

# 杂种落叶松连续繁殖与插穗生根关系的生理研究

孙晓梅, 韩 华, 王笑山, 谢允慧

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

**摘要:**观察了日×长杂种落叶松连续繁殖插穗不定根发育进程,研究了连续繁殖对插穗生根力衰退的阻滞效应,并分析了一轮采穗圃与原株采穗圃插穗不定根发育期内源激素含量的动态变化。结果表明:扦插后13~31 d是愈伤组织形成和不定根原始体分化发育的关键期,此时一轮分生株愈伤组织形成和不定根发育均优于原株。连续繁殖对插穗生根性状有显著作用,尤其是生根率很低的原株,经过一轮繁殖后,生根性状有极显著提高。连续繁殖影响插穗自身激素含量,尤其是 IAA,经过一轮繁殖后,含量明显高于原株。从不定根发育过程中激素的动态变化看,一轮分生株插穗(IAA + GA<sub>3</sub> + ZR)/ABA 比值在不定根发育前期明显高于原株,与生根率的变化一致,可用来衡量不同繁殖次数插穗生根性状的优劣。

**关键词:**落叶松;连续繁殖;内源激素;生根

中图分类号:S791.22

文献标识码:A

## Physiological Research on the Relationship between Repeated Cutting and Rooting of *Larix*

SUN Xiao-mei, HAN Hua, WANG Xiao-shan, XIE Yun-hui

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** The process of adventitious root development of original and partial ortet cuttings of *Larix* was investigated in the experiment. The effect of repeated cutting on cuttings' rooting was studied, and the changes of endogenous hormones content in different stages of adventitious root development were analyzed. The results showed that 13–31 days after cottage were the period key to rooting, the formation rate of callus and the growth speed of young roots of partial ortet cuttings were higher than that of the original ones. The effect of repeated cutting on cuttings' rooting was remarkable, especially the low-rooting percentage ortets, the rooting traits were remarkably improved. The repeated cutting impacted on the self-owned hormone contents, especially IAA, which was obviously higher than that in original ortet cuttings. The hormone ratio of (IAA + GA<sub>3</sub> + ZR)/ABA of partial ortet cuttings was higher than the original ones during adventitious root development, and the trend was similar to the change trend of rooting ability, which could be used as an index of rooting ability between original and partial ortet cuttings.

**Key words:** *Larix*; repeated cutting; endogenous hormones; cutting rooting

无性繁殖在林木育种和造林实践中有着重要的作用,而扦插育苗是公认的廉价、易行的无性繁殖方法<sup>[1]</sup>,但许多树种,特别是难生根针叶树种随着树龄(年代学树龄)的增高无性繁殖能力逐渐衰退,成为阻碍无性系发展的瓶颈。研究发现,连续继轮扦插繁殖既可以避免优良基因型材料在扩繁中发生分化,又可以增加繁殖材料,具有阻滞生根力随年龄增高而发生的衰退效应<sup>[2]</sup>。落叶松(*Larix*)属难生根树种,我国从20世纪80年代开始相继开展了母株年龄、整形修剪方法、基因型和激素处理等对插穗生根力影响的扦插育苗系列研究<sup>[3-7]</sup>,并形成了集人工控制授粉、采穗园经营管理、扦插苗培育为一体的落叶松杂种规模扦插繁殖配套技术<sup>[8-11]</sup>,但连续繁殖影响插穗生根的生理研究还未见报道。因此,本试验以不同杂种无性系原株和其一轮插穗为试验材料,开展了继轮对母株插穗生根的影响研究,并分析了不同插穗生根过程中内源激素含量的变化,旨在为阻滞落叶松母株的年龄衰退及幼化复壮能力提供理论依据。

## 1 试验地概况

扦插生根试验在辽宁省清原县大孤家林场进行。该场位于42°2'48" N, 124°47'48" E,海拔高225~394 m。年平均气温5.6℃,10℃以上积温2771.9℃,无霜期129 d,年降水量600~800 mm。扦插期间6、7、8月平均最高气温和最低气温分别为32.14、14.18、30.54、16.73、29.53、16.96℃。

