

两步生根法中 4 种因素对尾巨桉组培苗生根的影响

黄安瀛¹, 罗建中¹, 陈铭秋^{1,2}, 卢万鸿¹, 燕青³, 林彦^{1*}

(1. 中国林业科学研究院速生树木研究所, 广东 湛江 524300; 2. 西南林业大学, 昆明 650224; 3. 中国热带农业科学院湛江实验站, 广东 湛江 524013)

摘要: 组培苗的生根能力直接关系到其后续移栽成活率和生长能力, 桉树组培苗的生根研究对提升苗木生根质量、降低成本有着重要意义。以来源于同一杂交组合的 4 个尾巨桉(*Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*)无性系(EC262、EC264、EC269 和 EC272)为试验材料, 设计 4 因素(暗培养时长、培养基 1、培养基 2、无性系) 4 水平正交试验, 接种后培养 30 d 时测量其生根相关指标, 并利用极差分析对数据进行处理评价。结果表明, 不同处理下的无性系生根率、根数、平均根长、生根性状评分率、愈伤率等生根性状均在 $P<0.05$ 水平表现出显著差异。生根率为 12.5%~65%; 平均生根量为 1.9~3.57 条; 平均根长为 2.55~4.81 cm; 生根性状评分率为 28%~78%; 愈伤率为 10%~65%。极差分析表明诱导阶段的培养基(含生长调节剂)对平均根长的影响最大, 极差为 4.19; 生根性状则主要受根生长阶段的培养基影响, 其极差为 1.02, 无性系为影响愈伤率的最重要因素, 极差为 8.5。因此, 4 个尾巨桉无性系生根阶段平均根长受诱导阶段的环境因素影响更大, 生根性状则受到生长阶段环境因素影响更大, 此外, 虽然遗传因素(无性系)与环境因素(暗环境、培养基)均对愈伤率有显著影响, 但遗传因素影响更大。

关键词: 尾巨桉; 组培; 无性系; 生根率; 根系形态

doi: 10.11926/jtsb.4933

CSTR:32235.14.jtsb.4933

Effect of Four Factors in Two-step Rooting Method on Rooting of *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis* Clones

HUANG Anying¹, LUO Jianzhong¹, CHEN Mingqiu^{1,2}, LU Wanghong¹, YAN Qin³, LIN Yan^{1*}

(1. Research Institute of Fast-growing Trees, Chinese Academy of Forestry, Zhanjiang 524300, Guangdong, China; 2. Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 3. Zhanjiang Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524013, Guangdong, China)

Abstract: The rooting ability of tissue culture seedlings is directly related to their subsequent transplanting survival rate and growth capacity. The study on the rooting of *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis* tissue culture seedlings is of great significance for improving the quality of seedling rooting and reducing costs. Four *E. urophylla*×*E. grandis* clones (EC262, EC264, EC269 and EC272) from the same hybrid combination were used as experimental materials. A 4-factor (dark culture duration, medium 1, medium 2, clone) 4-level orthogonal experiment was designed. The rooting-related indicators were measured 30 days after inoculation, and the data were processed and evaluated by range analysis. The results showed that the rooting rate, number of roots, average root length, rooting trait score rate and callus rate of the clones under different treatments were significantly different at 0.05 level. The rooting rate ranged from 12.5% to 65%; the average number of roots was 1.9 to 3.57; the average root length ranged from 2.55 to 4.81 cm; the rooting trait score rate was 28% to 78%; and the callus rate was 10% to 65%. Range analysis indicated that the medium (containing growth regulators) in the

收稿日期: 2024-06-18

接受日期: 2024-08-31

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2022YFD2200203-3); 广东省林业科技创新项目(221KJCX019)资助

This work was supported by the National 14th Five-year Plan Key R&D Program (Grant No. 2022YFD2200203-3), and the Project for Forestry Science and Technology Innovation in Guangdong (Grant No. 221KJCX019).

作者简介: 黄安瀛(1992 年生), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事桉树无性繁殖理论与技术。E-mail: HuangAnying@caf.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liny10000@126.com

induction stage had the greatest effect on the average root length, with a range of 4.19; the rooting traits were mainly affected by the medium in the root growth stage, with a range of 1.02; and the clone was the most important factor affecting the callus rate, with a range of 8.5. Therefore, the average root length of the four *E. urophylla*×*E. grandis* clones during the rooting stage was more affected by the environmental factors in the induction stage, while the rooting traits were more affected by the environmental factors in the growth stage. In addition, although both genetic factors (clones) and environmental factors (dark environment, medium) had significant effects on the callus rate, the genetic factors had a greater influence.

