

植物光自养微繁殖技术研究进展

管道平 杨其长* 刘文科 肖平 杨建荣

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘要: 光自养微繁殖技术是一种全新的植物组织培养技术, 从提出该理论至今, 许多研究者已在光自养微繁殖方面做了大量的尝试, 使这一新技术逐步完善。本文对光自养微繁殖的研究进展进行了综述, 介绍了光自养微繁殖研究现状、研究热点、在种苗工厂化生产中的应用, 并提出光自养微繁殖技术研究动向。

关键词: 光自养微繁殖; 研究热点; 工厂化生产; 综述

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 03-0680-07

Development of Research on Photoautotrophic Micropropagation

Guan Daoping, Yang Qichang*, Liu Wenke, Xiao Ping, and Yang Jianrong

(Institute of Agricultural Environment and Sustainable Development, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstracts: The Photoautotrophic micropropagation is a new technology in plant tissue culture. This paper reviewed the summary of the photoautotrophic micropropagation research progress, present situation, Arousing general interests, in seedling factory-production application, and new research contents in the future.

Key words: Photoautotrophic micropropagation; Research hotspots; Factory production; Review

光自养微繁殖 (Photoautotrophic micropropagation) 技术又称无糖培养微繁殖 (Sugar-free micropropagation) 技术, 是由日本千叶大学设施园艺与环境控制专家古在丰树教授在 20 世纪 80 年代末提出的。一般认为在植物组织培养过程中的外植体是以培养基中添加的糖作为主要碳源进行异养或兼养生长, 糖被看作是植物组织培养中必不可少的物质; 古在丰树教授试验发现即使只有米粒大小的叶片都具有一定的光合能力, 在强光照和高二氧化碳浓度下, 小植株完全能够进行光自养生长, 提出了用二氧化碳代替培养基中的糖作为植物组培苗碳源的光自养微繁殖理论^[1,2]。从提出该理论至今, 许多学者已在光自养微繁殖方面做了大量的研究, 使这一新技术逐步完善, 现将该技术的研究进展做一综述。

1 光自养微繁殖技术的特征

在传统的组织培养技术中, 一直把培养基的配方作为研究的重点。包括培养基的类型、植物生长调节剂的种类、各种植物生长调节剂在培养基中的含量和有机物质的添加等。而事实上, 光照、温度、湿度、CO₂ 浓度、植株的密度、培养容器中空气流速等环境因子都影响小植株的生长发育。随着光自养微繁殖概念的提出, 利用工程技术手段调控组培微环境的 CO₂ 浓度、光照、湿度等来提高微繁殖苗的质量已成为组织培养技术研究的热点。光自养微繁殖技术的特征在于: 采用人工环境控制技术, 用 CO₂ 代替糖作为植物体的碳源, 通过调控培养容器内的有效光量子流密度 (Photosynthetic photon flux density, PPFD)、CO₂ 浓度以及气流速度等来提高微繁殖苗的光合速率, 从而促进植物的生长发育和快速繁殖; 其技术创新在于依靠组培微繁殖苗本身的光合作用来自我调节生长速度, 是植物组织培养的一种全新的概念, 是环境控制技术和组织培养技术有机结合的产物, 它适用于具绿叶或叶绿体的幼嫩组

收稿日期: 2005 - 07 - 14; 修回日期: 2005 - 09 - 21

基金项目: 科技部升级改造项目 (JG-2003-6); 中国农业科学院科研基金项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yangqichang1@vip.sina.com)

组织的微繁殖。光自养微繁殖技术解决了培养容器中气体环境（ CO_2 和乙烯）差、易污染等问题；与常规组织培养相比，光自养微繁殖技术能提高组培微繁殖苗生长速度、增强品质、缩短培养时间并降低成本。

2 光自养微繁殖研究现状

古在丰树把环境控制技术应用到植物组织培养中，开始了植物光自养微繁殖的研究与探索。光自养微繁殖的目的是在短时间内获得大量的遗传基础相同、生理一致、生长发育正常、无病原菌的植株。随着研究的深入及大量试验的成功，光自养微繁殖的可行性和优越性得到了肯定。光自养微繁殖理论与技术也逐渐被人们所接受，光自养微繁殖技术也在各国开始得到传播应用，并已逐渐在生产中推广应用，试验品种越来越多（表 1）。

