

# 转录因子 OsMADS25 提高水稻对低温的耐受性

闫凌月<sup>1</sup>, 张豪健<sup>1</sup>, 郑雨晴<sup>1</sup>, 丛韞起<sup>1</sup>, 刘次桃<sup>1</sup>, 樊帆<sup>1</sup>, 郑钺<sup>1</sup>, 袁贵龙<sup>2</sup>,  
潘根<sup>3</sup>, 袁定阳<sup>2</sup>, 段美娟<sup>1</sup>

1. 湖南农业大学农学院, 水稻逆境生物学湖南省重点实验室, 长沙 410128
2. 湖南杂交水稻研究中心, 杂交水稻国家重点实验室, 长沙 410125
3. 中国农业科学院麻类研究所, 长沙 410205

**摘要:** 低温冷害是影响水稻高产的关键环境因素, 鉴定和克隆具有重要应用价值的耐低温基因并培育耐低温新品种对于保障粮食安全具有重要意义。MADS 转录因子在植物逆境信号途径中扮演着重要的角色。本研究利用 qRT-PCR 检测, 发现 *OsMADS25* 受低温和脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导表达上调, 预示 *OsMADS25* 可能参与 ABA 依赖的逆境信号途径。进一步构建了水稻 *OsMADS25* 的过表达载体 pCambia1300-221-*OsMADS25*-Flag, 利用根癌农杆菌介导的遗传转化法将其导入水稻品种中花 11 (ZH11), 选取两个表达量高的纯合株系进行表型鉴定。结果表明, *OsMADS25* 过表达株系显著提高了水稻苗期对低温的耐受性以及 ABA 的敏感性。利用 3,3'-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)和氯化硝基四氮唑蓝(nitroterrazolium blue chloride, NBT)组织化学染色结果表明: 低温处理后, *OsMADS25* 过表达株系比野生型 ZH11 染色浅, 表明过表达株系在低温胁迫下积累的活性氧(reactive oxygen species, ROS)相对较少, 增强了对低温的耐受性。综合结果表明, 低温逆境下 *OsMADS25* 响应 ABA 信号, 通过提高水稻对 ROS 的清除能力, 避免水稻受到低温伤害。

**关键词:** 水稻; *OsMADS25*; 脱落酸; 活性氧; 耐低温

收稿日期: 2021-06-20; 修回日期: 2021-08-21

**基金项目:** 湖南省科技重大专项(编号: 2018NK1010), 湖南省科技人才支持项目(编号: 2019TJ-Q08), 湖南农业大学人才引进启动基金(编号: 20154/5407419002), 杂交水稻国家重点实验室(湖南杂交水稻研究中心)开放课题(编号: 2020KF05)和湖南省自然科学基金青年基金项目(编号: 2019JJ50714)资助[Supported by the Hunan Science and Technology Major Project (No.2018NK1010), the Hunan Science and Technology Talents Support Project (No.2019TJ-Q08), the Research Initiation Fund of Hunan Agricultural University (No.20154/5407419002), the Open Research Fund of the State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hybrid Rice Research Center (No.2020KF05) and the Hunan Province Natural Science Fund (No. 2019JJ50714)]

**作者简介:** 闫凌月, 在读硕士研究生, 专业方向: 作物遗传育种。E-mail: yanlingyue0203@163.com

**通讯作者:** 袁定阳, 博士, 研究员, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: yuandingyang@hhrc.ac.cn

段美娟, 博士, 研究员, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: duanmeijuan@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-217

网络出版时间: 2021/10/13 11:34:37

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20211012.2042.002.html>

# Transcription factor OsMADS25 improves rice tolerance to cold stress

Lingyue Yan<sup>1</sup>, Haojian Zhang<sup>1</sup>, Yuqing Zheng<sup>1</sup>, Yunqi Cong<sup>1</sup>, Citao Liu<sup>1</sup>, Fan Fan<sup>1</sup>, Cheng Zheng<sup>1</sup>, Guilong Yuan<sup>2</sup>, Gen Pan<sup>3</sup>, Dingyang Yuan<sup>2</sup>, Meijuan Duan<sup>1</sup>

1. Hunan Provincial Key Laboratory of Rice Stress Biology, College of Agriculture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, China

3. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China

**Abstract:** Cold stress is the limiting factor of rice growth and production, and it is important to clone cold stress tolerant genes and cultivate cold tolerance rice varieties. The MADS transcription factors play an important role in abiotic stress signaling in rice. This study showed that *OsMADS25* was up-regulated by low temperature and abscisic acid (ABA), suggesting that *OsMADS25* may be involved in ABA-dependent signaling. The *OsMADS25* overexpression vector, pCambia1300-221-*OsMADS25*-Flag, was constructed and introduced into the rice variety Zhonghua 11 (ZH11) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. Two homozygous lines with high expression levels were selected for phenotypic identification. *OsMADS25* overexpression lines show significantly improved cold stress tolerance and the sensitivity to ABA at the seedling stage of rice. Reactive oxygen species (ROS) was detected by diaminobenzidine (DAB) staining and nitroblue tetrazolium (NBT) staining. After treatment with cold stress, little ROS accumulation was observed in *OsMADS25* overexpression lines compared to wild-type ZH11. In conclusion, *OsMADS25* plays a role in scavenging reactive oxygen species (ROS) and could improve rice tolerance to cold stress involved in ABA-dependent pathway.

**Keywords:** rice (*Oryza sativa* L.); *OsMADS25*; abscisic acid (ABA); reactive oxygen species(ROS); cold tolerance

水稻(*Oryza sativa* L.)是最主要粮食作物,世界上有一半以上的人口以水稻为主食<sup>[1]</sup>。相比其他主粮作物如小麦(*Triticum aestivum* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)等,水稻对低温更加敏感<sup>[2]</sup>。世界上约有24个国家如中国、日本、朝鲜等遭遇过低温冷害问题<sup>[3]</sup>。低温对水稻的影响主要发生在幼苗期和生殖生长期。例如在我国的华南和长江中下游双季稻区早稻苗期遇到“倒春寒”,晚稻抽穗扬花期遇到“寒露风”低温灾害气候,导致水稻大幅减产<sup>[4-7]</sup>。低温灾害使我国每年粮食减产30~50亿公斤<sup>[8]</sup>。低温严重制约水稻的产量,因此挖掘耐低温新基因及培育耐低温新品种是水稻育种的重要研究方向。

