

# 植物有机营养无菌培养试验方法的研究与应用\*

吴良欢 陶勤南

(浙江农业大学, 杭州 310029)

**摘要** 本文对植物有机营养研究中无菌培养实验室的结构、功能作了描述,对有机营养无菌水培液的配制及无菌苗的筛选和培育方法作了检验。用此无菌培养试验法进行的水稻有机氮营养试验证明,水稻能直接吸收根际营养液中的氨基酸。在频繁更换营养液的培养条件下,等氮量(N 10mg/L)有机、无机氮对水稻的营养效果依次为甘氨酸态氮(无菌条件)>谷氨酸态氮(无菌条件)>铵态氮(无菌条件)>铵态氮(常规条件),反映出有机、无机氮种类及无菌、常规试验条件对水稻氮素营养的影响。

**关键词** 无菌培养方法, 无菌培养室, 氨基酸, 水稻

**中图分类号** Q945.18

除了矿质营养元素外,有机化合物形态的营养元素是否也能作为高等植物的营养来源,即植物的有机营养问题,随着土壤与植物营养科学的深入发展,相关学科如细胞生物学、分子生物学、无菌生物学等的兴起,越来越引起人们的关注<sup>[1,2]</sup>。植物有机营养要在杜绝微生物对有机营养物质分解的条件下研究,必须具备以下要求:

1. 根部环境无菌(包括容器及人工培养液)。
2. 空气中微生物很容易侵入根部环境,因此空气也需无菌。
3. 供试幼苗无菌。

以上试验条件是很难做到的,限制了有机营养理论的广泛和深入研究。参考当今国内外有关这方面的先进经验<sup>[3~7]</sup>,引进现代高新科学技术和先进材料,特别是超滤膜材料<sup>[8]</sup>,我们曾进行了一系列无菌试验条件的筛选,并根据研究结果建立了高等植物无菌培养实验室,确定了植物有机营养液的灭菌方法,得出了适于水稻种子灭菌、无菌苗培育的较佳技术。本文将对高等植物无菌培养实验室的结构和培养试验方法作一介绍,并对用此方法在水稻有机氮营养研究方面获得的一些初步结果作一简要报道。

## 1 植物无菌培养试验方法的建立

### 1.1 植物无菌培养实验室的设计和实施

1.1.1 植物无菌培养实验室的组成 植物无菌培养实验室总面积(98.3m<sup>2</sup>),主要由 10 部分组成:外室

\* 国家自然科学基金重点项目资助课题(批准号:39430090)

收稿日期:1998-01-14;收到修改稿日期:1998-05-21

(5.0m<sup>2</sup>), 更衣室 (5.0m<sup>2</sup>), 空气调温室 (10.0m<sup>2</sup>) (更衣室上层), 无菌化验室 (14.9m<sup>2</sup>), 常规分析室 (31.4m<sup>2</sup>), 气流调节室 (1.0m<sup>2</sup>), 无菌工作室 (12.8m<sup>2</sup>), 组织培养室 (15.5m<sup>2</sup>) (无菌工作室上层), 植培台 (2.7m<sup>2</sup>) 及水塔与水井等附加设施。详见实验室俯视示意图 (图 1) 及侧视示意图 (图 2)。

