

文章编号: 1001-1498(2007)06-0787-07

京 2 杨组培条件的优化及再生体系建立

张 蕾¹, 苏晓华^{2*}, 张冰玉², 黄秦军², 张香华², 李义良²

(1. 沈阳农业大学林学院, 辽宁 沈阳 110161; 2 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:以京 2 杨为研究对象, 确定了影响其组培苗生长的关键因子及组培苗生长的最佳条件, 并为其建立了稳定高效的再生体系。试验结果表明: 京 2 杨组织培养的最适基本培养基为 MS 培养基, 继代培养基和不定芽最佳生根培养基均为 $1/2MS + NAA 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + BA 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 培养基中加入活性炭不利于京 2 杨生长; 光周期对京 2 杨的生长影响较小, 但光照强度和继代培养基 pH 值对其生长影响显著, 最适光照强度为 2 500 lx, 最适 pH 值为 6.5; 无菌苗叶片最佳不定芽诱导培养基为 $MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 叶柄最佳不定芽诱导培养基为 $MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:京 2 杨; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Optimization of Tissue Culture Conditions and Establishment of Regeneration System for *Populus ×euramericana* cl. 'J2'

ZHANG Lei¹, SU Xiao-hua^{2*}, ZHANG Bing-yu², HUANG Qin-jun², ZHANG Xiang-hua², LI Yi-liang

(1. Forestry College, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, Liaoning, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF; Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The key factors affecting the growth of *Populus ×euramericana* cl. 'J2' *in vitro* and the optimal tissue culture conditions for it were ascertained. The high frequency regeneration system for *P. ×euramericana* cl. 'J2' was also established in this study. The optimum basic culture medium was MS; the optimal subculture medium and root inducement culture medium for shoot were $1/2MS + NAA 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + BA 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; active carbon disadvantaged the growth of *P. ×euramericana* cl. 'J2'; photoperiod had little effect on *P. ×euramericana* cl. 'J2', while light intensity and the pH value of subculture medium had great effect on it, the optimal light intensity was 2 500 lx and the optimal pH value was 6.5; the optimal shoot inducement culture medium for leaf-explant was $MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and for leafstalk-explant was $MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: *P. ×euramericana* cl. 'J2'; tissue culture; regeneration system

稳定高效的再生体系是通过基因工程手段对植物进行遗传转化成功的重要前提。目前, 国内外已获得了几十种杨树的再生植株, 但组培再生体系建立较为成熟的多为白杨派树种, 而黑杨派树种尤其

是美洲黑杨 (*Populus deltoids* Marsh.) 的组培再生则相对较难。近年来, 虽然国内外许多学者都在美洲黑杨组培再生及遗传转化方面做了很大的努力, 也相继获得了一些再生植株及转基因植株^[1-6], 但由

收稿日期: 2006-09-07

基金项目: 国家科技支撑计划课题“高产优质杨树、桉树等速生材树种新品种选育”(编号 2006BAD01A15)

作者简介: 张蕾 (1980—), 女, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种学研究。

*通讯作者, E-mail: suhx@caf.ac.cn

于美洲黑杨种内差异较大,从总体上看其组培再生体系建立至今仍不成熟。

京 2 杨 (*Populus × euram ericana* (Dode) Guiner cl 'J2') 为中国林业科学研究院与河北秦皇岛林业局等选育出的新品种,属聚合型杂种欧美杨,但其遗传成分中欧洲黑杨仅占 1/8,而美洲黑杨占 7/8。在普遍培养室中,京 2 杨组培苗的生长状况始终不够理想,再生十分困难,为其遗传转化及工厂化育苗带来了很大困难。本研究以京 2 杨为试验材料,对其组培条件进行了优化,确定了影响其组培苗生长的关键因子及组培苗生长的最佳条件,并初步建立了有效的叶片和叶柄的再生体系,为其遗传转化及工厂化育苗奠定了基础。

