

段俊枝,李莹,周雷,等.耐冷功能基因及其在植物耐冷基因工程中的应用新进展[J].江苏农业科学,2015,43(6):1-6.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.001

耐冷功能基因及其在植物耐冷基因工程中的应用新进展

段俊枝¹,李莹²,周雷³,潘英华⁴,赵明忠⁵,任银玲¹

(1. 河南省农业科学院农业经济与信息研究所,河南郑州 450002;2. 河南农业大学,河南郑州 450002;

3. 湖北省农业科学院粮食作物研究所,湖北武汉 430064;4. 广西壮族自治区农业科学院水稻研究所,广西南宁 530005;

5. 河南省农业科学院小麦研究所,河南郑州 450002)

摘要:低温是影响植物生长发育及作物产量最主要的环境胁迫因子之一。从合成渗透调节物质基因、抗冻蛋白基因、脂肪酸去饱和代谢关键酶基因、抗氧化酶类基因等全面系统地概述了耐冷功能基因及其在植物耐冷基因工程中的应用新进展,以期植物耐冷遗传改良及育种奠定基础。

关键词:植物;耐冷;功能基因;基因工程;新进展

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0001-05

低温是影响植物生长发育及作物产量最主要的环境胁迫因子之一。由于植物耐冷性大多是受多基因控制的性状,其耐冷机制复杂,采用传统育种方法改良植物耐冷性耗时费力、困难大,随着分子生物学的发展,分子生物技术不断被应用于植物抗逆性研究。利用现代分子生物技术发掘优异的基因资源,通过基因工程手段改良植物的耐冷性已成为提高植物耐冷性的研究热点。众所周知,在低温胁迫条件下,对植物直接起保护作用的蛋白称为功能蛋白,而编码这类蛋白的基因称为功能基因,是低温胁迫信号转导途径中的最下游基因,如脯氨酸、甜菜碱、小分子糖类等合成渗透调节物质、抗冻蛋白(AFP)、GPAT、FAD 等脂肪酸去饱和代谢关键酶、SOD、APX、GR、GST 等抗氧化酶类及 LEA、COR、HSP 等其他功能蛋白基因。本研究系统全面概述了这些耐冷功能基因及其在植物耐冷基因工程中的应用新进展,以期丰富耐冷基因资源,并为植物的耐冷遗传改良奠定基础。

1 合成渗透调节物质的基因

低温胁迫时,植物通过诱导合成渗透调节物质来维持渗透压平衡以避免低温伤害,其中,脯氨酸、甜菜碱、海藻糖、果聚糖等渗透调节物质对植物的低温耐性起重要作用。

将脯氨酸降解关键酶——脯氨酸脱氢酶反义基因 *AtproDH* 转入拟南芥,可以很好地抑制脯氨酸脱氢酶的产量,提高胞内脯氨酸含量,增强植物对低温和高盐的耐受性^[1]。水稻中,合成脯氨酸的关键酶基因 *OsP5CS2* 经 T-DNA 插入丧失功能后,与野生型相比,突变体对盐、冷敏感,经高盐、低

温处理后生长迟缓,*OsP5CS2* 对提高水稻耐冷、耐盐性十分重要^[2]。在落叶松中超表达乌头叶豇豆 *P5CS* 基因,转基因植株的耐冷冻、耐盐性得到提高^[3]。

甘氨酸甜菜碱生物合成途径包括胆碱脱氢/氧化和甘氨酸甲基化。前一条途径存在于大多数植物、动物、微生物中,以胆碱为底物,经过 1 步或 2 步脱氢/氧化生成甘氨酸甜菜碱,涉及的酶包括胆碱单加氧酶(CMO)、甜菜碱脱氢酶(BADH)、胆碱氧化酶(COD);后一条途径发现于盐生隐杆藻(*Aphanotece halophytica*)中,以甘氨酸为底物,经过 3 步甲基化生成甘氨酸甜菜碱,涉及的酶包括甘氨酸肌氨酸甲基转移酶(GSMT)、肌氨酸二甲基甘氨酸甲基转移酶(SDMT)^[4]。研究发现,将 *CodA* 基因在拟南芥中超量表达,可提高转基因植株中的甜菜碱含量,进而提高转基因植株的抗冷冻性^[5-6];在水稻中超量表达 *CodA* 基因,不仅可提高转基因水稻的耐寒能力,还可提高转基因水稻的耐盐性^[7];将榆钱菠菜 *BADH* 基因在小麦中超表达,不仅提高了转基因小麦细胞膜的完整性,降低了活性氧含量及膜脂过氧化程度,而且提高了转基因小麦的耐冷性^[8];将盐生隐杆藻的 *ApGSMT* 和 *ApDMT* 基因在水稻中同时过量表达,可提高转基因水稻的耐冷、耐盐性^[4]。

