

李兰芝, 吴坤鑫, 张家明. 紫萍休眠体的萌发诱导研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 532–536.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.157

紫萍休眠体的萌发诱导研究

李兰芝, 吴坤鑫, 张家明

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/
海南省生物质能源工程技术研究中心, 海南海口 571101)

摘要:以紫萍 DW2501-4 和 HB0301 产生的休眠体为材料, 利用单因子试验和正交试验研究不同蔗糖含量、不同的 GA_3 浓度、不同的温度和光照条件诱导紫萍休眠体萌发的最适条件。结果表明, 在 1%~5% 质量浓度蔗糖范围内, 高的蔗糖质量浓度会抑制休眠体的萌发, 质量浓度为 1%、2% 的蔗糖对 DW2501-4 和 HB0301 休眠体萌发诱导效果最好。在 20~32 ℃, DW2501-4 休眠体在 32 ℃ 下萌发效果最佳, HB0301 休眠体在 28 ℃ 下萌发效果最佳。在 0~10 mg/L 范围内 GA_3 能促进 DW2501-4 和 HB0301 休眠体的萌发, 最佳浓度为 0.1 mg/L。DW2501-4 和 HB0301 在光—暗周期为 24 h—0 h 和 16 h—8 h 下萌发势最高, 叶状体数量最多。3 种日照时间下萌发率差异不显著, 但长日照可缩短休眠体萌发时间, 促进叶状体繁殖。DW2501-4 和 HB0301-4 休眠体的最佳萌发诱导条件是 0.5 倍 Hoagland's 培养基中添加 1% 蔗糖和 0.1 mg/L 的 GA_3 , 在 28 ℃, 光—暗周期为 16 h—8 h 的条件下培养。

关键词:紫萍; 休眠体; 萌发; 最佳条件

中图分类号: Q945.1; S555⁺.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0532-05

紫萍 (*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid.) 属于浮萍科 (Lemnaceae) 紫萍属 (*Spirodela*)。自然界中, 夏末生长季节结束时紫萍会产生休眠体 (turion)^[1]。紫萍产生的休眠体直径大约为 2 mm, 呈椭圆形, 灰褐色。上表面平滑, 下表面微微凸出。新形成的休眠体会沉入水底进行冬眠, 经历一段时间的低温冬眠后, 春天随着温度上升, 光照时间延长, 细胞内碳水化合物的代谢发生变化, 冬眠才会被打破, 休眠体开始萌发^[2-3]。休眠体萌发时会从 2 个分生侧囊中长出新的营养生殖叶片^[4]。通过消耗休眠体内积累的大量淀粉, 新叶会快速

生长^[4]。寒冷处理对紫萍休眠体进行预催熟而更有利于休眠体的萌发, 光照、充足的碳水化合物供应是促进休眠体萌发的必要条件^[5-7]。影响休眠体萌发的主要因子包括温度、光照、营养条件、 GA_3 等^[7-10]。在实验室内紫萍的种质资源也可利用休眠体进行保种, 研究休眠体快速萌发的条件是实验室紫萍保种研究的重要部分。本试验通过研究不同蔗糖含量、不同的 GA_3 浓度、不同的温度和光照条件对紫萍休眠体萌发的影响, 以期在实验室长期保存紫萍种质资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料选用本实验室保存的采自海南的紫萍 DW2501-4 和湖北的紫萍 HB0301。试验于 2015 年 1—12 月在中国热带农业科学院热带生物技术研究所试验基地温室内进行。利用其无菌无藻的叶状体, 在含 0.005 mg/L ABA 的 0.5 倍缺氮的 Hoagland's 培养基, 24 ℃, 16 h—8 h 光—暗

收稿日期: 2016-05-19

基金项目: 国家国际科技合作专项 (编号: 2014DFA30680)。

作者简介: 李兰芝 (1990—), 女, 湖北广水人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子遗传学, E-mail: 317004873@qq.com; 共同第一作者: 吴坤鑫 (1969—), 男, 福建永定人, 博士, 副研, 研究方向作物遗传育种, E-mail: wukunxin@itbb.org.cn。

