

湿地松不定根诱导中内源激素水平变化*

王会周¹ 陈志东² 石礼盛¹ 黄淑敏¹

(1. 深圳市宝安区罗田林场, 广东 深圳 518100; 2. 福建农林大学 林学院, 福建 福州 350002)

摘要 以4年生湿地松 *Pinus elliottii* 母株上所采穗条为试验材料, 通过扦插育苗方法, 分析不定根诱导过程中插穗根茎解剖构造与内源激素水平的变化。结果表明: 湿地松无潜伏根原基, 生根诱导20天产生不定根原基, 诱导45天形成不定根。与诱导45天有根苗相比, 诱导45天无根苗具有根原基, 但根原基周围薄壁细胞中积累了大量脂性物质, 不定根发育受阻。内源 IAA、ABA、GAs 与不定根诱导密切相关, ZR 影响不明显。从生根过程中激素水平变化模式来看, IAA 先下降而上升、ABA 直线上升、GAs 先上升后下降。不定根诱导45天的无根苗与有根苗相比, IAA、ABA、ZR 水平无显著差异, 但无根苗中 GAs 显著高于有根苗。在生根诱导20天后, 以50 mg/L GAs 生物合成抑制剂多效唑 (PBZ) 喷施针叶, 能显著提高插穗生根率和根条数。初步认为, 湿地松不定根诱导应采用两步生根法, 前期 (扦插0~20天) 采用 IAA、GAs、ABA 组成的复合生长调节剂促进根原基形成, 后期 (扦插21~45天) 施加 PBZ 以促进不定根的发育。

关键词 湿地松; 良种繁育; 内源激素; 赤霉素; 多效唑

中图分类号: S791 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2022) 02-0096-06

Changes in Endogenous Hormone Levels during Adventitious Root Induction in *Pinus elliottii*

WANG Huizhou¹ CHEN Zhidong² SHI Lisheng¹ HUANG Shumin¹

(1. Shenzhen Bao'an Luotian Forest Farm, Shenzhen, Guangdong 518100, China;

2. College of forestry, Fujian agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract In order to provide scientific reference for the improvement of rooting ability of *Pinus elliottii*, the changes of anatomical structure and endogenous hormone levels of cuttings in adventitious root induction were analyzed by cutting. The results showed that there was no latent root primordium in *P. elliottii*. Adventitious root primordium was generated after 20 days of induction. Adventitious root was formed after 45 days of induction. After 45 days of rooting induction, compared with rooted cuttings, root-free cutting had root primordia, but a lot of lipid substances that accumulated in parenchyma cells surrounding root primordia. Adventitious root development was blocked. Endogenous IAA, ABA and GAs were closely related to adventitious root induction, while ZR did not significantly affected. The pattern of hormone levels during rooting showed that IAA decreased first and then increased, and ABA increased linearly, and GAs increased first and then decreased. There were no significant differences in IAA, ABA and ZR levels between root and rootless cuttings after 45 days of adventitious root induction, and GAs in rootless cuttings was significantly higher than that in root cuttings. After 20 days of rooting induction, spraying needles with 50 mg/L PBZ, which was a GAs biosynthesis inhibitor, could significantly increase the rooting rate and root number of cuttings. It was suggested that the adventitious roots of *P. elliottii*

第一作者/通信作者: 王会周 (1973—), 男, 工程师, 主要从事林木良种种苗培育等方面研究, E-mail: whuizhou73@163.com。

should be induced by two-step rooting method. In the early stage (cutting 0-20 days), a combined growth regulator composed of IAA, GAs and ABA should be used to promote the formation of root primordia, and in the later stage (cutting 21-45 days), PBZ can be added to speed up the development of adventitious roots.

