

# 赤霉素反应敏感型和不敏感型 谷子矮秆突变体的鉴定\*

陈金桂<sup>1</sup> 张玉宗<sup>2</sup> 周 燮<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 南京农业大学农学系农业部作物生长调控重点开放实验室, 南京 210095;  
<sup>2</sup> 河北省农林科学院谷子研究所, 石家庄 050031)

**摘 要** 采用赤霉素点滴法(苗期)、浸渍法(芽期)以及喷洒法(拔节期)对 3 种谷子矮秆突变体的赤霉素反应敏感性进行了研究。结果表明矮宁黄和 623C 属赤霉素反应敏感型, 它们苗期的叶片和叶鞘及拔节期的节间均可随外加赤霉素而显著伸长, 达到正常株(苗)高; CH84113 则属于赤霉素反应不敏感型, 多种赤霉素(GA<sub>1</sub>、GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>、GA<sub>9</sub>)处理均不能使其株(苗)高恢复正常。用 ELISA 对 3 种矮秆突变体和正常品种伸长敏感期(拔节期)幼茎的 GA<sub>1+3</sub> 含量进行了检测, 发现矮宁黄、623C 和 CH84113 的 GA<sub>1+3</sub> 含量均存在着显著的亏缺。  
**关键词** 谷子 矮化 突变体 赤霉素 敏感性

植物激素突变体是研究植物激素生物合成、代谢途径以及信号转导机制的重要材料。对水稻<sup>[6~6]</sup>、玉米<sup>[7~9]</sup>、豌豆<sup>[10]</sup>及拟南芥<sup>[11]</sup>等种植物赤霉素合成阻遏型(反应敏感型)矮秆突变体的研究, 为赤霉素生物合成途径的阐明作出了重要贡献, 并证实 GA<sub>1</sub> 为茎秆伸长生长的主控因子, GA<sub>3</sub> 因与 GA<sub>1</sub> 的结构极其类似或可转化为 GA<sub>1</sub>, 因而也可显著促进一些植物节间的伸长生长; 赤霉素反应不敏感型矮秆突变体则是赤霉素受体研究的好试材<sup>[12]</sup>, 为赤霉素信号的感受和转导的分子机制研究开辟了一条新途径。谷子种质资源丰富, 矮秆材料也较多, 但迄今很少见有关研究谷子赤霉素突变体的报道。笔者用赤霉素点滴法、浸渍法和喷洒法对 3 种谷子矮秆突变体(矮宁黄、623C 和 CH84113)的赤霉素反应敏感性进行了较全面的研究, 证实谷子中也存在赤霉素反应敏感型和不敏感型突变体, 并对其在伸长生长敏感期幼茎中的 GA<sub>1+3</sub> 含量进行了测定, 以探讨谷子矮化的内在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

3 种谷子(*Setaria italica* Beauv.)栽培品种冀谷 11 号(JG11)、昭谷 1 号(ZG1)和青丰谷

1996- 07- 02 收稿。  
 \* 河北省自然科学基金资助项目。

(QFG) 及矮秆突变体矮宁黄(ANH, 从 JG11 突变种中筛选得到)、623C 均由河北省农林科学院谷子研究所提供; 矮秆突变体 CH84113(从 ZG1 突变种中筛选得到) 由内蒙古赤峰市农科所提供。GA<sub>1</sub> 和 GA<sub>9</sub> 纯品由 R. P. Pharis 教授(加拿大)惠赠, GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub> 和 GA<sub>7</sub> 纯品由日本东京大学 N. Murofushi 教授惠赠。

