

外源施加多胺对提高玉米种子耐冷性的研究

王 成¹ 李月明¹ 郝 楠¹ 白 添²

(¹ 辽宁省农业科学院玉米研究所, 沈阳 110161; ² 辽宁省东北育才超常教育实验部, 沈阳 110161)

摘要:以玉米耐冷自交系辽 2386 和冷敏感自交系辽 6082 为材料,研究了以外源施加精胺(Spm)和亚精胺(Spd)作为引发病,对玉米种子吸胀中的耐冷性、发芽能力和苗期生物量的影响,探讨利用外源多胺缓解玉米低温胁迫的相关机制。结果表明,种子经 Spd 和 Spm 引发低温(5℃)吸胀后,辽 6082 发芽率为 93%,和引发前相比显著提高了 12%,且苗高显著提高了 44.62%,苗鲜重显著增加了 26.76%。同时,Spd 和 Spm 引发提高了低温胁迫期间两自交系胚中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性,降低了丙二醛(MDA)的含量。自交系辽 2386 在种子吸胀期间的耐冷性强于辽 6082,而不同自交系、不同器官对多胺敏感性不同。总之,Spd 和 Spm 处理能提高玉米种子吸胀期间的耐冷性,提高低温胁迫下种子的抗氧化能力和发芽能力。

关键词:多胺;玉米自交系;低温胁迫;发芽;抗氧化酶

玉米是温度敏感性作物,在种子吸胀期间如遇低温,极易发生吸胀冷害,造成后期成苗率显著下降,使玉米大幅减产^[1]。当植物遭遇低温胁迫时,细胞内会积累大量的氧自由基,细胞膜透性增大,造成

基金项目:辽宁省博士启动基金(20170520433);国家自然科学基金青年基金(31701441)

后继研究专题,主要是针对 PH6WC 等 Reid 系有较强配合力的父本系(Lancaster)组配基础材料,进行单倍体育种,以提高育种效率。本研究所获得的 DH 系均为父本系,与以 PH6WC 等 Reid 系为母本系组配杂交种,理论上将有良好育种效果。

在 DH 系群体田间综合鉴定方面,杂交组合材料(15D969×PH4CV)3 个超多穗行数 DH 系和回交组合材料(15D969×A6)5 个超多穗行数 DH 系,均兼有良好的抗病性、株型、果穗性状,说明超多穗行数基因型与优良农艺性状是可兼顾的。

在单倍体自交结实率方面,杂交组合材料(15D969×PH4CV)高于回交组合材料,说明杂交组合材料单倍体群拥有较多优良发育基因,107 份 DH 系应该具备更高配合力的潜力。

在超多穗行数基因型表达概率方面,回交组合材料(15D969×A6)超多穗行数基因型占 DH 系总数量 7.2%,穗行数 30 行基因型占 DH 系总数量 1.4%。穗行数 30 行基因型得以重现,说明决定超多穗行数

氧化胁迫伤害^[2]。多胺被认为是植物体内的生长调节物质,是一类具有生物活性的低分子量脂肪族含氮碱的总称,最常见的包括精胺(Spm,spermine)、亚精胺(Spd,spermidine)和腐胺(Put,putrescine),具有调节植物生长发育和响应逆境胁迫尤其是减少氧化胁迫伤害等作用^[3-6]。Kamiah 等^[7]研究表明,当

基因群具有一定程度整体功能性和可遗传性。

杂交组合材料(15D969×PH4CV)超多穗行数基因型占 DH 系总数量 0.45%,穗行数 28 行基因型占 DH 系总数量 0.3%,比张铭堂等^[5]研究的玉米花粉化学诱变隐性基因突变率高 0.14%~0.2%,说明玉米单倍体育种在挖掘稀有种质资源方面具有重要现实意义。

参考文献

- [1] 李忠南,王越人,郭生辉,曲海涛,许正学,李光发. 玉米超多穗行数 DH 系 15D969 的发现. 中国种业,2018(2): 68-70
- [2] 吴鹏昊,任姣姣,田小龙,刘晨旭,刘文欣,陈绍江. 玉米单倍体自然加倍若干问题探讨. 玉米科学,2016,24(4): 7-11
- [3] 李忠南,王越人,郭生辉,曲海涛,许正学,李光发. 玉米红白单倍体育种选择效应研究. 作物杂志,2017(5): 61-65
- [4] Zhang M T, Edward H. Doubled haploids. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 2009, 63: 127-142
- [5] 张铭堂,才卓. 美国玉米诱变(花粉 EMS)育种的商业化实施典例. 玉米科学,2017,25(3): 19-22

