

2015年度“中国生命科学领域十大进展”：水稻感受和抵御低温的机制研究



◀ 牵头科学家种康,中国科学院植物研究所研究员,中国科学院大学教授,现任中国科学院植物研究所副所长,中国植物学会副理事长,国际植物生物技术联合会中国联络人。国家杰出青年科学基金获得者,入选中国科学院“百人计划”、“新世纪百千万人才工程”国家级人选。

中国科协生命科学学会联合体:近年来全球气候变化导致的异常气温频发,直接威胁水稻的生产。了解水稻如何感知和适应低温环境将有助于国家粮食安全。中国科学院植物研究所种康研究组与中国水稻所钱前研究员等合作发现水稻感受低温的关键基因 *COLD1*。该基因编码一个9次跨膜的G-蛋白信号调节因子,定位于细胞质膜和内质网。遇冷时 *COLD1* 与G-蛋白 $\alpha$ 亚基RGA1 互作,激活  $Ca^{2+}$ 通道、触发下游耐寒防御反应。这是国际上首次报道的植物低温感受器,揭示了人工驯化赋予粳稻耐寒性的生物学机制,对于水稻耐寒性的分子设计改良有重要的指导意义和潜在的应用前景。本研究成果在2015年3月《Cell》杂志上以封面文章发表。

# 植物感知季节变换的机制

郭晓玉, 徐云远, 刘栋峰, 罗伟, 种康

中国科学院植物研究所, 北京 100093

## 1 温度是季节变换的重要标志

季节更迭的根本原因是地球的自转轴与其公转轨道平面不垂直,在不同的季节,南北半球所受到的太阳光照不相等。由于南北半球所受到光照的不同,导致了不同纬度的地区温度的差异。太阳直射的纬度地区,温度高,相反温度低。夏季是平均气温在22℃以上的连续时期,冬季是平均气温在10℃以下的连续时期。春季和秋季是介于10~22℃的时期。可以看出,温度是季节变换的重要标志,按照温度划分了一年四季(图1)。

春分时,太阳直射赤道,至此之后太阳直射北移,全球昼夜几乎等长(除极点附近以外)。春分时,全球无极昼极夜现象。春分之后,北极附近开始极昼,范围渐大;南极附近极昼结束,极夜开始,范围渐大。

夏至太阳几乎直射北回归线,北半球白昼最长,北极圈及其以北的地区太阳整日不落,形成面积最大的极昼区。此日过后,阳光直射位置向南移动,北半球白昼逐渐缩短,日出、日落的方位也开始往南移动。在北回归线及其以北地区,正午太阳高度亦日渐降低,日影逐渐被拉长。但由于太阳辐射到地面的能量仍比地面向空中发散的多,所以在短时间内气温继续升高。阳光几乎直射赤道,此后太阳直射点继续南移。

秋分时,全球昼夜等长。秋分之后,北半球各地昼渐短夜渐长,南半球各地昼渐长夜渐短。秋分时,全球无极昼极夜现象。秋分之

后,北极附近极夜范围渐大,南极附近极昼范围渐大。

冬至时太阳几乎直射南回归线,北半球白昼最短,北极圈呈永夜状态,南极圈呈极昼状态,其后阳光直射位置向

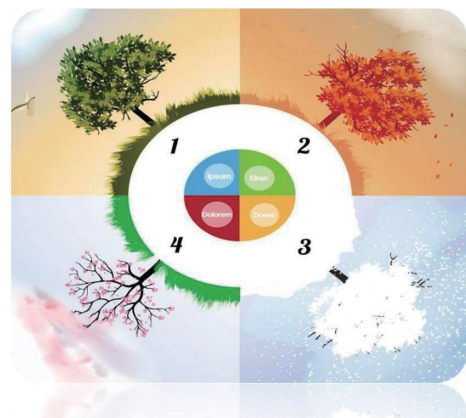


图1 温度是季节变换的重要标志  
(图片来源: <http://www.58pic.com/tupian/yusiji05shushiliangsucai.html>)

引用格式: 郭晓玉, 徐云远, 刘栋峰, 等. 植物感知季节变换的机制[J]. 科技导报, 2016, 34(13): 46-52; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.13.007

北移动,北半球白昼时数日渐增长,正午太阳高度也日渐升高,日影逐渐缩短。由于太阳辐射到地面的能量仍比地面向空中发散的少,所以在短时间内气温继续降低。

## 2 植物的进化与起源

随着地球上自然地理环境的变迁,植物界自身在不断的矛盾中运动和发展着。在一定的地质时期中占支配地位的类型,其优势在发展过程中被较为进化的另一类植物所取代,这时植物界就发生了质的变化,进入了一个新的发展阶段。一些类群的自然绝灭常伴随着新类群的形成,植物界的发展过程就是这样从低级向高级、从简单到复杂,不断地变化。

菌藻植物时代是指从35亿年前开始到4亿年前(志留纪晚期)近30亿年的时间,地球上的植物仅为原始的低等菌类和藻类。其中从35—15亿年为细菌和蓝藻独霸的时期,常将这一时期称为细菌-蓝藻时代。从15亿年前开始才出现了红藻、绿藻等真核藻类。

