

## 复幼措施对水曲柳生长与组培再生的影响

熊成明<sup>1</sup> 王巧欣<sup>1</sup> 何利明<sup>1,2</sup> 刘建飞<sup>1</sup>  
彭广州<sup>1</sup> 胡安红<sup>3</sup> 李新宇<sup>4</sup> 詹亚光<sup>1,2\*</sup>

(1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; 2. 林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学), 哈尔滨 150040; 3. 伊春森工南岔林业局有限责任公司, 南岔 153199; 4. 哈尔滨市松北区自然资源所, 哈尔滨 150028)

**摘要** 组织培养是珍贵用材树种水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)无性繁殖的重要方式之一,但年龄效应造成的外植体生理状态老化,显著降低组培效率,严重制约水曲柳优良品种的快速无性扩繁与推广应用,目前在林木中通过复幼克服年龄效应提高组培效率的研究未见报道。该文研究不同复幼措施对4年生水曲柳植株生长与组培再生的影响,结果表明:截干+遮阴处理后,新生枝的高度和径粗分别降低37.50%和42.90%,新生枝和茎段外植体数量分别增加2.6倍和2.8倍,组培再生能力显著提升。茎段外植体启动率、新芽分化率和增殖系数均升高,启动率最高达到82.42%,是未处理CK(25.30%)的3.26倍;分化率由9.90%提升到61.11%;增殖系数由0提升到6.00。进一步通过生理生化指标和相关基因表达变化探究复幼措施克服年龄效应的潜在机制,发现复幼处理后,带腋芽茎中蔗糖和可溶性糖含量分别显著减少23.17%和46.24%,而生长素(IAA)和细胞分裂素(CTK)含量分别显著增多70.01%和57.22%。基于*miR156A/C*基因表达随植物的成熟而下调的趋势,进一步通过*miR156-SPL-AP2/ERFs-ASA1*基因通路的转录分析,揭示采穗母树经过截干+遮阴处理后,复幼及芽再生相关基因*FmMiR156A*、*FmMiR156C*和*FmASA1*表达量较CK分别提高10.01倍、13.53倍和12.58倍,*FmSPL2*和*FmSPL9*表达量较CK分别降低93.05%和88.30%,揭示上述指标可能是促进水曲柳复幼从而提高外植体组培再生效率的关键因素。该研究为解决水曲柳等林木年龄效应问题和提高组培繁殖能力提供切实可行的方法,为水曲柳良种/新品种的规模繁育和推广提供技术支撑。

**关键词** 水曲柳;组织培养;年龄效应;复幼处理;生理生化指标;基因表达

中图分类号: Q945.4 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2026.01.008

## Impact of Rejuvenation Measures on Growth and Tissue Culture Regeneration of *Fraxinus mandshurica*

XIONG Chengming<sup>1</sup> WANG Qiaoxin<sup>1</sup> HE Liming<sup>1,2</sup> LIU Jianfei<sup>1</sup>  
PENG Guangzhou<sup>1</sup> HU Anhong<sup>3</sup> LI Xinyu<sup>4</sup> ZHAN Yaguang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040; 2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding (Northeast Forestry University), Harbin 150040; 3. Yichun Forestry Industry Group Nancha Forestry Bureau Co., Ltd., Nancha 153199; 4. Harbin Songbei District Natural Resources Office, Harbin 150028)

**Abstract** As an essential method for clonal propagation of the valuable timber species *Fraxinus mandshurica*, tissue culture is hindered by physiological aging of explants due to age-related effects, which significantly reduces tissue culture efficiency and severely restricts the rapid clonal propagation and widespread application of superior *F. mandshurica* varieties. Currently, there are no reports on overcoming the age effect through rejuvenation to improve tissue culture efficiency in forest trees. This study investigated the effects of different rejuvenation treatments on growth performance and tissue culture regeneration of 4-year-old *F. mandshurica* plants. The results showed that after trunk cutting + shading treatment, the height and diameter of new shoots

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFD2200303)。

第一作者简介:熊成明(1997—),男,硕士研究生,主要从事林木繁育和遗传改良研究。

\* 通信作者: E-mail: yaguangzhan@126.com。

收稿日期:2025年9月11日。

decreased by 37.50% and 42.90%, respectively, while the number of new shoots and stem segment explants increased by 2.6-fold and 2.8-fold, which significantly enhanced tissue culture regeneration capacity. The initiation rate of stem segment explants, new shoot differentiation rate, and propagation coefficient of the shoots under treatment all increased compared to the untreated control (CK). The highest initiation rate reached 82.42%, which was 3.26 times as high as that of the CK (25.30%). The differentiation rate increased from 9.90% to 61.11%. The propagation coefficient increased from 0 to 6.00. Further investigation into the mechanism by which rejuvenation measures overcome the age effect was conducted through the analysis of physiological and biochemical indicators and related gene expression changes. It was found that after rejuvenation treatment, sucrose and soluble sugar content significantly decreased by 23.17% and 46.24%, while the content of auxin (IAA) and cytokinin (CTK) significantly increased by 70.01% and 57.22%, respectively. Based on the trend of *miR156A/C* gene expression downregulating with plant maturation, transcriptional analysis of the *miR156-SPL-AP2/ERFs-ASAI* gene pathway further revealed that after trunk cutting + shading treatment, the expression levels of rejuvenation and bud regeneration-related genes *FmmiR156A*, *FmmiR156C*, and *FmASAI* increased by 10.01, 13.53, and 12.58 times compared to CK, while the expression levels of *FmSPL2* and *FmSPL9* decreased by 93.05% and 88.30% compared to CK. These findings indicated that the above indicators may be key factors promoting rejuvenation in *F. mandshurica*, thereby improving the tissue culture regeneration efficiency of explants. This study provided practical methods for addressing the age effect and improving tissue culture propagation capacity in *F. mandshurica* and other forest trees species, offering technical support for the large-scale propagation and promotion of superior varieties and new cultivars of *F. mandshurica*.

