

# 泡桐脱毒组培苗的生产和育苗技术

田国忠<sup>1</sup> 李志清<sup>2</sup> 张存义<sup>2</sup> 黄钦才<sup>1</sup> 张兆欣<sup>2</sup> 薛杰<sup>3</sup> 赵俊芳<sup>2</sup>

(1 中国林科院森林生态环境与保护研究所 2 河南省濮阳市林科所 3 山东菏泽市林科所)

**摘要:**根据多年的泡桐丛枝病理理论研究和防治经验,总结出一套泡桐脱毒组培苗生产与苗圃育苗技术要点,包括从泡桐原种的选择、组培脱毒和病菌检测技术、组培苗快繁、营养钵苗生产与运输、苗圃育苗等各个环节,以期规范泡桐脱毒苗木应用和育苗技术成果推广,有效控制种苗传播泡桐丛枝病途径,促进我国泡桐生产的健康持续发展 and 生态环境建设。

**关键词:**泡桐;脱毒苗;组培;育苗

泡桐是我国人工栽培历史最悠久的树种之一。其木材具有质轻、耐火性强、不易劈裂、不易变形、以及隔潮、耐腐、易干燥和声学性能好等特点。在民间建筑、家具、农具、乐器手工艺及文体用品等方面用途广泛。在木材工业中可作胶合板、造纸、木模、航空模型、航空包装、车船衬板、电线瓦板等。也是泡桐主产区传统的出口产品。泡桐成树开花多、花冠大、树冠优美,抗污染和空气净化能力较强,是城市和近郊重要的绿化和美化树种。另外,泡桐的花、叶、果、树皮是传统的中药材,也可作为动物的优良饲料。作为一种生长速度较快的树种,泡桐在我国具有广泛的栽种适生范围和多种经济、社会和生态价值<sup>[1,2]</sup>。

由植原体(原称为类菌原体,MLO)引起的泡桐丛枝病在我国泡桐栽培区发生十分普遍。病菌和 1~2 a 生幼树染病后多在当年死亡,3~5 a 的中幼龄树染病后冠形严重受损,影响美化效果,成年树材积和材质明显下降。泡桐丛枝病菌通过种根和种苗传播是此病害发生和流行的主导因子<sup>[3]</sup>。泡桐丛枝病脱毒育苗技术的建立和应用是解决当前在病区苗木带菌率高、病害随繁殖材料传播蔓延的有效措施。泡桐脱毒苗生产是指通过温度和茎尖组织培养相结合从组培苗中除去植原体病菌,脱毒组培苗原种经组培扩繁、生根、温室驯化最后到苗圃育苗一整套生产过程,由此获得的苗木即为脱毒苗或称之为无毒苗<sup>[4,5]</sup>。

多年的理论研究和在河南、山东、江西、北京和河北等地近 10 余年的试验和示范实践充分证明,采用

脱毒苗木造林绿化,不仅具有杜绝病害随种苗的长距离和短距离传播和危害、挽回苗木和幼树的死亡、避免或推迟成树发病等作用,而且对于改变传统落后的种苗繁育体系,推广和应用优良泡桐品系及配套先进技术也具有重要促进作用<sup>[6~9]</sup>。

根据多年试验和示范,在总结经验教训基础上,现总结出一套泡桐脱毒组培苗生产与苗圃育苗技术要点与规范,以期有利于该技术和成果的更好推广与应用,提高育苗质量,推动泡桐生产健康持续发展和生态环境建设。

## 1 泡桐原种的选择

### 1.1 泡桐种、品种(系)的选择

泡桐属共有 8 个种,并存在众多的天然杂种群体,以及经人工改良的品种(系)。不同的种、品种或无性系在材质、材性、抗逆性、冠形及接干性能、花色花期等各类性状方面都有明显的差异<sup>[10,11]</sup>。需根据林业生产和绿化美化的不同要求、营林和定向培育目标,选择适宜种类、优良品种或无性系作为组培脱毒快繁的原种材料。由于组织培养快繁为植物无性克隆繁殖,所以能够保持苗木遗传特性的稳定和一致。

### 1.2 适生范围的选择

泡桐在我国的分布范围广,其北界达辽宁南部、北京、太原、延安、平凉一带。南部分布至两广及海南。东起台湾,西至陇东、四川和云南的大部地区,分布达 23 个省、市、自治区。但不同的种或品种各自具有不同的生长特点和一定的适生地地域和条件。比如,白花泡桐种源在长江流域,其南界可达两广及海南;而毛泡桐、楸叶泡桐、圆冠泡桐种源的适生区在黄河流域及以北地区<sup>[1,2,12]</sup>。在选择繁殖材料之前,特别是在大规模育苗和工程造林前,充分了解脱毒种苗的

