

网络出版时间:2020-08-13 15:31 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.02.017
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200812.1352.010.html

牡丹试管苗生根过程中内源 IAA 及相关酶活性的变化

尚文倩¹,王政¹,何松林^{1,2},贺丹¹,董娜琳¹,郭英³

(1 河南农业大学 林学院,河南 郑州 450002;2 河南科技学院 园艺园林学院,河南 新乡 453003;

3 碧源建工有限公司,河南 郑州 450000)

【摘要】【目的】研究牡丹试管苗生根期间相关酶活性和内源生长素吲哚乙酸(IAA)含量的变化,以及生根期间茎基部内源 IAA 的分布,为牡丹快速繁殖提供理论依据。【方法】以牡丹试管苗‘凤丹白’为试验材料,以 WPM+ Ca^{2+} +聚乙烯吡咯烷酮(PVP)1 g/L+糖 30 g/L+植物凝胶 2 g/L(pH=5.8)为生根培养基,研究外源添加不同质量浓度(0(CK),1,2,3 和 4 mg/L)IAA 对其生根的影响,并测定牡丹试管苗生根期间茎基部过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性及内源 IAA 含量的变化,同时对牡丹试管苗生根期间茎基部进行细胞学观察和 IAA 免疫荧光定位分析。【结果】牡丹试管苗在外源添加 3 mg/L IAA 的生根培养基中生根率最高(52.00%)、生根指数最大(12.47),且显著高于其他处理;CK 处理的生根率、平均最大根长和生根指数均低于其他处理。在牡丹试管苗生根期间,其茎基部的 POD、PPO 和 IAAO 活性始终处于波动变化中;内源 IAA 含量则呈现先升高后降低的变化趋势,在生根培养 5 d 时达到最大值 62.80 ng/g。细胞学观察结果显示,牡丹试管苗根原基诱导期为接入生根培养基后的 3~5 d,对于生根培养基中添加 3 mg/L IAA 的处理,其试管苗茎基部 POD 和 PPO 活性均在培养 3 d 时达到峰值,IAAO 活性在培养 3~4 d 处于显著下降趋势,而内源 IAA 含量在培养 3~5 d 处于升高趋势。免疫荧光定位分析表明,在牡丹试管苗生根期间,内源 IAA 以茎基部维管束中分布最多,且一直作用于根原基形成和伸长的部位,荧光信号强弱与其含量相一致。【结论】在牡丹试管苗生根期间,外源添加 IAA 后,高活性的 POD、PPO 及低活性的 IAAO 有助于根原基的发生,内源 IAA 在根原基的积累与牡丹试管苗不定根的发生密切相关。

【关键词】 牡丹;组织培养;IAA;生根培养;酶活性;免疫荧光技术

【中图分类号】 S685.11

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)02-0129-08

Changes of endogenous IAA and related enzyme activities during rooting of *Paeonia suffruticosa* in vitro

SHANG Wenqian¹, WANG Zheng¹, HE Songlin^{1,2}, HE Dan¹, DONG Nalin¹, GUO Ying³

(1 College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China;

3 Biyuan Construction Engineering Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: 【Objective】The enzyme activities, endogenous hormones and IAA localization during rooting period of *Paeonia suffruticosa* in vitro were studied to provide basis for rapid propagation of tree peony. 【Method】In vitro cultivars of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) ‘Feng Dan Bai’ were tested using WPM+WPM (Ca^{2+}) + polyvinyl pyrrolidone (PVP) 1 g/L + sugar 30 g/L + Gellan gum 2 g/L (pH =

【收稿日期】 2020-02-19

【基金项目】 河南省科技创新人才计划项目(174200510004);河南省科技攻关项目(182102110033,202102110083);国家自然科学基金项目(31870698)

【作者简介】 尚文倩(1987-),女,河南孟津人,讲师,博士,主要从事园林植物生物技术研究。

【通信作者】 何松林(1965-),男,河南淮阳人,教授,博士,博士生导师,主要从事园林植物生物技术研究。

2.8) as rooting medium. The effects of IAA at different concentrations (0 (CK), 1, 2, 3 and 4 mg/L) on rooting were studied, and changes in peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and indoleacetic acid oxidase (IAAO) activities and content of endogenous IAA were measured. Cytological observation and IAA immunofluorescence localization were also performed. **【Result】** The highest rooting rate (52.00%) and rooting index (12.47) were obtained in the rooting medium supplemented with 3 mg/L IAA, which were significantly higher than other treatments. The rooting rate, average maximum root length, and rooting index of CK were lower than other treatments. During rooting of tree peony *in vitro*, the activities of POD, PPO and IAAO at the base of stem fluctuated, while the content of endogenous IAA showed a trend of increasing first followed by decrease with a maximum of 62.80 ng/g on the 5th day of rooting. The cytological observation results showed that the root primordium induction period of the tree peony *in vitro* was the 3rd to 5th day after rooting medium was inserted. For the treatment with 3 mg/L IAA, peak values of POD and PPO activities were reached on the 3rd day, IAAO activity showed a downward trend from the 3rd to 4th day, while endogenous IAA content increased from the 3rd to 5th day. Immunofluorescence localization analysis showed that endogenous IAA was mostly distributed in the vascular bundle of stem base during rooting, and it acted on root primordium formation and elongation. **【Conclusion】** High activities of POD and PPO and low activity of IAAO after IAA application were helpful to the occurrence of root primordium. The accumulation of endogenous IAA in root primordium was closely related to the adventitious roots of tree peony *in vitro*.

