文章编号:1002-2090(2009)04-0025-05

低温胁迫对 *ICE1* 转基因水稻苗期抗氧化系统的影响

汲臣明[1],胡向阳[2],殷奎德[1]
(1.黑龙江八一农垦大学农学院,大庆 163319;2.中国科学院昆明植物研究所)

摘 要:试验以水稻垦鉴稻10号及其转 *ICE1*(Inducer of CBF expression 1)基因水稻T2-9株系为实验材料,低温(0 ℃)处理水稻幼苗0-10 d,测定抗氧化酶(SOD、CAT、POD、GR和APX)活性。试验结果表明,常温下,转基因植株抗氧化酶活性与对照没有显著差异;经低温胁迫后,转基因水稻和非转基因水稻的抗氧化酶活性在变化幅度方面有明显的差异。冷处理12h后,除POD外非转基因水稻的抗氧化酶活性开始下降,而转基因水稻酶活性仍继续升高;SOD、CAT、APX和GR活性分别在冷处理2、4、4、6 d达到最大值。与非转基因水稻相比,低温胁迫过程中转基因水稻POD活性没有明显变化。非转基因水稻POD活性水平则明显升高,在冷处理2天时达到最大值,是同处理时期转基因水稻POD活性的2.1倍。

关键词:低温胁迫;转基因水稻;*ICE1*;抗氧化系统

中图分类号:S511 **文献标识码**:A

The effect of low temperature stress to the antioxidant system of the *ICE1* transgenic rice at seeding stage

Ji Chenming[1], Hu Xiangyang[2], Yin Kuide[1]
(1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319;
2. Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences)

Abstract: The rice (*Oryza sativa* L. cv Kenjiandao No.10) and its *ICE1* transgenic line T2-9 was used as the material of this experiment. The seedlings of rice were treated with low temperature (0 ℃) stress, for 1-10 days, and the activity of antioxidant enzyme (SOD, CAT, POD, GR and APX) were determined. The results indicated that the activity of antioxidant enzyme did not show significant different between the transgenic rice and the control at normal temperature. After low temperature, the activity level of antioxidant enzyme in transgenic rice was significant different from that of non-transgenic rice. Enhancement of antioxidant enzyme activity was obtained in transgenic rice except POD, but reduction occurred in non-transgenic rice after 12 hours of cold stress. POD activity of transgenic rice is not apparently diversity compared with non-transgenic rice under low temperature. However, the activity of POD was higher in control than in transgenic rice, and reached to the highest in treated 2 days which was 2.1 times than transgenic rice's.

Key words: low temperature; transgenic rice; *ICE1*; antioxidant system

低温冷害是限制植物地理分布和植物产量的重要环境因素之一[1],低温在植物整个生育过程中均会造成不利影响,如冷害会造成植株苗弱、生长迟缓、萎蔫、黄化、局部坏死、坐果率低、产量降低和品质下降等不良影响,对农业和林业生产造成严重损失[2]。因此研究并提高农作物抗寒能力具有重要的理论意义和现实意义,而培育抗寒作物品种无疑是一种最佳的选择。

ICE1(inducer of CBF expression 1)的发现为增强植物抗寒性提供了新的途径。ICE1是在低温时诱导 *CBF3* 表达的一个转录激活因子,ICE1在常温条件下钝化,在低温时能特定地结合到 *CBF3* (c-

收稿日期:2009-04-06
基金项目:黑龙江省教育厅课题(11511248)。
作者简介:汲臣明(1982-),女,黑龙江八一农垦大学2006级硕士研究生。
通讯作者:殷奎德,男,教授,博士研究生导师,E-mail:yinkuide@sohu.com。

repeat-binding factor3)的启动子序列上[3],诱导 *CBF3* 的表达,之后 *CBF3* 诱导其下游许多冷诱导基因*COR* 的表达[4]。转 *ICE1* 基因的拟南芥[5]、苹果[6]、柠檬[7]、甜杨[8]、烟草[9]和水稻[10]等植株与非转基因植株相比,前者具有较强的抗寒性。