通信作者: 张家明, 博士, 研究员。研究方向为生物质能源。E-mail: jmzhang@vip.163.com。

- [5] Chung C T, Niemela S L, Miller R H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*; transformation and storage of bacterial cells in the same solution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2172–2175.
- [6] 唐建国, 茹炳根, 徐长法, 等. 蛋白质工程的研究[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1998, 34(2): 342–348.
- [7] 陆海, 吴薇, 曾庆银, 等. 大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达重组蛋白的研究[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(6): 1–4.
- [8] 翟晓虎, 贺卫华, 沈晓鹏, 等. S100A16 蛋白多克隆抗体表达条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 39–41.
- [9] 王安平, 朱善元, 王永娟. 鸭甲型肝炎病毒 1 型 3C 基因的原核表达与多抗的制备[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 205–207.
- [10] 张卫东, 陈秀珠. 两种感受态细胞制备方法的比较[J]. 同济医科大学学报, 1997, 26(5): 43–50.

- [11] Shen P, Peng Z R. Progress in studies on natural transformation[J]. Nature, 1999, 398(6729): 641–650.
- [12] 李振宇, 徐开林, 潘秀英, 等. 氯化钡法制备感受态细胞[J]. 徐州医学院学报, 2004, 24(4): 315–316.
- [13] Castuma C E, Huang R, Kornberg A, et al. Inorganic polyphosphates in the acquisition of competence in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(22): 19280–19283.
- [14] 代军. 大肠杆菌感受态细胞制备及转化条件优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 53–54.
- [15] 晏国洪, 姜山. 长期保存活力低下的大肠杆菌制备感受态细胞条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 46–48, 134.
- [16] 张丽霞, 贾海燕. 一种简便高效大肠杆菌感受态细胞制备方法[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 41–42.

周期条件下,诱导休眠体。将诱导出的休眠体放在 4 ℃ 冰箱中黑暗处理 7 d,再接种到固体培养基中进行萌发诱导。本试验用含琼脂 8 g/L 的 0.5 倍 Hoagland's 固体培养基,培养基 pH 值为 5.8~6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 单因子诱导试验 不同蔗糖含量诱导试验中,0.5 倍 Hoagland's 固体培养基作为对照组,用添加 1%、2%、3%、5% (质量浓度)蔗糖的 0.5 倍 Hoagland's 固体培养基进行萌发诱导,培养条件为 28 ℃,24 h 光照。温度试验中,温度设置为 20、24、28、32 ℃,添加 1% 蔗糖的 0.5 倍 Hoagland's 固体培养基中,24 h 光照进行萌发诱导。光照试验中,光—暗周期为 8 h—16 h、16 h—8 h、24 h—0 h,添加 1% 蔗糖的 0.5 倍 Hoagland's 固体培养基中,28 ℃ 下进行萌发诱导。GA₃ 诱导试验中,在添加不同浓度的 GA₃ (浓度设置为 0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 mg/L) 的含 1% 蔗糖的 0.5 倍 Hoagland's 固体培养基中进行诱导,培养条件为 28 ℃,24 h 光照。每个培养皿中接种 20 个休眠体,重复 3 次,置于光温培养箱中培养。

1.2.2 正交试验 进行 4 因素 3 水平的 L₉ (3⁴) 正交试验,各因素水平见表 1。A 因素是蔗糖质量浓度,设 1%、2%、3% 3 个水平,B 因素是 GA₃,设 0.01、0.10、1.00 mg/L 3 个水平,C 因素是温度,设 24、28、32 ℃ 3 个水平,D 因素是光—暗周期,设 8 h—16 h、16 h—8 h、24 h—0 h 3 个水平。

每个皿接种 20 个休眠体,重复 3 次。根长 1 mm 或者叶状体直径 1 mm 均视为萌发,每 24 h 观察记录休眠体萌发情况,记录休眠体萌发情况和叶状体生长状态,得到休眠体萌发诱导最佳条件。

1.2.3 萌发测定指标 萌发时滞,即萌发启动时间,指从萌发诱导试验开始到第 1 个休眠体开始萌发所需要的时间;萌发高峰:日萌发数达到最大时的天数;萌发持续时间,从休眠体开始萌发到最后 1 个休眠体萌发所需的总天数;萌发势 = 日萌发数最大时的总数/休眠体总数 × 100%;萌发率 = 7 d 时