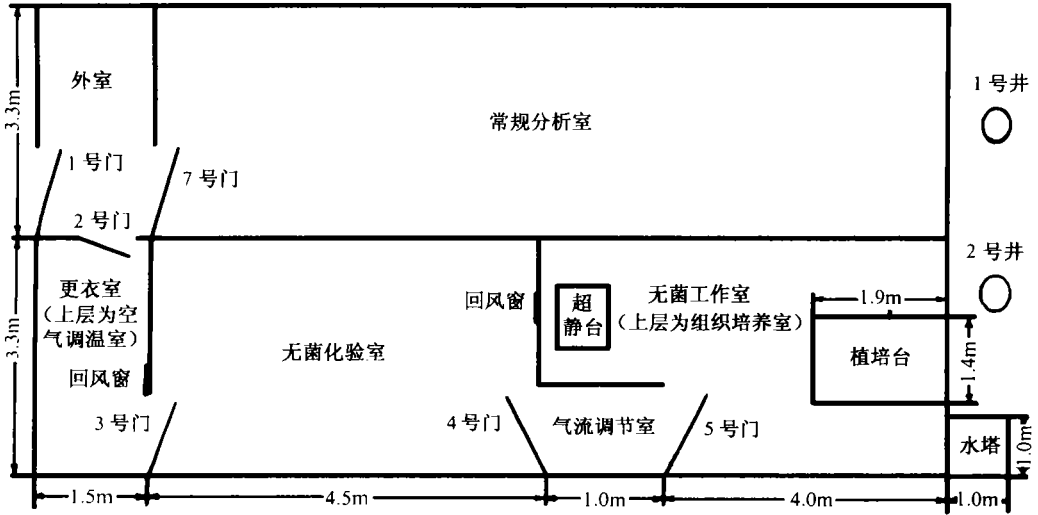
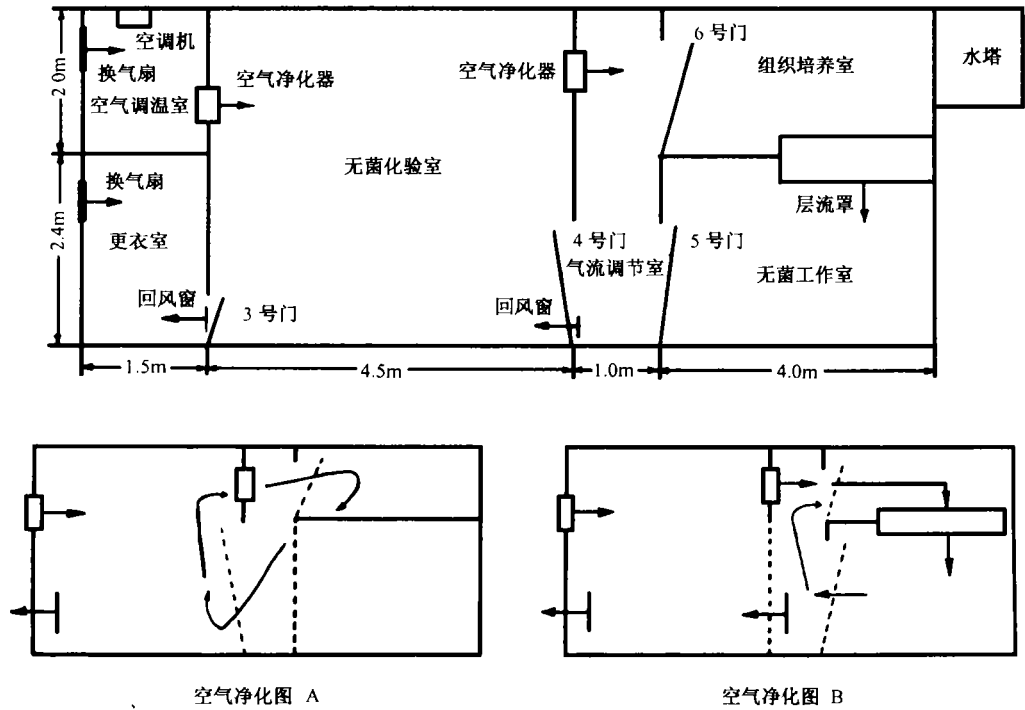


图1 植物无菌培养实验室俯视示意图

Fig.1 Vertical view of sterile laboratory for plant culture



空气净化图 A

空气净化图 B

图2 植物无菌培养实验室侧视示意图

Fig.2 Side view of sterile laboratory for plant culture

由图 1 可见, 试验人员须依次经 1 号门、2 号门、3 号门、4 号门、5 号门, 才能到达植培台, 再由图 2 可见, 室外空气由换气扇进入, 在空气调温室调节温度后, 须经过滤膜孔径皆为  $0.5\mu\text{m}$  的空气自净器和层流罩三次过滤后, 才能进入植培台, 这样能保证植培台内无菌要求, 确保植物无菌培养试验的顺利进行。