蕨类植物时代指的是从4亿年前由一些绿藻演化出原始陆生维管植物,即裸蕨。它们虽无真根,也无叶子,但体内已具维管组织,可以生活在陆地上。在3亿多年前的泥盆纪早、中期它们经历了约3千万年的向陆地扩展的时间,并开始朝着适应各种陆生环境的方向发展分化,此时陆地上已初披绿装。裸蕨植物在泥盆纪末期已绝灭,代之而起的是由它们演化出来的各种蕨类植物。至二叠纪约1.6亿年的时间,它们成了当时陆生植被的主角。许多高大乔木状的蕨类植物很繁盛,如鳞木、芦木、封印木等。

裸子植物时代是从二叠纪至白垩纪早期,历时约1.4亿年。许多蕨类植物由于不适应当时环境的变化,大都相继绝灭,陆生植被的主角则由裸子植物所取代。最原始的裸子植物(原裸子植物)也是由裸蕨类演化出来的。中生代为裸子植物最繁盛的时期,故称中生代裸子植物时代。

被子植物是从白垩纪迅速发展起

来的植物类群,并取代了裸子植物的优势地位。直到现在,被子植物仍然是地球上种类最多、分布最广泛、适应性最强的优势类群。纵观植物界的发生发展历程,可以看出整个植物界是通过遗传变异、自然选择(人类出现后还有人工选择)而不断地发生和发展的,并沿着从低级到高级、从简单到复杂、从无分化到有分化、从水生到陆生的规律演化。新的种类在不断产生,不适应环境条件变化的种类不断死亡和绝灭,这条植物演化的长河将永不间断,永远不会终结。

## 3 作物的进化

目前世界上被人们所栽培的植物约1500种,包括食用作物、特用作物、杂用作物等。农作物是由野生植物经过人类不断的选择、驯化、利用、演化而来的具有经济价值的被人们所栽培的一切植物。

广义上农作物可分为大田作物、园艺作物、林木3类,包括所有栽培植物,如大田作物、果树、蔬菜、观赏和药用植物、林木等。狭义上农作物专指大田作物(field crops),即在田间进行大面积栽培的农艺作物,包括粮、棉、油、麻、丝、茶、糖、烟和饲料等。

人类栽培作物推测有一万多年。据Helbaek在1959年发表文章称,伊拉克北部Jarmo所发现的素烧陶罐上所附着的谷类种子或小穗痕迹,经放射性碳同位素测定其年代在7000年以前。

西欧地区借由花粉分析的方法,推断西欧大部分地区在冰期后期,即距今8000年前,才开始有人类迁入。由湖泊沉积物的花粉图谱显示,新石器时代,最晚在青铜器时代中期之前(西元前1600年)已有谷类栽培的证据。

现今世上所栽培的作物均由野生植物逐渐演进而来。De Candolle《栽培植物的起源》(1882年),记录了共247种作物的发祥地。其后经Vavilov在1951年,以遗传学及植物地理学的方法,发展出遗传中心说(gene center hypothesis),提出8个原始中心,其后修正为10个起源中心。一般认为,玉米起源于北美洲南部,马铃薯和番茄起源于南美洲,橄榄起源于欧洲,大麦、小麦起源于西亚,大豆和水稻起源于中国等(图2)。

水稻(*Oryza sativa*)是世界上最古老的农作物之一,同时也是极富多样性的作物,在全球有成千上万个品种。水稻有2个主要的亚种,籼稻(*Oryza sativa ssp. indica*)和粳稻(*Oryza sativa ssp. japonica*)。籼稻米粒细长,煮熟后容易分开,大多种植在亚热带、热带、低海拔的温暖地区,即不耐低温,需要较高的年积温;粳稻米粒粗短,煮熟后有一定黏性,大多种植在亚热带和热带的高海拔地区以及温带,粳稻对低温有较强的耐受能力,所以他的种植需要较低年积温。印度栽培的水稻几乎都是籼稻,中国却既有籼稻又有粳稻,南方多种籼稻而北方多种粳稻,籼稻和粳稻

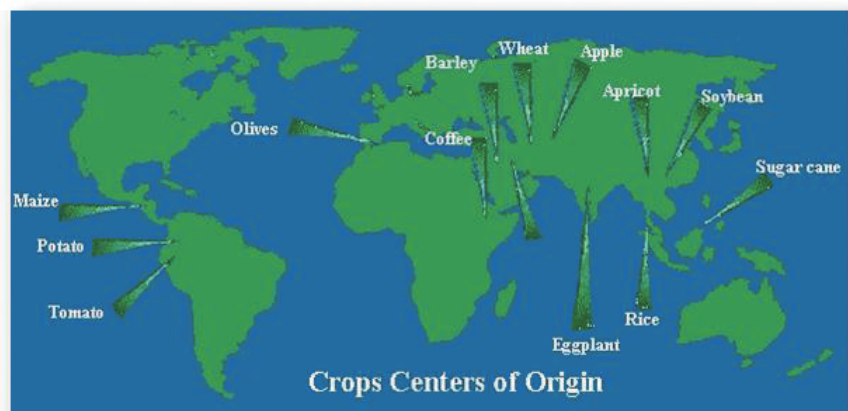


图2 作物的起源

(图片来源: [http://en.citizendium.org/wiki/Crop\\_origins\\_and\\_evolution](http://en.citizendium.org/wiki/Crop_origins_and_evolution))