## 2 试材与研究方法

### 2.1 材料及扦插试验

2006年7月1日,随机选取日草302×长238-19、日草302×长混10-7和日永13×长混9-183个无性系,分别从原株采穗圃(1997年2年生实生苗定植)和一轮分生株无性系采穗圃(2002年2年生扦插苗定植,扦插苗穗条来自原株采穗圃)采穗,穗长约15 cm,每个无性系原株和一轮分生株各采穗210根(一轮分生株,每无性系随机选10~15分生株作为采穗母株),从中随机取10根插穗,取基部5 cm保存于液氮中,用于内源激素分析,其余穗条按

无性系和继轮充分混合后扦插。试验采取随机完全区组设计,4次重复,每小区插50穗。插穗生根采用全光雾插技术,基质为纯净河沙。扦插深度3 cm,行株距5 cm×3 cm。

### 2.2 生根动态调查

扦插后于7月13日、7月31日、8月15日、9月1日、9月26日和10月23日,从每个区组各小区内随机挖取3根插穗调查生根情况,调查指标包括形成愈伤组织插穗的数量、每穗生根量和根系总长。

### 2.3 内源激素分析

于7月1日、7月31日、8月15日、9月26日和10月23日,从每个区组各小区内随机挖取3根插穗,保存基部5 cm于液氮中,用于分析不定根发育过程中内源激素变化。

本研究主要分析IAA、GA<sub>3</sub>、ZR和ABA 4种激素的含量变化,委托中国农业大学作物化学控制研究中心,采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)进行测定<sup>[12]</sup>。

### 2.4 数据分析

用SAS/STAT 6.12软件中PROC ANOVA过程进行方差分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 继轮繁殖插穗不定根发育进程的外观形态

从整个发育进程来看,继轮间插穗生根存在很大差异(表1)。一轮插穗愈伤组织形成和幼根出现的时间比原株早,同时生根率有所提高,根系后期发育也较好。7月13日(插后第13天),3个无性系原株和一轮分生株插穗均没有形成愈伤组织;7月31日(插后第31天)插穗逐渐形成愈伤组织,一轮分生株插穗愈伤组织形成率高于原株;8月15日(插后第46天),插穗全部形成愈伤组织,除了日永13×长混9-18原株插穗未见幼根外,其他无性系开始出现幼根,且一轮分生株插穗生根率高于原株;9月1日(插后第63天),生根率逐渐提高,但日永13×长混9-18原株插穗仍未见生根,而其一轮分生株插穗生根率已达到44.4%;此后新根的孕育过程大体结束,根系的发育主要集中于根长生长。

表1 原株与一轮分生株插穗扦插后不同时间的生根进程

无性系	繁殖轮次	时间(月-日)					
		07-13	07-31	08-15	09-01	09-26	10-23
日草 302 × 长 23 8-19	原株	无愈伤组织	愈伤组织率 33.3%	愈伤组织率 100%, 生根率 11.1%, 总生根量 2 条, 最长根总长 6 mm	生根率 16.7%, 总生根量为 2 条, 最长根总长 10 mm	生根率 16.7%, 总生根量为 2 条, 最长根总长 20 mm	生根率 16.7%, 总生根量为 1 条, 最长根总长 4 mm
	一轮	无愈伤组织	愈伤组织率 88.9%	愈伤组织率 100%, 生根率 22.2%, 总生根量 1 条, 最长根总长 3 mm	生根率 55.6%, 总生根量为 13 条, 最长根总长 39 mm	生根率 44.4%, 总生根量为 8 条, 最长根总长 309 mm	生根率 88.9%, 总生根量为 22 条, 最长根总长 467 mm
日草 302 × 长混 10-7	原株	无愈伤组织	愈伤组织率 33.3%	愈伤组织率 100%, 生根率 16.7%, 总生根量 1 条, 最长根总长 2 mm	生根率 16.7%, 总生根量为 3 条, 最长根总长 11 mm	生根率 33.3%, 总生根量为 7 条, 最长根总长 83 mm	生根率 66.7%, 总生根量为 15 条, 最长根总长 146 mm
	一轮	无愈伤组织	愈伤组织率 88.9%	愈伤组织率 100%, 生根率 22.2%, 总生根量 3 条, 最长根总长 4.5 mm	生根率 66.7%, 总生根量为 11 条, 最长根总长 14 mm	生根率 66.7%, 总生根量为 13 条, 最长根总长 197 mm	生根率 55.6%, 总生根量为 13 条, 最长根总长 270 mm
日永 13 × 长混 9-18	原株	无愈伤组织	愈伤组织率 100%	愈伤组织率 100%, 生根率 0%,	生根率 0%	生根率 16.7%, 总生根量为 7 条, 最长根总长 45 mm	生根率 16.7%, 总生根量为 6 条, 最长根总长 26 mm
	一轮	无愈伤组织	愈伤组织率 77.8%	愈伤组织率 100%, 生根率 11.1%, 总生根量 1 条, 最长根总长 3 mm	生根率 44.4%, 总生根量为 9 条, 最长根总长 29 mm	生根率 44.4%, 总生根量为 20 条, 最长根总长 260 mm	生根率 66.7%, 总生根量为 30 条, 最长根总长 290 mm

