

水稻耐冷分子育种研究进展

刘建新¹, 刘文萍^{2,3}, 郭德栋¹, 李柱刚^{2,3}

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 哈尔滨 150086)

摘要: 冷害是水稻减产的主要原因之一, 也是全世界普遍关注的问题。从水稻耐冷分子生理、耐冷相关基因的定位和克隆以及水稻耐冷分子育种等几个角度对水稻耐冷性研究作了阐述, 并对今后水稻耐冷研究和育种工作提出了一些建议。

关键词: 水稻; 耐冷性; 分子育种

中图分类号: S 511.034 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2007)04-0105-04

Status and Prospect of Molecular Breeding For Cold Tolerance In Rice

LIU Jian-xin¹, LIU Wen-ping^{2,3}, GUO De-dong¹, LI Zhu-gang^{2,3}

(1. College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080; 2. Biotechnological Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. Heilongjiang Key Laboratory of Molecular Breeding of Crop and Livestock, Harbin 150086)

Abstract: Cold stress is one of the most important factors to decrease the yield of rice, which is thought to be a matter of great urgency to be solved. Some problems such as the mechanisms of cold tolerance, cloning and localization of cold-responsive genes, and molecular breeding cold resistant on rice were discussed, and some suggestions were put forward for the research and breeding of cold tolerance in rice in the further.

Key words: rice; cold tolerance; molecular breeding

所谓冷害就是指作物在它生长所需的适温以下至冰点以上温度范围内所发生的生长停滞或生育障碍现象。低温使酶蛋白活性降低甚至变性, 植物各种生理机能出现障碍, 严重的会导致死亡^[1]。水稻在芽期、苗期、孕穗期和抽穗期都是低温敏感期, 低温对其生长和产量都有较大的影响。全世界每年因低温冷害损失稻谷 30 亿 kg ~ 50 亿 kg。近几十年来, 随着分子生物学的发展, 各国在耐冷相关基因的研究方面取得了一定的进展, 并且逐渐将研究成果应用于生产实践。主要表现在陆续将克隆的耐冷相关基因导入到水稻中, 利用分子标记辅助选择耐冷品种等, 以期改善水稻品种耐冷性能, 减少因低温冷害

造成的水稻减产。

本文将从水稻耐冷分子生理机理, 耐冷相关基因的克隆和水稻耐冷分子育种进展等几个方面阐述水稻耐冷性研究现状。

1 水稻耐冷分子机理

早期水稻受冷的生理研究多以叶片为研究对象。从分子角度分析, 水稻叶片受冷后表现为细胞损伤, 膜电阻消失, 胞内电解质大量外渗; 叶绿素含量降低, 线粒体膜流动性减少, 氧化磷酸化功能明显下降; 随着电解质渗漏率增加, 降低了可溶性糖的含量, 淀粉的积累速率也随之降低。在受害后, 水稻叶片中 ABA (脱落酸) 含量明显增加, 随低温时间的延

收稿日期: 2007-02-05

基金项目: 黑龙江省攻关重点项目 (GB05B104); 黑龙江省农业科学院创新工程项目

第一作者简介: 刘建新 (1976-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 硕士, 从事植物分子生物学研究。Tel: 13836112240; E-mail: wendy.liujx@163.com。

通讯作者: 李柱刚, 男, E-mail: lizhugang@163.com。

长,ABA含量增加,膜脂过氧化物产物丙二醛(MDA)增高;超氧歧化酶的活性、抗坏血酸和GSH(抗氧化剂)的含量下降^[2]。

2 耐冷相关基因

近年来,人们主要通过三种途径确定植物耐冷相关基因。①分离鉴定在冷驯化过程中受到诱导的基因。②耐冷性发生改变的突变体分析。③QTL作图进行耐冷基因定位。迄今,已从拟南芥、油菜、菠菜、马铃薯、苜蓿、大麦、小麦、黑麦、胡萝卜、水稻和番茄等喜凉或越冬植物中获得近100个冷诱导基因。

