

环境调控对甘薯组培苗光合自养和叶片超微结构的影响

崔 瑾¹, 徐志刚², 李式军³, 丁为民⁴, 丁永前⁴

(¹南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; ²南京农业大学农学院, 南京 210095;
³南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ⁴南京农业大学工学院, 南京 210032)

摘要: 以甘薯组培苗为材料, 在特定CO₂浓度, 光合光量子通量密度(PPFD)和相对湿度(RH)条件下, 研究其生长发育状况和叶片的超微结构。与传统培养方式相比, 在环境因子CO₂浓度、PPFD和RH分别调控为800~875 μmol·mol⁻¹、250 μmol·m⁻²·s⁻¹和75%~85%的条件下, 组培苗的叶片数、茎粗、单株鲜重、叶鲜重、叶面积、根鲜重、叶绿素含量和根系活力显著提高。无论培养基中是否有添加蔗糖, 环境调控方式下培养的组培苗, 叶片下表皮细胞的气孔大多数处于开放状态, 气孔的开度最大达50 μm; 叶肉细胞中的叶绿体数目多、体积大, 形状较为规则, 基粒片层的层数较多, 片层垛叠也相对整齐、紧密。结果证明, 环境调控技术的应用显著提高再生植株的光合自养能力, 促进生长发育。

关键词: 甘薯; 组培; 环境调控; 光合自养; 叶片; 超微结构

Effect of Environmental Control on Photoautotrophy and Leaf Ultrastructure of Plantlet *in vitro* of *Ipomoea batatas* (L.) Lam

CUI Jin¹, XU Zhi-gang², LI Shi-jun³, DING Wei-min⁴, DING Yong-qian⁴

(¹College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ³College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;
⁴College of Engineering, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210032)

Abstract: Carbon dioxide concentration, photosynthetic photon flux density(PPFD) and relative humidity in tissue culture environment were controlled at 800–875 μmol·mol⁻¹, 250 μmol·m⁻²·s⁻¹ and 75%–85% to study the development and leaf ultrastructure of plantlets *in vitro* of *Ipomoea batatas* Lam. Results showed that the leaf number, stem diameter, plantlet fresh weight, leaf fresh weight, leaf area, root fresh weight, chlorophyll content and root vigour of plantlets *in vitro* cultured in the controlled environment were improved obviously. Whatever the medium contained sugar or not, most of the stomata of plantlets growing in controlled environment were open, and its maximum was 50 μm, the number and size of chloroplast, grana and lamella were increased. Application of the technique of environmental control would improve the photoautotrophic ability and developmental level of plantlets *in vitro* significantly.

Key words: *Ipomoea batatas*(L.) Lam; Tissue culture; Environment control; Photoautotrophy; Leaf; Ultrastructure

越来越多的研究发现, 许多具叶组培植株在离体条件下也有很强的光合自养能力, 只要CO₂浓度、光合光量子通量密度(PPFD)和相对湿度(RH)等组培环境因子调控适当, 组培苗在无糖培养基中也能生长发育良好^[1]。因此, 在组培快繁生产中应用环境调控技术, 不仅是一项有效地促进组培植株生

长发育的新途径, 也是实现组培苗低成本、高效益、大规模生产的必然发展趋势。

国外学者已研究出应用组培环境调控技术实现规模化无糖组织培养的模式。如Kozai等研究发现, 与传统组培方式相比, 运用环境调控技术生产的组培苗具有生长发育迅速、整齐性好、移栽

收稿日期: 2003-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830230)和江苏省科委“九五”攻关资助项目(BE96340)

作者简介: 崔瑾(1974-), 女, 讲师, 博士, 主要从事植物生物技术科研及教学。Tel:025-84395473; E-mail:cuijin91@yahoo.com.cn

成活率高等优点^[1,2]。国内亦有学者研究环境因子对组培苗生长的影响^[3,4]，但还没有设计出专门的调控装置，实现对各环境因子的准确、有效控制。作者对以前设计制作的监控系统^[5~7]进行技术改进，增加了稀土元素荧光灯补光设备、流量调节阀、流量传感器和气体干燥循环系统，从而能够实现对培养箱中CO₂浓度、PPFD和RH的调控。本文在环境调控条件下，研究甘薯组培苗在生根培养阶段的生长发育状况以及叶片超微结构，旨在通过应用本系统实现环境调控，促进组培植株的光合自养能力和商品质量提高，为环境调控应用于大规模组培快繁提供理论模型和实践依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及处理