在中国都培育出了大量品种。比如我们熟知东北大米稻花香为粳稻,泰国香米和超级杂交稻为籼稻。

多起源理论认为:粳稻起源于中国,籼稻起源于印度之后再引种到中国南方。在一段时间内多起源理论模型逐渐为大家所接受。单一起源理论认为:籼稻和粳稻都是起源于中国的野生稻,虽然一开始所有的栽培稻都是粳稻,但在它向印度传播的过程中,不断和野生稻发生无意的杂交,这样便把野生稻中的籼型基因转移到了栽培型粳稻中,最后就形成了籼稻起源于印度的假象。有2个基因的功能研究支持单一起源的理论:控制水稻落粒性的 *SH4* 基因和控制水稻茎直立生长的 *PROG1* 基因,它们在籼稻和粳稻中非常相似,说明水稻只被驯化了1次。

美国多个单位的科学家联合,通过对水稻基因组重测序,追踪其进化的历史。来自纽约大学基因组学和系统生物学中心和生物系、华盛顿大学圣路易斯分校生物系、斯坦福大学遗传学系和珀德尤大学农学系的基因组研究人员共同从事研究,并于2011年5月在美国科学院院刊发表论文,公开他们对630个基因片段重测序后的分析结果,更支持水稻的单一起源理论;认为驯化水稻可能最早出现在大约9000年前的中国长江流域,粳稻和籼稻大约在4000年前发生进化分歧而将彼此区别开来。研究者发现籼稻和粳稻的血缘关系要比它们与任何野生稻间的关系都要近。从而推翻了之前“驯化水稻可能有印度和中国2个起源地”的观点。

#### 4 动植物对高温的响应

动物细胞感知外界刺激后,在神经元之间进行信号的传导。突触前神经元负责合成神经递质,并将其包裹在突触小泡内,在神经元发生冲动时,突触小泡通过胞吐作用,将其中的神经递质释放到突触间隙中。通过扩散作用神经递质分子抵达突触后细胞膜,并与其上的一系列受体通道结合,起到改变通道蛋白构相、激活第二信使( $\text{Ca}^{2+}$ 等)系统等作用,进而导致突触后神经元的电

位或代谢等变化。而植物也有着与动物类似的信号转导机制,对外界的温度变化作出相应的反应(图3)。由于植物生长是固定的不能移动,这使得植物必须迅速和有效地去应对环境中不同的胁迫。温度作为主要的环境因素,对植物的代谢、发育和生长起到非常重要的作用,陆地植物经常暴露在变化幅度较大的环境温度中,所以植物感知和抵御极端环境温度对其正常生长发育起着至关重要的作用。

随着全球变暖,温度不断升高,导致植物生长和作物产量下降,威胁到世界粮食供给。为了生存,植物积极响应环境高温,在高温对自己产生伤害前去激活一系列的防御反应,产生热耐受。热耐受是指有机体应付极度高温的能力,植物同时具有固有的耐热性和后期驯化获得耐热性的能力。获得耐热性可能是受短时间但不致死的高温或温度逐渐升高到致死剂量的高温所诱导。在自然环境下,植物不仅经历定期的和渐进的日常范围内波动的温度,同时也要适应逐渐升高的温度,否则就面临死亡。所以获得耐受性可能反应出植物耐热性的自然机制。

目前为止对植物的耐热性有了很广泛的研究。热激蛋白(HSP)在植物响应热激反应中起到非常重要的作用,叶绿体小分子热激蛋白通过保护光合作用机制增加转基因烟草的耐热性。在烟草中超表达番茄的线粒体小分子热激蛋白(MT-sHSP)能增加转基因烟草的耐热性,反义材料表现出热敏感的表型。水稻 *OsHSP1* (是热激蛋白90家族成员)受热胁迫诱导表达,异源表达 *OsHSP1* 到拟南芥中,能有效增加拟南芥的耐热性。在拟南芥中

*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* 和 *HsfA1e* (热激因子)是响应热胁迫的主要调控因子。但在 *HsfA1* 四突材料中,拟南芥仍具有热适应的能力,但比野生型的耐热性弱。所以在植物细胞中具有2种热胁迫感知机制,依赖 *HsfA1* 的途径和不依赖 *HsfA1* 的途径。

在热激反应中,一些酶类也起到非常重要的作用。通过超表达拟南芥的类受体激酶 *ERECTA* 有效改善水稻和番茄的耐热性。同时,超表达 *ERECTA* 的转基因拟南芥、番茄和水稻的生物量均增加,此发现对通过分子育种培育耐热型作物具有非常重要的意义。用甜辣椒的甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)转化烟草发现类囊体的膜脂饱和程度增加加强了光和系统的稳定性,从而使得转基因烟草耐热性增强。将来自水稻的 *OsHCI1* 在拟南芥中异源表达,能有效提高其获得耐热性。*OsHCI1* 是一个E3连接酶,在高温处理下,在细胞核中积累,通过影响核蛋白的单泛素化和启动核蛋白失活装备,从而调控核基质蛋白的核质囊泡运输,进而加强植物细胞的获得耐热性。ABA处理能有效增加玉米幼苗的耐热性,ABA诱导产生的耐热性是通过调节胞外钙离子内流和抗氧化酶(如SOD、CAT、APX和GPX等)的活性增加,最终诱导玉米幼苗耐热。