目前,对转 *ICE1* 基因植物抗寒性的研究主要集中在逆境胁迫后植株的表型观测,冷胁迫后 *ICE1*、*CBFs* 和 *COR* 等基因的表达[5-10],在抗氧化系统方面阐述转基因植株抗寒性的相关报道并不多。在前期工作的基础上,本试验以转 *ICE1* 基因水稻再生株系 T2-9 为试验材料,以非转基因水稻植株为对照,对其进行低温胁迫实验,研究了低温处理前后转基因植株及对照的抗氧化酶活性变化情况,初步探讨 *ICE1* 基因对提高植株抗寒性的机理,为研究 *ICE1* 基因与植株抗寒性的关系及培育新抗寒性水稻品种提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料是本实验室获得的转 *ICE1* 基因水稻阳性株系 T2-9[10],以其同龄水稻植株垦鉴稻 10 号为对照。转基因及非转基因水稻苗放入人工气候箱中,低温(0 ℃)处理 12 d,分别在处理的第 0、0.5、2、4、6、8、10 d 取样,测定抗氧化酶活性,重复 3 次,取平均值。冷处理期间,每隔两天拍照记录水稻植株表性变化。

1.2 方法

1.2.1 酶液提取

参照 Rao 方法提取[11],取 0.5-1 g 材料(地上部分)在液氮中研磨成粉,然后移到 50 ml 离心管中,加入预冷的提取液 5 mL(含 0.1M K_2HPO_4/KH_2PO_4 缓冲液 pH 7.5,1mM Na_2-EDTA,1%PVP40,1 mM PMSF 后二种现用现加)混匀,4 ℃下,15 000 g 离心 20 min,取上清液,分装到 1.5 ml EP 管,于-70 ℃条件下保存备用。

以上所有操作均在 0-4 ℃下进行(材料、药品都要放在冰上)。酶活性测定在 25 ℃下进行。

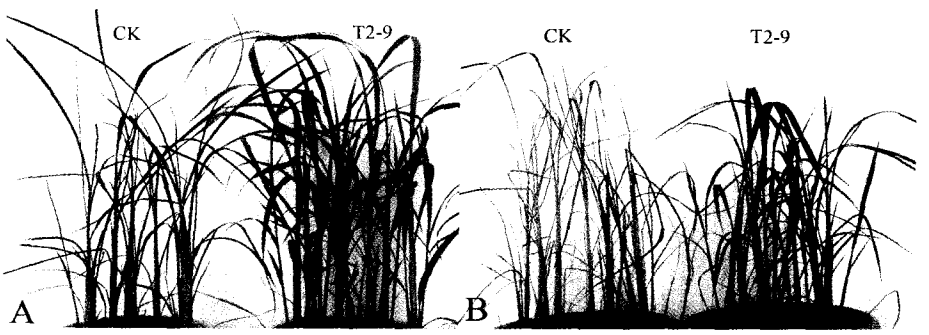
1.2.2 酶活性测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮兰四唑(NBT)光还原法;过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法;过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法;谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定采用 NADPH 法;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定采用抗坏血酸氧化还原法。

2 结果与分析

2.1 低温下转基因水稻的抗冷性

将同龄的转基因水稻及未转基因水稻放入 0 ℃培养箱冷处理后,转基因水稻再生植株 T2 代明显比同龄对照植株更具有耐寒性。结果如图 1 所示,图 A、B 分别是低温处理 2 d、12 d 后水稻植株的表型记录。冷处理 2 d 后,T2-9 株系的全部植株叶片平展,颜色健康,未发生萎蔫、倒伏等现象,而对照植株表现出部分叶片向内卷缩,下垂等冷害现象。冷处理 10 d 后,未转基因水稻叶片几乎全部枯萎,而 T2-9 株系植株叶片的枯萎程度明显轻于对照植株,只有轻微的失水萎蔫和下垂现象,叶片退绿现象也不明显,植株整体表现出轻微的冷害现象。以上结果表明 T2-9 株系水稻的耐寒力要强于未转基因水稻,能够在低温环境下生存更长时间,说明 ICE1 基因在转基因水稻植株中的表达并产生了抗冷作用,提高了水稻植株抗寒性。



