

赤霉素(GA₃)和脱落酸(ABA)对不同水稻品种生长和生理特性及GA20ox2、GA3ox2 基因表达的影响

杨艳华 张亚东 朱 镇 赵 凌 陈 涛 赵庆勇 王才林*
(江苏省农业科学院 粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心/国家水稻改良中心南京分中心, 江苏 南京 210014; * 通讯联系人, E-mail: clwang@jaas.ac.cn)

Effects of Gibberellic Acid 3 and Absciscic Acid on Growth, Physiological Characteristics and Gene Expression of GA20ox2 and GA3ox2 in Different Rice Cultivars

YANG Yan-hua, ZHANG Ya-dong, ZHU Zhen, ZHAO Ling, CHEN Tao, ZHAO Qing-yong, WANG Cai-lin*
(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu High Quality Rice R & D Center/Nanjing Branch of Chinese National Center for Rice Improvement, Nanjing 210014, China; * Corresponding author, E-mail: clwang@jaas.ac.cn)

YANG Yanhua, ZHANG Yadong, ZHU Zhen, et al. Effects of gibberellic acid 3 and absciscic acid on growth, physiological characteristics and gene expression of GA20ox2 and GA3ox2 in different rice cultivars. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(4): 433-437.
Abstract: Effects of exogenous gibberellic acid 3 (GA₃) and absciscic acid (ABA) on the growth, physiological characteristics and gene expression of GA20ox2 and GA3ox2 were studied at four-leaf stage with five rice cultivars. Results showed that 1 μmol/L GA₃ could promote seedling height, restrain root elongation, and increase the contents of chlorophyll and soluble protein, and permeability of cell membrane. However, 10 mg/L ABA could inhibit the seed germination heavily and also retard seedling height and decrease the contents of chlorophyll and soluble protein, and permeability of cell membrane. RT-PCR detection showed that the expression of GA20ox2 was obviously up-regulated under the GA₃ treatment, except for Nipponbare. On the contrary, ABA restrained the expression of GA20ox2. In the three rice cultivars, Nanjing 44, Kanto 194 and Nipponbare, GA₃ induced the expression of GA3ox2 and ABA inhibited the expression of GA3ox2.
Key words: rice; gibberellic acid; absciscic acid; dwarf gene; gene expression; growth; physiological traits

杨艳华, 张亚东, 朱 镇, 等. 赤霉素(GA₃)和脱落酸(ABA)对不同水稻品种生长和生理特性及 GA20ox2、GA3ox2 基因表达的影响. 中国水稻科学, 2010, 24(4): 433-437.
摘 要: 以 5 个水稻品种 4 叶 1 心期的幼苗为材料, 比较研究了 1 μmol/L GA₃ 和 10 mg/L ABA 处理对不同水稻品种生长发育、生理特性及基因表达的影响。结果表明, GA₃ 处理能够促进水稻地上部分伸长生长, 抑制根伸长生长; 同时, 5 个品种叶片的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量和细胞膜透性呈上升趋势。10 mg/L ABA 处理则严重抑制种子萌发和地上部伸长生长; 5 个品种叶片的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量和细胞膜透性则呈现下降趋势。用 RT-PCR 方法对 GA20ox2 和 GA3ox2 基因表达水平的变化进行检测, 结果表明 GA₃ 处理后, 日本晴 GA20ox2 基因表达略微下调, 其余 4 个品种的 GA20ox2 基因表达上调。ABA 处理抑制 GA20ox2 基因表达。GA3ox2 基因表达也受 GA₃ 和 ABA 调控。在南粳 44、关东 194 和日本晴中, GA₃ 诱导 GA3ox2 表达, ABA 显著抑制 GA3ox2 表达。
关键词: 水稻; 赤霉素; 脱落酸; 矮秆基因; 基因表达; 生长; 生理特性
中图分类号: Q943; Q945.31; S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7216(2010)04-0433-05

