



## 利用低温水浴鉴定水稻苗期耐寒性

刘栋峰, 唐永严, 雒胜韬, 罗伟, 李志涛, 种康, 徐云远\*

中国科学院植物研究所, 植物分子生理学重点实验室, 北京 100093

**摘要** 高效准确鉴定苗期耐寒性是水稻(*Oryza sativa*)耐寒研究的前提。基于流动水浴温度均一这一特性, 建立了一种恒温水浴鉴定水稻幼苗耐寒性方法。该方法中环境温度设定为20°C, 水浴温度设定为4°C。根据对2个水稻亚种不同材料的处理结果, 总结出几种常见品种的低温处理时间与存活率参考值, 并对操作过程中的一些注意事项进行了说明。

**关键词** 水稻, 苗期, 耐寒, 低温水浴

刘栋峰, 唐永严, 雒胜韬, 罗伟, 李志涛, 种康, 徐云远 (2019). 利用低温水浴鉴定水稻苗期耐寒性. 植物学报 54, 509–514.

低温是水稻(*Oryza sativa*)生产的一个重要限制因子, 我国的稻作区均会遭遇不同程度的低温冷害。苗期是水稻易遭受低温冷害的生长发育时期之一。在水稻苗期耐寒表型鉴定中, 鲜重、存活率、叶片枯萎度、酶活性和特定代谢物含量等常作为重要指标。Andaya和Tai (2006)根据水稻三叶期幼苗9°C下连续处理8–16天, 叶片的枯萎程度和死亡情况, 将水稻的耐寒性分成1–9级。Bonnecarrère等(2011)对水稻三叶期幼苗在10°C人工气候室中进行冷处理, 之后测定不同时间点叶片中SOD (superoxide dismutase)、APX (ascorbate peroxidase)和CAT (catalase)等抗氧化酶活性来评价不同材料的耐寒性。Zhang等(2011)则在4°C人工气候室处理四叶期水稻幼苗, 恢复后统计存活率进而评价其耐寒性。

在人工气候室或培养箱中进行低温处理, 往往存在处理空间内温度均一性较差的问题, 导致处理结果不稳定。结合多年实践, 我们建立了一种操作简单、条件稳定且准确规范的水稻苗期耐寒鉴定方法。该方法以三叶期水稻幼苗为处理对象, 将生长点和根部浸入4°C水浴处理一定时间, 恢复生长后以存活率作为鉴定标准。

### 1 实验材料

粳稻(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*/geng): 中花

10号(ZH10)、空育131 (KY131)、Hwayoung (HY)、Kitaake、日本晴(NIP)、Dongjin (DJ)和越冬稻(YD); 籼稻(*Oryza sativa* L. subsp. *indica*/xian): 广陆矮4号 (GLA4)、浙辐802 (ZF802)、IR64、明恢86 (MH86)和93-11; 以及*Ubi::COLD1* (Ma et al., 2015)的转基因材料OX8。以上种子均由本课题组保存。

### 2 试剂配方

实验中培养幼苗选用木村B培养液(Baba and Takahashi, 1956)或Yoshida营养液(Yoshida et al., 1976)。

### 3 仪器设备

实验选用水浴体积(长×宽×深)为92 cm×52 cm×37 cm的高精度低温水浴箱(北京远洋东方科技发展有限公司)。湿度测定使用HT-853型湿度计(宏诚科技)。光合作用光子通量密度测定使用UPRtek PG100N手持式植物生长照明检测仪(群耀科技)。光源选用Philips公司生产的GreenPower TLED DR/W/FR (用于水稻幼苗培养)和GreenPower LED DR/B (用于冷处理过程中光照)。水温和室温检测选用testo 175T3温度记录仪, 并用Testo Comfort Software软件导出和分析数据。

收稿日期: 2019-05-29; 接受日期: 2019-06-11

\* 通讯作者。E-mail: xuyy@ibcas.ac.cn

## 4 实验程序

### 4.1 水稻幼苗培养方法

将水稻种子置于牛皮纸袋中, 28–30°C浸种约48小时后取出, 继续在28–30°C催芽24小时至萌发露白(图1A)。挑选萌发状态一致的种子, 胚端朝上, 直立放置于切除底部的96孔PCR板中(图1B), 并置于木村B培养液中培养水稻幼苗(图1C)。环境条件: 光照强度为 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 温度为28°C/25°C (白天/夜晚), 光周期为10小时光照/14小时黑暗, 相对湿度60%–70%。期间每3天更换1次培养液, 直至幼苗发育到三叶期(约需15天), 待用。