1.1.1 材料 供试甘薯品种为台湾叶用甘薯 [*Ipomoea batatas*(L.) Lam]，以茎尖培养而成的组培苗为试材，剪下具2~3片叶的组培苗茎节段作为外植体。试验设4个处理：有糖处理(A组)、无糖处理(B组)、有糖对照(C组)和无糖对照(D组)。每处理接种10瓶，每瓶接种4个外植体，均以MS为基础培养基，不添加任何生长调节物质，琼脂浓度为6 g·L⁻¹，培养容器为透明、罐形玻璃瓶，空气容积310 ml，硫酸纸密封瓶口。A、C组培养基成分中蔗糖含量为10 g·L⁻¹，B、D组为0 g·L⁻¹。

1.1.2 环境条件 A、B组置培养箱中，利用CO₂监控系统^[8]，使培养箱中CO₂浓度调控在8 650~8 750 μmol·mol⁻¹^[6]，玻璃瓶中CO₂浓度800~875 μmol·mol⁻¹^[6]；利用稀土元素荧光灯补光设备使培养箱的侧向PPFD控制在250 μmol·m⁻²·s⁻¹；利用气体干燥循环系统使培养箱内的相对湿度控制在75%~85%。C、D组(对照)置于传统培养室的培养架上，由普通日光灯提供光照，PPFD为46 μmol·m⁻²·s⁻¹，CO₂浓度约210 μmol·mol⁻¹^[5]，培养室的光周期为12 h·d⁻¹，CO₂浓度约500 μmol·mol⁻¹，相对湿度65%~80%^[8]。培养室和培养箱的温度均为(25 ± 2) °C。

1.2 组培苗主要生长指标、叶绿素含量和根系活力测定

各处理培养25 d后，全部取出，分别随机测10株组培苗的叶片数、株高、茎粗、单株鲜重、叶鲜重、根鲜重及干重。然后用丙酮提取法测定组培苗叶片中叶绿素a、b含量^[9]，再用TTC法测定根系活力^[10]。每处理重复3次，取平均值。

1.3 电镜观察

1.3.1 扫描电镜观察叶片气孔 于10:00左右选取组培苗顶端向下第3片叶，切下叶片主脉两侧1cm×1cm小块，迅速投入预冷的3%戊二醛中，用注射器反复抽真空，使叶片沉底，置于4°C冰箱中固定12 h，自然干燥，喷镀金属膜，在Hitachi S-450型扫描电镜下观察、拍照。每处理观察10个以上视野。

1.3.2 透射电镜观察叶片叶绿体 材料的选取及固定过程同上，但块大小约1mm×1.5mm。从冰箱中取出后，经过一系列的磷酸缓冲液清洗、钨酸固定、乙醇脱水、浸渍、环氧树脂包埋、聚合、修块、切片、染色，制作成超薄切片，在JEM-100X II型透射电镜下观察、拍照。每处理观察10个以上视野。

2 结果与分析

2.1 环境调控对甘薯组培苗生长的影响

如图版I和表1所示，不同处理对组培苗生长状况影响显著。A、B 2组的组培苗叶色浓绿，叶面积大，茎秆粗壮，根系发达，B组的侧根数少一些。C组叶片黄绿，叶面积小，根系细弱。D组叶片黄绿，每个植株只有3~4片叶，1~2条短根。在叶片数、茎粗、单株鲜重、叶鲜重、叶面积和根鲜重6项指标中，A和B组之间差异不显著，A、B组与C、D组之间差异显著，而在株高和干重2项指标中，A组显著高于其它3个处理，B、C组显著高于D组。

2.2 环境调控对甘薯组培苗叶片叶绿素含量和根系活力的影响

叶绿素a、b、a+b含量以及根系活力由高向低排列的顺序依次为A、B、C、D，并且各处理之间的差异均达显著水平。其中有糖处理(A)比有糖对照(C)叶绿素b含量高59%，根系活力高122%，而无糖处理(B)比无糖对照(D)叶绿素b含量高269%，根系活力高1 409% (表2)。

