

继代培养次数对杜梨生根能力和 叶形态及其激素水平的影响

罗嘉亮, 李 凡, 李俊豪, 郝瑞杰, 李六林*

(山西农业大学 园艺学院, 山西太谷 030801)

摘 要: 为了探索杜梨组培复幼变化规律, 对 10 年生杜梨进行连续继代培养, 统计不同继代次数杜梨丛生芽繁殖系数和生根率, 观察记录叶片形态变化并测定内源激素含量。结果表明: (1) 通过连续继代培养, 杜梨丛生芽生根率由 0 提升到 66.70%, 繁殖系数由第 1 代的 2.13 提升到第 10 代的 4.20。(2) 叶片在继代第 3 次时出现裂刻且随后裂刻程度逐代加深; 在继代过程中, 丛生芽叶面积和叶脉数显著降低, 叶周长和叶形指数呈先下降后上升的变化趋势。(3) 丛生芽叶片内源 IAA 含量在继代第 6 次时达到 $46.39 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 且显著高于初代丛生芽; 随着继代次数的增加, 叶片内源 ZR 呈先上升后下降的变化趋势, 内源 GA_3 含量没有发生显著性变化, 而内源 ABA 含量逐渐降低; 叶片 IAA/ABA 和 IAA/ZR 的值随着继代次数的增加而增加。(4) 丛生芽叶片 ABA 含量和 IAA/ZR 与其生根率分别呈显著负相关和显著正相关关系, 叶片裂刻数和 IAA/ABA 与生根率均呈现极显著正相关关系, 而叶脉数与生根率则呈现极显著负相关关系。研究认为, 连续继代培养可显著提高杜梨丛生芽的生根能力, 并且与丛生芽叶形和激素含量及其比值有密切的关系, 该研究结果为难生根植物无性繁殖以及树木复幼提供了重要技术借鉴。

关键词: 杜梨; 复幼; 继代培养; 生根能力; 叶片形态; 内源激素

中图分类号: Q813.1⁺2; Q946

文献标志码: A

Effects of Subculture Times on Rooting Ability, Leaf Morphology and Hormone Level of *Pyrus betulaefolia*

LUO Jialiang, LI Fan, LI Junhao, HAO Ruijie, LI Liulin*

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: In order to explore the variation law of rejuvenation based on tissue culture, we selected 10-year-old *Pyrus betulaefolia* for continuous subculture, and then counted the propagation coefficient and rooting rate of multiple shoots of different subculture passages. We also observed and recorded the morphological changes of leaves and measured the content of endogenous hormones. The results showed that: (1) the rooting rate of multiple shoots increased from 0 to 66.70% and the propagation coefficient increased from 2.13 in the first subculture to 4.20 through continuous subculture. (2) The leaves showed a lobes at 3rd subculture and then the degree of lobes gradually deepened; during the continuous subculture, leaf area and vein number of multiple shoots were decreased significantly, and leaf perimeter and leaf index showed a trend of decreasing firstly and then increasing. (3) The endogenous IAA content of multiple shoots reached $46.39 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ at 6th subculture, which was significantly higher than that of 0th subculture; with the increase of subculture passages, the endogenous ZR showed a trend of increasing firstly and then de-

收稿日期: 2019-11-27; 修改稿收到日期: 2020-02-09

基金项目: 山西省重点研发计划(201803D221016-6, 201703D221015-2)

作者简介: 罗嘉亮(1994—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事果树栽培与生理研究。E-mail: 793685415@qq.com

* 通信作者: 李六林, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事果树栽培与生理研究。E-mail: tgliulin@163.com

creasing, and the endogenous GA_3 content did not change significantly, while the endogenous ABA content gradually decreased in the leaves; the values of IAA/ABA and IAA/ZR in the leaves increased with the number of subculture. (4) The ABA content and IAA/ZR of multiple shoots leaves showed significantly negative correlation and significantly positive correlation with rooting rate. The number of leaf lobes and IAA/ABA showed a significantly positive correlation with rooting rate, while the number of leaf veins showed a significantly negative correlation with rooting rate. It can be seen that continuous subculture can significantly improve the rooting ability of *P. betulaeifolia* multiple shoots, and it is closely related to leaf morphology and hormone content and ratio of multiple shoots, which provides reference for vegetative propagation of difficult rooting plants.

