

# 植物组培环境调控与规模化育苗技术研究进展

张春丽, 郭宇珍, 何松林\*

(河南农业大学 林学院园艺学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 综述了增施 CO<sub>2</sub>、新型光源的开发和培养支持体的改良对规模化生产组培苗的促进作用, 以及国内外大型环境调控设施和规模化育苗的研究进展, 并提出了组培环境调控技术的研究展望。

**关键词:** 植物组织培养; 环境调控; 规模化育苗

**中图分类号:** S336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)06-0022-04

植物组织培养是利用植物体的一部分进行无性繁殖, 而产生大量同源母本基因幼苗的生物技术。与传统的无性繁殖方法(分株、扦插等)相比, 它具有培养周期短、增殖率高、培养条件可人为控制、管理方便等优点, 因此更符合工厂化、规模化生产的需求。

随着植物组织培养技术的发展, 能够进行快速繁殖的植物种类越来越多, 许多种植物已开始进行大规模的商品化生产。然而, 传统组培环境下组培苗生长缓慢、污染严重、存活率低, 致使成品苗成本过高, 严重制约了组培苗的规模化、商业化生产。而运用环境调控技术可改善组培苗的生长环境, 以较低的成本生产大量基因相同、生长一致、发育正常、无病毒或少病毒和驯化期短的组培苗<sup>[1]</sup>。为了更好地促进植物组织培养的规模化生产, 很多学者对组培环境调控技术进行了研究, 取得了一定进展。

## 1 环境调控与规模化育苗的研究进展

长期以来, 在组织培养研究方面, 研究人员只注重培养基组成成分方面的探讨, 直到 20 世纪 70 年代末 80 年代初, 才开始有学者提出改善组培苗生长环境的观点, 而真正引起普遍重视并进行实质性研究则是在 80 年代末以后。国内外学者的研究内容主要集中在以下几个方面。

### 1.1 增施 CO<sub>2</sub>

传统理论认为, 组培苗的光合作用能力微弱, 无法实现光合自养生长, 惟有通过添加大量的外源糖来保证其碳源的供应。而最近的一些研究发现, 试

管苗对外源碳水化合物的需求程度与光强和培养容器内的 CO<sub>2</sub> 质量浓度有直接关系, 增施 CO<sub>2</sub> 可以有效提高组培苗的光合作用能力、促进其生长发育并缩短培养周期。Kozai 等<sup>[2]</sup>在大花蕙兰的组织培养中发现增施 CO<sub>2</sub> 可以显著提高组培苗的鲜重。崔瑾等<sup>[3]</sup>在葡萄组织培养时增施了 800~1200 μL/L 的 CO<sub>2</sub>, 结果组培苗生长健壮, 形成层明显发育, 鲜重及干重均明显增加。李宗菊等<sup>[4]</sup>也发现, 在组织培养中提高 CO<sub>2</sub> 浓度时, 配合光照强度的增加, 可以促进组培苗的生长。另外, Aitken-christie 等<sup>[5]</sup>研究发现, 许多试管苗如香石竹和大花蕙兰培养在高 CO<sub>2</sub> 质量浓度、高光强条件下, 可以在无糖或少糖的培养基中以光合自养的方式生长。何松林等<sup>[6]</sup>试验也表明, 文心兰试管苗在施 CO<sub>2</sub> 培养时, 培养基中的糖可以适当减少用量。培养基中除去糖后, 可以减少微生物的污染, 也可以减少组培苗生理、形态发育和基因的混乱和变异, 提高了组培苗品质。这样就大大降低了生产成本, 进而为组培苗的规模化、工厂化生产提供有利条件。

### 1.2 新型光源的开发

光照对植物外植体的生长和增殖有明显影响, 主要表现在光照强度、光质、光照时间和光照方式等方面。光质对光合作用的影响是指不同波长的光对光合作用的影响。近年有研究表明, 不同的光质在植物生长的不同时期可以起到促进作用, 如蓝光照射可以提高白桦苗的光合速率和叶绿素含量<sup>[7]</sup>; 对小苍兰的愈伤组织诱导率、叶绿素含量以及试管苗的干重/生物量也有明显的促进作用<sup>[8]</sup>。而红光可

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 河南省杰出青年基金(0412001900)

作者简介: 张春丽(1983-), 女, 河南周口人, 在读硕士研究生, 主要从事园林植物的组织培养研究。

通讯作者: 何松林(1965-), 男, 河南淮阳人, 教授, 博士, 主要从事园林植物生物技术教学及研究工作。

以促进大花蕙兰试管苗叶片生长<sup>[9]</sup>；促进杜鹃试管苗生根<sup>[10]</sup>；每天 18 h 的红光照射还可以大幅增加天竺葵苗茎的伸长量<sup>[11]</sup>。上述研究表明，不同种类的植物对光质的反应也有一定差异。