2.3 环境调控对甘薯组培苗叶片超微结构的影响

2.3.1 不同处理对甘薯组培苗叶片气孔的影响 扫描电镜的观察结果表明，4个处理组培苗叶片下表皮细胞的气孔密度和大小差异不大，但A、B组气孔大多数处于开放状态，气孔的开度最大达50 μm，而C组的气孔开度明显缩小，多数处于半关闭或关闭状态，D组气孔绝大多数处于关闭状态(图版II)。

2.3.2 不同处理对甘薯组培苗叶绿体的影响 透射电镜观察结果发现，经环境调控处理的A、B组植株叶肉细胞中的叶绿体数目、形状和片层结构与对

表 1 不同处理组培苗主要生长指标差异比较¹⁾

Table 1 Comparison of major growth index in different treatments

处理 Treatment	叶片数 Number of leaf	株高 Height of plantlet(mm)	茎粗 Stem diameter (mm)	单株鲜重 Fresh weight of plantlet(g)	叶鲜重 Fresh weight of leaf(g)	叶面积 Leaf area (cm ²)	根鲜重 Fresh weight of root(g)	干重 Dry weight (mg)
A	11.1a	47.1a	2.3a	1.57a	0.57a	3.91a	0.42a	279.5a
B	13.5ab	29.1b	2.2a	1.25a	0.53a	3.45a	0.27ab	94.1b
C	9.6b	25.5b	1.04b	0.51b	0.20b	1.97b	0.11bc	71.9c
D	3.6c	7.6c	0.44c	0.07b	0.03b	0.86c	0.01c	17.8d

¹⁾ 不同小写字母表示新复极差测验显著差异 ($P < 0.05$)。A. 有糖处理, B. 无糖处理, C. 有糖对照, D. 无糖对照。下同

The small letters express significant at $P < 0.05$ by new multiple range test. A. With sugar and environmental control; B. Without sugar but with environmental control; C. With sugar but without environmental control; D. Without sugar and environmental control. The same as below

表 2 不同处理组培苗叶片叶绿素含量和根系活力的差异比较

Table 2 Comparison of chlorophyll content and root vigour in different treatments

处理 Treatment	叶片色泽 Leaf color	叶绿素 a+b 含量 Chlorophyll a+b(mg·g ⁻¹ FW)	叶绿素 a Chlorophyll-a (mg·g ⁻¹ FW)	叶绿素 b Chlorophyll-b (mg·g ⁻¹ FW)	根系活力 Root vigour(TTF μ g·g ⁻¹ FW·h ⁻¹)
A	深绿 Dark green	0.574a	0.436a	0.132a	0.3372a
B	深绿 Dark green	0.473b	0.371b	0.096b	0.2657b
C	黄绿 Yellow green	0.384c	0.296c	0.083c	0.1518c
D	黄绿 Yellow green	0.118d	0.091d	0.026d	0.0176d

照 C、D 2 组差异明显 (图版 II)。A、B 组叶绿体数目多, 大多数为 4~6 个, 体积较大, 形状为规则的半卵圆形或半椭圆形, 内含淀粉粒较多, 基粒片层的层数较多, 片层垛叠也相对整齐、紧密。而对照 C、D 组中叶绿体数目明显减少, 一般 2~4 个, 体积小, 形状为不太规则的弯月形或半圆形, 几乎不含淀粉粒; 基粒片层稀少, 垛叠松散。尤其是 D 组的叶绿体数目更少, 内含物也少, 体积更小, 基粒片层薄, 难以观察。

3 讨论

试验结果表明, 与传统培养方式相比, 在环境调控方式下培养的甘薯组培苗, 具有生长迅速、光合产物积累明显、叶色深绿、根系发达等特点, 在反映植株生长状况的主要指标上显著高于对照。

较高的叶绿素 b 含量及较多的捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体, 有利于植物对光能的吸收和利用, 叶绿素 b 含量增加, 对于基粒数及基粒片层数目的增加有相当大的作用^[11]。根系活力反映根系对营养物质的吸收与合成能力, 根系活力强弱直接影响植物个体的生命活动。结果表明, 实施环境调控可以显著提高组培苗叶绿素含量和根系活力, 促进植株生长发育。A 和 B、C 和 D 之间的显著差异说明培养基中少量添加蔗糖对组培苗的光合作用有利, 这与 Desjardins 的研究结果一致^[12], 但是在 B 和 C 之间的显著差异说明蔗糖对组培苗生长的影响小于环境

