



现代农业高新技术丛书

组培苗无菌检测 原理及技术

吴沿友 孙卫红 赵玉国 赵 宽 著



科学出版社

现代农业高新技术丛书

组培苗无菌检测原理及技术

**Principle and Technology of Sterile
Measurement on the Plantlets *in vitro***

吴沿友 孙卫红 赵玉国 赵 宽 著

By Wu Yanyou Sun Weihong

Zhao Yuguo Zhao Kuan et al.

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书系统研究了组培苗无菌检测的原理和技术。利用图像分析法在线检测组培苗的质量、根的长度及体积,研究动态检测组培苗及其根的动态生长过程;通过无菌动态检测组培苗的光合能力,分析激素及光对组培苗自养能力的影响;利用叶绿素荧光技术在线测定植物的叶绿素荧光参数,探讨无菌在线检测组培苗自养能力的方法;通过无菌在线检测不同培养条件下不同类型组培苗对蔗糖和氮素的消耗,探讨在线检测组培苗的蔗糖和无机氮的利用率的方法。研究结果可为工厂化育苗的生产环境、培养基配方的调控以及植物适应性的研究提供科学依据。

本书可作为大专院校、科研单位以及农林、园艺、花卉企业从事组织培养的专业人员、科研工作者和研究生的参考用书,也可作为大学本科生学习农业生物技术的辅导材料。

图书在版编目(CIP)数据

组培苗无菌检测原理及技术/吴沿友等著. —北京:科学出版社,2012
(现代农业高新技术丛书)

ISBN 978-7-03-034698-8

I. ①组… II. ①吴… III. ①植物组织-组织培养-检测 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 121885 号

责任编辑:王海光 矫天扬 贺窑青/责任校对:朱光兰

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

铭浩彩色印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年6月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2012年6月第一次印刷 印张:12 1/4 插页:6

字数:230 000

定价:60.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

植物的组织培养是一种在人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件下,快速繁育植物的技术,是当前生物技术中的最基本的技术和手段,现已广泛应用到园艺、农业和林业生产中。与盆栽、田间栽培等相比,植物组织培养省去了中耕除草、浇水施肥、防治病虫害等一系列繁杂劳动,大大节省了人力、物力以及田间种植所需要的土地。自 1958 年美国植物学家 Steward 等成功利用胡萝卜韧皮部细胞培养得到完整植株,到现在已有 54 年。植物组织培养技术不仅已应用到工厂化育苗、组培脱毒快繁、种质资源保护、遗传育种等植物良种繁育上,而且也应用到细胞器移植、基因工程、蛋白质工程等方面。植物组织培养是农业工厂化育苗的发展方向,在解决 21 世纪随着地球人口的增加而带来的粮食与燃料的不足,以及环境恶化等问题中将发挥越来越重要的作用。

植物的组织培养需要人工提供植物生长发育所需的温度、光照、湿度、营养、激素等条件。组培苗的生长发育依赖于人工提供的培养条件和营养条件。培养条件和营养条件的好坏直接影响着大规模生产组培苗的效率。

对组培苗生长环境的无菌检测是大规模工厂化育苗环境调控的前提和基础。动态检测组培苗的生长、生根、自养能力、营养消耗等过程和机制,可以了解不同发育阶段组培苗生长所需的最适营养条件和环境条件,使对组培苗的生长发育的调控成为可能。调控组培苗的生长发育,将大大节约成本、增强生产计划的预见性,也将使工厂化育苗的集约化和自动化成为可能,这必将极大地提高工厂化育苗效率。

本书共分 9 章。第一章,绪论。介绍国内外对组培苗无菌检测技术研究现状以及当前无菌在线检测组培苗生长和生理状况所面临的问题。第二章,组培苗生长的动态无菌检测。研究组培苗生长量的动态检测方法,分析不同激素对比对诸葛菜和茅苍术生长模式的影响。第三章,组培苗自养能力的动态检测。研究组培苗自养能力的动态检测方法,分析激素及光对组培苗自养能力的影响。第四章,组培苗叶绿素荧光特性的无菌检测。研究组培苗叶绿素荧光的无菌检测方法和步骤,分析氮素、温度和光质对组培苗光合能力的影响,比较污染和未污染组培苗的叶绿素荧光特征。第五章,组培苗蒸腾速率和水分利用率的测定。研究组培苗蒸腾速率和水分利用率的测定,给出在不同氮素水平、继代次数下茅苍术组培苗蒸腾速率和水分利用率的测定实例。第六章,组培苗根生长的无菌动态检测。建立组培苗根的生长无菌监测技术,动态监测不同类型茅苍术的组培苗根的生长。第七章,组培培养基中蔗糖的无菌检测。建立基于近红外光谱分析的组培培养基