Key words: *Paenonia suffruticosa*; tissue culture; IAA; rooting cultivation; enzyme activity; immunofluorescence

牡丹(*Paenonia suffruticosa* Andr.)为落叶亚灌木,又名木芍药、富贵花等,属芍药科芍药属植物,是我国的传统名花,具有较高的观赏价值和药用价值^[1]。牡丹品种繁多,其花姿雍容端庄、花色鲜艳,有富贵吉祥和繁荣昌盛的寓意,被封为我国的国花。牡丹繁殖多以分株和嫁接为主,但其繁殖时间较长且繁殖率低,使牡丹种苗工厂化生产受到很大制约^[2]。组织培养具有繁殖速度快、系数高、周期短、可保持母株优良性状等优点,近年来广泛应用于植物的快速繁殖中。国内对牡丹组织培养的研究始于1982年^[3],但牡丹试管苗诱导存在不定根诱导难度增大^[4]、生根率低、不定根质量较差^[5]和移栽成活率低^[6]等问题,严重影响牡丹的快速繁殖。

在植物根系发生的不同阶段,其自身通过调控相关酶活性及内源激素浓度、比例的变化来影响根系发育,如过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和吲哚乙酸氧化酶(IAAO)等酶类及内源激素,均与植物不定根的发生密切相关^[7-8]。其中植物生长素吲哚乙酸(IAA)作为促进不定根发生的主要激素,其在植物体内分布及作用的部位,对于研究根系发生具有重要意义。免疫荧光技术利用抗体抗原特异性结合,揭示激素在植物组织的分布和作用位点,从而为其在植物体内的作用机理研究提供依据。国内

外学者已通过此技术研究了 IAA 在不同组织的分布对百合发芽分化^[9]、葡萄叶片高温胁迫^[10]和拟南芥下胚轴不定根生长^[11]的影响。近年来,有关牡丹酶活性和内源激素的研究主要集中在种子休眠和萌发^[12]、芽休眠^[13]、开花^[14]、体胚发生^[15]等方面,而关于试管苗生根方面的报道较少。本试验拟通过研究牡丹试管苗生根过程中茎基部内源 IAA 组织分布及相关内源激素和酶活性的变化,以期为牡丹等难生根植物的发根机理研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 牡丹试管苗诱导及生根培养

选取 5~8 年生的牡丹品种‘凤丹白’未萌动鳞芽为外植体,2 月取材,消毒后接种于 MS+WPM (Ca²⁺) + 6-苄基嘌呤(6-BA) 0.3 mg/L + 3-吲哚丁酸(IBA) 0.5 mg/L + 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 1 g/L + 琼脂 7 g/L + 蔗糖 30 g/L (pH=5.8) 的固体培养基上。培养条件为:光强 40 μmol/(m²·s),温度(23±2) °C,光照时间 12 h/d,诱导 40 d 即可得到供试试管苗。将诱导后的试管苗接种于 MS+WPM(Ca²⁺) + 6-BA 0.3 mg/L + 萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L + PVP 1 g/L + 抗坏血酸(Vc) 50 mg/L + 水解乳蛋白(LH) 0.5 g/L + 琼脂 7 g/L + 蔗糖 30

g/L (pH=5.8)的培养基上增殖培养 50 d,选取生长一致的试管苗作为供试材料。

将增殖后的试管苗转入含有 WPM+WPM (Ca²⁺)+PVP 1 g/L+糖 30 g/L+植物凝胶 2 g/L (pH=5.8)的培养基中,并分别添加质量浓度为 1, 2, 3, 4 mg/L 的 IAA,以不添加 IAA 的培养基为对照,每个处理 25 株苗,培养条件同 1.1 节,40 d 后统计生根指标。

1.2 生根指标的测算

采用游标卡尺测量每株生根试管苗的最大根长,并统计每个处理的生根株数,然后计算其生根率、平均根数、平均最大根长和生根指数,具体计算公式为:

$$\text{生根率} = \text{生根株数} / \text{培养株数} \times 100\%$$

$$\text{平均根数} = \text{生根总数} / \text{生根株数}$$

平均最大根长 = 生根苗最大根长总和 / 生根株数;

生根指数 = 平均最大根长 × 平均根数 × 生根率。

1.3 酶活性的测定

采用 1.1 节中筛选的最适培养基进行生根培养,并在接种后 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 20 和 25 d 从瓶中取出试管苗,在 4 ℃ 条件下用蒸馏水反复冲洗茎基部,并用滤纸吸干,取茎基部 0.2 g,用于测定相关酶活性,重复 3 次,以不加 IAA 的培养基培养的试管苗为对照。POD 活性参照愈创木酚法^[16]测定, PPO 活性参照邻苯二酚法^[17]测定, IAAO 活性参照张志良^[18]的方法测定。