Key words *Pinus elliottii*; improved seed breeding; endogenous hormone; gibberellic acid; Paclobutrazol

湿地松 *Pinus elliottii* 生长性状优良, 基于脂材两用的开发应用价值, 目前已成为我国南方主要造林树种^[1]。速生、高抗、优质多功能目标林木育种是实现林业可持续经营的根本与保障。然而当前湿地松速生高抗种子园产量较低, 育种周期又长, 远远不能满足当前种苗良种化大规模发展的需要^[2]。因此, 生产上建立一种高效的繁殖湿地松优良种质的技术体系尤为迫切。

无性繁殖是能保持亲体优良性状的一种繁殖技术^[3]。扦插作为无性繁殖技术中最简单易行的一种手段, 被广泛应用于林业科研和生产。以往研究发现, 湿地松扦插具有明显的生理年龄效应, 母株年龄为 1~3 年时, 扦插生根可达 90% 以上, 而母株年龄为 6 年时, 扦插生根率不足 30%^[2]。季孔庶等^[4]也发现, 4 年生以上马尾松 *Pinus massoniana* 母株插穗生根能力显著下降。杨峰等^[5]认为, 年龄效应是进行松树嫁接、扦插、组织培养等无性繁殖时的共同难题, 不定根诱导是组培、扦插无性育苗中的关键技术环节, 年龄效应直接影响不定根发生。为加快湿地松优良种质材料的推广应用, 进一步提升湿地松无性育苗中的生根稳定性极为重要。激素在植物不定根形成中起到至关重要的作用^[6-7]。因此, 本试验以 4 年生湿地松母株上所采穗条为试验材料, 通过扦插育苗的方法, 分析不定根诱导过程中插穗根茎解剖构造与内源激素水平变化, 以期揭示内源激素对湿地松生根的影响, 为湿地松生根能力优化与提升提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以优良的湿地松种子培育实生苗为采穗母株, 通过截顶促萌修剪方式进行母株管护, 采集 4 年生母株在当年 3 月份生产的 5~8 cm 长、生长健壮、未木质化穗条为试验材料, 通过扦插方式开展不定根诱导试验。

1.2 试验方法

1.2.1 不定根诱导 采用容器扦插育苗的方法, 以黄泥为育苗基质, 参照前人最优^[8]的湿地松扦插育苗生根处理方式(扦插成活率 97.5%), 以 1 000 mg/L IAA 浸泡插穗基部 5 min 后插入经高锰酸钾消毒的黄泥杯(Φ=4 cm, 高=7 cm)。不定根诱导试验在控制环境条件的光照培养箱中进行, 温度 25 ± 1℃, 光照强度 2 000 lx, 每日光照 16 h, 相对湿度 85%。试验重复 5 次, 每重复 60 株。

1.2.2 不定根解剖构造观察 显微镜观测: 在扦插生根处理中每隔 5 天取出穗条, 经流水冲洗干净后, 切下约 5~8 mm 长度大小的根茎基部, 转入 FAA 固定液进行, 依次用 30%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% 酒精系列脱水, 然后进行透蜡和包埋。最后用转动切片器切片, 进行番红固绿对染后用阿拉伯中性树胶封片, 观察不定根发生并显微拍照。重复 3 次取样进行观察拍照。

油镜观测: 为进一步清晰观测湿地松生根过程中根茎细胞变化, 参考吴均章和韩素芬方法^[9], 利用油镜进行显微观测。取样时间与方法同上, 然后将根茎样品转入 FAA 液固定, 再依次用 50%、70%、80%、95%、100% 酒精脱水。脱水后将根茎置入 Technovit7100 活化液中渗透, 然后采用电镜超薄切片用的定向包埋板, 于 40℃ 温箱中使之快速固化, 最后用旋转切片器切片, 利用 Gimsa 染色后在 1% 偏重亚硫酸钠溶液中漂洗, 将切片自然晾干后放入二甲苯透明, 中性树胶封藏。重复 3 次取样在油镜下进行观察拍照。

1.2.3 内源激素水平测定 根据生根解剖构造显微观察结果, 于生根诱导处理第 0 (初期, R0)、20 (根原基形成期, R20)、45 天 (不定根形成期, R45) 取样测定内源激素水平的变化。使用仪器: 美国安捷伦公司生产的 Agilent 1290 液相色谱仪、Agilent 6460C 三重四极杆质谱仪和配电喷雾离子源, 测定内源激素包括吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素 (GAs)、脱落酸 (ABA) 和玉米素核苷

