

# 加速组培小植株生长无糖培养技术

李宗菊

桂明英

(云南大学生命科学与化学学院·昆明) (中华全国供销总社昆明食用菌研究所)

房亚南 李文庚 邓纪新

(云南省农科院生物技术研究所·昆明)

## 第一作者简介 李宗菊

女, 1967年生, 云南人。

1987年毕业于西南农业大

学园艺系, 1990年于该校食

品系硕士研究生毕业, 同年

8月, 分配云南省农科院生

物技术研究所从事植物组织

培养工作。先后参与或主持

过多个课题, 曾对满天星、情

人草、勿忘我等鲜切花及魔

芋、香蕉等经济作物的组培

快繁进行深入研究及规模化生产。发表论文10余篇。

**摘要** 发展较低成本、自动化规模化生产组培小植株的繁殖体系, 必将在农业和森林中变得越来越重要。过去一直认为组培小植株几乎没有光合能力。因此, 在培养基中必须加入糖来提供碳源, 以保证小植株异养的需要。然而, 最近发现, 如培养瓶中 $\text{CO}_2$ 浓度、光照环境因素等被适当控制, 组培小植株仍然具有光合能力, 可以发展自养。在传统的密闭培养瓶中, 光期的 $\text{CO}_2$ 浓度常低于 $100(10^{-6})$ 且在大多数情况下小植株不能发展正碳平衡。据实验, 在无糖的培养基中, 在一个高光合电子流下富集 $\text{CO}_2$ 可以促进组培小植株生长, 且几乎没有细菌或真菌污染。因此, 可使用大培养瓶以降低劳动力消耗, 并采用自动化大规模生产系统。

**关键词** 无糖 组织培养

植物组培的应用范围正在逐步扩大, 由于组培小植株成本极高且应用主要限于一些园艺植物。为扩大其在农业、森林等植物上应用, 则必须发展一种新的适用于离体培养小植株的自动化规模繁殖体系, 以使生产成本降低70%~80%。无糖微培养生长模式就是

这种系统最新贡献。植物体生长方式有两种: 一是植物体靠光合作用进行自然生长(自养); 二是植物体靠培养基中的糖进行生长(异养)。因此, 传统的组培中都必须加糖, 为小植株提供碳源或能源。一般的组培苗生长不好, 究其原因, 主要是: 由于小植株长期靠培养基中的糖进行异养而导致叶片表层结构发育差, 气孔开闭功能差, 叶片小, 叶绿素含量降低, 继而使小植株丧失了光合作用的能力, 或者由于环境条件抑制了其进行光合作用。因此, 小植株表现为生长速度慢、徒长、发育差、生理形态异常、个体差异大、变异性增加、成活率降低。无糖培养的优点是: 促进光合作用, 促进自养生长; 减少污染; 减少植株生理形态方面障碍; 可省去驯化发根阶段; 对激素、维生素及其它有机营养的用量可减少到最小限度(在无糖培养中, 即使无生长素, 也能发根较好); 移栽入温室, 成活率高, 由于污染少, 可改用大容器培养, 用机器人进行自动化生产, 及用计算机进行控制等; 由于不用琼脂, 可对根际环境进行调节; 同时可用含无机营养的水培代替传统的组培, 采用较小型的营养液栽培体系。因此, 建立一种新型的含有培养箱、气体流动室、培养溶液室的无糖培养系统是植物组织培养的新途径。

## 1 组培小植株的生产进程

图1是组培小植株生产的程序示意图。外植体是由一些植株上分离的组织或器官切块; 愈伤组织为一些活性的块状非器官组织; 小植株是一种小的无性繁殖植株; 驯化是使小植株从瓶内转移到瓶外, 逐渐适应外界环境的一些程序。从图可看出, 一般要花费几星期或几个月来增殖小植株。在增殖期间, 小植株由于细菌或真菌污染造成的损失时有发生, 而且, 在移植到大田环境前, 还需几星期来进行驯化, 在驯化过程中约有20%~50%的小植株由于表1所列原因受到损失。

