

赵鑫闻, 王君, 彭儒胜. 新林1号杨开放式组织培养叶片再生技术研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(5): 538-544.

ZHAO Xinwen, WANG Jun, PENG Rusheng. Techniques on leaf-explant regeneration based on open tissue culture of populus cathayana × canadensis xinlin 1[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(5): 538-544.

新林1号杨开放式组织培养叶片再生技术研究

赵鑫闻¹, 王君², 彭儒胜¹

(1. 辽宁省杨树研究所, 辽宁 盖州 115200; 2. 北京林业大学 林木遗传育种全国重点实验室, 北京 100083)

摘要: 为提升杨树种苗快繁效率及质量, 以新林1号杨为研究对象, 在开放式组培适宜抑菌剂种类及浓度筛选基础上, 对不定芽诱导培养基、生根培养基等进行研究, 建立新林1号杨开放式组织培养再生技术体系。以新林1号杨叶片为外植体, 使用75%酒精进行外植体消毒, 考察百菌清及百菌清+头孢噻肟钠组合的抑菌效果, 进行抑菌剂种类及浓度的筛选, 建立抑菌体系。研究在非无菌的条件下生长调节剂6-BA、NAA对新林1号杨不定芽诱导的影响, 以及不同浓度IBA对不定芽生根的影响。结果表明: 百菌清和头孢噻肟钠组合作为新林1号杨叶片离体再生的抑菌剂不仅抑菌效果好, 而且对外植体生长和分化的影响较小, 最佳抑菌浓度组合为0.15 g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠; 以叶片为外植体的最适不定芽分化培养基植物生长调节剂配比为MS + 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.04 mg·L⁻¹ NAA, 不定芽诱导率为(91.57±0.21)%, 每个外植体平均不定芽诱导数为(7.5±1.0)个, 生根培养基为1/2MS + IBA 0.3 mg·L⁻¹, 再生苗移栽成活率可达95%以上。初步建立新林1号杨开放式组织培养再生技术体系, 为新林1号杨的种苗快繁提供技术指导, 同时也为杨属良种的工厂化育苗提供技术支撑。

关键词: 杨属; 开放式组培; 抑菌剂; 不定芽分化

中图分类号: S792.99

文章编号: 1000-1700(2024)05-0538-07

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Techniques on Leaf-explant Regeneration Based on Open Tissue Culture of *Populus cathayana* × *canadensis* Xinlin 1

ZHAO Xinwen¹, WANG Jun², PENG Rusheng¹

(1. Research Institute of Poplar of Liaoning Province, Gaizhou Liaoning 115200, China;

2. National Key Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to improve the efficiency and quality of poplar propagation, the *Populus cathayana* × *canadensis* Xinlin 1 were used as the object to study the types and concentrations of antimicrobial agents, inducing differentiation medium and rooting medium to establish the open tissue culture technique system. The leaves were used as the explant and sterilized with the low toxicity 75% alcohol, and the types and concentration of antimicrobial agents were screened with the chlorothalonil and the combination(chlorothalonil + sodium cefotaxime), and the bacterial inhibition system was established. The effects of 6-BA and NAA on adventitious bud induction were studied, and the effects of IBA on rooting was also studied. The results showed that the combination of chlorothalonil and cefotaxime sodium was effective as an antimicrobial agent and had less influence on the growth and differentiation of the open tissue culture of the *Populus cathayana* × *canadensis* Xinlin 1. The suitable inhibition concentration was 0.15 g·L⁻¹ chlorothalonil + 0.05 g·L⁻¹ cefotaxime sodium. The suitable differentiation medium was 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.04 mg·L⁻¹ NAA, the induction rate was (91.57±0.21)%, and the

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 科技创新2030—重大项目(2023ZD0405603); 辽宁省林业和草原局依托国家林草局科技创新平台研发项目(LLC[2022]18)

第一作者: 赵鑫闻(1983-), 女, 硕士, 高级工程师, 从事林木遗传育种研究, E-mail: ritaxw@126.com

average number of adventitious buds was 7.5 ± 1.0 . The suitable rooting medium was $1/2MS + IBA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the transplanting survival rate was over 95%. The open tissue culture technique system of the *Populus cathayana* \times *canadensis* Xinlin 1 was preliminarily established, providing a technique support for the rapid propagation of open tissue culture of *Populus cathayana* \times *canadensis* Xinlin 1, and also laying the foundation for the large-scale factory propagation of poplar cultivars.