植物耐受低温胁迫是一个复杂的遗传性状,受多个基因/数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)控制。与其他农艺性状相比,水稻低温耐受性的遗传研究进展缓慢,在过去几十年内,通过正向

遗传学方法鉴定出的耐低温基因相对有限,包括8个QTL定位的基因 $qLTG3-1$ 、 $COLD1$ 、 $qCTS-9$ 、 $GST22$ 、 $HAN1$ 、 $LTG1$ 、 $Ctb1$ 和 $CTB4a$ ,2个由全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)定位的基因 $bZIP73$ 和 $qPSR10$ 。 $qLTG3-1$ 编码一个富含甘氨酸(GRP)的保守结构域,第17位氨基酸为赖氨酸(Lys)基因型表现为低温下种子萌发率增强;而第17位氨基酸为组氨酸(His)基因型则表现为穗期耐低温<sup>[9,10]</sup>。 $COLD1$ 编码G蛋白信号调节因子,其与G蛋白 $\alpha$ 亚基RGA1互作,促进 $Ca^{2+}$ 流入细胞内,并增强G蛋白的GTP酶活性,进而增强水稻对低温的耐受性<sup>[11]</sup>。过表达 $qCTS-9$ 提高水稻对低温的耐受性<sup>[12]</sup>。 $OsGST22$ 第99位氨基酸为异亮氨酸(Ile)时,对提高水稻苗期耐低温起重要作用<sup>[13]</sup>。 $HAN1$ 编码氧化酶,催化生物活性的茉莉酰基-L-异亮氨酸(JA-Ile)转化为无活性形式的12-羟基-JA-Ile (12OH-

JA-Ile), 并通过调节茉莉酸(jasmonic acid, JA)含量来调控水稻对低温的耐受性<sup>[14]</sup>。*LTG1* 编码酪蛋白激酶 I (casein kinase I), 提高低温下水稻的生长速率及产量<sup>[15]</sup>。*Ctb1* 编码一个含有 F-box 结构域的蛋白, 其与 E3 泛素连接酶 Skp1 互作, 参与泛素-蛋白酶体的低温信号传导途径<sup>[16]</sup>。*CTB4a* 编码一个保守的富亮氨酸受体激酶 LRR-RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase), 其与 ATP 合成酶的  $\beta$  亚基 AtpB 互作, 并在低温下复合体通过影响 ATP 合成酶的活性, 从而影响水稻灌浆期的能量供应, 进而提高水稻抽穗期对低温的耐受性<sup>[3]</sup>。bZIP 转录因子 *bZIP73*, 与另一个 bZIP 蛋白 *bZIP71* 互作来调节水稻体内植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和可溶性糖水平, 从而提高水稻苗期和抽穗期对低温的耐受性<sup>[10,17]</sup>。*qPSR10* 在 343 位的核苷酸为 G 时, 表现出在苗期和抽穗期都耐低温<sup>[18]</sup>。

植物响应低温逆境信号的基因可分为有两大类: 第一类是功能基因, 其编码产物在植物受逆境胁迫时直接起保护作用, 例如渗透保护剂合成酶基因、抗氧化酶类等; 第二类是调节基因, 其编码产物通过调节功能基因的协同表达, 从而使植物避免受到逆境的伤害, 例如蛋白激酶类和转录因子<sup>[19]</sup>。一个转录因子可以调控一类相关性状的很多基因, 从而有效改变植物的相关特性。因此, 转录因子往往是植物耐受逆境(包括低温)等的主效基因。因此, 从一些关键调节因子入手, 可促使多个胁迫应答基因发挥作用。

MADS 转录因子广泛参与激素和非生物逆境胁迫应答。例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)开花时间基因 *SOC1* 的突变提高植物对低温的耐受性<sup>[20]</sup>; 拟南芥 *AGL21* 通过调节 ABA 信号基因 *ABI5* 的表达来调节植物对渗透胁迫的耐受性<sup>[21]</sup>。小麦(*Triticum aestivum* L.) *TaMADS2* 受条锈菌感染后表达上调<sup>[22]</sup>。水稻 *OsMADS26* 负调节水稻对病原体的抗性和对干旱的耐受性<sup>[23]</sup>, 而 *OsMADS87* 参与调节水稻对高温的敏感性<sup>[24]</sup>。最近研究表明, *OsMADS25* 通过影响硝酸盐的积累以及调节生长素的方式调节水稻根系发育, 进而提高水稻对盐的耐受性<sup>[25,27]</sup>。然而 *OsMADS25* 是否响应低温逆境胁迫仍不清楚。为了研究 *OsMADS25* 是否响应低温逆境信号途径, 本文探究了过表达 *OsMADS25* 转基因株系对逆境关键激

素 ABA 的响应, 以及转基因株系在低温下的存活率、下游调控基因和清除 ROS 的能力, 揭示 *OsMADS25* 响应水稻低温胁迫的可能分子机制。

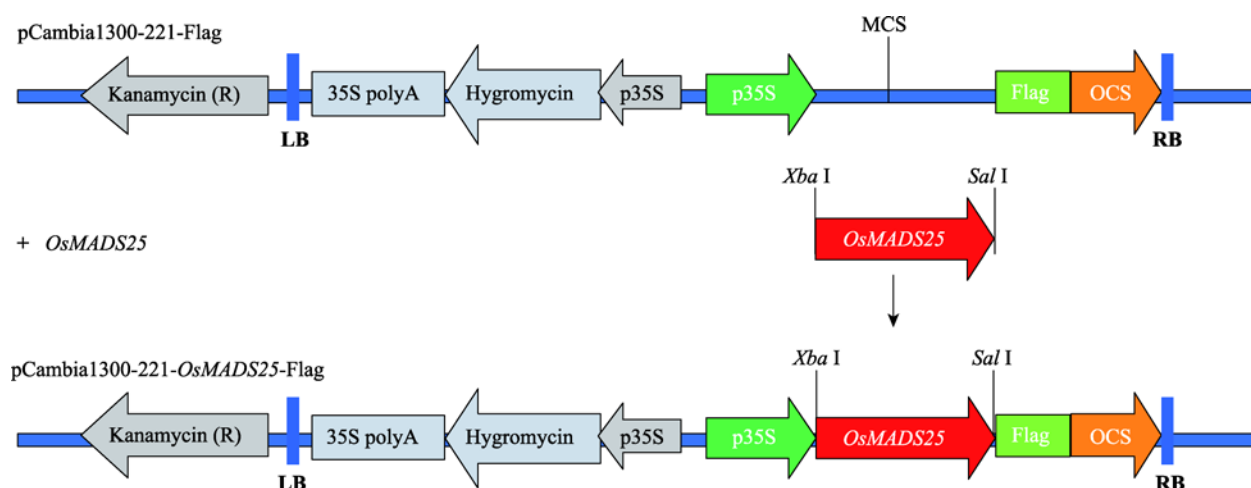
## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻粳稻品种 ZH11 和日本晴(Nipponbare), 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 AGL0、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  由湖南农业大学农学院湖南省逆境生物学重点实验和湖南杂交水稻研究中心提供。pCambia1300-221-Flag 质粒由中国科学院遗传与发育生物学研究所储成才研究员惠赠。高保真 DNA 聚合酶(KOD FX 酶)购于 TOYOBO(日本)公司; *Taq* 酶、限制性内切酶、T4 连接酶等购于 TaKaRa (日本)公司; DEPC 以及组培试剂购于 Sigma(美国)公司; RNA 提取 Trizol 购于 Invitrogen(美国)公司; 反转录试剂盒购于 TOYOBO (日本)公司; 质粒提取、胶回收试剂盒购于 TIANGEN(中国)公司; 3,3-二氨基联苯胺(diaminobezidine, DAB)和氯化硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)购于 Solarbio(中国)生物公司。引物合成和测序由擎科生物技术有限公司(中国)完成。

