

# 渝 17S 对低温胁迫的响应及耐冷机制初步研究

潘晓雪<sup>1</sup>, 张现伟<sup>2</sup>, 李经勇<sup>2</sup>, 雷开荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 重庆市农业科学院生物技术研究中心 / 逆境农业研究重庆市重点实验室, 重庆 401329;

<sup>2</sup> 重庆市农业科学院重庆再生稻研究中心, 重庆 402160)

**摘要:** 重庆及西南稻区水稻幼苗期倒春寒频发, 常常导致秧苗生长迟缓, 白化、烂秧等发生, 制约了优质水稻安全生产和轻简化技术的应用。本研究以耐冷性较强的渝 17S 和对低温敏感的 Y58S 为材料, 对比研究了 3 叶龄幼苗经 4 °C 低温处理后, 二者可溶性糖、海藻糖、脯氨酸、丙二醛和过氧化氢的含量, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶的活性, 以及荧光定量 PCR 检测胁迫相关的 9 个基因的表达情况。结果表明: 与 Y58S 相比, 渝 17S 具有更强的苗期耐冷性, 在低温胁迫下, 其死苗率为 7.5%, 而 Y58S 死苗率高达 96.7%; 低温胁迫下 2 个品种叶片中丙二醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量均升高, 但渝 17S 增幅较小; 渝 17S 叶片中抗氧化酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶)活性, 可溶性糖和海藻糖含量, 以及 *OsCATB*、*OsSOD*、*OsAPx8*、*OsTPS1*、*OsTPPI*、*OsMKG6*、*OsMAPK3* 和 *OsICE1* 基因表达量均呈不同程度增加; 2 个品种叶片中脯氨酸含量和脯氨酸合成限速酶基因(*OsP5CS*)的表达量未见明显差异。初步认为, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号分子和海藻糖可以调控渝 17S 对低温胁迫的响应, 从而增强其幼苗的抗寒性。

**关键词:** 水稻; 低温胁迫; 苗期; 耐冷机制

## The Effect of Low Temperature Stress on the Growth of 'Yu17S' and a Preliminary Study of Cold-resistance Mechanisms

PAN Xiao-xue<sup>1</sup>, ZHANG Xian-wei<sup>2</sup>, LI Jing-yong<sup>2</sup>, LEI Kai-rong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Biotechnology Research Center, Chongqing Academy of Agricultural Sciences/Chongqing Key Laboratory of Adversity

Agriculture, Chongqing 401329; <sup>2</sup> Chongqing Ratoon Rice Research Center, Chongqing

Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 402160)

**Abstract:** "Late spring coldness" negatively affects rice seedling establishment and leads to rice growth retardation, albinism and rotten in Chongqing and southwest China, which severely restricts the production of high-quality rice and the application of optimal cultivation technologies. To investigate the cold tolerance of the chilling-tolerant *indica* cultivar Yu17S and chilling-sensitive *indica* cultivar Y58S seedlings, different parameters including the contents of soluble sugar, trehalose, proline, MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the activities of antioxidant enzyme (SOD, POD and CAT), and the relative expression of stress relative genes were deployed. If compared with Y58S with the dead seedlings rate of up to 96.7%, Yu17S represented 7.5% of the dead seedlings rate, suggesting a stronger cold tolerance at the seedling stage upon the low temperature stress. The contents of both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA increased in both cultivars under the low temperature stress, whereas both values of Yu17S were lower than these of Y58S. In Yu17S, the CAT, SOD and APX activity, soluble sugar and trehalose content, as well as the transcripts of genes *OsCATB*, *OsSOD*, *OsAPx8*, *OsTPS1*, *OsTPPI*, *OsMKG6*, *OsMAPK3* and

收稿日期: 2020-05-27 修回日期: 2020-07-02 网络出版日期: 2020-08-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200527002>

第一作者研究方向为植物抗逆性(非生物胁迫)生理生化、植物抗逆性基因工程育种, E-mail: xiaoxuepan@126.com; 张现伟为共同第一作者

通信作者: 李经勇, 研究方向为中稻、再生稻栽培技术研究和品种选育, E-mail: ljiy@cqagri.gov.cn

雷开荣, 研究方向为水稻遗传育种、栽培及综合利用研究, E-mail: leikairong@126.com

基金项目: 重庆市农业科学院青年创新团队项目(NKY-2018QC04)

Foundation project: Program for Young Innovative Research Team in Chongqing Academy of Agricultural Sciences(NKY-2018QC04)

*OsICE1* have been observed to be significantly increased. No significant differences on the proline content and on the expression of *OsP5CS* that controls the proline biosynthesis in both cultivars were observed. It is possible that the  $H_2O_2$  signal molecule and trehalose of Yu17S may respond to the low temperature stress at the seedling stage, thus resulting in an enhancement on cold resistance.

**Key words:** rice; low temperature stress; seedling; cold-resistance mechanisms

低温是影响植物生长季节和地理分布的主要胁迫因子之一<sup>[1-3]</sup>。低温冷害虽不像霜冻及其他灾害那样引起作物枯萎、死亡等明显症状,但会引起植物体内一系列生理及代谢物的变化,如叶绿素合成受阻,渗透调节物质、丙二醛(MDA, malondialdehyde)、活性氧(ROS, reactive oxygen species)等含量的改变,因此即使恢复到适宜条件,受胁迫的植物的生长发育仍然受到显著抑制<sup>[4]</sup>。在低温胁迫下,积累大量的渗透调节物质(如可溶性糖和脯氨酸)来提高自身的渗透调节能力<sup>[5]</sup>。脯氨酸不仅可以保护低温胁迫下的蛋白质分子的完整性,还可以增强相关酶的活性和减少植物体内因胁迫产生的 ROS 来抵御冷害<sup>[6-7]</sup>。ROS 作为第二信使参与植物生长发育,激素信号转导以及逆境胁迫应答过程,但是 ROS 的过多积累会引起细胞膜脂不饱和和脂肪酸的过氧化作用,同时促进多聚不饱和脂肪酸降解并产生 MDA,从而损伤细胞膜系统<sup>[8-9]</sup>。因此,在植物体内形成一套抗氧化防御机制,超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化氢酶(CAT, catalase)和抗坏血酸过氧化物酶(APX, ascorbic acid peroxidase)作为抗氧化酶可以降解多余的过氧化氢( $H_2O_2$ )等 ROS,避免植物遭受过氧化伤害<sup>[10]</sup>。