中蔗糖含量的无菌检测方法, 监测不同种类组培苗培养过程中蔗糖的变化以及异养能力的变化。第八章, 组培培养基中氮素的无菌检测技术与应用。建立利用近红外光谱分析法对组培期培养基中的氮素含量动态监测的方法, 探讨不同种类组培苗培养基中氮素的利用规律。第九章, 结论与展望。总结组培苗无菌检测技术的研究结论, 预测组培苗无菌检测技术未来发展趋势、拓展领域, 阐明组培苗无菌检测技术对工厂化育苗中的环境控制的意义以及对农业工程学科发展的促进作用。

本书总结了近十年来作者所在的科研团队在农业生物环境信息检测方面的研究工作成果, 并得到了江苏大学现代农业装备与技术教育部重点实验室(Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education & Jiangsu Province, Jiangsu University, China)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏财教〔2011〕8号)(A Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, PAPD)、中国科学院“百人计划”项目、环境地球化学国家重点实验室项目以及江苏省农业高科技的重大科技项目等众多项目的资助。正是有了这些项目的资助, 才有了本书的出版, 在此, 我们表示衷心地感谢。

本书是由吴沿友教授领导的课题组集体撰写完成的。在本研究中, 吴沿友教授在学术思想的提升、项目组织的实施、学术成果的提炼中起着决定性的作用。各章撰写的分工为: 第一章, 孙卫红、吴沿友; 第二章, 吴沿友、赵玉国、许文祥、孙卫红、杨晓勇、吴晓明; 第三章, 吴沿友、许文祥、刘建、李国祥、孙卫红、赵玉国; 第四章, 赵玉国、鲁珊、徐红成、孙卫红、吴沿友、赵宽; 第五章, 吴沿友、赵宽、陈迎、庞静、孙卫红、赵玉国; 第六章, 赵玉国、杨晓勇、许文祥、孙卫红、吴沿友; 第七章, 吴沿友、宋艳娇、赵宽、鲁珊、赵玉国、孙卫红; 第八章, 赵玉国、赵宽、鲁珊、陈迎、庞静、孙卫红、吴沿友; 第九章, 吴沿友、孙卫红、赵宽。

我们衷心感谢江苏大学李萍萍教授、毛罕平教授多年的关心、启发和指导, 以及课题组朱咏莉博士、付为国博士等提供的诸多帮助!

组培苗无菌检测技术是农业工程技术在生物技术中的应用, 它涉及生物学、数学、化学、物理学等众多学科, 内容极其丰富、复杂。本书仅是冰山一角, 只能起抛砖引玉的作用。出版本书, 也只希望引来众多科学家的关注和兴趣。但愿今后有更多的学者和专家从多方面、多角度开展组培苗无菌检测技术的研究, 为高效、低耗、优质的工厂化育苗提供科技支撑。

由于著者学术水平有限、时间仓促, 本书不妥和疏漏之处在所难免, 恳请读者不吝赐教!

著 者

2011年12月30日

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 植物组织培养技术及应用	2
第二节 植物组织培养无菌检测发展现状	3
第三节 研究的目的意义和研究内容	5
参考文献	7
第二章 组培苗生长的动态无菌检测	9
第一节 标签法组培苗的无菌检测	11
第二节 单参照物法和两参照物法的组培苗的无菌检测	15
第三节 多参照内标法无菌动态检测茅苍术组培苗的生物量	24
第四节 多参照内标法无菌动态检测诸葛菜组培苗的生物量	28
第五节 小结与展望	31
参考文献	32
第三章 组培苗自养能力的动态检测	33
第一节 组培苗自养能力的动态测定	35
第二节 激素及光对组培苗自养能力的影响	40
第三节 小结与展望	45
参考文献	46
第四章 组培苗叶绿素荧光特性的无菌检测	47
第一节 叶绿素荧光技术在检测和诊断中的应用	48
第二节 组培苗叶绿素荧光参数的无菌检测	50
第三节 培养基中氮素浓度对组培苗光合作用能力的影响	51
第四节 培养环境对组培苗光合作用能力的影响	55
第五节 基于叶绿素荧光技术的组培苗污染的预测	58
第六节 小结与展望	61
参考文献	61
第五章 组培苗蒸腾速率和水分利用率的测定	65
第一节 组培苗蒸腾速率和水分利用率的测定原理及方法	68
第二节 茅苍术组培苗蒸腾速率和水分利用率的测定	70
第三节 小结与展望	77