1.2 外源 GA 的点滴法试验

参照村上浩的方法<sup>[1]</sup>, 稍加修改。种子经氯化汞消毒后, 播于湿润滤纸上, 25℃ 催芽。取第一叶鞘长度约为 2mm 的幼苗移至石英砂上培养。于一叶一心期, 挑选均匀一致的幼苗, 分成 6 组, 每组 20 株, 设 3 个重复。在刚出现的第二叶和第一叶之间, 用微量注射器分别滴加 2μl 不同浓度(0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 和 50mg/L) 的溶于 50% (V/V) 丙酮中的 GA(GA<sub>1</sub>、GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> 和 GA<sub>9</sub>) 溶液, 即 GA 的处理剂量分别为 0.0064, 0.032, 0.16, 0.8, 4, 20 和 100ng/株。在同一条件下继续培养至二叶一心期。分别测量对照和处理的第二叶鞘的长度。结果用 3 个重复的平均数表示。

1.3 外源 GA 的浸渍法试验

将萌芽一致的种子分别播于预先加有不同浓度(0.027, 0.082, 0.25, 0.74, 2.22, 6.67 和 20μmol/L) GA<sub>3</sub> 溶液的纱布(经高压灭菌)上, 每组 20 粒, 设 3 个重复, 25℃ 下照光培养, 于一叶一心期, 测量第一叶片的长度。结果为 3 个重复的平均数。

1.4 外源 GA 的喷洒法试验

在拔节期用微量喷雾器整株均匀喷布 50mg/L 的 GA<sub>3</sub> 溶液(含 0.05% 吐温 20), 每个处理约 30 株, 设 3 个重复。于完熟期测量第一、第二及第三伸长节间的长度及株高。结果表示为 3 个重复的平均数±标准差。

1.5 内源 GA<sub>1+3</sub> 含量的测定

在拔节期分别取样测定幼茎中的 GA<sub>1+3</sub> 含量, 重复 3 次, 测定方法(ELISA) 参见文献[3], 结果表示为 3 个重复的平均数±标准差。

2 结果与分析

2.1 谷子矮秆突变体在不同发育时期的矮化表现

谷子矮秆突变体的矮化在幼苗期即可显著表现出来, 在一叶一心期、三叶一心期和分蘖期, 它们的株高都比正常品种低 30% 左右; 拔节期, 则低 40% ~ 55%; 在抽穗期, 低 35% ~ 40%; 在完熟期, 矮宁黄的株高较冀谷 11 号低约 34%, CH84113 较昭谷 1 号低约 45%, 623C 较冀谷 11

表 1 谷子矮秆突变体与正常品种在不同发育时期的株(苗)高比较

品 种	株(苗)高(cm)					
	一叶一心期	三叶一心期	分蘖期	拔节期	抽穗期	完熟期
冀谷 11 号	2.0±0.2	4.6±0.3	20.3±1.5	61.4±4.5	96.8±8.2	117.8±9.2
矮宁黄	1.3±0.1	3.2±0.2	16.4±1.2	37.5±3.2	62.0±4.8	77.2±6.0
昭谷 1 号	2.2±0.2	4.6±0.4	21.0±2.0	57.5±4.8	90.2±8.5	125.5±9.5
CH84113	1.5±0.1	3.2±0.3	14.0±1.1	26.2±1.8	52.5±4.5	68.5±5.5
青丰谷	2.2±0.2	4.8±0.5	21.5±1.9	64.2±5.5	98.2±8.4	130.2±9.8
623C	1.4±0.1	3.3±0.3	14.6±1.0	36.0±2.8	61.2±5.0	78.4±6.2

注: 表中所列数据为 20 株株(苗)高的平均值±标准差。

号、昭谷 1 号和青丰谷分别低约 33%、38% 和 40%(表 1)。进一步的研究发现,谷子矮秆突变体与正常品种的株高差异在幼苗期,主要表现在叶片和叶鞘的长度上(分别相差约 25% 和 35%),而到了拔节期,则主要表现在第一、第二和第三伸长节间的长度上(分别相差约 35%、30%和 30%)。