1 材料与研究方法

1.1 植物材料及其处理

2004 年 3—7 月份于中国林业科学研究院温室选取扦插苗上生长健壮、腋芽饱满的京 2 杨嫩枝及幼嫩叶柄,剪去叶片,嫩枝剪成 2 cm 左右的单芽茎段。茎段和叶柄均于流动的自来水下冲洗 1~2 h,沥干后置于超净工作台上;茎段用 70% 乙醇处理 1 min,再用 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化汞溶液消毒 15~20 min,叶柄用 70% 乙醇处理 1 min,再用 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化汞溶液消毒 10~15 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次。

1.2 研究方法

1.2.1 最适基本培养基的选择 将灭菌后的茎段分别接种于不附加任何激素的 MS、WPM 和 GMS 培养基 (灭菌前 pH 值为 5.8) 中,每处理 50 个茎段,根据腋芽的生长状况筛选最适基本培养基。

1.2.2 最佳继代培养基的选择 在选定的 1/2MS 基本培养基中附加不同浓度的 萘乙酸 (NAA) 和 吲哚丁酸 (BA) (灭菌前 pH 值为 5.8)。当腋芽长约 1.5 cm 时,将其剪下接种于各处理的培养基中,以每株最长根长作为单株根长,计算 40 株组培苗的平均根长,根据组培苗根系的生长情况筛选最佳继代培养基。

1.2.3 其它培养条件的确定

1.2.3.1 活性炭对京 2 杨组培苗生长的影响 选择生长状况一致的京 2 杨组培苗,分别接种于含 0.3% 活性炭和未加活性炭的继代培养基 (灭菌前 pH 值为 5.8) 中,每处理 50 株。于接种后 30 d 观察这 2 处理中组培苗的生长状况。

1.2.3.2 最适光周期的确定 将京 2 杨组培苗 (培养基灭菌前 pH 值为 5.8) 分别置于光周期为 14 h/10 h、16 h/8 h、18 h/6 h、22 h/2 h 的培养箱中,每处理 50 株,光照强度为 1 500~1 800 lx。观察其生根和生长情况。

1.2.3.3 最适光照强度的确定 将京 2 杨组培苗置于光照强度分别为 1 700、2 500、3 200 lx 的培养箱中,光周期均采用选定的最适光周期。根据其生根和生长情况,确定最适光照强度。

1.2.3.4 继代培养基最适 pH 值的确定 将生长状况一致的京 2 杨组培苗接种于 3 种不同 pH 值的继代培养基中,根据其生根和生长情况,确定最适 pH 值。3 种处理均采用选定的光周期和光照强度。

1.2.4 京 2 杨再生体系的建立

1.2.4.1 最佳不定芽诱导培养基的选择 在 MS 培养基中加入不同浓度的 NAA、BA、6 苄基嘌呤 (BA) 和玉米素 (ZT),构成不同的处理,每处理分别接种 40 个无菌苗叶片和扦插苗叶柄。根据叶片和叶柄的分化情况筛选最佳不定芽诱导培养基 (增殖系数 = 每处理不定芽总数 / 外植体数)。

1.2.4.2 不定芽生根培养基的筛选 选取生长健壮的 不定芽,分别接种于附加不同浓度的 NAA 和 BA 的 1/2MS 培养基 (灭菌前 pH 值为 6.5) 中,根据其生根状况筛选不定芽最佳生根培养基。

2 结果与分析

2.1 基本培养基种类对京 2 杨腋芽启动和生长的影响

培养基的种类是影响组培苗生长的关键因素。MS、WPM 和 GMS 均为常用的林木组织培养培养基,其中 MS 和 WPM 属高盐浓度的培养基,富含植物生长所需的盐类。将茎段接种于 3 种培养基中,结果见表 1。

表 1 不同基本培养基中京 2 杨腋芽的启动和生长状况

培养基	接种茎段数 / 个	启动时间 / d	有效芽数 / 个	芽生长状况
MS	50	6	50	芽生长健壮,平均长约 2.5 cm
WPM	50	9	46	芽生长一般,平均长约 2.0 cm
GMS	50	13	38	芽生长一般,平均长约 1.3 cm

由表 1 可以看出,从启动效果和腋芽生长状况来看,MS 和 WPM 培养基均明显优于 GMS 培养基,

说明京 2 杨的生长需要相对较高的营养;而与 WPM 培养基相比,MS 培养基更有利于腋芽的启动和生长,不仅启动时间最早,有效芽数最多,而且芽生长最为健壮。故京 2 杨组织培养的最适基本培养基为 MS 培养基。由于茎段本身具有较多的营养物质可为腋芽生长所利用,因此,茎段外植体腋芽的启动培养也可选用不附加任何激素的 1/2MS 培养基作为启动培养基。