1.4 内源激素 IAA 含量的测定

在对最适培养基培养的牡丹试管苗进行生根期

间细胞学观察的同时,另取茎基部 0.5 g (重复 3 次),用蒸馏水反复冲洗后用滤纸吸干,液氮迅速冷冻后,置于 -80 ℃ 保存,以不添加 IAA 的培养基培养的牡丹试管苗为空白对照。参考 Gou 等^[19]的方法进行内源激素提取,采用超高效液相串联质谱法 (UHPLC-MS) 进行内源 IAA 含量的测定,观察其含量变化与荧光强度的变化是否一致。

1.5 牡丹试管苗生根期间茎基部的细胞学观察及 IAA 的免疫学定位

采用最适生根培养基培育的牡丹试管苗进行生根期间茎基部的细胞学观察,并采用免疫荧光定位观察生根期间 IAA 在牡丹试管苗茎基部的分布位置。对生根培养的试管苗,在接种后 0, 3, 5, 10, 15, 20 和 25 d 取其茎基部,用蒸馏水反复冲洗后用滤纸吸干,先将其放入固定液 (0.01 mol/L 磷酸缓冲液, pH=7.4, 内含 2% EDC·HCl) 内进行固定,抽真空后在室温下放置 1 h,然后取出用磷酸盐冲洗,转入含有 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的磷酸缓冲液中,4 ℃ 再次固定 12 h,最后参考杨捷频^[20]的方法进行石蜡包埋,免疫荧光切片参考张炜等^[21]的方法。

1.6 数据分析

数据统计采用 SPSS 19.0 和 Excel 2016 进行处理,所有数据均采用邓肯氏新复极差法 (SSR 法) 检测其差异显著性,显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度 IAA 对牡丹试管苗生根的影响

不同质量浓度 IAA 对牡丹试管苗生根的影响见表 1。

表 1 不同质量浓度 IAA 对牡丹试管苗生根的影响

Table 1 Effects of IAA at different concentrations on rooting of tree peony *in vitro*

IAA 质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration	生根率/% Rooting rate	平均最大根长/mm Average maximum root length	平均根数 Average number of roots	生根指数 Rooting index
1	12.00 d	13.39 ab	2.00 a	3.21 c
2	28.00 c	14.09 a	2.50 a	9.86 b
3	52.00 a	10.47 b	2.29 a	12.47 a
4	40.00 b	12.53 ab	2.18 a	10.93 b
CK	8.00 d	10.41 b	2.00 a	1.67 d

注:同列数据后标不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

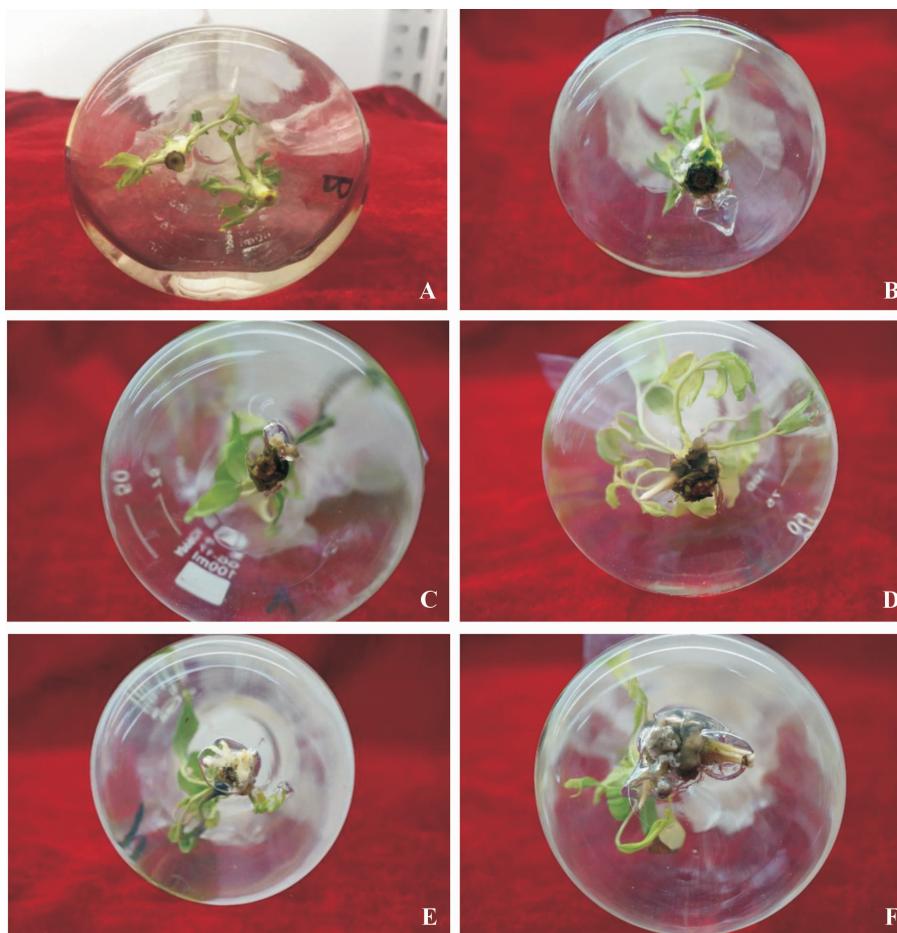
Note: Different letters show significant difference between treatments at $P < 0.05$.