CBF 是一类不依赖 ABA 的低温应答信号途径中的重要转录因子。CBF 的保守结构域 AP2 与低温响应基因(*CORs*)启动区结合,激活 *CORs* 基因的表达进而增强植物对低温胁迫的耐受性。在低温条件下, *CBF* 基因通常受上游 bHLH 类转录因子 ICE1 调控。因此,该低温调控途径又称为 ICE-CBF-COR 途径<sup>[11]</sup>。在水稻中,低温胁迫诱导 *OsMAPK3* 激活, *OsMAPK3* 的激活能够磷酸化 *OsICE1*/*OsHHLH002*,同时抑制 *OsICE1* 与 *OsHOS1* 的结合,进而抑制 *OsICE1* 的降解,维持了 *OsICE1* 的稳定性。磷酸化的 *OsICE1* 与 *OsTPP1* 启动子的 E-box 基序结合调控 *OsTPP1* 的表达,促进植物体内海藻糖的累积从而增强水稻对低温胁迫的耐受能力<sup>[11-12]</sup>。

水稻是喜温植物,在 10~12 °C 以下便会遭受

冷害<sup>[13-15]</sup>。在重庆春季,水稻苗期常常受倒春寒影响,白化苗、烂苗、死苗现象异常严重。随着直播等轻简化栽培技术的广泛应用,无薄膜保暖措施,幼苗期遇到持续期较长的倒春寒是这些地区水稻减产的主要因素之一;若延迟播种,又因重庆夏季高温频发,会导致水稻孕穗灌浆处于夏季的高温闷热气候条件,对产量及品质均会造成极大的负面影响。因此,提高水稻品种的苗期耐冷性对确保“苗全苗壮”、促进安全生产具有重要意义。通过杂交和回交的方式,将东乡野生稻中的耐冷基因导入到栽培稻中,育成的强耐冷粳稻品种可自然越冬<sup>[16-17]</sup>,这为改良栽培品种或选育新品种从而为生产实践提供了一定的理论依据。渝 17S 是通过核不育两用系 Y58S 与三系不育系渝 802A 杂交、分离鉴定选择、选育出的籼型光温敏不育系,它具有苗期耐冷性较强、不育期长、不育临界起点温度低、配组的杂交稻品质好且产量高等特点。本研究以渝 17S 和 Y58S 为材料,对比研究了低温胁迫对水稻幼苗生长、细胞膜透性、渗透调节和抗氧化能力的影响,以及相关耐冷胁迫相关基因在叶片中的表达情况,探究其耐冷性及调控机制,可为重庆地区培育耐冷新品种及制定合理栽培措施提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验材料为渝 17S (*Oryza.sativa* L.subsp.*indica* S.Kato) 和 Y58S (*Oryza.sativa* L.subsp.*indica* S.Kato),均由重庆市农业科学院重庆再生稻研究中心提供。

### 1.2 水稻苗期低温胁迫处理

2019 年 3 月上旬,试验在重庆市农业科学院生物技术研究中心 5 楼人工气候箱(型号: Climacell 222, 德国 MMM 集团产品)中进行。随机选取健康饱满且无病虫害的种子分 3 次播种,用 0.1% 的 HgCl 消毒 10 min,然后用去离子水冲洗干净,蒸馏水浸种 24 h 后,选择露白的种子播在剪破的 96 孔 PCR 板上,将 PCR 板放入遮光塑料盒中,置于 26 °C 光照培养箱内生长,光照强度 12000 lx、光照 12 h,空气相对湿度 70%~80%。去离子水培养

一周后加入国际水稻所 (IRRI, International Rice Research Institute) 配方营养液, 每 3 d 更换 1 次营养液。待苗生长至 3 叶 1 心期时剔除弱苗, 选取均匀一致的幼苗在 4 ℃ 的光照培养箱中 24 h 光照处理。48 h 后将处理材料置于 26 ℃ 弱光下恢复生长 1 周 (先弱光下生长 2 d, 再正常光照条件下生长 5 d), 记载死苗数。其中死苗率 (%) = (死苗数 / 成苗数) × 100%。参照潘晓雪等<sup>[17]</sup>的方法将死苗率作为苗期耐冷性的评价指标, 略有改动, 分 1~9 级评价。死苗率 ≤ 20% 评为 1 级, 为强耐冷品种; 20% < 死苗率 ≤ 50% 评为 5 级, 为中度耐冷品种; 死苗率 > 50% 评为 9 级, 为不耐冷品种。

### 1.3 苗期耐冷性相关生理生化指标测定

将渝 17S 和 Y58S 按上述方法培养。待苗生长至 3 叶 1 心时, 参照潘晓雪等<sup>[17]</sup>的方法将试验材料放入 4 ℃ 光照培养箱中进行低温处理, 分别于处理后 0 h、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h 取样, 样品保存于 -80 ℃ 冰箱内用于测定各项指标, 各指标的测定均设置 3 个重复。可溶性糖、海藻糖、脯氨

酸, MDA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量, SOD、CAT 和 APX 活性测定均采用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒检测。

### 1.4 基因表达量

利用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 参照说明书提取水稻叶片总 RNA, RNA 提取后再用 DNase (Roche) 处理, 以防 DNA 污染。取 1 μg RNA, 按照反转录试剂盒 Reverse Transcription system (Promega 公司) 进行 cDNA 的第一链合成。

以 cDNA 为模板, 以 ubiquitin 1 (*OsRub1*) (GenBank 登录号: AF184729) 为内参, 采用定量试剂盒 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司) 的操作步骤在实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 7500, Foster City, USA) 上进行 qRT-PCR 反应, 所有基因特异引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。qRT-PCR 反应条件为: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环; 60 ℃ 收集荧光。每个试验 3 次生物重复和 3 次技术重复, 基因相对表达量采用  $\Delta\Delta CT$  法。

