

分类号: Q78

密 级:

学 号: 20232006052

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



库尔勒香梨 *PP2C50* 基因在抗寒中的功能机理分析

学位申请人	包小霞
指导教师	李锦
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	遗传学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2026年5月

分类号:

密 级:

学 号: 20232006052

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



库尔勒香梨 *PP2C50* 基因在抗寒中的功能机理 分析

学位申请人	包小霞
指导教师	李锦
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	遗传学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2026年5月

**Analysis of the Functional Mechanism of the *PP2C50* Gene in *Pyrus
sinkiangensis* Under Low Temperature Stress**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

Natural Science

By

Bao Xiaoxia

(Genetics)

Dissertation Supervisor:

Li Jin

May, 2026

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：包小霞

时间：2026年5月20日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：包小霞

时间：2026年5月20日

导师签名：李锦

时间：2026年5月20日

摘要

库尔勒香梨 (*Pyrus sinkiangensis* Yü) 作为新疆特色果树, 既是众多梨品种选育的重要亲本, 也是新疆主要的出口农产品之一。然而, 随着冬季超临界低温天气的频繁发生, 梨树遭受严重冻害, 并由此引发重大次生病害, 严重制约了该产业的可持续发展。前期研究发现越冬高表达的 *PsHB12* 基因过表达可显著降低构树的抗寒性。进一步研究表明 *PsHB12* 基因可正调控 *PsPP2C50* 基因的表达, 提示 *PsPP2C50* 可能是 *PsHB12* 下游的关键靶点。为探究 *PsPP2C50* 基因在库尔勒香梨抗寒中的功能, 本研究综合运用生物信息学、分子生物学及基因工程技术, 系统解析了其分子机理。主要研究结果如下:

(1) 生物信息学分析显示, *PsPP2C50* 编码一个定位于内质网的亲水蛋白, 其 N 端含典型 PP2C 结构域, 属 PP2C 超家族的 A 亚家族。启动子区含 AREB、LTR、MRE/MYB 等多个胁迫响应元件。表达模式分析表明, *PsPP2C50* 受 ABA 诱导表达。

(2) 在桑树 (*Morus alba* L.) 中过表达 *PsPP2C50* 并进行低温胁迫处理, 发现过表达 *PsPP2C50* 显著降低了植株的低温耐受性, 低温处理下, 过表达株系萎蔫褐化加重, 相对含水量显著降低, 电解质外渗率显著升高, 脯氨酸和可溶性蛋白积累受抑制, 表明 *PsPP2C50* 负向调控植物抗寒性。

(3) 为明确 *PsPP2C50* 的下游分子网络, 通过库尔勒香梨基因组与越冬转录组分析筛选出 4 个候选互作蛋白。通过酵母双杂交、双分子荧光互补实验 (BiFC) 和谷胱甘肽巯基转移酶沉降技术 (GST pull down) 等验证, 表明 *PsPP2C50* 与 *PsSnRK2.7* 在内质网上存在特异性相互作用。

(4) 亚细胞定位显示, *PsSnRK2.7* 同时定位于细胞核和内质网, 且其基因表达受 ABA 信号诱导。过表达 *PsSnRK2.7* 可显著增强桑树的低温耐受性, 与 *PsPP2C50* 过表达结果相反。

(5) 利用病毒诱导的基因沉默技术 (VIGS), 分别沉默了休眠期库尔勒香梨枝条中的 *PsPP2C50* 与 *PsSnRK2.7* 基因的表达, 结果发现随着温度的下降, 韧皮部组织胞间含水量呈现增加趋势, 而胞内水分则表现为下降。然而当 *PsPP2C50* 沉默后则显著提高胞内水分, 降低胞间水分, *PsSnRK2.7* 沉默则表现出相反的趋势。同时, 沉默 *PsPP2C50* 的枝条表现出自由水含量降低而束缚水含量升高, 而沉默 *PsSnRK2.7* 则表现完全相反的特点。

