

碳源和光量对驱蚊香草组培苗生长及叶绿体超微结构的影响

邱秀茹 徐志刚

(南京农业大学农学院)

摘要:碳源和光量对组培苗的生长和品质具有重要影响,但环境中的 CO_2 和培养基中的糖等碳源对组培苗生长效应研究结果不一。该文以驱蚊香草组培苗为材料,在培养基不同糖含量(无糖和有糖)的基础上,设置不同 CO_2 和光量(PPFD)组合参数并定量调控,寻找相互关联的环境因子的最佳组合,进一步探讨 CO_2 、PPFD 和糖对驱蚊香草组培苗生长和叶绿体超微结构的影响。研究表明: CO_2 与 PPFD 对组培苗的生长具有协同作用。在协同调控 CO_2 和 PPFD 的条件下,培养基中的糖抑制组培苗的光合作用和生根,降低叶绿素含量,不利于叶绿体的正常发育;无糖培养能更好地促进生长和生根,光合速率最高,叶绿素和类胡萝卜素含量以及根系活力最大,叶绿体发育良好。在无糖培养时, CO_2 浓度和 PPFD 的控制参数在前期和后期分别取 $4\ 500\ \mu\text{mol}/\text{mol}$ 、 $130\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 $5\ 500\ \mu\text{mol}/\text{mol}$ 、 $160\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

关键词: 驱蚊香草;碳源;光量;叶绿体;超微结构

中图分类号: Q943.1;Q244;S682.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1522(2008)03-0128-04

DI Xiu-ru; XU Zhi-gang. **Effects of carbon sources and light density on the growth and chloroplast ultrastructure of *Pelargonium odoratissimum* in vitro**. *Journal of Beijing Forestry University* (2008) 30(3) 128-131 [Ch, 11 ref.] College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, 210095, P. R. China.

Carbon sources and light density have significant effects on growth and quality of plantlets *in vitro*. However, the effects of carbon sources including sugar and CO_2 on the growth of plantlets are still ambiguous. CO_2 concentration and light density (PPFD) on the basis of sugar-added and sugar-free medium were controlled to find the best combination of environmental factors and further investigate the effects on the growth and chloroplast ultrastructure of *Pelargonium odoratissimum* plantlets. Results show that CO_2 and PPFD play synergistic role on growth of *P. odoratissimum*. When CO_2 and PPFD are increased in cooperation, the sugar-added medium inhibits the development of chloroplast, rooting, and photosynthesis. On the contrast, the sugar-free medium promotes growth and rooting of *P. odoratissimum* and photosynthetic rates, pigment content and root vigor are higher than other treatments. Chloroplast develops well in sugar-free medium. The best combination of CO_2 and PPFD are $4\ 500\ \mu\text{mol}/\text{mol}$, $130\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{second})$ in initial, and $5\ 500\ \mu\text{mol}/\text{mol}$, $160\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{second})$ in later on sugar-free medium.

Key words *Pelargonium odoratissimum*; carbon sources; light density; chloroplast; ultrastructure

无糖组培快繁技术是以环境中的 CO_2 ^[1-2] 代替培养基中的蔗糖、麦芽糖和山梨醇等糖作为植物体的碳源,利用工程技术手段调节组培微环境 CO_2 、光量(Photosynthetic Photon Flux Density, PPFD)和湿度等影响因子,促进组培苗自养生长。目前,中国、美国、英国、韩国等国家已将该项技术应用于种苗工业化生产中^[3]。无糖光合自养生长的组培苗,其生长、成活率及适应性显著优于传统有糖培养基中以异养或兼养方式生长的组培苗^[4]。但 Solarova 等^[5]指出,

糖是初期组培苗幼芽生长、形态建成以及叶片进行光合作用所必需的。为此, Mosaleeyanon 等^[6]采用降低培养基糖含量、同时提高 CO_2 浓度的方法提高了雨树(*Samanea saman*)组培苗的光合作用,促进其离体和移栽后的生长发育。由此可以看出,碳源在组培苗生长发育中的作用仍是有待系统研究的重要课题。

驱蚊香草(*Pelargonium odoratissimum*)能挥发出柠檬香气,具有驱蚊、净化室内空气、美化居室的作用。

收稿日期:2007-04-30

http://www.bjfujournal.cn, http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2004107)、“863”国家高技术研究发展计划项目(2006AA03A165)。