(ZR), 激素标准品为 Sigma 公司生产, 色谱纯级。色谱条件和质谱条件参照王荣^[10]的方法, 取不同生根时间处理 R0、R20、R45 插穗基部 1 cm 长的根茎为测试样品, 各重约 2 g, 于液氮中研磨成粉末, 分离上清液, 过聚乙烯吡咯烷酮 PVPP 柱和二乙基氨基乙基交联葡聚糖凝胶 (DEAESephadex A-25) 柱净化, 过 0.22 μm 滤膜后检测。重复 3 次取样进行测定。

1.2.4 外源生长调节剂促根处理 根据解剖构造与内源激素水平分析结果, 生根处理 20 天后, 采用 4 个不同浓度多效唑 (PBZ) 水溶液喷施插穗针叶。其中, 以 0 mg/L PBZ (纯水) 为对照, 设置 25、50、100 mg/L 3 个 PBZ 处理。喷施插穗针叶时, 每株喷施 5 mL, 每隔 10 天喷施一次, 连续喷施 3 次。于生根处理 45 天, 取出插穗观察湿地松生根能力变化。统计不同 PBZ 处理插穗生根率和

长度 ≥ 5 mm 的不定根数目。其中, 生根率 (%) = (生根苗株数 ÷ 扦插穗条总数) × 100, 根条数 = 生根穗条不定根数目总和 ÷ 生根苗株数。每处理 5 重复, 每重复扦插 60 株。生根培养温度、光照、湿度条件同 1.2.1。

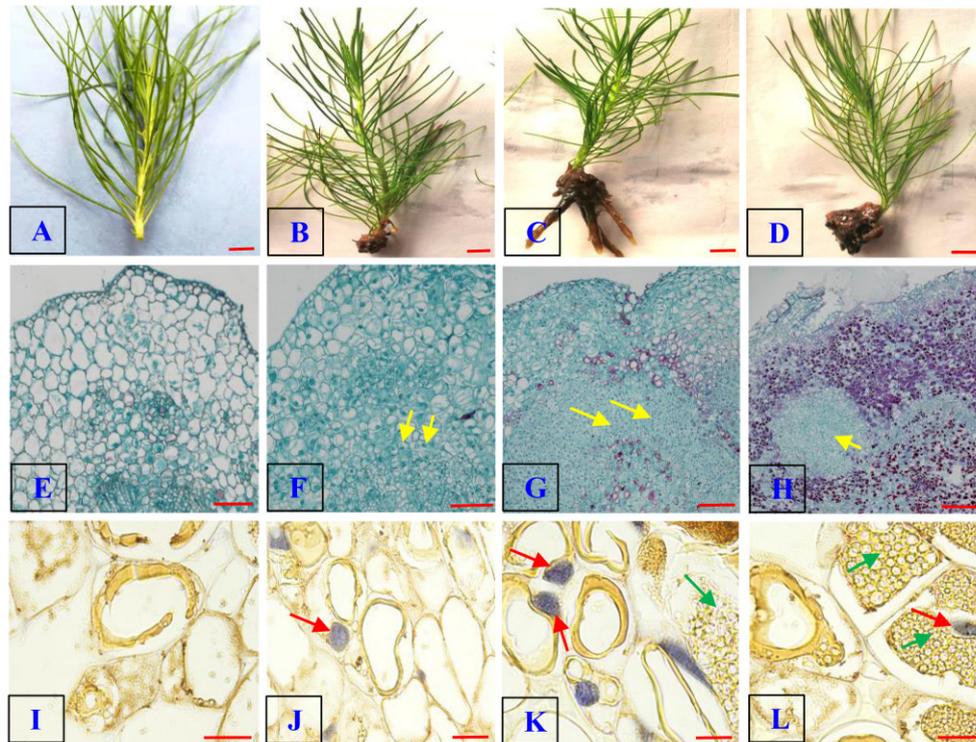
1.3 数据处理

利用单因素方差分析 (one-way ANOVA, α=0.05) 对不同 PBZ 处理间的均值进行差异显著性分析。数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行方差分析及 Duncan's 多重比较 (α=0.05)。

