

玉米子粒和果穗离体培养技术 及其应用研究进展

张凤路 王志敏 赵 明 王树安

(中国农业大学农学系, 北京 100094)

Progress on Technique and Application of Maize Kernel and Ear Culture *In Vitro*

Zhang Fenglu Wang Zhimin Zhao Ming Wang Shu'an

(China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The method of maize kernel *in vitro* culture and its application in the physiological study on kernel development were reviewed in this paper, and *in vitro* ear culture system was also set up.

Key Words: Maize; *In vitro* ear culture system; *In vitro* culture of maize Kernels; Kernel development

摘要 本文对玉米籽粒离体培养技术及其在子粒发育生理研究中的应用进行了评述,并提出了果穗离体培养方法。

关键词 玉米 籽粒离体培养 穗离体培养 籽粒发育

子粒的生长发育受到母体的控制。由于大田试验中采用的试验材料及试验条件等因素的不同,往往试验结果的可比性降低。与整株条件下的研究相比,离体培养条件可以排除母体的干扰,并可很方便地对培养基成分及培养环境进行调控,因此,离体培养技术已为越来越多的人所采用^[13,23,24]。早在1943年Keller^[20]就采用离体培养技术研究了小麦穗对养分的吸收利用问题,但玉米籽粒离体培养系统的建立始于Gengenbach(1977)^[4]开创性的工作。他将完整的玉米子房从果穗上切下,培养在琼脂培养基上,经人工授粉后有46%的子房受精,大约有5%的最初子房可发育成正常粒,60%的子粒在试验条件下发芽。该技术自建立至今经过不断发展完善,正日益广泛地应用于玉米生长发

育与环境关系^[12,18]、营养物质吸收运转^[8,15]、激素调控^[16]、基因表达^[14]等生理生化研究中。

目前对幼雌穗^[22,23]及吐丝期未受精果穗^[3]离体培养已有报道。而对授精后果穗离体培养的试验报道尚未见到。本文结合我们的实践,评述了籽粒离体培养研究进展,并提出了授精后果穗离体培养方法。

1 子粒离体培养技术

1.1 培养基

Gengenbach(1977)采用的培养基为经Gengenbach和Gree改良的RM培养基^[4],其中蔗糖15%,琼脂0.4%,pH为5.8。以后

的研究中多采用了这种培养基并做了某些修改,如 Jones (1981)⁽¹⁷⁾ 添加了 Oaks Beevers (1964) 所采用的氨基酸成分。由于这种培养基可较好地满足离体组织的要求,因此得到了广泛的采用。

最常用的 C 源为蔗糖,采用浓度在 5%~15% (W/V),常用 15%。Cobb (1988)⁽¹⁴⁾ 认为 8% 以上的蔗糖就可保证子粒生长至成熟。除蔗糖外,一些还原糖亦可作为营养来源⁽⁵⁾,但效果仍以蔗糖为优。 NH_4NO_3 是常用 N 源,亦有以谷氨酰胺作唯一 N 源的⁽¹⁶⁾。

固体培养基是离体培养常用的形式,琼脂含量在 0.4%~12%。Singletary (1989)⁽⁸⁾ 曾用 250ml 三角瓶,盛 94ml 液体培养基,用 2×55mm 铝条作支架,上覆滤纸,将粒块放在纸上,使液面在子粒以下而与切块的穗轴部分接触,获得理想的培养效果。

1.2 子粒离体处理

离体培养可在授粉前进行^(4,21),但为研究子粒的生长发育多采用受精后的果穗作培养材料。大田玉米经套袋、人工授粉后 2~7 天取回,在室内取穗块培养。随研究目的不同,切取穗块的大小及部位亦不同。早期,在 Gengenbach 等人的研究中,切块为双行,每行 5~6 粒⁽¹⁴⁾。以后为了能达到最大的粒重多采用减少粒块上子粒数目的方法,按粒:轴=1:6 的方式切取穗块^(6,9,19)。近年来离体培养有向培养多粒方向发展趋势。

1.3 离体培养的污染控制

因外植体体积较大,给灭菌工作带来不少困难。对外植体表面灭菌的效果如何直接影响培养的成败。用 1% NaOCl 或 70% 酒精灭菌是常用的灭菌方法。经过对不同灭菌方法进行比较研究认为⁽¹⁾,用 0.1% HgCl_2 消毒 5 分钟,之后用无菌水冲洗,灭菌效果较好。因 HgCl_2 毒性很强,在严格限定灭菌时间同时,冲洗一定要干净彻底,否则会使培养材料中途变褐坏死。

