

植物无糖组培

快繁工厂化生产技术

□ 肖玉兰 编著

THE TECHNIQUES
OF SUGAR-FREE
MICROPROPAGATION
PRODUCTION



植物无糖组培 快繁工厂化生产技术

□ 肖玉兰 编著

THE TECHNIQUES
OF SUGAR -FREE
MICROPROPAGATION
PRODUCTION

■ 云南科技出版社
· 昆明 ·

图书在版编目(CIP)数据

植物无糖组培快繁工厂化生产技术/肖玉兰编著.
昆明:云南科技出版社,2003.6

ISBN 7-5416-1730-X

I. 植... II. 肖... III. 植物—组织培养
IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 049891 号

云南科技出版社出版发行

(昆明市环城西路 609 号云南新闻出版大楼 邮编:650034)

昆明市五华区教育委员会印刷厂印刷 全国新华书店经销

开本:850×1168 1/32 印张:5.75 字数 140 千字

2003 年 6 月第一版 2003 年 6 月第一次印刷

印数 1~3000 定价 15 元

前言



从事植物组织培养工作的同行们、朋友们，想必您们一定碰到这样的问题，如果按组织培养理论增殖倍数来制定一年的生产计划及生产量，即使是按最低的增殖理论倍数来制定生产计划，其结果仍然达不到预定的

生产数量。另外好不容易得到了

古在丰树先生(2000年,昆明) 一个优良品种的试管苗，原指望它能为企业代来好效益，但还没等增殖起来，就已全军覆没。原因何在？是污染和植株生长发育不良而引起！大量的小植株在组培过程中因为污染而损失惨重；培养容器内不良的微环境条件导致试管苗瘦弱，玻璃化，黄化，畸形变异；特别是过渡阶段大量的小植株死亡更是令人痛心。为了防止污染，我们不得不采取种种严格的防范措施，过量使用各种消毒剂、杀菌剂，甚至不惜以损坏身体健康为代价，但效果仍然不尽人意。我们曾经长时间的思索过，探索过，希望能找到将污染减至最少，提高试管苗质量的途径。无糖培养微繁殖技术是组织培养的一个新亮点，当您读完这本书后，相信您已经找到了问题的答案和解决的办法。

无糖培养微繁殖技术(photoautotrophic micropropagation or sugar-free micropropagation)的发明人——古在丰树教授，现任日本千叶大学园艺学部部长，他是世界知名的环境控制和组织培养方面的专家，其研究硕果累累。在过去的30年间，他发

表了 200 多篇论文,出版了 100 多本书,并取得 10 多项发明专利。研究领域涉及温室环境调节、计算机、太阳能利用、自动控制、植物组织培养、闭锁型种苗生产等。其中多项研究获得重大奖励,例如:太阳光在温室的传播;工厂化种苗生产环境控制基本原理研究;光自养植物组织培养中的环境控制;通过环境控制调节试管中小植株的生长和快速繁殖等等。植物无糖培养微繁殖技术是他的诸多发明之一。2002 年他荣获日本科学技术类最高奖“紫绶奖章”。

自 1996 年起,古在丰树教授多次来到昆明,把植物无糖培养微繁殖技术无偿地传授给我们,为此他付出了大量心血和辛劳。2002 年 9 月,为了表彰他对中国的建设和发展所做的贡献,中国国家外国专家局授予他“友谊奖”。昆明市人民政府授予他“国际科学技术合作奖”。

笔者有幸师从古在丰树教授学习植物无糖培养微繁殖技术的理论,并进行了大量的试验、研究、示范和实践工作,并取得了一定成绩。所有这些,都得益于古在老师的精心指导、严格要求和热情帮助。老师教给我的不仅是知识、技术和严谨求实的学风,他高尚的情操、无私奉献的精神引导我在科学探索的道路上跋涉,甘于寂寞,淡泊名利。

实践证明,植物无糖培养微繁殖技术有着广阔的应用前景。因此,我把无糖培养微繁殖技术的理论和我们的实践经验介绍给大家,希望能对读者的工作有所帮助。由于时间仓促和水平有限,不足之处在所难免,敬请读者批评指正。

无糖培养微繁殖技术的引进、研究和应用,多年来得到中国国家外国专家局、昆明市科技局和昆明市环保局的支持、关心和帮助,使得该项技术得以在生产中应用和推广;在项目的实施过程中,领导的信任和对项目的支持,给予我们极大的精神鼓励

