

微环境调控对半夏无糖组培苗光合自养的影响*

占艳, 王荔**, 陈疏影, 杨艳琼, 和世平
(云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 以半夏叶片通过组织培养产生的不定芽为材料, 应用植物无糖组培快繁技术, 研究探讨了不同光照强度、不同光照时间对半夏无糖组培苗光合生理的影响。结果表明: 当光照强度在 $37.5 \sim 112.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围内, 半夏无糖组培苗净光合速率、光合色素含量与光照强度呈正相关; 随着光照强度的增加, 半夏无糖组培苗的蒸腾速率逐渐下降、气孔导度也逐渐减小; 随着光照强度增强, 半夏无糖组培苗的生长速率明显加快。无糖组培苗苗高、叶面积、主根数及须根数与有糖组培苗相比均显著增加, 且无糖组培苗长出大量须根, 而有糖组培苗无须根。

关键词: 半夏; 无糖组织培养; 光照强度; 光周期; 光合生理

中图分类号: S 567.239.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2009)04-0539-06

Effect of Microenvironment Control on the Photoautotrophic Growth of Plantlet in Sugar-free Tissue Culture of *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.

ZHAN Yan, WAGN Li, CHEN Shu-ying, YANG Yan-qiong, HE Shi-ping

(College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In this research, adventitious bud of *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. was used as material to study the effect of different light intensities and photoperiods on the photophysiology of leaf and root of plantlet in sugar-free tissue culture of *P. ternate*. The result showed that the photosynthetic rate and chlorophyllous contents of plantlet in sugar-free tissue culture of *P. ternate* plantlet increased obviously with the increase of light intensity [$37.5 \sim 112.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]; the transpiration rate and stomatal condance of plantlet in sugar-free tissue culture of *P. ternate* was lower than that in sugar tissue culture (CK); the rate of growth of the plantlet of *P. ternate* in sugar-free tissue culture increased significantly. The area of leaf and the numbers of root and fibrous increased obviously. While CK had no fibrous, the plantlet in sugar tissue culture had weaker root system.

Key words: *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit; sugar-free tissue culture; light intensity; photoperiod; photophysiology

半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 为天南星科 (Araceae) 南星亚科半夏属多年生草本植物, 又名麻芋头、麻芋子、天落星、野芋头等^[1]。中国产 7 种, 除 *P. ternate* (Thunb.) Breit. 外, 其余 6 种为中国特有。我国半夏野生资源分布广泛, 除内蒙、新疆、青海、西藏未见野生外, 其余各省均有分布, 以云南所产半夏质量优

良, 久负盛名, 为国内外药商所青睐^[2,3]。无糖组培快繁技术是由日本千叶大学的古在丰树教授 20 世纪 80 年代末发明, 它是一种全新的植物组织培养技术, 是环境控制技术和组织培养技术的有机结合。它以 CO_2 代替糖作为植物体的碳源, 利用工程技术手段调节组培微环境的空气、光照、温度、湿度等影响因子, 促进植物光合作用, 使

收稿日期: 2009-01-18 修回日期: 2009-03-20

* 基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2005C0034M)。

作者简介: 占艳 (1983-), 女, 湖南人, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物遗传的研究。

** 通讯作者 Corresponding author: 王荔, 教授, 博士生导师。E-mail: Wangli5820840@yahoo.com.cn

组培植物由兼养型转变为自养型,提高植物的光合自养能力,从而促进植物的生长发育^[4-6]。肖玉兰、王荔、李宗菊、屈云慧等应用无糖组培技术,分别对非洲菊、彩色马蹄莲、情人草、红掌、灯盏花、满天星等植物的进行了研究^[7-10]。但目前,该项技术在药用植物方面的应用,除本课题组报道外尚未见其它报道^[10-12]。