表 1 用于实时定量 PCR 分析的引物信息

Table 1 Gene-specific primers used for qRT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
<i>OsSOD</i> (XM_015784641)	GAAGCACACGCCACCTAC	CTCCGCCGTTGAACTTGAT
<i>OsCATB</i> (AK069446)	GCACAGTTTGACAGGGAGCG	GGTCTGAACACCAGGAGCAG
<i>OsAPx8</i> (AB114856)	CTCAAGACCACCTACTGCCAC	TCAATTCGGCGTCAAATCTC
<i>OsTPS1</i> (AK072132)	GGGGCAAGGATGAACTGG	CCCTGCGATGTTCTTCCAAT
<i>OsTPPI</i> (AK103391)	TGTCTCCCGTGATGAGAGCTG	AAACACCTTATTGCGGGACCTT
<i>OsP5CS</i> (AK102633)	CGGGAGCAACTCACTGAAACT	AGTGCCAACAGTCCTGCTAAAC
<i>OsMKK6</i> (AK059461)	TCAAGCAACACAGAACGCAC	GATGAAGATACAGTAGACCCTCC
<i>OsMAPK3</i> (AJ486975)	TGCTCAACTCCACCGACTACT	GCGTCCTCGTTCGGTATG
<i>OsICE1</i> (AK109915)	GAGGACGACGACGACAAGAA	GCCATTGAAGCAACTGATTACA
<i>OsRub1</i> (AF184279)	AGGGTTCACAAGTCTGCCTATT	TTCCATGCTGCTCTACCACAG

### 1.5 数据分析

利用 Office 2007 软件进行数据、表格及文字处理, 使用 OriginPro8 软件绘图。

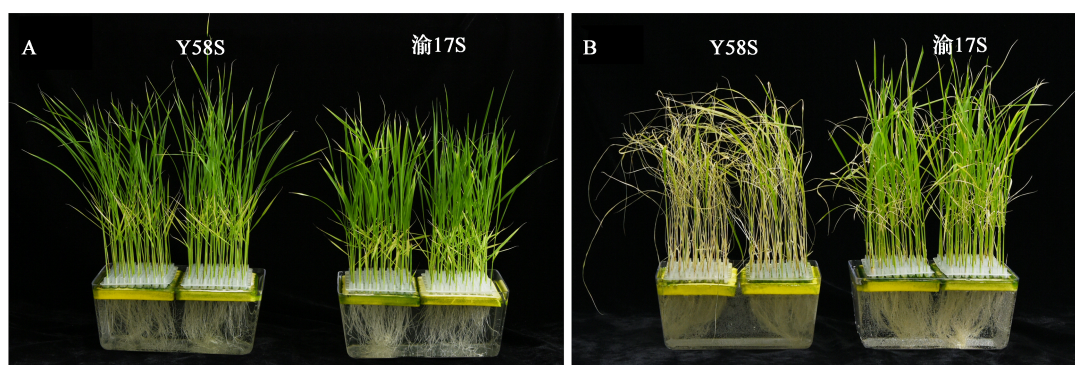
## 2 结果与分析

### 2.1 苗期低温对水稻幼苗生长状况的影响

4 ℃ 处理 48 h 并恢复生长 7 d 后, 渝 17S 和

Y58S 苗期耐冷性强弱的表现差异明显 (图 1)。经 3 次重复试验, 发现亲本 Y58S 低温处理 48 h 后经过 7 d 的恢复生长后的死苗率分别为 96.2%、97.6% 和 96.3%, 平均死苗率为 96.7%, 耐冷等级 9 级, 为不耐冷品种。其渗入系渝 17S 在 3 次苗期耐冷性鉴定中死苗率分别为 5.2%、7.9% 和 9.4%, 平均死苗率为 7.5%, 耐冷等级 1 级, 为强耐冷品种。





渝 17S 和 Y58S 生长至 3 叶期时放入 4 °C 光照培养箱中进行 48 h 的低温处理,然后将处理材料置于正常条件下生长 1 周。

A: 正常生长 3 周幼苗; B: 4 °C 冷处理 48 h 后在正常条件下恢复生长 1 周的幼苗

Yu17s and Y58S seedlings were grown to three-leaf stage under regular growth conditions and then moved to 4 °C ( cold conditions ).

After 48 hours in cold conditions, plants were moved back to regular growth conditions and allowed to recover for one week.

A: Plants just before cold exposure, B: Cold treated plants after recovery for one week

图 1 渝 17S 和 Y58S 的苗期耐冷性表现

Fig.1 Phenotype of Yu17S and Y58S upon chilling stress treatment

## 2.2 低温胁迫对水稻叶片可溶性糖、海藻糖和脯氨酸含量的影响

正常条件下,渝 17S 和 Y58S 叶片中可溶性糖、海藻糖和脯氨酸含量未见明显差异;与未处理时相比,2 个品种在 4 °C 处理后叶片中的可溶性糖、海藻糖和脯氨酸含量都呈上升趋势(图 2)。处理 6 h 后,渝 17S 叶片中可溶性糖和海藻糖含量分别

是 Y58S 的 1.48 倍和 1.35 倍;12 h 后,可溶性糖和海藻糖在渝 17S 叶片中的含量是 Y58S 的 2.36 倍和 2.05 倍;与常温相比,渝 17S 和 Y58S 叶片中脯氨酸含量在低温处理 12 h 后分别上升了 1.71 倍和 1.62 倍,一直持续到 48 h,但是两者脯氨酸含量在低温胁迫处理下未见明显差异(图 2A)。

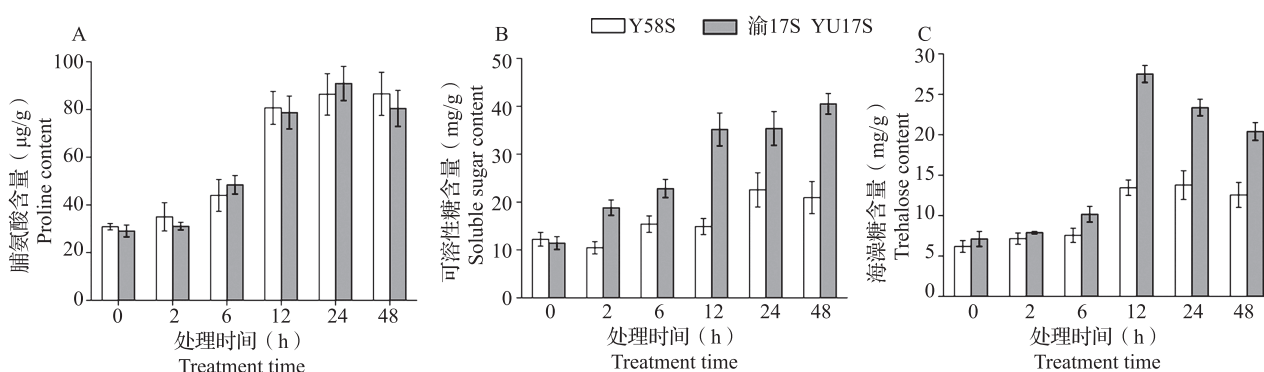


图 2 低温胁迫对渝 17S 和 Y58S 幼苗叶片中的脯氨酸、可溶性糖和海藻糖含量的影响

Fig.2 Contents of proline, soluble sugar and trehalose in the leaves of Yu17S and Y58S under cold stress treatments

