

观赏植物无糖组培快繁的研究现状及展望

蔡 汉^{1,2}, 张惠英³, 季卫忠⁴, 赵梁军¹, 谢玲玲²

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 扬州大学农学院, 江苏扬州 225009;

3. 苏州花园城市绿地有限公司, 江苏太仓 215400; 4. 太仓港港口开发区管委会, 江苏太仓 215400)

关键词: 观赏植物; 无糖; 组织培养

中图分类号: S068 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)06-0277-05

20世纪30年代以来,组织培养技术得到了不断的发展和完善,但真正能够用于商业化生产的观赏植物组培苗的种类却很少。究其原因,主要是组培苗的培养及驯化周期长、污染率高、移栽成活率低、生产成本低^[1-2]。日本千叶大学的 Kozai 等针对这些问题研发了无糖组培技术,给予植物组培技术一种全新概念。无糖组培快繁也称光独立组培快繁,是在培养基不加糖分的基础上,采用环境控制手段,通过对 CO₂、光照、温度、湿度等环境因子的调节,使组培苗加强自身的光合作用,由异养型转变为自养型,从而有效地降低生产的成本,达到快速繁殖优质种苗目的^[3-5]。本文综述了该技术在观赏植物上的研究现状及其展望。

1 观赏植物无糖组培快繁的意义

迄今为止已开展无糖组培快繁研究的观赏植物主要有:兰花(*Cymbidium* spp.)、大花蕙兰(*Cymbidium hybridus*)、菊花(*Dendranthema morifolium*)、香石竹(*Dianthus caryophyllus*)、满天星(*Gypsophila elegans*)、非洲菊(*Gerbera jamesonii*)、勿忘我(*Limonium sinuata*)、彩色马蹄莲(*Zantedeschia hybrida*)、洋桔梗(*Eustoma grandiflora*)、红掌(*Anthurium andraeanum*)、虎眼万年青(*Ornithogalum caudatum*)、绿巨人(*Spathiphyllum floribundum*)、玫瑰(*Rosa rugosa*)、马占相思(*Acacia mangium*)、桉树(*Eucalyptus* spp.)、

印度紫丁香(*Azadirachta indica*)、毛白杨(*Populus tomentosa*)、泡桐(*Paulownia fortunei*)、辐射松(*Pinus radiata*)等。对这些植物的研究表明,该技术可有效地降低组培苗的污染率,减少组培苗的玻璃化现象,促进组培苗的生长发育,是规模化、高效率生产组培苗的一条新途径。

1.1 降低组培苗的污染率

传统组培苗生长所依赖的碳源通常为糖,由于糖也是微生物的营养物质,一旦培养基被污染,微生物就会与组培苗争夺养分,导致组培苗因缺少养分而死亡。而无糖组培是在开放系统中进行的,组培苗可通过加强自身的光合作用合成其生长发育所需的有机物质,故不需要添加糖,这样微生物就失去了赖以生存的营养物质,组培苗污染率就会显著降低。

1.2 减少组培苗的玻璃化现象

传统组培苗常会发生玻璃化现象,呈现出各种生理或形态上的异常。而无糖组培技术可较好地改善组培环境中的通气状态及光照条件,显著降低组培苗的玻璃化现象。

1.3 促进组培苗的生长发育

传统组培苗多生长在小而密闭的组培容器内,常因不能进行光合作用而被迫进入异养状态。而无糖组培时,由于培养基中未加糖而污染率较低,因此可采用大而开放的组培容器,这为组培苗生长提供了良好的 CO₂ 浓度、光照和温湿度条件,增强了组培苗的光合自养能力,促进了组培苗的生长发育。

1.4 实现组培苗的规模化生产

传统组培苗的生长受诸多因素干扰,常造成个体间生长差异大,且繁殖周期不稳定,不利于规模化和商品化生产。而无糖组培技术既简化了消毒、定植和驯化操作的程序,又有利于提高生产效率,降低了劳动力成本。同时也可采用能够实施自动化环境监测和控制的大型组培设施,实现机器人操作和生