表 1 休眠体萌发诱导正交试验设计

试验号	水平组合	试验条件			
		蔗糖量 (%)	GA ₃ (mg/L)	温度 (℃)	光—暗周期
1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	1	0.01	24	8 h—16 h
2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	1	0.10	28	16 h—8 h
3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	1	1.00	32	24 h—0 h
4	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	2	0.01	28	24 h—0 h
5	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	2	0.10	32	8 h—16 h
6	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	2	1.00	24	16 h—8 h
7	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	3	0.01	32	16 h—8 h
8	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	3	0.10	24	24 h—0 h
9	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	3	1.00	28	8 h—16 h

休眠体萌发总数/休眠体总数 × 100%;叶状体数:7 d 时叶状体总数。

1.3 数据统计与分析

采用 Excel 进行数据处理,用 SPSS 19.0 统计分析软件进行数据的方差分析与差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 蔗糖含量对紫萍休眠体萌发的影响

蔗糖含量对 DW2501-4 休眠体萌发的影响:如表 2 所示,在蔗糖含量为 0、1%、2%、3% 条件下,DW2501-4 休眠体在第 2 d 开始萌发;在蔗糖含量为 5% 条件下,休眠体在第 3 d 开始萌发。在蔗糖含量为 0 条件下,休眠体在第 4 d 萌发到高峰期,在蔗糖含量 1%、2%、3%、5% 条件下,依次在第 2 d、第 3 d、第 5 d、第 5 d 休眠体萌发到高峰期;在蔗糖含量为 0、1%、2% 条件下,休眠体萌发持续 9 d、3%、5% 条件下,休眠体萌发持续 11 d;在蔗糖含量为 1%、2% 条件下,叶状体数显著高于 3%、5%。说明在蔗糖含量为 1%、2% 条件下,能有效诱导 DW2501-4 休眠体萌发,3% 和 5% 的蔗糖抑制 DW2501-4 休眠体萌发。

表 2 蔗糖含量对 DW2501-4 休眠体萌发的影响

蔗糖含量 (%)	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
0	2	4	9	38.3 ± 5.8ab	90.0 ± 0.0a	68 ± 4b
1	2	2	9	48.3 ± 7.6a	90.0 ± 5.0a	78 ± 9ab
2	2	3	9	35.0 ± 13.2ab	93.3 ± 2.9a	85 ± 11a
3	2	5	11	23.3 ± 2.9b	81.7 ± 15.3a	53 ± 3c
5	3	5	11	26.7 ± 7.6b	78.3 ± 7.6a	20 ± 2d

注:表中数据为 3 个重复平均数加标准误差,同行数据后的字母不同表示差异显著 (P < 0.05)。下表同。

蔗糖含量对 HB0301 休眠体萌发的影响:如表 3 所示,在蔗糖含量为 0、1%、2%、3%、5% 条件下,HB0301 休眠体均在第 2 d 开始萌发并达到高峰期;在蔗糖含量为 0、1%、2%、3% 条件下,休眠体全部萌发持续 4 d、5% 条件下,休眠体萌发持续 6 d;在蔗糖含量为 1% 条件下,萌发势、叶状体数均显著高于其他组,在 2% 条件下叶状体数显著高于 0、3%、5% 条件下,而在 5% 蔗糖下萌发势和叶状体数则显著低于不含蔗糖的。说明在蔗糖含量为 1%、2% 条件下,能有效诱导 HB0301 休眠体萌发;5% 的蔗糖抑制 HB0301 休眠体萌发。

在 1%~5% 蔗糖含量范围内,高的蔗糖含量会抑制休眠

体的萌发;含量为 1%、2% 的蔗糖对 DW2501-4 和 HB0301 休眠体萌发诱导效果最好;在 2%~5% 蔗糖下,HB0301 休眠体萌发高峰期早于 DW2501-4,且萌发率和萌发势高于 DW2501-4。

2.2 温度的对紫萍休眠体萌发的影响

温度对 DW2501-4 休眠体萌发的影响:如表 4 所示,在 20 ℃ 下,DW2501-4 休眠体在 7 d 时开始萌发,在 24 ℃ 下,休眠体在 3 d 时开始萌发,在 28、32 ℃ 下,休眠体在 2 d 时开始萌发;在 24、28、32 ℃ 下,休眠体依次在 4、2、2 d 达到休眠体萌发高峰期,在 20 ℃ 下,萌发迟滞,诱导 7 d 未出现高峰