结论: 库尔勒香梨韧皮部组织在越冬过程中采用胞间结冰的策略, 随着温度的降低, 不断将胞内多余水分外排至胞间, 从而有效防止胞内冰晶形成。然而, 胞内水分的过度外排易导致枝条抽干现象的发生。本研究发现受 ABA 诱导的 *PsHB12* 基因可正调控 *PsPP2C50* 基因的表达, 而 *PsPP2C50* 可通过与 *PsSnRK2.7* 的互作来抑制其功能, 通过这种 ABA 信号负反馈调控机制, 维持细胞水分在低温胁迫下的平衡。该研究不仅有助于理解香梨越冬的分子遗传背景, 同时为抗寒香梨培育提供理论支撑。

关键词: 库尔勒香梨; PP2C; SnRK2; ABA 信号; 越冬

Abstract

Pyrus sinkiangensis is a distinctive fruit tree of Xinjiang; it serves as a key parent in the breeding of numerous pear varieties and is one of Xinjiang's primary agricultural export products. However, with the frequent occurrence of supercritical low-temperature weather in winter, pear trees suffer severe frost damage, which in turn triggers major secondary diseases, seriously restricting the sustainable development of this industry. Previous studies have found that overexpression of the *PsHB12* gene, which is highly expressed during winter dormancy, can significantly reduce the cold tolerance of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). Further studies indicate that the *PsHB12* gene positively regulates the expression of the *PsPP2C50* gene, suggesting that *PsPP2C50* may be a key downstream target of *PsHB12*. To investigate the role of the *PsPP2C50* gene in the cold tolerance of Korla pears, this study employed a combination of bioinformatics, molecular biology, and genetic engineering techniques to systematically elucidate its molecular mechanisms. The main findings are as follows:

(1) Bioinformatics analysis shows that *PsPP2C50* encodes a hydrophilic protein localized in the endoplasmic reticulum, featuring a typical PP2C domain at the N-terminus and belonging to subfamily A of the PP2C superfamily. The promoter region contains multiple stress-responsive elements, including AREB, LTR, and MRE/MYB. Expression pattern analysis indicates that *PsPP2C50* expression is induced by ABA.

(2) Overexpression of *PsPP2C50* in *Morus alba* L. followed by low-temperature stress treatment revealed that *PsPP2C50* overexpression significantly reduced the plants' cold tolerance. Under 4°C and -4°C treatments, the overexpression lines exhibited more severe wilting and browning, a significant decrease in relative water content, electrolyte exudation rates increased significantly, and the accumulation of proline and soluble proteins was inhibited, indicating that *PsPP2C50* negatively regulates plant cold tolerance.

(3) To elucidate the downstream molecular network of *PsPP2C50*, four candidate interacting proteins were identified through analysis of the Korla pear genome and winter transcriptome. Validation using yeast two-hybrid, BiFC, and GST pull down assays demonstrated that *PsPP2C50* and *PsSnRK2.7* exhibit a specific interaction within the endoplasmic reticulum.

(4) Subcellular localization shows that *PsSnRK2.7* is localized in both the nucleus and the endoplasmic reticulum, and its gene expression is induced by ABA signaling. Overexpression of *PsSnRK2.7* can significantly enhance the cold tolerance of mulberry, which is opposite to the result of *PsPP2C50* overexpression.

(5) Using virus-induced gene silencing (VIGS) technology, the expression of the *PsPP2C50* and *PsSnRK2.7* genes was silenced in dormant Korla pear branches, respectively. The results showed that as the

temperature decreased, intercellular water content in phloem tissue tended to increase, while intracellular water content decreased. However, silencing *PsPP2C50* significantly increased intracellular water content and decreased intercellular water content, whereas silencing *PsSnRK2.7* exhibited the opposite trend. Additionally, branches with *PsPP2C50* silenced showed a decrease in free water content and an increase in bound water content, while those with *PsSnRK2.7* silenced exhibited the exact opposite characteristics.

