

## 植物的低温蛋白

李跃强, 宣维健, 盛承发\*

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

**摘要:**综述了与植物耐冻性有关的一些植物内源蛋白质或多肽, 包括低温防护蛋白、抗冻蛋白、植物脱水素、膜关联耐冻性多肽蛋白质。结果表明, 植物的耐冻性与其低温蛋白 (cold induced proteins) 有着密切的关系, 并指出了抗冻蛋白行使功能的两种可能的作用方式。同时, 耐冻性与除低温外的其它环境胁迫因子的植物抗性如抗干旱、抗病虫、高盐耐性、乙烯耐性等密切相关。

**关键词:**植物多肽; 抗冻蛋白; 脱水素; 冰晶化

### The cold induced proteins in plants

LI Yue-Qiang, XUAN Wei-Jian, SHENG Cheng-Fa\* (*Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(5): 1034~1039.

**Abstract:** The endogenous polypeptides or proteins that are related to plant tolerance to low temperature, which include cryoprotective proteins, antifreeze proteins, dehydrins and membrane proteins, are reviewed in this paper. These material proteins could also be useful to drought resistance, pathogen and pest resistance, and salt resistance. The cryoprotective proteins could protect isolated thylakoids from plastocyanin release of membrane rupture caused by freeze, which have higher protective activity than sucrose. Antifreeze proteins (AFPs) are mainly located in apoplast and have the effects of thermal hysteresis, ice crystal modification and recrystallization inhibition. Some of them are pathogenesis-related proteins (PR). In winter rye, seven polypeptides accumulate in the apoplast of cold-acclimated leaves. They are glucanase-like AFPs (GLPs) with 35kDa, 32kDa, chitinase-like AFPs (CLPs) with 35, 28kDa, and thaumatin-like AFPs (TLPs) with 25, 16kDa. Dehydrins are D11 LEA proteins that could be induced by droughts as well as low temperatures and other stress factors. They are boiling-stable and have high conserved Y, S and K segments. Their roles may be serving as molecular chaperone to protect proteins and membranes from denaturation. The membrane-related proteins like GPATs and LTPs play great roles in membrane fluidity and then relate closely to the freeze tolerance of plants. The results showed that plant cold-induced proteins are intimately responsible for plant freeze tolerance. Two modes of the functioning of antifreeze proteins are pointed out in this paper. Many methods and techniques for studying plant cold induced proteins are introduced briefly. We propose that plant resistance to low temperature may result from the total effects of the four types of cold induced proteins of cryoprotective proteins, antifreeze proteins, dehydrins and membrane related proteins, together. In the beginning of cold stress, cell cytoplasm membrane senses stress signal by putative sensor proteins located on cell cytoplasm membrane. The cells synthesize membrane-related proteins like GPATs to maintain membrane fluidity. The initial resistance or adaptation to low temperature is formed. Along with the increase of cold stress, plant synthesizes cryoprotective proteins to maintain the temporary stability of membrane from the rupture. If temperature goes to an even lower status, plants initiate to synthesize antifreeze proteins. These proteins could prevent cells from ice crystallization by the effective function of thermal hysteresis effect, ice crystal modification effect and recrystallization inhibition effect. When temperature is very far below 0°C and ice crystals have been formed intercellularly or intracellularly in plant cells, some amounts of water flow outside from cells, which result in cell

**基金项目:**中国科学院知识创新工程领域前沿资助项目 (KSCX3-IOZ-04); 国家自然科学基金会优秀中青年人才专项基金资助项目 (39221001)

**收稿日期:** 2003-07-24; **修订日期:** 2003-11-20

**作者简介:** 李跃强 (1968~), 男, 河南伊川人, 博士, 主要从事生理学和分子生态学研究。

\* 通讯作者: Author for correspondence. E-mail: shengef@panda.ioz.ac.cn

**Foundation Item:** CAS Innovation Program (No. KSCX3-IOZ-04) and National Natural Science Foundation of China (No. 39221001)

