

低温胁迫对转 *ICE1* 基因水稻抗氧化酶系统的影响

王北艳, 殷奎德* (黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要 [目的]研究低温胁迫对转 *ICE1* 基因水稻抗氧化酶系统的影响。[方法]以水稻空育 131 及其转 *ICE1* 基因水稻 T_1-16 及 T_1-24 株系为材料, 低温处理水稻幼苗 0~2 d, 测定其抗氧化酶(SOD、CAT、POD)活性及可溶性蛋白质含量。[结果]经低温处理后, 转基因水稻和非转基因水稻的抗氧化酶活性和可溶性蛋白质含量在变化幅度方面有明显的差异, 低温处理 2 d 后, 对照植株抗氧化酶活性和可溶性蛋白质含量均开始下降, 而转基因水稻 SOD、POD 活性和可溶性蛋白质含量高于对照, 且仍继续升高。[结论]试验结果表明转入 *ICE1* 基因确实提高了水稻的抗寒性。

关键词 低温胁迫; *ICE1*; 转基因水稻; 抗氧化酶系统

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-01902-03

Effects of Low Temperature Stress on Antioxidant Enzyme System of *ICE1* Transgenic Rice

WANG Bei-yan et al (School of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract [Objective] The aim was to study the effects of low temperature stress on antioxidant enzyme system of *ICE1* transgenic rice. [Method] The rice Kongyu 131 and its *ICE1* transgenic rice lines T_1-16 and T_1-24 were used as materials, and the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD) and soluble protein contents of the rice seedlings were determined through treatment at low temperature during 0-2 days. [Result] The activities of antioxidant enzymes and soluble protein contents of transgenic rice and non-transgenic rice were of significant differences in the amplitude of variation after treated at low temperature. Specifically, the activities of antioxidant enzymes and soluble protein contents of the control plants both began to decline, but the SOD, POD activity and soluble protein contents of the transgenic rice were higher than that of the control, and maintained rising. [Conclusion] The results of this experiment showed that inserted *ICE1* gene into rice could improve cold resistance of rice.

Key words Low temperature stress; *ICE1*; Transgenic rice; Antioxidant enzyme system

低温是植物生长和发育的重要环境胁迫因素之一, 不仅限制了作物的区域分布和生存, 还对作物产量有很大影响。黑龙江地区的水稻种植经常会遭受低温冷害, 使水稻的生长受到损害, 影响产量甚至威胁到粮食安全^[1]。因此, 利用其他物种的抗寒基因对水稻进行抗寒性遗传改进, 在基础理论和解决实际生产问题上都具有非常重要的意义^[2]。

ICE1 (inducer of CBF expression1), 也称诱导 CBF 表达的基因, 是调节 CBF 基因表达的最上游转录因子^[3]。*ICE1* 在常温下处钝化状态, 当有冷信号存在时, *ICE1* 由钝化状态转变为激活状态, 并结合于 CBF 基因启动子的 *ICE1* 盒处, CBF 通过与 *COR* 基因启动区的 CRT/DRE 顺式作用元件结合以达到对其相关基因的调控, 激活 CBF 基因的转录, 从而达到保护膜、抗渗透胁迫、抗寒和保护细胞活性等一些功能。目前已成功将 *ICE1* 基因转入烟草^[4]、柑橘^[5]、番茄^[6]、水稻^[7]、大花蕙兰^[8]和黄瓜^[9]中, 与非转基因植株相比, 前者具有较强的抗寒性。

在前期工作的基础上, 笔者以转 *rd29A-ICE1* 基因水稻再生株系 T_1-16 和 T_1-24 为试验材料, 以非转基因水稻植株为对照, 对其进行低温胁迫试验, 研究低温处理前后转基因植株及非转基因植株的抗氧化酶活性变化情况, 初步探讨 *ICE1* 基因提高植株抗寒性的机理, 从而为培育新抗寒性水稻品种提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料是笔者所在实验室获得的转 *rd29A-*

