

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

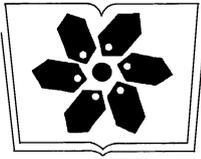
Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 24 期 Vol.32 No.24 **2012**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 24 期 2012 年 12 月 (半月刊)

目 次

从文献计量角度分析中国生物多样性研究现状.....	刘爱原,郭玉清,李世颖,等 (7635)
CO ₂ 浓度升高和模拟氮沉降对青川箭竹叶营养质量的影响.....	周先容,汪建华,张红,等 (7644)
陕西中部黄土高原地区空气花粉组成及其与气候因子的关系——以洛川县下黑木沟村为例.....	吕素青,李月从,许清海,等 (7654)
长三角地区 1995—2007 年生态资产时空变化.....	徐昔保,陈爽,杨桂山 (7667)
基于智能体模型的青岛市林地生态格局评价与优化.....	傅强,毛锋,王天青,等 (7676)
青藏高原高寒草地生态系统服务功能的互作机制.....	刘兴元,龙瑞军,尚占环 (7688)
北京城市绿地的蒸腾降温功能及其经济价值评估.....	张彪,高吉喜,谢高地,等 (7698)
武汉市造纸行业资源代谢分析.....	施晓清,李笑诺,赵吝加,等 (7706)
丽江市家庭能耗碳排放特征及影响因素.....	王丹寅,唐明方,任引,等 (7716)
基于分布式水文模型和福利成本法的生态补偿空间选择研究.....	宋晓谕,刘玉卿,邓晓红,等 (7722)
设施塑料大棚风洞试验及风压分布规律.....	杨再强,张波,薛晓萍,等 (7730)
湖南珍稀濒危植物——珙桐种群数量动态.....	刘海洋,金晓玲,沈守云,等 (7738)
云南岩陀及其近缘种质资源群体表型多样性.....	李萍萍,孟衡玲,陈军文,等 (7747)
沙埋和种子大小对柠条锦鸡儿种子萌发、出苗和幼苗生长的影响.....	杨慧玲,梁振雷,朱选伟,等 (7757)
栗山天牛天敌花绒寄甲在栎林中的种群保持机制.....	杨忠岐,唐艳龙,姜静,等 (7764)
基于相邻木排列关系的混交度研究.....	娄明华,汤孟平,仇建习,等 (7774)
三种回归分析方法在 Hyperion 影像 LAI 反演中的比较.....	孙华,鞠洪波,张怀清,等 (7781)
红松和蒙古栎种子萌发及幼苗生长对升温与降水综合作用的响应.....	赵娟,宋媛,孙涛,等 (7791)
新疆杨边材贮存水分对单株液流通量的影响.....	党宏忠,李卫,张友焱,等 (7801)
火干扰对小兴安岭毛赤杨沼泽温室气体排放动态影响及其影响因素.....	顾韩,牟长城,张博文 (7808)
不同潮汐和盐度下红树植物幼苗秋茄的化学计量特征.....	刘滨尔,廖宝文,方展强 (7818)
腾格里沙漠东南缘沙质草地灌丛化对地表径流及氮流失的影响.....	李小军,高永平 (7828)
西双版纳人工雨林群落结构及其林下降雨侵蚀力特征.....	邓云,唐炎林,曹敏,等 (7836)
西南高山地区净生态系统生产力时空动态.....	庞瑞,顾峰雪,张远东,等 (7844)
南北样带温带区栎属树种种子化学组成与气候因子的关系.....	李东胜,史作民,刘世荣,等 (7857)
模拟酸雨对龙眼叶片 PS II 反应中心和自由基代谢的影响.....	李永裕,潘腾飞,余东,等 (7866)
沈阳市城郊表层土壤有机污染评价.....	崔健,都基众,马宏伟,等 (7874)
降雨对旱作春玉米农田土壤呼吸动态的影响.....	高翔,郝卫平,顾峰雪,等 (7883)
冬季作物种植对双季稻根系酶活性及形态指标的影响.....	于天一,逢焕成,任天志,等 (7894)
施氮量对小麦/玉米带田土壤水分及硝态氮的影响.....	杨蕊菊,柴守玺,马忠明 (7905)
微山湖鸟类多样性特征及其影响因素.....	杨月伟,李久恩 (7913)
新疆北部棉区作物景观多样性对棉铃虫种群的影响.....	吕昭智,潘卫林,张鑫,等 (7925)
杭州西湖北里湖沉积物氮磷内源静态释放的季节变化及通量估算.....	刘静静,董春颖,宋英琦,等 (7932)
基于实码遗传算法的湖泊水质模型参数优化.....	郭静,陈求稳,张晓晴,等 (7940)
气候环境因子和捕捞压力对南海北部带鱼渔获量变动的的影响.....	王跃中,孙典荣,陈作志,等 (7948)
象山港南沙岛不同养殖类型沉积物酸可挥发性硫化物的时空分布.....	颜婷茹,焦海峰,毛玉泽,等 (7958)
专论与综述	
提高植物抗寒性的机理研究进展.....	徐呈祥 (7966)
植被对多年冻土的影响研究进展.....	常晓丽,金会军,王永平,等 (7981)
凋落物分解主场效应及其土壤生物驱动.....	查同刚,张志强,孙阁,等 (7991)
街尘与城市降雨径流污染的关系综述.....	赵洪涛,李叙勇,尹澄清 (8001)



封面图说: 永兴岛海滩植被——永兴岛是中国西沙群岛的主岛,也是西沙群岛及南海诸岛中最大的岛屿。国务院 2012 年 6 月批准设立的地级三沙市,管辖西沙群岛、中沙群岛、南沙群岛的岛礁及其海域,三沙市人民政府就驻西沙永兴岛。永兴岛上自然植被密布,野生植物有 148 种,占西沙野生植物总数的 89%,主要树种有草海桐(羊角树)、麻枫桐、野枇杷、海棠树和椰树等。其中草海桐也称为羊角树,是多年生常绿亚灌木植物,它们总是喜欢倚在珊瑚礁岸或是与其他滨海植物聚生于海岸沙滩,为典型的滨海植物。

彩图提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201106260945

徐呈祥. 提高植物抗寒性的机理研究进展. 生态学报, 2012, 32(24): 7966-7980.

Xu C X. Research progress on the mechanism of improving plant cold hardiness. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(24): 7966-7980.

提高植物抗寒性的机理研究进展

徐呈祥*

(肇庆学院生命科学学院, 肇庆 526061)

摘要: 低温胁迫是世界范围内影响植物产量和品质的主要非生物胁迫。植物抗寒生理生态研究是比较活跃和发展很快的领域。文章综述了提高植物抗寒性机理的研究进展。大量科学研究和生产实践表明, 气象因素与植物自身因素是影响植物抗寒性的关键因素, 前者主要是温度、光周期和水分, 后者主要是植物的遗传学基础、生长时期、发育水平以及低温胁迫下细胞的抗氧化能力。保证植物抗寒基因充分表达对提高植物抗寒性有重要意义。植物抗寒性的遗传机制与调控主要通过 5 条路径实现: 丰富多样的植物低温诱导蛋白, 低温转录因子 DREB/CBF 可同时调控多个植物低温诱导基因的表达, DREB/CBF 与辅助因子相互作用调控下游基因表达, Ca^{2+} 、ABA 及蛋白质磷酸化上游调控低温诱导基因表达, 以及不饱和脂肪酸酶基因的表达。基因工程改良植物抗寒性已获重要进展, 但距产业化尚有许多开创性的工作要做, 目前主要通过导入抗寒调控基因和抗寒功能基因而实现, 后者主要是导入抗渗透胁迫相关基因、抗冻蛋白基因、脂肪酸去饱和代谢关键酶基因、SOD 等抗氧化系统的基因以及与植物激素调节有关的基因。农林技术对提高植物抗寒性有重大实用价值, 其中的不少技术蕴涵着深刻的科学机理, 重点评述了抗寒育种、抗砧嫁接、抗寒锻炼、水肥耦合及化学诱导五大技术提高植物抗寒性的作用机理。展望了提高植物抗寒性的研究。

关键词: 植物; 低温胁迫; 提高抗寒性; 机理; 研究进展

Research progress on the mechanism of improving plant cold hardiness

XU Chengxiang*

College of Life Sciences, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China

Abstract: Low temperature stress is a worldwide major abiotic stress affecting plant yield and quality. Plant physiological ecology of cold hardiness research is a more active and fast growing field. In this paper, advances of study on the mechanism of improving plant cold hardiness was reviewed. Scientific research and production practice have showed that meteorological factors and/or factors of plant itself are the key factors affecting plant cold hardiness; the former is mainly temperature, photoperiod and water; while the latter is mainly plant genetic basis, growth period, development level and cell antioxidant capacity under low temperature stress. Ensuring fully expression of genes of plant cold hardiness is of important significance on improving plant cold hardiness. Genetic mechanism and regulation of plant cold hardiness are mainly through 5 paths to achieve, respectively: the rich diversity of low temperature induced plant proteins; low temperature transcription factor DREB/CBF can simultaneously control a plurality of expression of genes cold induced in plants; interactions of DREB/CBF and cofactor regulate expression of downstream genes; Ca^{2+} , ABA and protein phosphorylation regulate gene expression induced by low temperature in the upstream; and the expression of genes of unsaturated fatty acid synthase. Genetic engineering to improve plant cold hardiness has been significant progress, but from the industrialization has still a lot of pioneering work to do. Currently, genetic engineering of improving plant cold hardiness are mainly through the introduction of regulatory genes and/or functional genes, the latter is mainly the introduction of genes

基金项目: 广东省高等学校引进人才专项资金(2010); 国家自然科学基金项目(31270674)

收稿日期: 2011-06-23; 修订日期: 2012-08-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xucx2006@yahoo.com.cn

related to osmotic stress resistance, genes of antifreeze proteins, genes of fatty acid desaturation metabolism key enzyme, genes of SOD and other antioxidant system component, as well as genes involved in the regulation of plant hormone. Agricultural and forestry technologies to improve plant cold hardiness have important practical value, many of them are of profound scientific mechanism, in which we focused on the mechanism of 5 main technologies improving plant cold hardiness, respectively: cold hardiness breeding, grafting, cold acclimation, the coupling of water and fertilizer and chemical induction. The prospect of future research on improving cold resistance of plant was discussed.