Key words: *Pyrus betulaeifolia*; rejuvenation; subculture; rooting ability; leaf morphology; endogenous hormone

杜梨(*Pyrus betulaeifolia*)抗干旱、耐寒凉,通常作为梨树砧木,然而杜梨多采用种子繁殖,后代易变异,造成嫁接品种树势、抗逆性差异大,进而影响果实产量与品质。无性繁殖是保持优选杜梨砧木特性的理想繁殖方法,但杜梨属于难生根树种,不定根发生能力较弱,因此探索有效提高杜梨插条生根的方法意义重大。

难生根树种生根能力与植物体生理年龄密切相关。研究认为,处于幼年期的树木具有较强的不定根发生能力,因此难生根树种可以通过复幼处理来提高其生根能力^[1]。复幼是使植物成熟组织或器官恢复幼态特征的过程,其中组织培养是进行复幼处理有效方法之一^[2]。失去生根能力的桉树(*Eucalyptus brachyphylla*)可以通过组织培养来恢复^[3]。30年生毛白杨连续继代培养6次,其繁殖系数和生根能力也逐渐提高^[4]。因此,通过组培复幼来提高植物生根率具有重要意义。

树木由幼年期转为成年期会在叶片形态、生理生化和内源激素含量上发生许多变化^[5-6],这些变化可以作为树木阶段发育的特征^[7]。拟南芥幼叶与成年叶叶缘形态存在较大差异^[8],蜜桃童期叶与非童期叶之间有9种叶形态指标存在差异^[9]。植物激素在树木复幼过程中发挥着重要作用,含有细胞分裂素的培养基可以使橡胶树^[10]恢复到幼化状态,向培养基中添加 GA_3 可使成年樱桃^[11]复幼,并保持幼态特征。嫁接和埋干等复幼措施改变了植株插穗的内源激素水平^[12]。随着继代培养次数的增加,燕山红栗丛生芽中内源激素含量和激素之间的比值也会发生变化,这些变化都与生根率的提高密切相关^[13]。目前,对于杜梨在复幼过程是否存在幼化性差异还缺乏研究。本研究通过对10年生杜梨进行连续继代培养,记录叶片形态变化,明确杜梨复幼表型变化规律,并进一步分析继代过程中叶形和激素

与生根率的变化关系,以期为树木复幼提供重要参考与技术借鉴。

1 材料和方法

1.1 试验设计

供试外植体茎段于2018年5月采自山西省农业科学院果树研究所梨资源圃树龄10年的杜梨当年生枝条,经酒精和升汞消毒后,接种在 $MS+1.0\text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.1\text{ mg/L IBA}+6\text{ g/L 琼脂}+30\text{ g/L 蔗糖}$ 的初代培养基上,芽萌发至1.5 cm左右时,选取生长一致、健壮杜梨初代培养丛生芽接种在相同的MS继代培养基上,如此继代10次,每次继代时间为40 d。统计继代0次(初代)、1次、3次、6次和10次丛生芽的繁殖系数,并将部分丛生芽接种于生根培养基($1/2\text{ MS}+0.5\text{ mg/L IBA}+6\text{ g/L 琼脂}+20\text{ g/L 蔗糖}$)上,培养30 d后统计生根率。培养时温度控制在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,光照周期16 h/8 h,光强 $2\ 000\sim3\ 000\text{ lx}$ 。

1.2 指标测定

根据1.1中观察结果计算丛生芽繁殖系数和生根率,在不同继代培养的丛生芽中选取生长正常的幼叶用于激素测定,拍照记录叶片形态变化并统计叶片裂刻数和叶脉数,用Yaxin-1241叶面积仪进行扫描获取叶面积、叶周长、叶形指数(长/宽)。采用酶联免疫法^[14]测定叶片中内源吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA_3)、玉米素核苷(ZR)和脱落酸(ABA)含量,试剂盒由中国农业大学提供。

繁殖系数=诱导出丛生芽个数/接种外植体总数
生根率(%)=生根苗数/接种时总苗数 $\times 100\%$

1.3 数据处理

使用Excel 2013软件进行数据处理和作图,使用SAS 9.0软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 继代次数对杜梨丛生芽生根率和繁殖系数的影响

通过图 1 可以看出,在不同继代次数中杜梨丛生芽生根率和繁殖系数之间存在显著性差异。其中,继代次数为 0 次和 1 次时,杜梨丛生芽未能诱导出不定根;继代到第 3 代时开始生根,生根率为 21.35%;继代到第 10 次时,丛生芽生根率提高到 66.70%。同时,经过 1 次继代,杜梨丛生芽繁殖能力就发生显著变化,繁殖系数达到 2.13;当继代到第 10 次时,丛生芽繁殖系数提升到 4.20,是第 1 次继代的 1.97 倍(图 1、2)。

