

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.03.017

引用格式:杨明浩,龙羲,闫旭,等.外源激素处理对高加索三叶草根蘖芽生长发育的影响[J].草地学报,2026,34(3):929—939

YANG Ming-hao, LONG Xi, Yan Xu, et al. Effects of Exogenous Hormone Treatment on the Growth and Development of Rihzome of Caucasian Clover[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(3):929—939

外源激素处理对高加索三叶草根蘖芽生长发育的影响

杨明浩¹, 龙羲¹, 闫旭¹, 姜丁予¹, 王召明², 赵思文¹, 聂婉婷¹, 姜婧雯¹,
王孜成¹, 陈子瑞¹, 杨子源¹, 殷秀杰^{1*}

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150006; 2. 国家草业技术创新中心(筹), 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘要:植物激素在作物生长过程中起着重要的调节作用,然而外源激素诱导高加索三叶草(*Trifolium ambiguum*)根蘖芽生长发育的关系和机制尚不清楚。本研究比较了添加外源生长素(Indole acetic acid, IAA)、细胞分裂素(Cytokinin, CTK)和激动素(Kinetin, KT)对高加索三叶草根蘖芽生长发育、内源激素含量以及相关基因表达的影响,并选取对植株有正向响应的IAA和KT进行复合处理,以研究其对根蘖芽生长的影响。结果表明:IAA浓度为 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,外源IAA处理对高加索三叶草根蘖芽生长促进作用最强;CTK浓度为 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,外源CTK处理对高加索三叶草生长抑制作用最强;KT浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,外源KT处理对高加索三叶草根蘖芽生长影响最大。外源激素通过影响内源激素含量来调控植株生长发育,与对照组相比,外源激素处理对*BR11*, *AP2/ERF*, *KNOX*, *MAPK*基因家族和*PAL*, *POD*等相关基因有着显著影响。复合激素中 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA与 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT效果最佳。本研究为高加索三叶草的人工扩繁和草地快速建植提供了实践指导依据。

关键词:高加索三叶草;植物激素;复合激素;基因家族

中图分类号:S541.2

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)03-0929-11

Effects of Exogenous Hormone Treatment on the Growth and Development of Rihzome of Caucasian Clover

YANG Ming-hao¹, LONG Xi¹, Yan Xu¹, JIANG Ding-yu¹, WANG Zhao-ming², ZHAO Si-wen¹,
NIE Wan-ting¹, JIANG Jing-wen¹, WANG Zi-cheng¹, CHEN Zi-rui¹, YANG Zi-yuan¹, YIN Xiu-jie^{1*}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang Province 150006, China; 2. National Grassland Technology Innovation Center (Provisional), Hohhot, Inner Mongolia 010000, China)

Abstract: Plant hormones play important regulatory roles in crop growth, but the relationship and mechanism by which exogenous hormones induce the growth and development of Caucasian clover root tillers are still unclear. In this study, the effects of indole acetic acid (IAA), cytokinin (CTK) and kinetin (KT) on the growth and development, endogenous hormone content and expression of related genes in Caucasian clover root tillers were compared. The results showed when the concentration of IAA was $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, exogenous IAA treatment had the strongest effect on the growth of Caucasian clover root tillers. And when CTK concentration was $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, exogenous CTK treatment had the strongest inhibitory effect on the growth of Caucasian clover. Exogenous KT treatment had the greatest effect on the growth of Caucasian clover root tillers while KT concentration was $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the control group, exogenous hormone treatment had a signifi-

收稿日期:2025-02-10;修回日期:2025-04-23

基金项目:国家草业技术创新中心(筹)重大创新平台建设专项(CCPTZX2023N04, CCPTZX2024GJ01-1-2);国家自然科学基金项目(32471760);国家重点研发计划(2023YFD1200302);黑龙江省联合重点基金(ZL2024C018)资助

作者简介:杨明浩(2001-),男,汉族,黑龙江鸡西人,硕士研究生,主要从事草种质资源与育种研究, E-mail: 13763669989@163.com; *通信 Author for correspondence, E-mail: yinxiujie@126.com

cant effect on *BRI1*, *AP2/ERF*, *KNOX*, *MAPK* gene family, *PAL*, *POD* and other related genes. In conclusion, $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT work best. This study provides a practical guidance for the artificial propagation and rapid grassland planting of Caucasian clover.

Key words: Caucasian clover; Plant hormone; Complex hormone; Gene family

高加索三叶草(*Trifolium ambiguum*)为多年生根蘖型豆科植物,是优良的放牧型牧草,无论是单播还是混播均具有较高的产量和饲用价值,可通过发达的地下根蘖进行克隆繁殖。高加索三叶草具有发达的地下根蘖,表现为从水平侧根上的不定位置生长出根蘖芽,进而分化生长形成远离母体的独立枝条,这种繁殖方式是植物长期适应自然环境演化的结果^[1]。通过根蘖植株的迅速扩繁,高加索三叶草可以在地下获得营养物质的同时发挥保持水土等生态作用。高加索三叶草拥有较强的适应能力,能够适应多种生境的不同土壤类型,这都与它特有的根蘖系统有关^[2]。目前,国内外对高加索三叶草生物学特性、抗寒性、耐盐性、遗传学特性等进行了较多的研究,但对其根蘖性状的研究较少。

外源激素是指人工合成的植物生长调节剂,是一种和植物激素具有相似生理和生物学活性的物质。其中生长素是一种重要的植物外源激素,可以促进细胞分裂、诱导细胞分化,参与植物生长各阶段及应对外界响应^[3]。同时生长素可以调节植物形态、果实生长情况与植株生长方向^[4]。此外,植物通过调控生长素合成、运输与代谢来适应环境变化应对胁迫条件^[5]。细胞分裂素是调控植物生长和生理的关键激素,主要作用包括促进细胞分裂、生长及延缓衰老^[6],同时细胞分裂素在响应非生物胁迫中也发挥着关键作用。研究显示,细胞分裂素通过调控根系生长和分枝,影响根冠比,增强植物的抗旱能力^[7]。激动素对植物生长发育有显著影响,研究发现,激动素通过调节物质含量和抗氧化酶活性,减少活性氧产生,延缓衰老,增强植物抗逆性。同时促进细胞分裂和组织分化,增加芽和根的数量及叶绿素含量,有利于植物再生^[8]。施加外源激素,不仅对植物的生长产生影响,对植物体中基因的表达同样有影响。

高加索三叶草具有可以克隆繁殖的地下根蘖,使用根蘖芽进行高加索三叶草草坪建植可以弥补种子硬实导致的种子建植效率低的问题。植物激素对植物生长发育起到重要作用,施加适宜浓度的植物激素可以加速植物生长和生物量积累。目前,对于外源激素处理高加索三叶草根蘖芽生长的研究相对较少,不同外源激素对高加索三叶草根蘖芽