Key Words: plant; low temperature stress; improving cold hardiness; mechanism; research progress

早期关于植物抗寒机理的研究,主要是从比较冷敏感植物和抗冷植物或抗寒锻炼植物和未经抗寒锻炼植物的实验设计入手,从水平平衡、碳水化合物、氨基酸、核酸、蛋白质水平,细胞壁特性、原生质膜和细胞器的结构及其功能、生长调节物质的作用、膜脂去饱和作用等方面进行实验分析。结果表明,植物抗寒性提高与可溶性糖、膜磷脂、脯氨酸,特别是脱落酸、膜脂肪酸不饱和度的增加或多少有关,且保持生物膜系统功能、结构的稳定性是保持和提高植物抗寒性的基础。在 20 世纪七八十年代,较多的研究工作是关于生物膜保护系统的组分含量和活性与植物寒冻害及抗寒锻炼后植物抗寒能力提高的关系,以及蛋白质在植物抗寒锻炼前后的变化,在揭示膜保护系统、冷诱导特异蛋白的变化与植物抗寒性形成的关系方面获得较大进展^[1]。20 世纪 90 年代以来,生物技术迅猛发展并向生命科学的各领域迅速渗透,使得研究某一关键物质与植物抗寒性调节的因果关系,特别是研究低温胁迫信号如何被转导,进而调节相应的生理生化的研究成为可能。因此,近些年本领域的研究越来越多地采用分子生物学和转基因技术,根据以前的实验结果和理论研究某些重要物质或发现新的物质及其与植物抗寒性调控之间的关系,初步描绘了植物低温信号转导的网络架构,克隆了一些与调节植物抗寒性密切相关的基因,在植物抗寒基因工程方面进行了不少探索。迄今,在不同阶段和方向上取得的成果均有价值,包括通过育种、嫁接、施肥等农艺技术提高植物抗寒性。然而,植物抗寒性是微效多基因控制的数量性状,具有复杂属性,有很多课题尚未解决或者还没有得到令人信服的结果。本文综述提高植物抗寒性的机理研究进展。

1 低温胁迫对植物的损伤

被动适应寒冻胁迫的植物,形态结构很有特点,突出表现是:叶片较小,栅栏组织发达,细胞壁衍化成角质层,具蜡质、木质、栓质、表皮毛和特殊气孔等附属结构,这些附属结构以及木质部间的导管组织能阻止水分子和冰的扩散运动;主动适应寒冻胁迫的植物,通常能被诱导产生抗寒冻防卫反应,如:改变酶系统和植物激素调控系统的表达,修饰膜脂组成、提高能降低相变温度的不饱和脂肪酸的含量,增加细胞壁上可抑制冰晶生长速率、提高熔点的阿拉伯木葡聚糖,增加与细胞信号识别有关的表在糖蛋白,增强微管在低温下的稳定性,提高细胞内一些抗寒冻物质如糖类(蔗糖、葡萄糖、海藻糖等)、多元醇、内铵盐/甜菜碱、脯氨酸、多胺、自由氨基酸、可溶性蛋白质或亲水性多肽以及脱落酸等的含量。抗寒冻分子含有(多)羟基,可结合水分子、抑制细胞内水分减少,进而稳定低温胁迫下大分子物质和生物膜的结构^[2]。

但植物对寒冻的适应性受多种因素影响,几乎所有的生命活动都会不同程度地因低温胁迫而发生紊乱、失调甚至死亡。与热激胁迫所引起的蛋白质变性和折叠受阻不同,0℃以上低温胁迫对冷敏感植物的损伤首先是改变了磷脂双层膜的膜相,尤其是改变了质膜的空间构象和物理状态。膜相的改变可显著抑制细胞膜正常功能的发挥,而构象的改变则强烈影响膜的稳定性,使蛋白质从膜上解离,并发生膜融合。植物冻害的机理主要是结冰伤害、引起蛋白质损伤的巯基(-SH)假说和对膜的伤害。胞间结冰比胞内结冰对植物的伤害更大,主要原因是:(1)导致原生质过度脱水,使蛋白质变性或原生质发生不可逆的凝胶化;(2)冰晶对细胞的机械损伤;(3)解冻过快对细胞的重大损伤。冻害的症状往往明显,但冷害则不然,损伤程度除取决于低温外,还取决于低温的维持时间。低温胁迫对植物体造成损伤的直接表现是叶片呈水渍状或果实上出现斑点,这些生理受损组织往往易受病原微生物的侵染或造成局部坏死。引起冷害的低温胁迫在植株整个生长发育过程

中均能导致不利影响,结果是苗弱、植株生长迟缓、萎蔫、黄化、局部坏死、坐果率低、产量降低和品质下降等。此外,冷害还引起植物群体生长发育的不均一性,因而,对机械收获十分不利^[3]。

2 影响植物抗寒性的因素

植物抗寒性是植物对低温环境长期适应而形成的一种遗传特性。植物抗寒基因表达与外界环境条件(包括微地形、小气候、土壤肥力状况)和植物发育的内源节奏、生理状况有密切关系。保证植物抗寒性充分表达的适宜条件,对提高植物抗寒性有重要意义。

2.1 气象因素

2.1.1 温度

低温是重要的环境刺激信号。不同植物抗寒锻炼的温度有差异,但 10℃ 以下的低温通常即能诱导进入,温带植物最适宜的诱导温度大多在 2℃ 左右。抗寒遗传性的充分表达也需要在持续低温中锻炼一定时间,锻炼温度低,所需时间短,反之,则延长。Timmis 等建立了温度对花旗松(*Pseudotsuga menziesii*) 苗木抗寒锻炼和脱锻炼影响的数学模型,抗寒锻炼模型中每个时间段植物的抗寒性是低温积温的函数,由计算温度低于 4.4℃ 的时间(以小时计)获得,而在春季脱锻炼模型中则与热量积温有关,在 2—23℃ 间呈线性关系^[4]。Repo 等建立了欧洲赤松(*Pinus sylvestris*) 抗寒性的多个数学模型,认为同一温度既可引起抗寒锻炼,也可造成脱锻炼,主要取决于当时的抗寒性是否高于或低于由温度确定的其抗寒性固定水平^[5]。

2.1.2 光周期

短日照在诱导植物抗寒性增强方面具有非常重要的作用。单一低温条件固然能诱导植物抗寒基因的表达,但所获得的抗寒性远远不及低温+短日照的效应。对杜鹃(*Rhododendron simsii*) 品种进行低温锻炼时发现,低温(5℃)和短日照(8 h)可诱导出最强的抗寒性,而低温+长日照(18 h)所诱导的抗寒性很弱^[1]。但对欧洲赤松的研究发现,温度和光周期对松苗不同器官芽、茎、针叶和根的影响不是累加性的,而是存在交互作用;抗寒锻炼阶段不同,随着植株抗寒锻炼能力的增强,某些器官呈现加性特性,有的则没有^[6]。

2.1.3 水分

冷害引起植物表面水渍状的时间不等,由几小时至几天,主要取决于植物种类和温度,同时,植物体水分状况和光照条件间接影响到冷害的程度。越冬植物在秋季和初冬的抗寒锻炼过程中,最明显的适应性变化之一是植株地上部含水量降低,尤其是自由水含量的降低。对冬季禾本科植物的测试表明,地上部含水量保持在 65% 左右最适宜抗寒锻炼,能诱导最大的抗寒性,但含水量过低会因影响植株正常生长而不利于抗寒性提高。同时,植物在干旱条件下比在潮湿条件下更耐寒。很多试验表明,干旱和冷冻锻炼都可诱导植物抗寒性增强。

2.2 植物自身因素

2.2.1 植物的遗传学基础

植物对低温胁迫的敏感程度与其起源地密切相关。多数热带起源的植物较温带起源的植物对低温冰冻敏感得多,乡土植物的抗寒性通常强于引种的植物。但后一问题比较复杂,与引种方向(水平的经纬度和垂直的海拔变化)的温度变化有关,也与光周期变化引起的封顶早晚、历史分布区赋予植物种本身的适应潜质等其它诸多因素有关。此外,同一植物种的不同品种抗寒冻能力可能会差异很大,而野生种的抗寒冻能力通常强于其栽培品种。这些关系,仍不断被新的试验研究所证实和拓展,在农林业生产实践中有广泛应用。

2.2.2 植物的生长时期

植物有着抗寒性发育的内在节律。植物活跃生长与抗寒基因表达相矛盾。不同抗寒性的冬性作物品种,秋播后生长锥细胞有丝分裂动态表现出明显差异,抗寒性强的品种比抗寒性弱的品种生长更缓慢,且细胞分裂频率在秋季低温下逐渐降低,直至完全停止,从而使细胞的代谢活动转向与抗寒锻炼相适应的变化,抗寒基因被激活而表达,使细胞耐寒性提高。相反,抗寒性弱的品种,由于秋季生长活动较旺,细胞内代谢活动不能及时转向与抗寒锻炼相适应的改组,或者本身不存在抗寒基因,致使不能获得较强的抗寒性。木本植物在春

天的新梢生长期,无论光照和温度条件如何符合抗寒锻炼要求,都不能充分诱导其抗寒性,但到了秋季的生长末期,即使强迫处在长日照和高温下,其抗寒性也会发育到一定程度^[1]。

2.2.3 植物的发育水平

植物发育水平不同,抗寒性会有显著差异,但发育水平越低,抗寒性越易得到提高。这是由于植物在年幼时容易改变它的遗传性状,因而,利用低温处理开始萌动的种子可以显著提高它们的抗寒性,而对其几近长成的植株的处理效应则小很多。因此,黄瓜、番茄、水稻等的幼苗、愈伤组织、悬浮培养细胞是最常见的抗寒锻炼对象。特别,用组织培养形成的愈伤组织进行抗寒锻炼有许多有利条件,如:比较容易控制组织的年龄、都是薄壁细胞等,同时,又能基于同样的培养基。利用悬浮培养细胞进行抗寒性诱导也具有优越性,能够减少或排除在整株植物上由于细胞和器官特异性所造成的干扰,而且环境条件能够人工控制,细胞所经受的试验处理也都是均一的。

2.2.4 低温胁迫下植物细胞的抗氧化能力

低温胁迫下,对低温胁迫敏感的植物细胞中活性氧的产生加速,而清除活性氧的能力下降,导致活性氧水平升高。因此,低温胁迫下活性氧所引起的损伤是伤害产生的重要原因之一。另一方面,研究也证明,冷锻炼可提高细胞内抗氧化酶活性和内源抗氧化剂水平,缓解由低温胁迫而引起的膜蛋白和膜脂过氧化,从而提高植物抗寒性。同时,植物不同的抗寒性又与其细胞内具有不同水平的抗氧化酶活性和内源抗氧化剂含量相关,抗寒植物比冷敏感植物具有更高水平的抗氧化能力。 Ca^{2+} 浸种等处理能够提高植物抗寒性,均与提高了植物抗氧化胁迫能力有关。因此,有学者认为,细胞氧化应激机制很可能是调节植物抗寒性的另一个重要机制^[7]。

3 植物抗寒性的遗传机制与调控

多数植物经低温锻炼后,抗寒冻能力都增强。植物在低温锻炼下,通过上游调控来维持呼吸作用、光合作用和蛋白质合成代谢,进而获得对寒冻的抗性。在人工低温锻炼过程中,一系列低温诱导基因被诱导表达,植物系统获得性抗寒冻能力与低温诱导基因的诱导表达密切相关。研究低温诱导基因及其表达调控的方法是:(1)运用现代分子生物学技术,包括高通量 cDNA 微阵列或基因芯片技术、酵母单(或双)杂交方法、DNA 标签法和差别显示技术等直接分离和冷锻炼相关的基因;(2)运用正、反向遗传学方法,包括图位克隆法、转座子或 T-DNA 插入的定向基因失活技术、反义 RNA 和共抑制技术以及基因沉默技术,筛选和研究大量突变体中的低温胁迫基因作用位点和功能;(3)运用分子探针分析酶切扩增多态序列(CAPS)、限制性片段长度多态性(RFLP)和数量性状座位(QTL)谱确定低温诱导基因遗传图^[8]。目前,大量与植物低温诱导表达相关的基因已得到分离、鉴定,但一些基因的表达与植物抗寒性之间的关系还未全面揭示。基于胁迫损伤或耐性表型的遗传筛选方法,与现代分子生物学技术相辅相成,在植物低温转录因子表达、胁迫信号传递和代谢途径的研究中发挥着越来越重要的作用。

