

氮、磷、钾对若干种木本植物 离体培养繁殖的影响

诸葛强 阙国宁

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

摘要 本文通过培养基中三个主要营养元素氮、磷、钾对若干种木本植物(如杉木、北美红杉等)离体培养繁殖影响的研究,提出了较适合于这些木本植物离体培养的改良MS基本培养基(其中大量元素氮、磷、钾水平修改为: NH_4NO_3 850 mg/L, KNO_3 2000 mg/L, KH_2PO_4 100 mg/L)。在此基础上,讨论了工厂化组培繁殖木本植物特别是一些常规繁殖困难的林木树种的可能性,以及提高组培生产率和降低生产成本的有效措施。

关键词 氮; 磷; 钾; 木本植物; 组培繁殖

近年来,组织培养作为木本植物的一种大量繁殖方法引起了人们的极大重视,得到了迅速发展^[1~3]。然而,全世界用组织培养繁殖的植株仍只占木本植物年生产总量的一小部分^[4]。其原因一方面是由于以往采用的基本培养基的局限性,使不少木本植物特别是林木树种难以组培繁殖;另一方面是与常规繁殖相比,同种植物用这种方法繁殖的生产成本问题^[5]。

氮、磷、钾营养元素是培养基中基本而又大量的化学元素,木本植物成功地离体培养,在一定程度上依赖于对培养基中这三种元素的选择。从生理学观点来看,培养基中氮、磷、钾元素形态和水平的变化与培养体的分化、增殖以及生长状况密切联系。本试验试图通过基本培养基中三种营养物质——硝酸铵(NH_4NO_3)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、硝酸钾(KNO_3)——对若干种木本植物(杉木、北美红杉等)离体培养繁殖影响的研究,确定对这些木本植物较为理想的基本培养基。关于氮、磷、钾对这些植物离体培养的影响未见详细报道。

一、材料和方法

(一) 培养基设计

所有试验采用的培养基均在 Murashige 和 Skoog (MS) 基本培养基上进行修改,三组盐分浓度分别为1/2(低)、不变(中)、2倍(高)强度的MS大量元素浓度,其具体的硝酸铵(NH_4NO_3)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、硝酸钾(KNO_3)浓度处理如下, NH_4NO_3 为0、1000、2000、3000、4000 mg/L; NaH_2PO_4 为0、50、100、200、400 mg/L, KNO_3 为0、1000、

2000、3000、4000 mg/L。

(二) 试验材料

试验材料取自杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.)、北美红杉 (*Sequoia sempervirens* (Lamb.) Lindl.)、西洋杜鹃 (*Rhododendron hybridum* Ker.)、金边瑞香 (*Daphne odora* var. *marginota*) 的离体培养物, 为 3~5 cm 长的无菌嫩梢, 分别培养于附加不同的低浓度生长调节物质与 NH_4NO_3 、 NaH_2PO_4 、 KNO_3 处理的培养基上。培养基调至 pH 5.8, 于 121 °C 灭菌 20 min。培养体置于 25 ± 3 °C, 每日光照 (1500 lx) 16 h。每一处理至少 10 次重复。培养 2 个月后分别测定供试材料所诱导的嫩梢增殖数及其平均嫩梢长度和嫩梢品质。品质分级标准如下:

I 级: 增殖的嫩梢数量多, 多数在 1.5 cm 以上, 梢条粗壮, 叶色深绿。

II 级: 增殖的嫩梢数量多, 多数在 1.5 cm 以上, 但梢条较细, 叶色略淡。

III 级: 增殖的嫩梢数量较少, 多数在 1.5 cm 以下, 梢条较细, 叶色淡。

IV 级: 增殖的嫩梢数极少, 几乎无 1.5 cm 以上可用的嫩梢, 多数培养体 2 个月以后渐趋死亡。

V 级: 无嫩芽及嫩梢增殖, 2 个月以后全部培养体几乎死亡。

二、结果和讨论

(一) 硝酸铵处理对培养体的影响

1. 杉木 硝酸铵不同处理对杉木离体培养的结果(表 1)表明, 铵态氮与硝态氮对杉木培养体的分化、增殖和生长状况产生了不同的影响, 其嫩梢增殖数量、平均长度及品质出现了很大的差异, 大致可概括如下几点。

