



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102792891 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201210281953. 0

(22) 申请日 2012. 08. 09

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号

(72) 发明人 吴沿友 张开艳 杭红涛 王瑞

李海涛 刘丛强 王宝利 刘莹

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

组培苗自养份额的测定方法

(57) 摘要

本发明公开一种组培苗自养份额的测定方法,为组培过程中各种环境因子的调控,培养基组成,激素配比等提供理论依据。技术方案包含以下步骤:第一,选用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖作为有机碳源分别同时培养组培苗,并分别测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 值,甜菜蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{c1} ,甘蔗蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{c2} ;第二,测定组培苗分别在用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖为有机碳源时组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 δ_{t1} 和 δ_{t2} ;第三,将上述所得数据代入方

程: $f_B = \frac{\delta_{t1} - \delta_{t2}}{\delta_{c1} - \delta_{c2}}$, 计算出组培苗利用有机碳源

所占的份额,即异养份额 f_B ,组培苗的自养份额 f_A 就等于 $1-f_B$ 。本方法采用的步骤少,计算简单,能定量测定组培苗自养和异养份额。

1. 组培苗自养份额的测定方法,其特征是包含以下步骤:

第一,选用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖作为有机碳源分别同时培养组培苗,并分别测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 值,甜菜蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{c1} ,甘蔗蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{c2} ;

第二,测定组培苗分别在用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖为有机碳源时组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 δ_{t1} 和 δ_{t2} ;

第三,将上述所得数据代入方程:

$f_B = \frac{\delta_{t1} - \delta_{t2}}{\delta_{c1} - \delta_{c2}}$,计算出组培苗利用有机碳源所占的份额,即异养份额 f_B ,组培苗的自养份额 f_A

就等于 $1 - f_B$ 。

组培苗自养份额的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及组培苗自养份额的测定方法,属于植物生物技术领域。

背景技术

[0002] 植物的组织培养是当前生物技术中的最基本的技术和手段,现已广泛应用到园艺、农业和林业生产中。它是一种在人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件下,快速繁育植物的技术。

[0003] 在植物组织培养过程中,组培苗的生长方式有三种:一是小植株靠光合作用进行的自养生长;二是小植株靠培养基中的有机碳源进行异养生长;三是小植株既靠培养基中的有机碳源又靠人工光照,同时进行异养和自养的兼养生长。现在常规的植物组织培养快繁技术大多数是以第三种方式进行。组培苗的自养能力决定了组培苗生长的情况,仅以异养生长的组培苗,将会导致植株生理、形态上的紊乱,造成生长发育延缓或死亡,引起玻璃苗、生根困难等问题。组培苗行一定份额的自养作用是它良好地生长发育的基础。

[0004] 因此,组培苗自养份额的测定方法显得特别重要,目前虽然有用 Li-840 型 CO₂/H₂O 分析仪建立的 CO₂ 交换速率测定系统来测定组培苗的自养能力,但是测的只是瞬时的自养能力,不能代表一段时间内组培苗自养能力的情况,更不能测定出一段时间内组培苗的自养份额和异养份额。稳定碳同位素技术可以示踪营养源,因此,利用稳定碳同位素技术就可以解决以上问题。本发明的组培苗的自养和异养份额的测定方法就是基于稳定碳同位素技术。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是,提供一种组培苗自养份额的测定方法,为组培过程中各种环境因子的调控,培养基组成,激素配比等提供理论依据。

[0006] 本发明的技术方案:

它包括以下步骤:

第一,选用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖作为有机碳源分别同时培养组培苗,并分别测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 值,甜菜蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{C1} ,甘蔗蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{C2} ;

第二,测定组培苗分别在用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖为有机碳源时组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 δ_{T1} 和 δ_{T2} ;

第三,将上述所得数据代入方程:

$$f_{\text{B}} = \frac{\delta_{\text{T1}} - \delta_{\text{T2}}}{\delta_{\text{C1}} - \delta_{\text{C2}}}$$
,计算出组培苗利用有机碳源所占的份额,即异养份额 f_{B} ,组培苗的自养份额 f_{A}