1.4 离体培养的环境条件

1.4.1 光 子粒离体培养多是在黑暗中进

行,可能是为了造成与大田生长果穗所处的黑暗条件相似的生长环境。但也有试验表明光对子粒发育具有一定作用,在可控光温培养箱内采用 16/8hr 光暗交替,100~150 $\mu\text{E} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ 光强,子粒可良好发育⁽¹⁾。光对籽粒发育的效应仍待进一步研究。

1.4.2 温度 离体培养的温度一般为 26~30℃。Jones^(18~20) 曾对离体培养条件下温度对子粒发育的影响作过系列研究,认为与 10℃、15℃、35℃ 相比在 30℃ 条件下培养所得的粒重较高。值得注意的是以上培养多是恒温条件,与大田生长子粒所处的变温环境是不同的。据研究⁽¹⁾,采用昼夜 26~28℃/22~24℃ 培养,可取得良好效果,另外,合适的湿度条件也是离体培养所必须的。

1.5 离体培养下子粒的生长

1.5.1 子粒生长持续期 一般而言离体培养子粒约需 30~35d 可达生理成熟⁽⁵⁾。但也有达 40~50d 的报道⁽¹⁹⁾。定期更换培养液可能使籽粒生长期延长。生育期的长短也可能与营养供应水平有关,KOshimamoto⁽¹⁵⁾ 发现,在 50ml 培养基上,培养带 4 粒的外植体仅 5% 的蔗糖就可使籽粒在 2 周内正常生长。而 Hanft (1986)⁽¹²⁾ 发现在粒:轴=6:6 的培养条件下约 60% 的子粒因对养分的竞争而缩短生育期乃至中期败育。

1.5.2 粒重 一般而言,将果穗中部粒块离体培养其最终粒重只是同期大田生长的 70%~90% 左右⁽¹⁸⁾。说明要达到和大田相同的粒重水平培养条件尚待进一步改进。但是以果穗顶端子粒早期培养可获得比大田顶部粒更大的粒重⁽¹¹⁾。这为研究果穗顶部子粒的生长与败育问题提供了新的实验手段。

2 果穗离体培养技术

与子粒离体培养相比,果穗离体培养可以很方便地研究果穗输导系统的建成、营养物质在整个果穗上的分配、不同位势间子粒库的建成及粒间竞争等,尤其对子粒发育及败育研究是一很好实验手段。经过我们研究,

初步建立了果穗离体培养方法。

2.1 培养基

经过对多种培养基进行比较、筛选,最后确定的培养基为:大量元素用 MS 培养基加倍,微量元素用 MS 培养基,维生素用 ER 培养基,3.0mg/L 甘氨酸,80mg/L 肌醇,10%~15%蔗糖,0.8g/L 谷氨酰胺。培养液分装前要经高压灭菌或过滤灭菌(过 0.45 μ m 滤膜)。采用 500ml 广口瓶盛 200ml 液体培养基。

2.2 果穗离体处理

采用自交系冀 35,在大田吐丝前选株套雌穗,人工授粉后 2~4 天取穗培养。在大田取穗时要保留果穗上、下各 2 茎节和果穗叶,并避免对果穗的机械损伤。在室内先将离体材料插入水中,修整果穗上部茎节和果穗叶,保留穗上一节间和 1/5 的果穗叶。在水中剪去穗下节二节,仅保留穗下一节间。用 70%酒精或 1%NaOH 擦拭茎秆灭菌后,快速移植到培养瓶中,穗下节间插入瓶内,果穗露出瓶口外,在瓶口外用脱脂棉缠绕茎秆使整个外植体固定。

2.3 培养环境及污染控制

果穗离体培养可在室内灯光(60W/m²)下进行。有条件的可在培养室或大型培养箱内进行培养,控制污染是离体培养首要解决的问题。要控制培养环境的菌量和温度(18~22℃)。对培养瓶、培养基及外植体都要严格灭菌。在分装培养液时要防止营养液沾在瓶口。外植体要用脱脂棉固定好,防止培养瓶倾倒沾湿脱脂棉,造成菌类污染。

王志敏(1994)^[2]曾报道一种简易的培养基灭菌方法,采用在培养液中加浓硫酸(0.05%,V/V)的方法,可在一定时期内有效防止菌类污染。经过我们试验,在培养基灭菌后,往培养基中添加少量亚硫酸(达 0.3%,V/V)可在 7~10 天内保持无菌环境(培养液 pH 在 3.0 左右)待培养液变浊后,可进行换液继续培养直到生理成熟,在换液前要在水面下切去 0.5cm 左右穗下茎节以保持输导