生长的调控机制尚不清楚。因此,本试验使用不同浓度的外源生长素(Indole acetic acid, IAA)、细胞分裂素(Cytokinin, CTK)和激动素(Kinetin, KT)对高加索三叶草根蘖芽单一处理或两者复合处理,测定生理生化指标、内源激素含量以及相关基因表达水平,以期筛选出促进高加索三叶草根蘖芽生长发育的最适外源激素种类和浓度,并从内源激素和基因表达方面分析其调控途径,为高加索三叶草的快速扩繁提供理论基础,本研究也对扩大高加索三叶草人工草地栽培面积具有实践意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料取自黑龙江省牧草种质资源与育种重点实验室,选取生长状况良好、形态大小近似、经历过一个生长周期的高加索三叶草根蘖芽部分。将采集的植物材料用无菌水清洗三次以去除表面泥沙,然后留取地上部分1~2 cm、地下部分4~5 cm用于后续试验。

添加的外源激素 IAA, CTK 和 KT, 均购于上海 Sigma 公司。

1.2 材料处理

1.2.1 单一激素盆栽试验 按照不同植物激素(IAA, CTK 和 KT)的不同浓度对高加索三叶草根蘖芽进行分组处理,并将高加索三叶草地下根蘖芽在栽培前浸泡30 s,后将植株移栽于塑料花盆中,以灭菌蛭石为生长基质,花盆底部放置塑料托盘承接外渗营养液,每盆种植10株植物,在60%基质含水量、16 h/8 h 光暗周期、(25±1)℃室内温度下进行盆栽试验。试验分组如表1所示,共13组,每组试验三个重复。

1.2.2 复合激素盆栽试验 按照单一盆栽试验分析可发现,外源植物激素 IAA 和 KT 对植物生长有促进作用,因此选用这两种激素进行复合试验。试验分组方式遵循双因素随机分配原则,试验中两种因素分别为:IAA 浓度(2, 4, 8, 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 KT 浓度(0.5, 1, 5, 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。植株移栽方式以及植株生长条件和上述方法相同。试验分组如表1所示,共17组,每组试验三个重复。

表 1 激素处理组别

Table 1 Hormone treatment groups

处理组 Treatment	激素浓度 Hormone concentration/(mg·L ⁻¹)
CK	不添加激素(Not added)
IAA	2,4,8,16
CTK	50,100,200,400
KT	0.5,1,5,15
IAA+KT	IAA:2,4,8,16 KT:0.5,1,5,15

注:IAA+KT 处理组中,每种浓度两两配对,共 16 个处理组

Note: IAA+KT, each concentration was combined in pairs, a total of 16 groups

1.3 样品收集和分析

各处理组分别于培养的第 10,15 和 20 d 测定植株的株高和叶片数,在第 20 d 收取全部样品,部分样品于冰箱中保鲜保存,另一部分在-80℃的超低温冰箱中冷冻保存,以备后续分析,具体各项指标测定方法如下。

1.3.1 生长指标测定 株高:在植株生长 10,15,20 d 时,使用量尺测量植株从地面到植株最高点的自然高度;须根长度:植株生长 20 d 时,将地下部分小心冲洗干净后用直尺量取须根长度;须根重量:植株生长 20 d 时,将地下部分称重完毕后,将须根全部剪下称重;地下部分生物量:去除地上部分,称量含根蘖在内的所有地下部分重量;叶片重量:植株生长 20 d 时,取植株叶片置于电子天平上称重;地上部分生物量:植株生长 20 d 时,将地上部分与地下部分用镊子分开后,用天平称取地上部分。以上所有生长指标均是每组处理取 5 株测平均值。

1.3.2 内源激素含量测定 称取 1.0 g 叶片样品置于 10 mL 80% 的甲醇溶液(已预冷)中,4℃避光放置过夜。处理 12 h 后加入 0.2 g 交联聚乙烯基吡咯烷酮振荡 10 min,样本在 4℃下以 5000 ×g 离心 15 min 后再次加入 5 mL 甲醇。再次离心,取上清。上清液氮吹干燥后,加入 pH=3 的乙酸乙酯缓冲液萃取 3 次。再次氮吹干燥,加入 1 mL 甲醇后过滤(0.45 μm)。采用高效液相色谱法测定样本中内源生长素、细胞分裂素、脱落酸以及赤霉素(GA₃)含量。流动相设置为 100% 甲醇-水-冰乙酸,流速为 0.7 mL·min⁻¹,温度 40℃,波长 254 nm。

1.3.3 相关基因表达量测定 称取 0.2 g 叶片样品,用 1 mL RNA 保护液研磨、提取 RNA。具体操作如下:取氯仿 200 μL,振荡器上振荡 15~30 s,冰上放置 5 min 后 4℃、12 000 r·min⁻¹、15 min 离心,取最上层相 200 μL 到新离心管。加入 200 μL 异丙醇,温和混匀(上下颠倒),冰上放置 10 min 后 4℃、12 000 r·min⁻¹、10 min 离心,去上清。加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤,4℃、8000 r·min⁻¹、3 min 离心,去上清,重复两次。RNA 沉淀晾干后加入 20 μL 超纯水后使用诺唯赞反转录试剂盒反转录成 cDNA。使用不同引物(表 2)进行 qRT-PCR 定量。

表 2 基因引物序列

Table 2 Sequence of gene primers

基因名称 Gene	(5'—3')引物序列 (5'—3')Primer sequence
BR-F	GGAGGAAGTACGCTGCATGA
BR-R	AAAGCCGGAAGCAAGATCA
AP2/ERF-1-F	TTCACCGGAACCGAAACCC
AP2/ERF-1-R	CAGCTGCAAATTTCCCCCAT
AP2/ERF-2-F	ACCTTGGGGAATGAGGCGAG
AP2/ERF-2-R	GGCAGCCGGAAGATTGAA
KNOX1-F	GATCGCTACTACCCCCTCT
KNOX1-R	CCTGTTATGCCGGTGCTACT
KNOX2-F	GATCGCTACTACCCCCTCT
KNOX2-R	GTCCTGTTATGCCGGTGCTA
MAPK1-F	AGATCGCTACTACCCCCTC
MAPK1-R	TTGTTGCGGTGGTTTTTCACG
MAPK2-F	GACCACCCAGACGGAAT
MAPK2-R	TCTCCGAGGATGCAACCAAC
PAL-F	AGTGCCGAGCAACATAACCA
PAL-R	GCACCGTTCCACTCTCTCAA
POD-F	AAGGTTGTGATGGCTCGGTT
POD-R	TCTGCACAAGAGACGACACC
internal reference-F	TAATGCACCGAATCCCTCGT
internal reference-R	GAATGCAGATGACCGTTGG