(收稿日期: 2019-04-10)

植物幼苗遭遇盐胁迫时外源施加多胺能有效提高其抗性;当植物遭遇水胁迫时,生长发育会明显受到抑制,而 Duan 等^[8]的研究结果显示外源施加多胺能有效缓解水胁迫抑制作用。在玉米中的研究表明,叶面喷施外源多胺能显著提高夏玉米灌浆前期抗涝性^[9];当玉米幼苗遭受镉(Cd, Cadmium)胁迫时,多胺也能显著促进幼苗的生长,降低胁迫伤害^[10];崔宝明^[11]研究认为外源多胺可在一定程度上促进玉米幼苗的再生,增加株高、叶长、叶宽、鲜重,并提高其根系活力。

种子的萌发是由种子活力和外界环境因素共同决定的,而非生物胁迫是限制种子萌发的重要因素。引发剂是一类化学物质,而通过种子引发等化学调控方法能有效增强植物温度逆境耐性^[12]。目前关于低温对玉米种子萌发的研究较多,但大多集中在对发芽势、发芽率和活力指数等形态指标的研究上,而对外源引发剂施用对玉米种胚生理生化和萌发特性调控机制的研究较少。基于此,本研究以对低温敏感性不同的辽宁地区骨干自交系为研究材料,研究在低温胁迫下,外源施加 Spm 和 Spd 对玉米种子萌发、苗期生长和抗氧化酶活性等指标的影响,分析多胺施用与低温胁迫之间的关系,探讨利用外源多胺缓解玉米种子低温胁迫的相关机制,以期对种子引发技术在玉米生产上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为本实验室前期筛选的玉米耐冷自交系辽 2386 和冷敏感自交系辽 6082。

1.2 试验设计 试验采用完全随机区组设计,4次重复。

1.2.1 种子引发处理 在垫有两层滤纸发芽盒中均匀排列 50 粒玉米种子,加入 Spm (0.25mmol/L)、Spd (0.25mmol/L) 溶液各 10mL 和 NaClO (0.3%) 溶液 1mL,在 15℃ 黑暗条件下引发 72h。引发结束后,将种子用蒸馏水快速冲洗 3 次,吸干表面水分,于 25℃ 阴凉通风处放置 3d。对照为经 NaClO (0.3%) 溶液消毒 10min 而未引发的种子。

1.2.2 种子低温吸胀发芽 采用人工模拟低温的试验,将 2 个玉米自交系种子在 5℃ 黑暗条件下蒸馏水低温吸胀 48h 后,按照 GB/T3543.4-1995 标准发芽试验规程^[13],采用沙盘培养法在 25℃ (光照 12h/d) 的

