

植物抗寒及其基因表达研究进展

曹 琴¹, 孔维府^{2*}, 温鹏飞¹

(1. 山西农业大学园艺学院, 山西 太谷 030801; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要:植物经过逐渐降低的温度从而提高抗寒能力,这个过程被人们称为低温驯化。植物低温驯化过程是一个复杂的生理、生化和能量代谢变化过程,这些变化主要包括膜系统的稳定性、可溶性蛋白的积累和小分子渗透物质,比如脯氨酸、糖等,这些变化中的一些是植物抗寒必需的,而另外一些变化不是必需的。主要对冷害和低温生理生化变化、低温诱导表达基因的功能和作用、低温驯化的调节机制及其信号转导方面进行了综述。

通过差别筛选 cDNA 文库的方法已经鉴定了许多低温诱导表达、进而提高植物抗寒能力的基因,其中有脱水素、COR 基因和 CBF 1 转录因子等。低温信号的感受、转导和调节表达是低温驯化的关键环节,低温信号的转导过程与干旱胁迫之间具有一定的交叉,这为利用 ABA 等来提高植物抗寒能力成为可能,相信不久的将来人们可以通过提高植物抗寒能力从而增加经济产量成为现实。

关键词:植物; 抗寒性; 基因表达; 低温驯化

Plant freezing tolerance and genes express in cold acclimation: a review

CAO Qin¹, KONG Wei-Fu^{2*}, WEN Peng-Fei¹ (1. Institute of horticulture, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, Shanxi; 2. College of Ageonomy and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100094, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 806~811.

Abstract: In plants, freezing tolerance increases upon exposure to low temperatures, which is known as cold acclimation. Cold acclimation in plants is a complex process involving physiological, biochemical and energetic changes. These include membrane stabilization, the accumulation of soluble proteins, and small penetrable molecules such as proline, sugars and etc. Some of these changes are essential for plants to survive freezing temperature, whereas the others are not. Recent advances in understanding the physiological and biochemical changes upon freezing injury and exposure to low temperature, characterization and functions of low-temperature-induced genes, and the mechanisms including gene regulation by low temperature and signal transduction are reviewed.

By differential-screening cDNA library, many genes that are induced by low temperature to improve freezing tolerance in plants have been identified and characterized, such as dehydrins, COR genes and CBF1 factor. The sensing, transduction and the regulation of cold signals are the key stages in cold acclimation. There are also come cross-talks between cold acclimation and drought stress in signal transduction, which makes it a potential application to use ABA to increase plant freezing tolerance. In near future, plant productivity may be increased by improving freezing tolerance.

Key words: plant; freezing tolerance; genes expresl; cold acclination

文章编号:1000-0933(2004)04-0806-06 中图分类号:Q945 文献标识码:A

低温是影响植物生长、发育及其地理分布的一个重要生态因子。温带植物在秋末冬初感受逐渐下降的外界温度,体内发生一系列生理生化变化,产生适应性反应,提高对冬季低温的抵抗能力的过程被称作低温驯化(Cold acclimation, CA)^[1]。植物低

基金项目:山西省科委资助项目(991008);山西省教育厅科技资助项目(2002002)

收稿日期:2003-01-10;修订日期:2003-11-16

作者简介:曹 琴(1963~),女,硕士,副教授,主要从事果树生理生态学研究。

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: kongwf@eyou.com

Foundation item: Committee of science and technology, Shanxi Province(No. 991008); Department of Education, Shanxi Province(No. 2002002)

Received date: 2003-01-10; **Accepted date:** 2003-11-16

Biography: CAO Qin, Master, Associate professor, mainly engaged in fruit physiology and ecology.

