

铁皮石斛无糖组培技术初探

林小苹

(福建省漳州城市职业学院, 福建芗城 363000)

摘要: 以铁皮石斛原球茎诱导出的丛生苗为材料, 研究不同光照强度及 CO₂ 浓度条件下铁皮石斛试管苗无糖培养的生长及生理状况。结果表明, 保持 CO₂ 浓度 (350±50 mg/L) 不变, 光照强度的增加对其生长无明显促进作用, 无糖培养不如含糖培养; 保持光照强度 3500 Lx 不变, 加大 CO₂ 浓度, 对试管苗的光合作用有较大促进作用, 有些指标接近常规的含糖培养。

关键词: 铁皮石斛; 无糖培养; 光照强度; CO₂ 浓度

中图分类号: Q943.1;S567.2

文献标识码: A

文章编号: 1006—2327—(2018) 02—0006—05

植物无糖组织培养技术基础理论的建立已经成熟, 但商业化的应用尚未普及。目前许多试验都集中在研究和设计复杂的光自养微繁殖控制系统^[1,2], 但植物生长的复杂性往往会导致设施设计及使用的失败。因此, 本试验通过改变光强, 输入 CO₂ 等方式, 从增强植株自养能力的角度考虑, 对铁皮石斛无糖培养技术进行了初步探索, 力求使用最少的能源和原料培养生产高品质的植株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 原球茎分化出的丛生小苗为试验材料, 取长 2 cm 左右, 带 2~3 片叶, 茎干粗细相近的无根苗进行诱导生根培养。

1.2 方 法

1.2.1 培 养 方 法

培养基为 :a(常规培养基)MS+6-BA 3.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+NAA 0.6 mg/L+琼脂粉 6 g/L+糖 30g/L+香蕉 20g/L; b(无糖培养基)MS+6-BA 3.5 mg/L+KT 1.5 mg/L+NAA 0.6 mg/L+(不加维生素、有机物、糖)。pH 值均为 5.8, 培养温度为 24~26℃。

培养容器由储物箱改造而成, 具有可独立控制光照强度的照明系统。光照使用的光源系冷光源, 每天补充光照 18 h; CO₂ 供给方法: 钢瓶中的 CO₂ 通过流量计进入配气罐与空气混合成一定浓度的 CO₂, 启动真空泵使培养箱内形成负压, CO₂ 便进入培养箱内。输入 CO₂ 的时间与光照时间同步进行。每 2 天测一次培养容器内 CO₂ 的浓度并做相应的调整。

1.2.2 试 验 方 法

每瓶接 5 株材料, 每个处理 10 瓶, 重复 3 次。60 天后测定相关指标。

表 2 正交实验表 L4(2³)的设计

1.2.3 培 养 条 件 筛 选

根据查阅资料, 设计以下

正交因素水平表 (表 1)。

根据因素水平表设计正

交实验表 L4(2³) (表 2)。

水平	A 培养基	B 光照强度 (Lx)	C CO ₂ 浓度 (mg/L)
1	常规培养基	500	350±50
2	无糖培养基	3500	700±50

试验号	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

基金项目: 漳州市自然科学基金科技项目 (ZZ2013J12); 漳州城市职业学院科研项目 (YKY201504)。

作者简介: 林小苹 (1975 年-), 女, 福建莆田人, 副教授, 硕士。

1.2.4 数据分析

观察记录试管苗生长情况，使用 SPSS 2.0 软件和 Excel 软件进行数据统计分析。

1.2.4.1 形态指标：每个处理随机选取 3 瓶瓶苗，先测量植株的株高、最大叶宽、最大叶长、最大根长、根数、总鲜量及总干重。其中鲜重及干重为单位面积产量（单位 g/cm^2 ），测定方法如下：

每一瓶的瓶苗洗去培养基后吸干表面水分称重，获得重量（W），除以培养瓶瓶底面积（ 78.5 cm^2 ），即为总鲜重。然后将植株在 60°C 条件下恒温干燥 48 h 后称重，除以培养瓶瓶底面积（ 78.5 cm^2 ），即为总干重。