海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)和海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(TPP)是大肠杆菌中海藻糖合成的关键酶,将 2 个关键酶基因融合获得 *TPSP* 基因,超表达该融合基因可提高转基因水稻体内海藻糖含量,进而提高转基因水稻对低温、干旱、高盐的耐受性^[9-10]。Li 等在水稻中克隆了唯一具有 TPS 活性的 *OsTPS1* 基因,并在水稻中超量表达,发现转基因水稻中海藻糖、脯氨酸含量及一些胁迫相关基因的表达量提高,转基因植株的耐冷、耐盐、抗旱性也得以提高^[11]。

另外,将从枯草芽孢杆菌中分离克隆的果聚糖合成酶基因 *SacB* 导入番茄中,提高了转基因番茄的果聚糖含量,植株的抗寒性提高^[12];将小麦果聚糖合成酶基因 *WFT2* 转入水稻,同样也提高了转基因水稻植株体内的果聚糖含量及转基因植株的耐冷性^[13]。肌醇半乳糖苷合成酶(GS)是棉子糖家族寡糖合成的关键酶,沙冬青 *AmGS* 基因受冷、ABA 等胁迫诱导表达,将其转化石楠,提高了转基因石楠的耐冷性^[14]。

收稿日期:2014-07-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:30871512、31000701);河南省农业科学院高层次人才科研启动经费(编号:豫财教[2013]232号2060503)。

作者简介:段俊枝(1981—),女,河北沧州人,博士,助理研究员,主要从事作物遗传育种及科技期刊编辑工作。E-mail: junzhi2004@163.com。

通信作者:任银玲,女,硕士,副研究员,主要从事农业信息及科技期刊编辑工作。E-mail: renyingling@hnagri.org.cn。

2 抗冻蛋白基因

抗冻蛋白 (AFP) 是一类具有热滞效应和冰晶生长抑制效应的蛋白质,能以非线性形式降低水溶液的冰点,但对熔点影响甚微,从而导致水溶液的熔点和冰点之间出现差值,在受低温环境胁迫时能使有机体抵御冰冻环境^[15]。

抗冻蛋白最早在鱼类、昆虫类动物中发现。Wallis 等用合成的芸豆植物凝集素信号肽与美洲拟鲱 AFP 的融合基因转化马铃薯,在 $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,与非转基因植株相比,转基因植株叶片电解质渗出率显著降低,转基因植株耐冻性提高,且转基因植株中 AFP 蛋白表达水平与转基因植株的耐冻性呈正相关^[16]。黄永芬等将编码美洲拟鲱 AFP 基因导入番茄,转基因植株在田间低温胁迫条件下的生长势优于对照,致死温度也比对照降低了 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[17]。同样,将编码云杉色卷蛾幼虫抗冻蛋白的基因转化草菇发现,转基因植株有较强的耐低温能力且能够稳定遗传^[18];将编码准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白的基因转化烟草,转基因植株抗寒能力也明显提高^[19]。

后来,在植物中也发现了抗冻蛋白。胡萝卜 AFP 基因受冷诱导表达,在拟南芥中超量表达该基因,转基因植株蛋白提取物有明显的抗冻活性,且抗冻活性与 AFP 基因转录水平呈正相关^[20];在烟草中超量表达胡萝卜 AFP 基因,提高了转基因烟草的耐冷性^[15,21]。将编码冬黑麦抗冻蛋白的基因转入拟南芥,在低温胁迫条件下,转基因拟南芥的膜稳定性增强,提高了转基因植株的耐冷性^[22]。用沙冬青 *AnAFP* 基因转化烟草,在冷胁迫条件下,转基因烟草相对电导率变化很小、萎蔫现象很少^[23]。这些结果说明,AFP 基因在重要作物的耐冷性遗传改良方面具有潜在的应用价值。

3 脂肪酸去饱和代谢关键酶基因

生物膜是低温冷害作用的首要部位,而且低温伤害的原初反应发生在生物膜系统类脂分子的相变上^[24]。1973 年,Lyons 提出“膜相变的寒害”假说,认为当植物遭受低温伤害时,生物膜首先发生脂质的物相变化,膜脂从液晶相变为凝胶相,膜脂上的脂肪酸链由无序排列变为有序排列,膜结合酶的活力降低,且膜上出现孔道或龟裂,使膜的通透性增大,膜内可溶性物质大量向膜外渗透,破坏了细胞内外的离子平衡,同时,膜结合酶结构发生改变,酶促反应速度失去平衡,导致植物细胞产生生理代谢变化,出现功能紊乱,植物细胞受到伤害^[25]。研究发现,植物的相变温度越低,其抗寒性越强;而膜脂中类脂和脂肪酸成分的不饱和度可明显影响膜脂的相变温度,不饱和度越高,相变温度越低,植物的抗寒性越强^[26-28]。因此,可通过基因工程技术将脂肪酸去饱和酶基因导入植物中,通过降低脂肪酸的饱和度来提高植物的抗寒性。脂肪酸去饱和代谢关键酶基因主要包括甘油-3-磷酸脂酰基转移酶基因 (*GPAT*)、 $\omega-3$ 脂肪酸去饱和酶基因 (*FAD*)、植物硬脂酰 ACP 去饱和酶基因 (*SAD*) 及 $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 去饱和酶基因。