恒温培养箱(三洋 MLR-351H)进行发芽试验。

1.3 测定项目与方法 调查发芽 7d 后玉米种子的发芽数,并计算发芽率,测定苗长、根长、苗鲜重、根鲜重、苗干重和根干重等性状指标。

发芽率 = 发芽试验末期规定日期内正常的发芽种子数 / 供试种子数 × 100%。

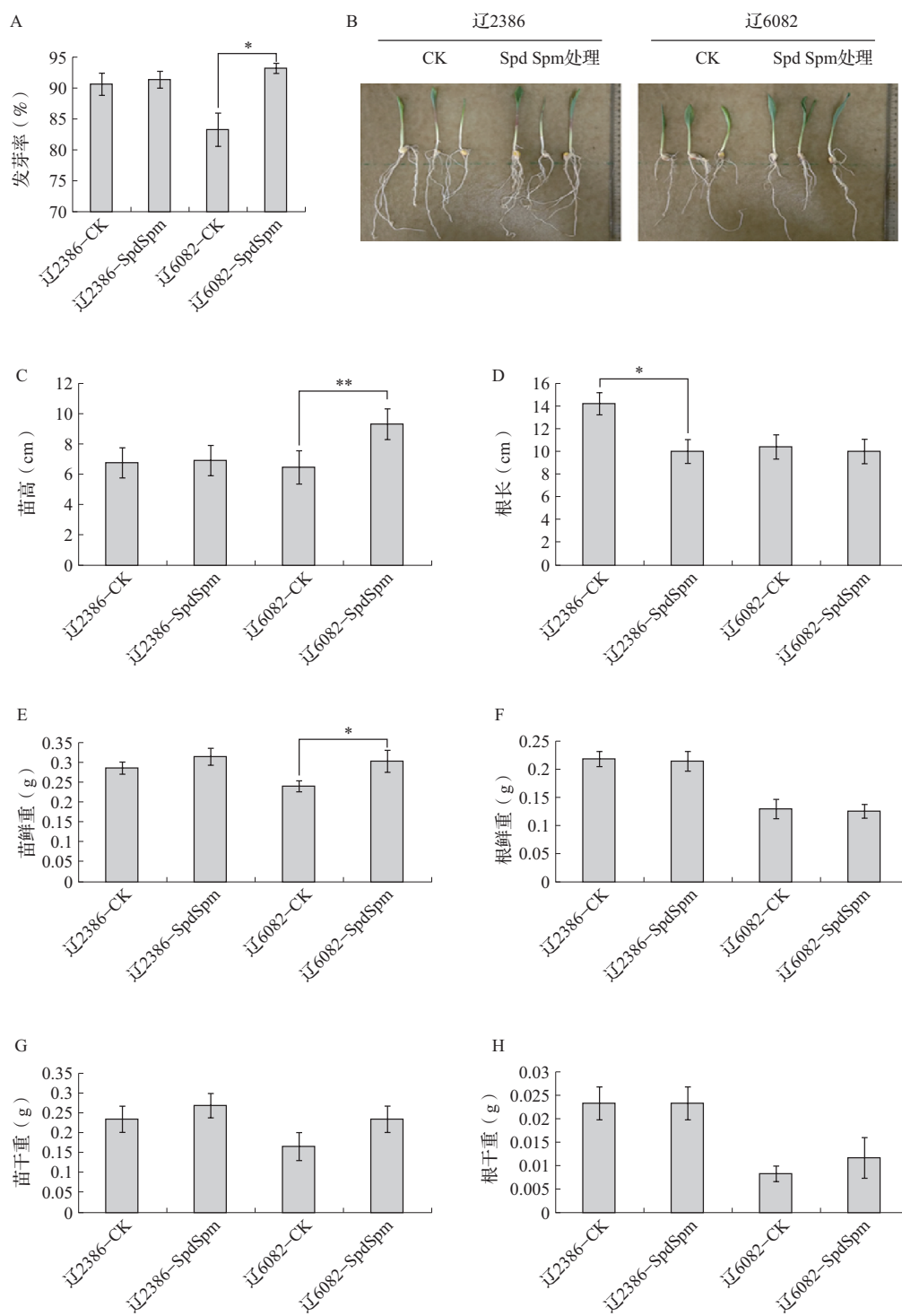
玉米种子在 5℃ 低温黑暗条件下分别吸胀 0h、12h、24h、36h 和 48h 后,手工剥离种胚,测定丙二醛(MDA)含量和过氧化歧化酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,3次重复。MDA 含量测定采用硫代巴比妥(TBA)显色反应法,POD 活性测定采用愈创木酚法,SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法,具体参照张蜀秋^[14]的方法。

1.4 数据分析 采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 多胺引发对玉米种子发芽和苗期生物量的影响 耐冷自交系辽 2386 低温吸胀后发芽率为 90%,冷敏感自交系辽 6082 低温吸胀后发芽率仅为 83%。种子经多胺引发后,辽 2386 的发芽率为 91%,和引发前差异不显著,而辽 6082 发芽率为 93%,和引发前相比显著提高了 12% (图 1A)。玉米苗期生物量测定结果显示:种子经多胺引发后,不同自交系苗期表型差异较大(图 1B)。辽 2386 苗高和根长分别为 $6.88 \pm 1.13\text{cm}$ 和 $10.06 \pm 1.04\text{cm}$,和未引发种子相比,苗高差异不显著,而根长显著降低了 29.08%;辽 6082 苗高和根长分别为 $9.28 \pm 0.37\text{cm}$ 和 $10.07 \pm 0.26\text{cm}$,和未引发种子相比,根长差异不显著,而苗高显著提高了 44.62% (图 1C 和 D)。对苗鲜重、根鲜重、苗干重和根干重等指标进行分析,辽 6082 种子经多胺引发后苗鲜重显著提高了 26.76% (图 1E),其他指标差异不显著(图 1F~H)。结果表明,玉米不同自交系及不同器官对多胺敏感性不同,施加该浓度的多胺引发剂对低温条件下冷敏感自交系种子生长和发育具有很好的促进作用。