表 1 硝酸铵浓度和总盐分处理对杉木和瑞香离体培养的影响

组号	培养基号	铵态氮 NH_4^{+} (mg/L)	硝态氮 NO_3^{-} (mg/L)	总盐分 (mg/L)	杉木			瑞香		
					总嫩梢增殖数 (条)	平均嫩梢长度 (cm)	嫩梢品质 (级)	总嫩梢增殖数 (条)	平均嫩梢长度 (cm)	嫩梢品质 (级)
A	1	0	132	1543	30	0.8	II	7	3.2	II
	2	175	307	2543	25	2.1	I	20	3.7	II
	3	350	482	3543	22	0.6	III	20	4.5	II
	4	525	675	4543	0	0	V	20	5.0	III
	5	700	832	5543	0	0	V	7	5.1	III
B	6	0	263	2983	38	0.7	II	11	4.6	II
	7	175	438	3983	30	1.1	I	15	4.9	I
	8	350	613	4983	29	1.0	III~IV	8	4.8	I
	9	525	788	5983	10	0.5	V	13	4.4	II
	10	700	963	6983	0	0	V	7	4.3	II
C	11	0	526	5863	40	1.2	II	6	4.5	I
	12	175	701	6863	75	1.4	I	7	5.0	I
	13	350	875	7863	29	0.6	III~IV	12	5.5	II
	14	525	1051	8863	0	0	V	5	1.5	III
	15	700	1226	9863	0	0	V	3	1.5	III

(1) 铵态氮对杉木的增殖不是必需的(如 1、6、11号培养基); 低浓度的铵态氮(175 mg/L)对杉木的增殖及生长效果好(如 2、7、12号培养基), 嫩梢增殖数量多且品质好, 这对批量繁殖来说是较有利的; 高浓度的铵态氮(525 mg/L 以上)对杉木则无诱导增殖效应, 甚至造成毒害作用, 使培养体在培养后期渐趋死亡。

(2) 在不含铵态氮的情况下, 硝态氮能为杉木增殖提供足够的氮源, 且在一定范围内随着硝态氮浓度的增大, 杉木培养体的嫩梢数、有效嫩梢数及嫩梢平均长度均有增加的趋势(如 1、6、11号培养基); 在低浓度铵态氮处理的情况下也得到了类似的结果。

(3) 虽然只含硝态氮的培养基对杉木增殖效果不差, 但如果与低浓度的铵态氮配合使用, 则效果更佳(如 2、7、12号培养基), 其增殖的嫩梢多且粗壮, 这说明低浓度的铵态氮对杉木增殖有促进作用。

(4) 培养体对硝态氮与总盐分浓度的适应范围较广。在铵态氮浓度不太高的情况下, 硝态氮含量从 132~701 mg/L、总盐分从 1543~6863 mg/L 的区间内, 其培养效果良好。但从整体水平来看, 总盐分为中、高浓度组的培养效果更好一些。

2. 瑞香 分析不同硝酸铵处理对瑞香离体培养的效果(表 1), 可明显看出其总的结果与杉木相类似, 但也有一些不同之处。

(1) 瑞香对铵态氮的吸收利用能力比杉木高, 表现在当培养基铵态氮含量为 350 mg/L 时比杉木在此浓度下的培养效果好得多。

(2) 总盐分含量从 1543~9863 mg/L 对瑞香培养体嫩梢增殖都能起作用, 这说明瑞香对总盐浓度的适应范围很大, 就培养体增殖嫩梢的整体品质来说, 高盐浓度组好于中盐浓度组, 而中盐浓度组又好于低盐浓度组。

(3) 虽在高盐浓度组的培养基中, 附加低浓度的铵态氮所增殖的嫩梢最粗壮, 然而这种粗壮嫩梢的基部很容易再度脱分化而引起愈伤组织增生; 在中盐浓度组中, 铵态氮浓度为 175~350 mg/L 时的诱导效果最佳, 嫩梢长度、粗度适中且数量多, 这为瑞香组培快速繁殖的理想范围。而在低盐浓度组中, 虽然铵态氮含量为 175~525 mg/L 时的嫩梢增殖数量多, 且较长, 但太纤细, 嫩梢无实用价值。

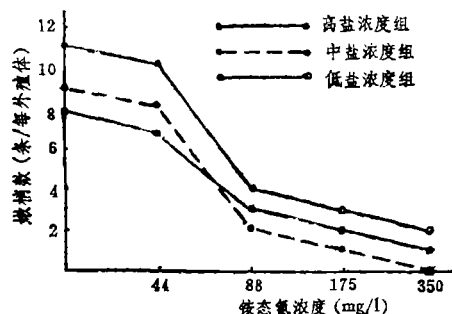


图 1 硝酸铵对杜鹃离体培养的影响

3. 杜鹃 就不同硝酸铵处理对杜鹃嫩梢增殖的影响(图 1)得到, 其增殖的嫩梢数随着铵态氮含量的下降而显著地增加。并且, 在三组总盐分浓度处理中, 低浓度组的培养体增殖率最高, 这表明杜鹃嫩梢增殖不适宜高浓度盐分的培养基。另外, 高浓度的铵态氮也对杜鹃培养体产生了毒害作用, 对嫩梢增殖诱导效应极差, 此结果与杉木很相似。

