

中国南方早、晚季稻田中杂草稻种子次生休眠分化及成因探究

Differentiation and genesis of secondary dormancy of weedy rice seeds occurring in double cropping rice fields in southern China

刘婧萱 李雨珊

[摘要] 杂草稻是世界范围内的稻田恶性杂草，具有很强的杂草性和种子落粒性，对全球水稻生产和粮食安全带来了严重危害。前期研究发现，广东雷州地区早、晚季稻田中的杂草稻群体已经发生了明显的遗传分化。本研究选取雷州地区三块水稻田内的早、晚季杂草稻群体为研究对象，通过 9℃低温埋土处理，利用植物激素水平以及 DNA 甲基化水平检测手段，探究早、晚季稻田中杂草稻种子的次生休眠性差异及其成因。结果显示，早季杂草稻群体的种子在低温埋土条件下能产生更强的次生休眠性，并且在埋土 105 天后更多的种子产生了休眠性。这些结果表明，早、晚季杂草稻群体的种子在次生休眠性上已经发生了分化。此外，埋土处理后的种子中与休眠性相关的植物激素 ABA、JA、JA-ILe、IAA、SA 和 cis-OPDA 发生了显著的含量变化，而且与水稻休眠性相关的功能基因 *SDR4* 的甲基化程度也发生了变化。这些发现表明，种子内植物激素水平、DNA 甲基化水平的变化可能是导致早、晚季杂草稻群体种子次生休眠性差异的主要原因。总而言之，本研究表明杂草稻种子在次生休眠性上发生了快速适应性进化，可以为杂草稻的有效防治策略制定提供理论依据。

[关键词] 种子休眠；杂草；水稻；植物激素；DNA 甲基化；埋土

1 引言

种子休眠是指具有活力的种子在适宜的温度、水分等条件下仍然不能够萌发的现象^[1]。种子休眠能够使其有更长时间进行长距离传播，或者在土壤种子库中进行季节性循环，并通过抑制萌发而帮助种子度过不利或不适合的环境条件（如干旱、低温），从而提高种子在自然环境条件下的存活率。基于休眠的发生时间和状态可分为初生休眠和次生休眠。初生休眠是在种子形成和发育过程中获得的，而次生休眠是不具有初生休眠或休眠已经被打破的种子，在不利环境的刺激下立即或经过一段时间后诱导产生的，如起源于栽培稻而不具有次生休眠性的杂草稻种子，在低温（9℃）埋土的条件下可以经诱导而产生较高水平的次生休眠性^[2]。

杂草稻（*Oryza sativa* f. *spontanea*）是一类在稻田中自生，早期形态性状与普通水稻相似，但具有杂草特性，在结实性、落粒性、品质等许多性状上不符合生产需要的稻属植物。据联合国粮农组织（FAO）2007 年的报道，杂草稻已被列为“全球三大草害”之一，表明杂草稻的危害已经对全球水稻生产和粮食安全造成了非常严重的影响^[3]。田间实地调查发现，广东省雷州市地区的早季与晚季稻田中都出现了杂草稻，并且早、晚季水稻种植季节之间的休耕期差异十分明显。通过采样和分子微卫星分析进一步发现早、晚季稻田中的杂草稻群体发生了较高水平的遗传分化^[4]。这些表明，早、晚季稻田中的杂草稻种子很有可能在不同的休耕期，分别快速响应当季的环境因子（如温度、光照）变化，形成不同周期的次生休眠进入土壤种子库，从而可以与栽培稻同步并周期性地在稻田中发生。因此，我们猜测，早、晚季稻田中杂草稻种子的次生休眠性也产生了一定程度的分化。

在本研究中，我们进行了杂草稻种子低温埋土处理、植物激素水平检测和 DNA 甲基化水平检测，希望回答以下的科学问题：（1）同一块水稻田中早、晚季杂草稻群体种子的次生休眠性是否产生了差异？