3.1 丰富多样的植物低温诱导蛋白

低温诱导蛋白质中有直接与提高植物抗寒性、保护细胞免受冻害的功能性蛋白质。如:胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA 蛋白)、抗冻蛋白(AFP)、DNA 结合蛋白、mRNA 结合蛋白、分子伴侣、离子通道蛋白、bZip 蛋白以及能保护其他酶类的蛋白质等;能改变膜脂组成的合成酶如脂肪酸不饱和酶;能降解毒性物的抗氧化胁迫酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等;也有能调控低温信号传导、抗寒冻基因表达和抗寒冻蛋白质活性的调控性蛋白质,包括低温转录因子、蛋白激酶以及一些蛋白酶^[7]。

LEA 蛋白主要出现在种子胚发育的晚期,具有富含 Lys 的 K 节和富含 Gly 的 Φ 节。研究低温诱导蛋白质的结果表明,许多低温诱导蛋白与 LEA 蛋白在氨基酸序列上有高度同源性,结构上普遍具有以下特点:含有大量亲水性氨基酸,在沸点下保持稳定;氨基酸组成简单,仅由几种氨基酸构成,Gly、Ala 含量较高;具有重复序列结构,内部缺少折叠区,受热难于聚集;形成双亲 α -螺旋,其疏水区与部分变性蛋白质及膜相互作用,阻止蛋白质和膜进一步变性,而亲水区与其它蛋白质结合,可能具有蛋白质分子伴侣的作用,在低温下稳定膜

结构与功能。低温诱导基因表达调控的机理很复杂。目前,世界上已分离、鉴定出十几种低温诱导基因,研究对象主要是模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 以及水稻 (*Oryza sativa*)、大麦 (*Hordeum vulgare*) 和苜蓿 (*Medicago sativa*)^[9]。

3.2 低温转录因子 DREB/CBF 可同时调控多个植物低温诱导基因的表达

高等模式植物拟南芥低温诱导基因 *cor*, 也称 *kin*、*rd*、*lti* 或 *erd* 基因, 所编码的多肽根据氨基酸组成可分成四类: COR6.6/KIN2、COR15a、RD29A/LTI78 / COR78 和 COR47/RD17, 其中 COR6.6 蛋白与富含丙氨酸的鱼类抗冻蛋白 I 在氨基酸组成上极为相似, RD29A 和 RD17 蛋白类似于 LEA II 蛋白, COR15a 蛋白可能与质膜相互作用, 可阻止六方晶 II 相发生, 提高低温胁迫下质膜的稳定性, 增强叶绿体和原生质体的抗寒冻能力^[10]。

研究基因缺失和碱基突变的结果表明, COR15a 基因启动子的顺式作用元件包括上游的 C-repeat 元件和下游的 ABA 响应元件 ABRE。C-repeat 元件, 也称 CRT 或 DRE 或 LTRE, 其核苷酸序列是 TGGCCGAC; ABRE 元件, 具有保守的 6 核苷酸序列 TACGTG。此外, 在 *rd29A* 基因启动子的顺式作用元件中也发现 ABRE 以及类似于 CRT 的脱水响应元件 DRE, 其核苷酸序列是 TACCGACAT^[11]。目前, 已确认 CRT/DRE /LTRE 元件或其核心序列 CCGAC 广泛存在于低温、高盐及脱水应答中一些诱导基因的启动子中, 但它对 ABA 的快速诱导没有响应^[12]。

采用拟南芥 *cor15a* 或 *rd29A* 基因的 CRT/DRE 元件, 以及酵母单杂交方法, 经凝胶移位和基因芯片技术, 结合位点选择分析以及反式激活分析, 已经分离和克隆了与低温胁迫耐性相关的转录因子 CBF1, 2, 3, 4 / DREB1B, 1C, 1A, 1D^[13]。CBFs 具有 AP2/ERF DNA 结合域, 可以识别和结合 CRT/DRE 元件。正常生长条件下, 野生型拟南芥植物中的 CBFs、*cor6.6*、*cor15a*、*cor47* 和 *rd29A* 基因不表达, 但低温冷锻炼 15min 后体内的 CBFs 基因开始表达, 约 2 h 左右前述 *cor* 基因表达。CBF1 或 CBF3 组成性过量表达, 可促进下游的 *cor* 基因也组成性地高水平表达, 与 *cor15a* 单独表达相比, 它可以使整株转基因植物抗冻性提高 3.3°C^[14]。用含基因的启动子控制 DREB1A 在转基因拟南芥植物中表达, 植物的抗寒性、抗旱性和耐盐性提高。遗传分析发现, ICE1 作为 CBF3 的激活子, 能识别和结合 CBF3 启动子的 MYC/B 序列。转 ICE1 基因植株的 CBF3、RD29 和 COR15a 在低温下高表达^[15]。

最近发现的转录因子 CBF4 显示了植物对低温和干旱胁迫反应进化上的相近性。CBF4 受干旱胁迫诱导, 但不受低温胁迫诱导。在转基因植株中, 过量表达的 CBF4 植株不但抗旱能力增强, 而且抗冻性也提高。CBF4 的原始基因很可能具有调控植物对于干旱胁迫作出响应的功能, 经过基因复制、启动子趋异及选择、外显子重组等作用, 逐渐具有调控植物抗寒性的功能^[16]。由于 CBF/DREB 能诱导多种与胁迫相关的基因表达而极大地增强植物抗逆性, 因此, 具有广泛的应用价值, 目前是研究热点之一, 有许多研究机构利用导入该转录因子来提高植物抗寒性、抗旱性, 并且获得了一定的成功。

3.3 CBF/DREB 与辅助因子相互作用调控下游基因表达

在一些基因表达过程中, 转录因子并不直接与顺式作用元件结合, 经过辅助因子活化后才能调控下游基因表达。在拟南芥中发现有类似酵母的适配器 (adaptor) ADA2 和具有组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 活性的 GCN5 蛋白。目前推测, CBFs 激活低温诱导基因表达依赖 GCN5 和 ADA2 的相互作用。CBFs 的酸性 C 端可能引导复合物到基因启动子, 使 HAT 修饰组蛋白, 改变染色质结构, 使之更容易与 mRNA 聚合酶结合。T-DNA 插入 ADA2 和 GCN5 中, 导致拟南芥突变体植株的 *cor* 基因转录本降低, 但对 CBFs 表达没有影响^[17]。用遗传突变方法还筛选到能影响 *cor* 基因表达但对 CBF/DREB1 转录因子没有影响的遗传突变位点, 这可能会成为研究低温胁迫信号传导和胁迫基因功能的有力工具。拟南芥冷敏感突变体 *sfr6* 就是其中的一个。Boyce 等利用基因敲除及分子标记技术, 筛选到拟南芥冷冻敏感突变体 *sfr*, 对冷冻处理显示出不同的生长发育和细胞生理损伤行为, 其中在 *sfr6* 突变体中检测不到 *cor* 基因表达但与 *cor* 基因启动子 CRT/DRE 元件结合的 CBF/DREB1 基因表达正常。据此, 他们认为, SFR6 蛋白可能对 CBF/DREB1 激活下游基因表达起正调控作用^[18]。

植物体内代谢物的合成与分解,总是处于微妙的动态平衡状态以感应外部环境变化和维护机体正常代谢。Ishitani 等在拟南芥中发现的 HOS1 蛋白可能是参与降解与 CBF/DREB1 表达相关的一种正调节器,对冷信号传递进行负调控^[19]。拟南芥 *hos1* 突变体能在低温下提前开花,其 CBF/DREB1 表达水平高于野生型,且 *cor* 基因过量表达。研究还发现,HOS1 具有泛素功能,可降解 ICE1,此后发现的转录因子 HOS9 则可以对 *cor* 基因表达进行负调控,但不依赖于 CBF 途径^[20]。通过遗传突变研究发现的另一个对低温胁迫有负调控作用的基因是 *esk1*。*esk1* 突变体植株与其野生型植株相比,脯氨酸和总糖含量高,RAB18(LEA II)高表达,抗寒性强,但对 COR 基因的表达没有影响。拟南芥转录组-表达谱的研究结果也证明,植物在冷锻炼过程中存在低温诱导基因表达的抑制途径^[21]。

3.4 Ca²⁺、ABA 及蛋白质磷酸化上游调控低温诱导基因表达

植物在感受到寒冷信号,如气温降低、短日照等之后,将产生一系列抗寒促进因子,启动一些抗寒基因的表达。要实现这些反应,必须能够顺利完成从刺激到准确反应的一系列信号转导过程。现已知,Ca²⁺、ABA 及蛋白质磷酸化上游调控低温诱导基因表达。

3.4.1 Ca²⁺

Ca 元素,不仅是细胞的结构物质,而且,作为第二信使几乎介导了植物生长发育和对低温胁迫等环境变化的全部反应。低温或激素不仅引起细胞质内 Ca²⁺ 水平升高,且引起细胞核内 Ca²⁺ 浓度迅速增加。对 ABA 不敏感型突变体的研究也证实 Ca²⁺ 参与低温胁迫下的信号转导。细胞质内 Ca²⁺ 浓度较低(≤0.10 μmol/L),而细胞壁、内质网和液泡中 Ca²⁺ 浓度比细胞质中高 2 个数量级以上。这些部位或细胞器称为细胞的“钙库”,细胞壁是“胞外钙库”,“胞内钙库”包括液泡、内质网和线粒体等。植物细胞中有精细的 Ca²⁺ 浓度调节机制,主要是 Ca²⁺ 通道、Ca²⁺/H⁺ 交换体、Ca²⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-结合蛋白。胞内 Ca²⁺ 分布严格区域化,保持胞质 Ca²⁺ 稳态是细胞正常生长的前提条件。细胞受刺激后,胞质中的 Ca²⁺ 浓度短暂而明显升高。胞质中 Ca²⁺ 浓度升高,源于胞外和胞内钙库。胞外 Ca²⁺ 可顺化学势梯度通过质膜上的 Ca²⁺ 通道进入细胞质,胞内 Ca²⁺ 通过内膜上的 Ca²⁺ 通道进入胞质。骤然低温引起抗寒植物叶片气孔关闭,该过程依赖于细胞质外体中的 Ca²⁺ 供应,而与通常引起气孔关闭的 ABA 无关。这可能与温度变化引起细胞质 pH 值改变有关^[22]。