收稿日期:2005-10-05

修回日期:2005-11-22

基金项目:国家级星火计划项目(国科发计字[2004]140号)“泡桐选用品系脱毒组培快繁和泡桐丛枝病配套控制技术”资助。

第一作者简介:田国忠(1963-),男,研究员,主要从事森林病理学和生物技术研究。

适生和遗传特性,并进行合理的引种试验示范,是确保育苗和营林质量、降低造林风险和增加遗传增益的重要前提。特别要根据不同的情况重点关注品种的抗寒、耐涝、抗风、抗盐碱及抗病虫等能力。

## 2 组培脱毒和植原体检测技术

将脱毒与组织培养技术相结合,可以实现根据客户和生产的需求对所获得的无病原种进行快速大量工厂化生产。一般情况下,从采集优良泡桐外殖体材料至获得脱毒原种组培苗需要3~6个月的时间。

### 2.1 外殖体来源

用于获得组培苗的材料,包括具有发芽能力的种根、休眠枝条、春季新发的嫩芽条以及其他生长季节的枝条。其中以种根和休眠枝条、室内水培萌条芽及春季自然萌条芽作为组培外殖体的材料效果最好。生长季节,特别是雨季从树上采集枝条常因微生物污染较重而成功率降低。

### 2.2 外殖体消毒

泡桐外殖体常采用75%乙醇和0.1%升汞进行消毒,处理时间长短因材料老嫩程度而异。严冬过后,将从大树上采回的主干上萌条截段长约50cm,下端浸水催出长约1~2cm新芽后剪下,清理外表老叶,用清水冲洗后在超静工作台上用0.1%升汞处理7~8min后,经无菌水洗3~4次即可放入培养瓶中培养。如果春后直接从树上采回萌芽长约3~5cm,去叶在自来水下冲洗,用75%酒精作表面消毒3~4s,然后用0.1%升汞溶液浸泡8~10min。无菌水洗3~4次,截成小段或整个小芽培养。

也可采用根段催芽作为外殖体培养。做法为把根段涮洗干净,放入托盘上用纱布保湿置室内25℃左右催芽。消毒方法同上,因材料幼嫩可不必用酒精,0.1%升汞溶液处理时间5~6min。

### 2.3 组织培养

不同遗传背景的泡桐材料其适用培养基有很大差异,需根据实验加以确定最适的组培条件。一般而言,从成年树上取来的材料,初次培养芽培养基以改良MS(其中硝酸铵和硝酸钾取1/2或1/4的量,其余不变),附加细胞分裂素(6-BA)浓度3.5mg/L,生长素(NAA)0.15~0.2mg/L,蔗糖30g/L,pH6.0。在两支40W光照下培养12~14h/d。室内温度25±2℃。当幼芽伸长2~3cm,可截带芽小段转入继代增殖培养基上培养<sup>[13]</sup>。

### 2.4 脱毒与病原检测

单纯的茎尖培养、采用四环素处理然后茎段培养

和以35~38℃温度处理结合茎尖培养方法皆可获得脱毒组培苗,但以35~38℃温度处理结合茎尖培养的脱毒效果最佳,脱毒率可达100%。

对组培苗脱毒效果评价包括组培苗生长状况的观察、DAPI荧光显微镜检查、血清试剂盒及PCR技术检测等方法。原种组培苗必须经直接PCR和进一步的巢式PCR3个重复检测证明无植原体后才能用于大量快繁<sup>[13]</sup>。

DAPI荧光显微镜技术步骤:取植物幼茎、叶柄或根等组织,进行组织切片,厚度在100μm左右,用5%戊二醛固定2h左右,用0.1M磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤后,用1μg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色,最后置于落射荧光显微镜下检查韧皮部特异性植原体DNA荧光,激发滤光片波长为365nm,阻断滤光片波长为420nm。

PCR技术步骤:从组织中提取植物和植原体总DNA,用植原体16S rRNA等基因序列的引物进行PCR基因扩增,然后进行琼脂糖电泳,检测特异性扩增产物谱带。

## 3 组培苗快繁

### 3.1 继代增殖培养

继代增殖培养是扩大组培苗原种基数。因品种不同,芽苗增殖生长对基本培养要求不同,不过在MS附加6-BA 1.5~2.5mg/L, NAA 0.1~0.2mg/L,蔗糖25~30g/L,均可生长,芽增殖率在3~4。

