植物组织培养育苗微生态环境控制的研究进展

吴沿友, 刘 建, 李国祥, 夏利利, 李西腾

(江苏大学农业工程研究院, 江苏省现代农业装备与技术重点实验室, 江苏镇江 212013)

摘要: 分析了传统植物组织培养设施与环境的诸多问题和缺陷, 综述了国内外组培微环境单因子和多因子控制的研究进展, 并提出了组培育苗微生态环境控制的发展趋势与建议。

关键词: 植物; 组织培养; 育苗; 环境控制; 微环境; 光合作用

中图分类号: S336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)04-0001-04

一般的高等植物通过种子繁衍后代, 或是通过嫁接、扦插、分枝等无性繁殖方法传种接代。而组织培养技术可以通过植物的组织和细胞的培养, 培育完整的植株。严格地讲, 植物组织培养是指将植物的活体组织部分(如茎尖、胚胎、胚轴、花药等)在适宜的人工培养基和无菌条件下, 进行离体培养产生愈伤组织, 并逐步分化出器官(芽和根)和再生植株的方法。

组织培养技术自诞生以来, 在一段很长的时间内, 生物学家们都注重于研究组培苗的内部生理机制, 寻找促成器官形成的激素, 完善培养基的营养配比, 以及探索不同的离体培养途径和组织培养技术, 而很少研究由于组培过程中特殊的生长环境对组培苗生长造成的生理影响, 很少重视在组培过程中实施微生态环境的调控^[1]。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和实质性研究则是在 80 年代末以后。然而由于传统的组培容器小, 且密封要求严格, 造成对环境因子的测量和调控十分困难。长期以来, 关于组培微环境因子控制技术的研究一直受到限制。总的来说, 对组培微生态环境的研究国内外还处于探索阶段, 尚未形成一套系统的理论^[1]。

1 传统组织培养育苗微生态环境

传统的组培苗培育基本上是在外加人工光源并

适当控制温度的组培室内进行, 小苗则生长在一个密闭的小玻璃瓶或是其他小型容器里, 这种密闭环境大大地制约了容器内外的气体交换。据日本的 Kozai 等研究发现, 在传统的组培方式下, 小苗接受光照后不久(一般在光照后 1 h), 瓶子内的 CO₂ 浓度就下降到作物光合作用的平均补偿点(50 μL/L 左右)以下, 以后就一直维持在这个水平, 使组培苗处于 CO₂ 饥饿状态^[2]。因此, 在传统的组培方式下必须在基质中外加糖作为组培苗生长所必需的碳源, 这使小苗的光合自养作用受到了严重抑制, 小苗主要以异养的方式进行生长^[3]; 另外, 密闭容器使小苗生长在一个高湿的环境内, 抑制了叶片的蒸腾作用, 进而造成组培苗叶片气孔功能的丧失, 降低了组培苗移栽后的成活率^[4-5]。组培基质中糖的存在和高湿的环境是组培苗易遭杂菌污染的主要原因, 为了防止污染, 不得不进行繁琐的手工灭菌, 增加了劳动强度和生产成本^[4]。

传统组培环境也引发了诸多问题和缺陷: (1) 繁殖周期不稳定, 生产计划难以安排; (2) 组培苗之间的生长差异大, 成品苗个体不能达到均匀一致; (3) 驯化阶段苗的成活率低。而且为了阻止微生物进入, 通常使用小玻璃容器, 不利于自动化控制、管理和操作以及组培苗生产的规模化和商品化。

2 组织培养育苗微生态环境控制的研究进展

目前关于组培苗微生态环境的控制主要以单因子和两因子的控制为主^[2,6-7], 单因子控制主要是 CO₂ 浓度、光照、温度、湿度等的控制, 两因子控制主要是控制两种气体环境因子以及一种气体环境因子和一种根际环境因子。近年来国内外也出现了一些关于组培多因子综合控制的报道。含叶绿体的组培

收稿日期: 2005-12-08

作者简介: 吴沿友(1966—), 男, 安徽贵池人, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 组培育苗微生态环境控制。E-mail: yanyouwu@ujs.edu.cn.

