



郭雅宁,赵震扬,梁梦婷,等.生长素与细胞分裂素单独或组合使用对红丝青叶组培苗生长的影响[J].黑龙江农业科学,2024(9):57-64.

生长素与细胞分裂素单独或组合使用对红丝青叶组培苗生长的影响

郭雅宁,赵震扬,梁梦婷,王 梅,郭智勇,管连庆,马雯雯,孙验玲

(青岛农业大学 海洋科学与工程学院,山东 青岛 266237)

摘要:为探究生长素和细胞分裂素对水生植物组培苗的作用规律,研究了生长素(IAA、IBA 和 2,4-D)与细胞分裂素(6-KT)对典型水生观赏植物红丝青叶(*Hygrophila polysperma*)的影响。结果表明,组培培养基中单独添加不同浓度梯度的 IAA、IBA、2,4-D 或 6-KT,组培苗在各种激素处理下,随着浓度的升高,均表现出先促进后抑制的表型,其中 IAA 组表现显著,因此进一步研究 IAA 与 6-KT 的组合使用对组培苗的影响。组合添加 IAA 与 6-KT 处理 18 d 后,随着处理浓度的升高,整体有促进组培苗生长的趋势,其中 $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA + $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 的处理效果最好,但随着 6-KT 浓度的升高,组培苗的叶片更为膨大。组培苗在培养瓶中继续生长 67 d 后,较高浓度的 IAA+6-KT 组合的叶片出现卷曲,底部变焦枯。其中 $1.0\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA + $2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合使其组培苗分孽较多,叶片较大,特别是 $2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA + $2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 的处理,进一步检测叶片的可溶性物质含量,发现该组合叶片的丙二醛含量较高,脯氨酸含量较低。综上可知,植物激素在红丝青叶的组织培养中应用浓度不宜过高, $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA + $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合短期处理效果最适宜。

关键词:组织培养;红丝青叶;IAA;6-KT

水生植物拥有庞大的数量和不同的生命周期架构^[1-4],具有多种生物学功能^[5-7]。近年来,随

着国内外水草景观艺术的兴起,水生观赏植物在传统的水族馆或水上花园中越来越受欢迎,因此,

收稿日期:2024-04-17

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2023MC154);国家自然科学基金青年基金项目(31902408)。

第一作者:郭雅宁(2001—),女,学士,实验员,从事水生植物组织培养研究。E-mail: gyn1506718741@163.com。

通信作者:孙验玲(1987—),女,博士,副教授,从事水生植物组织培养及病原防控研究。E-mail: sylsk046@163.com。

Influence of Substrate and IBA Concentration on Hard Branch Cuttings of Table Grape ‘Tiangongmoyu’

WANG Mingjie¹, LU Huiling¹, YANG Ruihua¹, HU Xixi², LIANG Wenwei³, YE Wanjun⁴, WANG Juan¹

(1. Horticulture Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China; 2. Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China; 3. Institute of Tillage and Cultivation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150023, China; 4. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to promote the breeding and promotion of table grape varieties, in this study, the effects of different substrates + different concentrations of IBA on the cuttings of table grape ‘Tiangongmoyu’ were studied. The results showed that with the increase of IBA concentration, the rooting rate of ‘Tiangongmoyu’ hard branch cuttings gradually increases. Under the same IBA concentration, perlite was used as the cutting medium, and the rooting rate of ‘Tiangongmoyu’ was the highest. Using elastic medium as cutting medium, ‘Tiangongmoyu’ hard branch cutting had the lowest rooting rate. When the concentrations of IBA were 750 and 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ there was no significant difference in the number of hard cuttings of ‘Tiangongmoyu’ under the same medium condition. Leaf number, root fresh weight, root dry weight, leaf fresh weight, leaf dry weight and other indexes of ‘Tiangongmoyu’ were evaluated comprehensively, the perlite was used as cutting medium and 750 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA was used as hormone.

Keywords: grape; matrix; IBA; hard branch cutting

需求也越来越大^[8-9]。红丝青叶(*Hygrophila polysperma*),属于爵床科,俗称为青叶红丝、青丝红叶、红青叶草等,系青叶草的改良品种,水上草外观与青叶草相似,但叶脉明显,叶色翠绿,披针形十字对生叶。水中草的叶型较为狭长,叶色可转为红色,颜色会随着环境的不同而不同,并且有明显白色的叶脉^[9],具有极高观赏价值,深受人们喜爱。然而,由于栽培周期长,环境条件不稳定,红丝青叶等水生植物繁殖效率不高^[10],而植物组织培养技术可以打破这些限制。但是,植物组织培养的成功取决于多种因素,包括激素调节、最佳营养平衡、外植体类型和生理状态以及微生物污染的控制^[4,11-12]。其中,植物激素,包括生长素和细胞分裂素,是植物组织培养过程中关键调控因子,可诱导芽和根的发生^[13]。到目前为止,对生长素和细胞分裂素作用的研究大多集中在陆地植物上,关于植物组织培养水生植物的报道很少。