Conclusion: During overwintering, the phloem tissue of Korla pears employs an intercellular freezing strategy. As the temperature drops, excess intracellular water is continuously exuded into the intercellular spaces, thereby effectively preventing the formation of intracellular ice crystals. However, excessive exudation of intracellular water can easily lead to the withering of branches. This study found that the ABA-induced *PsHB12* gene upregulates the expression of the *PsPP2C50* gene, while *PsPP2C50* suppresses its function by interacting with *PsSnRK2.7*. Through this ABA negative feedback regulatory mechanism, cellular water balance is maintained under cold stress. This research not only contributes to understanding the molecular genetic background of fragrant pear overwintering but also provides a theoretical basis for the breeding of cold-tolerant fragrant pears.

Key words: Korla pears; PP2C; SnRK2; ABA signaling; Overwintering

目录

摘要	I
Abstract	II
目录	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 冬季低温胁迫对植物的影响	1
1.1.1 植株与器官水平在冬季低温下的冻害症状	1
1.1.2 冬季低温对细胞膜系统的影响	2
1.1.3 冬季低温诱导的氧化胁迫	2
1.2 木本植物的休眠诱导与抗寒性建立	3
1.2.1 休眠类型及其与抗寒性建立的关系	3
1.2.2 冷驯化导致的生理生化变化	4
1.2.3 过冷机制与细胞玻璃化	5
1.3 ABA 介导的植物抗寒信号转导网络	5
1.3.1 ABA 的合成、感知与核心信号传导	5
1.3.2 ABA 介导的抗寒基因网络激活与调控	6
1.3.3 ABA 信号的负反馈与动态平衡机制	7
1.4 PP2C 基因家族在胁迫响应中的功能角色与分子机制	7
1.4.1 PP2C 家族的结构特征与物种分布	8
1.4.2 PP2C 各亚家族的功能分化	8
1.4.3 A 亚家族的 PP2C 参与 ABA 信号通路	9
1.5 本研究的目的、意义与技术路线	9
1.5.1 研究目的与意义	9
1.5.2 技术路线	10
第 2 章 <i>PsPP2C50</i> 基因的特征分析与亚细胞定位	12
2.1 实验材料	12
2.2 实验方法	12
2.2.1 <i>PsPP2C50</i> 基因特征分析	12
2.2.2 <i>PsPP2C50</i> 蛋白的结构分析	12
2.2.3 <i>PsPP2C50</i> 蛋白的亲疏水性预测分析	13
2.2.4 <i>PsPP2C50</i> 蛋白保守结构域及基因顺式作用元件分析	13

2.2.5	<i>PsPP2C50</i> 系统进化分析	13
2.2.6	<i>PsPP2C50</i> 的表达模式分析	13
2.2.7	<i>PsPP2C50</i> 的亚细胞定位分析	15
2.3	数据处理	16
2.4	结果与分析	16
2.4.1	<i>PsPP2C50</i> 的序列特征与理化性质	16
2.4.2	<i>PsPP2C50</i> 编码的蛋白质结构	16
2.4.3	<i>PsPP2C50</i> 蛋白的亲疏水性预测	18
2.4.4	<i>PsPP2C50</i> 蛋白保守结构域及基因的顺式作用元件分析	18
2.4.5	<i>PsPP2C50</i> 的系统进化分析	19
2.4.6	<i>PsPP2C50</i> 的表达模式分析	20
2.4.7	<i>PsPP2C50</i> 的亚细胞定位分析	21
2.5	结论与讨论	21
2.6	本章小结	22
第 3 章	<i>PsPP2C50</i> 的抗寒功能验证及互作蛋白的鉴定	23
3.1	实验材料	23
3.1.1	植物材料	23
3.1.2	菌株与质粒	23
3.1.3	主要试剂及仪器	23
3.2	实验方法	25
3.2.1	<i>PsPP2C50</i> 转基因桑树的获得	25
3.2.2	低温处理与生理指标的测定	26
3.2.3	候选互作 <i>PsSnRK2</i> 家族成员的筛选	27
3.2.4	酵母双杂交点对点互作验证	28
3.2.5	双分子荧光互补 (BiFC) 验证	29
3.2.6	GST pull down 体外互作验证	30
3.3	数据处理	32
3.4	结果与分析	32
3.4.1	<i>PsPP2C50</i> 转基因桑树的低温耐受性分析	32
3.4.2	候选互作蛋白筛选	37
3.4.3	酵母双杂交筛选互作蛋白	39
3.4.4	BiFC 验证体内互作	41
3.4.5	GST pull down 体外互作验证	41
3.5	结论与讨论	42

