

降低植物组织培养成本的研究进展

王秋洁, 李 青

(北京林业大学, 北京 100083)

摘要:成本过高是制约利用植物组织培养技术进行规模化生产的重要因素。为解决这一难题,许多研究人员从改良培养基支持体、降低糖质量浓度和改善培养环境条件等方面入手,取得了一定的成效。

关键词:组织培养;成本;培养基支持体;糖质量浓度;培养环境

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A

Research advance of dropping down the cost concerning plant tissue culture

WANG Qiu-jie, LI Qing

(Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The high cost is an important limiting factor of plant tissue culture in production, which is the problem that many researchers have tried to solve in supporting material, sugar concentration and environmental conditions.

Key words: Tissue culture; Cost; Supporting material; Sugar concentration; Environmental conditions

植物组织培养是在无菌条件下,将外植体接种到人工配制的培养基上,在人工控制的环境条件下产生完整植株的过程。它较之传统的无性繁殖方法(分株、扦插等)具有不受季节、环境限制和繁殖系数高、繁殖速度快等优点,因此更符合工厂化规模化生产的需求。组织培养自20世纪60年代用于兰花的工厂化生产,至今已经取得了很大的进展,能用组织培养大量繁殖的植物种类已经越来越多。然而,真正用于商业化生产的只有为数不多的种类,究其原因,成本过高是最重要的制约因素^[1]。

用组织培养繁殖植物需要具备相关的实验场地、仪器和药品,对技术人员的要求也较高,对于那些不易用传统繁殖方法繁殖的植物,以及数量少的珍稀品种或新品种而言,组织培养繁殖速度快、材料利用率高,种苗的成本低于传统方法繁殖的苗木,有较大的利润^[2]。为了使更多的植物能用组织培养规模化繁殖,研究人员从组织培养环节的各个方面入手,探寻降低成本的方法,并已经开展了许多卓有

成效的研究工作,取得了一定进展。

1 改良培养基支持体

液体培养需要投入振荡器等设备,成本较高,所以在生产中仍较多地采用固体培养。凝胶剂(如:琼脂、卡拉胶)一直以操作简便而作为培养基支持体的首选。然而,添加凝胶剂的培养基透气性差、营养元素分布不均匀且移动性差,直接影响到组织培养苗的质量。在竞争激烈的苗木市场,只有优质壮苗才能适应市场需求,对此改良培养基支持体不失为增加效益的一项重要措施。况且,添加凝胶剂的培养基不能循环利用,与植物的接触面积小,大量未被吸收的营养元素白白流失,加之培养于其中的植物根系通常瘦小、脆弱,当移栽到土壤中时容易被损坏^[3],无形中又加大了能耗、增加了成本。

近年来,研究者对开发新的培养基支持体以取代传统凝胶剂的研究逐渐增多。Kirdmanee等^[4]发现利用蛭石为支持体较之凝胶剂效果明显,玻璃化

现象也大为减少。王碧琴^[5]用蛭石做支持体时,发现猕猴桃组织培养苗生根提前,移栽成活率提高。Tanaka等^[6]利用岩棉块作为培养基支持培养蝴蝶兰时,组织培养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。棉籽壳和珍珠岩替代凝胶剂用于葡萄生根培养中,同样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^[7]。吴毅明^[8]也在实验中得出结论: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。

用蛭石、沙子、珍珠岩等取代凝胶剂除了能培养出优质试管苗,克服营养元素移动性差、不能循环利用等缺点,其本身还具有价格便宜,一次购进可多次重复利用且折旧率低等优点,进一步降低了成本。

2 降低糖浓度

一般认为组织培养苗的光合作用能力微弱,培养之初无力进行光自养生长,惟有通过添加大量的外源糖来保证其碳源的供应。虽然有实验表明,用普通白糖代替价格高出其4倍的分析纯蔗糖,可以大大降低成本,且培育的苗木质量无明显差异^[9-10]。但是,糖也是各种微生物生殖繁衍的碳源,一旦被微生物侵染,将很快在培养基上繁殖,造成污染,使组织培养的成本上升,不利于规模化生产^[11-12]。此外,组织培养苗长期依赖外源糖,叶片表皮结构发育不良,叶片小,叶绿素含量降低,丧失光合作用能力或光合作用受到抑制^[13],影响组织培养苗的质量。