1.4 数据统计分析

使用 Excel 2010 软件和 R 语言进行数据处理,使用 SPSS 21.0 版软件进行方差分析,多重比较基于最小显著差数法(Least significant difference, LSD 法)。

2 结果与分析

2.1 植物激素处理对高加索三叶草根蘖芽生长发育的影响

不同浓度的外源 IAA、CTK 和 KT 处理对高加索三叶草生长发育的影响如图 1 所示。与对照组相比, $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的处理组对植株的株高、根长、地上部分生物量、须根重、地下部分生物量和叶片重有显著的促进作用 ($P < 0.05$), 但 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IAA 施用反而对植株的生长影响不大。 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 处理组对植株的根长、须根重、地上部分生物量、地下部分生物量和叶重有着显著促进作用, 但对植株株高没有显著影响 ($P < 0.05$)。CTK 处理组对植株株高、根长、地上部分生物量、须根重、地下部分生物量和叶重均有所抑制。后续研究了外源复合激素对植株生长的影响, 选择了两种促植物生长激素 IAA 和 KT, 对植株进行不同浓度外源复合激素处理。与对照组相比, IAA 和 KT 的复合处理降低了地下部分生物量和须根重量, 但对叶片重量有促进作用。

2.2 植物激素处理对高加索三叶草根蘖芽内源激素含量的影响

不同外源激素对高加索三叶草根蘖芽内源激素含量的影响如图 2 所示。与对照组相比, $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组都可显著增加植株内源 IAA 含量 ($P < 0.05$), $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTK 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTK 处理组可有效降低植株内源 IAA 含量 ($P < 0.05$)。单一激素处理后各处理组 CTK 含量均有所下降, 其中 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTK 处理组效果最好。 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTK 和 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 处理组都可增加内源 ABA 含量, 其他处理组含量有所下降。单一激素处理后各处理组 GA_3 含量均有所降低, 其中 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTK 处理组效果最显著 ($P < 0.05$)。后续研究了复合激素对高加索三叶草内源激素的影响。复合激素处理后内源 IAA 含量与对照组相比均有所增加。 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 KT 处理组中, 随着外源 IAA 浓度的升高, 内源 IAA 含量降低, 其中, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 复合激素处理组内源 IAA 含量最高。外源 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组均可增加植株内源 ABA 含量。内源 GA_3 含量与对照组相比, 除了 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 复合处理组可以显著提升内源 GA_3

含量外, 其他各处理组均显著降低植株内源 GA_3 含量 ($P < 0.05$)。

2.3 植物激素处理下各指标间的主成分分析及相关性分析

2.3.1 单一植物激素处理下各指标间的主成分分析及相关性分析 对单一激素处理下各指标进行主成分分析(图 3A), 主成分 1 和主成分 2 的 PCA 图显示单一外源激素处理组的空间分布与对照组有一定距离。CTK 处理组的空间分布相对集中, 外源 IAA 处理组和外源 KT 处理组与外源 CTK 处理组相比, 距离对照组点位普遍更远。

相关性分析显示(图 3B), 单一激素各处理组之间植株的生长指标(包括株高、叶重、地上部分生物量、地下部分生物量、须根长度以及须根重量)都表现出正相关, 其中地下重和须根重、地上重和株高、地上重和须根长、叶重和其他生长指标都表现出极显著正相关。激素含量之间也都表现出正相关, 其中 CTK 和 GA_3 含量相关性表现最为显著。IAA 与各项生长指标都表现出较高的正相关。其他激素指标除了地下重和须根重之外的生长指标表现出较弱正相关, 对地下重和须根重表现出较弱的负相关性。

2.3.2 复合激素处理下各指标间的主成分分析及相关性分析 对复合激素处理组各指标进行了主成分分析(图 4A), 外源激素处理组的空间分布和对照组有一定距离, 这一结果和单一激素处理组相同。其中 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 和 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 与 KT 复合处理组点的空间分布较为集中, 与对照组相距较近。 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 与 KT 复合处理组与对照组相距较远。

相关性分析显示(图 4B), 复合激素各处理组之间植株的生长指标都表现出正相关, 其中生长指标(包括株高、叶重、地上部分生物量、地下部分生物量、须根长度以及须根重量)都表现出极显著的正相关。在激素含量之间, CTK 和 ABA、CTK 和 GA_3 都呈现较弱的正相关, 而其他激素都呈现较弱的负相关。而激素含量与生长指标之间, 除了 IAA 和地上重、IAA 和叶片重、CTK 和株高、CTK 和须根重、ABA 和各项生长指标都表现出较弱的正相关性之外, 其他各项指标均表现出负相关。