**1.1.2 植物无菌培养实验室的装置** 空气调温及净化系统: 无菌培养室的空气调温室配备有 RF7.5W 格力空调机一只, 该机冷暖二用, 控温幅度为  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。二只 ZJ-800TA 空气自净器, 其空气净化效率为  $>99.95\%$  (对于  $>0.5\mu\text{m}$  粒径的尘埃而言), 一只 JCZ-1850/1220 洁净层流罩 (据美国联邦标准 209D, 净化等级 100 级, 即对于  $>0.5\mu\text{m}$  粒径的尘埃  $\leq 3$  粒/L)。室外空气由换气扇进入, 在空气调温室调节温度, 经空气自净器过滤一次后, 先进入无菌化验室; 再经空气自净器过滤一次后, 进入组培室; 再经层流罩过滤后进入植培台, 然后进入无菌工作室。由此可见, 由无菌化验室至组培室, 再到无菌工作室的空气净化程度越来越高, 而层流罩下植培台内空气经空气自净器和层流罩三次过滤后, 可达到空气净化最高级别 100 级 (图 1)。此外, 化验室与组培室还可通过空气自净器对空气进行反复过滤而高度净化 (图 2, 空气净化图 A), 组培室与无菌工作室内空气也可通过层流罩的反复过滤而高度净化 (图 2, 空气净化图 B)。由于无菌室内还有 19 盏紫外灯可供使用, 其中更衣室 1 盏, 化验室 6 盏, 气流调节室 1 盏, 组培室 5 盏, 无菌工作室 5 盏, 植培台 1 盏。因此, 无菌培养室内空气还可通过紫外线经常定时照射而提高灭菌效果。人工照明及冷却系统: 植培台采用反光较强的不锈钢薄板隔制而成, 植物生长光源采用 6kW 水冷氙灯 (XSG6000 型长弧氙灯), 植培台面光强可达 6 万 lux, 其色温接近太阳光, 可满足植物正常生长需要。氙灯管外有水套, 其循环冷却水来自井内地下水, 井水由潜水泵自动提至水塔, 待泥沙沉淀后再流入水套, 对灯管起冷却作用。潜水泵开关由水塔水位控制, 若水位低于临界水位, 则潜水泵启动, 开始提水, 使水位上升。二口水井可一口作为提水井, 一口作为回水井, 也可提水、回水并用。冷却水还可用自来水代替, 以备自动提水控制装置或潜水泵失灵时用。用井水或自来水作冷却水时, 应注意突然断水危险 (如自动提水控制装置或潜水泵失灵, 自来水管冻结或停水维修等原因), 以免氙灯损坏。此外, 6kW 水冷氙灯的冷却水流速按规定不可低于  $5\text{L}/\text{min}$ , 出水温不可高于  $50^{\circ}\text{C}$ , 需要时地下水与自来水可同时使用, 以提高流速, 降低冷却水温, 延长灯管寿命。水冷氙灯使用 24h 左右后, 管内有大量水垢沉积, 可在进水处加浓盐酸洗涤灯管一次, 除去水垢, 确保亮度。

**1.1.3 植物无菌培养实验室的灭菌效果** 无菌室经消毒剂 (甲醛 + 高锰酸钾) 薰蒸过夜, 紫外线照射 30min, 空气过滤器开 48h 后, 灭菌效果检测如表 1。

表 1 菌检情况表明无菌室由外室向里面, 随着空气净化程度的提高, 灭菌效果越来越好, 用于培养植

表 1 植物无菌培养实验室的灭菌效果 (菌落数/皿)

Table 1 Effectiveness of sterilization of sterile laboratory for plant culture (colony numbers/dish)

外室	更衣室	无菌化验室	组培室	无菌工作室	植培台
Outside room	Changing-room	Sterile analysis room	Tissue culture room	Sterile working room	Plant culture platform
66±17	48±18	3.4±1.9	2.4±1.3	0.2±0.2	0

