

欧美杨 108 离体叶片和茎段再生体系的优化

许继飞¹,许继中²,赵吉¹,邹莉^{3*} (1. 内蒙古大学,内蒙古呼和浩特 010021;2. 内蒙古鄂尔多斯东胜区园林绿化事业局,内蒙古鄂尔多斯 017000;3. 东北林业大学,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的] 优化欧美杨 108 的无性繁殖再生体系的培养条件。[方法] 以欧美杨 108 无菌苗为材料,采用正交试验优化叶片直接分化和茎段愈伤组织分化再生体系的培养条件。[结果] 欧美杨 108 的叶片适宜在光照下进行直接再生分化,茎段适宜在光照下进行愈伤组织诱导再生分化。叶片不定芽分化的培养基为 MS 基本培养基(琼脂 7.00 g/L、pH 6.00、蔗糖 20 g/L)附加 0.60 mg/L 6-BA 和 0.20 mg/L NAA;茎段愈伤组织诱导培养基为 WPM 固体培养基附加 0.75 mg/L KT 和 1.50 mg/L 2,4-D。不定芽诱导生根培养基为 WPM 固体培养(蔗糖 30 g/L)附加 2.00 mg/L IBA。[结论] 优化了欧美杨 108 叶片的直接分化再生体系和茎段愈伤组织再生体系的培养条件,为其组织培养及遗传转化体系的构建提供了基础支持。

关键词 欧美杨 108;分化;再生;愈伤组织

中图分类号 S792.11 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-03946-05

Optimization of Regeneration System of Leaf and Stem for *Populus euramericana* 108

XU Ji-fei et al (Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the culture conditions of asexual reproduction system for *Populus euramericana* 108. [Method] Based on the orthogonal test design, the leaf and stem of aseptic seeding were taken as explants to study the optimization of regeneration system with direct differentiation from leaves and from callus differentiation from stems for *Populus euramericana* 108. [Result] Leaves of *Populus euramericana* 108 direct regenerate and differentiate appropriately under illumination, while stem segments prefer to regenerate and differentiate after callus induction under illumination. The differentiation medium of adventitious buds from leaves is MS medium (agar 7.00 g/L, pH 6.00, sucrose 20 g/L) added with 0.60 mg/L 6-BA and 0.20 mg/L NAA; Callus induction medium of stem segments is WPM solid medium added with 0.75 mg/L KT and 1.50 mg/L 2, 4-D. Induction medium for rooting of adventitious buds is WPM solid culture (sucrose 30 g/L) added with 2.00 mg/L IBA. [Conclusion] The culture conditions for regeneration system of differentiation direct from leaves and from callus of stems were optimized, which provides a basis support for its construction of tissue culture and genetic transformation system.

Key words *Populus euramericana* 108; Differentiation; Regeneration; Callus

目前,组织培养在杨树上的应用主要表现在以下方面:①难生根树种的扩大繁殖,如白杨系,因根蘖繁殖率低、扦插生根困难而难以运用传统方法大量繁殖。若用组织培养的方法,通过改变外植体的生长条件,则可在短期内获得大量组培苗。②运用组织培养的方法,控制植株的生长速度,不仅能避免种质资源受病虫害的侵袭,还能节省人力和空间。③组织培养系统可作为一种模式体系,用来分析基因转移、体细胞变异等方面的问题,研究杨树林木生长、分化及幼嫩、成熟和复幼的分子机制等^[1-2]。

欧美杨系列是中国林业科学院引进的杨树新品种。因其品质优良,已通过国家级技术鉴定,被国家林业局列为我国西部及华北地区重点推广树种。但是,随着欧美杨的广泛栽培,病虫害发生越来越严重,因此其抗性育种显得尤为迫切。采用基因工程技术开展转基因杨树的研究,是培育抗逆、抗虫和抗病杨树新品种的有效途径^[3]。作为植物基因转化受体系统,愈伤组织再生系统具有转化频率高的特点,但转化的外源基因遗传稳定性差;直接分化系统再生周期短、受体植物遗传稳定性好,但直接分化出芽比诱导愈伤组织要困难得多,转化频率低^[4-5]。鉴于这 2 种再生系统各有优缺点,故采用不同的培养方式,分别研究它们的高效再生条件。该研究以欧美杨 108 无菌苗为材料,通过对基本培养基的筛

选、激素种类和浓度的调整、培养条件的选择等优化了欧美杨 108 在直接分化再生系统和愈伤组织再生系统中的培养条件。

1 材料与方法

1.1 植物材料 供试材料为东北林大学林木遗传育种实验室提供的欧美杨 108(*Populus euramericana* cv. “114/690”). 无菌苗。