Key words: *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*; Tissue culture; Clone; Rooting rate; Root morphology

尾巨桉(*Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*)为目前国内常见的优良桉树杂交种,具有速生丰产,适应性广,抗逆抗病等优点,目前主要通过无性繁殖以实现市场需求^[1-2]。植物组织培养可通过人工控制生长环境大量快速的对植株进行扩繁,在我国尾巨桉新品种的“有性改良,无性利用”开发模式中扮演重要作用。然而,组培过程受多种因素影响,除组培苗自身基因型外,诱导方式、培养基类型、环境差异等均对其根系形成和生长有着直接影响^[3-4],而组培苗的生根能力直接关系到苗木移栽成活率和后续生长发育,生根率的提高将极大促进苗木生长,节约使用成本,对于优良无性系的使用和推广有着重要意义。本研究参考赵亚楠等^[5]的组培苗两步生根法,通过对尾巨桉组培苗进行诱导和生长两阶段培养,探索环境差异对组培苗的生根率、根数、根长、生根性状和愈伤率等 5 个生根指标的影响。

此外,植物生根涉及细胞脱分化和再分化等阶段,黑暗环境被认为可诱导脱分化过程^[6-8]。多项研究表明暗培养在桉树组培方面发挥重要作用。暗培养可促进桉树组培苗生长,在直干桉(*E. maideni*)降低外植体褐化率、提高成活率方面具有极显著效应^[9]。一定时长内(15 d)尾巨桉无性系组培苗的继代增殖研究中随着暗培养时间的增加,增殖系数和苗高也增加^[10-11]。巨桉(*E. grandis*)和赤桉(*E. camaldulensis*)暗培养 10 d 后均能促进不定芽分化,延缓愈伤组织老化和褐变速度^[12-13];大花序桉(*E. cloeziana*)在暗培养 7 d 后进行人工光照对继代增殖的效果最好^[14];本研究拟通过对尾巨桉进行不同长时的暗培养,观察其对根系,尤其是愈伤组织生长的影响。

前期研究中,尾巨桉无性系于 7 d 起愈伤组织陆续出现小根点^[15],本研究继续以 4 个尾巨桉无性系为材料,以 7 d 为分界线,0~7 d 为诱导阶段,将 4 个尾巨桉无性系组培苗接种于含有生长调节剂的培养基中进行生根诱导;7~30 d 为生长阶段,更换

培养基使其继续生长。研究除了解不同阶段环境差异对尾巨桉无性系 5 个生根指标的影响外,还进一步分析根长、生根性状和停留在愈伤组织阶段的植株(愈伤率)受影响程度,以期为本木植物尾巨桉的根系发育调控研究进行补充,并为后续研究提供理论和实践参考。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验以中国林业科学院速生树木研究所遗传育种团队自主研发,来自同一杂交组合的 4 个尾巨桉(*Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*)无性系(EC262、EC264、EC269 和 EC272)继代获得的无菌继代苗为试验材料。

1.2 方法

植物生长调节剂对不定根原基诱导 以 1/2MS 培养基为基础培养基,另添加 15 g/L 蔗糖,0.5 mg/L 的半胱氨酸和 7 g/L 的卡拉胶,pH 值为 5.8,以吲哚-3-丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)和无性系为试验因素,基础培养基在 121 ℃、20 min 高压灭菌后,加入滤膜过滤后的 IBA 和 NAA。设置 4 种浓度进行不定根的培养:(1) 1 mg/L IBA+1 mg/L NAA;(2) 1 mg/L IBA+2 mg/L NAA;(3) 2 mg/L IBA+1 mg/L NAA;(4) 2 mg/L IBA+2 mg/L NAA;各处理接种 10 株,重复 4 次,优化获得的植物生长调节剂组合用于后续两步中第一阶段的培养。

培养方法 选取继代培养 20~25 d,高度在(4±0.5) cm,生长健壮的丛生苗,剪取 2 cm 以上带顶芽部分进行生根诱导试验。培养环境为光照强度 36 000~45 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照时长 12 h,温度 28 ℃,湿度 80%~90%。

暗培养和两步生根法对不定根原基的影响 第一阶段将组培苗培养于含有 1 mg/L IBA+1 mg/L

NAA 的培养基 7 d; 第二阶段, 将组培苗转接于不含生长素的培养基上, 本研究设计 4 因素 4 水平正交试验, 4 因素分别为暗培养时长(A)、培养基 1 (B)、培养基 2 (C)和无性系(D), 其中, 暗培养时长分别为 1、3、7 和 15 d; 培养基分别为以 1/2MS 为基础