### 1.2 *OsMADS25* 过表达载体的构建

提取日本晴两周龄幼苗总 RNA, 经反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板, 以引物 F: 5'-CTAGTCTAGAATGGGGAGAGGGAAGATTGC-3' 和 R: 5'-ACGCGTCGACTTCATCTTCAACTTCTTTTGACTCA-3' (下划线为酶切位点), 高保真酶 KOD FX (TOYOBO 公司, 日本)进行 PCR 扩增, 获得 *OsMADS25* (*LOC\_Os04g23910*) CDS 序列。用 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切 PCR 纯化产物和双元表达载体 pCambia1300-221-Flag 质粒(构建过程如图 1 所示), 利用 T4 连接酶连接, 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  体内, 提取质粒。经酶切鉴定正确的质粒由美国 Invitrogen 公司测序。将测序正确的质粒, 转化于根癌农杆菌 AGL0, 成功转化到农杆菌的菌落再浸染 ZH11 的愈伤组织, 经潮霉素筛选获得 *OsMADS25* 过表达的阳性转基因植株。

图 1 *OsMADS25* 过表达载体构建示意图Fig. 1 Schematic construction of expression vector of pCambia1300-221-*OsMADS25*-Flag

### 1.3 逆境诱导表达谱分析

对两周龄的 ZH11 分别进行低温逆境(4℃)和 ABA (100 μmol/L)处理,以正常条件为对照,分别于 0、0.5、3、6、12、24 h 收集根和苗,按照美国 Invitrogen 公司 RNA 提取 Trizol 说明书提取总 RNA,按照日本 TOYOBO 公司反转录试剂盒操作说明进行反转录,获得 cDNA,以 *Ubiquitin* (*LOC\_Os03g13170*)为内参, qRT-PCR 检测不同时间点和不同部位 *OsMADS25* 在 RNA 水平的表达量。引物序列见表 1。

### 1.4 转基因株系低温耐受性检测

*OsMADS25* 转基因株系及野生型 ZH11 种子放入鼓风干燥箱箱(42℃, 7 d)以破除休眠,放入 37℃ 恒温箱浸种 2 d,露白后的种子移至剪孔型的 PCR 板中,用 IRRI 营养液(International Rice Research Institute Protocol, <http://irri.org>)培养至三叶一心时期,在光照培养箱(Percival 公司,美国)进行低温(4℃)处理,70%相对湿度、14 h 白天/10 h 夜晚。低温处理 3 d 后,恢复至正常温度(28±2℃),统计成活率。每个处理 120 棵苗,3 个平行重复。利用 SAS 软件(<http://www.sas.com/>)进行统计分析。

### 1.5 DAB 和 NBT 染色

DAB 和 NBT 染色分别用于检测 *OsMADS25* 过表达株系及野生型 ZH11 对照在低温处理后植株中

双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)含量。

DAB 染色采用 Solarbio 生物公司 DAB 浓缩型试剂盒。NBT 染色:称取 100 mg NBT 加入到 100 mL 10 mmol/L 的磷酸缓冲液(0.2 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mL、0.2 mol/L NaOH 4.52 mL、pH=7.8)中,充分搅拌至 NBT 完全溶解。两者均过夜染色,染色过程中避光,95%酒精清洗叶片,并在沸水中煮 10 min,以至叶片褪色,拍照。

### 1.6 ABA 敏感性检测

*OsMADS25* 过表达株系及野生型 ZH11 种子于 37℃ 浸种 2 d,将露白的种子放入铺有滤纸的培养皿中,分别用含 0 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L ABA 的水溶液处理 10 d,测量苗的长度。实验在人工气候室进行(28℃、70%相对湿度,14 h 白天/10 h 夜间光周期)。每个平皿 30 棵苗,每个处理 3 个平行重复,用 SAS 软件进行统计分析。

### 1.7 *OsMADS25* 下游基因的检测

提取两周龄 *OsMADS25* 过表达株系及野生型 ZH11 幼苗的总 RNA,经反转录合成 cDNA 第一条链, qRT-PCR 检测 *OsMADS25* 过表达株系和野生型 ZH11 中低温响应基因 *LTG1* (*LOC\_Os02g40860*)、*OsDREB6* (*LOC\_Os09g20350*)和 *OsTPP1* (*LOC\_Os02g44230*)的相对表达量,以 *Ubiquitin* (*LOC\_Os03g13170*)为内参。引物序列见表 1。



表 1 qRT-PCR 检测引物

Table 1 Sequences of primers used for qRT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>OsMADS25</i>	F: GAGGATCGACAACACGATGAA
	R: GGTGCAGGAGAAGACAATGA
<i>LTG1</i>	F: CGTGCTGAATGGGCTGATAA
	R: GTTGAGGTTGATGCCAAGGA
<i>OsEREB6</i>	F: TCCGGTTTGTTCACAGTTTATG
	R: GCCTGGATGTAGTGATCTG
<i>OsTPP1</i>	F: CCATCTACATTGGAGACGACAG
	R: CCTTGGGAACCTGTGAAACTA
<i>Ubiquitin</i>	F: GCTCCGTGGCGGTATCAT
	R: CGGCAGTTGACAGCCCTAG