1.2 培养基、植物激素和维生素 所用的培养基有 MS、MH、WPM 和 NT,培养基的制备采用常规配制方法,在 121 ℃ 下高压蒸汽灭菌 15 min^[6-7]。所用植物激素有 6-BA、NAA、IBA、2,4-D 和 KT,所用维生素有 VB₁、VB₃、VB₆、VH、VM 和肌醇,均为 Phytechnology Laboratorie LLC 生产,所配溶液均保存于 0~4 ℃ 冰箱之中。植物激素贮存液浓度及配制^[6]:6-BA(0.50 mg/ml)和 KT(0.20 mg/ml)先溶于 1 mol/L HCl,再加水定容;NAA(0.10 mg/ml)和 IBA(0.40 mg/ml)先溶于 95% 乙醇,再加水定容;2,4-D(1.00 mg/ml)溶于 1 mol/L NaOH,加水定容。维生素贮存液浓度及配制:VB₁(0.40 mg/ml)、VB₃(0.50 mg/ml)、VB₆(0.50 mg/ml)、肌醇(100 mg/ml)和 VH(0.05 mg/ml)均用水直接溶解即可;VM(0.50 mg/ml)先溶于氨水,再用水定容。其中,MS 培养基中维生素的工作浓度为 VB₁(0.40 mg/L)、VB₃(0.50 mg/L)、VB₆(0.50 mg/L)、肌醇(100 mg/L)、VH(0.05 mg/L)和 VM(0.50 mg/L)。其他培养基中植物激素和维生素的用量根据需要而定。

1.3 培养条件 温度 25 ℃;光强 1 500~2 000 lux;湿度:60%~80%;暗培养:24 h 置于暗室中培养,光培养:光/暗为

基金项目 大唐国际钙镁渣综合利用合作项目(136003)。

作者简介 许继飞(1979-),男,内蒙古鄂尔多斯人,讲师,博士,硕士生导师,从事环境生物修复和环境生物技术方面的研究,E-mail:Jifeixu@126.com。* 通讯作者,教授,博士生导师,从事资源微生物研究,E-mail:zouli6616@yahoo.com.cn。

收稿日期 2013-03-29

16 h/8 h)。

1.4 优化方法

1.4.1 影响苗木愈伤组织和不定芽诱导因子的初步筛选。将欧美杨 108 的无菌苗外植体(将叶片横切成 2~3 个片段;茎切成长为 0.8~1.5 cm 的茎段)置于 MS、WPM、NT 和 MH 这 4 种培养基上,在光和暗 2 种条件下培养,在 4 种培养基中分别加固定浓度的激素,其中附加 6-BA(0.8 mg/L) + NAA(0.2 mg/L)的记为培养基 I,附加 KT(0.5 mg/L) + 2,4-D(2.0 mg/L)的记为培养基 II。然后通过对愈伤组织的诱导率、愈伤组织长势、分化率、褐化率等方面进行分析比较,选出愈伤组织和不定芽诱导的外植体类型、基本培养基、激素种类和光暗培养条件。

1.4.2 叶片不定芽分化诱导培养条件的优化。

1.4.2.1 培养基理化性状对叶片不定芽分化的影响。将欧美杨 108 的无菌苗叶片横切成 2 段,接种在以 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 为基础的 $L_9(3^4)$ 正交设计的分化培养基上,研究琼脂浓度(6、7、8 g/L)、pH 值(6、6.4、6.8)、蔗糖浓度(20、30、40 g/L)以及琼脂和 pH 的交互作用对叶片不定芽分化的影响,30 d 后观察叶片的生长分化情况。

1.4.2.2 激素水平对叶片不定芽分化的影响。在无菌条件下将叶片横切为 2~3 段,将其接种在以 MS 为基本培养基的 $L_{16}(4^5)$ 正交设计的不定芽分化培养基上诱导出芽,将 6-BA 和 NAA 各设置为 4 个浓度,分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 mg/L 和 0.05、0.10、0.15、0.20 mg/L。接种后定期观察叶片的分化率和黄化率,通过比较分析,筛选诱导叶片不定芽的最适激素浓度配比。

1.4.3 茎段愈伤组织诱导培养条件的优化。将欧美杨 108 的无菌苗茎段接种在以 WPM + 2,4-D + KT 为基础的 $L_9(3^4)$

正交设计的愈伤组织诱导培养基上,附加激素 2,4-D 和 KT,各设 3 个浓度分别为 1.0、1.5、2.0 mg/L 和 0.25、0.50、0.75 mg/L。接种后观察愈伤组织的诱导率和愈伤组织湿重,选出茎段愈伤诱导的最优激素组合。采用选出的愈伤诱导培养基进行茎段的愈伤诱导,10 d 后将这些愈伤组织转接入已优化出的不定芽诱导培养基中进行分化。

1.4.4 不定芽生根诱导培养条件的优化。

1.4.4.1 蔗糖浓度对不定芽生根及生长的影响。将 1.50 cm 以上的不定芽接种于 WPM + 0.40 mg/L IBA 培养基上,通过观察不定芽的生根及生长情况,得出蔗糖浓度对不定芽生根的影响。

1.4.4.2 培养基种类和激素水平对不定芽生根及生长的影响。选取生长状况良好的不定芽,接种于 1/2MS 和 WPM 培养基中诱导生根,2 种培养基中加入不同浓度的激素 IBA,将 IBA 设置为 5 个浓度,分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L,每个处理接种 10 棵,重复 2 次,采用多因素完全随机试验设计,共 20 个处理。统计生根时间、生根率和直接萌生根数等。通过分析,筛选最佳的生根培养基和激素浓度。