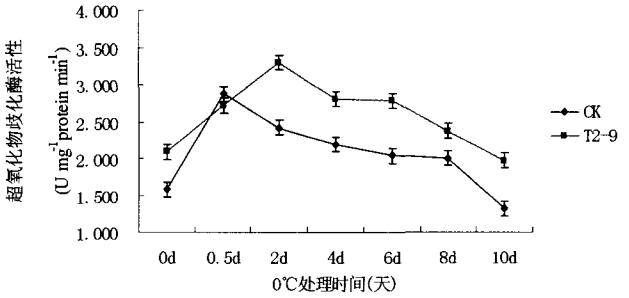
A: 0 ℃处理 2 d; B: 0 ℃处理 10 d; CK: 对照; T2-9: 转基因株系

图 1 转 *ICE1* 基因水稻抗寒实验

Fig.1 The experiment of *ICE1* transgenic rice plants to cold tolerance

2.2 低温处理对水稻植株 SOD 活性的影响

低温(0 ℃)胁迫条件下,对照和 T2-9 水稻植株 SOD 活性变化趋势如图 2。从图中可以看出,冷处理前转基因水稻 T2-9 的 SOD 酶活性稍高于对照植株,但差异不明显。冷处理后,两种水稻的 SOD 活性都显著升高。冷处理初期,对照植株升高的幅度要大于 T2-9,在冷处理 12 h 时达到最大值,随着冷处理时间延长 SOD 活性不断下降。T2-9 酶活性随处理时间延长而逐渐升高,冷处理 2 d 活性达到最大值,是同处理时间段对照组植株 SOD 活性的 1.4 倍,随后转基因植株 SOD 活性虽然有所下降,但仍高于对照植株。这说明外源基因 *ICE1* 可能在提高植物体 SOD 酶活性方面起着一定的作用。



CK: 对照;T2-9: 转基因株系

图 2　低温处理对水稻 SOD 活性的影响

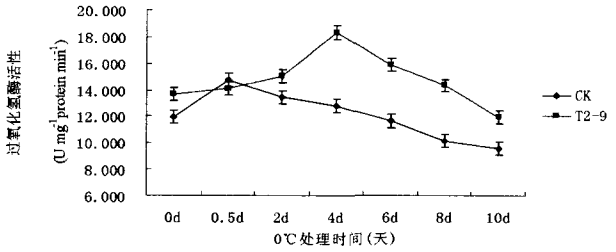
Fig.2　Changes of SOD activity of non-transgenic and *ICE1* transgenic rice plants under low temperature treatment for different time

2.3 低温处理对水稻植株 CAT 活性的影响

试验结果如图 3 所示：冷处理对同龄对照植株过氧化氢酶的危害要大于转基因植株，整个冷处理过程中，对照植株的 CAT 酶活性仅在处理 0 d 和 0.5 d 之间有所增加,冷处理 6 d 后,CAT 酶活性迅速下降。T2-9 株系 CAT 酶活性在冷处理 2 d 后快速升高,4 d 时达到最大值，分别是自身冷处理 0 d 和对照冷处理 4 d CAT 酶活性的 1.3、1.4 倍。根据以上试验结果，推测 *ICE1* 基因能保护植物组织中 CAT 酶，或者可以促进 CAT 酶的合成。

