

大型培养容器 在植物光自养微繁中的应用现状

■ 刘文科 杨其长 管道平

植物光自养微繁(Photoautotrophic Micropropagation), 又被称为植物光独立微繁或无糖培养, 是由日本设施园艺与环境控制专家古在丰树教授在 20 世纪 80 年代末提出的, 其特点是在培养基中不添加糖和生长调节物质情况下, 通过调控培养容器内的有效光子流密度(Photosynthetic Photon Flux Density, PPF)、 CO_2 浓度以及气流速度等来提高微繁植株的光合速率。其技术创新在于依靠组培微繁苗本身的光合能力来自我调节生长速度, 是一种全新的植物组织培养技术, 是环境控制技术和组织培养技术的有机结合。从提出该理论至今, 许多国内外学者已在光自养组织培养方面做了大量的研究, 使这一新技术逐步完善。

光自养微繁与常规组培比较

在植物组织培养中, 小植株的生长方式有三种: 一是自养方式, 植物体靠光合作用进行自然生长; 二是异养方式, 植物体靠培养基中的糖进行异养生长; 三是兼养方式, 植物体既利用培养基中的糖作为碳源, 又依靠人工光同时进行异养生长和自养生长。现在的植物组织培养微繁殖大多数是以第三种方式进行。在传统的组织培养技术中, 一直把培养基的类型、植物激素的种类、各种植物激素及有机物质在培养基中的含量和比例作为研究重点。而事实上, 光照、温度、湿度、 CO_2 浓度、植株的密度、培养容器中空气的流速等环境因子都影响小植株的生长发育等重要因素, 但很长一段时间未得到人们的重视。比较而言, 光自养微繁技术与常规组织培养有着本质的区别(见表 1)。随着光自养培养概念的提出, 利用工程技术手段来调控组培容器微环境(CO_2 浓度、光照、湿度等因子), 提高微繁苗的质量已成为组培技术研究的热点。其中以培养器皿的研究最为活跃, 涉及到培养容器的规格、体积和容器内的环境检测和控制等问题。从培养容器的发展来看, 大型化、组合式是当前和今后一段时间内的研究方向。培养容器作为整个光自养微繁技术的核心设施, 其技术进步涉及整个培养系统的水平和发展方向, 其中

主要包括强制通风系统、控制系统、支撑物质等。

大型培养容器的应用

培养容器是小植株生长的场所, 是植物组织培养中最重要的影响因素之一。培养容器的材质、形状、体积、功能极大地影响小植株的生长。在传统的组织培养中, 植株必须依赖外源糖作为碳源供植物生长。由于培养基中较高糖含量的存在, 易造成污染。因此, 为了防止病菌的污染, 一般是采用小的密封培养容器, 常用的有试管、三角瓶、广口瓶以及各种塑料器皿, 体积一般小于 0.5L。光自养培养微繁殖由于在培养基中除去了糖, 污染率降低, 大型的培养容器能够使用, 而且容器从初期的 2.6L 发展到现在的 120L 甚至更大。形状大多是长方体的透明体, 并开有多种功能的通风孔和放送植物材料的门。

大型培养容器的应用使组培苗的空间环境得到了扩展, 为空间环境因子的调控提供了可能性。因此, 大型培养容器在大型化方向发展的同时, 如何调控其空间环境成为必然面对和解决的问题。也就是说, 大型培养容器的发展和控制系统的开发是同时进行的, 是一整套的组培体系。有关在光自养微繁技术中采用带有强制性通风系统的大容器培养微繁苗已成为国内外研究的热点。Fujiwara 等 1988 年开发了一种大型培养容器(体积 18 L) 和强制

性通风系统, 该装置还设计了自动供应无菌营养液的控制系統。通过该培养体系提高了草莓在生根和驯化阶段的光自养微繁苗的品质。1992 年, Kubota 和 Kozai 用体积为 2.6L 的容器和强制性通风系统, 进行马铃薯光自养微繁试验。1999 年, Heo 和 Kozai 开发了类似的体积为 12.8L 的大容器培养了甜马铃薯苗。2001 年, 为提高容器内微繁苗的生长一致性, Heo 等开发了一个带有空气均匀释放管的大容器(体积为 11L)。在这个系统中, 培养容器内的气体分布均匀, 植株生长整齐。2000 年, 肖玉兰等开发了一个体积为 120L 的特大容器, 该装置已用于彩色马蹄莲非洲菊的工厂化生产, 在每一个生产周期每一个容器能够容纳 2300 株组培苗。这些研究表明, 大型化的组培容器及其配属的微环境控制系统在进行组织培养中显示出很好地生物学效应。另外, 由于大型培养容器的应用, 光自养微繁技术在工厂化生产的实践也初见端倪。通过组合大型培养容器, 采用集成的环境监测和控制系统, 以实时调控环境因子促进组培苗的生产。工厂化、商业化的生产是今后光自养微繁技术发展的必然方向。因此, 需要对培养系统进一步完善和改进, 以适合工厂化生产的需要。除此之外, 作为环境控制与生物技术的有机结合, 光自养微繁技术的工厂化应用还需对更多的植物种类进行光自养生物学性质的研究, 探索最适的环境控制方案。目前, 国内外采用光自养微繁的植物种类已达 20 余种, 包括草本和木本植物。主要种类有, 马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)、咖啡(*Coffea arabusta*)、甘薯(*Ipomoea batatas lam*)、草莓(*Fragaria ananassa Duchesne*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、情人草

