

植物无糖组培技术研究进展

牟宁宁 高亦珂

(北京林业大学园林学院)

摘要:利用试管苗小植株的光合自养能力可以对其进行无糖培养。这种组织培养模式可以有效地防止污染并能显著地促进试管苗的生长,尤其是增强试管苗的生根能力。植物无糖组培在环境调节、培养基质以及培养容器等方面较传统的组织培养有很大改善。综述了近20a来在植物试管苗的无糖组培技术的研究进展,并对无糖组培的前景作了展望。

关键词:组织培养;无糖培养;影响因素

在植物组织培养过程中,培养因素对试管苗的生长发育有着极其重要的影响。传统的植物组织培养方式,采用密闭性很强的容器,置于一定的光照条件下以一定的明暗周期恒温培养,试管苗依靠培养基中的糖进行异养生长。培养容器内一般气体流动性差,相对湿度高, CO_2 浓度不足,并且培养基中的糖容易造成微生物污染。而对植物进行无糖组织培养则可以在很大程度上改善上述问题。无糖组织培养是20世纪80年代末由日本学者古在丰树发明的一种新型的组织培养模式^[1],利用容器内小植株具有的光合自养能力,用 CO_2 气体代替糖作为植株生长所需的碳源,为植株的生长提供适宜的 CO_2 浓度,促进植株自身的光合作用,从而使试管苗能够正常生长。植物无糖组培在环境因子的调节、培养基质以及培养容器等方面较传统组织培养有很大的改进,使植株的生长环境更接近于自然状态。大量的研究表明^[2-10],与传统组培相比,这种培养方式可使苗长得更健壮,成活率更高,同时也可缩短培养周期和降低培养成本。

1 植物无糖组培中环境因子的调控

植物无糖组培的理论依据是容器内小植株具有的光合作用能力,研究表明^[11],只要具有20 mm²含有叶绿素的叶片,植物就能独立进行光合作用。因此,与光合作用有直接关系的 CO_2 浓度和光照条件是影响无糖组培中植物生长最重要的两个环境因子。

1.1 提高培养环境的 CO_2 浓度

无糖组培技术的一个重要特征是由 CO_2 气体代替糖作为碳源,以减少微生物的污染和促进小植株的

光合作用。Vyas和Purohit研究发现^[12],以蔗糖作为碳源和 CO_2 的气体环境都可以促进毛白杨试管苗芽的分化和生长,当碳源缺乏时,芽会出现褐化现象,并且在30 d之内死亡,但是在10.0 g/m³的 CO_2 浓度下,试管苗的生长状况比在30%的糖浓度下的生长状况好,在 CO_2 和糖同时作为碳源并且 CO_2 的浓度为0.6 g/m³的时候,试管苗芽的生长速度接近于常规培养条件下的两倍。李宗菊等^[13]研究发现,在任何糖浓度(0%、1%、3%)下, CO_2 富集处理的植株重量(包括干重和鲜重)随时间增加的量比非 CO_2 富集处理的大,而无糖培养时, CO_2 富集处理的增重效果最好。

屈云慧等^[9]研究发现,在彩色马蹄莲试管苗无糖生根培养中,1 000~1 200 mg/L浓度的 CO_2 已可满足组培小植株正常生长光合作用的需求。他们同时还发现 CO_2 的初始通气时间对彩色马蹄莲试管苗的生根也有一定影响,最佳 CO_2 初始通气时间为培养的第6天,较早通气的植株在培养后期普遍出现叶片发黄、植株生根率低等现象,通气时间较晚的小植株的各项观察指标均较低,植株生长缓慢,种苗质量明显较差。

李传业等^[14]设计开发的无糖组培微环境控制系统,可根据设定要求将固定量的高压、高纯度 CO_2 气体直接供入组培箱,并可对组培箱内湿度进行调控。控制系统对组培箱内 CO_2 浓度和相对湿度的控制范围分别为700~900 $\mu\text{mol/mol}$ 和80%~92%。王立文等^[15]设计开发的 CO_2 浓度控制软件程序运行结果表明,从控制开始到培养,环境中 CO_2 浓度达到的目标值所需要的时间不超过20 min,而浓度误差小于20 mg/kg。