研究表明,生长素在植物组织培养中具有诱导根形成、促进体细胞胚发育、抵抗外源微生物感染的作用^[14-17]。在植物组织培养中,一些生长素类似物,包括1-萘乙酸(1-Naphthaleneacetic acid, NAA)、吲哚丁酸(Indolebutyric acid, IBA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-D),与天然吲哚-3-乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)接近,常被添加应用于组培培养基中^[9,18-23]。细胞分裂素作为腺嘌呤衍生物,在植物组织培养中主要诱导芽的形成^[13-14,24-26]。一些细胞分裂素类化合物[Benzilaminopurine (BAP), Kinetin (Kin), 2-异戊烯腺苷(2-IP)和 Thidiazuron (TDZ)]早在50年前就被发现并分离出来,其中Kin可以诱导愈伤组织再分化为不定芽^[26]。此外,据报道,细胞分裂素还可缓解非生物和生物胁迫的渗透压力^[27-28]。值得注意的是,细胞分裂素与生长素存在拮抗互作,例如,在胚胎发育早期,生长素拮抗细胞分裂素信号以诱导胚胎根干细胞的产生,而细胞分裂素介导的下胚轴外植体器官发生是通过抑制生长素的极性运输而产生的^[13,25,29-30]。这两种激素的拮抗互作对于维持根和芽的再生、侧根的出苗和叶片形成至关重要^[13,25,30]。在植物组织培养中,不同的激素浓度比例可以诱导不同组织的生长分化并决定器官类型,因此生长素细胞分裂素的比例对于诱导根或

芽的形成过程非常重要^[12]。

前期,水草红丝青叶已在本实验室成功进行了组织培养^[4]。因此,本研究继续聚焦于红丝青叶,进一步比较研究生长素 IAA、IBA、2,4-D 和细胞分裂素 6-KT 单独与联合使用对水草红丝青叶组培苗生长的影响,和组培苗的相关生理应答变化。本研究主要考查生长素和细胞分裂素对水生植物组培苗生长的影响,为今后更多激素在水草组织培养中的成功应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:生长健壮、叶片翠绿、无染菌情况的生长 30 d 左右的红丝青叶组织培养苗。

供试培养基和药剂:MS 完全培养基(在 MS 基础培养基中加入 3%蔗糖,0.65%琼脂固化,pH 调至 5.8 ± 0.1 ,并进行 118 kPa 大气压,121 °C,高压灭菌 20 min);0.5,1.0,2.0 和 3.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和激动素(6-KT)母液。

1.2 方法

1.2.1 组织培养 前期已对红丝青叶进行组培^[4],本研究任意选取正常生长的组培苗在 MS 完全培养基上进行继代培养后的组培苗作为研究材料,将组培苗在 MS 完全培养基上继代后,继续放入光照培养箱(宁波,中国)进行组培生长,生长温度(26 ± 1) °C,湿度 60%~70%,光照条件为白天:黑夜=16 h:8 h (5 000 lx)。

1.2.2 单一生长激素添加培养红丝青叶组培苗

将 IAA、IBA、2,4-D 和 6-KT 4 种生长激素各自配制成 0.5,1.0,2.0 和 3.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,分别添加到 MS 固体培养基培养瓶中,按照 1:1 000 的体积进行添加,摇匀后,高压蒸汽灭菌(121 °C,20 min),待培养基分装冷却后,在超净台接入离体快繁培养的红丝青叶的带芽茎段,放入光照培养箱(26 ± 1) °C 培养 10 d 后观察组培苗表型。未经激素处理的作为对照组进行同等环境培养;各激素浓度处理 5 次重复,选择其中最具代表性的一组进行拍照。

1.2.3 组合生长激素添加培养红丝青叶组培苗

在单一激素作用效果明晰后,进行组合使用生长素(IAA)和细胞分裂素(6-KT)后,观察其表型应答情况,将吲哚乙酸(IAA)设置不同浓度

(0.5, 1.0 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 分别和激动素 (6-KT) 不同浓度 (0.5, 1.0 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 进行组合添加到 MS 固体培养基培养瓶中, 按照 1:1 000 的体积比进行添加, 摇匀后, 121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 高压蒸汽灭菌, 待冷却后, 在超净台接入离体的 2~4 cm 红丝青叶茎段, 放入光照培养箱 (26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养。培养 18 d 和 67 d 观察组培苗表型, 各处理 5 次重复。

1.2.4 不同浓度梯度的 IAA 和 6-KT 处理试验

待组合激素处理 60 d 左右, 观察组培苗在组培瓶中的状态并进行拍照记录, 包括单株植物的高度、叶片大小、叶脉凸显情况、有无叶面卷曲、叶芽多少、植物颜色、染菌情况等, 激素浓度单一变量组之间的差异情况, 包括生长高度差异、叶脉是否存在相同变异等, 对其外观进行记录整理。之后采集组培苗中部生长良好且大小均匀的叶片 3~5 片, 用直尺测定叶片宽度、叶片长度, 进行记录, 每瓶组培苗进行 3 次重复测量, 记录根的条数以及长度。之后将测量后的叶片用液氮进行冷冻保存测定其一系列的生理生化指标, 取其组培苗中间 3~4 片叶, 检测丙二醛、叶绿素、可溶性蛋白、脯氨酸含量, 各处理 5 次重复, 每次处理 3 片。

