

植物无糖组培快繁装置及其环境控制系统的研制

杨其长, 刘文科, 管道平

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘要:针对常规植物组培存在的问题,从植物无糖组培实用化角度出发,研制了带有新型 CO₂ 施放装置的 180 L 植物无糖组培容器及其环境控制系统,采用小流量控制、三通阀调节和 PWM 控制方式,实现了对 CO₂ 浓度的精确控制,控制精度达到 $\pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$;采用穴盘覆膜与气体循环吸附相结合的方式实现了对容器内相对湿度的自动控制,控制精度达到 $\pm 2\%$ 。通过圆叶海棠的无糖组培的试验,结果表明,该系统对组培苗的生长环境和生理品质的提高具有显著的促进作用。

关键词:植物无糖组培;培养容器;环境控制系统

中图分类号:Q813.1⁺2

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2007)04-0079-06

Design of Device for Fast Propagation of Plant Sugar-free Tissue and its Environmental Control System

YANG Qi-chang, LIU Wen-ke, GUAN Dao-ping

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A 180 L culture vessel for sugar-free tissue culture with new type CO₂ releasing pipe and its environment control system were designed, aiming at solving the problems existing in conventional plant tissue culture and from the view point of practicing plant sugar-free micropropagation. By combining the three techniques of small-flow control, three-way-valve adjustment and PWM control pattern, the CO₂ concentration in side of culture vessel was controlled within $\pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ around the target value. The technology of combining membrane tectoria with gas-cycle adsorption was used to realize the auto-control of inner relative humidity and the control precision has reached $\pm 2\%$. The result of experiment on culturing crabapple plant sugar-free tissue indicates that this system has the function of promoting the growth of tissue culture plantlets and improving their physiological quality.

Key words: plant sugar-free micropropagation; cultural vessel; environmental control system

传统的植物组织培养都是以密闭的小容器为培养装置,由于环境缺乏控制,组培苗是在高湿、低 CO₂、弱光和人为添加碳源培养基的生长环境下完成扩繁过程的,这种方式形成的微繁植株在解剖学、形态学和生理上存在着诸多异常,种苗生理品质差、污染率高、驯化周期长、成活率低的现象较为普遍^[1-3]。针对常规组培存在的问题,20 世纪 80 年代末,日本千叶大学古在丰树教授提出了植物无糖组织培养(plant sugar-free micropropagation)的概念,主要以组培苗的光合自养为理论依据,采用人工环境控制手段,用 CO₂ 光合形成的碳源代替培养基中的糖,以减少微生物的污染;同

时,通过调控培养容器内的光强度、CO₂ 浓度以及气流速度等来提高组培苗的光合速率,促进植株的生长发育和快速繁殖。与传统组织培养方式相比,植物无糖组织培养技术可显著提高组培苗生长速度、增强品质、缩短培养时间和降低运行成本。

多年来,国际上以日本 Kozai 为代表的一批学者一直致力于无糖组培容器的改进研究,相继开发出了体积不等、带有强制性通风设施的培养容器,但仍存在设备复杂、环境控制精度低等缺陷,影响了植物无糖组织培养技术的推广与普及^[4-7];国内以肖玉兰、徐志刚、李传业等为代表,

收稿日期:2007-06-26;修回日期:2007-07-10

基金项目:科技部仪器升级改造项目(JG-2003-6)和中国农业科学院科研基金项目资助。

作者简介:杨其长,研究员,博士,主要研究方向为设施园艺与环境工程。Tel:010-68976901;E-mail:Yangq@cjac.org.cn

开发了体积不等的植物无糖组培装置及其环境控制系统,但在 CO_2 浓度、相对湿度的精确控制方面尚未突破,难以实现普及与推广^[8~11]。针对国内外植物无糖组培容器及环境控制技术存在的主要问题,本研究从大型培养容器的优化设计、环境控制系统的研制以及 CO_2 浓度与相对湿度的精确控制等环节入手,进行了植物无糖组培装置及其环境控制系统的研究,为实现植物种苗快繁与工厂化生产提供技术支撑。

1 大型植物无糖组培装置的优化设计

大型培养容器是植物无糖组培装置重要组件之一,培养容器的材质、形状、体积、性能等要素极大地影响到小植株的生长。培养容器的设计必须考虑其透光、气体流动、散热以及湿度、 CO_2 的可控性等因素。因此,设计合理的大型培养容器是非常关键的,一方面可以提高组培苗生产的效率,另一方面可以提高组培苗环境控制的精度,为小