参考文献	79
第六章 组培苗根生长的无菌动态检测	81
第一节 基于图像分析法的诸葛菜组培苗根生长的无菌检测	82
第二节 基于图像分析法的茅苍术组培苗根生长的无菌检测	90
第三节 基于图像分析法的茅苍术组培苗根体积的无菌检测	103
第四节 小结与展望	112
参考文献	113
第七章 组培培养基中蔗糖的无菌检测	115
第一节 组培培养基中蔗糖的作用及检测方法	117
第二节 近红外光谱分析技术的原理及特点	118
第三节 组培苗培养基中蔗糖的无菌检测技术	122
第四节 组培苗生长过程中蔗糖含量的无菌动态监测	141
第五节 小结与展望	146
参考文献	147
第八章 组培培养基中氮素的无菌检测技术与应用	148
第一节 氮素的重要性及其传统测量方法	149
第二节 培养基中氮素含量的建模分析	152
第三节 组培苗培养基中氮素无菌动态检测	161
第四节 不同氮素水平下组培苗的氮素利用率	165
第五节 不同氮源水平下组培苗的氮素利用率	167
第六节 小结与展望	173
参考文献	174
第九章 结论与展望	177
参考文献	182
彩图	

Contents

Preface

Chapter 1 Introduction	1
Section 1 Techniques and applications of plant tissue culture	2
Section 2 The development status of sterile measurement in plant tissue culture	3
Section 3 The significance, purpose and contents of the studies	5
Reference	7
Chapter 2 The Sterile Dynamic Measurement on the Growth of Plantlets <i>in vitro</i>	9
Section 1 Sterile measurement plantlets <i>in vitro</i> by labeling	11
Section 2 Sterile measurement plantlets <i>in vitro</i> by single reference and double references	15
Section 3 Sterile measurement biomass of <i>Atractylodes lancea</i> plantlets <i>in vitro</i> by the internal standard method of more references	24
Section 4 Sterile measurement biomass of <i>Orychophragmus violaceus</i> plantlets <i>in vitro</i> by the internal standard method of more references	28
Section 5 Summary and prospects	31
Reference	32
Chapter 3 Dynamic Measurement on the Autotrophic Capability of Plantlets <i>in vitro</i>	33
Section 1 Dynamic determination on the autotrophic capability of plantlets <i>in vitro</i>	35
Section 2 The effect of hormone and light on the autotrophic capability of plantlets <i>in vitro</i>	40
Section 3 Summary and prospects	45
Reference	46
Chapter 4 Sterile Measurement on the Characteristics of Chlorophyll Fluorescence of Plantlets <i>in vitro</i>	47
Section 1 The application of the chlorophyll fluorescence technology on measurement and diagnose	48
Section 2 Sterile measurement on the chlorophyll fluorescence	

	parameters plantlets <i>in vitro</i>	50
Section 3	The effect of medium nitrogen content on the photosynthetic capacity of plantlets <i>in vitro</i>	51
Section 4	The effect of culture environment on plantlets <i>in vitro</i> photosynthetic capacity	55
Section 5	Prediction of plantlets <i>in vitro</i> contamination based on chlorophyll fluorescence technology	58
Section 6	Summary and prospects	61
Reference		61
Chapter 5	Measurement on Transpiration Rate and Water Efficiency Rate of Plantlets <i>in vitro</i>	65
Section 1	The principle and method of measurement on transpiration rate and water efficiency rate of plantlets <i>in vitro</i>	68
Section 2	Measurement on transpiration rate and water efficiency rate of <i>Atractylodes lancea</i> plantlets <i>in vitro</i>	70
Section 3	Summary and prospects	77
Reference		79
Chapter 6	Sterile, Dynamic Determining the Growth of Roots from Plantlets <i>in vitro</i>	81
Section 1	Sterile determining roots growth of <i>Orychophragmus violaceus</i> plantlets <i>in vitro</i> based on imaging analysis	82
Section 2	Sterile determining roots growth of <i>Atractylodes lancea</i> plantlets <i>in vitro</i> based on imaging analysis	90
Section 3	Sterile determining roots volume of <i>Atractylodes lancea</i> plantlets <i>in vitro</i> based on imaging analysis	103
Section 4	Summary and prospects	112
Reference		113
Chapter 7	Sterile Determining the Sucrose in the Medium Subcultured the Plantlets <i>in vitro</i>	115
Section 1	The role and method of measurement on sucrose of the medium in tissue culture	117
Section 2	The principle and characteristics of Near-Infrared Spectroscopy technology	118
Section 3	Sterile detecting technology of sucrose in the medium cultured the plantlets <i>in vitro</i>	122