就等于 $1 - f_{\text{B}}$ 。

[0007] 本发明的优点

自然界中碳元素有两种稳定同位素:¹²C 和 ¹³C,它们的天然平均丰度分别为 98.89% 和 1.11%。稳定碳同位素组成通常用 $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ 表示,自然界中 $\delta^{13}\text{C}$ 的变化为 $-90\text{‰} \sim +20\text{‰}$ 。

[0008] 在植物组织培养过程中,组培苗通常是进行兼养生长,因此,就得额外提供糖作为有机碳源。分别选用 C₃ 植物和 C₄ 植物的蔗糖作为有机碳源。C₃ 植物 δ¹³C 的变化范围为 -20‰~ -35‰, C₄ 植物 δ¹³C 的变化范围为 -9‰~ -17‰。C₃ 植物的代表性蔗糖是甜菜蔗糖, C₄ 植物的代表性蔗糖是甘蔗蔗糖。

[0009] 组培苗在生长过程中会利用有机碳源和无机碳源来生长,因此就会造成新生叶片的 δ¹³C 值既有来自有机碳源的组分(异养来源),又有来自无机碳源的组分(自养来源)。因此,可以利用两端元的同位素混合模型获取组培苗利用有机碳源的份额。

[0010] 两端元的同位素混合模型可以表示为:

$$\delta_{T_i} = \delta_{A_i} - f_{B_i} \delta_{A_i} + f_{B_i} \delta_{B_i} \quad (i=1,2,3, \dots) \quad (1)$$

这里的 δ_{T_i} 为新生叶片的 δ¹³C 值, δ_{A_i} 为组培苗完全利用空气中 CO₂ 作为无机碳源的 δ¹³C 值, δ_{B_i} 为组培苗完全利用蔗糖作为有机碳源的 δ¹³C 值, f_{B_i} 为该考察组培苗利用有机碳源时的异养份额。

[0011] 很显然,只知道 δ_{T_i} 很难求出 f_{B_i},因此,本发明采用利用具有较大差异的 δ¹³C 值有机碳源分别同时培养组培苗,以稳定碳同位素双标记来识别组培苗利用添加的有机碳源的异养份额。常见的组培培养基所使用的有机碳源为蔗糖。

[0012] 对于同位素标记 1 (i=1) 来说,方程(1)表示为如下式:

$$\delta_{T_1} = \delta_{A_1} - f_{B_1} \delta_{A_1} + f_{B_1} \delta_{B_1} \quad (2)$$

这里的 δ_{T₁} 为在甜菜蔗糖作为有机碳源培养组培苗时新生叶片的 δ¹³C 值, δ_{A₁} 为组培苗完全利用空气中 CO₂ 为碳源时新生叶片的 δ¹³C 值, δ_{B₁} 为组培苗完全利用甜菜蔗糖作为碳源时新生叶片的 δ¹³C 值, f_{B₁} 为该考察组培苗利用有机碳源所占的份额。

[0013] 对于同位素标记 2 (i=2) 来说,方程(2)表示为如下式:

$$\delta_{T_2} = \delta_{A_2} - f_{B_2} \delta_{A_2} + f_{B_2} \delta_{B_2} \quad (3)$$

这里的 δ_{T₂} 为在甘蔗蔗糖作为有机碳源培养组培苗时新生叶片的 δ¹³C 值, δ_{A₂} 为组培苗完全利用空气中 CO₂ 为碳源时新生叶片的 δ¹³C 值, δ_{B₂} 为组培苗完全利用甘蔗蔗糖作为碳源时新生叶片的 δ¹³C 值, f_{B₂} 为该考察组培苗利用有机碳源所占的份额。

[0014] (2)和(3)两个方程中 δ_{A₁} = δ_{A₂}, f_B = f_{B₁} = f_{B₂}, 联立求解

$$f_B = \frac{\delta_{T_1} - \delta_{T_2}}{\delta_{B_1} - \delta_{B_2}} \quad (4)$$