优化所得的大量元素培养基(K1)^[16]、1/2MS (K2)、N6 (K3)和 WPM (K4, 木本类植物培养基); 4 个无性系分别为 EC262、EC264、EC269 和 EC272。各处理接种 10 株, 重复 4 次, 培养基 1 与培养基 2 分别代表 2 个阶段的培养基。

表 1 培养基诱导组合

Table 1 Medium induction combination

试验编号 Test No.	试验组合 Experiment combination	暗培养时长 (A, d) Duration of dark culture	培养基 1 Medium 1 (B)	培养基 2 Medium 2 (C)	无性系 Clone (D)
T1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	1	1/2MS	1/2MS	EC262
T2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	1	大量元素培养基	大量元素培养基	EC264
T3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	1	N6	N6	EC269
T4	A ₁ B ₄ C ₄ D ₄	1	WPM	WPM	EC272
T5	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	3	1/2MS	大量元素培养基	EC269
T6	A ₂ B ₂ C ₁ D ₄	3	大量元素培养基	1/2MS	EC272
T7	A ₂ B ₃ C ₄ D ₁	3	N6	WPM	EC262
T8	A ₂ B ₄ C ₃ D ₂	3	WPM	N6	EC264
T9	A ₃ B ₁ C ₃ D ₄	7	1/2MS	N6	EC272
T10	A ₃ B ₂ C ₄ D ₃	7	大量元素培养基	WPM	EC269
T11	A ₃ B ₃ C ₁ D ₂	7	N6	1/2MS	EC264
T12	A ₃ B ₄ C ₂ D ₁	7	WPM	大量元素培养基	EC262
T13	A ₄ B ₁ C ₄ D ₂	15	1/2MS	WPM	EC264
T14	A ₄ B ₂ C ₃ D ₁	15	大量元素培养基	N6	EC262
T15	A ₄ B ₃ C ₂ D ₄	15	N6	大量元素培养基	EC272
T16	A ₄ B ₄ C ₁ D ₃	15	WPM	1/2MS	EC269

1.3 数据统计和分析

在培养 30 d 时统计生根情况, 以生根率、平均根长、根数^[17]、愈伤率和生根性状^[18]评分等作为评价标准, 其中, 愈伤率为 30 d 时仍旧只生成愈伤组织无生根趋势的植株, 愈伤率=愈伤植株/总植株×100%, 死亡植株(即使有生根或愈伤)不计入生根或愈伤率。

采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行整理, 运用 SPSS 21.0 对数据进行多重比较分析(Duncan 法), 差异显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 植物生长调节剂诱导尾巨桉生根比较

不同处理组合对无性系的生根情况影响不同(表 2), 4 个无性系在不同处理下的生根率为 0~57.5%, 生根数为 0~3.64 条。方差分析表明, 1 mg/L IBA+1 mg/L NAA 组合均有较高的生根率和根数。虽然 2 mg/L IBA+2 mg/L NAA 组合处理下部分无

性系的生根率或根数显著高于其他组合, 但对其余无性系并未表现出优势, 因而在后续试验中选用 1 mg/L IBA+1 mg/L NAA 作为生根诱导植物生长调节剂组合。

2.2 对不定根原基形成的影响

不同处理对 4 个尾巨桉无性系的影响不同, 5 个指标均在 $P<0.05$ 水平上表现出显著差异(表 3)。生根率为 12.5%~65%, 其中, T2、T6 和 T14 处理显著高于其余处理; 平均生根量为 1.9~3.57 条; 平均根长为 2.55~4.81 cm, 平均根长中显著高于其余处理的同样为 T2 和 T6, 分别为 4.81 和 4.48 cm; 生根性状评分率为 28%~78%, 生根效果最好的 T2 显著优于其余处理。T2 处理在 5 个指标中均表现出较优水平, T4 处理则均表现出较低水平, 不同处理下植株根系生长差异较大。此外, 愈伤率为 10%~65%, 愈伤率越低表示只形成愈伤组织而不生根的植株越少, 与生根率结合来看 T2 处理效果最好。

2.3 对平均根长、生根性状的极差分析

平均根长的极差分析结果表明(表 4), 除暗培养

表 2 植物生长调节剂对尾巨桉生根的影响

Table 2 Effect of plant growth regulator combination on rooting of *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*