**Received date:** 2003-07-24; **Accepted date:** 2003-11-20

**Biography:** LI Yue-Qiang, Ph. D., mainly engaged in physiology and molecular ecology.

desiccation. At this time plants synthesize dehydrins to protect macromolecules from denaturing, forming the last defense so as to make effect to survive. In ecology, we figure that the study of plant cold induced proteins has great importance in the field of plant-animal interaction if PR AFPs metabolism is well elucidated. The proper induction of defensins of cold-induced proteins could change the relationship between phytophagous animals and plants and then reduces the application of pesticides that have made great environmental pollution due to lavish use of toxin. Plant cold induced proteins may also be functioning in plants in animal taste and in the ecological distribution of plant community. Plants then affect the ecology of phytophagous animals, which includes reproduction, feeding, coupling and mating. In agriculture, plant acclimation and animal acclimation are critical in culture and the cold induced proteins relate the adaptive process. Plant cold proteins can also present clues to The Life Theory of Growth Redundancy in which plant plasticity due to growth reudundancy occupys a big part of important position. We think that the transformation of growth redundancy into proteins involved in cold resistance metabolism is the essence of plant adaptation, which is unique to living organisms in the world. We find that it is necessary for us to study further the mechanism of plant resistance to low temperature, especially the conditions of cold induction for resistance and the localization of induction and response. The relationship between the induction sites and responsive sites should be a study focus in the time of future.

**Key words:** plant polypeptides; antifreeze protein; dehydrins; crystallization

文章编号:1000-0933(2004)05-1034-06 中图分类号:Q51,Q946.1,Q948 文献标识码:A

地球也许是一个冷环境,其中许多生物会经常性地或周期性地经历低温逆境。在低温时,植物可以利用体内的一些已有蛋白质或新合成一些蛋白质,来维持常温下才能进行的一些新陈代谢。由于这些蛋白质或多肽在低温环境下表现活跃,对植物度过低温逆境具有重要作用,因此将这些蛋白质通称为植物低温蛋白(cold-induced proteins)。植物低温蛋白研究不仅是分子生物学研究的内容,也是生态学应当关注的内容。一个基因可以改变一个群体,一个蛋白也就可能改变一个生态系统。本文拟就这一问题进行综述。

### 1 低温防护蛋白(cryoprotective proteins)

多数植物在经历低温时蛋白质合成能力增强。在冷习惯植物中,蛋白质浓度的全面增加和蛋白质构成的变化表明蛋白质合成能力增强。总体蛋白质合成和基因表达的改变可以通过分析多核糖体群体的变化监测到。冬黑麦 5℃冷习惯后,叶中多核糖体(细胞质中和膜结合的)总量比对照植物增加 2.7 倍。含有 5 个以上核糖体的大多核糖体的比例在冷处理植物中比非处理植物中要高 63%<sup>[1]</sup>。这些结果表明在 25℃发育形成的冬黑麦叶片转入 5℃冷习惯条件后蛋白质合成增加。另一方面,蛋白质合成终止减少可以在低温下建起更多的大多核糖体。冬黑麦蛋白质合成装置的变化反映了植物在低温时的代谢调节,冬黑麦以此并通过增加多核糖体含量特别是与蛋白质合成有关的大多核糖体含量来保证冷处理头几天的生存。相应的已在低温下发育和生长 9~10 周的已充分冷习惯的黑麦叶片具有高的多核糖体含量并且大多核糖体形成增加<sup>[2]</sup>。

在体外冻融交替循环中加入从已冷习惯的菠菜和甘蓝叶片中提得的蛋白质,证明可以保护分离得类囊体不发生机械性膜破裂。这些蛋白质具有像蔗糖一样的冷保护(cryoprotection)活性,可以保护植物细胞及细胞器的暂时稳定性,不遭受分解、破裂等冷伤害影响,称为冷防护蛋白(cryoprotective proteins)。用体外标准实验证明,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的一个 *cor* 基因编码的基因产物,具有冷保护活性,可以降低冻融循环时质体蓝素(plastocyanin)从类囊体膜中释出的速度,并被提议在低温防护中有一定作用。有人使编码 COR15am 和 COR6.6 多肽的冷调节基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达并被纯化至几近纯<sup>[3]</sup>。没有其中一种蛋白质对冰冻或脱水胁迫期间的膜的低温稳定性有直接的低温保护效果<sup>[4]</sup>。然而用叶绿体荧光实验证明,编码叶绿体目标多肽的 COR15a 基因的组成型表达在体内可以增进非习惯植物叶绿体本身的耐冻性。最近,刚刚 Hinch 及其同事从经过冷习惯的甘蓝叶片中纯化出一个沸腾-稳定蛋白质(低温保护素),28.5kDa,并证明其冷保护活性与一个冷诱导的 7-kDa 糖蛋白有关。迄今为止,还没有分离到编码菠菜或甘蓝冷保护蛋白基因的报道<sup>[5]</sup>。