冷诱导基因表达的产物可分为两类:一类是与植物耐冷性的提高直接相关的功能性蛋白;另一类是调控性蛋白,调控寒冷信号传导、耐冷基因表达和抗寒蛋白活性,包括各种转录因子和蛋白激酶,如CBF(Cold-related Binding Factor)转录因子、Ca²⁺依赖性蛋白激酶、细胞分裂蛋白激活激酶等。

2.1 抗冻蛋白基因

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)是一类能抑制冰晶形成和生长的蛋白质。它能以非依数性形式降低水溶液的冰点而对其熔点影响甚微,于是导致水溶液的熔点(melting point, MP)和冰点(freezing point, FP)之间出现差值^[3]。比较已发现的植物AFPs,它们具有以下特点:①各种植物AFPs的蛋白质结构上差别很大,它们既没有相似的氨基酸序列,也没有共同的冰晶结合单元。②植物AFPs可能具有多重功能,既具有抗冻活性,同时又有酶(如内切几丁质酶,内切 β -1,3葡聚糖酶),抗菌(如甜味蛋白等)和抗虫(植物凝集素),抗旱(植物脱水素)等活性。③植物AFPs提高其抗冻性的主要途径不是通过阻止冰晶形成,而是通过控制冰晶增长和抑制冰晶重结晶效应。④除低温以外,其它因子如干旱,外源乙烯(可诱导冬黑麦的AFPs)、脱落酸等也可诱导植物AFPs的产生。

2.2 冰冻脱水保护蛋白基因

冰冻脱水保护蛋白基因按产物结构可以分为3种。①LEA(late embryo genesis abundant)蛋白基因,即胚胎发育晚期丰富蛋白基因,是指在胚胎发生后种子发生生理脱水之前大量合成积累的一大类蛋白质。②新型保护蛋白基因,拟南芥COR(cold related)基因家族是其中的主要一员,它们编码的蛋白质绝大多数是高度亲水的,具有热稳定性,氨基酸组成相对简单,由重复的氨基酸构成,且都含有能形成两性 α -螺旋的结构域。③分子伴侣基因,如热激蛋白基因(HSP)和富含甘氨酸RNA结合蛋白基因(GRP)。低温引起的生理变化会促进蛋白质变

性,热激蛋白可能通过帮助冷胁迫造成的变性蛋白进行重新折叠以稳定恢复它们的功能^[4]。GRP可能通过与RNA相互作用扮演了RNA分子伴侣的角色,使RNA分子在低温下能保持稳定。Gabriele Philips于2006年用RFDD-PCR(Restriction Fragment Differential Display PCR)方法从大麦(*Hordeum vulgare* L.)中克隆出受光和低温共同诱导的HvMC1基因就属于其中的一种^[5]。

2.3 调节基因

在已经分离到的低温诱导基因中有一类基因编码各种调节蛋白,它们通过调节耐寒基因的表达或调节参与抗冷性发展的蛋白活性来增强植物的抗寒性。其中最典型的为CBF(CRT/DRE binding factor)转录因子基因家族。转录因子(Transcriptional factors)是指能够同基因的控制元件结合的特异蛋白质^[6]。一般包括特异DNA结合结构域、转录激活结构域、二聚化结构域、以及蛋白-蛋白相互作用的其它形式的结构域。DNA结合结构域和激活结构域一般可以独立起作用。现已发现植物细胞内存在CBF1(DREB1B)、CBF2(DREB1C)、CBF3(DREB1A)、CBF4等多种蛋白,它们有非常相似的氨基酸序列(同源性高达91%)。在拟南芥染色体上,CBF蛋白基因是连锁的,组成了一个分子量的小多基因家族,并以串联排列方式定位在第4染色体短臂72.8 cM处,与分子标记m600和PG11紧密连锁;3个CBF基因中含有共同的核心序列CAN-NTG;3个CBF的分子量约为24kD,且均含有一个由60个氨基酸组成的、非常保守的DNA结合域(AP2-EREBF域)。