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsMADS25* 受低温和 ABA 诱导

对三叶一心时期(约两周龄)的野生型 ZH11 进行低温(4℃)逆境和逆境激素 ABA 处理,为区别 *OsMADS25* 是否响应光周期,本研究设置了正常培养条件作为对照。结果显示:经 ABA 处理,野生型 ZH11 根和地上部分 *OsMADS25* 的表达量上调;*OsMADS25* 在根中仅 0.5 h 就表现出上调,在 6 h 表达量达到峰值(图 2);在地上部分,*OsMADS25* 在 6 h 表达上调,在 12 h 表达量达峰值。经低温处理,*OsMADS25* 的表达量仅在根中 12~24 h 上调(图 2)。根是植物最先感知和响应逆境的部位,经 ABA 处理后,*OsMADS25* 表达量在根中增加的速度比地上部分要快(图 2)。结果表明,*OsMADS25* 受低温和 ABA 诱导表达上调,预示着 *OsMADS25* 可能参与响应 ABA 依赖的低温信号途径。

### 2.2 *OsMADS25* 提高水稻对低温的耐受性

*OsMADS25* 受低温诱导表明它可能参与低温逆境信号。为了鉴定 *OsMADS25* 在水稻中是否参与对低温耐受性的调节,本研究通过对 *OsMADS25* 过量表达的 T<sub>3</sub> 纯合株系中 *OsMADS25* 相对表达量的检测,选取 *OsMADS25* 相对表达量在转录水平上表达量高且差异显著的两个纯合株系 OE-1 和 OE-3 进行表型鉴定(图 3 B)。结果表明,在低温胁迫下,过表达株

系 OE-1 和 OE-3 的成活率分别比野生型 ZH11 高 53% 和 38% (图 3: A, C)。过表达株系极大的提高了水稻在低温下的成活率;且相对表达量高的株系 OE-1 的成活率显著高于 OE-3 (图 3: B, C),表明 *OsMADS25* 对低温的耐受性与相对表达量呈正相关。

### 2.3 *OsMADS25* 提高水稻对 ABA 的敏感性

*OsMADS25* 正调控水稻对低温的耐受性,且 *OsMADS25* 受 ABA 诱导表达上调,表明 *OsMADS25* 可能参与 ABA 依赖的低温信号途径。为探究 *OsMADS25* 是否参与 ABA 信号,本研究对 *OsMADS25* 过表达株系(OE-1 和 OE-3)及野生型 ZH11 进行 ABA 敏感性测试。结果表明:在 5 μmol/L 和 10 μmol/L 的 ABA 处理后,*OsMADS25* 过表达株系都表现为苗长都显著比 ZH11 矮 14% 和 6% 以上(图 4: C~F);而 *OsMADS25* 过表达株系与野生型 ZH11 在正常条件下无显著差异(图 4: A, B)。*OsMADS25* 过表达株系幼苗的生长受 ABA 抑制比野生型 ZH11 更强,这表明 *OsMADS25* 提高水稻对 ABA 的敏感性,预示了 *OsMADS25* 可能参与 ABA 依赖的低温逆境信号。

### 2.4 *OsMADS25* 上调低温响应相关基因

低温逆境下,植物通过提高抵御渗透胁迫和清除 ROS 的能力来应对逆境胁迫<sup>[28]</sup>。本研究利用 qRT-PCR 检测了在低温逆境中参与渗透胁迫、清除 ROS 的相关基因在 *OsMADS25* 过表达转基因株系的表达情况。结果表明, *LTG1*、*OsDREB6* 和 *OsTPP1* 表达上调(图 5)。*LTG1* 影响生长素运输、合成和信号传导,正调控水稻在营养生长期的低温耐受能力<sup>[15]</sup>。*OsDREB6* 影响渗透物质和 ROS 的积累,正向调控水稻对低温胁迫的耐受性<sup>[29]</sup>。*OsTPP1* 过表达株系,提高水稻海藻糖的含量,调节渗透压,进而使水稻对多种胁迫产生抗性<sup>[30-32]</sup>。这些结果表明:*OsMADS25* 可能通过上调 *LTG1*、*OsDREB6* 和 *OsTPP1* 的表达,进而提高水稻耐低温的能力。

### 2.5 *OsMADS25* 提高水稻对活性氧的清除能力

*OsMADS25* 上调 *OsDREB6* 的表达(图 5),而 *OsDREB6* 在逆境中发挥清除 ROS 的功能。另外,

Xu 等<sup>[26]</sup>报道 *OsMADS25* 通过激活下游基因谷胱甘肽转移酶 4 (glutathione S-transferase 4, *OsGST4*)和

*OsP5CR* 的表达,进而提高水稻在盐处理下清除 ROS 以及提高应对渗透胁迫的能力。那么 *OsMADS25* 参

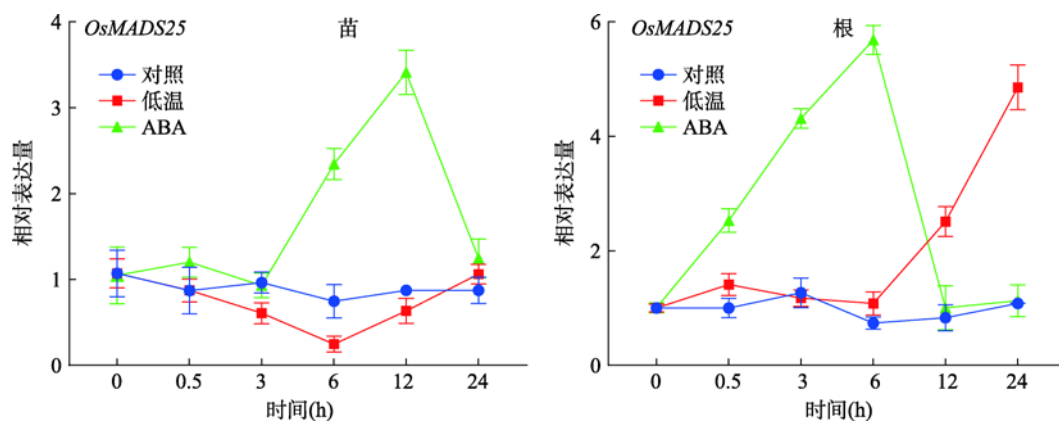


图 2 野生型 ZH11 中 *OsMADS25* 受低温和 ABA 诱导表达上调

Fig. 2 *OsMADS25* was up-regulated by cold stress and ABA treatment in wild-type ZH11