1.2.4.2 多糖含量测定方法：多糖含量测定方法参考林小苹等^[3]的方法，先用葡萄糖标准溶液绘制标准曲线方程式为 $C=144.85A - 0.3061(R^2= 0.9996)$ 。提取不同处理铁皮石斛叶中的多糖，按下式计算多糖的百分含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{C \times V1 \times V3 \times W}{V2 \times V4 \times 10000}$$

式中，V1 为样品定容体积（mL）；V2 为样品定容液取样体积（mL）；V3 为沉淀定容体积（mL）；V4 为测定用样液体积（mL）；W 为样品重量（g）；C 为标准曲线查得样品溶液中葡萄糖含量（ μg ）。

2 结果与分析

2.1 正交试验法测定铁皮石斛生长的影响因素

利用正交试验法设 4 个不同处理，通过生长量及多糖含量的极差分析，从表 3 可知，影响铁皮石斛无糖培养的 3 因素的主次顺序为 $A > C > B$ ，说明培养基是否添加有机物对铁皮石斛生长的影响最大，其次是 CO_2 浓度与光照强度。

表 3 极差分析结果（均值）

因子	总鲜重分析结果			总干重分析结果			多糖分析结果		
	水平 1	水平 2	极差 R	水平 1	水平 2	极差 R	水平 1	水平 2	极差 R
A 培养基	1.1355	0.5935	0.5420	0.4220	0.1725	0.2495	0.3595	0.1585	0.2010
B 光照强度	0.4760	0.8930	0.4170	0.2520	0.3425	0.0905	0.1860	0.3320	0.1460
C CO_2 浓度	0.6745	1.0545	0.3800	0.2115	0.3830	0.1715	0.1705	0.3475	0.1770

运用 Excel 软件对以上各指标数据进行单因素方差分析（表 4~表 6）结果显示 P 值均 < 0.01 ，说明不同处理对铁皮石斛试管苗的生长影响较大，均达到极显著差异水平。

2.2 不同光照强度和 CO_2 浓度对铁皮石斛无糖培养的影响

在确定影响铁皮石斛生长主要因素是培养基成分的基础上，设计试验，对光照强度和 CO_2 浓度 2 因素分别选择 4~6 个处理对铁皮石斛无糖培养进行研究。

2.2.1 不同光照强度下无糖培养方式对铁皮石斛生长的影响

以常规培养基培养为对照，设置了 500 Lx、3500 Lx、8000 Lx 三组不同光照强度，对无糖培养条件下铁皮石斛的生长情况进行比较。从表 7 可以看出，处理 1、处理 2、处理 3 的各项指标均显著大于相对应的处理 4、处理 5 和处理 6，说明在低 CO_2 浓度（ $350 \pm 50\text{ mg/L}$ ）下，无糖培养明显不如有糖培养，

表 4 鲜重方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	P-value	F crit
组间	1.322615	3	0.440872	541.1681	1.42E-09	4.066181
组内	0.006517	8	0.000815			
总计	1.329132	11				

表 5 干重方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	P-value	F crit
组间	0.298603	3	0.099534	388.7859	5.29E-09	4.066181
组内	0.002048	8	0.000256			
总计	0.300651	11				

提供糖等有机碳源有利于植物生长。

铁皮石斛叶色、健壮度等外观表现，不同处理表现出的性状与数据分析高度一致（见表 8）。处理 2 的优势明显，表现为植株健壮，叶色浓绿，茎粗壮，根粗壮色白；处理 1 的植株虽然长势稍逊于处理 2，但叶片变薄，数量增多，这是其在弱光环境下的一种适应性表现，通过增加叶片密度来增强对光能的利用。处理 3 叶小而厚，则是为降低光损伤而出现的叶片形态的改变。根生物量下降表明植物对地下部分的投入减少，将更多物质分配到地上部分以保持一定的光合产物的积累；处理 4 与处理 5 明显表现出生长受抑制现象，苗弱，叶色黄绿，根细弱，生根率下降；处理 6 的效果最差，部分植株出现死亡现象，成活苗更换有糖培养基继代培养，也无法复壮生根。