综合不同硝酸铵浓度处理对杉木、瑞香和杜鹃离体培养的效果^[6], 表明木本植物离体培养时对不同形态氮素的同化利用能力不同。如只供给硝态氮得到的增殖效果好, 供给低浓度铵态氮对增殖有促进作用; 供给高浓度铵态氮则无增殖效果; 同时供给硝态氮和低浓度的铵态氮的增殖效果最佳。Hageman (1980) 在综述了氮素形态对植物影响方面多年来的研究后认为^[7], Arnon 提出的“硝态氮和铵态氮都可以为植物的生长和生产提供足够的氮源, 但硝

酸盐更为安全”^[8]的观点仍然是对的。本试验在木本植物离体培养方面再次验证了这些观点。

(二) 硝酸钾处理对杉木、瑞香、杜鹃离体培养的影响

在不同浓度的硝酸钾处理试验的结果(表2)中出现了一个值得注意的现象,即除硝酸钾对照处理(不含硝酸钾)外,试验所采用的不同浓度硝酸钾处理对各培养体的增殖影响差异不明显,总体生长差异也不大。还存在一个趋势就是高浓度硝酸钾处理没有对培养体产生与硝酸铵处理那样的毒害作用,这说明各培养体对钾元素浓度的适应范围较广。其中瑞香在最高硝酸钾浓度处理下的生长最好,所增殖的嫩梢粗度适中,梢条整齐。而杉木、杜鹃于同一硝酸钾浓度下的增殖效果则差一些。试验还表明,与硝酸铵对照处理的培养体增殖效果仍不差的结果不同,硝酸钾对照处理的培养体生长状况最差(如杜鹃对照处理嫩梢增殖少而细,且后期叶枯致死),这说明如不供给钾元素,培养体增殖及生长就受抑制,即钾的供给还是必需的。

表2 硝酸钾处理对杉木、瑞香、杜鹃嫩梢增殖与生长的影响

硝酸钾浓度 (mg/L)	嫩梢数 (条/外植体)			平均嫩梢长度 (cm)		
	杉木	瑞香	杜鹃	杉木	瑞香	杜鹃
0	3.4	9.9	4.6	1.1	6.4	2.6
1000	4.6	16.2	7.8	1.4	5.7	3.5
2000	5.3	8.7	18.0	1.5	9.0	4.0
3000	5.2	8.3	5.9	1.4	6.3	3.0
4000	4.4	10.5	3.2	1.3	5.9	1.5

(三) 磷酸二氢钠处理对杉木、北美红杉离体繁殖的影响

磷酸二氢钠处理的试验结果(图2)极类似于硝酸钾处理的试验结果。有一个现象很明显,就是磷酸二氢钠对照处理的培养体无增殖效果,杉木和北美红杉在此条件下后期均趋死亡,这表示磷对杉木、北美红杉的离体培养是必需的。就杉木来说,随着磷酸二氢钠处理浓度的提高,其嫩梢增殖数也增加的趋势是相当明显的。北美红杉嫩梢增殖的总体水平也是随着磷酸二氢钠处理浓度的提高而增加的。这些

结果在一定程度上可说明,在一定的浓度范围内磷元素对培养体的增殖具有促进作用。反之,如缺乏磷则对培养体增殖产生抑制作用。然而,值得注意的是,本试验采用浓度为100 mg/L的磷酸二氢钠处理所诱导产生的嫩梢生长状况最佳,且同步性也好,适于批量生产。尽管磷酸二氢钠高浓度处理所诱导的嫩梢多而长,但不粗壮,因而无实际意义。