2 结果与分析

2.1 不定根发生过程分析

以湿地松 4 年生母株上扦插穗条为初始材料 (图 1A) 进行不定根诱导, 通过每隔 5 天取样动态观察发现, 湿地松生根处理 20 天时, 茎切口



注: A~D, 不同生根诱导处理时间根茎形态: A, 0 天 (R0); B, 20 天 (R20); C, 45 天 (R45 有根); D, 45 天 (R45 无根); E~F, 不同生根时间根茎显微解剖构造: E, 0 天 (R0); F, 20 天 (R20); G, 45 天 (R45 有根); H, 45 天 (R45 无根); I~L, 不同生根时间根茎细胞油镜显微构造: I, 0 天 (R0); J, 20 天 (R20); K, 45 天 (R45 有根); L, 45 天 (R45 无根)。比例尺: A~D, 1 cm; E~H, 200 μm; I~L, 50 μm。

Note: A~D, morphology of root and stem from different rooting induction time: A, 0 day (R0); B, 20 days (R20); C, 45 days (R45 with roots); D, 45 days (R45 without roots); E~F, microscopic anatomical structure of root and stem from different rooting induction time: E, 0 day (R0); F, 20 days (R20); G, 45 days (R45 with roots); H, 45 days (R45 without roots); I~L, microscopic anatomical structure of root and stem from different rooting induction time using oil immersion lens: I, 0 day (R0); J, 20 days (R20); K, 45 days (R45 with roots); L, 45 days (R45 without roots). Scale bars: A~D, 1 cm; E~H, 200 μm; I~L, 50 μm.

图 1 湿地松不定根生根过程及解剖构造变化

Fig.1 Rooting process and variations for anatomical structure of adventitious root in *Pinus elliottii*

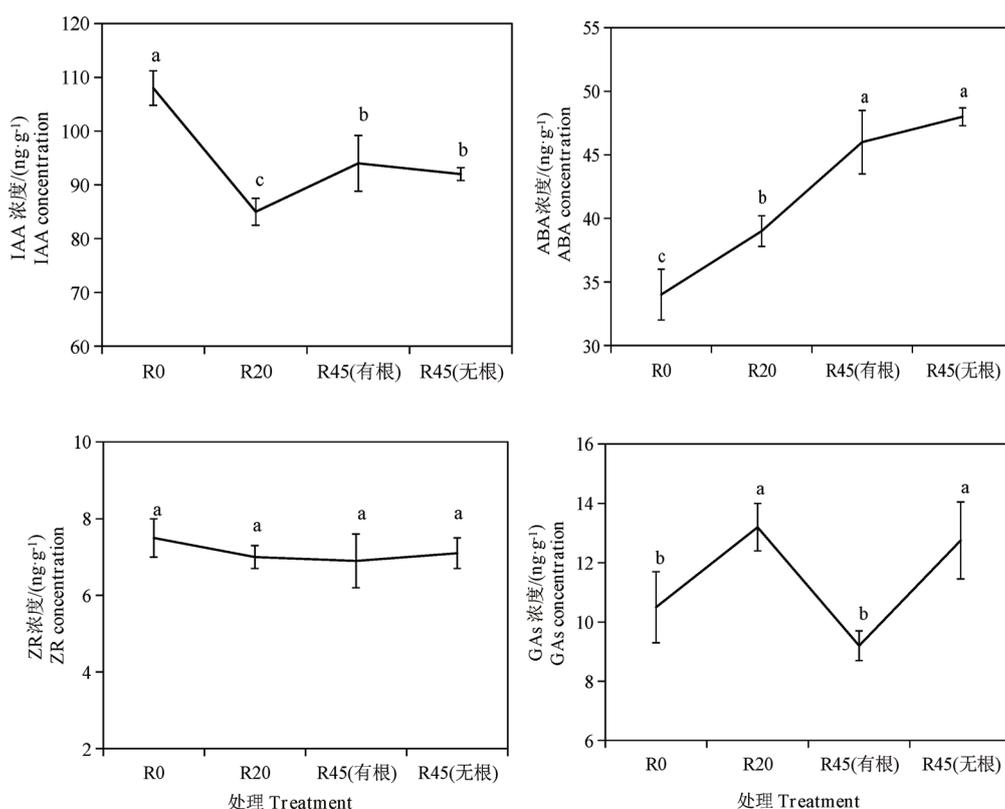
愈合(图 1B), 45 天时形成不定根(图 1C)。同时, 生根处理 45 天后观察到大量茎基部愈伤化程度严重的无根苗(图 1D)。通过显微结构观测证明, 湿地松无潜伏根原基(图 1E), 生根处理 20 天, 在维管形成层诱导产生根原始体细胞(图 1F, 黄色箭头所示), 在生根处理 45 天时发育形成不定根(图 1G)。而生根处理 45 天的无根苗中也发现了根原始体细胞团(黄色箭头所示), 但其周围薄壁细胞中出现大量染色为红色的栓化或脂质化物质(图 1H)。为进一步确证根茎细胞发育过程, 在高倍高清油镜显微镜观测下, 根原始体细胞(红色箭头所示的具有增大细胞核的细胞)在生根处理 20 天产生(图 1J), 而生根处理 45 天在有根与无根苗中均诱导出了根原始体, 但在无根苗的根茎细胞中发现大量脂性物质(绿色箭头所示, 图 1K~1L)。上述结果表明, 扦插生根处理 20 和 45 天, 可分别作为湿地松扦插苗根原基发生与不定根形成两个关键时期。同时, 根茎细胞中代谢物质积累与湿地松不定根发育和形成密切相关。