系统畅通。在插入培养瓶前要对穗下茎节进行表面灭菌。离体穗培养最终粒重可达大田对照粒重的 60%左右。

3 子粒离体培养技术的应用研究

3.1 C、N 供应与玉米子粒发育

Singletary(1989)^[9]在离体条件下研究了 C、N 物质供应与子粒发育的关系。供给低水平蔗糖(234mM)限制了胚乳中淀粉的累积;在高糖浓度下(468mM)胚乳中淀粉及蛋白质含量随 N 供应(0~13.4mM 纯 N)增加而增加。当 N 浓度超过 72mM 后淀粉累积受到影响,在培养基中 N 浓度达 36mM 时胚乳含 N 量达高峰。醇溶蛋白(Zein)的含量随 N 增加而增加,当 N 超过 36mM 后,谷蛋白(glutelin)含量稳定而清蛋白/球蛋白含量下降。Singletary(1990)^[9]进一步研究了培养基无 N(-N)、适量 N(+N)和前期缺 N 后期补 N(+N)处理对子粒发育的影响。与+N 处理相比,-N 处理使胚乳淀粉及蛋白质累积量均减少。而后期增 N 处理(+N)可使二者含量得到一定恢复。在 N 胁迫下,较高的糖分浓度对淀粉的累积影响不大。增加 N 素明显增强了蔗糖合成酶、磷酸果糖激酶及已糖激酶活性,认为缺 N 对淀粉沉积的影响是通过对一些关键性蛋白质的合成起作用的。Czyzewicz(1994)^[24]采用控制培养基 N 浓度(在 0~50mM)研究了 8 个单交种、4 个自交系对 N 的吸收利用问题,发现所有基因型对 N 的累积模式是相似的,达到最高子粒 N 所需 N 量要大于达最高子粒干重所需的 N 量。不同基因型对 N 的利用存在差异。

3.2 温度对子粒发育的影响

Jones(1981,1984,1985)^[17-19]等人采用离体培养方法对子粒发育与温度的关系进行了系列研究。将子粒分别培养在 15℃、30℃和 35℃下并以大田玉米作对照,发现 35℃下培养 7d 可获得比其它处理较大的干重,但 14d 后生长停止而败育。由于败育粒中含高浓度的糖分,说明淀粉的合成可能受阻。与

30℃培养相比,15℃下培养的子粒尽管生长期拉长三倍,但仍不能弥补因较低的子粒生长速率造成的损失。冷凉温度对蛋白质合成影响不大,线性灌浆期的长短受该期温度状况的调节,而灌浆期速率则与缓慢灌浆的温度关系密切。子粒缓慢灌浆期的温度状况直接影响到子粒库的潜势。研究发现在15℃下子粒重的下降主要是淀粉数量减少所致,而在35℃下淀粉粒数和胚乳细胞数都减少了。

Hanft (1986)^[11]研究发现,与正常粒相比,35℃高温造成的败育粒小穗柄(pedicle)中含有高浓度的蔗糖和低浓度的葡萄糖和果糖。小穗柄中可溶性酸性转化酶的活性亦较低。从而认为高温通过影响转化酶的活性,间接影响了蔗糖的卸载,并进而影响了胚乳中淀粉的合成。

3.3 植物生长调节剂对子粒发育的影响

利用离体培养方法可以研究植物生长调节物质对子粒发育的直接影响。为探讨乙烯与子粒败育的关系,Hanft (1990)^[12]研究了离体条件下ACC对子粒发育的影响。在培养基中加入ACC,造成了子粒败育增加,并降低了成熟子粒粒重。而当在培养基中加入乙烯作用位点抑制剂NBD(2,5-norbornadiene)则可很大程度抑制ACC的作用。ACC对子粒发育的影响主要在子粒形成阶段,并随培养基中蔗糖浓度的提高影响程度加重。此试验证明了乙烯是引起子粒败育的重要原因。

Myers (1990)^[16]等人研究了离体培养子粒胚乳细胞分裂与ABA的关系。将授粉后5天(5DAA)采回的果穗节片培养在含90mM(±)-ABA的培养基上,导致胚乳细胞数减少,11DAA取样培养对胚乳细胞数影响不大。ABA含量对胚乳细胞的鲜重影响较小,但与胚乳细胞数量呈显著负相关($R = -0.92$),认为在子粒发育前期提高ABA浓度会影响胚乳细胞分裂进而影响到子粒库容。王纪华(1994)^[1]在3-11DAA取样培养添加1-25mg/LGA₃均抑制子粒发育,添加10ml/