编号 No.	植物生长调节剂 Plant growth regulator		无性系 Clonal line	生根率 /% Rooting rate	根数 Number of rooting
	IBA	NAA			
T1	0	1	EC262	0d	0d
T2	1	0	EC262	10cd	1.50±1.00bcd
T3	1	1	EC262	42.5±17.1ab	3.00±1.46 ab
T4	2	2	EC262	37.5±9.6b	3.00±1.67 a
T5	0	1	EC264	15.0±10.1cd	2.00±1.11 abc
T6	1	0	EC264	10.0±8.2cd	1.50±0.58bcd
T7	1	1	EC264	57.5±9.6a	3.00±1.47ab
T8	2	2	EC264	55.0±12.9a	2.90±1.57ab
T9	0	1	EC269	0d	0d
T10	1	0	EC269	7.5±5.0cd	1.50±0.51cd
T11	1	1	EC269	15.0±10.0c	1.40±0.89bcd
T12	2	2	EC269	17.5±5.0c	1.82±0.87abc
T13	0	1	EC272	35.0±5.8b	3.64±1.65a
T14	1	0	EC272	45.0±12.9ab	2.79±1.99abc
T15	1	1	EC272	40.0±14.1ab	2.93±1.14ab
T16	2	2	EC272	52.5±15.2a	2.45±1.10abc

同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Data followed different letters within column indicate significant differences at 0.05 level. The same below

表 3 尾巨桉生根率

Table 3 Rooting of *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*

编号 No.	组合 Combination	生根率 /% Rooting rate	根数 Number of root	平均根长 Mean root length (cm)	生根性状评分率 /% Rooting traits score rate	愈伤率 /% Callus rate
T1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	42.5±12.6cd	2.47±1.07bcd	3.32±0.98 bc	56.0±1.56c	22.5±5bcd
T2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	65.0±19.1a	3.31±1.46a	4.81±2.13a	78.0±2.22a	10.0±8.16d
T3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	20.0±8.2feg	3.57±1.62a	2.55±0.78d	56.0±2.10c	35.0±5.77bc
T4	A ₁ B ₄ C ₄ D ₄	12.5±5.0g	2.20±1.30cd	2.93±1.10cd	28.0±2.88f	65.0±12.91a
T5	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	30.0±18.3de	3.25±1.36ab	3.92±1.28b	68.1±3.20bc	32.5±15.00bc
T6	A ₂ B ₂ C ₁ D ₄	65.0±20.8a	2.69±1.46bc	4.48±1.36a	69.0±3.47bc	37.5±12.58b
T7	A ₂ B ₃ C ₄ D ₁	25.0±12.9ef	2.10±0.99cd	3.13±1.29bc	63.3±1.40bc	27.5±9.57bcd
T8	A ₂ B ₄ C ₃ D ₂	37.5±17.1cde	3.00±1.18ab	2.42±0.95d	40.0±2.72e	25.0±10bcd
T9	A ₃ B ₁ C ₃ D ₄	5.0±14.1bc	3.10±1.33ab	3.79±1.14b	62.0±2.16bc	30.0±16.33bc
T10	A ₃ B ₂ C ₄ D ₃	25.0±19.1ef	1.90±0.99d	2.94±0.67cd	46.7±3.80de	25.0±17.32bcd
T11	A ₃ B ₃ C ₁ D ₂	47.5±20.6bc	2.79±1.23bc	3.24±1.39bc	72.0±2.01b	20.0±8.16bcd
T12	A ₃ B ₄ C ₂ D ₁	45.0±20.8bc	3.00±1.37ab	3.28±1.85bc	69.0±1.39bc	20.0±11.55bcd
T13	A ₄ B ₁ C ₄ D ₂	42.5±15.0cd	2.18±1.31cd	3.51±1.90cd	41.0±0.85e	17.5±9.57cd
T14	A ₄ B ₂ C ₃ D ₁	62.5±17.1a	3.40±1.66a	3.25±1.34bc	67.7±2.10bc	22.5±17.08bcd
T15	A ₄ B ₃ C ₂ D ₄	32.5±15.0de	3.08±1.68ab	3.70±2.13cd	66.0±2.77bc	25.0±5.78bcd
T16	A ₄ B ₄ C ₁ D ₃	17.5±9.6g	2.14±1.07cd	2.66±1.02d	36.0±3.57ef	37.5±9.51b

时长外，其余各因素对平均根长的影响均达到显著水平，其中，培养基 1 对平均根长的影响最大，极差为 4.19，且处理 K1 (1/2MS)和 K2 (大量元素)显著优于其余处理，而培养基 2、无性系、暗培养时长的极差分别为 3.70、2.85 和 0.85，重要性依次递减。

