



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103636498 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201310626729. 5

CN 1299586 A, 2001. 06. 20,

(22) 申请日 2013. 11. 29

CN 101715731 A, 2010. 06. 02,

JP H07308137 A, 1995. 11. 28,

(73) 专利权人 黑龙江省林业科学研究所

地址 150081 黑龙江省哈尔滨市哈平路 134 号

白卉等. 中国山杨与美洲山杨杂种腋芽离体快速繁殖与规模化生产. 《植物生理学通讯》. 2010, 第 46 卷 (第 1 期), 第 57-58 页.

(72) 发明人 白卉 王臣 李春明 邢亚娟

王艳敏 李海霞 卢慧颖 卓泳杉 郭成博

审查员 方晓云

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 侯静

(51) Int. Cl.

C12N 5/04(2006. 01)

A01H 4/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101897296 A, 2010. 12. 01,

CN 102919128 A, 2013. 02. 13,

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

山杨良种银 × 山 1333 组织培养基

(57) 摘要

山杨良种银 × 山 1333 组织培养基, 它涉及一种山杨良种银 × 山 1333 组织培养基。本发明要解决现有培养基对山杨与银白杨的杂交子代山杨良种银 × 山 1333 再生组织离体快繁效果差的问题。本发明山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基, 不定芽分化培养基由 YS 培养基与 6- 苄基氨基嘌呤和激动素组成; 继代增殖培养基由 YS 培养基与 6- 苄基氨基嘌呤和萘乙酸组成; 不定芽生根培养基由 YS 培养基与激素 A 组成, 所述的激素 A 由吲哚丁酸、吲哚乙酸和萘乙酸中的一种或几种按任意比例组成。本发明应用于植物组织培养领域。

1. 山杨良种银 × 山 1333 组织培养基,其特征在于山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基;

其中,所述的不定芽分化培养基由 YS 培养基与 1.0mg/L 的 6- 苄基氨基嘌呤和 0.1mg/L 的激动素组成;

所述的继代增殖培养基由 YS 培养基与 0.5mg/L 的 6- 苄基氨基嘌呤和 0.03mg/L 的萘乙酸组成;

所述的不定芽生根培养基由 YS 培养基与激素 A 组成,所述的激素 A 由 1.5mg/L 的吲哚丁酸和 0.01mg/L 的萘乙酸组成;

其中,所述的 YS 培养基是由大量元素、微量元素、铁盐、有机成分、强度为 1300g/cm² 的琼脂和水组成;

每 1L 的 YS 培养基中所述的大量元素由浓度为 340mg/L 的 KNO₃、400mg/L NH₄NO₃、96mg/L 的 CaCl₂ · 2H₂O、370mg/L 的 MgSO₄ · 7H₂O、550mg/L 的 Ca(NO₃)₂ · 4H₂O、600mg/L 的 K₂SO₄和 370mg/L KH₂PO₄组成;

每 1L 的 YS 培养基中所述的微量元素由浓度为 0.83mg/L 的 KI、6.2mg/L 的 H₃BO₃、22.3mg/L 的 MnSO₄ · 4H₂O、8.6mg/L 的 ZnSO₄ · 7H₂O、0.25mg/L 的 Na₂MoO₄ · 2H₂O 和 0.25mg/L 的 CuSO₄ · 5H₂O 组成;

每 1L 的 YS 培养基中所述的铁盐由浓度为 27.8mg/L 的 FeSO₄ · 7H₂O 和 37.3mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

每 1L 的 YS 培养基中所述的有机成分为蔗糖 20g/L、5mg/L 的盐酸硫胺素、0.5mg/L 的烟酸、0.6mg/L ~ 3mg/L 的盐酸吡哆醇、100mg/L 的肌醇和 2mg/L 的甘氨酸;

每 1L 的 YS 培养基中强度为 1300g/cm² 琼脂的质量含量为 5.5g/L;

所述的 YS 培养基的 pH 为 5.5。

山杨良种银 × 山 1333 组织培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及一种山杨良种银 × 山 1333 组织培养基,涉及植物组织培养领域。

背景技术

[0002] 杨树是我国北方普遍公认的用材林、防护林和园林绿化的优质速生树种,但是在近半个世纪引选的 1000 多个品种中,没有适于林区山地用材林造林的品种。而我国是以山地著称于世的国家,山区占国土面积的三分之二以上,因此开展山地杨树新品种推广转化十分必要。东北地区乡土树种中的山杨(*Populus davidiana* Dode)分布广泛、适应性强、材质优良,适于林区山地用材林的营造。但是其生长速度缓慢,年平均胸径生长仅 4mm 左右;扦插生根十分困难,繁殖率低;造林难成活,保存率低;心腐严重,20 年生山杨心腐率高达 70%,因此过去利用山杨造林很少。

