

## 植物抗寒冻的分子遗传与基因工程

费云标 黄涛 舒念红 赵淑慧

(中国科学院发育生物学研究所)

植物抗寒冻的遗传学研究表明,小麦的 21 对染色体中至少有 10 对染色体关系到寒冻抗性,在染色体 5A 和 D,携带着影响小麦抗性的许多基因(Guy1990)。寒冻抗性的 70%的诱生能力涉及到染色体 5A(Singh 等 1988)。

水稻在低温时, mRNA 合成下降,小亚单位停止合成,但大亚单位合成很少受影响,引起大小亚单位合成失调,在低温时寒冷敏感性水稻的一些细胞器和核编码的基因表达受抑制,这些关系到 Sh1, RbcS, atpE, Cox III, Cab, psaB 和 rbcL 基因的转录抑制(Guy1990)。

近几年来,对冷驯化, ABA 或脱水处理应激反应中相关的基因进行了克隆,序列分析和鉴定了它们的蛋白产物,研究材料包括拟南芥属,苜蓿,小麦,大麦,玉米,蕃茄,水稻等植物(Monroy 等 1993, Rao 等 1993)。

从拟南芥属中已分离到多个冷调节 cDNA 克隆,在低温驯化,脱水和 ABA 处理时明显提高转录水平(Hajela 1990, Kurkela 等 1990, Gilmour 等 1992)。冷驯化的 Kin1 基因,编码 66 氨基酸, 6.5KDa 的多肽,富含丙氨酸(22.7%),甘氨酸(13.6%)和赖氨酸(13.6%),有强亲水性,但也含 3 个小疏水区,主要是  $\alpha$ -螺旋结构,这些特征,表明该基因的表达产物类似于鱼类抗冻蛋白。该基因是最早鉴定为冷驯化特异基因,但它同时可由 ABA 和脱水诱生表达(Kurkela 等 1990)。在驯化期间也增加了内源的 ABA 水平(Chen 等 1983a, Daie 等 1981)。ABA 可能是启动了与驯化相关的遗传系统(Chen 等 1983a)。

在苜蓿中已分离到多种冷驯化特异的

cDNA,对 ABA,脱水或热休克处理诱生的转录累积与冰冻耐受性明显正相关(Mohapatra 等 1989, Houde 等 1992)。最近检出冷诱生的编码 14.5KD 蛋白的 Cas15 基因的转录水平与冰冻耐受性呈平行关系。Cas15 多肽中含有一些重复与保守序列,富含甘氨酸(25.7%),组氨酸(15.4%),赖氨酸(15.7%)和谷氨酸(11.8%),这四种氨基酸占多肽总量的 67.6%,推测具有亲水性,是一种可溶性蛋白质。二级结构主要是  $\alpha$ -螺旋构型(65%以上),其次是  $\beta$ 结构(18%)和一些其它的构型(约 12%)(Monroy 等 1993)。

水稻 rab-16A 基因的表达与 PEG 介导脱水(Rao 等 1993)诱生的蛋白或 ABA 的作用(Mundy 1990)和渗透反应相关,ABA 反应敏感元件可能涉及到 rab 基因的转录,用 CAT 报导基因表达的研究,推测这个基因对 ABA 依赖的表达的转录元件位于该基因的-294 和-52 之间,(Mundy 1990), Marcotte 等(1988),根据 GUS 报导基因的表达,确认水稻原生质体中 ABA 诱导基因的序列位于-550 和+95 之间。

当种子脱水和植物处于休眠态时,晚期胚胎发生过程中许多 ABA 敏感反应基因仍正常表达,所以这些 ABA 敏感反应基因编码着与渗透调节或其它保护性功能的蛋白质(Mundy 等 1990)。这些 rab-16A-D 基因的平均分子量为 16000,编码着 RAB 蛋白,有二个保守区域涉及到 ABA 的敏感反应,这个顺式反应的 ABA 敏感元件称为 ABREs, rab-16A 启动子中的保守序列可特异性地结合核蛋白因子。

在拟南芥植物中,对 ABA 突变体的冷驯化

和冷调节基因的表达研究,也证明有的突变体对冷驯化和 ABA 处理均有诱导基因表达的能力,但对诱导能力强度有差异,有的对冷有诱导能力而对 ABA 的诱导几乎无反应(Gilmour 等 1991)。可见它们作用的分子机理可能有某种联系,但各有其特异性。