近年来,随着人口的不断增长和人民生活水平的提高,增加水稻产量、提升稻米品质成为人们日益关注的问题。赤霉素(有生理活性的为赤霉酸, gibberellic acid, GA)和脱落酸(absciscic acid, ABA)是调节植物生长发育的重要激素。其中,赤霉素是一种促进生长的植物激素,调节多种生理活动,包括种子萌发、茎秆伸长、叶片生长、花粉管生长、花和种子发育等^[1-4]。脱落酸是一种抑制生长的植物激素,主要作用是引起芽休眠、叶片脱落和抑制生长等,在种子休眠、萌发、气孔关闭、干旱、低温等非生物胁迫应答中起重要调控作用^[5]。GA20ox 和 GA3ox 位于赤霉素合成途径的节点,催化多步反应,能将 GA₁₂ 和 GA₅₃ 催化合成有生物活性的 GA₁ 和 GA₄。这些基因的表达受到有生物活性的 GA 的反馈和前馈调节^[6]。水稻半矮秆基因 *sdl* (GA20ox2) 和矮秆基因 *d18* (GA3ox2) 会引起植株矮化^[5, 7]。本研究初步探讨了 GA₃ 和 ABA 对水稻生长、生理特性及 GA20ox2 和 GA3ox2 基因表达模式的影响,旨在揭示 GA 和 ABA 影响水稻生长的原因及作用机理,并进一步从生理、基因表达水平上寻找原因,为外源激素合理、有效施用提供理论参考,为作物产量的提高提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用水稻材料为江苏省常规粳稻品种武育粳 3

收稿日期: 2009-08-13; **修改稿收到日期:** 2009-11-05。
基金项目: 江苏省人事厅博士后资助项目; 江苏省农业科学院博士后基金资助项目; 江苏省农业科技自主创新基金项目(No. CX [08] 603)。

号、武运梗 7 号、南梗 44 和日本梗稻品种关东 194、日本晴。

1.2 种子萌发率和苗高测定

选取健壮饱满的种子,用 1% NaClO 溶液消毒 15 min,充分漂洗后置于铺垫 4 层滤纸、加有 15 mL 溶液的培养皿中,加盖培养。溶液分别为 1 μmol/L GA₃、10 mg/L ABA 和清水(CK)。每个培养皿 100 粒种子,摆放均匀,每个处理 3 次重复。培养至第 6 天时测定种子萌发率、芽长和根长,以幼根至少达种子长度、幼芽至少达种子一半长作为发芽标准^[8]。3 叶期时分别用 1 μmol/L GA₃、10 mg/L ABA 喷施叶片表面,隔天喷施 1 次,处理 8 d 后选取有代表性的 10 株测量地上部分的高度(苗高),取平均值进行比较分析。

1.3 生理指标测定和基因表达分析

1.3.1 试验设计与材料培养

选取健壮饱满的种子,浮洗,用 1% NaClO 溶液消毒 15 min,充分漂洗干净后于 28℃下浸种 36 h,然后 30℃下黑暗中催芽 48 h,露白后挑选长势一致的种子播种于周转箱中(16 cm × 24 cm × 6 cm),室温 28~30℃下培养,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,光照度为 2000~2200 lx。每 2 d 更换 1 次培养液(国际水稻研究所配方),每天用蒸馏水补充水分。待幼苗长至 3 叶期时,分别用 1 μmol/L GA₃ 和 10 mg/L ABA (预试验结果,对水稻作用效果明显且不伤害水稻叶片,添加少量的 Flucka 吐温-80)喷施叶片表面,隔天喷施 1 次,以不喷作对照(CK)。待幼苗长至 4 叶 1 心期时,取第 4 张真叶进行生理指标测定和基因表达分析。3 次重复,取其平均值进行统计分析(*t* 测验)。