对照: 两周龄的野生型 ZH11 在温室正常条件下培养; 低温: 两周龄的野生型 ZH11 在 4℃ 光照培养箱处理; ABA: 两周龄的野生型 ZH11 用含 100 μmol/L ABA 的 IRRI 营养液处理。

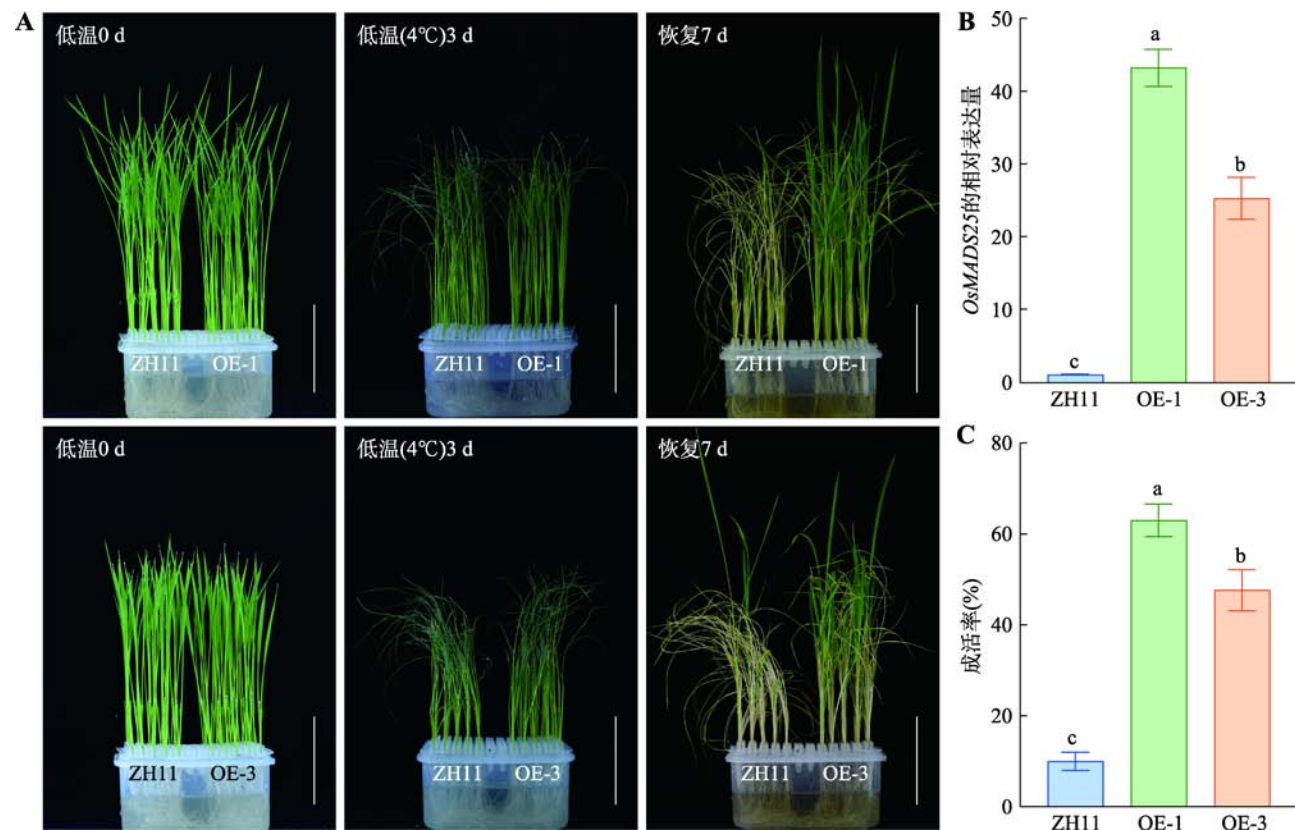


图 3 *OsMADS25* 提高水稻对低温的耐受性

Fig. 3 Overexpression *OsMADS25* improved rice tolerance to cold stress

A: 低温(4℃)处理 *OsMADS25* 过表达株系及野生型对照 ZH11。OE-1、OE-3 为 *OsMADS25* 过表达 T<sub>3</sub> 代的两个纯合株系; 比例尺: 5 cm。  
B: *OsMADS25* 过表达株系中 *OsMADS25* 在转录水平上的相对表达量。C: 转基因株系成活率统计。统计分析采用 SNK-q 单因素多重比较分析, 不同的字母表示具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