### 3.2 轮继繁殖对插穗不定根发育的影响

表2分析了无性系、连续繁殖以及其交互作用对插穗生根性状的影响。可以看出:无性系间、原株与一轮分生株间,以及其交互作用3个生根性状的差异均显著,连续繁殖对生根性状的影响极显著,因此,又进一步分析了连续繁殖对各无性系原株与一轮分生株插穗生根性状的影响(表3)。

一轮分生株生根性状与原株相比有所改善,尤其是原株生根率较低的日草 302 × 长 23 8-19 和日永 13 × 长混 9-18 无性系,经过一轮繁殖后,插穗的

各生根指标得到极显著地提高,而对于原株生根率相对较高的日草 302 × 长混 10-7 无性系,经过一轮繁殖后,插穗生根率和平均最长根长与原株差异不显著,只是平均生根量比原株提高了 18.99%。

表2 插穗生根性状方差分析

生根性状	F		
	无性系	继轮	交互作用
生根率	9.58 **	18.65 **	5.08 *
生根量	4.63 *	33.49 **	6.66 **
最长根长	4.44 *	36.69 **	10.68 **

表3 继轮次数对生根性状影响的方差分析

无性系	繁殖轮次	母株年龄/a		生根率/ %	生根量/ (条·穗 <sup>-1</sup> )	最长根长/ cm
		年代学年龄	分生母株年龄			
日草 302 × 长 23 8-19	原株	12.5	12.5	1.0	0.1	0.2
	一轮	12.5	7.5	39.3	2.5	7.6
	F 值			20.24 **	248.38 **	27.98 **
日草 302 × 长混 10-7	原株	12.5	12.5	36.0	2.0	4.0
	一轮	12.5	7.5	35.3	2.4	3.4
	F 值			0.0	1.0	1.3
日永 13 × 长混 9-18	原株	12.5	12.5	2.6	0.9	0.2
	一轮	12.5	7.5	18.9	5.2	4.4
	F 值			11.91 *	14.56 **	19.62 **

注: \*\* 表示差异极显著; \* 表示差异显著,以下相同。

### 3.3 继轮繁殖对插穗自身内源激素含量的影响

插穗茎基部的激素含量影响不定根发育,尤其是  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$ , 与生根性状显著相关<sup>[13]</sup>。本研究测定了日草 302 × 长 23 8-19、日草 302 × 长混 10-7 和日永 13 × 长混 9-18 原株和一轮分生株扦插当天插穗茎基部的 ABA、IAA、GA<sub>3</sub> 和 ZR 的含量,并计算  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  比值,各变量方差分析结果见表 4。日草 302 × 长 23 8-19 和日永 13 × 长混 9-18 无性系一轮分生株插穗茎基部的 IAA、ZR 含量均比原株的高,尤其是 IAA 的含量,分别比原株高 2.23、0.78 倍,这可能是导致一轮分

生株插穗生根率显著高于原株的部分原因;而日草 302 × 长混 10-7 无性系一轮分生株插穗茎基部 IAA 含量稍低于原株(表 4)。原株和一轮分生株插穗茎基部的激素相对值  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  全面反应了生根促进激素和生根抑制激素对生根的综合效应。日草 302 × 长 23 8-19 和日永 13 × 长混 9-18 无性系一轮分生株插穗茎基部的  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  值比原株高,而日草 302 × 长混 10-7 无性系一轮分生株插穗却比原株低,这可能是导致插穗生根率略低的又一因素。