### 2 抗冻蛋白(antifreeze proteins)

Griffith 及其同事筛选到一个用来阐明冷诱导蛋白的鉴定、功能和定位的技术途径<sup>[6]</sup>。他们在冰发生的细胞间空隙寻找与耐冻性增加有关的蛋白质。蛋白质被从冷习惯冬黑麦叶片的质外体用细胞间冲洗技术提取得到,而这种技术已广泛用于植物病理学家从被病原侵入的植物中获得植物分泌型蛋白。从质外体分离的蛋白具有抗冻蛋白独有的两个特征,即,能修改冰晶正常生长的模式和压低水的结冰温度<sup>[7]</sup>。从而,质外体蛋白被命名为抗冻蛋白(AFPs)。在冷习惯冬黑麦的叶片质外体中发现有 7 种多肽<sup>[8]</sup>,其中 6 种多肽从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中洗出后表现出高的抗冻活性。用氨基末端序列比较、免疫交叉反应、酶活性分析后发现,这些多肽与 3 类病原相关蛋白相似,即内几丁质酶、内-β-1,3-葡聚糖酶和 *thaumatin-like* 蛋白<sup>[9]</sup>。两种 AFPs (35 和

32kDa) 像葡聚糖酶 (glucanase-like proteins, GLPs), 两种 (35 和 28kDa) 像几丁质酶 (CLPs), 两种 (25 和 16kDa) 像 rhaumatin (TLPs)。这些多肽的氨基酸构成很相似, 即它们相对富含 Asp/Asn, Glu/Gln, Ser, Thr, Gly 和 Ala; 它们都缺乏 His (除一个多肽外) 且含多至 5% 的 Cys 残基。分子量为 13kDa 的质外体小多肽只有很小的抗冻活性。该多肽可能除控制冰形成外在冷适应过程中可能有其他作用。实际上, 13kDa 质外体蛋白与大麦脂质转移蛋白有 80% 的相同序列, 暗示它可在细胞壁修饰的角质沉积中起作用。

在确定 AFP 也是植物内源产生蛋白之前, 许多研究都集中在将鱼 (南极鱼) AFP 转化入植物中以便提高植物耐冻性<sup>[10]</sup>。Cutler 等将冬季比目鱼 AFP 真空渗入土豆、canola 和 *A. thaliana* 的 (拟南芥) 叶片的细胞外空间。AFP 渗入后, 结冰温度稍微降低, 因此支持了将鱼 AFP 基因转入植物以调节耐冻性的可行性。Georges 等设计和克隆了一个冬季比目鱼 AFP 合成基因并用电穿孔方法将联合基因转入玉米原生质体。AFP 表达为氯霉素乙酰基转移酶蛋白 N 末端伸展部分, 但只有 25% 的蛋白被运往细胞的细胞外空隙。转基因番茄植物已被证明可在 mRNA 水平上表达 AFP 基因, 然而用冰重结晶抑制法检测时只在含有编码修剪葡萄球菌蛋白 A 和 AFP 联合蛋白的基因的转基因植物中检测有抗冻活性。最近证明鱼 AFP 和抗冻糖蛋白 (AFGP) 对菠菜类囊体膜有低温毒性<sup>[11]</sup>。Hincha 等认为 AFP 基因在转基因植物中表达可在冰冻期间造成严重的膜损害, 特别是蛋白质以叶绿体作为目标时。这些结果表明如果 AFP 用来保护质膜不受冰冻伤害, AFP 应当被分泌到转基因植物的细胞外间隙中。Wallis 等的实验也支持这一观点。他们用连有信号肽的合成 AFP 转化土豆, 指导蛋白质进入质外体; 用电极渗漏实验表明, 表达该 AFP 的转化子比野生型具有更大的冰冻抗性<sup>[12]</sup>。