收稿日期:2006-07-20

基金项目:国家“十五”科技攻关计划项目(编号:2004BA521B02)。

作者简介:蔡 汉(1974—),男,江苏扬州人,在读博士生,讲师,主要从事园林植物栽培生理研究。Tel:(0514)2238026; E-mail: yzlxcai@126.com。通讯作者:赵梁军,教授,博士生导师,主要从事园林植物生理生态研究。Tel:(010)62733315; E-mail: zhaolj5073@sina.com。

产管理自动化,更好地实现组培苗的规模化生产。

2 观赏植物无糖组培技术的研究

无糖组培主要是为了促进组培苗的光合作用,增强组培苗的自养生长能力。因此该技术研究的重点是如何通过增施 CO₂、调节光环境、改善培养基质和调整培养基成分等措施,达到促进组培苗光合作用,增强其自养能力的目的。

2.1 CO₂ 的增施技术

2.2.1 CO₂ 浓度对组培苗生长发育的影响 CO₂ 是无糖组培系统的关键因素,且易于操作控制,所以 CO₂ 浓度与组培苗生长发育关系方面的研究很多。对菊花、兰花、甘薯和一些热带观赏植物的研究表明,对无糖组培苗进行 CO₂ 富集处理后,其生长发育速度明显优于有糖培养的组培苗^[6-9]。该领域研究的一个重点是 CO₂ 对无糖组培苗光合作用的影响。研究表明,增施 CO₂ 可显著提高香石竹无糖组培苗的鲜重、干重和叶绿素含量^[10]。在高 CO₂ 浓度条件下,桉树无糖组培苗的栅栏层厚度及指数、气孔密度、净光合速率和移栽成活率等指标均明显提高,且植株未经特殊驯化即可移栽^[11-12]。茼蒿属 (*Chrysanthemum*) 在无糖组培时,提高环境 CO₂ 浓度至 20 ml/L 后,叶绿素和类胡萝卜素的含量、叶绿素 a 和叶绿素 b 的比值、净光合速率、1,5-二磷酸核酮糖还原酶和氧化酶的比值均有所提高,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的活性也得到增强^[13]。地钱 (*Marchanteaceae polymorpha*) 的无糖组培苗在高浓度 CO₂ 环境下,叶绿体形态发育良好,细胞中叶绿体数量比低浓度 CO₂ 培养时多 70%,但细胞中叶绿素含量差别不显著^[14]。

2.2.2 CO₂ 增施方式对组培苗生长发育的影响

仅靠容器内的 CO₂ 远不能满足无糖组培苗对碳源的要求,还需要人为增施 CO₂,增施的方法主要有自然换气和强制换气两种。

2.2.2.1 自然换气 自然换气是指通过容器的微小缝隙或透气孔来进行容器内外气体的交换。目前的研究主要集中于不同的换气方法对组培苗生长的影响。如肖玉兰等以非洲菊为试材,研究了增强光照和增施 CO₂ 条件下容器封口膜孔数对无糖组培苗生长的影响,结果表明 2 孔通气面积最有利于组培苗生长,植株健壮且生长茂盛,干重、生根率、叶面积、1.5 cm² 以上的叶片数均高于无孔和 4 孔的^[15]。李宗菊等以满天星为试材,利用透气膜增施 CO₂,结

果表明在高光合光量子流下富集 CO₂ 可有效地促进无糖组培苗的生长,且几乎没有发生微生物的污染^[16]。廖飞雄等研究了容器封口膜密封和带滤菌膜透气对非洲菊组培苗的影响,结果表明用带滤菌膜的可透气封口膜能明显提高组培苗的鲜重增量和干重率,促进根系的形成和生长,提高组培苗的存活力和质量,延长其留瓶时间^[17]。由此可见,适当的自然换气有利于组培苗的生长,所以近年来具通气滤膜孔的封口膜和可调通气量的培养瓶盖已在组培苗生产上大量应用。自然换气的主要问题是组培苗的生长差异较大,这是由于气体流动、封口方式、封口材料以及外部气体环境的不同,尤其是由于植株在培养期间代谢活动的不同,导致了容器内 CO₂ 和其他气体的浓度差异可能较大。

