

渗透调节物质在植物抗寒基因工程的应用

张文玲, 陈凌 (重庆三峡职业学院, 重庆 404155)

摘要 提高农作物的抗寒性具有重要的现实意义, 文中综述了渗透调节物质对提高植物抗寒能力的作用原理以及有关基因导入植物的研究进展, 包括导入甜菜碱基因、脯氨酸基因、海藻糖相关基因等, 并指出了研究中存在的问题及可能的解决策略。

关键词 抗寒; 渗透调节物质; 基因工程

中图分类号 S426 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)14-06152-03

Improving the Cold-resistance of Plants with Osmoprotectant Genetic Engineering

ZHANG Wen-ling et al (Chongqing Three Gorges Vocational College, Chongqing 404155)

Abstract Improving cold-resistance of agricultural crops has important practical significance. The principle of improving the cold-resistance of plants with osmoprotectant were reviewed, as well as research advances of related genes transferred into plants, including betaine gene, proline gene, trehalose gene and so on. The existing problems in the research and possible solutions were pointed out.

Key words Cold resistance; Osmoprotectant; Genetic engineering

温度是植物正常生长的必要条件, 而低温对植物产生的危害分别称为冷害和冻害, 统称为寒害。冷害是指零上低温对植物的伤害; 冻害是指零下低温引起植物体组织细胞内的水发生冰冻而造成的伤害^[1]。传统降低低温伤害造成的损失主要手段有: ①人为保护, 如增加防寒设施, 但成本相对较高; ②运用传统手段, 但周期长, 进展缓慢; ③外源调节, 如喷施 ABA、氯化钙等试剂, 但存在残留安全问题。随着植物抗寒分子机制研究的不断深入和基因工程技术的发展, 利用转基因技术将抗寒基因导入栽培品种, 已成为提高植物抗寒性的最有效手段。

低温对植物的影响主要在于对细胞膜的伤害、细胞蛋白质变性及渗透胁迫^[2]。植物抗寒基因工程主要有 2 方面的研究: 一是导入调控功能基因, 包括抗冻蛋白、抗渗透胁迫相关基因、脂肪酸去饱和和代谢关键酶基因及抗氧化酶活性基因等; 二是导入抗寒调控基因包括转录因子 CBF 等。文中综述了渗透调节物质在抗寒调节中的作用机理及其在抗寒基因工程中的研究进展, 分析了其中可能存在的问题并对其发展前景进行了展望。

1 渗透调节物质抗寒调节机理

盐碱、低温、干旱、水涝是影响植物生长和生产力最主要的非生物胁迫因子。植物生长在渗透胁迫条件下, 其细胞在渗透上有活性和无毒害作用的主动净增长过程叫做渗透调节。植物在长期进化过程中产生了一些小分子细胞相容性物质, 用以在逆境中调节细胞浓度, 降低渗透势, 维持适当的水含量, 保护蛋白质和膜系统, 维持植物体细胞的正常生长和生命活动, 这类物质即渗透调节物质。自然界的渗透调节物质主要包括 3 类: ①游离是氨基酸及其衍生物, 如脯氨酸等; ②季铵类化合物, 如甜菜碱和磷酸胆碱等; ③糖醇类化合物, 如甘露醇、山梨醇和海藻糖等^[3]。

目前, 渗透调节物质已在提高植物抗寒性的试验中广泛应用, 其对低温胁迫下植物的生理作用也得到了进一步的

改善。

1.1 渗透调节物质对活性氧产生的调节 氧作为植物体内重要的电子受体参与多项生命活动, 并提供能量, 但同时自身也会被活化, 形成对细胞有伤害的活性氧。活性氧是指超氧化物的阴离子氧(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基($-OH$)。这种活性氧是涉及电子传递的生化过程中产生的一种正常的代谢产物, 但它必须及时被除去, 否则会引起膜脂的过氧化作用、DNA 的破坏和蛋白质的变性, 以及膜脂肪酸不饱和度的降低, 从而导致细胞损伤甚至死亡^[4]。植物体内产生的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等酶系统可主动清除活性氧, 对胁迫造成的活性氧积累作出积极反应。线粒体是产生活性氧的主要场所, 呼吸作用的氧气自氧化, 转化成超氧 O_2^- , 在 SOD 酶的作用下被还原成 H_2O_2 , 在 POD 和 CAT 的作用下转变成无毒害作用的 H_2O 和 O_2 。