表 3 蔗糖含量对 HB0301 休眠体萌发的影响

蔗糖含量 (%)	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
0	2	2	4	60.0 ± 13.2bc	100 ± 0.0a	57 ± 3d
1	2	2	4	95.0 ± 5.0a	100 ± 0.0a	94 ± 5a
2	2	2	4	73.3 ± 5.8b	100 ± 0.0a	89 ± 7b
3	2	2	4	56.7 ± 7.6c	100 ± 0.0a	69 ± 3c
5	2	2	6	33.3 ± 7.6d	100 ± 0.0a	35 ± 2e

表 4 温度对 DW2501-4 休眠体萌发的影响

温度 (℃)	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
20	7				5.0 ± 0.0b	2 ± 1d
24	3	4	7	50.0 ± 0.0c	100.0 ± 0.0a	38 ± 3c
28	2	2	6	60.0 ± 0.0b	100.0 ± 0.0a	75 ± 5b
32	2	2	6	75.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a	90 ± 7a

注:“—”因为该处理萌发率太低,在研究时限内未获得该数据。下表同。

期;在 24、28、32 ℃ 下,休眠体萌发持续时间依次为 7、6、6 d;在 32 ℃ 下萌发势、叶状体数均显著高于其他组。由表 5 可见,在 20 ℃ 下,HB0301 休眠体在 7 d 时开始萌发,在 24 ℃ 下,休眠体在 3 d 时开始萌发,在 28、32 ℃ 下,休眠体在 2 d 时开始萌发;在 24、28、32 ℃ 下,休眠体依次在 4、2、2 d 达到休眠体萌发高峰期,在 20 ℃ 下,萌发迟缓,诱导 7 d 未出现高峰期;在 24、28、32 ℃ 下,休眠体萌发持续依次为 5、4、4 d;HB0301 在 28、32 ℃ 下叶状体数均显著高于 20、24 ℃。

表 5 温度对 HB0301 休眠体萌发的影响

温度 (℃)	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
20	7				15.0 ± 2.0b	7 ± 2c
24	3	4	5	60.0 ± 2.0b	100.0 ± 0.0a	58 ± 4b
28	2	2	4	70.0 ± 3.4a	100.0 ± 0.0a	96 ± 6a
32	2	2	4	65.0 ± 4.1b	100.0 ± 0.0a	92 ± 4a

在 20~32 ℃,大体上随着温度升高,休眠体萌发加快,叶状体繁殖增多;虽然 24~32 ℃ 萌发率一样,但是 28、32 ℃ 的萌发时滞和萌发高峰都要比 24 ℃ 快;DW2501-4 休眠体在 32 ℃ 下萌发效果最佳,HB0301 休眠体在 28 ℃ 下萌发效果最佳。在 24、28 ℃ 下,HB0301 比 DW2501-4 所需萌发持续时间短,萌发势高。

2.3 GA₃ 浓度对紫萍休眠体萌发的影响

GA₃ 浓度对 DW2501-4 休眠体萌发的影响见表 6。在 0.000~10.000 mg/L 范围内的几个 GA₃ 试验浓度下,DW2501-4 休眠体均在 2 d 时开始萌发,并且在 2 d 时达到

萌发高峰期;在 GA₃ 浓度为 0.000 mg/L 和 0.001 mg/L 时,休眠体萌发持续 9 d,在 GA₃ 浓度为 0.010 mg/L 和 0.100 mg/L 时,休眠体萌发持续 7 d,在 GA₃ 浓度为 1.000 mg/L 和 10.00 mg/L 时,休眠体萌发持续 4 d;在 0.010~10.000 mg/L 范围内的几个 GA₃ 试验浓度下,萌发率和叶状体数均显著高于 GA₃ 浓度为 0.000 mg/L 时,说明这几个 GA₃ 浓度均对休眠体萌发起诱导作用。其中在 10.000 mg/L 浓度下,虽然萌发率高但叶状体分化几天后玻璃化。在 GA₃ 浓度为 0.100 mg/L 和 1.000 mg/L 时 DW2501-4 休眠体萌发势、萌发率高,叶状体总数多,生长状态最好。