植物在感知外界高温时,细胞膜流动性发生改变,影响钙离子通道,导致

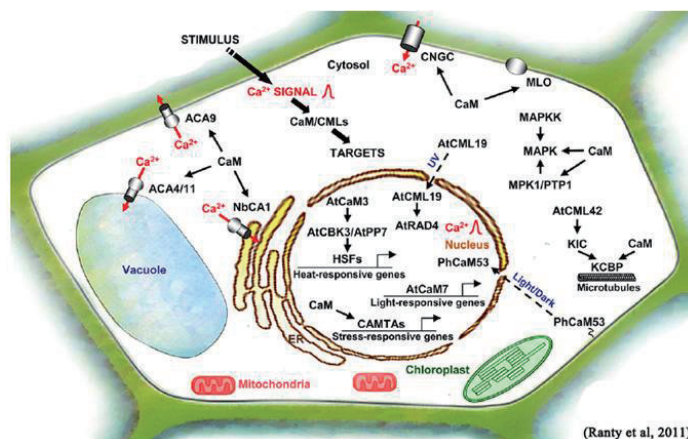


图3 植物对外界温度的感知  
(图片来源:Ranty et al, 2011)

细胞内作为第二信使的钙离子、NO 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等升高,使下游组分如钙调蛋白、丝裂原活化蛋白激酶、分子伴侣热激蛋白 HSP101、HSP90、HSP70 等活性改变,从而起始一系列细胞热耐受反应。

## 5 植物对低温的响应

植物对冷胁迫的感知分为感知瞬时低温胁迫和感知累积低温反应(即春化作用, Vernalization) 2 种。春化作用是指植物体、萌发的种子、幼苗或幼芽持续在低温下较长时期,促进植物开花的过程,春化过程不是全或无,而是一个缓慢的量化过程,该过程积累到一定程度而使植物体内达到某个饱和点后就可以促进开花。春化在分生组织中诱导产生的效应十分稳定,即便是在经过多代细胞的有丝分裂之后仍可以保持,但是减数分裂能解除春化状态,所以冬性一年和两年生植物的每一代以及多年生植物的每一年都需要经过春化。开花受低温影响的植物主要是一些二年生植物(萝卜、白菜、甜菜和风信子等)和一些冬性一年生植物(如冬小麦、冬黑麦等)。冬小麦品种间的春化特性及其与冬春季气温适应程度直接影响其产量。谚语“麦盖三床被,头枕馍馍睡”就是生产上对春化作用充分利用的很好例子,该谚语形容的是冬小麦能被冬天的厚雪覆盖,得到充分的春化,次年肯定能应时地开花结实。

春化作用有明显的特点:1) 春化是个缓慢过程,对于同一个物种的不同生态型对春化作用的需求存在差异;2) 一定时间的春化效果可以被高温所解除;3) 感受春化作用的部位是茎尖的幼叶(或原基);4) 春化作用不能被有丝分裂所解除但经过减数分裂后春化效应即消失。

春化作用这一复杂的生理现象自 20 世纪 20 年代被发现以来,研究者先后从遗传学、生理学和分子生物学方面解释这一生理学现象。20 世纪的研究发现,春化作用使冬小麦体内多种酶的活性发生了改变,随后认为呼吸代谢、核酸代谢也发生了明显的变化,并由此提出了冬小麦春化作用的 5 个阶段的

概念:氧化及氧化磷酸化为主的时期、以脱氢酶活性占优势时期、与核酸代谢密切相关的时期、蛋白质代谢相关的时期和诱导稳定期。

除了在生理水平上对春化的研究,许多科学家在更微观的水平上也对小麦春化作用进行了剖析(图 4)。经过研究发现,在小麦中,春化作用受到多个蛋白的调控,如 VRN1、VRN2、VRN3、VER2 和 GRP2 等。VRN1 (Vernalization-related 1) 能够编码一个类似 FRUITFULL 的 MADS-box 转录因子,该蛋白在小麦春化中起到一个至关重要的作用,能够促进小麦春化作用,未经春化处理时,小麦中的 VRN1 表达量非常低,几乎不存在。随着季节的变化,从秋天到冬天,温度逐渐变低,经过漫长冬天低温的处理,小麦中的 VRN1 表达量大幅上升,同时 VRN1 基因也发生表观修饰对春化作用产生记忆,能够使得小麦在合适的时间顺利地由营养生长转变到生殖生长。很多育种专家根据小麦 VRN1 基因的差异将小麦分成冬小麦和春小麦,在春小麦中不需要低温处理 VRN1 就能够大量表达。VRN3 编码一个 RAF 激酶抑制子类似蛋白,能够正调控 VRN1 从而促进春化作用,VRN2 编码一个具有锌指和 CCT 结构域的蛋白,该蛋白对 VRN3 的表达起到一个抑制作用。在春化之前,VRN2 抑制 VRN3 的表达,此时小麦中

VRN1 很少。从秋天到冬天,随着日长变短 VRN2 表达量有所下降,经过低温处理,VRN1 的表达量大幅度上升,进一步抑制 VRN2 的表达,从而 VRN3 受到的抑制作用得到解除,表达量开始上升,同时 VRN3 又对 VRN1 有一个正反馈的调节作用,所以春化过后,VRN1 处于高度表达的状态。经过春化作用以后,小麦中的 VRN1 和 VRN3 这些促进春化的蛋白大量存在,而抑制因子 VRN2 几乎消失,从而使得小麦能够经过春化作用顺利开花。