温驯化包括许多生理生化反应,如蔗糖、甜菜碱、脯氨酸等的增加,脂膜变化,蛋白表达等。日益增加的证据表明,植物抗寒的生理生化变化是通过低温改变基因表达而引发的,而且已经克隆了许多相关的基因^[2]。通过转基因方法验证其中一部分确实可以改变植物体内生理生化反应,提高植物的抗寒能力。

“低温”信号传入细胞、启动或阻遏基因表达需要一个复杂的信号系统,其中包括 Ca^{2+} 、ABA、蛋白磷酸化酶、蛋白激酶和一些转录因子等。从第一个低温诱导基因被分离^[3]到现在不到 20a 的时间已经分离了许多相关基因,也得到适应低温的许多突变体和转基因植物,但要真正弄清植物抗寒的机理还需要大量的研究工作。

1 冷冻伤害及低温驯化植物生理生化变化

研究表明,植物冷害首先发生在细胞膜系统^[1,4]。已经证明:膜系统损伤首先是冷冻引发的严重脱水所致^[4,5]。低温引起植物胞外或胞内结冰,由于胞外空间冰点较高且有一些灰尘或冰核细菌作冰核,所以胞外先于胞内形成冰晶。冰晶溶液比液态溶液的水势低得多,并且温度越低水势差值越大,因而胞内的水分通过质膜流出,导致细胞严重脱水^[6]。

脱水会对细胞产生多种伤害,包括膜的结构和功能。脱水后升温,原生质迅速膨胀而裂解(embaspion-induce-lysis);脂分子双层被破坏,一部分膜脂疏水头部聚在一起形成直径 2nm 的六角堆积结构体(lamellar-to-hexagonal- II phase transitions, Hex II);在经低温驯化的原生质中,可以观察到膜片跳跃(fracture-jump lesion, Fjl),可能是由于质膜与其他细胞膜,尤其叶绿体被膜融合而引起。但是不清楚为什么 Hex II 损伤只发生在没有驯化的细胞中,而 Fjl 则在低温驯化细胞中广泛存在,而且在许多植物中都能发现^[14 15]。此外,由于低温诱导而产生活性氧也能损伤膜的结构,胞外形成的冰晶刺伤细胞壁或细胞膜引起细胞的破裂^[15]。这些均使质膜失去渗透反应能力^[4]。

另外,低温还会使蛋白质变性^[53],冷敏感水稻细胞液泡膜 ATP 酶等酶活性降低,而质膜 ATP 酶活性变化小^[54]。

比较低温驯化与不驯化或具有不同驯化能力植株的代谢变化和结构组分是研究植物抗寒能力的重要方法。通过比较发现低温驯化过程中有许多生理生化变化(见图 1)^[7]。但在如此多的变化中,很难区分哪些变化使植物产生了抗寒能力。因此,植物抗寒性是一个数量性状^[7,11]。例如自由脯氨酸含量的变化,番茄积累脯氨酸的体细胞突变体中,脯氨酸积累与其抗寒性提高一致^[8],4 C 驯化野生型拟南芥植株,脯氨酸增加 10 倍,这充分说明了脯氨酸在植物抗寒中的作用。但是拟南芥低温驯化中脯氨酸水平的增加却发生在抗寒性提高之后^[9],还发现有一些突变体与不驯化的野生株一样具有很低的脯氨酸水平,但是却具有抗寒能力^[7]。同样,植物在低温驯化过程中糖、甜菜碱、氨基酸(如 γ -氨基丁酸)^[10]等渗透物质、可溶性蛋白、膜脂组分与结构变化等与抗寒性的关系均没有定论,因此 Wanner 等^[9]推测在植物低温驯化是所发生的生理生化变化中,一些是提高抗寒性必需的,而另外一些不是必需的,可能仅仅是低温的结果。

2 植物低温驯化诱导的基因及其作用

植物的抗寒性是长期进化的结果。当外界温度下降时,植物感受低温信号,引起许多基因表达的变化。

在过去 20a 中,利用差别筛选 cDNA 文库的方法鉴定了许多冷诱导基因,并通过转基因的方法推断其作用。由于模式植物的应用,筛选突变体和转基因植物成为重要的研究方法。在分离的众多基因中有一些编码具有催化功能的蛋白,如乙醇脱氢酶^[12]、苯丙氨酸解氨酶、花青苷合成酶^[13]、脂肪酸不饱和酶^[50]、过氧化氢酶^[51]、 Δ -吡咯啉-5-羧基合成酶^[52],还有一些与脱水素和 LEA 蛋白类似的蛋白质、抗冻蛋白、热激蛋白和分子伴侣等;一些编码参与信号转导和调节过程的蛋白质,如分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)^[17,18]、钙依赖蛋白激酶(CDPK)^[19]和 CRT 结合因子 CBF1(结合在重复序列 CRT 启动冷调节基因表达的转录因子)^[20]等。