1.5 数据统计方法 所有数据统计分析由 SPSS 与 DPS 软件做方差分析与多重比较(LSD 法, $P \leq 0.05$ 和 $P \leq 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 培养基种类和培养条件对苗木愈伤组织和不定芽诱导的影响 在植物组织培养中,不同外植体材料、培养基类型、激素种类和培养条件对苗木愈伤组织和不定芽的诱导都会产生很大的影响^[8-9]。试验选用叶片和茎段为外植体材料,采用 MH、WPM、NT、MS 这 4 种培养基,BA 0.8 mg/L + NAA 0.2 mg/L 和 2,4-D 2.0 mg/L + KT 0.5 mg/L 激素,在光暗 2 种条件下进行了愈伤组织和不定芽诱导的研究,结果见表 1、2。

表 1 培养基 I 在光/暗培养条件下对叶片和茎段生长的影响

外植体	培养基I	光培养				暗培养			
		愈伤率//%	分化率//%	褐化率//%	愈伤评价	愈伤率//%	分化率//%	褐化率//%	愈伤评价
叶片	MH	0	92.31	0	+	0	0	22.22	+
	WPM	7.14	92.86	7.14	++	0	25.00	0	++
	NT	21.43	100.00	0	++	41.18	35.29	0	++
	MS	100.00	100.00	0	+++	18.75	0	0	++
茎段	MH	76.92	11.32	0	++	0	0	0	+
	WPM	25.00	12.36	0	+++	20.00	0	0	++
	NT	100.00	0	0	++	100.00	16.27	0	+++
	MS	50.00	22.30	0	+++	50.00	0	0	+++

注: + 基本上没有愈伤长出; ++ 愈伤组织极小,不形成团块,仅有一层突起; +++ 叶片愈伤组织面积较大,但是较为疏松,白绿色,没有明显的生长点; ++++ 叶片伤口处及茎四周均长愈伤组织,长势较好,有的将茎包住,白色透明; +++++ 愈伤组织处于旺盛生长期,从叶片伤口和茎段两端及中部长出,将茎段包住,愈伤组织嫩绿、致密、长势最好。

由表 1 可以看出,光暗 2 种培养条件对叶片和茎段愈伤率及愈伤生长的影响不大。但是叶片和茎段的分化率在光培养条件下显著优于暗培养。在光培养条件下,叶片的不定芽分化率均达到了 90% 以上,而茎段的不定芽分化率最高仅有 22.30%。因此,适宜选用叶片在光照条件下进行不定芽的诱导。由表 2 可以看出,光暗 2 种培养条件对叶片和茎段的愈伤诱导率、分化率和愈伤生长的影响不大。在暗培养条

件下,除了 WPM 培养基以外,其他培养基上的愈伤组织生长 2 周左右开始出现褐化,并且随着时间的推移,褐化的愈伤组织越来越多。在光培养下,叶片和茎段的愈伤组织诱导较好,且愈伤诱导率差异不显著。但是由叶片诱导出的愈伤组织生长缓慢,先为白色,后部分变为褐色,呈水渍状,且这种愈伤组织分化不定芽的能力差。由茎段诱导的愈伤组织先为淡黄色,后呈绿色,且紧实有光泽,不定芽分化率较高。因

此,适宜选择茎段在光照条件下诱导愈伤组织形成。

由表 1 和 2 可以看出,在光培养条件下,培养基 I 的叶片和茎段的分化率显著高于培养基 II;培养基 II 的叶片和茎段愈伤率和愈伤生长显著优于培养基 I。当培养基 I 中的基本培养基是 MS 和 NT 培养基时,叶片不定芽的分化率最高,均为 100%。当培养基 II 中的基本培养基为 WPM 培养基时,叶片和茎段的愈伤率为 100%,愈伤长势最好。在暗培养条件下,培养基 I 的叶片和茎段的分化率显著高于培养基 II;

培养基 II 的叶片和茎段愈伤率和愈伤生长状况显著优于培养基 I。但是,虽然培养基 I 有利于不定芽的诱导,但是其最高的分化率也仅为 35.92%,远远低于光培养条件下的分化率 100%。在培养基 II 中,WPM、MH、MS 和 NT 这 4 种基本培养基对茎段愈伤组织诱导的差别不大,其愈伤率及愈伤长势都较好,但是愈伤组织的褐化现象严重。因此,适宜选择培养基 I 中的 MS 或 NT 培养基用于不定芽的分化诱导;选择培养基 II 中的 WPM 培养基用于愈伤组织诱导。

表 2 培养基 II 在光暗培养条件下对叶片和茎段生长的影响

外植体	培养基II	光培养				暗培养			
		愈伤率//%	分化率//%	褐化率//%	愈伤评价	愈伤率//%	分化率//%	褐化率//%	愈伤评价
叶片	MH	100	0	0	++++	100	0	23.53	+++
	WPM	100	0	0	+++++	100	0	5.36	+++
	NT	100	0	0	++++	100	0	37.50	+++++
	MS	100	0	0	++++	100	0	22.22	+++
茎段	MH	100	0	0	++++	100	0	76.92	+++++
	WPM	100	0	0	+++++	100	0	10.17	+++++
	NT	100	0	0	++++	100	0	21.43	+++++
	MS	100	0	0	++++	100	0	14.29	+++++