结合表 7 及图 1 分析，无论培养基中是否添加糖源，同一培养基条件下，随着光照强度的增加，各项指标均表现出先增加后降低的趋势。光照强度达到 8000Lx 时，出现明显的光抑制现象，各项指标均有显著下降，说明铁皮石斛试管苗对光照强度的耐受能力有限，单纯依靠提高光照强度来提高组培苗的光合能力是不可行了。这应该与其为阴生植物有关，太强的光照对其生长不利。

表 8 不同光照强度和糖含量对铁皮石斛生长性状的影响

处理	培养基	光照强度	生长性状
1	常规培养基	500 Lx	苗健壮，长势较好，株高较一致；茎绿色，纤细，节间长；叶较薄，数量多，浅绿色；全部生根，根粗壮色白
2	常规培养基	3500 Lx	苗健壮，长势好，株高较一致；茎粗壮，绿色，节间较短；叶色浓绿，肥厚；全部生根，根粗壮色白
3	常规培养基	8000 Lx	苗稍弱，长势较差，植株高低差异较大；茎绿色，纤细，节间较短；叶小而厚，叶缘呈红褐色；全部生根，根细弱色白
4	无糖培养基	500 Lx	苗稍弱，生长慢，叶色黄绿，70%生根，根细弱，浅褐色，部分植株死亡
5	无糖培养基	3500 Lx	苗稍弱，长势较差，叶色浅绿，茎叶均细长，全部长根，根细弱色白
6	无糖培养基	8000 Lx	苗细弱，生长慢，叶色黄绿，60%生根，根细弱，黄褐色，部分植株死亡

注：所有处理条件下 CO₂ 浓度保持在 350±50 mg/L。

2.2.2 不同 CO₂ 浓度下无糖培养方式对铁皮石斛生长的影响

以常规培养基培养为对照，设置了 350±50 mg/L、750±50 mg/L 二组不同 CO₂ 浓度，对无糖培养条件下铁皮石斛的生长情况进行比较。

表 6 多糖含量方差分析结果

差异源	SS	df	MS	F	P-value	F crit
组间	0.279961	3	0.09332	5748.99	1.14E-13	4.066181
组内	0.00013	8	1.62E-05			
总计	0.280091	11				

表 7 不同光照强度和糖浓度对铁皮石斛生长发

处理	培养基	光照强度	株高(cm)	叶长(cm)	叶宽(cm)	根长(cm)	根数(条)
1	常规培养基	500 Lx	5.298B	2.089B	0.865B	6.176B	7.374A
2	常规培养基	3500 Lx	5.568A	2.136A	0.904A	6.582A	7.773A
3	常规培养基	8000 Lx	4.503C	1.785C	0.721C	4.408C	6.169B
4	无糖培养基	500 Lx	2.119D	0.856E	0.346D	3.064D	5.981C
5	无糖培养基	3500 Lx	2.290D	0.992D	0.204E	3.117D	5.623CD
6	无糖培养基	8000 Lx	1.591E	0.634E	0.261E	2.562E	2.301E

注：所有处理条件下 CO₂ 浓度保持在 350±50 mg/L。

同列数据后不同大写字母表示在 0.01 水平上差异极显著。

由表 9 及图 2 可知,不同 CO₂ 浓度对铁皮石斛试管苗生长量及多糖含量等生理指标的影响有显著不同。在保持光照强度不变(3500Lx)的情况下,处理 2 大于处理 1,处理 4 大于处理 3,说明 CO₂ 浓度对铁皮石斛生长影响差异极显著,输入 CO₂ 对铁皮石斛生长有明显的促进作用;处理 1 不小于处理 4,说明在输入 CO₂ 的条件下,培养基中是否添加有机碳源,铁皮石斛生长效果差不多。以上结果表明在适宜的光照强度下,植物能以 CO₂ 代替糖作为碳源,由异养变为自养。增施 CO₂ 有利于提高组培苗的光合能力,有助于试管苗生长,促进多糖成分的积累。