[0003] 黑龙江省林业科学研究所从“六五”到“九五”,主持了《新选杨树用材和绿化品系研究》黑龙江省科技重点项目和《山杨良种选育》国家科技攻关专题,历经二十年,从不同种源,不同杂交组合的 1800 多个无性系中,选育出了银 × 山 1333 (*P. alba* × *P. davidian* CL. '1333'),2010 年该品种通过了黑龙江省森工林区林木品种审定委员会组织的良种审定。该良种是适于林区山地营造速生丰产用材林的优质山杨杂交新品种,其干形通直,雄株,不飞絮,干皮白色,抗性强,生长快,材质好,17 年生胸径达 17.99cm ~ 19.00cm,树高达 15.37m ~ 16.60m,单株材积 $0.87835\text{m}^3 \sim 1.0866\text{m}^3$,是山地杨树用材林、工业原料林、纸浆原料林等速生丰产林和城市园林绿化基地建设不可多得良种资源。良种与乡土山杨相比较:抗逆性高提高 17%,材积生长量实际增益提高 61.47%,木材基本密度提高 6.61%。山杨良种银 × 山 1333 填补了我国北方缺乏山地造林阔叶树速生树种的空白。

[0004] 山杨根分蘖能力强,但扦插生根极为困难,这影响了山杨良种银 × 山 1333 的规模化繁殖与推广。现有技术中也没有利用组织培养技术繁育山杨良种银 × 山 1333 的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有培养基对山杨与银白杨的杂交子代山杨良种银 × 山 1333 再生组织离体快繁效果差的问题,而提供山杨良种银 × 山 1333 组织培养基。

[0006] 本发明山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基;

[0007] 其中,所述的不定芽分化培养基由山杨良种银 × 山 1333 组织基础培养基(YS 培养基)与 0.1mg/L ~ 1.5mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤和 0mg/L ~ 0.1mg/L 的激动素组成;

[0008] 所述的继代增殖培养基由 YS 培养基与 0.1mg/L ~ 1.0mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤和 0mg/L ~ 0.05mg/L 的萘乙酸组成;

[0009] 所述的不定芽生根培养基由 YS 培养基与激素 A 组成,所述的激素 A 由 0.1mg/L ~ 2.0mg/L 的吲哚丁酸、0.1mg/L ~ 2.0mg/L 的吲哚乙酸和 0.01mg/L ~ 2.0mg/L 的萘乙酸中的一种或几种按任意比例组成;

[0010] 其中,所述的山杨良种银 × 山 1333 组织基础培养基(YS 培养基)是由大量元素、微量元素、铁盐、有机成分、强度为 1300g/cm²的琼脂和水组成;

[0011] 每 1L 的 YS 培养基中所述的大量元素由浓度为 330mg/L ~ 350mg/L 的 KNO₃、390mg/L ~ 410mg/L NH₄NO₃、90mg/L ~ 100mg/L 的 CaCl₂ · 2H₂O、360mg/L ~ 380mg/L 的 MgSO₄ · 7H₂O、540mg/L ~ 560mg/L 的 Ca (NO₃)₂ · 4H₂O、580mg/L ~ 620mg/L 的 K₂SO₄和 350mg/L ~ 380mg/L KH₂PO₄组成;

[0012] 每 1L 的 YS 培养基中所述的微量元素由浓度为 0.83mg/L 的 KI、6.2mg/L 的 H₃BO₃、22.3mg/L 的 MnSO₄ · 4H₂O、8.6mg/L 的 ZnSO₄ · 7H₂O、0.25mg/L 的 Na₂MoO₄ · 2H₂O 和 0.25mg/L 的 CuSO₄ · 5H₂O 组成;

[0013] 每 1L 的 YS 培养基中所述的铁盐由浓度为 25mg/L ~ 28mg/L 的 FeSO₄ · 7H₂O 和 36mg/L ~ 38mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

[0014] 每 1L 的 YS 培养基中所述的有机成分为蔗糖 15g/L ~ 25g/L、4mg/L ~ 6mg/L 的盐酸硫胺素、0.3mg/L ~ 0.6mg/L 的烟酸、0.6mg/L ~ 3mg/L 的盐酸吡哆醇、80mg/L ~ 110mg/L 的肌醇和 1mg/L ~ 3mg/L 的甘氨酸;