1.2.5 测定项目及方法 丙二醛含量测定: 取茎段中部叶片 3~5 片, 准确称量叶片并记下质量。将称量后的叶片加入到含 10% TCA (三氯乙酸) 中 (避光), 在研磨机中 60 Hz 研磨后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (3 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 后取出。吸取上清液, 加入 0.67% TBA (硫代巴比妥酸) 溶液, 充分震荡混匀, 沸水显色 15 min 后冰浴冷却, 离心后吸取上清提取液, 于 600, 532 和 450 nm 处测定 OD 值, 0.67% TBA 溶液作为空白对照, 根据如下公式计算丙二醛浓度和丙二醛含量。

$$\text{丙二醛浓度}(M) = 6.45(\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 \text{OD}_{450}$$

丙二醛含量 ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) = 丙二醛浓度 \times 提取液总体积 / 测定吸光度所用体积 / 叶片鲜重^[31]

叶绿素含量测定: 取茎段中部叶片 3~5 片, 准确称量叶片并记下质量。将称量后的叶片加入到含 96% 乙醇中 (避光)。60 Hz 研磨 180 s, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (3 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 获取上清提取液, 在 665 nm 和 649 nm 下测定吸光度值, 以 96% 乙醇作为空白对照, 根据如下公式计算叶绿素含量。

$$C_a = 13.95\text{OD}_{665} - 6.88\text{OD}_{649};$$

$$C_b = 24.96\text{OD}_{649} - 7.32\text{OD}_{665};$$

$$C_{a+b} = 6.63\text{OD}_{665} + 18.08\text{OD}_{649}$$

叶绿素含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) = (叶绿素浓度 \times 提取液总体积 \times 稀释倍数 / 测定吸取体积) / 叶片鲜重^[32]

脯氨酸含量测定: 取茎段中部叶片 3~5 片, 准确称量叶片并记下质量, 加入到 3% 磺基水杨酸溶液, 沸水浴 10 min 后冷却。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (10 min, 2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)。取上清加入 2.5% 的酸性茚三酮显色液及冰醋酸, 沸水浴 40 min, 溶液即呈红色, 冷却后向各试管中加入甲苯, 充分振荡 30 s, 静置分层, 轻轻吸取上层红色脯氨酸甲苯溶液于酶标板中, 以甲苯为空白对照 (操作时酶标板中要避免有气泡), 在酶标分析仪上测吸光度值 (520 nm 波长) 并计算叶片组织中脯氨酸含量 (如下):

脯氨酸含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) = (提取液中脯氨酸浓度 \times 提取液总体积 / 测定吸取体积) / 样品鲜重^[33]

可溶性蛋白含量测定: 取茎段中部叶片 3~5 片, 准确称量叶片并记下质量。将称量后的叶片液氮冷冻处理后, 60 Hz 研磨 180 s, 加入预冷的 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液 (pH=7.8), 震荡摇匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min。然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (20 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 移取上清液于试管中, 加入 5 倍体积的考马斯亮蓝 G-250 试剂并充分混匀, 放置 2 min 后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 冷却后吸取上清液置入酶标板, 于 595 nm 处测吸光度值并计算可溶性蛋白含量 (如下)。

可溶性蛋白含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) = (提取液中蛋白质浓度 \times 提取液总体积 / 测定吸取体积) / 样品鲜重^[34]

1.2.6 数据分析 试验各指标测定均采用 3 个生物重复, 数据以平均值 \pm 标准差表示。试验数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据整理和方差分析 (ANOVA), 处理间显著性差异采用 LSD 检验, ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 单一生长激素对红丝青叶生长效果分析

2.1.1 IAA 由图 1 可知, 在 MS 培养基上处理 10 d 后, 0.5~1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 IAA 浓度对组培苗的生长有促进作用, 其中 1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 组的组培苗生长效果最好, 茎最高, 叶片舒展, 叶片也比其他 IAA 组大、长 (图 1c)。当 IAA 浓度等于或大于 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 特别是当 IAA 浓度达到 3.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 与对照相比, 处理后的植株生长发育迟缓 (图 1e)。