2.2 不同激素配比诱导腋芽生根效果

选用 1/2MS 培养基,附加不同浓度的 NAA 和 BA。在接种 30 d 后观察各处理中腋芽根系的生长情况,结果见表 2。

从表 2 可以看出,单独使用 NAA 或 BA 诱导生根的效果较混合使用二者时差。单独使用 NAA 时,根长但纤细,而且 NAA 浓度过高,生根处会产生大块愈伤组织;单独使用 BA 时,不定

根少而短粗。这是因为高浓度的 NAA 会诱导愈伤组织产生,而 BA 则主要促进主根生长。不定根的生长受 NAA 与 BA 比值的影响,当 NAA:BA 为 1:1 时(即处理 1、处理 4 和处理 6)生根率达 100%,根长而粗壮。在相同的 NAA:BA 下,不定根的生长又受二者绝对浓度的影响,较高浓度的 NAA 和 BA 更利于京 2 杨组培苗不定根的诱导,但如果 NAA 和 BA 的浓度过高,生根处就会产生大块愈伤组织,不利于不定根与茎牢固结合,从而降低移植成活率。处理 4 中京 2 杨组培苗不仅生根率高达 100%,不定根数量多而长,而且生根处无大块愈伤组织。在继代培养过程中,组培苗的生根情况往往也影响其生长状况,观察发现,生根最好的处理 4 组培苗长势也最佳。故京 2 杨最佳继代培养基为 1/2MS + NAA 0.08 mg · L⁻¹ + BA 0.08 mg · L⁻¹。

表 2 1/2MS 培养基中不同激素组合及配比诱导腋芽生根结果的比较

处理	激素浓度及比例			外植体数/个	生根率/%	最长根平均根长/cm	根系生长状况
	NAA/(mg · L ⁻¹)	BA/(mg · L ⁻¹)	NAA:BA				
1	0.10	0.10	1:1	40	100	10	多而纤细,有大块愈伤组织产生
2	0.10	0.05	2:1	40	80	9	多而纤细,有大块愈伤组织产生
3	0.10	0.01	10:1	40	70	7	多而纤细,有大块愈伤组织产生
4	0.08	0.08	1:1	40	100	11	根系发达,无愈伤组织产生
5	0.05	0.10	1:2	40	50	8	根系发达,无愈伤组织产生
6	0.05	0.05	1:1	40	100	8	根少而粗,无愈伤组织产生
7	0.05	0.01	5:1	40	80	6	根少而粗,无愈伤组织产生
8	0.02	0.01	2:1	40	60	5	根少而粗,无愈伤组织产生
9	0.10			40	80	8	多而纤细,有大块愈伤组织产生
10	0.05			40	70	6	根系发达,无愈伤组织产生
11	0.02			40	60	6	根少而纤细,无愈伤组织产生
12		0.10		40	60	4	根少而粗,无愈伤组织产生
13		0.05		40	40	4	根少而粗,有愈伤组织产生
14		0.01		40	40	5	根少而粗,无愈伤组织产生

2.3 不同培养条件对京 2 杨组培苗生长的影响

2.3.1 活性炭对京 2 杨组培苗生长的影响 组培条件下,植物在生长过程中会分泌出酚类等次生物质,这些物质会对植物的生长产生不良影响。活性炭是组织培养中常用的酚类物质吸附剂,同时也能改善培养基的通透性,但在京 2 杨继代培养基中加入 0.3% 的活性炭后,组培苗的生长明显变差,培养 30 d 后未加活性炭的培养基中组培苗平均株高达 6.4 cm,而加入活性炭的培养基中组培苗黄弱,平均株高仅为 3.0 cm (图 1)。这说明生根培养基中加入活性炭不利于京 2