2.2.2.2 强制换气 强制换气即人为地通入 CO₂,利用机械设施进行容器内外气体的交换。强制换气可在大型培养箱或组培室内进行,CO₂ 和其他气体的浓度可根据植物的生长阶段进行调节。研究表明强制换气比自然换气更利于组培苗的生长^[18]。如桉树无糖组培苗在强制通气条件下的鲜重、干重、净光合速率和移栽成活率均高于自然换气方式的^[19]。兰花等观赏植物的无糖组培研究也表明了类似的结论^[20]。

2.2 光环境的调节

光环境是影响无糖组培苗光合作用和生长的内在因素^[21],包括光量、光质和光周期 3 个因子。

光量可通过 PPFD 来衡量,高 PPFD 可显著促进无糖组培苗的生长。如玫瑰无糖组培苗进行高 PPFD 处理后,净光合速率和生长量都显著提高^[22];生长在高光照强度条件下的香石竹无糖组培苗,其鲜重、干重和叶面积也都明显增加^[10]。

光质对组培苗的影响主要表现为不同波长的光对光合作用的影响。如唐菖蒲组培苗在蓝光下较白光和红光下生长旺盛,根系粗壮,侧芽多^[23];甜叶菊在红光下较在白光下生长快、侧芽多^[24]。

光周期也会影响组培苗的生长,如 4 h 光期/2 h 暗期的光周期处理的桃花组培苗生长优于 16 h 光期/8 h 暗期处理^[25]。

须要注意的是,要实现无糖组培苗的自养生长,必须同时增加 CO₂ 浓度和光照强度,否则植株将无法进行有效的自养生长^[10,26]。如非洲菊在光照 8 000 lx + CO₂ 1.98 ml/L 的条件下,组培苗生根快而健壮,叶面积大,干物质含量高^[15]。

2.3 培养基质的改善

传统组培中常以琼脂、卡那胶等凝胶状物质作为培养基质(支持物质),在此基质上长出的组培苗的根系常瘦小而脆弱,移栽时易受伤。而无糖组培则常采用多孔的无机材料如蛭石、塑料泡沫、珍珠岩、石棉、陶棉、纤维素等作为培养基质,这些基质具有孔隙度高、透气性好、含氧量高的特点,故能显著地促进组培苗根系的发育,使组培苗具有较高的生根率;而且这些材料价格低廉,可以大大降低生产成本^[27]。Kirdmanee 等分别以琼脂、塑料网、卡那胶和蛭石为培养基质进行桉树无糖组培,证明组培苗的栅栏层指数、净光合速率和移栽成活率均为蛭石的组培苗最高,而最差的是用琼脂培养的组培苗^[28]。

2.4 培养基成分的调整

光合作用的强弱在一定程度上取决于组培苗叶绿素含量,而谷氨酸是合成叶绿素的起始物质,向无糖培养基中加入谷氨酸可促进叶绿素的生物合成,加强植株的光合作用,从而增强其自养能力。如满

天星在无糖组培条件下,谷氨酸的浓度在 1 ~ 10 mg/L 范围内随着浓度的增加,组培苗的干重、叶绿素含量、净光合率等均呈上升趋势^[16]。

3 观赏植物无糖组培生产系统的研究

传统组培容器内环境是相对不变的,且组培室内的可控因子(如光照、温湿度等)一般是相对固定的,因此多数情况下无需进行培养条件的调控。但在无糖组培时,为确保组培苗的健壮生长,必须进行培养容器内的 CO₂ 浓度、光照强度、温度和湿度的自动监测及综合调控。

国内外现已研究出几种无糖组培的生产系统模式,其中以 Kozai 等开发出的具有强制通风功能的大型组培设施最具代表性(图 1)^[29]。该系统能够较好地控制组培苗生长环境中的 PPFD、CO₂ 浓度和温湿度。此外 Kozai 等还研制出既能控制气体环境又能控制培养基化学成分的大型营养液组培设施(图 2)^[30]。