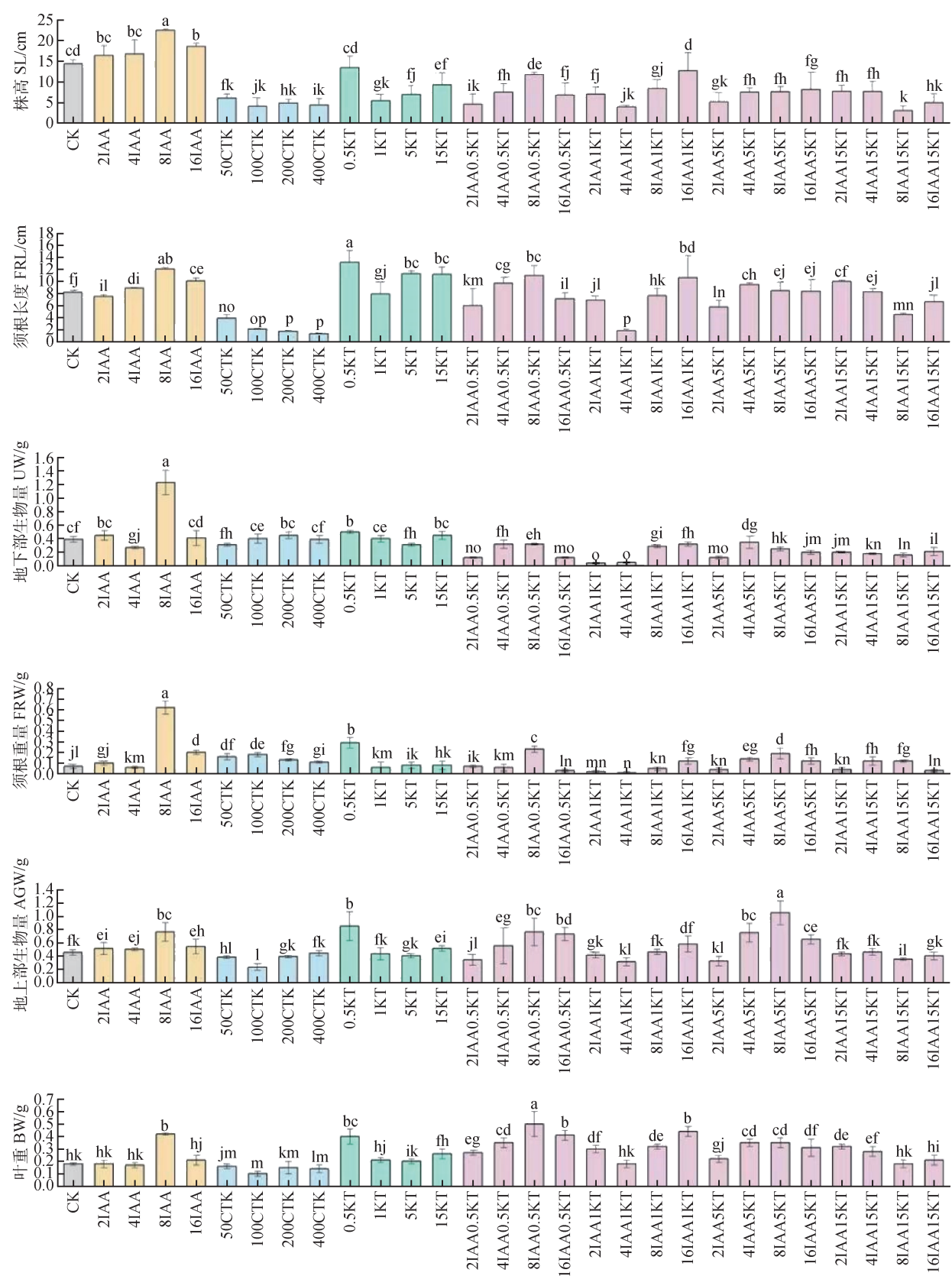


图 1 不同浓度不同激素处理下高加索三叶草的生理指标变化

Fig. 1 Physiological indexes of Caucasian clover treated with different concentrations and different hormones

注:图中不同小写字母表示不同激素处理下测定指标间差异显著(P<0.05),横坐标中的数字代表不同激素的浓度,单位为mg·L⁻¹

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences between the measured indexes under different hormone treatments (P<0.05). The numbers in the abscissa represent the concentrations of different hormones in mg·L⁻¹

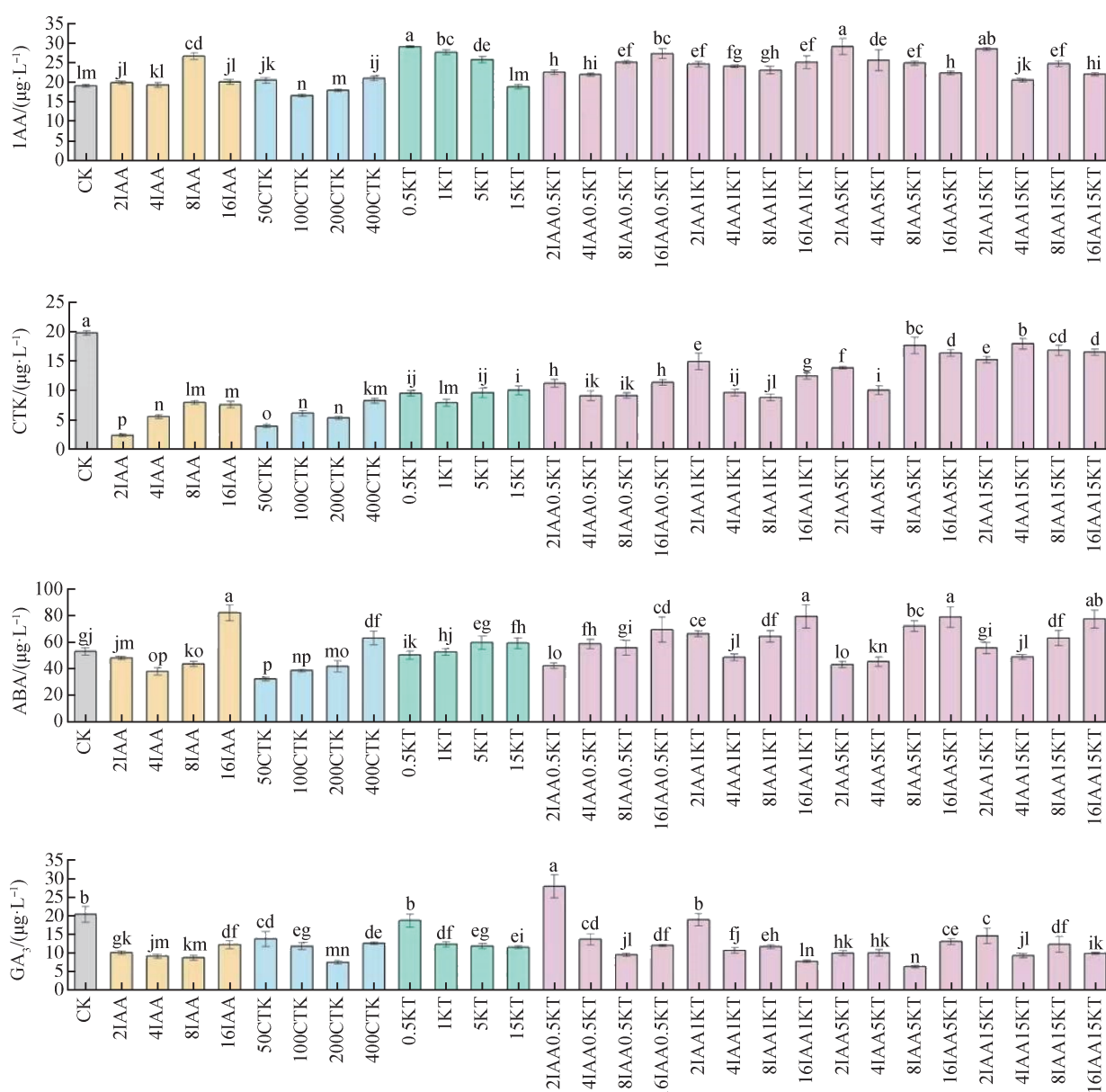


图2 不同浓度不同激素处理下高加索三叶草的内源激素含量变化

Fig. 2 Changes of endogenous hormone content in Caucasian clover treated with different concentrations and different hormones
注:图中不同小写字母表示不同激素处理下测定指标间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences between the measured indexes under different hormone treatments ($P<0.05$)

2.4 外源激素处理对高加索三叶草根蘖芽生长相关基因表达量的影响

从图 5A-C 可以看出单一 IAA, KT 与 IAA 和 KT 复合处理组中 *BRI1*, *AP2/ERF-1* 与 *AP2/ERF-2* 相比于对照组显著上调($P<0.05$)。图 5D-F 可以看出单一 IAA 处理组中 *KNOX-1*, *KNOX-2* 与 *MAPK-1* 表达量相比于对照组没有明显变化;单一 KT 处理组与 IAA 和 KT 复合处理组中, *KNOX-1*, *KNOX-2* 与 *MAPK-1* 表达量相比于对照组发生显著上调($P<0.05$)。由图 5G 可以看出三种处理