Key words: *Populus*; open tissue culture; bacteriostatic agent; adventitious buds regeneration

杨树(*Populus* L.)是世界上分布最广、适应性最强的树种之一,栽培利用价值极高,广泛应用于生态防护、工业用材及景观建设等领域^[1-2]。据第九次全国森林资源清查,我国现有杨树人工林面积757万 hm^2 ,是我国重要的人工林树种^[3]。黑杨派树种及其杂种是我国杨树人工林建设的主力,然而由于黑杨抗寒性较差,在我国辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古及河北部分地区特殊年份常遭遇大规模冻害,严重影响了人们种植杨树的积极性^[4]。新林1号杨(*Populus cathayana* \times *canadensis* Xinlin 1)是辽宁省国有新民林场选育的新一代杨树优良品种(辽R-SC-PCC-006-2015),不仅具有黑杨派树种生长迅速的特点,而且树形优美、环境友好、抗寒性突出,在沈阳及以北等低纬度地区栽植适应性较强^[5],广受林农欢迎。目前,新林1号杨生产上主要依靠扦插繁殖,增殖速度慢、整齐度低,且存在病虫害风险,难以满足新品种大面积推广的需求。组织培养是种苗繁育、病毒脱除的重要手段,然而由于需无菌环境、技术复杂、成本高,在杨树规范化繁育中尚未广泛应用。

为了降低组培成本,简化组培步骤,推动组培工厂化,前人进行了多项研究。HERMAN^[6]认为不需要严格的无菌环境也能进行组织培养,根据他的研究,科研人员提出了一种新的组培技术——开放式组织培养技术,是一种通过在培养基中添加抑菌剂实现在非无菌条件下进行组培操作的技术方案,其不依赖高压灭菌,不需要超净工作台,具有操作简便、成本低廉、污染率低等优点,在植物工厂化育苗中渐受重视^[7-9]。在香蕉^[10]、荸荠^[11]、甘蔗^[12]、铁皮石斛^[13]、山丹丹^[14]、杜鹃^[15]等多种植物中,已开展了开放式组培研究。但至今仍有一个重要的技术难题没有攻克:由于选择的抑菌剂种类及浓度的问题,外植体的生长及分化受到了严重抑制,增殖困难,因此很难在生产上推广应用。黄泰达等^[16]对香蕉进行开放式组培研究,由于选择的抑菌剂的影响,大部分丛生芽在接种初期就开始严重褐化。HUANG等^[17]利用百菌清对金合欢进行开放式组培研究,由于抑菌剂的影响,外植体未能分化,只能通过调整培养基成分才实现了增殖培养。姜武等^[18]利用多种药剂配制的抑菌剂YJ104进行多花黄精的开放式组培,虽然能够进行增殖培养,但是抑菌剂YJ104配方复杂,难以获得,不利于实验及生产上的应用。因此,本研究以新林1号杨为对象,重点研究抑菌剂的种类及浓度,以及它们对外植体生长和分化的影响,并对不定芽诱导分化及生根培养进行研究,建立新林1号杨开放式组织培养技术体系,为新林1号杨的种苗繁育提供一种新方法,同时也为高质量、大规模的杨属植物工厂化育苗提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

2023年3月于辽宁省杨树研究所院内,采取叶芽饱满、无病虫害的新林1号杨(*Populus cathayana* \times *canadensis* Xinlin 1)1 a生枝条,置于温室内水培,待叶芽抽出后,取萌发的叶片作为试验材料。供试75%百菌清为利民化学有限公司生产,注射用头孢噻肟钠为悦康药业集团股份有限公司生产,供试植物生长调节剂6-BA和NAA均为国药集团化学试剂有限公司生产,供试培养基为MS培养基。