2.2 继代次数对杜梨丛生芽叶片形态的影响

通过图 3 和表 1 可以看出,与田间 10 年生杜梨叶片相比,继代 0 次和 1 次杜梨丛生芽叶片叶缘差异较小,叶缘均为全缘;继代 3 次、6 次和 10 次丛生芽叶片发生显著性变化,当继代到第 3 代时,丛生芽叶片出现裂刻,并且随着继代次数的增加裂刻程度逐渐加深。丛生芽叶面积由 0 代继代到第 3 次的过程中显著下降,而在 3 代继代到第 10 代则保持相对

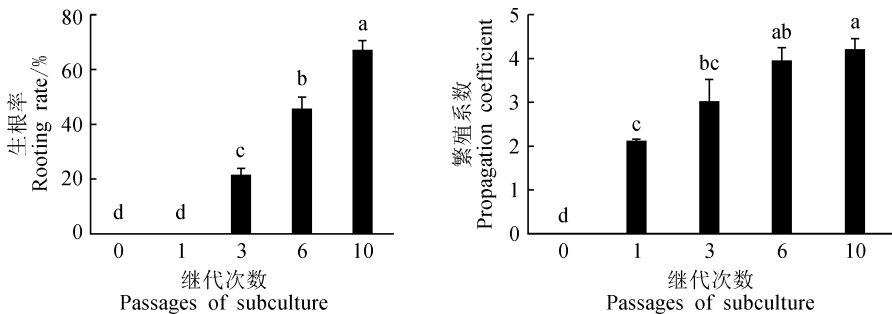
稳定。随着继代次数的增加,丛生芽叶周长和叶形指数呈现先下降后上升的变化趋势,而叶脉数则逐渐减少,且第 3 代与第 0 代和第 10 代均显著差异。

2.3 继代次数对杜梨丛生芽叶片中内源激素含量及比例的影响

杜梨丛生芽叶片内源 IAA、ZR 和 ABA 含量在不同继代次数之间存在显著性差异,而其内源 GA₃ 含量则没有发生显著变化(图 4)。其中,杜梨丛生芽叶片 IAA 含量随着继代次数的增加表现出增加的趋势,第 6 代叶片 IAA 含量(48.39 ng · g⁻¹)比初代



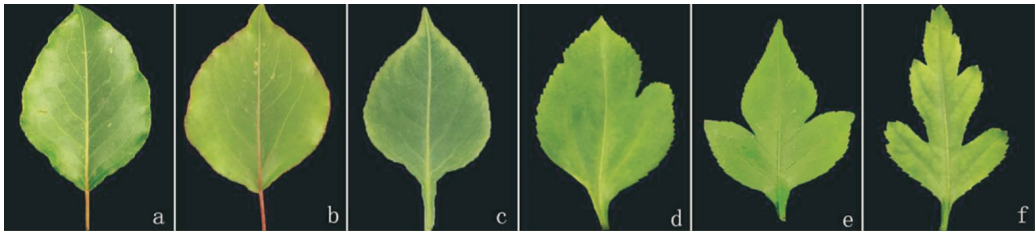
图 2 继代 10 次杜梨丛生芽和生根苗
Fig. 2 Multiple shoots and rooting shoots of *P. betulaefolia* at 10th subculture



不同小写字母表示继代次数间在 0.05 水平存在着显著性差异;下同
图 1 不同继代次数杜梨丛生芽生根率和繁殖系数的变化

Different normal letters indicate significant differences among passages of subculture; the same as below

Fig. 1 Rooting rate and propagation coefficient in multiple shoots of *Pyrus betulaefolia* at different passages of subculture



a 为田间 10 年生树当年生枝条叶片;b~f 分别为继代 0、1、3、6 和 10 次丛生芽叶片

图 3 不同继代次数杜梨丛生芽叶片形态特征

a is the leaf of the current year branch of 10a tree in the field; b~f are the leaves of subculture 0th, 1st, 3rd, 6th and 10th multiple shoots, respectively

Fig. 3 Leaf morphology of different passages of subculture in multiple shoots of *P. betulaefolia*