1.2 改善培养环境的光照条件

1.2.1 光照强度

光照强度是植物进行光合作用重要的制约因素之

收稿日期:2006-03-13

修回日期:2006-06-20

基金项目:国家林业局“948”资助项目(编号:2004-4-01)。

第一作者简介:牟宁宁(1980-),女,硕士生,研究方向为新技术在植物组培中的应用。

一,当培养容器中的 CO_2 浓度处于补偿点之上时,提高光强对改善试管苗的光合作用和促进其生长发育有积极影响^[5]。徐志刚等^[16~18]采用光照强度和 CO_2 浓度间接调控甘薯无糖组培苗的微环境,大大促进了光合作用,试管苗的干重、叶绿素含量、根系和叶面积均有增加,叶片的气孔有明显的增大,过氧化物酶的活性也有显著提高。肖玉兰等^[6]报道,非洲菊茎段无糖壮苗培养的最佳光强是 8 000 lx。李宗菊等^[8]对满天星茎段进行无糖组培时,光照采用 4 根荧光灯管,培养瓶与灯管距离 15 cm,光强为 5 000 lx,取得了较好的效果。Nhut 等^[10]研究发现,对草莓进行无糖培养的最适光照强度为 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;对白鹤芋^[19]进行无糖组培时发现,在光照强度为 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 $75 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下,其地上部分与地下部分鲜重明显优于在 $45 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下。

1.2.2 光质

植物本身存在 3 套受光系统:叶绿素吸收 660 nm 波长附近的光进行光合作用,类胡萝卜素吸收 450 nm 波长附近的光引起植物的光形态建成,光敏素吸收 660、730 nm 波长的光控制植物的形态发生^[20]。这导致不同波长的光对植物的生长发育产生不同的影响。Tanaka 等^[21]用红光和蓝光对大花蕙兰进行无糖组培时发现,红光可促进叶片生长,阻碍叶绿素合成,而蓝光的作用则恰恰相反,其最佳红/蓝光比例为 8/2。Miyashita 等^[22]在对马铃薯进行无糖组培时也得到了相同的结果。Nhut 等^[10]研究发现,红/蓝光比例为 7/3 时,草莓无糖组培试管苗的各项生长指标明显优于其他的红/蓝光比例,其驯化阶段的存活率也显著高于其他处理;而在白鹤芋^[19]的无糖组培中,红/蓝光比例为 8/2 时试管苗生长得最好。

1.2.3 光周期

植物对光期长短的反应,不同植物种类有一定的差异,大多数植物试管苗适宜在 16~18 h 的光期条件下生长^[23]。Fujiwara 等^[24]在进行马铃薯无糖组培时发现,当光周期为 0.25 h 光期/0.125 h 暗期时,马铃薯试管苗的干物重有明显增加。

1.2.4 光源

传统组培中应用较广泛的光源有高压钠灯、金属卤化物灯和荧光灯等,它们普遍存在寿命短、发热量大以及发光效率不理想等缺点。在植物的无糖组培中,一些研究者将发光二极管(LED)作为光源,取得了不错的效果。LED 是冷光源,与传统的热光源相比,具有光电转换率高、体积小、寿命长、波长固定、光

强可调、发热量低、节约电能以及可提高单位面积的栽培量等优点^[25,26]。Tanaka 等^[21]认为,不同波长的光及光强度可调的 LED 比荧光灯更能有效地对幼苗光合作用进行调控。同时,利用发单色光的 LED 还可以调节光质。