1.2 方法

1.2.1 抑菌剂种类及浓度的筛选 选取长度大于1 cm的新林1号杨叶片,用流动的自来水冲洗干净后,再用75%的乙醇处理3次,每次处理30 s,处理后在叶片基部保留0.5 mm的叶柄,从叶片一侧剪过主脉,剪成0.5~1.0 cm的狭长型叶片,分别接种于添加不同种类及浓度抑菌剂的MS培养基中,百菌清(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)设5个浓度处理,百菌清(0.05, 0.10, 0.15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)+头孢噻肟钠(0.02, 0.05, 0.10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组合共设9个浓度处理,每个处理接种10个叶片,试验设3次重复。分别于培养10, 20, 30 d观察并记录外植体褐化数、污染数和存活数。

1.2.2 叶片不定芽的诱导及分化 选取长度大于1 cm的新林1号杨叶片,灭菌处理同上,剪成0.5~1.0 cm的狭长型叶片,分别接种于附加不同浓度6-BA (0.2,0.4,0.8 mg·L⁻¹)和NAA (0.02,0.04,0.08 mg·L⁻¹)的MS培养基上,每种分化培养基接种10片叶,试验设3次重复。每日光照12~14 h,光强2 500 lx,培养温度(25±2) °C,观察叶片的分化情况,并做好记录。

培养基蔗糖浓度均为25 g·L⁻¹,琼脂浓度均为6 g·L⁻¹,添加0.3 g·L⁻¹百菌清及0.15g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠组合作为抑菌剂,并采用开放式接种方式。

1.2.3 生根培养基的筛选 取长2~3 cm,生长健壮的不定芽,接种到含有不同浓度(0.1,0.2,0.3,0.4 mg·L⁻¹)IBA的1/2MS培养基上,进行生根培养,观察不定芽的生根情况,每处理10个不定芽,3次重复。

1.2.4 再生苗的移栽 当组培苗根系长到3~4 cm时,打开封口膜进行炼苗,炼苗3 d后进行移栽。基质选择草炭:珍珠岩:河沙=1:1:1,然后将再生苗取出,洗去根部残留的培养基,将再生苗移栽至组培盒中,浇透水,并盖上盖子进行保湿,于温室中进行培养,温度控制在20~30 °C,防止温度过高影响再生苗的移栽成活率。

1.3 数据处理方法

试验所得数据结果使用Excel 2013软件进行整理,用SPSS软件进行单因素方差分析、双因素方差分析、差异显著性检验及多重比较。外植体的褐化率、污染率、存活率,不定芽诱导数和诱导率的计算方法如下。

$$\text{褐化率}(\%) = (\text{褐化数} / \text{接种数}) \times 100$$

$$\text{污染率}(\%) = (\text{污染数} / \text{接种数}) \times 100$$

$$\text{存活率}(\%) = (\text{存活数} / \text{接种数}) \times 100$$

$$\text{平均不定芽诱导数} = \text{产生的不定芽总数} / \text{产生不定芽的外植体数}$$

$$\text{诱导率}(\%) = (\text{产生不定芽的外植体数} / \text{接种数}) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 抑菌剂种类及浓度的筛选

由表1可知,百菌清浓度为0.3 g·L⁻¹时,外植体存活率最高,为96.6%,极显著高于其他处理,并且污染率为0,灭菌的效果非常理想,褐化的外植体也较少,褐化率仅为1.1%。因此,在MS培养基中加入0.3 g·L⁻¹的百菌清是比较适宜的抑菌处理。

表1 不同浓度百菌清对新林1号杨开放式叶片再生的影响

Table 1 Effects of different concentrations of chlorothalonil on leaf regeneration of *Populus cathayana* × *canadensis* Xinlin 1 under open-condition

