

欧美山杨杂种工厂化育苗技术¹⁾

刁桂萍 杨传平 詹亚光

(东北林业大学, 哈尔滨, 150040)

摘要 为了降低欧美山杨杂种无性系的繁殖成本,以欧美山杨杂种(*Populus tremula* × *P. tremuloides*)优良无性系为研究材料,用自来水和绵白糖替代蒸馏水和蔗糖配制培养基,结合试管苗瓶外生根和扦插技术,提出了适合欧美山杨杂种工厂化生产技术的工艺体系,为欧美山杨杂种生产走上工厂化、产业化之路提供参考。

关键词 欧美杂种山杨;组织培养;工厂化生产

分类号 S813.23

Industrial Seedling-raising Technique for *Populus tremula* × *P. tremuloides*/Diao Guiping, Yang Chuanping, Zhan Yaguang (School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China) // Journal of Northeast Forestry University. -2008, 36(9). -14~16

A series of experiments were carried out in order to reduce the production cost of seedling production of the hybrid poplar using elite clones of *Populus tremula* × *P. tremuloides* as research materials. Combined with the techniques of outside test-tube rooting and seedling cutting, an industrial seedling-raising technique was proposed by using tap water and white sugar to make the culture medium in stead of distilled water and sucrose, which provides a theoretical basis for the industrialized production of *Populus tremula* × *P. tremuloides* seedlings.

Key words *Populus tremula* × *P. tremuloides*; Tissue culture; Industrial production

欧美山杨杂种(*Populus tremula* × *P. tremuloides*)是欧洲山杨和北美山杨的杂交种,具有生长快、耐寒、耐贫瘠、树形高大、适应性强等特点,是寒温带山地造林的优良树种。另外,该杂种材质较软、细密、洁白、树干端直,是用于造纸及生产胶合板和刨花板的优质原料^[1]。因此,对山杨杂种进行大规模的商业化生产具有巨大的市场潜力和经济效益。

到目前为止,有关欧美山杨杂种组培育苗的研究很多,在外植体的选取、形态建成、分化诱导、诱导生根等主要组培工艺方面做了大量有益的工作^[2-4]。然而,对该树种目前的研究仍存在繁殖系数低、无性系繁殖成本高的问题。

1 材料与方法

材料:2001年春,将从芬兰取回的40年生欧美山杨杂种的枝条经过水培后,取嫩茎和新叶接种,在接种前用清水冲洗5 min,无菌水冲洗3~4遍,再用75%酒精浸泡30 s,边浸泡边摇动。然后用0.1%升汞灭菌2 min,再用灭菌的蒸馏水洗4遍,接种在WPM+BA1+2%蔗糖培养基上使之启动,腋芽分化形成无菌试管苗。

廉价替代品配制的培养基:①培养基中去除肌醇;②降低大量元素用量;③以普通自来水代替蒸馏水;④以绵白糖代替分析用蔗糖;⑤卡拉胶代替琼脂配制培养基。

分化培养基:①用自来水替代蒸馏水配制培养基;②NT(去除肌醇)+BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+2%蔗糖;③1/2NT+BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+2%蔗糖;④NT+BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+2%市售绵白糖;⑤1/4NT+BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+2%蔗糖;⑥1/2NT(去除肌醇)+BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+2%蔗糖(用自来水配制);⑦NT(去除肌醇)+

BA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+2%蔗糖(用自来水配制)。

生根培养基:①1/2WPM+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.05 mg/L+2%蔗糖;②1/4WPM+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.05 mg/L+2%蔗糖;③WPM(去除肌醇)+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.05 mg/L+2%蔗糖;④WPM+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.05 mg/L+2%市售绵白糖;⑤WPM+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.05 mg/L+2%蔗糖(自来水代替蒸馏水配制培养基);⑥WPM+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.05 mg/L+2%蔗糖(卡拉胶代替琼脂配制培养基)。