凝集素是因其能够与红血球表面糖基结合而将红血球凝聚而得名,它是一类可特异结合单糖或寡聚糖的蛋白质或糖蛋白。凝集素广泛存在于动植物中,在细胞识别和防御反应中扮演着重要的角色,但对其参与动植物生长发育的研究甚少。在 10 多年前曾发现小麦 Jacalin 类凝集素 VER2 参与开花调控的现象,超表达 VER2 能够部分取代春化作用促进开花。VER2 随着春化处理表达量上升,是一个受春化诱导表达的基因,在细胞的核质膜上都有定位。研究表明在单子叶植物冬小麦的春化过程中, Jacalin 类凝集素 VER2 通过识别糖基化修饰的 RNA 结合蛋白 TaGRP2 形成复合物,它们的互作依赖于 TaGRP2 的 O-GlcNAc 修饰和 VER2 的磷酸化修饰。TaGRP2 是一个可以结合 RNA 的蛋白,能够识别并结合春化

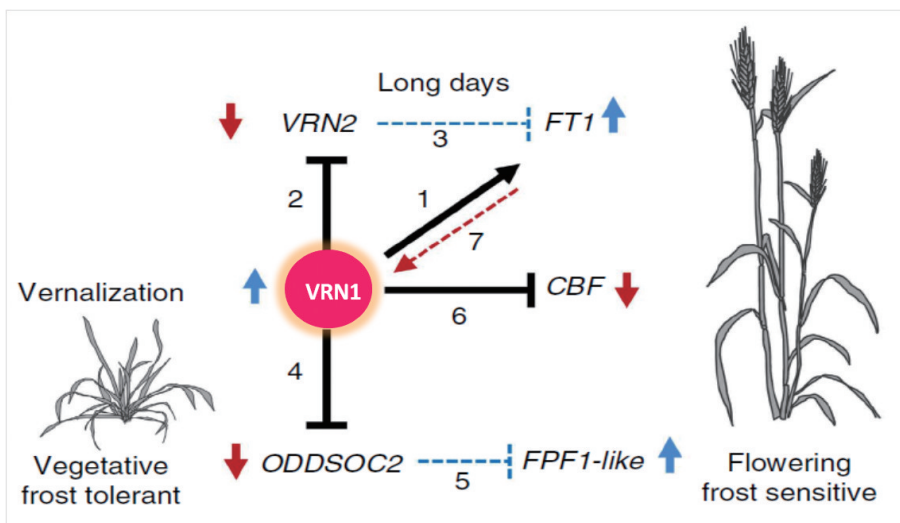


图 4 小麦春化遗传网络感受信号启动

(图片来源: Deng et al, 2015)

关键基因 *TaVRN1* 的 pre-mRNA 的部分序列,进而抑制 *TaVRN1* 的转录表达与开花启动。随着长时间低温处理(春化作用), *TaGRP2* 的 *O*-GlcNAc 修饰水平升高,同时磷酸化形式的 VER2 在春化处理进入细胞核与 *O*-GlcNAc 修饰的 *TaGRP2* 直接作用,将其从细胞核里拉到细胞质中,以解除 *TaGRP2* 对 *TaVRN1* 基因转录的抑制,完成春化开花的启动。近期 Dubcovsky 实验室发现 *VRN1* 被 *TaGRP2* 所结合的区域决定了小麦的春冬性。

但小麦是如何感知春化信号的现在并不清楚。春化信号实际上是低温累积产生的信号,随着低温处理时间的延长,植物逐渐适应这种低温环境,这种适应过程可能是某些代谢的小分子的累积由量变到质变的过程,特别是与能量代谢相关的小分子,如 UDP-GlcNAc。这些小分子能够引起植物体内蛋白质组层面的修饰发生改变,从而使得许多已经存在的蛋白功能多样化,这样一方面节约了能量不用去合成新的功能蛋白,另一方面也能维持一些必需的生长发育事件继续进行。所以植物非常聪明,能够利用最少的原料产出最大的收益,使得自身利益最大化。之前的研究表明糖能部分代替春化,促进植物开花,在植物开花过程中起到重要的作用。糖的具体作用,可能和提高原生质黏度,改变生物体的内部环境,有利于低温下生化反应的进行,为以后的生命活动提供大量的 ATP 和各种各样的中间代谢产物等有关。糖代谢的中间代谢产物是多样化的,其中 UDP-GlcNAc 就是其中一员。本实验室之前的研究表明冬小麦在春化处理 35 d 后 *O*-GlcNAc 修饰的蛋白显著增加。未来对 *O*-GlcNAc 信号的研究可能在解析小麦感知春化信号机制中起到重要的作用。

对低温的响应方面,水稻和小麦完全不同,小麦对低温有很强的偏好性,而水稻起源于热带和亚热带地区,对环境低温胁迫非常敏感,尤其是苗期和孕穗期。植物受到一段时间的低温刺激后,为了减少自身的损伤,可以更好地

适应低温环境,这种现象叫作低温驯化(或冷适应)。农作物的产量受到众多环境因素的影响,其中冷害是影响作物产量的很重要因素,可以直接导致作物的减产(图 5)。农作物对低温环境的适应是其种植纬度北移的重要条件。植物对冷害的反应有很多方面,包括萌发率降低、叶片变黄、幼苗发育不良、叶片卷曲甚至死亡。冷害也会严重导致农作物产量的降低。植物对低温响应的途径主要分为依赖于 CBF(C-repeat binding factor) 的低温信号途径和不依赖于 CBF 的低温信号途径。