表 6 GA₃ 对 DW2501-4 休眠体萌发的影响

GA ₃ 浓度 (mg/L)	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
0.000	2	2	9	56.7 ± 7.6b	86.7 ± 5.8b	78 ± 5d
0.001	2	2	9	66.7 ± 12.6ab	95.0 ± 0.0a	89 ± 7cd
0.010	2	2	7	60.0 ± 10.0b	95.0 ± 5.0a	99 ± 5bc
0.100	2	2	7	68.3 ± 2.9ab	100.0 ± 0.0a	113 ± 10a
1.000	2	2	4	78.3 ± 7.6a	100.0 ± 0.0a	109 ± 7ab
10.000	2	2	4	58.3 ± 5.8b	100.0 ± 0.0a	101 ± 6ab

GA₃ 浓度对 HB0301 休眠体萌发的影响见表 7。在 0.000~10.000 mg/L 范围内的几个 GA₃ 试验浓度下,HB0301 休眠体均在 2 d 时开始萌发,并且在 2 d 时达到萌发高峰期;在 GA₃ 浓度为 0.000、0.010、0.100、1.000 mg/L 时,休眠体萌发持续 3 d,在 GA₃ 浓度为 10.000 mg/L 时,休眠体

萌发持续 4 d,叶状体生长受抑制且几天后玻璃化,在 GA₃ 浓度为 0.001 mg/L 时,休眠体萌发持续 5 d;不同 GA₃ 浓度下,萌发率无差异,但 GA₃ 浓度为 0.010 mg/L 和 0.100 mg/L 时萌发势、叶状体数均显著高于 1.000 mg/L 和 10.000 mg/L 时。说明 HB0301 在 GA₃ 浓度为 0.100 mg/L 时萌发诱导效

表 7 GA₃ 对 HB0301 休眠体萌发的影响

GA ₃ 浓度 (mg/L)	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
0.000	2	2	3	86.7 ± 10.4a	100.0 ± 0.0a	91 ± 5ab
0.001	2	2	5	86.7 ± 7.6a	100.0 ± 0.0a	87 ± 5b
0.010	2	2	3	85.0 ± 5.0a	100.0 ± 0.0a	94 ± 4ab
0.100	2	2	3	90.0 ± 5.0a	100.0 ± 0.0a	96 ± 6a
1.000	2	2	3	63.3 ± 10.4b	100.0 ± 0.0a	75 ± 3c
10.000	2	2	4	45.0 ± 5.0c	100.0 ± 0.0a	45 ± 2d

果最佳。

与不添加 GA₃ 相比在 0.001 ~ 10.000 mg/L 范围内 GA₃ 能促进 DW2501 - 4 和 HB0301 休眠体的萌发,在 GA₃ 浓度为 0.100 mg/L 时休眠体萌发率高,叶状体数最多,萌发效果最佳。

2.4 光照时间对紫萍休眠体萌发的影响

由表 8 可见,在 28 ℃,光—暗周期为 24 h—0 h、16 h—8 h、8 h—16 h 下,DW2501 - 4 休眠体在 2 d 时开始萌发,且在 2 d 时达到休眠体萌发高峰期;光—暗周期为 24 h—0 h 时和 16 h—8 h 时休眠体萌发持续时间都是 6 d,小于 8 h—16 h 的 9 d,而在 16 h—8 h 时萌发势最高,在 24 h—0 h 时产生的叶状体数最多。从表 9 可知,在 28 ℃,光—暗周期为 24 h—0 h、16 h—8 h、8 h—16 h 下,HB0301 休眠体在 2 d 时开始萌发,且在 2 d 时达到休眠体萌发高峰期;在光—暗周期为 24 h—0 h 和 16 h—8 h 下休眠体萌发持续时间都是 4 d,小于 8 h—16 h 的 5 d,而在 24 h—0 h 和 16 h—8 h 下萌发势和叶状体繁殖数量都要比 8 h—16 h 下高。总之,在上述 3 个光—暗周期下 DW2501 - 4 和 HB0301 中休眠体萌发率没有显著差异,但长日照可缩短休眠体萌发持续时间,并促进叶状体繁殖。