第一作者:邱秀茹。主要研究方向:园林植物组织培养。电话:025-84379092 Email: 2005101057@njau.edu.cn 地址:210095 南京农业大学农学院。

责任作者:徐志刚,副教授。主要研究方向:组培微环境调控。电话:025-81581355 Email: xuzhigang@njau.edu.cn 地址:同上。

用,应用前景广阔、市场需求量大。常规扦插繁殖和分株繁殖等方法,存在生长速度慢和繁殖系数低等不足,采用植物组织培养方法生产种苗是满足市场需求的重要途径^[7]。已有研究主要侧重于外植体和培养基组分选择,关于 CO₂、PPFD 和糖对驱蚊香草组培苗生长和光合能力的影响,尚未见研究报道。本文以生根阶段的驱蚊香草组培苗为材料,在培养基不同糖含量(无糖和有糖)的基础上,设置不同 CO₂ 和 PPFD 组合参数并定量调控,寻找相互关联的环境因子的最佳组合,进一步探讨 CO₂、PPFD 和糖对驱蚊香草组培苗生长和叶绿体超微结构的影响,为驱蚊香草组培苗的无糖组培快繁提供依据和指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养基

以驱蚊香草叶柄外植体离体培养获得的不定芽为实验材料。无糖培养基为 1/2 MS + IBA 0.2 mg/L,琼脂浓度 6.5 g/L;在无糖培养基的基础上添加 20 g/L 的蔗糖,构成有糖培养基。培养基 pH 值为 5.8,4 孔透气膜封口;滤膜直径 10 mm,滤膜微孔直径

0.5 μm。每瓶接种 5 株。在组培室环境中预培养 4 d。组培室环境条件为:(25 ± 2) °C 室温,12 h 光照,40 μmol/(m²·s) 光量,75% 的相对湿度。组培室内 CO₂ 浓度,即组培瓶外 CO₂ 浓度为 400 μmol/mol。

1.2 CO₂ 浓度和 PPFD 控制参数的确定

将经过预处理的 20 瓶有糖培养基瓶苗移入组培苗微环境调控系统^[8]中,系统内的 CO₂ 浓度,亦即组培瓶外的 CO₂ 浓度在 500 ~ 6 500 μmol/mol 可调,PPFD 在 52 ~ 160 μmol/(m²·s) 可调。系统自动采集并记录 CO₂ 浓度的下降量和时长,并依据文献[9]的公式计算组培苗净光合速率 P_n (图 1)。Fujiwara 等^[10]指出当培养室内 CO₂ 浓度达到 1 890 μmol/mol 时,培养容器内 CO₂ 浓度仅为 363 μmol/mol,正好等同于外界环境的 CO₂ 浓度。因此本实验以获取最大光合速率为原则,取组培苗前期的调控参数组合(CO₂ 浓度、PPFD)为 4 500 μmol/mol、130 μmol/(m²·s);取后期的调控参数组合(CO₂ 浓度、PPFD)为 5 500 μmol/mol、160 μmol/(m²·s)。经测定瓶内实际 CO₂ 浓度前期和后期分别为 1 000 和 1 500 μmol/mol。

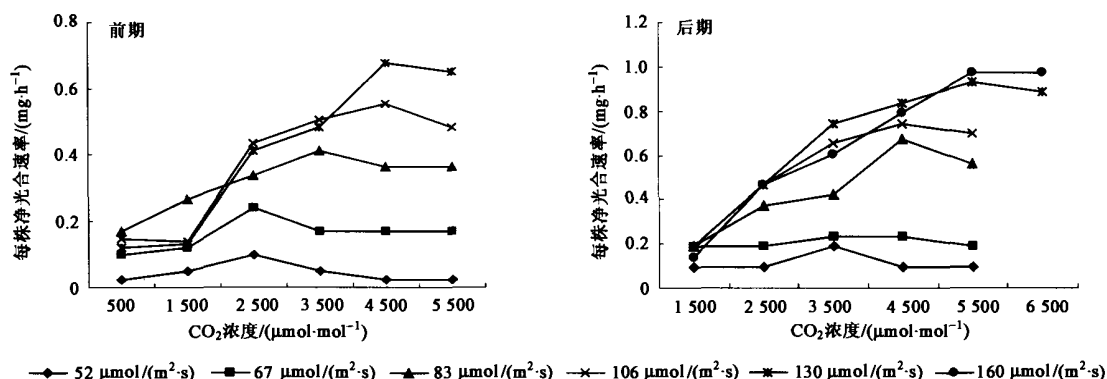


图 1 驱蚊香草组培苗光合速率对 CO₂ 的响应

FIGURE 1 The response of photosynthetic rates to CO₂ in *P. odoratissimum* in vitro