由表 1 可知,随着 IAA 质量浓度的升高,牡丹试管苗的生根率先升高后降低,在 IAA 质量浓度为 3 mg/L 时生根率达到最高 (52.00%),且与其他处理均差异显著;平均最大根长则出现在 IAA 2 mg/L 的处理,达到 14.09 mm,且与对照差异显著;

平均根数在各处理间无显著差异;生根指数在 IAA 3 mg/L 时最高,表明在培养基中添加 3 mg/L IAA 最利于牡丹试管苗生根,故后续试验皆采用加入 3 mg/L IAA 的生根培养基中培育的牡丹试管苗。

图 1 为生根培养 35 d 时,加入不同质量浓度

IAA 培育的牡丹试管苗生根情况。



A. 生根培养 0 d; B-F. 生根培养 35 d, IAA 质量浓度依次为 0, 1, 2, 3, 4 mg/L

A. Rooting culture on day 0; B-F. Rooting culture on day 35 with concentrations of 0, 1, 2, 3 and 4 mg/L

图 1 不同质量浓度 IAA 处理的牡丹试管苗生根情况

Fig. 1 Rooting of tree peony *in vitro* with different IAA concentrations

2.2 牡丹试管苗生根期间相关酶活性的变化

2.2.1 POD 活性 牡丹试管苗生根过程中 POD 活性的变化见图 2。

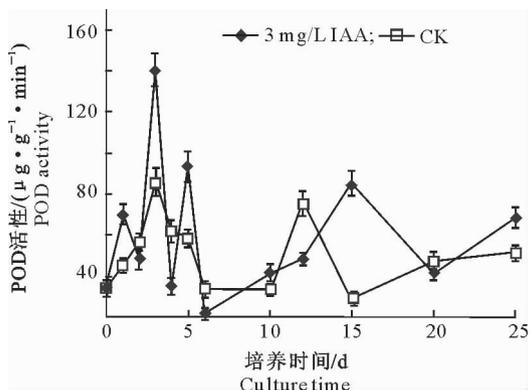


图 2 牡丹试管苗生根过程中 POD 活性的变化

Fig. 2 Changes of POD activities during rooting of tree peony *in vitro*

由图 2 可知,牡丹试管苗在生根期间的 POD 活

性始终处于上下波动趋势,其中 3 mg/L IAA 处理的试管苗在培养 3 d 时 POD 活性达到峰值,为 $140.16 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;培养 6 d 时活性达到最低值,为 $21.67 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;生根期间 POD 活性平均值为 $63.04 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。对照(CK)处理 POD 活性也在培养 3 d 达到峰值,为 $85.45 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$,但显著低于 3 mg/L IAA 处理;培养 15 d 时 POD 活性达到最低值,为 $28.33 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;生根期间 POD 活性平均值为 $52.33 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$,显著低于 3 mg/L IAA 处理。说明添加 IAA 能促进牡丹试管苗根原基诱导期 POD 活性的升高,从而有助于不定根的形成。

2.2.2 PPO 活性 由图 3 可知,3 mg/L IAA 处理的牡丹试管苗 PPO 活性在培养 0~3 d 呈上下波动趋势,培养 3 d 时 PPO 活性达到峰值,为 $47.50 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;培养 25 d 时 PPO 活性达到最低值,为

21.25 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;生根期间 PPO 活性平均值为 32.92 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。对照处理(CK)则在培养 0~2 d PPO 活性变化趋势与 3 mg/L IAA 处理一致,但活性始终较低,培养 3 d 时 PPO 活性达到最低值,为 20.90 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;培养 6 d 时 PPO 活性达到峰值,为 44.17 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$;生根期间 PPO 活性平均值为 28.75 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$,显著低于 3 mg/L IAA 处理。说明添加 IAA 能促进牡丹试管苗根原基诱导期 PPO 活性的升高,从而有助于不定根的形成。

2.2.3 IAAO 活性 由图 4 可知,3 mg/L IAA 处理的牡丹试管苗在培养 6 d IAAO 活性达到最低

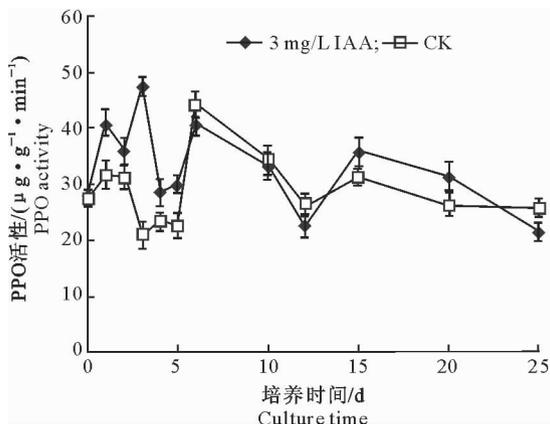
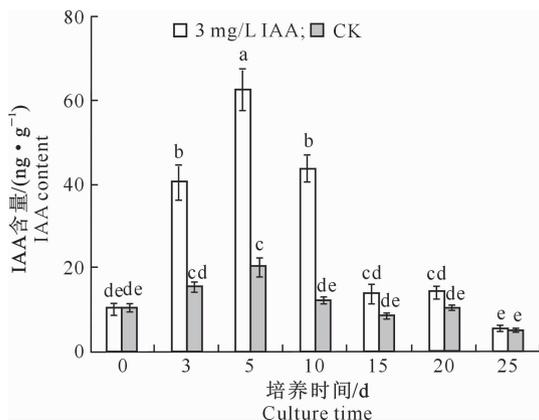