Bula 等<sup>[12]</sup>认为，光质比例、强度可调的发光二极管(LED)可以有效地替代白炽灯。最新研究发现，光质比例和光照强度可调的 LED 光源比通常使用的植物组织培养用的荧光灯能更有效地促进试管苗的光合作用。LED 属于冷光源，具有很多优点，如体积小、不易碎、单色性好、寿命长，而且耗能低，几乎不发热，便于组培室的温度控制，节约能源等。其性能远优于常用的光源如荧光灯、金属卤化物灯、高压钠灯和白炽灯<sup>[9]</sup>。尤其是红、蓝光 LED 产生的红光和蓝光能显著影响植物生长<sup>[13]</sup>。

蒋要卫<sup>[14]</sup>以自行开发的、光质比例和光量子数可调的超高亮度红光与蓝光 LED 灯具为人工光源，对大花蕙兰和蝴蝶兰试管苗进行培养试验。结果表明：不同光质比例光源相比，含有较大红光比例的 LED 光源对大花蕙兰和蝴蝶兰试管苗的影响优于含有较大蓝光比例的 LED 光源。红蓝光比例为 80:20 的 LED 光源作大花蕙兰试管苗组织培养用光源，并结合 CO<sub>2</sub> 营养，可以显著改善大花蕙兰试管苗的生长状况并提高其品质，而传统组织培养用荧光灯仍是蝴蝶兰试管苗生长较为理想的光源。生长在不同光质比例光源下的大花蕙兰试管苗除地上部测定指标和干物率与对照处理没有明显差异外，叶绿素指数、气孔大小和面积均高于对照处理。而生长在不同光质比例光源下的蝴蝶兰试管苗除干物率和叶绿素指数高于对照处理外，其他测定指标均不及对照处理。Tanaka 等<sup>[9]</sup>利用 LED 作为兰花组培苗光源，发现红光促进大花蕙兰试管苗叶片的生长，但降低叶绿素含量，且这种现象可被蓝光抵消。

另外，由于 LED 体积小，可直接安装在培养容器上，大大节省了空间，比传统方法增加有效培养室空间 3 倍以上，为组培苗的规模化生产创造了条件。新型 LED 光源以其高效、节能等优势将成为未来组培光源的发展方向。在实际生产中，如果蓝光 LED 成本能进一步降低，则应用前景更为广阔。另外，扩散性光纤和微波光源也被认为是未来植物组织培养中较为理想的照射光源<sup>[15]</sup>。

### 1.3 培养基支持体的改良

由于液体培养成本较高，目前在生产中仍较多地采用固体培养。但是利用凝固剂(如琼脂、卡那胶)等配制的固体培养基也存在很多不足，如透气性

差、营养元素分布不均匀、移动性差、抑制幼苗生长和胚胎形成等<sup>[16]</sup>，直接影响到组培植株的生根率和根系生长状态，小植株根系发育细弱，移栽时容易损伤，这样又增加了成本。

近年来，研究人员对开发新的培养基支持体以取代传统琼脂的研究逐渐增多。Kirdmanee 等<sup>[17]</sup>发现，利用蛭石为支持体进行试管苗培养时，较之传统琼脂效果明显，且玻璃化现象大为减少。Tanaka<sup>[18]</sup>和何松林等<sup>[19]</sup>利用岩棉块作为培养基支持体分别培养蝴蝶兰和文心兰时，发现组培苗根系发育较好且移栽驯化时不会发生根之间的相互缠绕，减少了移栽过程中对根的伤害。棉籽壳和珍珠岩代替凝胶剂用于葡萄生根培养中，也取得了较好的效果，提高了生根率，获得了高质量的试管苗<sup>[20]</sup>。吴毅明<sup>[21]</sup>也在试验中发现，用通透性好的化学纤维、纸卷、蛭石、沙子等代替凝胶剂作为培养基的支持体，可改善根际环境，促进小植株生根。上述研究表明，以聚乙烯发泡材料、岩棉、蛭石、陶瓷纤维和植物纤维的扁平压制块作支撑材料，更有利于组培苗的生长。而且这些材料的价格远远低于琼脂的价格，一次购进可多次重复利用且折旧率低，极大地降低了成本。

## 2 大型环境调控设施与规模化育苗的研究进展

近年来，国内外出现了一些关于组培多因子综合控制的报道，一些研究者开发出大型的组培设施，对 CO<sub>2</sub> 质量浓度、光照、温度、湿度等环境因子进行综合控制，使它们有效地结合，发挥各自的最大潜能，大大降低了组培成本，促进组织培养技术走向商品化生产。