1 材料与方 法

1.1 不同光照时间对半夏无糖组培苗生长发育影响

材料:半夏叶片产生的不定芽

实验设计:设 3 个不同光照时间处理:处理 I (10 h/d)、处理 II (12 h/d)、处理 III (14 h/d)、处理 IV (16 h/d) 附加自配基质、营养液 (1/4MS 营养液,除去有机元素,除去糖)、基质中加入已经筛选出的最佳激素浓度配比 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L IAA,光照强度 [112.5 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], CO_2 浓度 (1 200 ~ 1 500 $\mu\text{mol}/\text{mol}$)、温度 [(24 \pm 2) $^\circ\text{C}$] 进行培养,每个处理接种一苗盘 (50 cm \times 30 cm \times 8 cm) 每盘接种 150 颗不定芽并设 3 次重复,以有糖组培 (CK) 光照时间 14 h/d 为对照,筛选出利于半夏无糖组培苗生长的最佳时间长度。

观察记录:不定芽接种到苗盘培养 28 d 时,统计半夏苗的苗高、根长、地上部分和地下部分的干重。

1.2 不同光照强度对半夏无糖组培苗光合生理影响

材料:半夏叶片产生的不定芽

实验设计:设 3 个不同光照强度处理:光强 I [37.5 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], 光强 II [75 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], 光强 III [112.5 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], 附加自配基质、营养液 (1/4MS 营养液,除去有机元素,除去糖),基质中加入已经筛选出的最佳激素浓度配比 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L IAA,光照

时间, CO_2 浓度 (1 200 ~ 1 500 $\mu\text{mol}/\text{mol}$), 温度 [(24 \pm 2) $^\circ\text{C}$] 进行培养,每个处理接种一苗盘 (50 cm \times 30 cm \times 8 cm) 每盘接种 150 颗不定芽,并设 3 次重复,以有糖组培 (CK) 光照强度 [37.5 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 为对照,研究不同光照强度对半夏无糖组培苗光合生理的影响。

观察记录:不定芽接种到苗盘培养 28 d 时,对其进行各项生理指标的测定包括:叶绿素含量,净光合速率,蒸腾速率,气孔导度^[13,14]。

2 结果与分析

2.1 不同光照时间对半夏无糖组培苗生长发育影响

由表 1, 图 7, 图 8 可知,在光期 14 h、暗期 10 h 条件下,半夏无糖组培苗根壮、苗壮,单株鲜重达 2 212.32 mg/株,是有糖组培苗的 6.2 倍,干重也达最大 303.23 mg/株,是有糖组培苗的 5.8 倍;且半夏无糖组培苗长出大量须根,有糖组培苗无须根。说明此条件是最适合半夏生长的光周期,也是最适合半夏块茎生长的光周期。光照时间过短,半夏无糖组培苗发育不良;光照时间过长,半夏无糖组培苗地上部分陡长而影响根系的生长。

由表 1, 7, 8 可知,在光期 14 h,暗期 10 h 条件下,半夏无糖组培苗根壮、苗壮,单株鲜重达 2 212.32 mg/株,是有糖组培苗的 6.2 倍,干重也达最大 303.23 mg/株,是有糖组培苗的 5.8 倍;且半夏无糖组培苗长出大量须根,有糖组培苗无须根。说明此条件是最适合半夏生长的光周期,也是最适合半夏块茎生长的光周期。光照时间过短,半夏无糖组培苗发育不良;光照时间过长,半夏无糖组培苗地上部分陡长而影响根系的生长。

2.2 不同光照强度对半夏无糖组培苗光合生理和生长速率的影响

2.2.1 不同光照强度对半夏无糖组培苗净光合速率 (Pn) 的影响

表 1 不同光照时间对半夏无糖组培苗生长发育的影响

Tab. 1 Effect of different photoperiods on the growth rates of *P. ternate* plantlet cultured in sugar-free tissue among

处理 treatment	光照时间/(h · d ⁻¹) photoperiod	苗高/cm seeding height	须根数/条 fibre number	最长主根根长/cm length of the longest root	单株鲜重/mg fresh individual weight	单株干重/mg dry individual weight
I	10	8.3	23	5.6	1 206.31	196.37
II	12	10.6	35	6.1	1 789.40	227.13
III	14	12.6	67	12.6	2 212.32	303.23
IV	16	12.2	49	8.6	2 004.76	225.32
CK(有糖 sugar tissue)	14	5.1	0	2.8	358.44	52.42