2.2 内源激素水平变化

内源激素与不定根形成及植物代谢物质积累紧密关联。根据生长素(IAA)、细胞分裂素(ZR)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GAs)四大类内源性激素在湿地松不定根形成中检测结果发现, IAA、ABA、GAs 水平随生根过程不同而变化, 而 ZR 水平变化不大。其中, IAA 先下降后上升, GAs 与之相反呈先上升后下降趋势, ABA 则随生根时间延长而增加。说明, IAA、ABA、GAs 显著影响着湿地松不定根产生。根据生根处理 45 天有根与无根苗中内源性激素水平的差异分析结果来看, IAA、ABA、ZR 无显著差异, 而无根苗中 GAs 水平显著高于有根苗。这暗示了, 高浓度的内源 GAs 与湿地松不定根形成困难密切相关。

2.3 PBZ 促根性分析

从有根与无根中内源性激素水平的分析来看, GAs 显著影响湿地松不定根的形成。以 GAs 生物合成抑制剂多效唑(PBZ)为促根剂在扦插 20 天后喷施插穗针叶, 分析 PBZ 对湿地松不定根发

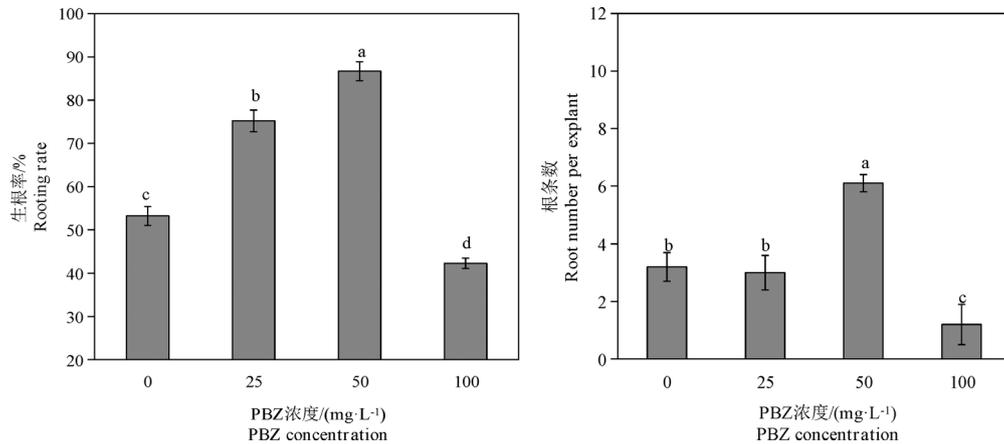


注: 不同小写字母表示 $\alpha=0.05$ 水平不同生根时间内源激素水平的差异显著性。

Note: different lowercase letters indicate significant differences in endogenous hormone levels among different rooting time at $\alpha=0.05$.