2.4 低温处理对水稻植株 POD 活性的影响

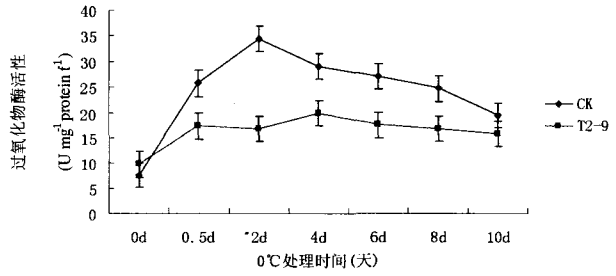
低温(0 ℃)胁迫下水稻植株 POD 活性变化趋势如图 4 所示，低温处理前,T2-9 植株中的 POD 活性与相同处理下同龄的对照植株相比没有显著差异。低温处理后，同龄对照植株的 POD 活性明显提高，2 d 时 POD 酶活性较低温处理前自身增幅 3.6 倍,然后逐渐下降；在整个处理期间,T2-9 植株的 POD 酶活性变化与同龄对照植株明显不同,T2-9 植株的最高 POD 酶活值仅比自身冷处理前增幅 1.0 倍，而同处理时期的对照植株的同期酶活均比 T2-9 高,最高可达到 1.7 倍。分析此情况的原因,推测可能是由于外源基因 *ICE1* 插入到某个与 POD 酶基因表达相关的基因序列内，或者 *ICE1* 自身表达产物对 POD 有阻遏作用，从而使转基因植株的 POD 酶活性低于对照植株。



CK: 对照;T2-9: 转基因株系

图 3　低温处理对水稻 CAT 活性的影响

Fig.3　Changes of CAT activity of non-transgenic and *ICE1* transgenic rice plants underlow temperature treatment for different time



CK: 对照;T2-9: 转基因株系

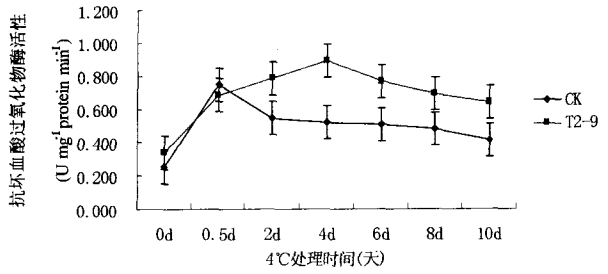
图 4　低温处理对水稻 POD 活性的影响

Fig.4　Changes of POD activity of non-transgenic and *ICE1* transgenic rice plants underlow temperature treatment for different time

2.5 低温处理对水稻植株 GR 活性的影响

低温胁迫下,对照和 T2-9 中 GR 活性的变化趋势见图 5。低温处理前,T2-9 植株与同龄对照植株的谷胱甘肽还原酶活性相差无几，低温处理后,T2-9 植株和对照植株酶活性都升高,但上升速率不同。对照植株在冷处理初期，谷胱甘肽还原酶活性大幅度增强,在低温胁迫 0.5 d 时 GR 活性达到最高峰,是自身低温胁迫 0 d 时 GR 活性的 2.9 倍,说明谷胱甘肽还原酶在水稻植株抵御低温伤害和氧毒害方面有重要作用。T2-9 植株低温处理后,谷胱甘肽还原酶活性也得到增强，冷处理初期酶活性大幅度升高,6 d 达到最高峰，是同处理时期对照植株谷胱甘肽还原酶

活性的 1.6 倍。



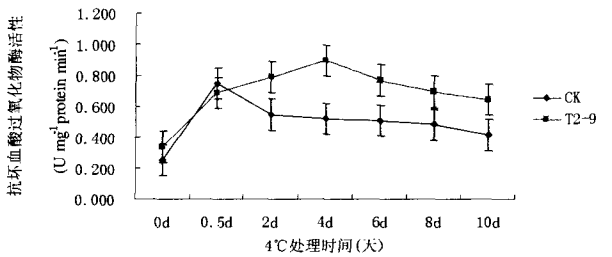
CK: 对照;T2-9: 转基因株系

图 5 低温处理对水稻 GR 活性的影响

Fig.5 Changes of GR activity of non-transgenic and *ICE1* transgenic rice plants underlow temperature treatment for different time