植株提供最佳的光照、相对湿度、温度和 CO_2 浓度等生长条件,提高组培苗的质量。

在综合考虑培养容器的结构特点以及对环境控制要求的基础上,设计了 180 L 的大型培养箱 ($1.2 \text{ m} \times 0.5 \text{ m} \times 0.3 \text{ m}$),培养箱结构简图见图 1、实物照片见图 2 所示。箱体材料采用透光率高、耐老化的进口有机玻璃板,壁厚 1 cm。容器内安装了水平悬挂式 CO_2 施放管 ($\Phi 2 \text{ mm}$),其上设有开口方向与垂直面成 60° 的两排均匀送气孔,孔径为 0.5 mm,孔间距离为 2 cm,长度为 1.25 m。安装时一端露出 3 cm,连接气源,为进气口;另一端封闭后安装在箱体的内嵌小槽中固定。箱体内置环境传感器(温度、湿度和 CO_2 传感器),通过控制系统实现对箱体内环境参数的自动检测与控制。培养箱箱体的侧面开孔为多孔梅花状通风口,进行自然通风换气。密封门通过铰链设置在箱体上,并嵌设用于密封的密封条和关闭时固定的锁扣件。

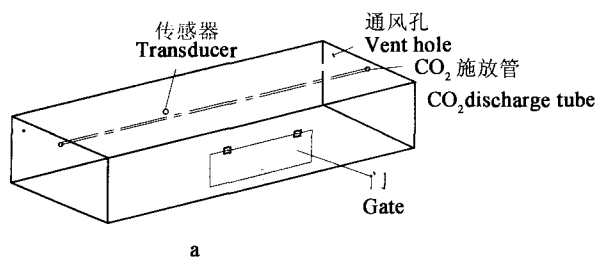


图 1 培养容器结构简图

Fig. 1 The sketch of the cultural vessel.

a. 箱体结构; b. CO_2 施放管

a. cultural vessel structure; b. CO_2 discharge tube.

在大型培养容器的设计过程中, CO_2 的均匀施放是系统设计的关键,目前常规方法是通过输气管直接将 CO_2 输入到箱体内,输气管的排气口通常设置在培养容器壁的边缘,通过气体的自由扩散来实现 CO_2 的施放。由于 CO_2 的分子量大于空气分子量的平均值,容易造成气体混合不均匀,使不同位置产生 CO_2 的梯度差异。在此环境下进行植物无糖培养,易造成组培苗生长不一致。所以开发更加有效的 CO_2 施放管(图 1. b)成为提高无糖组培苗质量的重要内容。带孔施放装置的设计可以保证 CO_2 在箱体空间内迅速均匀地分布,以减少扩散引起的滞后,提高 CO_2 浓度控制的精度。

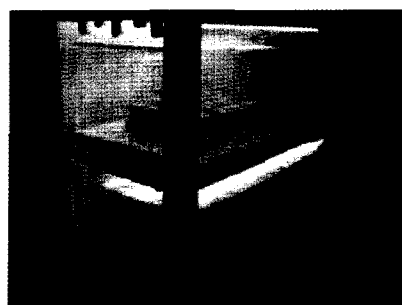
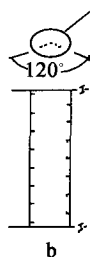


图 2 培养容器实物图

Fig. 2 Physical map of the cultural vessel.

2 植物无糖组培环境控制系统的研制

植物无糖组培环境控制系统采用单片机分布式控制模式(图 3),以一组控制单元进行组培间的控制与多个单元进行培养容器环境控制系统并联的方式,实现组培间与大型培养容器的协同调节与控制。控制系统各控制点均设有自动和手动功能,手动控制不受相应传感器信号和单片机设定值的限制,可以强制开启空调、除湿泵、 CO_2 电磁阀等执行机构。自动控制时,可以根据要求设定温度、相对湿度和 CO_2 浓度的控制点和控制范

围,系统自动控制空调、除湿泵及 CO₂ 电磁阀的工作量或开闭;通过安装自行研制的计算机软件 Condition controller 1.0 进行环境参数的自动控制

