plant, 1995, 94: 87-93.
- [15] NOMURA M, MURAMOTO Y, YASUDA S, et al. The accumulation of glycinebetaine during cold acclimation in early and late cultivars of barley[J]. Euphytica, 1995, 83: 247-250.
- [16] DORFFLING K, DORFFLING H, LESSLICH G, et al. Heritable improvement of frost tolerance in winter wheat by in-vitro-selection of hydroxyproline-resistant proline overproducing mutants[J]. Plant Mol Biol, 1997, 23: 221-225.
- [17] TAO D L, OQUIST G, WINGSLE G. Active oxygen scavengers during cold

- acclimation of Scots pine seedlings in relation to freezing tolerance[J]. *Cryobiology*, 1998, 37: 38-45.
- [18] STEPONKUS P L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1984, 5: 543-548.
- [19] STEPONKUS P L, UEMURA M, BALSAMO R A. Transformation of the cryobehavior of rye protoplasts by modification of the plasma membrane lipid composition[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 9026-9030.
- [20] WANNER I A, JUNTTILA O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120: 391-400.
- [21] BOWLER C, VAN MONTAHU M, INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83-116.
- [22] WADA H, GOMBOS Z, MURATA N. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation[J]. *Nature*, 1990, 347: 200-203.
- [23] PRASAD T K, ANDERSON M P, MARTIN B A, *et al.* Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 65-74.
- [24] PRASAD T K. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings[J]. *Plant Physiol*, 1997, 114: 1369-1376.
- [25] PRASAD T K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities[J]. *Plant J*, 1996, 10: 1017-1026.
- [26] HAUSJEM A, ALSCHER R G. Cold-hardiness-specific glutathione reductase isozymes in red spruce. Thermal dependence of kinetic parameters and possible regulatory mechanisms[J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 215-223.
- [27] GUPTA A S, WEBB R P, HOLADAY A S, *et al.* Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress[J]. *Plant Physiol*, 1993, 103: 1067-1073.
- [28] VAN CAMP W, CAPIAN K, VAN MONTAGU M, *et al.* Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts[J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1703-1714.
- [29] RISTIC Z, ASHWORTH E N. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation [J]. *Protoplasma*, 1993, 172: 111-123.
- [30] McKOWN R, KUROKI G, WARREN G. Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance[J]. *J Exp Bot*, 1996, 47: 1919-1925.
- [31] XIN Z, BROWSE. *Eskinol* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7799-7804.
- [32] HAYASHI H, ALJA MUSTARDY L, DESHNIUM P, *et al.* Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress[J]. *Plant J*, 1997, 12: 133-142.
- [33] DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants[J]. *Plant J*, 1993, 4: 21-223.
- [34] YANG W J, NADOLSKA-ORCZYK A, WOOD K V, *et al.* New-isogenic lines of maize differing for glycinebetaine[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 621-630.
- [35] HINCHA DK, SONNEWALD U, WILLMITZER L, *et al.* The role of sugar accumulation in leaf frost hardiness: investigations with transgenic tobacco expressing a bacterial pyrophosphatase or a yeast invertase gene[J]. *J Plant Physiol*, 1996, 147: 604-610.
- [36] LEVVA A, JARILLO J A, SALINAS J, *et al.* Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 39-46.
- [37] GIBSON S, ARONDEL V, IBA K, *et al.* Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3-desaturase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1615-1621.
- [38] HUGHES M A, PEARCE R S. Low temperature treatment of barley plants causes altered gene expression in shoot meristems[J]. *J Exp Bot*, 1988, 39: 1461-1467.
- [39] DUNN M A, MORRIS A, JACK P L, *et al.* A low-temperature-responsive translation elongation factor 1 alpha from barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 23: 221-225.
- [40] GILMOUR S J, AITA N N, THOMASHOW M F. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 13-22.
- [41] LIN C, THOMASHOW M F. A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1992, 183: 1103-1108.
- [42] KURKELA S, FRANCK M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene[J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 137-144.
- [43] ANDERSON J V, NEVEN I G, LI Q B, *et al.* A cDNA encoding the endoplasmic reticulum-luminal heat-shock protein from spinach (*Spinacia oleracea* L.)[J]. *Plant Physiol*, 1993, 104: 303-304.
- [44] UKAJI N, KUWABARA C, TAKEZAWA D, *et al.* Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation[J]. *Plant Physiol*, 1999, 120: 481-490.
- [45] JONAK C, KIEGERL S, LIGTERINK W, *et al.* Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1425-1436.
- [46] TAHTIARJU S, SANGWAN V, MONROY A F, *et al.* The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium [J]. *Planta*, 1997, 203: 442-447.
- [47] MARTIN M L, BUSCONI L. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature[J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1442-1449.
- [48] ARTUS N N, UEMURA M, STEPONKUS P L, *et al.* Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13404-13409.
- [49] STEPONKUS P L, UEMURA M, JOSEPH R A, *et al.* Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14570-14575.
- [50] JAGLO-OPTOSEN K R, GILMOUR S J, ZARKA D G, *et al.* *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance [J]. *Sci*, 1998, 280: 104-106.
- [51] LIU Q, KASUMA Y, ABE H, *et al.* Two transcription factors, DREBA 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* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391-1406.
- [52] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 251-264.
- [53] BAKER S, WILHELM K S, THOMASHOW M F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 701-713.
- [54] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035-1040.

