

杨 涛,钱 蕾,吕永桂,等. 丰花月季低成本组织培养快繁的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):53-55.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.017

丰花月季低成本组织培养快繁的研究

杨 涛¹, 钱 蕾¹, 吕永桂¹, 陶洪波², 王立荣³, 龚束芳¹

(1. 东北农业大学园艺学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 江苏省徐州市铜山区林业技术指导站, 江苏徐州 221110;
3. 黑龙江省大庆市大同区八井子乡政府, 黑龙江大庆 163515)

摘要:为降低丰花月季组织培养的生产成本,提高经济效益,从配制培养基的原料、初代培养器皿的类型进行了选择性试验。试验结果,用塑料试管(透气)来代替玻璃三角瓶(50 mL)、沉淀白开水代替蒸馏水、20 g/L 白砂糖代替 30 g/L 蔗糖、省略熬制环节直接添加卡拉胶配制的培养基,对丰花月季进行组织培养无显著的影响,幼苗生长健康状况相似。结果表明,在规模化扩繁丰花月季组培苗时,用试管进行初代培养,初代和继代培养基原料中大量使用的水、糖可以使用沉淀白开水和普通白砂糖替代蒸馏水和高纯度蔗糖,同时将熬制和高压灭菌环节合并,培养效果相近,但生产成本显著降低。

关键词:丰花月季;组织培养;快繁;低成本

中图分类号:S685.120.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)08-0053-03

寒地丰花月季是近几年培育出的丰花月季新品种系列。具有能够在黑龙江地区露地越冬、花期长、耐粗放管理特点,亟需大量的苗木以进入推广应用环节。但是,通过一般的扦插繁殖,不仅繁殖速度慢、效率低、种苗易退化,而且成苗率受季节、插穗质量、插穗位置、基质、温度等诸多因素的影响,难以在相对较短的时间内获得大量种苗。因此,采用组织培养的方式进行快速繁殖是推动寒地丰花月季尽快推广应用的首选繁殖方法。然而,现有较成熟的丰花月季组织培养方案存在成本过高的问题,只有降低扩繁过程中的各项成本投入,才能在实际应用中产生更大经济效益、社会效益和生态效益。

本着节约成本、减少投入,同时提高生产效率,为丰花月季提供规模化生产模式的目的,本研究以寒地丰花月季“粉-A”为试验材料,通过对初代培养使用的器皿类型以及继代增殖阶段对培养基配制环节和配制原料的使用进行选择性的试验,寻找适宜丰花月季低成本组织培养快繁的生产模式,为丰花月季规模化、工厂化组织培养生产提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为丰花月季“粉-A”,由东北农业大学园林植物应用课题组提供。

1.2 培养条件

试验应用的常规培养基中水质为蒸馏水,碳源为 30 g/L 的蔗糖,卡拉胶浓度为 6.5 g/L,初代和继代的培养基配方均为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L,pH 值 5.8~6.0,

培养条件温度(25±2)℃,光照时长 10~12 h/d,光照度 1 500~2 000 lx。

1.3 试验方法

1.3.1 培养容器对丰花月季组织培养降低成本的效应 设计初代培养容器单因素试验,2 个因素分别为:(1)带盖透气塑料试管(直径 5 mL,长 15 mL);(2)玻璃三角瓶(50 mL)。每个处理接种 30 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次。统计单位面积容器的摆放数量,20 d 后统计其初代培养的污染率、芽苗生长情况,30 d 后统计培养基失水、开裂的有效时间。培养基为常规培养基。

1.3.2 水质对丰花月季组织培养的影响 设计水质单因素试验,4 个因素分别为:(1)蒸馏水;(2)自来水;(3)白开水;(4)沉淀白开水(自来水煮沸,静置 2~3 h 后,取上层液)。每个处理接种 30 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次。检测不同水质的 pH 值、电导率,观察培养基外观,60 d 后统计其继代的生长情况。培养容器为 50 mL 玻璃三角瓶,培养基中除水质外,其他为常规培养基配方。

1.3.3 碳源对丰花月季组织培养的影响 碳源的单因素试验中 2 个因素分别为:(1)蔗糖;(2)白砂糖。蔗糖浓度为 30 g/L,白砂糖浓度 3 个水平分别为 30、20、10 g/L。其他培养条件相同,30 d 统计其污染率,60 d 统计其继代的生长情况。培养容器为 50 mL 玻璃三角瓶,培养基中水质为沉淀白开水。