3.6 本章小结	44
第4章 PsPP2C50-PsSnRK2.7 模块与抗寒水分平衡的调控机理	45
4.1 实验材料	45
4.2 实验方法	45
4.2.1 <i>PsSnRK2.7</i> 的表达模式分析	45
4.2.2 <i>PsSnRK2.7</i> 亚细胞定位分析	45
4.2.3 <i>PsSnRK2.7</i> 的功能验证	45
4.2.4 VIGS 载体构建与侵染	46
4.2.5 沉默株系的低温处理及相关生理指标的测定	47
4.3 数据处理	48
4.4 结果与分析	48
4.4.1 <i>PsSnRK2.7</i> 的表达模式	48
4.4.2 <i>PsSnRK2.7</i> 在细胞核与内质网的双定位	49
4.4.3 过表达 <i>PsSnRK2.7</i> 增强桑树的低温耐受性	50
4.4.4 VIGS 沉默 <i>PsPP2C50</i> 与 <i>PsSnRK2.7</i> 对香梨枝条水分状态的影响	53
4.5 结论与讨论	56
4.6 本章小结	59
第5章 总结与展望	60
5.1 主要结论	60
5.2 创新点	60
5.3 展望	61
参考文献	62
附录	74
致谢	83
作者简介	84

主要缩略词表

英文缩写 English abbreviation	英文名 English name	中文名 Chinese name
ABA	Abscisic acid	脱落酸
TDZ	Thidiazuron	噻苯隆
Tm	Timentin	特美汀
MES	2-Morpholinoethanesulfonic Acid	2-吗啉乙磺酸
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量
RT-PCR	Reverse transcription PCR	反转录 PCR
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
REL	Relative electrolyte leakage rate	电解质外渗率
RWC	Relative water content	相对含水量
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Gen	Gentamicin	庆大霉素
AS	Acetosyringone	乙酰丁香酮
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
ABRE	ABA-responsive element	ABA 响应元件
CDS	Coding Sequence	编码序列
TRV	Tobacco rattle virus	烟草脆裂病毒
eGFP	Enhanced green fluorescent protein	增强型绿色荧光蛋白
YFP	Yellow fluorescent protein	黄色荧光蛋白
GST	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽巯基转移酶
VIGS	Virus-Induced gene silencing	病毒诱导的基因沉默

第1章 绪论

1.1 冬季低温胁迫对植物的影响

根据冬季气温变化特点及胁迫温度的不同,可将冬季低温对植物造成的损伤分为冷害与冻害两类。在 0°C 以上的低温环境下通常会发生冷害,而在 0°C 以下的低温环境则会发生冻害。两类损伤在植株与器官水平呈现出不同的外观症状。冷害症状主要表现为植株生长迟缓、叶片失绿、萎蔫,严重时出现水渍状坏死斑块^[1]。冻害症状则更为严重。组织结冰导致叶片或枝条褐变、萎蔫,呈烫伤状,直至整株死亡^[2,3]