采用两种方式进行试管苗瓶外生根试验。微体扦插法:即是将无根试管苗切下,经过生长素处理后,扦插到基质中进行保湿管理来完成生根的方法。将山杨杂种试管苗从培养基中取出,剪取高为2.5~3.0 cm的幼嫩无根组培苗。用不同质量浓度的IBA及ABT生根粉对无根组培苗进行不同浸泡时间的处理,在5种不同基质上(①泥炭土、沙、珍珠岩(体积比1:1:1);②泥炭土、沙(体积比1:1);③纯泥炭土;④纯沙;⑤泥炭土、沙(体积比2:1))采用完全随机区组设计进行对比试验。试管苗瓶外生根:将泥炭土进行高温灭菌,然后分别装入塑料袋中。每袋一般可栽4~6株,示情况而定。栽苗前,先用配置好的母液润湿在泥炭土上挖好的坑,然后将1.5~3.0 cm的健壮无菌试管苗切下,栽入坑中,然后再倒入少许母液。最后将塑料袋塑封上,15~30 d观察生根情况。

2 结果与分析

2.1 采用廉价替代品配制培养基

2.1.1 分化培养

外植体分别在①、②、③、④、⑤5种培养基中进行培养。从表1可以看出:培养基成分对组培苗分化的影响由小到大依次为:自来水<肌醇<蔗糖<大量元素。从外植体在⑥、⑦两种培养基中的分化情况来看,上述几种成分对组培苗分化的影响是相互独立的。因此,分化培养基可去除肌醇并采用自来水进行配制。

1) 国家林业局“948”项目。

第一作者简介:刁桂萍,女,1981年11月生,东北林业大学林学院,助教。

收稿日期:2008年1月11日。

责任编辑:李金荣。

表1 分化培养基的简化

培养基类型	增殖系数			
	第一继代	第二继代	第三继代	第四继代
①	4.75	4.13	4.17	4.29
②	4.50	4.23	4.49	4.03
③	4.05	4.61	2.73	2.82
④	3.67	4.33	4.06	2.13
⑤	3.22	3.23	1.04	2.39
⑥	4.53	4.49	3.84	2.74
⑦	4.62	4.25	4.15	4.06

2.1.2 生根培养

从表2得知:1/2WPM 的生根情况好于1/4WPM,无性系平均生根率可达97.2%。无性系在无肌醇条件下诱导生根,平均生根率可达95.0%。因此,在生根培养中可不添加肌醇。选用自来水替代蒸馏水配制培养基,无性系平均生根率可达95%;用绵白糖、卡拉胶替代蔗糖、琼脂配制生根培养基效果不理想,无性系平均生根率仅为77.8%和80.0%。分析原因可能有两方面:一是市售的绵白糖质量差,所含杂质较多;二是用绵白糖与卡拉胶配制的培养基随机性大,由于其厂家及其每批的质量有所差异而导致试管苗的生根率时高时低。

表2 简化生根培养基试管苗生根情况

培养基种类	外植体数/个	生根率/%	单枝平均根数/个	根的特征	
				颜色	长度/cm
①	48	97.2	6~7	红	0.5~2.0
②	41	80.0	5~6	粉红	0.5~1.5
③	42	95.0	5~6	粉白	0.5~1.5
④	21	77.8	6~7	粉红	0.5~1.5
⑤	36	95.0	3~4	粉白	0.5~1.5
⑥	40	80.0	3~4	粉红	0.5~2.0

2.2 试管苗瓶外生根

2.2.1 微体扦插

ABT生根粉对生根的影响:试验均是以纯沙为基质。在ABT质量浓度为100 mg/L时,生根率随ABT生根粉溶液浸泡时间的增加而提高;而质量浓度为500 mg/L时,生根率随ABT生根粉溶液浸泡时间的增加而减少(表3)。由此可见,生根处理随ABT生根粉溶液质量浓度的增加而需要减少浸泡时间,而随质量浓度的减少,浸泡时间需相应加长。本试验中,以100 mg/L浸泡15 min生根率最高,为72.7%,比水对照高出50%,且根系生长状况良好,1级苗比率为68.7%,苗木生长旺盛。

