

转 *CpFATB* 水稻后代耐冷性鉴定与筛选

刘建新^{1,2}, 刘文萍^{1,2}, 南相日^{1,2}

(1. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了获得水稻抗寒育种的基因资源, 将腊梅花硫酯酶基因(*CpFATB*)转入水稻中, 并对其后代进行了耐冷性鉴定。结果表明: 转基因水稻低温下发芽率与常温发芽率比值为 98%, 与对照相比有所提高, 达 0.01 水平显著差异; 幼芽 5℃ 存活率最高为 98.41%, 与对照达 0.001 水平显著差异; 芽期在经历低温后比对照能较快地恢复生长; 孕穗期经低温处理后, 穗长、穗重、千粒重等指标无显著差异, 有效分蘖率最高为 76.928%, 空粒率最低为 10.02%, 与对照达 0.001 水平显著差异。说明外源基因 *CpFATB* 在一定程度上提高了水稻的耐冷性。

关键词:水稻; *CpFATB*; 耐冷性

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)09-0018-04 **DOI:** 10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0018

黑龙江省是全国最大的商品稻米生产基地。自 2004 年起, 黑龙江省水稻种植面积一直在快速增加, 至 2013 年, 已达到 400 万 hm^2 ^[1]。随着气候变暖等因素, 水稻种植区域大幅向北拓展, 积温带向北推移了 30~50 km^2 ^[2]。水田北扩工程相继引发了水稻冷害发生的频率加大, 造成水稻减产严重, 水稻产量稳定性差等问题。2014 年, 黑龙江省大面积的倒春寒灾害致使多地的水稻产生障碍型冷害, 水稻生产严重受损。

选育和使用抗寒品种是解决黑龙江省水稻冷害问题的根本措施。然而缺乏优良的抗寒材料严重限制了水稻抗寒品种选育工作的发展。本研究将抗寒相关基因腊梅花硫酯酶基因(*CpFATB*)转入水稻中, 获得了转基因植株, 并对其后代的耐冷性进行鉴定, 以期获得水稻抗寒育种的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

转化受体为合江 19, 由黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所提供。植物表达载体 pTEV7-*CpFATB*(HM138365) 由吉林大学张世宏教授提供。2010 年用农杆菌介导法进行转化, 获得转 *CpFATB* 水稻, 经过 2 a 田间筛选获得的第三代

基因修饰材料, 共计 6 个株系, 命名为 TF1~TF6。对照为非转化基因水稻品种合江 19, 即 H19。

1.2 方法

根据实际试验条件, 该试验设计为发芽期耐

冷性、幼苗期耐冷性和孕穗期耐冷性评价三部分。
1.2.1 发芽期耐冷性 参照《水稻耐冷性鉴定评价方法》(韩龙植, 2004)^[3-4], 根据实际试验条件适当加以改动。将水稻种子在 40~50℃ 高温处理 48 h, 打破休眠后, 加入 75% 酒精浸泡 1 min, 用无菌水冲洗 2~3 遍, 放入装有滤纸的平皿中, 每皿 50 粒, 每个品系 5 次重复。室温浸种放置 2 d 后, 在 5℃ 条件下低温处理 5~10 d, 对照为不经低温处理的材料。以芽长至 5 mm 为标准, 计算低温下发芽率和低温下发芽率与常温下发芽率的相对比值。发芽率(%) = (发芽粒数/供试总粒数) × 100。低温下幼芽存活率: 正常条件下发芽, 待幼芽长至 5 mm 时移至 5℃ 培养箱中 12 h 光照继续培养, 5 d 后测量芽长 1 cm 以上株数, 计算存活率, 按评级标准进行评级: 1 级为全部存活, 3 级为 80%~99% 存活, 5 级为 50%~79% 存活, 7 级为 1%~49% 存活, 9 级为全部死亡^[5]。