2.2 低温吸胀期玉米胚中 MDA 含量和抗氧化酶活性的变化 对胚中 MDA 含量进行分析,结果显示,随着 5℃ 低温吸胀时间的延长,辽 2386 多胺引发前后胚中的 MDA 含量大体上呈现先下降后上升的趋势,而辽 6082 大体上呈现先上升后下降的趋势。未经引发处理的辽 6082 种胚中的 MDA 含量在 0h、



A: 发芽率; B: 苗期表型; C-H: 苗期生物量性状指标

*代表不同处理间差异达显著水平 ($0.01 \leq P < 0.05$), **代表不同处理间差异达显著水平 ($P < 0.01$)

图1 多胺引发对玉米种子低温吸胀后发芽率和苗期生物量的影响

12h、24h和48h 4个吸胀时期均高于辽2386,并分别在24h和36h先后达到峰值。两自交系种子经多胺引发后,胚中MDA含量均显著降低,且辽6082在大部分吸胀时期均高于辽2386(图2A)。

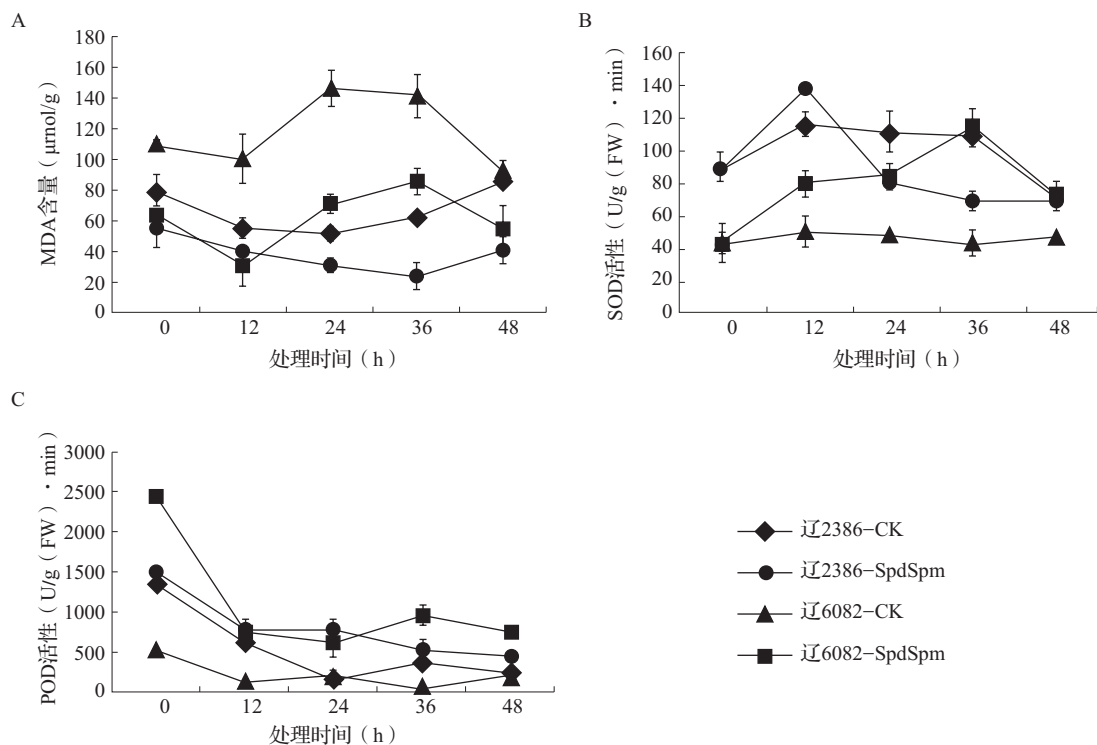
对胚中SOD活性进行分析,结果显示,随着

5℃低温吸胀时间的延长,辽2386和辽6082多胺引发前后胚中的SOD活性大体上呈现先下降后上升的趋势。辽2386未经引发处理的胚中SOD活性高于辽6082。经多胺引发后,辽2386胚中SOD活性在吸胀前期显著升高且在12h达到高峰后又逐渐下