### 4.2 低温处理

将水浴箱温度设定为4.0°C, 利用温度记录仪, 每5分钟记录1次温度变化, 使24小时内4个不同部位温度基本恒定在3.8–4.1°C之间(图2A)。

将带有幼苗的96孔板水平固定在有机玻璃支架上(图2B, C)。调整水深, 使之淹没幼苗地上部约3

cm, 以保证茎尖生长点完全浸入冷水中(图2D)。处理过程中, 由于每个96孔板都被卡定在有机玻璃架上, 故保证了所有幼苗淹没的深度一致。依据处理材料的遗传背景, 选择合适的4°C处理时间。

处理期间, 室内环境条件: 光照强度为 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 温度(20±2)°C, 相对湿度55%–65%, 光周期10小时光照/14小时黑暗。此期间弱光有助于控制环境温度。

### 4.3 耐寒表型数据统计

将处理后的材料转移至幼苗培养条件下, 恢复生长1–2周, 统计存活率(存活率=(存活的幼苗数/总幼苗数)×100%)。判断幼苗死亡的标准为恢复生长后, 心叶(最新生长出的叶子)是否枯黄。每份材料每次鉴定需要30棵以上生长一致的幼苗, 并且至少进行3次重复。

本方法中低温水浴箱水浴面积较大(0.5 m<sup>2</sup>), 可同时放置42块96孔板, 容纳4 032株苗(图2), 对于群体筛选耐寒株系十分高效。

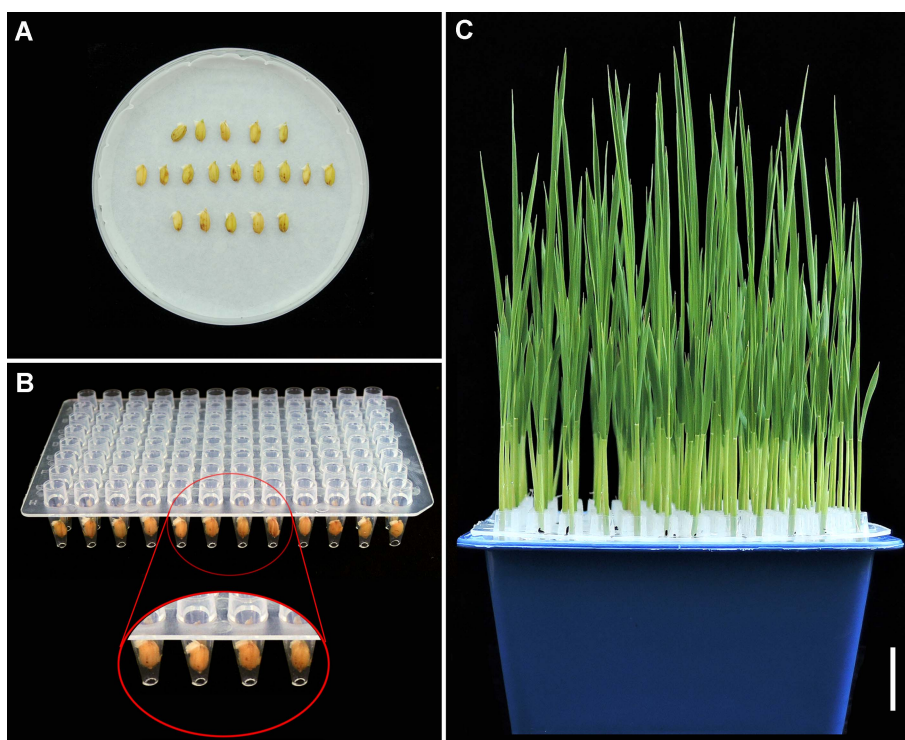


图1 水稻种子萌发、播种和幼苗培养方式

(A) 水稻种子萌发状态; (B) 萌发种子在96孔板上的放置方式; (C) 三叶期幼苗(Bar=2 cm)

Figure 1 Germination and sowing of rice seeds, and the way of seedling culture

(A) Germination of rice seeds; (B) Placement of germination seeds in 96-well plates without bottom; (C) Trefoil stage seedlings (Bar=2 cm)