1.1.1 植株与器官水平在冬季低温下的冻害症状

冬季,植物面临的主要胁迫是冰点以下的冻害以及伴随的生理干旱。与生长季不同,进入冬季的落叶植物的叶片已经脱落,植株以枝条、芽、主干和根系等器官度过严寒期。不同器官对低温的敏感程度存在明显差异,其损伤表现也各有特点。

枝条和芽是落叶植物越冬的关键器官,也是对冬季低温最为敏感的部位。当冬季气温降至植物耐受阈值以下时,花芽和叶芽内部可能发生结冰,导致花原基或生长点坏死,受冻芽的外观表现为芽体褐变、干枯,翌年春季不能正常萌发^[4]。即使部分萌发,也常出现开花不整齐、花朵畸形或大量落花^[5]。对于果树而言,花芽冻害直接影响坐果率和果实品质。研究表明,在气温低于 -10°C 时,元帅、金冠、胜利、富士、国光等苹果品种因冻害导致其坐果率分别下降43.8%、9.7%、17.6%、21.6%和23.2%^[6]。枝条受冻后,形成层和髓部变为淡褐色,严重时可导致形成层坏死,水分和养分运输中断,枝条逐渐干枯死亡,树皮也随之开裂、剥离^[7]。枝条受冻的另一典型表现为枝条抽干,这是由于枝条中的水分在冬季散失而导致的。

主干和树皮在越冬期间同样面临冻害威胁。主干冻害主要有两种形式。其一为冬季日灼,多出现在向阳面,初冬和早春时节昼夜温差显著,白天皮部组织随气温升高而开始活动,到了夜间温度急剧下降,皮部组织便易受冻^[8]。其二为冻裂,初冬气温猛降时,皮层组织快速冷缩,木质部冷缩速度相对较慢,二者冷缩程度不同产生拉应力,致使树皮被撑裂^[9]。受冻树皮纵向开裂,严重时环绕树干,阻断水分和养分运输,导致整株死亡^[10]。此外,根颈部因最晚停止生长、气温回升后又活动较早,导致抗寒性较差,并且由于其接近地表、温差大,容易发生韧皮部变褐、坏死等现象^[11]。主干与根颈部的冻害相互影响,严重时均可导致整株死亡。

根系虽处于土壤中,但同样面临冻害风险。由于无法进入自然休眠状态,根系的抗

冻能力普遍较弱，其中靠近地表的根系受冻害风险最高。尤其在冬季少雪、干旱的沙土地条件下，这一危害更为严重^[12]。冻害会导致根系皮层变褐，并与木质部发生分离或脱落。受冻根系无法正常吸收水分和养分，但植株在春季初期仍可依靠自身储存的物质发芽，待储存物质耗尽后，地上部分因供水不足而突然萎蔫死亡^[13]。根系冻害具有隐蔽性，因其症状在春季发芽后才显现，因此，无法被及时察觉，典型表现为春季植株在萌发后不久突然死亡。

综上所述，植株与器官水平的外观损伤不仅是判断冻害程度的直观依据，更是低温胁迫在宏观层面的表现。这些可见的萎蔫、褐变、开裂与坏死，与低温对细胞膜系统结构与功能的破坏密切相关。

1.1.2 冬季低温对细胞膜系统的影响

当冬季气温降至冰点以下时，细胞间隙的水分因冰点较高且缺乏冰核抑制物质而率先结冰，细胞内水分则因溶质浓度较高仍维持过冷状态^[14]。胞外冰晶的形成导致细胞间隙水势显著降低，从而在胞外与胞内之间形成水势梯度，驱动胞内水分外排至胞间，导致细胞急剧脱水^[15]。这一脱水过程并非均匀发生，而是随着胞外冰晶的不断扩张，原生质体体积会逐渐缩小，质膜随之向内凹陷并发生皱缩。若降温速度缓慢，细胞尚有时间通过调整质膜组成来适应这种体积变化。但当冬季气温骤降时，脱水速率超过质膜的承受极限，膜脂发生相变，膜通透性显著增加，导致膜系统出现不可逆损伤^[9,10]。