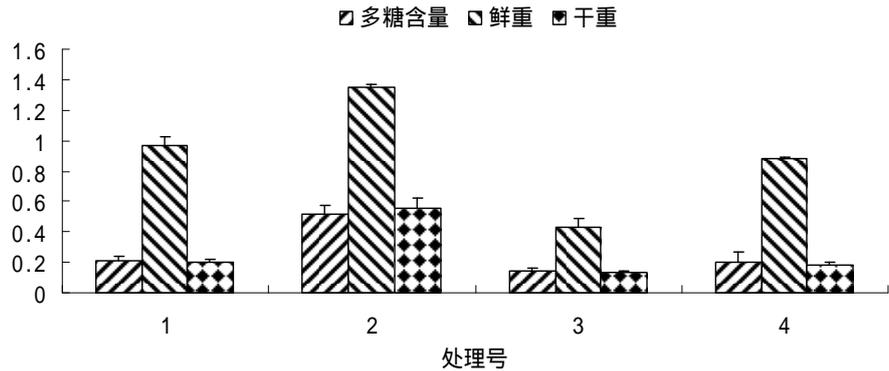


图 2 不同 CO₂ 浓度和糖浓度对铁皮石斛多糖含量及生长量的影响

表 9 不同 CO₂ 浓度和糖浓度对铁皮石斛生长发育的影响

处理	培养基	CO ₂ 浓度 (mg/L)	株高 (cm)	叶长 (cm)	叶宽 (cm)	根长 (cm)	根数 (条)
1	常规培养基	350±50	5.568B	2.136B	0.904B	6.582B	7.773B
2	常规培养基	750±50	6.725A	4.894A	1.016A	9.218A	8.912A
3	无糖培养基	350±50	2.290D	0.992C	0.204C	3.117D	5.623D
4	无糖培养基	750±50	5.373C	2.128B	0.816BC	6.301C	6.796C

注:所有处理条件下光照强度保持在 3500 Lx;同列数据后不同大写字母表示在 0.01 水平上差异极显著

铁皮石斛试管苗培养 60 天后,各处理的生长状态有显著差异(详见表 10)。在提供糖源的情况下,提高 CO₂ 浓度至 750±50 mg/L(处理 2),试管苗的光合自养能力得到促进,生长势具有明显的优势,叶色浓绿,茎粗壮,根系也生长健壮;处理 4 的 CO₂ 浓度虽然也补充到 750±50 mg/L,在相对密闭的培养瓶中,CO₂ 吸收利用还是比较有限的,无法与直接供能的糖类有机物相比,因此试管苗长势稍弱,叶色浅绿,茎叶细长,根细弱。

表 10 不同 CO₂ 浓度和糖含量对铁皮石斛生长性状的影响

处理	培养基	CO ₂ 浓度 (mg/L)	生长性状
1	常规培养基	350±50	苗健壮,长势好,株高较一致;茎粗壮,绿色,节间较短;叶色浓绿,肥厚;全部生根,根粗壮色白
2	常规培养基	750±50	苗健壮,长势好,株高较一致;茎粗壮,带紫色(铁锈色),节间较短;叶色浓绿,肥厚;全部生根,根粗壮色白
3	无糖培养基	350±50	苗细弱,生长慢,叶色黄绿,60%生根,根细弱,黄褐色,部分植株死亡
4	无糖培养基	750±50	苗稍弱,长势较差,叶色浅绿,茎叶均细长,全部长根,根色白,细弱

2.3 无糖培养的适用性

铁皮石斛工厂化生产的投入成本及获得利润的多少,与厂家在市场的竞争力密切相关。其生产成本主要涉及:厂房建设、设备购置、试剂药品、水电、人力成本等。扣除人力资源管理成本、销售成本等两者较一致的投入外,从设备的购置、试剂药品、水电费等方面进行比较分析,两者费用的差异见表 11。综合以上几个方面的分析,建立一个中等规模的铁皮石斛无糖培养工厂,第一年设备购置的前期投入成本比较高,但生产过程中的药品耗材及后期瓶苗成活率所需成本大幅降低。以五年为投资周期,年产 200 万瓶试管苗进行盈利预测分析,要到第 3 年才开始出现盈利情况。因此,厂家要熟知无糖组培技术的各