L的赤霉素抑制剂BA-984可降低GA₃的不利效果。添加0.1-2.5mg/LABA对离体果穗的子粒发育有促进作用。ABA对子粒发育的影响仍需探讨。

总之,子粒离体培养技术为研究子粒发育及粒重的调控因素提供了有效的实验手段。我们提出的果穗离体培养方法对于研究穗粒数的形成、粒间竞争及果穗的发育也可能具有重要价值,目前,我们正在开展该方法的应用研究。

参 考 文 献

- 1 王纪华. 玉米子粒败育机理及发育调控研究. 北京农业大学博士生论文, 1995
- 2 王志敏. 小麦穗离体培养的简化方法. 北京农业大学学报, 1994, 20(3): 20
- 3 黄国中等. 玉米雌穗离体培养诱导孤雌生殖结实. 遗传学报, 1995, 22(3): 230-238
- 4 Gengenbach TC. 1977. Development of maize caryopses resulting from in vitro pollination. *Planta*, 134: 91-93
- 5 Cobb BG. 1988. The effects of modifying sucrose concentration on the development of maize kernels grown in vitro. *Annals of Botany*, 62: 265-270
- 6 Cully DE. 1984. Endosperm protein synthesis, and L-(35S) methionine incorporation in maize kernels cultured in vitro. *Plant Physiol.* 74: 389-394
- 7 Felker FC. 1992. Participation of cob tissue in the uptake of medium components by maize kernels cultured in vitro. *J. Plant Physiol.* 139: 647-652
- 8 Singletary GW. 1989. Growth and composition of maize kernels cultured in vitro with varying supplies of carbon and Nitrogen. *Plant Physiol.* 89: 341-346
- 9 Singletary GW. 1990. Nitrogen-induced changes in the growth and metabolism of developing maize kernels grown in vitro. *Physiol.* 92: 160-167
- 10 Afuakwa JJ. et al. 1984. Effect of temperature and sucrose availability on kernel black layer development in maize. *Crop Sci.* 24: 285-288
- 11 Hanft JM. 1986. Kernel abortion in maize. I. Carbohydrate concentration patterns and invertase activity of maize. *Plant Physiol.* 81: 503-510
- 12 Hanft JM. 1986. Dry matter accumulation and carbohydrate concentration patterns of field-grown and in vitro cultured maize kernels from the tip and middle ear positions. *Crop Sci.* 26: 568-572

- 13 Hanft JM. et al. 1990. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on maize kernel development *in vitro*. J. plant Growth Regul. 9(2):89-94
- 14 Cobb BG. 1986. Sugar utilization by developing wild-type and shrunken-2 maize kernels. Plant Physiol. 80: 609-611
- 15 Shimamoto K. 1981. Movement of C-compounds from maternal tissue into maize seeds grown *in vitro*. Plant Physiol. 67:429-432
- 16 Mayers PN. et al. 1990. Absciscic acid inhibition of endosperm cell division in cultured maize kernels. Plant Physiol. 94:1330-1336
- 17 Jones RJ. 1981. Temperature effects on *in vitro* kernel development of maize. Crop Sci. 21:761-767
- 18 Jones RJ. 1984. Thermal environment during endosperm cell division and grain filling in maize. Crop Sci. 24:133-137
- 19 Jones RJ. 1985. Thermal environment during endosperm cell division and grain filling in maize; Effects on number of endosperm cells and starch granules. Crop Sci. 25:830-834
- 20 Keller W. 1943. Seed production on grass culms detached prior to pollination. J. Am. Soc. Agron. 35:617-624
- 21 Gengenbach BG. 1977. Genotypic influences on *in vitro* fertilization and kernel development of maize. Crop Sci. 17(4):489-492
- 22 Bommioneni VR. 1987. *In vitro* culture of ear shoots of *zea mays* and the effect of kinetin on sex expression. Amer. J. Bot. 74(6):883-890
- 23 Pinthus MJ. 1994. Maize topmost axillary shoot interference with lower ear development *in vitro*. Crop Sci. 34:458-461
- 24 Czyzewicz JR. 1994. Genotypic variation for nitrogen uptake in maize kernels grown *in vitro*. Crop Sci. 34: 1003-1008