注: 空气取样时间 30min, 培养皿直径 9cm, 重复 5 次。

物的植培台已达无菌要求, 能满足植物无菌培养试验的需要。

## 1.2 植物有机营养无菌水培液的配制

前文<sup>[9]</sup>曾比较了几种可用于配制植物有机营养无菌水培液的灭菌方法, 包括高温灭菌、辐射灭菌、超

滤膜灭菌及精滤柱过滤法等,结果表明,超滤膜灭菌法效果最好。

本研究对该法作了进一步验证,用此法配制 N 10mg/L 的氨基酸营养液:先用高温灭菌法对营养液基质灭菌,再取浓度为 N 500mg/L 的甘氨酸,谷氨酸与谷氨酰胺母液各 20ml,分别用孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后直接加入 1000ml 无菌基质液中,配成各种氨基酸营养液。三天后用营养琼脂培养基<sup>[10]</sup>检菌,并测定营养液中氨基酸浓度,重复 6 次,结果如表 2 所示。

表2 植物有机营养无菌水培液制备方法验证试验结果

Table 2 Verification of the method for preparing sterile nutrient solution in the study of plant organic nutrition

氮源种类	灭菌率	浓度	t 值
Nitrogen sources	Sterilization rate (%)	Concentration (Nmg/L)	t value
甘氨酸	100	10.3 $\pm$ 1.6	0.47
谷氨酸	100	10.4 $\pm$ 1.5	0.73
谷氨酰胺	100	10.6 $\pm$ 2.0	0.74

由表 2 可见,采用该法配置的甘氨酸,谷氨酸与谷氨酰胺营养液不但绝对无菌,而且经 t 测验,营养液浓度实测值与理论值(N 10mg/L)也无显著差异。这说明该法适用于植物有机营养研究无菌水培液的配制。

### 1.3 水稻种子灭菌及无菌苗的培育

作者曾对供试水稻无菌苗的筛选和培育方法作过报道<sup>[11]</sup>。其主要步骤如下:

1.3.1 选种 选择发芽率高(95%以上)的纯净种子,用盐水(25%氯化钠)选种。

1.3.2 浸种 a.对活力较高的种子先用肥皂水洗净,再在自来水龙头上冲洗 24h,37℃ 无菌水浸种 24h,然后进行灭菌。b.对普通种子可先去壳,无菌水 37℃ 浸种 24h后再灭菌。

1.3.3 灭菌 用 70%酒精浸 30s、无菌水洗 3 次,继用 0.1%氯化汞浸 20min,无菌水洗 10 次。

1.3.4 无菌苗筛选及培育 种子灭菌后置平板营养琼脂培养基上,每只 9cm 培养皿放 20 颗种子,于黑暗及 37℃ 条件下培养 5d,然后在超净台上挑选无菌发芽种子,用接种针再置于平板上,每皿放 15 颗,在组织培养架内日光灯下培养 3d 后菌检。再取无菌种子用接种针逐粒种于 18 $\times$ 180mm 的试管平板或 50ml 三角瓶平板内,7d 后菌检,如发现菌落即行弃去,最后将无菌试管苗置组织培养架内日光灯下备用。

本研究以籼、粳稻种子为供试材料,去壳后,对该法作了进一步的验证。结果为籼稻“中早 5 号”的灭菌率为(69 $\pm$ 13.8)%,发芽率为(83 $\pm$ 5.7)%;粳稻“秀水 11 号”的灭菌率为(71 $\pm$ 9.8)%,发芽率为(86 $\pm$ 7.3)%。这说明该法可为水稻无菌培养试验提供大量无菌苗。

## 2 无菌培养试验方法在水稻氮素营养研究中的应用

### 2.1 水稻根际脱氨基酶活性

水稻根际营养液脱氨基酶存在与否关系到氨基酸营养试验的严密性,因脱氨基酶会引起氨基酸分解,使氨基酸态氮转化为铵态氮,从而使氨基酸态氮与铵态氮效应难以区分。为了解不同品种水稻在氨基酸态氮与铵态氮营养环境中的根际脱氨基酶活性,设以下 4 个处理:(1)籼稻,N 10mg/L 甘氨酸态氮营养液。(2)籼稻,N 10mg/L 铵态氮营养液。(3)粳稻,N 10mg/L 甘氨酸态氮营养液。(4)粳稻,N 10mg/L 铵态氮营养液。重复三次。