Section 4	Sterile and dynamic measurement on sucrose in the growth process of plantlets <i>in vitro</i>	141
Section 5	Summary and prospects	146
Reference		147
Chapter 8	The Technology of Sterile Determining the Nitrogen in the Medium Subcultured the Plantlets <i>in vitro</i> and Application	148
Section 1	The importance and traditional methods of measurement on nitrogen	149
Section 2	Modeling and analysis of nitrogen content in the medium	152
Section 3	Sterile and dynamic determination of nitrogen content of the medium cultured the plantlets <i>in vitro</i>	161
Section 4	The nitrogen use efficiency of plantlets <i>in vitro</i> under different nitrogen content levels of the medium	165
Section 5	The nitrogen use efficiency of plantlets <i>in vitro</i> under different nitrogen source of the medium	167
Section 6	Summary and prospects	173
Reference		174
Chapter 9	Conclusions and Prospects	177
Reference		182
Plate		

第一章 绪 论

内容提要 植物组培育苗是一项在人工控制的环境条件下获得大量同源母本基因幼苗的技术,具有其他育苗手段所无法比拟的优点。组培苗在园艺、农业等科研和生产领域具有广泛的应用前景,已成为商品逐步大量供应于生产。传统组培苗的检测手段制约了其商品化生产的发展及大规模应用。采用先进的环境综合调控育苗设施及检测手段,进行工厂化、规模化组培苗生产,是组培苗成为商品普遍应用于社会生产的必要前提。

本研究致力于组培苗的生长检测及生长环境监测问题,尝试新的研究思路和方法。建立组培苗及其根生长的动态无菌监测方法;构建一系列模型,预测不同培养条件下组培苗的自养能力和光合能力;探明不同氮素和继代次数对组培苗蒸腾速率和水分利用率的影响;利用近红外光谱分析技术和图像处理法对培养基中蔗糖含量、氮素含量和组培苗生物量进行无菌动态监测,综合组培苗的生长量、蔗糖和氮素的消耗量,分析组培苗的生理状况,为组培苗工厂化生产的环境调控提供科学依据。

Chapter 1 Introduction

Summary Plant propagation *in vitro* is a widely used biological technique in the production of a large number of genetically identical plantlets under manually operated environmental conditions. It has many advantages compared to conventional propagation techniques. Plantlets *in vitro* obtained from plant tissue culture have widely applied to horticulture, agriculture and so on. Industrial-scale plantlets *in vitro* have become commercial application in agriculture. Conventional monitoring measurements on plantlets *in vitro* have limited commercial micro-propagation production and its large scale application. Development and application of both automated environment control system and industrial-scale measuring facilities are essential for its commercial application in agriculture.

This study focused on the monitoring of the growth and its environmental, and tried some new research thoughts and approaches. The methods about the

sterile dynamic monitor on the growth of the plantlets *in vitro* and their roots were established. A series of models were constructed, and autotrophic ability and photosynthetic capacity under different culture conditions for tissue culture were predicted. The effect on plantlets *in vitro* transpiration rate and water use efficiency under different nitrogen levels and subculture times was ascertained. The sterile, dynamic monitoring the sucrose content, nitrogen content in the medium and the biomass of plantlets *in vitro* was made via using the near-infrared spectral analysis and image processing technology. The physiological status was analyzed using the data of plantlets growth, sugar and nitrogen consumption. It provides the scientific basis for environmental regulation during plant tissue culture production.