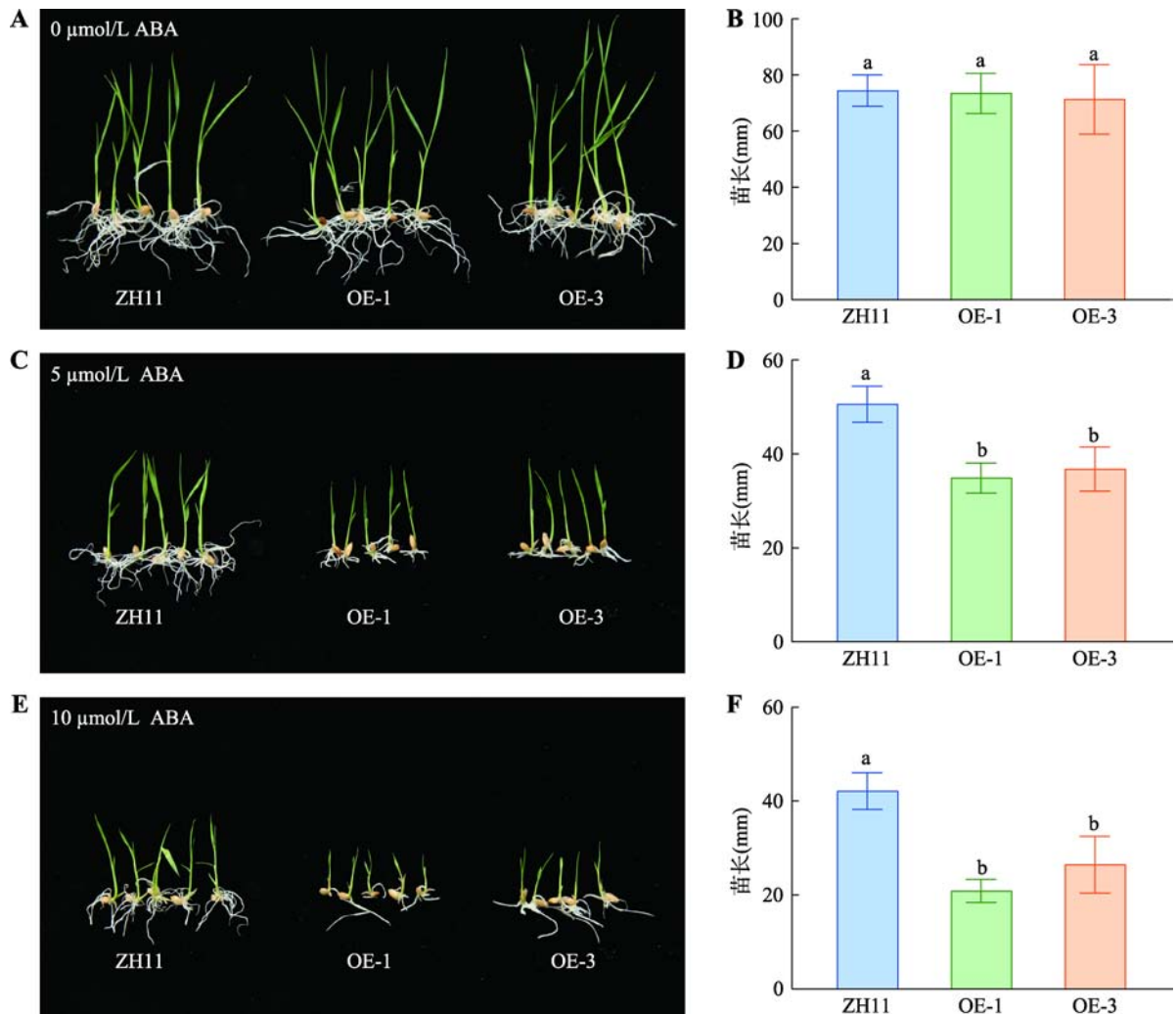


图 4 *OsMADS25* 过表达株系幼苗的生长受 ABA 抑制比野生型 ZH11 更强

**Fig. 4** The growth rates of *OsMADS25* overexpression lines are slower than the wild-type ZH11

A, B: 0  $\mu\text{mol/L}$  ABA 处理 *OsMADS25* 过表达株系与野生型 ZH11 并在 10 d 后统计苗长; C, D: 5  $\mu\text{mol/L}$  ABA 处理 *OsMADS25* 过表达株系与野生型 ZH11 并在 10 d 后统计苗长; E, F: 10  $\mu\text{mol/L}$  ABA 处理 *OsMADS25* 过表达株系与野生型 ZH11 并在 10 d 后统计苗长。OE-1、OE-3 为 *OsMADS25* 过表达  $T_3$  代的两个纯合株系; 统计分析采用 SNK-q 单因素多重比较分析, 不同的字母表示具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

与低温逆境是否与耐盐有相似的生理机制? 为了进一步探讨 *OsMADS25* 参与低温逆境的生理机制, 本研究对 *OsMADS25* 转基因株系及野生型 ZH11 对照在低温 ( $4^\circ\text{C}$ ) 处理 6 h 后, 进行 DAB 和 NBT 染色, 检测叶片中  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{O}_2^-$  的含量。结果表明: 野生型 ZH11 的叶片染色深, 而转基因株系 OE-1、OE-3 的叶片染色浅 (图 6), 说明转基因株系中积累的活性氧  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{O}_2^-$  的含量比 ZH11 少, 由此说明 *OsMADS25* 可能通过提高水稻在低温下对 ROS 的清除能力进而提高对低温的耐受性。

### 3 讨论

*OsMADS25* (LOC\_Os04g23910) 在水稻 4 号染色体 13.6 Mb 位置上, 与 Schläppi 等<sup>[5]</sup>利用全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 定位的水稻微核心种质资源群体 (Minicore) 苗期耐低温 QTL 的 *qLTSS4-1* 位置重叠。过表达 *OsMADS25* 提高了水稻对低温的耐受性, 说明 *OsMADS25* 可能是耐低温 QTL *qLTSS4-1* 的主效基因。

*OsMADS25* 过表达转基因的  $T_3$  代纯合株系

OE-1 的表达量高于 OE-3, 对低温的耐受性也是 OE-1 高于株系 OE-3, 这表明 *OsMADS25* 正调控水

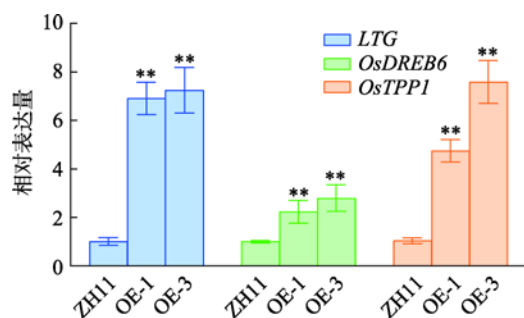


图 5 *OsMADS25* 过表达株系提高耐低温相关基因的表达

Fig. 5 Cold tolerance genes were up-regulated in *OsMADS25* overexpression lines

ZH11 为野生型对照; OE-1、OE-3 为 *OsMADS25* 过表达 T<sub>3</sub> 代的两个纯合株系; 统计方法为 *t*-test; \*\**P* < 0.01, 差异极显著。

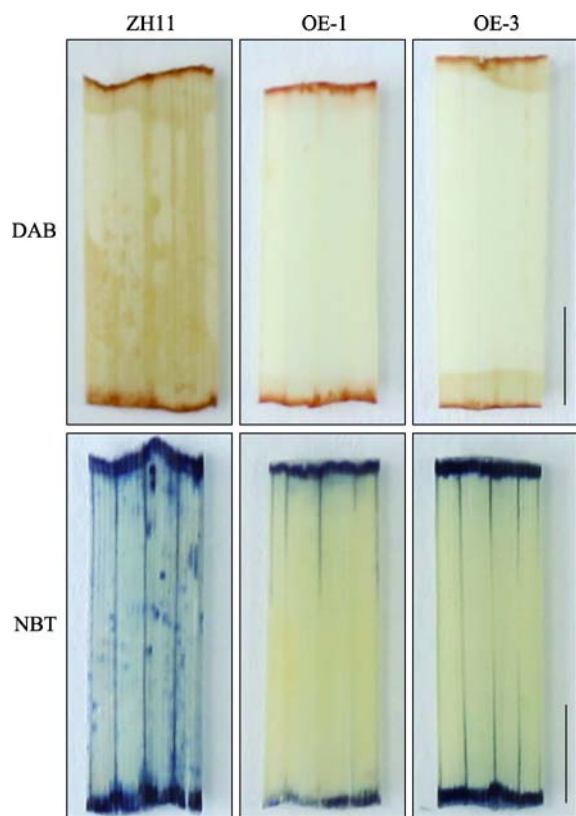


图 6 *OsMADS25* 提高水稻对 ROS 的清除能力

Fig. 6 *OsMADS25* improved rice ability of scavenging reactive oxygen species (ROS)