### 3.2 生根培养

泡桐试管芽苗在MS基本培养基上,在没有细胞分裂素和生长素存在条件下,都可形成根,只是生根慢、根细长。在1/2MS(大量元素减半,其余不变),附加NAA 0.05~0.1mg/L和IBA 0.1~0.15mg/L,25g/L蔗糖或白沙糖20g/L条件下,10d左右就生根,生根率90%以上,再过5d左右可进行炼苗移栽。

### 3.3 组培苗原种的长期保存

多数种类泡桐组培苗原种可以通过正常的定期茎段继代培养得以长期组培保存,种性特征无明显的改变。降低培养室温度、采用相对密闭的培养瓶及将培养瓶直接转至8~15℃的冰箱或冷藏室内能降低组培苗生长和代谢速度,减少转代次数和工作量。

## 4 营养钵苗生产与运输

用脱毒组培苗原种进行组培扩繁,可获得大量营养钵小苗,供应苗圃育苗或直接在大田定植。

### 4.1 组培营养钵苗的生产季节

通常应根据苗木生产需求提前安排苗木繁育任

## 技术开发

务。从原种苗生芽组培扩繁至获得可移栽苗木的生产周期一般为3个月左右。在中原地区,要做到当年组培苗下地、当年造林用标准苗出圃,需赶在当年3月下旬至4月上旬营养钵苗按时移栽。若在夏季或秋季生产的营养钵苗,可通过人工遮荫或在温室内炼苗后于第2年早春移入苗圃内育苗,通过几个月的炼苗后,已木质化和根系发达的小苗,能够在较低温度下越冬(6℃以上),且移栽苗圃后的成活率更高,可达100%。此苗也可以用于直接定植造林。

### 4.2 温室(棚)条件

温室在育苗期间的温度控制在20~25℃左右。温室内无泡桐丛枝病株和其他严重发生的病虫害,否则应在育苗前对温室进行熏蒸或喷药消毒处理。在泡桐丛枝病区,温室通风开口处要加挂40目的防虫网,以免室外带毒介体昆虫飞入温室传病;在未有防虫网的简易塑料薄膜温棚,也不能为了通风透光或除湿而将塑料布随便打开(无病区除外)。

### 4.3 营养钵与营养土

营养钵常用黑色塑料杯,成本较低,规格8 cm×8 cm或10 cm×10 cm。最理想的营养钵是无纺纸容器,既透水透气、又透根,运输方便,且连容器栽植,苗木成活率高。

营养土壤常用草炭和珍珠岩,按3:1混合使用。所用营养土壤不能含有检疫性病虫害,比如根癌土壤杆菌、根结线虫、根部害虫等。必要时要进行营养土壤熏蒸、高温灭菌或喷药处理。喷药处理以50%多菌灵600~800倍溶液与基质搅拌或用1‰~2‰高锰酸钾溶液与基质拌匀,湿度以手握成团不滴水,放手不散开为度。随即盛入容器或堆积塑料薄膜覆盖2~3 d后盛入容器,栽植苗前1 d尚需用清水淋透备用。

### 4.4 生根苗驯化与移栽

当试管生根苗普遍根长1~2 cm后,可以连瓶拿到室温20℃左右的温室或塑料大棚里,在遮荫网下(避免阳光直射),搁置5~7 d炼苗,在移栽前1~2 d打开瓶盖进一步炼苗。从瓶里取出苗时,最好先倒入点清水,用镊子往瓶底部周围划一周,把瓶壁与培养基划开,轻轻倒出小苗。顺手轻轻洗去根部培养基。

### 4.5 营养钵苗的管理

把幼苗栽上容器后,随即覆盖透光塑料膜保湿,塑料膜上面再盖遮荫网(阳光强时)。在栽植头3~5 d,不必喷淋,此后可在塑料布上四周开几个小口透气,至1周后逐步揭开塑料布。泡桐组培苗最易发生

由真菌引起的猝倒病,要经常检查,可喷50%多菌灵800~1000倍液防治。1个月后容器苗可外运至苗圃,尚需3~5 d适当防风保湿过渡性炼苗,以适应外界条件。

### 4.6 苗木运输

由于脱毒组培苗不携带任何检疫性病虫害,可以作为植物检疫上的免检种苗进行运输。通过各种交通工具如汽车、火车、轮船和飞机等进行长途运输时,可以带土运输,也可去土裸根运输(以木质化程度高的越冬落叶苗效果最佳)。