质膜组成与抗寒性关系密切^[21]。低温下植物不饱和脂肪酸增加,并且质膜中磷脂含量及其与蛋白比值也发生变化^[22],检测 74 种植物抗寒性与反式单不饱和和磷脂酸的含量显著相关^[24]。Murata 等^[25]把冷敏感南瓜和抗寒拟南芥中编码甘油-3-磷酸酰基转移酶的基因转移到不抗寒的烟草中,发现转入拟南芥基因的烟草具有抗寒力,而转入南瓜基因的不抗寒。这种差异的造成是由于拟南芥磷脂酰甘油熔点较低,而相比之下南瓜的磷脂酰甘油熔点较高所致,有力的证明了质膜中不饱和和磷脂酸含量的增加有助于提高质膜的流动性,从而提高植物的抗寒性。但 Wu 等^[26]研究表明:质膜由高熔点磷脂酰甘油组成的拟南芥突变体,仍具有抗寒能力,与上述论点相反,这表明植物的抗寒性与磷脂酰甘油组成的关系不是那么简单的。

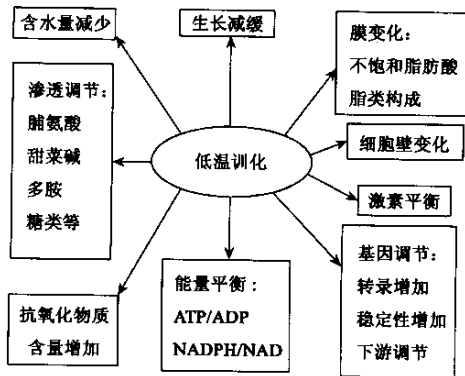


图 1 植物在低温驯化过程中的物质和变化^[7]

Fig.1 Material and energetic changes during plant cold acclimation^[7]

脱水素基因定位和禾本科植物抗寒研究表明:脱水素是抗脱水胁迫的重要组成部分之一^[27]。在柑橘上克隆了 6 个低温诱导的 cDNA, 其中 pBCORc115、pBCORc119 分别编码 19.8 kDa (COR19) 和 11.4 kDa (COR11) 的蛋白, 和柑橘低温诱导的 CuCOR19^[28] 的氨基酸序列中都含有赖氨酸丰富区, 具有很高的亲水性, 与棉花脱水素 D-11 和 Group2 LEA 蛋白结构相似^[29]。在低温驯化和水分胁迫时, 菠菜 CAP85 蛋白及其基因转录增加, 序列分析表明, CAP85 蛋白也具有赖氨酸丰富区, 并与 Group2 LEA 蛋白相似的结构和性质^[30]。在低温和 ABA 处理的拟南芥中发现与鱼抗冻蛋白相似的基因产物^[31]。Guy 等^[32] 在低温驯化的菠菜叶片、叶柄、下胚轴、根和柑橘叶片中均发现 CAP160、CAP85 蛋白积累, 并且菠菜和柑橘中 CAP160 的分子量和等电点很接近, 表明没有亲缘关系的植物能合成相同的抗寒蛋白质。但是, 将 35S 启动子连接的 CAP160 和 CAP85 基因转入烟草, 低温处理后, 却与野生烟草无差异, 电解质渗透率改变很少, 说明这两个低温诱导蛋白的异体表达对植物抗寒能力提高很小^[33]。Takahashi 等^[34] 也通过脱水和低温处理从水稻中筛选出 9 个 cDNA 克隆, 其中 WIS18 蛋白与 LEA 蛋白 N 末端有相同的保守序列, C 末端有丙氨酸和赖氨酸丰富区。