表 1 光自养微繁殖条件下植物组培试验品种

Table 1 Experimental species for photoautotrophic micropropagation

品种 Species	支撑材料 Supporting medium	主要结论 Major findings	引用文献 References
马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i>	蛭石 Vermiculite	促进植株生长和移栽成活率,降低生产成本 Improved plantlet growth and survival ex vitro, reduced produce cost	[3, 4]
咖啡 <i>Coffea arabusta</i>	Florialite (蛭石和纤维的混合物 A mixture of vermiculite and fiber)	促进植株光合作用和移栽成活率 Enhanced plantlet photosynthesis and survival ex vitro	[5, 6]
桉树 <i>Eucalyptus</i> spp.	Florialite	促进植物生长和移栽成活率 Improved plantlet growth and survival ex vitro	[7 ~ 10]
甘薯 <i>Ipomoea batatas</i> Lam.	Florialite、蛭石、蛭石 + 纸浆 Vermiculite, Vermiculite + paper pulp	促进植株生长和净光合速率,提高移栽成活率 Enhanced plantlet growth, net photosynthesis and ex vitro	[11 ~ 18]
草莓 <i>Fragaria ananassa</i> Duchesne	聚酯纤维 Polyester fiber	促进植株生长和光合速率 Enhanced plantlet growth and photosynthesis	[19]
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	珍珠岩、玻璃纤维 Perlite, fiberglass	促进植株生长和移栽成活率,降低生产成本 Improved plantlet growth and survival ex vitro, cost was less than control	[20, 21]
补血草 <i>Limonium latifolium</i>	珍珠岩 Perlite	促进植株生长和移栽成活率,降低生产成本 Improved growth and survival ex vitro, cost was less than control	[20]
非洲菊 <i>Gerbera jamesonii</i>	珍珠岩 Perlite	植株生根快,健壮,叶片大,干物质含量高 Plantlets grew best in terms of root development, leaf area and dry matter than control	[22 ~ 24]
西瓜 <i>Cucumis melo</i> L.	蛭石 Vermiculite	植株生长快,净光合速率增加,移栽成活率高 Enhanced growth, net photosynthesis and survival ex vitro	[25]
芋 <i>Colocasia esculenta</i>	琼脂 Agar	植株生长迅速,POD活性增强,光合自养能力得到显著提高 Improved growth, increased POD activity and photoautotrophic capacity	[26]
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	琼脂 Agar	组培苗生长健壮,发育提前,光合能力促进,驯化成活率高 Enhanced growth, net photosynthesis and survival ex vitro	[27]
万年青 <i>Rohdea japonica</i> Roth	蛭石 Vermiculite	种苗质量优于常规组培 Quality of seedlings is superior to that cultivated by conventional tissue culture	[28]
丝石竹 <i>Gypsophila paniculata</i>	珍珠岩 + 菜园土 Perlite + vegetable soil	光自养微繁殖的各项指标将接近于有糖培养 Sugar-culture plantlet grow as well as that of sugar-containing	[29, 30]
香石竹 <i>Dianthus caryophyllus</i>	珍珠岩、蛭石 Perlite, vermiculite	根系发达,植株健壮 Improved growth and root development	[30]

3 研究热点领域

在光自养微繁殖条件下通过环境控制可以对植株的生长和发育进行调控，采用有环境控制和监控系统的大型容器，在此基础上的技术改进有利于组培苗的商品化生产。

3.1 培养容器向大型化发展

培养容器是小植株生长的场所，是植物组织培养中最重要的影响因素之一。培养容器的材质、形

状、体积、功能极大地影响小植株的生长。在传统的组织培养微繁殖中,由于培养基中糖的存在,为了防止病菌的污染,一般是采用小的密封培养容器,常用的有玻璃试管、三角瓶、广口瓶以及各种塑料器皿。光自养微繁由于在培养基中除去了糖,污染率降低,大型的培养容器能够使用。