[0015] 每 1L 的 YS 培养基中强度为 1300g/cm²的琼脂的质量含量为 5.0g/L ~ 6.0g/L。

[0016] 氮是构成植物体蛋白质、核酸、ATP、NADPH 或 NADPH⁺、叶绿素等物质的主要元素,能促进植物的细胞分裂,是植物生长必需的营养元素之一。但在植物组织培养愈伤组织及其不定芽形成阶段养分浓度过高会引起异常氮代谢途径的出现,而降低细胞全能性。本发明 YS 培养基氮浓度为 252.38mg/L,常用的 MS 培养基氮浓度为 840.87mg/L,YS 培养基合理的降低了氮的浓度,促进了植物细胞的脱分化与再分化。从生理角度来看,铵态氮和硝态氮都是植物良好的氮源,都能被植物很好地吸收利用,但二者的存在状态、吸收、运输、同化过程等不尽相同。NO₃-N 是阴离子,呈氧化态;NH₄-N 是阳离子,呈还原态,二者含氧不同,所带的电荷性质也不同,因此在不同的环境条件(特别是介质 pH)下,同种植物对 NO₃-N 和 NH₄-N 的吸收量不同。本发明 YS 培养基硝态氮占总氮源质量的 72.26%,而 MS 培养基硝态氮占总氮源质量的 65.66%,在 pH 值为 5.5 ~ 6.0 的条件下对山杨良种银 × 山 1333 进行分化培养,分化率分别为 84.6% 和 44.3%,证明对于山杨良种银 × 山 1333 外植体,在培养基 pH 值 5.5 ~ 6.0 的条件下,硝态氮占总氮源百分比越高,越有利于分化。总之,两种培养基相比,YS 培养基中的氮源总浓度做到了合理的降低,硝态氮比例的增大,提高了肥效。

[0017] 盐酸硫胺素(维生素 B1)对愈伤组织的产生、不定芽的分化和生活力有重要作用,本发明中盐酸硫胺素加入的浓度由 1mg/L 调整到 5mg/L,不定芽分化率 44% 提高到 86%,继代增殖系数提高到由 1.5 提高到 4.7,生根率达到由 76.5% 提高到 94.5%,作用效果明显。

[0018] 本发明的有益效果:

[0019] 利用组织培养的方法培养山杨良种银 × 山 1333,不仅可以获得性状高度一致的山杨良种银 × 山 1333 群体,而且大大加快了良种推广的进程,并为遗传改良提供了新的途径。

[0020] 本发明克服了成年山杨良种银 × 山 1333 的再生组织培养的不定芽分化率低、增殖系数低、组培苗生根率低、根系不健壮等问题,本发明提供的山杨良种银 × 山 1333 组织培养基,该培养基具有使山杨良种银 × 山 1333 再生组织的不定芽分化率、增殖系数高和生根率高,通过培养基获得的山杨良种银 × 山 1333 再生组织的试管苗移栽成活率高、组培苗

生长健壮、叶形叶色正常、皮下生根和新叶萌发快等优点,能够满足商品化、工厂化大规模快速生产山杨良种银 × 山 1333 无菌容器苗的需要,具有良好的应用前景。

[0021] 通过本发明山杨良种银 × 山 1333 不定芽分化培养基培养的不定芽分化率可达 75% ~ 88%,分化系数 3.50 ~ 4.50 ;山杨良种银 × 山 1333 的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为 1.5 ~ 4.7 ;山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 76.5% ~ 94.5% 以上,生根 5 ~ 14 条,移栽成活率高达 90.5%。

具体实施方式

[0022] 具体实施方式一:本发明中山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基;

[0023] 其中,所述的不定芽分化培养基由 YS 培养基与 0.1mg/L ~ 1.5mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤和 0mg/L ~ 0.1mg/L 的激动素组成;

[0024] 所述的继代增殖培养基由 YS 培养基与 0.1mg/L ~ 1.0mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤和 0mg/L ~ 0.05mg/L 的萘乙酸组成;

[0025] 所述的不定芽生根培养基由 YS 培养基与激素 A 组成,所述的激素 A 由 0.1mg/L ~ 2.0mg/L 的吲哚丁酸、0.1mg/L ~ 2.0mg/L 的吲哚乙酸和 0.01mg/L ~ 2.0mg/L 的萘乙酸中的一种或几种按任意比例组成;

[0026] 其中,所述的山杨良种银 × 山 1333 组织基础培养基(YS 培养基)是由大量元素、微量元素、铁盐、有机成分、强度为 1300g/cm²的琼脂和水组成;

[0027] 每 1L 的 YS 培养基中所述的大量元素由浓度为 330mg/L ~ 350mg/L 的 KNO₃、390mg/L ~ 410mg/L NH₄NO₃、90mg/L ~ 100mg/L 的 CaCl₂ · 2H₂O、360mg/L ~ 380mg/L 的 MgSO₄ · 7H₂O、540mg/L ~ 560mg/L 的 Ca (NO₃)₂ · 4H₂O、580mg/L ~ 620mg/L 的 K₂SO₄和 350mg/L ~ 380mg/L KH₂PO₄组成;