2.2 培养基理化性状对叶片不定芽分化的影响 培养基的理化性状包括硬度、pH 及渗透势(蔗糖浓度)等,它们对苗木的分化和生长有着极为重要的影响^[8]。培养基硬度与琼脂用量呈线性相关,琼脂一方面起凝固剂作用,即固化后作为培养材料的支持物;另一方面其有吸附能力,可除去细胞代谢废物。pH 对培养基中一些物质的溶解度、植物材料的生长和琼脂的凝固效果有重要影响。培养基中的蔗糖,一方面为植物材料的生长和发育代谢提供所需的能量和底物,另一方面也影响培养基中的渗透势,培养基中的渗透势反过来又对培养物的代谢起到调节作用^[8,10]。

该研究采用 L₉(3⁴) 正交试验设计,共 9 个处理(表 3),对琼脂、pH 和蔗糖 3 个影响不定芽分化的因素进行分析,得出了这 3 个因素在不同水平下叶片分化率和黄化率,结果如图 1 所示。通过方差分析可知,琼脂、pH、蔗糖浓度以及琼脂和 pH 的交互作用对叶片分化率和黄化率的影响均达到极显著水平,其中 pH 对叶片分化影响最大,其次是琼脂浓度,影响最小的是蔗糖浓度。琼脂浓度是影响叶片黄化的最重要因子,影响最小的是琼脂和 pH 的交互作用。

为进一步研究各因素在不同水平下对叶片分化和黄化的影响,对琼脂、pH 和蔗糖浓度进行 LSD 多重比较分析,发现随着琼脂浓度的增加,分化率逐渐下降,而黄化率逐渐上升。当琼脂为 8.0 g/L 时,其分化率为 51.77%,而黄化率则高达 84.28%。就 pH 来说,当 pH 为 6.0 时,分化率达到了最大,为 94.53%;当 pH 为 6.8 时,虽然其分化率要大于 pH 6.4,但是其黄化率达到了 58.74%。因此,培养基 pH 应以 6.0 左右为宜。蔗糖浓度虽然不如琼脂和 pH 对叶片分化的影响大,但是过高或过低的蔗糖浓度都会降低叶片分化率,而使叶片的黄化率升高。为了获得叶片不定芽分化的最优培养基,对琼脂和 pH 交互作用进行多重比较分析。

表 3 琼脂、pH、蔗糖水平设计

处理	琼脂//g/L	pH	蔗糖//g/L
1	6	6.00	20
2	6	6.40	30
3	6	6.80	40
4	7	6.00	30
5	7	6.40	40
6	7	6.80	20
7	8	6.00	40
8	8	6.40	20
9	8	6.80	30

分析可知(图 1),处理④、⑦与其他处理差异显著。处理④、⑦叶片分化率分别为 97.60% 和 93.50%,黄化率分别为 4.30% 和 54.85%,适宜用做叶片分化培养基的处理为④,即琼脂 7.0 g/L、pH 6.0 和蔗糖 30 g/L。

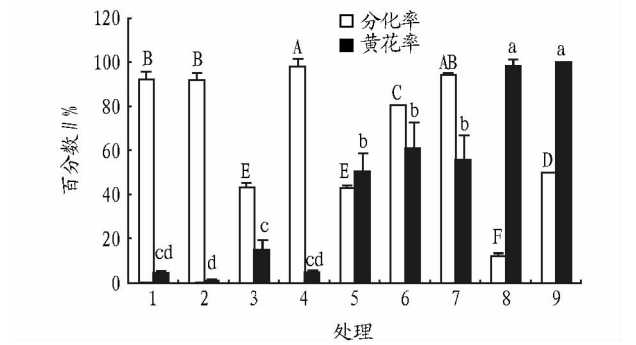


图 1 培养基性状对叶片分化和黄化的影响

2.3 激素水平对叶片不定芽分化的影响 筛选适宜的培养基是组织培养成功的关键,而培养基中各种激素的含量及其合理配比尤其重要。培养基中激素的种类和浓度配比的不同影响了内源激素的分布,从而造成外植体生长和分化的能力的不同^[11-12]。KT、6-BA 和 ZT 等细胞分裂素有促进芽分

化的作用,而生长素 IAA、IBA、NAA 和 2,4-D 等在组织培养中的主要作用是与细胞分裂素配合,共同促进不定芽的分化。该研究采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计共 16 个处理研究了 NAA、6-BA 不同配比对杨树叶片分化的影响,结果见表 4。根据上述试验结果,选取 MS + 6-BA + NAA 作为直接诱导杨树不定芽分化的培养基,研究 6-BA 和 NAA 不同浓度配比对叶片分化率的影响。