表 1 不同继代次数杜梨丛生芽叶片形态指标变化

继代次数 Passages of subculture	叶片裂刻数 Number of lobes	叶面积 Leaf area/mm ²	叶周长 Leaf perimeter/mm	叶形指数 Leaf index	叶脉数 Number of leaf vein
0	0d	246.92±16.12a	68.61±2.10a	2.02±0.08a	7.80±0.25a
1	0d	204.92±7.59b	60.35±0.99b	1.85±0.07ab	7.80±0.25a
3	0.80±0.20c	122.95±9.53c	44.32±1.83c	1.74±0.05b	6.00±0.21b
6	1.50±0.31b	110.60±10.80c	45.82±2.44c	1.81±0.07ab	5.40±0.31bc
10	3.00±0.33a	108.12±4.07c	59.32±2.04b	1.96±0.05a	4.60±0.22c

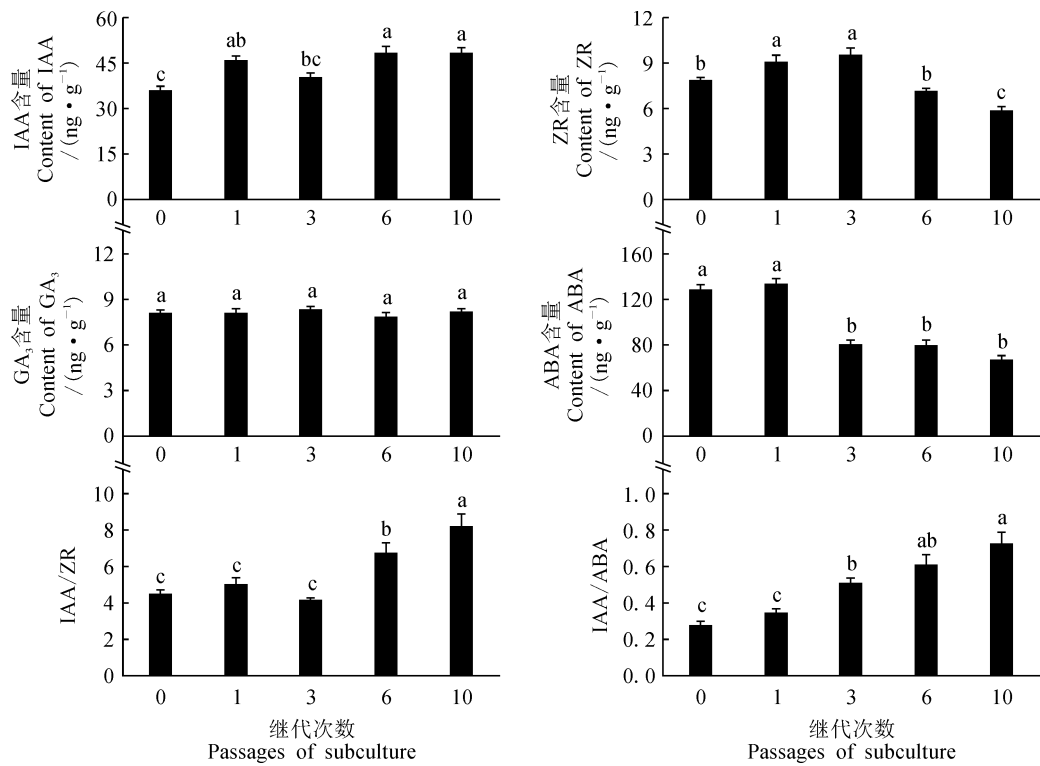


图 4 不同继代次数杜梨丛生芽叶片中内源激素含量及其比例的变化

Fig. 4 Changes of endogenous hormone contents and their ratio in the leaves of different passages of subculture in multiple shoots of *P. betulaefolia*

叶片含量($35.92 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)显著上升了 34.7% ($P < 0.05$);随着继代次数的增加,叶片内源 ZR 含量呈现先上升后下降的变化趋势,在第 3 次继代时含量最高($9.50 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$),显著高于初代叶片 21.0% ,第 10 代时又比初代叶片显著降低 25.5% ;叶片内源 ABA 含量在第 1 代前保持着较高的水平,最高达 $133.01 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,而继代到第 3 代快速下降到 $80.05 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,降幅达到 56.4% ($P < 0.05$),随后保持相对稳定水平。