生根性状评分率极差分析结果表明(表 5)，培养基 2 为最大的因素，其极差为 1.02，处理 K4 (WPM)

显著低于其余处理。此外，培养基 2、无性系、暗培养时长的极差分别为 0.88、0.51 和 0.40，重要性依次递减。4 个因素中，培养基 1 和培养基 2 的差异达到显著水平，其他因素内差异均不显著。

2.4 对尾巨桉愈伤率的极差分析

愈伤率极差分析结果表明(表 6)，各因素对愈伤率的影响均达到显著水平，其中无性系为影响愈伤

率的最重要因素，其极差为 8.5，其中 K2 (大量元素)显著高于除 K3 (N6)外的其余处理。此外，培养基 1、培养基 2、暗培养时长的极差分别为 5.50、4.75 和 3.75，重要性依次递减。

表 4 尾巨桉平均根长的极差分析

Table 4 Range analysis of the average root length of rooting for *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*

编号 No.	暗培养时长 Duration of dark culture	培养基 1 Medium 1	培养基 2 Medium 2	无性系 Clone
K1	13.61a	14.54a	13.70b	12.99b
K2	13.96a	15.48a	15.72a	13.98ab
K3	13.26a	12.62b	12.02b	12.06b
K4	13.12a	11.29b	12.51b	14.91a
极差 R	0.85	4.19	3.70	2.85

表 5 尾巨桉生根性状评分率的极差分析

Table 5 Range analysis of rooting traits score rate of *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*

编号 No.	暗培养时长 Duration of dark culture	培养基 1 Medium 1	培养基 2 Medium 2	无性系 Clone
K1	2.19a	2.28b	2.14b	2.57a
K2	2.36a	2.62a	2.82a	2.33a
K3	2.51a	2.54ab	2.27ab	2.06a
K4	2.12a	1.74c	1.80c	2.27a
极差 R	0.40	0.88	1.02	0.51

表 6 尾巨桉愈伤率极差分析

Table 6 Range analysis of callus rate for *Eucalyptus urophylla*×*E. grandis*

编号 No.	暗培养时长 Duration of dark culture	培养基 1 Medium1	培养基 2 Medium2	无性系 Clone
K1	13.25a	10.25b	12.00ab	9.25b
K2	12.25a	9.50b	8.75b	7.25b
K3	9.50b	10.75b	11.25ab	13.25ab
K4	10.50ab	15.00a	13.50a	15.75a
极差 R	3.75	5.50	4.75	8.50

3 讨论和结论

3.1 不同因素对尾巨桉生根的影响

遗传因素和环境因素均在桉树生根的过程中扮演重要作用，综合考虑暗培养和培养基等环境因素，结合无性系等遗传因素对尾巨桉组培苗根系发育效果进行研究。本研究结果表明，不同处理对 4 个尾巨桉的生根率、根数、根长生根性状和愈伤率均有显著影响。前期研究表明，植株生根不同阶段的主要影响因子不同，在生根初始阶段，主要是遗传因素(无性系间差异)决定其生根差异，而在根系发育的后续阶段，环境因素(培养基类型)的影响超过了遗传因素^[15]。在本研究中，将尾巨桉的处理分为诱导(0~7 d)和生长(7~30 d) 2 个阶段，着重了解根长、生根性状等发育相关指标，结果表明，平均根

长受到诱导阶段的培养基影响更大，该阶段中，1/2MS 和大量元素培养基作用显著高于其余培养基，而生根性状主要受到生长阶段培养基的影响，其中大量元素显著高于除 N6 培养基外的其他培养基类型。该结果说明了 4 种尾巨桉无性系不同阶段的生根重点是不同的，诱导阶段主要影响根长发育，而生长阶段则主要影响生根性状，此外，2 个阶段需要的营养元素也略有差异，1/2MS 和大量元素培养基更利于根长，而 N6 和大量元素培养基优势在于根系状态，因此在尾巨桉根系生长过程中适量增加培养基中硝酸钾等大量元素有利于根系状态的生长。WPM 培养基中愈伤不生根植株概率显著高于其它培养基，故过高的硫酸根离子可能不利于愈伤组织分化。本研究中，诱导阶段培养基含有的生长调节剂也在一定程度对根长具有影响，而生根性状