[0028] 每 1L 的 YS 培养基中所述的微量元素由浓度为 0.83mg/L 的 KI、6.2mg/L 的 H₃BO₃、22.3mg/L 的 MnSO₄ · 4H₂O、8.6mg/L 的 ZnSO₄ · 7H₂O、0.25mg/L 的 Na₂MoO₄ · 2H₂O 和 0.25mg/L 的 CuSO₄ · 5H₂O 组成;

[0029] 每 1L 的 YS 培养基中所述的铁盐由浓度为 25mg/L ~ 28mg/L 的 FeSO₄ · 7H₂O 和 36mg/L ~ 38mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

[0030] 每 1L 的 YS 培养基中所述的有机成分为蔗糖 15g/L ~ 25g/L、4mg/L ~ 6mg/L 的盐酸硫胺素、0.3mg/L ~ 0.6mg/L 的烟酸、0.6mg/L ~ 3mg/L 的盐酸吡哆醇、80mg/L ~ 110mg/L 的肌醇和 1mg/L ~ 3mg/L 的甘氨酸;

[0031] 每 1L 的 YS 培养基中强度为 1300g/cm²的琼脂的质量含量为 5.0g/L ~ 6.0g/L。

[0032] 本实施方式中选取银 × 山 1333 植物组织的取材特征:取材时应从健壮的植株上取材料,不取有伤口或有病虫的银 × 山 1333 植物组织,取银 × 山 1333 植物组织时应在晴好的天气的中午或下午;方法为:采用消毒剂 70% ~ 75% 乙醇先对接种材料表面消毒 10s ~ 20s,然后用 0.1% 氯化汞消毒 3min。

[0033] 本实施方式中山杨良种银 × 山 1333 组织培养基的培养条件:将灭菌后的银 × 山 1333 植物组织接种到不定芽分化培养基中,在培养条件为昼温 23℃ ~ 27℃,夜温不低于 15℃,光照时间 12h/d ~ 16h/d,光强 2500Lux ~ 3500Lux 下培养,得到愈伤组织;将培养

30d~45d的愈伤组织转入到继代增殖培养基中,在培养条件为昼温21℃~25℃,夜温不低于15℃,光照时间10h/d~12h/d,光强2500Lux~3500Lux,湿度60%~70%下培养,得到无菌苗,其中光源为白炽日光灯;将培养到1.5cm~2.0cm苗高无菌苗转入到不定芽生根培养基中,在培养条件为23℃~26℃,光照时间12h/d~14h/d,光强2500Lx~3500Lx,湿度70%~80%的条件下,培养30d~45d。

[0034] 本实施方式中山杨良种银×山1333不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达75%~88%,分化系数3.50~4.50;山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为1.5~4.7;山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到76.5%以上,生根5~11条,移栽成活率也较高90.5%。

[0035] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同点在于:所述的不定芽分化培养基由YS培养基和浓度为1.0mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.1mg/L的激动素组成。其它与具体实施方式一相同。

[0036] 本实施方式中山杨良种银×山1333不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达88%,分化系数4.23;山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为1.5~4.7;山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到76.5%以上,生根5~11条,移栽成活率也较高90.5%。

[0037] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一或二不同点在于:所述的不定芽分化培养基由YS培养基和浓度为0.5mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.1mg/L的激动素组成。其它与具体实施方式一或二相同。

[0038] 本实施方式中山杨良种银×山1333不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达78%,分化系数3.59;山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为1.5~4.7;山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到76.5%以上,生根5~11条,移栽成活率也较高90.5%。

[0039] 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式一至三之一的不同点在于:所述的不定芽分化培养基由YS培养基和浓度为1.5mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.1mg/L的激动素组成。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0040] 本实施方式中山杨良种银×山1333不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达80%,分化系数3.69;山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为1.5~4.7;山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到76.5%以上,生根5~11条,移栽成活率也较高90.5%。

[0041] 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式一至四之一不同点在于:所述的继代增殖培养基由YS培养基和0.5mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.03mg/L的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至四之一相同。

[0042] 本实施方式中山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为4.7。

[0043] 具体实施方式六:本实施方式与具体实施方式一至五之一的不同点在于:所述的继代增殖培养基由YS培养基和0.1mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.03mg/L的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至五之一相同。