细胞膜上的钙离子通道和钙依赖型蛋白激酶(CDPKs)等信号感受器,接受低温胁迫信号后诱导细胞释放 Ca²⁺,或诱导细胞产生肌醇多聚磷酸盐、cADP 核糖以及 NADP 盐等二级信号分子,从而刺激细胞释放 Ca²⁺,激活蛋白激酶参加蛋白质磷酸化代谢过程,诱导胁迫靶基因表达。用 Ca²⁺ 螯合剂、Ca²⁺ 通道阻断剂和转 Ca²⁺ 通道蛋白基因技术的研究结果表明,Ca²⁺ 参与植物对低温胁迫的响应,并与植物的一些低温诱导基因的表达调控相关,如拟南芥的 *cor6.6/kin1*、苜蓿的 *cas15*^[23]。通过改变二级信号分子的生化代谢途径,影响 Ca²⁺ 流释放水平,可调节低温胁迫基因表达,影响植物抗寒性。当细胞中的肌醇磷脂系统(IP₃)被激活后,也可促使内膜系统中 Ca²⁺ 的释放,因为 IP₃ 具有打开 Ca²⁺ 通道的功能。IP₃ 是水溶性的,可从质膜扩散到胞质溶胶,然后与内质网或液泡膜上的 IP₃-Ca²⁺ 通道结合而使通道打开。IP₃ 的生理功能都通过 Ca²⁺ 浓度升高引起,由 Ca²⁺ 作为第二信使介导完成。实验表明,Ca²⁺ 能明显提高低温胁迫下植物种子的生活力和萌发率,Ca²⁺ 浸种可使水稻等植物的种子在低温吸胀过程中电解质渗漏率明显降低,说明 Ca²⁺ 对冷害种子细胞膜结构有稳定作用。

3.4.2 ABA

早在 20 世纪 80 年代初,人们就注意到植物抗寒性与 ABA 有关。虽然低温锻炼(4℃/2℃)或用外源 ABA 处理能诱导低温诱导基因表达、增强植物抗寒性,并且 ABA 缺失突变体 *aba-1* 或不敏感突变体 *abi-1* 的 ABA 合成受阻或对 ABA 的作用不敏感会导致植物耐冻性下降,但 *aba-1* 突变体植株的 *cor* 基因表达正常,且 *abi-1* 能影响 ABA 诱导的 *cor* 基因表达而不影响低温诱导的 *cor* 基因的表达,ABRE 缺失也不影响低温胁迫因子对 CRT/DRE 的诱导表达^[24]。根据基因表达对 ABA 的依赖与否,可将低温下信号传导 ABA 诱导的基因分为三类:(1)基因表达依赖 ABA 的传导(如:种子贮藏蛋白基因和逆境诱导基因);(2)冷诱导基因表达不依赖

ABA 的传导途径;(3) ABA 与低温共同作用控制基因的表达。有学者在分析了拟南芥突变株在低温胁迫响应中的信号转导途径后指出,依赖和不依赖 ABA 的信号转导途径并不是完全不相关的,而是存在交叉转导作用。

用萤火虫荧光素酶基因(*rd29A-luc*)转基因植物为材料,分离到两个拟南芥突变体 *los5* 和 *los6*,这两个突变体植物不能合成 ABA,*rd29A*、*cor15a* 和 *cor47* 等的表达也比野生型低。遗传分析表明,*los5* 是 *aba3* 的等位基因,*los6* 是 *aba1* 的等位基因,而且,ABA 与 Ca^{2+} -CaM 信号系统共同执行抗寒信号的传导^[25]。外源 ABA 的抗寒性诱导作用已在棉花(*Gossypium hirsutum*)、苜蓿、油菜(*Brassica campestris* L.)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、水稻等植物中得到证实。低温锻炼和 ABA 处理都具有增强植物抗寒性的作用。目前,已发现有多种基因的表达可为外源 ABA 所诱导,其中大多数基因在种子后成熟期或植物器官对逆境胁迫反应时表达。喷施外源 ABA,水稻幼苗在低温胁迫下及回温恢复中 SOD 活性增强,但水稻幼苗 SOD 活性增加并非激活该酶而是促进了该酶的再合成。

3.4.3 蛋白质磷酸化

拟南芥 *fry1* 基因编码肌醇多聚磷酸盐 1-磷酸酶,能降解信号分子肌醇 1,4,5-三磷酸盐(IP_3),对冷信号传递进行负调控。*fry1* 突变体的 IP_3 含量比野生型高,*cor* 基因表达增强,抗寒性提高^[26]。实验结果表明,低温诱导细胞内的 Ca^{2+} 量增加,从而激活 CDPK,增强水稻(*Oryza sativa* L.)抗寒性、抗旱性^[27]。用基因沉默技术,可抑制分解 CDPK 的蛋白质磷酸酶 2C 基因表达、促进冷诱导基因表达,提高转基因植物的低温锻炼水平^[28]。

蛋白激酶催化蛋白质磷酸化,有蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶、蛋白质酪氨酸激酶和蛋白质组氨酸激酶 3 类。越来越多的证据显示,蛋白激酶参与植物低温逆境信号传导。苜蓿促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)基因 *mapk14* 可被低温和干旱快速激活,它在接收由第二信使传导的多种细胞内集成信号中起关键作用。MAPK 级联系统包括 3 种蛋白激酶,即 MAPK、MAPK 激酶(MAPKK)和 MAPK 激酶激酶(MAPKKK)。首先,MAPKKK 接受低温逆境刺激信号,由失活型转变为激活型,从而进一步激活 MAPKK,激活型 MAPKK 又会进一步使 MAPK 激活,向下传导信息。实验证实,MAPK 级联系统在参与植物低温胁迫信号传导时,其信号传导元件 mRNA 水平上升以提高相应蛋白含量,将外界胁迫信号级联放大^[29]。此外,有些报道表明,在某些植物中,对抗寒锻炼起作用的并非一类激素的绝对含量,而是与 GAs 一类激素的比例。因此,有人认为 ABA/GAs 更反映出植物的抗寒性。

3.5 不饱和脂肪酸酶基因的表达

Roughan 在研究 74 种植物膜上的磷脂酰甘油(PG)脂肪酸组成与抗寒性之间的关系时发现,细胞膜脂肪酸的不饱和度对植物抗寒性有很大影响,细胞膜脂的不饱和脂肪酸含量愈高,植物的抗寒性愈强。用脂质体原生质体融合和基因转化技术,转化甘油-3-磷酸酰基转移酶基因和转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *fad2-8* 的水稻植株,可以降低或增强转基因植株抗寒性。但拟南芥的另一个突变体 *fab1* 的 PG 饱和脂肪酸表达水平却提高,植株的抗寒性也增强,显示 PG 饱和度并不是唯一影响植株抗寒性的因素,可能还有其他因子参与低温调控^[30]。

膜脂降解与植物抗寒性关系的证据主要来源于对磷脂酶 PLD 的研究。PLD 是催化膜脂分解的主要酶之一。低温胁迫下,PLD 介导的膜磷脂的分解得到强化。有学者将编码 PLD 和反义 PLD 的基因分别转入烟草,转反义 PLD 转化株抗寒性获得提高,而转 PLD 转化株的抗寒性下降。无疑,不饱和脂肪酸,特别是某些膜脂中的不饱和脂肪酸分子种(PG 分子种)对植物抗寒性的形成具有重要的作用,而且通过对脂肪酸的去饱和和作用或抑制膜脂的降解进行遗传操作已证明可以改变植物对低温胁迫的敏感性^[31]。膜脂脂肪酸的去饱和和作用调节植物抗寒性的一个重要机制。

4 基因工程改良植物抗寒性

1970 年,科学家首次提出了植物在适应低温胁迫的过程中基因表达发生改变的观点。此后的研究发现,

抗寒锻炼/冷锻炼能诱导和增强植物的一些基因的表达,使多种基因表达发生改变。目前,国内外的植物抗寒基因工程主要是针对以上两类低温诱导基因加以展开的。

4.1 导入抗寒调控基因

植物在感受和传导寒冷信号的过程中,有多种调控基因参与编码产生信号传递因子和调控蛋白,包括各种转录因子和蛋白激酶,如 DREB 转录因子、细胞分裂蛋白激活激酶、14-3-3 蛋白等。目前,有关导入抗寒调控基因的研究主要围绕与抵抗寒冻所导致的渗透胁迫相关的低温诱导基因转录因子 DREB 展开^[32]。研究发现,植物在抵抗寒冻所造成的渗透胁迫过程中,有多种基因得以诱导表达,且多数在转录水平调节的低温诱导基因和水分胁迫诱导基因的启动子区域有一个顺式(cis)作用元件 TACCGA-CAT 是这些胁迫诱导基因表达所必需的调控区,与低温胁迫调节信号的作用有关,被称为脱水反应因子 DRE。还有一些低温诱导基因上有两个顺式作用元件 CRT/DRE,如转录因子 CBF1 能结合 CRT/DRE 元件,CBF4 能结合 CBF/DREB1 元件,从而诱导低温胁迫诱导基因和水分胁迫诱导基因的表达^[33]。由于转录因子能诱导多种低温胁迫诱导基因和其它逆境胁迫诱导基因的表达,因而,可在很大程度上增强植物抗寒性。利用农杆菌介导法将由诱导型启动子 *rd29A* 调控的拟南芥转录因子 CBF3 基因导入烟草,获得 Southern 阳性转基因烟草,低温胁迫实验表明,CBF3 转基因烟草幼苗获得了一定的抗寒能力,特别是可溶性糖、可溶性蛋白质和游离脯氨酸含量均较对照极显著提高^[34]。

4.2 导入抗寒功能基因

4.2.1 导入抗渗透胁迫相关基因

植物在抵抗寒冻所导致的渗透胁迫过程中,体内将积累大量糖类和脯氨酸等渗透调节物质,并有多冷调节蛋白得以诱导表达。这些调节蛋白含大量亲水性氨基酸,具有热稳定性,且多数具有重复的氨基酸序列和相对简单的氨基酸组成,基因启动子区域含有 DRE 顺式作用元件。目前,研究较深入的是 LEA 蛋白基因和 COR 家族蛋白的基因。使 COR15am 多肽在转基因拟南芥中大量表达后,与野生型相比,转基因植株叶绿体和原生质体对寒冷耐受性提高,原生质膜稳定性增强,减轻了寒冻所造成的损伤^[35]。

4.2.2 导入抗冻蛋白基因

对植物中抗冻蛋白(AFP)的研究较晚。Griffith 等在上世界上首次明确指出,冷锻炼的冬黑麦(*Secale cereale* L.)中有内源 AFP 产生,此后,世界各地在多种植物中发现了 AFP,且植物中存在的 AFP 较动物中更普遍,是抗寒冻植物对冬季低温较为普遍的适应机制。这些抗冻蛋白都具有 3 个基本性质:1) 热滞效应;2) 冰晶形态的修饰效应;3) 抑制重结晶^[36]。由于 AFPs 显著的抗冻调节作用,有关 AFPs 蛋白基因的转基因工程近年来开展甚多。用真空透析法将冬比目鱼 *afp* 基因导入马铃薯、拟南芥和欧洲油菜中,降低了 3 种植物的自然结冰温度;用电击法将冬比目鱼 *afp* 基因导入玉米原生质体中获得了表达,提高了玉米抗寒性;用花粉管通道和子房注射法将整合在 Ti 质粒上的美洲拟鲽 *afp* 基因导入番茄中,提高了番茄抗寒性^[37]。但是,在已研究过的绝大多数植物材料中,AFP 活性大大低于鱼类和昆虫中的,所研究的植物虽多达几十种,真正可被分离纯化出来的 AFP 尚不多。