每盆一株, 苗龄二叶期。营养液采用国际水稻所水稻营养液配方<sup>[12]</sup>, 供试水稻品种为籼稻“中早 5 号”, 粳稻“秀水 11”, 试验盆钵采用 1000ml 三角瓶, 内盛石英砂 200g, 上覆 20×200mm 试管一只, 以保持瓶内湿度, 并允许稻苗往上生长。瓶内营养液二叶期前为 40ml, 二叶期后为 60ml。隔三天换一次营养液, 一个月后, 在超净台上取各处理根标营养液 10ml, 其中 5ml 放于 10ml 刻度试管中, 外加 5ml 浓度为 500mg/kg 的甘氨酸态氮底物, 作为反应管; 另外 5ml 放于另一只 10ml 刻度试管中, 加入 5ml 去离子水, 作为对照管, 于生化培养箱内黑暗下 37℃ 培养 24 小时后, 分别测定反应管、对照管及甘氨酸态氮底物中的铵态氮浓度。将反应管中铵态氮含量减去底物中微量铵态氮后, 再与对照管的铵态氮量比较, 即可确定水稻根际营养液的脱氨基酶活性。

为明确育苗方式及微生物对水稻根际营养液脱氨基酶活性的影响, 设 4 个处理: (1) 带胚乳稻苗有菌培养。(2) 带胚乳稻苗无菌培养。(3) 去胚乳稻苗有菌培养。(4) 去胚乳稻苗无菌培养。培养试验采用 N 4mg/L 铵态氮营养液, 供试水稻品种为籼稻“中早 5 号”, 试验方法同上。去胚乳稻苗的去胚乳时间为种子露白后三天, 也即第一次菌检结束后进行。用于测定脱氨基酶活性的各处理根际营养液来自 6 叶期稻苗用营养液按上述试验方法连续培养一周后的吸收液, 重复三次, 每盆 2 株。

2.1.1 不同基因型水稻根际营养液脱氨基酶活性 籼稻、粳稻二个品种根际营养液脱氨基酶活性测定结果如表 3。

表 3 籼稻、粳稻二个品种根际营养液不加甘氨酸(对照管)及加甘氨酸(反应管)无菌培养 24 小时后的铵态氮浓度

Table 3 Ammonium-N concentration of root nutrient solution in control tube and reaction tube (added glycine) for *indica* and *japonica* cultivar after 24 hours of sterile incubation

处理号 Treatment No.	处理内容 Treatments	对照管 Control tube N (mg/L)	反应管 Reaction tube N (mg/L)	差值 Difference N (mg/L)	t 值 t value
1	籼稻, 甘氨酸态氮	0.31±0.37	0.33±0.39	-0.02±0.09	0.38
2	籼稻, 铵态氮	4.63±0.24	4.58±0.22	-0.05±0.41	0.17
3	粳稻, 甘氨酸态氮	0.01±0.02	0.03±0.01	0.02±0.03	0.87
4	粳稻, 铵态氮	7.19±2.18	7.27±1.91	0.08±0.64	0.33

表 3 中无论是籼稻、还是粳稻, 采用无机或有机营养液栽培的水稻根际营养液对照管与反应管的铵态氮浓度差异经 *t* 测验未达显著水平。这表明在无菌培养条件下, 水稻根际营养液检测不出脱氨基酶活性, 稻根对氨基酸营养液中氨基酸的分解作用可以不予考虑。这与奥田东等试验结果相一致, 即无菌水稻根际营养液中不存在氨基酸分解酶<sup>[13]</sup>。加甘氨酸无菌培养的处理 1 与 3 对照管中的少量铵态氮可能来自根分泌, 粳稻分泌量少于籼稻, 其原因有待进一步研究。

2.1.2 育苗方式及微生物对水稻根际营养液脱氨基酶活性的影响 在低浓度铵态氮(4mg/L)无菌或有菌培养条件下, 由带胚乳及去胚乳二种种子发育的水稻根际营养液脱氨基酶活性检测结果如表 4。

*t* 测验表明, 在无菌培养下由带胚乳及去胚乳二种种子发育的水稻根际营养液对照管

表4 在低浓度铵态氮(4mg/kg)无菌或有菌培养条件下籼稻根际营养液不加甘氨酸(对照管)及加甘氨酸(反应管)培养24h后的铵态氮浓度

Table 4 Ammonium-N concentration of rice root nutrient solution from sterile and conventional water culture (N 4mg/L) in control tube and reaction tube (added glycine) for *indica* cultivar after 24 hours of incubation.