苗具有显著的光合作用能力^[8],如果环境条件得到适当控制,组培苗在光合自养条件下比在异养或兼养条件下生长更好,发育更快、活力更强,有利于降低生产成本。

2.1 单因子控制

2.1.1 CO₂ 浓度

1986年 Mousseau 首次对西红柿组培苗进行了二氧化碳富集处理,发现进行光合兼养的苗(基质中含糖),其干物质积累增加了31%,而进行光合自养的苗(基质中不含糖),其干物重积累却增加了100%^[9]。随后,各国的科研工作者对组培过程中增施 CO₂ 和增强光合光量子流(PPF)方面做出了积极的探索,日本的 Kozai 等、加拿大的 Desjardins 都发现 CO₂ 富集和高的光合光量子流对促进小苗的生长和增加干物质的积累起到积极的作用^[10-11]。日本的 Kozai 等^[2]以及 Matthieu 等^[12]分别研制了连续测量组培苗 CO₂ 交换速率的装置,能研究 CO₂ 浓度对组培苗光合速率的影响,以寻求适宜的 CO₂ 浓度控制参数。

我国南京农业大学的丁永前采用有机玻璃作组培箱体材料,组培苗直接定植于箱体内,并对箱体内组培苗实施 CO₂ 浓度监控。用赤霞珠葡萄组培苗所做的无糖对照试验结果表明,与传统设施环境相比,在该设施中生长的葡萄组培苗的叶面积、茎粗和枝高分别增长90.0%、76.6%和62.8%^[1]。这是国内首次报道运用工程技术手段,实现组培苗光合自养生长发育的微环境控制。

2.1.2 光照

光照包括光强、光质、光周期3个因子。光强主要以PPFD来衡量,一般来说,植物的光合作用会随着PPFD的增加而增强,然而当达到光合作用的饱和点后光合作用却反而下降^[13]。容器内外的PPFD,由于受到容器及其顶盖的材质、形状、密封方式^[14]和组培容器空间排列方式^[15]的影响,而有很大的不同。传统的组培光源都是安放在容器正上方,随着组培苗的生长,被上层叶片遮断拦截的光能不断增加,只有少部分的光能到达下层叶片,而采用侧向光照系统能够避免上述问题。1992年,日本的 Kozai 等在传统的顶向光照的基础上增加了侧向光照,与传统的顶向光照相比,提高了空间和光合有效辐射的利用率,并发现培养出的组培苗长得粗壮,更有利于组培苗移栽后的生长^[16-17]。我国南京农业大学的徐志刚^[18]于2002年设计了一套能调节光照度的组培装置,在顶向光照的同时增加侧向光照,通过调节亮灯个数达到了调节光量子通量的

目的。

光质和光周期也影响苗的生长。Moe 等^[19]、Seibert 等^[20]分别对黄瓜、烟草组培苗进行光质调节照射,发现黄瓜增加蓝光照射可降低株高,而增加红光照射则使光合产物较多地转运到叶片;增加红光照射对烟草组培苗有促进发根的作用,蓝光和近紫外光有促进芽的发生和愈伤组织增重的作用。Morini 等发现在FFPD较大的情况下,与16h光期、8h暗期的光周期相比,经4h光期、2h暗期处理的桃树苗生长得更好^[21]。

2.1.3 温度

温度是构成组培微环境的重要环境因子,直接影响组培苗的生长。每一种组培苗都有适宜生长的温度,高温会降低组培苗的光合作用,引起光合午休,抑制其生长。目前国内外研究组培苗温度环境影响的还很少,我国南京农业大学的徐志刚^[18]发现在组培室恒温的大环境下,光源是引起温度升高的唯一因素,并在2002年设计了一套光温控制系统,通过阻断热对流等方式,有效地控制了内环境的温度。1992年日本的 Kozai 等^[22]研究了变温管理对组培苗的影响,在日平均温度为20℃的情况下,分别设定3个不同的变温管理,结果表明,苗的高度随温度差值的增大而增大,与光强不显著相关;干重和鲜重不受温差值的影响。

2.1.4 湿度

目前国内外对控制组培微环境的相对湿度的研究很少,一般都认为在传统组培环境中,高湿(相对接近100%)环境会造成气孔开闭功能的丧失,并有利于菌类的生长。而对这种高湿环境引起组培苗形态和生理上的变化的研究却少有报道。1992年 Tanaka 等利用不同盐类的饱和溶液获得不同的相对湿度,对西红柿苗进行了对照试验,试验结果表明:相对湿度高,叶片气孔导度高,CO₂在叶片中的扩散率高,净光合速率也高;相对湿度低,则反之^[23]。Kozai 等对马铃薯组培苗做了不同湿度条件下的生长试验,结果发现苗的长度与相对湿度呈负相关,单位干重叶面积与相对湿度呈正相关,而干重与相对湿度无明显相关^[24]。

2.2 多因子综合控制

采用透气性好的容器作组培容器,可降低容器内的相对湿度和提高容器内的CO₂浓度,促进组培苗更好地生长,并减少玻璃苗的产生。该方法已进入实用阶段^[25]。

日本千叶大学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度、CO₂ 浓度、温度和相对湿度。与传统组培设施相比,生长在该设施内的草莓组培苗的干重与 R_{NP} 都显著提高^[25]。