编号 No.	百菌清浓度/(g·L ⁻¹) Chlorothalonil concentration	褐化率/% Browning rate	污染率/% Pollution rate	存活率/% Survival rate
B1	0.1	54.61±1.01 ^A	46.25±1.88 ^A	26.29±1.35 ^{BC}
B2	0.2	45.20±0.85 ^A	19.45±2.28 ^{AB}	8.30±1.58 ^C
B3	0.3	1.11±1.05 ^B	0 ^B	96.61±0.17 ^A
B4	0.4	24.88±0.94 ^A	0 ^B	72.82±0.51 ^{AB}
B5	0.5	49.66±0.41 ^A	0 ^B	49.66±0.41 ^{ABC}

注:表中数据为平均值±标准差,同列不同字母代表在 $p=0.01$ 水平上差异显著,下同。

Notes: The data in the table are the mean±standard deviation, and different letters indicate significant differences between different treatments at the 0.01 level, the same below.

在百菌清中加入头孢噻肟钠,将二者复配使用,比较各浓度组合的抑菌效果可知(表2),外植体在添加了0.15 g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠的组合中污染率为0,褐化率也为0,抑菌效果最佳,极显著高于其他组合。

综合而言,B3处理和T6处理均有较好的抑菌效果。T检验结果表明,B3处理和T6处理在污染率($P=1.0>0.05$)方面差异不显著,因此,仅从抑菌效果来看,0.3 g·L⁻¹百菌清和组合(0.15 g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠)都是新林1号杨开放式组培比较适宜的抑菌处理。

表2 不同浓度抑菌剂组合对新林1号杨叶片再生的影响

Table 2 Effects of different combinations and concentrations of bacteriostats on leaf regeneration of *Populus cathayana* × *canadensis* Xinlin 1 under open condition

编号 No.	百菌清浓度/(g·L ⁻¹) Chlorothalonil concentration	头孢噻肟钠浓度/(g·L ⁻¹) Cefotaxime sodium content	褐化率/% Browning rate	污染率/% Pollution rate	存活率/% Survival rate
T1	0.05	0.02	16.60±2.23 ^{ABC}	26.29±1.35 ^{AB}	42.46±0.70 ^{AB}
T2	0.10	0.02	6.48±1.32 ^{BC}	71.91±0.84 ^A	10.01±1.81 ^B
T3	0.15	0.02	8.30±1.58 ^{ABC}	66.58±0.20 ^A	19.10±0.67 ^{AB}
T4	0.05	0.05	62.04±0.80 ^A	1.11±1.00 ^{BC}	30.47±1.19 ^{AB}
T5	0.10	0.05	10.01±1.81 ^{ABC}	25.94±2.60 ^{AB}	41.35±0.99 ^{AB}
T6	0.15	0.05	0 ^C	0 ^C	100.00±0.00 ^A
T7	0.05	0.10	29.84±1.32 ^{AB}	0 ^C	24.01±2.50 ^{AB}
T8	0.10	0.10	40.00±0.00 ^{AB}	1.11±1.05 ^{BC}	56.57±0.22 ^{AB}
T9	0.15	0.10	30.56±1.74 ^{AB}	0 ^C	58.31±1.58 ^{AB}

2.2 植物生长调节剂对开放式叶片不定芽诱导的影响

以0.3 g·L⁻¹百菌清及0.15 g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠组合作为抑菌剂对新林1号杨进行开放式不定芽诱导。在以0.3 g·L⁻¹百菌清作为抑菌剂的处理中,将幼嫩的叶片分别接种到附加了不同植物生长调节剂种类及浓度的分化培养基上,接种30 d后,叶片两端仍未发现有不定芽的萌发,表明在培养基中加入0.3 g·L⁻¹的百菌清有可能抑制了叶片的分化。

而在以0.15 g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠组合为抑菌剂的处理中(表3),接种16 d后,发现部分叶片开始萌生丛生芽,在叶片两端的切口处出现一些绿色芽点,有单芽、双芽或丛生芽(图1A)。接种30 d后,新林1号杨叶片在0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.04 mg·L⁻¹ NAA处理中的不定芽诱导率和平均分化不定芽数均表现为最高,分别为(91.57±0.21)%和7.5±1.0,极显著高于其他组合。新林1号杨叶片在添加了0.15 g·L⁻¹百菌清+0.05 g·L⁻¹头孢噻肟钠组合抑菌剂的分化培养基中长势良好,丛生芽生长旺盛(图1B),由此可见,利用百菌清和头孢噻肟钠组合作为抑菌剂进行新林1号杨开放式组织培养是可行的。