1.3 生长实验组的控制参数设置

将经过预处理的有糖和无糖组培瓶苗移入组培苗微环境调控系统中,依据环境参数最佳组合,实施自动定量调控,构成生长控制组;另设无糖和有糖对照组,对照组的参数(CO₂ 浓度、PPFD)就是组培室内的环境参数。总计构成 4 个实验组(见表 1),每个实验组 20 瓶,总计 80 瓶。

表 1 生长实验组的控制参数设置

TABLE 1 The control parameters in the experiments

实验设置	CO ₂ 浓度/ (μmol·mol ⁻¹)		PPFD / (μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)		蔗糖 含量/ (g·L ⁻¹)
	前期	后期	前期	后期	
有糖处理	4 500	5 500	130	160	20
有糖对照	400	400	40	40	20
无糖处理	4 500	5 500	130	160	0
无糖对照	400	400	40	40	0

1.4 指标测定与数据处理

培养 25 d 后出苗,洗净琼脂,称量鲜重后,放入

干燥箱中 105 °C 杀青 15 min,80 °C 烘干 48 h 至恒重,称量干重。取组培苗上层伸展叶片,用无水乙醇与丙酮 1:1 (体积比) 提取液浸泡法测定叶片叶绿素,蒽酮比色法测定叶片可溶性糖,TTC 法测定根系活力^[11]。叶片中部主脉两侧切取大小 1 ~ 2 mm² 小块,用 3% 的戊二醛固定叶片,清洗、固定、脱水包埋、切片和染色后,用日立 H-7650 型透射电子显微镜观察并照相。以上每个实验重复 3 次。

用 Microsoft excel 2003 进行数据和图表管理,用 SAS 软件进行统计分析,LSD 法进行显著性差异比较(显著水平 $P \leq 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 碳源和 PPFD 对组培苗生长的影响

如图 2 所示,无糖处理组培苗生长健壮,叶片厚大,叶色浓绿,根系发达,长势最好;有糖处理组培苗

长势次之;有糖对照组培苗叶色淡绿,根较短小;无糖对照组培苗矮小,长势最差。这表明在气体碳源

(CO₂)和 PPFD 得到满足的条件下,培养基中碳源(糖)的存在对组培苗的生长无明显的有益作用。

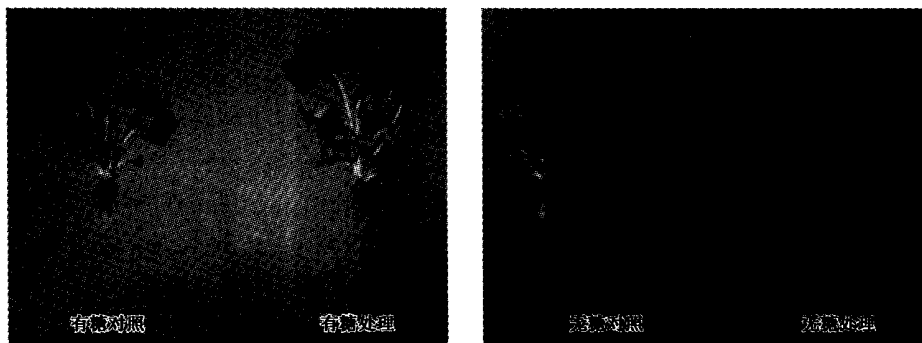


图 2 不同碳源和 PPFD 条件下生长的驱蚊香草组培苗

FIGURE 2 *Pelargonium odoratissimum* plantlets cultured in different carbon sources and PPFD

如表 2 所示,碳源和 PPFD 对驱蚊香草组培苗的各部分干、鲜重有显著的影响,以有糖处理最大;无糖处理与有糖对照次之,二者无差异;无糖对照最小。有糖处理的根冠比与无糖处理之间的差异不显著,但无糖对照最小。根冠比反映同化物在植物体内分配特征,在 CO₂ 和 PPFD 充足时,糖的存在与否对根冠比有影响,但差异不显著。

表 2 碳源和 PPFD 对驱蚊香草组培苗干鲜重及根冠比的影响

TABLE 2 Effects of carbon sources and PPFD on dry weight, fresh weight and root/shoot ratios