和相应的物质保障；我的同事们，特别是从事工程技术的同事们，他们的协作与全身心的投入，对项目的完成起了非常重要的作用；本书在编写过程中，得到了 Professor Toyoki Kozai(古在丰树教授)，Dr. Cheri Kubota, Dr. S. M. A. Zobayed, Dr. F. Afreen-Zobayed 的支持和帮助，并提供了相关的图片，在此一并深表感谢。此外，本书引用了大量国内外文献中的研究成果、数据，在此也向文献的作者们致以衷心的感谢。

作 者

2002 年 12 月

目 录

第一章 植物无糖培养微繁殖技术的概念和原理	(1)
第一节 植物无糖培养微繁殖技术的来源	(1)
第二节 植物无糖培养微繁殖技术的概念	(2)
第三节 无糖培养微繁殖技术的特点	(5)
第四节 植物有糖培养微繁殖技术存在的问题	(7)
第五节 无糖培养微繁殖技术的优势和限制因素	(13)
第六节 无糖培养微繁殖技术的适用范围	(16)
第二章 微繁殖中植物的碳营养和光合作用	(20)
第一节 微繁殖中的碳营养	(20)
第二节 异养和兼养营养方式下小植株的形态和生理特征	(22)
第三节 微繁殖中小植株的光合作用	(29)
第三章 微繁殖中的环境控制	(47)
第一节 环境控制与光自养微繁殖	(47)
第二节 培养容器	(49)
第三节 CO ₂ 浓度	(58)
第四节 光 照	(62)
第五节 温 度	(68)

第六节	相对湿度	(71)
第七节	根区环境对植株生长发育的影响	(73)
第四章	植物无糖组培微繁殖工厂化生产技术	(80)
第一节	植物无糖组培快繁工厂的设计	(80)
第二节	植物无糖培养微繁殖的设备和要求	(89)
第三节	培养基	(104)
第四节	基本操作技术	(119)
第五节	无糖培养中的环境控制操作技术	(135)
第六节	影响无糖培养微繁殖效果的因素	(137)
第七节	生产成本分析	(141)
第八节	无糖培养微繁殖技术应用实例	(145)
第五章	闭锁型种苗生产技术	(157)
第一节	闭锁型种苗生产技术的来源	(157)
第二节	人工光闭锁系统	(161)
第三节	日本千叶大学的闭锁型种苗工厂	(169)

第一章 植物无糖培养 微繁殖技术的概念和原理

第一节 植物无糖培养微繁殖技术的来源

植物无糖培养微繁殖技术来源于日本,其技术的发明人是日本千叶大学园艺学部环境调节工学研究室的古在丰树教授。他原从事温室环境控制方面的研究,1986年,应邀帮助一位从事观赏园艺植物组培快繁生产的朋友,解决生产中常出现的组培苗生根困难、污染率高等问题时发现,植物在大自然中生长健壮,不存在微生物污染问题,它们与组织培养植株的根本不同点在于两者的碳源来源不同。前者的碳来自于空气中的 CO_2 ,后者的碳来自于培养基中的糖。糖是引起微生物污染的主要因素,如果能用 CO_2 代替培养基中的糖作为组培苗生长的碳源,就有可能解决植物组织培养生产中存在的污染问题,以及由此带来的诸如组培苗生长环境不佳,劳动力成本高等一系列问题。

这次偶然的发现使古在丰树开始了他的无糖培养微繁殖研究道路。他发现在试管苗生长的容器中,在光照期间,容器中的 CO_2 急剧下降,这表明光照时容器内的 CO_2 被消耗了,并且把培养基中的糖除去以后,小植株仍然能够存活并生长。于是他肯定容器中的小植株具有一定的光合能力, CO_2 能够取代培养基中的糖作为组培苗的碳源。无糖培养微繁殖的理论自此诞生。

古在丰树把温室环境控制技术应用到植物组织培养中,开

始了植物无糖培养的研究和探索。随着研究的深入及大量试验的成功,无糖培养的可行性和优越性得到了肯定。无糖培养理论与技术也逐渐被人们接受。20世纪90年代中后期,这一技术成为植物组织培养研究的新领域,受到广泛的关注,无糖培养微繁殖技术也在各国开始得到传播应用。