表 8 光照时间对 DW2501 - 4 休眠体萌发的影响

光—暗周期	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
24 h—0 h	2	2	6	68.3 ± 5.8ab	100.0 ± 0.0a	102 ± 6a
16 h—8 h	2	2	6	75.0 ± 5.0a	98.3 ± 2.9a	97 ± 4ab
8 h—16 h	2	2	9	60.0 ± 8.7b	95.0 ± 5.0a	89 ± 4b

表 9 光照时间对 HB0301 休眠体萌发的影响

光—暗周期	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续时间 (d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
24 h—0 h	2	2	4	80.0 ± 5.0a	100 ± 0.0a	112 ± 5a
16 h—8 h	2	2	4	75.0 ± 10.0ab	100 ± 0.0a	105 ± 4a
8 h—16 h	2	2	5	60.0 ± 8.7b	100 ± 0.0a	90 ± 4b

2.5 正交试验结果分析

由表 10 可知,在 1 ~ 6 号试验条件下,诱导 7 d DW2501 - 4 休眠体的萌发率均为 100%,但在 2 号和 3 号试验条件下,萌发完全所需时间最少,3 号试验条件下萌发势最高,2 号试验条件下叶状体最多。从表 11 可知,在 1 ~ 7 号试验条件下,诱导 7 d HB0301 - 4 休眠体的萌发率均为 100%,但在 2 号试验条件下,萌发完全所需时间少,萌发势最高,叶状体最多。

表 10 DW2501 - 4 休眠体萌发的正交试验结果

试验号	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续 时间(d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
1	2	3	6	60.0 ± 10.0bc	100.0 ± 0.0a	60 ± 5d
2	2	2	4	75.0 ± 8.7ab	100.0 ± 0.0a	105 ± 7a
3	2	2	4	81.7 ± 5.8a	100.0 ± 0.0a	100 ± 6ab
4	2	2	5	58.3 ± 7.6c	100.0 ± 0.0a	95 ± 9b
5	2	3	5	50.0 ± 10.0de	100.0 ± 0.0a	82 ± 3c
6	2	2	5	53.3 ± 7.6de	100.0 ± 0.0a	77 ± 3c
7	2	3	9	45.0 ± 5.0de	85.0 ± 5.0b	59 ± 6d
8	3	4	10	38.3 ± 12.6d	75.0 ± 8.7c	42 ± 5e
9	3	5	8	51.7 ± 10.4de	85.0 ± 5.0b	55 ± 7d

DW2501 - 4 和 HB0301 - 4 休眠体的最佳诱导条件是,0.5 倍 Hoagland’s 固体培养基中添加 1% 蔗糖和 0.100 mg/L 的 GA₃,在 28 ℃,光—暗周期为 16 h—8 h 的条件下培养。

3 结论与讨论

在 1% ~ 5% 质量浓度蔗糖范围内,较高质量浓度的蔗糖

表 11 HB0301 休眠体萌发的正交试验结果

试验号	萌发时滞 (d)	萌发高峰 (d)	萌发持续 时间(d)	萌发势 (%)	萌发率 (%)	叶状体数 (片)
1	2	3	5	78.3±2.9abc	100.0±0.0a	78±5cd
2	2	2	4	85.0±2.9a	100.0±0.0a	92±4a
3	2	2	4	80.0±5.0ab	100.0±0.0a	87±3ab
4	2	2	4	68.3±11.5bcd	100.0±0.0a	83±5bc
5	2	3	4	76.7±5.8abcd	100.0±0.0a	85±6ab
6	2	2	5	73.3±10.4abcd	100.0±0.0a	64±7fg
7	2	3	7	65.0±5.0cde	100.0±0.0a	70±3ef
8	3	4	8	53.3±7.6e	83.3±2.9c	58±2g
9	3	5	6	63.3±7.6de	95.0±0.0b	75±4de