细胞膜系统的损伤并不止于结冰阶段。在气温回升的解冻过程中，胞间冰晶融化使细胞外液渗透压急剧下降^[14]。此时，若细胞膜已在冷冻脱水阶段受损，质膜将无法有效调控水分的跨膜运输，导致水分快速回渗，进一步加剧膜通透性的改变和离子平衡的破坏^[16-18]。虽然植物细胞壁的存在可防止细胞因吸水过多而涨破，但膜功能的持续紊乱仍会严重影响细胞正常代谢。研究表明，解冻阶段的渗透膨胀是细胞发生膜损伤的重要原因之一^[19]。此外，即使细胞在冻融循环中存活下来，膜脂相变引发的膜蛋白功能紊乱也可能持续存在，表现为离子稳态难以恢复、代谢速率下降等长期影响。

然而，冬季气温的剧烈波动或极端低温的持续过长时，会不可避免地造成膜结构损伤与功能紊乱，进而阻碍细胞内电子传递，这就诱发活性氧（ROS）爆发，产生的活性氧进一步去加剧细胞膜的损伤，这也就是氧化胁迫产生的原因。

1.1.3 冬季低温诱导的氧化胁迫

膜系统损伤的另一个重要后果是细胞内 ROS 的过量积累。低温会破坏细胞代谢平衡，抑制线粒体等细胞器电子传递链的活性，导致活性氧（包括 O_2^- 和 H_2O_2 ）的产生速率超过其清除速率，最终导致氧化胁迫的发生^[20]。

活性氧引发细胞损伤的核心特征在于膜脂发生过氧化反应。ROS 作用于膜脂中的不饱和脂肪酸，诱发链式反应，并伴随丙二醛（MDA）等过氧化产物的生成，导致膜脂结构被破坏、膜的流动性和选择性通透性进一步下降^[21]。研究表明，低温胁迫下 MDA 含量的变化趋势与电解质渗出率的变化趋势基本一致，说明膜损伤与氧化胁迫相互加剧^[22]。

面对氧化胁迫，植物会激活自身的抗氧化防御体系。低温条件下，超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）和过氧化氢酶（CAT）等抗氧化酶的活性被诱导升高，其作用是消除细胞内过量积累的 ROS^[23]。然而，当低温胁迫强度过大或持续时间过长时，抗氧化酶的活性会逐渐下降，活性氧的产生与清除失衡^[24]。未被及时清除的活性氧会进一步攻击膜系统，造成更严重的膜脂过氧化，形成恶性循环。研究表明，冷驯化可以有效增强植物的抗氧化能力，经过低温锻炼的植株，其抗氧化酶活性更高，可以更好地维持 ROS 的平衡，从而减轻其对细胞膜系统的氧化损伤^[25]。

综上，冬季低温对植物的伤害源于胞间结冰。胞间结冰造成被动细胞脱水，致使细胞膜脂发生相变、膜的通透性增加。膜结构破坏又触发 ROS 爆发式累积，膜损伤与氧化胁迫相互放大，最终导致细胞代谢紊乱和植株冻害。而高纬度地区的木本植物为了在冬季寒冷条件下存活，演化出了休眠与冷驯化等适应性策略来规避或减轻上述损伤。

1.2 木本植物的休眠诱导与抗寒性建立

植物越冬是植株在低温、冰冻、光照和热量资源短缺条件下维持存活并保障翌年春季正常萌动的关键阶段。木本植物长期适应季节性变化，已形成以休眠诱导、组织抗冻性提升为核心的越冬策略。伴随日照缩短及太阳辐射强度下降，植株逐步终止活跃生长并转入生理休眠，最大限度减少能量消耗。

