

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.10.034

组培苗蒸腾速率和水分利用率动态检测*

吴沿友 赵宽 陈迎 庞静 徐红成 毛罕平

(江苏大学现代农业装备与技术教育部重点实验室, 镇江 212013)

【摘要】 利用图像分析方法,根据质量守恒定律获得组培苗的生长信息和蒸腾失水信息。通过 Logistic 方程、线性方程和非线性双曲线方程拟合组培苗生物量与培养时间、水分损失与培养时间以及组培苗蒸腾失水量与生物量形成的关系,建立组培苗生长预测模型、组培苗蒸腾失水模型与组培苗水分利用率模型,并由此计算出组培苗蒸腾速率和水分利用率。通过测定不同氮素水平、继代次数差异下的茅苍术组培苗蒸腾速率和水分利用率,发现茅苍术组培苗的蒸腾速率和水分利用率随培养时间的增加而减少,继代次数少、培养基中氮素含量高的组培苗,蒸腾作用强。

关键词: 组培苗 蒸腾速率 水分利用率 组织培养 动态检测 图像分析

中图分类号: S184; Q945.17⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)10-0190-05

Dynamic Detection of Transpiration Rate and Water Using Efficiency for Plantlets

Wu Yanyou Zhao Kuan Chen Ying Pang Jing Xu Hongcheng Mao Hanping

(Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education,

Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract

The growth information and transpiration information of plantlets *in vitro* were acquired by image processing and utilization of the law of mass conservation, respectively. The Logistic, linear and nonlinear hyperbolic equations were used for fitting the relationship of biomass of plantlet *in vitro* and culture time, water loss and culture time, transpiration water loss and biomass of plantlet *in vitro*. The models of growth prediction, transpiration of water loss and water using efficiency of plantlet were established. The transpiration rate and water using efficiency of plantlet *in vitro* were calculated. The transpiration rate and water using efficiency of *Atractodes lancea* plantlets *in vitro* at different nitrogen levels in the medium and subculture generation were measured. The transpiration was strong with less subculture generation and higher nitrogen content in culture medium.

Key words Plantlets, Transpiration rate, Water using efficiency, Tissue culture, Dynamic determination, Image analysis

引言

陆生植物吸收的水分,一小部分(1%~5%)用于代谢,绝大部分散失到体外。其散失的方式,除了少量的水分以液体状态通过吐水的方式散失外,大

部分水分则以气态,即以蒸腾作用的方式散失。蒸腾作用消耗水分,这对陆生植物来说是不可避免的,它既会引起水分亏缺,破坏植物的水分平衡,同时又对植物的生命活动具有重要的意义。蒸腾作用的正常进行有利于 CO₂ 的同化、矿物质和有机物的吸收

收稿日期: 2011-12-09 修回日期: 2012-03-09

* 江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏财教(2011)8号)和中国科学院百人计划资助项目

作者简介: 吴沿友,研究员,博士生导师,主要从事农业工程研究, E-mail: yanyouwu@ujs.edu.cn

和降低植物体的温度^[1]。

植物组织培养是指在控制环境下的人工配制培养基中将外植体进行培育的技术。常规的组织培养快繁技术中的大多数组培苗既靠培养基中的糖又靠人工光照,为同时进行异养和自养的兼养生长。组培苗的光合能力影响着植株的生长、发育和分化^[2],组培苗在进行光合作用时,与周围环境发生气体交换,同时会引起组培苗大量丢失水分,因此组培苗的蒸腾作用的大小与组培苗的自养能力有关。

植物蒸发蒸腾量的测量方法有水文学方法、微气象学方法、红外遥感法和植物生理学方法^[3-4]。这些方法根据不同的特点均在实际生产中具有重要的应用^[5-9]。对于常规小容器培养的组培苗来说,这些方法显然是不合适的,不仅会破坏植株生长的无菌封闭环境,同时也不能长期动态地检测组培苗生长过程中的蒸腾作用和水分利用率。因此,寻找一种动态、无菌检测组培苗蒸腾速率和水分利用率的方法,对了解组培苗的生长具有重要的意义。本研究通过非破坏性动态测定组培苗的生物量变化以及水分损失,获得组培苗的蒸腾速率和水分利用率。

1 材料与方法

1.1 实验设计

实验样品分别是继代培养 10 次和 4 次的茅苍术组培苗,以含有不同水平的无机氮素(低氮为 0.632 g/L,对照为 0.908 g/L,高氮为 1.159 g/L)的 MS 培养基培养组培苗。以 KNO₃ 的加入量调节无机氮素水平,实验处理如表 1 所示。

表 1 实验处理

Tab. 1 Experimental treatment

处理号	继代次数	无机氮素质量 浓度/g·L ⁻¹
1	10	0.632
2	10	0.908
3	10	1.159
4	10	1.423
5	4	0.632
6	4	1.159

1.2 培养条件

实验在人工气候室内进行,室内温度、湿度及 CO₂ 浓度均可调。培养室温度为 (25 ± 0.5) °C, CO₂ 摩尔分数控制在 3.6 × 10⁻⁴ mol/mol, 空气相对湿度控制在 45%。组培瓶为玻璃制作的 100 mL 三角培养瓶。光周期为光 12 h、暗 12 h,继代培养所用为基本 MS 培养基附加 0.1 mg/L NAA (α-萘乙酸)、