1.3.2 生理指标的测定及 SDS-PAGE

参照 Arnon 的方法^[9]测定叶绿素含量。参照 Bradford 的方法^[10]测定可溶性蛋白质含量。参照紫外吸收法^[11]测

定细胞膜透性。

1.3.3 GA20ox2 和 GA3ox2 基因表达模式检测

基因表达分析中所需试剂均购自 MBI Fermentas 公司。

1.3.3.1 总 RNA 的抽提和 cDNA 第 1 链的合成

水稻叶片总 RNA 抽提采用总 RNA 提取试剂盒进行。1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度和完整性。取 1 μg 总 RNA,参照反转录试剂盒方法,利用 Oligo(dT)₁₈ 合成各个样品的 cDNA 第 1 链。反转录条件:70℃下 5 min,42℃下 60 min,70℃下 10 min,4℃下 10 min。

1.3.3.2 半定量 RT-PCR 检测表达模式

RT-PCR 的内参基因为 *ACTIN*,PCR 反应程序为:94℃下 3 min,94℃下 30 s,55℃下 30 s,72℃下 60 s,26 个循环;72℃下 10 min。*GA20ox2*、*GA3ox2* 的 PCR 反应程序与内参基因 *ACTIN* 相似,只是退火温度分别为 56℃和 60℃,32 个循环。试验所用引物详见表 1,引物设计参考 Sakamoto 等^[7]。取 PCR 产物 3 μL 用于 1%琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色后用凝胶成像系统(USAGENE 公司)扫描成像。利用 BandLeader 3.0 凝胶图像处理软件对 PCR 产物进行量化计算,目的基因的相对表达量以基因电泳条带的吸光度峰值与内参基因的吸光度峰值的比值来表示。为保证结果的准确性,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 GA₃ 和 ABA 对种子萌发率和苗高的影响

由表 2 可以看出,1 μmol/L GA₃ 对不同水稻品种种子萌发率的影响不大,不过,此浓度的 GA₃ 显著促进水稻地上部分的伸长生长,抑制根的伸长生长。10 mg/L ABA 处理对 5 个水稻品种种子的萌发具有极强的抑制作用,在此浓度下,

表 1 基因和引物序列

Table 1. Genes and sequences of the primers used in the study.

基因 Gene		引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物长度 Length of product / bp
ACTIN	正向引物 Forward primer	TGTGTTGGACTCTGGTGA	268
	反向引物 Reverse primer	TCCTCCAATCCAGACACTG	
OsGA20ox2	正向引物 Forward primer	TACTACAGGGAGTTCTTCGCGGACAGCA	
	反向引物 Reverse primer	TGTGCAGGCAGCTCTTATACCTCCCGTT	
OsGA3ox2	正向引物 Forward primer	TCTCCAAGCTCATGTGGTCCGAGGGCTA	346
	反向引物 Reverse primer	TGGAGCACGAAGGTGAAGAAGCCCGAGT	

表 2 GA₃ 和 ABA 处理对种子萌发率、幼苗根长和苗高的影响

Table 2. Effects of GA₃ and ABA on root length and coleoptile length, and seed germination.

品种 Cultivar	种子萌发率			芽长		根长	
	Seed germination/%			Coleoptile length/cm		Root length/cm	
	CK	GA ₃	ABA	CK	GA ₃	CK	GA ₃
武育梗 3 号 Wuyujing 3	99	96	0	1.73±0.26	1.80±0.18	3.35±0.25	1.47±0.21***
武运梗 7 号 Wuyunjing 7	95	100	0	1.55±0.14	1.90±0.22**	2.24±0.33	1.73±0.15**
关东 194 Kanto 194	95	98	0	1.09±0.11	1.77±0.32***	1.62±0.32	1.59±0.17
南梗 44 Nanjing 44	97	96	0	1.76±0.36	2.13±0.29**	2.75±0.26	1.98±0.20**
日本晴 Nipponbare	96	97	0	1.73±0.14	2.03±0.21**	2.55±0.22	1.90±0.16***

** 和 *** 分别表示在同一品种中,处理与对照间差异达 0.01 和 0.001 显著水平。
** and *** indicate that the difference between treatment and control (CK) for a cultivar are significant at 0.01 and 0.001 levels, respectively.