表3 ABT不同质量浓度、不同浸泡时间对生根率的影响

质量浓度/ mg · L ⁻¹	处理时 间/min	扦插 株数	生根 株数	生根 率/%	生根级别		
					1	2	3
50	10	22	10	45.5	7	2	1
100	5	22	8	36.4	6	1	1
	10	22	15	68.2	11	3	1
	15	22	16	72.7	11	1	1
200	10	22	11	50.0	7	3	2
500	10	22	5	22.7	4	0	1
	5	22	11	50.0	5	2	4
1 000	0.5	22	9	40.9	6	2	1
水对照		22	5	22.7	5	0	0

注:1级具3条以上的根;2级具1~2条根;3级具1条根。

IBA溶液不同质量浓度、不同浸泡时间对幼嫩组培苗生根的影响:在IBA质量浓度为20 mg/L和100 mg/L时,诱导生根率随IBA溶液浸泡时间的增加而显著提高(20 mg/L时,

浸泡10 min时生根率为45.5%,20 min时为77.3%);而质量浓度为500 mg/L时,生根率随浸泡时间增加而降低(表4)。本试验表明,以20 mg/L浸泡20 min和100 mg/L浸泡15 min,其生根率均为77.3%,一级根比例分别为82.3%和64.7%。因此,以20 mg/L浸泡20 min为最优处理,且根系比较整齐,苗木长势好。

表4 IBA不同质量浓度、不同浸泡时间对生根率的影响

质量浓度/ mg · L ⁻¹	处理时 间/min	扦插 株数	生根 株数	生根 率/%	生根级别		
					1	2	3
20	20	22	17	77.3	14	2	1
	10	22	10	45.5	4	1	5
100	5	22	10	45.5	9	1	0
	10	22	13	59.1	8	2	3
	15	22	17	77.3	11	3	3
250	10	22	8	36.4	4	4	0
500	0.25	22	8	36.4	6	2	0
	10	22	7	31.8	5	2	0
水对照		22	9	40.9	5	2	2

注:1级具3条以上的根;2级具1~2条根;3级具1条根。

不同基质对扦插生根的影响:本试验共采用了5种基质,分别是:A、纯沙;B、纯泥炭土;C、土与沙等量混合;D、土、沙、珍珠岩三者等量混合;E、上层放沙,下层放土。由表5可以看出:不同的基质对扦插苗生根的影响有明显的差异。全沙和上沙下泥炭土(上层沙为5 cm,下层土为3 cm)的基质明显优于其他基质,扦插成活率可达70%以上。其主要原因可能是由于沙床温度偏高于其它基质,而且通气透水性好,利于愈伤组织和根的形成。据观察得知,沙床上的扦插苗比泥炭土床上的扦插苗要提前生根,一般都具有2~4条一级根(从茎端直接生出的根),且根系生长比泥炭土床上的快。而泥炭土床由于每天浇水,土壤较易板结,透气性较差,常出现褐黄色根而导致扦插苗逐渐枯死。

表5 不同基质扦插成活率的差异

基 质	处理方法		扦插 株数	成活 株数	成活 率/%
	激素	质量浓度/ mg · L ⁻¹ 时间/min			
沙	IBA	100 15	22	16	72.7
		20 20	22	17	77.3
	ABT	100 15	22	16	72.7
	总计		66	49	74.2
泥炭土	IBA	100 15	22	11	50.0
		20 20	22	12	54.5
	ABT	100 15	22	13	59.1
	总计		66	36	54.5
泥炭土+沙(体积比1:1)	IBA	100 15	22	10	45.5
		20 20	22	10	45.5
	ABT	100 15	22	14	63.6
	总计		66	35	53.0
泥炭土+沙+珍珠岩(体积比1:1:1)	IBA	100 15	22	13	59.1
		20 20	22	13	59.1
	ABT	100 15	22	14	63.6
	总计		66	40	60.6
上层沙、下层泥炭土	IBA	100 15	22	16	72.7
		20 20	22	16	72.7
	ABT	100 15	22	15	68.2
	总计		66	47	71.2