ICE1 基因水稻阳性株系 T_1-16 和 T_1-24 , 以其同龄水稻植株空育 131 为对照。

1.2 低温胁迫试验 将转基因及非转基因水稻苗(约 25 d 苗龄)放入人工气候箱中, 4℃处理 2 d, 分别在处理的第 0、1、2 天取样, 测定抗氧化酶活性, 重复 3 次, 取平均值。冷处理 4 d 后, 于 25~28℃培养, 拍照记录水稻植株表型变化并统计存活率。

1.3 抗氧化酶的提取与活性测定 参照 Rao 等^[10]的方法提取, 取 0.5~1.0 g 新鲜水稻叶片在液氮中研磨成粉, 然后移至 50 ml 离心管中, 加入预冷的提取液 5 ml [0.1 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH 7.5), 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 1% PVP40, 1 mmol/L PMSF], 混匀, 4℃、15 000 g 离心 20 min, 取上清液, 于 -70℃下保存备用。

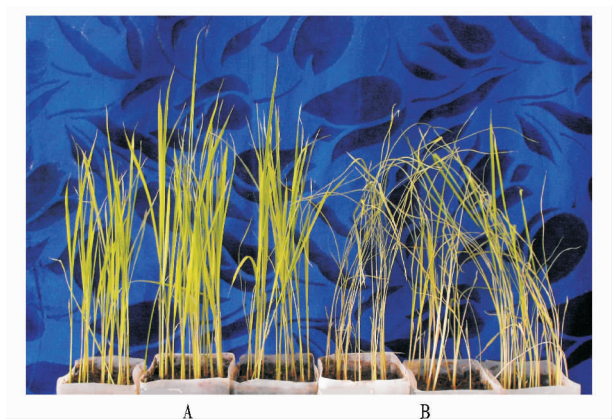
超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮兰四唑(NBT)光还原法; 过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法; 过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法。可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法。

2 结果与分析

2.1 低温处理下转基因水稻的抗寒性 将同龄的转基因水稻及未转基因水稻放入 4℃培养箱冷处理后, 转基因水稻再生植株 T_1 代明显比同龄对照植株更具有耐寒性。如图 1 所示, 低温处理后大部分未转基因植株发生叶面卷曲、萎蔫、植株倒伏现象, 存活率为 10%, 而转基因水稻植株 T_1-16 和 T_1-24 则表现出比对照植株明显强的耐低温能力, 植株叶片平展, 颜色健康, 未发生萎蔫、倒伏等现象, 存活率为 80%。这表明转 *ICE1* 水稻株系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表达并提高了转基因水稻植株的抗寒性。

作者简介 王北艳(1979-), 女, 黑龙江富锦人, 实验师, 硕士, 从事生物学和分子生物工作, E-mail: wangbeiyang1980@163.com。
* 通讯作者, 教授, 博士, 从事植物分子育种研究工作。

收稿日期 2013-01-07



注:A. 转基因植株;B. 未转基因对照植株。

图1 转基因植株 T₁ 代抗寒性检测结果

2.2 低温处理对转基因水稻 SOD 活性的影响 超氧化物歧化酶(SOD)是活性氧清除反应过程中第一个发挥作用的关键抗氧化酶,能将超氧化物阴离子自由基快速歧化为过氧化氢和分子氧。由图 2 可知,低温胁迫处理前,转基因水稻植株的 SOD 活性低于同龄野生型对照植株;当 4 ℃ 低温处理 1 d 后,转基因水稻植株和同龄野生型对照植株 SOD 活性均明显升高;4 ℃ 低温处理 2 d 后,转基因水稻植株 SOD 活性高于同处理对照水稻植株,转基因水稻植株 SOD 活性继续升高,而对照植株 SOD 活性开始下降。因此可推断,常温条件下 ICE1 基因的转入对 SOD 活性有抑制作用,但低温胁迫可明显提高 SOD 活性。