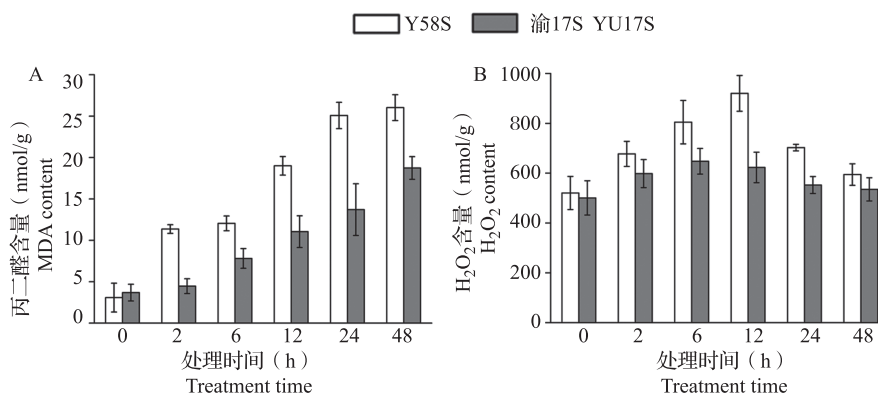
## 2.3 低温胁迫对水稻叶片 MDA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

4 °C 处理后,渝 17S 和 Y58S 叶片 MDA 含量呈不断增加趋势(图 3A)。Y58S 叶片 MDA 含量增加迅速,处理 2 h 后叶片 MDA 含量比常温增加 2.69 倍,渝 17S 增加了 21.19%;处理 24 h 后,Y58S 叶片 MDA 含量是渝 17S 的 1.83 倍(图 3A)。

与此同时,低温处理后,渝 17S 和 Y58S 叶片

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量都呈先增加后降低的变化趋势(图 3B)。处理 2 h 后,渝 17S 和 Y58S 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量逐渐增加,处理 6 h 后渝 17S 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量相对于常温提高了 29.37%,达到最大值,是 Y58S 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的 80.49%;而 Y58S 叶片的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量在处理 12 h 后达到最大值,相对于处理前提高了 66.60%,是渝 17S 的 1.45 倍;但在处理 48 h 后,渝 17S 和 Y58S 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量都比处理前要高(图 3B)。



图3 低温胁迫对渝 17S 和 Y58S 幼苗叶片中的丙二醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响Fig.3 Contents of MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the leaves of Yu17S and Y58S under cold stress treatments

## 2.4 低温胁迫对水稻叶片抗氧化酶 (CAT、APX 和 SOD) 活性的影响

低温处理前,渝 17S 和 Y58S 叶片中 CAT、APX 和 SOD 活性均没有明显差异。总体来看,4 °C 低温处理后,与 Y58S 相比,渝 17S 叶片中的 CAT、SOD 和 APX 的活性有不同程度的增加(图 4)。4 °C 处理后,渝 17S 叶片 CAT 酶活性迅速增加,在 12 h 时上升达最大值,从 20.62 U/g 上升至 73.17 U/g,增加了

2.55 倍,是同时间 Y58S 的 2.09 倍。同时在各处理点,渝 17S 叶片 CAT 酶活性均高于 Y58S(图 4A)。

渝 17S 和 Y58S 水稻叶片 APX 酶活性均呈现先增加后减低的趋势,渝 17S 在处理 2 h 后增加至最大值,从 0.99 U/g 上升至 1.81 U/g,上升了 0.82 U/g,是 Y58S 在同时间点的 1.59 倍(图 4B)。渝 17S 水稻叶片中的 SOD 酶活性在低温处理 2 h 后呈上升趋势,但是 Y58S 与常温相比未见明显变化(图 4C)。

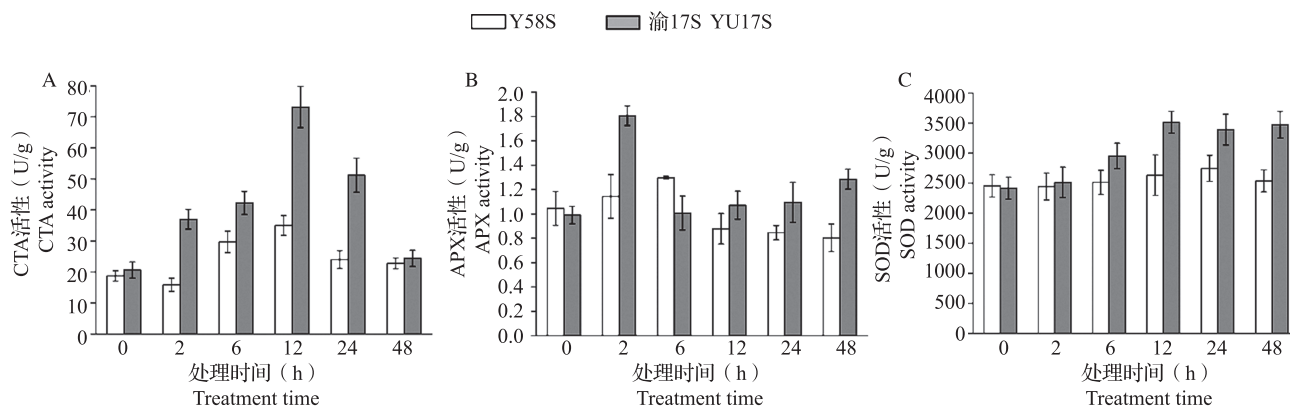


图4 低温胁迫对渝 17S 和 Y58S 幼苗叶片中的 CAT、SOD 和 APX 活性的影响

Fig.4 Activities of CAT, SOD and APX in the leaves of Yu17S and Y58S under cold stress treatments