表3 6-BA、NAA对新林1号杨开放式叶片不定芽诱导的影响

Table 3 Effects of 6-BA and NAA on adventitious bud induction with leaf under open condition

编号 No.	6-BA浓度/(mg·L ⁻¹) 6-BA concentration	NAA浓度/(mg·L ⁻¹) NAA concentration	平均不定芽诱导数 Average No. of adventitious buds	诱导率/% Induction rate
Z1	0.8	0.08	0 ^C	0 ^C
Z2	0.8	0.04	0 ^C	0 ^C
Z3	0.8	0.02	3.67±1.15 ^B	12.50±1.47 ^{BC}
Z4	0.4	0.08	4.00±1.73 ^{AB}	33.31±1.05 ^{AB}
Z5	0.4	0.04	3.10±2.00 ^B	12.50±0.00 ^{BC}
Z6	0.4	0.02	3.01±1.15 ^B	12.50±2.03 ^{BC}
Z7	0.2	0.08	5.30±1.00 ^{AB}	79.24±0.61 ^A
Z8	0.2	0.04	7.50±1.00 ^A	91.57±0.21 ^A
Z9	0.2	0.02	4.60±1.00 ^{AB}	62.57±0.93 ^B

由表4可知,植物生长调节剂NAA对开放式不定芽诱导率的影响达到极显著水平($p<0.01$),而6-BA的影响不显著($p>0.05$)。

表4 6-BA、NAA对新林1号杨开放式叶片不定芽诱导影响的方差分析

Table 4 Variance analysis on the effects of 6-BA and NAA of adventitious bud induction of

Populus cathayana × *canadensis* Xinlin 1 under open condition

因素 Factor	均方 SS	自由度 df	F	P
6-BA	0.28	2	0.27	0.77
NAA	46.23	2	45.27	0
误差 Error	1.02	2		



A、B. 新林1号杨开放式不定芽诱导; C、D. 新林1号杨开放式不定芽生根; E、F. 再生植株
A, B. Adventitious bud induction under open condition; C, D. Rooting seedlings under open condition; E, F. transplanted plantlets

图1 新林1号杨再生植株

Figure 1 Plant regeneration of *Populus cathayana* × *canadensis* Xinlin 1

2.3 开放式不定芽的生根及移栽

将不定芽接种到附加不同浓度激素的生根培养基上,各处理生根培养基中均添加了抑菌剂,7~10 d后,茎段底部开始萌生不定根,由图2可知,新林1号杨在处理3中生根率最高,达到100%,极显著高于其他处理,而且生根效果好,根短且粗壮(图1C和D),因此选择1/2MS+IBA0.3 mg·L⁻¹作为新林1号杨开放式不定芽生根培养基。

当再生苗株高达到3~4 cm时进行移栽,选取生长健壮的组培苗,洗净根部的培养基,移栽到装有基质(珍珠岩:草炭:河沙=1:1:1)的培养盒中,盖上盖子保温保湿(图1E),温度保持在20~30℃,7~10 d后,待组培苗萌生新叶后打开盖子,定期管理,成活率可达95%以上。移栽25 d后,再生苗生长健壮,革质化程度较高,且获得了较高的移栽成活率(图1E和图1F)。