组表达量均有所提高。从图 5H-I 可以看出,单一 IAA 处理组中 *PAL* 基因表达量显著下调至对照组的 0.66% ($P<0.05$), 而 *POD* 基因表达量相比于对照组没有明显变化;单一 KT 处理组中 *PAL* 基因表达量显著下调至对照组的 18.85%, 而 *POD* 基因表达量相比于对照组显著上升 2.28 倍 ($P<0.05$); IAA 和 KT 复合处理组中, *PAL* 基因表达量显著下调至对照组的 5.29%, 而 *POD* 基因表达水平相比于对照组没有明显变化, 但相比于单一 KT 处理两个酶基因均显著下调 ($P<0.05$)。

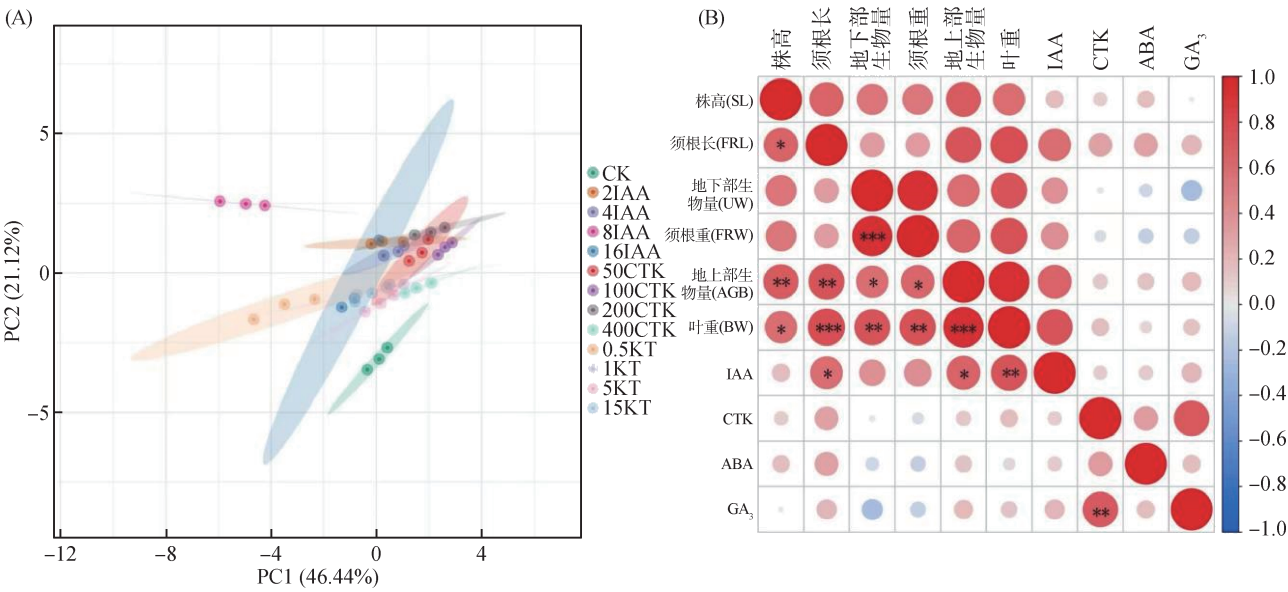


图 3 单一激素处理组间主成分分析(A)和各项生理指标相关性分析(B)

Fig. 3 Principal component analysis (A) and correlation analysis of physiological indicators (B) among groups treated with single hormone

注:图中的*, **, ***表示相关性级别分别为0.05,0.01,0.001

Note: *, **, and *** in the figure indicate that the correlation levels are 0.05, 0.01, and 0.001, respectively

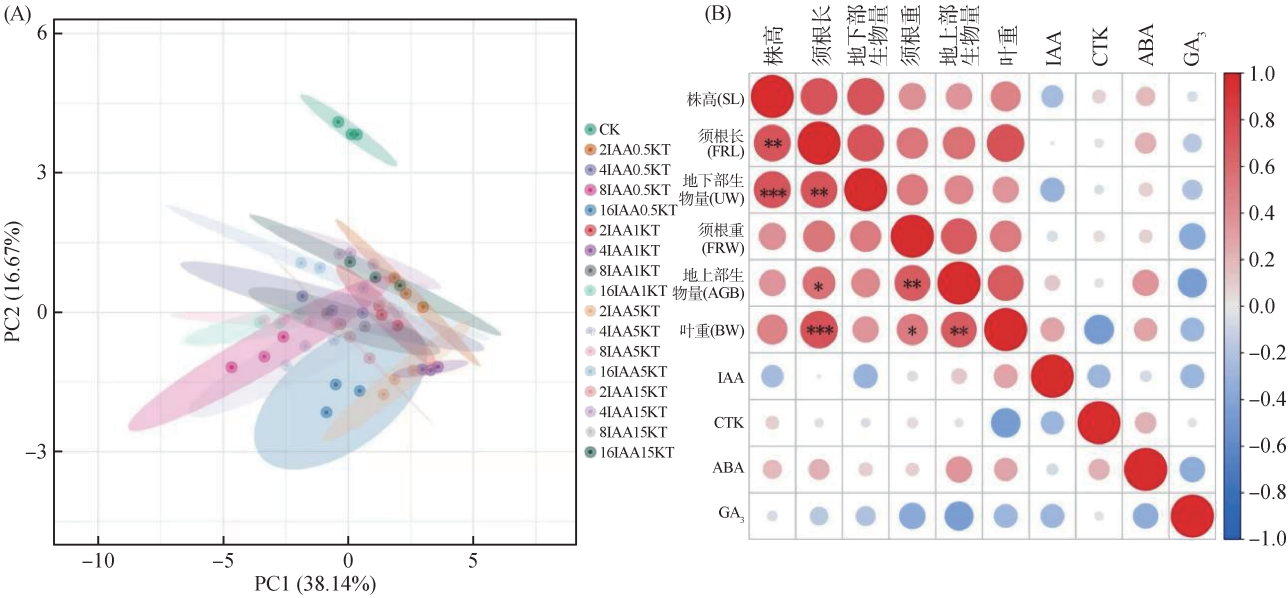


图 4 复合激素处理组间主成分分析(A)和各项生理指标相关性分析(B)

Fig. 4 Principal component analysis (A) and correlation analysis of various physiological indexes (B) between groups treated with complex hormones

注:图中的*, **, ***表示相关性级别为0.05,0.01,0.001

Note: *, **, and *** in the figure indicate that the correlation levels are 0.05, 0.01, and 0.001, respectively