## 2.5 低温胁迫对水稻胁迫相关基因表达的影响

**2.5.1 渗透胁迫相关基因** 为探究低温胁迫对渗透胁迫相关基因表达的影响,利用 qRT-PCR 技术分析脯氨酸合成限速酶基因 (*OsP5CS*)、海藻糖代谢关键酶基因 (*OsTPS1* 和 *OsTPP1*) 的表达水平。4 °C 低温处理 2 h 后, *OsP5CS*, *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 基因的表达均被诱导上调表达(图 5),表明 *OsP5CS*, *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 基因受到低温诱导,但是渝 17S 叶片 *OsP5CS* 的表达量与 Y58S 相比,没有明显差异。4 °C 低温处理 48 h 后,渝 17S 叶片 *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 表达量分别是 Y58S 的 3.54

倍和 1.39 倍。以上结果表明,通过提高 *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 的转录活性,可以调节低温胁迫下渝 17S 的海藻糖含量,保护水稻幼苗免受伤害。

**2.5.2 抗氧化酶基因** 为进一步研究低温胁迫对水稻抗氧化系统的影响,通过 qRT-PCR 技术对低温胁迫下 *OsCATB*、*OsSOD* 和 *OsAPx8* 基因的表达情况进行了测定。与 Y58S 相比,渝 17S 中 *OsSOD*、*OsCATB* 和 *OsAPx8* 的转录水平在低温处理 48 h 后发生不同程度的上调(图 6)。表明通过提高 *OsSOD*、*OsCATB* 和 *OsAPx8* 的转录水平,可以调节低温胁迫下渝 17S 的抗氧化酶活性,从而保护水稻幼苗免受伤害。

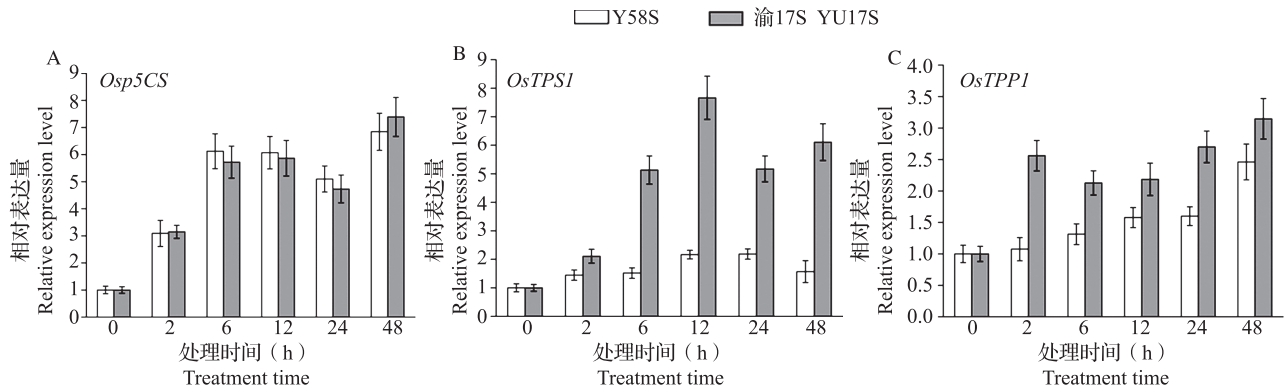


图5 低温胁迫对渝17S和Y58S幼苗叶片*OsP5CS*、*OsTPS1*和*OsTPPI*基因表达的影响

Fig.5 Expression of *OsP5CS*, *OsTPS1* and *OsTPPI* in the leaves of Yu17S and Y58S under cold stress treatments

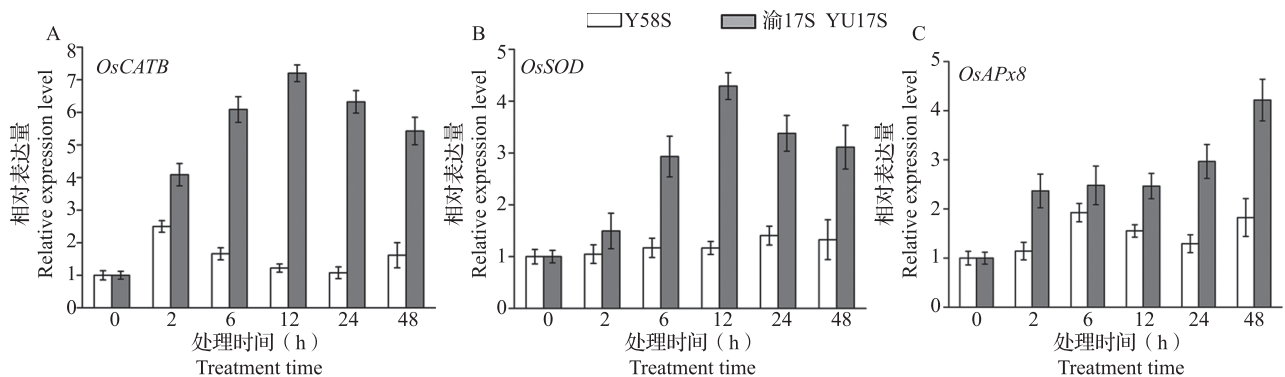


图6 低温胁迫对渝17S和Y58S幼苗叶片*OsCATB*、*OsSOD*和*OsAPx8*基因表达的影响

Fig.6 Expression of *OsCATB*, *OsSOD* and *OsAPx8* in the leaves of Yu17S and Y58S under cold stress treatments

**2.5.3 MAPK 激酶级联途径相关基因** 为了探究低温胁迫对水稻 MAP 激酶级联途径相关基因表达的影响,利用 qRT-PCR 技术分析 *OsMAPK3*、*OsMKK6* 和 *OsICE1* 基因的表达水平 (图 7)。低温处理 2 h 后,渝 17S 叶片中 *OsMAPK3*、*OsMKK6* 和

*OsICE1* 基因的表达量均分别是 Y58S 的 1.75 倍、1.59 倍和 1.60 倍,24 h 后分别是 4.65 倍、2.46 倍和 2.13 倍,以上数据表明 *OsMAPK3*、*OsMKK6* 和 *OsICE1* 基因可能在渝 17S 苗期低温胁迫响应中起重要作用。