3 讨论与结论

3.1 抑菌剂的筛选

抑菌剂是影响开放式组织培养成功的关键因素,抑菌剂种类和浓度的选择关系到开放式组培的成败。适宜的抑菌剂筛选困难,不同物种对不同抑菌剂的种类和浓度要求不同。孙占育等^[19]对9种抑菌剂进行筛选,发现仅多菌灵和代森锰锌适宜长柄扁桃的开放式组织培养;而在甘蔗的开放式组培中发现次氯酸钠的抑菌效果最好^[12];马铃薯的最适抑菌剂为多锰锌^[20];樱桃砧木则在添加了多菌灵的培养基中抑菌效果最好^[21]。多种抑菌剂复配使用抑菌效果更佳。崔刚等^[22]从多种中草药中提取活性成分混合配伍,成功地应用在葡萄、苹果、红栌、香槐花等多种植物的开放式组培中。张艳等^[23]利用复合抑菌剂(代森锰锌+菌杀保果+次氯酸钠)对杉木进行开放式组织培养,不仅抑菌效果好,而且对生长的影响也较小。这与本试验研究结果相同,单独使用百菌清虽然抑菌效果好,但没有获得丛生芽,而将百菌清与头孢噻肟钠复配使用不仅抑菌效果好,而且获得了较高的诱导率。

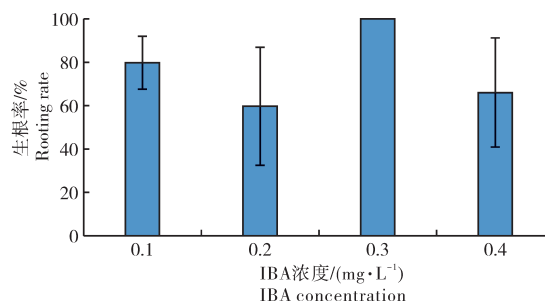


图2 不同浓度IBA对开放式生根的影响

Figure 2 Effects of IBA on rooting under open condition

目前研究中筛选的抑菌剂大多在控制污染方面效果较好,但是极少见对生长和分化影响较小的,有的甚至无法进行增殖培养。赵青华等^[24]利用H198抑菌剂对魔芋进行开放式组织培养,结果抑菌效果较好,但是从生芽褐化严重。王鸿等^[25]利用百菌清进行相思开放式组培研究,虽然外植体没有出现褐化或死亡等现象,但是外植体不分化,只能采用多次继代生根的方法进行增殖培养。黄敏等^[26]利用次氯酸钠作为抑菌剂对铁皮石斛进行开放式组织培养,虽然将污染率控制在10%以内,但获得的芽的成活率显著低于传统组培;本研究最初选择0.3%百菌清为抑菌剂对新林1号杨进行开放式组织培养,虽然污染率为0,但叶片未能分化;将百菌清与头孢噻肟钠复配使用,结果不仅污染率为0,而且获得的诱导率和增殖系数也较高,与传统组培差异不大。原因可能是0.3%百菌清的毒性太强,抑制了叶片的分化,卢艳萍等^[27]利用0.2%的百菌清通过降低MS培养基浓度的方式实现了对相思的开放式增殖培养。多项研究表明头孢噻肟钠对杨树叶片分化影响较小,分化率最高可达100%,而且分化芽多^[28-30]。因此以组合 $0.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 百菌清+ $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢噻肟钠作为抑菌剂进行开放式组培极大地降低了培养基的毒性,保证了外植体的生长与分化。因此综上可知,本研究筛选的抑菌方案不仅有效的控制了污染,而且对外植体生长及分化的影响较小,是比较好的抑菌方案。

3.2 开放式不定芽诱导

开放式组织培养,由于在培养基中添加了抑菌剂,因此外植体的生长及分化都会受到一定程度的影响,因此要选择生理状态好、耐受能力强的外植体进行增殖培养,才能提高开放式组培的成功率^[25]。通常的研究是以茎段为外植体,而本研究则以叶片为外植体,叶片虽然相对比较脆弱,但是组培的增殖率比茎段高^[31]。姜武等^[18]采用嫩茎开展黄精开放式组培研究获得的增殖系数为2~3;刘雨轩等^[15]采用茎段进行杜鹃花开放式组培获得的增殖率系数也仅为3.067;卢艳平等^[27]利用茎段进行相思开放式组培研究获得的增殖系数最高也只有3.38,本试验研究结果表明,叶片外植体在添加了抑菌剂组合($0.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 百菌清+ $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢噻肟钠)的处理中不仅存活率为100%,诱导率及增殖率也较高,分别为 $(91.57\pm 0.21)\%$ 和 (7.5 ± 1.0) ,表明以叶片为外植体进行开放式组织培养是可行的,而且能够获得较高的增殖率。