Artus 等^[35] 研究表明: COR15a 基因表达的蛋白质具有保护叶绿体和原生质的作用。COR15a 蛋白定位在叶绿体基质中, 有一个区域形成 α -螺旋具有亲水性, 可通过改变叶绿体内被膜的折叠来推迟六角堆积结构体 (Hex II) 的形成而起作用。但通过转入 COR15a 基因后, 植株的抗寒力未能显著提高, 这表明 COR15a 蛋白对提高抗寒性作用不大^[22]。同样, 转入其他转基因的植株抗寒性也没有大幅度的变化。Umeda 等分析饥饿、盐、低温等逆境条件下, 参与 ATP 形成过程中酶的基因的 mRNA 水平, 发现磷酸丙糖异构酶、丙酮酸激酶、琥珀酰 CoA 合成酶和琥珀酸脱氢酶含量增加^[36], 促进 ATP 和 GTP 的形成, 这对于维持植物体内能量平衡, 进而提高植物的抗寒能力具有重要的作用。

转录激活因子 CBF1 的转基因株也证明了这一种假设。CBF1, 又称 DREB1B (干旱转录元件的结合因子), 是结合在重复序列 CRT (AAGAC) 启动冷调节基因表达的转录因子。常温下转 CBF1 基因的拟南芥经低温驯化后 COR 基因完全表达, 用离子渗漏方法分析发现不驯化的转基因植株比对照 (不转基因植株) 抗寒性提高 3.3 °C^[37]。其抗寒性增强幅度显著高于过量表达 COR15a 基因的植株抗寒性增强幅度, 表明 CBF1 和 CBF1 介导的冷诱导基因在提高抗寒性中起重要作用。综上所述, 可以认为: 抗寒性是多基因作用的结果。

3 低温驯化的信号转导及其调控

植物低温驯化时, 从感受低温信号到发生一系列生理生化反应和调节基因表达, 进而产生抗寒能力, 存在一个复杂的信号网络系统。目前, 仍不清楚植物如何感知低温信号并传递低温信号到核内激活转录因子, 进而调节基因转录或引起一系列生理生化反应。生理生化和遗传学实验表明低温驯化的信号系统与其他逆境 (如干旱、高盐) 信号系统存在交叉性的信号物质和途径。因此, 可以认为植物体内存在一个平行的、多分支的信号网络调控植物抗寒性^[7]。

实验表明, 当植物经过低温驯化后, 胞质中 Ca^{2+} 迅速增加^[55], 同时诱导 Ca^{2+} 浓度增加的温度与低温驯化温度相同, 而且 Ca^{2+} 螯合剂和 Ca^{2+} 通道堵塞剂抑制 COR 基因表达, Ca^{2+} 的载体可以通过产生 Ca^{2+} 流而在常温下诱导 COR 基因表达^[57], 这表明细胞中 Ca^{2+} 的变化可能参与感受环境温度的变化, 参与低温信号转导。

证据表明, 植物内源激素 ABA 在低温驯化信号转导过程中起重要作用。生长温度 (22 °C) 下 ABA 处理可以增加包括拟南芥在内的许多植物的抗寒性; 低温驯化, 内源 ABA 含量迅速增加^[38,39]; ABA 缺陷型突变体 (aba-1) 经过低温驯化后抗寒能力削弱, 且外加 ABA 可以使其抗寒性恢复到野生植株的水平; ABA 不敏感突变体 (abi-1) 诱导 COR 基因表达, 但外源施用 ABA 不能产生低温驯化作用。这说明 abi-1 突变体中 ABA 的下游信号被切断, 而突变体 aba-1 中缺少的是 ABA 的上游信号; 低温和 ABA 处理均可以诱导 COR 基因表达^[40], 但是低温也诱导 ABA 缺陷型 (aba-1) 和不敏感突变体 (abi-1) COR 基因表达^[41,42], 推测可能在不依赖 ABA 的信号转导途径。实际上, 通过分析启动子序列知道 COR 基因启动子上游的 CRT/DRE 元件并不响应 ABA, 但 **芳芳数据** 元件, ABRE 响应于 ABA 而启动 COR 基因表达^[42]。