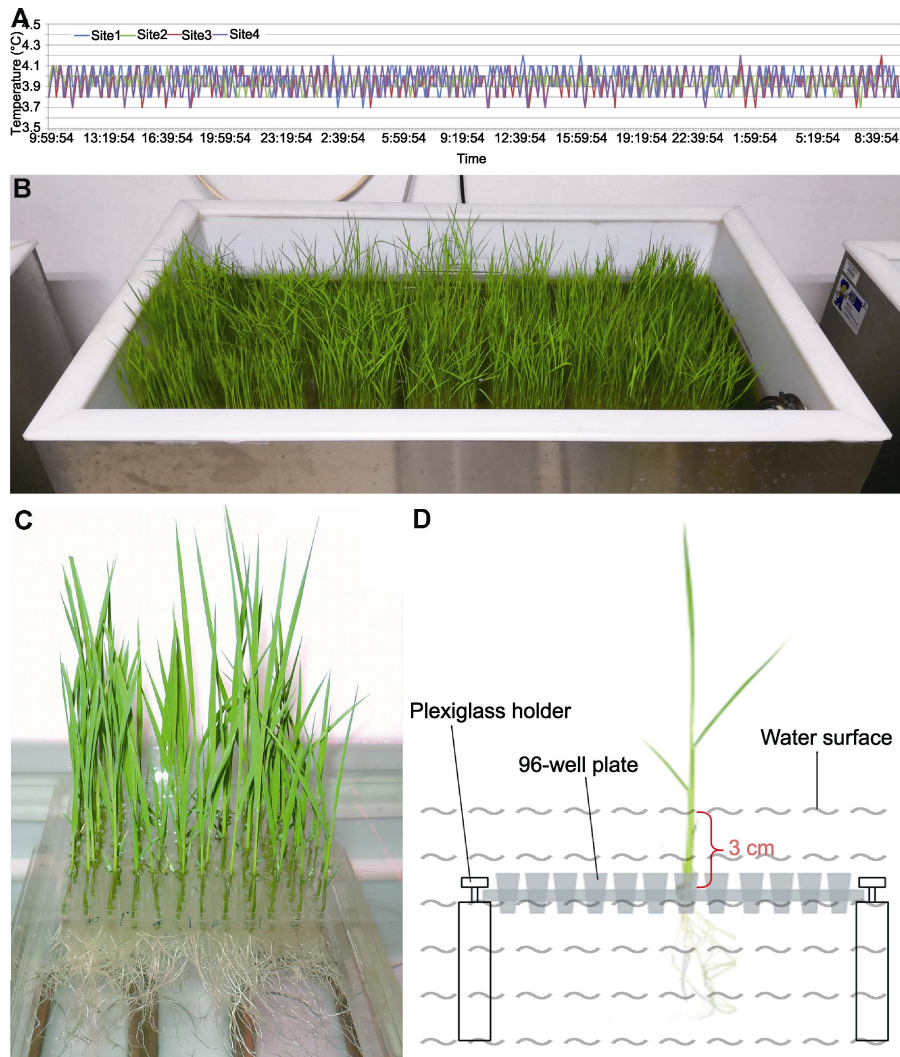


图2 幼苗低温水浴处理示意图

(A) 水浴箱24小时内温度检测结果; (B) 低温水浴箱冷处理三叶期幼苗; (C) 幼苗在低温水浴箱中放置局部放大图; (D) 低温水浴箱中幼苗放置和固定方式

Figure 2 The diagram of low temperature water bath treatment of rice seedlings

(A) The temperature of water bath within 24 h; (B) Seedlings under chilling treatment in 4°C water bath; (C) Partially enlarged detail of the seedlings in the cold water bath tank; (D) A diagram of the fixation pattern of seedlings in cold water bath

## 5 注意事项

### 5.1 温度的均一性

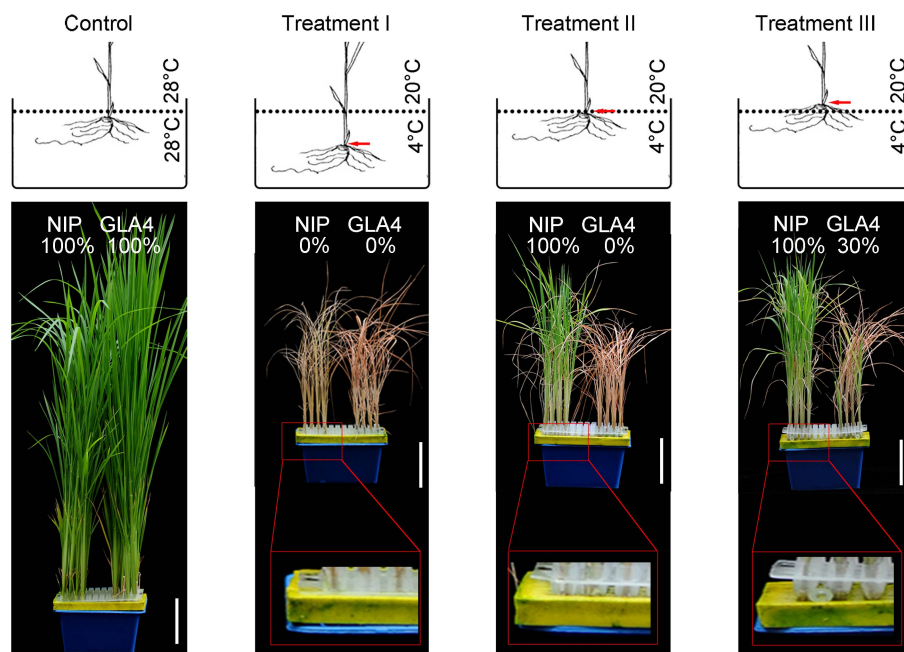
根据恒温水浴锅的工作原理、借助小型水泵及有机玻璃支架的固定作用, 实现“水在动、苗固定”。基于这一思路, 我们设计制作了此款可精确控温的水浴箱。当水浴箱环境温度为18–22°C时, 如果水浴温度设定为4°C, 实测温度则为3.7–4.1°C (大部分时间为

