

○ 刘美芹 尹伟伦 卢存福 著



SHADONGQING KANGHANXING FENZI

沙冬青抗寒性分子 基础研究

JICHU YANJIU

北京林业大学优秀博士
论文基金资助丛书

中国环境科学出版社

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

沙冬青抗寒性分子基础研究

刘美芹 尹伟伦 卢存福 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

沙冬青抗寒性分子基础研究/刘美芹等著. —北京: 中国环境科学出版社, 2009

(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)

ISBN 978-7-5111-0019-1

I. 沙… II. 刘… III. 冬青科—抗冻性—研究

IV. Q949.754.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 178317 号

责任编辑 周 煜

封面设计 龙文视觉

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)

网 址: <http://www.cesp.com.cn>

联系电话: 010-67112765 (总编室)

发行热线: 010-67125803

印 刷 北京中科印刷有限公司

经 销 各地新华书店

版 次 2009 年 10 月第 1 版

印 次 2009 年 10 月第 1 次印刷

开 本 850×1168 1/32

印 张 5.125

字 数 150 千字

定 价 25.00 元

【版权所有。未经许可请勿翻印、转载, 侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书
编辑委员会

主 任：尹伟伦

副主任：马履一

委 员（按姓氏笔画）：

刘俊昌 余新晓 吴 斌 张启翔 李凤兰

李俊清 俞国胜 赵广杰 骆有庆 贾黎明

续九如 蒋湘宁 翟明普

秘 书：王兰珍

序 言

科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北大建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着一个高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看做是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还以此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才备受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自

己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长，野外条件难于严格控制，工作条件难苦等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士

沈国舫

2002年8月10日

引 言

植物的低温伤害现象遍及全球，世界范围内每年因低温寒害造成的损失高达数千亿美元。因此，揭示植物的低温伤害与低温抗性机理，探讨提高植物抗寒性的技术措施，一直是生物科学的一个重要研究方向。

我国由于大部分地区地处温带，气温较低，冬季寒冷，农林业生产中时常遭受低温寒害。尤其是西北地势纬度较高的地区，每年都会因此造成农林业生产的损失。2008 年初我国南方爆发的大规模的冰雪灾害，不仅造成上千亿元的经济损失，而且造成了严重的林业生态破坏。频繁发生的低温寒害，极大地限制了植物分布。西北干旱寒冷的荒漠地区尤其如此，大部分植物无法正常生长，抗寒的沙漠化植物又在不断减少，土地沙漠化程度日趋加剧。因此，研究和利用抗逆性强的沙漠植物，对于探讨植物的抗寒机理，选育植物新品种，改善生态环境都具有重要的意义。

沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim) Cheng.f] (附图 I) 作为我国北方阿拉善荒漠区特有的常绿阔叶灌木和特有的建群植物，对维持当地的生态平衡、延缓沙漠的扩展发挥重要作用。沙冬青是豆科植物中比较原始的种，属第三代古地中海沿岸的植物，是古地中海退缩、气候旱化过程中幸存的残遗物种之一^[1]，具有极强的抗逆性与重要的资源价值，在研究第三纪气候特征、地理环境变迁、亚洲中部荒漠植被的起源和形成等方面有重要的科学价值。沙冬青的现分布区属温带荒漠区，气候条件恶劣，夏季高温炎热，冬季低温寒冷，最低温到 -30°C 以下，且气候干燥，

降水极少。沙冬青在如此残酷的环境中能幸存至今，一定有其适应环境的独特机制。但沙冬青分布范围狭小、生境严酷，又遭人类活动的破坏，其数量正在不断减少，现已濒临灭绝，被列为国家三级保护植物^[2]。所以无论是探讨树木对环境的适应机理，还是研究珍稀树种的保护，沙冬青都是一种非常理想的研究材料。