**Key words** *Fraxinus mandshurica*; tissue culture; age effect; rejuvenation treatment; physiological and biochemical indicators; gene expression

林木无性繁殖主要有扦插、嫁接和组织培养这3大类<sup>[1-2]</sup>,也是良种推广应用的重要途径,尤其是组培微繁技术,不受季节限制,可规模化生产<sup>[3]</sup>。高大乔木如水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.)通常树体高大,生命周期长,在遗传因素与环境因素的长期共同作用下,会产生年龄效应<sup>[4]</sup>。年龄效应指随着树木年龄增长,其生理状态和遗传特性发生改变,导致林木无性繁殖能力、生长活力下降,如生根困难、萌芽率降低等<sup>[5]</sup>,在水曲柳、杂交松(*Pinus taeda* × *P. caribaea*)、珍珠黄杨(*Buxus sinica* var. *parvifolia*)等树种<sup>[6-8]</sup>均有相关报道,但目前报道主要集中在对扦插繁殖的影响方面。

水曲柳为木犀科(Oleaceae)梣属(*Fraxinus*)阔叶乔木,广泛分布于我国东北的大兴安岭东部、小兴安岭、长白山等地<sup>[9]</sup>。水曲柳的木材纹理美观、材质优良,是重要的珍贵用材树种和东北地区主要的造林树种<sup>[10]</sup>。课题组前期的研究发现,4年生水曲柳植株出现明显年龄效应,降低组培微繁效率,4年生较1年生的茎段外植体腋外植体启动率显著下降,启动率、新芽分化率分别仅为25.30%和9.90%,且后期死亡,增殖系数为0,难以获得组培丛生苗(附表1、2和附图1、2,见本刊网站补充材料)。因此,克服年龄效应是目前水曲柳良种组

培快繁与推广应用的关键。

复幼是使成熟树木重现某些幼态性状的过程<sup>[11]</sup>。树木复幼措施有截干、遮阴、埋干及循环扦插等<sup>[6,12-15]</sup>。截干可打破顶端优势,促进侧芽萌发,产生更多新生枝,增加生长潜力;遮阴对复幼具有重要的调控作用,通过不同光照强度对光合作用的影响,调控糖代谢来实现幼化,延迟树木成熟和枝条老化;循环扦插复幼能显著增强细胞分裂活力,提高生长素(IAA)、细胞分裂素的含量及再生相关酶活性<sup>[6,15]</sup>。因此,复幼对提高林木无性繁殖效率具有十分显著的作用<sup>[16-18]</sup>。

在植物的生长发育和成熟过程中,*miR156A*和*miR156C*基因扮演着重要的调控角色,与植物的生长发育和年龄密切相关<sup>[19]</sup>。通常在幼龄植物中,它们的表达水平相对较高。*miR156A/C*基因可靶向负调控*SPL2/10/11/9/15*基因表达,其中*SPL2/10/11*的积累抑制*AP2/ERFs*基因表达,导致不能充分诱导*ASAI*基因转录<sup>[20]</sup>,减少IAA合成,而*SPL9/15*的积累负调控*ARR2/12*基因表达<sup>[21]</sup>,减少细胞分裂素合成。因此,*miR156-SPL-AP2/ERFs-ASAI*通路的基因表达水平可作为评价植物幼化<sup>[22]</sup>状态和组培再生能力的依据。

本研究针对水曲柳的年龄效应影响其组培微

繁效率问题,采用不同复幼措施对4年生水曲柳进行处理,调查对其生长、幼化和腋芽增殖途径组培再生的影响,筛选并优化复幼措施;进一步从生理生化指标、关键基因表达变化等层面,解析最优复幼措施克服植株年龄效应、改善外植体幼化状态的潜在机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

东北林业大学帽儿山实验林场苗圃4年生(4 a)水曲柳植株。

### 1.2 复幼处理及植株生长性状调查

#### 1.2.1 复幼处理

截干:2024年5月中旬,选取30株4 a水曲柳植株,留取地上部分10 cm,用枝剪截去上部多余部分,随后在切口处涂刷油漆,防止树干失水。

截干+遮阴:5月中旬,选取30株4 a水曲柳植株,进行截干+遮阴处理,即在截干处理的同时参考刘建飞<sup>[23]</sup>的方法,用遮阴网对其进行遮阴处理(光照强度约为 $270 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,郁闭度60%~70%)。

埋干:5月中旬,选取30株4 a水曲柳植株,进行埋干处理,即将水曲柳实生苗枝干留50 cm,大约3~5对芽点,横埋于厚度50 cm、长×宽为2 m×1.5 m的沙池, $m$ (杀菌剂): $m$ (硝基苯)=2:1消毒,晾晒1 d后使用,后续定期浇水保持沙池湿润。

循环扦插复幼<sup>[15]</sup>:选取30株4 a水曲柳植株,进行嫩枝扦插,从次年成活的扦插苗上取穗进行扦插,然后再从扦插成活苗上取穗扦插,连续3轮,每轮扦插称为一次循环。

#### 1.2.2 生长性状调查

在6月中旬,调查未处理和经截干、埋干、截干+遮阴、循环扦插复幼处理的水曲柳新生枝数量、新生枝高度、新生枝径粗、茎节数量和可用于组培的茎段外植体数量。

### 1.3 水曲柳组培繁殖方法

次年6月初,取截干、埋干、截干+遮阴、循环扦插复幼(1、2、3轮)后的水曲柳萌枝带腋芽茎段为外植体进行组培繁殖,以未复幼处理的4 a水曲柳植株当年新生枝带腋芽茎段为对照。茎段外植体经表面消毒,接种于启动培养基(WPM+4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂+20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖),各处理接种30个外植体,重复3次,调查启动