表 2 不同光照强度对半夏无糖组培苗各项光合生理指标的影响

Tab. 2 Effect of different light intensities on the photosynthetic physiology indexes of *P. ternate* plantlet cultured in sugar-free tissue

处理 treatment	光照强度/ [$\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$] light intensity	CO ₂ 浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) CO ₂ concentration	叶绿素含量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) chlorophyll content	净光合速率/ [$\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$] synthetic rate (Pn)	蒸腾速率/ [$\text{mmol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$] transpiration rate	气孔导度/ [$\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$] stomatal conductance
I	37.5	1 200 ~ 1 500	1.98	6.97	3.35	0.18
II	75	1 200 ~ 1 500	2.15	9.84	2.71	0.15
III	112.5	1 200 ~ 1 500	2.54	12.32	1.49	0.11
CK(有糖 sugar tissue)	37.5	330	1.85	2.63	4.43	0.22

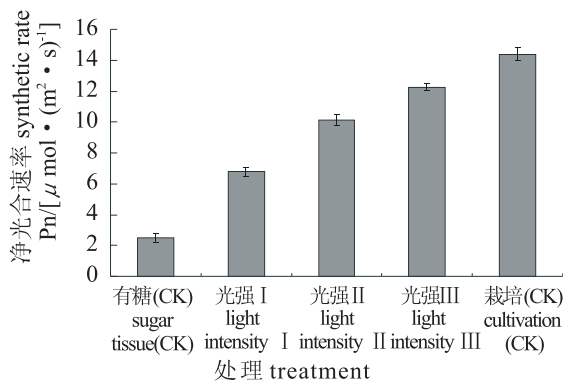


图 1 不同光照强度对半夏无糖组培苗净光合速率 (Pn) 的比较

Fig. 1 Effect of different light intensities on Pn of *P. ternate* plantlet cultured in sugar-free tissue

从表 2, 图 1 可以看出, 随着光照强度的增强, 半夏无糖组培苗的净光合速率 (Pn) 显著上升, 且无糖组培各个处理的净光合速率 (Pn) 都高于有糖组培 (CK) 的净光合速率 $2.63 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光强 III 处理与自然栽培苗的净光合速率 $14.33 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 较接近。研究表明, 光环境是影响组培苗光合作用的主要因素之一, 适度提高光照可使半夏无糖组培苗更好地光合自养, 从而提高自身的净光合速率。

2.2.2 不同光照强度对半夏无糖组培苗光合色素含量的影响

从表 2 可以看出, 随着光照强度的增加, 半夏无糖组培苗的叶绿素含量也随之增加, 光照强度与叶绿素含量呈正相关, 当光照为 $112.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时叶绿素含量最高, 各个处理的叶绿素含量都高于有糖组培苗 (CK)。说明增加光照强度对半夏无糖组培苗叶绿素含量的提高效果显著。

2.2.3 不同光照强度对半夏无糖组培苗蒸腾速率的影响

从表 2, 图 2 可以看出, 随着光照强度增强,

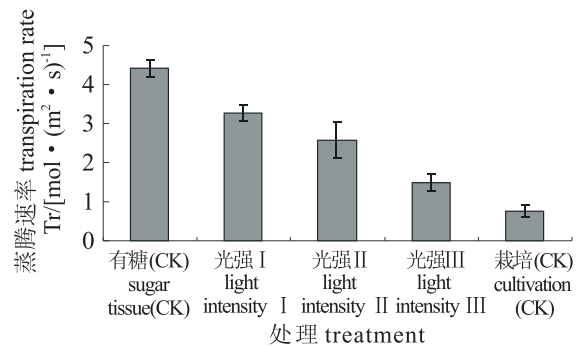


图 2 不同光照强度对半夏无糖组培苗蒸腾速率的影响
Fig. 2 Effect of different light intensity on the transpiration rate of plantlet in sugar-free tissue culture of *P. ternate*

蒸腾速率下降。由于有糖组培的封闭环境不利于气体的流动交换, 半夏苗生理活动产生的热量被局限在很小的空间中, 使半夏机体温度上升; 为了降低自身温度, 半夏有糖组培苗蒸腾速率剧增。而无糖组培通过增强光照强度和 CO₂ 浓度、强制性通气等微环境调控措施, 使蒸腾速率趋于缓和。所以在本研究中无糖组培各个处理的蒸腾速率远低于有糖 (CK) 的蒸腾速率。