## 5 脱毒苗的圃地培育

### 5.1 苗圃地的选择

新建的泡桐脱毒育苗苗圃或育苗基地应满足下述的条件之一:(1)原无泡桐栽植地区或无泡桐丛枝病地区;(2)在苗圃地周围2 km范围内无泡桐病树,最好无泡桐栽植;(3)若在此范围内有少量病树,必须在育苗当年泡桐萌芽前砍除此病树,并彻底挖除病树的根,避免病根条萌生病苗而成为侵染源。选择育苗地周围有其他高大的非泡桐树种的隔离林带的地块作为苗圃地则效果更佳。

苗圃地要选择土壤肥沃,有良好的浇水和排水条件,特别不能在低洼和排水不良的地块育苗。

### 5.2 育苗方法

在平整土地时每667 m<sup>2</sup>施入腐熟土杂肥5000 kg,过磷酸钙25~50 kg,有条件的地方可施50~100 kg饼肥,以及5%辛硫磷颗粒剂3~5 kg和硫酸亚铁10~15 kg防治地下病虫害和进行土壤消毒。

年降雨量较多和有可能频发水涝的地方,要做到高垄育苗,一般底宽40~50 cm,高20~30 cm,垄的方向以东西向为好,利于挡风增温。在雨水偏低、春季风沙较重的干旱地区,应做低床育苗。

组培容器苗栽植时,左手倒托住小苗,右手轻轻取下塑料杯。注意勿弄散土团,然后将小苗放入坑内填好土,随即淋入定根水。

泡桐苗生长迅速,苗期需要分期追施肥料,第1次5月底前施硫酸35 kg/667 m<sup>2</sup>,第2次6月下旬,第3次7月中旬,施硫酸50 kg/667 m<sup>2</sup>。8月下旬以后苗木生长速度显著下降,为了促进苗木木质化,提高抗寒能力,应停止追氮肥,改追磷钾肥。

育苗干高4~5 m的苗木,地径6~7 cm(一级苗),株行距各1 m为宜,即每667 m<sup>2</sup>育苗667株;若培养特级苗,苗高5 m以上,需株行距1 m×1.1 m,每667 m<sup>2</sup>育苗600余株;地径7~8 cm苗,需株行距

1.2 m × 1.5 m, 每 667 m<sup>2</sup> 育苗 400 ~ 500 株。

### 5.3 田间管理

泡桐苗期主要病害是炭疽病和黑痘病。每隔半月喷洒 1 次 200 ~ 250 倍等量式波尔多液; 600 ~ 800 倍的 50% 退菌特; 1000 倍的 70% 甲基托布津, 交替使用。

泡桐幼苗常遇到地老虎幼虫、蛴螬、霜天蛾等危害。可用青草 25 kg 切碎加入 50% 辛硫磷, 傍晚撒入苗圃毒杀地老虎幼虫。

当苗木生长到 20 cm 高以后, 将萌发的附梢及时抹掉, 每隔 1 周抹除 1 次。

适时浇水是保证苗木正常生长的重要措施之一, 5 月中旬为了预防干热风应普遍浇水 1 次, 6 月中下旬再浇水 1 次。浇水与追肥相结合效果更好。出现积水和洪涝灾害时要及时排水和灾后松土排湿。当年生泡桐苗木连续泡水 7 d 左右即会导致烂根死苗。

### 5.4 苗木出圃

泡桐苗当年生长正常, 未发生丛枝病害, 苗木生长迅速, 苗质量好, 达到一级苗标准即可出圃。出圃苗木的规格为苗高 3 m 以上、地径 5 cm 以上, 无损伤和其他病虫害。一般情况下, 1 a 生泡桐苗的分级标准为: 特级苗地径 7 ~ 8 cm, 高 5 m 以上; 一级苗地径 6 ~ 7 cm, 高 4 ~ 5 m; 二级苗地径 5 ~ 6 cm, 高 3 ~ 4 m; 三级苗地径 4 ~ 5 cm, 高 2.5 ~ 3 m; 等外苗地径小于 4 cm, 高 2.5 m 以下<sup>[2]</sup>。