表 4 继轮对插穗(鲜)内源激素含量的影响及其方差分析

无性系	繁殖轮次	激素含量/(ng · g <sup>-1</sup> )				激素比值
		ABA	IAA	GA <sub>3</sub>	ZR	$(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$
日草 302 × 长 23 8-19	原株	59.87	11.75	21.08	8.36	0.70
	一轮	79.79	37.92	17.62	9.04	0.81
	F 值	7.74 *	79.28 **	9.97 *	2.23	2.59
日草 302 × 长混 10-7	原株	47.46	29.64	20.56	4.28	1.15
	一轮	68.06	25.37	19.73	5.16	0.74
	F 值	198.26 **	4.58	0.39	4.88	60.82 **
日永 13 × 长混 9-18	原株	157.90	33.29	14.22	5.58	0.34
	一轮	183.86	59.36	39.46	12.16	0.60
	F 值	37.01 **	12.72 *	8.92 *	110.40 **	18.89 *

注:测定内源激素含量的样品为 7 月 1 日扦插时采取的茎段。

### 3.4 继轮繁殖插穗内源激素的动态变化

为了研究原株和一轮分生株插穗不定根发育过程中激素的动态变化,测定了日草 302 × 长 23 8-19 无性系原株和一轮分生株插穗不定根发育不同时期内源激素的含量(图 1)。结果表明:原株和一轮分生株插穗中 ZR 和 GA<sub>3</sub> 含量的变化趋势大体相同,均经历了先下降后上升的过程,但一轮分生株插穗中上述 2 种激素出现上升的时间早于原株,并且在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 1 a, c);在 ABA 含量的变化上,一轮分生株插穗先下降,后逐步上升,直到 10 月 23 日大幅下降,而原株插穗的波动较大,并且一轮分生株插穗在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 1 a, c);在 ABA 含量的变化上,一轮分生株插穗先下降,后逐步上升,直到 10 月 23 日大幅下降,而原株插穗的波动较大,并且一轮分生株插穗在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 1 a, c);在 IAA 含量的变化上,一轮分生株插穗扦插当天(7 月 1 日)的

含量远远高于原株,之后大幅下降,从 7 月 31 日平稳上升,直到 10 月 23 日出现下降,而原株的变化很不稳定,经历了上升下降后又上升下降的变化过程(图 1 d)。

不定根发育过程中单一激素含量的变化不能准确反映插穗的生根能力,而  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  综合考虑了生根促进激素和生根抑制激素对插穗生根的影响,因此用  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  能更全面的反映各类激素的变化(图 2)。日草 302 × 长 23 8-19 一轮分生株插穗的  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  比值在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 2)。原株和一轮分生株插穗  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  比值在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 2)。原株和一轮分生株插穗  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  比值在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 2)。原株和一轮分生株插穗  $(IAA + GA_3 + ZR)/ABA$  比值在 7 月 31 日到 9 月 26 日这段时间内,平稳上升(图 2)。