则基本不受生长调节剂影响,这与前期研究结果^[15]相符。难生根的桉树苗通常最终停留在 2 种形态上:难以脱分化的组培苗最终基部仍为茎段状态;难以再分化的组培苗基部产生大量愈伤团,并最终停留在愈伤团状态,愈伤组织是否形成则是区分这两者的关键。生根初期形成的小愈伤组织表明植株顺利进入脱分化状态,有利于生根进程的推进,但愈伤组织持续增大则会加速培养基中的营养消耗及有毒代谢物的积累,反过来阻碍愈伤组织的生长,导致停留在愈伤组织未分化的植株最终走向死亡。本研究中,虽然暗环境、培养基和基因型均对愈伤率有显著影响,但基因型在其中扮演最重要的角色。

3.2 培养基对生根的影响

培养基对根长、生根性状和愈伤率的影响各不相同,对根长和愈伤率的影响主要发生在诱导阶段,而对生根性状的影响主要发生在生长阶段。对这 3 种性状影响的主要培养基也不尽相同,根长、生根性状受 1/2MS、大量元素和 N6 等 3 种培养基的影响更大,愈伤率则主要受 WPM 影响更大,推测 WPM 培养基可能在诱导愈伤组织形成或抑制愈伤组织再分化方面发挥作用。对比 4 个配方,WPM 中硫酸根离子高于其余 3 种培养基约 5~6 倍,研究表明,水稻(*Oryza sativa*)根能够在硫缺乏的情况下识别并诱导根产生独脚金内酯,而在其他情况下则不会^[19-20],独脚金内酯被证实通过降低 PIN 蛋白在木质部薄壁组织细胞质膜上的积累从而阻碍生长素的运输,并以此影响初生根的伸长和细胞增殖^[21-24]。独脚金内酯的缺失促进了侧根的形成^[25-26],本研究中,高浓度的硫酸根可能通过抑制独脚金内酯的生成从而阻碍了根的形成,进一步说明独脚金内酯可能在促进愈伤组织分化方面具有一定功能,这或许为本研究中 WPM 培养基下,只生成愈伤组织而不生根植株的比例显著高于其余试验组这一现象提供理论参考。

3.3 暗培养对生根的影响

烟草植物长时间暴露在黑暗中会导致叶片变黄,并伴有染色质去浓缩、核仁结构破坏和中心外异染色质的脱密等干细胞特性^[6-7],而这些特征在其形成过程中涉及到广泛的细胞重编程^[8],因而,暗培养被认为可以诱导细胞重编程的信号,促使干细胞特征(脱分化)生成。已有多项研究表明不同桉树在暗环境中培养一段时间后有助于组培苗的生长^[9-14]。在本研究中,桉树生根过程中暗培养

时长对愈伤率有显著影响,暗培养 7 d 以上可显著降低愈伤不生根的概率。光环境被认为在诱导细胞再分化方面发挥作用,通过多种信号通路介导动态调整植物根系结构以优化生长和性能^[27],赤霉素、生长素和细胞分裂素^[28-31]信号网络均被证实受到光照的调控作用。光照在诱导麻风树(*Jatropha curcas*)^[32]、甜菊(*Stevia rebaudiana*)^[33]、菩提花(*Protea cynaroides*)^[31]、葡萄(*Hybrid grapes*)^[34]等植物的生根及根系的生长过程中具有重要作用。本研究虽未直接研究光环境对生根的影响,但暗培养 7 d 的愈伤率显著低于 1 和 3 d,而 15 d 的愈伤率与其余处理无显著差异,表明暗培养时长过长或过短均不利于愈伤组织分化。

综上,尾巨桉无性系生根阶段平均根长受诱导阶段环境因素影响更大,生根性状受生长阶段环境因素影响更大,大量元素培养基作为基础培养基更适合尾巨桉根系各阶段的生长;一定时长的暗培养可促进根系生长,过长或过短均影响愈伤分化,暗培养 7 d 有助于愈伤分化。环境因素(暗环境、培养基)虽对根系生长影响显著,但其受遗传因素(无性系)的影响更大。