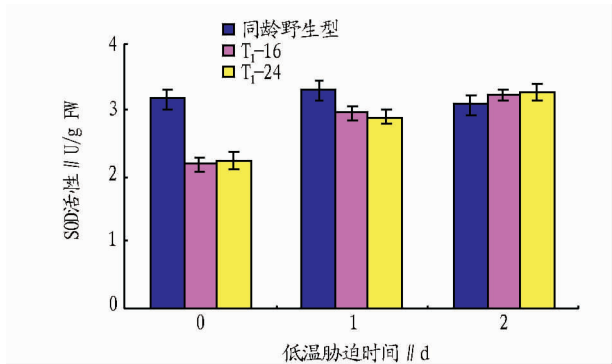


图2 低温处理对转基因和非转基因水稻 SOD 活性的影响

2.3 低温处理对转基因水稻 CAT 活性的影响 过氧化氢酶(CAT)存在于细胞的过氧化物体内,可促使 H₂O₂ 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受的 H₂O₂ 毒害,是生物防御体系的关键酶之一。由图 3 可知,低温胁迫处理前,转基因水稻植株与同龄野生型对照植株的 CAT 活性大致相同;4 ℃ 低温处理 1 d 后,同龄野生型对照植株的 CAT 活性升高,而转基因水稻植株 CAT 活性基本不变;4 ℃ 低温处理 2 d 后,同龄野生型对照植株的 CAT 活性迅速下降,转基因水稻植株的 CAT 活性也略有下降,但转基因水稻植株的 CAT 活性明显高于同龄野生型对照植株。根据以上结果可推测,转基因水稻植株的 CAT 在低温胁迫处理 1 ~ 2 d 内达活性最大值,然后开始下降。

2.4 低温处理对转基因水稻 POD 活性的影响 过氧化物

酶(POD)是以过氧化氢为电子受体催化底物氧化且活性较高的一种酶,在植物体内普遍存在。由图 4 可知,低温胁迫处理前,转基因水稻植株与同龄野生型对照植株 POD 活性无较大差异;4 ℃ 低温处理 1 d 后,两者 POD 活性均明显升高;4 ℃ 低温处理 2 d 后,同龄野生型对照水稻植株的 POD 活性开始下降,而转基因水稻植株 POD 活性继续升高,且转基因水稻植株 POD 活性明显高于同龄野生型对照水稻植株。这说明转入的 ICE1 基因可能在提高 POD 活性方面具有一定作用。