在低温条件下, 清除酶活性降低, 并使抗氧化剂和其他保护性物质含量和活性下降, 电子传输系统被破坏, 从而打破活性氧低水平的动态平衡, 导致活性氧的积累, 造成膜脂、蛋白质和核酸的过氧化性伤害。

Smirnoff 等^[5]发现甘露醇、山梨醇、脯氨酸等均是 $-OH$ 的有效清除剂, 可通过清除 $-OH$ 而使植物免受氧化伤害。Park 等^[6]发现, 转甜菜碱合成酶基因番茄在 3℃低温处理后甜菜碱的积累与 H_2O_2 含量呈负相关, 与过氧化氢酶含量呈正相关, 说明甜菜碱的合成有利于去除过氧化物毒害。苏文潘等^[7]发现甜菜碱对 7℃低温处理的香蕉幼苗叶片具有保护作用, 可减少 SOD、POD 活性的下降幅度, 并提高 CAT 的活性, 从而提高了香蕉幼苗的抗冷能力。

1.2 渗透调节物质对膜系统的保护 生物膜是细胞的基本结构, 各细胞器都是由生物膜构建而成的膜系统。细胞膜的流动性和稳定性是细胞乃至整个植物体赖以生存的基础。行使光合作用的叶绿体和行使呼吸作用的线粒体均属于此类膜系统。

低温干旱可导致植物体内的生化和生理变化, 包括脂质、蛋白质、碳水化合物成分的改变。在细胞受害过程中, 膜

作者简介 张文玲(1984-), 女, 山西大同人, 讲师, 硕士, 从事花卉遗传育种方面的研究, E-mail: 307564459@qq.com。

收稿日期 2013-04-16

最易受到冻害和脱水的伤害。

Demel 等^[8]发现在有水条件下,果聚糖与磷脂可相互作用,从而认为果聚糖可通过直接与膜相互作用来保护植物不受到脱水的伤害。Gorham 等^[9]发现甜菜碱可在极端温度下保护细胞膜的稳定性,防止膜的过氧化损伤,Coughlan 等^[10]发现甜菜碱可保护菠菜类囊体膜抵御冰冻胁迫。王超等^[11]发现在低温胁迫下,甜菜碱有利于维持类囊体膜脂不饱和脂肪酸的相对含量,维持类囊体膜蛋白(或蛋白复合体)的含量和相对活性,有利于保持类囊体膜的流动性、缓解叶片光抑制、提高光保护作用从而改善叶绿体的光合功能。

1.3 渗透调节物质对蛋白质的保护 低温胁迫会引起蛋白质的解联合变性,从而导致其功能的故障和失活。抗寒性强的植物一般积累较多的可溶性糖、蔗糖、果胶糖和海藻糖,它们对防止脱水后的蛋白质变性具有保护作用。在低温条件下,很多渗透胁迫物质质量分数的变化也会引起代谢酶的变化,并促进植物的抗胁迫生长。汤章城等^[12]发现当植物细胞受到逆境胁迫时,脯氨酸可通过保护生物大分子的功能结构,为生化反应提供足够的自由水和酶类等活性物质,从而保护植物度过逆境。Mohanty 等^[13]发现甜菜碱通过保持光系统 II 复合体蛋白的稳定性来保持盐胁迫、极端温度下光系统的活性。

1.4 渗透调节物质对细胞渗透的调节 在低温胁迫下,冷敏感植物根细胞的吸水能力急剧降低,ABA 的合成和运输受到抑制,叶片气孔关闭能力减弱,从而造成水分丢失,植株萎蔫。

渗透调节物质可降低植物体内水势,增强吸水,维持水分平衡,缓解低温脱水造成的渗透胁迫。汤章城等^[12]用高粱幼苗证明外源脯氨酸可解除高等植物的渗透胁迫。Nguyen 等^[14]发现转甜菜碱合成酶基因的水稻对水分缺乏及渗透胁迫的抗性显著提高。Van 等^[15]发现果聚糖的聚合度能减少低温下的细胞膜渗漏。

另外,研究发现渗透调节物质在低温胁迫中可有效的维持细胞膨压,减轻组织受损离子外渗,并对 PSII 放氧中心结构的选择性保护、保持细胞生长、气孔开放调节和光合作用等生理过程的进行都有积极的作用。

2 渗透调节物质在植物抗寒基因工程的应用

随着人们对渗透胁迫物质的认识和相关基因的克隆,利用基因工程手段将关键基因导入烟草、拟南芥等模式植物中进行研究,在低温胁迫中,受体植物合成少量的渗透调节物质,但转基因植物的抗逆境能力显著提高(表 1)。