DAB 染色表示植物在低温处理后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累情况, NBT 染色表示植物在低温处理后 O<sub>2</sub> 的积累情况。ZH11 为野生型对照; OE-1, OE-3 为 *OsMADS25* 过表达 T<sub>3</sub> 代的两个纯合株系; 比例尺: 5 mm。

稻对低温的耐受性。*OsMADS25* 受低温和 ABA 诱导表达上调(图 2), *OsMADS25* 转基因株系提高了水稻对 ABA 的敏感性(图 4), *OsMADS25* 下游调控基因 *OsTPP1*、*OsDREB6* 受 ABA 诱导表达上调<sup>[29,31]</sup>。这些结果表明: *OsMADS25* 参与 ABA 依赖的低温逆境信号。低温处理后, *OsMADS25* 转基因株系 NBT 和 DAB 染色浅, ROS 积累少, 对低温耐受性强。Xu 等<sup>[26]</sup>报道 *OsMADS25* 通过提高水稻在盐逆境下对 ROS 的清除能力, 从而提高水稻的耐盐性。另外, *OsMADS25* 的另一下游调控基因 *OsTPP1*, 在逆境具有调节渗透压的作用<sup>[30~32]</sup>。这说明 *OsMADS25* 在低温逆境下可能通过调控 *OsTPP1* 的表达, 进而调节渗透压, 提高水稻对低温的耐受性。这表明 *OsMADS25* 在耐盐和耐低温有相似的生理机制。综上所述, 低温逆境时, 转录因子 *OsMADS25* 响应 ABA 信号, 通过调节 *OsDREB6* 的表达, 进而提高水稻对 ROS 的清除能力; 同时, 通过调节 *OsTPP1* 的表达, 进而调节渗透压, 降低低温对水稻的伤害(图 7)。*OsMADS25* 是一个耐低温新的基因, 其功能的鉴定对于丰富水稻耐低温基因资源, 以及培育耐低温水稻新品种具有一定的意义。

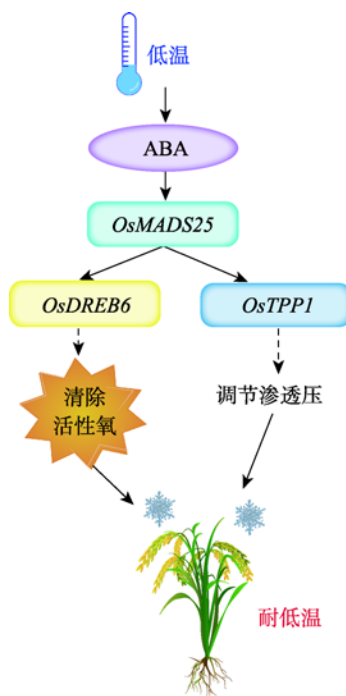


图 7 *OsMADS25* 提高水稻耐低温的可能机制

Fig. 7 The proposed molecular mechanism underlying *OsMADS25* tolerance to cold stress