最近,有关光自养微繁技术中采用带有强制性通风系统的大容器培养微繁苗已成为国内外研究的热点。Fujiware等 1988年开发了 1种大型培养容器(18 L)和强制性通风系统,该装置还设计了自动供应无菌营养液的控制系统。该容器提高了草莓在生根和驯化阶段的光自养微繁苗的品质^[19]。1992年, Kubota等用带有多孔穴盘体积为 2.6 L的容器和强制性通风系统进行马铃薯苗的光自养微繁^[21]。1999年, Heo等也开发了类似体积为 12.8 L的容器进行马铃薯苗的光自养微繁^[11]。为提高容器内微繁苗的生长一致性,2001年, Heo等设计了体积为 11 L的容器。在这个装置中,培养容器内的气体分布均匀,植株生长整齐^[12]。2000年肖玉兰等开发了体积为 125 L的特大容器,该装置已用于彩色马蹄莲和非洲菊的工厂化生产^[20]。这些研究表明:与传统的植物组织培养相比,采用带有强制性通风系统的大容器进行光自养微繁培养能够显著提高组培苗的生长和发育。

3.2 光自养微繁环境调控研究

国内外研究人员对组培环境的调控技术做了很多有益的探索。Michio等^[31]和 Kozai等^[32]对组培环境的控制技术进行了研究,利用工程技术手段调节组培微环境的空气、光照、温度和湿度等环境因子。Hayashi等研究开发了一套适用于组培苗驯化阶段的环境控制系统,该系统可以实现驯化室内温度、相对湿度、光照强度、CO₂浓度和气流速度的综合控制^[33]。Kitaya等利用蘑菇作为 CO₂发生器,研究开发了一套独特的光自养组培系统^[34]。1998年 Kozai和 Fujiwara研制出既能控制气体环境又能控制培养基化学成分的组培设施^[35]。2002年徐志刚,丁永前等在进行组培环境与规模化育苗设施环境调控研究中,设计开发了一套基于生长模型的、半开放式的中小型组培设施及其环境自动化调控系统,通过对组培箱内的 CO₂浓度、相对湿度以及光照强度的调控实现了对组培容器的间接调控^[36,37]。肖玉兰等开发出组合式无糖组培快繁装置,该装置包括培养架、培养容器、供气系统、光照系统、气体流量控制系统、CO₂浓度控制系统。装置分固定式和移动式两种^[30]。

3.3 光照强度和 CO₂浓度的相关性研究

光照强度和 CO₂浓度是植物进行光合作用的最重要的两个环境因子,通过对这两个环境因子的调控可以对小植株的光合作用产生重要影响。有研究表明,在低 CO₂、高 O₂和弱光下不利于光合作用,对试管苗生长不利^[38,39]。Kozai等提出在 1个强光照条件下富集 CO₂可促进组培小植株的生长^[2]。Nguyen等发现在高速率强制换气和高 PPF对咖啡组培苗茎和根的生长有抑制作用^[40]。在培养非洲菊时,肖玉兰等进行了高光照(100 μmol·m⁻²·s⁻¹)和高 CO₂(3 920 μmol·mol⁻¹)试验,发现使其叶面积、大叶片数和干样质量均比低光照(35 μmol·m⁻²·s⁻¹、不加 CO₂)的高,且生根率高,植株矮、粗壮,长势好^[22]。徐志刚等定量分析了外环境中 CO₂浓度和光合光量子通量密度(PPFD)对无糖组培苗光合特性的影响,结果表明在使用透气率为 0.4的封口材料时,甘薯无糖组培苗的光合作用在光合光量子通量密度为 250 μmol·m⁻²·s⁻¹和外环境 CO₂浓度为 8 735 μmol·mol⁻¹时最为适宜^[16]。

3.4 微繁苗生长一致性调控研究

在光自养条件下,由于采用了大型容器培养,植株的栽培密度显著增加。例如,每平方米的栽培面积可以培养 4 600株的马铃薯和 2 644株的桉树微繁苗^[8,20]。为了提高微繁苗生长和发育的一致性,必须保证培养容器内环境条件的一致。由于 CO₂是光自养微繁系统中唯一的碳源,培养容器内的 CO₂浓度和空气流速是否均一是限制植物生长一致性的重要因子。在大型的培养容器内,如果仅仅进行强制性通风,培养容器内的 CO₂浓度在进气口非常高,而在排气口浓度非常低,在进气口和排气口之间 CO₂浓度存在着显著差异,导致容器内培养的植株生长不一致^[11,41]。主要原因为仅采用强制通风措施是不能实现容器内环境条件均匀的。为了克服这个问题, Zobayed等 1999年在强制通风系统的基