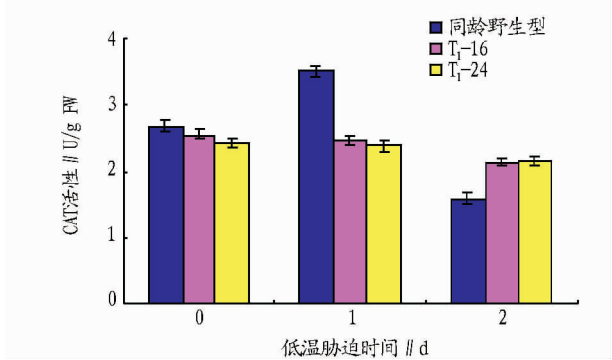


图3 低温处理对转基因和非转基因水稻 CAT 活性的影响

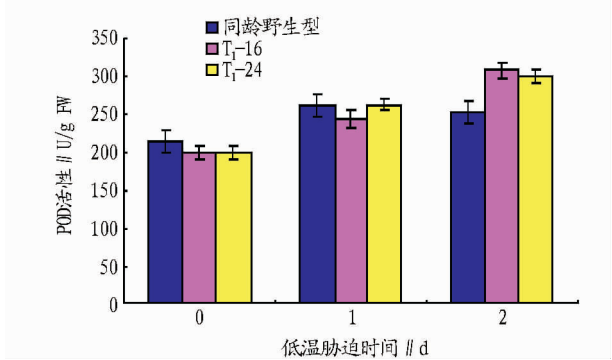


图4 低温处理对转基因和非转基因水稻 POD 活性的影响

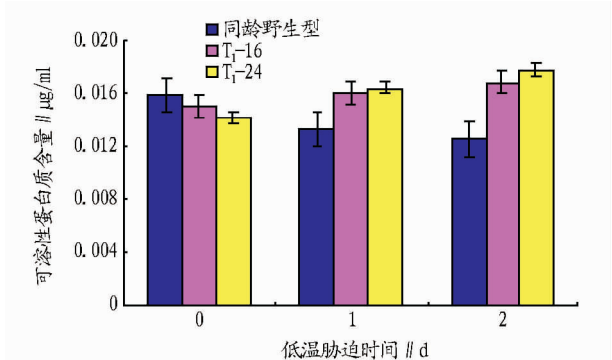


图5 低温处理对转基因和非转基因水稻可溶性蛋白质含量的影响

2.5 低温处理对转基因水稻可溶性蛋白质含量的影响 可溶性蛋白含量的降低是植物不能充分利用周围环境中的 N 源来合成自身蛋白的一种表现。由图 5 可知,低温胁迫处理前,转基因水稻植株与同龄野生型对照植株的可溶性蛋白质含量大致相同;4 ℃ 低温处理 1 d 后,对照的可溶性蛋白质含量降低,而转基因植株的可溶性蛋白质含量升高;4 ℃ 低温

处理 2 d 后,转基因水稻植株的可溶性蛋白质含量显著高于对照,说明对照合成自身物质的能力已受到抑制,表明转基因植株的抗寒性强于对照。

3 讨论

植物感受低温的伤害主要体现在细胞内活性氧的积累及引发的氧胁迫^[11]。叶绿体和线粒体是细胞内产生活性氧的重要器官。活性氧升高可通过破坏脂类、核酸和蛋白质等来扰乱细胞正常的代谢。细胞抗氧化系统中各类酶活性的增强是对低温胁迫的关键性防御措施。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)是维持植物细胞氧化还原平衡的主要抗氧化酶,它们的活性水平及稳定性直接影响着植物的抗逆性。SOD 能快速地将超氧阴离子歧化为过氧化氢和分子氧。CAT 是过氧化物酶体的标志酶,能够催化过氧化氢分解为水和分子氧。POD 的作用与 CAT 相同,但其主要是以过氧化物和氢供体为底物。Bhatnagar-Mathur 等^[12]的研究表明,干旱胁迫时转 *AtDREB1A* 基因花生植株体内的 SOD、APX 和 GR 活性持续升高的时间要比对照植株长;Wang 等^[13]在拟南芥和水稻植株中过表达 *OsDREB1F* 基因,发现 2 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。该研究对转 *ICE1* 基因水稻 T_1 代进行了抗氧化酶系统检测,结果表明:常温下,SOD 活性明显低于野生型对照植株,CAT 和 POD 活性与野生型对照植株大致相同。推测转入的 *ICE1* 基因在常温时对 SOD 具有一定的抑制作用。低温处理 1 d 后,SOD 和 POD 活性升高,CAT 活性基本不变。低温处理 2 d 后,SOD、CAT 和 POD 活性均高于同处理野生型对照植株。在低温胁迫过程中,转基因水稻植株和野生型对照水稻植株的抗氧化酶系统都发生了变化,但两者在抗氧化酶活性上持续时间是不同的。低温处理 2 d 后转基因水稻的 SOD 和 POD 活性仍在升高,而野生型对照植株活性则开始下降。这说明在低温胁迫下,非转基因水稻植株对逆境做出了快速的应激反应,启动了抗氧化还原系统,但这种应激反应在短时间内便达到了最大值,随

后因无法承受过多的由逆境所带来的伤害,细胞防御系统崩溃,致使植株受到低温伤害。而转 *ICE1* 基因水稻植株抗氧化酶发挥保护作用的时间要长于非转基因水稻。另外,经低温处理后转基因水稻植株抗氧化系统活性氧清除能力要高于非转基因水稻植株。通过这 2 方面的作用,抗氧化系统的保护作用得到加强,最终提高了植株的抗寒性。