### 5.1 依赖于 CBF 的低温信号途径

CBF 依赖的信号通路是拟南芥中最重要的低温信号传递通路。CBFs 也叫做 DREB (dehydration-responsive element binding protein),它们是一类转录因子,能够与核心序列为 G/ACCGAC 的顺式元件结合,而对冷胁迫应答的那些基因 *COR* (*cold regulated genes*) 其启动子区域常含有该顺式作用元件,从而激活这些基因的表达。早期研究发现 *COR15A* 基因启动子的部分区段对低温、ABA 和干旱在转录水平上有响应,它包含了响应干旱和低温的顺式作用元件,从而命名为 DRE 元件。后来发现的很多低温响应基因里也含有此元件,经过不断的研究最终发

现了结合 DRE 元件的反式作用因子——DREB1 和 DREB2。在拟南芥中, *DREB1* 和 *DREB2* 分别对低温和干旱做出响应。

在拟南芥中 CBF 家族有 3 个同源性比较高的成员,分别是 *CBF1*、*CBF2* 和 *CBF3* (或 *DREB1B*、*DREB1C* 和 *DREB1A*)。在低温诱导下,这 3 个基因在转录水平和蛋白水平都能迅速被上调,并协同调控 *COR* 基因的转录。*CBF* 基因的转录受到一些正向或者负向转录因子的调控,它们通过结合 *CBF* 基因上的顺式作用元件发挥作用。低温胁迫下, *ICE1* (inducer of CBF expression 1) 和 *ICE2* 通过正调控转录因子 CBF,从而增加植物的耐冷性。可以看出,在该途径中主线是转录因子 *ICE1* 激活下游转录因子基因 *CBF* 的表达, *CBF* 再激活更下游 *COR* 基因的表达。那么, *ICE1* 又是如何在蛋白质水平被调节的呢?

近年研究发现,低温条件能快速激活激酶 *OST1* (open stomata 1) 的活性,激活状态的 *OST1* 能够与 *ICE1* 互作,并将 *ICE1* 蛋白磷酸化,促进 *ICE1* 与其靶基因 DNA 的结合能力,这从 *ICE1* 的活性上给予保证。另一方面,因泛素连接酶 *HOS1* (high expression of osmotically responsive gene 1) 可以泛素化 *ICE1*, 并



在孕穗期遇到低温伤害后,耐受性较强的品种能够正常结实,颖壳为麦黄色(左图),然而低温敏感品种(右图)的育性下降,未授粉小花表现为颖壳绿色

图5 环境低温引起水稻育性下降

使 ICE1 被 26S 蛋白酶体降解,而被磷酸化修饰的 ICE1 可以降低与 HOS1 之间的互作,让更多的 ICE1 不被泛素化降解,这从蛋白量上给予保证。可以看出,通过酶活性的调节可以快速应答环境低温刺激,启动 ICE1-CBF-COR 这一途径。

很多研究报道 *CBF1*、*CBF2*、*CBF3* 在植物体内超表达,可以在常温下引起冷诱导基因表达、脯氨酸和可溶性糖含量上升,植株的耐冷性增强。

### 5.2 不依赖于 CBF 的低温信号途径以及转录后调控

有研究发现植物响应低温还会通过独立于 CBF 的其他信号途径。拟南芥 *eskimo1* 突变体对低温耐受性增强,但是并没有通过激活 *CBF* 基因来响应低温的信号。也有芯片数据显示并非所有冷响应基因都包含 CRT 或者 DRE 元件,也并非都受 CBF 家族蛋白的调控。另外,在拟南芥中组成型表达 CBF 家族的基因并没有完全引起冷适应。2010 年科学家发现拟南芥突变体 *hos9-1* 耐冷性增强,但是 CBF 家族基因的表达量并没有改变,这也表明 *HOS9* 调控植物耐冷的信号通路是独立于 CBF 途径的。

近年研究发现转录后调控在植物冷适应过程中发挥了重要功能。细胞可以通过 mRNA 可变剪切的方式从同一个基因合成出不同的蛋白以应对不同的环境条件。例如拟南芥 *STAI* 可以调控 mRNA 前体的剪切,其缺失会导致冷诱导的 *COR15A* 的 mRNA 前体剪切缺陷,突变体表现出冷敏感表型。在冷胁迫下,小麦中 2 个 *COR* 基因的内含子滞留在成熟 mRNA 中,从而来调节基因表达。此外,小 RNA 在植物应答胁迫反应中也发挥着重要的功能,低温会诱导 *miR393*、*miR397b*、*miR402*、*miR319c* 的上调,其中 *miR393* 的上调会导致其靶基因 E3(编码一个 E3 泛素连接酶)的 mRNA 切割增强,从而抑制了 E3 泛素连接酶对其靶蛋白的水解。

### 5.3 植物对低温信号的感知

植物对外界刺激的感知首先是通过细胞膜上的蛋白受体,其后会通过细

胞内的信号转导引起下游的冷响应基因以及转录因子的表达。冷胁迫会导致植物细胞膜流动性降低和硬度增加、膜蛋白构象的改变、代谢物的积累以及细胞内氧化还原状态的改变等。

研究表明,细胞膜的流动性改变是植物遇到低温刺激后首先发生的物理学改变,这也是植物感知低温的一个生物学基础。温度降低使得细胞膜流动性降低,硬度变大,温度升高则相反。研究发现,二甲亚砜处理可以使得细胞膜流动性降低,从而模拟了低温响应过程,可以激活下游冷诱导基因的表达。苯甲醇处理可以使得细胞膜流动性增强,抑制了下游低温相关基因的表达。由此得知,细胞膜流动性的改变是植物感知低温必须的条件。