实验设置	茎鲜重/g	根鲜重/g	茎干重/g	根干重/g	根冠比
有糖处理	6.90 A	2.16 A	0.61 A	0.18 A	0.30 A
无糖处理	4.29 B	1.21 B	0.30 B	0.05 BC	0.18 AB
有糖对照	4.59 B	1.42 B	0.28 B	0.08 B	0.28 AB
无糖对照	1.76 C	0.41 C	0.09 C	0.01 C	0.15 B

注:不同大写字母代表在 0.01 水平差异显著,表 3~4 同此。

2.2 碳源和 PPFD 对组培苗叶片色素含量及光合速率的影响

如表 3 所示,叶绿素含量和光合速率依次为无糖处理>有糖处理>有糖对照>无糖对照,且差异显著。与有糖处理相比,无糖处理组培苗的光合速率最高,分别是有糖处理和有糖对照的 2 和 6 倍。结果表明培养基中的糖对组培苗的光合作用有抑制作用。处理组的类胡萝卜素含量显著高于对照组。

表 3 碳源和 PPFD 对驱蚊香草组培苗色素含量及光合速率的影响

TABLE 3 Effects of carbon sources and PPFD on pigment and photosynthetic rates

实验设置	叶绿素 a/ (mg·g ⁻¹)	叶绿素 b/ (mg·g ⁻¹)	叶绿素 总量/ (mg·g ⁻¹)	类胡 萝卜素/ (mg·g ⁻¹)	每株光合 速率/ (mg·h ⁻¹)
有糖处理	1.193 B	0.355 B	1.542 B	0.400 A	0.976
无糖处理	1.324 A	0.417 A	1.741 A	0.423 A	1.854
有糖对照	1.039 C	0.346 B	1.385 C	0.351 B	0.285
无糖对照	0.753 D	0.209 C	0.962 D	0.266 C	0.136

2.3 碳源和 PPFD 对组培苗生根及可溶性糖含量的影响

无糖处理组的组培苗,在第 10 天生根数极少,第 15 天时也低于有糖处理组,但在第 20 天时无糖处理组的根长显著增加。培养结束后,根长为无糖处理>有糖处理>无糖对照>有糖对照,根系活力为:无糖处理>有糖处理>有糖对照>无糖对照(见表 4)。增施 CO₂ 显著增加根系活力,且无糖处理优于有糖处理。无糖处理的可溶性糖与有糖培养无差异。根系活力反映根系对营养物质的吸收与合成能力,是衡量组培苗品质的重要指标。在 CO₂ 和 PPFD 充足时,无糖培养能够获得根系发育更好的组培苗。

表 4 碳源和 PPFD 对驱蚊香草生根的影响

TABLE 4 Effects of carbon sources and PPFD on rooting

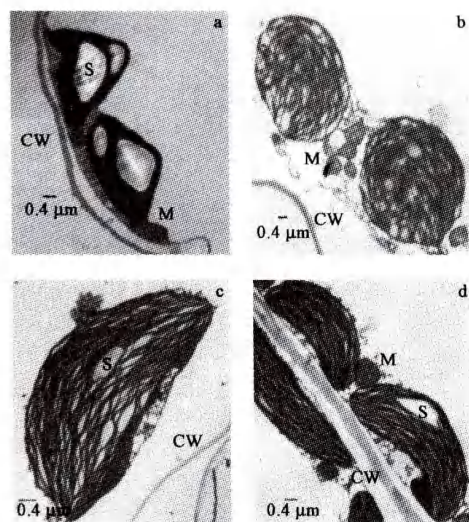
实验设置	单株 根数	根长/ cm	根系活力/ (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	可溶性 糖/%
有糖处理	4.5	2.92	0.28A	55.85A
无糖处理	4.9	3.81	0.31A	52.40A
有糖对照	4.65	2.45	0.13 B	47.93A
无糖对照	3.33	2.53	0.10 B	23.50B

2.4 碳源和 PPFD 对叶绿体超微结构的影响

有糖对照的叶绿体受到多颗大淀粉粒的挤压,叶绿体形态不正常(图 3a);无糖对照的叶绿体肿胀变成圆球形,形态反常、线粒体多(图 3b);有糖处理的叶绿体中有多颗小淀粉粒,膜发生了破损(图 3c)或解体;无糖处理的叶绿体数量最多且排列紧密,紧贴在细胞内表面,形态规则呈长纺锤形,基质基粒丰富,发育良好,结构完整(图 3d)。超微结构分析表明,在 CO₂ 和 PPFD 得到满足时,无糖培养促进叶绿体的正常发育,糖对叶绿体发育产生不良影响。