近来开展了基因工程和转基因植物的研究,自从用黄盖鲮鱼抗冻蛋白(Cutler 等 1989)改善了植物组织的抗寒冻性能的实验后,已把鱼类抗冻蛋白基因导入另一种鱼类和植物中,人工合成的黄盖鲮鱼抗冻蛋白基因经导入玉米原生质体,在植物细胞中获得了表达(Georges 等 1990)。鱼类抗冻蛋白基因转移至烟草和蕃茄已获得较好的表达,抑制了冰晶的生长,一方面有可能使收获的果品和蔬菜免受冻融而影响质量;另一方面,因为抗冻蛋白渗透到植物体内,降低了结冰温度,保护植物的抗冻性(Hightower 等 1991, Cutler 等 1989)。美国 DNA 植物技术公司已经报导,在蕃茄中导入鱼类抗冻蛋白基因已培育出耐寒性的蕃茄,导入鱼抗冻蛋白基因的酵母表达抗冻蛋白后,在低温条件下生存率提高 2-4 倍,并认为抗冻蛋白有可能应用于所有的蔬菜品种的改良。

本实验室在研究鱼类抗冻蛋白(费云标 1992a, b; 费云标等 1992a, b)转基因鱼的同时,开展了转抗冻蛋白基因植物的研究,已获得了转基因鱼(费云标等 1993)和某些转基因植物。

植物的冷损伤可能关系到膜脂的相变而引起,而相变转换温度涉及到膜脂类的脂肪酸的不饱和程度。通过导入双键(double bonds)到膜脂的脂肪酸的遗传操作,改变了植物的抗寒性,植物中减饱和作用的 desA 基因编码了一种减饱和酶(desaturase)和减饱和酶的辅酶,它能在脂肪酸结合到膜甘油脂的  $\Delta 12$  位置导入第二个顺式双键,所以 desA 基因产物与脂肪酸的减饱和作用相关,以兰菌(cyanobacteria)作为植物细胞的模式系统(Wada 等 1990),将抗寒兰菌的 desA 基因导入寒冷敏感的兰菌后,增加了对低温的抗性。

又如,由于叶绿体甘油-3-磷酸酰基转移酶

可能对叶绿体磷脂酰甘油脂肪酸的不饱和水平起着决定性的作用,因此它的水平关系到植物对寒冷的敏感性,从南瓜藤和拟南芥属(Murata 1992)得到的甘油-3-磷酸酰基转移酶基因重组在 pBI121 质粒,导入烟草后,使烟叶中的甘油-3-磷酸酰基转移酶从占可溶性蛋白  $< 0.01\%$  增加至  $0.1-1\%$ ,明显改变了磷脂酰甘油的脂肪酸组成,提高了植物的抗寒性。

综上所述,以研究植物抗寒冻的分子遗传为基础,进行基因工程的研究,有可能改良植物的抗寒冻性能,这是当今研究的发展趋势和重点,同时由于植物对寒冻的抗性常属多基因控制与调节,在研究转基因植物时除了注意导入关键性基因的同时,有必要进一步开展细胞融合和染色体工程的研究。

### 参考文献

1. 费云标 1992a, 生物工程进展, 12(3), 33-35.
2. 费云标 1992b, 高技术报导, No. 1, 6-8.
3. 费云标等, 1992a, 生物工程学报, 8(2), 192-196.
4. 费云标等, 1992b, 生物工程进展, 12(6), 17-20, 46.
5. 费云标等, 1993, 生物工程学报, 9(4), 387-388.
6. Chen, H. H. et al. 1983, Plant Physiol. 71, 362-365.
7. Cutler, A. J. et al. 1989, J. Plant Physiol. 135, 351-354.
8. Daie, J. et al. 1981, Plant Physiol. 67, 26-29.
9. Georges, F. et al. 1990, Gene, 91, 159-163.
10. Gilmour, S. J. et al. 1991, Plant Mol. Biol. 17, 1233-1240.
11. Gilmour, S. J. et al. 1992, Plant Mol. Biol. 18, 13-21.
12. Guy, G. L. 1990, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41, 187-223.
13. Hajela, R. K. et al. 1990, Plant Physiol., 93, 1246-1252.
14. Hightower, R. et al. 1991, Plant Molecular Biology, 17, 1013-1021.
15. Houde, M. et al. 1992, Plant Physiol. 99, 1381-1387.
16. Kurkela, S. et al. 1990, Plant Molecular Biology, 15, 137-144.
17. Marcotte, W. R. et al. 1988, Nature, 335, 454-457.
18. Mohapatra, S. S. et al. 1989, Plant Physiol. 89, 375-380.
19. Monroy, A. F. et al. 1993, Plant Physiol. 102, 873-879.
20. Mundy, J. et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1406-1410.
21. Murata, N. et al. 1992, Nature, 356(6371), 710-713.
22. Rao, A. H. et al. 1993, J. Plant Physiol. 142, 88-93.
23. Singh, J. et al. 1988, Biochem. Cell Biol. 66, 650-657.
24. Wada, H. et al. 1990, Nature, 347(6289), 200-203.

(下转第 26 页)