2.1 甜菜碱 甜菜碱是高等植物重要的渗透调节物质,在调节植物对环境胁迫的适应性,提高植物对各种胁迫因子抗性等方面具有重要的生理作用。有很多常见作物中,如番茄、水稻等自身并不合成甜菜碱,通过遗传转化的手段将甜菜碱合成基因导入,可改善作物的抗寒性。甜菜碱是以胆碱为底物经过两步酶的催化氧化生成,即:

胆碱→甜菜碱醛→甜菜碱

在高等植物中催化第 1 步反应的是胆碱氧化酶(CMO)、

催化第 2 步反应的是甜菜碱醛脱氢酶(BADH)。

Park 等^[6]将菠菜中的胆碱氧化酶基因 *codA* 导入本身不合成甜菜碱的番茄植株,发现转基因植株中的叶片、种子、根尖、雌蕊、花药、花瓣、萼片、茎尖中均有甜菜碱的合成,月含量均为 0.1~0.3 $\mu\text{mol/gow}$ 。结果表明,幼苗的抗冷能力和种子的萌发能力较野生番茄明显提高了 30%,3 $^{\circ}\text{C}$ 处理后,转化株叶片、花序、幼果与野生植株相比,伤害大幅减轻,低温胁迫下的产量也较野生型增加 10%~30%。Huang 等^[16]将细菌的胆碱氧化酶基因 *COM* 分别转入拟南芥、烟草、油菜中,获得高甜菜碱水平的植株(拟南芥中 613 $\mu\text{mol/gow}$,油菜中 250 $\mu\text{mol/gow}$,烟草中 80 $\mu\text{mol/gow}$,转化株甜菜碱的积累提高了植株的抗寒性,并且有助于吸胀萌发及幼苗早期生长对低温的忍耐性。Jin 等^[17]将细菌的胆碱氧化酶基因 *COM* 连接一个脱落酸的启动子后转入水稻,提高了水稻叶片中的甜菜碱浓度,且转基因植株对盐和低温都有较强的忍耐性。Hayashi 等^[21]将细菌胆碱氧化酶基因 *CodA* 连接 35S 启动子转入拟南芥中,发现转化株的萌动种子和幼苗对低温有较好的耐受性,植株在冷胁迫下叶片失绿较轻。

2.2 脯氨酸 脯氨酸是水溶性很大的氨基酸,具有较强的水合能力。在植物受到低温胁迫时,脯氨酸的积累有利于提高植物抗寒性。Nanijo 等^[22]将脯氨酸脱氢酶(脯氨酸降解的关键酶)反义基因 *AtproDH* 的 cDNA 成功转入拟南芥中,转基因植株的脯氨酸积累明显高于野生植株,抗冻性得到提高。Deirdre 等^[23]将豇豆中脯氨酸合成酶基因 *P5CS* 以农杆菌介导的方法转入落叶松中,得到转基因植株的脯氨酸含量比未转基因的对照植株高 30 倍,且 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温下转基因植株在低温下的生长率大幅高于野生植株,抗冻能力增强。Parvanova 等^[24]发现转脯氨酸合成酶基因的烟草可耐 -2 $^{\circ}\text{C}$ 的低温,而对照全部死亡。

2.3 海藻糖 海藻糖是一种非还原二糖,广泛存在于海藻、酵母、霉菌、食用菌、虾、昆虫及高等植物生物体内,具有保护生物细胞核生物活性物质在脱水、干旱、高温、冷冻及有毒试剂等不良环境条件下活性免遭破坏的功能。In-Cheo 等^[27]将大肠杆菌中编码 6-磷酸海藻糖合成酶的基因 *TPS1* 和编码 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶的基因 *TPP* 融合成 TPSP,用玉米 *Ubi1* 作为启动子转化水稻,获得的转基因水稻海藻糖含量达较高水平(1.076 mg/g),且能耐受干旱、盐、低温等胁迫。

2.4 果聚糖 果聚糖解聚能释放大量可降低组织水分冰点的游离果糖,而果糖位于液泡之中,从而起到液泡渗透缓冲剂和低温防护剂的作用。王关林等^[25]将枯草芽孢杆菌的果聚糖合成酶基因 *SacB* 置于 *CaMV35S* 启动子的调控下转入番茄中,通过抗冻试验、叶片电导率测定、多糖含量测定,表明果聚糖赋予了番茄良好的抗寒性状,受到 0 $^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫的转基因植株仍可正常生长,并大量结果,而对照出现冻害黄化,未能开花结果。转基因番茄果实 -5 $^{\circ}\text{C}$ 的冷冻下也可保持食用价值。Sevenier 等^[26]将 *SacB* 基因转入甜菜中,也发现转基因植株细胞内高聚合度的果聚糖含量增加,转基因植株表现良好的抗寒特性。