同时,与单一的内源激素含量相比,杜梨丛生芽叶片两种内源激素含量之间的比值在不同继代培养间显示出更规律的变化趋势,IAA/ABA 和 IAA/ZR 比值在不同继代次数中存在显著差异(图 4)。其中,丛生芽叶片内源 IAA/ZR 的值在继代第 3 代

开始随着继代次数的增加而逐渐显著增加,当继代到第 10 次时达到 8.32 ,是第 3 代比值的 1.84 倍;丛生芽叶片内源 IAA/ABA 的值随着继代次数的增加呈现逐渐上升变化趋势,在第 10 次继代时值达到 0.73 ,是初代叶片比值的 2.61 倍 ($P < 0.05$)。以上结果说明继代培养可改变杜梨丛生芽叶片内源激素含量及比例,从而影响相应的生理状态。

2.4 杜梨丛生芽叶片形态指标和激素水平与生根率的关系

相关分析结果(表 2)表明,杜梨丛生芽叶片裂刻数分别与叶脉数和生根率呈显著负相关(-0.943 , $P < 0.05$)和极显著正相关(0.984 , $P < 0.01$);其叶脉数分别与叶面积和生根率呈现显著正相关(0.936)和极显著负相关(-0.972);其叶周长与叶形

表 2 叶片形态指标与生根率相关系数

Table 2 Correlation coefficient between leaf morphological indexes and rooting rate						
指标 Index	叶片裂刻数 Number of lobes	叶面积 Leaf area	叶周长 Leaf perimeter	叶形指数 Leaf index	叶脉数 Number of leaf vein	生根率 Rooting rate
叶片裂刻数 Number of lobes	1	−0.795	−0.250	−0.078	−0.943 *	0.984 **
叶面积 Leaf area		1	0.782	0.532	0.936 *	−0.855
叶周长 Leaf perimeter			1	0.905 *	0.545	−0.372
叶形指数 Leaf index				1	0.206	−0.023
叶脉数 Number of leaf vein					1	−0.972 **
生根率 Rooting rate						1

注: ** 表示在 0.01 水平上极显著相关, * 表示在 0.05 水平上显著相关;下同
Note: ** indicate significant correlation at the 0.01 level, while * indicates significant correlation at the 0.05 level; the same as below

表 3 激素含量及其比值与生根率的相关系数

Table 3 Correlation coefficient between hormone content and their ratio and rooting rate							
指标 Index	IAA	ZR	GA ₃	ABA	IAA/ZR	IAA/ABA	生根率 Rooting rate
IAA	1	−0.486	−0.338	−0.495	0.790	0.730	0.695
ZR		1	0.489	0.489	−0.908 *	−0.655	−0.784
GA ₃			1	−0.149	−0.382	−0.023	−0.126
ABA				1	−0.624	−0.941 *	−0.902 *
IAA/ZR					1	0.835	0.899 *
IAA/ABA						1	0.982 **
生根率 Rooting rate							1

指数呈现显著正相关(0.905)。同时,表 3 显示,杜梨丛生芽叶片 ABA 含量与生根率呈显著负相关,相关系数为 −0.902;其叶片 IAA/ZR 与生根率呈现显著正相关,相关系数为 0.899;其叶片 IAA/ABA 与生根率呈现极显著正相关,相关系数为 0.982。

3 讨 论

处于幼年的植物通常具有较强营养生长能力,较易诱导出不定根和分化丛生芽,而植物年龄越大,其年龄效应越明显,如生根能力随着年龄的增长而递减,组织培养分化丛芽能力减弱^[15]。杉木经过组织培养复幼处理后,其丛芽繁殖系数和生根率均显著高于成年树^[16]。Manzanera 等^[17]研究表明通过组织培养复幼处理,成年树丛生芽的繁殖系数和生根率显著提高。本研究结果同样表明,随着继代次数的增加,丛生芽繁殖系数和生根率也随之升高,成熟组织进一步被幼化,年龄效应逐渐降低,幼化程度不断加深。成年插条会主动抵抗激素诱导,抑制细胞分裂分化相关基因的表达^[18],这可能是初代丛生芽繁殖系数和生根率较低的原因。