表 4 激素水平对叶片不定芽诱导的影响

处理	激素浓度//mg/L			不定芽分 化率//%
	6-BA	NAA	6-BA: NAA	
1	0.2	0.05	4:1	97.50
2	0.2	0.10	4:2	75.00
3	0.2	0.15	4:3	95.00
4	0.2	0.20	4:4	85.00
5	0.4	0.05	8:1	65.00
6	0.4	0.10	8:2	77.50
7	0.4	0.15	8:3	50.00
8	0.4	0.20	8:4	72.50
9	0.6	0.05	12:1	92.50
10	0.6	0.10	12:2	12.50
11	0.6	0.15	12:3	97.50
12	0.6	0.20	12:4	100
13	0.8	0.05	16:1	17.50
14	0.8	0.10	16:2	82.50
15	0.8	0.15	16:3	100
16	0.8	0.20	16:4	65.00

在试验过程中发现,叶片先产生少量愈伤组织,然后在愈伤上分化不定芽。叶片在接种 4 d 左右表现出明显的膨大和增厚;叶柄的切口端在接种 5 d 后形成明显可见的愈伤组织;10 d 后叶柄的愈伤组织长至黄米粒大小,此时开始在叶脉切口及叶边缘出现愈伤组织,15 d 后这些愈伤组织开始进入分化状态。对不定芽的分化率进行方差分析和对 2 种激素的不同浓度进行 LSD 检验。通过方差分析可知,叶片不定芽的分化率在不同浓度 6-BA、NAA 及二者的交互作用的情况下差异极显著。由表 5 的 LSD 多重比较表明,当 6-BA 浓度为 0.15 mg/L 时,不定芽分化率最高,6-BA 浓度高于或低于 0.15 mg/L 都会降低叶片不定芽的分化率;当 NAA 浓度为 0.20 mg/L 或 0.60 mg/L 时,不定芽分化率显著高于另外 2 个 NAA 浓度 0.4 mg/L 和 0.8 mg/L。

表 5 激素浓度对叶片分化率影响的多重比较

NAA 浓度 mg/L	分化率 平均数 %	LSD 检验		6-BA 浓度 mg/L	分化率 平均数 %	LSD 检验	
		0.05	0.01			0.05	0.01
0.2	72.88	a	A	0.05	60.15	c	BC
0.4	54.72	b	B	0.10	51.91	d	C
0.6	68.19	a	A	0.15	74.83	a	A
0.8	58.44	b	B	0.20	67.35	b	AB

在 6-BA 和 NAA 二者的共同作用下,处理 12 和 15 叶片不定芽分化率最高达到了 100%;其次为处理 1 和 11,其分化率为 97.5%;处理 8 分化率最低为 72.5%。可见,叶片不定

芽分化不仅需要适宜的生长素与细胞分裂素,而且二者的比例也是影响分化的重要因素。因此,6-BA 要与适量 NAA 配合使用才能够达到不定芽分化的目的。试验表明,处理 12 和 15 是诱导杨树叶片不定芽分化的最佳激素配比,即 6-BA 0.60 mg/L + NAA 0.20 mg/L 或者 6-BA 0.80 mg/L + NAA 0.15 mg/L。

2.4 激素水平对茎段和叶柄愈伤组织诱导的影响 愈伤组织的形成是一个植物体材料、培养基成分和外界环境条件诸因素之间相互作用的复杂过程。在诱导愈伤组织培养基中可调节幅度最大的成分是植物生长调节物质。对多数植物材料来说,2,4-D 是愈伤组织诱导最有效物质,同时加入一定量的 KT 会对组织和细胞的生长有帮助^[13]。该试验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计共 9 个处理研究了 2,4-D、KT 以及二者的交互作用对欧美杨 108 茎段愈伤诱导生长的影响,表 6 所示为茎段的愈伤生长情况。

表 6 激素水平对茎段和叶柄愈伤组织诱导的影响

处理	激素浓度//mg/L		2,4-D: KT	茎段	
	2,4-D	KT		愈伤率//%	每个愈伤鲜重//mg
1	1.00	0.25	24:6	79.98 ± 1.87	152.28 ± 2.88
2	1.00	0.50	24:8	91.61 ± 1.82	181.24 ± 2.05
3	1.00	0.75	24:18	100	151.69 ± 2.98
4	1.50	0.25	24:4	95.73 ± 0.66	131.70 ± 1.34
5	1.50	0.50	24:6	99.33 ± 0.95	223.89 ± 4.53
6	1.50	0.75	24:12	100	230.61 ± 8.39
7	2.00	0.25	24:3	100	194.80 ± 2.20
8	2.00	0.50	24:6	98.78 ± 1.73	126.89 ± 1.69
9	2.00	0.75	24:9	90.68 ± 1.45	161.77 ± 1.44