[0044] 本实施方式中山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为

2.0。

[0045] 具体实施方式七：本实施方式与具体实施方式一至六之一的不同点在于：所述的继代增殖培养基由YS培养基和0.3mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.01mg/L的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至六之一相同。

[0046] 本实施方式中山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为3.0。

[0047] 具体实施方式八：本实施方式与具体实施方式一至七之一不同点在于：所述的继代增殖培养基由YS培养基和0.3mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.05mg/L的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至七之一相同。

[0048] 本实施方式中山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为3.8。

[0049] 具体实施方式九：本实施方式与具体实施方式一至八之一不同点在于：所述的继代增殖培养基由YS培养基和0.5mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.01mg/L的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至八之一相同。

[0050] 本实施方式中山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为3.4。

[0051] 具体实施方式十：本实施方式与具体实施方式一至九之一不同点在于：所述的继代增殖培养基由YS培养基和1.0mg/L的6-苄基氨基嘌呤和0.03mg/L的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至九之一相同。

[0052] 本实施方式中山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为4.0。

[0053] 具体实施方式十一：本实施方式与具体实施方式一至十之一不同点在于：所述的不定芽生根培养基由YS培养基和激素组成，所述的激素为1.5mg/L的吲哚丁酸和0.01的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至十之一相同。

[0054] 本实施方式中山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到87.5%。

[0055] 具体实施方式十二：本实施方式与具体实施方式一至十一之一不同点在于：所述的不定芽生根培养基由YS培养基和激素组成，所述的激素为0.5mg/L的吲哚丁酸。其它与具体实施方式一至十一之一相同。

[0056] 本实施方式中山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到80.5%。

[0057] 具体实施方式十三：本实施方式与具体实施方式一至十二之一不同点在于：所述的不定芽生根培养基由YS培养基和激素组成，所述的激素为1.0mg/L的吲哚丁酸。其它与具体实施方式一至十二之一相同。

[0058] 本实施方式中山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到80.0%。

[0059] 具体实施方式十四：本实施方式与具体实施方式一至十三之一不同点在于：所述的不定芽生根培养基由YS培养基和激素组成，所述的激素为1.5mg/L的吲哚丁酸。其它与具体实施方式一至十三之一相同。

[0060] 本实施方式中山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 86.5%。

[0061] 具体实施方式十五：本实施方式与具体实施方式一至十四之一不同点在于：所述的不定芽生根培养基由 YS 培养基和激素组成，所述的激素为 1.5mg/L 的吲哚丁酸和 0.02 的萘乙酸组成。其它与具体实施方式一至十四之一相同。

[0062] 本实施方式中山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 85.7%。

[0063] 具体实施方式十六：本实施方式与具体实施方式一至十五之一不同点在于：所述的大量元素由浓度为 340mg/L 的 KNO_3 、400mg/L NH_4NO_3 、96mg/L 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、370mg/L 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、550mg/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、600mg/L 的 K_2SO_4 、370mg/L KH_2PO_4 、27.8mg/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 37.3mg/L 的 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 组成。其它与具体实施方式一至十五之一相同。

[0064] 本实施方式中山杨良种银 × 山 1333 不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达 75% ~ 88%，分化系数 3.50 ~ 4.50；山杨良种银 × 山 1333 的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为 1.5 ~ 4.7；山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 76.5% 以上，生根 5 ~ 11 条，移栽成活率也较高 90.5%。

[0065] 具体实施方式十七：本实施方式与具体实施方式一至十六之一不同点在于：所述的每 1L 的 YS 培养基中的有机成分为蔗糖 20g/L、5mg/L 的盐酸硫胺素、0.5mg/L 的烟酸、0.5mg/L 的盐酸吡哆醇、100mg/L 的肌醇和 2mg/L 的甘氨酸。其它与具体实施方式一至十六之一相同。

[0066] 本实施方式中山杨良种银 × 山 1333 不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达 75% ~ 88%，分化系数 3.50 ~ 4.50；山杨良种银 × 山 1333 的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为 1.5 ~ 4.7；山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 76.5% 以上，生根 5 ~ 11 条，移栽成活率也较高 90.5%。

[0067] 具体实施方式十八：本实施方式与具体实施方式一至十七之一不同点在于：所述的每 1L 的 YS 培养基中强度为 $1300\text{g}/\text{cm}^2$ 的琼脂的质量含量为 5.5g/L。其它与具体实施方式一至十七之一相同。

[0068] 具体实施方式十九：本实施方式与具体实施方式一至十八之一不同点在于：所述的 YS 培养基的 pH 为 5.5 ~ 6.0。其它与具体实施方式一至十八之一相同。