1.2.2 幼苗期耐冷性 种子正常条件萌发, 待芽长约 5 mm 时放入铺有滤纸的平皿中, 每皿 50 粒, 每个品系 3 次重复。在 5℃ 条件下处理 10 d, 然后在光照培养箱中 12 h 光照下恢复生长 5 d, 测量叶片长度。将叶片长度从 2 cm 起每 0.5 cm 为一个集群至 >4 cm, 共 6 个集群, 按照每个集群的个体数量占总数量的百分率进行统计。

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 黑龙江省自然科学基金面上资助项目(C201105); 中国科学院北方粳稻分子育种中心子课题资助项目

第一作者简介: 刘建新(1976-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 在读博士, 助理研究员, 从事生物技术育种和分子生物学研究。E-mail: wendyliujx@163.com。

1.2.3 孕穗期耐冷性 在常温下育苗,室外盆栽场中培养,当材料进入幼穗分化期时,在人工气候室中进行低温处理,每个品种 2 盆,每盆 3 株。人工气候室的光照设为 30 000 lx,温度 12℃ 下处理 5 d 后移至常温下恢复生长,直至成熟。对收获期性状进行调查,每个品系 5 次重复,指标包括有效分蘖率、穗长、穗重、空粒率和千粒重等。本实验选取了在盆栽场生长状况良好的 4 个转基因株系,所有参试株系均经过 PCR 检测证明含有外源基因,对照为非转基因合江 19。

1.2.4 数据分析 采用 GraphPad Prism 5 和 SPSS19.0 软件数据分析和制图。

2 结果与分析

2.1 发芽期耐冷性

低温下发芽率是目前在发芽期耐冷性鉴定中最常用的一种标准。由图 1 可知,经过 5℃ 的低温处理以后,各品系水稻种子发芽率有所下降,但下降幅度略有不同。由于各品系种子质量参差不齐,本身的发芽率就有差异,因此用低温下发芽率与常温下发芽率的比值作为衡量标准。相较于对照品种 86.39% 的结果,TF1、3、4 和 6 的比值均在 98% 以上,与 H19 达 0.01 水平显著差异,TF5 与 H19 达 0.05 水平显著差异,为 96.43%,而 TF2 则比对照有所降低,这主要是因为 TF2 这个品系种子整体质量差,其对照发芽率也比较低,低温下发芽率更低的缘故。

供试材料在 5℃ 的发芽率比值相对较高,与原栽培种对照差异仅达到显著水平,但在发芽的后期阶段,即幼芽伸长阶段,同样在 5℃ 的生长条件下,幼芽的伸长显示出极显著差异,此指标用存活率来体现。由图 1 可知,对照栽培种的存活率为 79.40%,与之相比,TF1 和 TF5 两个品系幼芽存活率分别为 98.41% 和 96.18%,达 0.01 水平显著差异;TF4 为 91.11%,达 0.01 水平显著差异;TF3 为 90.89%,达 0.05 水平显著差异。而 TF2 和 TF6 幼芽存活率与对照相比无显著差异。除 TF2 以外,所有供试品系均在芽期耐冷性评级中属于 3 级标准,对照为 5 级。

合江 19 是 20 世纪 80 到 90 年代在黑龙江省第二、三和四积温带广泛种植的品种,具有早熟、耐寒性强、适应性广和高产稳产等优点,是我国北方稻区一份宝贵的种质资源^[6]。从该品种衍生出了一系列具有优良性状的品系和品种并得到广泛

应用。尤其是合江 19 具有优异的组培特性,其花药培养力和愈伤组织培养力均较高,被广泛应用于生物技术育种中,成为东北粳稻中进行遗传转化的主要受体之一。从图 1 可以看出,合江 19 本身就具有较好的耐寒特性,其低温发芽率与常温发芽率比值达到 86%,幼芽低温处理后的存活率为 79.4%。经过基因修饰的 6 个株系中,除 TF2 外,其它 5 个株系均或多或少体现出了比合江 19 更强的耐冷性。TF1 和 TF5 的幼芽存活率极显著 ($P < 0.001$) 高于对照,说明外源基因对于提高转基因植株的耐寒性起到了积极的作用。