（2）早、晚季杂草稻产生次生休眠性差异是否受植物激素水平以及表观遗传因子影响？这些问题的解决将为同一块水稻田内的早、晚季杂草稻群体的遗传分化提供有力证据，证明杂草稻种子在水稻田内发生的快速适应性进化，为将来的杂草稻防控治理策略提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 杂草稻种子收集

从中国广东省雷州市三个地点的双季稻田中采集了遗传分化程度较高的 3 个早、晚季杂草稻群体对的成熟种子（表 1），每个群体 60 个单株。分别经早、晚季同质园繁育一代后获得 12 个群体（CDE-E, CDL-E, DCE-E, DCL-E, HJE-E, HJL-E, CDE-L, CDL-L, DCE-L, DCL-L, HJE-L, HJL-L）。将收获后的种子装入有硅胶的密封袋中室温下干燥一周以上，之后置于室温保存。

2.2 低温埋土处理

将稻田土灭菌后在不锈钢托盘底层均匀铺上一层，厚度约 1 cm，再将装好种子的网袋在土层上方平铺，最后在种子上方均匀铺上土，土层厚度约 2 cm。埋土完成后浇水适量，保持土壤湿润即可。置于 9 °C 黑暗培养箱中，分别埋土 35 天、70 天、105 天。

2.3 种子萌发与活力检测

在不同埋土时间处理结束后取出种子，立即以清水冲洗干净，转移至萌发培养皿（垫两层滤纸）中，加 4 mL 去离子水，置于 28 °C 培养箱中，萌发 6 天，统计萌发种子数。对未萌发的种子，用刀片将其纵向切开，置于浓度为 0.1% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）溶液中浸泡 2 小时进行胚部染色^[5]。若胚被染成紫红色，表明种子具有活力，计入休眠的种子；若胚未被染色，表明种子已经失去活力，计入死亡种子数。统计死亡种子数和休眠种子数。

2.4 植物激素含量检测

将每份样品液氮研磨，取 100±5 mg 于 2 mL 离心管中，加入 30 μL 内标溶液和 1 mL 乙腈水溶液（1%FA），震荡混匀 2 min；4 °C 避光抽提 12 h，14000 g 离心 20 min，取上清液 800 μL，氮气吹干，用 100 μL 乙腈水（1:1,v/v）复溶，14000 g 离心 20 min，取上清进样分析。采用 Waters I-Class LC 超高效液相色谱系统进行分离。之后采用 5500 QTRAP 质谱仪（AB SCIEX）在正/负离子模式下进行质谱分析，用 MRM 模式检测待测离子对。最后，采用 Multiquant 软件提取色谱峰面积及保留时间。根据标准曲线，计算样品中测得植物激素的含量。

2.5 特定位点的 DNA 甲基化检测

用 CTAB 法提取杂草稻种子的基因组 DNA，利用 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒（天根）将 DNA 中非甲基化的胞嘧啶（C）转变成尿嘧啶（T）。设计针对 *SDR4* 的特异性结合甲基化的 DNA 和特异性结合未甲基化的 DNA 的引物（表 2），进行 PCR 扩增，并利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物扩增情况。PCR 反应体系见表 3，反应程序见表 4。

表 1 用于本研究的杂草稻群体，以及在广东省雷州市的收集地点与地理位置

收集地点	地理位置	采样群体	采样季节	群体大小/株
赤豆村	20°52.4986'N, 109°46.5007'E	CDE	早季	60
		CDL	晚季	60
和家村	20°56.2696'N, 109°58.8599'E	HJE	早季	60
		HJL	晚季	60
东村	20°46.0530'N, 110°03.5190'E	DCE	早季	60
		DCL	晚季	60

表 2 针对 *SDR4* 的特异性结合甲基化的 DNA 和特异性结合未甲基化的 DNA 的引物序列

引物名称	碱基序列（5'-3'）	引物名称	碱基序列（5'-3'）
Sdr4_M-F	TACGTATTTCGTTTCGTTTTTTTAC	Sdr4_U-F	TGTATTTTGTTTTGTTTTTTTATGT
Sdr4_M-R	CATAATCTCGTTAACCTTCACGAC	Sdr4_U-R	CCATAATCTCATTAACTTCACAAC