(4)式中 δ_{B₁} - δ_{B₂} 可以换算成同位素标记 1 的甜菜蔗糖的 δ¹³C 值 δ_{C₁} 与同位素标记 2 的甘蔗蔗糖的 δ¹³C 值 δ_{C₂} 的差,则:

$$f_B = \frac{\delta_{T_1} - \delta_{T_2}}{\delta_{C_1} - \delta_{C_2}} \quad (5)$$

因此,可以通过测定甜菜蔗糖的 δ¹³C 值 δ_{C₁} 和甘蔗蔗糖的 δ¹³C 值 δ_{C₂},同时测定对应蔗糖培养组培苗新生叶片的 δ¹³C 值,即测定出 δ_{T₁} 和 δ_{T₂} 值,依(5)计算出该考察组培苗利用有机碳源所占的份额,即异养份额 f_B。

[0015] 因此,组培苗利用无机碳源所占的份额即组培苗自养份额 f_A 就等于 1 - f_B。

[0016] 本方法采用的步骤少,计算简单,能定量测定组培苗自养和异养份额。

具体实施方式

[0017] 本发明的实施例：

第一步骤，选用两种 $\delta^{13}\text{C}$ 值差较大的 C_3 植物的代表性蔗糖甜菜蔗糖和 C_4 植物的代表性蔗糖甘蔗蔗糖作为有机碳源，分别测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 值，甜菜蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{C1} ，甘蔗蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{C2} ；用这两种蔗糖同时培养被考察组培苗，培养条件完全一样，区别在于一个是以甜菜蔗糖为有机碳源，另一个是以甘蔗蔗糖为有机碳源。

[0018] 第二步骤，同时用甜菜蔗糖和甘蔗蔗糖分别培养组培苗，培养一段时间后，

取一定量的组培苗新生叶片，测定其稳定碳同位素组成 $\delta^{13}\text{C}$ 值。在甜菜蔗糖培养的组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{T1} ，在甘蔗蔗糖培养的组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{T2} 。

[0019] 第三步骤，计算被考察组培苗在各培养条件下的有机碳利用份额，是将甜菜蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{C1} ，由甜菜蔗糖作为有机碳源的组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{T1} ；将甘蔗蔗糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{C2} ，由甘蔗蔗糖作为有机碳源的组培苗新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值记为 δ_{T2} ；代入 $f_{\text{B}} = \frac{\delta_{\text{T1}} - \delta_{\text{T2}}}{\delta_{\text{C1}} - \delta_{\text{C2}}}$ ，可以计算出各个培养条件下组培苗利用有机碳源的份额，即异养

份额。因为组培苗新生 $\delta^{13}\text{C}$ 值来源于组培苗利用的有机碳和无机碳。因此组培苗利用无机碳源所占的份额 f_{A} 就等于 $1 - f_{\text{B}}$ ，也即是组培苗自养份额 f_{A} 就等于 $1 - f_{\text{B}}$ ；计算出 f_{B} ，也就间接地计算出组培苗自养份额了。

[0020] 本发明的实施效果如下：

培养材料：白及组培苗和油菜组培苗。

[0021] 白及的培养基配方为 MS +6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.15 mg/L，pH 值：5.8，琼脂：6.5g/L，蔗糖：30 g/L，培养温度：25±2℃，光周期：12h/d。

[0022] 分别用甘蔗蔗糖和甜菜蔗糖作为有机碳源，其稳定碳同位素值为：甘蔗蔗糖 -12.2‰(PDB)，甜菜蔗糖 -25.8‰(PDB)。培养基配好后，将白及组培苗在不同光照(2000 lx 和 4000 lx)下培养，采用密封和半透气的封口方式。

[0023] 油菜的培养基配方为 MS +6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L，pH 值：5.8，琼脂：6.5 g/L，培养温度：25±2℃。光周期：12 h/d。