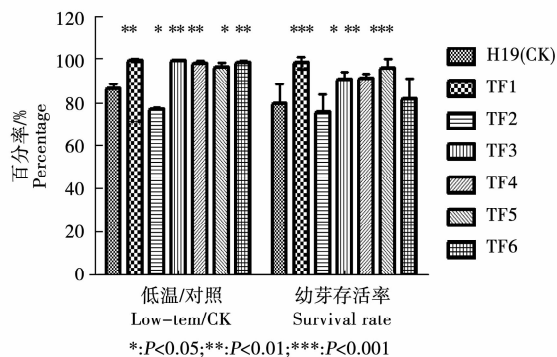


图 1 低温下水稻发芽率与常温下发芽率的比值和幼芽存活率

Fig. 1 Low-tem/CK of germination rate and survival rate seedling

2.2 苗期耐冷性

有研究报道,苗期耐冷性与孕穗期和开花期耐冷性有着密切的关系^[7],因此苗期耐冷性普遍应用于稻种资源的耐冷性鉴定。

经过发芽期耐冷性鉴定,筛选出了 TF1 和 TF5 作为苗期耐冷性评价的对象。图 2 显示了每个株高群体占整个品系群体的比重,体现了正常发芽的水稻幼苗在经过 10 d 低温处理又回到正常培养条件后,幼苗恢复生长的能力。其中,对照合江 19 的株高主要集中在 2~3 cm,占总体的 56% 以上,株高 3 cm 以上的个体数不到 30%。株系 TF1 低于 2 cm 的个体数仅有 1.32%,3.0~3.5 cm 范围内的个体数最多,为 35%,3.5 cm 以上的个体数占 27.6%,也比较多。株系 TF5 在 2.5~3.0 cm 和 3.0~3.5 cm 这两个高度范围内所占比例比较大,分别为 28.9% 和 29.8%。每个群体的各阶段株高基本呈正态分布。上述结果证明,转基因株系在芽期受到低温冷害后,能够较为迅速地恢复生长,耐冷能力有所增加。

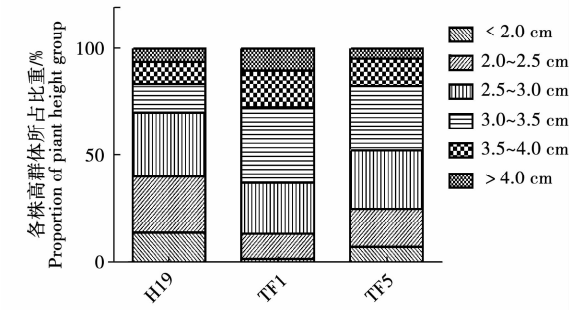


图 2 低温对幼苗期水稻生长的影响
Fig.2 Effect of low-temperature on
growing rate of seedling

2.3 孕穗期耐冷性

由表 1 可见,经过在孕穗期长达 5 d 的低温

表 1 孕穗期经低温处理后收获期产量性状分析

Table 1 Analysis on yield trait after low-temperature treatment in booting stage

品系	平均穗长/cm	平均穗重/g	有效分蘖率/%	空粒率/%	千粒重/g
Strains	Panicle length	Panicle weight	Effective tillering rate	Empty seeds rate	1000-grain weight
H19	18.1±1.475	2.33±0.798	67.740	30.18±10.366	24.8
TF1	18.8±1.44	2.59±0.131	76.928**	16.98±5.189**	24.4
TF3	15.9±1.651	1.96±0.288	74.162	11.32±4.365***	28.0
TF4	16.4±1.720	2.3±0.43	75.900*	10.02±4.304***	23.8
TF5	16.3±1.204	2.16±0.624	64.374	10.24±7.071***	27.0

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$.