图 3 牡丹试管苗生根过程中 PPO 活性的变化

Fig. 3 Changes of PPO activities during rooting of tree peony *in vitro*

2.3 牡丹试管苗生根期间内源激素 IAA 的变化

牡丹试管苗生根期间茎基部内源 IAA 含量的变化见图 5。



图柱上标不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

Different letters show significant difference between treatments at $P < 0.05$

图 5 牡丹试管苗生根期间茎基部内源 IAA 含量的变化
Fig. 5 Changes of endogenous IAA content at the base of stem during rooting of tree peony *in vitro*

由图 5 可知,生根培养基中加入 3 mg/L IAA

值,为 59.92 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$,其次是培养 4 d,IAAO 活性为 60.69 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$;培养 25 d IAAO 活性达到峰值,为 100.03 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$;生根期间 IAAO 活性平均值为 73.87 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。对照处理(CK)牡丹试管苗在生根培养 2 d 时 IAAO 活性达到最低值,为 57.25 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$,其次是培养 1 d,IAAO 活性为 63.85 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$;培养 20 d 时 IAAO 活性达到峰值,为 96.17 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$;生根期间 IAAO 活性平均值为 74.14 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。说明添加 IAA 后,牡丹试管苗在根原基诱导期 IAAO 活性处于较低水平,有助于不定根的发生。

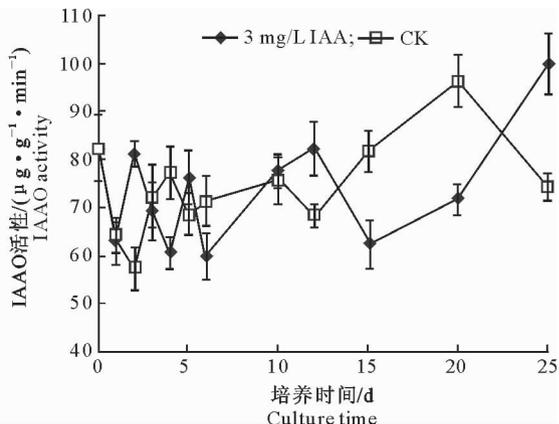


图 4 牡丹试管苗生根过程中 IAAO 活性的变化

Fig. 4 Changes of IAAO activities during rooting of tree peony *in vitro*

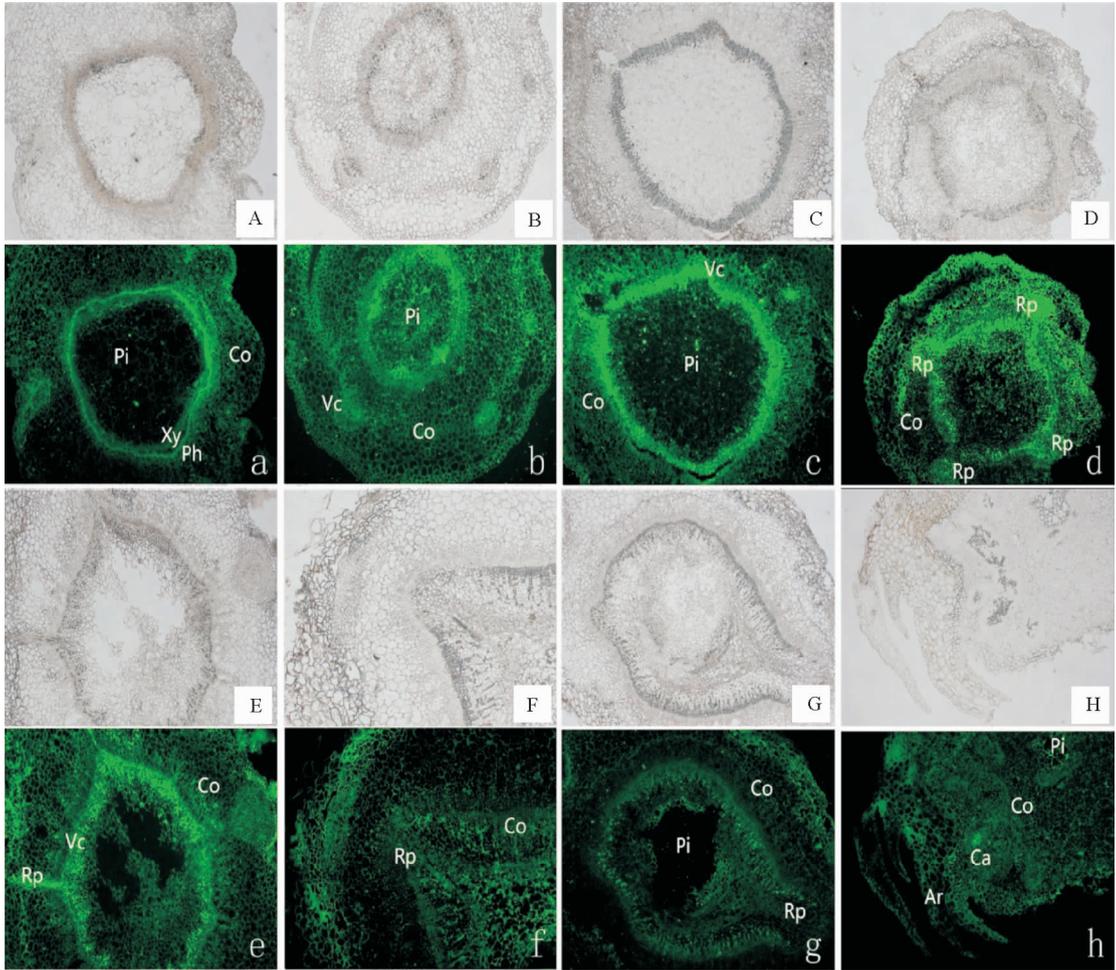
的处理,在生根诱导 0 d 时,牡丹试管苗茎基部 IAA 含量较低,之后其含量持续升高,且在培养 5 d 达到最高,之后呈下降趋势,在培养 25 d IAA 含量最低。对照处理(CK)牡丹试管苗茎基部 IAA 含量的整体变化趋势与 3 mg/L IAA 处理基本一致,但在培养 3,5 和 10 d 时,其内源 IAA 含量显著低于 3 mg/L IAA 处理,说明生根培养基中添加 IAA 后,牡丹试管在根原基形成期内源 IAA 含量明显升高。