与数据采集,操作非常方便。控制系统所使用传感器的参数见表 1。

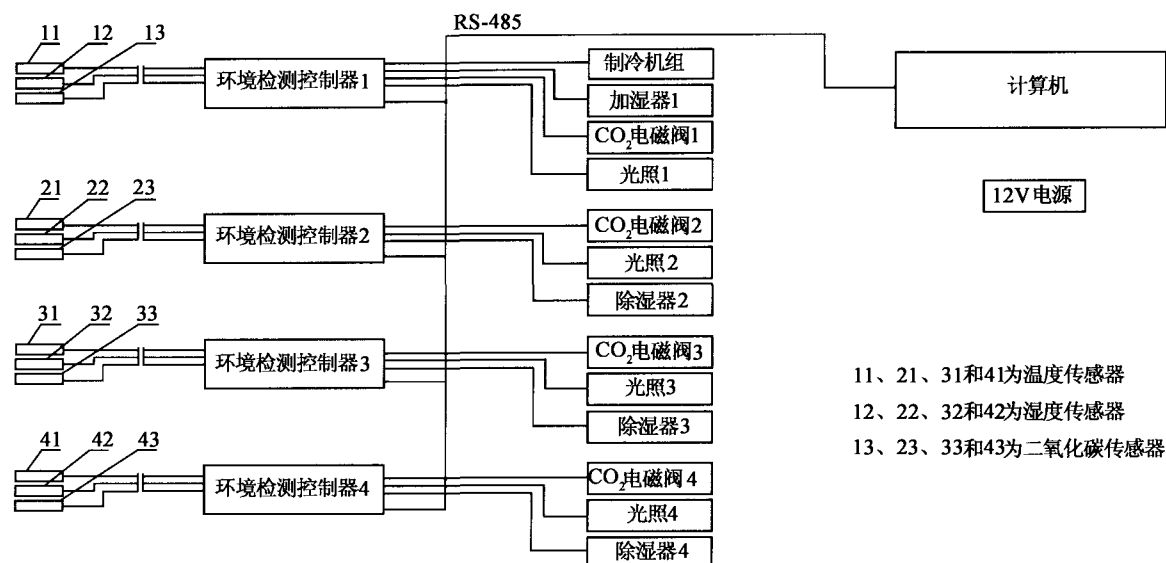


图3 分布式无糖组培环境控制系统

Fig.3 Distributed control system.

表1 环境控制系统传感器参数

Table 1 The sensor parameter of the environmental control system.

环境因子 Environment factors	产地 Producing area	检测精度 Detection precision	测量范围 Measuring range
温度 Temperature	E + E ELEKTRONIK Austria	0.3℃	0 ~ 50℃
湿度 Relative Humidity	MH - 1500 Humirel America	3%	1% ~ 99%
CO ₂ 浓度 CO ₂ concentration	E + E ELEKTRONIK Austria	30 μmol · mol ⁻¹	0 ~ 5 000 μmol · mol ⁻¹

2.1 CO₂ 浓度控制

CO₂ 浓度控制系统由 CO₂ 传感器、气源组件、PWM 控制器、电磁阀, 和稳流阀等组成(图 4)。PWM 控制器是可程序的单片机, 能够完成数据采集、处理和发出控制指令等功能。气源组件包括 CO₂ 液化气钢瓶、减压阀、稳压稳流装置、输气管和流量控制器等。CO₂ 控制与光照互锁启动。

在 CO₂ 控制过程中, 首先通过减压阀把 CO₂ 钢瓶内的压力降低, 再通过稳压稳流装置和流量控制器将 CO₂ 输送的速度降低到一个稳定的速率。系统输入 CO₂ 的多少主要通过 PWM 控制模式来实现, 利用单片机的 PWM 端口, 在不改变 PWM 控制周期的前提下, 通过 PWM 信号来控制电磁阀开启所需要的时间。即在一个控制周期

内, 当 PWM 控制器检测到培养容器中的 CO₂ 浓度不符合设定标准时, 通过比较实测值与设定值之间的偏差, 根据比例参数计算出电磁阀的开启时间, 采用 PWM 信号作为电磁阀的驱动信号进行间接控制。在程序中设定以 50 s 为一个控制周期。PWM 控制器通过通讯接口(RS-485)和上位计算机进行通讯, 既具有自我诊断的功能, 又可直接接受上位计算机的信号指令。计算机控制系统的控制程序采用 VB 语言编制, 检测记录可利用 Office 软件进行数据处理。