杨组培苗的生长,由此也可以推断,培养基通透性和酚类物质的毒害作用并不是影响京 2 杨组培苗生长的主要因子。

2.3.2 光周期对京 2 杨组培苗生长的影响 在其它培养条件一致的情况下,光照时间为 14、16、18、22 h 的 4 种处理中京 2 杨组培苗的生长状况见表 3。由表 3 可看出,在 4 种光周期下,京 2 杨组培苗的生根率和株高大致相同,生长状况也相差不大,底叶均有变黄的现象。光周期为 16 h/8 h 时,组培苗的长势略好于其它 3 个处理,因此,京 2 杨组织培养的光周期应选用 16 h/8 h。



图 1 活性炭对京 2 杨组培苗生长的影响

表 3 组培条件下不同光周期对京 2 杨生长的影响

光照时间 / h	株数 / 株	10d后平均株高 / cm	20d后平均株高 / cm	30d后平均株高 / cm	生根率 / %	苗生长状况
14	50	2.7	3.7	6.0	100	良好,底叶微黄
16	50	2.7	3.9	6.2	100	良好,底叶微黄
18	50	2.5	3.6	6.0	100	良好,底叶微黄
22	50	2.4	3.5	5.9	98	良好,底叶微黄

2.3.3 光照强度对京 2 杨组培苗生长的影响
由表 4 可看出,较高的光强条件适宜京 2 杨的生长,但是光照强度过高又会产生不利影响,组培苗的生根和生长均会受到严重抑制。当光照强度为 1 700 lx 时,生根率可达 100%,但培养 10、20、30 d 时平均株高仅为 2.5、3.9、6.1 cm,并观察到组培苗的底叶略黄;当光照强度为 3 200 lx 时,苗长势最差,高生长量降低,生根率仅为 70%;当光照强度为 2 500 lx 时,组培苗长势最好,生根率达到了 100%,组培苗生长健壮,培养 30 d 后平均株高达 7.8 cm,明显好于其它 2 个处理。实验结果表明,适宜京 2 杨组培苗生长的光照强度大致应为 2 500 lx。

表 4 组培条件下不同光照强度对京 2 杨生长的影响

光照强度 / lx	株数 / 株	10 d 后平均株高 / cm	20 d 后平均株高 / cm	30 d 后平均株高 / cm	生根率 / %
1 700	50	2.5	3.9	6.1	100
2 500	50	2.8	4.5	7.8	100
3 200	50	2.0	3.6	5.7	70

注:光周期为 16 h/8 h

2.3.4 继代培养基 pH 值对京 2 杨组培苗生长的影响
pH 值不同的继代培养基 1/2MS + NAA 0.08 mg · L⁻¹ + BA 0.08 mg · L⁻¹ 中京 2 杨的生长状况见表 5。由表 5 可以看出,继代培养基 pH 值对京 2 杨组培苗的生长有很大的影响。3 个处理中组培苗

的生根率基本相同,处理 2 (pH 为 6.5) 组培苗长势最好,培养 30 d 后平均株高约为 8.5 cm,且生长健壮;处理 1 次之,组培苗长势良好;处理 3 (pH 为 7.0) 最差 (图 2)。这说明高压灭菌前继代培养基 pH 为 6.5 最适宜京 2 杨的生长。与大部分杨树相比^[7,8],京 2 杨在组培环境中更适宜在 pH 值相对较高的条件下生长。

表 5 继代培养基 pH 值对京 2 杨生长的影响

处理	pH 值	株数 / 株	10d后平均株高 / cm	20d后平均株高 / cm	30d后平均株高 / cm	生根率 / %
1	5.8	50	2.4	4.0	6.3	100
2	6.5	50	3.0	4.9	8.5	100
3	7.0	50	2.6	3.7	5.9	96

注:光周期为 16 h/8 h,光照强度为 2 500 lx

2.4 不同激素组合诱导不定芽分化效果

将京 2 杨组培苗叶片及脱菌处理后的叶柄接种于表 6~9 所示的各处理中,观察其分化情况。10 d 左右,叶片切口处突起,出现肉眼可见的愈伤组织;第 14 天,部分处理愈伤组织分化产生芽点,而部分愈伤组织仅体积增大,并未分化出芽点;第 21 天,芽点伸长至 0.2~0.3 cm;第 35 天,不定芽长度可达 0.5~1.2 cm。叶柄在接种后 10 d 左右,切口处膨大,并出现肉眼可见的淡红色愈伤组织;第 14 天,部分处理愈伤组织分化产生芽点;第 21 天,芽点伸长至 0.2~0.4 cm;第 35 天,不定芽长度可达 0.7~1.3 cm。