中国国家外国专家局和昆明市科技局于1996年邀请古在丰树教授到昆明等地进行学术讲座,将无糖培养微繁殖技术传播到中国。这项技术研究也于1997年起列入昆明市重点科技计划,昆明市环境科学研究所受中国国家外国专家局和昆明市科技局委托承担了该项技术的引进、研究、试验、示范和推广任务。通过几年的试验研究和生产示范,课题进展顺利取得很好的效果。在引进消化吸收国外先进技术的基础上,结合国情,开发了无糖培养微繁殖生产的配套、设备设施,获得三项专利:①植物光独立培养微繁殖供气装置,专利号:ZL0022377.5。②植物光独立培养微繁殖培养箱,专利号:ZL0022377.1.7。③组合式植物光自养组培快繁装置,专利号:ZL 02221205.1。并对非洲菊、康乃馨、满天星、情人草、勿忘我、彩色马蹄莲、洋桔梗、草莓、菠萝、马铃薯、甘蔗、甘薯等多种植物进行了无糖微繁殖研究和生产。如今植物无糖培养微繁殖技术受到广泛的关注,并已逐渐在生产中推广应用。不少的组培工作者认为,该技术将成为植物组织培养一个新的发展方向。

第二节 植物无糖培养微繁殖技术的概念

一、植物无糖培养

植物组织培养(Plant tissue culture)是指在无菌的条件下,将离体植物的器官(根、茎、叶、花、果实等)、组织(形成层、花药

组织、胚乳、皮层等)、细胞(体细胞和生殖细胞)以及原生质体,培养在人工配制的培养基上,在人工控制的环境里使其再生形成完整的植株。也就是将植物体的一部分(外植体)放在无菌的容器中,供给它们充足的营养物质,置于适宜的环境中,使它们得以生存和形成完整植株的一种方法。植物组织培养的优势在于脱除病毒、快速繁殖和保存种质资源。

在植物组织培养中,离体的组织和细胞接种到培养器内培养获得的小植株叫试管苗。采用植物组织培养方法可以使试管苗具有很高的繁殖速度,因此,人们又将这一繁殖方法称为快速繁殖或微繁殖(micropropagation)。它是相对于外界的自然条件下的常规繁殖(propagation)方法而言的。微繁殖可以在一定的时间内从一个外植体,繁殖出比常规繁殖多几百倍,甚至千万倍与母体遗传性状相同而健康的小植株,其标准可达到大田生产种苗的要求。用于植物组织培养的离体组织、器官或细胞,称为外植体,外植体包括茎尖、根、茎、叶、花器官以及它们形成的体细胞胚等材料。植物微繁殖技术是当前生物工程中应用最广泛,最有效的技术和方法,在园艺、农林、药用植物种植生产得到广泛的应用。

长期以来,在植物组织培养中一直是以糖作为植物体的碳源,我们把它称之为有糖培养微繁殖(sugar-containing micropropagation),它与无糖培养微繁殖技术的根本区别在于碳源的供给方式不同而引起植株生理、形态、生长、发育方面的许多的不同,在以后的章节中,我们将进行详细的论述。植物无糖培养微繁殖技术是在植物组织培养技术研究的基础上发展起来并用于工厂化生产的技术。无糖培养微繁殖的目标是在短时间内获得大量的遗传基础相同、生理一致、生长发育正常、无病无毒的群体植株。要求植株有高的光合能力或光独立生长能力(能利用空

气中的 CO_2 作为主要的碳源);在简陋的温室中能成活,生长成本低,能进行自动化环境控制和很少的人工操作。

二、光自养微繁殖(Photoautotrophic micropropagation)

光自养微繁殖技术或者说无糖培养微繁殖(sugar-free micropropagation)技术是指容器中的小植株在人工光照下,吸收 CO_2 进行光合作用,以完全自养的方式进行生长繁殖。其特点在于:采用人工环境控制手段,用 CO_2 代替糖作为植物体的碳源,提供最适宜植株生长的光、温、水、气、营养等条件,促进植株的光合作用,从而促进植物的生长发育和快速繁殖。它适用于所有植物的微繁殖,是植物组织培养的一种全新的概念,是环境控制技术和组织培养技术的有机结合。

1. 光自养繁殖

光自养微繁殖有狭义和广义两种定义。

(1)狭义的光自养微繁殖

一种没有任何有机物作为有机体生长的营养成分的营养方式称之为自养微繁殖。在这个狭义的定义下,光自养微繁殖的培养基应除去所有的有机成份。正如水耕法一样,光自养培养基由无机营养构成。微生物、生长激素、和凝胶状的物质不能加入培养基中。在光自养微繁殖中,多孔的物质例如蛭石被用作培养质基。