2.2 相对湿度控制

针对培养容器内湿度过大、结露现象严重、影响组培苗生长和传感器寿命等问题, 采用穴盘覆膜与气体循环吸附除湿方式实现对箱体内相对湿

度的自动控制。湿度循环吸附控制系统由湿度传感器、可编程控制器、过滤器、微型真空泵、输气管道等部分组成(图4)。微型真空泵的特点为无污染传输,允许介质富含水汽,可以任意方向安装,低能耗。输气管道采用的是 PPE 胶管,管外径 8 mm,管内径 6 mm。

在试验过程中选取变色硅胶作为除湿剂,由于采用穴盘覆膜技术,可以忽略基质表面水汽蒸发量;同时,由于培养容器与培养间内的空气交换较少,可以忽略自然通风换气引起的水汽量的变化。因此,除湿系统的吸湿量 E 主要由植物组培

苗蒸腾作用引起的水蒸气量构成。

假定植物组培苗蒸腾引起的水蒸气全部由除湿剂吸收,则由植物组培苗蒸腾引起的吸湿量 E 的计算公式为:

$$E = N \times n \times A \times Tr \times M \times h$$

式中: E 为吸湿量, N 为培养容器内植株数量, n 为单株组培苗叶片数, A 为平均叶面积(m^2), Tr 为叶片蒸腾速率($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), M 为 H_2O 的摩尔质量($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$), h 为光照时间。

考虑到干燥剂的吸湿效率为 μ ,实际所需干燥剂的质量应为: $W = E/\mu$

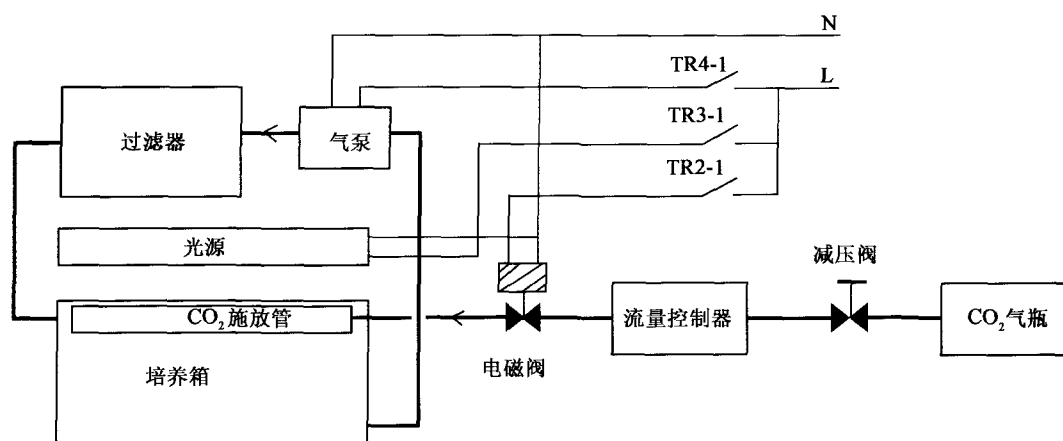


图4 大型培养容器环境控制系统结构

Fig. 4 Schematic diagram of the environmental control system for large culture vessel.

3 结果与分析

为了评价系统的性能,进行了大型植物无糖培养容器内环境因子的调控试验,测试在培养过程中控制系统对培养容器内 CO_2 浓度、相对湿度的控制效果。以茎尖培养的圆叶海棠 (*Malus pruniolia* var. *ringo*) 组培苗为试验材料,将生长健康并具有 3 片叶的组培苗在 MS 培养基中用 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 诱导生根,3 d 后转接到无激素无糖 1/2 MS 培养基上;培养容器为带有 2 个透气膜的方盒,容积为 445 mL。培养支持物为蛭石。每盒装入培养基 45 mL,每盒栽培 2 株组培苗。以海棠组培苗生根诱导后进行常规组织培养为对照。培养 20 d 后观察测量相关指标,重复 3 次。试验过程中选取相对湿度为 80%、 CO_2 浓度为 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 常用水平进行测试。培养容器

内其他环境因子的控制参数为:温度为 25°C ,光照度为 $62.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照周期为 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。 CO_2 增施与光照互锁启动。