时间,30 d后统计腋芽的启动率(已萌发的腋芽数量/总腋芽数量×100%)和生长情况;将启动后的腋芽转入芽分化培养基(WPM+0.8 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂+20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖),各处理接种20个外植体,重复3次,15 d后统计芽分化率(产生的腋芽总数/接种的腋芽总数×100%)、新芽数量和增殖系数(培养后的芽总数量/接种的初始芽数量×100%);继续将新生芽转入增殖培养基(WPM+6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂+20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖),每个复幼处理接种10个外植体,重复3次,1个继代之后调查增殖系数及生长情况;将3~5 cm长的健壮不定枝接入生根培养基(WPM+1.4 mg·L<sup>-1</sup> IBA+0.7 mg·L<sup>-1</sup> NAA+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>)进行生根培养,30 d后统计生根率,再移栽至V(草炭土):V(蛭石)=3:1的育苗钵中,30 d后统计成活率。

### 1.4 生理生化指标和基因表达的测定

以来自至少9株植株新生枝的第3~4对带腋芽的茎段为材料,用液氮研磨后使用试剂盒测定相关指标。内源激素吲哚乙酸(IAA, ng·g<sup>-1</sup>)、细胞分裂素(CTK, ng·g<sup>-1</sup>)、赤霉素(GA, ng·g<sup>-1</sup>)和脱落酸(ABA, ng·g<sup>-1</sup>)质量分数测定使用的酶联免疫分析(ELISA)试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司;总抗氧化能力(T-AOC, U·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)、过氧化物酶活性(POD, U·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)、过氧化氢酶活性(CAT, U·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)、营养物质(可溶性蛋白、可溶性糖、蔗糖, mg·g<sup>-1</sup>)质量分数测定使用的试剂盒均购于苏州格锐思生物科技有限公司。使用AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量PCR试剂盒在ABI-7500Real-Time PCR system上测定相关基因表达量,具体反应体系及程序参考该试剂说明书。有关基因的相对表达量数据经7500 Software 2.0.6软件导出,按照基因相对定量法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )对基因的相对表达量进行计算<sup>[24]</sup>,水曲柳内参基因见参考文献[25],引物序列见附表3。

### 1.5 数据处理

利用SPSS 27.0软件单因素检验中的邓肯模型比较不同处理间的差异显著性( $P<0.05$ ),使用GraphPad Prism 8软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 复幼措施对水曲柳生长的影响

4 a水曲柳植株经截干、截干+遮阴、埋干处理后,新生枝数量相较CK(1个)分别显著增加

140.00%、280.00%、60.00%，而循环扦插复幼3次后水曲柳当年新生枝数量与CK无明显变化，复幼措施对新生枝数量的影响表现为截干+遮阴>截干>埋干>循环复幼(1~3次)；截干、截干+遮阴、埋干、循环扦插复幼(1~3次)处理下，新生枝高度相较CK(28.00 cm)分别显著降低17.14%、37.50%、16.68%、43.45%、46.43%、44.29%，埋干和截干的新生枝高于其他处理(图1)，新生枝径粗相较CK(6.90 mm)分别显著降低30.87%、42.90%、36.09%、33.72%、43.86%、50.82%；截干、截干+遮阴处理的茎节数量相较CK(4.67个)分别减少26.28%、26.29%，埋干和循环复幼处理的茎节数量相较CK无明显变化。截干、截干+遮阴后水曲柳带腋芽茎段外植体数量均比CK明显增多，其中，截干+遮阴处理的外植体数量约是CK的3.60倍。

## 2.2 复幼措施对水曲柳组培再生的影响

4 a 水曲柳植株经截干、截干+遮阴处理、埋干、循环复幼1~3次处理后，茎段外植体启动率分别为74.03%、82.42%、85.74%、56.30%、70.37%、82.59%(图2~4、表1)，分别是CK的2.93、3.26、3.39、2.23、2.78、3.26倍；启动时间相较CK(20 d)均提前13 d左右；芽分化率分别为44.44%、61.11%、

25.56%、34.44%、55.56%、63.33%，是CK(9.90%)的4.49、6.17、2.58、3.48、5.61、6.40倍，增殖系数分别为CK的4.23、6.00、3.77、4.43、5.87、6.63倍。分化率和增殖系数大小排序均为循环复幼3次>截干+遮阴>循环复幼2次>截干>循环复幼1次>埋干，其中，循环复幼3次的增殖系数最高，为6.63。

## 2.3 最优复幼措施的选择

采用等权重的隶属函数法，利用外植体启动率、芽分化率、分化芽数量、增殖系数4个指标的隶属函数值对不同复幼处理带腋芽茎段的组培再生能力进行综合性评价。由表1可知，CK的组培再生能力最差，并且在芽启动后发现长势较弱，逐渐老化。6种复幼处理下外植体启动率、芽分化率、分化芽数量、增殖系数均显著高于CK(未复幼)，表明复幼措施显著增强水曲柳的组培繁殖再生能力。经综合分析，截干+遮阴为最优复幼措施，同时考虑循环复幼能显著提升水曲柳的再生能力，将截干+遮阴处理后的组培再生植株进行循环组培繁殖，能够有效提高组培繁殖的效率和规模。