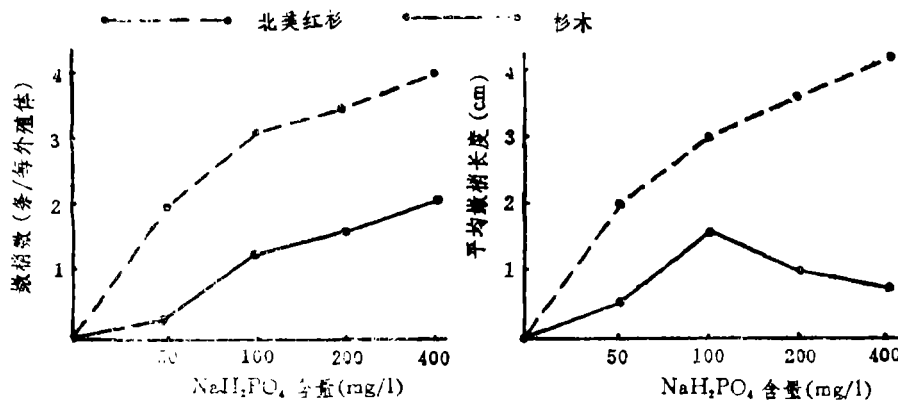


图2 磷酸二氢钠处理对杉木、北美红杉嫩梢增殖及嫩梢平均长度的影响

在总结了氮、磷、钾营养元素对本试验所采用的若干种木本植物离体培养繁殖影响的基础上,把MS基本培养基中的大量元素化合物(硝酸铵、硝酸钾、磷酸二氢钾)浓度水平修改为:硝酸铵(NH_4NO_3) 850 mg/L,硝酸钾(KNO_3) 2000 mg/L,磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 100 mg/L。此培养基既大大提高了试管苗的增殖率,又节省了培养基中大量元素的药品用量。我们进行组培繁殖的20多种木本植物对这一修改了的培养基都具有广泛的适应性。在此基础上,我们对一些树种还通过减少繁殖步骤或简化工序来达到降低生产成本的目的。例如:杉木组培繁殖,将生根与驯化结合起来,组培方法只用于外植体的形成和增殖,嫩梢采下后,用或者不用生长素处理,将其插入各种基质或预先准备好的容器内,再置于高温条件下也可以使其生根,北美红杉在组培增殖率极高的基础上,也同样获得了成功。用这套方法繁殖林木,大大降低了其生产成本,这就为工厂化批量生产苗木特别是一些常规繁殖困难的树种提供了可能^[9],在当前更具有重大意义。

参 考 文 献

- [1] Brigge, B. A. et al., 1983, Progress of micropropagation of woody plants in the United States and western Canada, *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 33, 239~248.
- [2] George, E. F. et al., 1984, Plant propagation by tissue culture, *Exegetics Ltd. Eastern Press*, Reacing, Berkshire, 709.
- [3] Loreti, F. et al., 1982, Mass propagation of fruit trees in Italy by tissue culture, present status and perspectives, *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 32, 283~291.
- [4] Zimmerman, R. H., 1984, Proceedings of the third Tennessee symposium on plant cell tissue culture: Tissue culture in forestry and agriculture, the University of Tennessee, Knoxville, 9~13.
- [5] Durzan, D. J., 1984, Proceedings of the third Tennessee symposium on plant cell tissue culture: Tissue culture in forestry and agriculture, the University of Tennessee Knoxville, 9~13.
- [6] 阙国宁等, 1986, 氮素营养对离体培养的北美红杉嫩梢增殖的影响, *亚林科技*, 1986, (3), 27~30.
- [7] Hageman, R. H., 1981, Nitrification inhibitor potential and limitations, *American Society of Agronomy and Soil Society of America*, 1980, 677s, 47~62.
- [8] Arnon, D. I., 1937, *Soil Sci.*, 44, 91~120.
- [9] Harsanyi, H., 1981, Biotechnology in the Year 2000 (Chapter 11), In *Biotechnology Present Status and Future Prospects*, Proceedings Conference, R. S. First, Inc. White Plains, New York, 15.

EFFECTS OF NITROGEN, PHOSPHORUS AND POTASSIUM ON THE PROPAGATION IN VITRO OF SEVERAL WOODY PLANTS

Zhuge Qiang Que Guoning

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract This report recommended a revised MS basal medium (macro-elements were modified as follows: NH_4NO_3 , 850 mg/L, KNO_3 , 2000 mg/L, KH_2PO_4 , 100 mg/L, which is suitable for tissue culture of woody plants, by studying effects of three major nutrient elements (nitrogen, potassium and phosphorus) on the propagation in vitro of several woody plants (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Lindl., etc.). Based on the data of the researches, the possibility in mass propagation in vitro of woody plants in particular those with difficulty for conventional propagation and some effective measures for increase of productivity and decrease of production cost were discussed.

Key words nitrogen; phosphorus; potassium; woody plants; propagation in vitro

石梓栽培技术研究成果达到国内领先水平

为了发展和利用石梓这一珍贵树种资源, 1976年农林部下达“优良、速生珍贵用材树种调查和栽培技术”研究课题, 石梓为其中之一。1980年林业部把石梓速生丰产栽培技术研究列入重大课题, 由中国林科院热带林业研究所和大青山实验局共同负责进行专项研究, 取得了可喜的成果。种子贮藏期延长至1年, 发芽率仍保持88%; 种子催芽技术获得了成功; 提出了整地方式、低切干苗和容器小苗栽培方法、造林密度、抚育间伐期及间伐强度, 为培育石梓丰产林, 提出了可行的技术措施。7年生的石梓林, 平均年生长量每公顷为26.0~29.7m³。受林业部的委托, 中国林科院于1989年底对该项成果进行书面鉴定, 专家们认为, 经过10多年的培育试验, 并与生产单位结合, 营造3000多亩中间试验林, 整理出系统的研究资料, 这对我国热带、亚热带地区发展石梓这一树种提供了科学依据, 并作出显著的成效, 研究成果达到国内领先水平。

(中国林业科学研究院 吴金坤)