由于低温寒害是一种严重的自然灾害，长期以来，人们从植物生理、形态学、遗传学、细胞生物学等方面对低温伤害进行了广泛的研究，并取得了很大进展。尤其是近二十年来，分子生物学技术的发展使得多个低温相关基因得以克隆与鉴定，在很大程度上推动了植物抗寒机理的研究；基因工程的应用加速了抗寒性植物新品种的培育，丰富了提高植物抗寒性的措施和途径。但直到现在，人们仍没有阐明抗寒机理，没有形成耐低温机制的一致看法，特异基因在耐低温过程中的作用和作用方式都没搞清楚，对冷适应的了解也不足。而且已鉴定的多个低温诱导基因，几乎都是从草本植物中克隆得来的，有关木本植物抗寒机制的了解更少。这主要是由于林木分子生物学研究起步晚、技术复杂、研究周期长所致。到目前只在木本植物沙冬青^[3-6]、桃树^[34]、连翘^[35]中发现了抗冻蛋白，但一直没有木本植物的抗冻蛋白基因的研究报道；在葡萄越冬芽中发现类似 LEA 蛋白^[36]；在柑橘花芽中有低温响应类脱水素^[37]；在白云杉^[38]、柑橘^[39, 40]、桃树^[41-43]中克隆鉴定了受低温诱导的脱水素基因，在柑橘中鉴定出了低温响应的 *LEA2* 基因^[44]，在白桦树中克隆了低温诱导基因 *Bplti36*^[45]，Wei 等应用表达序列标签法（EST）从长绿阔叶木本植物杜鹃的低温锻炼叶片中得到多个抗寒相关基因^[46]。

相对于草本植物，木本植物的低温适应是一个更复杂的生物学过程，但生物技术应用用于林木遗传改良有着很大的潜力。而从草本植物中获得的理论知识，又不能简单地照搬到木本植物上。随着模式植物分子生物学的快速发展，对植物逆境抗性

分子机制的研究，必然从模式植物向极端环境植物的研究过度，最终了解这些极端环境植物生存的分子机制，使解决农林业生产中面临的低温伤害问题、培育抗逆性强的农林作物新品种更具目的性和针对性。如同盐生植物是研究植物抗盐性机理的理想种质资源，强抗旱的复苏植物是研究植物抗旱机理的理想种质及实验材料，强抗寒植物必定是研究抗寒性的分子基础及机理的理想实验对象。因此，从强抗逆性常绿木本植物沙冬青中克隆抗寒相关基因，并采用生物信息学手段，对克隆到的基因和数据库中已有的抗寒相关基因的结构性质、起源进化 and 功能进行对比分析，对探讨抗寒基因的作用方式，深入了解抗寒机制具有重要的意义。

随着杨树基因组测序工作的完成，林木抗逆性的分子生物学研究将会获得快速的进展。在国家自然科学基金（30271067，30671476，30700559，30371143，30730077）的资助下，自2001年开始，我们率先开展了沙冬青抗寒基因及抗寒性的研究。本书内容是近几年研究的部分结果，立足于探讨木本植物抗寒性机理，选用沙冬青幼苗为实验材料，采用自行优化的固相扣除杂交技术分离获得了多个沙冬青低温诱导基因，对这些特异基因在抗寒性形成中的可能作用进行了鉴定。本书的研究结果为深入探讨木本植物的低温适应机制，利用沙冬青低温诱导基因进行分子育种，培育抗寒林木花卉新品种，积累了一定的理论和技术基础。因此，开展沙冬青抗寒性及抗寒相关基因的研究，不仅有益于这种濒危植物的保护和利用，而且会为植物抗性分子生物学和抗性分子育种积累新的基础资料。

目 录

1 优化的固相杂交扣除技术克隆沙冬青低温诱导基因	1
1.1 沙冬青抗寒性研究概况	1
1.2 克隆未知差异表达基因的方法与技术	3
1.3 低温驯化提高沙冬青抗寒性	5
1.4 优化的固相扣除杂交技术克隆沙冬青低温诱导基因.....	7
1.5 讨论	16
2 沙冬青低温诱导基因的功能分析	18
2.1 植物的低温抗性研究概况	18
2.2 沙冬青低温诱导基因的功能分析	30
3 <i>AmCIP</i> 的功能鉴定.....	47
3.1 沙冬青中 <i>AmCIP</i> 的低温诱导性.....	48
3.2 <i>AmCIP</i> 内含子分析.....	49
3.3 <i>AmCIP</i> 异位表达提高转基因烟草的非生物胁迫抗性 ...	50
3.4 <i>AmCIP</i> 的亚细胞定位表达分析.....	73
3.5 离体 <i>AmCIP</i> 性能鉴定.....	83

4 沙冬青的抗寒性与 DNA 甲基化的关系	93
4.1 非生物胁迫与 DNA 的甲基化之间关系的研究概况	95
4.2 沙冬青的抗寒性与 DNA 甲基化的关系	97
参考文献	111
附录 I	134
附录 II	138
附录 III	144
后 记	146
附 图	148