冬黑麦在冷适应期间累积的质外体  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶具有抗冻活性且有酶活性。相反, 纯化的病原诱导烟草内几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶不表现出任何冰结合活性。这些结果暗示冬黑麦 AFP 是 PR-蛋白 (病原相关蛋白 pathogenesis-related proteins) 靠累积突变进化后才形成结合冰的能力。PR 蛋白 (病原相关蛋白 pathogenesis-related proteins) 也可以在植物中被其它与病原体无关的其他胁迫因子诱导合成, 如乙烯、紫外线、臭氧、高盐、热、植物性毒素金属和创伤。对这些发育或环境诱导的 PR 蛋白, 没有可定义的专一作用, 但有人提出具有普遍胁迫反应作用。PR 蛋白的低温诱导不仅在黑麦上有报道, 同时在大麦、bermuda 草、土豆、甘蓝和菠菜上也都有报道<sup>[13-14]</sup>。Antikainen 和 Griffith 检验了以前证明在病原或其他胁迫下能诱导产生 PR 或 PR 样蛋白质的耐冻和冰冻敏感双子叶植物和单子叶植物, 看低温处理是否可上诱导分泌蛋白质到质外体中<sup>[15]</sup>。他们证明对长期低温暴露, 并不是所有供试物质外体蛋白含量都增加。因此, 蛋白质分泌到质外体抗冻性升高不是一个普遍胁迫反应, 而仅仅是一个与谷物耐冻性相关联的更专一的反应。可以与冬黑麦 AFP 抗血清起交叉反应的多肽可在 Poaceae 科 *Triticum* 组植物的质外体中冷诱导累积证明了这一点。显然, 在单子叶和双子叶植物中的耐冻性包括着不同的蛋白质<sup>[16]</sup>。

有几种假设来描述冷适应植物质外体中 AFP 的作用:

第一, 这些 AFP 与构成细胞间空隙的表皮细胞和叶肉细胞有关联<sup>[7]</sup>。如果 AFP 不从细胞壁中释出, AFP 可以作为一个屏障阻止冰扩展进入植物或进入某个细胞。表皮 AFP, 连同角质化细胞壁和增加的角质外蜡质可能提供冰扩张和病原从植物外进入植物的屏障。进一步的, 与维管束周边细胞相关连的 GLP、CLP 可能在降低来自木质部的次级冰核化作用中很重要, 它们也阻止细胞的冰冻接进 (接种并进入)。GLP 在叶肉细胞细胞壁上的免疫金定位及木质部导管的次级增厚, 即面对细胞外冰形成位点支持 AFP 具有冰扩张屏障功能<sup>[17]</sup>。AFP 也存在于某些动物中。鱼皮肤含有 AFP, 可为冰接进提供一个有效的屏障。在昆虫上也是一样, AFP 已被免疫定位于表皮细胞的细胞膜上, 表明它们在蜡质覆盖的表皮下形成冰接进屏障。

第二, 在冷适应黑麦叶片中 AFP 紧靠自由水经过处, 表明松散结合的 AFP 通过结合到冰晶上发挥作用, 在控制冰晶化或水的再结晶化中有重要作用。在这种情况下, AFP 可能与细胞壁结合不很牢固, 以便同细胞外冰晶的表面结合。Gaudet 等支持这个假说, 他们报道细胞间清洗技术可以去除溶解在细胞间自由水中或与细胞壁结合不紧的一些物质<sup>[18]</sup>。此外, 组织印记技术也已成功地用在细胞及细胞外蛋白质的定位。用以  $\text{CaCl}_2$  预处理过的硝酸纤维素纸可以定位所有可溶性和盐溶性蛋白质, 包括细胞壁蛋白质。如果细胞壁蛋白相互交叉连接或与其他细胞壁成分连接在一起, 它们不能被转移到纸上被这种方法检测到。发现用盐 ( $\text{CaCl}_2$  或  $\text{MgCl}_2$ ) 抽提的质外体提取液的抗冻活性比单独用抗坏血酸抽提的提取液的活性高, 表明用盐可以释出更多的 AFP<sup>[19]</sup>。当质外体蛋白被抽提后冬黑麦叶片冰冻伤害增加, 表明相当量的 AFP 被移去。AFP 与冰晶的结合可能通过冰结合主题 (ice-binding motifs (IBMs)) Thr/Asp 等的自由 -OH, -C=O, 或 -NH<sub>2</sub> 基与冰表面结合。