## 2 降低生产成本

组培小植株的高生产成本的主要原因概述于表

稿件修回日期: 1998-06-28

2. 降低成本的可能途径概述于表 3。既使在培养基中  
加入较多的糖, 小植株在瓶内生长仍比瓶外慢。另外,

异养、兼养到自养, 也常发生戏剧性的变化, 并引起小  
植株严重的生理性破坏。另外, 在这些阶段, 还可能导  
致小植株较低的生长率及存活率。

表 2 导致组培小植株生产成本高的主要因素

- A 需要几周或几个月的时间来完成小植株的增殖准备和驯化
- B 在增殖、准备阶段, 污染造成的损失不可能消除
- C 在驯化阶段存活率不高
- D 总的生产成本中, 劳动力占 60% ~ 70%
- E 对市场需求预测不足, 过量生产或生产不足时有可能发生
- F 能量消耗如: 光照、空调、消毒等可能是高的
- J 基本材料和设备的消耗如: 糖、琼脂、培养瓶、透气膜等值得引起注意
- H 因外源激素及不正常的环境因素等, 突变时有可能发生

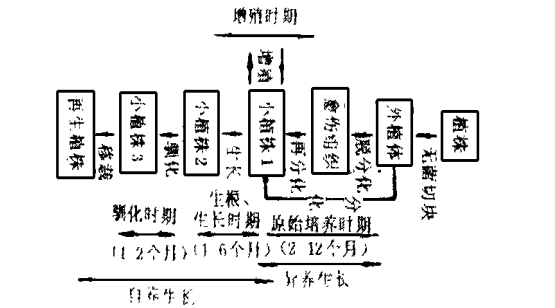
表 3 降低组培小植株生产成本的方法

- A 在增殖和准备阶段, 通过控制环境因素以促进组培小植株的自养, 并可减少生理障碍
- B 在增殖、驯化阶段, 通过应用组培机器人来进行选材、切取及接种等, 以降低劳动量
- C 降低能源的消耗, 对能源进行循环使用
- D 改进培养室、培养瓶及驯化室的设计和操作系统
- E 改用计算机控制, 进行大容器培养
- F 引进新材料、人造物质、灯等

4 小植株的无糖培养(自养)

无糖培养主要是提高光合作用, 提高自养生长能力。因此, 环境条件(CO<sub>2</sub> 浓度及光照强度)的改变对无糖培养的成功与否非常关键。离体培养的小植株仍然含有叶绿体, 在环境条件如: CO<sub>2</sub> 浓度及光强被适当控制时, 培养瓶内的小植株仍然也可以象瓶外小植株一样, 通过促进光合作用而发展自养。但是在相对密闭的培养瓶中 CO<sub>2</sub> 浓度很低, 通常小于大气中的 CO<sub>2</sub> 浓度(350(10<sup>-6</sup>)), 这时小植株不能吸收 CO<sub>2</sub>, 光合作用被抑制。一般利用透气膜可使 CO<sub>2</sub> 通过透气孔进入, 使容器中 CO<sub>2</sub> 浓度升高(可提高到 200 ~ 250 (10<sup>-6</sup>)). 但这种情况下 CO<sub>2</sub> 仍很不足, 如把瓶内 CO<sub>2</sub> 提高到 350(10<sup>-6</sup>)或更高, 就可促进小苗生长。因此, 在提高 CO<sub>2</sub> 浓度时, 配合光照强度的增加, 可以促进小苗生长。但一般当 CO<sub>2</sub> 浓度在 350(10<sup>-6</sup>)以上时, 光照强度的增加非常明显地看出对苗的影响。

表 4 及表 5 分别为非 CO<sub>2</sub> 富集及 CO<sub>2</sub> 富集即瓶外的 CO<sub>2</sub> 浓度维持于 1000 ~ 1500(10<sup>-6</sup>)水平, 这时瓶内外的 CO<sub>2</sub> 通过气体透过的同时进行自然交换, 这样瓶内的 CO<sub>2</sub> 浓度接近于 400 ~ 900(10<sup>-6</sup>)条件下, 增加光强(强光用三根荧光灯管, 垫高 10cm)。当培养基中



组织培养生产小植株程序图

表 1 驯化阶段小植株存活率和生长率的可能原因

- (1)组培小植株光合率低
- (2)不完全自养
- (3)薄的角质层及不正常的气孔功能导致高的蒸腾率
- (4)不完全生根
- (5)有生理障碍如: 玻璃化等

糖在瓶中最可能引起污染。因此, 在生产中必须使用小的密闭玻璃瓶以减少污染的快速扩散, 而这些小的密闭玻璃瓶要求大量的劳动强度, 难以自动化, 有时还会引起小植株的生理障碍。即使在培养基中有糖, 小植株为什么依然生长如此慢? 很多人认为, 这是因为瓶内小植株的光合能力低或者无光合能力。其实, 并非完全如此。