调控对组培苗生长的影响。

有研究认为, 叶片的光合速率大、消耗 CO₂ 多, 使细胞内 pH 增高, 淀粉磷酸化酶水解淀粉为葡萄糖-1-磷酸, 细胞内葡萄糖浓度增高, 水势下降, 副卫细胞的水分进入保卫细胞, 气孔开度增大^[13]。尤华明等^[14]研究发现, 施用营养液后可使毛竹叶片的气孔开度、大小和密度增大, 增强毛竹的蒸腾、光合及呼吸作用, 增加有机物质的积累和传导, 有效促进毛竹的生长发育。本试验结果发现, 无论培养基中是否有蔗糖, 在环境调控方式下培养的组培苗, 叶片下表皮细胞气孔大多数处于开放状态, 气孔开度最大达 50 μm, 而传统方式下培养的组培苗气孔开度明显减小, 甚至处于关闭状态。但未发现对气孔密度和大小有明显影响。

叶绿体是植物光合作用的主要场所, 叶绿体数目和大小反映了植物的光合能力。魏珉等^[15]的研究发现, CO₂ 促进黄瓜叶片和叶绿体的发育, 叶肉细胞内叶绿体、淀粉粒数目增加, 体积增大, 基粒数和片层数增加, 并认为叶片显微结构的变化可能是对高浓度 CO₂ 的适应, 以提高对光能和环境 CO₂ 的吸收利用能力。许守民等^[16]研究发现, 大豆叶片叶绿体基粒片层数与光合速率呈正相关。本文透射电镜观察结果发现, 与传统培养方式相比, 经环境调控处理的组培苗叶片细胞中的叶绿体数目多、体积大, 形状较为规则, 淀粉粒增加, 基粒片层的层数较多, 片层垛叠也相对整齐、紧密。进一步证

明实施环境调控技术显著提高了组培植株的光合能力。

作者认为,利用本文的环境调控系统可以建立各种组培植株不同生长阶段的环境调控模式,并应用于大规模无糖组织培养。与传统有糖组织培养相比,利用环境调控技术不仅能够促进组培植株光合自养,缩短培养周期,降低污染率,提高组培苗商品质量和驯化成活率,降低生产成本^[17],而且由于工业CO₂气体价格低廉,补光及降湿设备运行成本较低,因此,在大规模无糖组织培养中运用该项技术将取得良好的经济效益。