可能会抑制休眠体的分化萌发。DW2501-4 在蔗糖质量浓度为 1% 条件下萌发势最高,叶状体数在 2% 蔗糖下产生最多,其次是 1% 蔗糖。HB0301 在蔗糖质量浓度为 1% 条件下萌发势最高,叶状体数也最多,其次是 2% 蔗糖。在 3% 蔗糖和 5% 蔗糖下,DW2501-4 休眠体萌发完全所需时间相对较长,萌发势和萌发率相对较低。随着培养基营养消耗,蔗糖含量降低,对分化的抑制作用降低,剩余的蔗糖可以继续为叶状体的分化和生长供能。因此含 2% 蔗糖的培养基营养供给比含 1% 蔗糖的多,对于叶状体的持续分化和生长繁殖更有利。

在 0.001~1.000 mg/L 范围内,总体上随着 GA₃ 浓度升高,DW2501-4 休眠体分化萌发持续时间越短,在 10.000 mg/L 浓度下叶状体数量较多,但叶状体分化几天后玻璃化。DW2501-4 在 GA₃ 浓度为 1.000 mg/L 时休眠体萌发势最高,但在 0.100 mg/L 浓度下叶状体总数最多,生长状态最好。HB0301 在 GA₃ 浓度为 0.100 mg/L 时,萌发所需时间短,萌发势和萌发率高、叶状体数多。GA₃ 在一定浓度范围内对休眠体萌发有诱导作用,且有最佳诱导浓度,因此 GA₃ 是诱导休眠体萌发的有效因子。

在 20~28℃,总体随着温度升高,DW2501-4 和 HB0301 休眠体萌发时滞逐步减少,叶状体繁殖增多。休眠体的萌发率从 20℃ 的低位快速提升到 24℃ 的 100.0%。20℃ 下休眠体也可以萌发,只是萌发迟缓,说明温度条件对休眠体萌发起重要作用;32℃ 下,虽然休眠体的萌发率和叶状体数量也多,但 28℃ 下叶状体生长状态更好。更低或者更高的温度都不利于 HB0301 和 DW2501-4 休眠体的萌发和叶状体生长。在 24℃ 和 28℃,HB0301 休眠体比 DW2501-4 休眠体萌发持续时间短,萌发势高,说明相同条件下 HB0301 休眠体比 DW2501-4 休眠体更易萌发。

DW2501-4 在光—暗周期为 16 h—8 h 下萌发势最高,24 h—0 h 时产生叶状体数量最多;HB0301 在光—暗周期为 24 h—0 h 下萌发势最高,叶状体数量最多;3 个光—暗周期下萌发率没有明显差异,但长日照可缩短休眠体萌发时间。

参考文献:

[1] Appenroth K J, Nickel G. Turion formation in *Spirodela polyrhiza*: The environmental signals that induce the developmental process in nature [J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(3): 312-320.

[2] Appenroth K J, Palharini L, Ziegler P. Low-molecular weight carbohydrates modulate dormancy and are required for post-germination growth in turions of *Spirodela polyrhiza* [J]. *Plant Biology*, 2013, 15(2): 284-291.

[3] Appenroth K J, Augsten H. Photophysiology of turion germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden. V. Demonstration of a calcium-requiring phase during phytochrome-mediated germination [J]. *Photochem Photobiology*, 1990, 52(1): 61-65.

[4] Newton R J, Shelton D R, Disharoon S, et al. Turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza* [J]. *American Journal of Botany*, 1978, 65(4): 421-428.

[5] Appenroth K J, Ziegler P. Light-induced degradation of storage starch in turions of *Spirodela polyrhiza* depends on nitrate [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2008, 31(10): 1460-1469.

[6] Appenroth K J, Keresztes A, Krzysztofowicz E, et al. Light-induced degradation of starch granules in turions of *Spirodela polyrhiza* studied by electron microscopy [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(2): 384-391.

[7] Reimann R, Hippler M, Machelett B, et al. Light induces phosphorylation of glucan water dikinase, which precedes starch degradation in turions of the duckweed *Spirodela polyrhiza* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(1): 121-128.

[8] Perry T O. Dormancy, turion formation, and germination by different clones of *Spirodela polyrhiza* [J]. *Plant Physiology*, 1968, 43(11): 1866-1869.

[9] Lator M A M. On the influence of gibberellic acid and kinetin on the germination of turions of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden [J]. *Acta Botanica Neerlandica*, 1969, 18(4): 550-557.

[10] Malek L, Oda Y. Germination of *Spirodela polyrhiza* turions: the role of culture conditions during turion development [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1980, 21(2): 357-361.