[0069] 具体实施方式二十：本实施方式与具体实施方式一至十九之一不同点在于：所述的 YS 培养基的 pH 为 5.5。其它与具体实施方式一至十九之一相同。

[0070] 通过以下验证实验验证本发明的有益效果：

[0071] 验证实验一：

[0072] 本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基，其特征在于山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基组成；

[0073] 其中，所述的不定芽分化培养基由 YS 培养基与浓度为 1.0mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和 0.1mg/L 的激动素(KT)组成；

[0074] 所述的继代增殖培养基由 YS 培养基与 0.3mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和 0.05mg/L 的萘乙酸(NAA)组成；

[0075] 所述的不定芽生根培养基由 YS 培养基与激素 A 组成,所述的激素 A 为 1.5mg/L 的吲哚丁酸。

[0076] 所述的 YS 培养基是由大量元素、微量元素、铁盐、有机成分、强度为 1300g/cm²琼脂和水组成;

[0077] 每 1L 的 YS 培养基中所述的大量元素由浓度为 340mg/L 的 KNO₃、400mg/L NH₄NO₃、96mg/L 的 CaCl₂·2H₂O、370mg/L 的 MgSO₄·7H₂O、550mg/L 的 Ca(NO₃)₂·4H₂O、600mg/L 的 K₂SO₄、370mg/L KH₂PO₄、27.8mg/L 的 FeSO₄·7H₂O 和 37.3mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

[0078] 每 1L 的 YS 培养基中所述的微量元素由浓度为 0.83mg/L 的 KI、6.2mg/L 的 H₃BO₃、22.3mg/L 的 MnSO₄·4H₂O、8.6mg/L 的 ZnSO₄·7H₂O、0.25mg/L 的 Na₂MoO₄·2H₂O 和 0.25mg/L 的 CuSO₄·5H₂O 组成;

[0079] 每 1L 的 YS 培养基中所述的铁盐由浓度为 25mg/L 的 FeSO₄·7H₂O 和 36mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

[0080] 每 1L 的 YS 培养基中所述的有机成分为蔗糖 20g/L、5mg/L 的盐酸硫胺素、0.5mg/L 的烟酸、0.6mg/L ~ 3mg/L 的盐酸吡哆醇、100mg/L 的肌醇和 2mg/L 的甘氨酸;

[0081] 每 1L 的 YS 培养基中强度为 1300g/cm²琼脂的质量含量为 5.5g/L。

[0082] 本验证试验中所述的 YS 培养基的 pH 为 5.5。

[0083] 本验证试验的山杨良种银 × 山 1333 待培养组织的前期处理:

[0084] 本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基选取银 × 山 1333 的待培养组织时应从健壮的植株上取得,植株不取有伤口或有病虫的银 × 山 1333 植物组织,取银 × 山 1333 植物组织时应在晴好的天气的中午或下午;待培养组织的消毒方法为:采用消毒剂 70% ~ 75% 乙醇先对接种材料表面消毒 10s ~ 20s,然后用 0.1% 氯化汞消毒 3min。

[0085] 本验证试验的培养条件:

[0086] 本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基的培养条件:将灭菌后的银 × 山 1333 植物组织接种到不定芽分化培养基中,在培养条件为昼温 23℃ ~ 27℃,夜温不低于 15℃,光照时间 12h/d ~ 16h/d,光强 2500Lux ~ 3500Lux 下培养,得到愈伤组织;将培养 30d ~ 45d 的愈伤组织转入到继代增殖培养基中,在培养条件为昼温 21℃ ~ 25℃,夜温不低于 15℃,光照时间 10h/d ~ 12h/d,光强 2500Lux ~ 3500Lux,湿度 60% ~ 70% 下培养,得到无菌苗,其中光源为白炽日光灯;将培养到 1.5cm ~ 2.0cm 苗高无菌苗转入到不定芽生根培养基中,在培养条件为 23℃ ~ 26℃,光照时间 12h/d ~ 14h/d,光强 2500Lx ~ 3500Lx,湿度 70% ~ 80% 的条件下,培养 30d ~ 45d。

[0087] 本验证试验的结果:

[0088] 本验证试验中山杨良种银 × 山 1333 不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达 88%,分化系数为 4.23;山杨良种银 × 山 1333 的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为 3.8;山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 86.5%,生根 5 ~ 11 条,移栽成活率高于 90.5%。

[0089] 验证实验二:

[0090] 本验证试验本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基,其特征在于山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基组成;

[0091] 其中,所述的不定芽分化培养基由YS培养基与1.5mg/L的6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和0.1mg/L的激动素(KT)组成;

[0092] 所述的继代增殖培养基由YS培养基与0.5mg/L的6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和0.03mg/L的萘乙酸(NAA)组成;