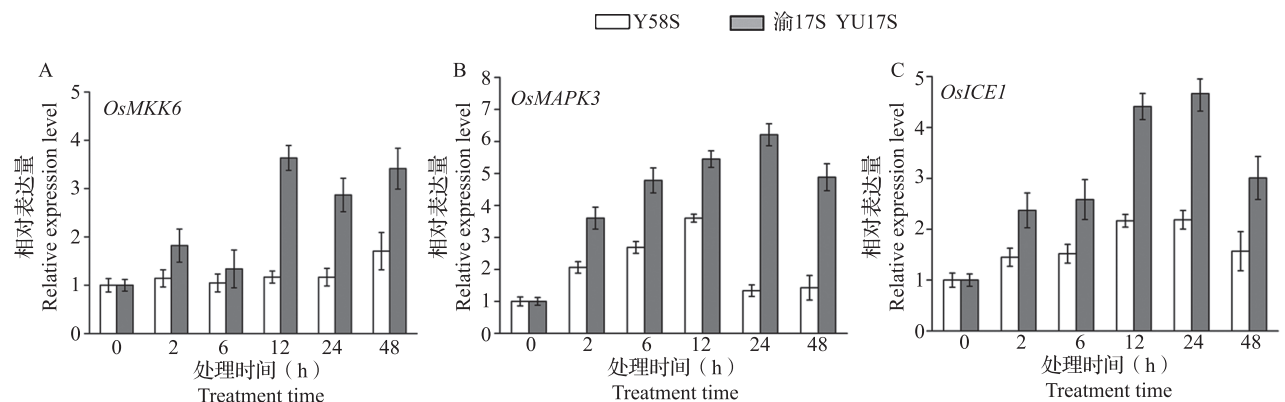


图7 低温胁迫对渝17S和Y58S幼苗叶片*OsMKK6*、*OsMAPK3*和*OsICE1*基因表达的影响

Fig.7 Expression of *OsMKK6*, *OsMAPK3* and *OsICE1* in the leaves of Yu17S and Y58S under cold stress treatments

### 3 讨论

水稻苗期易遭受低温胁迫,苗高、苗重、存活率、

萎蔫率和枯死率等常作为水稻苗期耐冷表型鉴定指标<sup>[18]</sup>。Andaya 等<sup>[19]</sup>将水稻三叶期幼苗在 9 °C 下连续处理 8~16 d 后考查群体萎蔫率和死苗率,并

将水稻的耐冷性分成 1~9 级。潘晓雪等<sup>[17]</sup>将三叶期水稻幼苗在 4 ℃处理 48 h 后统计存活率并进行耐冷性评估,之后测定耐冷品种糯稻 89-1 及其渗入系 S176 不同时间点叶片中可溶性蛋白、脯氨酸和 MDA 含量,以及 SOD 和 POD 活性来评价不同材料的耐冷性,且所得耐冷性强弱结果与以死苗率为标准鉴定结果一致,认为死苗率可以作为鉴定水稻耐冷性指标。本研究发现渝 17S 和 Y58S 在苗期遭受低温胁迫后,存活率存在显著差异,Y58S 低温处理 48 h 后经过 7 d 的恢复生长的平均死苗率为 96.7%,渝 17S 的平均死苗率为 7.5%,表明渝 17S 在苗期的耐冷性明显强于 Y58S(图 1)。

植物生理水平的变化可以反映植物对低温胁迫的响应程度,其中脯氨酸、可溶性糖、MDA 和  $H_2O_2$  含量、SOD、POD、CAT 和 APX 活性常被作为衡量植物耐低温的生理指标。4 ℃低温处理后,野生稻(*Oryza longistaminata*)根茎和茎秆中可溶性糖和脯氨酸含量增加<sup>[20]</sup>。但是低温敏感水稻材料“IR29”与耐冷材料“LTH”幼苗中脯氨酸含量在低温胁迫处理下未见明显差异<sup>[21]</sup>。本研究发现低温处理 12 h 后,可溶性糖在渝 17S 叶片中的含量是 Y58S 的 2.36 倍(图 2)。虽然渝 17S 叶片中脯氨酸含量和脯氨酸合成限速酶基因 *OsP5CS* 的表达量随着低温处理时间的增加而增加(图 2、图 5),但是与 Y58S 相比未见明显差异。表明在低温胁迫下,与耐冷材料“LTH”一样,脯氨酸含量的多少与渝 17S 的耐冷性并没有明确的相关性,可溶性糖作为渗透调节物质可能在渝 17S 低温耐受上起主要作用。但是低温敏感水稻材料“IR29”与耐冷材料“LTH”幼苗中脯氨酸含量在低温胁迫处理下未见明显差异<sup>[21]</sup>。低温处理 48 h 并恢复 24 h 后,“IR29”幼苗中 MDA 的含量明显高于“LTH”<sup>[21]</sup>。有研究表明降低植物叶片 MDA 和  $H_2O_2$  含量可以影响活性氧积累,从而提高油菜幼苗的耐冷性<sup>[22]</sup>。在本研究中,渝 17S 叶片中的 MDA 和  $H_2O_2$  含量在低温胁迫下的积累量低于 Y58S(图 3),说明渝 17S 水稻细胞膜脂过氧化程度较低,因此细胞膜受到的损伤程度也较小。低温胁迫下,草莓和小麦 APX 活性与  $H_2O_2$  的含量呈正相关,且在清除  $H_2O_2$  的过程中发挥着重要作用<sup>[23-24]</sup>。4 ℃低温处理可以提高甘蔗幼苗中 SOD、CAT 和 APX 活性<sup>[25]</sup>。油菜叶片中 CAT、SOD、APX 和 GR 基因的表达和根中 APX、CAT、POD 和 SOD 活性明显升高<sup>[22]</sup>。总体来看与 Y58S 相比,渝 17S 中 SOD、CAT 和 APX 活性及叶

片中 SOD、CAT 和 APX 基因的表达均升高(图 4、图 6),表明低温胁迫产生的自由基在 SOD、CAT 和 APX 协调作用下维持在较低水平,从而减少细胞膜的损伤,提高渝 17S 的耐冷性。