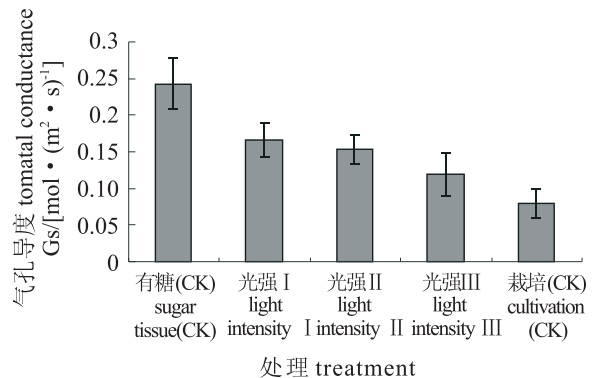


图 3 不同光照强度对半夏无糖组培苗气孔导度的影响
Fig. 3 Effect of different light intensity on the stomatal conductance of plantlet in sugar-free tissue culture of *P. ternate*

2.2.4 不同光照强度对半夏无糖组培苗气孔导度的影响

从表 2、图 3 可以看出，随着光照强度增强，半夏组培苗的气孔导度逐渐减小，无糖苗各个处理的气孔导度都比有糖苗（CK）气孔导度小。且其中光强Ⅲ气孔导度与自然栽培苗（CK）差异最小。气孔是植物气体交换和水分蒸发的主要通道，

植物通过调节气孔导度来调节机体内部与外界之间的蒸腾压力差。因此，适当的气孔导度代表植物良好的机体内环境。本研究结果表明，随着光照强度的增强，无糖组培苗的机体内环境趋于改善。

2.2.5 不同光照强度对半夏无糖组培苗生长速率的影响

表 3 不同光照强度对半夏无糖组培苗生长速率的影响

Tab.3 Effect of different light intensities on the growth rate of *P. ternate* plantlet cultured in sugar-free tissue

处理 treatment	光照强度/ [$\mu\text{mol} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$] light intensity	苗高/cm seedling height	叶面积 4.0 cm ² 以上 的叶片数/片 the number of leaves whose leaf areas are above 4.0 cm ²	须根数/条 fibre number	主根数/条 root number	最长主根根长/cm length of the longest root
I	37.5	7.6	3	32	8	3.1
II	75	8.2	4	44	11	6.6
III	112.5	13.5	6	68	20	13.4
CK	37.5	4.7	0	0	5	2.5

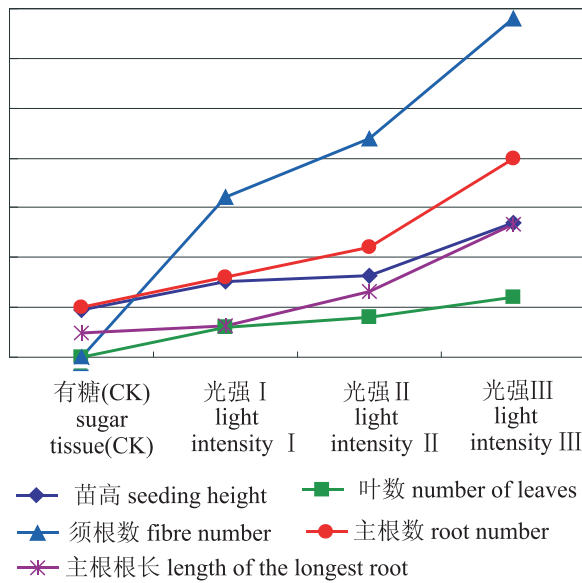


图 4 不同光照强度下半夏无糖组培苗生长速率的比较
Fig. 4 Comparison of growth rates of *P. ternate* plantlet cultured in sugar-free tissue among different light intensities

从表 3，图 4，图 7，图 8 可以看出，随着光照强度的增强，无糖组培苗其株高、叶面积及主根数与有糖组培苗相比差异明显。且半夏无糖组培苗长出大量须根，有糖组培苗无须根。