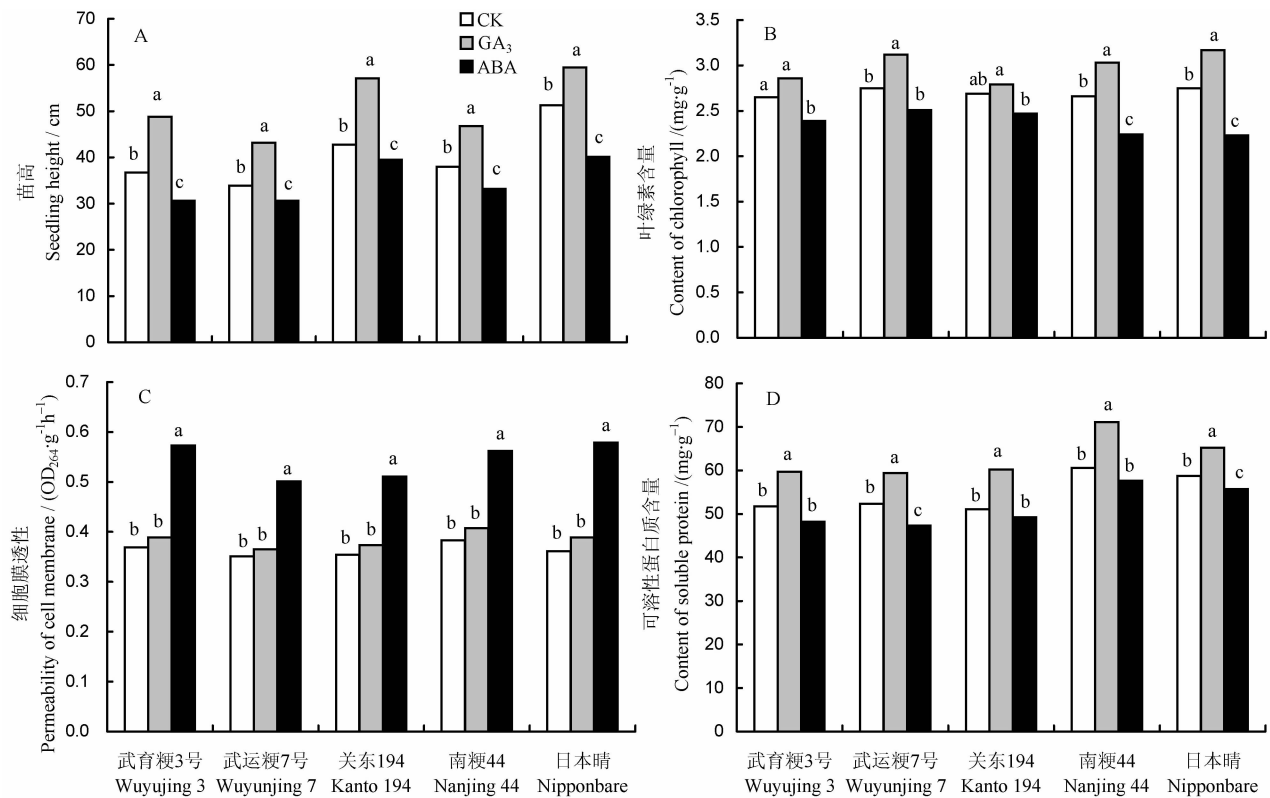


图1 GA₃和ABA处理对水稻苗高、叶片叶绿素含量、细胞膜透性和可溶性蛋白质含量的影响
Fig. 1. Effects of GA₃ and ABA on seedling height, chlorophyll content, permeability of cell membrane and soluble protein content. 柱子上带不同小写字母者表示品种之间差异显著($P < 0.05$)。图2同。
Different lowercase letters above columns indicate significant difference at the 0.05 level for the same cultivar. The same as in Fig. 2.