第一节 植物组织培养技术及应用

19 世纪 Schleiden 和 Schwann 提出的细胞学说认为：细胞是具有潜在全能生理和发育功能的生物体的基本结构单位（陈正华，1986）。植物细胞的全能性就是指植物体的任何一个细胞都包含有发育成完整植株的全部信息，在离体培养的条件下，这种信息可以产生出完整植株（李浚明，1992）。植物体的任何细胞，无论来自生殖器官，还是来自根、茎、叶等，只要置于合适的培养基上，都能长成完整植株。通过无菌操作，把植物的各类结构材料（即外植体）接种于人工配置的培养基上，在人工控制的环境条件下进行培养的技术与方法称为植物组织培养，又称为植物离体培养（丁永前，2000）。

植物产生新个体的繁殖方式有多种，无性繁殖在保持植物的优良性状及后代的整齐一致方面，具有有性繁殖所无法比拟的优点。常用来扦插、嫁接、压条等传统无性繁殖育苗的植物品种较少，且繁殖速度慢，品质不易保证，远远不能满足现代农业生产发展的要求（陈振光，1987）。将植物组织培养技术应用于植物的无性繁殖一般称为“组培育苗”、“微繁育苗”、“离体快繁育苗”（钱迎倩和孙敬三，1987）。组培育苗具有如下优势：繁殖速度快、繁殖系数大、组培苗整齐一致、可以获得脱病毒幼苗、组培苗能保持母本基因的同一致性和一致性等（张志宏等，2001；Seko and Nishimura，1997）。

目前，植物组织培养在遗传育种、种质资源保护、组培脱毒快繁等方面得到广泛应用（李宗菊等，1999）。组培快繁育苗已成为植物优良品种繁育的重要手段，组培苗在园艺、农业和林业中的应用正日益广泛和深入（徐志刚等，2004）。同时，植物细胞在分子水平上的研究（如细胞器移植、基因工程、蛋白质工程等）将促进植物组织细胞培养技术的研究和应用向更高、更新的水平发展。可以

预见,组培苗的工厂化生产将走向产业化,组织培养技术在解决 21 世纪随着地球人口的增加而带来的粮食与燃料的不足以及环境恶化等问题中,将得到长足的发展和大规模的普及应用。

第二节 植物组织培养无菌检测发展现状

近年来,植物组织培养技术得到迅猛的发展,工厂化程度越来越高,在组培苗工厂化生产的过程中,如何提高育苗成活率一直是组织培养的难题,是组培苗大规模工厂化生产的制约因素。要实现组培苗大规模生产,在组织培养设施与环境监控系统方面必须解决以下关键问题:要设计产品结构简单、操作方便的大型组织培养设备;要有一套与大型设施相匹配的、能适应各种组培苗生长的智能综合调控系统;要实现组培苗生产过程的机械化、自动化流水作业,提高作业效率,降低组织培养成本等。这是解决组培苗育苗规模化难题的必由之路。

大型培养容器的应用使组培苗的空间环境得到了发展,为空间环境因子的调控提供了现实的可能性。因此,组织培养容器在向大型化方向发展的同时,如何调控其空间环境成为必然要面对和解决的问题。可通过组合大型组织培养容器,采用集成的环境监测和控制系统,以实时调控环境因子促进组培苗的生产。

组培苗生长在组织培养容器内,其所处的生长环境完全不同于大田环境和温室环境,但在组织培养微环境的研究方法上,可以将组织培养容器看成是一个微型温室或一个小型植物生长室(徐志刚等,2003)。由于传统组织培养容器中的环境完全不能等同于温室,很长时间以来环境因素对组培苗生长的重要作用都被忽视,以至存在的许多意想不到的生理和病理问题没有及时解决(徐志刚等,2001)。Aitken 等(1995)对组织培养环境特征作了如下描述:温度变化小、相对湿度高、光合光量子通量低、 CO_2 浓度日变化率大、培养基中糖和激素以及盐分的含量高、有毒物持续积累、微生物污染菌类大量生长。这些环境特征导致组培苗的蒸发量降低、光合能力降低、对水和营养成分以及 CO_2 的吸收减少、暗呼吸作用增强和组培苗的损失提高等问题,从而使组培苗的生长减缓。

传统组培苗检测方法是通过对接触性测量获得的,这些方法简单、准确,但也有诸多缺点。首先,接触性测量会破坏组培苗生长的无菌微环境而导致污染;其次,由于接触性测量破坏苗的生长环境,只能获得单一株苗的一组生长信息,难以获得动态的生长信息;再次,这些方法难以对结果进行校正,不能长久地保存结果,更不能在线使用等。因此,就需要一种新的方法以无菌、动态、长期地检测组培苗的生长发育情况。