由图 4 可以看出，随着光照强度的增强，无糖组培苗各项指标都有显著提高，且都高于有糖苗（CK），说明了随着光照强度增强，半夏无糖

组培苗的生长速率明显加快。研究表明，光照强度对半夏无糖组培苗生长发育影响显著。



图 5 不同光照时间的半夏无糖培养
Fig. 5 *Pinellia* cultured in sugar-free tissue under different photoperiods

3 讨论

3.1 不同光照时间对半夏无糖组培苗生长发育的影响

光照时间即光周期，光周期对植株的生长影响十分显著，光期和暗期的长短对植株的生长影响很大，对于大多数植物来讲每天 14 ~ 16 h 的光照，8 ~ 10 h 的暗期即可满足生长发育的要求^[15~18]。本研究表明，当光照时间在 14 h，单株鲜重达 2 212.32 mg/株，是有糖组培苗的 6.2 倍，干重也达最大 303.23 mg/株，是有糖组培苗的



图6 不同光照强度的半夏无糖培养
Fig. 6 *Pinellia* cultured in sugar-free tissue under different light intensities



图7 同苗龄半夏无糖苗与有糖苗的比较
Fig. 7 Comparison between the seedlings cultured in sugar-free tissue and sugar tissue



图8 同龄半夏无糖苗与有糖苗根、茎、叶的比较
Fig. 8 Comparison of root, stem and leaf between the seedlings cultured in sugar-free tissue and sugar tissue seedling age

5.8倍; 即光期14h, 暗期10h能促进半夏根系的生长。

3.2 不同光照强度对半夏无糖组培苗净光合速率(Pn)的影响

植物无糖组培技术的基本原理就是采用环境控制的手段, 人为调节光照和补充CO₂, 为组培苗提供适宜的环境条件, 促进植物的光合作用, 从而促进植株的生长发育^[22]。无糖组培的培养基中去除了蔗糖, 小植株在强光照条件下, 以培养箱中高浓度CO₂为碳源, 进行自养生长, 大大提高了植株的光合自养能力。本研究结果

表明, 光照强度在37.5~112.5 μmol/(m²·s)范围内, 随着光照强度的增强, 半夏无糖组培苗的净光合速率(Pn)显著上升。强光照有效提高了半夏无糖组培苗的光合能力和对环境的适应能力。

3.3 不同光照强度对半夏无糖组培苗蒸腾速率和气孔导度的影响

气孔是植物叶片与外界环境间气体、水分交换的通道, 气孔导度表征这一通道的通畅程度。较大的气孔导度虽然有利于叶内外CO₂, O₂等气体的转换, 能促进光合作用, 但也会因蒸腾速率过大而使水分散失过快, 导致植物其他更多生理功能的减弱, 因此气孔导度应维持在一个适宜的范围^[19~22]。本研究结果表明, 无糖组培通过微环境调控光照、CO₂浓度和湿度, 使组培苗不需要很高的气孔导度就能获得所需的气体交换量。同时, 也提高了气孔开闭的自我调节能力, 随着光照强度增强, 半夏无糖组培苗的蒸腾速率下降、气孔导度逐渐减小。从而有效的提高了无糖组培苗适应自然环境的能力, 使无糖组培苗在移栽时有较强的保水能力, 可以迅速适应自然栽培环境下水分散失速率快的状况, 从而提高组培苗的大田移栽成活率^[14]。而有糖组培苗长期处于高湿、低CO₂浓度的环境中, 气孔长期处于开放状态, 逐步丧失了自我调节能力^[24,25]。所以当有糖组培苗进行移栽时, 过高的气孔导度及蒸腾速率使苗极易失水而导致枯萎死亡, 这也是有糖组培苗大田移栽后成活率低的主要原因^[13,24]。