参考文献

- [1] OUYANG L J, HUANG Z C, ZHAO L Y, et al. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla*×*Eucalyptus grandis* from stem segment [J]. Braz Arch Biol Technol, 2012, 55(3): 329–334. doi: 10.1590/S1516-89132012000300001.
- [2] LU H F, XU J M, LI G Y, et al. Site classification of *Eucalyptus urophylla*×*Eucalyptus grandis* plantations in China [J]. Forests, 2020, 11(8): 871. doi: 10.3390/f11080871.
- [3] HUANG L J, WANG H. Advances in tissue culture techniques of trees and the problems existed [J]. For Res, 2016, 29(3): 464–471. [黄烈健, 王鸿. 林木植物组织培养及存在问题的研究进展 [J]. 林业科学研究, 2016, 29(3): 464–471. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2016.03.024.]
- [4] LEI J M. Study on rapid tissue culture micropropagation and cutting propagation of *Prunus* subgenus *Cerasus* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020. [雷巾茗. 樱花组培快繁与扦插繁殖研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2020.]
- [5] ZHAO Y N, ZHANG Y, TAN X, et al. Optimizing two-step rooting techniques of *in vitro* cultured *Pyrus betulifolia* [J]. J China Agric Univ, 2021, 26(11): 105–112. [赵亚楠, 张懿, 谭旭, 等. 杜梨组培苗两步生根技术体系优化 [J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(11): 105–112. doi: 10.11841/j.issn.1007-4333.2021.11.10.]

- [6] FLORENTIN A, DAMRI M, GRAFI G. Stress induces plant somatic cells to acquire some features of stem cells accompanied by selective chromatin reorganization [J]. *Dev Dyn*, 2013, 242(10): 1121–1133. doi: 10.1002/dvdy.24003.
- [7] DAMRI M, GRANOT G, BEN-MEIR H, et al. Senescing cells share common features with dedifferentiating cells [J]. *Rejuven Res*, 2009, 12(6): 435–443. doi: 10.1089/rej.2009.0887.
- [8] AY N, IRMLER K, FISCHER A, et al. Epigenetic programming via histone methylation at *WRKY53* controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2009, 58(2): 333–346. doi: 10.1111/j.0960-7412.2009.03782.x.
- [9] WANG X L, SUN J R, WEI W C, et al. Technical system of tissue culture for rapid propagation of *Eucalyptus maideni* superior seedlings [J]. *J NW For Univ*, 2019, 34(4): 131–138. [王晓丽, 孙继瑞, 韦文长, 等. 直干桉超级苗组培快繁技术体系研究 [J]. 西北林学院学报, 2019, 34(4): 131–138. doi: 10.3969/j.issn.1001-7461.2019.04.19.]
- [10] SHI Q, LI F Y, LIANG X L, et al. Multiplication subculture of three clones of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2016, 44(16): 179–182. [石前, 李飞宇, 梁秀莉, 等. 尾巨桉3个无性系继代增殖培养研究 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(16): 179–182. doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2016.16.060.]
- [11] OUYANG L J, HUANG Z C, SHA Y E, et al. Effects of a new synthetic cytokinin PBU on embryogenic callus induction and plant regeneration of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* [J]. *Plant Physiol J*, 2011, 47(8): 785–791. [欧阳乐军, 黄真池, 沙月娥, 等. 新型分裂素PBU对尾巨桉胚性愈伤组织诱导及植株再生的影响 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(8): 785–791. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2011.08.003.]
- [12] DENG Y, ZENG B S, LIU Y, et al. Establishment of high-efficiency regeneration system of leaf explants of *Eucalyptus grandis* clone EG5 [J]. *For Res*, 2012, 25(3): 394–399. [邓艺, 曾炳山, 刘英, 等. 巨桉无性系EG5叶片高效再生体系的建立 [J]. 林业科学研究, 2012, 25(3): 394–399. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2012.03.011.]
- [13] GUAN Y L, HUANG M R, WANG M X. *In vitro* plant regeneration from the seedling leaves of *Eucalyptus camaldulensis* [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 2005, 29(3): 45–48. [关亚丽, 黄敏仁, 王明麻. 赤桉叶片的离体培养与植株再生 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(3): 45–48. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2005.03.011.]
- [14] TANG Q L. Studies on tissue culture of *Eucalyptus cloeziana* [D]. Nanning: Guangxi University, 2006. [唐庆兰. 大花序桉组织培养的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2006.]
- [15] HUANG A Y, CHEN M Q, LIN Y, et al. Effects of different medium and hormone concentration on the rooting of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* clones [J]. *For Res*, 2023, 36(6): 69–77. [黄安瀛, 陈铭秋, 林彦, 等. 不同培养基、生长调节剂浓度对4个尾巨桉无性系组培生根的影响 [J]. 林业科学研究, 2023, 36(6): 69–77. doi: 10.12403/j.1001-1498.20230061.]
- [16] WANG C B, LI H Q, FAN L H, et al. Effects of nutrient elements on rooting of eucalyptus in tissue culture [J]. *Eucalypt Sci Technol*, 2021, 38(1): 45–50. [王楚彪, 李华强, 樊林华, 等. 大量元素对桉树组培生根的影响 [J]. 桉树科技, 2021, 38(1): 45–50. doi: 10.13987/j.cnki.askj.2021.01.008.]
- [17] ZHANG P J, GAO L Q, SHANG X H. Effects of different hormone types, concentrations and soaking time on cutting rooting of *Xanthostemon chrysanthus* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2020, 41(6): 1084–1091. [张沛健, 高丽琼, 尚秀华. 不同激素种类、浓度及浸泡时间对金蒲桃扦插生根的影响 [J]. 热带作物学报, 2020, 41(6): 1084–1091. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2020.06.003.]
- [18] WANG Y, JIA Z K, MA L Y, et al. Effects of four plant growth regulators on rooting of the softwood cutting of *Magnolia wufengensis* [J]. *Sci Silv Sin*, 2019, 55(7): 35–45. [王艺, 贾忠奎, 马履一, 等. 4种植物生长调节剂对红花玉兰嫩枝扦插生根的影响 [J]. 林业科学, 2019, 55(7): 35–45. doi: 10.11707/j.1001-7488.20190704.]
- [19] SHINDO M, NAGASAKA S, KASHIWADA S, et al. Shoot has important roles in strigolactone production of rice roots under sulfur deficiency [J]. *Plant Sign Behav*, 2021, 16(4): 1880738. doi: 10.1080/15592324.2021.1880738.
- [20] SHINDO M, SHIMOMURA K, YAMAGUCHI S, et al. Upregulation of *DWARF27* is associated with increased strigolactone levels under sulfur deficiency in rice [J]. *Plant Direct*, 2018, 2(4): e00050. doi: 10.1002/pld3.50.
- [21] KAWADA K, SASAKI Y, ASAMI T, et al. Insect growth regulators with hydrazide moiety inhibit strigolactone biosynthesis in rice [J]. *J Pestic Sci*, 2022, 47(1): 43–46. doi: 10.1584/jpestics.D21-063.
- [22] ZHANG J, MAZUR E, BALLA J, et al. Strigolactones inhibit auxin feedback on PIN-dependent auxin transport canalization [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3508. doi: 10.1038/s41467-020-17252-y.
- [23] HOFFMANN B, PROUST H, BELCRAM K, et al. Strigolactones inhibit caulonema elongation and cell division in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99206. doi: 10.1371/journal.pone.0099206.
- [24] SHINOHARA N, TAYLOR C, LEYSER O. Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(1): e1001474. doi: 10.1371/journal.pbio.1001474.
- [25] OMOARELOJIE L O, KULKARNI M G, FINNIE J F, et al. Strigolactones and their crosstalk with other phytohormones [J]. *Ann Bot*,