数字图像处理是通过计算机对图像进行去除噪声、增强、复原、分割、提取特征等处理的方法和技术。图像处理技术已广泛应用于生物学的研究和农业生产

中(王桂琴等, 2003; 李长缨等, 2003; 陈全胜等, 2005; Brosnan and Sun, 2004; Rodrigues and Fernandes, 2006)。在植物组织培养的研究中, 图像处理技术已经用于对微繁小植株、组织和细胞的生长评估以及逆境对组织培养物生长影响的监测。Smith 等(1989)利用图像处理技术无菌检测试管中组培苗的生长和发育, 以及盐分逆境对组培苗生长发育的影响。

光环境因子是影响光合作用和生长的内在因素(Chen and Chen, 2002)。一般植物的光合作用随光量的增加而增强, 当光量超过一个限度后, 光合强度反而随光量的增加下降, 这个临界的光量值就是光合作用的光饱和点(Kubota and Kozai, 1995)。光质对光合作用的影响, 是指光合色素对不同颜色的光的吸收峰不同而对光合作用产生不同的影响(Kozai et al., 1994)。组织培养环境是一个半封闭的无菌微环境, 组培苗生长在这个环境中, 现有的在大田作物上应用的光合速率测定系统不适合对组培苗光合作用的测定。因此国内外学者研制了多套专门的组培苗光合速率测量系统, 徐志刚等(2003)也设计了国内首套组培苗光合速率测量系统, 但这些方法中都存在着相应的缺陷。

组培苗根系传统的测定方法一般为直接测量法和网格交叉法, 这些方法测量比较准确, 可以直接获得根系的生长数据, 但必须直接接触根系并且不能获得根系连续生长的信息, 无法评价不同培养基对根系生长的影响。因此, 为了研究培养基微环境对组培苗根系生长影响的动态过程, 必须寻找一种非接触的、无菌的、动态的监测组培苗根系生长的方法。随着信息、传感检测技术的飞速发展, 图像处理技术已经广泛应用于农业、林业的各个领域(Liu and Paulsen, 2000; Kawasse et al., 2003), 在根系的研究方面主要用来测量根长和根面积。Benjamin 等(2004)应用扫描仪获取豌豆根系图片, 利用图像处理软件分析得出豌豆根的表面积; Himmelbauer 等(2004)用两种不同的图像分析系统测量根的长度、直径及表面积, 并与人工测量数据进行相关性分析; Wu 等(2008)利用图像处理技术对诸葛菜组培苗根系生长实行无菌检测, 并通过实验获得组培苗生长的最佳激素配比。目前对植物生长拟合多采用三参数 Logistic 方程, 通过三参数 Logistic 方程的拟合达到对产量的预测。姜丽霞等(2008)利用 Logistic 方程对大豆的产量进行预测, 克服了对预报产量的估算误差; 也有学者通过对三参数 Logistic 方程求导得出拐点的方法求出植物的对数生长期(宋晓珍等, 2009)。但将二参数或三参数 Logistic 方程用来确定对数生长期的持续时间和何时进入对数生长期有较大困难, 利用三参数 Logistic 方程确定对数生长期的持续时间明显大于实际对数生长期的持续时间, 对于何时进入对数生长期, 三参数 Logistic 方程则无能为力, 运用四参数 Logistic 方程可以直接得出最初生物量和对数生长期, 可以解决植株生长拟合过程中的难题。

自然界中, 富含叶绿素的高等植物通过光合作用进行自养生长, 即利用大气

中 CO_2 作为碳源进行生长。当一种植物既可以以大气中的 CO_2 为碳源,也可以吸收的有机物质为碳源时,属于兼养生长型植物。植物组织培养处于半封闭状态,组织培养容器内 CO_2 浓度很低,如果组培苗的植株体较小,即使含有叶绿素,光合作用也很弱,特别是植株体很小时,几乎没有光合能力,不足以维持组培苗自身的健康生长,因此需要在培养基中加入糖类作为碳源来维持植株体的生长。培养基中可添加糖的种类较多,蔗糖能支持绝大多数植物离体培养物的旺盛生长,一直被作为植物组织培养的标准碳源广泛应用,大多数合成培养基也均以蔗糖作为唯一碳源。传统的蔗糖检测方法为盐酸水解法和酶-比色法。国内外利用近红外光谱分析技术在无损检测蔗糖方面进行了深入的研究,对食品中蔗糖的定量检测应用最为广泛(Xie et al., 2009)。Filho (2009) 利用近红外光谱分析法对巧克力中的蔗糖含量进行快速无损检测;侯瑞丽等(2007)利用近红外透射法快速测定蜂蜜中的蔗糖含量。近红外光谱仪所采集的光谱易受仪器状态、样品状态、测量环境等的影响,所得光谱除样品的自身信息外,还包括其他无关信息和噪声。因此在建模过程中,光谱数据的预处理、特征波长的优化、最适建模方法的选择等都对模型的准确性和稳健性起着非常重要的作用。