Kozai 等研制出既能控制气体环境又能控制培养基化学成分的组培设施^[25],在该设施中培养草莓组培苗,其 R_{NP} 是对照组的 4 倍以上,28 d 后的干重是对照组的 1.7 倍。

我国南京农业大学的徐志刚^[18] 在 2002 年设计开发了一套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 CO₂ 浓度、光照度和相对湿度,实现间接调控。试验叶用甘薯组培苗显著提高了光合作用能力,促进了植株生长。

2004 年,中国农业大学的李传业等^[26] 以 PLC 为控制核心,设计了一套能对组培箱内 CO₂ 浓度、相对湿度进行调控的组培微环境控制系统。系统调试试验结果表明,控制系统能将光期组培箱 CO₂ 摩尔分数和相对湿度分别控制在 700 ~ 900 μmol/mol 和 80% ~ 92% 的目标范围内,达到了预期效果。

3 发展趋势与建议

3.1 计算机模拟在组织培养微生态环境控制中的应用

微生态系统的计算机模拟将成为组织培养中一个新的研究领域^[5]。目前模拟模型广泛应用于大田、温室作物的产量预测、作物育种、田间生产管理等,像 Aggawal 等运用作物生长模型对春小麦在泰国、菲律宾、印尼种植的可行性及生产潜力进行了研究^[27]。Aggarwal 提出了水稻育种的生长模型^[28]。然而计算机模拟运用到组织培养中目前还未见报道。组培微生态环境控制中利用计算机模拟就需要将计算机科学和生物学结合,创建出组培苗的微生态系统模型,用以指导组培育苗的自动化和工厂化生产。

3.2 无糖组织培养的微环境控制

通过控制根际环境,实施无糖或低糖培养,不仅能促进组培苗的生长发育,提高品质,而且能减少或控制污染,减少组培苗的损失。无糖培养改革了传统用糖作为碳源的培养技术,增加了植物生长和生化反应所需的物质流的交换和循环,减少消毒、驯化等过程,降低组培苗生产成本,且显著缩短培养周期。此外,无糖培养还有利于实施组培微生态环境的自动化监测和控制,有利于生产管理自动化。国外(主要是日本)早在 20 世纪 90 年代初就开始大

力研究无糖培养的环境控制,而我国这方面的研究还很少,在未来的研究中必然有着广阔的发展前景。

3.3 采用新型光源

应用新型光源[如发光二极管(LED)]作为植物生长的光源,国外(主要是日本)已经有一些学者开始了这方面的研究,而国内未见报道。Tanaka 等利用 LED 作为兰花组培苗光源,发现利用新型 LED 光源比传统光源明显促进组培苗生根和生长^[29]。发光二极管属于冷光源,体积小、不易碎、单色性好、寿命长,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^[30]。由于发光二极管体积小,可直接安装在培养容器上,可大大节省空间,比传统方法增加有效培养室空间 3 倍以上;而且耗能低,几乎不发热,便于组培室的温度控制,节约能源;最显著的特点是单色性好,红、蓝发光二极管产生的红光和蓝光能显著影响植物生长^[31]。新型 LED 光源因其具有高效、节能、栽培成活率高等优点,将成为未来的组培光源的发展方向。

参考文献:

- [1] 丁永前. 组培苗微生态环境中 CO₂ 控制的研究[D]. 南京:南京农业大学,2000;3-4.
- [2] Kozai T, Fujiwara K, Kitaga Y. Modeling, measurement and control in plant tissue culture[J]. Acta Horticulturae, 1993(343):68-78.
- [3] 史跃林. 组培苗的生育环境与调节[J]. 植物生理学通讯,1990(3):65-67.
- [4] 吴毅明. 国外设施园艺环境控制新技术的发展[J]. 农业工程学报,1988,4(3):80-91.
- [5] Pierik R L. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation[J]. Acta Horticulturae,1988(230):63-71.
- [6] Kirdmanee C, Kitaga Y, Kozai T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of eucalyptus plantlets *in vitro* and *ex vitro*[J]. Acta Horticulturae, 1995(393):111-118.
- [7] Seko Y, Nishimura M. Effects of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants *in vitro* on sugar-free medium[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1997,46(3):257-264.
- [8] Walker P N, Harris J P, Gautz L D. Optimal environment for sugarcane micropropagation[J]. Transactions of the ASAE,1991,34(6):2609-2614.
- [9] Desjardins Y. Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems[J]. Acta Horticulturae, 1995(393):45-61.
- [10] Kozai T, Koyama Y, Watanaba I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux[J]. Acta Horticulturae,1988(230):121-127.