3.4 不同光照强度对半夏无糖组培苗生长速率的影响

无糖组织培养过程中半夏以CO₂代替糖作为碳源植株以自养方式进行生长, 不同于有糖组织培养中植物以兼养方式进行生长, 在无糖组培的整个过程中人为对组培容器内环境的光照, 温度, 湿度, CO₂浓度等的控制使半夏的光照利用率加强光合速率大大加强从而生长速率也大大提高。无糖组培苗其株高、叶面积及根长与有糖组培苗相比均明显增加, 其株高是有糖组培苗的3倍、叶面积是4倍、根长是5倍, 且无糖组培苗长出大量须根, 而有糖组培苗无须根。说明: 随着光照强度增强, 半夏无糖组培苗的生长速率明显加快。

[参考文献]

- [1] 中国医科学院药物研究所. 中药志 (第 2 册, 第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 38.
- [2] 侯典云, 王荔, 杨艳琼, 等. 半夏不同居群的细胞学研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2005, 20 (2): 159-162
- [3] 郭巧生. 半夏研究进展 [J]. 中药研究与信息, 2000, 2 (10): 15-20.
- [4] KOZAI T, CHERI, BYOUNG R J. Environmental Control for the Large-scale Production of Plants Through in Vitro Techniques [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 51: 49-56.
- [5] KOZAI T, HIROSHI O, FUJIWARA K. Photosynthetic Characteristics of Cymbidium Plantlet in Vitro [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 22: 205-211.
- [6] 杨武振, 王荔, 侯典云, 等. 无糖组织培养技术研究进展 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2004, 19 (3): 239-242, 254.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 杨凯, 王荔, 杨艳琼, 等. 灯盏花不定芽无糖生根培养的微环境调控技术研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2007, 22 (3): 319-322.
- [11] 陈疏影, 王荔, 杨艳琼, 等. 微环境调控对灯盏花无糖组培苗显微结构的影响 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2007, 22 (2): 183-187.
- [12] 杨艳琼, 王荔, 陈疏影, 等. 不同光照强度对灯盏花无糖组培苗生长发育的影响 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2007, 22 (3): 323-326.
- [13] 叶尚红. 植物生理生化实验教程 [M]. 昆明: 云南科技出版社. 2004: 116-120.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [15] JONES G E. Chromosomen Numbers and Phylogenetic Relationships in the Araceae [J]. *Diss Abstr*, 1957, 17: 2394.
- [16] SKOOG F, MILLER C O. Chemical Regulation of Growth and Formation in Plant Tissues Cultivated in Vitro [M] // *The Biological Action of Growth Substances*, Symposium of Society of Experimental Biology XI, 1957: 118-191.
- [17] KOZAI T, KITAYA Y, KUTOTA C. Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation [J]. Chaila University Press, 1995, (3): 591-947.
- [18] 刘弘, 李保印, 马杰, 等. 紫叶桃、绿叶桃光合特性及其影响因素研究 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32 (2): 318-320
- [19] KOZAI T, FUJIWARA K, KITAGA Y. Modeling, Measurement and Control in Plant Tissue Culture [J]. *Acta-Horticulturae*, 1993, 343: 68-78.
- [20] JIANG G M, HE W M. Species and Habitat Variability of photosynthesis, Transpiration and Waater use Efficiency of Different Plant Species in Maowusu Sand Area [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41 (10): 1114-1124.
- [21] 楼程富. 桑树不同含水量与光合速率、蒸腾强度及气孔阻力间的关系 [J]. 蚕业科学, 1984, 10 (3): 129-133.
- [22] 王建林, 于贵瑞, 王伯伦, 等. 北方粳稻光合速率、气孔导度对光强和 CO₂ 浓度的响应 [J]. 植物生态学报, 2005, 29 (1): 16-25.
- [23] LEUNING R. Modeling Stomatal Behavior and Photosynthesis of Eucalyptus Grandis [J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1990, 17: 159-175.
- [24] BAI X F, JIANG X M, ZHU J J. Studies on the Photosynthetic Characteristics of Taro Test-tube Plantlets after Transplantation [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32 (3): 518-520.
- [25] CAO Z Y, LI W, WANG X S. Effect of ABA and Environmental Factors on the Degree of Stomatal Opening in Grape Leaf in Test Tube [J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1993, 19 (4): 371-378.
- [26] NIU G, KOZAI T. Simulation of the Growth of Potato Plantlets Cultured Photoautotrophically in Vitro [J]. *Transactions of American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 1997, 40: 255-260.