CBF/DREB转录因子在植物中广泛存在。田秀红设计特异性引物,用PCR方法从水稻基因组中得到5个与DREB具有同源序列的基因,其中1个属于DREB1型,其余4个属于DREB4型。表达模式实验表明其中两个CR103和CR223受到干旱和高盐诱导,另外3个表达较弱,可能为组成型表达^[7]。霍秀文等根据已有文献及公开的拟南芥基因组序列,利用PCR方法从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组DNA中扩增得到了转录因子CBF4上游的DNA片断,对其进行序列分析表明与GenBank序列高度同源,采用生物信息学方法对这一序列分析的结果显示这一片段具有启动子的特殊结构域;初步表明所获片断为CBF4基因的诱导型启动子^[8]。2005年,Morsy等发现编码低分子量膜蛋白的OsLti6基因在不同的低温敏感水稻品种的表达产物也不相同,并且此基因的表达受到DREB/CBF转录因子的诱导^[9]。

早期报道都普遍认为 CBF 转录因子是通过调控起作用的, 但 Yaopan Mao 等 2006 年研究了拟南芥转录共激活蛋白基因 ADA2 与乙酰基转移酶 GCN5 和冷诱导转录因子 CBF1 的关系, 发现 CBF1 的 DNA 结合区域能够直接与 ADA2 蛋白结合^[10]。这一研究结果为今后深入研究 DRE/CBF 转录因子提供了新的思路。

2.4 其他耐冷相关基因

植物的耐冷性是多基因作用的结果, 而耐冷基因的研究还处于起步阶段。除上述的基因以外, 还有许多其他类型和功能的基因如信号转导途径基因即编码 MAPK (mitogen activated protein kinases) 的基因, 脯氨酸代谢关键酶基因, 糖类代谢关键酶基因, 以及控制细胞壁结构和组成成分的相关基因均可能与植物的耐冷性能相关, 有待于我们进行更加深入的研究。

3 水稻耐冷分子育种研究进展

3.1 水稻耐冷相关基因转基因工程

随着耐冷基因研究的不断深入和耐冷相关基因的克隆, 水稻的转基因研究也在不断的进行。1998 年 Yokoi 等将拟南芥 GPAT (Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyl transferase) 的 DNA 转入粳稻品种 Yamahoyshi 中, 结果转基因植株叶片的不饱和脂肪酸含量比对照高 28%, 耐冷能力提高, 在低温胁迫下净光合速率提高 20%^[11]。2004 年 R. Chandra Babu 等对转入 HVA1 (一种 LEA 基因) 基因的水稻进行检验, 发现在环境胁迫下 HVA1 产生的蛋白质能够对细胞膜起到良好的保护作用^[12]。2005 年朱宝成等将来源于大麦的 LEA3 基因转入水稻中并进行了抗渗透胁迫能力分析, 结果证明, 在环境胁迫条件下, 转基因植株的可溶性糖含量, 可溶性蛋白含量以及 SOD 活性均高于对照^[13]。2006 年陈能刚等将异戊烯基转移酶 (isopentenyl transferase, ipt) 基因 (细胞分裂素生物合成步骤中的一个关键限速酶) 转入水稻 ey-105 中, 并对转基因水稻进行检测发现: 在孕穗期和开花期低温处理下, 转 ipt 基因 ey-105 的相对电导率的变化量和叶绿体受低温的危害小于对照^[14]。

目前, 水稻的耐冷转基因工程进行的并不多, 这是因为植物对逆境的适应机制十分复杂, 涉及到一系列形态和代谢过程的变化, 不同植物在不同条件下, 可能有不同的适应途径, 因此转移单个基因往往只能获得部分抗性。针对植物抗逆的多种途径, 在今后的研究中可以考虑同时转入多个基因, 从而获得具有更强抗逆性的基因工程水稻。