3 讨论

3.1 外源 IAA 处理对高加索三叶草根蘖芽生长的影响

生长素对植物生长的调节具有明显的低浓度促进、高浓度抑制作用,其对植物根系发育具有重

要调控作用^[9],这与本研究的结论相一致。在低浓度范围内,外源 IAA 处理促进了高加索三叶草根蘖芽地上、地下的生长发育,而高浓度时会抑制其促进效果。在本研究中,外源 IAA 处理对高加索三叶草根蘖芽的最佳促生长浓度为 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。生长素最显著的作用之一就是快速介导细胞扩增的变

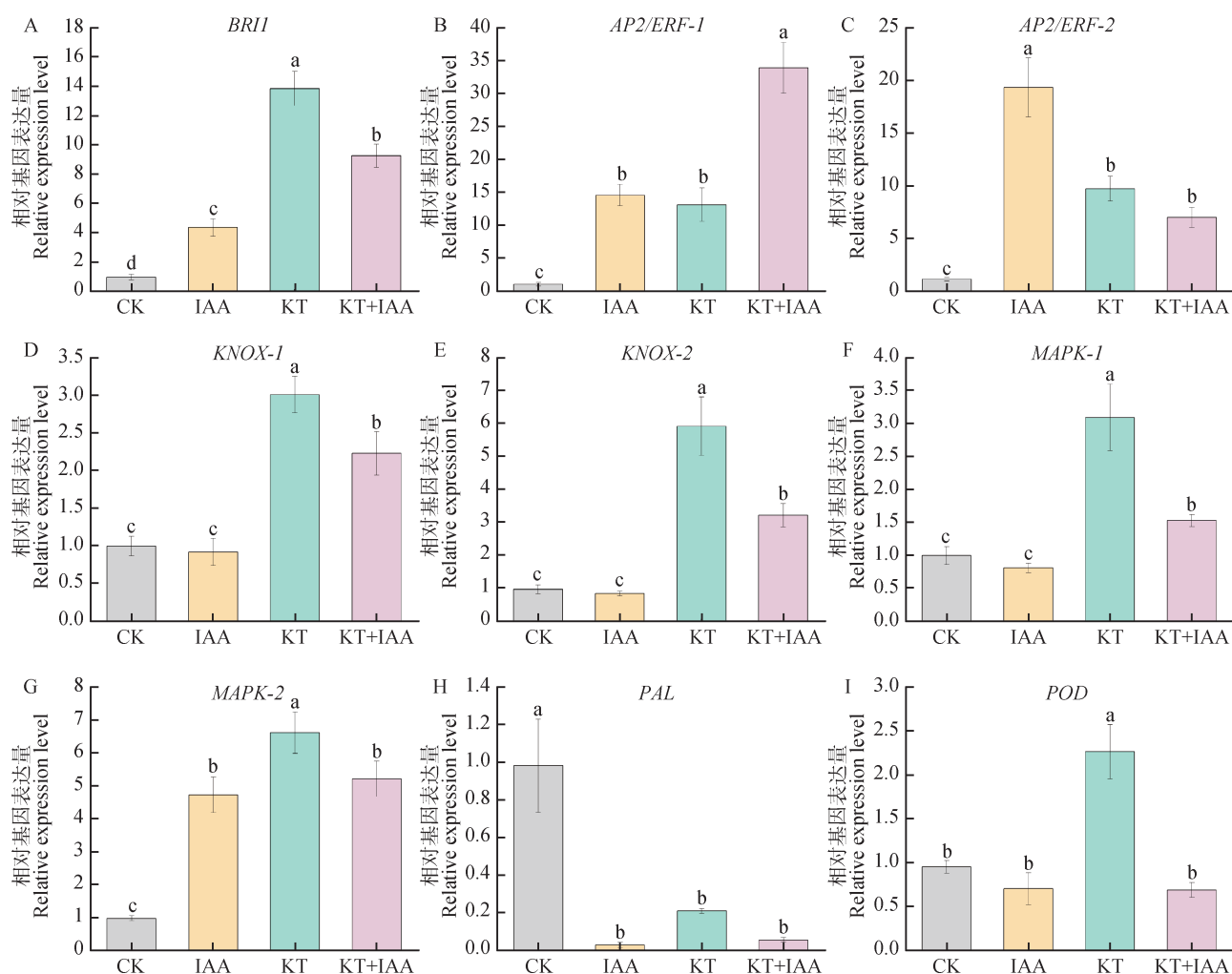


图 5 IAA 和 KT 处理对高加索三叶草根蘖芽基因表达的影响

Fig. 5 Effects of IAA and KT treatments on gene expression in roots and tillers of Caucasian clover

注:图中不同小写字母表示不同激素处理下测定指标间差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences between the measured indexes under different hormone treatments ($P < 0.05$)

化,能够通过调节扩增、分裂和分化等基本细胞过程来控制植物生长和发育的各个方面。有研究报道,生长素会引起细胞壁基质多糖大小的变化,进而加速细胞壁的扩张^[10-11]。生长素对于细胞壁的这种调控作用可能是引起高加索三叶草根蘖芽茎伸长的主要原因。本研究中外源 IAA 处理后,株高增加、叶片重量上升、地上部分生物量增加。已有多个研究报道外源生长素能够通过控制主根伸长和侧根的形成以调节根系结构的整体发育。有研究表明,IAA 处理能够促进黄瓜根系的整体发育以及主根的生长^[12]。生长素会以时间依赖性方式通过影响根内不同蛋白质的积累和损失来调节拟南芥根系的发育过程^[13]。同时,IAA 处理后叶片的发育也能够通过增强光合速率积累更多有机质并传递到地下部分^[14]。本研究中,8.0 mg·L⁻¹ IAA 处理会

影响高加索三叶草根蘖芽地下部分的生长,主要包括须根长度、重量以及地下部分生物量的增加。

3.2 外源细胞分裂素处理对高加索三叶草根蘖芽生长的影响

细胞分裂素在芽和根中起着关键且相反的作用,细胞分裂素是茎分生组织活性的正调节剂和根分生组织活性的负调节剂^[15]。CTK 和 KT 是两类不同的细胞分裂素。不同类型的细胞分裂素对植物生长发育的影响也不同。叶晓青等人比较了外源 6-苄基氨基嘌呤、KT 以及苯基脲类细胞分裂素处理对扇蕨(*Neocheiropteris palmatopedata*)不定芽发育的不同影响,这三类细胞分裂素对叶片不定芽的诱导率分别为 25.0%、40.6% 和 35.7%^[16]。本研究中,外源 CTK 和 KT 处理也表现出了对高加索三