项操作环节,在保证种苗质量的前提下,进行技术创新,降低生产成本,提高产品竞争力,使利润达到最大化。

3 讨论

无糖培养主要通过促进植物自养能力的提高,减少植物形态结构发育差,生理功能弱等不利因素。因此,与光合作用有关的环境条件,如 CO₂ 浓度、光照强度等条件的改变对无糖培养的成功与否至关重要。本试验

中,在低光照强度(500 Lx)条件下,增加 CO₂ 浓度,对铁皮石斛生长效果影响不明显,而在较高光照强度(3500 Lx)条件下,是否增加 CO₂ 浓度对铁皮石斛生长效果有显著性差异。说明在提高 CO₂ 浓度时还要增强光照强度,否则铁皮石斛生长各项指标可能不进而退。

CO₂ 是植物进行光合作用的原料,目前大气中的 CO₂ 浓度(约 350 mg/L 左右)远远低于大部分植物的 CO₂ 饱和点,这是影响植物生长量的主要限制因子之一^[4]。本试验中,在同等的光照强度和 CO₂ 浓度下,铁皮石斛在无糖培养基中的生长状态比有糖培养基稍差些,说明在相对密闭的培养瓶中,CO₂ 吸收利用还是比较有限的,无法与直接供能的糖类有机物相比,如果无法满足植物对 CO₂ 的需求,无糖培养效果差,不可取。

无糖组织培养在相对密闭的培养装置进行,由于植物本身的消耗,CO₂ 浓度会越来越低,导致植物光合作用被抑制,需要人为输入 CO₂ 以维持一定的浓度。因此,在商业化运行中,CO₂ 供给方式和浓度的调控是关键技术之一。相关设施的成本的多少对生产成本有重大影响。从成本及污染率、后期移栽成活率等方面考虑,如果生产规模达到一定程度,还是无糖培养的效益高。

无糖培养技术对组培生产所起的作用已在非洲菊^[5]、彩色马蹄莲^[6]、满天星^[7]等花卉植物产业化生产中得到肯定,但目前尚未得到大规模推广。与一般的组培技术相比,它对外植体的要求较高,如茎叶要粗壮,需要具有进行光自生长的叶面积等等。同时,微环境控制方面需要专业的技术人员,CO₂ 及光照设施的前期投入和生产中电、气的消耗等均是一笔不小的投入。因此,要成功利用无糖组培技术,必须在充分认识和掌握其理论与技术操作后,才能取得最佳培养效果。

参考文献

[1]马明建,马娜,宋越冬,等.大空间植物无糖组织培养装置温湿度变化规律[J].农机化研究,2012,(6):130-133.
 [2]曲英华,周炜,李艳,等.无糖培养条件下大型组培箱内 CO₂ 变化规律及对组培苗的影响[J].农业工程学报,2007,(8):216-221.
 [3]林小苹,赖钟雄.不同光质条件下铁皮石斛多糖含量与磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因表达变化[J].热带作物学报,2017,38(5):1-7.
 [4]GENTHONC,6-BARNOLAJM,RAYNAUDD.Vostok icecore. Climate response to CO₂ and orbit forcing changes over the last climatic cycle [J].Nature,1987,(329):414-418.
 [5]肖玉兰,张立力,张光怡.非洲菊无糖组织培养技术的应用研究[J].园艺学报,1998,25(4):408-410.
 [6]屈云慧,熊丽,张素芳,等.彩色马蹄莲组织苗无糖生根培养的环境控制[J].植物遗传资源学报,2004,5(2):166-169.
 [7]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.

序号	列项	无糖培养	有糖培养
1	CO ₂ 及光照补充设施的 前期投入	根据设施的智能化程度千元到几十万不等	0
2	CO ₂ 混合、通入及补充光照所需的电、气的消耗	48000 元/年	0
3	培养基基本材料、糖、有机物、维生素等	栽培基质蛭石、珍珠岩等(10 元/500g)	糖 4.20 元/500g 琼脂粉 140 元/500g 有机物及维生素 500 元/套 植物激素 1000 元/套
4	污染率、驯化阶段的死亡率造成的损失	比有糖培养低 40%	高