5个水稻品种种子的发芽率均为零。由图1-A可以看出,喷施GA₃显著促进水稻地上部分的伸长生长。喷施ABA对水稻地上部分的抑制作用不显著($P = 0.165$)。

2.2 GA₃和ABA处理对叶绿素含量的影响

由图1-B可以看出,GA₃处理后,5个水稻品种叶片的叶绿素含量均呈上升趋势。其中,日本晴叶片的叶绿素含量比比对照增加了15.3%,上升幅度最大。ABA处理后,5个水稻品种叶片的叶绿素含量皆呈下降趋势。日本晴叶片的叶绿素含量下降幅度最大,为其对照的81.1%,关东194叶片的叶绿素含量下降幅度最小,为其对照的91.8%。研究结果表明,日本晴叶片的叶绿素含量受GA₃和ABA影响较大。

2.3 GA₃和ABA处理对细胞膜透性的影响

本研究用紫外吸收物质的泄漏率来表示细胞膜透性的大小。由图1-C可以看出,ABA处理后,5个水稻品种叶片的细胞膜透性显著上升。GA₃处理后,5个水稻品种叶片的细胞膜透性有所上升,但与对照差异不显著。

2.4 GA₃和ABA处理对可溶性蛋白质含量的影响

由图1-D可以看出,ABA处理后,5个水稻品种叶片的可溶性蛋白质含量呈轻微下降趋势,与对照差异不显著。GA₃处理后,5个水稻品种叶片的可溶性蛋白质含量提高,与对照差异显著。

2.5 GA₃和ABA处理对GA20ox2和GA3ox2基因表达的影响

本研究采用RT-PCR方法检测GA20ox2和GA3ox2基

因表达水平的变化,以探讨GA₃和ABA对GA20ox2和GA3ox2基因表达模式的影响。由图2和图3可见,在武育梗3号、武运梗7号、关东194和南梗44中,GA20ox2基因表达受GA₃诱导,表现为表达上调。在日本晴中,GA20ox2基因表达受到抑制,表达略微下调。GA20ox2基因表达受ABA抑制,5个品种中均表现为表达下调。一般而言,GA₃和ABA具有拮抗作用,GA20ox2在5个品种中的表达模式也验证了这一点。与其他4个品种不同,日本晴属于高秆品种

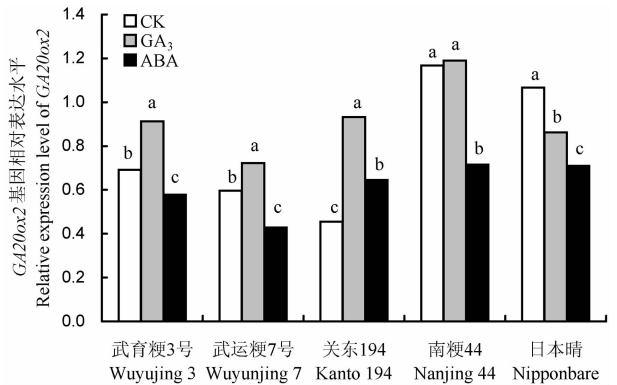


图2 GA₃和ABA处理对GA20ox2基因相对表达水平的影响
Fig. 2. Effects of GA₃ and ABA on the relative expression level of GA20ox2.

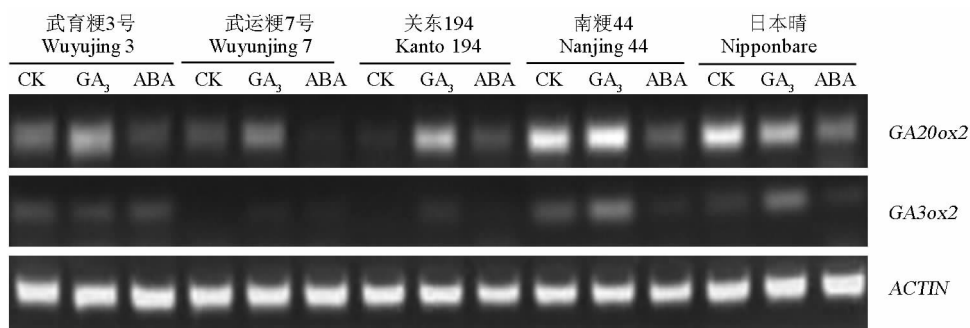


图 3 GA₃ 和 ABA 处理对 GA20ox2 和 GA3ox2 基因表达的影响
Fig. 3. Effects of GA₃ and ABA on the expression of GA20ox2 and GA3ox2.