进一步研究表明,细胞膜流动性改变会直接导致胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流, $\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使最早响应低温信号。低温胁迫还会导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的空间分布发生改变,从而细胞内产生钙信号,进一步导致胞内一系列的生理生化反应。细胞内还存在钙离子结合蛋白,当细胞受到低温刺激时,细胞内钙离子水平升高,使钙离子结合蛋白的构象发生改变,激活其他蛋白质或自身的活性,来影响下游的靶基因转录或者蛋白水平变化,从而响应外界的低温和胁迫刺激。研究表明,在外界低温刺激作用下,细胞内钙离子水平发生急速变化,细胞内发生一系列钙信号反应,响应外界低温胁迫刺激,所以钙离子在植物体的低温信号途径中发挥着至关重要的作用。

植物遭遇低温刺激后,细胞骨架会发生改变,微管和微丝解聚。2004 年 Pokorna 等利用烟草 BY-2 细胞(处于分裂间期)发现,低温处理 20 min 后细胞的微管开始解聚,液泡周围射线状的肌动蛋白丝消失。细胞骨架的改变是否位于冷信号传导的上游呢? 研究发现,微管和微丝稳定剂紫杉醇处理使得冷诱导上调的基因 *BN115* 的表达受到抑制,相反微管和微丝解聚剂秋水仙胺的处理可以促进 *BN115* 基因表达上调。在苜蓿细胞中做同样的处理也有类似的结果。可以看出细胞骨架的解聚是

植物细胞感应低温所必需的。

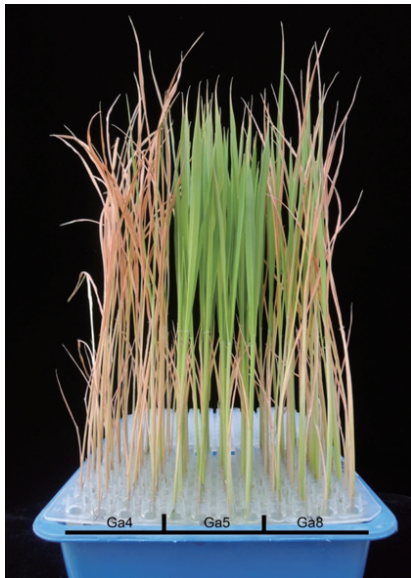
在动物中已经有报道,一些 TRP (transient receptor potential) 家族成员的蛋白表达对温度极其敏感。至少有 3 个热诱导表达的蛋白——TRP1、TRP3 和 TRP4 在感知高温过程中起到重要作用。2002 年也发现了响应冷的受体——TRPM8,它同样也属于 TRP 通道蛋白家族,主要在感受疼痛和温度的神经细胞中表达。在动物细胞中 TRPM8 可以受到冷和薄荷醇的诱导表达。2009 年报道了动物中另外一个 TRP 家族感受低温的受体——TRPA1。但是目前在植物中还没有关于冷受体的报道。

## 6 水稻耐低温研究

利用水稻为材料,探索植物响应低温信号、抵御低温胁迫的分子机理,可以挖掘具有低温耐受特征的主效功能基因。我们在近 10 多年的工作中鉴定、发现并克隆了很多冷诱导相关的基因,例如编码不同酶分子的基因 *OsRAN2*、*OsBURP16* 和 *OsUGE-1* 以及编码转录因子的基因 *OsMYB3R-2*、*OsCOIN*、*OsMADS57*、*OsHHLH001* 和 *OsHHLH002* 等,建立了稳定的水稻苗期耐冷筛选鉴定方法(图 6)。

*OsRAN2* 是个核定位的小 GTPase,在冷胁迫下 *OsRAN2* 的表达量增加,反义转基因水稻株系在有丝分裂中纺锤体出现异常、生长受到抑制;超表达株系在冷胁迫条件下,通过维持细胞分裂,减少有核微管蛋白的细胞比例,形成正常的核被膜加强水稻的耐寒性。*OsUGE-1* 作为一个水稻中的差向异构酶,如果让其在拟南芥中超表达,可引起下游代谢产物棉子糖含量升高,从而使得植株耐冷性增强。

*OsMYB3R-2* 在胁迫响应以及发育过程中都发挥重要作用。超表达转基因材料表现出耐冷性增强。*OsMYB3R-2* 表达受冷诱导,它编码一个转录因子,可以结合到有丝分裂特异性的顺式作用元件上,这个序列在细胞周期蛋白基因 *CycB1;1* 和 *OsKNOLLE2* 的启动子区域都非常保守。流式细胞



生长于96孔板中的三叶期幼苗,经低温处理后,常温恢复生长1周,耐冷材料(Ga5)和冷敏感材料(Ga4、Ga8)表现出明显差异

图6 水稻苗期耐冷性鉴定

仪检测发现冷处理促进了OsMYB3R-2超表达植株细胞的有丝分裂过程。这些结果表明冷胁迫条件下,OsMYB3R-2通过结合*CycB1;1*启动子区,调控细胞周期的进程,维持分生组织在低温条件下持续的分裂能力。