ROS 作为信号分子在植物对生物和非生物胁迫的响应中发挥重要作用<sup>[26]</sup>,同时  $H_2O_2$  的积累也能进一步诱导植物体内 MAPK 基因表达<sup>[27]</sup>。MAP 级联途径是将细胞外信号在胞内传导的重要途径,研究表明 *AtMEKK2*、*LeMAPK4*、*OsMAPK3*、*OsMAPK6*、*OsMKK6* 和 *MsMKK2* 参与了对低温胁迫的响应<sup>[28-32]</sup>。*OsMKK6* 在体外可以与 *OsMAPK3* 和 *OsMAPK6* 互作,过量表达 *OsMKK6DD* 转基因水稻对低温胁迫的耐受性增强<sup>[33]</sup>。在水稻中,低温胁迫诱导 *OsICE1* 激活下游基因 *OsTPP1* 的表达,促进海藻糖的积累,增强水稻对低温胁迫的耐受能力<sup>[11-12]</sup>。在本研究中,与 Y58S 相比,低温处理后渝 17S 叶片中 *OsMKK6*、*OsMAPK3* 和 *OsICE1* 表达量分别上调(图 7),表明 *OsMKK6*、*OsMAPK3* 和 *OsICE1* 参与了渝 17S 对低温胁迫的应答反应。海藻糖作为一种可溶性双糖,在烟草、水稻、西红柿等高等植物中含量甚少<sup>[34]</sup>。过表达 *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 基因可以增加植物体内海藻糖含量,从而提高水稻幼苗对寒冷、高盐、干旱等处理的耐受能力<sup>[35-37]</sup>。外源施加一定浓度的海藻糖可以提高拟南芥和水稻对非生物胁迫的耐受能力<sup>[38-40]</sup>。此外,玉米穗中 *OsTPP1* 的过表达可以提高玉米耐干旱胁迫能力和干旱胁迫下玉米产量<sup>[41]</sup>。在本研究中,低温处理 2 h 后渝 17S 叶片中海藻糖含量明显高于 Y58S, *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 表达量分别是 Y58S 的 1.46 倍和 2.38 倍(图 2、图 5)。表明在低温胁迫下,通过提高 *OsTPS1* 和 *OsTPP1* 的转录活性,从而调控海藻糖含量,可能在渝 17S 决定水稻的低温耐受性方面有重要作用。

#### 参考文献

- [1] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 444-451
- [2] Ma Y, Dai X Y, Xu Y Y, Luo W, Zheng X, Zeng D, Pan Y, Lin X, Liu H, Zhang D, Xiao J, Guo X, Xu S, Niu Y, Jin J, Zhang H, Xu X, Li L, Wang W, Qian Q, Ge S, Chong K. COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 2015, 160(6): 1209-1221
- [3] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324
- [4] Zhang Q, Chen Q H, Wang S L, Hong Y H, Wang Z L. Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold



- tolerance-related quantitative trait loci. *Rice*, 2014, 7(1): 24
- [5] Khan T A, Fariduddin Q, Yusuf M. Low-temperature stress: Is phytohormones application a remedy?. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(27): 21574-21590
- [6] Anjum F, Rishi V, Ahmed F. Compatibility of osmolytes with gibbs energy of stabilization of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1476(1): 75-84
- [7] Matysik J, Alia A, Bhalu B, Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reaction oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 2002, 82(5): 525-532
- [8] Mittal D, Madhyastha D A, Grover A. Genome-wide transcriptional profiles during temperature and oxidative stress reveal coordinated expression patterns and overlapping regulons in rice. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40899
- [9] Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products. *Chemico Biological Interactions*, 2011, 192(1-2): 14-20
- [10] Wang X, Dong X, Feng Y, Liu X, Wang J, Zhang Z, Li J, Zhao Y, Shi S, Tu P.  $H_2O_2$  and NADPH oxidases involve in regulation of 2-(2-phenylethyl) chromones accumulation during salt stress in *Aquilaria sinensis* calli. *Plant Science*, 2018, 269(5): 1-11
- [11] Zhao C Z, Zhang Z J, Xie S J, Si T, Li Y Y, Zhu J K. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2744-2759
- [12] Zhang Z, Li J, Li F, Liu H H, Yang W S, Chong K, Xu Y Y. OsMAPK3 phosphorylates OsbHLH002/OsICE1 and inhibits its ubiquitination to activate OsTPP1 and enhances rice chilling tolerance. *Developmental Cell*, 2017, 43(6): 731-743
- [13] 夏秀忠, 张宗琼, 杨行海, 农保选, 曾宇, 刘开强, 邓国富, 李丹婷. 广西水稻地方品种耐冷性鉴定及相关分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(6): 969-975
- Xia X Z, Zhang Z Q, Yang X H, Nong B X, Zeng Y, Liu K Q, Deng G F, Li D T. Evaluation and correlation analysis of cold tolerance of Guangxi iandrace rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(6): 969-975
- [14] 孟宏宇, 李昂, 何晓寒, 王青, 严成其, 张维林, 杨玲. 来源于疣粒野生稻的越冬性新种质 SH5 的鉴定. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(5): 1001-1005
- Meng H Y, Li A, He X H, Wang Q, Yang C Q, Zhang W L, Yang L. Identification of one rice germplasm with overwintering trait from *Oryza meyeriana*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(5): 1001-1005
- [15] 柏斌, 吴俊, 庄文, 姚栋萍, 李莺歌, 邓启云. 广适性光温敏不育系 Y58S 幼穗分化期耐冷性表现及生理机制. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(4): 646-652
- Bo B, Wu J, Zhuang W, Yao D P, Li Y G, Deng Q Y. Studies on cold tolerance of widely adaptable PTGMS Line Y58S and its physiological mechanism at the booting stage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(4): 646-652
- [16] 盛文涛, 柏斌, 吴俊. 东乡野生稻有利性状鉴定与育种利用研究进展. *杂交水稻*, 2016, 31(6): 1-6
- Sheng W T, Bo B, Wu J. Research progress on identification of favorable characteristics in Dongxiang wild rice and utilization in rice breeding. *Hybrid Rice*, 2016, 31(6): 1-6
- [17] 潘晓雪, 胡明瑜, 白文钦, 蒋晓英, 王春萍, 吴红, 雷开荣. 糯稻 89-1 渗入系苗期耐寒鉴定及生理机制初步分析. *分子植物育种*, 2016, 14(10): 2798-2802
- Pan X X, Hu M Y, Bai W Q, Jiang X Y, Wang C P, Wu H, Lei K R. Identification of cold tolerance and primary analysis of physiological mechanism of introgression lines of glutinous Rice 89-1 at seedling stage. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(10): 2798-2802
- [18] 陈昊, 徐日荣, 陈湘瑜, 张玉梅, 胡润芳, 蓝新隆, 唐兆秀, 林国强. 花生种子萌发吸胀阶段冷害抗性的鉴定及耐冷种质的筛选. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(1): 192-200
- Chen H, Xu R R, Chen X Y, Zhang Y M, Hu R F, Lan X L, Tang Z X, Lin G Q. Identification of imbibitional chilling injury resistance for peanut and screening of imbibitional chilling-tolerance germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(1): 192-200
- [19] Andaya V C, Tai T H. Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(3): 467-475
- [20] Zhang T, Huang L Y, Wang Y X, Wang W S, Zhao X Q, Zhang S L, Zhang J, Hu F Y, Fu B Y, Li Z K. Differential transcriptome profiling of chilling stress response between shoots and rhizomes of *Oryza longistaminata* using RNA sequencing. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0188625
- [21] Zhang T, Zhao X Q, Wang W S, Pan Y J, Huang L Y, Liu X Y, Zong Y, Zhu L H, Yang D C, Fu B Y. Comparative transcriptome profiling of chilling stress responsiveness in two contrasting rice genotypes. *PLoS ONE*, 2012, 7: e43274
- [22] 罗丹瑜, 张小花, 李巧丽, 王娟, 郑晟, 张腾国.  $\alpha$ -萘乙酸对低温胁迫下油菜幼苗抗寒性的影响. *生态学杂志*, 2020, 39(1): 99-109
- Luo D Y, Zhang X H, Li Q L, Wang J, Zheng S, Zhang T G. Regulation of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid on cold resistance of *Brassica campestris* seedlings under low temperature stress. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(1): 99-109
- [23] 罗娅, 汤浩茹, 张勇. 低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响. *园艺学报*, 2007, 34(6): 1405-1410
- Luo Y, Tang H R, Zhang Y. Effect of low temperature stress on activities of SOD and enzymes of Ascorbate-Glutathione cycle. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(6): 1405-1410
- [24] 范博. 低温胁迫下 ABA 诱导冬小麦抗氧化防护系统的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012
- Fan B. Detection of antioxidant protection system in winter wheat at low temperature induced by ABA. Harbin: Heilongjiang Province Northeast Agricultural University, 2012
- [25] 朱鹏锦, 庞新华, 梁春, 谭秦亮, 严霖, 周全光, 欧克维. 低温胁迫对甘蔗幼苗活性氧代谢和抗氧化酶的影响. *作物杂志*, 2018, (4): 137-143
- Zhu P J, Pang X H, Liang C, Tan Q L, Yan L, Zhou Q G, Ou K W. Effects of cold stress on reactive oxygen metabolism and antioxidant enzyme activities of sugarcane seedlings. *Crops*, 2018(4): 137-143
- [26] Simon-Plas F, Elmayan T, Blein J P. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal*, 2002, 31(2): 137-147
- [27] Gilroy S, Białasek M, Suzuki N, Górecka M, Deviredy A R, Karpiński S, Mittler R. ROS, calcium and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology*, 2016, 171(3): 1606-1615