表 3 甲基化特异性 PCR 反应体系

成分	体积（μL）
ddH ₂ O	13.8
10×Taq Buffer（Mg ²⁺ Plus）	2.0
dNTPs（2.5 mM）	1.6
模板 DNA	2.0
上下游引物（10 μM）	0.4
Taq DNA polymerase（5 U/μL）	0.2

表 4 甲基化特异性 PCR 反应条件

温度（°C）	时间	循环数
95	5 min	30
95	30 s	
50	30 s	
72	30 s	
72	5 min	
4	∞	

3 实验结果

3.1 低温埋土诱导早季杂草稻群体种子产生更强的次生休眠性

经过不同时间的低温埋土处理后，我们发现：（1）埋土处理的杂草稻种子均诱导产生了次生休眠性，

并且随着埋土时间的增加，休眠性增强（图 1A-C）；（2）以 105 天埋土结果为例，CD 和 HJ 的早季杂草稻群体种子表现出显著更高的次生休眠性（图 1A, B）；（3）将所有早季/晚季群体各视为一个群体，早季杂草稻群体种子产生的次生休眠性在不同埋土处理时间都显著高于晚季群体（图 1D）。考虑到死亡率随着埋土时间的增加而增加，可能是导致早、晚季群体间休眠性差异波动的原因。

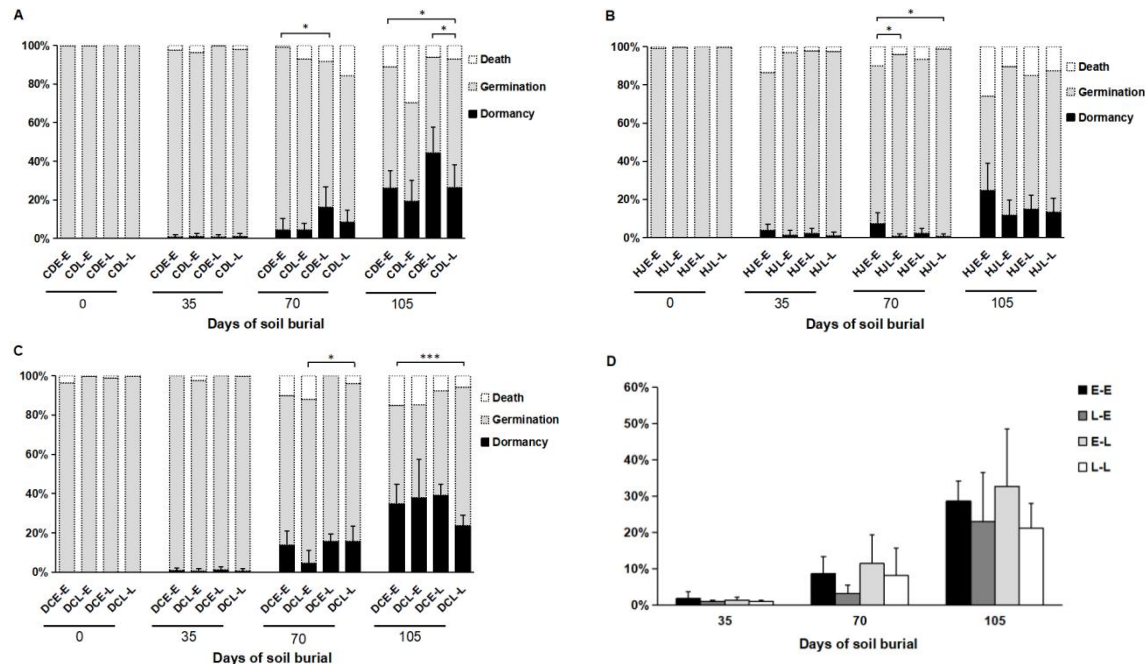


图 1. 杂草稻群体 9℃埋土处理不同时间后的休眠率、萌发率和死亡率。

A.来自赤豆村（CD）的杂草稻群体，B.来自和家村（HJ）的杂草稻群体，C.来自东村（DC）的杂草稻群体，D.早季同质园收获的早季群体（E-E），早季同质园收获的晚季群体（L-E），晚季同质园收获的早季群体（E-L），晚季同质园收获的晚季群体（L-L）。通过双样本 T 检验对早、晚季杂草稻群体间的种子平均休眠率差异进行检验，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ 。误差线代表标准误差。