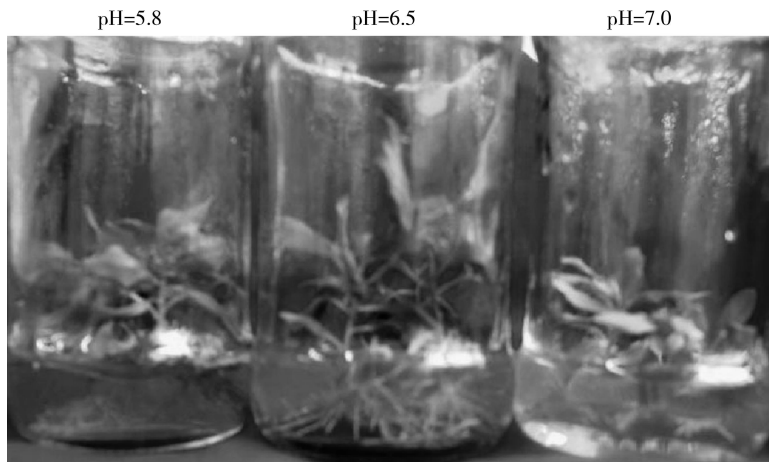


图 2 不同 pH 值继代培养基中京 2 杨组培苗的生长情况

由表 6~9 可以看出,4 种组合中 BA/NAA 组合的诱导效果最好,叶片和叶柄的分化率相对较高,不定芽生长状况也相对较好,ZT/NAA 组合效果次之,BA/BA 组合效果较差,而 ZT/BA 组合效果最差,表明京 2 杨不定芽的诱导对激素组合效应有明显差异。不定芽的分化不仅受培养基中激素种类的影响,也受激素含量的影响。在 BA/NAA 组合中,BA 浓度以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。BA 与 NAA 的比值对不定芽的诱导有调控作用,BA 浓度增加有利于丛状芽形成,但过高则不利于芽抽茎。在所有处理中,BA/NAA 组合中

的处理 6 对无菌苗叶片不定芽诱导效果最好,叶片分化率达 90%,增殖系数达 10 倍;该组合中处理 9 对叶柄不定芽诱导效果最好,叶柄分化率高达 98%,不定芽的增殖系数高达 17 倍,且不定芽生长健壮(图 3)。因此,京 2 杨无菌苗叶片外植体最佳不定芽诱导培养基为:MS+BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;叶柄外植体最佳不定芽诱导培养基为:MS+BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。外植体类型不同不定芽分化的效果也不同,试验结果表明,京 2 杨叶柄的再生能力比组培苗叶片的高。

表 6 BA/NAA 激素组合诱导外植体产生不定芽效果比较

处理	激素浓度及比例			外植体数 / 个	分化率 / %		增殖系数	
	BA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	BA NAA		叶片	叶柄	叶片	叶柄
1	0.1	0.05	2 1	40	40	50	4	5
2	0.5	0.05	10 1	40	50	70	5	7
3	1.0	0.05	20 1	40	80	75	8	12
4	1.5	0.05	30 1	40	60	63	8	10
5	0.5	0.10	5 1	40	50	55	7	6
6	1.0	0.10	10 1	40	90	93	10	13
7	1.5	0.10	15 1	40	50	88	7	12
8	0.5	0.20	5 2	40	40	58	6	5
9	1.0	0.20	5 1	40	70	98	9	17
10	1.5	0.20	15 2	40	88	85	7	12

表 7 ZT/NAA 激素组合诱导外植体产生不定芽效果比较

处理	激素浓度及比例			外植体数 / 个	分化率 / %		增殖系数	
	ZT / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	ZT NAA		叶片	叶柄	叶片	叶柄
1	0.1	0.05	2 1	40	20	40	1	3
2	0.5	0.05	10 1	40	30	50	3	6
3	1.0	0.05	20 1	40	60	60	5	8
4	1.5	0.05	30 1	40	40	50	2	7
5	0.5	0.10	5 1	40	30	70	3	10
6	1.0	0.10	10 1	40	70	80	5	4
7	1.5	0.10	15 1	40	40	70	3	5
8	0.5	0.20	5 2	40	30	68	4	9
9	1.0	0.20	5 1	40	60	80	5	4
10	1.5	0.20	15 2	40	60	70	5	6