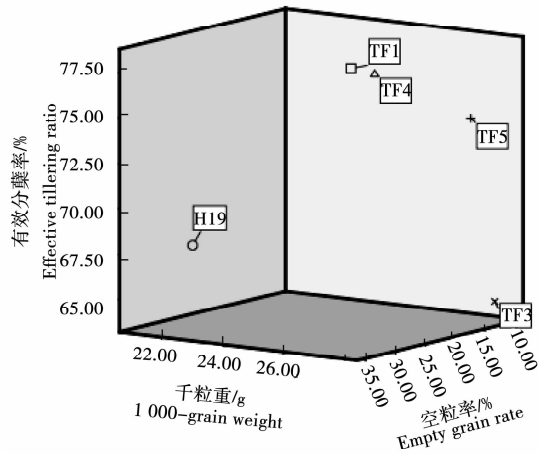


图 3 孕穗期低温处理水稻产量性状 3D 分布散点图
Fig. 3 3D scatter diagram of yield trait after
low-temperature treatment in booting stage

选择空粒率、有效分蘖率和千粒重 3 个指标为坐标轴,用 SPSS19.0 绘制 3D 分布散点图,从图 3 可以很直观的看出,在所有株系中,TF1、TF4 和 TF5 相对来说是综合性状较好的株系,与

处理后,各株系在穗长、穗重和千粒重这 3 个指标上并未表现出明显差异,但有效分蘖率、空粒率这两个指标表现出显著差异。处理的材料穗长在 15.9~18.8 cm,其中最长的 TF1 为 18.8 cm,最短的 TF3 为 15.9 cm,与对照 18.1 cm 相比,差异不显著。穗重在 1.96~2.59 g,最重的是 TF1, 2.59 g,平均穗重最小的是 TF3 为 1.96 g,用 SPSS19.0 进行方差分析,与对照 2.33 g 相比没有显著差异。有效分蘖率在 65%~77%,有效分蘖率最高的是 TF1 为 76.928%,与对照相比呈显著差异,其次为 TF4,75.900%,与对照相比呈较显著差异。在各项指标中,空粒率的差异范围最大,对照为 30.18%,而转基因株系则在 10%~17%,TF1 表现为显著差异,其余 3 个株系为极显著差异。

对照相比,有效分蘖率高,空粒率低,千粒重比对照稍高。因此可以说明经过低温处理后,转入外源基因的株系在孕穗期耐低温能力上有所提高。

3 结论与讨论

从结果可以看出:无论是在发芽期、芽期、苗期还是在孕穗期,CpFATB 基因修饰材料都在一定程度上显示出了较高的耐冷能力,尤其是幼芽存活率和空粒率这两个指标都达到了 0.001 水平极显著差异。说明外源基因在一定程度上提高了水稻的耐冷性。

植物脂酰-酰基载体蛋白硫酯酶(FAT)是一种终止脂肪酸合成的酶。它的基本功能就是将 acyl-ACPs 水解成游离脂肪酸和 ACP,从而终止脂肪酸从头合成途径中脂肪酸链的延长^[7]。脂肪酸在植物响应非生物胁迫过程中扮演着很重要的角色,可以保持细胞膜质的稳定性,并参与一些信号传导途径中的生物合成。本试验所用 Cp-FATB 基因是从腊梅(*Chimonanthus praecox*)的 cDNA 文库中克隆获得的,腊梅具有很强的耐干

旱、耐低温能力以及对许多常见植物致病菌的抵抗力,可以为提高植物抗生物胁迫和非生物胁迫能力提供众多的备选基因^[8]。张世宏等将 *CpFATB* 基因转入烟草中发现该基因在转基因烟草中定位于叶绿体,转基因烟草中的肉豆蔻酸含量增加了 46%,而油酸含量降低了 35%;同时还验证了转 *CpFATB* 的烟草植株具有较强的耐干旱能力,转基因烟草的离体叶片失水率明显低于未转化野生型烟草^[9]。