3.2 植物激素含量/比例的变化可能诱导非休眠性杂草稻群体种子产生次生休眠性

激素检测结果显示，七种与种子休眠相关的植物激素（ABA、IAA、ACC、SA、JA、JA-ILe、cis-OPDA）含量在低温埋土处理后发生了明显变化（图 2），表明低温埋土过程影响杂草稻种子中植物激素的水平，从而诱导杂草稻种子产生次生休眠。另外，ABA、JA、JA-ILe、IAA、SA 和 cis-OPDA 的含量在埋土处理后的杂草稻种子中明显下降，表明这些激素的减少可能引起杂草稻种子休眠性的产生。然而，未发现早、晚季杂草稻群体种子在激素含量上有显著差异，可能是因为早、晚季杂草稻群体之间的次生休眠性差异不够大，在激素水平上还无法表现出显著性差异。

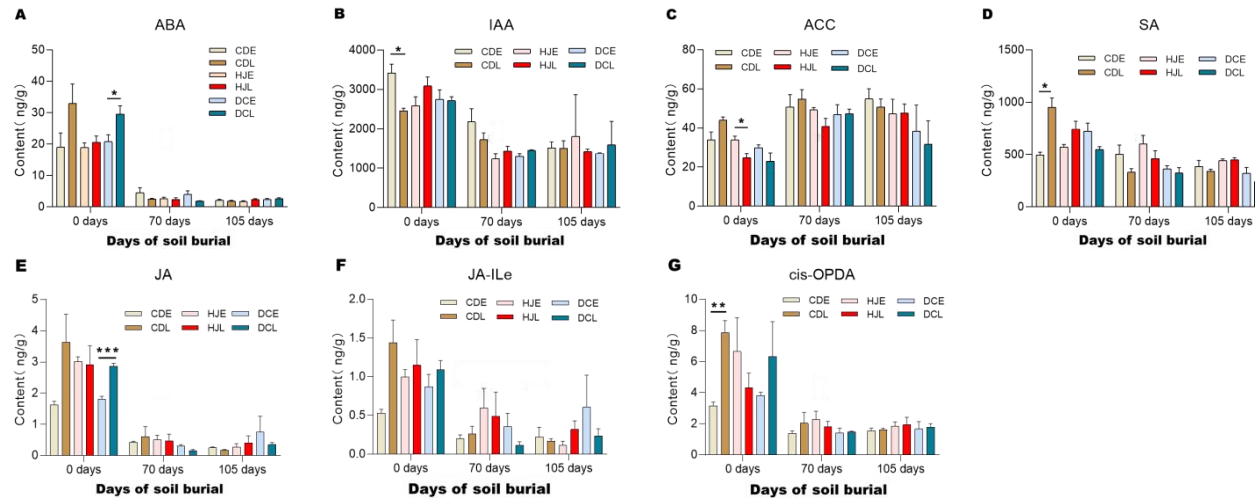


图 2. 不同埋土处理时间的杂草稻群体种子中的植物激素含量变化。

0 天, 在低温下吸胀处理的种子; 70 天, 低温埋土处理 70 天的种子; 105 天, 低温埋土处理 50 天的种子。通过双样本 T 检验对早、晚季杂草稻群体间的激素含量差异进行检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。误差线代表标准误差。

3.3 与种子萌发和休眠相关的基因甲基化可能诱导非休眠性杂草稻群体种子产生次生休眠性

我们利用甲基化特异性 PCR 检测了未埋土处理的干种子和低温埋土处理 70 天的种子中 *SDR4* 基因的甲基化状态。结果发现, 未埋土处理的干种子中 *SDR4* 基因甲基化程度很低, 而低温埋土处理 70 天的种子中 *SDR4* 基因发生了明显的甲基化 (图 3), 表明该基因的甲基化可能引起杂草稻的次生休眠。