1.3.4 溶胶方式对丰花月季组织培养的影响 (1)传统培养基:在培养液中添加卡拉胶后进行加热熬制,至卡拉胶全部溶解后,对每一个培养容器进行定量分装,高压灭菌后,取出自然冷却。(2)不熬制培养基:先将定量的卡拉胶 6.5 g/L 均匀地添加进去,再将培养液均匀倒入每个培养容器中,按量定容,进行高压灭菌后,取出自然冷却。

初代培养每个塑料试管培养基定量为 5 mL,卡拉胶含量为 0.033 g,50 mL 玻璃三角瓶培养基定量为 20 mL,卡拉胶含量为 0.13 g。继代培养中每个 100 mL 玻璃方瓶培养基定量

收稿日期:2015-02-28

基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划项目(编号:WB13B102)。

作者简介:杨 涛(1980—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士,实验师,从事园林植物与应用研究。

通信作者:龚束芳,博士,教授,从事园林植物生理及生态研究。

E-mail:gongsf1971@163.com。

为 40 mL,卡拉胶含量为 0.26 g。其他培养条件相同,观察培养基的外观、平均凝固时间和软硬程度,60 d 统计继代的生长情况。培养基中水质为沉淀白开水,碳源为 20 g/L 白砂糖。

2 结果与分析

2.1 培养容器对丰花月季组织培养降低成本的效应

传统植物组织培养中,多以玻璃三角瓶为培养容器,最大优点是透光性好,一般使用于科学研究。但是,三角瓶占用空间大,并需要较多的培养基,在大批量生产中会相应增加生产成本。

本试验以 50 mL 玻璃三角瓶为对照,用塑料试管对丰花月季进行初代培养试验,培养容器对丰花月季组织培养,可有效降低生产成本(表 1)。

表 1 不同培养容器对丰花月季组织培养的效果

容器	摆放数量 (个/m ²)	每容器培养基 体积(mL)	污染率 (%)	培养基有效时间 (d)	原料价格 (元/个)	生长情况
玻璃瓶	289	20	10.6	25~30	3.5	芽苗健壮
塑料试管	1 000	5	3.4	35~40	0.8	芽苗健壮

从表 1 可以看出,用试管代替三角瓶作为初代培养容器对丰花月季初代芽的生长状况无显著影响;但由于试管的占用空间小,在同样单位面积的组培架上的摆放量是三角瓶的

3.46 倍,1 m² 可多摆放 711 棵苗;试管盛装的培养基仅为三角瓶的 25%;初代组培苗的污染率试管容器比三角瓶降低了 68%,可能与口径及培养基表面积较小有关;同时,由于试管盛装的培养基深度较大,在相同时间内配制的培养基的有效时间,试管要比三角瓶长 10 d 左右;另外,用试管代替三角瓶作为初代培养容器,容器价格由原来的 3.50 元降至 0.80 元,每个试管成本为三角瓶的 22.86%。

带盖试管在丰花月季组培生产的初代培养中进行应用,不仅可以提高单位面积的摆放数量,减少培养基用量,降低污染率,降低容器成本,由于用带盖塑料试管接种初代月季外植体时,省去了用三角瓶接种时拆掉和固定封口膜的时间,可以在单位时间内接种更多的外植体。在丰花月季规模化、工厂化生产中可极大地提高工作效率,节省空间,降低成本。

2.2 水质对丰花月季组织培养的影响

在组织培养中,蒸馏水制备是费时、费工、费电的过程,在试验阶段用量较少时购买蒸馏水比较合算,但是在规模化生产中购买或制备蒸馏水配制培养基成本都会极大提高,如果自来水经过简单处理能够作为基质水源使用,无疑是最经济合理的。

本试验以蒸馏水为对照,分别用自来水、白开水、沉淀白开水配制培养基进行丰花月季的组培试验,不同水质对丰花月季生长的影响见表 2。

表 2 不同水质对丰花月季组培苗生长的影响

水质	pH 值	电导率 (μS/cm)	培养基外观	生长情况		
				壮度	叶色	长势
蒸馏水	6.61	4.8	透明、无色	健壮	深绿色	旺盛
自来水	6.79	961.0	半透明,大量白色絮状沉淀	细弱	黄色	较弱
白开水	7.44	789.0	透明,少量白色絮状沉淀	细弱	微黄色	较弱
沉淀白开水	7.62	663.0	透明、无色	健壮	绿色	旺盛

从表 2 可以看出,不同水质的 pH 值从低到高依次为蒸馏水、自来水、白开水、沉淀白开水;水质 pH 值的大小对组培苗生长无影响,用蒸馏水和自来水配制培养基时,需加碱能达到规定 pH 值;用白开水和沉淀白开水配制培养基时,需加酸能达到规定 pH 值。电导率测量主要用来检测水的纯净度,是检测水中离子杂质的一种有效、简便和可靠的方法^[1]。从不同水质的电导率可以看出,自来水中的离子杂质最多,蒸馏水离子杂质含量极少;使用蒸馏水和沉淀白开水配制的培养基均为透明、无色且无杂质沉淀,二者对组培苗的生长、叶色