表 8 BA/IBA 激素组合诱导外植体产生不定芽效果比较

处理	激素浓度及比例			外植体数 / 个	分化率 / %		增殖系数	
	BA / (mg · L ⁻¹)	IBA / (mg · L ⁻¹)	BA IBA		叶片	叶柄	叶片	叶柄
1	0.1	0.05	2 1	40	10	20	2	2
2	0.5	0.05	10 1	40	20	20	4	3
3	1.0	0.05	20 1	40	30	40	3	6
4	1.5	0.05	30 1	40	30	50	4	5
5	0.5	0.10	5 1	40	20	30	1	3
6	1.0	0.10	10 1	40	40	60	6	7
7	1.5	0.10	15 1	40	40	50	4	5
8	0.5	0.20	5 2	40	20	30	2	3
9	1.0	0.20	5 1	40	50	70	5	10
10	1.5	0.20	15 2	40	50	40	3	5

表 9 ZT/IBA 激素组合诱导外植体产生不定芽效果比较

处理	激素浓度及比例			外植体数 / 个	分化率 / %		增殖系数	
	ZT / (mg · L ⁻¹)	IBA / (mg · L ⁻¹)	ZT IBA		叶片	叶柄	叶片	叶柄
1	0.1	0.05	2 1	40	10	10	1	1
2	0.5	0.05	10 1	40	10	10	1	2
3	1.0	0.05	20 1	40	20	30	3	2
4	1.5	0.05	30 1	40	20	30	2	2
5	0.5	0.10	5 1	40	10	10	3	5
6	1.0	0.10	10 1	40	30	50	2	4
7	1.5	0.10	15 1	40	30	50	3	4
8	0.5	0.20	5 2	40	20	20	2	3
9	1.0	0.20	5 1	40	30	30	4	3
10	1.5	0.20	15 2	40	30	30	3	2



图 3 京 2 杨不定芽的分化情况

A: 京 2 杨无菌苗叶片在 BA/NAA 组合处理 6 中的分化情况 B: 京 2 杨叶柄在 BA/NAA 组合处理 9 中的分化情况

2.5 不同激素配比诱导不定芽生根效果

由表 10 可以看出, 处理 3 不定芽生根效果最好, 生根率达 100%, 根系生长健壮, 且茎部切口处

无愈伤组织产生, 便于移植。因此, 不定芽生根培养基仍选用 1/2MS + NAA 0.08 mg · L⁻¹ + BA 0.08 mg · L⁻¹。

表 10 不同激素及配比诱导不定芽生根结果比较

处理	激素浓度及比例			不定芽数 / 个	生根率 / %	根系生长状况
	NAA / (mg · L ⁻¹)	BA / (mg · L ⁻¹)	NAA BA			
1	0.10	0.10	1 1	40	85	多而纤细, 有愈伤组织产生
2	0.10	0.01	10 1	40	70	根少而粗, 有愈伤组织产生
3	0.08	0.08	1 1	40	100	根系发达, 无愈伤组织产生
4	0.05	0.05	1 1	40	93	根系发达, 无愈伤组织产生
5	0.05	0.01	5 1	40	80	根少而粗, 有愈伤组织产生

2.6 京 2 杨组培苗的炼苗移植

当组培苗根系达 3~4 cm 时,将其在自然条件下炼苗 1 周,然后用清水洗去根部培养基,再将其移植到草炭土:珍珠岩为 3:1 的基质中,并用塑料罩于营养钵上保湿。1 周后,揭去塑料。经 10 d 左右的恢复期后,组培苗移植成活率可达 92%。