最近的一些研究表明,如果相关条件满足,一些组织培养苗可以在少糖或无糖的培养基中生长得更好。Aitken-christie等^[14]研究发现,许多组织培养苗如香石竹和大花蕙兰在高质量浓度CO₂、高光强条件下,可以在无糖或少糖的培养基中进行光自养生长。Kozai^[15]建议在提高培养容器内CO₂质量浓度并维持高光强条件下,减少甚至不必添加外源糖,以进一步降低组织培养苗的生产成本。何松林等^[16]的研究表明,文心兰组织培养苗在增施CO₂培养时,外源糖仍是必要的,但可以适当减少用量。同时,降低外源糖含量还能降低组培苗对光抑制的敏感性^[17]。李宗菊等^[18]的实验也表明在增加光强、增大透气孔、增施CO₂的条件下,无糖培养的各项指标将接近有糖培养。

Kozai发明了无糖组织培养技术(光独立培养法),它是向大型培养器内导入CO₂以代替糖作为植物体的碳源,利用工程技术手段调节组织培养微环境的空气、光照、湿度等影响因子,促进植物体自养生长的方法^[19-21]。具有植株生长速度快,生长发育均匀;减少了因高湿、弱光等引起的生理及形态的异常;简化或省略驯化过程;减少因污染引起的植物损失;促进光合成和生根,减少生根植物生长调节剂的使用等优点^[22]。

虽然无糖组织培养技术需要增施CO₂、增加光强的设施,提高了一些前期投入,但它能提高组织培养苗的质量、繁殖系数和驯化成活率,缩短生产周期,降低污染率。从长期发展的眼光来看,它还是一项收效显著的培养技术。

3 改善培养环境

在组织培养的发展初期,研究者多关注培养基的成分,以期使植物在生长过程中得到全面、充分的营养物质。然而,除了营养物质外,植物所处的环境条件也是影响其是否能快速、健壮生长的因素。组织培养苗的环境条件由人为控制,如果能找到最适合植物生长的环境条件,人为的加以调控,不仅比调节田间环境更易操作,而且生产出来的苗木生长加快、长势健壮、移栽易成活,有较强的市场竞争力。

3.1 光照

在组织培养苗培养过程中,白炽灯通常作为人工光源为植物提供能量。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,如红光可以促进大花蕙兰叶子的生长^[23];每日18 h的红光照射可以大幅增加天竺葵苗茎的伸长量^[24];红光还可以促进水母雪莲愈伤组织的生长^[25];蓝光照射可以提高白桦苗的光合速率和叶绿素含量^[26],蓝光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/生物量有明显的促进作用^[27];蓝光可以促进欧芹细胞的黄酮合成^[28];绿光和黑暗对小苍兰茎尖的分化与生长均有不利影响,出现玻璃化现象^[27];在一品红芽分化的过程中,黄光的抑制作用最显著,绿光的抑制作用最弱^[29]等。因此,Bulla^[30]认为光质比例、强度可调的发光二极管可以有效地替代白炽灯。在新型照射光源开发方面,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^[31]。

通常白炽灯是设置在培养物的上方约30~

50 cm处,但 Hayashi 等^[32]认为这种方式并不是最好的,并提出了白炽灯在侧面的光照方式。侧向照明时,组培苗获得了更加均匀一致的光能,呈现出上部叶片小下部叶片大的正常状态^[33]。Kitaya 等^[34]应用这种方式培育马铃薯,结果获得了更高质量的马铃薯组培苗。

3.2 湿度

由于培养容器密闭,其内的相对湿度一般高于 96%^[35],导致组培苗的表皮角质层不发达^[36],生长势弱,易出现玻璃化现象,蒸腾量小,不利于组培苗光合作用的进行^[37]。且与自然环境中的水分含量差异较大,移栽不易成活,增加了成本投入。