参考文献

- [1] 和红军,田丽萍,薛琳.植物抗寒性生理生化研究进展[J].天津农业科学,2007,13(2):10-13.
- [2] 周德宝,张一红.植物抗寒性与抗寒基因的表达和调控[J].生物技术通报,2006(S1):14-16.
- [3] 张玉,蒋欣梅,于锡宏.*ICE1* 基因表达载体的构建及对番茄的转化[J].中国蔬菜,2010(18):27-33.
- [4] 黄文功,邓馨,王丽丽,等.利用冷诱导表达 *ICE1* 载体提高烟草抗寒性[J].中国烟草学报,2008,14(5):69-73.
- [5] HUANG J Q, SUN Z H. Agrobacterium - Mediated Transfer of Arabidopsis *ICE1* Gene into Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F. cv. Eureka) [J]. Agricultural Sciences in China, 2005, 4(9): 714-720.
- [6] 张玉,蒋欣梅,于锡宏.*ICE1* 基因表达载体的构建及对番茄的转化[J].中国蔬菜,2010(18):27-33.
- [7] 向殿军,殷奎德,满丽莉,等.生菜低温胁迫转录因子 *LsICE1* 的克隆、特征分析及其转化水稻[J].中国农业科学,2011,44(21):4340-4349.
- [8] 张瑜,向殿军,殷奎德.农杆菌介导的大花蕙兰转 *ICE1* 基因[J].中国农学通报,2008,24(12):40-43.
- [9] LIU L Y, LIU S D, ZHANG J C, et al. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) over-expressing cold-induced transcriptome regulator *ICE1* exhibits changed morphological characters and enhances chilling tolerance [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 124(1):29-33.
- [10] 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.
- [11] ZHOU C Y, YANG C D, ZHAN L. Effects of Low Temperature Stress on Physiological and Biochemical Characteristics of *Podocarpus nagi* [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(3):533-536.
- [12] BHATNAGAR-MATHUR P, DEVI M J, VADEZ V, et al. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(11):1207-1217.
- [13] WANG Q Y, GUAN Y C, WU Y R. 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.
- [14] 杨晓斌,宋晓虹,彭力.恰西雪岭云杉自然保护区地衣植物区系研究[J].中山大学学报:自然科学版,2008,47(S1):85-90.
- [15] 努尔巴衣·阿不都沙勒克,阿不都拉·阿巴斯,艾尼瓦尔·吐米尔.喀纳斯自然保护区地衣区系的基本特点[J].干旱区研究,2001,18(1):62-65.
- [16] 中国科学院登山科学考察队.天山托木尔峰地区的生物[C]//王先业.托木尔峰地区的地衣.乌鲁木齐:新疆人民出版社,1985:328-353.
- [17] 热衣木·马木提,阿地里江,阿不都拉·阿巴斯.托木尔峰自然保护区地衣的地理成分及垂直分布[J].东北林业大学学报,2010,38(10):44-47,50.
- [18] 热衣木·马木提,阿不都拉·阿巴斯,艾尼瓦尔·吐米尔.新疆天山一号冰川地衣地理区系与生态特征[J].东北林业大学学报,2009,37(12):111-113.
- [19] 买买提·沙塔尔,马衣拉·莫合买提,阿不都拉·阿巴斯,等.新疆乌鲁木齐南山八一林场地衣生态地理学特征[J].干旱区研究,2012,29(1):86-92.
- [20] 董东平.嵩山与鸡公山自然保护区植物区系比较研究[J].武汉植物学研究,2008,26(1):47-52.
- [21] 孙立彦,刘振亮,赵遵田.内蒙古自治区赛罕乌拉自然保护区地衣的区系研究[J].山东科学,2004,17(2):24-26.
- [22] 潘晓玲,张宏达.哈纳斯自然保护区植被特点及植物区系形成的探讨[J].生态科学,1996,15(2):32-37.

(上接第 1897 页)