助选择和基因组选择策略聚合微效抗性基因,将更加充分和有效地利用望水白和苏麦3号等一批赤霉病抗性优良的种质资源。尤其是在小麦基因组测序^[36]后,大规模高通量分子标记的开发,使赤霉病抗性基因的定位和克隆更加简单,尤其是针对特定性状的定向基因组选择也将更加有效。

参考文献

[1] 全国小麦赤霉病研究协作组. 小麦品种资源抗赤霉病性鉴定研究[J]. 作物品种资源,1984(4):2-7.

[2] 王玉,张其昌. 小麦品种资源赤霉病抗源鉴定筛选[J]. 湖北农业科学,1985(8):20-22.

[3] 刘宗镇,汪志远,赵文俊. 小麦品种资源抗赤霉病性研究[J]. 上海农业学报,1985,1(2):75-84.

[4] 黄昌,牟建梅,刘敬阳,等. 小麦赤霉病抗性鉴定和新抗源筛选[J]. 江苏农业科学,2000(2):24-28.

[5] 周森平,任丽娟. 3B染色体短臂小麦赤霉病抗性主效QTL的分析[J]. 遗传学报,2003,30(6):571-576.

[6] CUTHBERT P A, SOMERS D J, THOMAS J, et al. Fine mapping Fhb1, a major gene controlling *Fusarium* head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 1465-1472.

[7] CUTHBERT P A, SOMERS D J, BRULE-BABLE. Mapping of Fhb2 on chromosome 6BS: a gene controlling *Fusarium* head blight field resistance in bread wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114: 429-437.

[8] 陆成彬,程顺和,吴荣林,等. 扬麦13抗赤霉病品系的分子标记辅助选育[J]. 麦类作物学报,2010,30(6):1058-1064.

[9] 张鹏,王磊,杨学明,等. 幼胚培养与标记辅助选择培育抗赤霉病小麦新种质[J]. 江苏农业科学,2012,40(11):70-71.

[10] 高凤梅,邵立刚,王岩,等. 春小麦赤霉病主效抗性基因的 SSR 分子检测与应用研究[J]. 黑龙江农业科学,2012(11):15-20.

[11] MA H X, BAI G H, ZHANG X, et al. Main effects, epistasis and environmental interactions of quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in a recombinant inbred population [J]. Phytopathology, 2006, 96(5):534-541.

[12] 周森平,任丽娟,张旭,等. 小麦赤霉病抗性 QTL 分析[J]. 作物学报,2004,30(8):739-744.

[13] 张旭,任丽娟,周森平,等. 三个小麦赤霉病抗源的抗性 QTL 定位[J]. 麦类作物学报,2006,26(3):28-33.

[14] 陆维忠. 小麦赤霉病抗性分子标记的筛选及其利用[J]. 江苏农业学报,2011,27(2):243-249.

[15] 张勇,程顺和,马有志,等. 小麦抗赤霉病基因的 SSR 标记筛选[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2004,25(4):12-16.

[16] MA H X, ZHANG K M, GAO L, et al. Quantitative trait loci for resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Wangshuibai wheat under field conditions [J]. Plant Pathology, 2006, 55: 739-745.

[17] 李友芳,余毓君. 小麦品种温州红和尚对赤霉病抗性指标的单体分析[J]. 华中农业大学学报,1988,7(4):327-331.

(上接第6154页)

[20] KISHITANI S, TAKANAMI T, SUZUKI M, et al. Compatibility of glycine-betaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase form balley [J]. Plant Cell Environ, 2000, 23: 107-114.

[21] HAYASHI A H, CHEN T H H. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis during germination and early growth [J]. Plant Cell Environ, 1998, 21(2):232.

[22] NANIJO T, KOBAYASHI M, YOSHIDA Y. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Letter, 1999, 461: 205-221.

[23] DEIRDRE GLEESON, MARIE-ANNE LELU-WALTER, MICHAEL PARKINSON. Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost [J]. Molecular Breeding, 2005, 15: 21-29.

[24] PARVANOV D, POPOVA A. Low temperature tolerance of tobacco plants transformed to accumulate proline, fructans or glycine betaine. Variable chlorophyll fluorescence evidence [J]. Photosynthetica, 2004, 42(2):179

[18] 余毓君. 平湖剑子麦、洪湖大太宝、崇阳红麦、延岗坊主、万年2号抗赤霉病性基因分析[J]. 作物学报, 1991, 17(4): 248-254.