GLP 位于靠近质膜的小囊泡中并可越过质膜, 这表明在细胞外冰冻和及冰冻诱导脱水期间 AFP 可能起到稳定质膜的外表面以保持结构稳定性的作用<sup>[18]</sup>。相应的, THP (thermal hysteresis proteins, 热滞蛋白) 在 *Solanum dulcamara* 茎的某类细胞中免疫定位于细胞质膜上。来自南极鱼的抗冻糖蛋白被认为与细胞膜相互作用并可提高细胞膜的稳定性。然而, AFGP、THP 或 AFP 起到稳定细胞膜作用的机制仍不清楚。总得说来, 具有抗冻活性的 GLP、CLP、TLP 在冷适应冬黑麦组织中都位于质外体。这些蛋白质在表皮和周围细胞间空隙中的分布与附生冰 (epiphytic ice) 和细胞外冰的位置有关, 表明这些蛋白在修饰冰生长上有作用。此外, 在非适应植物中 GLP、CLP 和 TLP 缺乏抗冻性并一般位于不同的组织, 表明 AFP 是 PR 蛋白的不同的异构体。

通过研究植物 AFP 的性质,组织定位、功能,来探究植物与动物的互作生态学关系和分子生态学关系,探讨植物低温蛋白与昆虫种群的必然联系,以便为昆虫生态学和冗余学说以及生物适应性提供实验证据。同时,昆虫和动物都常以植物为食,植物逆境蛋白包括低温蛋白在改变动物包括人在内的口味上有重要作用,如冬小麦的味道常常就比春小麦面粉为好。这是一项极富挑战性的探索性课题。

### 3 与脱水耐性有关的蛋白质——脱水素 (dehydrin)

环境恶化也包括干旱和低温。低温常常像干旱那样可以诱导植物合成脱水素。脱水素是干旱胁迫下植物累积的一个蛋白质,广泛存在于植物、藻类和细菌等光合生物中<sup>[20]</sup>。分子量变化很大,从 9kDa~2000kDa 不等。植物脱水素又称为胚胎发生晚期富有 (LEA) 蛋白。LEA 蛋白可被划分为 D19 LEA (1 族)、D11 LEA (2 族)、D7 LEA (3 族)、D113 LEA (4 族)、D29 LEA (5 族) 和 D95 LEA (6 族) 等 6 族。植物脱水素属 2 族 LEA 或 D11 LEA。具有强亲水性、沸腾稳定的特点,并有高度保守的 Y (DEYGNP)、S (SSSSSS (SS)) 和 K ((E)EKKGIMDKIKEKLP) 片段。目前至少有 30 种植物脱水素基因已被鉴定。已知的与植物耐冻性有关即可以冷诱导的植物脱水素有水稻的 21kDa protein, RAB21, 玉米的 RAB17, 豇豆 35kDa protein, 番茄 TAS14, 柑桔 CuCOR19, 菠菜 CAP85, 拟南芥 LTI29、LTI30、RD29A、COR47、RAB18, 苜蓿 CAS17, 小麦 WCOR410、COR39、WSC120 等<sup>[21-23]</sup>。

脱水素在植物代谢中有分子伴侣 (molecular chaperone) 和保护蛋白结构的作用,从而保护细胞在缺水时不发生蛋白质变性。许多种子在脱水后发芽率上升,如大豆。脱水素在这个过程中起防护作用或激活作用。干燥和外施 ABA 证明也可以提高植物的冰冻耐性。许多粮食可以通过干燥脱水而越冬保存。通过免疫定位证明低温可以诱导小麦 WCS 蛋白家族合成,WCS 蛋白家族在筛管过渡区高度表达,而在成熟的木质部、茎尖分生组织或侧生根原基中没有<sup>[23, 24]</sup>。虽然在细胞壁或其他细胞器中没有发现 WCS 蛋白家族,但却存在于细胞质和核浆中,进一步表明在保护细胞可溶性部分中起作用。用细胞分馏法对冷适惯菠菜组织研究,表明 CAP85 主要存在于胞液中。与 CAP85 相似或紧密联系的冷调节蛋白 COR85,已从冷适惯菠菜叶片中提取纯化并被定性。该蛋白在冷适惯菠菜的叶片、叶柄和茎中累积,但不在冷适惯菠菜的根中累积。相反,反应干旱和盐胁迫时 COR85 可在所有组织中累积。COR85 以 350-kDa 的寡聚物存在于胞液中,并被认为在冰冻诱导的脱水下对细胞内分子有低温保护作用。

此外脱水素还可以通过其双亲水  $\alpha$  螺旋区域,在细胞脱水时代替细胞膜中原来的水分位置,其分子内羟基与磷脂分子中的极性键形成氢键,使膜脂的状态仍类似于未脱水状态,从而防止因膜水分丢失而相变温度及相变,保护生物膜。