叶片形态变化是树木从幼年期向成年期转变的标志^[19]。拟南芥幼叶圆形,边缘光滑,相比之下,成

年叶细长、叶形指数更大,叶缘有锯齿^[8]。马尾松经复幼处理,叶片节间增长,顶端针叶成簇状,颜色变淡绿色^[20]。而与小金海棠^[21]的相关研究相同,本研究同样发现杜梨植株处于成年期时生根率较低且叶缘为圆形无裂刻,通过连续多次继代培养,生根率提高的同时丛生芽叶片出现裂刻,且随之裂刻程度逐渐加深。胡杨植株随着树龄的增长,丛生芽叶形指数逐渐减少,叶面积逐渐增大^[22]。本研究发现,通过继代培养,杜梨丛生芽叶脉数和叶面积显著降低;在第 3 次到第 10 次继代过程中,丛生芽叶片变细长,叶形指数上升,当叶面积未发生显著变化时,叶片裂刻程度加深,叶周长则会呈现上升的趋势;进一步的相关性分析认为,叶脉数和叶片裂刻数与生根率极显著相关。低叶脉密度有利于减少水分向气孔运输,降低叶脉蒸腾能力^[23]。富春元等^[24]研究发现叶缘裂刻的小白菜幼苗比全缘幼苗具有更强的抗旱能力。植株处于幼年期时,其抗逆能力较弱,当丛生芽脱离母株时,处于逆境胁迫,叶片叶脉密度降低且出现裂刻可以减少水分流失,调节叶面温度,对不同的逆境表现出更强的适应性,这可能是复幼离体丛生芽不定根产生的重要保证。

内源激素与植物复幼和丛生芽生根密切相关^[7, 25-26]。核桃插穗经埋干复幼处理后其诱导生根

率高达 98.1%,复幼插穗内源 IAA 的含量显著高于成年插穗,而内源 ABA 含量则是成年插穗较高,内源 GA₃ 和 ZR 含量在两者之间差异不显著^[12]。随着茎段继代次数的增加,苹果砧木 M9 和 M26 叶片中内源 IAA 含量显著提高,而内源 ABA 的含量逐渐下降^[27]。本研究通过连续继代培养复幼后,杜梨丛生芽叶片中内源 IAA 含量显著提高,且内源 ABA 含量显著下降,这与核桃、苹果砧木的研究结果类似。在生根诱导过程中叶片合成的激素可以通过极性运输向下运至茎基部,直接影响不定根的发生^[28]。本研究分析认为,相对于杜梨初代丛生芽,继代 10 次的丛生芽叶片含有较高浓度的 IAA 和较低的 ABA,可向茎基部运输更多的 IAA 和较少的 ABA,从而促进不定根的诱导。有研究表明,内源 CTK 含量可作为橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 组培苗复幼的标记^[10]。Day 等^[29] 研究表明粗毛野桐 (*Mallotus hookerianus*) 幼年期叶片比成年期叶片含有更多更活跃的 CTK。本研究结果显示,随着继代次数的增加,杜梨丛生芽叶片内源 ZR 含量呈现先升后下降的趋势,但与生根率的相关性不显著。也有研究认为赤霉素也是植物生长阶段转变的关键调节因子^[30]。如 GA 加快拟南芥和玉米进入成年阶段^[31],而本研究结果显示,随着继代次数的增加,

杜梨丛生芽叶片内源 GA₃ 含量无显著性变化。

与单一的内源激素含量相比,两种内源激素含量之间的比值在树木年龄阶段转变显示出更规律的变化趋势^[6, 32]。裴东认为 IAA/ABA 能有效反映植株的幼化程度^[33];随着青海云杉和翅果油树母树树龄的增加,插穗内源 IAA/ABA 和 IAA/ZR 的值呈现下降趋势,其生根率较低^[34-35];燕山红栗在连续继代培养过程中,丛生芽叶片 IAA/ABA 和 IAA/CTK 的值不断升高,且生根率也相应得到提高^[13];‘红玉’苹果在连续继代培养中丛生芽生根率不断提高,虽然内源 IAA 含量基本保持稳定,但 ABA 含量显著下降,IAA/ABA 的值从 0.2 上升到 0.7^[36]。本研究结果表明,随着继代次数的增加,杜梨丛生芽叶片内源 IAA/ABA 和 IAA/ZR 的值总体呈现上升的趋势,相关性分析结果表明 IAA/ZR 和 IAA/ABA 的值与丛生芽叶片生根率密切相关,与上述前人研究结果相似。

综上所述,连续继代培养可以使杜梨发生复幼,其丛生芽分化能力和生根能力得到提高。在连续继代培养过程中,叶片在第 3 代出现裂刻且裂刻程度逐渐加深、叶脉数降低,叶片内源激素含量及其之间的比值发生变化,这些变化与丛生芽叶片生根率的提高密切相关。