处理号	处理内容	对照管	反应管	差值	t值
Treatment No	Treatments	Control tube N (mg/L)	Reaction tube N (mg/L)	Difference N (mg/L)	t value
1	带胚乳有菌培养	1.40±1.50	6.43±1.58	5.03±1.02	8.54*
2	带胚乳无菌培养	0.52±0.71	0.87±0.64	0.35±0.59	0.03
3	去胚乳有菌培养	1.95±0.40	11.31±2.23	9.36±2.55	6.36*
4	去胚乳无菌培养	2.11±0.13	1.94±0.69	-0.17±0.56	0.49

与反应管铵态氮浓度无显著差异,即水稻根际营养液对甘氨酸的分解作用不显著,其脱氨基酶活性可以不予考虑。但在有菌培养下,这二种带胚乳及去胚乳的水稻根际营养液对甘氨酸有较为显著的分解作用,可以推断这是根际营养液中微生物酶解所致。因此,有机氮营养试验必须在无菌条件下进行,才能获得较为严密的试验结果。

## 2.2 水稻氨基酸态氮的营养效应

为确定水稻氨基酸态氮的营养效应,并明确微生物对铵态氮常规培养试验的影响,设4个等氮量(N 10mg/L)处理:1. 甘氨酸态氮营养液无菌培养。2. 谷氨酸态氮营养液无菌培养。3. 铵态氮营养液无菌培养。4. 铵态氮营养液有菌培养。重复7次,完全随机排列,供试品种为籼稻“中早5号”,每盆一株,苗龄二叶期,试验方法同上。36天后收获,分别测定干物重、活叶数、枯叶数、根长、根数、株高、顶叶叶绿素计读数(SPAD值)。结果如表5。

由表5可知,在等氮量(10mg/kg)有机、无机氮无菌培养下的水稻干物重依次为甘氨

表5 氨基酸态氮和铵态氮对水稻生理性状和生物学性状的影响<sup>1)</sup>

Table 5 Effects of amino acid-N and ammonium-N on physiological and biological characteristics of rice

处理号	干物重	株高	根数	根长	SPAD值
Treatment No.	Dry weight (mg/plant)	Plant height (cm)	Root number	Root length (cm)	SPAD value
1	6.8a A	26.1a A	20.6a A	9.7a A	33.9a A
2	4.5b B	26.5a A	12.4b B	7.1b A	25.6b B
3	3.5c C	21.2b B	12.1b B	6.4b A	24.6b B
4	2.8d C	14.7c C	9.0c B	5.8b A	9.3b C

1) 平均数后大、小写字母分别表示 $P=0.01$ 及 $0.05$ 的差异显著性水平(SSR法)。

酸态氮 > 谷氨酸态氮 > 铵态氮,其差异达到了0.01的极显著水平,这反映了氨基酸态营养对水稻干物质积累有较大的促进作用;等氮量铵态氮在无菌条件下的干物重大于有菌条件,其差异达到了0.05的显著水平,这可能是有菌条件下微生物与水稻争夺营养所致,说明了习惯上矿质营养常规培养试验结果与无菌试验有较大差异,需引起注意。

氨基酸态氮对水稻生长的促进作用在长势上主要表现在稻株高大,根系发达,根数增多及根长增长,叶色浓绿,叶绿素计读数(SPAD值)上升,尤其是甘氨酸,其株高、根数与

SPAD 值与铵态氮均有极显著差异, 显示出小分子有机氮化合物对水稻生长的良好营养效果。

氨基酸态氮处理的水稻功能叶片 SPAD 值高于铵态氮。已有试验表明 SPAD 值与作物单位面积叶片含氮量、叶绿素含量呈密切正相关<sup>[14]</sup>, 也有试验指出水稻叶片含氮量与光合速率有密切关系。随着含氮量的提高, 叶绿体数目、叶绿体表面积密度与体积密度增加, 以致叶绿体与外界能量、物质的交换界面扩大; 基粒类囊体变厚、垛叠数增多, 致使基粒圆柱体表面积及体积剧增, 而类囊体膜上光合色素叶绿素 a、b 及类胡萝卜素含量也增加, 从而提高了叶绿体光合能力; 叶片气孔导度上升, 二氧化碳供应充足, 使叶绿体的光合潜能得以充分发挥<sup>[15]</sup>。因此, 施用氨基酸态氮可改善水稻氮素营养状况, 进而促进光合作用。