(2)广义的光自养微繁殖

除了糖之外,可以使其它的有机物质作为有机体生长的营养成分的营养方式称之为广义的光自养微繁殖。换言之,培养基中不加入糖,用 CO_2 代替糖作为植物体的碳源,而其他的有机物,例如琼脂,植物生长激素可以加入到培养基中。

光自养微繁殖和无糖培养微繁殖这两个术语常常被混淆误

用,任何含叶绿素的细胞、组织、器官、植株在一般条件下,使用含糖的培养基,都能进行兼养生长。

2. 容器中小植株的营养方式

(1) 自养

当叶绿素植物仅仅使用 CO_2 作为碳源时,称之为自养。 CO_2 固定的过程称之为光合作用。在光自养的情况下,植株仅依靠无机营养生长,或者说没有碳水化合物例如糖的供给。绿色植物只有生长在没有任何碳水化合物供给,完全依赖于光合作用的情况下时,其营养方式才能称为自养。

(2) 异养

当植物或组织生长在有碳水化合物供给作为碳源,而且不依靠光合作用的情况下,称为异养。异养是培养物依赖于外源碳水化合物(例如培养基中的糖)作为唯一能源的营养方式。

(3) 兼养

当植物生长在有 CO_2 和碳水化合物供给的条件下,不仅使用内源的碳水化合物,而且也使用外源的碳水化合物作为能源的营养方式。不管培养基中的糖的含量多或少,只要叶绿素的培养物是生长在含糖的培养基中,都可以归属于兼养。

第三节 无糖培养微繁殖技术的特点

一、 CO_2 代替了糖作为植物体的碳源

碳素营养是植物生命的基础,在一般的有糖培养微繁殖中,小植物是以糖(例如蔗糖、果糖、葡萄糖和山梨糖等)作为主要碳源进行异养或兼养生长,糖被看作是植物组织培养中必不可少的物质。无糖培养微繁殖是以 CO_2 作为小植株的唯一碳源进行

自养生长。

二、环境控制促进植株的光合速率

在传统的组织培养中,很少对植株生长的微环境进行研究,研究的重点是放在培养基的配方以及激素的用量和有机物质的添加上;而成功的光自养微繁殖是建立在对培养容器内环境控制的基础上,提高小植株的光合速率是提高植株生长率的主要途径,为了促进容器内小植株的光合速率,必须了解容器内的环境条件。例如容器中的光照强度和 CO_2 浓度以及如何保持在最佳的范围内,最大限度地提高植物的光合速率。

三、使用多功能大型培养容器

在传统的组织培养中,由于培养基中糖的存在,为了防止污染,一般使用或者说只能使用小的培养容器。而无糖培养可以使用各种类型的培养容器,小至试管,大至培养室,因为无糖培养可以将其污染降至最低。

四、多孔的无机材料作为培养基质

在传统的组织培养中,常常使用凝胶状的物质,如琼脂、卡那胶等作为培养基质。而无糖培养主要是采用多孔的无机物质,例如:蛭石、珍珠岩、砂等作为培养基质。

五、闭锁型培养室

传统组织培养中的培养室是半开放型的,有许多明亮的窗户以利于阳光直接进入培养室;而无糖培养采用的是闭锁型的培养室,无窗户,全部采用人工光源,墙壁加了保温层,以便不受外界环境的干扰,能周年进行稳定的生产。

第四节 植物有糖培养微繁殖技术存在的问题

植物微繁殖技术是组织培养在生产中应用最为广泛和最有效的一项生物技术,也是快速繁殖植物新品种的重要方法。从理论上计算,植物组培快繁的繁殖率很高,扩繁速度可比常规方法快数万倍到数百万倍。种苗繁殖速度可用公式计算: $Y = m \times X^n$ (Y —一年繁殖数, m —无菌母株数, X —每个培养周期增殖的倍数, n —全年可增殖的周期次数)。

从公式看出,种苗繁殖速度是以几何级数增殖的。然而,由于培养基中糖的存在,操作过程中的污染损失、材料变异、生长不良、培养瓶内植株的生根率低、驯化期间较高的死亡率等,每一步的损失加起来,数字是惊人的。因此植物组培快繁实际的产出率远远低于理论值,这是造成较高生产成本的重要原因,也是植物组培快繁技术在商业化的应用中,仍然受到一定限制的重要原因。