参考文献:

- [1] WENDLING I, TRUEMAN S J, XAVIER A. Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance[J]. *New Forests*, 2014, **45**(4): 473-486.
- [2] 裴东,谷瑞升. 树木复幼的研究概述[J]. *植物学通报*, 2005, **40**(6): 753-760.
PEI D, GU R S. A review on the rejuvenation of mature trees [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, **40**(6): 753-760.
- [3] LEVY A, SZWERDSZARF D, ABU-ABIED M, et al. Profiling microRNAs in *Eucalyptus grandis* reveals no mutual relationship between alterations in miR156 and miR172 expression and adventitious root induction during development[J]. *BMC Genomics*, 2014, **15**(1): 524.
- [4] 张劲,刘勇,薛敦孟,等. 毛白杨无性繁殖材料老化与复壮研究[J]. *西北林学院学报*, 2017, **32**(4): 87-91, 171.
ZHANG J, LIU Y, XUE D M, et al. Aging and rejuvenation pattern of reproductive material of *Populus tomentosa* sprouts [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2017, **32**(4): 87-91, 171.
- [5] 郭长花,康向阳. 树木发育中的阶段转变研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2008, **19**(5): 784-786.
GUO C H, KANG X Y. Progress in phase change during tree development[J]. *Letters in Biotechnology*, 2008, **19**(5): 784-786.
- [6] WANG J W, PARK M Y, WANG L J, et al. MiRNA control of vegetative phase change in trees[J]. *PLoS Genetics*, 2011, **7**(2): e1002012. DOI:10.1371/journal.pgen.1002012.
- [7] 赵建国,崔佳雯,金飏. 树木幼年向成年转变的发育调控机制研究进展[J]. *植物生理学报*, 2015, **51**(11): 1765-1774.
ZHAO J G, CUI J W, JIN B. Research advances of developmental changes of juvenile to adult transition in woody plants [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, **51**(11): 1765-1774.
- [8] WU G, PARK M Y, CONWAY S R, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2009, **138**(4): 750-759.
- [9] 张立彬,刘桂森,王秀梅,等. 深州蜜桃实生树叶形态变化与童程的关系[J]. *果树科学*, 1997, **14**(1): 28-31.
ZHANG L B, LIU G S, WANG X M, et al. Relationship between leaf characters and juvenile span on Shenzhoumitao peach seedlings[J]. *Journal of Fruit Science*, 1997, **14**(1): 28-31.
- [10] PERRIN Y, DOUMAS P, LARDETS L, et al. Endogenous cytokinins as biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, **47**(3): 239-245.
- [11] FORD Y, TAYLOR J, BLAKE P S, et al. Gibberellin A3 stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2002, **37**(2): 127-133.

[12] 刘 昊. 核桃复幼促进扦插生根的多激素作用机制[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.

[13] HOU J W, GUO S J, WANG G Y. Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. 'yanshanhong'[J]. *Journal of Forestry Research*, 2010, **21**(2): 155-160, 256.

[14] 吴颂如, 陈婉芬, 周 燮. 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素[J]. 植物生理学通讯, 1988, **24**(5): 53-57.

WU S R, CHEN W F, ZHOU X. Enzyme linked immunosorbent assay for endogenous plant hormones[J]. *Plant Physiology Communications*, 1988, **24**(5): 53-57.

[15] BONGA J M. Clonal Propagation of Mature Trees: Problems and Possible Solutions[M]//Cell and Tissue Culture in Forestry. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987: 249-271.

[16] 黄发新, 李明鹤. 不同生理老化程度杉木外植体的组培效果[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2001, **25**(2): 83-86.

HUANG F X, LI M H. Results of *in-vitro* explants with different maturation status from the same gene-types of Chinese fir[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*(Natural Sciences Edition), 2001, **25**(2): 83-86.

[17] MANZANERA J A, PARDOS J A. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, **21**(1): 1-8.

[18] 徐晓召. ‘中砧 1 号’成龄期绿枝插穗难生根的分子机制初探[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.

[19] POETHIG R S. The past, present, and future of vegetative phase change [J]. *Plant Physiology*, 2010, **154**(2): 541-544.

[20] 王 胤, 姚瑞玲, 李慧娟, 等. 基于外植体生理复幼的马尾松茎段芽无菌离体培养[J]. 植物生理学报, 2019, **55**(9): 1 375-1 384.