通过方差分析可知,2,4-D、KT 以及二者的交互作用对茎段愈伤诱导的影响均达到了极显著水平。由表 7 多重比较表明,当 2,4-D 为 1.50 mg/L 时,茎段愈伤鲜重最高,为 195.40 mg,其他 2 个水平间差异不明显,但是愈伤鲜重均有不同程度的下降;当 KT 为 0.75 mg/L 时,茎段愈伤鲜重最高,为 181.36 mg,随着 KT 浓度的降低,茎段愈伤鲜重呈减少趋势;在 2 种激素共同作用下,当 2,4-D 为 1.50 mg/L,KT 为 0.75 mg/L 时,茎段的愈伤鲜重在全部处理中最高,为 188.50 mg,随着二者浓度比值的增加或降低,其愈伤鲜重均有不同程度的下降。因此,采用 2,4-D 和 KT 诱导茎段的最佳配比为 2:1,即当 2,4-D 1.50 mg/L,KT 0.75 mg/L 时,茎段愈伤鲜重最大。然后在适当的条件下,将愈伤组织置于分化培养基上,进行器官发生而产生分化芽,进而再生植株,由茎段诱导的愈伤组织 2 周左右不定芽的分化率可以达到 75% ~ 85%。

表 7 激素浓度对茎段愈伤鲜重影响的多重比较

2,4-D 浓度 mg/L	鲜重 平均数 mg	LSD 检验		KT 浓度 mg/L	鲜重 平均数 mg	LSD 检验	
		0.05	0.01			0.05	0.01
1.00	161.15	b	B	0.25	159.59	c	C
1.50	195.40	a	A	0.50	177.34	b	B
2.00	161.74	b	B	0.75	181.36	a	A

2.5 蔗糖浓度对不定芽生根及生长的影响 采用单因素随机试验设计进行不定芽的生根诱导,设置 10、20、30、40、50 g/L 共 5 种蔗糖浓度梯度进行完全随机试验,通过记录生根

率、平均根数、根长、苗高和叶片重量等指标来比较不同蔗糖浓度对苗木生根及生长情况的影响,结果见表 8。
方差分析表明,蔗糖浓度对苗木主根数的影响达到了显

表 8 蔗糖浓度对不定芽生根及生长的影响

处理	根数//个	根长//cm	生根率//%	苗高//cm	叶片重量//mg	根重//mg
1	5.17 ± 1.47a	8.05 ± 1.85a	100	4.15 ± 1.29	297.50 ± 12.00a	197.38
2	2.67 ± 1.51b	6.20 ± 3.11ab	100	1.67 ± 1.01	191.17 ± 135.12ab	130.88
3	2.83 ± 0.98b	5.22 ± 2.42b	100	1.35 ± 0.36	130.83 ± 13.88b	98.80
4	3.83 ± 1.17ab	2.90 ± 0.26bc	100	0.57 ± 0.35	65.60 ± 24.78b	49.74
5	4.67 ± 2.94ab	1.97 ± 1.31c	83.33	0.13 ± 0.12	39.33 ± 20.47b	38.60

著水平,而对叶片重量、苗高和根长 3 项指标的影响达到了极显著水平。进一步对各水平进行多重比较,检验结果表明蔗糖浓度在 20 g/L 时对苗木根长等指标的影响与其他水平之间差异显著。随着蔗糖浓度的升高所测苗木的各项指标都有不同程度的下降,当蔗糖浓度为 40 g/L 时,苗木出现黄化现象,基本未见有生长。可以得出,培养基中的蔗糖浓度为 20 g/L 时,对苗木的生根及生长是最适宜的。

2.6 培养基种类和激素浓度对不定芽生根及生长的影响 当分化芽增殖到一定数量后要使部分培养物分流,从而进入壮苗与生根途径,若不能将分化芽适时大量转移到生根

培养基上,就会使久不转移的芽苗发黄老化或因过分拥挤而致使无效苗增多。当分化芽长成一株小苗时,需要将其茎段转入生根培养基中进行继代培养^[14]。该研究采用 WPM 和 1/2MS 培养基附加 IBA 进行分化芽生根培养,30 d 后统计生根及生长情况,结果见表 9。不定芽在 WPM 培养基中,大约 7 d 便可生根,所生的根细而长,主根较少侧根较多,根的颜色发红,在各个处理上的生根率都为 100%;而 1/2MS 培养基中,IBA 是其茎段生根的必要条件,大约 9 d 开始生根,所生的根粗而短,主根较多侧根较少,根的颜色为白色,除了未加 IBA 处理的生根率为零,其他处理的生根率也达到了 100%。

表 9 培养基种类和激素浓度对不定芽生根及生长的影响

处理	因素		生根率	叶片重量	主根长度	苗高
	培养基	IBA//mg/L	%	mg	cm	cm
1	WPM	0	100	194.69 ± 4.05	10.50 ± 0.50	2.53 ± 0.80
2	WPM	0.5	100	114.73 ± 3.87	4.47 ± 0.93	1.13 ± 0.38
3	WPM	1.0	100	133.91 ± 4.19	5.07 ± 1.05	2.17 ± 0.59
4	WPM	1.5	100	107.31 ± 3.50	2.10 ± 0.70	1.40 ± 0.36
5	WPM	2.0	100	209.64 ± 7.81	4.10 ± 0.46	3.43 ± 2.11
6	1/2MS	0	0	15.09 ± 1.42	0	0
7	1/2MS	0.5	100	142.11 ± 2.27	3.60 ± 0.85	1.40 ± 0.20
8	1/2MS	1.0	100	97.42 ± 4.41	3.33 ± 0.35	0.27 ± 0.06
9	1/2MS	1.5	100	144.22 ± 4.86	4.47 ± 0.25	0.53 ± 0.35
10	1/2MS	2.0	100	78.81 ± 2.28	3.30 ± 0.10	0.43 ± 0.21