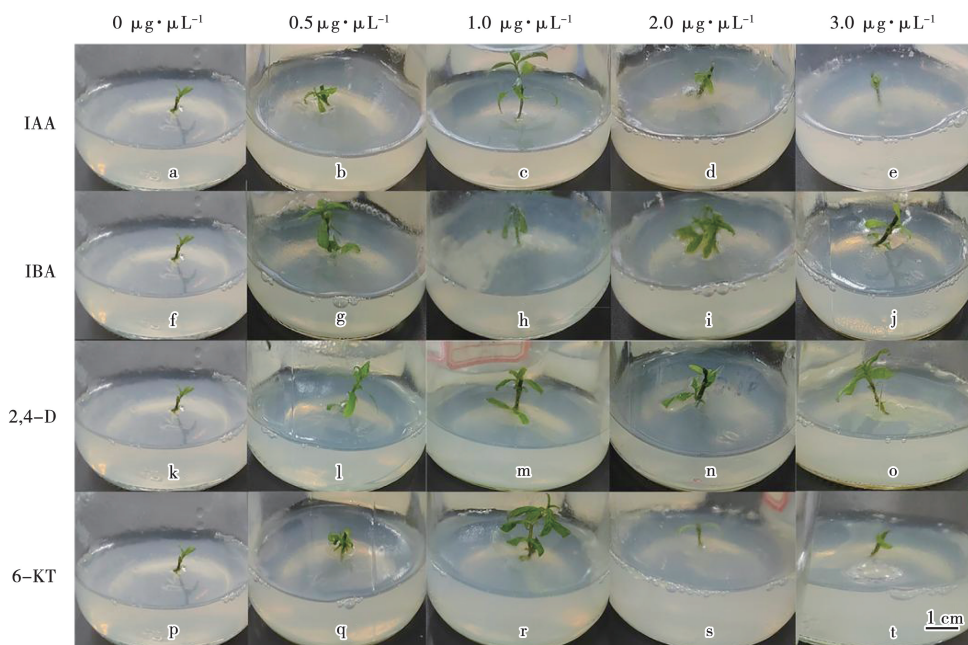


图1 不同生长激素不同浓度处理 10 d 后对红丝青叶组培苗形态的影响

2.1.2 IBA 相对于对照组,IBA 处理组整体生长趋势明显优于 IAA 组,在 $0.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,表现出对组培苗生长的促进作用(图 1g 和 i)。随着 IBA 浓度升高,组培苗生长影响呈现波动,在 $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,叶片少,茎相对短(图 1h),但总体而言,各组 IBA 处理后均对组培苗生长有促进作用,生长效果优于对照组,但 IBA 各组均未达到 IAA 组的茎长及生长状态。

2.1.3 2,4-D 2,4-D 处理后的红丝青叶组培苗与 IBA 处理组生长趋势相似,各组与对照组相比均对组培苗生长有促进作用,在 $0.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时叶片多、茎长(图 1l),而整体用 2,4-D 处理后的各组组培苗叶片呈现狭长态,稍有卷曲、不舒展,所以相比 $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA,2,4-D 处理不能达到最佳组培苗生长状态。

2.1.4 6-KT 与 IAA 相似,6-KT 处理组在 $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图 1r) 时明显有利于红丝青叶的生长(图 1p~t),茎长,叶芽多,但同时可明显看到其叶片的叶脉与其他组相比有明显白化,且叶片卷曲,所以也不能满足组培苗的最佳生长状态。而其他处理组与对照组相比几乎无差异或有很少差异, $0.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 2,4-D 处理后抑制叶片的正常生长,叶片变得细长且抑制茎变长(图 1q), $2.0\sim 3.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理后与对照组的生长状态几乎相同,对其没有促进作用(图 1s 和 t)。

由此可见,在 MS 培养基中补充适宜浓度的 IAA、IBA、2,4-D 和 6-KT 均有利于红丝青叶组培

苗的生长。其中, $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 添加入培养基后,能促进红丝青叶组培苗的生长,且长势最为明显。所以,进一步对 IAA 和 6-KT 进行组合配比添加,研究二者互作对红丝青叶组培苗的生长影响。

2.2 组合生长激素对红丝青叶的生长效果分析

2.2.1 生长状态观察 由图 2 可知,整体来看,处理 18 d 后,随着 IAA 浓度的升高,红丝青叶组培苗生长呈现变好趋势,其中, $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理组的组培苗生长显著优于其他处理组(图 2h)。值得关注的是,较高的 $2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 的组合应用虽促进了组培苗的生长,但叶片形态呈现过于膨大的非正常状态(图 2i 和 o),表明过高的 6-KT 不利于组培苗的正常生长。进一步生长 67 d 后,在 $1.0\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA+ $1.0\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理下,组培苗底部叶片出现焦灼干枯现象(图 2k、l 和 q、r),尤其在 $1.0\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA+ $2.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理下组培苗叶片仍较大较长,出现卷曲或叶边缘的波浪纹,靠近培养基的底部叶片变枯(图 2l 和 r)。相比之下,较低浓度的 $0.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA+6-KT 组合或 IAA + $0.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合反而长势略胜一筹和(图 2e、f 和 j、p),表明植物激素对幼苗的早期生长影响较显著,促进苗子生长后要尽快继代移瓶。并且较高浓度的激素是影响组培苗的长期生长的,尤其是高浓度的 6-KT($> 1.0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)不利于组培苗的生长。