日益增加的证据表明蛋白激酶 (PK) 和蛋白磷酸化酶 (PP) 也参与低温驯化中的信号转导过程。通过同源序列分析和抗体

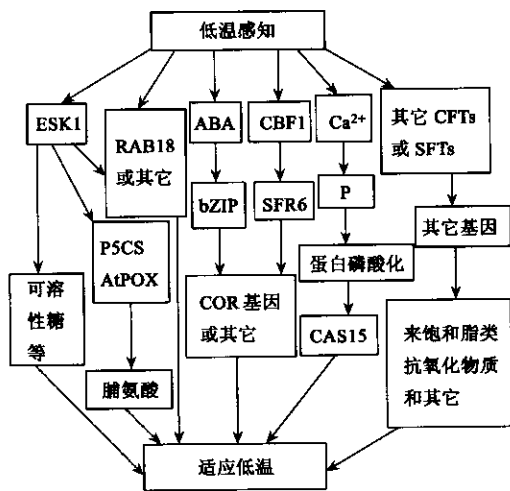


图 2 植物低温驯化信号转导的可能途径

(引自 Xin, Z^[7], 稍作修改)

Fig. 2 Signal transduction sketch during plant cold acclimation

(see Xin Z. ^[7])

识别实验,已经分离出响应低温的 PK。使用 PK 抑制剂(星形孢菌素)可以抑制低温对 CAS15 基因的诱导表达,而在 25℃ 时,PP 抑制剂(冈田酸)可以诱导 CAS15 基因表达。而低温降低蛋白磷酸酶(PP2A)活性是依赖 Ca^{2+} 流的,这表明可能低温引发 Ca^{2+} 流,降低 PP2A 的活性,蛋白质发生磷酸化从而诱导 CAS15 基因的表达^[43,44]。

实验表明^[46]紫苜蓿经低温处理 10min 后即可激活一种分裂原激活的蛋白激酶 p44^{MMK4}(MAPK),20min 后转录水平增加;而 MMK2 和 MMK3 不被激活,表明低温激活蛋白激酶的特异性。拟南芥 S6 核糖体蛋白激酶(一种 MAPK),低温、机械刺激和脱水处理均可诱导其表达^[46]。拟南芥经低温处理也积累钙依赖蛋白激酶(CDPK),它的信号途径需要进一步研究^[47]。

4 基因表达的转录水平调节

使用遗传学方法,如把冷调节基因 COR78(RD29)的启动子与报告基因(如荧光素酶基因)融合后转入植物,经低温诱导检测报告基因的表达,同时发现 COR78 启动子上游具有低温、干旱和 ABA 的响应元件(这种方法也是研究低温、干旱和 ABA 等的信号过程的重要方法)。已经鉴定了一百多个可以改变荧光素酶活性的转基因突变体,其中包括组成型(cos)、缺失型(los)和诱导超表达型(hos)。

有几个 COR 基因 5'端调节区的几个 NDA 序列,如 CRT、DRE、ABRE 已经被鉴定,并且已经克隆了一些结合在这些元件上的转录因子,这些转录因子属于小基因家族,其中包括 3 个成员 CBF1、CBF2、CBF3(其基因正向串联排列在拟南芥 4 号染色体上),这 3 个转录本在驯化 15min 后迅速增加,再过 3 个 h CBF1 介导的 COR 基因表达^[37-49]。

其中存在一个组成型(不用驯化)表达抗寒物质的信号途径来提高植物的抗寒性。组成型抗寒突变体 esk1 中积累高浓度的脯氨酸,但是不恒定表达 COR 基因。在 esk1 突变体中脯氨酸积累由△-吡咯嗉-5-羧基合成酶和脯氨酸氧化酶共同作用完成,表明 ESK1 是信号或调节组分,既然 esk1 突变体中有 COR 基因表达,一定存在第 3 条信号途径。

存在几个 cft 突变体既不积累脯氨酸,又不激活 COR 基因,所以一定还有另外的信号途径。在每个组成型抗寒突变体中,可能只有一条或一部分信号途径被激活,从而获得一部分抗寒性。分析不能进行完全驯化的 sft 突变体,也得到相同的结论^[49]。许多 sfr 突变体具有 50%的驯化能力,推测其只有一条或一部分信号途径被阻塞,因此每个突变体仍可通过未被阻塞的信号途径产生部分驯化能力,这些基因的克隆和转化将为驯化抗寒过程中的信号转导途径的完善提供更多的资料。