脂酰甘油 (PG) 具有较多的饱和脂肪酸,是决定膜脂相变的主要因素,而 GPAT 又是 PG 生物合成过程中的第一个酰基酯化酶,对决定植物膜 PG 的不饱和度起关键作用^[29]。将冷敏植物南瓜的 *GPAT* 基因转入烟草,转基因烟草膜脂中脂肪酸饱和度增加;相反,将耐冷植物拟南芥的 *GPAT* 基因转入烟

草,转基因植株内囊体 PG 的脂肪酸组成趋向不饱和,转基因植株抗寒性大大提高^[26]。同样,将拟南芥 *GPAT* 基因导入水稻,转基因水稻叶片中不饱和脂肪酸含量及光合速率提高,转基因植株的耐冷性增强^[30]。Ariizumi 等将拟南芥和菠菜的 *AGPAT* 和 *SGPAT* 基因分别转入水稻,2 种转基因水稻叶片内磷脂酰甘油的顺式不饱和脂肪酸含量均明显提高,光合速率均增加,转基因植株生长加快,耐冷性提高^[31]。

除 GPAT 外,对 $\omega-3$ 脂肪酸去饱和酶 FAD 的研究也较多。将拟南芥叶绿体 *FAD7* 在烟草中组成型超表达,转基因烟草中三烯脂肪酸含量提高,其前体物质相应减少,表现出明显的抗寒性,通过脂肪酸去饱和作用可提高植物适应及耐受低温的能力^[32-33];而将其在烟草中经低温胁迫诱导表达,转基因烟草中三烯脂肪酸含量同样增加,存活率显著提高,表现出很强的抗寒性^[34]。除 *FAD7* 基因外,Gibson 等从拟南芥中分离得到另一个受低温诱导的叶绿体 $\omega-3$ 脂肪酸去饱和酶基因 *FAD8*,它与 *FAD7* 基因核苷酸序列同源性达 75%,两者功能互补,共同催化膜脂中脂肪酸的去饱和^[35]。对甘蓝型油菜 *BnFAD8* 基因研究发现,该基因在常温下仅存在痕量表达,而在低温条件下叶中其表达量出现较大幅度升高,推测 *BnFAD8* 基因和油菜的低温调控存在联系^[36]。另外,对辣椒中的叶绿体 *CachFAD* 基因研究发现,在叶片受到伤害时,*CachFAD* 基因转录水平迅速提高,随后亚麻酸 (18:3) 含量也提高^[37];将烟草微粒体基因 *NiFAD3* 转入甘薯,同样提高了转基因甘薯的亚麻酸 (18:3) 含量^[38]。进一步研究发现,将番茄内质网 *LeFAD3* 基因在番茄中超量表达,不仅提高了转基因番茄的亚麻酸 (18:3) 含量,而且降低了转基因番茄受冷伤害程度,提高了转基因番茄的耐冷性^[39]。

对植物 $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 去饱和酶及硬脂酰 ACP 去饱和酶的研究也取得一定进展。从膜脂不饱和脂肪酸突变蓝细菌中分离得到 4 个去饱和酶基因 *desA*、*desB*、*desC*、*desD*,其编码蛋白分别特异性催化脂肪酸 $\Delta 12$ 、 $\omega 3$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 6$ 位置的去饱和,对低温依赖表达的程度不同。在低温胁迫条件下,*desA* 表达量增加,膜脂不饱和度增加,从而增加了膜脂的流动性; $\Delta 6$ 、 $\omega 3$ 去饱和酶基因的表达水平也增加,但增加速率不同; $\Delta 9$ 去饱和酶基因的表达水平几乎不变^[40-42]。将从酵母或蓝细菌中克隆的 $\Delta 9$ 去饱和酶基因 *desC* 转入烟草,转基因烟草叶片中不饱和脂肪酸的含量增加,转基因植株耐冷性明显提高^[43]。另外,Ma 等将菠菜硬脂酰 ACP 去饱和酶基因 *SAD* 导入烟草中,转基因烟草的抗寒性增强^[44];对马铃薯硬脂酰 ACP 去饱和酶 $\Delta 9$ 基因研究发现,在低温胁迫下,耐冷品种中该基因表达量提高,而不耐冷品种中该基因表达量没有变化, $\Delta 9$ 与马铃薯的耐寒性有关^[45]。