## 2.4 截干结合遮阴处理对水曲柳生理生化指标和复幼关键基因表达的影响

为进一步探究复幼措施克服年龄效应、提高

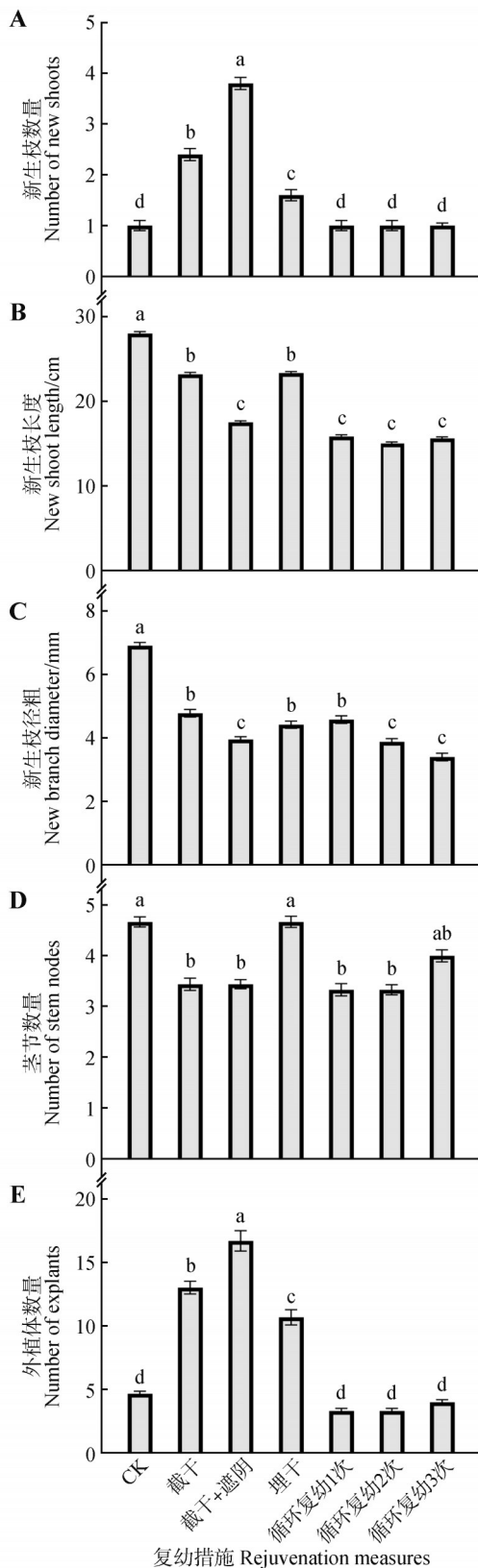
表1 不同复幼处理后水曲柳组培再生能力指标隶属函数分析

Table 1 The membership function analysis of the regeneration capacity indicators of *Fraxinus mandshurica* tissue culture under different rejuvenation treatments

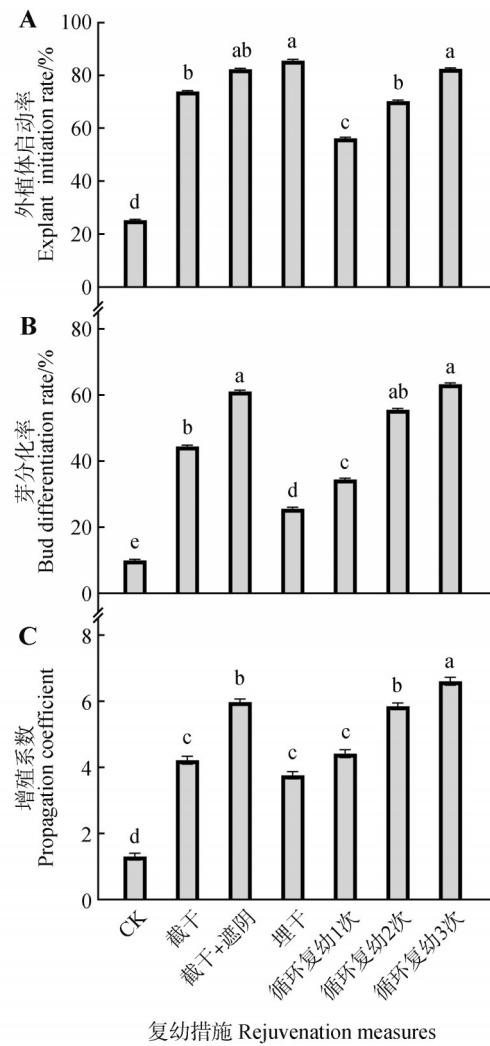
不同复幼处理 Different rejuvenation treatments	外植体启动率 Explant initiation rate/%	芽分化率 Differentiation rate/%	分化芽数量 Number of differentiated buds	增殖系数 Propagation coefficient	隶属函数值 <i>D</i>	排名 Ranking
截干+遮阴 Trunk cutting+shading	82.42	61.11	5.67	6.00	0.99	1
循环3次 Three cycles of rejuvenation	82.59	63.33	6.33	6.63	0.76	2
截干 Trunk cutting	74.03	44.44	4.33	4.23	0.76	3
埋干 Stem layering for shoot regeneration	85.74	25.56	1.33	3.77	0.63	4
循环2次 Two cycles of rejuvenation	70.37	55.56	4.67	5.87	0.61	5
循环1次 One cycle of rejuvenation	56.30	34.44	2.67	4.43	0.41	6
未处理 CK	25.30	9.90	1.33	0	0.09	7

注：基于水曲柳组培繁殖中各指标的重要性的研究，进行综合评价，参考[18]。

Note: A comprehensive evaluation was conducted based on the importance of various indicators in the tissue culture propagation of *Fraxinus mandshurica*, with reference to [18].



不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。 Different lowercase letters indicated significant differences between treatments ( $P < 0.05$ )。 图1 不同复幼措施对水曲柳生长参数的影响 Fig.1 Effects of different rejuvenation measures on the growth parameters of *Fraxinus mandshurica*



不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。 Different lowercase letters indicated significant differences between treatments ( $P < 0.05$ )。 图2 不同复幼处理对水曲柳芽组培再生的影响 Fig.2 Effects of different rejuvenation treatments on tissue culture regeneration of *Fraxinus mandshurica*

组培再生能力的作用机制,分析了关键生理生化指标(内源激素、营养物质含量及抗氧化酶活性)和基因表达等变化特征(图5)。

截干+遮阴处理下,带腋芽的茎段 IAA 质量分数较 CK ( $145.45 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 显著提高 70.01%, CTK 质量分数与 CK ( $210.78 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比显著提高 57.22%, GA 质量分数与 CK ( $158.10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比显著提高 44.14%, ABA 质量分数与 CK ( $646.42 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比显著降低 37.08%。

截干+遮阴处理下,带腋芽的茎段 T-AOC 为  $18.37 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 比 CK ( $27.87 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 降低 34.09%, CAT 活性为  $512.28 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 比 CK