[0024] 分别用甘蔗蔗糖和甜菜蔗糖作为有机碳源，其稳定碳同位素值为：甘蔗蔗糖 -12.2‰(PDB)，甜菜蔗糖 -26.0‰(PDB)。将组培苗在蔗糖分别为 30、15 和 5 g/L 的浓度下进行培养，采用半透气的封口方式。在 30 g/L 蔗糖浓度下，设置一个密封处理类型。

[0025] 白及培养 40 天，油菜培养一个月后，分别测定不同实验条件下新生叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值，用本发明方法，得出白及组培苗和油菜组培苗利用有机碳源的份额 f_{B} ，如表 1。随后，利用本发明，即可求出白及组培苗利用空气的无机碳源份额 $1 - f_{\text{B}}$ ，即组培苗自养份额 f_{A} ， $f_{\text{A}} = 1 - f_{\text{B}}$ ，如表 2。

表 1 白及和油菜组培苗的培养条件

白及培养条件	δ_{T1} ‰ PDB	δ_{T2} ‰ PDB	油菜培养条件	δ_{T1} ‰ PDB	δ_{T2} ‰ PDB
2000lx 半透气 30g/L 蔗糖	-26.9	-18.4	2000lx 密封 30g/L 蔗糖	-28.8	-15.2
2000lx 密封 30g/L 蔗糖	-28.2	-16.6	2000lx 半透气 30g/L 蔗糖	-28.4	-20.4
4000lx 半透气 30g/L 蔗糖	-31.2	-21.9	2000lx 半透气 15g/L 蔗糖	-29.7	-23.1
4000lx 密封 30g/L 蔗糖	-27.9	-17.2	2000lx 半透气 5g/L 蔗糖	-28.3	-25.1

表 2 白及和油菜组培苗各培养条件下的异养份额 f_B 和自养份额 f_A

白及培养条件	f_B	f_A	油菜培养条件	f_B	f_A
2000lx 半透气 30g/L 蔗糖	0.63	0.37	2000lx 密封 30g/L 蔗糖	0.99	0.01
2000lx 密封 30g/L 蔗糖	0.85	0.15	2000lx 半透气 30g/L 蔗糖	0.58	0.42
4000lx 半透气 30g/L 蔗糖	0.68	0.32	2000lx 半透气 15g/L 蔗糖	0.48	0.52
4000lx 密封 30g/L 蔗糖	0.79	0.21	2000lx 半透气 5g/L 蔗糖	0.23	0.77

[0026] 从表 2 可以看出,无论是白及组培苗还是油菜组培苗,在半透气的培养条件下,蔗糖利用份额(异养份额)都较密封培养条件下小。这是因为在半透气情况下,组培瓶中 CO_2 浓度高于密封条件下的组培瓶中 CO_2 浓度,较多的无机碳源可供组培苗利用,其自养份额也就大于密封培养条件下的组培苗。

[0027] 从表 2 中还可以看出,对于白及组培苗来说,在 2000lx 光照,半透气培养条件下,其利用蔗糖的份额最小,这与白及喜生于较阴凉湿润的环境有关。在半透气培养条件下,2000lx 光照比 4000lx 光照更适合白及组培苗的生长,这与实际情形是一致的。

[0028] 与白及组培苗相比,在 2000lx 光照、半透气以及培养基蔗糖含量为 30g/L 的培养

条件下,油菜组培苗的自养份额大于白及组培苗的自养份额,表明油菜组培苗的培养条件较合适,这与此条件下油菜组培苗的生长速率是白及组培苗的3倍的实际情况相吻合。

[0029] 最后,从表2中还可以看出,培养基的蔗糖含量影响组培苗的自养份额。与培养基的蔗糖含量为30 g/L或15 g/L的培养条件下相比,培养基的蔗糖含量为5g/L时,油菜组培苗蔗糖的利用份额(异养份额)最小,这是因为在这个培养条件下,培养基中蔗糖含量较少,组培苗为保证其正常生长,就得多利用空气中的CO₂来合成自身的有机物。

[0030] 通过测定组培苗的自养份额,就可以为组培过程中各种环境因子的调控,培养基组成,激素配比等提供理论依据。