和长势也都有利,植株生长较好。自来水在不添加任何药剂的情况下进行高压灭菌,会在瓶壁上产生大量白色水垢,影响瓶壁的透光性,因此将自来水煮沸,使杂质沉淀,取上层液用于配制培养基效果较好。

2.3 碳源对丰花月季组织培养的影响

碳源在组织培养试验中消耗量较大,传统培养基需要蔗糖 30 g/L,是培养基中支出较大的部分。本试验以 30 g/L 蔗糖为对照,分别用 30、20、10 g/L 白砂糖配制培养基进行丰花月季的组培试验,不同碳源对丰花月季生长的影响见表 3。

表 3 不同碳源对丰花月季组培苗生长的影响及成本比较

碳源	含量 (g/L)	污染率 (%)	生长情况			原料价格 (元/L)	成本比率与 对照比较
			壮度	叶色	长势		
蔗糖	30	10.0	健壮	深绿色	旺盛	1.5	1.00
白砂糖	30	10.5	健壮	深绿色	旺盛	0.3	0.20
白砂糖	20	5.3	健壮	绿色	旺盛	0.2	0.13
白砂糖	10	4.0	细弱	微黄	较弱	0.1	0.07

蔗糖和白砂糖的成分几乎相近,是葡萄糖和果糖脱水化合而成的还原性二糖。培养基中的糖,无论是蔗糖还是白砂糖都是先转化为葡萄糖再为月季的分化所吸收利用^[2]。白砂糖的市场价为蔗糖的 1/10,大大节约了月季组织培养的生产成本。糖是各种微生物生殖繁衍的碳源,一旦被微生物侵染,很快在培养基上繁殖造成污染,使组织培养的成本上升,

不利于规模化生产^[3]。从表 3 可以看出,当碳源为 10 g/L 白砂糖时,污染率最低,但是组培苗叶片颜色偏黄,苗细弱,长势较弱;碳源为 30 g/L 蔗糖、30 g/L 白砂糖时,组培苗的叶片均为深绿色,苗生长健壮,长势旺盛,污染率较高,蔗糖成本高;碳源为 20 g/L 白砂糖时,植株生长健壮,叶片绿色,长势旺盛,污染率偏低,成本较低。

研究结果表明,组织培养苗长期依赖外源糖,叶片表皮结构发育不良,叶片小,叶绿素含量降低,丧失光合作用能力或光合作用受到抑制,影响组织培养苗的质量^[4]。适当降低糖(碳源)浓度,有利于提高组培苗的质量、降低污染率。综合考虑上述因素,在丰花月季规模化、工厂化组织培养中,在对组培苗影响不大的情况下应尽量用较低的糖浓度。

2.4 溶胶方式对丰花月季组织培养的影响

传统配制培养基时,在添加卡拉胶后需要进行加热熬制,目的是为了将卡拉胶完全溶解于培养液中,有利于培养基的凝固,但是在大量生产月季组培苗时,熬制培养基是耗费时间

和能源的过程。

本试验以传统熬制培养基的方法为对照,与在溶液中添加培养基原料后直接进行高压灭菌,省略了熬制过程的培养基进行继代生长状况比较,不同溶胶方式对组培苗生长的影响见表4。

从表4结果可以看出,用2种方式配制培养基,无论是培养基外观、平均凝固时间、软硬度还是植株叶色、长势都较一致,对试验结果无不良影响。由此可见,在培养基配制过程中,溶液中添加卡拉胶后直接进行高压灭菌的方式是可行的,可以为丰花月季规模化、工厂化组织培养生产简化操作程序,节省能源,提高培养基配制效率。

表4 不同溶胶方式对丰花月季组培苗生长的影响

溶胶方式	外观	培养基状况		生长情况		
		平均凝固时间(min)	软硬度	壮度	叶色	长势
熬制培养基	透明、无色、无沉淀	15~20	适中	健壮	深绿色	旺盛
未加热培养基	透明、无色、无沉淀	15~20	适中	健壮	深绿色	旺盛