4.2.3 导入脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因

不同高等植物膜中脂肪酸不饱和度和冷敏感性密切相关,膜脂中心位置顺式双键的存在可把相变温度降至接近 0℃。导入脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因后,其表达产物可能使一部分饱和脂肪酸催化成不饱和脂肪酸,从而提高膜脂不饱和度,提高植物抗寒性。还有些酶可催化饱和脂肪酸中顺式双键的形成,将编码这些酶的基因导入植物体内也可使其获得抗冷性状。将南瓜藤和拟南芥属得到的甘油 3-磷酸酰基转移酶基因,导入烟草中明显改变磷酸酰基甘油的脂肪酸组成并提高其抗寒性^[38]。将拟南芥的编码 ω-3 脂肪酸去饱和酶 FAD 基因、将菠菜的硬脂酰基载体蛋白去饱和酶 SAD 基因分别导入烟草,均增强转基因烟草的抗寒性^[38]。

4.2.4 导入 SOD 等抗氧化系统的基因

植物抗氧化防御系统能起到调节膜透性,增强膜结构和功能稳定性的作用。其中以 SOD 最为重要,是植

物体内第一个清除活性氧的关键抗氧化酶。目前,有不少研究者应用遗传工程技术转抗氧化酶基因或提高抗氧化剂含量,以期直接研究抗氧化酶、抗氧化剂与植物抗寒性表达调控的关系。将 SOD 的 cDNA 导入烟草 (*Nicotiana tabacum*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和苜蓿等植物中,大量表达后均增强了植株的抗氧化能力。利用质体转化技术,将拟南芥的 Fe-SOD 和 *Nicotina plumbaginifolia* 的 Mn-SOD 基因导入玉米,获得抗寒转基因玉米。也有研究将拟南芥脯氨酸脱氢酶反义 RNA 的 cDNA 导入拟南芥以抑制脯氨酸降低、实现其高水平表达,显著提高转基因植株对低温和高盐的耐受性。这些方面研究虽已取得令人可喜的效果,但距定向操纵的目标还有相当多问题。如:需要加强对低温胁迫下植物某个生理过程中活性氧特征和不同抗氧化酶过量表达在清除活性氧中的协同效应的研究,各种抗氧化酶反应后所生成的产物以及细胞对活性氧所形成氧化逆境的应激机制的研究,从而更好地选择基因工程中的某些关键组分^[7]。

4.2.5 导入与植物激素调节有关的基因

植物在抗寒锻炼中发生改变的激素主要有脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA) 和植物细胞分裂素 (CTKs),其中以 ABA 表现最为显著。因此,导入与植物激素调节有关的基因也为植物分子育种者所关注。目前,CK 合成中第一个限速酶—异戊烯基转移酶基因 (*ipt*) 已被转入烟草、拟南芥、油菜、菊花、水稻等多种植物体内。外源 *ipt* 基因表达变化及额外细胞分裂素的合成对延长植物在低温环境中的持绿期及改善植株其他性状起重要作用。Hu 等的研究发现,转 *ipt* 基因高羊茅抗寒性明显提高,低温条件下植株活力更强,持绿期更长^[39]。段永波研究了转 *ipt* 基因水稻与对照未转基因水稻幼苗对低温胁迫的响应,结果表明,低温胁迫后,转基因植株脯氨酸含量比对照大大提高,而叶绿素含量、POD 与 SOD 的活性及 MDA 含量能保持稳定,抗寒性明显提高^[40]。

5 农林技术提高植物抗寒性

农林技术对提高植物抗寒性有重大实用价值。迄今,针对植物抗寒性弱或导致寒冻灾害发生的原因,相关国家和地区基本上都进行了不同程度和范围的试验研究,初步探索出了有一定成效的抗寒技术路线或方法体系,如培育抗寒品种、推广抗砧嫁接繁育、进行抗寒锻炼、配制“热性”土、适期播种和收获、优化作物种植制度,混交栽植、丛植、群植,改善植物营养状况、合理灌溉与排水、接种丛枝菌根真菌、重视整形修剪的作用、切实防治病虫害、健全防护林网,树盘培土、壅土护根(茎)、树干涂白、熏烟防冻、实行生物或薄膜覆盖,使用 ABA、多效唑 (CCC) 等植物生长调节物质进行种子包衣或直接喷施,以及加强寒冻天气预报、增强防冻减灾意识、应用抗寒防冻技术等,其中的不少技术蕴涵着深刻的抗寒机理。

5.1 抗寒育种

植物优异的抗寒性,首先来自于优良的种质与遗传。近两个世纪以来,国内外科研人员通过杂交、芽变、诱变和实生育种等常规育种途径,已培育出许多具有优良抗寒性的果树、蔬菜、农作物和园林花卉品种,在实际生产中发挥了重大作用。如,中国对抗寒、高产、胶木兼用橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 品种(系)的选育种^[41],美国等国在葡萄 (*Vitis vinifera*) 抗寒性与高产性、优质性结合方面的辉煌育种成就^[42-43],世界各国对柑橘 (*Citrus reticulata*)^[44-45]、苹果 (*Malus domestica*)^[46-47]、梨 (*Pyrus spp*)^[48]、杏 (*P. armeniaca*)^[49] 等植物抗寒种质资源的发掘与抗寒新品种选育(其中 85% 以上是实生及杂交选育而成)。科研和生产已经并将继续证明,培育抗寒优良品种,是减轻植物冻害的有效手段和根本途径,对提高植物抗寒性非常重要,也非常有潜力。未来,在已有成绩基础上,随着对抗寒植物资源的进一步挖掘和利用、对植物抗寒性遗传规律认识的加深以及生物技术等新的育种手段的应用,必将涌现出更多更好的抗寒植物新品种。特别是生物技术的发展和应用,目前已渗透到植物遗传育种的各个领域,SSR 标记在植物品种鉴别、系谱分析和遗传图谱构建方面已得到广泛应用,基于 DNA 分子标记遗传图的构建加速了杂种的早期选择,遗传图和物理图的结合可以克隆控制重要性状的功能基因,遗传转化技术的应用可以更快地改良现有的植物品种^[50]。但总体上,我国目前植物抗寒育种等抗性育种开展的仍然比较少,且力量薄弱,人员分散、不稳定,无长远规划,对选育出的新品种也缺乏系统研究,现代育种技术与常规育种尚不能有机结合^[47]。

5.2 抗砧嫁接

嫁接是一项古老而有无穷生命力的世界性植物技术。中国是全世界公认的最早发明嫁接技术的国家。

利用嫁接的最初目的是进行植物的营养繁殖,充分发挥栽培品种的优良特性,现代嫁接技术主要是用来改良植物性状。目前,嫁接在植物良种繁育中的应用有:挽救濒危植物,保持和发展优良种性,固定杂种优势,实现丰产优质,调控植株大小,增强抗逆性和适应性,更换优良品种,控制性别,繁育无病毒良种,开展杂交制种利用,调节成熟期,增强观赏性(如改换植物性别、人造连理树、一木多花、植物造型与组装等);嫁接在植物新品种选育中的应用有:保存特殊的育种中间材料,培育属间嫁接杂种(嵌合体),克服远缘杂交不亲和性,利用嫁接产生的可遗传变异育种,以及用于无性变异的遗传稳定性测定。利用嫁接产生的可遗传变异,目前是国内外植物生物学的研究热点之一^[51-52]。因此,植物嫁接技术在农林业的诸多方面都有不可替代的价值。钱学森认为:剪枝整形和嫁接技术在农业、林业中大有前途,开发一门技术性科学——“植物嫁接改造学”,它的作用决不亚于基因工程学^[53]。

植物的所有部分几乎均可进行嫁接。因此,确切讲,嫁接就是植物器官、组织或细胞间的结合。但嫁接不是无性杂交,不是接穗和砧木机械的愈合,而是一个与愈伤反应不同的更为复杂的生理过程,是接穗和砧木两者相互影响,相互作用,组成一个有机的整体。一种嫁接组合,是不同于另一种嫁接组合的,也不同于砧木本身或接穗本身。大量试验表明,选用抗性强的适宜砧木进行嫁接,可显著提高栽培品种对寒冻等生物非生物逆境的抗性,但迄今对嫁接植物的代谢过程、砧木与接穗联合效应的作用机理以及嫁接植株的遗传状况等尚有许多不明确之处,作用机理研究还不是很深入。概括起来,抗砧嫁接提高植物抗寒冷性的作用机理是:1)低温胁迫下,嫁接苗较自根苗根系吸收养分与水分能力显著增强;2)嫁接苗较自根苗在矿质吸收、激素代谢、膜保护酶系活性、糖和蛋白质含量等方面均发生了利于抗寒性提高的明显变化;3)嫁接苗较自根苗根系在低温条件下伸展性好,根系和叶片的致死温度显著低于自根苗,叶片保水力较强,能量代谢水平较高;4)嫁接后抗寒性的提高与植物体内活性氧清除系统中抗氧化剂含量和抗氧化酶活性提高有关,嫁接苗的活性氧清除能力均高于自根苗,抗寒性越强的活性氧清除能力越高;5)低温胁迫下,植物嫁接苗较自根苗的细胞之间存在活跃的长距离信号转导和遗传物质交换^[54]。

5.3 抗寒锻炼

植物对低温胁迫的抗性有一个适应过程。在植物遭遇寒冻害之前,逐步降低温度,使植物预先经受适当的寒冻锻炼,可有效提高对更低温度的抗性,否则,极易在突然遇到低温时受害。春季在温室、温床育苗,进行露天移栽前,必须先降低室温或床温,如番茄苗移出温室前,须先经1—2 d、10℃处理,移栽后即可抗5℃左右的低温;黄瓜苗经10℃低温锻炼后即可抗3—5℃的低温;植物愈伤组织及组织培养苗,经17℃/12℃昼夜低温锻炼可明显提高2—4℃低温胁迫下的抗寒性,植株存活率和细胞活力显著提高;经过抗寒锻炼的冷地型草坪草-草地早熟禾、沟叶结缕草, LT_{50} 分别降低-8.8℃、-2.7℃^[55]。

低温锻炼提高植物抗寒性,实质是化学模拟植物胁迫,有着深刻的生理生化学与分子生物学原因。概括起来主要是:1)通过低温锻炼后,植物细胞内的生理生化代谢发生变化,含水量发生变化,自由水减少,束缚水相对增多;2)膜脂组成和结构改变,不饱和脂肪酸增多,膜流动性增大,膜相变的温度降低,膜透性相对稳定或增大幅度小;3)细胞质中的渗透调节物质,特别是糖类(包括葡萄糖、果糖、蔗糖等可溶性糖)含量提高,一些多羟基醇,如山梨醇、甘露醇、乙二醇,以及多胺类化合物、脯氨酸、 Ca^{2+} 等抗寒物质分子的含量也提高,升高的 Ca^{2+} 来源于细胞壁;4)细胞内NADPH/NADP比值和ATP含量增高,激素比例发生改变,脱落酸(ABA,有“可传导的锻炼促进剂”、抗冷基因表达的启动因子之称)增多;5)基因表达改变,特别是改变了 cor 基因的转录和蛋白合成模式,合成了一些新蛋白,或某些蛋白的合成增加,而另一些蛋白减少或消失,可溶性蛋白的质和量改变,膜指代谢过程中的一些酶类如磷脂酶D的活性变化^[7,31]。