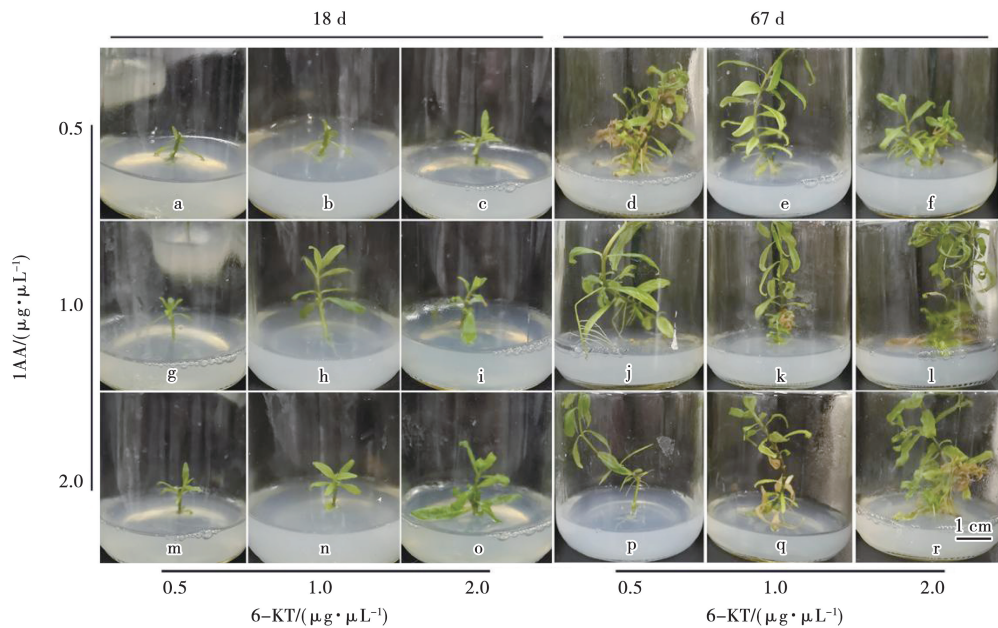


图 2 不同浓度 IAA 和 6-KT 对红丝青叶表型的影响

2.2.2 叶片生长指标 67 d 后,大部分大多数处理过的组培苗变得又高又壮。0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA+6-KT 组合的组培苗长出了新芽和丰富的根,随着 6-KT 浓度升高,叶长和叶宽变得更长和更宽(表 1),当 6-KT 由 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 升高至 1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,叶长由 1.24 cm 增加至 1.92 cm,达到 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,叶长又降为 1.67 cm;而叶宽则由 0.41 cm 增加至 0.53 cm,后降为 0.44 cm,表明过高的 6-KT 会对组培苗的生长产生不利影响。在 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA+0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合处理下,该组的叶

片发生卷曲和黄化现象(图 2 d)。随着 IAA 浓度的升高,1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 1.0~2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合反而影响组培苗的根和叶的生长(表 1)。1.0~2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 1.0~2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组均出现向下卷曲的叶片(图 2k、l、q、r)。然而,1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组的植株表现出强壮的茎、阔叶和气生根(图 2j 和表 1)。此外,2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组的植株根数最多(表 1)。

表 1 不同浓度 IAA 和 6-KT 组合处理对红丝青叶的生长指标(叶长、叶宽和根数量)的影响

项目	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA				1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA				2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA			
	6-KT		6-KT		6-KT		6-KT		6-KT		6-KT	
	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
叶长/cm	1.24±0.04 c	1.92±0.14 ab	1.67±0.07 b	2.24±0.10 a	1.51±0.02 b	2.12±0.11 a	1.65±0.11 b	1.34±0.03 bc	1.71±0.18 b			
叶宽/cm	0.41±0.02 b	0.53±0.06 ab	0.44±0.07 b	0.62±0.10 a	0.45±0.04 c	0.56±0.03 ab	0.53±0.04 ab	0.47±0.02 b	0.68±0.05 a			
根数	1.12±0.06 d	7.02±0.08 b	5.14±0.11 b	6.18±0.24 b	7.25±0.16 b	6.47±0.31 b	5.56±0.20 b	3.81±0.12 c	12.01±0.41 a			

注:数值为平均值±SE,不同小写字母表示组间差异显著(LSD 检验, $P<0.05$)。

2.2.3 叶片生理指标 培养 67 d 后,在 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合处理下,该组的叶片丙二醛含量(MDA)最高(289 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)(图 3A),且叶绿素、可溶性蛋白和脯氨酸含量低(图 3),表明该组叶细胞的膜脂过氧化程度高,且光合能力和渗透调节能力弱,组培苗生长状态欠佳;但当 6-KT 分别增加至 1.0 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,MDA 含量降低(图 3A),叶绿素含量升高(图 3B),生长状态较好。1.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$

6-KT 组 MDA 含量最低(47 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$),叶绿素含量(0.23 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、可溶性蛋白含量(3.56 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)和脯氨酸含量(24.9 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)最高(图 3),表明该组叶片细胞的膜脂过氧化程度最低,且光合和渗透调节能力最强,组培苗生长状态最佳;随着 6-KT 增加,MDA 含量升高,脯氨酸含量降低(图 3A 和 D)。此外,2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和各浓度的 6-KT 组合,尤其是 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 的组合,脯氨酸含量较低(5.9 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,图 3D)。