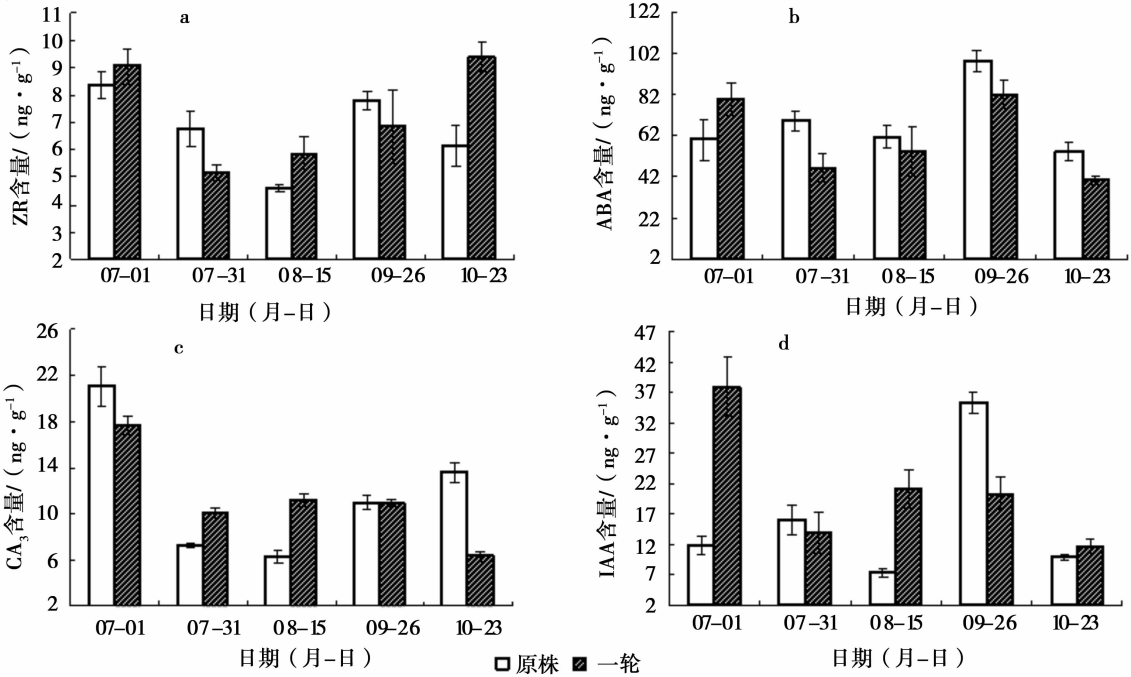


图1 日草302 × 长23 8-19 原株和一轮分生株插穗不定根发育过程中激素含量的变化

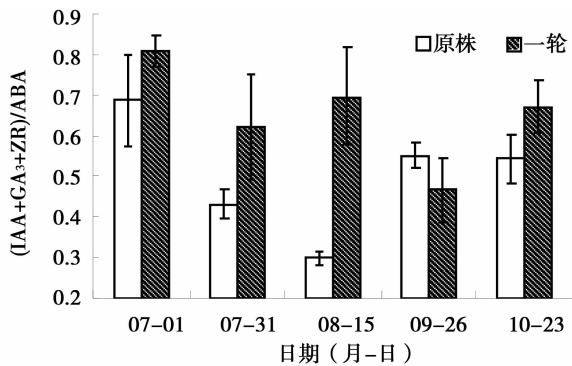


图2 日草302 × 长23 8-19 原株和一轮分生株插穗不定根发育过程中(IAA + GA<sub>3</sub> + ZR)/ABA 的变化

## 4 结论与讨论

### 4.1 继轮繁殖与生根的关系

从母株上采取穗条,生根后培育成新的采穗母株,再从新的采穗母株上采穗扦插,这种方法被称为连续繁殖<sup>[14]</sup>。该方法可以有效延迟母株的老龄化进程,提高穗条的生根力<sup>[12]</sup>。本试验发现,通过继代繁殖,母株得到幼化,尤其对于生根率低的母株来说,继代幼化效果更显著,而对于生根率相对较高的原株,经过一轮繁殖后插穗生根性状并没得到明显改善,这可能与生根优良无性系还没有进入老龄化阶段有关。因此,生产上采用继代繁殖的方法不仅可提高优良母株的采穗量,同时还可对老龄化采穗母株起到很好的幼化复壮效果,以满足无性系规模

造林的需要。

### 4.2 内源激素含量与生根的关系

扦插初期,插穗激素主要来源于自身,生根性状的好坏受到采穗母株自身激素水平的影响。IAA 在 不定根形成中起关键作用<sup>[15-18]</sup>,有研究表明,插穗自身的生长素含量越高,生根率越高<sup>[19-20]</sup>。本研究中,一轮分生株插穗自身 IAA 含量明显高于原株,在某种程度上解释了一轮分生株插穗生根性状优于原株。生长素,赤霉素、细胞分裂素和脱落酸在 不定根的发育中共同起作用<sup>[21-23]</sup>,因此,(IAA + GA<sub>3</sub> + ZR)/ABA 比值能更全面地反映生根促进物质与生根抑制物质对不定根发育的效应<sup>[13]</sup>。本研究中,从原株与一轮分生株插穗不定根发育进程看出,扦插后 13~31 d 是愈伤组织形成和不定根原始体分化发育的关键时期,一轮分生株愈伤组织形成率高于原株,幼根生长速度也比原株快,与之对应的激素比值,在 不定根发育的前期也高于原株。