3.8–4.1°C)。

根据我们的实验, 水箱内放置2个60瓦的小水泵, 很容易达到箱内温度均一性的要求(图2A)。如果增大水面, 可适当考虑增加水泵数量。当然小型水浴锅只要温度恒定, 也能满足表型鉴定要求, 但不适于批量筛选。

### 5.2 处理部位

生产实践中, 尽管水稻幼苗叶片首先遭遇环境低温伤



**图3** 冷水淹没深度对水稻低温耐受性的影响

红色箭头指示茎尖生长点的位置, 该部位在处理I、II和III中分别处于水深的不同位置(虚线为水面)。图中百分数表示恢复生长7天后幼苗的存活率。以28°C水浴作为对照(左图)。Bars=6 cm

**Figure 3** Effect of submerged depth of cold water on low temperature tolerance of rice

Red arrow indicated the site of shoot apical meristem under different water depth in chilling treatment I, II and III. Dotted lines represent the water surface. The survival rates were indicated on the top of the seedlings recovered for 7 days. Treatment with 28°C water was used as control (left). Bars=6 cm

害, 但茎尖分生组织是否受到伤害是决定其存活的关键点。为了确定浸入低温水浴幼苗的合适组织部位, 我们以粳稻NIP和籼稻GLA4为材料, 探索了不同冷水淹没深度对幼苗存活率的影响(图3)。处理I, 淹没地上部3 cm, 此时茎尖生长点已完全浸入水浴中; 处理II, 幼苗茎尖生长点基本与液面平齐; 处理III, 地上部悬空在液面之上。经过144小时(全致死的处理时间, 见后)低温处理, 恢复生长7天后, NIP在3种处理条件下的存活率分别为0%、100%和100%, GLA4在3种处理条件下的存活率分别为0%、0%和30% (图3)。可以看出冷水淹没位置对幼苗存活率的影响十分明显, 因此, 建议选择冷水淹没幼苗地上部分3 cm作为可控深度。

### 5.3 处理与恢复时间

粳、籼稻之间的耐寒性差别十分明显, 对于耐寒性差别不突出的同一亚种内不同品种就需适当调整处理时间, 也可通过设定冷处理时间梯度, 来达到最佳耐

寒性鉴定效果。例如, 经4°C水浴处理96小时, 恢复7天后, 粳稻DJ和NIP的存活率分别为20%与80%, 而与其同时处理的籼稻MH86全部死亡(图4A)。结合我们对水稻苗期耐寒筛选的经验, 总结了几种常用材料的处理条件和存活率, 详见表2。

低温处理后恢复时间如果较短时, 一些“伤而未死”的植株新叶尚未长出, 会直接影响统计结果, 所以建议恢复生长的时间可适当延长。例如, 恢复生长50天, 存活的幼苗会十分明显, 便于观察统计(图4B)。

### 5.4 光照条件

实际工作中, 我们也注意到幼苗的生长状态直接影响鉴定结果。例如, 较弱光强下培养的幼苗其耐冷性明显要弱。因此, 在选择处理时间时需要结合光照条件适当调整。同一批材料的筛选与鉴定, 一定要用恒定的培养条件。培养过程中, 除避免病害侵染和非生物胁迫反应等发生外, 还要避免幼苗转移过程中遭遇极