4 抗氧化酶类基因

当植物遭遇非生物胁迫时,细胞内会产生大量活性氧自由基 (ROS),导致氧化胁迫、膜脂过氧化及膜蛋白聚合,质膜透性增加,膜正常结构遭到破坏。植物在长期进化过程中形成了一个复杂的抗氧化保护系统来清除或降低 ROS 的伤害,包括非酶促保护系统和酶促保护系统。非酶促抗氧化保护系统包括还原性谷胱甘肽 (GSH)、类胡萝卜素 (CAR)、抗坏血酸 (AsA) 等;酶促抗氧化保护系统包括超氧化物歧化酶

(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)等。在整个抗氧化保护系统中,涉及的抗氧化解毒酶类包括 SOD、CAT、POD、APX、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、谷胱甘肽-S-转硫酶(GST)、醛糖/醛还原酶(ALR)。

SOD 是第一个清除 ROS 的关键抗氧化酶,可以清除胁迫细胞产生的超氧自由基及其衍生物。将烟草 Mn-SOD 的 cDNA 转入苜蓿,构建载体 pMitSOD 包含一段转运肽序列,携带 Mn-SOD 蛋白酶进入线粒体,另一载体 PChlSOD 编码的合成蛋白定位至叶绿体,转化植株对除草剂二苯醚的抗性增强,对低温胁迫耐性增强,且线粒体、叶绿体等不同细胞器定位的 Mn-SOD 转基因植株间抗性差异不同^[46]。Duan 等将克隆的番茄类囊体抗坏血酸过氧化物酶基因 *LetAPX* 在番茄中过量表达发现,在冷胁迫条件下,转基因番茄 APX 活性、GSH 含量、叶绿素含量、净光合速率、最大光化学效率提高,过氧化氢含量、离子渗漏率、MDA 含量降低,超表达 *LetAPX* 减轻了转基因植株的光抑制并提高了转基因植株的耐冷性^[47]。将芜菁 *MDHAR* 基因在拟南芥中超量表达,转基因拟南芥 *APX*、*DHAR*、*GR*、*SOD*、*GPX* 等基因的表达量增加,且 ASA、GSH、叶绿素含量提高,MDA 含量降低,提高了转基因植株的耐冷性^[48]。通过 RNAi 技术将番茄 *MDHAR* 基因表达量降低,进而降低其 MDHAR 活性,则转基因番茄的耐冷性也降低^[49]。Shu 等分离了番茄 *LeGR* 基因并获得反义转基因番茄,与非转基因番茄相比,在冷胁迫条件下转基因番茄积累较多的过氧化氢,电解质渗漏严重,净光合速率、最大光化学效率降低,生长发育受到抑制,APX 活性、GSH 含量、AsA 含量均降低,转基因植株对冷敏感,*LeGR* 基因可提高植株的耐冷性^[50]。毒性较高的质膜过氧化产物如 HNE(4-hydroxynon-2-enal),其解毒作用是通过与 GSH 结合完成的,而此过程又是由 GST 或 ALR 催化完成的。研究表明,超量表达 *ALR* 基因可提高转基因烟草的耐冷性和耐镉性^[51];将水稻 *OsGSTL2* 基因转化拟南芥,转基因拟南芥对重金属、冷、盐、渗透胁迫的耐性也提高^[52]。

5 LEA、COR 蛋白及其他功能蛋白基因

胚胎发育晚期丰富的 LEA 蛋白、COR 蛋白、脱水蛋白基因与植物耐冷功能也密切相关,且这 3 种蛋白几乎均具有亲水性,可减少盐、干旱、冷冻脱水造成的细胞伤害。LEA 蛋白是植物胚胎发生后种子中大量积累的一类蛋白质,具高亲水性和热稳定性,与植物抗逆功能密切相关。在酵母中超量表达西红柿 LEA 蛋白基因 *Le25*,转基因酵母细胞的耐冷和耐盐性显著提高^[53];在桑树中超量表达大麦 LEA 蛋白基因 *HVA1*,转基因桑树的耐冷、耐盐和抗旱性均提高^[54]。

COR 蛋白基因大多受冷胁迫诱导,如在拟南芥冷驯化过程中产生的 *COR15a*、*COR6.6*、*COR78* 及与 *LEA* 同源的 *COR47* 基因等,一些 COR 蛋白具有 LEA 家族蛋白的典型结构而具有高度的亲水性,可减少胁迫脱水对植物造成的伤害。将 *COR15a* 在拟南芥中大量组成型表达,与野生型相比,转基因植株叶绿体和原生质体的耐冷性及原生质膜的稳定性均增强,低温所造成的损伤减轻^[55]。在甘蓝型油菜中分离了

BnCOR25 基因,其在下胚轴、子叶、茎和花中大量表达,且其表达量受低温和渗透胁迫影响显著,将该基因分别转入拟南芥中,在 4℃ 低温下转基因拟南芥的生根速度明显快于野生植株,超量表达 *BnCOR25* 基因可提高转基因酵母及拟南芥的耐冷性^[56]。芥菜 *CbCOR15b* 基因在根成熟区、茎、叶中均表达,将其转化烟草,从电解质渗出率、相对含水量、葡萄糖含量及表型来看,转基因烟草在冷胁迫条件下受伤害较轻、耐冷性提高^[57]。