[0093] 所述的不定芽生根培养基由YS培养基与激素A组成,所述的激素A为1.5mg/L的吲哚丁酸和0.01mg/L的萘乙酸(NAA)组成。

[0094] 所述的YS培养基是由大量元素、微量元素、铁盐、有机成分、强度为1300g/cm²琼脂和水组成;

[0095] 每1L的YS培养基中所述的大量元素由浓度为340mg/L的KNO₃、400mg/L的NH₄NO₃、96mg/L的CaCl₂·2H₂O、370mg/L的MgSO₄·7H₂O、550mg/L的Ca(NO₃)₂·4H₂O、600mg/L的K₂SO₄、370mg/L的KH₂PO₄、27.8mg/L的FeSO₄·7H₂O和37.3mg/L的Na₂-EDTA组成;

[0096] 每1L的YS培养基中所述的微量元素由浓度为0.83mg/L的KI、6.2mg/L的H₃BO₃、22.3mg/L的MnSO₄·4H₂O、8.6mg/L的ZnSO₄·7H₂O、0.25mg/L的Na₂MoO₄·2H₂O和0.25mg/L的CuSO₄·5H₂O组成;

[0097] 每1L的YS培养基中所述的铁盐由浓度为25mg/L的FeSO₄·7H₂O和36mg/L的Na₂-EDTA组成;

[0098] 每1L的YS培养基中所述的有机成分为蔗糖20g/L、5mg/L的盐酸硫胺素、0.5mg/L的烟酸、0.6mg/L~3mg/L的盐酸吡哆醇、100mg/L的肌醇和2mg/L的甘氨酸;

[0099] 每1L的YS培养基中强度为1300g/cm²琼脂的质量含量为5.5g/L。

[0100] 本验证试验中所述的YS培养基的pH为5.5。

[0101] 本验证试验的山杨良种银×山1333待培养组织的前期处理:

[0102] 本验证试验山杨良种银×山1333组织培养基选取银×山1333的待培养组织时应从健壮的植株上取得,植株不取有伤口或有病虫的银×山1333植物组织,取银×山1333植物组织时应在晴好的天气的中午或下午;待培养组织的消毒方法为:采用消毒剂70%~75%乙醇先对接种材料表面消毒10s~20s,然后用0.1%氯化汞消毒3min。

[0103] 山杨良种银×山1333组织培养条件:

[0104] 本验证试验山杨良种银×山1333组织培养基将灭菌后的银×山1333植物组织接种的不定芽分化培养基中,培养条件为昼温23℃~27℃,夜温不低于15℃,光照时间12h/d~16h/d,光强2500Lux~3500Lux,湿度70%~80%;将培养30d~45d的愈伤组织转入到继代增殖培养基中,培养条件为昼温21℃~25℃,夜温不低于15℃,光照时间10h/d~12h/d,光强2500Lux~3500Lux,其中为光源为白炽日光灯,湿度70%~80%;将培养到1.5cm~2.0cm苗高无菌苗转入到不定芽生根培养基中,培养条件为23℃~26℃,光照时间12h/d~14h/d,光强2500Lx~3500Lx,湿度70%~80%,培养时间30d~45d。

[0105] 本验证试验的结果:

[0106] 本验证试验中山杨良种银×山1333不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达80%,分化系数为3.69;山杨良种银×山1333的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为4.7;山杨良种银×山1333的不定芽生根培养基培养可使生根率达到87.5%,生根5~11条,移栽成活率高于90.5%。

[0107] 验证试验三:

[0108] 本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基,其特征在于山杨良种银 × 山 1333 组织培养基包括不定芽分化培养基、继代增殖培养基和不定芽生根培养基三种培养基组成;

[0109] 其中,所述的不定芽分化培养基由 YS 培养基与浓度为 1.0mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和 0.1mg/L 的激动素(KT)组成;

[0110] 所述的继代增殖培养基由 YS 培养基与 0.5mg/L 的 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和 0.03mg/L 的萘乙酸(NAA)组成;

[0111] 所述的不定芽生根培养基由 YS 培养基与激素 A 组成,所述的激素 A 为 1.5mg/L 的吲哚丁酸(IBA)和 0.01mg/L 的萘乙酸(NAA)组成。

[0112] 其中,所述的 YS 培养基是由大量元素、微量元素、铁盐、有机成分、强度为 1300g/cm²琼脂和水组成;

[0113] 每 1L 的 YS 培养基中所述的大量元素由浓度为 340mg/L 的 KNO₃、400mg/L NH₄NO₃、96mg/L 的 CaCl₂·2H₂O、370mg/L 的 MgSO₄·7H₂O、550mg/L 的 Ca(NO₃)₂·4H₂O、600mg/L 的 K₂SO₄、370mg/L KH₂PO₄、27.8mg/L 的 FeSO₄·7H₂O 和 37.3mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