1987 年，日本学者古在丰树等<sup>[22]</sup>开发出一套具有强制通风功能的大型组培设施。该设施的环境调控系统能够控制组培苗生长环境中的光照强度、CO<sub>2</sub> 浓度、温度和相对湿度。与传统组培设施相比，生长在该设施及其环境中的草莓组培苗的干重和净光合速率都显著增长。

2000 年，南京农业大学设计出一套组培环境 CO<sub>2</sub> 增施监控系统。该系统的组培箱采用透光率高的箱体材料，控制系统用 VC++ 编程，由计算机软件对组培苗实施 CO<sub>2</sub> 浓度实时监控，结果表明：与传统设施环境相比，在该设施中生长的赤霞珠葡萄组培苗的叶面积、茎粗和株高分别提高 90.0%，76.6% 和 62.8%。但由于中间储气需人工操作，而且一次储气使用不到 1 周，所以只能实现短期的半

自动化 CO<sub>2</sub> 增施调控,无法实现长期的自动增施监控<sup>[23]</sup>。

2002年,南京农业大学的徐志刚<sup>[1]</sup>设计开发了一套基于生长模型的、半开放式的中小型组培设施及其环境自动化调控系统,对组培箱内的 CO<sub>2</sub> 浓度、相对湿度和光照强度进行间接调控。结果显著提高了叶用甘薯组培苗的光合作用能力,促进了植株生长。

云南昆明市环境科学研究所的肖玉兰<sup>[24]</sup>用培养箱(1000 mm×500 mm×250 mm)作培养容器,培养了满天星、康乃馨、非洲菊、绿巨人、彩星、马铃薯等多种植物,组培苗都比传统的组培苗健壮且生根快、叶片大、生长量成倍增长、干物质含量高、生产成本降低。

2004年,中国农业大学的李传业等<sup>[25]</sup>设计了一套基于 PLC(可编程控制器)的无糖组培微环境控制系统,对组培箱内的 CO<sub>2</sub> 浓度、相对湿度进行调控,达到了预期效果。

### 3 展望

近年来,随着组培环境研究的深入以及工程技术在组培环境测控中的应用,特别是随着无糖组织培养技术应用研究的不断深入,植物组培的规模化、自动化进程不断加快。但由于受研究思路、测量和控制等试验手段与设施的制约,研究工作还缺乏系统性和整体性,迄今为止的研究以定性研究为主,只是表明了某些物理因子对组织培养植株在某些性能方面的影响效应,其作用机理还远远没有被理解。只有定量的全面了解物理环境的调控效应及其作用机理,人们才能根据生产和科研实际的需要,有针对性地提出相应的环境调控要求及其措施。从整体来看,中国组培环境领域调控技术的研究明显落后于发达国家,国外开展这方面的研究仅有 20 多年的时间,近年来工程学科的渗入与结合使研究的深度和广度得到增强。而在国内,目前的研究以生物学科为主,与工程学科的交叉渗透尚处于起步阶段。国内对组培环境因子的综合调控及其控制系统的研究尚处于起步阶段,且多数研究集中于大型组培箱及强制供气系统研制和改进上,而有关组织培养环境综合调控技术的相关报道较少。

针对上述问题,各国科研人员正在多学科和多角度地研究攻关,也不断地取得进展。有理由相信,运用环境调控技术,给植株创造良好地生长环境,可得到高品质的组培苗,从而实现工厂化和规模化生产。

### 参考文献:

- [1] 徐志刚. 组培微环境与规模化育苗设施环境调控的研究[D]. 南京:南京农业大学,2002.
- [2] Kozai T, Fujiwara K, Watanabe I. Fundamental studies of environments in plant tissue culture vessels[J]. *Agric Meteorol*, 1986, 42: 119-127.
- [3] 崔瑾, 丁永前, 李式军, 等. 增施 CO<sub>2</sub> 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.
- [4] 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*, 1991(1): 15-17.
- [5] Aitken-christie J, Kozai T, Smith M A L. Automation and environmental control in plant tissue culture[M]. Kluwer Dordrecht (The Netherlands): Academic Publishers, 1995.
- [6] 何松林, 杨秋生, 孔德政, 等. 施 CO<sub>2</sub> 时培养基糖浓度对文心兰试管苗生长的影响[J]. *园艺学报*, 2003, 30(6): 745-747.
- [7] Saebo A, Krekling T, Appलगren M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 41(2): 177-185.
- [8] 车生泉, 盛月英, 秦文英. 光质对小苍兰茎尖试管培养的影响[J]. *园艺学报*, 1997, 24(3): 269-273.
- [9] Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, et al. *In vitro* growth of cymbidium plantlets cultured under super-bright red and blue light-emitting diodes (LEDs)[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1998, 73(1): 39-44.
- [10] Read P E, Economou A. Supplemental lighting in the propagation of deciduous *Azaleas*[J]. *Proc Int Plant Prop Soc*, 1982, 32: 639-645.
- [11] Appलगren M. Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro*[J]. *Science Horticulturae*, 1991, 45: 345-351.
- [12] Bula R J, Morrow R C. Light emitting diodes as a radiation source for plants[J]. *Hortscience*, 1991, 26: 203-205.
- [13] 诸葛强, 关亚丽, 施季森, 等. 组培新技术及其在桉树快繁中的应用[J]. *林业科技开发*, 2003, 17(6): 37-38.
- [14] 蒋要卫. 大花蕙兰、蝴蝶兰试管苗光合自养培养体系初步建立[D]. 郑州:河南农业大学,2006.
- [15] Cournac L, Girier I, Chagvardieff P. Improvement of photoautotrophic *Solanum tuberosum* plantlet culture by light and CO<sub>2</sub>: Differential development of photosynthetic characteristics and varietal constraints [J]. *Acta Horticulturae*, 1992, 319: 53-58.