目前已有多个耐冻性脱水素基因已被克隆,如小麦中 *dhn1-dhn7*, 小麦中 *wcor410*, 玉米中的 *dhn1/rab17* 和 *dhn2* 以及拟南芥中的 *dhnX*、*cor47*、*rab18* 等。

水环境问题是近年来生态学的一个重要问题,因此研究植物的低温蛋白也可以为节水农业提供指导、维持人类生存的水生态平衡。同时在对野外冷适惯植物生态学考察时,可以在某种程度上忽略其干旱作用。

### 4 与膜脂修饰有关的蛋白质 (membrane related proteins)

低温常导致植物膜流动性降低及光合作用发生光抑制。曾有许多研究报告膜脂流动性与植物抗冷性的关系。然而,只是近年来才对膜脂改变的分子机理有了较深刻认识。首先研究较透彻的是甘油-3-磷酸酰基转移酶 glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)。用分别来自冷敏感西葫芦和耐冷拟南芥的编码甘油-3-磷酸酰基转移酶 (GPAT) 的基因转化冰冻敏感烟草,结果表明转化拟南芥 GPAT 基因的烟草更耐冻 (1°C10d) 且具有更少的光抑制;同时发现烟草细胞膜中磷脂酰甘油的顺式不饱和脂肪酸含量上升到 72%。最近用植物和蓝藻突变体研究阐明了与膜脂成分有关的蛋白质改变在低温伤害中的作用。*A. thaliana* 的 *fab* 突变体 (脂肪酸生物合成欠缺) 具有较高的饱和脂肪酸水平,在 2°C 下生长一段时间可使光合容量 ( $F_v/F_m$ ) 下降并使叶绿体破坏<sup>[25]</sup>。这一下降被认为是 PSII 中心功能减小的结果。在具有失活去饱和酶基因的蓝藻突变体中,膜脂不饱和度可以影响 PSII 反应中心蛋白 D1 蛋白的转换。在低温下,低水平的脂肪酸不饱和度可削弱 D1 蛋白翻转,并因此阻碍光合作用从光抑制的恢复<sup>[26]</sup>。

脂转移蛋白 (lipid-transfer proteins, LTPs) 被认为参与生物细胞内生物膜之间的脂质转移。然而,LTP 也定位于细胞外不支持发生在细胞内的作用<sup>[27]</sup>。有实验揭示编码 LTPs 的基因可对 ABA 和各种胁迫包括冷、干旱、盐和病原菌起反应。在冬大麦上,*blt4* 基因家族可被冷和干旱胁迫诱导。大麦 *blt4* 基因家族被证明拥有相一致的 N-末端信号序列用来进行向细胞外运输。用原位杂交技术证明大麦 *blt4.9* 基因的表达定位于冷处理过的分生组织和老叶片组织的表皮中。定位于表皮中的 *blt4.9* 表达与假设的其在表皮形成中的作用一致。*LTP* 定位于表皮细胞外空间及其与角质层蜡质的关系暗示 *LTP* 可能与蜡质合成或分泌有关<sup>[28]</sup>。*LTP* 在植物中的另一个可能作用是植物防御。对大麦 *LTP* 基因家族调节元件的分析表明有推定的 ABA 反应元件 (ABRE) 和低温反应元件 (ACCGACA),进一步支持 *LTP* 在低温和相关胁迫中的保护作用。

另一个与膜脂流动性的有关的蛋白是去饱和酶 des A 蛋白 (desaturated A)。Los 等发现蓝细菌 (*Synechocystis* PCC6803) 的

*des A* 基因在环境温度由 36°C 下降到至 2°C 时,该基因的表达在 1h 内就增加 10 倍。Vigh 等报道刺激 *des A* 表达是由于低温首先降低了膜脂的流动性,刺激 *des A* 的转录,使膜脂不饱和度增加,从而增加膜脂的流动性。将 *des A* 基因导入蓝细菌 *Anacystis nidulans* 中,后者膜脂脂肪酸的不饱和度增加,相应地,其光合作用在 5°C 下不受明显抑制。