近红外光谱技术是近年发展起来的无损检测技术,其最大的特点就是快速、无损、无菌,样品无需或只需很少的预处理,分析速度快,无需化学试剂。其检测原理为化合物分子基团的含氢基团(如 $\text{O}-\text{H}$ 、 $\text{C}-\text{H}$ 、 $\text{N}-\text{H}$)等的伸缩振动频率符合基频振动的频率,在 2000 cm^{-1} 以上(即波长 5000 nm 以下)的振动才可能在近红外区形成有适当强度可检测的倍频与合频吸收,形成近红外光谱,根据这些基团近红外吸收频谱出现的位置、吸收强度等信息特征,进行定性和定量分析。氮素含有 $\text{N}-\text{H}$ 基团,符合红外区的振动频率,可以用 $\text{N}-\text{H}$ 基团近红外吸收频谱对氮素进行定量分析。国内外学者逐步开展了利用光谱方法测定分析不同环境中的氮素的研究。潘瑜春(2007)利用遥感监测小麦长势估测土壤氮素累积情况;张金恒和王珂(2008)利用鲜叶光谱信息估测氮素营养状况;Bronson 等(2003)利用光谱信息对灌溉期棉花的氮素进行了测定研究。

第三节 研究的目的意义和研究内容

组培苗生长在无菌、半封闭、人工环境中,营养方式属于兼养生长,即吸收培养基中的碳源异养生长和光合自养生长,因此,寻找组培苗无菌生长测定和环境因素测定的方法以及在培养过程中如何改善培养微环境提高组培苗生长的方法具有重要意义。

目前,图像处理技术已经广泛应用于农业、林业的各个领域,但国内外利用图像处理技术监测组培苗动态生长过程的报道则很少。我们研究了基于图像分析

的不同参照物的组培苗的无菌检测技术,分析了不同类型组培苗在不同激素配比的培养基中的动态生长信息,为组培苗的无菌检测做了基础性的研究,这对制定组培苗工厂化生产标准具有重要意义。

组培苗生长在无菌、半封闭的微环境中,现有的应用于农林作物的光合测定系统(Li-6400)不适合对组培苗光合特征的测定。本研究设计了以Li-840型 $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ 分析仪为主要测量仪器的封闭式组培苗光合作用测定系统,研究光合作用的测定方法,为研究组织培养微环境对光合作用的影响提供了方法和手段。光在植物组织培养中起着至关重要的作用,如何在太阳光照不足的情况下调控特定人造光源满足植物生长发育的需要且不浪费资源,是现代组织培养技术的重要研究内容。本研究通过建立组培苗自养能力的测定方法以及光合能力的无菌测定方法,研究组培苗培养基中激素的种类和浓度、培养基组成以及组织培养光(光量和光照强度)、温度等环境因子对组培苗光合自养能力和叶绿素荧光参数的影响,为组织培养过程中的激素配置和光的调控提供理论依据。

组培苗蒸腾速率和水分利用率是组培苗极其重要的生理参数。本研究通过建立一系列模型,获取组培苗的蒸腾速率和水分利用率。通过研究不同氮素水平、继代次数下组培苗蒸腾速率和水分利用率的差异,了解组培苗的生理状况,为组培苗的水分补给及组培苗的转接提供科学依据。

组培苗根系生长得好坏直接影响组培苗的出苗效果。为了研究培养基微环境对组培苗根系生长影响的动态过程,必须寻找一种非接触的、无菌的、动态的监测组培苗根系生长的方法。本研究通过图像分析法探讨组培苗根系的无菌监测,评价不同激素配比的培养基对不同种类组培苗根系生长的影响;选择四参数Logistic数学模型对茅苍术根系生长进行拟合,并与三参数Logistic方程进行比较,从而更好地反映根系生长的动态情况,提高组培苗根系动态生长的预测精度,为订单苗木的生产提供科学依据。