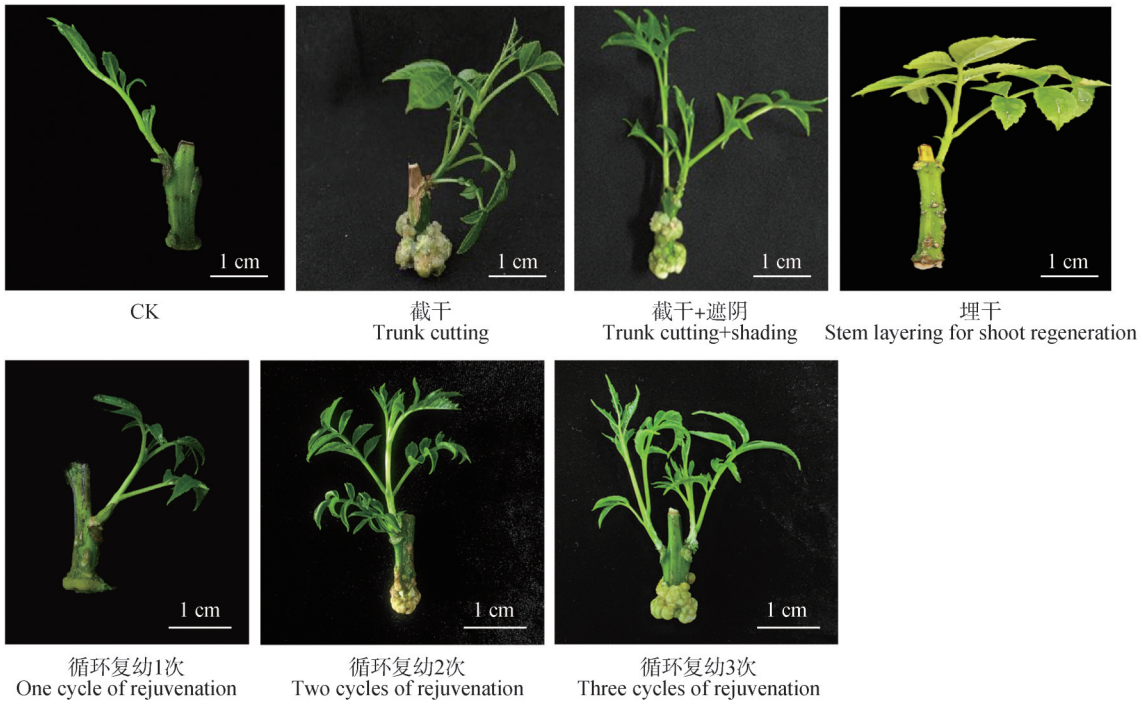


图3 不同复幼措施下水曲柳腋芽启动状态

Fig.3 Bud activation state of *Fraxinus mandshurica* under different rejuvenation treatments