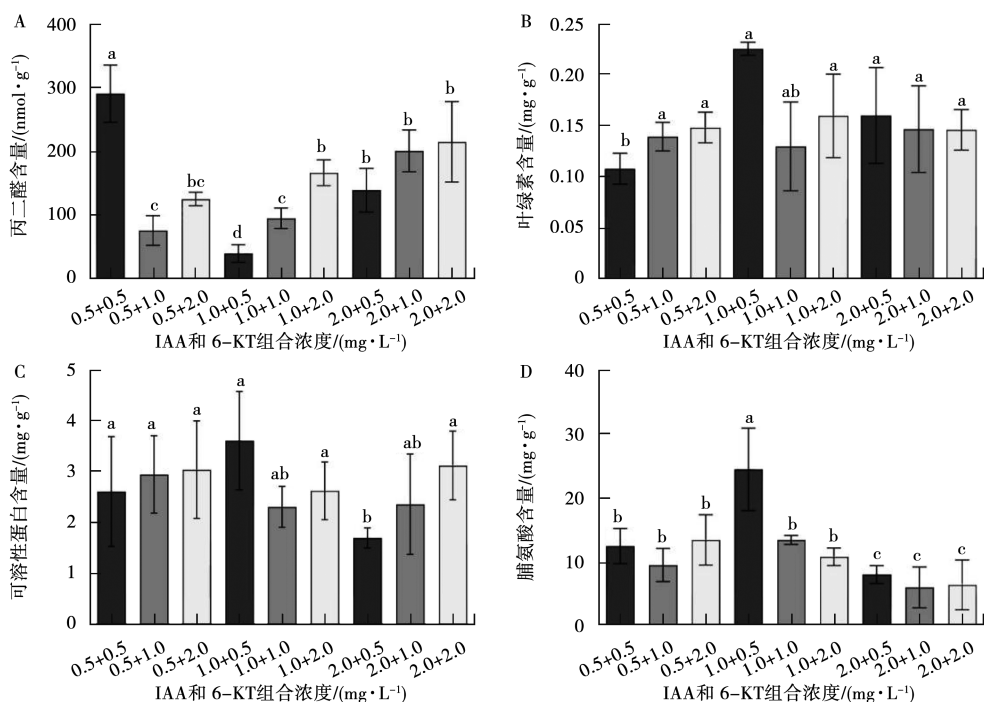


图3 不同浓度 IAA 和 6-KT 组合处理对红丝青叶叶片生理指标的影响

注：不同小写字母表示组间差异显著(LSD 检验, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究主要讨论生长素和细胞分裂素对典型水草红丝青叶生长的影响。首先,在 MS 培养基中分别添加 IAA、IBA、2,4-D、6-KT 等单一生长素。结果表明,与对照组相比,经激素处理的红丝青叶生长更迅速,新芽更多,叶片更伸展。其中 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 的效果突出。就生长素或 6-KT 的单一作用而言,低浓度的 IAA 或 6-KT 有利于红丝青叶的生长,而浓度过高则会阻碍红丝青叶的生长。IAA 和 6-KT 的最佳浓度均小于 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。一旦这两种激素超过阈值,红丝青叶的生长就会受到阻碍。同样,有报道表明,在植物组织培养中,低浓度范围的 IAA 和 6-KT 诱导了芽或根的形成^[9,22,35-36]。当然,某些植物如在沙漠苗木的组培中,需要高达到 $3.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 IAA 或 IBA^[36]。当 6-KT 浓度在 $0 \sim 1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,红丝青叶的生长得到促进,并诱导出更多的新芽。但当 6-KT 浓度达到 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上时,红丝青叶的生长受到严重抑制,说明过量的 6-KT 对红丝青叶的生长不利。重要的是,之前曾报道过细胞分裂素与生长素的拮抗相互作用^[13,23,25]。由此可知,过高的 6-KT 通过调节生长素生物合成或分布的关键基因的表达,抑制了生长素的信号传导或运输。在植物组织培养中,一些植物中,激动素不能完全被其他类似细胞分裂素的化合物

BAP 或 TDZ 所取代^[9,18,26,35-36]。由此可见,6-KT 对水生植物的影响较为复杂。在组培条件下,6-KT 浓度在 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以下才能够促进水生植物的生长,否则,高于 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 6-KT,会抑制生长,即 6-KT 的最大使用浓度阈值为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

在红丝青叶组培中,单独施用生长素 IAA、IBA 或 2,4-D 均能促进组培苗的生长,其中 IAA 单独效果较佳,且当 IAA 与 6-KT 组合使用时,其效果优于单独的 IAA。进一步研究发现, $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 与 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 的组合对红丝青叶的短期促进效果最好。而在长期处理, $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理以及 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理的组培苗均具有生长优势。在报道多种水生植物的组织培养中,IAA 也常被选择添加在组培培养基中^[9,20,22]。值得注意的是, $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合,及 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组合均能促进组培苗的生长,诱导丰富的根,且与其生理指标相一致。经检测,该组培苗叶片的丙二醛含量低,而叶绿素、可溶性蛋白和脯氨酸含量高,表明该组培苗叶细胞的膜脂过氧化程度低,光合能力和渗透调节能力强,生长良好。另外,有报道表明,生长素调节初始根的形成和再生^[15,24],因此经 IAA 处理的组培苗呈现出许多根,以及积累可溶性物质以适应其快速生长的状态^[31]。