随着现代仪器和检测技术的发展,高效液相色谱法和气相色谱法等已被用来分离和定量检测蔗糖。由于植物组织培养是在无菌、半封闭环境中进行的,而这两种方法都需要将培养基中的蔗糖分离纯化后才能进行测定,这样既破坏了培养基本身,也破坏了组培苗生长的无菌环境,因此需要一种快速、便捷、无菌的蔗糖检测技术。近红外光谱技术是根据蔗糖含氢基团的近红外吸收频谱出现的位置、吸收强度等信息特征,通过分析测量近红外光谱漫反射信号,对蔗糖进行定量分析的,因此能够实现对组培苗培养基中蔗糖的无菌检测。本研究利用近红外光谱技术定量检测组织培养培养基中蔗糖的含量,结合图像分析法测定的生物量,分析不同类型组培苗对培养基中蔗糖的利用效率,对了解不同组培苗的生理机制,节约培养成本具有重要意义。

氮素是植物生长发育不可缺少的营养元素,被称为生命元素(黄长兵等,

2010)。相关研究表明,氮素对植株产量和品质影响最大,过量或缺乏都会对植株产生很大影响,合理施用氮素有利于植株对磷、钾、钙、镁的吸收(Zheng et al., 2005)。植物种间具有生理差异性,不同种类组培苗有不同的最适氮素浓度,不同种类植物甚至同种植物在不同培养条件下都具有不同的光合能力,在同等条件下其生长速率、氮素的利用率、生长快慢周期等都会不同。在大规模的组织培养生产中,仅靠植株体的外观和培养基的体积消耗来判断组培苗的生长发育,缺少科学依据,往往会延误组培苗的最佳接种移栽期,造成氮素浪费,或者是组培苗对氮素的利用效率低,生长缓慢,延误组培苗的培养时间,不利于组培苗的接种换代。因此,如果能对组织培养过程中培养基中的氮素含量进行无菌动态检测,就可以研究培养物生长过程中培养基氮的消耗情况,根据氮的消耗分析组培苗的快慢生长周期,方便研究组培苗的生理机制,判断组培苗的最佳接种期,为植物组织培养的大规模发展提供参考依据。利用近红外光谱分析法对植物组织培养的半固态培养基中的氮素含量的测定还未见系统性的报道。本研究利用近红外光谱技术检测培养基中的氮素含量,以便估测组培苗的生长状况,为组培苗的规模化生产提供参考依据。

参 考 文 献

- 陈全胜,赵杰文,张海东,等. 2005. 利用计算机视觉识别茶叶的色泽类型. 江苏大学学报(自然科学版), 26(6): 461-464.
- 陈振光. 1987. 园艺作物离体培养. 北京: 中国农业出版社.
- 陈正华. 1986. 木本植物组织培养及应用. 北京: 高等教育出版社.
- 丁永前. 2000. 组培微生态环境中的 CO₂ 控制的研究. 南京: 南京农业大学.
- 侯瑞丽,程玉来,重腾和明. 2007. 采用近红外光谱技术检测蜂蜜中蔗糖含量的研究. 食品工业, 2: 57-58.
- 黄长兵,房伟民,杨勇,等. 2010. 不同水平和形态氮素供应对盆栽小菊外观品质个光合特性的影响. 浙江农业学报, 22(1): 45-50.
- 姜丽霞,那济海,朱海霞,等. 2008. 基于 Logistic 方程的大豆产量预报方法. 大豆科学, 27(3): 414-419.
- 李长缨,滕光辉,赵春江,等. 2003. 利用计算机视觉技术实现对温室植物生长的无损监测. 农业工程学报, 19(3): 140-143.
- 李浚明. 1992. 植物组织培养教程. 北京: 北京农业大学出版社.
- 李宗菊,周应揆,桂明英,等. 1999. 满天星无糖组培快繁技术研究. 云南大学学报, 21(4): 134-138.
- 潘瑜春. 2007. 基于小麦长势遥感监测的土壤氮素累积估测研究. 农业工程学报, 23(9): 58-64.
- 钱迎倩,孙敬三. 1987. 植物组织培养. 北京: 人民教育出版社.
- 宋晓珍,张文辉,何景峰. 2009. 瑞典能源柳不同无性系扦插苗年生长规律研究. 西北农业学报, 18(1): 271-276.
- 王桂琴,杨子彪,郑丽敏,等. 2003. 计算机视觉在农产品检测中的应用. 农业工程学报, 5(3): 52-56.
- 徐志刚,崔瑾,焦学磊,等. 2004. 光照强度和 CO₂ 浓度间接调控对甘薯无糖组培苗光合特性的影响. 南