2 植物无糖组培中培养基质的改进与研究

传统组织培养方式多以琼脂作固体培养基,基质的透气性差,不利于养分、水分和气体的移动。在植物无糖组培中可用化学纤维、珍珠岩、纸卷、蛭石、塑料泡沫、石棉、陶棉、沙子等多孔的无机材料代替琼脂作培养基,由于其良好的透气性,可改善根际环境,促进小植株生根^[7,27],而且多孔的无机材料与琼脂相比价格低廉,可节约培养成本。在培养基中添加一定浓度的激素可促进植物无糖组培试管苗的生长。屈云慧等^[9,28]在彩色马蹄莲试管苗和虎眼万年青试管苗无糖生根培养中发现,培养基质中附加一定浓度的 NAA 对彩色马蹄莲和虎眼万年青的生根有促进作用,且 NAA 的最适宜浓度为 0.1 mg/L。

3 植物无糖组培中新型培养容器的应用

在传统的组织培养中,一般采用容积较小的培养容器以降低培养基中糖引起的污染。容器中的空气流动性差,相对湿度高, CO_2 浓度低。研究表明^[29~31],较高的相对湿度可导致试管苗叶片的解剖结构发生变化,蒸腾拉力降低,影响试管苗的正常生长。Kubota 等^[32]研究证明,在较高的光照强度和 CO_2 浓度下,良好的空气流动性对试管苗的生长有促进作用。Kozai 等的^[30]实验也表明,在无糖组培中的暗期进行降低气温的变温管理,同时在培养后期适当降低一定变幅内的相对湿度,可明显提高试管苗质量。

无糖组培技术在培养基质中去除糖,很大程度上降低了污染率,为使用大型的培养容器提供了可能。昆明市环境科学研究所开发的容器,尺寸根据日光灯管长度和培养架的宽度设定,体积 120 L,培养面积 $54\,610 \text{ cm}^2$,能够进行多层立体式培养,可同时控制容器内的 CO_2 浓度、气体流动速度、温度和相对湿度等因素,不仅解决了传统培养容器中空气流动性差的问题,降低了培养过程中的相对湿度,还有效地利用了光源和培养面积,降低了能量消耗和培养成本^[7]。

为了增强容器内外的气体交换,降低培养容器内的相对湿度,近年来也有不少学者研究高分子膜材料制成的培养容器的有效性。这类材料普遍具有高透气性的特点,与传统的玻璃容器相比,可极大地改善容器内外的气体交换情况,除此之外,它们还具有透