抗寒锻炼是如何启动膜脂代谢的变化,膜脂分子如何调节其它代谢的变化,与抗寒性有关的物质分子又是如何有序、协调调节抗寒力的表达的,在低温逆境生理生态研究中广受关注。现已知, Ca^{2+} -CaM信使系统是调节植物抗寒性形成的有关生理生化过程的重要信号系统,启动的一个中心环节就是胞质中 Ca^{2+} 浓度的改变,参与胞质中 Ca^{2+} 水平的调节有质膜上 Ca^{2+} 通道活性、 Ca^{2+} -ATPase以及 Ca^{2+}/H^{+} 反向传递体。植物细胞内

液泡是很重要的贮钙体,普遍存在于液泡膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向传递体及 Ca^{2+} 通道也与胞质中 Ca^{2+} 水平变化密切相关。 Ca^{2+} 完成信息传递功能是通过 Ca^{2+} 调节靶酶,如蛋白酶激酶,以及 Ca^{2+} 结合蛋白特别是 CaM,进而调节靶酶,完成对生理生化的调节。磷脂酶 D 能感知低温的信息,进而调节膜脂的代谢,改变了膜脂成分,而磷脂酶 D 的活性受 Ca 浓度的变化所影响。又由于 Ca^{2+} 的共轭性,使得 Ca^{2+} 信使系统与磷脂酰肌醇信使系统相关联,磷脂酰肌醇系统中 DG 和 IP_3 两种信使物质对调节生理变化起着重要作用^[56]。

5.4 水肥耦合

合理施肥,包括增施有机肥,无机肥和有机肥相结合,特别是调节氮(N)、磷(P)、钾(K)肥比例,实行平衡施肥、配方施肥,对植物的长势、经济产量和品质及抗逆性可产生重大影响,是提高植物抗寒性的重要措施,相关报告非常多。如:按 $\text{N}:\text{P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O}$ 为 8:3:3 配合施肥对腰果(*Anacardium occidentale*) 树促花增产效应及冬季抗寒性的显著提升作用^[57],以 $\text{N}:\text{P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O}$ 为 2:1:1 配方施肥对温州蜜柑产量、品质和抗寒性的提升效应最大^[58]。增施钙(Ca)肥^[22-23,59]、硅(Si)肥^[60]以及铁(Fe)^[61]和稀土微肥^[62],对提高植物抗寒性也有比较显著的效应。其实,每一种矿质元素在提高植物抗寒性中都有特殊作用,如前已述及的 Ca 元素。酸性土壤供 Ca^{2+} 水平较低是植物易受冻害的土壤学原因,而低温胁迫下加 Si 处理后高抗植物品种体内较高的 Si 含量是其比低抗品种具有更强抗寒性的原因之一^[60]。

水是植物细胞的重要组成成分,是代谢过程的反应物质,是各种生理生化反应和物质运输的介质,植物正常的生命活动都必须在细胞含有一定水分的状况下才能进行。水还具有特别重要的生态学意义,如调节植物体温,改善田间小气候,使植物保持固有姿态,可“以水促肥”,实现“水肥耦合”效应等。如果植物在湿度不良的土壤或基质中长期生长,根系就不能健康生长,必然导致植株发黄,叶缘枯焦,叶片早落,枝条死亡,果实或种子减产甚至绝收。因此,水分管理对提高植物抗寒性具有非常大的作用。我国果树生产中对于水分管理强调“前促后控,促控结合”、“春水早,夏水巧,秋水控,冬水饱”所体现的就是合理灌溉的思想,也是防止植物特别是木本植物冬春时节“冻旱”、“抽梢”、“抽干”的重要措施^[63]。

研究和实践表明,合理灌溉施肥、“水肥耦合”是植物健康生长的基本措施之一,干旱或涝渍胁迫对植物生长发育和抗寒性具有同等危害,不结合施肥的灌水与不结合灌水的施肥都不利于植物水肥利用效率和抗寒性的提高,然而,在植物特别是栽培作物频繁发生寒冻灾害的地方这一点往往被忽视。目前,现代灌溉技术装备正在得到普及,各种先进的微灌技术,如滴灌、微喷灌、涌泉灌,实现了灌溉土地向灌溉植物的跨越,实现了灌溉施肥的有机结合,不仅具有节水、节肥、省工的功效,而且,对提高植物抗寒性也发挥着实实在在的重要调节作用。

5.5 化学诱导

激素被认为是抗寒基因表达的启动因子。植物生长调节剂能有效地影响和控制植物的生长发育及对低温胁迫的适应性。植物抗寒性的化学诱导,是基于人们对植物抗寒机理的深入研究,尤其是对植物抗寒化学信号物质的种类、性质和作用的透彻了解。尽管化学诱导效应不能瞬间见效,但在某些条件下应用技术成熟、效应显著。目前,实践中使用的抗寒化学诱导剂,最多的是植物系统抗寒性形成过程中起低温胁迫信号转导物质的一类分子及其衍生物,如寡糖素,水杨酸(SA)及其衍生物,脱落酸(ABA)及其衍生物,乙烯(ETH)、细胞分裂素(CTKs),茉莉酸(JA)和茉莉酸甲酯(Me-JA),以及矮壮素(CCC)、多效唑(PP_{333})、油菜素内酯(BRs)。

普遍认为,茉莉酸在许多方面,可以起到脱落酸的一些生物学效应,所以在实践中获得了广泛应用。乙烯可以独立于脱落酸途径之外,激活植物的抗性基因。乙烯作为一种气态激素,对植物个体间的抗逆诱导通讯具有重要意义,实践中经常使用乙烯利发生乙烯,或用低浓度 ABA 刺激植物产生乙烯,以达到抗逆诱导的目的。业已证实,ABA 在植物系统抗性的形成过程中具有特别重要的地位,是极其重要的抗寒诱导剂。使用 CCC、PP333 等生长延缓剂来提高植物抗寒性已普遍应用于生产实践。多数诱导剂施用后增强植物抗寒性的作用机理主要是:促进 ABA 生物合成,诱导活性氧清除功能增强,利于糖类、可溶性蛋白等渗透物质的积累,

调节植物生长发育^[25,64-65]。

6 展望

植物抗寒性具有不稳定性,同时,其表现是多方面的,由诸多环节构成,并随时间、温度、光周期、含水量、发育时期、营养状况、基因型等因素的不同而有改变。目前,对这些复杂因素和环节与植物抗寒性的关系有许多并非很清楚,对植物抗寒性的几个方面或诸多环节间的联系尚缺乏全面了解。以下3方面的深入研究应该是非常有价值的:(1)强化抗寒生理学与育种学的联系,使抗寒机理研究与抗寒技术创新紧密结合起来;(2)植物第二信使在低温胁迫下的作用机制及其在提高植物抗寒性中的功能;(3)现代矿质营养与管理在植物抗寒生理及生态适应性中的重要作用。

以往研究中已从低温信号的识别、转导、信号级联放大、响应等方面对植物低温信号传递网络进行了有一定深度的剖析,但对低温胁迫下相关分子应答途径、基因转录调控方面的研究还不够深入。低温会引起代谢过程及大量产物的变化,对于调控这些过程的转录因子及关键功能基因、相关交叉信号途径的全面了解与解析,将有助于植物抗寒新品种的培育。同时,植物抗寒性又是由多个微效基因控制的数量遗传性状,由一系列相关的直接或间接作用的基因构成了一个复杂的调控网络,尽管通过转基因技术可在一定程度上提高植物的抗寒性,但仅靠转移一、两个抗寒基因就想获得抗寒植物有一定难度。

对植物感受和转导寒冷信号的机制,植物抗寒冻的确切分子机制尚不是很清楚。ABA与Ca²⁺信号转导途径如何协同作用将寒冷胁迫信号传递到细胞核的转录因子,转录因子如何调控抗寒基因的表达,诸抗寒基因又是如何发挥抗寒活性等的分子机制研究应是植物抗寒冻基因工程的基础。植物低温诱导蛋白质的研究虽然已取得很大进展,但迄今对低温诱导蛋白质的研究主要还是通过分析其与已知蛋白质的同源性以及一些生理现象确定的,除少数确定为植物适应胁迫过程中的必需蛋白质外,大部分低温诱导蛋白质的功能及其表达机制仍不清楚。随着全序列测定物种的增加以及大量表达序列标签(EST)的产生,精细遗传和物理图谱的构建,反向遗传学、蛋白质组学和比较基因组学在基因功能研究中越来越显示出重要性,人们对复杂信号的表达、传递和代谢系统的了解必将越来越清晰。

在与植物抗寒性有关的生物化学与分子生物学研究方面,如下三点有必要重视:(1)质膜液晶态稳定性应是植物抗寒研究的一个重点。由于低温锻炼提高植物对低温的抗性除了诱导产生冷反应基因外,也增加了膜对低温抗性的稳定性,因而,冷反应基因产物与质膜液晶态稳定性的关系应成为研究的重要课题之一。(2)尽管通过低温锻炼、改善矿质营养或植物激素处理的研究表明,植物对低温抗性的提高与微管在低温下的稳定性之间存在密切联系,但有关激素调控元件或者转录激活因子调控的基因产物是否直接或间接调控微管或微丝的动态特性仍缺乏实验证据,这一工作的深入对阐明植物对低温的抗性乃至植物抗逆的分子机制具有重要的理论和现实意义。(3)分离、鉴定植物在低温诱导过程中产生的冷反应基因、相关的基因以及它们之间的相互作用,对确定植物对低温胁迫的分子反应和信号传递的一些关键环节,特别是细胞骨架的调控机理具有重要意义。

由上也可见,虽然提高植物抗寒性的机理研究已经取得很大进步,但对主要生理过程之间的关系的研究分析仅限于少数植物种,如拟南芥及部分农作物,因此,有的机制的普适性可能需要更广泛、更深入的研究。同时,在研究手段上,目前很多研究采用人工气候室模拟低温胁迫,虽然可以很好的指示单一胁迫对植物的影响,但是用其来推断野外实验结果有很大局限性,甚至有时控制实验与野外试验的结果相互矛盾,在未来的研究当中应多结合野外实验,并充分关注现代产业条件下植物抗寒性的研究、提高。

References:

- [1] Jian L C, Wang H. Plant Stress Cell Biology. Beijing: Science Press, 2008: 140-142.
- [2] Nagao M, Oku K, Minami A, Mizuno K, Sakurai M, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D. Accumulation of theandrose in association with development of freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry*, 2006, 67(7): 702-709.
- [3] Emsminger I, Busch F, Huner N P A. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*,