### 2.2 谷子矮秆突变体幼苗的第二叶鞘对外源 GA 的反应

如图 1 所示,矮宁黄和 623C 都对外源  $GA_1$ 、 $GA_3$ 、 $GA_4$ 、 $GA_7$  和  $GA_9$  产生了反应,它们的第二叶鞘显著伸长。总的来说,随着 GA 处理剂量的增加,矮宁黄和 623C 的叶鞘的长度也逐渐增加,而且它们对  $GA_1$  和  $GA_3$  的敏感性要比对  $GA_4$ 、 $GA_7$  及  $GA_9$  的高,其中,对  $GA_3$  和  $GA_7$  的反应敏感性又要分别比  $GA_1$  和  $GA_4$  的高。矮宁黄和 623C 对同一种 GA 的反应敏感性也仍存在着差异,使矮宁黄第二叶鞘增长 50% 所需的  $GA_1$ 、 $GA_3$ 、 $GA_4$ 、 $GA_7$  和  $GA_9$  的剂量 ( $ED_{50}$ ) 分别约为 0.8, 0.16, 10, 8 和  $20ng/株$ , 623C 的则为 1.6, 0.35, 12, 10 和  $4ng/株$ 。

CH84113 的第二叶鞘对所有供试 GA 均未产生反应。

### 2.3 谷子矮秆突变体幼苗的第一叶叶片对外源 GA 的反应

由上可知,在所有供试 GA 中,以  $GA_1$  和  $GA_3$  促进伸长的效果为最显著。因此,笔者用  $GA_3$  浸渍法对矮秆突变体的 GA 反应敏感性进行了进一步鉴定。结果表明,  $0.25\mu mol/L$  的  $GA_3$  即可分别使矮宁黄和 623C 的第一叶叶片增长约 30% 和 7%, 它们的  $ED_{50}$  分别为  $0.70\mu mol/L$  和  $2.00\mu mol/L$ 。随着 GA 处理剂量的增加,矮宁黄和 623C 的叶片伸长幅度也随之增加(图 2)。与第二叶鞘的伸长生长相似,矮宁黄和 623C 的第一叶叶片对  $GA_3$  的反应敏感性也存在着差异,矮宁黄的第一叶片反应更为敏感。