增加培养容器的透气性可以有效降低其内部湿度,培育出优质的苗木。陈龙清等^[38]以聚乙烯塑料薄膜封口,随着继代次数的增加出现玻璃化苗,而以棉塞封口的无一出现玻璃化现象。将透气膜上的透气孔面积增大时,满天星的无糖培养得到了较大的促进^[18]。

3.3 CO₂ 质量浓度

由于容器密闭,气体交换受到抑制,培养容器内的 CO₂ 质量浓度通常在组织培养苗接受光照 2 h 内急剧下降,接近或略高于植物的 CO₂ 补偿点^[39]。培养容器内 CO₂ 的亏缺限制了绿色茎叶小植株光合作用的发挥,使其不得不依靠培养基中的糖。同时,CO₂ 亏缺也是组织培养苗强光下生长不良的原因之一^[8]。

增施 CO₂ 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。崔瑾等^[40]在组织培养葡萄时增施了 800~1200 μL/L 的 CO₂,结果葡萄组织培养苗生长健壮,形成层明显发育,鲜重及干重均明显增加。Kozai^[41]在大花蕙兰的组织培养中发现增施 CO₂ 可以显著提高组织培养苗的鲜重,如果此时伴随有高光强则能缩短 1/2 的培养时间。李宗菊^[42]也发现在组织培养中提高 CO₂ 浓度时,配合光照强度的增加,可以促进组培苗的生长。

国内外在 CO₂ 施用装置方面的研究较少。Kozai^[43-44]主要是依据培养容器内外的浓度差,通过渗透的方式向容器内增施 CO₂。国内的设备与 Kozai 设计的原理基本相同。丁永前^[13]将培养箱与培养容器直接贯通,并在适当位置安装了一个 CO₂ 传感器,它可以测定 CO₂ 浓度,并根据需要更改 CO₂ 浓度设定值。

综合上述,降低组织培养生产成本和提高组织

培养苗质量的方法有很多,这对指导实践起到了重要作用。然而,多种节能方法综合应用的报道还很少见到,如果能进一步深入,探寻它们之间有效结合的途径,发挥各自的最大潜能,将大大降低组培成本,为组织培养技术走向生产扫除一大障碍。

参考文献:

- [1] 陈维伦. 我国植物快速繁殖和无毒种苗生产的现状和问题. 植物生物技术改良[M]. 北京: 中国科技出版社, 1991.
- [2] 郭绍霞, 张玉刚, 姜淑庆. 观赏植物试管快繁现状与展望[J]. 莱阳农学院学报, 2001, 18(3): 181-186.
- [3] 肖玉兰, 张光怡. 植物无糖组培快繁工厂化生产技术[J]. 农业生物技术通讯, 2002(1): 8-10.
- [4] Kirdmanee C, Kitaya 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 Hortic, 1995, 393: 111-118.
- [5] 王碧琴. 不同固化物对中华猕猴桃胚乳试管苗生根的影响[J]. 江西林业科技, 1997(4): 12.
- [6] Tanaka M, Yoneyama M, Minami T, Noguchi K. Micropropagation of phalaenopsis by using synthetic seeds in film culture vessels[M]. UK Glasgow: HMSO Publications Centre, 1993.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 王玉军. 简化植物组培快繁技术体系的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2000, 6(1): 10-11.
- [10] 何川生, 王晓云, 雷永和, 等. 烟草快速繁殖及培养的研究[J]. 云南农业大学学报, 1998, 13(4): 392-395.
- [11] Kozai T. 国外设施园艺环境控制新技术的发展[J]. 农业工程学报, 1988(1): 80-91.
- [12] Desjardins Y. Photosynthesis in vitro on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems[J]. Acta Hortic, 1995, 393: 45-61.
- [13] 丁永前, 丁为民, 崔瑾, 等. 组培环境 CO₂ 增施监控系统的设计与实验[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 96-98.
- [14] 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.
- [15] Kozai T. Internodal stem segments in vitro[J]. Acta Hortic, 1995, 393: 135-142.
- [16] 何松林, 杨秋生, 孔德政, 等. 施 CO₂ 时培养基浓度对文心兰试管苗生长的影响[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 745-747.
- [17] Serret M D, Trillas M I, Matas J, Araus J L. Development and photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jadinoides* plantlets during micropropagation[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 45(1): 1-16.
- [18] 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.