2.6 低温处理对水稻植株 APX 活性的影响

由图 6 可知，低温胁迫下对照植株和同龄的转基因再生植株 T2-9 的抗坏血酸过氧化物酶活性变化趋势与 GR 相似。低温处理 0 d,对照植株和 T2-9 的酶活性大致相同，低温处理 0.5 d 后，对照植株 APX 活性达到最大，是自身低温处理 0 d 的 2.9 倍。转基因水稻低温处理 4 d 后 APX 活性达到最大值，是同处理时间对照植株酶活性的 1.7 倍,同时比自身低温处理前的酶活性增幅 1.7。



CK: 对照;T2-9: 转基因株系

图 6 低温处理对水稻 APX 活性的影响

Fig.6 Changes of APX activity of non-transgenic and *ICE1* transgenic rice plants under low temperature treatment for different time

3 讨论

研究结果表明,常温条件下,*ICE1* 基因的表达对水稻抗氧化酶活性没有造成大的影响，转基因水稻植株(T2-9)和对照水稻植株的抗氧化酶活性大致相同,这说明 *ICE1* 在常温下钝化,对植株的生理生化代谢没有影响。低温胁迫后,转基因水稻植株的抗氧化酶活性明显提高,说明 *ICE1* 基因在提高植物抗氧化酶活性方面起重要作用，为植株维持正常的生理生化代谢提供保护，使转基因水稻比对照植株具有更强的抗氧胁迫能力以及抗寒性。

低温胁迫初期,转基因水稻和对照植株的 SOD、CAT、APX 以及 GR 活性都呈上升趋势，但对照植株的酶活性上升时间没有转基因植株持续的时间长，对照的 SOD、CAT、APX 以及 GR 活性在低温处理 0.5 d 时就达到了最大值，而转基因植株在冷处理 0.5 d 后，以上四种酶活性仍然呈上升趋势,SOD、CAT、APX 及 GR 活性分别在冷处理 2、4、4 和 6 d 达到最大值。说明在低温胁迫下,外源基因 *ICE1* 的表达对水稻植株抗氧化酶具有保护作用，使其在较长时间的胁迫条件下酶活性仍能够保持较高水平。

在酶活性水平上，对照植株也没有转基因植株高，整个冷处理过程中，转基因植株的 SOD、CAT、APX 以及 GR 活性都处在较高水平，特别是在冷处理后期表现更为突出。这说明外源基因在宿主细胞内的表达能够改变植物体抗氧化酶活性水平，而这种变化可能是通过低温条件下 *ICE1* 基因激活一系列与拟南芥同源的 *CBF/DREB* 转录因子，再由该转录因子调控其他耐逆相关基因的表达而实现的。Pooja Bhatnagar-Mathur 等 [12] 的研究表明，过表达 *AtDREB1A* 基因的花生在受到干旱胁迫时,转基因植株体内的 SOD、APX 和 GR 活性持续升高的时间要比对照植株长，抗旱性也要比对照高很多;Qiuyun Wang 等[13]在拟南芥和水稻植株中过表达 *OsDREB1F* 基因,两种植物的抗寒性都得到增强,同时还具有一定得耐盐和抗旱能力。所以,我们推测 *ICE1* 基因对水稻植株起保护作用的过程中,*CBFs* 基因的过表达是非常关键的。当然,这需要进一步研究 *CBF/DREB*、*COR* 基因转录情况，抗氧化系统相关基因及其他耐逆基因的表达情况才能证实这一推论。

值得注意的一点是转基因水稻植株 POD 酶活性变化情况。低温处理前后非转基因水稻 POD 活性有明显的升高和下降趋势，说明该酶对低温胁迫做出了相应的防御反应。而转基因水稻植株 POD 酶活性在低温处理前后变化幅度不大，酶活水平也明显没有非转基因植株高(图 3、4)。说明 POD 不能够迅速的感知低温信号并作出快速的应激反应，即转基因植株 POD 对低温胁迫不敏感。这暗示外源基因 *ICE1* 对水稻植株的过氧化物酶带来了一定的破坏作用，可能是外源基因的表达影响了水稻本身一些基因的功能。*ICE1* 基因可能插入到某个与 POD 酶基因表达相关的序列内,阻遏了 POD 的大量表达,或者 *ICE1* 自身表达产物对 POD 有阻遏作用，从而使转基因植