CH84113 的第一叶叶片对  $GA_3$  未产生伸长加快的反应。

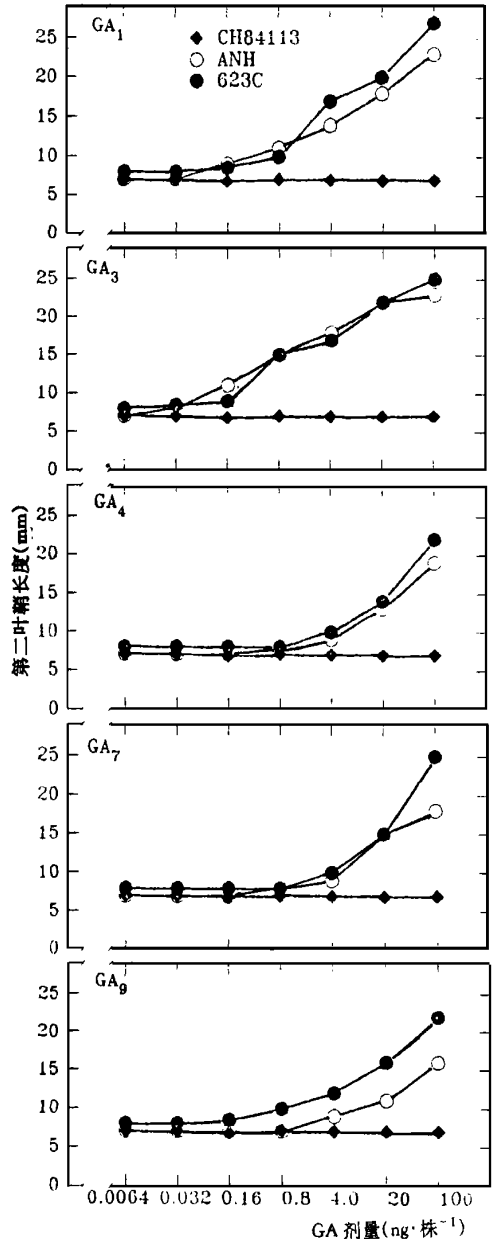


图 1 谷子矮秆突变体幼苗的第二叶鞘对外源 GA 的反应

## 2.4 谷子矮秆突变体的伸长节间对外源 GA 的反应

喷洒法的结果表明, 在拔节期,  $GA_3$  主要是促进第一、第二和第三伸长节间的长度, 而叶片和其后的穗轴、穗则无显著增长。 $GA_3$  处理后, 矮宁黄的第一、第二和第三伸长节间分别较对照增长约 350%、273% 和 164%; 623C 分别增长约 103%、119% 和 123% (图 3)。 $GA_3$  处理使矮宁黄和 623C 的株高分别增加约 47% 和 30% (图 4)。

与叶片和叶鞘的反应相似, CH84113 的伸长节间对  $GA_3$  未产生反应,  $GA_3$  处理后的株高与对照无显著差异。

综上所述, 可确证矮宁黄和 623C 为 GA 反应敏感型矮秆突变体; 而 CH84113 为 GA 反应不敏感型矮秆突变体。

## 2.5 谷子矮秆突变体与正常品种幼茎中 $GA_{1+3}$ 的含量差异

ELISA 的测定结果表明, 三种矮秆突变体幼茎中的  $GA_{1+3}$  含量均较正常品种中的低。其中, 矮宁黄的比冀谷 11 号的约低 44%; CH84113 的比昭谷 1 号的约低 56%; 而 623C 则分别比冀谷 11 号、昭谷 1 号和青丰谷约低 66%、50% 和 43% (图 5)。

# 3 讨论

## 3.1 矮秆突变体赤霉素反应敏感性鉴定方法的比较

点滴法、浸渍法和喷洒法均可用于鉴定矮秆突变体对赤霉素的反应敏感性, 但三种方法各有优缺点。用喷洒法在拔节期进行鉴定, 实验周期较长, 实验条件不易精确控制, 每株处理量的