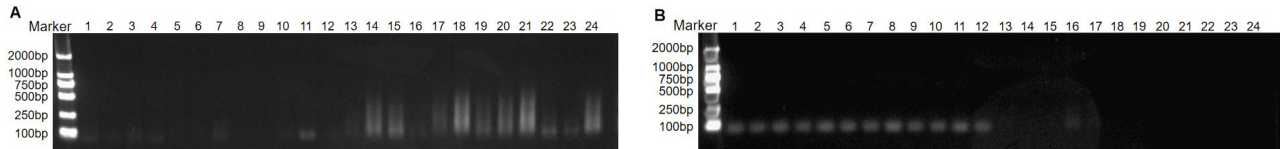


图 3. 甲基化特异性 PCR 检测 *SDR4* 基因的甲基化状态。

A. 未进行埋土处理的干种子。B. 低温埋土处理 70 天的种子。选取了 6 个杂草稻群体, 每个群体两个重复。CDE: 1-2, 13-14; CDL: 3-4, 15-16; HJE: 5-6, 17-18; HJL: 7-8, 19-20; DCE: 9-10, 21-22; DCL: 11-12, 23-24。泳道 1-12 为用特异性结合甲基化 DNA 的引物扩增的 PCR 产物, 泳道 13-24 为用特异性结合未甲基化 DNA 的引物扩增的 PCR 产物。

4 讨论和展望

本文利用低温埋土能够诱导杂草稻种子产生次生休眠这一特性, 设计了梯度时间的低温埋土实验, 证明了来自同一块早、晚季稻田中的杂草稻种子经过低温埋土后确实会产生不同程度的次生休眠性。这表明在自然环境条件下, 早、晚季杂草稻群体种子在土壤中经历不同时间后, 能够诱导产生不同程度的次生休眠性, 并可能产生了一定分化。但是, 我们的结果没有显示出显著差异, 这可能是相比于稻田中数以万计的种子, 本实验所用种子数量过少, 难以使发生在稻田中的显著性差异在本实验中得到体现。

在广东雷州地区, 早季稻种植时间为农历一月底到五月底, 生长周期约为 120 天; 晚季稻种植时间为农历六月底到十月初, 生长周期约 100 到 110 天。早季稻成熟到晚季稻种植之间只有约一个月的时间, 说明早季杂草稻种子在成熟落入土壤后, 需要在这一个月迅速进入休眠, 才能避免在晚季稻播种前萌发。而晚季稻成熟到下一季早季稻种植之间有足足四个月的时间, 晚季杂草稻种子只需在这段时间内进入休眠就可以避免在早季稻播种前萌发。这表明早季杂草稻群体的种子进入休眠的需求更为迫切, 或许可以解释早季杂草稻群体的种子为什么有比晚季杂草稻群体的种子更强的诱导次生休眠的能力。

低温埋土后杂草稻种子植物激素含量变化结果, 表明低温埋土过程可以影响杂草稻种子中某些关键植物激素的水平, 从而诱导原本不具有休眠性的杂草稻种子产生次生休眠。先前的一些研究报道 JA 含量的增加会促进种子发芽^[6], 我们的研究结果与这些报道也大致相符。ABA、IAA、SA 和 cis-OPDA 含量的增加会抑制种子发芽并诱导种子休眠^{[7][8][9][10]}, 然而我们的研究结果与此相悖。因此, ABA、IAA、SA 和 cis-OPDA 的相互作用以及在调节杂草稻种子萌发与休眠过程中的实际功能, 仍需要进一步研究。