(下转第 30 页)

- [8] 张华华,冯九焕,卢永根,等.利用激光扫描共聚焦显微镜观察同源四倍体水稻胚囊的形成与发育[J].电子显微学报,2003,22(5):380-384.
- [9] 申家恒,李慧荣,李玉芬,等.玉米双受精过程的细胞学观察[J].植物学报,1987,29(5):480-485.
- [10] 卫星,申家恒.星星草受精作用及其胚与胚乳早期发育的观察[J].西北植物学报,2004,24(1):31-37.
- [11] 胡适宜.被子植物胚胎学[M].北京:人民教育出版社,1982:103-135.
- [12] Huang B Q, Russell S D. Fertilization in *Nicotiana tabacum*. cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. a hypothesis for short-distance transport of sperm cells prior to gamete fusion[J]. Planta,1994,194:200-214.
- [13] Huang B Q, Pierson E S, Russell S D, et al. Cytoskeletal organization and modification during pollen tube arrival, gamete delivery and fertilization in *Plumbago zeylanica*[J]. Zygote,1993,1:143-154.
- [14] Huang B Q, Sheridan W F. Actin coronasin normal and *Indeterminate gametophyte* L embryo sacs of maize[J]. Sex Plant Reprod,1998,11:257-264.
- [15] Huang B Q, Fu Y, Zee S Y, et al. Three-dimensional organization and dynamic changes of the actin cytoskeleton in embryosacs of *Zea mays* and *Torenia fournieri*[J]. Protoplasma,1999, 209:105-119.
- [16] Fu Y, Yuan M, Huang B Q, et al. Changes in actin organization in the living egg apparatus of *Torenia fournieri* during fertilization[J]. Sex Plant Reprod, 2000, 12:315-22.
- [17] Ye X L, Yeung E C, Zee S Y. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant[J]. Phaius tankervilleae Planta,2002,215:60-66.
- [18] 邱义兰,刘如石,田惠桥.被子植物受精过程中细胞骨架的动态变化[J].生命科学研究,2005,9(2):105-110.
- [19] Zhang Z, Russell S D. Sperm cell surface characteristics of *Plumbago zeylanica* L. in relation to transport in the embryo sac[J]. Planta,1999,208,539-544.

(上接第24页)

- [16] Smith M A L, Spomer L A. Vessel, gels, liquid media and support system[C]//. Aitken-Christie J, Kozai T, Smith M A L. In Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Dordrecht(The Netherlands); Kluwer Academic Publishers, 1995: 371-404.
- [17] Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets in vitro and ex vitro[J]. Acta Hortic,1995,393:111-118.
- [18] Tanaka M, Yoneyoma M, Minami T, et al. Micropropagation of phalaenopsis by using synthetic seeds in film culture vessels[M]. UK Glasgow; HMSO Publications Centre,1993.
- [19] 何松林,任凝辉,潘会堂,等.高分子树脂膜培养容器在文心兰试管苗培养中的应用[J].北京林业大学学报,2002,42(4):93-96.
- [20] 陈青瑛,范国成,陈景耀.植物组织培养节省成本的初步试验[J].福建果树,1997(1):3-7.
- [21] 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.
- [22] 古在丰树.植物组织培养的新阶段[M].日本东京:农山渔村文化协会,1998.
- [23] 丁永前.组培苗微生态环境中CO<sub>2</sub>控制的研究[D].南京:南京农业大学,2000.
- [24] 肖玉兰.植物无糖组培快繁工厂化生产技术[M].昆明:云南科技出版社,2003.
- [25] 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.