1.2.1 休眠类型及其与抗寒性建立的关系

植物休眠是内源激素与外源环境共同作用的复杂生理过程，依据诱导因素，休眠可分为三种类型，即类休眠、内休眠和生态休眠^[26]。类休眠源于植株其他器官的结构性约束，例如，顶芽输出生长素形成浓度梯度，一旦切除顶端，侧芽即可迅速恢复生长^[27,28]。内休眠由器官内部生理机制主导。在此机制下，芽组织自身无法萌发，必须依靠足够时长的外部低温刺激来逆转内部状态，才能解除停滞，为后续萌发奠定基础。该阶段既是多年生植物年周期中的必经环节，也是解析落叶果树休眠机理的关键切入点^[29,30]。生态休眠由外界不利条件引发，如干旱、低温或养分匮乏均可使生长暂时停顿。当限制因素消失后，植株才能恢复生长^[31,32]。

木本植物抗寒性的系统性建立始于内休眠的启动，该阶段通常出现在夏末秋初。缩短的光周期与昼夜节律共同下调赤霉素（GA）的合成并提升脱落酸（ABA）的含量水

平,从而阻止细胞分裂^[33]。在冷胁迫相关基因被诱导表达的同时,植物的抗寒性也开始初步建立^[34]。随着温度的进一步降低,芽体逐步进入深度内休眠阶段。在应对冷冻胁迫的过程中,细胞膜通过不断增加不饱和脂肪酸的含量来维持膜系统在低温环境下的流动性,进而确保细胞结构的完整性不受破坏^[21]。脯氨酸与棉子糖系列寡糖(RFOs)迅速累积,提高细胞渗透势,减少胞内水分外流^[35]。LEA等可溶性蛋白的积累可以稳定膜结构,并防止冷冻胁迫导致的细胞过度失水^[36]。同时,SOD、POD与CAT等抗氧化酶协同清除过量ROS,避免氧化损伤。在上述机制的协同作用下,植物的抗冻性不断增强^[37]。

内休眠的完整生理链由起始、维持与终止三个连续环节组成。落叶果树在秋季同时感知短日照与低温双重信号,但不同树种对主导因子的响应存在差异^[38]。苹果与梨的休眠诱导主要受低温调控^[39],而桃则优先依赖短日照,低温仅起辅助作用^[40]。当植株完成休眠诱导并转入维持期后,必须在0-7℃范围内经历足够时长的低温方可触发休眠终止,否则将导致萌芽不齐、开花延迟^[41,42]。

进入冬末春初,生态休眠接替内休眠成为芽体状态的主导因素,环境温度成为限制萌发的直接条件。冷调节基因表达虽呈下降趋势,但其对抗寒性的基础性维持作用仍在持续^[43]。纵观越冬全程,秋季光周期缩短与气温逐渐下降构成冷驯化的起始信号。植物在长期进化中将低温锻炼与休眠紧密关联,依赖激素再平衡及保护性物质的协同积累,建立对持续低温的系统适应。导致植物抗冻性的建立的原因,依赖于植物进化出的另一种生存策略,即冷驯化。秋季植物经冷驯化后会调整内部生理生化反应增强植物的抗冻性。

1.2.2 冷驯化导致的生理生化变化

缩短光照时间、降低光照强度并配合低温锻炼,可协同诱发冷驯化,从而增强越冬能力^[44]。昼夜节律在光周期与低温的共同调控下主导该过程,成为多年生植物触发休眠的关键机制^[45]。秋季冷驯化是温带植物在0℃以上低温条件下启动的可逆适应性程序,通过系统性的生理与生化重构应对即将到来的严冬,主要表现为生长停滞、呼吸速率下降、细胞分裂减缓及叶片形态变化等特征^[46]。植物进入生长暂停状态以降低代谢消耗。例如,秋季植物降低呼吸速率并减慢细胞分裂,表现为叶片黄化与厚度增加^[47]。这种生长抑制由ABA主导,有利于保存能量以抵御寒冷^[48]。