References

- [1] Toyoki K, Chieri K, Byoung R J. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 51: 49-56.
- [2] Toyoki K, Hiroshi O, Kazuhiro F. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 22: 205-211.
- [3] 肖玉兰, 张立力, 张光怡, 韩亚平, 赵家聪. 非洲菊无糖培养技术的应用研究. *园艺学报*, 1998, 25 (4): 408-410.
Xiao Y L, Zhang L L, Zhang G Y, Han Y P, Zhao J C. Application of sucrose-free tissue culture in *Gerbera jamesonii* propagation. *Acta Horticulturae*, 1998, 25 (4): 408-410. (in Chinese)
- [4] 郭延平. 草莓离体试管苗光合作用的研究. *果树科学*, 2000, 17 (3): 202-206.
Guo Y P. Studies on photosynthesis of strawberry plantlets *in vitro*. *Journal of Fruit Science*, 2000, 17 (3): 202-206. (in Chinese)
- [5] 崔瑾, 丁永前, 李式军, 丁为民, 徐志刚, 杨旭东. 增施CO₂对葡萄组培苗生长发育和光合自养能力的影响. *南京农业大学学报*, 2001, 24 (2): 28-31.
Cui J, Ding Y Q, Li S J, Ding W M, Xu Z G, Yang X D. Effect of CO₂ enrichment on the growth and photoautotrophic capability of grape (*Vitis L.*) plantlet *in vitro*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24 (2): 28-31. (in Chinese)
- [6] 崔瑾, 徐志刚, 李式军, 丁为民, 丁永前. CO₂浓度和光合光子通量密度对叶用甘薯组培苗光合自养和过氧化物酶活力的影响. *应用与环境生物学报*, 2003, 9 (5): 482-484.
Cui J, Xu Z G, Li S J, Ding W M, Ding Y Q. Effect of CO₂ concentration and photosynthetic photo flux density on photoautotrophic capability and peroxidase activity of *Ipomoea batatas* Lam *in vitro*. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2003, 9 (5): 482-484. (in Chinese)
- [7] 徐志刚, 丁为民, 崔瑾, 李式军. 组培室补光光源应用分析与评价. *农业机械学报*, 2001, 32 (5): 62-64.
Xu Z G, Ding W M, Cui J, Li S J. Analysis and evaluation of electrical lights in tissue culture works. *Journal of Agricultural Machinery*, 2001, 32 (5): 62-64. (in Chinese)
- [8] 徐志刚. 组培微环境与规模化育苗设施环境调控的研究. *南京农业大学博士学位论文*, 2002: 78.
Xu Z G. Research on micro-environmental of micro-propagation and environmental control facilities for large-scale plant tissue culture. Ph. D. Dissertation, Nanjing Agricultural University, 2002: 78. (in Chinese)
- [9] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 95-96.
Shanghai Institute of Plant Physiology of Chinese Academy of Science, Shanghai Society for Plant Physiology. *Experimental Guider of Modern Plant Physiology*. Beijing: Science Press, 1999: 95-96. (in Chinese)
- [10] 白宝璋, 金锦子, 白 菘, 黄丽萍. 玉米根系活力TTC测定法的改良. *玉米科学*, 1994 (2) 4: 44-47.
Bai B Z, Jin J Z, Bai S, Huang L P. Improvement of TTC method determining root activity in corn. *Maize Science*, 1994, (2) 4: 44-47. (in Chinese)
- [11] 甄 伟, 张福墀. 弱光对黄瓜功能叶片光合特性及超微结构的影响. *园艺学报*, 2000, 27 (4): 290-292.
Zhen W, Zhang F M. The effects of low light intensity on photosynthetic characteristics and ultrarstructure of cucumber functional leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27 (4): 290-292. (in Chinese)
- [12] Desjardins Y, Laforge F, Lussier C, Gosselin A. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Horticulturae*, 1988, (230): 45-53.
- [13] 叶小利, 李学刚, 陈时洪, 王 强. 表面活性剂对大豆叶面气孔和蜡质层的影响研究. *大豆科学*, 2000, 19 (1): 49-56.
Ye X L, Li X G, Chen S H, Wang Q. The effects of surfactants on stomata and epicuticular wax structure of soybean. *Soybean Science*, 2000, 19 (1): 49-56. (in Chinese)
- [14] 尤华明, 刘金福, 刘迎春. 施用营养液对毛竹叶片气孔超微结构的影响. *林业科学*, 2001, 37 (专刊1): 162-166.
You H M, Liu J F, Liu Y C. Applied nutrient solution effect on ultrastructure of stoma of leaves of *Phyllostachys heterocyclus* cv. *pubescens Scientia Silvae Sinicae*, 2001, 37 (Suppl. 1): 162-166. (in Chinese)
- [15] 魏 珉, 邢禹贤, 王秀峰, 马 红. CO₂加富对黄瓜叶片显微和亚显微结构的影响. *园艺学报*, 2002, 29 (1): 30-34.
Wei M, Xing Y X, Wang X F, Ma H. Effects of CO₂ enrichment on the microstructure and ultrastructure of leaves in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29 (1): 30-34. (in Chinese)
- [16] 许守民, 苗以农, 姜秋艳, 胡阿林, 佟德娟, 王英典, 朱长甫, 刘学军. 大豆不同生殖生长期不同冠层光合活性差异与叶片结构关系探讨. *作物学报*, 1992, 18 (3): 191-195.
Xu S M, Miao Y N, Jiang Q Y, Hu A L, Tong D J, Wang Y D, Zhu C F, Liu X J. Relationship between leaf photosynthetic activity and the structure of leaves at different position during reproduction growth phase. *Acta Agronomica Sinica*, 1992, 18 (3): 191-195. (in Chinese)
- [17] 崔瑾. 芋脱毒快繁体系的构建以及组培苗无糖培养的研究. *南京农业大学博士学位论文*, 2002: 88.
Cui J. Key techniques and mechanism in construction micropropagation system of virus-free taro (*Colocasia esculenta* L.) and study on sugar-free tissue culture. Ph. D. Dissertation, Nanjing Agricultural University, 2002: 88. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)