3.2 水稻耐冷性基因定位

水稻耐冷性基因定位是进行分子标记辅助选择培育耐冷品种的前提。水稻耐冷性是较复杂的数量性状, 在各生育时期表现出不同的冷害反应, 并且各生长器官对低温的抵抗反应以及对整个植株体生长发育的影响程度也不一样。来自不同生态区的水稻耐冷基因源所具有的耐冷主效基因不一样的可能性较大, 应该分别进行其耐冷基因的定位研究。随着分子生物学的快速发展, 水稻耐冷性 QTLs (quantitative trait loci) 分析有了较大进展, 成为了一种进行耐冷性基因定位的主要方法^[15]。而且, 农作物许多主要经济性状都属于微效多基因控制的数量性状, 传统的数量遗传学研究方法对于鉴别单个数量基因及与之有关的染色体片段, 确定它们在染色体上的位置等显得无能为力。DNA 分子标记的建立和发展, 使得研究这些数量性状的遗传变异成为可能。QTL 定位的条件是要求目标性状在群体中分离明显, 符合正态分布。故在选择亲本时, 应尽可能地选择性状表现差异大和亲缘关系较远的材料。

2002 年陈大洲等应用由 213 个株系组成的协青早 B/东乡野生稻的 BC₁F₁ 群体, 分析了东乡野生稻的耐冷基因与 DNA 标记的连锁关系。以苗期的死苗率为指标, 对亲本和 BC₁F₁ 群体各株系进行耐冷鉴定, 结果表明: 死苗率在 BC₁F₁ 群体中呈连续分布, 表明耐冷性是由多基因控制的数量性状。应用单因素方差分析法, 分别在第 4、第 8 染色体上发现有与耐冷性连锁的 SSR 标记 RM280、RM337^[16]。2003 年乔永利等利用“密阳 23 号/吉冷 1 号”杂交后代 F₃ 系统群 200 个株系, 探讨了芽期耐冷性遗传变异以及在自然和冷水处理条件下各主要农艺性状的相关关系, 并进行了芽期耐冷性以及冷水处理下主要农艺性状表型值和冷水反应指数的 QTL 定位, 共检测到与芽期耐冷性相关的 QTLs 6 个, 分别分布于第 2、4 (2 个)、7、8、9 染色体上^[17]。2005 年曾亚文等对选育的粳稻孕穗期突变体 02428c 进行耐冷性遗传分析证明 02428c 的孕穗期耐冷性受一对主效显性基因影响^[18]。陈纬等利用纸卷法测定 1 个水稻重组自交系群体对 10℃ 低温的芽期耐冷性, 结合 1 张高密度分子遗传图谱, 进行 QTL 定位分析。检测到控制水稻芽期耐冷性的 4 个 QTL, 分别位于 1、3、7 和 11 号染色体上。其中, 位于 11 号染色体上的 QTLqSCT-11 的效应最大^[19]。2006 年寻梅梅等以 98 个 Nipponbare/ kalasath// Nipponbare 回交重组自交家系 (BILs) 组成的群体为材料, 进行水稻苗期耐冷性数量性状基因座的检测和遗传效应分析表现。采用 Windows QTL Car-

together 1.13a 软件的复合区间作图法,共检测到 2 个苗期耐冷性,分别位于第 2 和第 3 染色体上,命名为 qSCT-2 和 qSCT-3^[20]。到目前为止,水稻的耐冷性分子研究还基本处于基因定位阶段,相信在不久的将来,随着耐冷性基因定位研究的不断深入,将进一步开展耐冷性水稻分子标记辅助选择育种工作。

4 展 望

鉴于低温胁迫对粮食生产的严重影响,国际上已经广泛开展了耐冷性生理、耐冷基因的定位和克隆、耐冷植物育种等各方面的研究,并且取得了一定的成果。然而,经典遗传学分析表明,植物耐冷性是一种涉及众多微效基因的数量性状,因此,对于水稻的耐冷性育种工作也必须从多方面入手。

在转基因方面,可以考虑将多种耐冷基因同时转入水稻中。如将多个耐冷相关基因共同串联至同一载体,或者将携带有不同基因的农杆菌同时进行转化。为此应进一步大力开展功能基因组的研究,克隆出更多有实用价值的功能基因作为今后发展的基础;进一步改进多基因转化技术的细节,如更好的多基因表达载体的构建,更有效的多基因转化方法的建立,定点整合技术的建立以及寻找更多样化的启动子。