础上开发了气体管道装置，在管道上按照一定比例打孔，其主要目的是提供均匀的 CO_2 浓度、相对湿度和气体流速^[15]。Heo等 2001年也开发了类似的装置^[12]。

3.5 支撑材料的研究

在大型培养容器内支撑材料在组织培养过程中起着关键的作用。在植物组织培养中，常常使用凝胶类物质（琼脂、卡那胶、塑胶等）作为支撑材料，通常在这类培养基中植株根系瘦小、脆弱，且非功能性根系增加，当移植到土壤中时容易被损坏^[42]。而液体培养时，容易使植株根系缺氧，必须在摇床上进行震荡培养，且液体培养易使小植株呈水浸状，产生玻璃化苗^[30]。用多孔的培养材料代替凝胶类物质可以极大的改善根区的环境和植物根系的组织结构，以聚乙烯发泡材料、岩棉、蛙石、陶瓷纤维和植物纤维的扁平压制块作支撑材料，更有利于组培苗的生长^[30, 43, 44, 45]。多孔培养基的高孔隙度、高气体扩散性和高含氧量有利于组培苗的生长，而且在移栽驯化阶段也有较高的成活率^[5, 7, 14, 15, 21]。

3.6 有益微生物的应用研究

传统的离体培养基含有高浓度的糖、盐和生长调节物质，培养基中高渗透压的环境条件抑制了有益微生物（有益细菌和菌根真菌）的生存。微繁殖苗在无菌条件下繁育，缺少有益微生物的侵染，导致微繁殖苗生长势弱、抗逆性差、移栽成活率低^[46]。而光自养微繁殖技术依靠组培微繁殖苗本身的光合作用来自调节生长速度，培养基中不加入糖，同时降低了矿物质离子浓度的用量，为有益微生物的生存提供了可能^[30]。1996年，Cassells等报道了在光自养条件下生根阶段接种丛枝菌根真菌对草莓微繁殖苗植株生理品质的影响^[47]，2000年，Duffy等研究了在光自养离体条件下接种丛枝菌根真菌对马铃薯微繁殖苗品质的影响^[48]。以上研究都表明，接种丛枝菌根真菌在提高微繁殖苗生长速度、生理状况和品质上效果显著，并能提高后期产量。另外，光自养微繁殖技术对环境控制水平的要求高、成本较高，菌根真菌能提高植株对环境因子的利用效率，降低植株对环境条件的要求和能量能耗。目前尚未见有关在光自养微繁殖中丛枝菌根—微繁殖苗互作机理的研究报道。在将来的植物光自养组培生产系统中，有益微生物将扮演重要的角色。

4 光自养微繁殖技术在工厂化种苗生产中的应用

光自养微繁殖技术改革了传统的用糖作为碳营养和培养瓶作为培养空间的技术方法，增加了植物生长和生化反应所需要的物质流的交换和循环，促进了植株的生长和发育，实现了微繁殖苗的优质生产。同时，光自养微繁殖生产工艺简单，技术和设备的集成度高，降低了操作技术难度和劳动作业强度，使该技术在工厂化种苗生产中得到了推广应用。2003年，肖玉兰等应用大型的培养容器和 CO_2 强制性供气系统，实现了非洲菊的优质苗工厂化生产。通过人工控制、动态调整优化植物生长环境，为种苗繁殖生长提供适宜的 CO_2 浓度、光照、湿度、温度等环境条件，促进了植株的生长发育，培养周期缩短 40%以上。由于大幅度降低了植物组培过程中的微生物污染率；而且植株的生根率、成苗率和种苗质量显著提高，使得种苗驯化期间的成活率大幅度上升，驯化过程得以简化，与传统的组织培养技术相比，种苗生产综合成本平均降低 30%^[30]。

5 展望

光自养微繁殖技术培养的组培种苗与常规组培相比，在种苗质量及生产成本上具有明显的优势，在植物种苗生产中具有广阔的应用前景。然而，该技术目前在生产中的应用规模很小，大多处于科研阶段或中试水平。许多工程和生理生态方面的问题还没有完全解决，有待于各学科间的进一步交叉合作。随着生物、工程、环境与信息等领域的技术突破，光自养微繁殖技术在未来的发展过程中将更多地体现现代科技成果的集成与创新。为了实现光自养微繁殖技术的商业化生产，需要加强以下几个方面的研究。