3 组培小植株的自养、兼养及异养

叶中含叶绿素的高等植物通常通过光合作用依靠光能进行自养生长。也即是高等植物利用大气中 CO<sub>2</sub> 作为碳源进行生长。而一些植物及所有的动物、微生物通过异养(吸收有机物质作为其碳源)进行生长。当一种植物既可从大气中的 CO<sub>2</sub> 得到碳源, 也可从有机物质中得到碳源时, 我们说这种植物属于兼养生长。据资料, 组培的外植体或小植株即使含有叶绿素, 也被认为其几乎没有光合能力。因此, 在培养基中必须加入糖(大多用蔗糖, 有时也用葡萄糖或果糖)作为碳源维持小植株生长, 这时小植株靠异养或兼养进行生长。有时为加速组培小植株的异养生长, 常在黑暗条件下, 将小植株放入含糖的液体培养基中, 并振动或旋转。这样, 糖被小植株吸收, 小植株的生长得到促进。即使如此, 在驯化及以后的各阶段, 高等植物小植株不得不靠自养生长, 如图 1 所示。很明显, 这是因为还没有任何人仍然在土壤中继续促进小植株的异养或兼养生长。在很多情况下, 伴随着环境因素的戏剧性变化, 从

蔗糖浓度为 0%、1%、3% 时满天星小植株的生长情况, 见表 4、表 5。

表 4 非 CO<sub>2</sub> 富集时强光下不同糖浓度小植株的生长情况

| 处理                   | 处理后的天数 | 植株高 (cm) | 叶数 | 鲜重 (mg) | 干重 (mg) | 苗生长状况  |
|----------------------|--------|----------|----|---------|---------|--------|
| 0% <sub>s</sub> (MS) | 15     | 2.0      | 4  | 78.3    | 9.3     | 苗黄绿、细弱 |
|                      | 30     | 3.8      | 9  | 135.8   | 16.3    | 同上     |
| 1% <sub>s</sub> (MS) | 15     | 2.7      | 6  | 86.7    | 10.4    | 苗浓绿、稍瘦 |
|                      | 30     | 6.1      | 11 | 253.5   | 30.4    | 同上     |
| 3% <sub>s</sub> (MS) | 15     | 3.5      | 8  | 96.2    | 11.5    | 苗浓绿、健壮 |
|                      | 30     | 6.8      | 12 | 291.8   | 35.0    | 同上     |
| 0% <sub>s</sub> 水培 * | 15     | 2.3      | 5  | 79.1    | 9.4     | 苗黄绿、细弱 |
|                      | 30     | 3.9      | 9  | 139.3   | 16.7    | 同上     |

\* 水培采用 Hogland 营养液

表 5 CO<sub>2</sub> 富集时强光下不同糖浓度小植株的生长情况

| 处理                   | 处理后的天数 | 植株高 (cm) | 叶数 | 鲜重 (mg) | 干重 (mg) | 苗生长状况  |
|----------------------|--------|----------|----|---------|---------|--------|
| 0% <sub>s</sub> (MS) | 15     | 4.4      | 9  | 100.0   | 12.0    | 苗浓绿、健壮 |
|                      | 30     | 6.8      | 13 | 299.8   | 35.9    | 同上     |
| 1% <sub>s</sub> (MS) | 15     | 5.0      | 9  | 102.0   | 12.2    | 苗浓绿、健壮 |
|                      | 30     | 7.1      | 14 | 305.9   | 36.8    | 同上     |
| 3% <sub>s</sub> (MS) | 15     | 4.6      | 8  | 101.0   | 12.1    | 苗浓绿、健壮 |
|                      | 30     | 7.0      | 14 | 304.5   | 36.5    | 同上     |
| 0% <sub>s</sub> 水培   | 15     | 4.5      | 9  | 102.8   | 12.3    | 苗浓绿、健壮 |
|                      | 30     | 6.9      | 15 | 301.5   | 36.2    | 同上     |

由表 4、表 5 可以看出, 在任何糖浓度(0%、1%、3%)下, CO<sub>2</sub> 富集处理的重量随时间增加的量比非 CO<sub>2</sub> 富集处理的大, 而无糖培养时, CO<sub>2</sub> 富集处理的增重效果最好。

参考文献

1 Fujiwara, k., Kozai, T., and Watanabe, I., 1988. Development of aphotoautotrophic tissueculture system for plantlets at rooting and acclimatization stages. Acta Horticulturae 230.