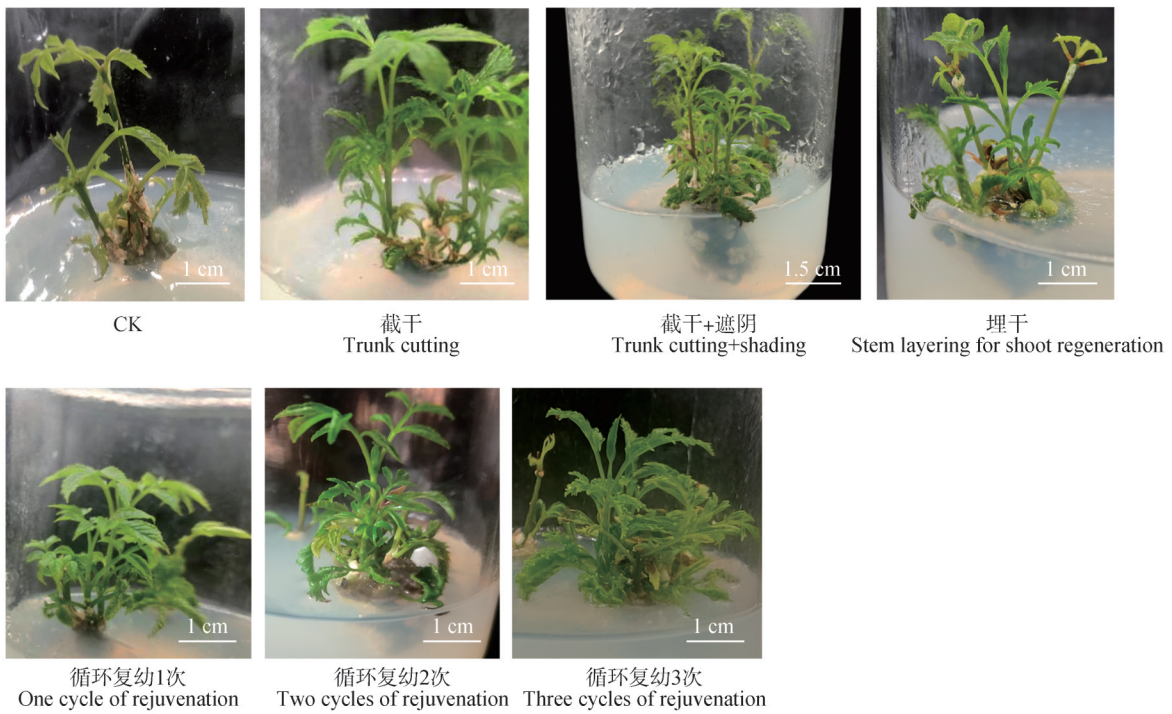


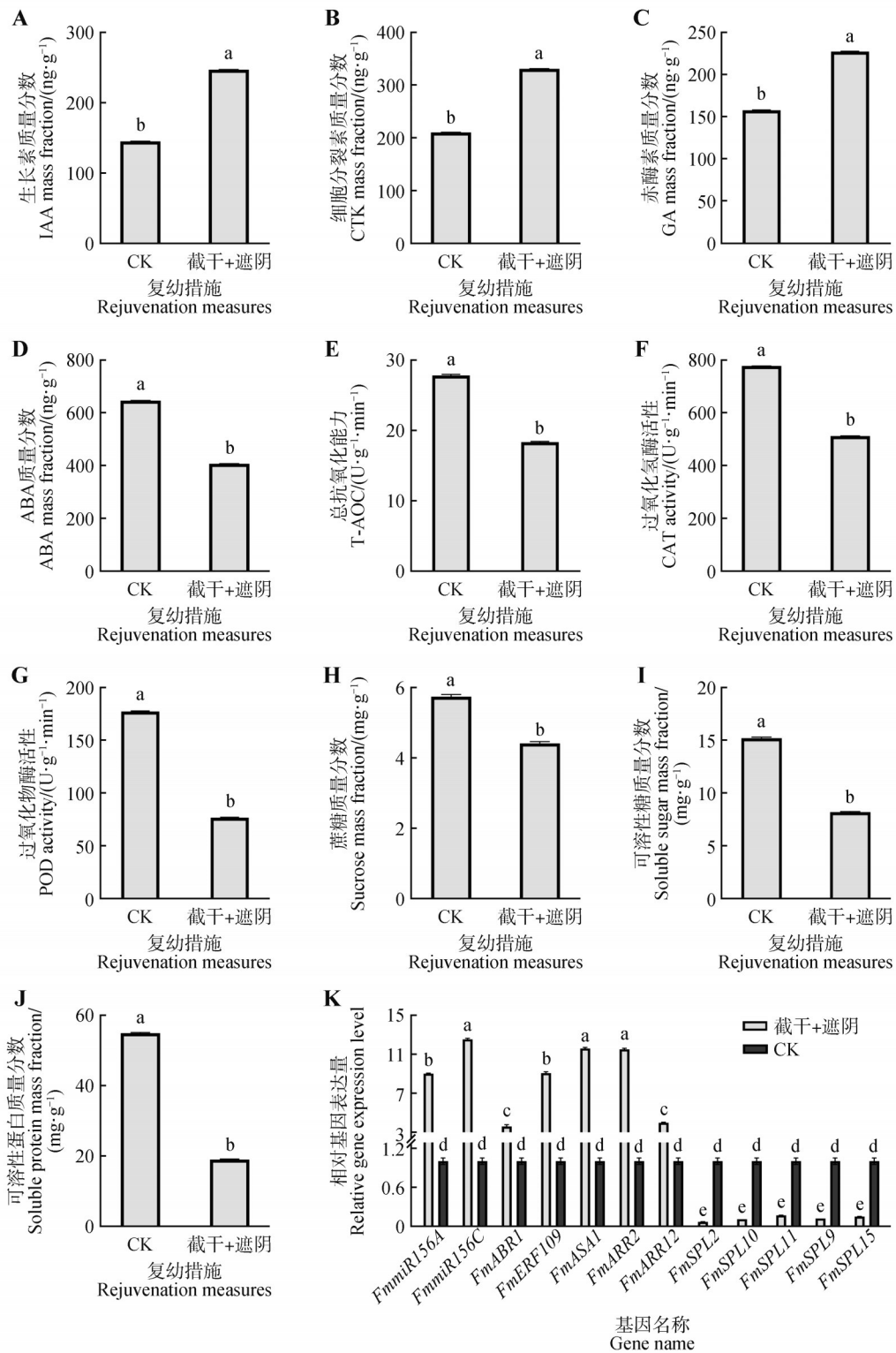
图4 不同复幼措施下水曲柳外植体芽分化状态

Fig.4 Status of bud differentiation of *Fraxinus mandshurica* under different rejuvenation treatments

( $778.77 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )降低 34.22%; POD 活性为  $76.89 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , 比 CK ( $177.50 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )降低 56.68%。

截干+遮阴处理后,带腋芽的茎段蔗糖含量显

著下降,低于CK( $5.74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )的 23.17%;可溶性糖含量显著下降,显著低于CK( $15.19 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )的 46.24%;可溶性蛋白含量显著下降,显著低于CK( $54.88 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )的 65.58%。



不同小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicated significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

图5 截干结合遮阴处理对内源激素、营养物质质量分数、抗氧化酶活性、基因表达的影响

Fig.5 Effects of trunk cutting combined with shading treatment on the mass fraction of endogenous hormones and nutrients, activity of antioxidant enzymes, and level of gene expression

基于 *miR156A/C* 基因随植物的成熟而下调的趋势, 针对 *miR156-SPL-AP2/ERFs-ASA1* 通路进行基因转录水平分析, 结果表明: 截干+遮阴处理后, 植株叶片的 *FmMiR156A*、*FmMiR156C*、*FmABR1*、*FmERF109*、*FmASA1*、*FmARR2*、*FmARR12* 相对表达量上升, *FmSPL2*、*FmSPL10*、*FmSPL11*、*FmSPL9*、*FmSPL15* 表达量逐渐下降。 *FmMiR156A*、*FmMiR156C*、*FmABR1*、*FmERF109*、*FmASA1*、*FmARR2*、*FmARR12* 基因相对表达量较 CK 分别提高 9.01、12.53、3.60、9.06、11.58、11.50、3.99 倍, *FmSPL2*、*FmSPL10*、*FmSPL11*、*FmSPL9*、*FmSPL15* 基因相对表达量较 CK 分别降低 93.05%、89.03%、82.30%、88.30%、85.11%。

### 3 讨论

水曲柳作为我国北方珍贵的大径级用材树种, 植株年龄效应是限制其组培无性扩繁和推广的关键问题。本研究采用截干、截干+遮阴、埋干及循环复幼等措施, 系统比较了不同处理对水曲柳生长和组培再生的影响, 确定截干+遮阴为最优复幼措施。在生长方面, 截干+遮阴使水曲柳新生枝数量增加, 高度、径粗显著降低, 茎节数量显著减少, 植株形态转变表明其生长趋向幼化, 为提高组培再生能力奠定基础。在组培方面, 截干+遮阴使外植体启动率、芽分化率、分化芽数量及增殖系数均上升。上述结果表明: 截干+遮阴处理能有效克服水曲柳年龄效应, 可从母株复幼的角度获得高质量的组培外植体, 也显著提升 4 a 水曲柳的茎段外植体数量。