2.2.2 试管苗瓶外袋生根

不同无性系瓶外袋生根情况:选取6个山杨杂种无性系,在培养条件相同的条件下,对比瓶外生根效果。由表6可知:8号、19号、和16号无性系生根率比较高,达到了90%;而7号

和17号无性系生根率相对较低,仅为70%左右。从移栽成活率来看,8号、7号、6号和16号无性系的移栽成活率都达到了80%以上。从最终成活率的综合角度看,6号和16号无性系明显优于其他无性系,二者的最终成活率为78%以上。

表6 不同无性系瓶外生根效果

无性系号	总苗数/株	生根苗数/株	生根率/%	成活苗数/株	移栽成活率/%	最终成活率/%
8	30	27	90.0	22	81.5	73.3
7	167	116	69.5	99	85.3	59.3
19	31	28	90.3	18	64.3	58.1
17	24	17	70.8	13	76.5	54.2
6	64	54	84.4	50	92.6	78.1
16	236	213	90.3	186	87.3	78.8

不同时期瓶外袋生根情况:从2004年5月初—8月中旬,在大棚内进行试管苗瓶外袋生根试验,观察不同时期试管苗瓶外生根的变化情况。

表7 不同时期试管苗瓶外生根的变化情况

月份	总苗数/株	生根苗数/株	生根率/%	成活苗数/株	移栽成活率/%
5	279	224	80.3	211	94.2
6	415	348	83.9	302	86.8
7	616	476	77.3	399	83.8
8	149	114	76.5	94	82.5

由表7可知:5—8月份苗木的平均生根率为77.8%,平均成活率为87.6%。通过对比可以看出,试管苗瓶外生根和移栽的最适季节为5、6月份。7、8月份由于天气炎热,苗木在塑料袋中根部易腐烂,导致生根率和移栽成活率有所下降。

工厂化生产工艺流程见图1。

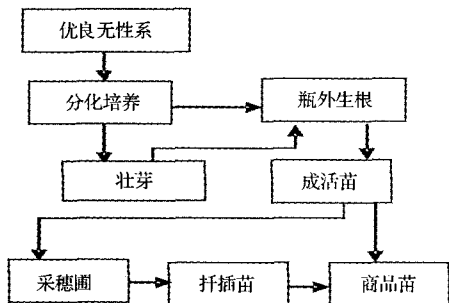


图1 工厂化生产工艺流程

3 结论与讨论

在简化培养基的试验中,通常方法为采用廉价替代品来配制培养基、培养基的二次利用以及培养基中成分的简化。本研究在山杨杂种分化及生根培养基的简化试验中发现:采用自来水配制试管苗分化培养基,并同时去除肌醇,对试管苗分化效果影响不大;生根过程中,WPM大量元素减半、去除肌醇以及用自来水代替蒸馏水配制生根培养基,试管苗生根率及其长势与原培养基相同。组织培养中,无论是购买蒸馏水,还是自己烧制蒸馏水,都是一项费时、费工、费电的工作,实验阶段少量的使用可购置或烧制,但当进入大规模工厂化育苗阶段,每天需配制几十升的培养基,这时如果用自来水代替蒸馏水,将会使育苗流水线中省去一个环节的工作,因而会节省一大笔开支。