## 参考文献(References):

- [1] Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, Hettel GP. Rice almanac: source book for the most important economic activity on earth (3rd edition). Oxon, U.K.: CABI Pub., 2002. [DOI]
- [2] Gross BL, Zhao ZJ. Archaeological and genetic insights into the origins of domesticated rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(17): 6190–6197. [DOI]
- [3] Zhang ZY, Li JJ, Pan YH, Li JL, Zhou L, Shi HL, Zeng YW, Guo HF, Yang SM, Zheng WW, Yu JP, Sun XM, Li GL, Ding YL, Ma L, Shen SQ, Dai LY, Zhang HL, Yang SH, Guo Y, Li ZC. Natural variation in *CTB4a* enhances rice adaptation to cold habitats. *Nat Commun*, 2017, 8: 14788. [DOI]
- [4] Wang D, Liu JL, Li CG, Kang HX, Wang Y, Tan XQ, Liu MH, Deng YF, Wang ZL, Liu Y, Zhang DY, Xiao YH, Wang GL. Genome-wide association mapping of cold tolerance genes at the seedling stage in rice. *Rice*, 2016, 9(1): 61. [DOI]
- [5] Schläppi MR, Jackson AK, Eizenga GC, Wang AJ, Chu CC, Shi Y, Shimoyama N, Boykin DL. Assessment of five chilling tolerance traits and GWAS mapping in rice using the USDA Mini-Core collection. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 957. [DOI]
- [6] Zhao JL, Zhang SH, Yang TF, Zeng ZC, Huang ZH, Liu Q, Wang XF, Leach J, Leung H, Liu B. Global transcriptional profiling of a cold-tolerant rice variety under moderate cold stress reveals different cold stress response mechanisms. *Physiol Plant*, 2015, 154(3): 381–394. [DOI]
- [7] Pan YH, Zhang HL, Zhang DL, Li JJ, Xiong HY, Yu JP, Li JL, Rashid MAR, Li GL, Ma XD, Cao GL, Han LZ, Li ZC. Genetic analysis of cold tolerance at the germination and booting stages in rice by association mapping. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120590. [DOI]
- [8] Zhu YJ, Chen K, Mi XF, Chen TX, Ali J, Ye GY, Xu JL, Li ZK. Identification and fine mapping of a stably expressed QTL for cold tolerance at the booting stage using an interconnected breeding population in rice. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145704. [DOI]
- [9] Fujino K, Sekiguchi H, Matsuda Y, Sugimoto K, Ono K, Yano M. Molecular identification of a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(34): 12623–12628. [DOI]
- [10] Liu CT, Schläppi MR, Mao BG, Wang W, Wang AJ, Chu CC. The bZIP73 transcription factor controls rice cold tolerance at the reproductive stage. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(9): 1834–1849. [DOI]
- [11] Ma Y, Dai XY, Xu YY, Luo W, Zheng XM, Zeng DL, Pan YJ, Lin XL, Liu HH, Zhang DJ, Xiao J, Guo XY, Xu SJ, Niu YD, Jin JB, Zhang H, Xu X, Li LG, Wang W, Qian Q, Ge S, Chong K. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 2015, 160(6): 1209–1221. [DOI]
- [12] Zhao JL, Zhang SH, Dong JF, Yang TF, Mao XX, Liu Q, Wang XF, Liu B. A novel functional gene associated with cold tolerance at the seedling stage in rice. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(9): 1141–1148. [DOI]
- [13] Kim SI, Andaya VC, Tai TH. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2. *Biochem J*, 2011, 435(2): 373–380. [DOI]
- [14] Mao DH, Xin YY, Tan YJ, Hu XJ, Bai JJ, Liu ZY, Yu YL, Li LY, Peng C, Fan T, Zhu YX, Guo YL, Wang SH, Lu DP, Xing YZ, Yuan LP, Chen CY. Natural variation in the *HAN1* gene confers chilling tolerance in rice and allowed adaptation to a temperate climate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(9): 3494–3501. [DOI]
- [15] Lu GW, Wu FQ, Wu WX, Wang HJ, Zheng XM, Zhang YH, Chen XL, Zhou KN, Jin MN, Cheng ZJ, Li XY, Jiang L, Wang HY, Wan JM. Rice *LTG1* is involved in adaptive growth and fitness under low ambient temperature. *Plant J*, 2014, 78(3): 468–480. [DOI]
- [16] Saito K, Hayano-Saito Y, Kuroki M, Sato Y. Map-based cloning of the rice cold tolerance gene *Ctb1*. *Plant Sci*, 2010, 179(1-2): 97–102. [DOI]
- [17] Liu CT, Ou SJ, Mao BG, Tang JY, Wang W, Wang HR, Cao SY, Schläppi MR, Zhao BR, Xiao GY, Wang XP, Chu CC. Early selection of *bZIP73* facilitated adaptation of *japonica* rice to cold climates. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3302. [DOI]
- [18] Xiao N, Gao Y, Qian HJ, Gao Q, Wu YY, Zhang DP, Wang Z, Zhang XX, Yu L, Li YH, Pan CH, Liu GQ, Zhou CH, Jiang M, Huang NS, Dai ZY, Liang CZ, Chen Z, Chen JM, Li AH. Identification of genes related to cold tolerance and a functional allele that confers cold tolerance. *Plant Physiol*, 2018, 177(3): 1108–1123. [DOI]
- [19] Yang SJ, Vanderbeld B, Wan JX, Huang YF. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol Plant*, 2010, 3(3): 469–490. [DOI]
- [20] Seo E, Lee H, Jeon J, Park H, Kim J, Noh YS, Lee I. Crosstalk between cold response and flowering in *Arabidopsis* is mediated through the flowering-time gene

- SOC1* and its upstream negative regulator *FLC*. *Plant Cell*, 2009, 21(10): 3185–3197. [DOI]
- [21] Yu LH, Wu J, Zhang ZS, Miao ZQ, Zhao PX, Wang Z, Xiang CB. *Arabidopsis* MADS-box transcription factor AGL21 acts as environmental surveillance of seed germination by regulating *ABI5* expression. *Mol Plant*, 2017, 10(6): 834–845. [DOI]
- [22] Wei B, Cai T, Zhang RZ, Li AL, Huo NX, Li S, Gu YQ, Vogel J, Jia JZ, Qi YJ, Mao L. Novel microRNAs uncovered by deep sequencing of small RNA transcriptomes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Funct Integr Genomics*, 2009, 9(4): 499–511. [DOI]
- [23] Khong GN, Pati PK, Richaud F, Parizot B, Bidzinski P, Mai CD, Bès M, Bourrié I, Meynard D, Beeckman T, Selvaraj MG, Manabu I, Genga AM, Brugidou C, Nang Do V, Guiderdoni E, Morel JB, Gantet P. *OsMADS26* negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice. *Plant Physiol*, 2015, 169(4): 2935–2949. [DOI]
- [24] Chen C, Begcy K, Liu K, Folsom JJ, Wang Z, Zhang C, Walia H. Heat stress yields a unique MADS box transcription factor in determining seed size and thermal sensitivity. *Plant Physiol*, 2016, 171(1): 606–622. [DOI]
- [25] Zhang GP, Xu N, Chen HL, Wang GX, Huang JL. *OsMADS25* regulates root system development via auxin signalling in rice. *Plant J*, 2018, 95(6): 1004–1022. [DOI]
- [26] Xu N, Chu YL, Chen HL, Li XX, Wu Q, Jin L, Wang GX, Huang JL. Rice transcription factor *OsMADS25* modulates root growth and confers salinity tolerance via the ABA-mediated regulatory pathway and ROS scavenging. *PLoS Genet*, 2018, 14(10): e1007662. [DOI]
- [27] Yu CY, Liu YH, Zhang AD, Su S, Yan A, Huang LL, Ali I, Liu Y, Forde BG, Gan YB. MADS-box transcription factor *OsMADS25* regulates root development through affection of nitrate accumulation in rice. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135196. [DOI]
- [28] Liu CT, Wang W, Mao BG, Chu CC. Cold stress tolerance in rice: physiological changes, molecular mechanism, and future prospects. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(3): 171–185. 刘次桃, 王威, 毛毕刚, 储成才. 水稻耐低温逆境研究: 分子生理机制及育种展望. 遗传, 2018, 40(3): 171–185. [DOI]
- [29] Ke YG, Yang ZJ, Yu SW, Li TF, Wu JH, Gao H, Fu YP, Luo LJ. Characterization of *OsDREB6* responsive to osmotic and cold stresses in rice. *J Plant Biol*, 2014, 57(3): 150–161. [DOI]
- [30] Habibur Rahman Pramanik M, Imai R. Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(6): 751–762. [DOI]
- [31] Ge LF, Chao DY, Shi M, Zhu MZ, Gao JP, Lin HX. 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. [DOI]
- [32] Zhang ZY, Li JH, Li F, Liu HH, Yang WS, Chong K, Xu YY. *OsMAPK3* phosphorylates *OsBHLH002/OsICE1* and inhibits its ubiquitination to activate *OsTPP1* and enhances rice chilling tolerance. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 731–743.e5. [DOI]

(责任编辑: 储成才)