- [19] Kozai T, Hiroshi O, Fujiwara K. Photosynthetic characteristics of cymbidium plantlet in vitro [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 22:205-211.
- [20] Niu G, Kozai T. Simulation of the growth of potato plantlets cultured photoautotrophically in vitro [J]. *Trans. ASAE*, 1997, 40: 255-260.
- [21] Kozai T, Chieri, BYoung R J. Enviromental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 51:49-56.
- [22] 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.
- [23] Tanaka M, Takamura T, Watanbe H, Endo M, Yanagi T, Okamoto K. In vitro growth of cymbidium plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes(LEDs) [J]. *Journal of Horticultural Science*, 1987, 112:588-592.
- [24] Appelgren M. Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium* in vitro [J]. *Science Horticulturae*, 1991, 45:345-351.
- [25] 赵德修,李茂寅,邢建民,等. 光质、光强和光期对水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响 [J]. *植物生理学报*, 1999, 25(2):127-132.
- [26] Saebo A, Krekling T, Appelgren 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.
- [27] 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.
- [28] Eneminger P A, Schaefer E. Blue and ultraviolet-B light photoreceptors in parsley cells [J]. *Photochem Photobiol*, 1992, 55: 437-447.
- [29] 焦海华,铁 军. 不同光质对一品红幼茎愈伤组织的诱导和器官分化影响的研究 [J]. *内蒙古师范大学学报自然科学(汉文)版*, 2003, 32(2):168-170.
- [30] Bula R J, Morrow R C. Light emitting diodes as a radiation source for plants[J]. *Hortscience*, 1991, 26:203-205.
- [31] Kozai T, Kino S, Jeong B R, Hayashi M, Kinowaki M, Ochiai M, Mori K. A sideward lighting system using diffusive optical fibers for production of vigorous micropropogated plantlets [J]. *Acta Hotic*, 1992, 319:237-242.
- [32] Hayashi M, Lee H C, Kozai T, Tateno M, Fujiwara K. Effects of the lighting cycle on the growth and morphology of potato plantlets in vitro under photomixotrophic culture conditions [J]. *Environ Control Biology*, 1993, 31(3):161-166.
- [33] Hayashi M, Kozai T, Ochiai M. Effect of the sideways lighting on the growth and morphology of potato plantlets in vitro [J]. *Society of High Technology in Agriculture*, 1994, 5(6):1-7.
- [34] Kitaya Y, Fukuda O, Kozai T, Kirdmanee C. Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets in vitro [J]. *Science Horticulture*, 1995, 62:15-24.
- [35] Fujiwara K, Aitken-christie J, Kozai T. Water potential of radiata pine shoots cultures in vitro under different relative humidities [J]. *Plant Tissue Cult Lett*, 1993, 10:144-150.
- [36] Gribble K, Sarafis V, Nailon J, Holford P, Uwins P. Enviromental scan electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) cultured in vitro [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(10):771-776.
- [37] Smith E F, Gribaudo I, Roberts A V, Mottley J. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated Grapevine [J]. *Hortscience*, 1992, 27:111-113.
- [38] 陈龙清,李 春. 日本早小菊的组织培养及玻璃苗防治 [J]. *华中农业大学学报*, 1995(14):272-274.
- [39] Kozai T, Sekimoto K. Effects of the number of air exchanges per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessle and the growth of strawberry plantlets in vitro [J]. *Environ Control in Biol*, 1998, 26:21-29.
- [40] 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.
- [41] Kozai T, Fujiwara K, Watanabe I. Fundamental studies of environments in plant tissue culture vessels [J]. *Agric Meteorol*, 1986, 42:119-27.
- [42] 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.
- [43] Kozai Y, Chieri, 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.
- [44] Kozai T, Kitaya Y, Kutota C. *Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation Volume 2* [M]. Japan: Chiba University Press, 1995. 591-947.