- [ 28 ] Furuya T, Matsuoka D, Nanmori T. Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 2014, 588 ( 11 ): 2025-2030
- [ 29 ] Gao J, Zhang S, He W D, Shao X H, Li C Y, Wei Y R, Deng G M, Kuang R B, Hu C H, Yi G J, Yang Q S. Comparative phosphoproteomics reveals an important role of MKK2 in Banana (*Musa spp.*) cold signal network. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40852
- [ 30 ] Huo C, Zhang B, Wang H, Wang F, Liu M, Gao Y, Zhang W, Deng Z, Sun D, Tang W. Comparative study of early cold-regulated proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis reveals a key role for phospholipase D $\alpha$ 1 in mediating cold acclimation signaling pathway in rice. *Molecular Cellular Proteomics*, 2016, 15 ( 4 ): 1397-1441
- [ 31 ] Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl J L, Hirt H. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 2004, 15 ( 1 ): 141-152
- [ 32 ] Xiong L Z, Yang Y N. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 2003, 15 ( 3 ): 745-759
- [ 33 ] Xie G, Kato H, Imai R. Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signaling pathway for chilling stress tolerance in rice. *The Biochemical Journal*, 2012, 443 ( 1 ): 95-102
- [ 34 ] El-Bashiti T, Hamamci H, Öktemac H A, Yücel M. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science*, 2005, 169 ( 1 ): 47-54
- [ 35 ] Garg A K, Kim J K, Owens T G, Ranwala A P, Choi Y D, Kochian L V, Wu R J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99 ( 25 ): 15898-15903
- [ 36 ] Ge L F, Chao D Y, Shi M, Zhu M Z, Gao J P, Lin H X. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*, 2008, 228 ( 1 ): 191-201
- [ 37 ] Jang I C, Oh S J, Seo J S, Choi W B, Song S I, Kim C H, Kim Y S, Seo H S, Choi Y D, Nahm B H, Kim J K. 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. *Plant Physiology*, 2003, 131 ( 2 ): 516-524
- [ 38 ] Mostofa M G, Hossain M A, Fujita M, Tran L S. Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11433
- [ 39 ] Nakamura J, Yuasa T, Huong T T, Harano K, Tanaka S, Iwata T, Phan T, Iwaya M. Rice homologs of inducer of CBF expression ( OsICE ) are involved in cold acclimation. *Plant Biotechnology*, 2011, 28 ( 3 ): 303-309
- [ 40 ] Yang L, Zhao X J, Zhu H, Paul M, Zu Y G, Tang Z H. Exogenous trehalose largely alleviates ionic unbalance, ROS burst, and PCD occurrence induced by high salinity in *Arabidopsis* seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 570
- [ 41 ] Nuccio M L, Wu J, Mowers R, Zhou H P, Meghji M, Primavesi L F, Paul M J, Chen X, Gao Y, Haque E, Basu S S, Lagrimini L M. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. *Nature Biotechnology*, 2015, 33 ( 8 ): 862-869