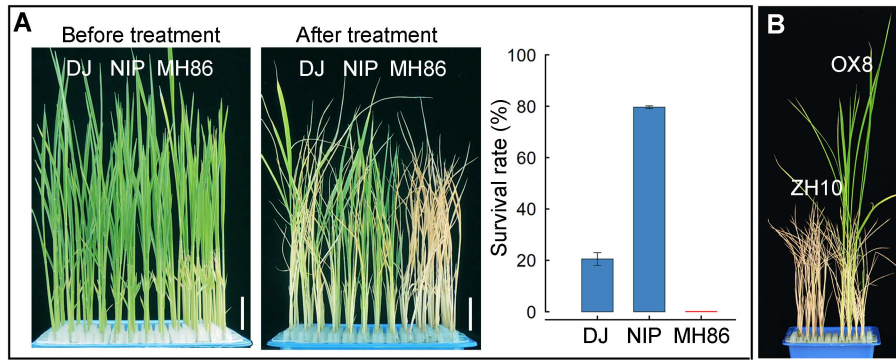


图4 不同水稻材料的苗期耐寒鉴定结果

(A) Dongjin (DJ)、日本晴(NIP)和明恢86 (MH86)幼苗4°C处理96小时并恢复7天(28°C)后的表型及存活率(平均值±标准差,  $n \geq 30$ , 3次重复); (B) ZH10和OX8低温处理(28°C)后恢复50天28°C的表型。Bars=2 cm

Figure 4 The evaluation of cold tolerance for different rice varieties at seedling stage

(A) Phenotypic response to chilling in DJ, NIP and MH86, the survival rate was determined after cold-water treatment at 4°C for 96 h and subsequent recovery at 28°C for 7 days (means±SD,  $n \geq 30$ , three replicates); (B) The phenotype for seedlings of ZH10 and OX8 after the chilling treatment at 4°C for 120 h, subsequently at 28°C for 50 days. Bars=2 cm

表2 籼稻和粳稻常见品种苗期不同存活率的建议处理时间

Table 2 The recommended treatment time for different survival rates of cultivars of *indical/xian* and *japonical/geng*

Subspecies	Cultivars	Survival rate (>50%)	Survival rate (<10%)
<i>japonical/geng</i>	KY131, Kitaake	60–80 h	96–120 h
	DJ, HY	72–84 h	120–144 h
	ZH10, NIP	72–96 h	120–144 h
	YD	96–144 h	168–192 h
<i>indical/xian</i>	ZF802, GLA4, IR64	12–28 h	40–60 h
	93-11, MH86	24–40 h	48–60 h

端温度, 防止幼苗产生应激反应影响处理结果。总之, 保持幼苗生长状态一致及维持水温恒定是获得准确可重复结果的前提。

## 参考文献

- Andaya VC, Tai TH (2006). Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theor Appl Genet* **113**, 467–475.
- Baba S, Takahashi Y (1956). Water and sand culture. In:

Togari Y, Matsuo T, Hatamari M, Yamada N, Horada T, Suzuki N, eds. *Sakumotsi-Shiken-ho (Laboratory Manual in Crop Science)*. Kyokai, Tokyo: Nogyo-Gijitsu. pp. 157–185.

Bonnecarrère V, Borsani O, Díaz P, Capdevielle F, Blanco P, Monza J (2011). Response to photooxidative stress induced by cold in *japonica* rice is genotype dependent. *Plant Sci* **180**, 726–732.

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 (2015). *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell* **160**, 1209–1221.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976). *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. Las Banos, Laguna: IRRI. pp. 62.

Zhang X, Guo XP, Lei CL, Cheng ZJ, Lin QB, Wang JL, Wu FQ, Wang J, Wan JM (2011). Overexpression of *SICZFP1*, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato, confers enhanced cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol Rep* **29**, 185–196.

## Identification of Chilling Tolerance of Rice Seedlings by Cold Water Bath

Dongfeng Liu, Yongyan Tang, Shengtao Luo, Wei Luo, Zhitao Li, Kang Chong, Yunyuan Xu<sup>\*</sup>

Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

**Abstract** The premise of studies on rice chilling tolerance is to find an efficient and accurate way to evaluate chilling tolerance of rice seedling. In this study, we developed an efficient technology to evaluate the cold tolerance at seedling stage by using a constant temperature water bath, based on the characteristics of excellent temperature uniformity for circulation of water. In this method, the setting temperature of environment temperature and water bath was 20°C and 4°C, respectively. From the results of two subspecies (*indica/xian* and *japonica/geng*), we summarized the reference treatment time for different survival rate of cultivars. Some attention to the cold treatment procedure was also discussed.

**Key words** rice, seedling, cold tolerance, low temperature water bath

**Liu DF, Tang YY, Luo ST, Luo W, Li ZT, Chong K, Xu YY** (2019). Identification of chilling tolerance of rice seedlings by cold water bath. *Chin Bull Bot* **54**, 509–514.

---

\* Author for correspondence. E-mail: xuyy@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)