株的 POD 酶活性低于非转基因植株。但从总整体上看,POD 酶活性的缺失并没有影响转基因植株整体的抗寒性,低温胁迫条件下转 *ICE1* 基因水稻植株的抗寒性仍高于非转基因水稻植株。

参考文献:

[1] 陈儒钢,巩振辉,逯明辉,等.植物抗寒基因工程研究进展[J]. 西北植物学报,2008 ,28 (6) :1274-1280.

[2] 刘忠,邓俭英,唐其展,等.植物抗冷性研究进展[J]. 广西农业科学,2006,37(6):7-10.

[3] Viswanathan Chinnusamy,Masaru Ohta,Siddhartha Kanrar, *et al.ICE1*:a regulator of cold-induced transcription and freezing tolerance in Arabidopsis[J].Genes&Development, 2003,(17):1043-1054.

[4] Michael F Thomashow,Sarah J Gilmour,Eric J Stockinger, *et al.* Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation[J]. Physiol Plant,2001,112: 171-175.

[5] Kenji Miura, Jing Bo Jin, Jiyoung Lee, *et al.*SIZ-midiated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J].Plant cell, 2007, 19(4): 1403-1414.

[6] 赵玲玲.苹果 *MdSAMDC2* 和 *MdICE1* 基因的功能鉴定以及抗逆性研究[D].泰安:山东农业大学,2007.

[7] 黄家权. 抗寒基因的克隆及根癌农杆菌介导的 *ICE1* 基因转化柑橘的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005.

[8] 林元震,张志毅,刘纯鑫,等.甜杨抗冻转录因子*ICE1* 基因的 in silico 克隆及其分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 424-430.

[9] 郑银英,崔百明,常明进,等. 转拟南芥 *ICE1* 基因增强烟草抗寒性的研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(1): 0075-0079.

[10] Xiang Dian-jun, Hu Xiang-yang,Zhang Yu,*et al.* Over-Expression of *ICE1* Gene in Transgenic Rice Improves Cold Tolerance[J]. Rice Science, 2008,15(3): 173-178.

[11] Rao M V, Hale B A, Ormrod D P. Amelioration of Ozone-Induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide[J]. Plant Physiol.1995,109: 421-432.

[12] Pooja Bhatnagar-Mathur,M.Jyostna Devi,Vincent Vadez, KiranK.Sharma. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress[J]Journal of Plant Physiology,2009,doi:10.1016:1-11.

[13] Qiuyun Wang,Yucheng Guan,Yaorong Wu.Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice [J]. Plant Mol Biol,2008, 67:589-602.

(上接第 11 页)

参考文献:

[1] 徐建华.现代地理学中的数学方法[M].北京:高等教育出版社,2002.

[2] 蔺涛,谢云,刘刚,等.黑龙江省气候变化对粮食生产的影响[J]. 自然资源学报,2008,23(2):307-318.

[3] 续珊珊,刘书琪.运用灰色系统理论预测黑龙江省粮食产量[J].黑龙江粮食, 2008,(1):26-28.

[4] 邹立尧,赵秀兰.黑龙江省农业气候背景分析[J].黑龙江气象,2000,19(1):34-38.

[5] 周秀杰,张桂华,郑红,等.黑龙江省气候变暖对极端天气气候事件的影响[J].气象,2004,30 (11):47-50.

[6] 祖世亨.黑龙江省气候变化与农业发展对策[J].黑龙江气象,1996,15(4):42-44.

[7] 张丽娟.气候变化对黑龙江省农业生态环境的影响[J]. 哈尔滨师范大学学报, 1998,14(4):105-108.