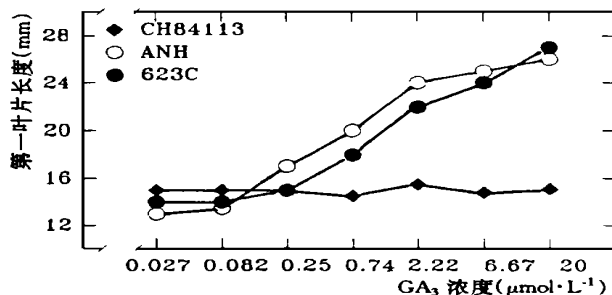


图 2 谷子矮秆突变体幼苗的第一叶叶片对外源  $GA_3$  的反应

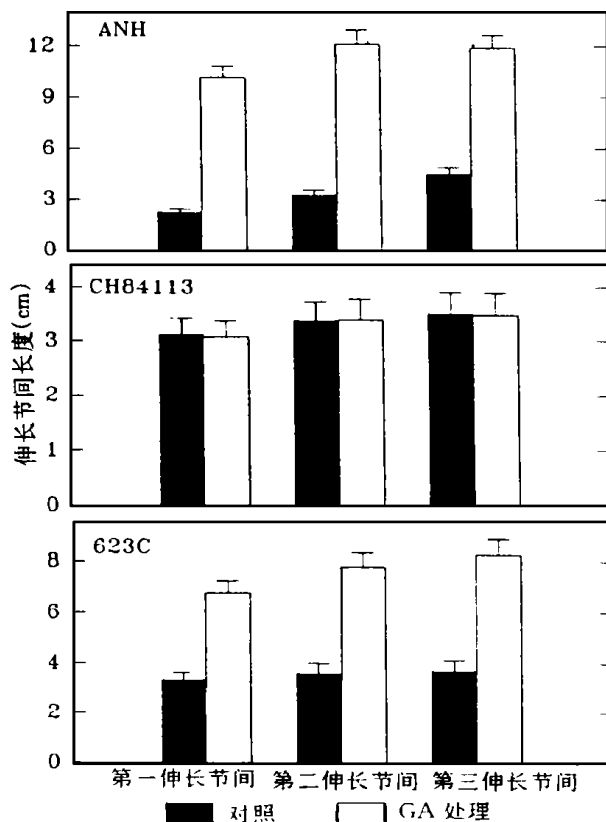


图 3 谷子矮秆突变体第一、二、三伸长节间对外源  $GA_3$  的反应

误差也大,对于一些昂贵的标准品(如  $GA_1$ 、 $GA_4$ 、 $GA_7$  和  $GA_9$  等)来说,尤其不太适用。浸渍法与喷洒法相比,实验周期短,可在幼苗期进行鉴定,用它来观察叶片的伸长生长很有利,但较易受到污染,而且实验过程中需不断补充蒸发掉的水分。点滴法与前两种方法相比,具有很多优点:1) 便于精确控制处理剂量,可分别对每株进行精确操作,实验误差大大降低;2) 可节省标准品的用量,尤其适用于那些较昂贵的标准品;3) 适合于对叶鞘伸长生长的观察,也适用于对叶片伸长生长的观察;4) 实验条件便于控制;5) 实验周期短。存在的缺点是操作相对复杂,需对每一株苗进行处理。实际操作中既要考虑到简便和快速,又要顾及到可靠性及实验误差的大小,还有一个不容忽视的问题是鉴定时期是否为被鉴定材料的伸长敏感期。本实验在用点滴法确定了  $GA_3$  和  $GA_1$  促进谷子伸长生长效果最显著的基础上,选择较易获得、相对便宜而又有显著促进伸长效果的  $GA_3$ ,进一步用浸渍法和喷洒法研究了叶片和节间对  $GA_3$  的反应敏感性。既研究了叶片和叶鞘对赤霉素的反应,也兼顾了伸长敏感期茎秆对赤霉素的敏感性,因而鉴定结果较可靠。确证了在谷子上存在赤霉素反应敏感型和不敏感型矮秆突变体。

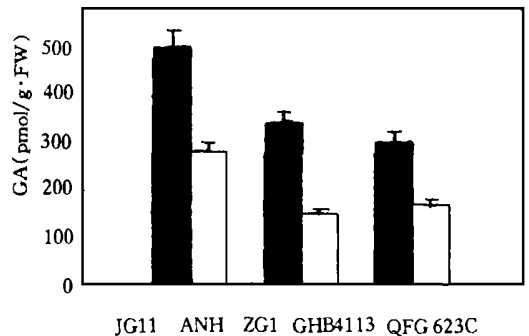
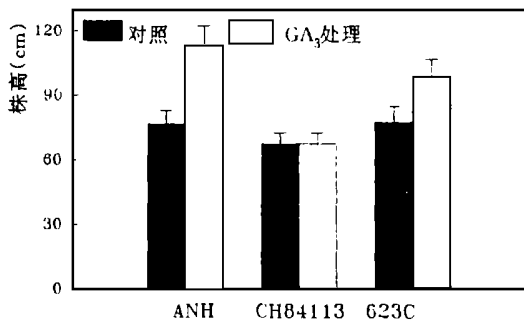