植物还通过合成抗冻蛋白(AFPs)进行渗透调节,该类蛋白主要抑制冰晶重结晶,防止小冰晶在温度波动下融合为大冰晶^[14,18]。此外,低温驯化中另一重要策略是增强脱水耐受性,即降低细胞内自由水含量以减少可结冰水分^[14]。同时,细胞合成脯氨酸、甜菜碱、蔗糖、山梨糖醇等渗透调节物质,以降低胞内冰点并防止脱水损伤^[24]。

伴随秋季降温,植物重塑膜脂组成,显著提高不饱和脂肪酸比例,使膜相变温度下降,从而维持低温流动性^[49]。研究表明,低温驯化可诱导茶树及杂交杨中FAD家族基

因的表达上调, 该基因通过维持膜系统流动性, 增强植物在冬季低温环境中的耐受性^[50,51]。上述变化协同提升细胞的过冷能力, 为细胞玻璃化创造条件。

1.2.3 过冷机制与细胞玻璃化

冬季, 高纬度植物面临的主要威胁之一就是细胞内结冰。冰晶在细胞内部形成后, 可直接对细胞膜结构产生不可逆的破坏作用, 最终导致细胞死亡。为抵御这一低温胁迫, 木本植物在进化过程中形成了两套防御机制, 即过冷机制与细胞玻璃化。过冷机制可避免胞内水分结晶, 使水分子在低于冰点的条件下仍保持液态^[52]。细胞玻璃化则通过使胞质黏度急剧升高, 水分子扩散停滞, 最终转化为无定形固态, 从而避免冰晶形成^[53]。二者协同作用, 可以保证植物在冬季严寒环境中正常存活并安全越冬。

过冷机制 (Deep supercooling) 指植物细胞在极端低温条件下仍能保持液相的能力^[54]。研究发现, 矮竹 (*Sasa senanensis*) 叶片在冬季可通过过冷机制, 使叶肉细胞在-20°C下仍保持液态而不结冰^[55]。过冷机制通常仅能维持至-40°C左右, 而某些木本植物在更低温下可通过胞内玻璃化维持细胞活性^[56]。

当温度进一步降低, 超过过冷机制的维持极限时, 细胞进入另一种更极端的保护状态, 即细胞玻璃化。在低温或极度脱水条件下, 细胞质中的水分和溶质因黏度急剧升高而来不及形成冰晶, 最终转变成一种无定形、非晶态的“玻璃状固体”^[57]。此时细胞进入类似休眠的状态, 但细胞结构未被冰晶破坏, 仍具有潜在活性。这一过程被称为细胞玻璃化, 其本质是大分子拥挤导致水分子扩散停滞, 抑制冰晶形成^[58,59]。玻璃化状态的细胞可在液氮 (-196°C) 中长期存活^[60]。类似地, 在自然环境中, 玻璃化也为木本植物在极端寒冷 (如-50°C) 条件下的存活提供了重要保障。在冷驯化的杨树 (*Populus*) 枝条中, 当温度缓慢下降至-28°C以下时, 细胞内部的水分不再形成冰晶, 而是转变为无定形固体^[61]。这种转变发生在大约-45°C, 随后在-70°C以下发生第二次玻璃转变^[62]。即使解冻过程非常缓慢 ($\leq 5^\circ\text{C/h}$), 植物组织仍能保持活性, 避免冰晶对细胞造成致命损伤^[63]。综上, 木本植物越冬休眠过程中通过各种机制协同提高对冬季低温的耐受性, 而 ABA 与在这个过程中发挥着重要作用。

1.3 ABA 介导的植物抗寒信号转导网络

1.3.1 ABA 的合成、感知与核心信号传导

ABA 是一种广泛存在于植物体内的倍半萜类激素, 在种子休眠、萌发及逆境响应中发挥关键调控作用^[64]。在低温胁迫下, 植物内源 ABA 水平显著上升, 并与植株抗寒能力密切相关, 如黄瓜叶片和根系中的 ABA 含量即与其耐寒性呈正相关^[66]。外源 ABA 处