为了缩短育苗周期、降低生产成本,国内外许多学者就现有的生根和驯化程序进行了改进,从而产生了试管苗瓶外生

根技术。试管苗瓶外生根技术是近几年研究成功的一项组培生根的先进技术。该技术的关键是将试管苗生根阶段中的生根和驯化结合起来,省去了用来提供营养物质并起支持作用的培养基及芽苗试管内生根的传统程序。该技术的应用不仅减少了一次无菌操作的步骤,提高了培养空间,又简化了组培程序、降低了生产成本。Debergh等认为诱导试管苗生根过程的费用占总费用的35%~75%^[5]。有研究证实,采取瓶外生根技术,可以减少总费用的70%左右^[6]。本研究试管苗瓶外生根试验采用微体扦插和试管苗瓶外袋生根两种方法,其中试管苗瓶外袋生根无性系最高生根率达90%以上。

试管苗瓶外生根优于试管苗瓶内生根主要表现在以下几个方面:(1)移栽成活率高。移栽成活率是检验组培是否成功的关键,也是检验组培能否进行工厂化的关键。试管无根苗瓶内生根和瓶外移栽是两个单独的过程,其生根率和移栽成活率是需要累计连续计算的。而瓶外生根率是将生根和移栽合二为一。综合国内外研究认为,试管苗瓶外生根的移栽成活率比瓶内生根后再移栽的成活率显著提高,瓶外生根苗避免了根细附着的琼脂造成的污染腐烂,并且发育正常健壮,而瓶内生根根系往往为肉质根,吸收功能很差。瓶外生根在生根过程中已经逐步适应了环境,经受了自然环境的锻炼,不适应环境的弱苗在生根过程中已经被淘汰,移栽苗都是抗逆性强的壮苗,容易成活。(2)大幅度降低成本。首先,无性系瓶内生根成本高主要表现在设备投资大、用电量大的培养基成本高等方面,而且大批量生产过程中,往往因操作失误导致污染。国内外的组织培养室都是全封闭的,靠人工光照和空调来满足试管苗对光照和温度的要求,这种培养室的耗电量大,电费约占整个成本的50%,并且培养基中的琼脂不仅用量大而且价格很高。相比之下,试管苗瓶外生根使用纯沙、泥炭土为基质,液体培养基用量少,利用自然光照,培养温度随季节变化而变化;其次,试管苗移栽前需要经过炼苗过程,移栽后会出现休眠期,要想打破休眠,就需要使用赤霉素进行喷淋,而赤霉素价格昂贵。同时,试管内生根的苗木移栽过程中会伤根系,易感染病害,移栽后每隔10d喷需一次杀菌剂,每隔2周要喷一次苗肥以促进其生长,并且移栽成活率随季节变动大;而试管苗瓶外生根苗木在移栽过程中不需要缓苗,无休眠期,抗病害能力强,无需定期喷洒杀菌剂及施肥,而且最终移栽成活率高于瓶内生根的苗木,大大节省了人力和物力。另外,劳动力是组织培养成本的主要组成部分,在发达国家,由于劳动力生产成本较高,仅有一半的组织培养苗木可应用于生产。试管苗瓶内生根技术对人工技术水平要求高,操作繁琐;而试管苗瓶外生根技术对人工技术水平无特别要求,普通劳动力即可,从而大大降低了人工费用。

参考文献

- [1] Winton L L. Shoot and tree production from aspen tissue cultures [J]. Am J Bot, 1970, 57: 904-909.
- [2] Ahuja M R. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen [J]. Silvae Genet, 1983, 32: 131-135.
- [3] Chalupa V. Micropropagation of mature tress of birch (*Betula pedula* Roth) and aspen (*Populus tremula* L.) [J]. Lesnictvi, 1989, 35 (11): 983-993.
- [4] 徐妙珍,刘培林,于启滨. 山杨组织培养的研究[M]//刘培林. 山杨育种研究. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1993:50-62.
- [5] Debergh P C, Zimmerman R H. Micropropagation technology and application [M]. Kluwer: Academic Publishers, 1991.
- [6] 冯学赞,陈文龙,王玉珍,等. 组培苗气培生根法的研究[J]. 林业科技通讯, 1996(10): 18-20.