方差分析表明,培养基对苗木的苗高和叶片重量的影响均达到了极显著水平,对苗木根长的影响也达到了显著水平;而 IBA 在 0~2.00 mg/L 的范围内,对苗木生根及生长的影响不明显。综合上述观察和分析结果,WPM 培养基较 1/2MS 培养基更适合茎段的生根及生长,最佳培养基为 WPM + 2.00 mg/L IBA。

3 结论

通过对 MS、MH、WPM 和 NT 培养基的筛选,6-BA、2,4-D、KT 和 NAA 激素种类和浓度的调整以及光暗培养时间的选择,优化得到了欧美杨 108 再生体系的培养基及培养条件。研究所获得的结论主要有:①欧美杨 108 直接分化再生体系适宜选用叶片为外植体材料,采用 MS(琼脂 6.0 g/L,pH 6.0、蔗糖 20 g/L) + 0.6 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基,在光照培养条件下诱导不定芽。②欧美杨 108 愈伤组织再生体系适宜选用茎段为外植体材料,采用 WPM + 0.75 mg/L KT + 1.5 mg/L 2,4-D 培养基,在光照培养条件下诱导

愈伤组织。③欧美杨 108 不定芽的生根诱导适宜采用 WPM (蔗糖 30 g/L) + 2.0 mg/L IBA 培养基。

参考文献

[1] 赵华燕,卢善发,晁瑞堂.杨树的组织培养及其基因工程研究[J].植物学通报,2001,18(2):169-176.
[2] 刘岩,周军,段安安,等.杨树组织培养的研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(4):2116-2119.
[3] 张红梅,夏新莉,尹伟伦.毛果杨的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2009,45(1):53-54.
[4] 邹莉,孙婷婷,许继飞,等.根癌农杆菌介导欧美杨 108 遗传转化体系的优化[J].安徽农业科学,2012,40(32):15585-15587,15616.
[5] 林善枝,肖基许,张志毅.杨树抗性基因工程研究进展[J].北京林业大学学报,2000,22(6):85-88.
[6] 李红.杨树高频再生体系的建立及耐盐碱基因转化研究[D].大连:辽宁师范大学,2004:7.
[7] WINTON L. Plantlets from aspen tissue culture[J]. Science,1986,160:1234-1235.
[8] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:1,78,90-92.
[9] XU J,WANG Y Z,ZHANG Y X,et al. Rapid multiplication and rooting of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd[J]. Acta Physiol Plant,2008,30(1):129-132.

下采矿巷道复杂,塌陷区整体的恢复治理在客观上存在一定困难。因此,该地区的土地综合治理以地表变形监测、土地破坏程度全面调查、塌陷坑回填、土地整平和生态恢复为主。

3.1.1 地表变形监测。按地表移动观测规程要求,设置地面塌陷监测点。采用全站仪观测炉子坪采空区地面各监测点水平、垂直位移情况。监测周期为每月一次,雨季或出现异常情况加密监测。

3.1.2 土地破坏程度全面调查。组织专人对炉子坪采空区土地破坏程度进行全面详细调查。调查内容主要包括采空区范围内房屋破坏、耕地变形情况和现有塌陷坑数目、位置、面积、幅度等。

3.1.3 塌陷坑回填。剥离塌陷坑表层的可耕作土壤,就近选取土石比为 7:3~8:2 的土石方对塌陷坑进行回填。回填过程中须对土石方进行分层(单层厚不大于 0.5 m)夯实,增加土体强度。回填至地表时,将收集的可耕作肥土或壤成分和肥力相近的客土覆盖于土石方表面^[6],覆土厚度不小于 0.5 m。

3.1.4 土地平整。对变形耕地和回填后的塌陷坑进行土地平整。平整时采取就近原则,挖取高于设计面标高的土方回填至附近低于设计面标高的地块。平整过程中不可在地表形成凹槽状地形,以防积水和地表水渗入。

3.1.5 生态恢复。对土地进行深翻耕,保证翻耕后的土层厚度满足适宜耕种土壤的有效厚度。翻耕后选择地面平整,水利条件好的土地复垦为耕地。其余土地在地表撒播草籽,并种植生长快、适应及抗病虫害能力强的速生杨,将其恢复为林地。

3.2 矿渣堆场土地综合整治 磷矿区土地的恢复治理必须兼顾经济适用性与实际可行性。炉子坪磷矿山高坡陡,交通条件较差,矿渣堆总体积约 13 万 m³,矿渣整体清方运输成本较高。黄锴等通过大量实验,发现磷矿渣可作为掺合料应用在水泥生产中^[7]。因此在磷矿渣场土地治理时,可将成分适合的磷矿渣优先进行回收利用,不能利用的矿渣采取设置挡土墙、排水沟等措施保证矿渣堆的稳定性,并对其进行覆土绿化。