1 优化的固相杂交扣除技术克隆沙冬青低温诱导基因

1.1 沙冬青抗寒性研究概况

沙冬青是暖温型荒漠生态系统中的物种，属豆科，沙冬青属 (*Ammopiptanthus*)，共两种，其中矮沙冬青 [*Ammopiptanthus nannus* (M.Pop) Cheng.f.] (又称小沙冬青) 仅见于新疆天山南部和昆仑山西北端的接合部并向两山延伸的一段狭窄地带，被列为国家一级保护植物^[7]。另一种是蒙古沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxin) Cheng.f.]，是我国北方荒漠地区唯一的强旱生常绿阔叶灌木，也是阿拉善荒漠区特有的建群植物，对维持当地生态平衡起着重要的作用，主要分布在内蒙西部库布齐沙漠、乌兰布和沙漠、狼山山前、宁夏北部贺兰山前和腾格里沙漠一带^[8]，已被列为国家三级保护植物^[2]。

沙冬青为常绿灌木，高 1.5~2.0 m。叶革质，表面密被银白色柔毛。总状花序顶生，具小花 8~10 朵，蝶形花冠，雄蕊 10，分离，子房披针形。荚果扁平，种子球状肾形。沙冬青萌动较早，花期 4—5 月，果实成熟期为 7—8 月。染色体为 $2n=18$ ^[9]。根系为轴根系，主根粗壮，侧根发达，具根瘤，根系的生长明显强于地上部分。沙冬青的分布区属温带荒漠区，气候条件恶劣，夏季高温炎热，最高达 35℃ 以上；冬季低温寒冷，最低温到 -30℃ 以下；且气候干燥，降水极少，蒸发量为降水量的 23 倍之多，干燥度为 4.05~8.90。沙冬青分布的这些地区大都处于沙质荒漠地

带,土壤类型主要为灰棕荒漠土,基质为砾质或沙质黏土,瘠薄,有机质含量不到 1%;地下水深一般在 5 m 以下,植物根系难以利用。土质保水性能极差,还呈较强的碱性,pH 值在 8.42~9.15,全盐含量达 0.25%~0.38%^[10]。

沙冬青分布区属典型的大陆型气候区,冬季极端低温可达 -30℃ 以下。沙冬青在这种气候条件下能正常越冬且保持常绿,分析发现与其典型的旱生特征有直接关系:如叶片细胞水势很低,束缚水含量达 50%^[11],当胞外结冰时,细胞具有很强的耐脱水能力;叶片的角质层很厚,可有效的阻止外部的冰核侵入叶内,协助保持组织水分的超冷状态;叶表皮密被的浓密表皮毛在冬季有阻止散热,防寒避风的作用等。

从人们对冬季沙冬青的组织细胞结构等多方面进行的抗寒性研究发现,沙冬青冬季叶片栅栏组织细胞质浓厚,紧贴细胞壁,含有一种电子密度很高的特殊内含物^[12],这种高浓度的细胞质,会使冰点降低。叶肉细胞的大液泡膜有内陷和吞噬细胞质现象^[13],有的内陷形成细胞质带,将大液泡分隔成小液泡,扩大了膜的表面积。被吞噬的物质在液泡内形成膜状结构并逐步解体,增加了液泡浓度。有的大液泡中还含有一种源自于膜、含有大量脂类的特殊内含物。进一步研究发现,这种物质除了为膜的修复提供脂类物质和起冷冻保护剂的作用外^[14],还能像有机物质一样被运输^[15]。叶绿体大多聚集分布,保持个体完整性,但也有少量融合现象^[16]。部分类囊体膜解体,周围有大量拟脂颗粒出现^[17],可能与膜分解后脂质的积累有关。但叶绿体中淀粉粒缺乏,推测是被水解成糖以提高细胞质的含糖量,增强抗寒性^[16]。这些特征对冰冻情况下维持细胞内的超冷状态,保持细胞结构和膜的稳定性可能起着重要作用。

人们不仅从组织细胞水平上揭示沙冬青的抗寒生理基础,而且着手努力从分子水平了解其抗寒性形成的机理。受极区鱼中发现的抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)研究的启发,人们尝试