图4  $GA_3$  处理对谷子矮秆突变体株高的影响

图5 谷子矮秆突变体与正常品种幼茎中  $GA_{1+3}$  含量的比较

### 3.2 谷子矮秆突变体的应用

赤霉素反应敏感型矮秆突变体可应用于赤霉素生物合成途径的研究上,一般来说,在这类突变体中,GA 合成途径中的某些步骤被阻断<sup>[8,4,7,9~11]</sup>,导致了内源 GA 水平的亏缺。笔者证实了谷子赤霉素反应敏感型矮秆突变体矮宁黄和 623C 也存在着内源 GA 水平的亏缺,它们伸长敏感期幼茎中的  $GA_{1+3}$  含量显著低于正常品种。笔者以往的研究也发现它们幼苗期地上部  $GA_{1+3}$  的亏缺现象<sup>[1]</sup>。因此,可增加供试 GA 的种类(如  $GA_{19}$ 、 $GA_{20}$  和  $GA_{32}$  等)及对内源 GA 进行精确的鉴定和定量分析,来研究突变体中 GA 生物合成被阻断的部位。

虽然物理和化学等分析方法(HPLC, GC/MS 等)及酶联免疫测定方法(ELISA)已可精确定量各种试样中的 GA 含量<sup>[4]</sup>,但生物检测方法仍以其操作简易、试验结果直观、可用来直接检验试样中待检物的生物学效应以及无需特别设备等优点,在 GA 的检测方法中仍占有重要的位置。GA 对水稻等绿色健壮植物,尤其对幼嫩和矮化植物显示促进伸长的效应,其促进强度因 GA 种类和供试器官的不同而有所变化。GA 还可增加谷类种子中的多种水解酶,特别是  $\alpha$ -淀粉酶的活性。GA 的这两种作用常常被用于它的生物检测,而又以前一种更为常用。Nishijima 等<sup>[5]</sup>和村上浩<sup>[1]</sup>曾以矮秆水稻为材料,用点滴法发展了 GA 的生物检测法,但常规的检

测仍不够灵敏。若用 GA 生物合成的抑制剂预先处理供试植株, 然后再滴加试样可大大提高检测的灵敏度, 但毕竟增加了操作的难度。谷子籽粒小, 千粒重仅为 2.8g 左右, 因而, 用谷子赤霉素反应敏感型矮秆突变体作为供试材料有发展更为灵敏的 GA 生物检测方法的可能。

赤霉素反应不敏感型矮秆突变体的内源 GA 并不一定会发生亏缺<sup>[8]</sup>, 笔者先前的研究发现, 谷子赤霉素反应不敏感型矮秆突变体 CH84113 的幼苗地上部中的 GA<sub>1+3</sub> 含量高于正常品种<sup>[9]</sup>。在本实验中, 笔者则发现 CH84113 幼茎中的 GA<sub>1+3</sub> 含量低于正常品种, 外源添加 GA<sub>3</sub> 仍不能使其恢复正常株高, 表明了有其它控制因子的存在, 这种控制因子很可能就是 GA 受体。已有研究证实在玉米的赤霉素反应不敏感型矮秆突变体中, 存在着一种低 GA 亲和力的 GA 结合蛋白(不同于正常品种中的)<sup>[12]</sup>。这说明, 如果 GA 结合蛋白亲和力低, 即使存在足够量的 GA, 也不能高效地转导 GA 分子信号。在 GA 结合蛋白的数量和分布上, 赤霉素反应不敏感型矮秆突变体也可能与正常品种之间存在着显著差异。