3.1 CO_2 浓度控制测试分析

在 CO_2 控制试验中,研究了控制系统在相应比例参数下的控制精度。图 5 是 CO_2 浓度控制值为 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、比例参数 1 500 的控制曲线。结果显示,系统的控制精度小于 $\pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$,能够满足植物无糖培养容器对 CO_2 浓度控制精度的要求。

3.2 相对湿度控制测试分析

湿度控制是采用穴盘覆膜与气体循环吸附方式联合来实现的,穴盘覆膜抑制了基质水分的蒸发,阻隔了基质水分与空气间交换的通道,使基质水分在膜与穴盘狭小的空间循环,既保持原有的

基质水分不易散失,又大大减少了培养箱内的除湿量。干燥剂吸收的水分主要来源于组培苗蒸腾引起的水分增加量。从图 6 可知,当相对湿度目

标控制值为 80% 时,系统稳定后控制最大值为 82%,最小值为 79%,控制精度为 $\pm 2\%$,达到了较好的控制效果。

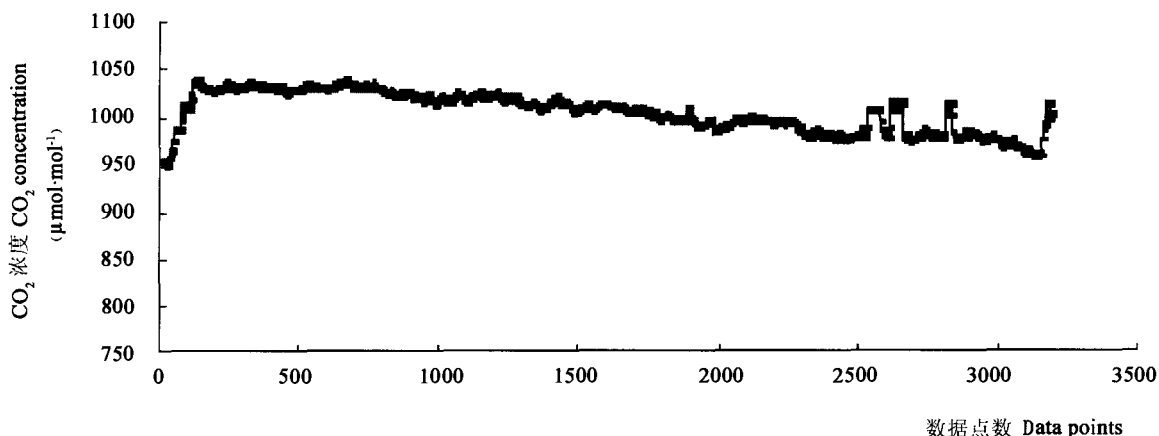


图 5 CO₂ 浓度控制曲线

Fig. 5 Control curve of CO₂ concentration.

CO₂ 浓度目标值为 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, 比例系数为 1 500

CO₂ concentration under 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ destination with 1 500 proportional coefficient.

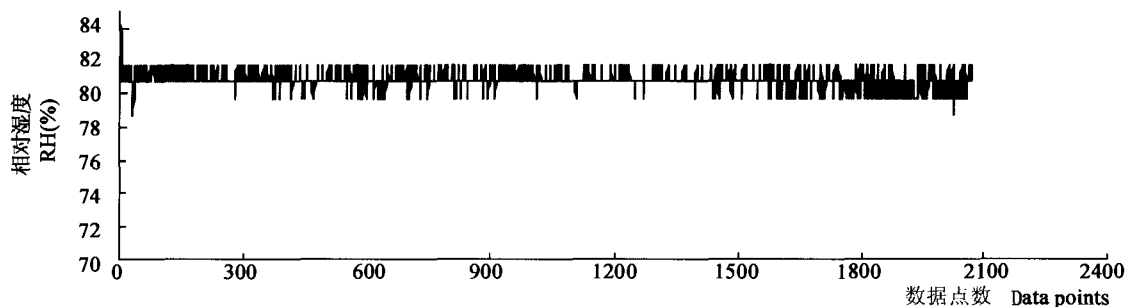


图 6 相对湿度控制曲线

Fig. 6 Control curve of RH

相对湿度目标值为 80%, 控制差为 $\pm 2\%$

RH under 80% destination and $\pm 2\%$ control error in cultural vessel.