截干+遮阴处理后, 水曲柳带腋芽的茎段营养物质(蔗糖、可溶性糖、可溶性蛋白)、内源激素 ABA 含量、抗氧化酶(T-AOC、CAT、POD)活性均下降。内源激素参与调控植物生长发育和形态建成, 可作为评价植株幼化程度的重要指标。幼龄期植株较高的 IAA、CTK 水平对维持细胞分裂、分化活性不可或缺; 截干+遮阴处理显著提高水曲柳的茎段 IAA、CTK、GA 含量, 降低 ABA 含量, 这与湿加松(*Pinus elliottii* × *P. caribaea*)<sup>[26]</sup>的结果一致。水曲柳经截干+遮阴处理后, 其茎段抗氧化酶(CAT 和 POD)活性降低, 可溶性糖含量也下降, 与彭广州等<sup>[15]</sup>循环扦插复幼的结果相似。此外, 王佳佳等<sup>[13]</sup>对芒萁(*Dicranopteris dichotoma*)盆栽苗遮光处理后, 发现其体内的 CAT 和 POD 活性降低,

本研究结果与之相符。

进一步分析水曲柳 *miR156-SPL* 等复幼关键基因表达, 结果显示, 截干+遮阴处理后, *Fm-miR156A/C*、*FmABR1*、*FmERF109*、*FmASA1*、*Fm-ARR2*、*FmARR12* 基因相对表达量上升, *FmSPL2/10/11/9/15* 基因相对表达量下降, 说明复幼措施可能通过调控该通路基因差异表达, 促进生长素、细胞分裂素合成信号转导, 推动复幼。光照是影响植物生命活动的主要环境因素<sup>[27]</sup>, 遮阴降低光合作用, 抑制糖等光合产物的积累, 调控成熟相关基因表达, 达到复幼效果。Yu 等<sup>[28]</sup>发现, 当拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)在无糖条件下的光合作用受到抑制时, 幼年期延长, 且 *miR156* 基因表达量升高。Yang 等<sup>[17]</sup>对拟南芥施加外源葡萄糖或蔗糖处理后, 降低了 *miR156* 基因表达水平, 加速拟南芥从幼年期向成年期转变。刘建飞<sup>[23]</sup>对 4 a 及以上水曲柳苗木进行遮阴处理, 发现其茎段内蔗糖含量降低, *miR156* 基因表达水平显著升高, 且通过提高插穗幼化程度, 使扦插繁殖效率显著提升。水曲柳虽为阳生树种<sup>[29]</sup>, 但其实生苗在幼年期表现出一定的耐阴能力<sup>[30]</sup>, 在弱光下生长较好。因此, 本研究建立的截干+遮阴技术可作为水曲柳复幼的有效措施。该遮阴强度的选择对同是耐阴的珍贵树种, 如南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)<sup>[31]</sup>、百山祖冷杉(*Abies beshanzuensis*)<sup>[32]</sup>等具有一定的借鉴意义, 而其他树种, 需选择合适的遮阴复幼强度, 以获得更好的复幼和组培效果。

基于叶腋增殖途径的组培快繁是扩繁后优良性状稳定的保证, 因其未经历愈伤组织脱分化过程, 其繁殖效率的提高依赖于芽外植体来源母树的复幼状态。与同等组培条件下未复幼材料的培养效果相比, 本研究建立的复幼调控技术可以有效提高水曲柳外植体启动率和新芽分化率, 为提高其他珍贵硬木阔叶树种组培繁殖效率提供了新途径。

### 参 考 文 献

- [1] 张鹏. 不同发育阶段水曲柳种子的休眠与萌发生理[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.  
ZHANG P. The dormancy and germination physiology of Manchurian ash seeds in different development stage[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008.
- [2] 刘婷, 李明月, 朱美如, 等. 不同水曲柳无性系种子休眠差异[J]. 植物研究, 2024, 44(5): 711-720.