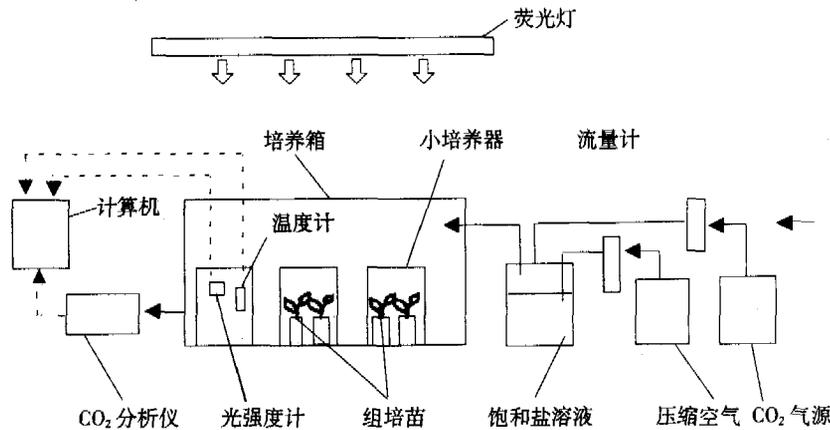


图 1 大型无糖组培生产系统示意图 (Kozai 等, 1987)

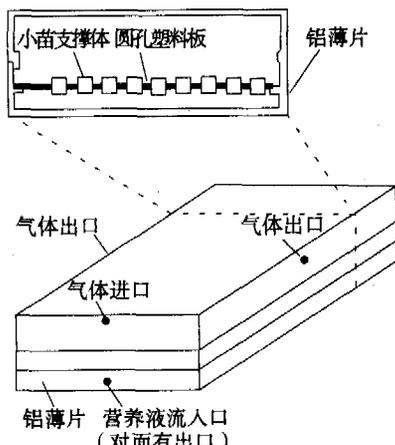


图 2 营养液组培设施示意图 (Kozai 等, 1998)

肖玉兰等研发出大型培养容器和 CO₂ 强制性供气系统,其装置分为固定式和移动式两种,主要包括培养架、培养容器、供气系统、光照系统、提高光能利用效率的系统、气体控制流量系统、CO₂ 浓度控制系统。无糖组培供气装置将纯 CO₂ 气体经消毒、干燥后,强制性输入培养容器内,输入容器内的 CO₂ 的气量和浓度均可控制。无糖组培箱可以自由组合,便于进行立体培养。该系统培养出的组培苗生长量成倍增长,可大大缩短培养周期^[31]。

丁永前等通过对 CO₂ 富集等环境因素对组培苗生长发育影响的研究,开发出 CO₂ 适时增施监控系统(图 3)。该系统能够有效地将 CO₂ 浓度控制在

设定的 0.8 ~ 1.2 ml/L 范围内,以满足组培苗光合作用的需要。该系统培养出的组培苗生长健壮、发育良好,光合自养能力显著增强,植株整体发育进程加快^[32]。

李传业等设计并开发了一套基于 PLC 的无糖组培微环境控制系统,其总体结构如图 4 所示。该系统以 PLC 为控制核心,采用定量供给的 CO₂ 增施控制策略,根据设定要求将固定量的高压、高纯度 CO₂ 直接供入组培箱,并可对组培箱内的湿度进行

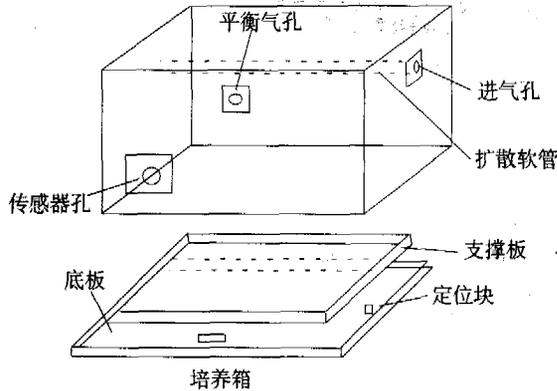


图 3 CO₂ 增施监控系统示意图(丁永前等,2002)