膜脂降解与植物抗冷力关系的证据主要来自对磷脂酶 D(PLD)的研究。PLD 是催化膜脂分解的主要酶之一。冷胁迫增加了由 PLD 介导的膜磷脂的分解。而有人将编码 PLD 和反义 PLD 的基因分别转入烟草,转反义 PLD 转化株抗冷力获得提高,而转 PLD 转化株抗冷力下降。

Murata 和 Los 提出了一个膜流动性调节去饱和酶基因表达的信号模型。温度降低以膜流动性改变形式为位于质膜上的某种感应器感知,这个感应器蛋白可以是一个  $Ca^{2+}$  通道或 His 激酶。信号以某种未知途径经调节传递到去饱和酶基因,被上调。去饱和酶合成并被运输到质膜和类囊体膜,从而增加膜脂脂肪酸的去饱和,并补偿膜流动性的降低。

## 5 结语

植物的低温抗性应当是适应性的一种,也是生物特有的。低温蛋白在植物的低温抗性形成中起作用。植物的低温抗性或称为冷适应性很可能是上述低温防护蛋白、抗冻蛋白、植物脱水素、膜关联耐冻性多肽蛋白质等四类低温蛋白共同作用的结果。在植物生长发育中,当外界冷压力刚刚触及植物时,植物细胞膜最先感应到冷刺激信号,细胞合成膜关联耐冻性多肽蛋白质改变膜脂组成成分,对低温形成初期抗性和适应性。随着低温逆境程度的加剧,植物启动合成低温防护蛋白。当低温逆境进一步加深,即将引起植物细胞结冰时,植物合成抗冻蛋白,利用抗冻蛋白的热滞效应、冰晶形态效应和重结晶抑制效应等特有功能阻止细胞结冰。但当植物处在零下几十度的低温细胞结冰后,引起细胞内外不同程度的颗粒结冰,致使细胞脱水,此时植物合成的植物脱水素(dehydrin)保护蛋白质不变性可以形成植物的最后一道防线而去努力维持生命。可能不同种类的植物采取不同的方式更多一些,如有的利用低温防护蛋白多一些,另一些利用抗冻蛋白(AFP)多一些。同时应该注意到,植物的低温抗性的产生是一个系统工程,需要除植物低温蛋白外的其他一些代谢的协调参与。

植物与环境的关系问题不仅是植物生理学家研究的课题,而且也是动物学家和生态学家应当关注的问题。为保护环境植物和农田作物,杀灭有害昆虫如蝗虫和有害动物如仓鼠、田鼠等植食性动物,人们大量生产继之大量使用化学农药。农药的大量使用造成严重的残留和误杀等环境污染是近年来生态学尤为突出的一个重要问题。少施农药或施化学农药是人们追求的目标。许多植物低温蛋白类似植物防御素。研究低温蛋白和植物的低温保护和诱导机制,不仅可以增加植物的低温抗性,而且也可以为植物抗干旱、抗盐碱提高作出贡献,并可能最终提高植物的抗病抗虫性、甚至抗小型哺乳动物(拒食)。植物的这种诱导抗性不仅可以使植物在没有外加胁迫时不表达而节省能量,将更多的物质用于植物生长,而且可以在有外源胁迫时牵一发而动全身,在低温蛋白发挥作用保护植物免遭冰冻伤害的同时,也可以同时交叉抵抗(cross-talk)病虫害,进一步节省能量资源。科学合理地利用和开发植物的这种低温蛋白,可以为合理有效防治病虫害,减少农药使用、以及减少人类化肥生产所需煤电、水分等有限自然资源开辟新的思路。在高原和高山环境,生态系统的主要部分是冷生态系统,因此研究高山植物的生态群落时低温蛋白如 GPAT 可能在植物群落分布中起着重要的作用。高山地区的生态群落模型也许就是植物低温蛋白的群落模型。而植被分布直接影响植食性动物群落的生态分布。植物的低温抗性机制研究同时具有非常显著的农业意义。重要粮食作物小麦中的冬小麦产量形成的一个主要限制因子就在于春前冬期植株发育迟缓,而同时又需低温春化作用。如果弄清楚植物的低温抗性机制,就可以在保证冬小麦在进行春化作用的同时,促进其拔节前发育,形成更多的拔节前小麦叶片,就可以最终提高人类粮食供应并改变春小麦的不良口味。另外,低温蛋白作为植物和动物的重要适应性蛋白,在栽培驯化植物和培养驯化动物的研究中,为阐明动植物适应机制,培养优良驯化品种具有重要意义。