在长期处理中,高浓度 IAA 的($1.0 \sim 2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)和 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理的组培苗生长受到严重抑制,甚至茎尖出现干旱和坏死,可能与 Ca^{2+} 信号或乙烯的产生相关^[24-25,36]。所以,高浓度 IAA 和 6-KT,尤其是 6-KT,可能会抑制水生植物组培苗的生长,严重引起茎尖坏死。下一步,需要通过同位素标记或免疫标记外源激素并追踪其动态变化,或通过液相色谱-质谱联用 LC-MS/MS 检测组培苗体内生长素或细胞分裂素的含量分布,以明确植物激素的内在调节作用。此外,可运用基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学或 CRISPR(聚集规律间隔短回文重复序列)技术研究激素处理前后组培苗相关差异基因变化^[31-32,34],进一步揭示 IAA 和 6-KT 在水草组培中调控幼苗生长的分子机制。

本研究结果揭示了水草组培中生长素 IAA 和细胞分裂素 6-KT 的单独或组合使用效果及其适宜浓度范围,可以为更多水生植物组织培养中的成功应用提供重要参考。

4 结论

本研究首次报道了生长素(IAA、IBA 和 2,4-D)和细胞分裂素(6-KT)单独或组合应用对水生观赏植物红丝青叶生长的影响,并筛选适宜的使用浓度。在 $0.5 \sim 3.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度处理范围内,单独添加生长素和细胞分裂素对组培苗呈现先促进后抑制的影响;组合处理后,在 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 处理阈值下,IAA 和 6-KT 对组培苗生长有促进作用,其中 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 短期处理 18 d 后的效果最佳。长期处理 67 d 后, $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理组以及 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 处理的组培苗均表现出生长优势;而高浓度 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA 和 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT 组红丝青叶的叶片卷曲,底部叶片出现枯黄变干,且与其较高的丙二醛含量和极低的脯氨酸含量相一致,表明水草红丝青叶组培中,生长素和细胞分裂素的使用浓度均不宜超过 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] POLUNIN N. "Aquatic ecosystems: trends and global prospects," in aquatic ecosystems: trends and global prospects [J]. Cambridge University Press, 2008, 1: 482.
- [2] ZHENG H, QIAO M, XU J P, et al. Culture-based and culture-independent assessments of endophytic fungal diversity in aquatic plants in southwest China [J]. Frontiers in Fungal Biology, 2021, 692549.
- [3] LEWIS M, THURSBY G. Aquatic plants: test species sensitivity and minimum data requirement evaluations for chemical risk assessments and aquatic life criteria development for the USA [J]. Environmental Pollution, 2018, 238: 270-280.
- [4] LI W J, CAO G L, ZHU M Q, et al. Isolation, identification and pollution prevention of bacteria and fungi during the tissue culture of dwarf hygro (*Hygrophila polysperma*) explants [J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2476.
- [5] SRIVASTAVA J, GUPTA A, CHANDRA H. Managing water quality with aquatic macrophytes [J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2008, 7(3): 255-266.
- [6] REZANIA S, TAIB S M, MD DIN M F, et al. Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 318: 587-599.
- [7] EBRAHIMBABAIE P, MEEINKUIRT W, PICHTEL J. Phytoremediation of engineered nanoparticles using aquatic plants: mechanisms and practical feasibility [J]. Journal of Environmental Sciences, 2020, 93: 151-163.
- [8] MAKI K, GALATOWITSCH S. Movement of invasive aquatic plants into Minnesota (USA) through horticultural trade [J]. Biological Conservation, 2004, 118(3): 389-396.
- [9] KARATAŞ M, AASIM M, ÇINAR A, et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explant of dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson) [J]. The Scientific World Journal, 2013(3): 680425.
- [10] SULAIMAN E S. Development of sterilization procedures and in vitro studies of *Nymphaea lotus* [D]. Serdang, Malaysia: Universiti Putra Malaysia, 2004.
- [11] KIM D H, GOPAL J, SIVANESAN I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed [J]. RSC Advances, 2017, 7(58): 36492-36505.
- [12] MELNYK C W. Quantitative regeneration: Skoog and Miller revisited [J]. Quantitative Plant Biology, 2023, 4: e10.
- [13] PERNISOVÁ M, KLÍMA P, HORÁK J, et al. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3609-3614.
- [14] HOWELL S H, LALL S, CHE P. Cytokinins and shoot development [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(9): 453-459.
- [15] YOSHIDA S, SAIGA S, WEIJERS D. Auxin regulation of embryonic root formation [J]. Plant & Cell Physiology, 2013, 54(3): 325-332.
- [16] PERICA M C. Auxin-treatment induces recovery of phytoplasma-infected periwinkle [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1826-1834.
- [17] KARAMI O, PHILIPSEN C, RAHIMI A, et al. Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2023, 113(1): 7-22.
- [18] SRIVASTAVA D R, ANDRIANOV V M, PIRUZIAN E S. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski) [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8(5): 300-302.
- [19] CARDOSO J C, TEIXEIRA da SILVA J A. *Gerbera* micropropagation [J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1344-1357.