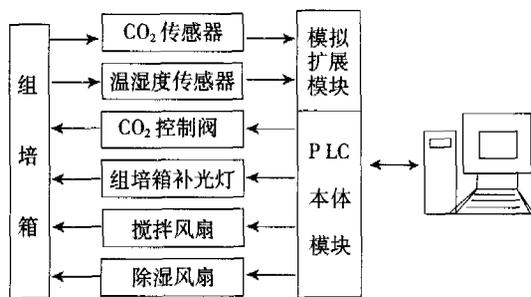


图 4 无糖组培微环境控制系统总体结构框图(李传业等,2004)

4 观赏植物无糖组培研究展望

观赏植物无糖组培是近年兴起的一项新技术,由于起步相对较晚,目前还存在诸多问题,尚有待进一步深入研究。

首先,要进一步扩大观赏植物无糖组培的研究对象。从总体看,无糖组培所涉及的观赏植物还较少,尤其是针对我国的特色花卉开展的研究工作更是鲜见报道。因此今后我国观赏植物无糖组培的研究应集中于发挥我国植物资源优势,开发我国传统名花及特色花卉的无糖组培快繁体系与配套设备,不断将新的植物和品种推向国内外市场。

其次,要深入研究无糖组培系统中的微生态环境及其调控方法。影响无糖组培苗生长发育的环境

调控。该系统可实现组培微环境 CO₂ 增施的长期自动控制,解决在增施 CO₂ 过程中可能将杂菌引入组培箱内的问题^[33]。

此外,何焰等研究了一种微型化、简便化的无糖组培控制系统,以独立箱体形式提供无糖组培微环境,由 CO₂ 供气系统、消毒系统、光照系统、温度控制系统、营养液循环系统、监测系统、加湿系统等部分组成^[34]。

因子很多,如温湿度、光环境、CO₂ 浓度、通气时间、气流量、培养基质、容器内空气的流通速度及组培苗密度等。目前有关无糖组培苗生长的最佳环境参数组合的研究报道很少,现有的研究工作主要是针对单个因子如 CO₂ 浓度或光环境开展的。大部分研究表明增施 CO₂ 和增加光强有利于充分发挥无糖组培苗的自养能力,促进组培苗的生长发育。但也有个别研究表明某些植物的有糖组培配合增施 CO₂ 和光强的调节似乎更有利于组培苗的生长,如 Adelberg(1999)发现糖浓度为 3%、1.5 ml/L CO₂ 浓度和 150 PPFD 时组培苗的生长发育最好。这反映了无糖组培微生态环境的研究尚未形成统一的观点和成熟的理论,深入开展这方面的研究是今后的重点。