在分子标记辅助选择育种方面,将与耐冷性密切相连锁的分子标记提供于分子标记辅助选择育种,以提高水稻耐冷性育种效率等,这将是我们的主要工作方向。对于黑龙江省的水稻育种工作者来说,首先应筛选出本地区特有的耐冷水稻品种,尤其是孕穗期较耐冷的品种,进行耐冷基因的定位研究;其次,将本地区耐冷品种的分子标记与具有普遍性的耐冷性分子标记结合研究,找到共同的与耐冷性密切相连锁的分子标记提供于分子标记辅助选择育种;第三,寻找新型的分子标记,简化分子标记技术,降低成本,实现检测过程的自动化、规模化。将分子标记辅助选择技术与常规育种紧密结合起来,利用中国传统水稻育种的丰富经验,加快水稻育种进程,尽快产生较大的经济效益和社会效益。

参考文献:

- [1] 刘良式. 植物分子遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [2] Zhu JK. Cell signaling under salt, water and cold stresses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001(4): 401-406.
- [3] Zhang DQ, Liu B. Expression, purification and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 35: 257-263.
- [4] C. Zhang, C. L. Guy. In vitro evidence of Hsc70 functioning as a molecular chaperone during cold stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006(9): 1-7.
- [5] Gabriele Philipps, Corinna Dzewiecki. Light-dependent expression of the cold-regulated gene HvMC1 in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Journal of Thermal Biology, 2006, 31: 473-482.
- [6] Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi, Shin-ozaki. Molecular responses to drought and cold stress[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1996(7): 161-167.
- [7] 田秀红. 水稻 DREB 转录因子基因的克隆及相关研究[D]. 北京: 中国农业大学博士研究生论文, 2004.
- [8] 霍秀文, 米福贵, 云锦凤, 等. 转录因子 CBF4 诱导型启动子的克隆及功能分析[J]. 分子植物育种, 2005(3): 363-368.
- [9] Mustafa R. Morsy, Abeer M. Almutairi. The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature[J]. Gene, 2005, 344: 171-180.
- [10] Yaopan Mao, Kanchan A. Pavangadkar. Physical and functional interactions of Arabidopsis ADA2 transcriptional coactivator proteins with the acetyl transferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1759: 69-79.
- [11] Yokoi S, Higashi S, Kishitani S, et al. Introduction of the DNA for Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyl transferase (GPA T) confer unsaturation of fatty acid and chilling tolerance of photosynthesis on rice[J]. Mol. Breeding, 1998(4): 269-275.
- [12] R. Chandra Babu, Zhang JX. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection[J]. Plant Science, 2004, 166: 855-862.
- [13] 张妍, 王瑛, 梁玉玲, 等. 转 LEA3 基因水稻的抗性分析[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(5): 33-37.
- [14] 陈能刚, 余显权, 赵德刚, 等. 转 ipt 基因水稻植株耐冷性研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(2): 255-258.
- [15] Zhang HZ, Li Su, Li Wei, et al. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Science, 2005, 168: 527-534.
- [16] 陈大洲, 钟平安, 肖叶青, 等. 利用 SSR 标记定位东乡野生稻苗期耐冷性基因[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(6): 753-757.
- [17] 乔永利. QTL Basic analysis for cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)[D]. 西安: 西北农林科技大学硕士论文, 2003.
- [18] Zeng YW, Shen SQ, PU XY. Genetic analysis of Japonica Mutant "02428c" with cold tolerance gene at booting stage[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2005, 19(1): 6-8.
- [19] Chen Wei, Li Wei. Mapping of QTL conferring cold tolerance at early seedling stage of rice by molecular markers[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(2): 116-120.
- [20] XUN MM, Jiang L. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) by using backcross inbred lines[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2006, 29(2): 123-126.