表 1 光自养微繁和常规组织培养的差异

培养因素	光自养微繁	常规组织培养
碳源	CO_2	糖(蔗糖、果糖、葡萄糖等)
培养容器	各种类型的培养容器(试管至 120L 培养容器)	小的培养容器
支撑材料	多孔无机物质(蛭石、珍珠岩等)	主要是凝胶状物质(琼脂、卡拉胶等)
激素	低浓度或者无	高浓度激素
离子浓度	低离子浓度	高离子浓度
环境控制	环境控制自动化	很少研究植株的微环境控制
植株材料	具叶或叶绿体的幼嫩组织	幼嫩的组织或器官

(*Limonium bittleard*)、非洲菊 (*Gerbera jamesonii*)、西瓜 (*Mucumis melo L.*)、芋 (*Colocasia esculenta*)、葡萄 (*Vitis vinifera L.*)、万年青 (*Rohdea japonica Roth*)、满天星 (*Serissa japonica*)、康乃馨 (*Dianthus Caryophyllus*)、桉树 (*Eucalyptus spp.*)、中国杉 (*Cunninghamia lanceolata*) 等。现今,已有少数研究机构开始了工厂化生产的初步试验,有理由相信,不久的将来,会有更多植物种类的组培苗的生产将会采用光自养微繁的方法,以满足人们在生态恢复、农业生产、园艺栽培等领域的苗木需求。

大型培养容器应用优势及不足

大型培养容器设计与生产已经比较成熟,现今关键技术在于怎样更好地调控其内部的环境因子。这既是大型培养容器的优势所在,也是许多不足的存在之处。

大型培养容器内环境调控优点: ① 使用强制通风系统,使大型容器的气体交换、相对湿度、CO₂ 浓度和其它环境因子可较容易地进行调控,这可最大程度地优化植株的在整个生长期内的环境条件,从而很好地解决了常规培养中小容器内相对湿度过高的关键问题,也就是避免了因相对湿度过大导致的植株非功能性气孔和抑制表皮蜡质层形成等生理失调等问题,可生产出生长一致的植株; ② 强制通风使容器内的气体流动增加,有利于植物的生长; ③ 大型培养容器的使用增加了微繁苗的栽培密度,并且容器可随意进行空间组合,提高了生产效率; ④ 大型培养容器的开发使组培工厂化、规模化生产趋于成熟,使得生产系统的自动化控制和机器人管理成为可能; ⑤ 通过促进植物生长,缩短植株培养周期,并省去驯化阶段,可明显降低生产成本; ⑥ 在大型培养容器内,支撑材料呈多样化趋势。在植物组织培养中,常常使用凝胶类物质(琼脂、卡那胶、塑胶等)作为支撑材料。采用多孔的培养材料代替凝胶类物质可以极大的改善根区的环境和植物根系的组织结构,多孔培养基的高孔隙度、高气体扩散性和高含氧量有利于组培苗的生长。

大型培养容器内环境调控不足: ① 大型容器的表面消毒需要考虑解决的问题。容器在使用前的消毒是保证组织培养成功的先决条件之一。对小容器而言,由于体积小,可通过高压灭菌器进行。一般在121℃、1.4kg/cm²气压下持续20~40min即可。对大型容器而言,由于体积较大,难以通过上述方法进行,一般采用化学消毒方法。此方法费时费力,有时很难保证消毒质量。因此,需要研究替代的消毒方法,提高效率。② CO₂ 的添加释放均匀度问题。在大型的栽培容器内,如果仅仅进行强制性通风,培养容器内的CO₂ 浓度在进气口非常高,而在排气口CO₂ 浓度非常低,尤其在栽培容器内只有一个进气口和排气口的情况下,在进气口和排气口之间CO₂ 浓度差异显著,导致容器内培养的植株生长极为不一致。其主要原因容器内存在CO₂ 浓度梯度,气体环境不均一所致。为了克服这个问题,Zobayed 等于1999年在强

制通风系统的基础上开发了气体释放管道,在管道上均匀的打孔,其主要目的是提供均匀的CO₂、相对湿度和气体流速。Heo 等在2001年也开发了类似的装置。③ 环境因子的检测和控制技术有待进步。目前,对大型培养容器内的主要环境因子(温度、湿度、光照和CO₂ 浓度)的检测和传输技术已比较成熟,但真正意义上实现了控制的只有光照和CO₂ 浓度,且控制精度也有待提高。

展望

光自养微繁技术集生物技术和环境控制技术于一体,技术和设备的集成度提高,降低了操作技术难度和劳动作业强度,使该技术在工厂化种苗生产中有着广阔的应用前景。许多工程和生理生态方面的问题还没有完全解决,还有待于各学科间的进一步交叉合作。大型培养容器是整个光自养微繁技术的核心设施,其技术进步涉及整个培养系统的水平和发展方向。目前而言,此装置的生产和应用规模很小,大多处于科研阶段或中试水平。随着生物、工程、环境与信息等领域的技术突破,在未来的发展过程中光自养微繁技术也将更多地体现现代科技成果的集成与创新。

■ 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所 100081

基金项目: 中国农业科学院科研基金项目“植物无糖培养环境控制系统与综合配套技术研究”, 科技部项目“植物无糖组织培养环境综合调控系统的升级改造”(项目编号: JG-2003-6)。

昆山市永宏温室有限公司

地址: 昆山市花桥镇(312国道旁)
邮编: 215332
传真: 0512-5769424
电话: 0512-57696583