## References:

- [1] Antikainen M, Pihaskaski S. Cold-induced changes in the polysome pattern and protein synthesis in winter rye (*Secale cereal*) leaves. *Physiol. Plant*, 1993, **89**:111~116.
- [2] Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, et al. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, 2002, **416**:455~459.
- [3] Gilmour SJ, Lin C, Thomashow MF. Purification and properties of *Arabidopsis thaliana* COR (Cold-Regulated) gene polypeptides COR15am and COR6.6 expressed in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.*, 1996, **111**:293~299.
- [4] Uemura M, Gilmour SJ, Thomashow MF, et al. Effects of COR6.6 and COR15am polypeptides encoded by COR (Cold-Regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on the freeze-induced fusion and leakage of liposomes. *Plant Physiol.*, 1996, **111**:313~327.
- [5] Sieg F, Schroder W, Schmitt JM, et al. Purification and characterization of a cryoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage. *Plant Physiol.*, 1996, **111**:215~221.
- [6] Griffith M, Ala P, Yang DSC, et al. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol.*, 1992, **100**:593~

596.

- [7] Pudney PDA, Buckley SL, Sidebottom CM, *et al.* The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perene*). *Archives Biochem. Biophys.*, 2003, **410**:238~245.
- [8] Antikainen M, Griffith M, Zhang J, *et al.*, Pihakaski-Maunsbach K. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing. *Plant Physiol.*, 1996, **110**:845~857.
- [9] Hon W-C, Griffith M, Mylnarz A, *et al.* Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, 1995, **109**:879~889.
- [10] Kuroda K, Kasuga J, Arakawa K, *et al.* Xylem ray parenchyma cells in boreal hardwood species respond to subfreezing temperatures by deep supercooling that is accompanied by incomplete desiccation. *Plant Physiol.*, 2003, **131**:736~744.
- [11] Hinch DK, DeVries AL, Schmitt JM. Cryotoxicity of antifreeze proteins and glycoproteins to spinach thylakoid membranes-comparison with cryotoxic sugar acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1146**:258~264.
- [12] Wallis JG, Wang H, Guerra DJ. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. *Plant Mol. Biol.*, 1997, **35**: 323~330.
- [13] Gatschett MJ, Taliaferro CM, Porter DR, *et al.* A cold-regulated protein from bermudagrass crowns is a chitinase. *Crop Sci.*, 1996, **36**:712~718.
- [14] Hinch DK, Meins Jr F, Schmitt JM. B-1,3-Glucanase is cryoprotective *in vitro* and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiol.*, 1997, **114**:1077~1083.
- [15] Antikainen M, Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol. Plant*, 1997, **99**:423~432.
- [16] Michael JK, Peter LD, Virginia KW. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne*. *Biophys. J.*, 2001, **81**:3560~3565.
- [17] Pihakaski-Maunsbach K, Griffith M, Antikainen M, *et al.* Immunogold localization of glucanase-like antifreeze protein in cold acclimated winter rye. *Protoplasma*, 1996, **191**:115~125.
- [18] Gaudet DA, Lanche A, Frick M, *et al.* Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiol. Plant*, 2003, **117**:195~205.
- [19] Hon W-C, Griffith M, Chong P, *et al.* Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale L.*) leaves. *Plant Physiol.*, 1994, **104**:971~980.
- [20] Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, *et al.* Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol. Plant*, 2003, **118**:262~269.
- [21] Huges MA, Dunn MA. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.*, 1996, **47**:291~305.
- [22] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1996, **7**:161~167.
- [23] Houde M, Daniel C, Lachapelle M, *et al.* Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.*, 1995, **8**:583~593.
- [24] Sarhan F, Ouellet F, Vasquez-Tello A. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiol. Plant*, 1997, **101**:439~445.
- [25] Wu J, Lightner J, Warwick N, *et al.* Low temperature damage and subsequent recovery of *fab1* mutant Arabidopsis exposed to 2 C. *Plant Physiol.*, 1997, **113**:347~356.
- [26] Kanervo E, Tasaka Y, Murata N, *et al.* Membrane lipid unsaturation modulates processing of the photosystem II reaction-center protein D1 at low temperatures. *Plant Physiol.*, 1997, **114**:841~849.
- [27] Kader J-C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1996, **47**:627~654.
- [28] Pyee J, Kolattukudy PE. The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *Plant J.*, 1995, **7**: 49~59.