- LIU T, LI M Y, ZHU M R, *et al.* Differences in seed dormancy among different clones of *Fraxinus mandshurica* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2024, 44(5): 711-720.
- [3] 丁一巍. 水曲柳组培苗生根技术研究及根发育基因 *PLT* 表达分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- DING Y W. Study on shoot rooting technology in vitro and *PLT* gene expression analysis during root development of *Fraxinus mandshurica* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.
- [4] 郭长花. 白杨年龄与位置效应的生理生化机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- GUO C H. Study on physiological and biochemical mechanism of age effect and position effect in white poplar [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2008.
- [5] 苏畅. 基于白桦全基因组重亚硫酸盐测序(bisulfite-sequencing)的甲基化图谱分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- SU C. Shotgun bisulfite sequencing of the *Betula platyphylla* genome reveals the tree's DNA methylation patterning [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2015.
- [6] LIU J F, FU K Z, LI B Y, *et al.* A novel approach for enhancing sprouting to increase yield and its mechanism in *Fraxinus mandshurica* Rupr [J]. Scientia Horticulturae, 2025, 339: 113897.
- [7] 栾启福, 姜景民, 沈凤强, 等. 影响杂交松扦插成活率因素的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(16): 32-35.
- LUAN Q F, JIANG J M, SHEN F Q. Study on several factors of influencing survival rate of stem cutting of pine hybrids [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(16): 32-35.
- [8] 黄焱, 季孔庶, 汤庚国. 珍珠黄杨不同扦插继代的荧光特性[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(10): 9-11.
- HUANG Y, JI K S, TANG G G. Chlorophyll fluorescence parameters in different successive continuous cutting generations of *Buxus sinica* var. *parvifolia* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2008, 36(10): 9-11.
- [9] HE L M, YAN J L, LU H, *et al.* Phenotypic differences of leaves and transcriptome analysis of *Fraxinus mandshurica* × *Fraxinus sogdiana* F1 variety [J]. Forests, 2023, 14(8): 1554.
- [10] 李传胄. 水曲柳物候性状高通量评价及萌动差异耐寒杂种优势形成机制研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2024.
- LI C Z. High-throughput evaluation of climatic traits and the formation mechanism of sprouting differential cold-tolerant hybrids in *Fraxinus mandshurica* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2024.
- [11] ZHANG Z J, SUN Y H, LI Y. Plant rejuvenation: from phenotypes to mechanisms [J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(10): 1249-1262.
- [12] 张瑞娥. 毛白杨不同优良无性系组培特性的比较研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- ZHANG R E. A comparatively study on the tissue culture characteristics of *Populus tomentosa* Carr. clones [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2003.
- [13] 王佳佳, 张明如, 高磊, 等. 遮荫和氮素添加对芒萁光合特性与抗氧化酶活性的影响[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2019, 39(6): 24-32.
- WANG J J, ZHANG M R, GAO L, *et al.* Effects of light intensity gradient and nitrogen addition on photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of *Dicranopteris dichotoma* [J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2019, 39(6): 24-32.
- [14] 叶洲辰, 杨顺, 于添化, 等. 复幼处理对小黑杨叶片营养成分及光合特性的影响[J]. 森林工程, 2025, 41(6): 1145-1155.
- YE Z C, YANG S, YU T H, *et al.* Effects of rejuvenation treatment on nutritional composition and photosynthetic characteristics of *Populus simonii* × *P. nigra* leaves [J]. Forest Engineering, 2025, 41(6): 1145-1155.
- [15] 彭广州, 刘建飞, 王巧欣, 等. 循环复幼对水曲柳生长繁殖及生理的影响[J]. 植物研究, 2024, 44(5): 721-729.
- PENG G Z, LIU J F, WANG Q X, *et al.* Effects of cycle rejuvenation on growth, reproduction and physiology of *Fraxinus mandshurica* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2024, 44(5): 721-729.
- [16] 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.
- [17] YANG L, XU M L, KOO Y, *et al.* Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C* [J]. eLife, 2013, 2: e00260.
- [18] 薛文辉, 詹亚光, 何利明, 等. 水曲柳复幼: 微繁技术研究[J]. 林业科技, 2016, 41(2): 4-8.
- XUE W H, ZHAN Y G, HE L M, *et al.* Rejuvenation and micropropagation study in *Fraxinus mandshurica* [J]. Forestry Science & Technology, 2016, 41(2): 4-8.
- [19] BHATIA S, SINGH R. Interconversion of free sugars in relation to activities of enzymes catalyzing synthesis and cleavage of sucrose in growing stem tissues of sorghum [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2001, 39(10): 1035-1040.
- [20] YE B B, SHANG G D, PAN Y, *et al.* AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root re-

- generation[J].The Plant Cell,2020,32(1):226-241.
- [21] ZHANG T Q, LIAN H, TANG H B, *et al.* An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants[J].The Plant Cell, 2015, 27(2):349-360.
- [22] 刘杰,孙宇涵,袁存权,等.林木根萌复幼方式的研究进展[J].分子植物育种,2022,20(14):4867-4872.
- LIU J, SUN Y H, YUAN C Q, *et al.* A review for rejuvenation of root-sprout in trees[J].Molecular Plant Breeding, 2022, 20(14):4867-4872.
- [23] 刘建飞.水曲柳扦插繁殖配套技术及糖代谢调控年龄效应促进生根研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2025.
- LIU J F. Study on a comprehensive technology of cutting propagation and promoting root formation by the age effect regulation on sugar metabolism in *Fraxinus mandshurica*[D].Harbin:Northeast Forestry University, 2025.
- [24] LIVNE S, WEISS D. Cytosolic activity of the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1A[J]. Plant & Cell Physiology, 2014, 55(10):1727-1733.
- [25] 彭广州.循环复幼促进水曲柳扦插生根繁殖研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2024.
- PENG G Z. Study on promoting rooting propagation of *Fraxinus mandshurica* cutting by cyclic rejuvenation[D]. Harbin:Northeast Forestry University, 2024.
- [26] 杨舜垚.湿加松平茬复幼机理研究[D].北京:北京林业大学,2022.
- YANG S Y. The mechanism of *Pinus elliottii* × *P. caribaea* rejuvenation after stem pruning[D].Beijing:Beijing Forestry University, 2022.
- [27] 刘从,田甜,李珊,等.中国木本植物幼苗生长对光照强度的响应[J].生态学报,2018,38(2):518-527.
- LIU C, TIAN T, LI S, *et al.* Growth response of Chinese woody plant seedlings to different light intensities [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(2):518-527.
- [28] YU S, CAO L, ZHOU C M, *et al.* Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants [J]. eLife, 2013, 2:e00269.
- [29] 郑万钧.中国树木志:第4卷[M].北京:中国林业出版社,2004:4389-4404.
- ZHENG W J. Silva Sinica: Vol.4[M].Beijing:China Forestry Publishing House, 2004:4389-4404.
- [30] 薛思雷,王庆成,孙欣欣,等.遮荫对水曲柳和蒙古栎光合、生长和生物量分配的影响[J].植物研究,2012, 32(3):354-359.
- XUE S L, WANG Q C, SUN X X, *et al.* Effects of shading on the photosynthetic characteristics, growth, and biomass allocation in *Fraxinus mandshurica* and *Quercus mongolica* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2012, 32(3):354-359.
- [31] 孙佳音,杨逢建,庞海河,等.遮荫对南方红豆杉光合特性及生活史型影响[J].植物研究,2007, 27(4): 439-444.
- SUN J Y, YANG F J, PANG H H, *et al.* Effects of shading treatment on photosynthetic response and life cycle form of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J].Bulletin of Botanical Research, 2007, 27(4):439-444.
- [32] 陈德良,陶月良,吴友贵,等.遮荫对百山祖冷杉光合特性和叶绿素荧光参数的影响[J].核农学报,2016, 30(10):2056-2064.
- CHEN D L, TAO Y L, WU Y G, *et al.* Effect of shade on the photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of *Abies beshanzuensis* M.H.Wu.[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(10): 2056-2064.