从沙冬青中分离抗冻蛋白。费云标等最早在沙冬青中发现具有抗冻活性 (THA) 的抗冻蛋白^[3]。用差示扫描量热法测定其热滞效应发现, 沙冬青的抗冻蛋白具有很高的抗冻活性^[18]。1999 年魏令波等分离到一种热滞活性为 0.9°C (20 mg/ml), 分子质量为 40 ku 的新抗冻糖蛋白 (AFGP), 在沙冬青体内广泛分布且叶片含量较高^[5]; 随之江勇等分离得到三种具有热滞活性的抗冻蛋白, 但均不是糖蛋白^[4]。2000 年, 费云标等纯化后获得了电泳纯的分子质量约为 50 ku 的抗冻糖蛋白, 差示扫描量热法 (DSC) 测定该蛋白热滞活性在 5 mg/ml 时约为 0.35°C , 进一步分析其二级结构时发现该 AFGP 中 α -螺旋为 11%, 反平行 β -折叠为 34%, 无规则线团为 55%, 与某些鱼类 AFP 的二级结构相似^[6]。随后, Wang 等在沙冬青冬季叶片中分离提纯到 34.7 ku 和 37.1 ku ^[47]及 28 ku 的热稳定抗冻蛋白, 其中 28 ku 的蛋白质量浓度为 10 mg/ml 时热滞活性为 0.15°C ^[48]。人们对沙冬青中多种抗冻蛋白的理化性质也做过分析, 在测定热滞效应时还发现有的 AFP 具有双重热滞效应, 对水和冰晶有两种不同而又相互关联的作用^[19], 但其作用机理还没搞清楚, 可能与其它多种抗寒冻因子协同维持沙冬青的强抗冻性, 可见沙冬青的抗冻蛋白与抗冻机制都很复杂。

虽然人们对沙冬青的抗寒性开展了上述研究, 但截止作者开展工作前, 未见沙冬青基因的研究报导, 为了进一步探讨沙冬青抗寒性的分子基础, 本文率先开展了沙冬青抗寒基因的克隆及功能研究。

1.2 克隆未知差异表达基因的方法与技术

生物体内基因的表达具有时空性, 外界条件的改变和生长发育的不同阶段, 细胞和组织的转录组之间都会表现出差异。这种基因表达的选择性参与决定多种生命过程, 分离与鉴定不同条件下差异表达的基因, 有助于深入了解这些生命过程。但每个细胞

选择性表达的差异基因大多未知,而且丰度很低。为研究富集这些未知差异表达基因,提出了多种策略,如核酸杂交、PCR 扩增、限制性酶切、随机引物扩增等。逐步出现了差异杂交(difference hybridization)、差减杂交(subtractive hybridization)、表达序列标记(expression sequence tags, ESTs)、转座子标签(transposon tagging)和图位克隆(map-based cloning)、微点阵杂交(microarrays hybridization)等未知差异基因克隆方法。后来又提出了几种基于 RT-PCR 的基因克隆新方法,主要有 mRNA 差异显示(mRNA difference display, DD)法、代表性差式分析技术(representational difference analysis, RDA)、扣除杂交法(subtractive hybridization, SH)等,这些方法逐渐成为克隆未知基因的主要方法。

mRNA 差异显示(mRNA difference display, DD)-PCR 的基本原理是 RNA-反转录-PCR。该方法操作简单,灵敏度高。最大缺点是假阳性太高,得到的只是基因片段,不是完整的基因。扣除杂交法(subtractive hybridization, SH)^[20]是具有代表性的常用方法之一。扣除杂交技术在经历了十几年的不断优化后,已形成了一套有效的富集差异表达 mRNA 的策略。早期的扣除杂交技术需要大量的 poly(A)⁺mRNA 和多步耗时费力的步骤,并且很难获得低丰度的差异表达基因。为此,人们引入了 PCR 技术,可以对差异表达的片断进行特异性扩增,大幅度提高了扣除杂交的效率。但典型的扣除杂交方法中,通常包含限制酶处理的步骤,因此应用传统的扣除杂交技术只能得到 cDNA 片段,不能直接得到全长 cDNA。要获得差异表达基因的全长 cDNA 序列,还需要在后续研究中进行 cDNA 序列的末端扩增或筛选 cDNA 文库,增加了实验的工作量和难度。

抑制性扣除杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)是在典型扣除杂交的基础上发展起来的,运用了杂交二级动力学原理,即丰度高的单链 cDNA 在退火时产生同源杂交的速度要快于丰度低的单链 cDNA,从而使原来在丰度上有差别的