2 Kozai, T., M. Hayashi, Y. Hirose, T. Kodama, and I. Watanabe, 1987a. Environmental control or acclimatization of in vitro cultured Plantlets. (1) Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivations. J. Agr. Met., 42(4), 349—358.

3 Kozai, T. and Y. Iwanami, 1988b. Effects of CO<sub>2</sub> enrichments and sucrose concentration under high photon flux on the tissue cultured plantlet growth of camaron ( dianthus caryophyllus L.) during the preparation stage. J. Jap. Soc. for Hort. Sci. Vol. 57. 255—264

(地址: 昆明市北校场 邮编 650223)

山茶花粉萌发试验

魏 岩 雷庆峰

山茶( *Camellia japonica* L.) 有着重要观赏价值。用品种间杂交育种其茶花粉生活时间很短, 因此在控制授粉前进行花粉生命力测定是十分必要的。

1 试材和方法

1.1 试材 山茶花粉; 蔗糖; 硼酸。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 花粉培养采用不同浓度蔗糖和硼酸为主要成分, 组合设计出六种培养液, 即 5%蔗糖+10(10<sup>-6</sup>)硼酸、5%蔗糖+30(10<sup>-6</sup>)硼酸、5%蔗糖+50(10<sup>-6</sup>)硼酸、10%蔗糖+10(10<sup>-6</sup>)硼酸、10%蔗糖+30(10<sup>-6</sup>)硼酸、10%蔗糖+50(10<sup>-6</sup>)硼酸。将所配制的培养液分别滴入凹窝载玻片内, 每个培养液三次重复。将花粉播在培养液上, 再将载玻片放入带有浸入滤纸的培养皿内, 送入 22℃ 的恒温箱中。

1.2.2 观察的时间和方法 在花粉培养到 12、16、20h 时取样观察, 每个切片随机观察三个视野, 计算花粉萌发的百分率。

2 结果及分析

2.1 花粉萌发过程的观察 山茶花粉为近圆形。经 12h 的培养后, 首先从花粉粒上出现透明突起, 随着时间的推移, 形成花粉管, 到一定时间后, 长度不再增加。

2.2 方差分析结果

2.2.1 原始数据经整理后见表 1。

表 1 原始数据统计

| 蔗糖A                   | A1(蔗糖 5%) |        | A2(蔗糖 10%) |        | TBj    |       | B |
|-----------------------|-----------|--------|------------|--------|--------|-------|---|
| 硼酸B                   |           |        |            |        |        |       |   |
| B1                    | 30.92     |        | 28.07      |        |        |       |   |
| 10(10 <sup>-6</sup> ) | 44.17     | 117.65 | 33.81      | 103.55 | 221.20 | 36.87 |   |
| 硼酸                    | 42.56     |        | 41.67      |        |        |       |   |
| B2                    | 25.24     |        | 20.94      |        |        |       |   |
| 30(10 <sup>-6</sup> ) | 29.17     | 79.81  | 24.82      | 75.44  | 155.25 | 25.88 |   |
| 硼酸                    | 25.40     |        | 29.68      |        |        |       |   |
| B3                    | 21.98     |        | 23.41      |        |        |       |   |
| 50(10 <sup>-6</sup> ) | 17.90     | 63.06  | 27.04      | 70.65  | 133.71 | 22.29 |   |
| 硼酸                    | 23.18     |        | 20.20      |        |        |       |   |
| TAi                   | 260.52    |        | 249.64     |        | 510.16 |       |   |

2.2.2 经双因素方差分析见表 2。

表 2 双因素方差分析

| 变差来源 | 自由度 | 离差平方和   | 均方     | 均方比       | F2               |
|------|-----|---------|--------|-----------|------------------|
| A    | 1   | 6.53    | 6.53   | FA=0.28   | F0.01(2,14)=6.15 |
| B    | 2   | 692.66  | 346.33 | FB* =14.9 | F0.01(1,14)=8.86 |
| 剩余   | 14  | 324.17  | 23.15  | 6         |                  |
|      | 17  | 1023.55 |        |           |                  |

3 结论

由方差分析表 2 可见, 5%、10% 的两种蔗糖浓度培养液对山茶花粉萌发的影响差异不显著。而不同的硼酸浓度对山茶花粉的萌发有极其显著的影响。其结果 10(10<sup>-6</sup>) 浓度硼酸为最佳选择。

(沈阳苏家屯辽宁省林业学校 邮编 110101)