- 2006, 126(1): 28-44.
- [4] Timmis R, Flewelling J, Talbert C. Frost injury prediction model for Douglas fir seedlings in the Pacific Northwest. *Tree Physiology*, 1994, 14(7/8/9): 855-869.
- [5] Repo T, Maekelae A, Haeninen H. Modelling frost resistance of trees. *Silva Carelica*, 1990, 15: 61-74.
- [6] Zhang G, A Ryyppö A, Repo T. The electrical impedance spectroscopy of Scots pine needles during cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(3): 385-392.
- [7] Li M R, Liu H X, Wang Y R. Studies on the mechanisms of cell oxidative stress and plant chilling resistance. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 1996, 8(4): 30-34.
- [8] Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 2006, 126(1): 52-61.
- [9] Li Y Q, Xuan W J, Sheng C F. The cold induced proteins in plants. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(5): 1034-1039.
- [10] Liu Q, Nan M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Effect of DREB transcription factors in increasing plant stress resistances. *Chinese Bulletin of Sciences*, 2000, 45(1): 11-16.
- [11] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cisacting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 1994, 6(2): 251-264.
- [12] Jiang C, Iu B, Singh J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(3): 679-684.
- [13] Gilmour S J, Fowler S G, Thomasow M F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(5): 767-781.
- [14] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 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. *The Plant Cell*, 1998, 10(8): 1391-1406.
- [15] Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong C H, Fujii H, Zheng X, Zhu J K. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(49): 37636-37645.
- [16] Haake V, Cook D, Riechmann J L, Pineda O, Thomashow M F, Zhang J Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 639-648.
- [17] Stockinger E J, Mao Y P, Regier M K, Triezenberg S J, Thomashow M F. Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(7): 1524-1533.
- [18] Boyce J M, Knight H, Deyholos M, Openshaw M R, Galbraith D W, Warren G, Knight M R. The *sf76* mutant of Arabidopsis is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *The Plant Journal*, 2003, 34(4): 395-406.
- [19] Ishitani M, Xiong L, Lee H, Stevenson B, Zhu J K. HOS1, a genetic locus involved in cold responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 1998, 10(7): 1151-1161.
- [20] Dong C H, Agrwal M, Zhang Y Y, Xie Q, Zhu J K. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2006, 103(21): 8281-8286.
- [21] Sarah F, Thomashow M F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell*, 2002, 14(8): 1675-1690.
- [22] Carpaneto A, Ivashikina N, Levchenko V, Krol E, Jeworutzki E, Zhu J K, Hedrich R. Cold transiently activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells. *Plant Physiology*, 2007, 143(1): 487-494.
- [23] Stroock J, Diversé-Pierluissi M A. Ca²⁺ Channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Molecular Pharmacology*, 2004, 66(5): 1071-1076.
- [24] Nordin K, Heino P, Palva E T. Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology*, 1991, 16(6): 1061-1071.
- [25] Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, 2002, 14(Suppl): S165-S183.
- [26] Xiong L M, Lee H, Huang R F, Zhu J K. A single amino acid substitution in the *Arabidopsis* FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. *The Plant Journal*, 2004, 40(4): 536-545.
- [27] Abbasi F, Onodera H, Toki S, Tanaka H, Komatsu S. OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(4): 541-552.
- [28] Tahtiharju S, Palva T. Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2001, 26(4): 461-470.
- [29] Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(7): 339-346.
- [30] Wang J W, Ming F, Pittman J, Han Y Y, Hu J, Guo B, Shen D L. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast ω-3 fatty acid desaturase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(4): 1209-1216.
- [31] Zeng Z B, Mei X R, Zhong X L, Li Y Z, Wang T, Wang H Y, Sun L. Acting Pathways of Phospholipase Dα in the Process of Cold Acclimation

- in *Arabidopsis thaliana*. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(4): 703-708.
- [32] Savitch L V, Allard G, Seki M, Robert L S, Tinker N A, Huner N P A, Shinozaki K, Singh J. The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. *PlantCell Physiology*, 2005, 46(9): 1525-1539.
- [33] Sha L N, Guo Z K, Wan X Q, Yan P Q, Liu D, Liu L. Construction of CBF4 gene in plant expression binary vector. *Biotechnology*, 2009, 19(4): 6-9.
- [34] Liu R M, Li F L, Hu G F, Hu B Z. Cold resistance of transgenic tobacco with CBF3 gene. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(1): 119-123.
- [35] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, Salazar M P, Houghton J M, Thomashow M F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *The Plant Journal*, 1998, 16(4): 433-442.
- [36] Zhou L Y, Yang L T, Zheng J Y. Recent progresses in the studies of genetic engineering for cold resistance in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2001, 18(3): 325-331.
- [37] Huang Y F, Wang Q Y, Fu G Y, Zhao R X, Yang Z X. The research on introducing flounder antigreeze protein gene (*afp*) into tomato. *Chinese Biochemical Journal*, 1997, 13(4): 418-422.
- [38] Ma J Z, Liu D, Tang P. Cloning of spinach SAD gene, its construction and transformation to tobacco. *Plant Physiology*, 1996, 111(Suppl 2): 814-814.
- [39] Hu T, Metz S, Chay C, Zhou H P, Biest N, Chen G, Cheng M, Feng X, Radionenko M, Lu F, Fry J. Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(10): 1010-1019.
- [40] Duan Y B, Zhao D G, Zhao F L, Feng Y. Study on the physiological characteristics of isopentenyl transferase (*ipt*) transgenic rice under low temperature stress. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2007, 26(2): 95-98.
- [41] Li T R, Pang Z C, Zhang J Z, Wu Q S, Deng X, Wang Y C. Cold resistance of a new rubber clone Zhanshi 327-13 to chilling injury occurring during Winter-Spring of 2007 to 2008. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2009, 30(11): 1553-1557.
- [42] Liu J, Wang X W, Wei Q P, Lu R Q, Gao Z Q. Achievements and prospects of world cold-resistant grape breeding. *Journal of Fruit Science*, 2004, 21(5): 461-466.
- [43] Lin J X. Achievements and prospect on wine grape breeding for cold resistance in China. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24(1): 89-93.
- [44] Li W, Sun Z H, Zhang W C, Liu D H. Studies on screening freezing resistant regenerated plants from X ray irradiated cotrus protoplasts. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40(8): 729-733.
- [46] Shen H B, Chen X S, Zhang Y M. Advances of the studies on the inheritance and breeding of cold hardiness variety in fruit crops. *Journal of Fruit Science*, 2002, 19(5): 292-297.
- [47] Guo G N, Yan Z L, Zhang S N. Review and outlook of apple breeding in China. *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(2): 127-134.
- [48] Chai M L, Shen D X. Status and prospects of pear breeding in China. *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(5): 379-383.
- [49] Zhang J K, Sang C G, Li J R, Li L, Zhu Y Q. Cold resistance evaluation of apricot cultivars. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-Occidentalis*, 1999, 27(6): 79-84.
- [50] Wang J. Biotechnology and genetic breeding of grapevine. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(8): 2862-2874.
- [51] Gao J J, Qin A G, Yu X C. Effects of grafting on cucumber leaf SOD and CAT gene expression and activities under low temperature stress. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(1): 213-217.
- [52] Taller J, Hirata Y, Yagishita N, Kita M, Ogata S. Graft-induced genetic changes and the inheritance of several characteristics in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(5/6): 705-713.
- [53] Qian X S. A letter from Mr. Qian Xuesen on plant physiology and agriculture. *Plant Physiology Communications*, 1993, 29(6): 458-458.
- [54] Stegemann S, Bock R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*, 2009, 324(5927): 649-651.
- [55] Wei Z W, Fan Z L, Wang H S. Cold acclimation on various types of turfgrasses. *Pratacultural Science*, 1997, 14(3): 60-65.
- [56] Jian L C, Lu C F, Li J H, Li P H. Increment of chilling tolerance and its physiological basis in chilling-sensitive corn sprouts and tomato seedlings after cold-hardening at optimum temperatures. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(8): 971-976.
- [57] Wnag J H, Liang L H, Huang W J, Zhang Z R, Huang H J. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on recovery growth and fruiting of cold injured cashew. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(1): 188-190.
- [58] Chen H G, Wu G L. Relationship between fertilizer application and yield, quality, cold resistance of *Citrus unshiu* Marc. *Fujian Fruits*, 2001, (3): 18-20.
- [59] Sun X C, Hu C X, Tan Q L, Liu J S, Liu H G. Effects of molybdenum on expression of cold-responsive genes in abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways in winter wheat under low-temperature stress. *Annals of Botany*, 2009, 104(2): 345-356.
- [60] Liang Y C, Zhu J, Li Z J, Chu G X, Ding Y F, Zhang J, Sun W C. Role of silicon in enhancing resistance to freezing stress in two contrasting winter wheat cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 64(3): 286-294.
- [61] Liu J P, You M H, Mao K, Zhang X Q. Effects of foliar spray of N and Fe on cold resistance of centipedegrass in late autumn. *Subtropical Plant Science*, 2004, 33(1): 12-15.
- [62] Zhang X F, Jiang X M, Yu X H. Effect of $CeCl_3$ spraying on cold resistance of cucumber seedling. *Journal of Northeast Agricultural University*,

2008, 39(7): 25-28.

- [63] Xu C X, Ma Y P. Advances and review of applied researches on apple drip-irrigation. *Journal of Nanjing Agricultural Technology College*, 2000, 16(4): 32-39.
- [64] McLanughlin S B, Wimmer R. Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytologist*, 1999, 142(3): 373-417.
- [65] González-Aguilar G A, Tiznado-Hernández M E, Zavaleta-Gatica R, Martínez-Téllez M A. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(3): 694-701.