一、污 染

在传统有糖微繁殖中,小植株主要依靠培养基中的糖作为碳源。由于培养基中糖的存在,从而导致了一系列问题的发生。首先是污染存在于整个组培快繁生产中的每一个环节,污染是指在组培过程中,由于真菌、细菌等微生物的侵染,在培养容器内滋生大量的菌斑,使培养材料不能正常生长和发育的现象。培养基中的糖是造成污染的主要原因。培养基中含有高浓度的糖,微生物如细菌和真菌一旦接触培养基,其生长速度比培养的组织快得多,最终导致培养物之死。污染微生物还可能排泄对植物组织有毒的代谢废物。在一般的微繁殖中,预防污染是一项艰巨

而重要的工作,需消耗大量的人力和物力,能否有效控制微生物污染是关系到种苗工厂成败的关键。

二、只能使用小的培养容器

在一般的组培快繁中,由于培养基中糖的存在,污染在培养过程中随时可见,防不胜防,为了减少微生物的污染,人们不得不使用封闭的、小的培养容器以减少微生物感染的机率,例如,试管、三角瓶、罐头瓶等,培养容器的容积一般在 5~350ml 之间,目前生产中大部份使用的是 200ml 左右的培养容器。在生产中,人们发现,在同样的培养条件下,大容器中生产的植株比小容器中生长的好,但大容器的污染率高于小的培养容器;并且随着培养容器的增大污染率逐渐增加。在大多数情况下,培养容器是用盖子和塑料薄膜密封,小植株生长在不透气的、高温、高湿的环境条件下,极易导致植株的生长发育不良,甚至死亡。而且由于小培养容器的使用,需要消耗大量的劳力用于瓶子的清洗、培养基的分装、灭菌、接种。而且需要一定的空间放置空瓶子,瓶子的破损随时发生,每年需补充一定数量的瓶子。在小的培养容器中,环境控制系统的开发是困难的,从而给生产带来很多的不便。

三、组培苗瘦弱或徒长

由于使用密封的小培养容器,容器内的环境与植株自然生长环境的差异极大,导致小植株叶片表层结构发育差,气孔开闭功能不强,叶片小,叶绿素含量降低,最终抑制和降低了小植株的光合作用能力;并且还导致了植株生理、形态上的紊乱,难以适应的种类会生长发育延缓或死亡。有的种类会出现植株生长细弱,叶片舒展度差,生根不良,后期驯化阶段植株死亡率较

高。例如：在过高的温度条件下，植株节间伸长速度快，叶片变薄、变长、组培苗特别细弱。光照不足，组培苗会在短时间内变黄、变弱，变细。湿度过高，通气不良，除了引起玻璃化的发生外，还会引起植株徒长瘦弱。

四、玻璃化

玻璃化是试管苗的一种生理失调症状，当植物材料进行离体繁殖时，有些培养物的嫩茎、叶片往往会出现半透明状和水渍状，这种现象即称为玻璃化。玻璃化使试管苗生长缓慢、繁殖系数下降。呈现玻璃化的试管苗，其茎、叶表无蜡质，体内的极性化合物水平较高，细胞持水力差，无法进行正常移栽。这种情况主要是由于培养容器中空气湿度过高，透气性较差造成的。植株生长的环境条件不良是造成玻璃化苗的主要原因。

温度：温度主要影响苗的生长速度，温度升高时，苗的生长速度明显加快，高温达到一定限度后，对植株正常的生长和代谢产生不良影响，促进玻璃化的产生；变温培养时温度变化幅度过大，或忽高忽低容易在瓶内壁形成小水滴，增加瓶内湿度，提高玻璃化发生率。

湿度：包括瓶内的空气湿度和培养基的含水量。瓶内湿度与通气条件密切相关，使用有透气孔的膜或通气较好的滤纸、牛皮纸封口时，通过气体交换瓶内湿度降低，玻璃化发生率减少。相反，如果用塑料或铁皮瓶盖、不透气的封口膜、锡箔纸封口，不利于气体的交换，瓶子内处于不透气的高湿条件下，苗的生长势快，但玻璃化的发生频率也相对较高。一般来说在单位容积内，培养的材料越多，苗的长势越快，玻璃化出现的频率就越高。

光照时间：增加光照强度可以促进光合作用，提高碳水化合物含量，使玻璃化的发生比例降低。光照不足再加上高温，极