植物耐寒性是一个非常复杂的生理过程,涉及到众多信号传导机制和分子响应机制,单纯靠某一个外源基因的作用很难有效地提高植物的耐寒能力。黑龙江省大部分地区水稻生产由以前的直播为主改为现在的温室育苗移栽为主,由于受到水稻播种方式的影响,水稻受苗期低温冷害的可能性大大降低。有资料显示,水稻孕穗期对低温冷害反应最敏感。因此,有必要在孕穗期进行耐冷性鉴定,并且应以处于敏感时段的稻穗(不分主茎或分蘖)的空壳率作为评价标准^[7]。空粒是没有完成受精过程而停止发育的颖花,空壳率(空粒率)则最能反映水稻受障碍型冷害影响的程度^[10]。尽管本研究获得的基因修饰材料在一定程度上耐寒能力有所提高,仍然暂时不能成为育种材料进行实际应用。原因之一是这些材料在后续的田间实验中未表现出比其它水稻品种更强的优越性,而且显现出了比野生型合江 19 更晚熟的特性;另外该基因是否会参与水稻种子物质积累和化合物合成,是否会对水稻品质成分有所影响

还有待于进一步的研究考证;*CpFATB* 基因在水稻中的耐寒机理也需要进一步研究,这将是以后要进行的工作。

参考文献:

- [1] 矫江,李禹尧. 黑龙江省水稻面积快速增加应注意的问题[J]. 北方水稻,2012(3):1-4.
- [2] Gu Hong, Du Chunying, Gao Yonggang, et al. Variation of accumulated temperature and precipitation and its effects on crop belts over the past 48 years in Heilongjiang province[J]. Meteorological and Environmental Research, 2010,1(10):12-15.
- [3] 韩龙植,张三元. 水稻耐冷性鉴定评价方法[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(1):75-80.
- [4] 戴陆园,叶昌荣,余腾琼,等. I. 稻冷害类型及耐冷性鉴定评价方法概述[J]. 西南农业学报,2002(1): 41-50.
- [5] 李太贵. 在低温下筛选水稻不同生长期耐寒品种的室内方法[J]. 国外农业科技,1981(4): 18-21.
- [6] 孙岩松,辛爱华,聂宏. 寒地水稻优良种质资源合江 19 等的鉴定与利用[J]. 黑龙江农业科学,1991(2):25.
- [7] 王威浩,谭晓风. 植物脂酰-酰基载体蛋白硫酯酶研究综述[J]. 经济林研究,2009,27(2): 118-124.
- [8] Zhang S H, Wei Y, Liu J L, et al. Baldwin TCCpCHT1 an apoplastic chitinase isolated from the corolla of wintersweet (*Chimonanthus praecox communis* L.) exhibits both antifungal and antifreeze activities[J]. Biol Plantarum, 2011, 55:141-148.
- [9] Zhang L H, Jia B, Zhuo R Y, et al. An Acyl-acyl carrier protein thioesterase gene isolated from wintersweet (*Chimonanthus praecox*), *CpFATB*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012,30(2): 433-442.
- [10] 王连敏,王立志,王春艳,等. 黑龙江水稻冷害Ⅵ寒地水稻障碍型冷害鉴定过程的启发[J]. 黑龙江农业科学, 2010(2):20-21.

Identification and Screening on Cold Tolerance Performance of Transgenic *CpFATB* Rice

LIU Jian-xin^{1,2}, LIU Wen-ping^{1,2}, NAN Xiang-ri^{1,2}

(1. Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to acquire cold-tolerance resources of rice for breeding, *CpFATB* (*Chimonanthus praecox* chloroplast acyl-ACP thioesterase) was transferred into japonica rice, and the ability of cold-tolerance of the third GMOs' generation was tested. The results showed that the ratio of the germination rate under low-temperature treatment and regular temperature was 98% that significantly higher than the non-GMO cultivar. The survival rate of seedling at 5°C was 98.41%, reached highly significant level. The GMOs recovered quicker than non-GMO cultivar after low-temperature treatment in sprouting stage. There was no significant difference with status like TKW, average panicle weight and length. But the effective tillering rate and empty seeds rate were in highly significant level difference after low-temperature treatment in booting stage. All results certificated that the *CpFATB* improved the ability of cold-tolerance of rice to a certain degree.

Keywords: rice; *CpFATB*; cold-tolerance