- 2019, 124(5): 749–767. doi: 10.1093/aob/mcz100.
- [26] ALTAMURA M M, PIACENTINI D, DELLA ROVERE F, et al. New paradigms in brassinosteroids, strigolactones, sphingolipids, and nitric oxide interaction in the control of lateral and adventitious root formation [J]. *Plants (Basel)*, 2023, 12(2): 413. doi: 10.3390/plants12020413.
- [27] LEE H J, PARK Y J, HA J H, et al. Multiple routes of light signaling during root photomorphogenesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22(9): 803–812. doi: 10.1016/j.tplants.2017.06.009.
- [28] KOBAYASHI K, BABA S, OBAYASHI T, et al. Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 1081–1095. doi: 10.1105/tpc.111.092254.
- [29] ROMAN H, GIRAULT T, BARBIER F, et al. Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth [J]. *Plant Physiol*, 2016, 172(1): 489–509. doi: 10.1104/pp.16.00530.
- [30] STIRK W A, BÁLINT P, TARKOWSKÁ D, et al. Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 79: 66–76. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.03.005.
- [31] WU H C, LIN C C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro* [J]. *HortScience*, 2012, 47(10): 1490–1494. doi: 10.21273/HORTSCI.47.10.1490.
- [32] DAUD N, FAIZAL A, GEELEN D. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2013, 49(2): 183–190. doi: 10.1007/s11627-012-9486-4.
- [33] RAMÍREZ-MOSQUEDA M A, IGLESIAS-ANDREU L G, BAUTISTA-AGUILAR J R. The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni [J]. *Sugar Tech*, 2017, 19(3): 331–336. doi: 10.1007/s12355-016-0459-5.
- [34] POUDEL P R, KATAOKA I, MOCHIOKA R. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008, 92(2): 147–153. doi: 10.1007/s11240-007-9317-1.