叶草根蘖芽生长不同的影响,外源CTK处理后叶重和须根长度、重量下降,而外源KT处理后叶重和须根长度、重量上升。该结果进一步证明了不同细胞分裂素处理对植物生长产生不同程度的影响,可能是由于不同细胞分裂素的靶基因不同,从而引起内部基因转录、蛋白调控过程不同。

3.3 外源 IAA、CTK 处理对高加索三叶草根蘖芽内源激素的影响

外源 IAA 处理对高加索三叶草根蘖芽生长发育有促进作用。已有研究表明,外源生长素处理能够通过调节这些内源激素来进一步调节植物生长发育^[17]。本研究中,外源 IAA 处理对植株内源 IAA 含量有促进作用,这与 Jin 等人的结果一致^[18]。内源 IAA 含量的这种变化能够促进高加索三叶草根蘖芽植株株高伸长、叶片发育以及有机质的积累^[19]。本研究结果显示,外源 IAA 处理能够显著降低内源 CTK 的含量。外源 CTK 和 KT 处理也能够通过影响高加索三叶草根蘖芽内源激素含量,从而影响植物生长发育。本研究中,外源 CTK 和 KT 细胞分裂素处理显著降低了内源 CTK 含量,这可能与外源细胞分裂素能够对内源细胞分裂素的合成、转运中涉及的反馈调节有关。也有可能是不同细胞分裂素之间本身也存在竞争性抑制^[20]。有研究表明将外源细胞分裂素应用于玉米和豌豆(*Pisum sativum*)根部也会导致 IAA 水平升高^[21-22]。与此一致的是,拟南芥中内源性细胞分裂素含量的下降会导致生长素水平下降^[23]。本研究中两种不同类型的外源细胞分裂素处理对高加索三叶草根蘖芽内源 IAA 含量产生了不同的影响,进一步表明细胞分裂素对内源生长素含量的影响并不是可以简单总结的,而是与其类型、作用浓度有关。外源 CTK 和 KT 细胞分裂素处理都显著降低了高加索三叶草根蘖芽内源 GA₃ 含量。细胞分裂素和赤霉素信号途径中具有相同的调控因子 ARR1,这是细胞分裂素信号的正调控因子,也是赤霉素信号的负调控因子。由此表明细胞分裂素与赤霉素之间可能存在相互负调控的情况^[24]。这能解释本研究中两种不同的细胞分裂素处理都降低了高加索三叶草根蘖芽内源 GA₃ 含量的现象。

3.4 外源激素处理对高加索三叶草根蘖芽生长相关基因表达量的影响

油菜素甾醇是对植物生长和发育至关重要的

类固醇激素。该激素对植物根部生长发育的影响存在最佳浓度,过量和缺乏均会造成短根的情况^[25-26]。同时油菜素甾醇也能参与植物在干旱、寒冷、炎热和盐度等多种胁迫下的应激反应^[27]。本研究结果表明,IAA 和 KT 复合处理能够显著上调高加索三叶草根蘖芽油菜素甾醇相关基因的表达,进一步证明了生长素和细胞分裂素对植物内源油菜素甾醇通路的影响。AP2/ERF 转录因子家族是植物体内的一个重要家族,是连接植物激素信号的关键调节器^[28-29]。AP2/ERF 转录因子能参与调控植物生长发育、果实成熟、防御反应和新陈代谢等多个过程^[30-33]。在本研究中,IAA 和 KT 复合处理能显著上调 AP2/ERF 基因的表达,进一步证明外源生长素和细胞分裂素的添加也能通过 AP2/ERF 转录因子调控整个植物内源激素信号传导网络。KNOX 基因已被证明可以调控多种激素途径,包括生长素和油菜素甾醇,以及许多在植物发育中发挥重要作用的基因^[34]。本研究中,KNOX 基因在 KT 处理组中表达量显著上调,证明了 KNOX 基因对外源细胞分裂素的响应。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联是真核生物中普遍存在的信号模块,能够通过下游信号靶标(包括其他激酶、酶、细胞骨架蛋白或转录因子)的磷酸化,在环境和发育信号的转导中发挥关键作用^[35]。本研究中,IAA 和 KT 复合处理能显著提高高加索三叶草根蘖芽中 MAPK 基因的表达水平。苯丙烷途径主要负责合成许多对植物生长和应激反应很重要的化合物。本研究结果表明,IAA 和 KT 复合处理显著降低高加索三叶草根蘖芽 PAL 相关基因的表达水平。与此同时,本研究结果表明,仅 KT 单独处理显著上调高加索三叶草根蘖芽 POD 相关基因的表达水平,而外源 IAA 处理和复合处理对此无影响。这一差异现象可能跟植株本身基因型、生长阶段有关,并且具有一定组织特异性^[36]。同样,在防御酶相关基因表达方面,本研究也证实了外源生长素与细胞分裂素之间的拮抗作用。

4 结论

外源生长素能显著促进高加索三叶草根蘖芽地上地下的生长发育,细胞分裂素处理则会抑制高加索三叶草的发育和生物量的积累,不同浓度外源激动素处理会导致高加索三叶草的生长指标出现

差异。外源生长素处理,高加索三叶草根蘖芽 *BR*, *AP2/ERF* 和 *MAPK-2* 表达量显著上调, *PAL* 表达量有所下降。外源激动素处理,高加索三叶草根蘖芽 *BR*, *AP2/ERF*, *KNOX*, *MAPK* 和 *POD* 表达量均显著上调, *PAL* 表达量下降。本研究筛选出促进复合激素 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 与 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 为高加索三叶草根蘖芽生长发育的最适浓度与激素种类,并从内源激素和基因表达方面分析其调控途径,为高加索三叶草的快速扩繁提供理论基础,也对扩大高加索三叶草人工草地栽培面积具有实践意义。