3 与结论与讨论

在继代增殖培养中,组培苗需要增殖分化,如果选用塑料试管(透气)作为培养容器空间太小,会影响组培苗的生长,因此塑料试管(透气)只适合作为月季组培的初代培养容器。曾有人利用密封的塑料袋来代替玻璃容器进行草本植物的继代培养,而对于月季这样的木本植物,密封的塑料袋易变形,不利于组培苗营养的吸收。可用果酱瓶和普通玻璃瓶来代替三角瓶作为继代培养容器。那宁馨等用果酱瓶等小罐头瓶替代三角瓶培养芦荟^[5],程丽芬用广口果酱瓶代替三角瓶培养珍稀阴生观叶花木^[6],李江等用玻璃瓶代替三角瓶培养樱桃^[7],均不会影响组培苗的增殖和生长。因此对于培养容器来说,只要容器空间大小适宜,透光性好是最重要的选择条件。

从碳源角度降低培养成本,无糖培养无疑是最佳选择。李宗菊等用无糖培养基,在强光高CO₂浓度条件下,小植株增重生长显著^[8],表明在外界增施CO₂的前提下,一些组织培养苗可以在少糖或无糖的培养基中生长得更好。但是,培养过程中提高培养环境的CO₂浓度需要密闭性极好的空间,这种措施的实际操作性还有待进一步完善。

本试验中在培养基不熬制的情况下,为做到快速准确,添加卡拉胶需要找出容积正好为5、20、40 mL的容器和盛装卡拉胶的量为0.033、0.26 g的盛具。本试验中通过多次试验,利用不同型号的EP管并进行适度人工修整,制作出一套适合的容器和盛具。在规模化、工厂化的组培生产中,由于培养液和卡拉胶的量是定量添加到容器中的,根据需要定制称量容器和盛具,甚至是机械化称量,都具有较高的可行性。

降低组织培养成本的其他措施:庞淑敏等用蛭石代替高成本琼脂作为马铃薯快繁培养基的支持体^[9];张和琴用蛭石固化物代替琼脂为月季生根^[10];郑加协等用不加琼脂的简化培养基对蜜宝菠萝的芽继代增殖和生根进行液体浅层培养^[11]。张继东用果酱瓶代替烧杯作接种器械冷却支架试验^[12]。培养室温度、光源和外植体不同部位的选择也是降低成本的重点考虑因素,降低或控制月季组培过程中的污染率,也是降低生产成本不可忽视的关键问题。

在进行植物组织培养规模化生产中,节约生产成本、提高生产效率的措施落实在各个环节,通过系统的规划和设计,以

最低的产能高效生产植物组培苗是完全可行的。

带盖试管代替玻璃三角瓶(50 mL)应用在丰花月季组培生产的初代培养中,单位面积的摆放数量增加为原来的3.46倍,培养基用量减少为原来的25%,并减少了68%的污染率,培养基有效时间延长了10 d左右,容器成本为原来的22.86%;用烧开后经过沉淀的自来水代替高成本的蒸馏水,价格由原来的200元/t降低为3.1元/t,在忽略污染损失的情况下,水成本降低了98.45%;选择低成本的20 g/L白砂糖代替高成本的30 g/L蔗糖为碳源,污染率降低了47%,碳源成本为原来的13%;在丰花月季组织培养配制培养基的过程中,去掉加热熬制培养基的步骤,培养基对月季组培苗生长无影响。采用上述有效措施培养效果相似,成本可大幅度降低。

参考文献:

[1] 张伟,袁梦琦. 解析超纯水领域的电导率测量[J]. 世界仪器与自动化,2007(5):58-60.

[2] 刘英,陈美霞,郝会军. 半夏组织培养中降低成本的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(3):983-984,987.

[3] 王秋洁,李青. 降低植物组织培养成本的研究进展[J]. 江苏林业科技,2006,33(4):42-45.

[4] 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.

[5] 那宁馨,郭晓华,齐淑艳,等. 木立芦荟和三角芦荟的组织培养和低成本快繁[J]. 沈阳农业大学学报,2001,32(2):107-109.

[6] 程丽芬. 简化培养基试验[J]. 山西林业科技,1999(3):1-4.

[7] 李江,马正炳,孙仲序,等. 植物组织培养的简化[J]. 植物生理学通讯,2003,39(4):356-358.

[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] 庞淑敏,方贵娜,周建华. 用蛭石做马铃薯快繁培养基支持体的初步研究[J]. 中国马铃薯,2003,17(5):292-293.

[10] 张和琴. 不同固化物对月季试管苗生根影响的研究[J]. 园艺学报,1991,18(2):180-182.

[11] 郑加协,李华东,甘勇辉. 蜜宝菠萝组织培养及低成本快繁技术研究[J]. 果树学报,2005,22(1):27-30.

[12] 张继东. 降低组织培养成本研究——果酱瓶代替烧杯作接种器械冷却支架试验[J]. 农业科技与信息,2009(2):60-61.