[0114] 每 1L 的 YS 培养基中所述的微量元素由浓度为 0.83mg/L 的 KI、6.2mg/L 的 H₃BO₃、22.3mg/L 的 MnSO₄·4H₂O、8.6mg/L 的 ZnSO₄·7H₂O、0.25mg/L 的 Na₂MoO₄·2H₂O 和 0.25mg/L 的 CuSO₄·5H₂O 组成;

[0115] 每 1L 的 YS 培养基中所述的铁盐由浓度为 25mg/L 的 FeSO₄·7H₂O 和 36mg/L 的 Na₂-EDTA 组成;

[0116] 每 1L 的 YS 培养基中所述的有机成分为蔗糖 20g/L、5mg/L 的盐酸硫胺素、0.5mg/L 的烟酸、0.6mg/L ~ 3mg/L 的盐酸吡哆醇、100mg/L 的肌醇和 2mg/L 的甘氨酸;

[0117] 每 1L 的 YS 培养基中强度为 1300g/cm²琼脂的质量含量为 5.5g/L。

[0118] 本验证试验中所述的 YS 培养基的 pH 为 5.5。

[0119] 本验证试验的山杨良种银 × 山 1333 待培养组织的前期处理:

[0120] 本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基选取银 × 山 1333 的待培养组织时应从健壮的植株上取得,植株不取有伤口或有病虫的银 × 山 1333 植物组织,取银 × 山 1333 植物组织时应在晴好的天气的中午或下午;待培养组织的消毒方法为:采用消毒剂 70% ~ 75% 乙醇先对接种材料表面消毒 10s ~ 20s,然后用 0.1% 氯化汞消毒 3min。

[0121] 本验证试验的培养条件:

[0122] 本验证试验山杨良种银 × 山 1333 组织培养基将灭菌后的银 × 山 1333 植物组织接种的不定芽分化培养基中,培养条件为昼温 23℃ ~ 27℃,夜温不低于 15℃,光照时间 12h/d ~ 16h/d,光强 2500Lux ~ 3500Lux,湿度 70% ~ 80%;将培养 30d ~ 45d 的愈伤组织转入到继代增殖培养基中,培养条件为昼温 21℃ ~ 25℃,夜温不低于 15℃,光照时间 10h/d ~ 12h/d,光强 2500Lux ~ 3500Lux,其中为光源为白炽日光灯,湿度 70% ~ 80%;将培养到 1.5cm ~ 2.0cm 苗高无菌苗转入到不定芽生根培养基中,培养条件为 23℃ ~ 26℃,光照时间 12h/d ~ 14h/d,光强 2500Lx ~ 3500Lx,湿度 70% ~ 80%,培养时间 30d ~ 45d。

[0123] 本验证试验的结果:

[0124] 本验证试验中山杨良种银 × 山 1333 不定芽分化培养基培养的愈伤组织分化可达 88%,分化系数为 4.23;山杨良种银 × 山 1333 的继代增殖培养基培养可使继代增殖系数为

4.7 ;山杨良种银 × 山 1333 的不定芽生根培养基培养可使生根率达到 87.5%,生根 5 ~ 11 条,移栽成活率高于 90.5%。

[0125] 综上所述:由 YS 和 6-BA 0.5 ~ 1.0mg/L 和 0mg/L ~ 0.1mg/L KT 组成山杨良种银 × 山 1333 组织培养基的不定芽分化培养基的培养效果好,培养的山杨良种银 × 山 1333 苗茎高、粗,无玻璃化现象,长势较好,愈伤组织分化可达 75% ~ 88%,分化系数 3.50 ~ 4.50 ;由 YS 和 0.1mg/L ~ 1.0mg/L 的 6- 苄基氨基嘌呤(6-BA) 和 0mg/L ~ 0.05mg/L 的萘乙酸(NAA) 组成山杨良种银 × 山 1333 组织培养基的继代增殖培养基的培养效果好,继代增殖系数为 3.5 ~ 4.7 ;由 YS 和培养基和激素组成,所述的激素为 0.1mg/L ~ 2.0mg/L 的吲哚丁酸(IBA)、0.1mg/L ~ 2.0mg/L 的吲哚乙酸(IAA) 和 0.01mg/L ~ 2.0mg/L 的萘乙酸(NAA) 中的一种或几种按任意比例组成的山杨良种银 × 山 1333 组织培养基的不定芽生根培养基的培养效果好,生根率高达 76.5% ~ 87.5%,生根数高达 14 条。