图 2 湿地松不定根生根过程中内源激素水平变化

Fig.2 Endogenous hormone levels during adventitious rooting in *Pinus elliottii*



注：不同小写字母表示 $\alpha=0.05$ 水平不同 PBZ 处理间生根率、根条数的差异显著性。

Note: different small lowercase letters indicate significant differences in rooting rate or root number per explant among PBZ treatments at $\alpha=0.05$.

图 3 PBZ 对湿地松不定根发育的促根性

Fig.3 Promotive effects of PBZ on adventitious root development in *Pinus elliottii*

育的促进性。由图 3 可知，相较未施用 PBZ 对照处理 (0 mg/L PBZ)，施用 50 mg/L PBZ 能明显改善插穗生根率与根系质量，生根率和根系条数分别增加了 63.0% 和 90.6%，但过高浓度 PBZ (100 mg/L) 较对照降低了 20.5% 和 62.5%。说明，PBZ 能提升湿地松插穗生根能力，具有较强的促根性，但其使用浓度应控制在一个适度范围。

3 结论与讨论

生根解剖构造观察结果证明，湿地松无潜伏根原基，不定根通过由诱导根原始体发育形成。无潜伏根原基是植物生根困难的关键原因^[11]。研究发现，植物不定根大多源于维管形成层^[12-13]，在维管形成层中可直接诱导产生不定根原始体^[14-16]。从植物细胞功能来看，维管形成层细胞分裂分化能力强，易被诱导、分化^[17]。从本试验研究结果来看，湿地松不定根诱导处理 20 天，在维管形成层诱导产生了具有明显增大细胞核的不定根原始体。之后，在生根处理 45 天时随着不定根原基细胞进一步分裂分化而发育成为不定根。与马尾松 *P. massoniana*、核桃 *Juglans regia*、毛白杨 *Populus tomentosa* 等难生根木本植物相比，湿地松不定根发生部位相似^[12-13,18]。在湿地松有根与无根苗中，均发现了大量诱导产生的根原基细胞团，但无根苗皮层及韧皮薄壁细胞中积累了大量脂性物质，从而可能形成了一种机械性障碍，阻碍了根原基细胞团进一步发育成为不定根。这说明，今后湿地松不定根再生要从不定根发生（根原基诱

导）与形成（根原基发育）两个阶段进行考虑，尤其后者将直接影响着根系再生效果。

从本试验湿地松插穗生根过程中 IAA、ABA、ZR 和 GAs 4 种内源激素水平的变化来看，IAA、ABA 和 GAs 与湿地松不定根诱导密切相关，其中 GAs 影响根原基发育。作为植物生长发育的重要调节因子，激素在根原基诱导中起到关键性作用^[6-7]。通过分析 IAA、ABA 和 GAs 水平在湿地松不同生根时期的变化，能较好地反映内源激素在湿地松不定根再生中的作用。对 IAA 而言，先下降后上升变化模式说明低水平 IAA 利于根原基诱导，而高水平 IAA 能促进不定根发育与形成；ABA 直线上升趋势说明高水平的 ABA 利于湿地松不定根的再生；GAs 先上升后下降，说明 GAs 在湿地松不定根再生中早期能促进不定根原基产生，但后期不利于不定根形成，在湿地松生根中存在双重作用，而生根处理 45 天无根苗中高水平的 GAs 也揭示了 GAs 对湿地松不定根发育的潜在抑制性。为观察 GAs 在湿地松不定根发育中的作用，本试验采用一种被广泛使用的 GAs 生物合成抑制剂多效唑 (PBZ)^[19-20] 作为促根剂，在诱导出根原基后通过喷施枝叶促根发育。根据试验结果，在 50 mg/L PBZ 作用下湿地松 4 年生母株插穗生根率和根条数均显著增加，说明 GAs 在湿地松不定根发育中具有抑制性，外源性 PBZ 能提升湿地松生根能力。