2.4 牡丹试管苗生根期间茎基部细胞学观察及 IAA 的免疫荧光定位

由图 6 可知,牡丹茎基部横切面从外到内依次为表皮、皮层和维管束。在牡丹试管苗转入生根培养 0 d 时,茎基部细胞排列疏松整齐,未见潜在根原基的存在(图 6-A);培养 3 d 时在维管束周围和皮层薄壁细胞周围有密集的细胞团形成,开始出现根原基,根原基的发生方式有 2 种:愈伤组织(图 6-B)和维管束(图 6-C);培养 5 d 时根原基明显,且开始向皮层生长(图 6-D);培养 10~15 d 根原基持续伸长(图 6-E,F),20 d 逐渐延伸至表皮(图 6-G),25 d 形成完整的根(图 6-H)。由荧光强度可知,在生根培

养 0 d 时牡丹试管苗茎基部中 IAA 以维管束分布为主(图 6-a);在培养 3 d 时,荧光主要聚集于根原基发生的部位,在表皮也有较弱的荧光,仍以维管束分布为主(图 6-b,c);培养 5 d 时荧光信号整体增强,根原基荧光信号明显,且皮层也开始出现大量荧

光信号(图 6-d);在培养 10~15 d 时荧光逐渐变弱,且在根原基向皮层延伸的根尖周围大量分布,同时表皮的荧光信号增强(图 6-e,f);培养 20 d 时荧光信号继续减弱,皮层中基本无荧光信号(图 6-g);培养 25 d 时不定根上存在较强的荧光信号(图 6-h)。



A-H. 牡丹试管苗生根培养期间的明场照片;A. 0 d;B,C. 3 d;D. 5 d;E. 10 d;F. 15 d;G. 20 d;H. 25 d;
a-h. 为与 A-H 对应的荧光照片;Co. 皮层;Vc. 维管形成层;Ph. 韧皮部;Xy. 木质部;Pi. 髓;Rp. 根原基;Ca. 愈伤组织;Ar. 不定根
A-H were are field maps during rooting period;A. 0 d;B,C. 3 d;D. 5 d;E. 10 d;F. 15 d;G. 20 d;H. 25 d;
a-h are fluorescent images of A-H;Co. Cortex;Vc. Vascular cambium;Ph. Phloem;Xy. Xylem;Pi. Pith;Rp. Root primordium;
Ca. Callus;Ar. Adventitious roots

图 6 牡丹试管苗生根期间茎基部的 IAA 免疫荧光定位(40×)

Fig. 6 IAA immunofluorescence localization of stem base during rooting of tree peony *in vitro* (40×)

3 讨论

植物不定根形成的主要过程是薄壁细胞脱分化形成潜在的发根点后,经过细胞分裂和形成层增大,最后形成根原基^[8]。通过细胞学观察发现,牡丹试管苗生根培养 3~5 d 为根原基诱导的关键时期,茎基部 POD 活性在培养 3 d 时达到峰值,表明 POD 活性升高可促进根原基的诱导,这与大部分研究认为 POD 活性升高可促进生根的结果^[22-23]一致。牡

丹试管苗茎基部 PPO 活性在生根培养 3 d 时达到峰值,且添加 3 mg/L IAA 的处理在生根关键期(3~5 d)PPO 活性始终高于对照,表明高活性的 PPO 可促进根原基的诱导,这可能是添加 IAA 的处理在 PPO 作用下促进了 IAA 与酚类物质的结合,形成了进一步促进生根的辅助因子^[24]。生长素促进生根的主要原因与形成层诱导的第 1 次细胞分裂有关,生长素含量高峰与根原基出现在同一时期^[25]。本研究中,牡丹试管苗培养 3 d 时茎基部的

IAA 含量大幅上升,5 d 时达到峰值,且在培养 3~4 d 时 IAAO 活性处于下降趋势,这有利于茎基部 IAA 的积累,表明 IAA 含量高可促进细胞分化从而形成根原基。生根培养 5 d 后根原基开始逐渐伸长,最终突破表皮,此阶段中茎基部的 IAA 含量显著低于 3~5 d,表明茎基部低含量的 IAA 有利于根的伸长生长,这与于雪飞等^[26]、欧阳芳群等^[27]的研究结果一致。