开放式组织培养,由于不需要严格的无菌条件,因此对外植体消毒的要求不高。传统组培大多采用高毒的升汞消毒,虽然能够降低组培的污染率,但对外植体的伤害比较严重。本研究则采用低毒的75%酒精进行消毒,处理后直接将外植体接种在添加了抑菌剂的培养基中进行培养,不仅污染率降为0,褐化率也降为0,而且存活率大幅度提升,达到100%,找到了一种抑菌且存活率高的消毒方式。

3.3 再生培养基的植物生长调节剂配比

在培养基中添加适当的植物生长调节剂通常会促进器官及组织的再生,调节其浓度及配比,能提高外植体的再生频率^[32]。在本研究中,6-BA和NAA是适合新林1号杨开放式叶片不定芽诱导的生长调节剂,低浓度的NAA对叶片的生长及分化有明显的促进作用,在激素配比为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的分化培养基中获得的诱导率高达90%以上,而且萌生的芽点多,芽点翠绿。这与青杨、大青杨、香杨、欧美杨渤丰1号杨的研究结果相同^[33-36]。研究发现生长调节剂NAA的浓度对新林1号杨叶片诱导分化的影响显著,这与姜洋等^[34]对大青杨叶片不定芽诱导及花景阳等^[37]对加拿大杨茎段诱导分化的研究结果相同。

本研究选择低价、安全、高效的百菌清和头孢噻肟钠组合作为抑菌剂,在不定芽诱导、生根培养、再生苗移栽等方面建立了完整的开放式组培体系,不再需要高温高压灭菌,不再需要超净工作台,也不再需要严格的无菌环境,增强了组培苗的适应性,不仅极大地降低了成本,而且提高了组织培养的效率及质量,具有重要的现实意义,为未来杨属植物大规模工厂化育苗提供了重要的发展方向,同时也为其他树种提供了参考。有研究表明蔗糖在增殖过程中并非是必不可少的^[38-39],降低MS培养基浓度有利于开放式组培芽诱导,为进一步降低开放式组培的成本提供了方案,是下一步需要重点研究的内容。

本研究建立了新林1号杨开放式组织培养技术体系:以叶片为外植体,最适抑菌剂种类及浓度组合为 $0.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 百菌清+ $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢噻肟钠;最适不定芽分化培养基为MS+ $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,每个外植体平均不定芽数可达 (7.5 ± 1.0) ,诱导率为 $(91.57\pm 0.21)\%$;不定芽生根最

佳培养基为 1/2MS+IBA 0.3 mg·L⁻¹, 再生苗移栽成活率可达 95% 以上。

参考文献:

- [1] FRANCO J A. *Populus*. Flora Europaea[M]. London: Cambridge University Press, 1993.
- [2] LINNAEUS C. *Populus*. Linn. Sp. Pl. [M]. London: Bernard Quaritch Ltd, 1753.
- [3] 国家林业和草原局. 2021 年度中国林业和草原发展报告[M]. 北京: 中国林业出版社, 2022.
- [4] 杨成超, 孙良岩, 李荣全. 辽宁省杨树越冬伤害发生规律调查研究[J]. 辽宁林业科技, 2016(2): 10-11, 53.
- [5] 吴永良. 新林 1 号速生杨优良特性评价[J]. 防护林科技, 2018(8): 45-46.
- [6] HERMAN E B. Non-axenic plant tissue culture: Possibilities and opportunities[J]. Acta Hort, 1990(80): 233-238.
- [7] 周亚辉. 植物组培新方法——开放式组织培养研究概况[J]. 中国园艺文摘, 2018, 34(6): 57-59.
- [8] 李钰媛. 徐香猕猴桃开放式组织培养及工厂化育苗[D]. 南阳: 南阳师范学院, 2022.
- [9] 朱梦珠. 切花菊‘白扇’开放式组培快繁体系的建立[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
- [10] 解辉, 莫廷辉, 曾丽星. 次氯酸钠在香蕉开放式组织培养中的应用研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 886-890.
- [11] 吴桂容, 曲芬霞, 余炳锋. 贺州荸荠开放式组织培养体系建立[J]. 北方园艺, 2013(6): 110-112.
- [12] 李松, 刘欣, 刘红坚, 等. 次氯酸钠在甘蔗开放式组培苗繁殖中的应用研究[J]. 中国糖料, 2016, 38(6): 3-6.
- [13] 张志勇, 黄作喜, 齐泽民. 铁皮石斛开放式组织培养体系的建立[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(6): 1-5.
- [14] 王凯, 蔡晓妮, 王延峰. 山丹丹开放式组织培养抑菌剂的筛选[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(23): 140-142.
- [15] 刘雨轩, 胡宗琪, 汪雪蓉, 等. 杜鹃花开放式组织培养体系的建立及其遗传稳定性分析[J]. 福建农业学报, 2022, 37(3): 344-353.
- [16] 黄泰达, 莫廷辉. 香蕉开放式组织培养中增殖培养基成分优化研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9584-9586.
- [17] HUANG L J, WANG H, SHAHID M Q, et al. Chlorothalonil: An effective bacteriostatic agent for bud induction of *Acacia auriculiformis* under open condition (non-axenic)[J]. Plant Methods, 2019, 15: 5.
- [18] 姜武, 陈家栋, 段晓婧, 等. 一种多花黄精的开放式组织培养方法: CN113678737B[P]. 2022-05-17.
- [19] 孙占育, 曹彬, 李红芳, 等. 长柄扁桃开放式组培试验研究[J]. 现代农业科技, 2013(20): 66, 69.
- [20] 康俊. 真菌抑菌剂在马铃薯开放式组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(26): 108-110, 121.
- [21] 廖晴, 玛尔哈巴·吾斯满, 王继勋. 樱桃砧木吉赛拉组培快繁生产中玻璃化及污染分析[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(3): 537-541.
- [22] 崔刚. 植物开放式组织培养与工厂化育苗新模式的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [23] 张艳. 杉木开放式组织培养的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [24] 赵清华, 陈永波, 滕建勋, 等. 开放式组织培养下魔芋快繁技术研究[J]. 现代农业科技, 2011(13): 114-115.
- [25] 王鸿. 三种相思开放式组培快繁及扦插生根技术研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [26] 黄敏, 梁春辉, 李秀平, 等. 两种抑菌剂在铁皮石斛开放式组织培养的应用[J]. 北方园艺, 2018(12): 136-140.
- [27] 卢艳平, 陈玉军, 李玫, 等. 马占相思开放式组培体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(7): 107-114.
- [28] 冯连荣, 张兴芬, 尹杰, 等. 杨树农杆菌介导遗传转化中抗生素浓度的筛选[J]. 西南林业大学学报, 2014, 34(4): 31-35.
- [29] 李巍娜. 山杨转双价抗虫基因的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [30] 徐晨曦, 姜静, 李俊涛, 等. 几种抗生素对山新杨离体叶片不定芽再生的影响[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(1): 28-30.
- [31] 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.
- [32] 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): 317-325.
- [33] 杜晓艳, 韩素英, 梁国鲁, 等. 青海青杨高效再生体系的建立[J]. 林业科学研究, 2011, 24(6): 701-706.
- [34] 姜洋, 刘焕臻, 李开隆. 大青杨再生体系的优化[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(4): 28-32.
- [35] 李开隆, 靳春莲, 李明德, 等. 香杨的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(3): 281.
- [36] 崔旭东, 苏晓华, 张冰玉. 欧美杨渤丰 1 号高效组培再生体系建立[J]. 林业科学研究, 2012, 25(2): 157-162.
- [37] 花阳景, 林碧瑜, 张智勇, 等. 加拿大杨茎段愈伤组织诱导及不定芽分化研究[J]. 三明学院学报, 2014, 31(2): 79-83.
- [38] MARTIN K P. In vitro propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 102(2): 277-282.
- [39] GARCÍA-RAMÍREZ Y, BARRERA G P, FREIRE-SEIJO M, et al. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 137(2): 239-247.

[责任编辑 马迎杰]