种,缺少 *sd1* 基因,这或许能部分解释日本晴 GA20ox2 基因的下调表达。GA3ox2 在武育梗 3 号中表达水平没有明显变化,在武运梗 7 号中表达量很低,基本检测不到。在南梗 44、关东 194 和日本晴等 3 个品种中,GA₃ 诱导 GA3ox2 表达,表达量相应升高,而 ABA 则抑制 GA3ox2 的表达,表达量显著下降。

3 讨论

GA 和 ABA 是调节植物生长发育的重要激素。一般而言,GA 和 ABA 具有拮抗作用,分别具有促进和抑制植物生长的作用^[12]。本研究结果表明,1 μmol/L GA₃ 和 10 mg/L ABA 处理影响水稻的生长、生理特性及 GA20ox2 和 GA3ox2 基因的表达。GA₃ 对种子萌发率影响不大,但显著促进地上部的伸长生长,抑制根的伸长生长。在生理特性方面,GA₃ 和 ABA 对不同水稻品种表现出相反的作用效果。这与多个研究结果一致^[13-18]。已有研究表明,低浓度的 ABA 会促进生长,增强作物对胁迫环境的抗逆性^[19-20]。

GA20ox2 基因的表达模式与其功能密切相关^[21]。GA20ox 位于赤霉素合成途径的节点,催化多步反应,在赤霉素生物合成途径中具有极其重要的功能,是赤霉素代谢途径的关键限速酶^[22-24]。Sasaki 等^[23] 研究认为先发现的编码 GA₂₀ 氧化酶基因(GA20ox1)与 *sd1* 无关。*sd1* 参与赤霉素的生物合成,编码由 389 个氨基酸组成的 GA₂₀ 氧化酶(GA20ox),GA20ox 是赤霉素合成途径中的关键酶,催化 GA₅₃ 转换为 GA₂₀。GA20ox2 基因在叶片、茎秆、未开放的花中强烈表达,而 GA20ox1 基因则是在未开放的花中表达,这解释了 *sd1* 水稻株高降低,而产量不受影响的原因,同时也进一步验证了 GA20ox2 功能的重要性。日本晴 GA20ox2 表达下调可能与其缺少 *sd1* 基因有关^[25]。本研究结果表明,在武育梗 3 号、武运梗 7 号、关东 194 和南梗 44 中,GA₃ 诱导 GA20ox2 基因表达,显著促进水稻地上部分的伸长生长,产生高秆表型,与已有研究结果一致^[26]。与 GA20ox2 基因一样,GA3ox2 基因也是赤霉素生物合成途径中的一个关键基因^[24]。除武育梗 3 号和武运梗 7 号之外,GA3ox2 基因的表达模式和 GA20ox2 基因的表达模式基本一致。已有研究表明,水稻矮秆基因 *d18* 的矮化效应是 GA 合成受阻造成的,它的编码产物为 GA₃ 氧化酶^[27]。由于本研究所用品种不含有矮秆基因 *d18*,因而 GA₃ 和 ABA 处理后,GA3ox2 在 5 个品种中表现出相似的表达模式。研究表明,绝大多数

矮秆水稻品种植株的内源赤霉素类物质含量极少,当用 GA₃ 处理后,这些植株能够生长成正常高度的植株,表明矮秆基因的存在对赤霉素的新陈代谢有抑制作用^[28],这与我们的研究结果基本一致。由于 GA 和 ABA 的拮抗作用,因而在影响 GA20ox2 和 GA3ox2 基因表达时亦呈现出相反的作用模式。