[19] WAN Y F, YEN C, YANG J L. The diversity of head-scab resistance in *Triticaceae* and their relation to ecological conditions [J]. Euphytica, 1997, 97: 277-281.

[20] 王耀南,陈佩度,刘大钧,等. 巨大冰麦草种质转移给普通小麦的研究. I 普通小麦(巨大冰麦草)F1的产生[J]. 南京农业大学学报,1986(9):10-14.

[21] 杨艳萍,陈佩度. 普通小麦与鹅冠草属间杂种F1及BC1的分子细胞遗传学、育性和赤霉病抗性研究[J]. 遗传, 2009, 31(3): 290-296.

[22] MUJEEB-KAZI A, RODRIGUEZ R. An intergeneric hybrid of *Triticum aestivum* L. $\times$ *Elymus giganteus* [J]. J Hered, 1981, 72(4): 253-256.

[23] CHEN P D, LIU W X, YUAN J H, et al. Development and characterization of wheat-Leymus racemosus translocation lines with resistance to *Fusarium* head blight [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 941-948.

[24] 王林生,陈佩度. 抗赤霉病普通小麦-大赖草端二体代换系7Lr#1S(7A)的选育及减数分裂行为分析[J]. 科学通报, 2008, 53(20): 2493-2499.

[25] 崔承齐,王林生,陈佩度. 普通小麦-大赖草易位系T7BS·7Lr#1S和T2AS·2AL-7Lr#1S的分子细胞遗传学鉴定[J]. 作物学报, 2013, 39(2): 191-197.

[26] 翁益群,刘大均. 鹅观草(*Roegneria C. Koch*)与普通小麦(*Triticum aestivum* L.)属间杂种F1的形态、赤霉病抗性和细胞遗传学研究[J]. 中国农业科学, 1989, 22(5): 1-8.

[27] 马鸿翔,陆维忠. 小麦赤霉病抗性改良研究进展[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 197-203.

[28] 刘登才,郑有良,王志容,等. 影响小麦赤霉病抗性的 *Lophopyrum elongatum* 染色体定位[J]. 四川农业大学学报, 2001, 19(3): 200-205.

[29] JAUHAR P P, PETERSON T S, XU S S. Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to *Fusarium* head blight [J]. Genome, 2009, 52(5): 467-483.

[30] 胡忠,杨增明,王均. 天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性[J]. 云南植物研究, 1988, 10(4): 373-380.

[31] 周森平,杨学明,姚金保,等. 转 *Gastrodin* 基因提高小麦赤霉病和纹枯病的抗性[J]. 作物学报, 2012, 28(9): 1617-1624.

[32] 叶兴国,SHIRLEY SATO,徐惠君,等. BCL, RIP 细胞凋亡基因向小麦中的导入和赤霉病抗性鉴定[J]. 作物学报, 2005, 31(11): 1389-1393.

[33] 叶兴国,程红梅,徐惠君,等. 转几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶双价基因小麦的获得和鉴定[J]. 作物学报, 2005, 31(5): 583-586.

[34] DONG N, LIU X, LU Y, et al. Over expression of *TaPIEP1*, a pathogen-induced *ERF* gene of wheat, confers host-enhanced resistance to fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* [J]. Funct Integr Genomics, 2010, 10(2): 215-226.

[35] 刘欣,蔡士宾,张伯桥,等. 抗纹枯病、赤霉病的转 *TaPIEP1* 基因小麦的分子鉴定与选育[J]. 作物学报, 2011, 37(7): 1144-1150.

[36] RACHEL BRENCHELEY, MANUEL SPANAGL, MATTHIAS PFEIFER, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing [J]. Nature, 2012, 491: 705-710.

-185.

[25] 王关林,李铁松,方宏筠,等. 番茄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.

[26] SEVENIER R, HALL R D, VANDER MEER I M, et al. High level fructan accumulation in transgenic sugar beet [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 843-846.

[27] JANG, 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.

[28] PENNYCOOKE J C, JONES M L, STUSHNOFF C. Down-regulating a-galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia [J]. Plant Physiol, 2003, 133: 901-909.

[29] PRABHAVATHI V, YADAV J S, KUMAR P A. Abiotic stress tolerance in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) by introduction of bacterial mannitol phosphodehydrogenase gene [J]. Molecular Breeding, 2002, 9(2): 137-147.