## 参 考 文 献

- 1 陈金桂, 周 燮, 张玉宗. 三种谷子矮秆突变体对 GA<sub>3</sub> 反应差异的内源激素解析. 南京农业大学学报, 1996, 19(2): 6~11
- 2 村上浩. 生物检定. 见: 高桥信孝编. 植物化学调节实验法. 东京: 植物化学调节学会, 1989, 30~37
- 3 Kobayashi M, et al. Quantative analysis of endogenous gibberellins in normal and dwarf cultivars of rice. Plant Cell Physiol, 1989, 30: 963~969
- 4 Murofushi N. Biosynthesis of gibberellins in rice and its dwarfism. Gamma Field Symposia, 1992, 31: 11~23
- 5 Suzuki Y, Kurogochi S, Murofushi N, et al. Seasonal changes of GA<sub>1</sub>, GA<sub>19</sub> and abscisic acid in three rice cultivars. Plant Cell Physiol, 1981, 22: 1089~1093
- 6 Takahashi N. Endogenous plant hormones in rice in relation to the regulation of its life cycle. In: Pharis RP, Rood SB, eds. Plant Growth Substances, New York: Springer-Verlag, 1988, 11~20
- 7 Fujioka S, Yamane H, Spray CR, et al. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of normal dwarf-1, dwarf-2, dwarf-3 and dwarf-5 seedlings of *Zea mays* L. Plant Physiol, 1988, 88: 1367~1372
- 8 Fujioka S, Yamane H, Spray CR, et al. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 9031~9035
- 9 Phinney BO, Spray CR. Chemical genetic and the gibberellin pathway in *Zea mays* L. In: Wareing PF, ed. Plant Growth Substances 1982, New York: Academic Press, 1982, 101~110
- 10 Reid JB, Davies PJ. The genetic and physiology of gibberellin sensitivity mutants in peas. In: Karssen CM, van Loon LC, Vreugdenhil D, eds. Progress in Plant Growth Regulation. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1992, 214~225
- 11 Zeevaart JAD, Talon M. Gibberellin mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: Karssen CM, van Loon LC, Vreugdenhil D, eds. Progress in Plant Growth Regulation. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1992, 34~42
- 12 Sakai S, Katsumi M. Properties of gibberellin-binding proteins from normal and dwarf-8(a dominant gibberellin non-responding dwarf mutant) seedlings of *Zea mays* L. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58

(7): 1340~1342

- 13 Zheng ZF, Zhou X. A monoclonal antibody recognizing non-derivative 13- hydroxycy gibberellin A<sub>3</sub> and their glucosides. Acta Botanica Sinica, 1995, 37( 10): 761~769
- 14 Yamaguchi I, Nakazawa H, Nakagawa R, et al. Identification and semi- quantification of gibberellins from the pollen and anthers of *Zea mays* by immunoassay and GC/MS. Plant Cell Physiol, 1990, 31( 8): 1063~1069
- 15 Nishijima T, Katsura N. A modified micro-drop bioassay using dwarf rice for detection of femtomol quantities of gibberellins. Plant Cell Physiol, 1989, 30: 623~627

## Characterization of Gibberellin-Responding and Non-Responding Dwarf Mutants in Foxtail Millet

Chen Jingui<sup>1</sup> Zhang Yuzong<sup>2</sup> Zhou Xie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Crop Growth Regulation, Ministry of Agriculture, Department of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

<sup>2</sup>Institute of Millet, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031)

**Abstract** Seedlings of foxtail millet (*Setaria italica* Beauv.) dwarf mutants, Aininghuang (ANH), 623C and CH84113 were treated with gibberellins (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> and GA<sub>9</sub>) by micro-drop method and by pre-soaking in GA<sub>3</sub> solution. Further, plants were sprayed with GA<sub>3</sub> solution at jointing stage. It was found that ANH and 623C were GA<sub>3</sub>-responding dwarf mutants, whose leaf blade, leaf sheath and elongating internodes length increased significantly after GA application, whereas CH84113 was a non-GA<sub>3</sub>-responding dwarf mutant. Using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it was found that the endogenous GA<sub>1+3</sub> contents in culms of all three dwarf mutants decreased by 50% or so, in comparing with the normal cultivars, Jigu 11 (JG11), Zhaogu 1 (ZG1) and Qingfenggu (QFG).

**Key words:** Foxtail millet (*Setaria italica* Beauv.); Dwarfism; Mutant; Gibberellins; Sensitivity