在低温埋土实验中, 我们发现早、晚季同质园繁育一代的同一杂草稻群体种子休眠率之间有差异, 但有的表现为在早季种植可以提高种子诱导休眠的能力, 有的表现为在晚季种植可以提高种子诱导休眠的能力。这表明种植季节会对杂草稻种子产生一定的影响, 我们猜测这种影响可能是不同种植季节的环境因素使种子在表观遗传修饰上产生差异。因此进行了 DNA 甲基化检测实验, 证明了产生次生休眠的杂草稻种子中与休眠相关的功能基因 *SDR4* 确实发生了甲基化, 表明该基因的甲基化可能与原本不具有休眠性的杂草稻种子产生次生休眠有关。先前的研究报道 *SDR4* 受一种子成熟调控基因 *OsVPI* 的正向调控, 并且依次正调控 3 个种子成熟的相关蛋白基因 *OsDOGI-like* 并抑制萌发后基因的表达, 这表明 *SDR4* 在种子成熟过程中起到介导种子休眠的作用^[11]。然而我们的研究发现, 在产生次生休眠的种子中, *SDR4* 甲基化程度较高, 可能会使 *SDR4* 沉默表达, 因此 *SDR4* 基因在种子次生休眠中的作用尚需进一步研究。

总之, 我们针对雷州地区双季稻田中早、晚季杂草稻群体的研究揭示了早、晚季水稻田中杂草稻群体在诱导次生休眠的能力上发生了分化。对雷州地区双季稻田中杂草稻群体种子次生休眠形成原因的探究, 将有助于我们理解植物的快速适应性进化, 并为将来制定有效的杂草稻防治方法提供理论依据。例如根据杂草稻种子在土壤中可以诱导产生次生休眠的特性, 我们建议水稻收割后不要立即翻耕。未来的研究, 可以进一步以早、晚季稻田中杂草稻群体为对象, 通过设计并模拟自然条件下的埋土环境来检测早、晚季杂

草稻群体种子的次生休眠程度是否具有显著差异，并且可以通过种子繁育的方法验证这种差异是否可以在后代中稳定保持（遗传效应）。

参考文献

- [1] Taiz L, Zeiger E, Møller I M & Murphy A. (2015) Plant Physiology and Development. *Sinauer Associates*.
- [2] Jiang, X. Q., Zhu, X. Y., Lu, B. R. (2021). Soil burial induced dormancy in weedy rice seeds through hormone level changes: Implications in adaptive evolution and weed control. *Journal of Systematics and Evolution*. 00:1-13.
- [3] Delouche J C, Labrada R, Rosell C. et al. (2007). Weedy rices: origin, biology, ecology and control. *Rome: Food & Agriculture Organization of the United Nations*.
- [4] He, Z., Jiang, X., Ratnasekera, D., Grassi, F., Perera, U., & Lu, B. R. (2014). Seed-mediated gene flow promotes genetic diversity of weedy rice within populations: implications for weed management. *PloS one*, 9(12), e112778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112778>
- [5] Lakon G. (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant physiology*, 24(3), 389 – 394. <https://doi.org/10.1104/pp.24.3.389>
- [6] Singh, P., Dave, A., Vaistij, F. E., Worrall, D., Holroyd, G. H., Wells, J. G., Kaminski, F., Graham, I. A., & Roberts, M. R. (2017). Jasmonic acid-dependent regulation of seed dormancy following maternal herbivory in Arabidopsis. *The New phytologist*, 214(4), 1702 – 1711. <https://doi.org/10.1111/nph.14525>
- [7] Holdsworth, M. J., Bentsink, L., & Soppe, W. (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *The New phytologist*, 179(1), 33-54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x>
- [8] Xie, Z., Zhang, Z. L., Hanzlik, S., Cook, E., & Shen, Q. J. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant molecular biology*, 64(3), 293-303. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9152-0>
- [9] Dave, A., & Graham, I. A. (2012). Oxylin Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA). *Frontiers in plant science*, 3, 42. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00042>
- [10] Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H. Q., Luan, S., Li, J., & He, Z. H. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), 15485-15490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304651110>
- [11] Sugimoto, K., Takeuchi, Y., Ebana, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hara, N., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Ban, Y., Hattori, T., & Yano, M. (2010). Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 5792-5797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911965107>