5.1 光自养微繁过程中植物生物学机理研究。研究植株光自养生长的生理变化规律, 优化培养条件, 开创新的以改进光自养生长为基础的高效益低成本的植物微繁生产系统。

5.2 人工光环境调控研究。通过荧光灯高效间歇补光、发光二极管等新型光源的研制, 采用红光、绿光、蓝光、远红外光源组合, 配合植物光合所需要的 Hf (高频荧光灯) 光源, 进行人工光环境调控技术的研究。达到既能人工调控植株生长, 又能减少光源发热量和系统的温度控制负荷的目的。

5.3 研究光自养微繁自动化生产工艺及配套设备。光自养微繁技术的发展需进一步与商业化生产相结合, 通过环境控制研究, 实现光照、温度、湿度、CO₂ 浓度自动化调控, 形成完善的生物技术快繁生产体系。

5.4 完善温室配套驯化体系, 获得高产优质的商品苗。充分利用我国的温室资源, 使植物微繁苗驯化体系走适合我国国情的产业化发展道路。

参考文献:

- 1 Kozai T, Iwanami Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation. J. Japan Soc Hort Sci, 1988, 57 (2): 279 ~ 288
- 2 Kozai T, Koyama Y, Watanabe I. Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux. Acta Horticulturae, 1988, 230: 121 ~ 127
- 3 Xiao Y, Kozai T. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation. Hort Science, 2004, 39 (6): 1387 ~ 1391
- 4 屈云慧, 熊丽, 张素芳, 杨春梅, 蒋亚莲. 彩色马蹄莲组织苗无糖生根培养的环境控制. 植物遗传资源学报, 2004, 5 (2): 166 ~ 169
Qu Y H, Xiong L, Zhang S F, Yang C M, Jiang Y L. Environmental control in sugar-free culture of colored zantedeschia in vitro. Journal of Plant Genetic Resources, 2004, 5 (2): 166 ~ 169 (in Chinese)
- 5 Afreen F, Zobayed S M A, Kozai T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos II: development of a bioreactor for the large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. Ann Bot, 2002, 9: 20 ~ 29
- 6 Nguyen Q T, Kozai T, Nguyen K L, Nguyen U V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of in vitro coffee plantlets. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1999, 58: 51 ~ 57
- 7 Zobayed S M A, Afreen F, Kobota C, Kozai T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets cultured photoautotrophically under forced ventilation. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2001, 37: 807 ~ 813
- 8 Zobayed S M A, Afreen F, Kobota C, Kozai T. Mass propagation of *Eucalyptus* in a scaled-up vessel under in vitro photoautotrophic condition. Ann Bot, 2000, 85: 587 ~ 592
- 9 Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of eucalyptus plantlets in vitro and ex vitro: Anatomical comparisons. Acta Hort, 1995, 393: 111 ~ 118
- 10 Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of eucalyptus plantlets in vitro and ex vitro. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1995, 31: 144 ~ 149
- 11 Heo J, Kozai T. Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweet potato plantlets. Environ Cont Biol, 1999, 37: 83 ~ 92
- 12 Heo J, Wilson S, Kozai T. A forced ventilation micropropagation system for production of photoautotrophic sweet potato plug plantlets in a scaled-up culture vessel: I growth and uniformity. HortTech, 2001, 11: 90 ~ 94
- 13 Wilson S B, Heo J, Kubota C, Kozai T. A forced ventilation micropropagation system for photoautotrophic production of sweet potato plug plantlets in a scaled-up culture vessel: II Carbohydrate status. HortTech, 2001, 11: 95 ~ 99
- 14 Zobayed S M A, Afreen F, Kobota C, Kozai T. Water control ability of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation. Ann Bot, 2000, 85: 603 ~ 610
- 15 Zobayed S M A, Kubota C, Kobota C, Kozai T. Development of a forced ventilation micropropagation system for large-scale photoautotrophic culture and its utilization in sweet potato. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1999, 35: 350 ~ 355
- 16 徐志刚, 崔瑾, 焦学磊, 丁为民, 李式军. 光照强度和 CO₂ 浓度间接调控对甘薯无糖组培苗光合特性的影响. 南京农业大学学报, 2004, 27 (1): 11 ~ 14
Xu Z G, Cui J, Jiao X L, Ding W M, Li S J. Effects of photosynthetic photon flux density and CO₂ concentration on photosynthesis of sugar-free micropropagation of sweet potato plantlets. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27 (1): 11 ~ 14 (in Chinese)