**致谢** 本文承蒙中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室孙宗修研究员帮助, 中国水稻研究所育种系提供了试验种子, 谨此一并致谢。

### 参 考 文 献

1. 国家自然科学基金会编. 1994 年度国家自然科学基金项目指南. 北京: 北京大学出版社, 1993. 51~52
2. Jones D L, Darrah P R. Influx and efflux of amino acids from *Zea mays* L. roots and their implications for N nutrition and the rhizosphere. In *Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993. 91~94
3. 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌. 植物生理学通讯, 1996, 32(6):444~449
4. 吴良欢, 陶勤南. 植物营养研究中无菌培养技术应用概况与展望. 见: 张福锁、龚元石、李晓林主编. 土壤与植物营养研究新动态(第三卷). 北京: 中国农业出版社, 1995. 301~308
5. 高井康雄. 植物营养与技术(敖光明等译). 北京: 农业出版社, 1965. 463~473
6. Hewitt E J. *Sand and Water Culture Methods used in the Study of Plant Nutrition*. London: Eastern Press, 1966. 316~339
7. Haggquist M L, Svenningsson H, Olsson S, et al. Long-term culturing of plants with aseptic roots. Determination of rape root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 1984, 7:549~552
8. 郭有智, 罗克勤. 用微孔滤膜去除肝舒口服液液中杂质的研究和设计. 膜科学和技术, 1994, 14(3): 63~67
9. 吴良欢, 陶勤南. 植物有机营养无菌水培液制备方法研究. 见: 黄巧云主编. 迈向二十一世纪的土壤与植物营养科学. 北京: 中国农业出版社, 1997. 462~464
10. 李影林主编. 培养基手册. 长春: 吉林科学技术出版社. 1991. 125
11. 吴良欢, 陶勤南. 水稻有机营养试验供试无菌苗的筛选和培育方法. 浙江农业大学学报, 1997, 33(6): 711~715
12. 吉田昌一, 福尔诺 D A, 科克 J H 等编. 水稻生理学实验手册(北京市农业科学院作物研究所情报组译). 北京: 科学出版社, 1975. 57~63
13. 奥田东, 山口益郎, 慎镛吉. 水稻幼植物の無菌培養法の検討と, その利用による水稻根のフォスファターゼ活性. アシ, 酸分解酵素活性の吟味. 高等植物の生育に及ぼす有機物質の影響(第 1 報). 日本土壤肥料学雑誌 1964, 39(9):311~314
14. Wu F, Wu L, Xu F. Chlorophyll meter to predict nitrogen sidedress requirements for short-season cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Field Crops Research*, 1998, 56(3):309~314
15. 吴良欢, 陈峰, 方萍, 陶勤南. 水稻叶片氮素营养对光合作用的影响. 中国农业科学, 1995, 28(增刊):104~107

## STUDY OF STERILE CULTURE METHOD FOR RESEARCHING PLANT ORGANIC NUTRITION AND ITS APPLICATION

Wu Liang-huan    Tao Qin-nan

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310039)

### Summary

This paper describes the structure and function of plant sterile culture laboratory in details. Some key steps in plant sterile culture such as sterilization of nutrient solution and culture of aseptic seedlings were tested successfully. Results from sterile experiment for rice organic N nutrition showed that amino acid could be directly taken up by plants. The effectiveness of N sources at equal N concentration (N 10mg/L) for rice followed the order: glycine-N (sterile culture) > glutamic acid-N (sterile culture) > ammonium sulphate-N (sterile culture) > ammonium sulphate-N (conventional culture) under frequent renewal of nutrient solution in the experiment. This indicated clearly the differences among the efficiency of various organic and inorganic N compounds, and sterile and conventional growth conditions on rice N nutrition.

**Key words** Sterile culture method, Sterile culture room, Amino acid, *Oryza sativa* L.