3 结论与讨论

1) 组培微环境(CO₂ 浓度、PPFD)组合前期 4 500 μmol/mol、130 μmol/(m²·s)和后期 5 500 μmol/mol、160 μmol/(m²·s)有利于驱蚊香草组培苗无糖生



a. 有糖对照; b. 无糖对照; c. 有糖处理; d. 无糖处理;
CW. 细胞壁; M. 线粒体; S. 淀粉粒

图3 碳源和PPFD对驱蚊香草叶绿体超微结构的影响

FIGURE 3 Effects of carbon sources and PPFD
on chloroplast ultrastructure

根培养。叶绿素含量多,光合能力提高。两者表现一定相关性。类胡萝卜素的含量也得到提高,有利于保护叶绿素免受光氧化,增强其抗光抑制能力。

2) CO_2 浓度与 PPFD 对驱蚊香草组培苗的生长具有协同作用。在提高 CO_2 浓度的同时相应增加 PPFD,能够促使生根阶段的组培苗在无糖培养基中实现光合自养生长,其长势和指标优于在有糖培养基中生长的组培苗。

3) 无糖处理的驱蚊香草组培苗的根数、根长和根系活力等指标高于有糖处理和有糖对照,而且组培苗可以通过光合自养合成代谢所需的物质或能量。

4) 4个实验组中,唯有无糖处理的叶绿体形态正常,结构完整,排列整齐,有少量的淀粉存在。无糖培养时,提高 CO_2 浓度和 PPFD 能够促进叶绿体的正常发育,增强光合能力。

参 考 文 献

- [1] 何松林,刘震,杨秋生,等. CO_2 施肥时非无菌条件下树脂膜容器内文心兰试管苗接种技术[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(4): 49-53.
HE S L, LIU Z, YANG Q S, *et al.* Inoculation of *in vitro* shoots of *Oncidium* in film culture vessels under open condition and CO_2 enrichment condition[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2003, 25(4): 49-53.

- [2] 潘会堂,刘秀丽,张启翔. CO_2 施肥对设施花卉生产的影响[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(1): 93-99.
PAN H T, LIU X L, ZHANG Q X. Influences of CO_2 enrichment on ornamental plant production[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2003, 25(1): 93-99.
- [3] MICHIO K, MASAKATU O, MICHIO A, *et al.* The effect of carbon dioxide enrichment, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of carliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1998, 123(2): 176-181.
- [4] KOZAI T, KUBOTA C, JEONG B R, *et al.* Environmental control for large-scale production of plants through *in vitro* techniques[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 51(1): 49-56.
- [5] SOLAROVA J, POSPHILSILOVA J, CATSKY J, *et al.* Photosynthesis and growth of tobacco plantlets independence on carbon supply[J]. *Photosynthetica*, 1989, 23(4): 629-637.
- [6] MOSALEEYANON K, CHAUM S, KIRDAMANEE C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO_2 -enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium[J]. *Scientia Horticulturae*, 2004, 103(1): 51-63.
- [7] 李际红,周庆和,谢会成. 驱蚊香草的组织培养技术[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(5): 92-96.
LI J H, ZHOU Q H, XIE H C. Studies of the tissue culture techniques of *Citrosa* [J]. *Journal of Central South Forestry University*, 2005, 25(5): 92-96.
- [8] 刘晓英,徐志刚,焦学磊,等. 基于 C8051F005 的组培 CO_2 微环境调控系统的研制与试验[J]. 农业工程学报, 2006, 22(11): 209-212.
LIU X Y, XU Z G, JIAO X L, *et al.* Development and test on new monitoring and control system of CO_2 gaseous micro-environment for plant tissue culture based on C8051F005[J]. *Transactions of the CSAE*, 2006, 22(11): 209-212.
- [9] KATSUM O, KOZAI T. CO_2 concentration profiles in a plant tissue culture vessel[J]. *Environ Control Biol*, 1997, 35(3): 197-202.
- [10] FUJIWARA K, KOZAI T, WATANABE L. Fundamental studies on environment in plant tissue culture vessel. (3) Measurement of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets[J]. *J Agric Meteorol*, 1987, 43(1): 21-30.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 119-120, 195-197.
LI H S. *Experiment principle and technology of plant physiology and biochemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 119-120, 195-197.

(责任编辑 董晓燕)