专论综述

光率高、耐高温、耐腐蚀等优点。何松林^[33]在培养文心兰试管苗时,采用四碳氟乙烯树脂膜为材料制成的培养容器,取得了理想的效果。

4 展望

植物无糖组织培养打破了传统组织培养中植株依靠糖进行异养生长的培养方式,利用小植株具有的光合作用能力让其进行自养生长。在这种更接近于自然环境的条件下,可以很大程度地降低试管苗的污染率,改善其生长状况,缩短培养周期,提高培养效率,降低生产成本。到目前为止,无糖培养技术已经成功地应用于多种植物的组织培养当中。随着研究的不断深入,无糖组织培养技术将在植物工厂化、规模化生产中发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 杨武振,王荔,侯典云,等. 无糖组织培养技术研究进展[J]. 云南农业大学学报,2004,19(3):239-242.
- [2] Sha V K, Kozai P S T, Nguyen Q T, et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 71: 141-146.
- [3] 李孟超. 火鹤组培苗无糖生根培养试验[J]. 北京农业科学, 2000, 18(5): 30-32.
- [4] 崔瑾, 丁永前, 李式军, 等. 增施 CO₂ 对葡萄组培苗生长发育和光合自养能力的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(2): 28-31.
- [5] Matysiak B, Nowak J. Carbon dioxide and light effects on photosynthesis, transpiration and ex vitro growth of *Homalomena* 'Emerald Gem' plantlets[J]. *Scientia Horticulturae*, 1994, 57(4): 353-358.
- [6] 肖玉兰, 张立力, 张光怡, 等. 非洲菊无糖组织培养技术的应用研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 408-410.
- [7] 屈云慧, 熊丽, 吴丽芳, 等. 无糖组织培养的应用及发展前景[J]. 中国种业, 2003, 12: 17-18.
- [8] 李宗菊, 周应揆, 桂明英, 等. 满天星无糖组培快繁技术研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21(2): 134-138.
- [9] 屈云慧, 熊丽, 张素芳, 等. 彩色马蹄莲组培苗无糖生根培养的环境控制[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(2): 166-169.
- [10] Nhut D T, Takamura T, Watanabe H, et al. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73: 43-52.
- [11] Noe N, Bonini L. Leaf anatomy of Highush Blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to ex vitro conditions[J]. *Biologia Plantarum* (Prague), 1996, 38(1): 19-25.
- [12] Vyas S, Purohit S D. *In vitro* growth and shoot multiplication of *Wrightia tomentosa* Roem et Schult in a controlled carbon dioxide environment[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 75: 283-286.
- [13] 李宗菊, 桂明英, 房亚南, 等. 加速组培小植株生长无糖培养技术[J]. 北方园艺, 1999(1): 17.
- [14] 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.
- [15] 王立文, 丁为民, 丁永前, 等. 植物组织培养中浓度控制软件的设计开发[J]. 农机化研究, 2004, 5(3): 216-218.
- [16] 徐志刚, 崔瑾, 焦学磊, 等. 光照强度和 CO₂ 浓度间接调控对甘薯无糖组培苗光合作用的影响[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 11-14.
- [17] 崔瑾, 徐志刚, 李式军, 等. 环境调控对甘薯组培苗光合自养和叶片超微结构的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(6): 821-824.
- [18] 崔瑾, 徐志刚, 李式军, 等. CO₂ 浓度和光合光子通量密度对叶用甘薯组培苗光合自养和过氧化物酶活力的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 482-484.
- [19] Nhut D T, Takamura T, Watanabe H, et al. Artificial light source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets[J]. *Acta Horticulturae* (ISHS), 2005, 692: 137-142.
- [20] 方炜, 饶瑞信. 高亮度发光二极管与生物产业之应用[J]. 中华农学会报, 2004, 5(5): 432-446.
- [21] Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, et al. *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs)[J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 1998, 73(1): 39-44.
- [22] Miyashita Y, Kitaya Y, Kozai T. Effects of red and far-red light on the growth and morphology plantlets *in vitro*; using light emitting diodes as a light source for micropropagation[J]. *Acta Horticulturae*, 1995, 393: 189-194.
- [23] Morini S, Trinci M, Zacchini M. Effect of different photoperiods on *in vitro* growth of MR. S 2/5 plum rootstock[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 25: 141-145.
- [24] Hayashi M, Fujiwara K, Kozai T, et al. Effect of lighting cycle on daily CO₂ exchange and dry weight increase of Potato plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically[J]. *Acta Horticulturae*, 1995, 393: 213-218.
- [25] Okamoto K, Yanagi T, Takita S. Development of plant growth apparatus using blue and red LED as artificial light source[J]. *Acta Horticulturae*, 1996, 440: 111-116.
- [26] Tripathy B C, Brown C S. Root-shoot interaction in the greening of wheat seedlings grown under red light[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107: 407-411.
- [27] 吴毅明. 植物组织培养的环境调节研究进展[J]. 生态农业研究, 2000, 8(1): 73-75.
- [28] 屈云慧, 熊丽, 张素芳, 等. 虎眼万年青离体快繁体系及无糖生根培养[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5): 56-58.
- [29] Gribble K, Sarafis V, Nailon J, et al. Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babes Breath) cultured *in vitro*[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(10): 771-776.
- [30] Kozai T, Kubota C, Byoung R J. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 51: 49-56.
- [31] 曲英华, 胡秀婵, 吴毅明. 植物组织培养新技术: 光独立培养法[J]. 农业工程学报, 2001, 17(6): 90-92.
- [32] Kubota C, Kakizaki N, Kozai T, et al. Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation[J]. *Hort Science*, 2001, 36: 49-52.
- [33] 何松林, 潘会堂, 杨秋生, 等. 高分子树脂膜培养容器在文心兰试管苗生产中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(4): 93-96.

(通讯地址: 100083, 北京市海淀区清华东路 35 号)