上述研究都是基于反向遗传学的手段,从基因入手,进一步挖掘其功能。正向遗传学的研究证明了在水稻的不同生育时期,其耐冷性受到多个基因的控制。科学家们已经鉴定发现了大量的水稻耐冷数量性状基因座(quantitative trait loci, QTLs)。QTL是一段含主控或联系数量性状的基因的DNA,可通过如AFLP或更常见的SNP等分子标签将这些控制数量性状的基因定位到基因组的特定区域上,这是对主控性状变异的实际基因进行鉴定与测序的先行步骤。数量性状指的是那些可区分程度的表型(特征),这些性状起因于多基因效应(例如2个及以上的基因产物)及环境的共同作用。已经报道的在水稻不同发育时期控制耐冷性的QTL有很多,其中有几个QTL被精

细定位,如芽期耐冷性QTL有*qLTG-3*、*qLTG-9*,苗期耐冷性QTL有*qCTS4*、*qCtss1*和*qCTS12*等,孕穗期耐冷性相关QTL有*qLTB3*、*qCTB7*和*qCTB8*等。研究发现,水稻在不同发育时期对低温的耐受性受不同的基因控制,但在同一发育时期的多个低温抗性基因中,主要是一些主效基因在发挥功能。目前,大部分耐冷QTL的发现和鉴定都是通过粳稻和籼稻的杂交构建的遗传群体,例如重组自交系、染色体片段代换系等获得的。

SNP是指单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性。例如,来自2个不同个体的DNA片段-AAGCCTA-和-AAGCTTA-中的第5个碱基就是1个SNP,包含此SNP的2个基因互为等位基因。SNP位点的分布是不均匀的,在非编码区比在编码区更常见。一般来说,自然选择倾向于保留最利于遗传适应性的SNP位点。

本课题组基于野生稻、籼稻、粳稻在耐低温方面的差异,通过对遗传材料的筛选,挖掘优异天然等位变异。借助粳稻日本晴和籼稻93-11组合得到的重组自交系群体,筛选到5个耐冷的候选QTL位点,其中之一将其命名为*COLD1*(chilling-tolerance divergence 1)。进一步借助近等基因系验证了来自粳稻日本晴的该基因*COLD1<sup>NP</sup>*可以使籼稻93-11的耐低温能力增强;超表达粳稻*COLD1*的转基因株系(即在细胞内积累更多的蛋白质*COLD1<sup>NP</sup>*)的耐寒性显著增强,而该基因功能缺失突变体*cold1-1*或转反义基因株系(即在细胞内缺少或降低蛋白质*COLD1<sup>NP</sup>*)的耐寒性却降低。

利用具有区域代表性的栽培稻和野生稻的127个种质基因组信息以及它们的耐寒性强弱,比对分析发现,*COLD1*基因中存在7个单核苷酸多态性位点(SNP),其中的第2个SNP(SNP2)位于*COLD1*基因的第4个外显

子内,在籼稻中是胞嘧啶或胸腺嘧啶,粳稻中此位点是腺嘌呤,这一差别使得*COLD1*蛋白中第187位氨基酸由籼稻中的蛋氨酸/苏氨酸变为粳稻中的赖氨酸。耐寒实验显示只有当*COLD1*基因中SNP2为腺嘌呤时才能互补*cold1-1*的耐寒缺陷,说明特异的SNP2对粳稻的耐寒性直接相关。从127个种质材料种植区域的分布可以看出,SNP2为腺嘌呤的水稻材料都出现在日本、韩国及中国的东北等年积温较低的区域,进化生物学分析显示SNP2处的腺嘌呤起源于中国的野生稻,在粳稻的人工驯化选择过程中被保留下来。

*COLD1*编码一个9次跨膜的蛋白质,免疫印迹杂交、标签蛋白的荧光显微观察发现*COLD1*蛋白主要定位于细胞质膜和内质网。酵母双杂交、免疫共沉淀和双分子荧光互补实验表明,*COLD1*可以与G-蛋白的 $\alpha$ 亚基RGA1互作;检测RGA1的GTPase活性发现,来自于粳稻的*COLD1*蛋白(*COLD1<sup>NP</sup>*)可以增强RGA1的酶活性,而籼稻中的*COLD1*蛋白(*COLD1<sup>IND</sup>*)却有一定的抑制作用,说明*COLD1*是一个G-蛋白信号的调节子。电生理实验显示:*COLD1*蛋白参与调控胞质钙离子的内流;检测低温刺激时突变体材料、转基因材料中胞质Ca<sup>2+</sup>浓度显示*COLD1<sup>NP</sup>*对于低温刺激引起的胞质钙离子瞬间升高是必需的。

这些结果说明*COLD1*编码一个G-蛋白信号调节因子,定位于细胞膜和内质网上。冷处理时,*COLD1*与G-蛋白的 $\alpha$ 亚基RGA1互作,参与依赖于G-蛋白的信号转导,激活Ca<sup>2+</sup>通道,触发下游耐寒防御反应,从而赋予粳稻耐寒性。这些结果勾勒出了细胞膜处接收环境低温、引起细胞质中生化反应、调控细胞核中特定防御基因的表达这一较为完整的途径,解释了粳稻耐受低温的分子细胞学机制。*COLD1*基因可直接用于对水稻耐寒性改良,对培育耐寒新品种具有重要的应用前景。