- [11] Desjardins Y. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue cultured strawberry, raspberry and asparagus plantlets [J]. *Acta Horticulturae*, 1988(230): 45-53.
- [12] Matthieu F, Danielc, Rose G. A method for the study of CO₂ exchanges *in vitro* cultured vitis rupestris plantlets [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1991, 27: 175-181.
- [13] Niu G, Kozai T, Kitaya Y. Simulation of the time of CO₂ concentration in the culture vessel and net photosynthetic rate of *Cymbidium* plantlets [J]. *Transactions of the ASAE*, 1996, 39(4): 1567-1573.
- [14] Solarova J, Souckova D, Ullmann J. *In vitro* culture; environmental conditions and plantlet growth as affected by vessel and stopper types [J]. *Hort Science*, 1996, 23(2): 51-58.
- [15] Read P E. Environmental effects in micropropagation [M]// Ammirato P V, Evans D A, Sharp W A. *Handbook of plant cell culture*. New York: McGraw-hill Pub, 1990: 95-125.
- [16] Kozai T, Kino S, Jeong B R, et al. A sideward lighting system using diffusive optical fibers for production of vigorous micropropagated plantlets [J]. *Acta Horticulturae*, 1992(319): 237-248.
- [17] Hayashi M. Effect of sideward lighting on the growth of potato plantlet *in vitro* [J]. *Acta Horticulturae*, 1992(319): 163-167.
- [18] 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: 38-104.
- [19] Moe R, Morgan L, Gridal G. Growth and plant morphology of cucum is sativus and fuch sia hybrid are influenced by light quality during the photoperiod and by temperature alternations [J]. *Acta Hort*, 2002(580): 229-234.
- [20] Seibert M, Wetherbee P J, Job D D. The effects of light intensity and spectral quality on growth and initiation in tobacco callus [J]. *Plant Physiol*, 1975, 56: 130-139.
- [21] Morini S, Fortuna P, Muleo R. Effects of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro* [J]. *Advances Hort Science*, 1990, 4: 163-166.
- [22] Kozai T, Kushihashi S. Effects of difference between photoperiod and dark period temperarures and phoyosynthetic photo flux density on the shoot length and growth of potato plantlets *in vitro* [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 1992, 61(1): 93-98.
- [23] Tanaka K, Fujiwara K, Kozai T. Effects of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro* [J]. *Acta Horticulturae*, 1992(319): 59-63.
- [24] Kozai T, Tanaka K, Jeong B R. Effects of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato plantlets *in vitro* [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 1993, 62(2): 413-417.
- [25] 徐志刚, 丁为民, 丁永前, 等. 规模化组培育苗设施环境与控制的研究进展 [J]. *农业机械学报*, 2002, 33(1): 106-110.
- [26] 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.
- [27] Aggarwal P K, Penning de Vires F W T. Potential and water limited wheat yields in rice based cropping systems in southeast Asia [J]. *Agric Syst*, 1989, 30: 49-69.
- [28] Aggarwal P K, Kropff M J. The challenge of integrating systems approach in plant breeding: opportunity, accomplishments and limitations [C]// Kropff M J. *Application of systems approaches at the field levels*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1996: 1-24.
- [29] Tanaka M, Goi M, Higashiora T. A novel disposable culture-vessel made of flourcarbon polymer films micropropagaion [J]. *Acta Horti-culturae*, 1998(426): 663-670.
- [30] Tanaka M, Takamun T, Watanalbe 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.
- [31] 诸葛强, 关亚丽, 施季森, 等. 组培新技术及其在校树快繁中的应用 [J]. *林业科技开发*, 2003, 17(6): 37-38.

信息快递

中国农业网址大全简介

中国农业网址大全 <http://www.ny3721.com> 由北京和图时代网络技术有限公司创建于2003年, 建立的宗旨是方便网友们快速找到自己需要的网站和信息, 而不用去记忆太多复杂的网址。

目前, 中国农业网址大全收录了超过6 000家的农业类网站, 日访问量超过30万, 全球排名约7 000名(全球有>400亿个网站), 是全国影响力最大的农业网站。

中国农业网址大全一直在孜孜不倦地追求技术创新, 突破现有技术的限制, 以提供快速准确而又简单易用地找到最有效的信息的工具。中国农业网址大全已成为企业采购、销售人员, 企业管理者, 农业技术人员, 网站站长, 农业院校求职者寻找信息、寻找商机、寻找合作伙伴的最佳助手。