3 结论与讨论

京 2 杨组织培养的最适基本培养基为 MS 培养基;组培苗最佳继代培养基和不定芽生根培养基均为 $1/2MS + NAA 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + BA 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;继代培养基中加入活性炭不利于京 2 杨生长,其组织培养不宜使用活性炭;光周期对京 2 杨生长影响较小,但光照强度和培养基 pH 值对其生长有很大影响,最适光照强度为 2500 lx,继代培养基最适 pH 值为 6.5;无菌苗叶片最佳不定芽诱导培养基为 $MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,叶柄最佳不定芽诱导培养基为 $MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

组织培养是一个复杂的过程,影响外植体分化及组培苗生长的因子也是多方面的,既包括生长介质,也包括各种环境因子。环境条件影响着植物的生长和形态建成,并与各种内部因素互作,对植物产生多方面的影响。关于环境因子的研究多集中在培养基种类、激素以及光照条件上,对于培养基 pH 值对组培苗生长影响的报道相对较少。有研究表明,在组织培养中环境 pH 值对植物激素作用、生理代谢及培养物的生长和分化都存在不同程度的影响^[9,10],因此,培养基 pH 值也是组织培养中应加以重视的影响因子。本研究的结果也表明,继代培养基 pH 值对京 2 杨生长影响较大。在组培条件下,大部分杨树在培养基 pH 值为 5.8 时即可满足生长需求,而京 2 杨则适宜在 pH 值相对较高的条件下生长,这与其原产地土壤 pH 值较高是一致的。活性炭是各种有害物质的有效吸附剂,研究表明在培养基中加入活性炭对许多植物的生长均有促进作用^[11,12],但由于其吸附选择性差,在吸附有害物质的同时也会大量吸收培养基中的养分和生长调节物质,这可能是导致京 2 杨在加入活性炭的培养基中生长变差的主要原因。此外,培养基中激素的种类

和含量是影响组培苗生长和不定芽再生的关键因素,调节其水平和配比,是提高组织分化频率的有效手段^[13]。有研究认为控制器官形成的是培养基中激素的相对含量,不是其绝对含量^[14],而本实验的结果表明,激素的相对含量和绝对含量对器官的形成、组培苗的生根以及不定芽的诱导均有很大影响。

参考文献:

- [1] Coleman G D, Erst S G. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8: 459~462
- [2] Confabonieri M, Balestrazzi A, Cella R. Genetic transformation of *Populus deltoides* and *P. xeurum americana* clones using *Agrobacterium* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 48(1): 53~61
- [3] Chaturvedi H C, Shama A K, Agha B Q, et al. Production of cloned trees of *Populus deltoides* through *in vitro* regeneration of shoots from leaf, stem and root explants and their field cultivation [J]. *Indian J Biotech*, 2004, 3: 203~208
- [4] 陈颖,韩一凡,李铃,等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因转化美洲黑杨的研究 [J]. *林业科学*, 1995, 31(2): 97~103
- [5] 李红,王关林,李洪艳,等. 美洲黑杨的组织培养和快繁 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(6): 708
- [6] 康薇,郑进,刘凯于,等. 美洲黑杨(中嘉 8 号)离体叶片再生研究 [J]. *武汉植物学研究*, 2006, 24(1): 83~86
- [7] 易丽娟,曾幼玲,吕艳,等. 中林美荷杨叶柄的组织培养及植株再生 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(5): 576
- [8] 孙宇飞,高秀华,赵彦修,等. 欧美 107 杨组织培养再生系统的建立 [J]. *山东师范大学学报(自然科学版)*, 2004, 19(2): 85~87
- [9] Morisawa M, Steinhardt R A. Affecting factors of the differentiate of slime fungus [J]. *Exp Cell Res*, 1982, 140: 341~351
- [10] 曹新祥,韩小云. 植物组织培养中的 pH 值 [J]. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 2003, 2(1): 60~63
- [11] Johansson L B, Calleberg E, Gedin A. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis* [J]. *Physiol Plant*, 1990, 80: 243~249
- [12] 胡蕙露,杨景华,杨荻荣,等. 银杏茎段试管培养条件筛选研究 [J]. *林业科学*, 2002, 38(3): 52~56
- [13] 詹祥灿. 植物体细胞胚状体与器官发生的激素调节 [J]. *植物生理学报*, 1983, 9(3): 317~323
- [14] Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* [J]. *Biological Action of Growth Substances*, 1957(11): 118~131