- 17 Afreen F, Zobayed SM A, Kubota C, Kobota C, Kozai T. Supporting material affects the growth and development of in vitro sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 1999, 35: 470 ~ 474
- 18 Afreen F, Zobayed SM A, Kubota C, Kobota C, Kozai T, Hasegawa O. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the Photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science*, 2000, 157: 225 ~ 231
- 19 Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort*, 1988, 230: 152 ~ 158
- 20 Xiao Y, Zhou J, Kozai T. Practical sugar-free micropropagation system using large vessels with forced ventilation. In: Kubota C, Chun C eds. *Transplant Production in the 21st Century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 266 ~ 273
- 21 Kubota C, Kozai T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* in vitro under forced ventilation. *HortScience*, 1992, 27: 1312 ~ 1314
- 22 肖玉兰, 张立力, 张光怡, 韩亚平, 赵家聪. 非洲菊无糖组织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 Sinica*, 1998, 25 (4): 408 ~ 410 (in Chinese)
- 23 周锺信, 李明, 张丽香, 张丽清. 非洲菊光合微繁殖技术的研究. *天津农学院学报*, 2002, 9 (4): 15 ~ 18
Zhou Z X, Li M, Zhang L X, Zhang L Q. Study on photo-micropropagation techniques of *Gerbera jamesonii*. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2002, 9 (4): 15 ~ 18 (in Chinese)
- 24 廖飞雄, 李玲, 姚翠娟, 郭仲孝. 无蔗糖培养和不同封口膜对非洲菊组培苗生长的影响研究. *中国农学通报*, 2004, 20 (4): 211 ~ 214
Liao F X, Li L, Yao C X, Guo Z X. The growth of gerbera plantlets on the sucrose-free medium and effect of different closures on it in vitro. *China Agronomy Avis*, 2004, 20 (4): 211 ~ 214 (in Chinese)
- 25 Adelberg J, Fujiwara K, Kirdmanee C, Kozai T. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 57: 95 ~ 104
- 26 崔瑾. 芋 (*Colocasia esculenta* L. Schott) 脱毒快繁体系的构建以及组培苗无糖培养的研究: [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2002. 78 ~ 82
Cui J. Study on construction micropropagation system of virus-free taro (*Colocasia esculenta* L.) and on sugar-free tissue culture: [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2002. 78 ~ 82 (in Chinese)
- 27 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)
- 28 屈云慧, 熊丽, 张素芳, 吴丽芳, 杨春梅. 虎眼万年青离体快繁体系及无糖生根培养. *中南林学院学报*, 2003, 23 (5): 56 ~ 58
Qu Y H, Xiong L, Zhang S F, Wu L F, Yang C M. Rapid micro propagation system in vitro and photoautotrophic culture of *Omithogalum dubium*. *Journal of Central South Forestry University*, 2003, 23 (5): 56 ~ 58 (in Chinese)
- 29 李宗菊, 周应撰, 桂明英, 王玲. 满天星无糖组培快繁技术的研究. *云南大学学报 (自然科学版)*, 1999, 21: 134 ~ 138
Li Z J, Zhou Y Z, Gui M Y, Wang L. Study on the technology of autotrophic (sugar-free) micropropagation of *Gypsophila paniculata*. *Journal of Yunnan University (Natural Science)*, 1999, 21: 134 ~ 138 (in Chinese)
- 30 肖玉兰. 植物无糖微繁殖工厂化生产技术. 昆明: 云南科技出版社, 2003. 176
Xiao Y L. The plant factory production technology under sugar-free micropropagation. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2003. 176 (in Chinese)
- 31 Michio K, Masakatsu O, Michiko A. The effect of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured in vitro photoautotrophically and photomixotrophically. *J. Amer Hort Sci*, 1998, 123 (2): 176 ~ 181
- 32 Kozai T, Chieri B R J. Environmental control for the large-scale production of plant through in vitro techniques. *Plant cell tissue and organ culture*, 1997, 51: 49 ~ 56
- 33 Hayashi M, Kozai T. Development of a facility for accelerating the acclimatization of tissue-cultured plantlets and the performance of test cultivations. Belgium: Symp. Florizel on Plant Micropropagation in Hort Ind, 1987. 123 ~ 134
- 34 Kitaya Y, Sakami K, Kozai T. Development of photoautotrophic plant tissue culture system using CO₂ from shiitake mushroom. *Acta Horticulturae*, 1995, 393: 195 ~ 202
- 35 刘再亮. 密闭式人工光组培室的环境控制与洁净技术的研究: [硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2004. 51
Liu Z L. Study on environment control combined with clean technology in a closed tissue culture system under artificial lighting: [Master Dis-