### 参考文献:

- [1] 王景章,丁振芳. 日本落叶松、杂种落叶松嫩枝扦插技术的研究 [C]//张颂云. 主要针叶树种应用遗传改良论文集. 北京:中国林业出版社,1990:107-111
- [2] 季孔庶,章 荣,陈天华,等. 马尾松插穗内源抑制物质的研究 [J]. 林业科学,1997,33 (2):142-151
- [3] 王笑山,胡新生,王有才,等. 母株和插穗基部切削方式对日本落叶松扦插生根的影响 [J]. 林业科学研究,1993,6 (6):626

-632

- [4] 王笑山,郑先武,王建华,等. 采穗园母株生根性状遗传变异和选择效应[J]. 林业科学研究,1995,8(1):48-53
- [5] 王笑山,孙晓梅,齐力旺,等. 日本落叶松整形修剪对母株生长、产穗量、插穗生根和扦插苗生长的影响[J]. 林业科学,2003,39(2):44-51
- [6] 孙晓梅,张守攻,王笑山,等. 生长调节剂对落叶松杂种生根和幼苗生长的影响[J]. 北京林业大学学报,2006,28(2):68-72
- [7] 孙晓梅,张守攻,王笑山,等. 日×长落叶松杂种组合间生根性状及幼林生长的遗传变异[J]. 林业科学,2008,44(4):41-47
- [8] 张颂云,王青林,王力华,等. 日本落叶松嫩枝扦插繁殖技术的研究[C]//张颂云. 主要针叶树种应用遗传改良论文集. 北京:中国林业出版社,1990:89-99
- [9] 赵士杰,杨俊明. 华北落叶松全光自控喷雾扦插技术的研究[C]//张颂云. 主要针叶树种应用遗传改良论文集. 北京:中国林业出版社,1990:100-106
- [10] 王秋玉,杨书文. 长白落叶松硬枝和嫩枝的扦插繁殖[J]. 东北林业大学学报,1996,24(1):9-16
- [11] 王笑山,马浩,王建华,等. 落叶松杂种大规模繁殖配套技术研究[J]. 林业科学研究,2000,13(5):469-476
- [12] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京:北京农业大学出版社,1997
- [13] 孙晓梅,韩华,王笑山. 不同株龄日本落叶松插穗的内源激素含量与生根的关系[J]. 植物生理学通讯,2009,45(3):217-222
- [14] St. Clair J B, Kleinschmidt J, Svolba J. Juvenility and serial vegetative propagation of Norway Spruce clones (*Picea abies* Karst) [J]. *Silvae Genetica*,1985,34:42-48
- [15] Woodward A W, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction [J]. *Ann Bot (Lond)*, 2005, 95:707-735
- [16] Aloni R, Aloni E, Langhans M, *et al.* Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism [J]. *Ann Bot (Lond.)*, 2006, 97: 883-893
- [17] 祁德富,马明呈,李军. 4种植物生长激素对大果沙棘温室扦插成活率的影响[J]. 中国农学通报,2007,23(1):234-236
- [18] Han H, Zhang S G, Sun X M. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8 (3):348-353
- [19] Blazkova A, Sotta B, Tranvan H, *et al.* Auxin metabolism and rooting in young and mature clones of *Sequoia sempervirens* [J]. *Physiol Plant*,1997,99:73-80
- [20] Caboni E, Tonelli M G, Lauri P, *et al.* Biochemical aspects of almond microcuttings related to in vitro rooting ability [J]. *Biol Plant*,1997,39: 91-97
- [21] 王金祥,严小龙,潘瑞焱. 不定根形成与植物激素的关系[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):133-142
- [22] Tanimoto E. Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin [J]. *Plant Sciences*, 2005,24(4): 249-265
- [23] Ruzicka K, Simásková M, Duclercq J, *et al.* Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport [J]. *PNAS*,2009,106(11):4284-4289