在探究 IAA 在植物体内的作用机理时,首先必须明确其在植物器官的作用位点和分布特征。免疫荧光定位技术能揭示内源 IAA 的分布位置,目前已有部分学者进行了这方面的研究,如 Dinis 等^[10]通过免疫荧光技术,对葡萄叶片中的 IAA 和 ABA 进行了原位分析;de Almeida 等^[28]对桉树组培苗茎基部进行免疫荧光定位后发现,IAA 在根原基的积累促进了不定根的形成,且易生根的桉树中 IAA 含量是难生根桉树中的 2 倍。王清民^[29]研究发现,核桃子叶在诱导生根前 IAA 主要分布在维管组织和未成熟的导管细胞中,根原基形成期维管组织中 IAA 分布逐渐减少,而根原基中 IAA 荧光信号变强,不定根伸长期根尖生长点的 IAA 最多。本研究中,在牡丹试管苗生根诱导开始前(0 d),IAA 主要分布在维管束周围;在根原基诱导期,茎基部 IAA 的荧光信号逐步变强,且主要分布于维管束的根原基周围,根原基周围的皮层中也有 IAA 的分布;之后在维管束中荧光信号逐渐变弱,但 IAA 在根原基向皮层延伸的根尖周围大量分布,同时表皮的荧光信号增强;当不定根突破表皮后,IAA 信号主要聚集于根尖。上述免疫荧光分析表明,IAA 作用于牡丹试管苗根系发生时,首先在维管束周围大量分布,刺激根原基的形成;根原基形成后逐步向皮层、根尖形成部位以及皮层分布,促进根的伸长,且在诱导期荧光信号最强。研究表明,核桃组培苗在根系诱导中不定根形成前期,内源 IAA 含量在短时间内急速升高,但对 IAA 的作用位点并未说明^[30]。本研究表明,牡丹试管苗在根系发生诱导期,茎基部 IAA 信号强烈,且发现牡丹不定根发生起源于微管形成层和皮层愈伤组织,此时微管束和皮层中有根原基出现时,IAA 也大量聚集于此,这与 de Almeida 等^[28]和王清民^[29]的研究结果一致,表明 IAA 在根原基的积累与不定根发生密切相关。

4 结 论

牡丹试管苗在生根培养 3 d 时根原基开始出

现,培养 5 d 时根原基基本形成,此时添加外源 IAA 的生根培养基培育的牡丹试管苗,其 POD 和 PPO 活性呈升高趋势,IAAO 活性呈下降趋势,这有助于根原基的发生;在根原基发生期间,内源 IAA 主要分布于根原基形成的位置,且含量呈升高趋势,说明 IAA 在根原基的积累与牡丹试管苗不定根的发生密切相关。

[参考文献]

- [1] 包满珠. 花卉学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 409-410.
Bao M Z. Floriculture [M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2011: 409-410.
- [2] 李嘉珏, 张西方, 赵孝庆. 中国牡丹 [M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2011: 21-30.
Li J Y, Zhang X F, Zhao X Q. The Chinese peony [M]. Beijing: China Encyclopedia Press, 2011: 21-30.
- [3] 李玉龙, 吴德玉, 潘淑淑, 等. 名贵花卉组织培养研究 [J]. 河南农业科学, 1982(12): 2.
Li Y L, Wu D Y, Pan S L, et al. Research on tissue culture of rare flowers [J]. Journal of Henan Agricultural Science, 1982(12): 2.
- [4] 符真珠, 杜 君, 何松林, 等. 酚类物质与牡丹试管苗褐变关系的初步分析 [J]. 核农学报, 2016, 30(1): 201-207.
Fu Z Z, Du J, He S L, et al. The influence of phenols on tissue browning of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(1): 201-207.
- [5] 贺 丹, 王 政, 何松林. 牡丹试管苗生根过程解剖结构观察及相关激素与酶变化的研究 [J]. 园艺学报, 2011, 38(4): 770-776.
He D, Wang Z, He S L. Adventitious root generating process and hormone and enzyme changes *in vitro* *Paeonia suffruticosa* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(4): 770-776.
- [6] 张 倩, 王华芳. 牡丹试管苗生根与移栽技术研究进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1819-1828.
Zhang Q, Wang H F. *In vitro* shoot rooting and plantlet transplanting of tree peonies [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(9): 1819-1828.
- [7] 郑均宝, 裴保华, 耿桂荣. 毛白杨插穗生根的研究 [J]. 东北林业大学学报, 1988(6): 34-41.
Zheng J B, Pei B H, Geng G R. Study on rooting of cuttings of poplar [J]. Journal of Northeast Forestry University, 1988(6): 34-41.
- [8] 闫 帅, 张少瑜, 徐 锴, 等. 杜梨组培生根过程中多胺、内源激素及相关氧化酶活性的变化 [J]. 果树学报, 2019, 36(3): 318-326.
Yan S, Zhang S Y, Xu K, et al. Dynamic changes in polyamines, endogenous hormones and oxidase activities during rooting of *in vitro* plantlets of *Pyrus betuli folia* Bunge [J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(3): 318-326.