脱水蛋白具有赖氨酸富集结构域,也具有高度的亲水性,在响应胁迫的过程中起到分子伴侣作用,可减少胁迫脱水对植物造成的伤害。马铃薯脱水蛋白基因 *Dhn24* 在根、茎、叶、子叶中均有表达,将其转化黄瓜后发现,该基因在转基因黄瓜根中高表达,且转基因黄瓜的冷害程度减轻、耐冷性提高,但耐冷程度与 DHN24 蛋白表达水平没有相关性^[58]。Hoi 等对烟曲霉中分离的类脱水蛋白基因 *DprC* 研究发现,其缺失突变体的耐冷性降低,该基因可提高植物的耐冷性,*DprC* 蛋白介导的耐冷性响应依赖于 SakA MAP 激酶^[59]。

另外,还有一些功能蛋白基因也参与植物的冷胁迫响应,如热休克蛋白(HSP)、水通道蛋白等。许多 HSP 具有分子伴侣活性,在胁迫条件下可维持蛋白的功能结构,从而防止错误折叠蛋白或功能失调蛋白的聚集。甜辣椒 *CaHSP26* 基因编码叶绿体小热休克蛋白,将其转化烟草后发现,超量表达该基因提高了转基因烟草在冷胁迫下的光化学效率和耐冷性^[60]。水通道蛋白又名水孔蛋白,是一种位于细胞膜上的蛋白质,在细胞膜上组成“孔道”,可控制水在细胞的进出。棉花 *GhTIP1;1* 编码液泡膜水通道蛋白,将其在酵母中超量表达后,冷胁迫条件下酵母细胞的存活率提高,这说明该基因与细胞耐冷性相关^[61]。另外,Qiao 等将动物细胞死亡抑制基因 *Bcl-xL* 转化马铃薯后发现,*Bcl-xL* 可以通过保持细胞器官的动态平衡来抑制细胞死亡,加强植物在冷胁迫条件下的生存能力^[62]。Thorlby 等发现,拟南芥 β -葡糖苷酶基因 *SFR2* 突变体在低温胁迫条件下电解质渗出量增加,对冷敏感,基因敲除可得到同样的结果,*SFR2* 基因具有提高植物耐冷性的作用,并推测其可能参与细胞壁中多糖的转换或保护细胞膜免受低温伤害^[63]。Komori 等研究表明,雄性不育恢复基因 *Rf-1* 可增强低温胁迫条件下杂交水稻的育性^[64]。Xu 等发现,拟南芥 *AZII* 基因受壬二酸和低温诱导表达,将其在拟南芥中超量表达,转基因植株细胞受低温伤害减轻;如将该基因敲除,转基因植株细胞受低温伤害加重,如将其转化酿酒酵母,在低温胁迫条件下转基因酿酒酵母的存活率升高,这表明 *AZII* 可提高植物的耐冷性^[65]。Zhang 等研究发现,水稻液泡 H^+ 转移无机焦磷酸酶基因 *OVP1* 受低温诱导表达,在水稻中超量表达该基因并提高了转基因水稻的耐冷性,转基因水稻细胞膜完整性程度增加,MDA 含量降低,脯氨酸含量增加^[66]。Zhou 等将番茄类胡萝卜素 ϵ -羟化酶基因 *LeLUT1* 转化烟草后发现,在冷胁迫条件下,转基因烟草的活性氧含量、MDA 含量、电解质渗出率均降低,光化学效率及净光合速率均提高,转基因烟草的耐冷性提高^[67]。

6 展望

随着全球气候变化,尤其是在全球气候逐渐变暖的背景下,极端气候发生频率增加,冷热不均,雨雪、冰冻天气造成低

温灾害频率增加。因此,提高作物耐冷性在维护农业高产稳产、农业可持续性发展,保障国家粮食安全方面具有越来越重要的作用。目前,关于耐冷功能基因方面,从渗透调节物质、抗冻蛋白、脂肪酸去饱和和代谢关键酶、抗氧化酶类基因等通过基因工程手段已取得一定的进展。但植物耐冷性大多是受多基因控制的数量性状,而目前通过基因工程手段获得的转基因植物大多是转单基因的,也有少量转双基因的,转基因植株耐冷性的增强幅度有限,今后应趋向于转入多个相关基因的系统研究,以获得理想的耐冷植株。当前,同时转化多个基因的技术还不成熟,有待进一步深入研究。