- [55] GILMOUR S J, ZAIKA D G, STOCKINGER E J, *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression[J]. *Plant J*, 1998, 16: 433-442.
- [56] MEDINA J, BARGUES M, TEROL J, *et al.* The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 463-469.
- [57] MANTYLA E, IANG V, PALVA E T. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 141-148.
- [58] WARREN G, MCKOWN R, MARIN A, *et al.* Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1011-1019.
- [59] KNIGHT H, TREWAVAS A J, KNIGHT M R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involved two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 489-503.
- [60] MONROY A F, DHINDSA R S. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 321-331.
- [61] ORVER B L, SANGWAN V, OMANN F, *et al.* Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity[J]. *Plant J*, 2000, 23: 785-794.
- [62] KRATSCCH H A, WISE R R. The ultrastructure of chilling stress[J]. *Plant Cell and Environ*, 2000, 23: 337-350.
- [63] MONROY A F, SANGWAN V, SHINDSA R S. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation[J]. *Plant J*, 1998, 13: 653-660.
- [64] KENNELLY P J, KREB E G. Consensus sequences as substrate specificity determinations for protein kinases and protein phosphatases[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 15555-15558.
- [65] HEINO P, SANDMAN G, LANG V, *et al.* Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 79: 801-806.
- [66] IANG V, MANTYLA E, WWLIN B, *et al.* Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1341-1349.
- [67] GRAY G R, CHAUVIN L P, SARHAN F, *et al.* Cold acclimation and freezing tolerance[J]. *Plant Physiol*, 1997, 114: 467-474.

(上接第 48 页)

- [10] SOMMER A, NÉEMAN E, STEFFENS J C, *et al.* Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase[J]. *Plant physiology*, 1994, 105(4): 1301-1311.
- [11] NEWMAN S M, EANNETTA N Y, YUH, PRINCE J P, *et al.* Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 1035-1051.
- [12] MARI S, MARQUES L, BRETON Frédéric, *et al.* Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1213-1217.
- [13] THYGENSEN P W, DRY I B, ROBINSON S P. Polyphenol oxidase in potato[J]. *Plant physiology*, 1995, 109(2): 525-531.
- [14] CRAY J W, LAX A R, FLURKEY W H, *et al.* Clone and characterization of cDNAs coding for vicia faba Polyphenol oxidase[J]. *Plant Mol Biol* 1992, 20: 245-253.
- [15] THIPYAPONG P, JOEL D M, STEFFENS J C. Differential expression and turnover of the tomato Polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development[J]. *Plant physiology*, 1997, 113(3): 707-718.
- [16] BOSS P K. An apple Polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues[J]. *Plant Mol Biol* 1995, 27: 429-433.
- [17] THIPYAPONG P, HUNT M D, STEFFENS J C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) Polyphenol oxidase[J]. *Phytochemistry*, 1995, 40: 673-676.
- [18] CONSTABEL C P, RYAN C A. A survey of wound-and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants[J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(4): 507-511.
- [19] HARUTA M, PEDERSEN J A, CONSTABEL C P. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates[J]. *Physiologia plantarum*, 2001, 112(4): 552-558.
- [20] THIPYAPONG P, STEFFENS J C. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals[J]. *Plant physiology*, 1997, 115: 409-418.
- [21] DRY I B, ROBINSON S M, *et al.* Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase gene[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 495-502.