参考文献

- [1] KIM B W, ALBRECHT K A. Yield and species composition of binary mixtures of kura clover with Kentucky bluegrass, orchardgrass, or smooth brome grass [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2008, 21(7):995-1002
- [2] SPENCER K, GOVAARS G A, HELY W F. Early phosphorus nutrition of eight forms of two clover species, *Trifolium ambiguum* and *T. repens* [J]. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2011, 23(4):457-475. DOI:10417869
- [3] 王晓莉. 生长素信号对植物生长与系统性获得抗性的调控作用[D]. 南京:南京农业大学, 2008:8-72
WANG X L. Regulation of auxin signal on plant growth and systemic acquired resistance[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008:8-72
- [4] 夏丽莎. 两种植物珠芽发育中生长素信号通路相关基因的作用[D]. 贵阳:贵州大学, 2019:9-93
XIA L S. The role of auxin signaling pathway related genes in the development of bulbil for two species of plant [D]. Guiyang: Guizhou University, 2019:9-93
- [5] 孙丽静, 赵慧, 吕亮杰, 等. 小麦细胞分裂素受体基因 *TaHK1* 的生物信息学及表达特性分析[J]. *华北农学报*, 2019, 34(4):75-82
SUN L J, ZHAO H, LYU L J, et al. Bioinformatics and expression analysis of cytokinin receptor *TaHK1* in wheat [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(4):75-82
- [6] POSPÍŠILOVÁ H, JISKROVÁ E, VOJTA P, et al. Transgenic barley overexpressing a cytokinin dehydrogenase gene shows greater tolerance to drought stress [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(5):692-70
- [7] 陶园. 拟南芥 ICE1 通过调节赤霉素合成调控植物生长发育[D]. 泰安:山东农业大学, 2009:3-131
TAO Y. *Arabidopsis* ICE1 regulates plant growth and development by regulating gibberellin synthesis [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2009:3-131
- [8] 张佩佩. 吲哚乙酸和激动素对镉胁迫下菊芋生理响应的影响[D]. 金华:浙江师范大学, 2022:2-74
ZHANG P P. Effects of indole acetic acid and kinetin on physiological response of *Helianthus tuberosus* L. under ca stress [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2022:2-74
- [9] 李晓冰. 生长素、乙烯利对大豆生根及茎伸长的调控作用[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2018:2-47
LI X B. Regulation of auxin and ethephon on rooting and stem elongation of soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018:2-47
- [10] COSGROVE, DANIEL J. Growth of the plant cell wall [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(11):850-861
- [11] KUTSCHERA U, DENG Z, OSES-PRIETO JA, et al. Cessation of coleoptile elongation and loss of auxin sensitivity in developing rye seedlings: A quantitative proteomic analysis [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(5):509-517
- [12] 欧阳立明, 张舜杰, 陈剑峰, 等. 不同植物生长物质对水培黄瓜幼苗生长和根系发育的影响 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(3):161-166
OUYANG L M, ZHANG S J, CHEN J F, et al. Effects of different plant growth substances on the growth and root development of water cultured cucumber seedlings [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(3):161-166
- [13] WILLIAM S, RAY W, SHERRY H, et al. Exogenous auxin elicits changes in the *Arabidopsis thaliana* root proteome in a time-dependent manner [J]. *Proteomes*, 2017, 5(3):16
- [14] 娄成后. 高等植物生长发育中物质的运输与信息的传递(一) [J]. *生物学通报*, 1991(11):3
LOU C H. Material transportation and information transmission in the growth and development of higher plants (I) [J]. *Bulletin of Biology*, 1991, 26(11):3
- [15] TOMÁS W, VÁCLAV M, VALÉRIE L. Cytokinin-deficient transgenic *arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11):2532-2550
- [16] 叶晓青, 余建明, 邓衍明, 等. 不同类型细胞分裂素对扇蕨不定芽诱导和植株再生的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(1):175
YE X Q, SHE J M, DENG Y M, et al. Effects of cytokinins of different types on induction of adventitious buds and plant regeneration in *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 28(1):175
- [17] CAI T, MENG X, LIU X, et al. Exogenous Hormonal Application Regulates the Occurrence of Wheat Tillers by Changing Endogenous Hormones [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:1886
- [18] JIN M, LIU Y, SHI B, et al. Exogenous IAA improves the seedling growth of *Syringa villosa* via regulating the endogenous hormones and enhancing the photosynthesis [J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 308:111585
- [19] 宋佳琦, 王玉祥, 张博. 内源激素变化及外源生长素对紫花苜蓿种子萌发过程的影响 [J]. *草地学报*, 2018, 26(3):691-696
SONG J Q, WANG Y X, ZHANG B. Effects of endogenous hormone change and exogenous auxin on the germination pro-

- cess of alfalfa seed [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26 (3): 691-696
- [20] 金洪. 外源 CPPU 对黄瓜果实生长发育及内源激素的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010: 6-64
- JIN H. Effects of exogenous CPPU on growth and development of cucumber fruit and endogenous hormones [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2010: 6-64
- [21] BOURQUIN M, PILET PE. Effect of zeatin on the growth and indolyl-3-acetic acid and abscisic acid levels in maize roots [J]. *Physiologia Plantarum*, 1990, 80 (3): 342-349
- [22] BERTELL G, ELIASSON L. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid [J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 84 (2): 255-261
- [23] BRZOBOHAT B, MOORE I, PALME K. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development [J]. Springer Netherlands, 1994, 26 (5): 1483-97
- [24] EL-SHOWK S, RUONALA R, HELARIUTTA Y. Crossing paths: Cytokinin signalling and crosstalk [J]. *Development*, 2013, 140 (7): 1373-1383
- [25] CHAIWANON J, WANG ZY. Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in *Arabidopsis* roots [J]. *Current biology*, 2015, 25 (8): 1031-1042
- [26] GONZALEZ-GARCIA MP, VILARRASA-BLASI J, ZHI-PONOVA M, et al. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots [J]. *Development*, 2011, 138 (5): 849-859
- [27] PLANAS-RIVEROLA A, GUPTA A, BETEGÓN-PUTZE, ISABEL, et al. Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress [J]. *Development*, 2019, 146 (5): dev151894
- [28] GU C, GUO ZH, HAO PP, et al. Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm [J]. *Botanical Studies*, 2017, 58 (1): 6
- [29] KITOMI Y, ITO H, HOBOT T, et al. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOTLESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling [J]. *The Plant Journal*, 2011, 67 (3): 472-484
- [30] YIN X R, XIE X L, XIA X J, et al. Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening [J]. *The Plant Journal*, 2016, 86 (5): 142
- [31] TONG L, JIANG Z, ZHANG L, et al. Apple (*Malus domestica*) MdERF2 negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription [J]. *The Plant Journal*, 2016, 88 (5): 735-748
- [32] ZHAO Y, WEI T, YIN KQ, et al. *Arabidopsis* RAP2.2 plays an important role in plant resistance to *Botrytis cinerea* and ethylene responses [J]. *New Phytologist*, 2012, 195: 450-460
- [33] 洪林, 杨蕾, 杨海健, 等. AP2/ERF 转录因子调控植物非生物胁迫响应研究进展 [J]. *植物学报*, 2020, 55 (4): 496
- HONG L, YANG L, YANG H J, et al. Research advances in AP2/ERF transcription factors in regulating plant responses to abiotic stress [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55 (4): 496
- [34] TSUDA K, HAKE S. Diverse functions of KNOX transcription factors in the diploid body plan of plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 27 (5): 91-96
- [35] XU J, ZHANG S. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development [J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20 (1): 56-64
- [36] ZIESLIN N, BEN-ZAKEN R. Effects of applied auxin, gibberellin and cytokinin on the activity of peroxidases in the peduncles of rose flowers [J]. *Plant Growth Regulation*, 1992, 11 (1): 53-57

(责任编辑 付 宸)