参考文献:

- [1] 简令成, 王红. 逆境植物细胞生物学. 北京: 科学出版社, 2008: 140-142.
- [7] 李美如, 刘鸿先, 王以柔. 细胞氧化应激机制与植物抗冷性机理的研究. *生命科学*, 1996, 8(4): 30-34.
- [9] 李跃强, 宣维健, 盛承发. 植物的低温蛋白. *生态学报*, 2004, 24(5): 1034-1039.
- [10] 刘强, 南明, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. *科学通报*, 2000, 45(1): 11-16.
- [31] 曾正兵, 梅旭荣, 钟秀丽, 李玉中, 王涛, 王海燕, 孙磊. 磷脂酶 D α 在拟南芥低温驯化过程中的作用途径分析. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(4): 703-708.
- [34] 刘荣梅, 李凤兰, 胡国富, 胡宝忠. 转 CBF3 基因烟草的抗寒性研究. *东北农业大学学报*, 2011, 42(1): 119-123.
- [36] 周丽英, 杨丽涛, 郑坚瑜. 植物抗寒冻基因工程研究进展. *植物学通报*, 2001, 18(3): 325-331.
- [37] 黄永芬, 汪清胤, 付贵荣, 赵荣祥, 杨志兴. 美洲拟鳞抗冻蛋白基因 (*afp*) 导入番茄的研究. *中国生物化学与分子生物学学报*, 1997, 13(4): 418-422.
- [40] 段永波, 赵德刚, 赵丰兰, 冯怡. 低温胁迫下转 *ipt* 基因水稻某些生理特性研究. *山地农业生物学报*, 2007, 26(2): 95-98.
- [45] Li X G, Zhang J X, Sun Z H. Breeding research advances of citrus. *Southern China Fruits*, 2004, 33(3): 19-20, 25-25.
- [41] 李士荣, 庞振才, 张健珍, 吴青松, 邓旭, 王一承. 2007/2008 年冬春寒害中橡胶树新品系湛试 327-13 的抗寒性. *热带作物学报*, 2009, 30(11): 1553-1557.
- [42] 刘军, 王小伟, 魏钦平, 鲁韧强, 高照全. 世界葡萄抗寒育种的成就与展望. *果树学报*, 2004, 21(5): 461-466.
- [43] 林兴桂. 我国酿酒葡萄抗寒育种的回顾与展望. *果树学报*, 2007, 24(1): 89-93.
- [44] 李卫, 孙中海, 章文才, 刘道宏. 柑桔原生质体辐射诱变筛选抗寒再生植株. *植物学报*, 1998, 40(8): 729-733.
- [45] 李新国, 张建霞, 孙中海. 柑桔抗寒育种研究进展. *中国南方果树*, 2004, 33(3): 19-20, 25-25.
- [46] 沈洪波, 陈学森, 张艳敏. 果树抗寒性的遗传与育种研究进展. *果树学报*, 2002, 19(5): 292-297.
- [47] 过国南, 阎振立, 张顺妮. 我国建国以来苹果品种选育研究的回顾及今后育种的发展方向. *果树学报*, 2003, 20(2): 127-134.
- [48] 柴明良, 沈德绪. 中国梨育种的回顾和展望. *果树学报*, 2003, 20(5): 379-383.
- [49] 张军科, 桑春果, 李嘉瑞, 李莉, 朱延庆. 杏品种资源抗寒性主成分分析. *西北农业大学学报*, 1999, 27(6): 79-84.
- [50] 王军. 生物技术与葡萄遗传育种. *中国农业科学*, 2009, 42(8): 2862-2874.
- [51] 高俊杰, 秦爱国, 于贤昌. 低温胁迫下嫁接对黄瓜叶片 SOD 和 CAT 基因表达与活性变化的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(1): 213-217.
- [53] 钱学森. 钱学森先生谈植物生理学与农业的一封信. *植物生理学通讯*, 1993, 29(6): 458-458.
- [55] 魏臻武, 范占炼, 王槐三. 不同类型草坪草的抗寒锻炼. *草业科学*, 1997, 14(3): 60-65.
- [56] 简令成, 卢存福, 李积宏, Li P H. 适宜低温锻炼提高冷敏感植物玉米和番茄的抗冷性及其生理基础. *作物学报*, 2005, 31(8): 971-976.
- [57] 王金辉, 梁宏宏, 黄伟坚, 张中润, 黄海杰. 氮磷钾对寒害腰果植株恢复生长结果的影响. *生态环境学报*, 2010, 19(1): 188-190.
- [58] 陈洪国, 吴高岭. 柑桔配方施肥对产量品质及抗寒性的效应. *福建果树*, 2001, (3): 18-20.
- [61] 刘金平, 游明鸿, 毛凯, 张新全. 秋冬季叶施 N、Fe 提高假俭草坪抗寒性研究. *亚热带植物科学*, 2004, 33(1): 12-15.
- [62] 张险峰, 蒋欣梅, 于锡宏. CeCl₃ 喷施对黄瓜幼苗抗冷性的影响. *东北农业大学学报*, 2008, 39(7): 25-28.
- [63] 徐呈祥, 马艳萍. 苹果滴灌应用研究进展与述评. *南京农专学报*, 2000, 16(4): 32-39.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 32, No. 24 December, 2012 (Semimonthly)
CONTENTS

A bibliometric study of biodiversity research in China LIU Aiyuan, GUO Yuqing, LI Shiyong, et al (7635)

Effects of elevated CO₂ and nitrogen deposition on leaf nutrient quality of *Fargesia rufa* Yi
..... ZHOU Xianrong, WANG Jianhua, ZHANG Hong, et al (7644)

Airborne pollen assemblages and their relationships with climate factors in the central Shaanxi Province of the Loess Plateau:
a case in Xiaheimugou, Luochuan County LÜ Suqing, LI Yuecong, XU Qinghai, et al (7654)

Spatial and temporal change in ecological assets in the Yangtze River Delta of China 1995—2007
..... XU Xibao, CHEN Shuang, YANG Guishan (7667)

Evaluation and optimization of woodland ecological patterns for Qingdao based on the agent-based model
..... FU Qiang, MAO Feng, WANG Tianqing, et al (7676)

Interactive mechanism of service function of alpine rangeland ecosystems in Qinghai-Tibetan Plateau
..... LIU Xingyuan, LONG Ruijun, SHANG Zhanhuan (7688)

Preliminary evaluation of air temperature reduction of urban green spaces in Beijing
..... ZHANG Biao, GAO Jixi, XIE Gaodi, et al (7698)

Resources metabolism analysis for the pulp and paper industry in Wuhan, China
..... SHI Xiaoping, LI Xiaonuo, ZHAO Linjia, et al (7706)

The characteristics and influential factors of direct carbon emissions from residential energy consumption: a case study of Lijiang
City, China WANG Danyin, TANG Mingfang, REN Yin, et al (7716)

Spatial targeting of payments for ecosystem services Based on SWAT Model and cost-benefit analysis
..... SONG Xiaoyu, LIU Yuqing, DENG Xiaohong, et al (7722)

The wind tunnel test of plastic greenhouse and its surface wind pressure patterns
..... YANG Zaiqiang, ZHANG Bo, XUE Xiaoping, et al (7730)

Population quantitative characteristics and dynamics of rare and endangered plant *Davidia involucrata* in Hunan Province
..... LIU Haiyang, JIN Xiaoling, SHEN Shouyun, et al (7738)

Phenotypic diversity in populations of germplasm resources of *Rodgersia sambucifolia* and related species
..... LI Pingping, MENG Hengling, CHEN Junwen, et al (7747)

Effects of sand burial and seed size on seed germination, seedling emergence and growth of *Caragana korshinskii* Kom. (Fabaceae) ...
..... YANG Huiling, LIANG Zhenlei, ZHU Xuanwei, et al (7757)

Population-keeping mechanism of the parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrideridae) of *Massicus raddei*
(Coleoptera: Cerambycidae) in oak forest YANG Zhongqi, TANG Yanlong, JIANG Jing, et al (7764)

Study of mingling based on neighborhood spatial permutation LOU Minghua, TANG Mengping, QIU Jianxi, et al (7774)

Comparison of three regression analysis methods for application to LAI inversion using Hyperion data
..... SUN Hua, JU Hongbo, ZHANG Huaiqing, et al (7781)

Response of seed germination and seedling growth of *Pinus koraiensis* and *Quercus mongolica* to comprehensive action of warming
and precipitation ZHAO Juan, SONG Yuan, SUN Tao, et al (7791)

Impacts of water stored in sapwood *Populus bolleana* on its sap flux DANG Hongzhong, LI Wei, ZHANG Youyan, et al (7801)

Dynamics of greenhouse gases emission and its impact factors by fire disturbance from *Alnus sibirica* forested wetland in
Xiaoxing'an Mountains, Northeast China GU Han, MU Changcheng, ZHANG Bowen (7808)

Different tide status and salinity alter stoichiometry characteristics of mangrove *Kandelia candel* seedlings
..... LIU Biner, LIAO Baowen, FANG Zhanqiang (7818)

Effects of shrub encroachment in desert grassland on runoff and the induced nitrogen loss in southeast fringe of Tengger Desert
..... LI Xiaojun, GAO Yongping (7828)

Community structure and throughfall erosivity characters of artificial rainforest in Xishuangbanna
..... DENG Yun, [TANG Yanlin], CAO Min, et al (7836)

Temporal-spatial variations of net ecosystem productivity in alpine area of southwestern China
..... PANG Rui, GU Fengxue, ZHANG Yuandong, et al (7844)

- Relationships between chemical compositions of *Quercus* species seeds and climatic factors in temperate zone of NSTEC LI Dongsheng, SHI Zuomin, LIU Shirong, et al (7857)
- Effects of simulated acid rain stress on the PS II reaction center and free radical metabolism in leaves of longan LI Yongyu, PAN Tengfei, YU Dong, et al (7866)
- Assessment of organic pollution for surface soil in Shenyang suburbs CUI Jian, DU Jizhong, MA Hongwei, et al (7874)
- The impact of rainfall on soil respiration in a rain-fed maize cropland GAO Xiang, HAO Weiping, GU Fengxue, et al (7883)
- Effects of winter crops on enzyme activity and morphological characteristics of root in subsequent rice crops YU Tianyi, PANG Huancheng, REN Tianzhi, et al (7894)
- Dynamic changes of soil moisture and nitrate nitrogen in wheat and maize intercropping field under different nitrogen supply YANG Ruiju, CHAI Shouxi, MA Zhongming (7905)
- Characteristics of the bird diversity and the impact factors in Weishan Lake YANG Yuewei, LI Jiuen (7913)
- The effect of cropping landscapes on the population dynamics of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in the northern Xinjiang LU Zhaozhi, PAN Weilin, ZHANG Xin, et al (7925)
- The seasonal variations of nitrogen and phosphorus release and its fluxes from the sediments of the Beili Lake in the Hangzhou West Lake LIU Jingjing, DONG Chunying, SONG Yingqi, et al (7932)
- Optimization of lake model salmo based on real-coded genetic algorithm GUO Jing, CHEN Qiuwen, ZHANG Xiaoqing, et al (7940)
- The influence of climatic environmental factors and fishing pressure on changes of hairtail catches in the northern South China Sea WANG Yuezhong, SUN Dianrong, CHEN Zuozhi, et al (7948)
- Seasonal and spatial distribution of acid volatile sulfide in sediment under different mariculture types in Nansha Bay, China YAN Tingru, JIAO Haifeng, MAO Yuze, et al (7958)
- Review and Monograph**
- Research progress on the mechanism of improving plant cold hardiness XU Chengxiang (7966)
- Influences of vegetation on permafrost: a review CHANG Xiaoli, JIN Huijun, WANG Yongping, et al (7981)
- Home-field advantage of litter decomposition and its soil biological driving mechanism: a review ZHA Tonggang, ZHANG Zhiqiang, SUN Ge, et al (7991)
- Research progress on the relationship of pollutants between road-deposited sediments and its washoff ZHAO Hongtao, LI Xuyong, YIN Chengqing (8001)

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的生态学专业性高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,300 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

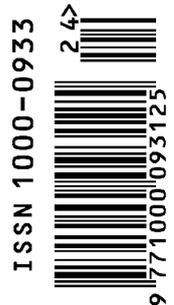
第 32 卷 第 24 期 (2012 年 12 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 24 (December, 2012)

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel: (010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail: journal@espg.net	Distributed by	Science Press Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel: (010)64034563 E-mail: journal@espg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add: P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元