单链 cDNA 相对含量达到基本一致^[20]。该技术的假阳性较低，充分富集了目的基因片段，保证了低丰度 mRNA 的检出，但也不能得到全长基因序列。后来，又提出了获得全长基因的扣除杂交方法，是在 SSH 基础上进行的优化，操作简单，原理是，分别将试验组和扣除组的 mRNA 反转录，其中对于试验组，利用其 mRNA 3' 的 poly (A) 尾和 5'-GGG 帽结构分别在试验组 cDNA 两端加上序列相同的锚定引物；对于对照组，将其 cDNA 进行随机引物 PCR 扩增制备扣除探针，同时掺入生物素；然后将试验组的 cDNA 与掺有生物素扣除探针进行液相杂交，杂交反应物用连有链亲合素的磁珠吸附掉杂交体系中未杂交的扣除探针，得到实验组独有的 cDNA，然后用锚定引物将其扩增并克隆^[49]。

1.3 低温驯化提高沙冬青抗寒性

温带地区的植物，在温暖季节对冰冻的抗性相当弱。但随着季节的变化，气温的逐渐降低，在低温环境生长一段时间后，就会产生适应性反应，提高抗冻能力，从而能耐受随即发生的冰冻温度胁迫，这个主动适应过程称为低温驯化或低温适应 (cold acclimation, CA)^[50]。植物在低温驯化过程中，体内会发生一系列形态特征、生理生化变化。1970 年，Weiser 首次提出植物在适应低温的过程中基因表达可能会发生改变的观点^[51]。由于这一反应的复杂性和对农业生产的重要性，人们对此作了大量研究。到 1980 年，已有大量研究此问题的文章出现，也在以下几个方面取得了很大进展：低温耐性是多基因特性，植物和组织的低温伤害主要是由于冰晶的形成而造成的严重细胞脱水；膜系统是低温伤害的最初位点等。到 1985 年，Guy 等最先证明菠菜在低温锻炼过程中基因表达确实发生了改变^[52]，进一步证实了 Weiser 的观点。基于前人的以上研究结果不难推出，沙冬青低温驯化后抗寒性提高的同时伴有低温诱导基因的表达。

要探讨温带植物沙冬青抗寒性提高的分子基础,了解与抗寒性相关的基因信息,首先需要确定使沙冬青抗寒性得以提高的低温驯化条件,获得有低温相关基因表达的实验材料,从中克隆沙冬青的低温诱导基因。根据实验室几年来对沙冬青抗寒性研究的积累来看,沙冬青的抗寒性很强,直接将正常条件下(25℃)生长的幼苗放到 2~6℃条件下不会出现伤害,尤其是在 MS₀ 培养基中生长的无菌苗。

沙冬青无菌苗对于减少基因分离中可能出现的污染、保证实验材料的一致性方面具有一定的优势,所以我们以沙冬青无菌苗为研究对象开展基因研究工作。将沙冬青种子消毒后播种在无菌 MS₀ 培养基中,26℃,160 μmol/(m²·s)光照,14 h/22℃,黑暗,10 h 的条件下育苗培养。幼苗长到刚露出真叶,但没有完全展开时进行低温驯化,驯化条件是 2~6℃,50 μmol/(m²·s)光,14 h/2℃,暗,10 h;驯化的时间是 14 天。

为确定上述低温条件能否使沙冬青得到驯化,能否提高其冰冻抗性,将驯化后的幼苗进行了冷冻处理。具体操作是:将生长状态一致的低温驯化后的幼苗及非驯化苗同时放入 0℃的低温实验箱内,20 min 后,温度降到-2℃。然后每隔 20 min 降低 2℃,到-8℃时持续 2 h。然后关闭仪器制冷开关,使箱内温度自然回升至室温,已结冰的幼苗组织及培养基自然融化。结果发现冷冻处理过程中,驯化后的幼苗子叶及胚轴大多不发生结冰,而非驯化幼苗大多结冰。

待培养基及其中幼苗恢复常温后,驯化后的幼苗仍能保持直立生长状态,而非驯化幼苗因发生组织结冰而萎蔫倒伏。离子渗漏测定结果同样显示驯化后沙冬青幼苗受到的伤害较轻,而非驯化苗则受害严重(图 1.1)。由此可见,2~6℃低温诱导 14 天,能使沙冬青得到驯化,使抗冻性得以提高。