此外,还要加快无糖组培的生产系统的研发。开发无糖组培技术的最终目的是要与产业化生产有机结合,真正向规模化、自动化、低成本、易操作且适合我国国情的产业化方向发展。然而现有的大型无糖组培生产系统均处在实验阶段,存在着诸多问题,建立完全成熟的商品化、规模化无糖组培生产系统尚需要大量的研究工作。因此加快我国无糖组培生产系统的研发是促进无糖组培技术产业化的当务之急。我国在国家“十五”科技攻关计划项目中,已将无糖组培列入重点内容,目前正在大花蕙兰、蝴蝶兰、月季等观赏植物上开展相关研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 曹效东, 曹孜义. 植物试管繁殖的成本与效益浅析[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(4): 284 - 291.
- [3] Kozai T. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photo - synthetic photon flux[J]. Acta Hort, 1988 (230): 121 - 127.
- [4] Kozai T, Fujiwara K, Kitaga Y. Modeling, measurement and control in plant tissue culture[J]. Acta Hort, 1993(343): 68 - 78.
- [5] Niu G, Kozai T. Simulation of CO₂ concentration in the culture vessel and growth plantlet in micropropagation[J]. Acta Hort, 1998(456): 37 - 43.
- [6] Nguyen Q T, Kozai T, Nguyen K L, et al. Photoautotrophic micropropagation of tropical plants[J]. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 1999, 36: 659 - 662.
- [7] Tanaka F, Watanabe Y, Shimada N. Effects of concentration on photorespiration in *Chrysanthemum morifolium* plantlets *in vitro* cultured photoautotrophically and photomixotrophically[J]. Plant Tissue Culture Letters, 1991, 8(2): 87 - 93.
- [8] 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.
- [9] Zobayed S M A, Afeen F, Kozai T, et al. Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation[J]. Acta Hort, 2000(530): 377 - 386.
- [10] Jeong B R, Yang C S, Lee E J. Photoautotrophic growth of *Dianthus caryophyllus* *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and CO₂ concentration[J]. Acta Hort, 1996(440): 611 - 615.
- [11] 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*; anatomical comparisons[J]. Acta Hort, 1995(393): 111 - 118.
- [12] Sha Valli Khan P S, Kozai T, Nguyen Q T, et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 71(2): 141 - 146.
- [13] Cristea V, Vecchia F Dalla, Rocca N L, et al. Developmental and photosynthetic of a photoautotrophic *Chrysthemum* culture[J]. Photosynthetica, 1999, 37(1): 53 - 59.
- [14] Bockers M, Capkova V, Ticha I, et al. Growth at high CO₂ affects the chloroplast number but not the photosynthetic efficiency of photoautotrophic *Marchantia polymorpha* culture cells[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 48: 103 - 110.
- [15] 肖玉兰, 张立力, 张光怡, 等. 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.
- [16] 李宗菊, 桂明英. 谷氨酸在无糖组织培养中的应用[J]. 西南农业学报, 1999, 12(3): 45 - 49.
- [17] 廖飞雄, 李 玲, 姚翠娟, 等. 无蔗糖培养和不同封口膜对非洲菊组培苗生长的影响[J]. 中国农学通报, 2004, 20(4): 211 - 214.
- [18] Nguyen Q T, Kozai T, Heo J, et al. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 66: 217 - 225.
- [19] Zobayed S M A, Afreen F, Kubota C, et al. Water control and survival of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation[J]. Annals of Botany, 2000, 86: 603 - 610.
- [20] Mitra A, Dey S, Sawarkar S K. Photoautotrophic *in vitro* multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO₂ enrichment[J]. Biologia Plantarum, 1998, 41(1): 145 - 148.
- [21] Desjardins Y. Factors affecting CO₂ fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1995, 1(1): 13 - 25.
- [22] Genoud - Gourichon C, Sallanon H, Coudert A. Effects of sucrose, agar, irradiance and concentration during the rooting phase on the acclimation of rose hybrida plantlets to *ex vitro* condition[J]. Photosynthetica, 1996, 32(2): 263 - 270.
- [23] 杨增海. 园艺植物组织培养学[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 1 - 3.
- [24] 张方丕. 植物组织培养在繁殖上的应用[J]. 上海: 上海教育出版社, 1985: 11 - 13.
- [25] 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.
- [26] Jeong B B, Fujiwara K, Kozai T. Environmental control and photoautotrophic micropropagation[J]. Horticultural Reviews, 1995, 17: 125 - 172.
- [27] 肖玉兰, 张光怡, 杨育华, 等. 植物无糖组培微繁殖规模化生产技术[C]//中国园艺学会. 中国园艺学会第九届学术年会论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 404 - 407.
- [28] Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material on growth, photosynthesis and water potential of *Eucalyptus* shoots/plantlets cultured photoautotrophically *in vitro* [J]. Environm Control Biol, 1995, 33: 133 - 141.
- [29] Kozai T, Iwanami Y, Fujiwara K. Environment control for mass propagation of tissue cultured plantlets. I. Effects of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage[J]. Plant Tiss Cult Lett, 1987(4): 22 - 26.
- [30] 古在丰树. 植物组织培养的新阶段[M]. 东京: 农山渔村文化协会, 1998: 72 - 115.
- [31] 肖玉兰, 钱 彪, 和树庄, 等. 植物光独立培养微繁殖供气装置: 中国, 00223772. 5[P] 2001 - 04 - 05.
- [32] 丁永前, 丁为民, 崔 瑾, 等. 组培环境 CO₂ 增施监控系统的设计与试验[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 96 - 98.
- [33] 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.
- [34] 何 焰, 戴雅奇, 梁方瑜, 等. 无糖组培微环境控制技术高新设备的研制与应用[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(12): 2460 - 2462.