苗木出圃时间从 10 月下旬至第 2 年 3 月均可。但要注意其间 1 月份气温过低, 苗根受冻, 不宜出圃。出圃苗木根幅应保持 50 cm 左右为宜, 过小将影响其生长。出圃苗木若不能及时栽植要在背风向阳地方挖深 70 cm、宽 1 m 左右假植沟假植起来, 只覆盖土不浇水。

在起苗过程中严防树皮破伤和在苗木运输和栽植过程中采取树皮保护措施对造林后的树干的健康生长和保证木材质量有重要意义。

### 5.5 种根多代繁殖

在无病区的苗圃, 同一品种的进一步扩大育苗可用本苗圃内采挖的种根作为无毒种根, 进行多代苗木繁育; 其生产成本和价格将远低于组培营养钵苗, 而苗木质量和脱毒效果与营养钵苗相当。壮根的标准粗度为 1.5 ~ 2.0 cm, 种根截长 15 ~ 18 cm, 上平下斜剪口平滑作为根穗。剪好的种根及时晾晒 1 ~ 2 d, 不能堆成大堆以免霉烂。但在需增加新品种或无性系时只能重新用组培营养钵育苗。

在病区, 1 ~ 2 km 范围内无泡桐丛枝病株的育苗地, 可用脱毒苗种根进行苗木繁育, 并定期调查和取样检测苗木经昆虫传播而被再感染的状况, 田间发现病株应及时清除, 并对周围健株进行带菌追踪检测。清除方法是: 尽量不要碰晃病株, 以免带菌昆虫飞到四周健株上取食传病; 先用适宜浓度的触杀式杀虫剂喷洒发病泡桐苗及临近四周的未发病泡桐苗, 彻底杀灭其上取食的刺吸式昆虫, 然后再将病树连根挖除后异地深埋或烧掉。更好的措施是将发病树四周经病菌检测证明已带菌的无症带菌苗木加以清除。

原则上在河南、山东等重病区未采取相应的隔离措施的苗圃, 从当年培育的脱毒苗上取根繁殖的苗木即不能再称之为脱毒苗。不能将这类苗木供应无病区和轻病区, 更不能将种根用做无病苗木繁育的原种。

**致谢:** 中国林科院李永同志参加了部分研究工作。

### 参考文献

- [1] 中国林业科学研究院泡桐组, 河南省商丘地区林业局. 泡桐研究 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1982.
- [2] 蒋建平. 泡桐栽培学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1990.
- [3] Tian Guozhong and Raychaudhuri SP. Paulownia witches'-broom disease in China: present status, Forest Trees and Palms: Diseases and Control [M]. Oxford, IBH, 1996
- [4] 黄钦才, 田国忠, 袁巧平, 等. 泡桐微茎尖培养脱除泡桐丛枝病原 (MLO) 的研究 [J]. 生物技术, 1994, 4 (5): 9-12.
- [5] 张锡津, 田国忠, 黄钦才. 温度处理和茎尖培养结合脱除泡桐丛枝病原类菌原体 (MLO) [J]. 林业科学, 1994, 30(1): 34-38.
- [6] 洪炜, 洪杏春, 何小平, 等. 北亚热带泡桐无毒苗山地造林研究 [J]. 林业科技通讯, 1996(4): 16-17.
- [7] 王松枝, 薛敦孟, 王丽军, 等. 泡桐无毒组培种苗规模化生产技术研究 [J]. 林业科技通讯, 1998(4): 27-28.
- [8] 张锡津, 田国忠, 罗飞, 等. 无植原体泡桐苗防治丛枝病效果初析 [J]. 森林病虫害通讯, 1996(4): 6-8.
- [9] 田国忠. 我国泡桐丛枝病的综合治理策略研究——理论分析与防治实践探索 [J]. 中国造纸学报——2004 年中国科协年会第十一会场论文集 2004, 19(增刊): 352-355.
- [10] 林业部科技司. 阔叶树优良无性系图谱 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991.
- [11] 张存义, 赵裕后. 泡桐属一新天然杂种——圆冠泡桐 [J]. 植物分类学报, 1995, 33(5): 503-505.
- [12] 谢卫权, 徐东山. 泡桐在华南地区的引种技术 [J]. 林业科技开发, 2004, 18(2): 64.
- [13] 田国忠, 温秀军, 李永, 等. 枣疯病和泡桐丛枝病原植原体几个分离物的组织培养保藏和嫁接传染比较研究 [J]. 林业科学研究, 2005, 18(1): 1-9.

(通讯地址: 100091, 北京市海淀区颐和园后)