综上所述，建议湿地松不定根诱导可采用两步法，早期（扦插 0~20 天）生根培养中可使用由生长素、赤霉素和脱落酸组成的一种复合型外源

生长调节剂, 后期(扦插 21~45 天)培养中则使用多效唑。根据以往文献报道, 松树生根能力有着显著的遗传基础与生理年龄效应^[4-5,21], 因此添加的生长调节剂浓度应根据材料来源(种源、家系、无性系)与材料类型(幼龄、成熟龄)进行相应调整。

参考文献

- [1] 邓乐平, 黄婷, 王哲, 等. 湿地松改良种子园无性系的遗传评价及新一轮育种亲本选择[J]. 林业与环境科学, 2020, 36(4): 1-7.
- [2] 杜超群, 许业洲, 李婷婷. 湿地松萌芽条扦插生根试验研究[J]. 湖北林业科技, 2011(5): 11-14+46.
- [3] 朱之梯. 树木的无性繁殖与无性系育种[J]. 林业科学, 1986, 22(3): 280-290.
- [4] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 马尾松扦插繁殖年龄效应及继代扦插复壮效果[J]. 浙江林学院学报, 1999(4): 341-345.
- [5] 杨峰, 刘代亿, 夏绍辉. 松类针叶树走无性系道路存在的障碍及克服的途径[J]. 林业调查规划, 2009, 34(2): 127-130.
- [6] FUKAKI H, TASAKA M. Hormone interactions during lateral root formation[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(4): 437-449.
- [7] HUANG Y, JI K S, ZHAI J R. Relationship between rooting ability and endogenous phytohormone changes in successive continuous generation cuttings of *Buxus sinica* var. *parvifolia*, an endangered woody species in China[J]. Forestry Studies in China, 2007, 9(3): 189-197.
- [8] 黄逢龙, 甘青, 龚伟, 等. 湿地松扦插繁育技术研究[J]. 南方林业科学, 2018, 46(4): 10-14.
- [9] 吴均章, 韩素芬. 塑料半薄片法观察豆科植物根表面传递细胞[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003(2): 65-68.
- [10] 王荣. 苹果砧木茎源根系发生中次生代谢、内源激素和转录组差异分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [11] MINOCHA R, JAIN S M. Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology[M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000: 125-128.
- [12] 王清民, 彭伟秀, 吕保聚, 等. 核桃试管不定根组织学研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(4): 719-724.
- [13] 王瑞勤, 董源. 毛白杨1~2年生根萌条不定根起源和发育的观察[J]. 北京林业大学学报, 1987, 9(3): 249-256.
- [14] BALLESTER A, SAN-JOSE M C, IDAL N V, et al. Anatomical and biochemical events during in vitro rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut[J]. Annals of Botany, 1999, 83: 619-629.
- [15] VILLORDON Q A, LA-BONTE R D, FIRON N, et al. Characterization of adventitious root development in sweetpotato[J]. HortScience, 2009, 44(3): 651-655.
- [16] MA J, ALONI R, VILLORDON A, et al. Adventitious root primordia formation and development in stem nodes of 'Georgia Jet' sweetpotato, *Ipomoea batatas*[J]. American Journal of Botany, 2015, 102(7): 1040-1049.
- [17] AREND M, FROMM J. Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar[J]. Plant Biology, 2003, 5: 255-264.
- [18] 姚瑞玲, 王胤. 温度对马尾松组培单芽不定根发生的影响[J]. 广西植物, 2016, 36(11): 1282-1287.
- [19] WATSON G. Effect of transplanting and paclobutrazol on root growth of 'Green Column' black maple and 'Summit' green ash[J]. Journal of Environmental Horticulture, 2004, 22(4): 209-212.
- [20] KAMRAN M, WENNAN S, AHMAD I, et al. Application of paclobutrazol affect maize grain yield by regulating root morphological and physiological characteristics under a semi-arid region[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4818-4832.
- [21] 姚瑞玲, 王胤, 吴幼媚. 马尾松组培生根关键因子分析[J]. 广西植物, 2016, 36(11): 1288-1294;1375.