- sertation 1 Beijing: China Agriculture University, 2004. 51 (in Chinese)
- 36 徐志刚. 组培微环境与规模化育苗设施环境调控的研究: [博士学位论文] 南京: 南京农业大学, 2002. 128
Xu Z G. Research on micro-environmental of micro-propagation and environmental control facilities for large-scale plant tissue culture: [P. D. Dissertation] Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2002. 128 (in Chinese)
- 37 丁永前, 丁为民, 崔 瑾, 李式军, 徐志刚, 汪小函. 组培环境 CO₂ 增施监控系统的设计与试验. 农业工程学报, 2002, 18 (1): 96 ~ 98
Ding Y Q, Ding W M, Cui J, Li S J, Xu Z G, Wang X H. Design and experiment of CO₂ enrichment and real-time control system for tissue culture. Transactions of the CSAE, 2002, 18 (1): 96 ~ 98 (in Chinese)
- 38 Lakso A N, Reisch B I, Mortensen J, Roberts M H. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of in vitro-propagated grapevines after transfer from culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1986, 111 (4): 634 ~ 638
- 39 Desjardins Y, Lafoe 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 Hort., 1988, 230: 45 ~ 53
- 40 Nguyen Q T, Kozai T, Heo J, Thai D X. Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. Plant Cell Tissue Org., 2001, 66 (3): 217 ~ 225
- 41 Kubota C, Kozai T. Mathematical models for planning vegetative propagation under controlled environments. HortScience, 2001, 36: 15 ~ 19
- 42 蔡 能, 易自力, 李 祥. 改善植物大规模组织培养条件的研究进展. 植物学通报, 2003, 20 (6): 745 ~ 751
Cai N, Yi Z L, Li X. Advances in improvement of tissue culture conditions of plants on large scale. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20 (6): 745 ~ 751 (in Chinese)
- 43 曲英华, 胡秀婵, 吴毅明. 植物组织培养新技术: 光独立培养法. 农业工程学报, 2001, 17 (6): 90 ~ 93
Qu Y H, Hu X C, Wu Y M. New technique of plant tissue cultivation photoautotrophic micropropagation. Transactions of the CSAE, 2001, 17 (6): 90 ~ 93 (in Chinese)
- 44 徐志刚, 丁为民, 丁永前, 崔 瑾, 李式军. 规模化组培育苗设施环境与控制的研究进展. 农业机械学报, 2002, 1: 106 ~ 110
Xu Z G, Ding W M, Ding Y Q, Cui J, Li S J. Development of environment and control for large-scale tissue culture production. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2002, 1: 106 ~ 110 (in Chinese)
- 45 Roche T D, Long R D, Sayegh A J. Commercial scale photoautotrophic micropropagations in Irish agriculture, horticulture and forestry. Acta Hort., 1996, 440: 515 ~ 520
- 46 Budi S W, Cordier C, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson C, Gianinazzi S, Blal B, Lemoine M C, Scannerini S, Baker A, Charlwood B V, Damiano C, Franz C, Gianinazzi S. Arbuscular mycorrhiza as a way of promoting sustainable growth of micropropagated plants. Acta Horticulturae, 1998, 457: 71 ~ 77
- 47 Cassells A C, Mark G L, Periappuram C. Establishment of arbuscular mycorrhizal fungi in autotrophic strawberry cultures in vitro. Comparison with inoculation of microplants in vivo. Agronomie, 1996, 16: 625 ~ 632
- 48 Duffy E M, Cassells A C. The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 137 ~ 144
- 49 Nguyen Q T, Kozai T, Heo J, Thai D X P. Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 66: 217 ~ 225
- 50 Lakso A N, Reisch B I, Mortensen J, Roberts M H. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of in vitro-propagated grapevines after transfer from culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1986, 111 (4): 634 ~ 638