另外,转基因植株的耐冷性鉴定大多是在室内可控条件下进行的,而田间自然冷害与室内模拟冷害有所不同,在室内条件下表现耐冷性的转基因植株在田间条件下可能未必具有耐冷性。因此,在室内进行转基因植株耐冷性鉴定的基础上,还应进一步在田间进行,以确定转基因植株的耐冷性。需说明的是,组成型强启动子驱动耐冷目的基因在提高转基因植株耐冷性的同时,也会使植株出现矮化、发育不良等,可能会影响作物的产量,在今后研究及应用中使用胁迫诱导型启动子驱动耐冷目的基因,应考虑在提高转基因植株耐冷性的同时,不能影响植株的正常生长发育。

参考文献:

- [1] Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Letter, 1999, 461 (3): 205 – 221.
- [2] Hur J, Jung K H, Lee C H, et al. Stress – inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice [J]. Plant Science, 2004, 167 (3): 417 – 426.
- [3] Gleeson D, Lelu – Walter M, Parkinson M. Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea* Dengler) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost [J]. Molecular Breeding, 2005, 15 (1): 21 – 29.
- [4] Niu X G, Xiong F J, Liu J, et al. Co – expression of ApGSMT and ApDMT promotes biosynthesis of glycine betaine in rice (*Oryza sativa* L.) and enhances salt and cold tolerance [J]. Environmental and Experimental Botany, 2014, 104: 16 – 25.
- [5] Hayashi H, Alia, Mustardy L, 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 (1): 133 – 142.
- [6] Sakamoto A, Valverde R, Alia, et al. Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants [J]. Plant J, 2000, 22 (5): 449 – 453.
- [7] Sakamoto A, Murata A N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38 (6): 1011 – 1019.
- [8] Zhang X Y, Liang C, Wang G P, et al. The protection of wheat plasma membrane under cold stress by glycine betaine overproduction [J]. Biologia Plantarum, 2010, 54 (1): 83 – 88.
- [9] Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2002, 99 (25): 15898 – 15903.
- [10] Jang I C, Oh S J, Seo J S, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose – 6 – phosphate synthase and trehalose – 6 – phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress – tolerance without stunting growth [J]. Plant Physiol, 2003, 131 (2): 516 – 524.
- [11] Li H W, Zang B S, Deng X W, et al. Overexpression of the trehalose – 6 – phosphate synthase gene *OsTPSI* enhances abiotic stress tolerance in rice [J]. Planta, 2011, 234 (5): 1007 – 1018.
- [12] 王关林, 李铁松, 方宏筠, 等. 番茄转果聚糖合酶基因获得抗寒植株 [J]. 中国农业科学, 2004, 37 (8): 1193 – 1197.
- [13] Kawakami A, Sato Y, Yoshida M. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance [J]. J Exp Bot, 2008, 59 (4): 793 – 802.
- [14] Song J, Liu J, Weng M L, et al. Cloning of galactinol synthase gene from *Ammopiptanthus mongolicus* and its expression in transgenic *Photinia serrulata* plants [J]. Gene, 2013, 513 (1): 118 – 127.
- [15] Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. A carrot leucine – rich – repeat protein that inhibits ice recrystallization [J]. Science, 1998, 282 (5386): 115 – 117.
- [16] Wallis J G, Wang H Y, Guerra D J. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35 (3): 323 – 330.
- [17] 黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鳞抗冻蛋白基因 *afp* 导入番茄的研究 [J]. 生物化学杂志, 1997, 13 (4): 418 – 422.
- [18] 郭丽琼, 林俊芳, 熊 盛, 等. 抗冷冻蛋白基因遗传转化草菇的研究 [J]. 微生物学报, 2005, 45 (1): 39 – 43.
- [19] 王 艳, 邱立明, 谢文娟, 等. 昆虫抗冻蛋白基因转化烟草的抗寒性 [J]. 作物学报, 2008, 34 (3): 397 – 402.
- [20] Meyer K, Keil M, Naldrett M J. A leucine rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity [J]. FEBS Letters, 1999, 447 (2/3): 171 – 178.
- [21] Fan Y, Liu B, Wang H, et al. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants [J]. Plant Cell Reports, 2002, 21 (4): 296 – 301.
- [22] Zhang C, Fei S Z, Arora R, et al. Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance [J]. Planta, 2010, 232 (1): 155 – 164.
- [23] Deng L Q, Yu H Q, Liu Y P, et al. Heterologous expression of antifreeze protein gene *AnAFP* from *Ammopiptanthus nanus* enhances cold tolerance in *Escherichia coli* and tobacco [J]. Gene, 2014, 539 (1): 132 – 140.
- [24] Warren G J, Thorlby G J, Knight M R. The molecular biological approach to understanding freezing – tolerance in the model plant, *Arabidopsis thaliana* [J]. Environmental Stressors and Gene Responses, 2000, 1: 245 – 258.
- [25] Lyons J M. Chilling injury in plants [J]. Annual Review Plant Physiology, 1973, 24 (1): 445 – 466.
- [26] Murata N, Lshizaki – Nishizawa O, Higashi S, et al. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants [J]. Nature, 1992, 356 (23): 710 – 713.
- [27] 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]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1998, 95 (24): 14570 – 14575.
- [28] Cyril J, Powell G L, Duncan R R, et al. Changes in membrane polar