3.3 环境调控对无糖组培苗生理指标的影响与分析

从表 2 可知,增加光照强度和提高了 CO₂ 浓度,改善了海棠组培苗生长的环境条件,无糖培养组培苗的光合速率是常规组培对照的 3.2 倍;而且,组培苗根系发达(图 7),有大量的侧根形成,根条数和侧根数分别是对照的 2.2 倍和 7.5 倍;通过环境调控,海棠组培苗叶片具有较强的气孔控制能力和水分控制能力;而在常规组织培养条件下,海棠组培苗的气孔调节能力较差,水分散失快,其气孔导度和蒸腾速率分别是无糖培养处理组的

3.1 倍和 19.9 倍。因此,在生根阶段,采用无糖组培及其环境调控技术,能够显著改善组培苗的生理品质,使其在移栽驯化阶段能够很好地适应外界环境条件的变化,克服了高湿、低 CO₂ 浓度、弱光照等常规组织培养引起组培苗品质差的弊端,提高了组培苗的质量。

4 结论

通过对大型植物无糖组培装置的研制,使操作更加简便,提高了组培苗生产的效率;同时,更

表 2 无糖组织培养对圆叶海棠组培苗生长和光合参数的影响

Table 2 The effect of sugar-free tissue culture on growth and photosynthetic parameters of crabapple plantlets.

处理 Treatments	光合速率 Photosynthetic rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	气孔导度 Stomatal conductance ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	蒸腾速率 Transpiration rate ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	根条数 Root number per plant	侧根数 Lateral root number
对照 CK	1.01b	41.79a	5.77a	5.3b	3.3b
无糖培养 Sugar-free culture	3.19a	13.41b	0.29b	11.7a	25a

同一列中,各处理的平均值作 LSD 检验,字母不同者差异显著 ($P < 0.05$)。

According to LSD test, different small letter in each column represents significance at $P < 0.05$.



图 7 海棠无糖培养组培苗

Fig. 7 Crabapple plantlets under sugar-free culture.

大的垂直空间,提高了培养箱气体浓度的缓冲性能; CO_2 施放管的设计与安装,为提高 CO_2 的控制精度创造了条件。采用小流量控制技术(减压阀、稳流器、流量计和电磁阀等)、三通阀调节和 PWM 控制实现了对 CO_2 浓度的高精度控制,控制精度可达 $\pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。采用穴盘覆膜与气体循环吸附方式相结合实现了对箱体内相对湿度的自动控制,改善了植物组培苗的生长环境。通过与常规组织培养的对照试验,植物无糖组培容器及其环境控制系统显著改善了组培苗的生长环境和生理品质,促进了植株的生长发育,实现了组培苗的优质生产。

参 考 文 献

- [1] Kozai T. Micropropagation under photoautotrophic conditions [A]. In: Debergh P C, Zimmerman R H. (Eds.). Micropropagation; technology and application [M]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1991. 447 - 469.

- [2] Preece J E., Scutter E G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field [A]. In: Debergh P C, Zimmerman R H. (Eds.). Micropropagation; technology and applications [M]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1991. 71 - 93.
- [3] Ziv M. Vitrification; morphological and physiological disorders of *in vitro* plants [A]. In: Debergh P C, Zimmerman R H. (Eds.) Micropropagation; technology and application [M]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1991. 45 - 68.
- [4] Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages [J]. Acta Hort., 1988, 230: 152 - 158.
- [5] Kozai, T. Autotrophic (sugar-free) micropropagation for a significant reduction of production costs [J]. Chronic Hort., 1989, 29(2): 19 - 20.
- [6] Kubota C, Kozai T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced ventilation [J]. Hort. Science, 1992, 27: 1312 - 1314.
- [7] Heo J, Kozai T. Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweet potato plantlets [J]. Environ. Cont. Biol., 1999, 37: 83 - 92.
- [8] 肖玉兰, 钱彪, 树庄, 等. 植物光独立培养微繁殖培养箱 [P]. 2001, 中国专利, 00223771.7. 2001 - 05 - 16.
- [9] 徐志刚. 组培微环境与规模化育苗设施环境调控的研究 [D]. [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [10] 李传业, 滕光辉, 曲英华. 基于 PLC 的无糖组培微环境控制系统 [J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 30 - 34.
- [11] Xiao Y, Kozai T. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation [J]. Hort. Science, 2004, 39(6): 1387 - 1391.