5 基因表达的转录后调节

真核生物的转录水平和转录后调节是性状表现的重要手段,在驯化提高抗寒性中这种调节方式也很重要。用核连缀转录分析大麦茎尖 9 个 COR 基因的低温调节过程,发现其中 3 个主要是转录后调节表达的^[57]。而据^[58]报道 4 个拟南芥冷诱导基因中有 3 个是转录加工后才起作用的。

6 展望

目前植物抗寒能力的研究主要集中在脂膜、可溶性蛋白和小分子渗透物质等方面。近 20a 来分子生物学迅猛发展,在低温驯化提高抗寒能力研究上的应用也日益加强,但是总体来讲,利用分子生物学技术方法进行低温驯化和植物抗寒能力的研究还很薄弱,主要表现在低温驯化基因的差别筛选还不系统全面;在研究植物感受低温方面还很欠缺,思路不够开阔,投入也不足;低温驯化诱导基因的转录和转录后的调控方面的研究也需要加强;对于木本植物,尤其园艺植物低温驯化及其抗寒能力的研究具有很高的经济价值。

植物,尤其温带植物,其抗寒性是长期进化的结果,是植物从细胞膜、细胞器的结构和功能到渗透物质、各种蛋白和能量代谢均发生改变,而表现出的系统性全方位适应。从第一次观察到植物细胞外结冰,到细胞内复杂的生理生化反应的研究;从第一个冷诱导基因的分离,到植物低温突变体和转基因植物应用,人们不断的追求和探索,现在更有分子生物学的迅猛发展为人们走出“假说”、“猜测”提供了有力工具,相信不久的将来,人们会对植物低温适应及其抗寒能力的提高有一个完整的认识。这些结果使人类了解植物的生态分布、确定其适合的生长区域,从而使植物经济产量的增加成为可能。

References:

- [1] Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Vol 1. 2nd edn. Academic Press,1980.
- [2] Hughes M A,Dunn M A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.*,1996, **47**:291~305.
- [3] Guy C L, Niemi K J, Brambl R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985,**82**:3673~3677.
- [4] Steponkus P L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*,1984,**35**:543~584.
- [5] Steponkus P L Uemura M,Webb M S. Membrane destabilization during freeze-induced dehydration. *Curr. Topics. Plant. Physiol.*,1993, **10**:37~47.
- [6] Guy C L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*,1990, **41**:18
- [7] Xin Z, Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell and Environment*,2000,**23**:893~902.

- [8] Delauney A J. Verma DPS Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, 1993,**4**:215~223.
- [9] Wanner L A, Junttila O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 1999,**120**:391~400.
- [10] Cholewa E,Cholewinski A J, Shelp B J, *et al.* Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^{+} . *Can. J. Bot.*, 1997,**75**:375~382.
- [11] Thomashow M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulation mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999,**50**:571~599.
- [12] Jarillo J A, Leyva A, Salinas J, *et al.* Low temperature induces the acclimation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. *Plant Physiol.*, 1993,**101**:833~837.
- [13] Leyva A, Jarillo J A, Salinas J, *et al.* Low temperature induces the acclimation of mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. *Plant Physiol.*, 1995, **101**:833~837.
- [14] 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. *Plant Physiol.*, 1994,**104**:467~478.
- [15] Uemura M, Joseph R A, Steponkus P L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.*, 1995, **109**:15~30.
- [16] Olien C R, Smith M N. Ice adhesions in relation to freeze stress. *Plant Physiol.*, 1977,**60**:499~503.
- [17] Jonak C, Kiegl S, Ligterink W, *et al.* Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996,**93**: 11274~11279.
- [18] Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, *et al.* A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996,**93**:765~769.
- [19] Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy A F, *et al.* The induction of kin genes in cold-acclimation *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta*, 1997, **203**: 442~447.
- [20] 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, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997,**94**: 1035~1040.
- [21] Steponkus P L, Uemura M, Joseph R A, *et al.* Mole of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998,**95**:14570~14575.
- [22] Palta J P, Whitaker B D, Weiss L S. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Physiol.*, 1993, **103**:793~803.
- [23] Xin Z, Browse J. *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998,**95**:7799~7804.
- [24] Roughan P G. Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plant. *Plant Physiol.*, 1985,**77**:740~746.
- [25] Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, *et al.* Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*, 1992, **356**:710~713.
- [26] Wu J, Browse J. Elevated levels of high-melting-point phosphatidylglycerols do not induce chilling sensitivity in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell*, 1995,**7**:17~27.
- [27] Close T J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant*, 1997, **100**:291~296.
- [28] Hara M, Wakasugi Y, Ikoma Y, *et al.* cDNA sequence and expression of a cold-responsive gene in Citrus unshiu. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999,**63**(2):433~437.
- [29] Cai Q, Moore G A, Guy C L. An unusual Group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Mol. Biol.*, 1995,**29**:11~23.
- [30] Neven L G, Haskell D W, Hofig A, *et al.* Characterization of a gene for spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Mol. Biol.*, 1993,**21**:291~305.
- [31] Kurkela S, Franck M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol. Biol.*, 1990, **15**:137~144.
- [32] Guy C L, Haskell D, Yelenosky G. Changes in freezing tolerance and polypeptide content of spinach and citrus at 5 C. *Cryobiology*, 1988, **25**:264~271.
- [33] Kaye C, Neven L, Hofig A, *et al.* Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. *Plant Physiol.*, 1998, **116**:1367~1377.
- [34] Takahashi R, Joshee N, Kitagawa Y. Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. *Plant Mol. Biol.*, 1994,**26**:339~352.
- [35] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996,**93**:13404~13409.
- [36] Umeda M, Hara C, Matsubayashi Y, *et al.* Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: a number of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol. Biol.*, 1994,**25**:469~478.
- [37] Jaglo-ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, *et al.* *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance.