- lipid fatty acids of seashore paspalum in response to low temperature exposure[J]. *Crop Science*, 2002, 42(6): 2031–2037.
- [29] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 植物抗冷性分子生物学研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2000, 8(1): 70–80.
- [30] Yokoi S, Higashi S I, Kishitani S, et al. Introduction of the cDNA for shape *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4(3): 269–275.
- [31] Ariizumi T, Kishitani S, Inatsugi R, et al. An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings[J]. *Plant Cell Physiology*, 2002, 43(7): 751–758.
- [32] Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, et al. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1994, 105(2): 601–605.
- [33] Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi T, et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107(4): 1177–1185.
- [34] Khodakovskaya M, McAvoy R, Peters J, et al. Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast ω -3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter[J]. *Planta*, 2006, 223(5): 1090–1100.
- [35] Gibson S, Arondel V, Iba K, et al. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(4): 1615–1621.
- [36] 刘锦学, 王茂华, 向俊蓓. 甘蓝型油菜 *BnFAD8* 基因编码序列的克隆和表达谱分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2011, 48(3): 697–702.
- [37] Kwon J H, Lee Y M, An C S. cDNA cloning of chloroplast omega-3 fatty acid desaturase from *Capsicum annuum* and its expression upon wounding[J]. *Mol Cells*, 2000, 10(5): 493–497.
- [38] Wakita Y, Otani M, Hamada T, et al. A tobacco microsomal ω -3 fatty acid desaturase gene increases the linolenic acid content in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*)[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(3): 244–249.
- [39] Yu C, Wang H S, Yang S, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(11/12): 1102–1112.
- [40] Reddy A S, Nuccio M L, Gross L M, et al. Isolation of a Δ^6 -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(2): 293–300.
- [41] Vigh L, Los D A, Horváth I, et al. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1993, 90(19): 9090–9094.
- [42] Los D A, Ray M K, Murata N. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Mol Microbiol*, 1997, 25(6): 1167–1175.
- [43] Orlova I V, Serebriiskaya T S, Popov V, et al. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants[J]. *Plant Cell Physiology*, 2003, 44(4): 447–450.
- [44] Ma J Z, Liu D, Tang P S. Cloning of spinach *SAD* gene, its construction and transformation to tobacco[J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(2): 814–823.
- [45] Vega S E, del Rio A H, Bamberg J B, et al. Evidence for the up-regulation of stearoyl-ACP (Δ^9) desaturase gene expression during cold acclimation[J]. *American Journal of Potato Research*, 2004, 81(2): 125–135.
- [46] McKersie B D, Chen Y, de Beus M, et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(4): 1155–1163.
- [47] Duan M, Feng H L, Wang L Y, et al. Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(9): 867–877.
- [48] Shin S Y, Kim I S, Kim Y S, et al. Ectopic expression of *Brassica rapa* L. MDHAR increased tolerance to freezing stress by enhancing antioxidant systems of host plants[J]. *South African Journal of Botany*, 2013, 88: 388–400.
- [49] Airaj H E, Gest N, Truffault V, et al. Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 86: 502–510.
- [50] Shu D F, Wang L Y, Duan M, et al. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast glutathione reductase enhances susceptibility to chilling stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(10): 1228–1237.
- [51] Hegedüs A, Erdei S, Janda T, et al. Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress[J]. *Plant Science*, 2004, 166(5): 1329–1333.
- [52] Kumar S, Asif M H, Chakrabarty D, et al. Expression of a rice lambda class of glutathione S-transferase, OsGSTL2, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 248/249: 228–237.
- [53] Imai R, Chang L, Ohta A, et al. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1996, 170(2): 243–248.
- [54] Checker V G, Chhibbar A K, Khurana P. Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress[J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(5): 939–957.
- [55] 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]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1996, 93(23): 13404–13409.
- [56] Chen L, Zhong H, Ren F. A novel cold-regulated gene, *COR25*, of *Brassica napus* is involved in plant response and tolerance to cold stress[J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(4): 463–471.
- [57] Wu L, Zhou M Q, Shen C, et al. Transgenic tobacco plants overexpressing cold regulated protein CbCOR15b from *Capsella bursa-pastoris* exhibit enhanced cold tolerance[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(14): 1408–1416.