3.2.1 磷矿渣回收利用。磷矿渣替代粉煤灰作为掺合料掺入混凝土后,可提高混凝土的抗拉强度和极限拉伸值。选用磷矿渣成分指标符合水泥生产国家标准(GB125-92),且 MgO 含量较高、CaO/SiO₂ 值较大的磷矿渣进行回收加工^[8],作为混凝土的掺合料使用。

3.2.2 设置挡土墙。矿区内矿渣堆场整体稳定性较差,必须设置挡土墙,以确保渣堆场的稳定。挡墙尽可能设置在堆场前缘的平缓或较平缓斜坡地带,并选用强度较高的地基,以确保挡墙自身的稳定和支挡效果的发挥。尽量减少对周

边环境条件的扰动破坏,避免影响自然斜坡的稳定性。

3.2.3 设置截、排水沟。在矿渣堆场内设置截、排水沟,充分拦截并排泄地表水,防止地表水大量渗入矿渣堆场,影响矿渣堆场的稳定性,并减小尾矿淋滤水对地表水的污染。截、排水沟设置于矿渣堆场与自然斜坡交接部位,并尽可能选用已有自然冲沟、洼槽布设以减少对周边环境条件的扰动破坏,减少开挖工程量。

3.2.4 坡面修整。挡土墙和截、排水沟修建完毕后,应对挡土墙后的矿渣堆斜坡进行修整,使矿渣堆的坡面较为平整,坡度不大于其自然休止角。既能保证矿渣堆整体稳定性,又为后期坡面植物生长创造有利条件。

3.2.5 覆土绿化。选择适宜当地植物生长的土壤,对修整过的矿渣坡面进行覆土,覆土厚度不小于 0.5 m。覆土后对坡面进行夯实,以增加土体强度。在坡面上撒播草籽,并种植速生杨,将矿渣堆恢复为林地。

4 结语

(1)炉子坪磷矿开采严重破坏了矿区土地资源破坏。目前,矿区土地破坏面积达 12 hm²,耕地破坏面积 7.86 hm²。其中由地面塌陷引起的耕地破坏面积为 6.93 hm²,由矿渣堆放引起的耕地破坏面积为 0.935 hm²,给当地社会农业经济发展和生态环境造成了极大的影响。

(2)土地综合恢复治理的核心是因地制宜,还地于民。在充分调查了解该矿区土地破坏现状的基础上,提出兼顾经济适用性和实际可行性的多种措施,将土地复垦为林地或耕地,有效地增加区内的耕地、林地、建设用地的面积。

(3)炉子坪磷矿土地的综合恢复治理是缓解人地矛盾,促进农业和矿业协调发展的利民工程。通过土地综合恢复治理,矿区百余户居民免受地质灾害威胁,使矿区农民群众有地可耕,自然生态环境得以改善,为当地经济的可持续发展打造良好的环境。

参考文献

- [1] 郭维君,陈书文,陈学军,等.广西金属矿山农业复垦主要问题及对策[J].矿业研究与开发,2007,32(2):82-85.
- [2] 李锦文.浅析宜昌磷矿开发中存在的问题及对策[J].化工矿产地质,2000,22(3):184-187.
- [3] 秦祖国.树空坪矿区薄矿体开采方式探讨[J].化学矿物与加工,2011(10):34-35.
- [4] 王金应.磷矿尾库水的淋滤对土壤水的污染[J].环境科学与技术,1996,74(3):11-14.
- [5] 丁汉锋.矿区地质环境评价与治理恢复[D].开封:河南大学,2012.
- [6] 郭建一.矿山土地复垦技术与研究评价[D].沈阳:东北大学,2009.
- [7] 孙洪丽,刘全军,林文军.我国磷矿发展现状及可持续性发展[J].云南冶金,2006(4):13-15.
- [8] 曹庆明.磷矿渣——新型混凝土掺合料的应用[J].水利水电科技进展,1999,19(2):61-63.
- [9] 物理学报,1980,22(4):311-315.
- [10] 马宗新,高玉祥,赵红,等.三倍体速生杨树的组织培养及应用[J].安徽农业科学,2004,32(4):715-716.
- [11] 杨传平,郑琼,马旭俊,等.欧美杨“山地1号”组织培养再生系统的建立[J].分子植物育种,2006,4(4):579-582.
- [12] 陈维伦,郭东红,杨善英,等.山新杨(*Populus davidiana* × *P. bolleana* Louche) 叶外植体的器官分化以及生长调节物质对它的影响[J].植物学报,1980,22(4):311-315.
- [13] 沈周高,项艳,蔡诚,等.3个杨树品种叶片再生体系的建立[J].林业科学,2006,22(11):90-96.
- [14] YAN H B, LIANG C X, YANG L T, et al. In vitro and ex vitro rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant[J]. Acta Physiol Plant, 2010, 32(1):115-120.

(上接第 3950 页)