- [20] STANLY C, BHATT A, KENG C L. An efficient *in vitro* plantlet regeneration of *Cryptocoryne wendtii* and *Cryptocoryne beckettii* through shoot tip culture[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(2): 619-624.
- [21] SHARMA S, KAMAL B, RATHI N, et al. *In vitro* rapid and mass multiplication of highly valuable medicinal plant *Bacopa monnieri* L. Wettst[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9: 8318-8322.
- [22] DOGAN M. Multiple shoot regeneration from shoot tip and nodal explants of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex roxb) koehne[J]. Anatolian Journal of Botany, 2017, 1(1): 4-8.
- [23] PASTERNAK T P, STEINMACHER D. Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro* [J]. Plants, 2024, 13(2): 327.
- [24] MOTTE H, VEREECKE D, GEELEN D, et al. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(1): 107-121.
- [25] PERILLI S, MOUBAYIDIN L, SABATINI S. The molecular basis of cytokinin function[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(1): 21-26.
- [26] BARCISZEWSKI J, MASSINO F, CLARK B F C. Kinetin: a multiactive molecule[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 40(3): 182-192.
- [27] MANDAL S, GHORAI M, ANAND U, et al. Cytokinin and abiotic stress tolerance-What has been accomplished and the way forward[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 3:943025
- [28] POLIVANOVA O B, BEDAREV V A. Hyperhydricity in plant tissue culture[J]. Plants, 2022, 11(23): 3313.
- [29] YAROSHKO O, PASTERNAK T, LARRIBA E, et al. Optimization of callus induction and shoot regeneration from tomato *Cotyledon* explants[J]. Plants, 2023, 12(16): 2942.
- [30] MOUBAYIDIN L, Di MAMBRO R, SABATINI S. Cytokinin auxin crosstalk[J]. Trends in Plant Science, 2009, 14(10): 557-562.
- [31] SUN Y L, KONG X P, LI C L, et al. Potassium retention under salt stress is associated with natural variation in salinity tolerance among *Arabidopsis* accessions[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0124032.
- [32] SUN Y L, MU C H, ZHENG H X, et al. Exogenous Pi supplementation improved the salt tolerance of maize (*Zea mays* L.) by promoting Na^+ exclusion [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 16203.
- [33] SUN Y L, ZHENG H X. Divergent molecular and physiological response of two maize breeding lines under phosphate deficiency[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2022, 40(1): 197-207.
- [34] ZHAO Z Y, ZHENG H X, WANG M H, et al. Reshifting Na^+ from shoots into long roots is associated with salt tolerance in two contrasting inbred maize (*Zea mays* L.) lines[J]. Plants, 2023, 12(10): 1952.
- [35] GAO S L, HUANG H P, WEI K H. Tissue culture and generation of autotetraploid plants of *Sophora flavescens* Aiton[J]. Pharmacognosy Magazine, 2010, 6(24): 286.
- [36] REN H M, XU Y, ZHAO X H, et al. Optimization of tissue culturing and genetic transformation protocol for *Casuarina equisetifolia* [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 784566.

Effects of Auxin IAA Alone or in Combination with Cytokinin 6-KT on Growth of *Hygrophila polysperma* *in vitro* Tissue Culture

GUO Yaning, ZHAO Zhenyang, LIANG Mengting, WANG Mei, GUO Zhiyong, GUAN Lianqing, MA Wenwen, SUN Yanling

(School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266237, China)

Abstract: In order to uncover the influences of auxin and cytokinin on tissue culture seedlings of aquatic plants, in this study, the single and combined effects of auxin IAA and cytokinin 6-KT were investigated on the typical ornamental plants *Hygrophila polysperma*. The results showed that, firstly, IAA, IBA, 2,4-D or 6-KT had an enhanced effects for each on the growth of the plantlets *in vitro*, and then inhibited them along with the increase of the concentration of IAA, IBA, 2,4-D or 6-KT. Among them, $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA showed a significant change, and the combination of IAA and 6-KT was further investigated. As a result, with the increase of the concentration of IAA combined with 6-KT, the growth of the plantlets was promoted as a whole, and the treatment of $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA + $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT had the best effect, however, with the increase of 6-KT concentration, the leaf area of the plantlets obviously expanded. After 67 days treatment of high concentration of IAA + 6-KT, the leaves of *H. polysperma* appeared to be coiled and the bottom of the leaves became scorched. The combination of $1.0-2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA + $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6-KT made the leaves branched and large, especially, under the combination of $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA + $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6-KT, the leaves of plantlets had higher malondialdehyde and lower proline content relative to other groups. In conclusion, the application concentration of plant hormones in tissue culture of aquatic plants is not feasible to be too high, and the combination of $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IAA + $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 6-KT is appropriate for short-term treatment.

Keywords: tissue culture; *Hygrophila polysperma*; IAA; 6-KT