降,而辽 6082 胚中 SOD 活性在大部分吸胀时期均显著升高,且在 36h 达到高峰(图 2B)。

对胚中 POD 活性进行分析结果显示,随着 5℃ 低温吸胀时间的延长,POD 活性大体上呈现下降趋

势,未经引发处理的辽 2386 胚中的 POD 活性在大部分吸胀时期均高于辽 6082,经多胺引发后,POD 活性均显著提高,辽 6082 提高幅度更大且在 36h 达到高峰(图 2C)。



A: MDA 含量; B: SOD 活性; C: POD 活性

图2 低温吸胀下胚中 MDA 含量以及 SOD 和 POD 活性

3 结论与讨论

吸胀冷害是指种子在低温下进行吸胀产生损伤,导致种子活力下降,影响种子的田间出苗率和幼苗的正常生长发育^[15]。玉米种子萌发的最适温度一般是 24~31℃,低温对种子活力指标有显著的抑制作用。不同的玉米自交系对温度敏感性差异较大,在本试验中,种子在 5℃ 黑暗条件下低温吸胀 48h 后,冷敏感自交系辽 6082 发芽率显著低于辽 2386,在种子吸胀中的低温胁迫期,从 MDA 含量和 POD、SOD 的活性测定分析结果中也可以看出,辽 2386 的膜脂过氧化程度较轻,而对氧自由基的清除能力和对低温逆境的适应性强于辽 6082。说明不同基因型玉米对低温的耐受性存在显著差异,这与前人研究结果^[16]相一致。

目前,对冷害机制研究较多,多数学者认为冷害对植物的伤害主要表现为膜损伤而引起的内部代谢紊乱。正常情况下,生物膜保持一定的流动性,当

遭遇冷害时,冷敏感植物的膜紧密收缩,使膜透性增大,导致细胞内的溶质外渗,同时酶系统遭受破坏,酶活性降低,严重时发生冷害死亡。而一些植物的膜系统修复能力较强,同时能够及时清除细胞内的氧自由基,提高低温逆境的适应性^[17]。MDA 为膜脂过氧化过程中,活性氧攻击细胞膜上的膜脂而产生,因此 MDA 含量是逆境生理研究中的一个标志膜脂过氧化程度的重要生理指标,而 POD 和 SOD 能够通过化学反应清除植物体内的氧自由基,保护植物细胞。一般认为,植物内部的 POD、SOD 活性与种子对低温逆境的适应性呈正相关,而 MDA 含量与种子对低温逆境的适应性呈负相关^[18],这与本研究所得结果相一致。

种子引发技术已被应用到不同植物种子生产实践中,引发后的种子出苗率高且整齐,苗期抗逆性好^[19-21],但国内玉米种子引发剂筛选研究较少。左冰云等^[22]研究表明以外源赤霉素(GA)作为引发

剂对玉米种子进行处理可显著提高玉米叶片的净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 浓度、单株叶面积、干物质积累量、光合色素含量以及百粒重和籽粒产量。王莉等^[23]以 GA 和 KCl 作为引发剂对玉米种子进行处理,结果表明引发剂可不同程度增强种子活力、提高发芽质量以及增强耐盐性。杜锦等^[24]研究表明玉米种子经 NaCl 溶液引发处理后,出苗率和苗期生物量均显著增加。以上研究筛选出了多种适宜玉米种子萌发的引发剂,为引发剂在玉米种子生产应用中奠定了基础。而多胺作为引发剂的研究较少,张彦萍^[25]研究结果证明多胺引发能够提高茄子种子活力及幼苗抗冷性。本研究主要是以低温敏感性不同的玉米作为材料,研究结果表明多胺引发剂 Spd 和 Spm 引发能有效提高吸胀中低温胁迫下种子的抗氧化能力和发芽能力,结合前人研究结果推测,多胺能够提高植物抗冷性的可能原因主要是多胺是一类具有生物活性的低分子量脂肪族含氮碱,可以以多聚阳离子的方式存在,同时可以结合带负电荷的核酸以及蛋白质等物质,从而激活一系列表达调控反应,调节抗氧化酶 SOD 和 POD 等活性,从而使植物产生抗冷性^[26-27]。因此,外源多胺引发处理这项技术的应用将对提高早春低温播种条件下玉米出苗率和成苗率具有重要的意义。