宋榕洁,唐艳葵,陈玲,等.超富集植物对镉、砷的累积特性及耐性机制研究进展[J].江苏农业科学,2015,43(6):6-10.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.002

超富集植物对镉、砷的累积特性及耐性机制研究进展

宋榕洁,唐艳葵,陈玲,王生业,李坤

(广西大学环境学院,广西南宁 530004)

摘要:超富集植物以其超强的重金属耐性和富集能力而成为近年来植物修复领域的研究热点,然而目前关于超富集植物对重金属的吸收累积特性及耐性机制仍须要进一步研究。为了解超富集植物对镉(Cd)、砷(As)的累积特性及耐性机制,总结了国内外相关研究成果,分别从细胞、亚细胞、分子水平 3 个层面对镉、砷在超富集植物体内的分布特性及机制研究进展进行阐述,分析了超富集植物对镉、砷的耐性机制,提出了该领域的研究目前存在的问题及今后发展的方向。

关键词:超富集植物;镉;砷;累积;耐性;研究进展

中图分类号:X173 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)06-0006-05

近年来,重金属污染的植物修复技术受到了广泛关注,被誉为廉价的“绿色修复技术”。超富集植物是指能够超量吸收和累积重金属、并能将其转移到地上部的植物,吸收量比一般植物高 100 倍以上,且不影响植物的正常生理活动^[1-2]。超富集植物的这一特性在清除土壤或水体环境中的重金属污染方面表现了巨大潜力,从而引起学术界广泛的关注和研究^[3]。然而,目前关于超富集植物的研究多数集中在超富集植物对重金属的吸收、迁移、分布等方面,对重金属的耐性及

富集机制仍没有定论,且相关的报道较少,从而限制了超富集植物的实际应用^[4-5]。因此,对这方面的研究工作进行系统的总结,对植物修复的发展和大规模应用具有重要的实践意义^[6]。与其他重金属相比,镉迁移能力强,极易在植物体内累积,从而进入食物链产生毒害作用;而砷在土壤中主要以砷酸盐形态存在,该形态的砷很容易被植物吸收和转运,极微量的砷即可引起中毒症状。目前对砷超富集植物的研究较少,因此本文以镉、砷为例,在总结国内外相关研究成果的基础上,综述了超富集植物对镉、砷的累积特性及耐受机制,并对今后的发展趋势进行了展望^[7]。

1 植物对重金属胁迫的响应分类

当植物受到重金属胁迫时,不同的植物会产生不同的效应。根据植物对重金属的吸收累积及耐受能力的不同,可将植物分为 4 大类:敏感植物(能够吸收和运输重金属,且表现出明显的毒性症状,见图 1-A)、耐受排斥植物(能够阻止重

收稿日期:2014-06-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:51168001);广西研究生教育创新计划(编号:YCSZ2014028)。

作者简介:宋榕洁(1988—),女,河南郑州人,硕士研究生,主要从事环境污染控制及修复研究。Tel:(0731)64902506;E-mail:18376762737@163.com。

通信作者:唐艳葵,博士,教授,主要从事环境修复及环境友好材料的研发工作。E-mail:tangyankui101@163.com。

[58] Yin Z M, Trorat T, Szabala B M, et al. Expression of a *Solanum sogarandinum* SK3 -type dehydrin enhances cold tolerance in transgenic cucumber seedlings[J]. Plant Science, 2006, 170(6): 1164-1172.

[59] Hoi J W S, Beau R, Latgé J P. A novel dehydrin-like protein from *Aspergillus fumigatus* regulates freezing tolerance[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(3): 210-216.

[60] Guo S J, Zhou H Y, Zhang X S, et al. Overexpression of *CaHSP26* in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PS II and PS I during chilling stress under low irradiance[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(2): 126-136.

[61] Li D D, Tai F J, Zhang Z T, et al. A cotton gene encodes a tonoplast aquaporin that is involved in cell tolerance to cold stress[J]. Gene, 2009, 438(1-2): 26-32.

[62] Qiao J B, Mitsuhashi I, Yazaki Y, et al. Enhanced resistance to salt, cold and wound stresses by overproduction of animal cell death suppressors Bcl-xL and Ced-9 in tobacco cells - their possible contribution through improved function of organelle[J]. Plant Cell Physiology, 2002, 43(9): 992-1005.

[63] Thorlby G, Fourrier N, Warren G. The sensitive to freezing 2 gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a beta-glucosidase[J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 2192-2203.

[64] Komori T, Imaseki H. Transgenic rice hybrids that carry the *Rf-1* gene at multiple loci show improved fertility at low temperature[J]. Plant, Cell and Environment, 2005, 28(4): 425-431.

[65] Xu Z Y, Zhang X, Schläppli M, et al. Cold-inducible expression of *AZII* and its function in improvement of freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(13): 1576-1587.

[66] Zhang J, Li J Q, Wang X C, et al. *OVPI*, a vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(1): 33-38.

[67] Zhou B, Deng Y S, Kong F Y, et al. Overexpression of a tomato carotenoid ϵ -hydroxylase gene alleviates sensitivity to chilling stress in transgenic tobacco[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 70: 235-245.