Science, 1998, **280**: 104~106.

- [38] Chen H H, Li P H, Brenner M L. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol.*, 1983, **71**: 362~365.
- [39] Luo M, Liu J, Mohapatra S, *et al.* Characterization of a gene family encoding abscisic acid and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**: 15367~15374.
- [40] Kurkela S, Franck M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol. Biol.*, 1990, **15**: 137~144.
- [41] Koornneef M, Leon-Kloostezal K M, Schwartz S H, *et al.* The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 1998, **36**: 83~89.
- [42] Gilmour S J, Thomashow M F. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 1991, **17**: 1233~1240.
- [43] Monroy A F, Castonguay Y, Laberge S, *et al.* A new cold-induced Alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol.*, 1993, **102**: 873~879.
- [44] Monroy A F, Sangwan V, Dhindsa R S. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J.*, 1998, **13**: 653~660.
- [45] Jonak C, Kiegl S, Ligterink W, *et al.* Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**: 11274~11279.
- [46] Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, *et al.* A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**: 765~769.
- [47] Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy A F, *et al.* The induction of kin genes in cold-acclimation *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta*, 1997, **203**: 442~447.
- [48] Gilmour S J, Zarka 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. *Plant J.*, 1998, **16**: 433~442.
- [49] Warren G, McKown R, Marin A, *et al.* Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.*, 1996, **111**: 1011~1019.
- [50] Gibson S, Arondel V, Iba K, *et al.* Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3-desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 1994, **106**: 1615~1621.
- [51] Prasad T K, Anderson M K, Martin B A, *et al.* Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 1994, **6**: 65~74.
- [52] Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, *et al.* Correlation between the induction of a gene for delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal*, 1995, **7**: 751~760.
- [53] Guy C, Haskell D, Li Q B. Association of protein with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. *Cryobiology*, 1998, **36**: 401~414.
- [54] Kasamo K. Response of tonoplast and plasma membrane ATPases in chilling-sensitive and -insensitive rice (*Oryza sativa* L.) culture cells to low temperature. *Plant Cell Physiol.*, 1988, **29**: 1085~1094.
- [55] Polisensky D H, Braam J. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol.*, 1996, **111**: 1271~1279.
- [56] Monroy A F, Sarhan F, Dhindsa R S. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. *Plant Physiol.*, 1993, **102**: 1127~1135.
- [57] Dunn M A, Goddard N J, Zhang, *et al.* Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms. *Plant Molecular Biology*, 1994, **24**: 879~888.
- [58] Hajela R K, Horvath K P, Gilmour S J, *et al.* Molecular cloning and expression of COR (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 1990, **93**: 1246~1252.