参考文献

- [1] 王琪,马树庆,郭建平,张铁林,于海,徐丽萍. 温度对玉米生长和产量的影响. 生态学杂志, 2009, 28 (2): 255-260
- [2] Lyons J M. Chilling injury in plants. Annu Rev Plant Physiol, 1973, 24: 445-466
- [3] Imai R, Ali A, Pramanik M H R, Nakaminami K, Sentoku N, Kato H. A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. Journal of Plant Physiology, 2004, 161 (7): 883-886
- [4] Liang Y L, Lur H S. Conjugated and free polyamine levels in normal and aborting maize kernels. Crop Science, 2002, 42 (4): 1217-1224
- [5] Liu H P, Dong B H, Zhang Y Y, Liu Z P, Liu Y L. Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. Plant Science, 2004, 166 (5): 1261-1267
- [6] Liu J H, Nada K, Honda C, Honda C, Kitashiba H, Wen X P, Pang X M, Moriguchi T. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress : Importance of arginine decarboxylase pathway in stress response. Journal of Experimental Botany, 2006, 57 (11): 2589-2599
- [7] Kamiab F, Talaie A, Masood K, Amanallah J. Exogenous application of free polyamines enhance salt tolerance of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings. Plant Growth Regulation, 2014, 72 (3): 257-268
- [8] Duan H G, Yuan S, Liu W J, Xi D H, Qing D H, Liang H G, Lin H H. Effects of exogenous spermidine on photosystem II of wheat seedlings under water stress. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48 (8): 920-927
- [9] 刘冰,周新国,李彩霞,甄博,李会贞,李中阳. 叶面喷施外源多胺提高夏玉米灌浆前期抗涝性. 农业工程学报, 2016, 32 (12): 122-128
- [10] 李佳,刘杨,羌维民,王棹仁,温晓霞,廖允成. 镉胁迫下多胺对玉米苗期生长的影响及其机理. 农业环境科学学报, 2015, 34 (6): 1021-1027
- [11] 崔宝明. 外源多胺对玉米愈伤组织再生植株的影响. 现代农业科技, 2018 (6): 2-4
- [12] Madakadze R M, Senaratna T. Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium* × *hortorum*) somatic embryos. Plant Growth Regulation, 2000, 30 (1): 55-60
- [13] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程: 发芽试验 (GB/T3543. 4-1995). 北京: 中国标准出版社, 1995
- [14] 张蜀秋. 植物生理学实验技术教程. 北京: 科学出版社, 2011
- [15] 张福锁. 植物营养生态生理学和遗传学. 北京: 中国科学技术出版社, 1993
- [16] 李霞,李连禄,王美云,李立公,彭金凤,赵明. 玉米不同基因型对低温吸胀的响应及幼苗生长分析. 玉米科学, 2008, 16 (2): 60-65
- [17] 秦晓惠,李凯文,段志坤. 植物冷胁迫信号研究进展. 分子植物育种, 2018, 16 (21): 7187-7194
- [18] 马延华,王庆祥,陈绍江. 玉米耐寒性生理生化机理与分子遗传研究进展. 玉米科学, 2013, 21 (3): 76-81
- [19] Heydecker W. Germination of an idea : the priming of seeds. University of Nottingham School of Agriculture Report, 1974: 50-67
- [20] 阮松林,薛庆中. 植物的种子引发. 植物生理学通讯, 2002, 38 (2): 198-202
- [21] 张卫华,郝丽珍,胡宁宝,张进文. 种子引发及其效应. 种子, 2004, 23 (6): 49-51
- [22] 左冰云,解君,韩清芳,崔雯雯,刘铁宁,王兴义,丁瑞霞. 赤霉素 GA4+7 种子引发处理对玉米光合作用及产量的影响. 农药学学报, 2017, 19 (3): 331-340
- [23] 王莉,管博,周沫,于君宝,张晓龙,尹娜,王栋. 种子引发对甜高粱和玉米种子耐盐性的影响. 种子, 2015, 34 (6): 72-77
- [24] 杜锦,蒙雨莲,向春阳,李润枝,何丽丽. 种子引发对盐胁迫下玉米种子萌发及幼苗生长的影响. 天津农学院学报, 2012, 19 (1): 1-6
- [25] 张彦萍. 种子引发提高茄子种子活力及幼苗抗冷性的效应及机理研究. 保定: 河北农业大学, 2011
- [26] Andronis E A, Moschou P N, Toumi I, Rouelakis-Angelakis K A. Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science, 2014, 5 (2): 132-142
- [27] Song Y, Diao Q, Qi H. Polyamine metabolism and biosynthetic genes expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings during cold acclimation. Plant Growth Regulation, 2015, 75 (1): 21-32

(收稿日期: 2019-04-10)