WANG Y, YAO R L, LI H J, *et al.* *In vitro* sterilized culture of nodal segments based on explants physiological rejuvenation in *Pinus massoniana* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, **55**(9): 1 375-1 384.

[21] HUANG H, HAN S S, WANG Y, *et al.* Variations in leaf morphology and DNA methylation following *in vitro* culture of *Malus xiaojinensis* [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2012, **111**(2): 153-161.

[22] 王玉丽, 焦培培, 顾亚亚, 等. 胡杨叶形变化与 POD 同工酶的关系研究[J]. 干旱区资源与环境, 2013, **27**(4): 181-186.

WANG Y L, JIAO P P, GU Y Y, *et al.* Study on the relationship between leaf shape change and POD enzyme of *Populus euphratica* [J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2013, **27**(4): 181-186.

[23] ZHANG S B, SUN M, CAO K F, *et al.* Leaf photosynthetic rate of tropical ferns is evolutionarily linked to water transport capacity[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e84682. DOI:10.1371/journal.pone.0084682.

[24] 富春元, 张淑娟, 鱼昭君, 等. PEG 模拟干旱胁迫对叶缘裂刻小白菜生理特性的影响[J]. 西北农业学报, 2014, **23**(5): 139-145.

FU C Y, ZHANG S J, YU Z J, *et al.* Effects of drought stress simulated by PEG 6000 on physiological characteristics of lobe-leafed non-heading Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2014, **23**(5): 139-145.

[25] 张焕欣, 董春娟, 李福凯, 等. 植物不定根发生机理的研究进展[J]. 西北植物学报, 2017, **37**(7): 1 457-1 464.

ZHANG H X, DONG C J, LI F K, *et al.* Progress on the regulatory mechanism of adventitious rooting[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, **37**(7): 1 457-1 464.

[26] SAINI S, SHARMA I, *et al.* Auxin: a master regulator in plant root development[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, **32**(6): 741-757.

[27] 肖祖飞. 童性对苹果砧木绿枝扦插生根的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.

[28] MARKOVSKI A, POPOVSKA M, GJAMOVSKI V. Investigation of the possibility for production of some stone fruit rootstocks by rooting cuttings[J]. *Acta Agriculturae Serbica*, 2015, **20**(39): 75-83.

[29] DAY J S, JAMESON P E, GOULD K S. Cytokinins associated with metamorphic vegetative growth in *Elaeocarpus hookerianus* [J]. *Functional Plant Biology*, 1995, **22**(1): 67-73.

[30] LAVEE S, HASKAL A. Partial fruiting regulation of olive trees (*Olea europaea* L.) with paclobutrazol and gibberellic acid in the orchard[J]. *Advances in Horticultural Science*, 1993, **7**(2): 83-86.

[31] SCHWARZ S, GRANDE A V, *et al.* The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, **67**(1/2): 183-195.

[32] MUNNÉ-BOSCH S, LALUEZA P. Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions[J]. *Planta*, 2007, **225**(4): 1 039-1 049.

[33] 裴 东, 袁丽钗, 奚声珂, 等. 核桃品种试管嫩茎生根的研究[J]. 林业科学, 2002, **38**(2): 32-37, 177.

PEI D, YUAN L C, XI S K, *et al.* Shoot rooting *in vitro* for walnut cultivars[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2002, **38**(2): 32-37, 177.

[34] 师晨娟, 刘 勇, 王春城, 等. 青海云杉扦插的年龄效应及其生根机理研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, **34**(12): 101-104.

SHI C J, LIU Y, WANG C C, *et al.* Study on the age effect of cutting propagation of *Picea crassifolia* and its rooting mechanism[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry* (Natural Science Edition), 2006, **34**(12): 101-104.

[35] 刘 涛, 张华新, 庞晓慧. 翅果油树年龄与内源激素含量及嫩枝扦插生根率的关系[J]. 经济林研究, 2009, **27**(4): 26-30.

LIU T, ZHANG H X, PANG X H. Correlation between rooting rate of green-wood cutting, ages and endogenous hormone contents of stock tree in *Elaeagnus mollis* [J]. *Economic Forest Researches*, 2009, **27**(4): 26-30.

[36] NOITON D, VINE J H, MULLINS M G. Effects of serial subculture in vitro on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of ‘Jonathan’ apple [J]. *Plant Growth Regulation*, 1992, **11**(4): 377-383.

(编辑:裴阿卫)