总之,通过本研究我们初步探讨了 GA₃ 和 ABA 对水稻生长发育、生理特性及 GA20ox2 和 GA3ox2 基因表达模式的影响,在一定程度上揭示了 GA₃ 和 ABA 影响水稻生长、生理特性的原因及作用机理,并从基因表达水平上找到原因,为外源激素在水稻上的合理、有效施用提供了一定的理论参考。不过,由于 GA₃ 和 ABA 对植物的作用机理和作用过程非常复杂,要全面了解其作用机理及过程,尚需对它们的功能进行详细研究。

参考文献:

[1] Fleet C M, Sun T P. A DELLAcate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(1): 77-85.

[2] Razerm F A, Baron K, Hill R D. Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(5): 454-459.

[3] Wang Y, Li J. Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59(1): 253-279.

[4] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59(1): 225-251.

[5] Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(4): 436-442.

[6] 黄先忠, 蒋才富, 廖立力, 等. 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展. *植物学通报*, 2006, 23(5): 499-510.

[7] Sakamoto T, Miura K, Itoh H, et al. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1642-1653.

[8] 浙江农业大学种子教研组. 作物种子学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1982.

[9] Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physical*, 1949, 24(1): 1-15.

[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantiza-

tion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.

[11] 谢 田, 徐中际. 测定细胞膜透性的紫外吸收法. 植物生理学通讯, 1986(1): 45-46.

[12] Chrispeels M J, Varner J E. Inhibition of gibberellic acid induced formation of α -amylase by abscisin II. *Nature*, 1966, 212(5066): 1066-1067.

[13] 郎 杰. 光对 GA₃ 大麦叶段叶绿素含量的影响. 植物研究, 1996, 16(2): 224-227.

[14] 王贵元, 夏仁学, 周开兵. 外源 ABA 和 GA₃ 对红肉脐橙果皮主要色素含量变化和果实着色的影响. 武汉植物学研究, 2004, 22(3): 273-276.

[15] 韩寒冰, 陈大清. GA₃ 和表面活性剂对水稻幼苗生理的影响. 湖北农学院学报, 1999, 19(2): 97-99.

[16] 尹艺林, 余 梅, 梁海超. ABA 对栝楼幼苗生长和生理特性的影响. 中国林副特产, 2008(1): 3-5.

[17] 王国莉. 非生物胁迫和 ABA 处理对水稻酸性可溶性蛋白含量的影响. 河南农业科学, 2008, (4): 25-28.

[18] 梁宗锁, 康绍忠, 高俊风. 分根渗透胁迫与 ABA 对玉米根系生长和 WUE 的影响. 作物学报, 2000, 26(2): 250-255.

[19] 徐福乐, 罗立津. ABA 对作物种子萌发和幼苗生长的影响. 福建农业科技, 2007(6): 69-71.

[20] 刘红娟, 刘 洋, 刘 琳. 脱落酸对植物抗逆性影响的研究进展. 生物技术通报, 2008(6): 7-9.

[21] Yang Y H, Zhang F M, Ge S. Evolutionary rate patterns of the gibberellin pathway genes. *BMC Evol Biol*, 2009, 206(9): 1471-2148.

[22] Martin D N, Proebsting W M, Parks T D, et al. Feed-back regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta*, 1996, 200(2): 159-166.

[23] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, et al. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 2002, 416(6882): 701-702.

[24] Appleford N E, Evans D J, Lenton J R, et al. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta*, 2006, 223(3): 568-582.

[25] Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, et al. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution” gene encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res*, 2002, 9(1): 11-17.

[26] Huang S, Raman A S, Ream J E, et al. Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1998, 118(3): 773-781.

[27] Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, et al. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8909-8914.

[28] 宋 平. 赤霉素结合蛋白对水稻矮生性的调控. 作物学报, 1996, 22(6): 652-656.