- [9] Zhang D, Ren L, Yue J H, et al. GA₄ and IAA were involved in the morphogenesis and development of flowers in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(11):966-976.
- [10] Dinis L T, Bernardo S, Luzio A, et al. Kaolin modulates ABA and IAA dynamics and physiology of grapevine under Mediterranean summer stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 220:181-192.
- [11] Da Costa C T, Gaeta M L, de Araujo M J E, et al. Comparative adventitious root development in pre-etiolated and flooded, *Arabidopsis*, hypocotyls exposed to different auxins [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 127:161-168.
- [12] Zhang K, Yao L, Zhang Y, et al. A review of the seed biology of *Paeonia* species (*Paeoniaceae*), with particular reference to dormancy and germination [J]. *Planta*, 2019, 249(2):291-303.
- [13] 郑国生, 盖树鹏, 盖伟玲. 低温解除牡丹芽休眠进程中内源激素的变化 [J]. *林业科学*, 2009, 45(2):48-52.
- Zheng G S, Gai S P, Gai W L. Changes of endogenous hormones during dormancy release by chilling in tree peony [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45(2):48-52.
- [14] 史国安, 郭香凤, 孔祥生, 等. 牡丹呼吸速率和内源激素含量变化与开花衰老的关系 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(2):303-310.
- Shi G A, Guo X F, Kong X S, et al. Respiration rate and endogenous hormone levels in relation to the flower development of tree peonies [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(2):303-310.
- [15] 王 政, 杨大娟, 何松林, 等. 不同处理对牡丹体细胞胚发生早期生理生化的影响 [J]. *河南农业科学*, 2018, 47(3):111-117.
- Wang Z, Yang D J, He S L, et al. Effects of different treatments on physiological biochemical properties of early somatic embryogenesis of *Paeonia suffruticosa* Andr. [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2018, 47(3):111-117.
- [16] 李合生, 孙 群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004:184-227.
- Li H S, Sun Q, Zhao S J. Principle and technology of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2004:184-227.
- [17] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理实验 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1990:37-39.
- Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. Plant physiological experiments [M]. Beijing: Peking University Press, 1990:37-39.
- [18] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990:210-212.
- Zhang Z L. Guidance for plant physiology experiments [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1990:210-212.
- [19] Gou J, Strauss S H, Tsai C J, et al. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(3):623-639.
- [20] 杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良 [J]. *生物学杂志*, 2006, 23(1):45-46.
- Yang J P. Improvement of conventional paraffin section method [J]. *Journal of Biology*, 2006, 23(1):45-46.
- [21] 张 炜, 高 巍, 曹 振, 等. 干旱胁迫下小麦 (*Triticum aestivum* L.) 幼苗中 ABA 和 IAA 的免疫定位及定量分析 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(15):2940-2948.
- Zhang W, Gao W, Cao Z, et al. Immunolocalization and quantitation of ABA and IAA in the organs of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(15):2940-2948.
- [22] 董然然. 抗寒梅花嫩枝扦插技术及其生根机理研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- Dong R R. The studies on softwood cutting technique and rooting mechanism of cold-resistant mei [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016.
- [23] 刘玉民, 刘亚敏, 马 明, 等. 马尾松扦插生根过程相关生理生化分析 [J]. *林业科学*, 2010, 46(9):28-33.
- Liu Y M, Liu Y M, Ma M, et al. Analysis of relevant physiological and biochemical characteristics of *Pinus massoniana* during cuttings rooting [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2010, 46(9):28-33.
- [24] Haissig B E. Influence of auxins and auxin synergists on adventitious root primordia initiation and development [J]. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 1974, 4(2):311-323.
- [25] 刘明国, 王 玲, 董胜君, 等. 北美香杉插穗生根过程中内源激素的变化 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2011, 41(5):555-559.
- Liu M G, Wang L, Dong S J, et al. Endogenous hormone variation in cuttings of *Thuja occidentalis* L. in the period of adventitious root formation [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2011, 41(5):555-559.
- [26] 于雪飞, 白 卉, 王洪星. 4 种内源激素在中美山杨组培生根过程中的变化 [J]. *林业科技*, 2009, 34(2):5-7.
- Yu X F, Bai H, Wang H X. The change of 4 endogenous hormones during the rooting tissue of *Populus davidiana* × *P. tremuloides* [J]. *Forestry Science and Technology*, 2009, 34(2):5-7.
- [27] 欧阳芳群, 付国赞, 王军辉, 等. 欧洲云杉扦插生根进程中内源激素和多酚类物质变化 [J]. *林业科学*, 2015, 51(3):155-162.
- Ouyang F Q, Fu G Z, Wang J H, et al. Qualitative analysis of endogenesis hormone and polyphenol during rooting of cuttings in norway spruce (*Picea abies*) [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(3):155-162.
- [28] de Almeida, Márcia Rodrigues, De Bastiani D, et al. Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in eucalyptus [J]. *Plant Science*, 2015, 239:155-165.
- [29] 王清民. 核桃不定根发生调控的组织和免疫化学研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- Wang Q M. Study on the histology and immunity histochemistry during rhizogenesis of walnut [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2007.
- [30] Gatineau F, Fouché J G, Kevers C, et al. Quantitative variations of indolyl compounds including IAA, IAA-aspartate and serotonin in walnut microcuttings during root induction [J]. *Biologia Plantarum*, 1997, 39(1):131-137.