2 mg/L 6-BA (6-苄基嘌呤) 的培养基,培养基用量为 50 mL。光强设定为 45 μmol/(m²/s)。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 培养瓶质量

分别称量转接天数 t_0, t_1, \dots, t_n 的有组培苗的培养瓶质量 $m_{P_{t_0}}, m_{P_{t_1}}, \dots, m_{P_{t_n}}$, 以及装有同体积培养基的无组培苗空白培养瓶的质量 $m_{N_{t_0}}, m_{N_{t_1}}, \dots, m_{N_{t_n}}$ 。

1.3.2 组培苗生物量

组培苗生物量的检测采用图像处理法^[10]。其方法如下:把待测的组培苗加入到不同质量的同类组培苗中间,获得彩色图像。在 Photoshop 软件中将彩色图像转换为灰度格式,再将灰度格式的图像经过亮度和对比度调整,最后将图像进行反转,使得图像中除组培苗外的其他背景的灰度为零,再根据反转图像对各瓶组培苗进行像素点数的统计。把已知质量的 6 瓶组培苗作为内标,对 6 个内标的质量和对应的像素点进行线性回归,获得线性回归方程。将待测未知样品的像素点代入该方程,可分别获得组培苗天数 t_0, t_1, \dots, t_n 后的质量 $m_{t_0}, m_{t_1}, \dots, m_{t_n}$ 。

1.3.3 蒸腾失水量

根据质量守恒定律可知,在组培过程中,培养瓶内部蒸腾失水量 T_p 表示为

$$T_{P_{t_{01}}} = m_{P_{t_0}} - m_{P_{t_1}} + m_{N_{t_0}} - m_{N_{t_1}} - m_{t_0} + m_{t_1} \quad (1)$$

式中 $T_{P_{t_{01}}}$ ——培养天数为 $t_0 \sim t_1$ 的蒸腾失水量

同样的方法和步骤,依次测定培养 $t_0 \sim t_n$ 时间段的蒸腾失水量 $T_{P_{t_{0n}}}$ 。

1.4 模型建立

1.4.1 蒸腾失水量与培养时间的关系模型

利用线性方程建立蒸腾失水量 T_p 与培养时间 t 的关系模型

$$T_p = At + B \quad (2)$$

式中 A, B ——拟合参数

根据关系式(2),求一阶导数,可知这瓶组培苗蒸腾失水速率 T'_p 为 A 。

1.4.2 组培苗生物量与培养时间的关系模型

用四参数 Logistic 方程拟合建立的组培苗生物量 M 与培养时间 t 的关系模型^[11]为

$$M = M_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{t}{T_0}\right)^b} \quad (3)$$

式中 M_0 ——对数生长起始期组培苗的生物量

a ——组培苗生物量的最大生长量

b ——拟合参数中的指数项

T_0 ——在对数生长量一半时的时间

根据式(3)可求各时间的组培苗生物量即时值。

1.4.3 组培苗生物量与蒸腾失水量的关系模型

用非线性双曲线方程拟合的组培苗生物量 M 与蒸腾失水量 T_p 的关系模型为

$$M = \frac{mT_p}{n + T_p} \quad (4)$$

式中 m 、 n ——拟合参数

将非线性双曲线方程(4)以 M 对 T_p 求一阶导数,可得水分利用率方程

$$W_t = M' = \frac{mn}{(n + T_p)^2} \quad (5)$$

1.5 组培苗蒸腾速率和水分利用率的计算方法

根据蒸腾失水速率 T'_p 与组培苗的生物量 M , 计算出培养期间任一时间 t_i 的组培苗的蒸腾速率为

$$T_{Rt_i} = \frac{T'_p}{M_{t_i}} \quad (6)$$

将式(2)代入式(5),算出培养期间任一时间 t_i 的组培苗的水分利用率为

$$W_{t_i} = \frac{mn}{(n + At_i + B)^2} \quad (7)$$

2 结果与分析

2.1 模型描述

利用 1.3 节测定项目与方法计算出不同因素水平下蒸腾失水量 T_p 以及组培苗生物量 M 随培养时间 t 变化的实验数据,如表 2 所示。并利用 1.4 节拟合出蒸腾失水量 T_p 与培养时间 t 的关系模型,组培苗生物量 M 与培养时间 t 的关系模型,组培苗生物量 M 与蒸腾失水量 T_p 的关系模型,如表 3 所示。

分别建立 6 个处理的茅苍术组培苗的模型,结果表明,蒸腾失水量 T_p 与培养时间 t 的模型用线性

表 2 建模实验数据

处理号		t/d					
		6	12	16	21	28	38
1	T_p	1.008	1.712	2.741	3.727	5.614	7.823
	M	0.134	0.159	0.191	0.243	0.261	0.274
2	T_p	1.005	1.719	2.175	3.136	5.060	7.347
	M	0.151	0.168	0.184	0.221	0.234	0.247
3	T_p	1.020	1.738	2.852	3.923	5.920	8.177
	M	0.131	0.177	0.269	0.394	0.463	0.517
4	T_p	0.986	1.660	2.690	3.670	5.663	7.835
	M	0.133	0.156	0.218	0.296	0.369	0.422
5	T_p	0.932	1.612	2.633	3.510	5.618	8.123
	M	0.114	0.143	0.205	0.270	0.369	0.459
6	T_p	1.000	1.782	3.010	4.342	6.779	9.316
	M	0.157	0.265	0.484	0.889	1.334	1.717

方程能较好地拟合 ($R^2 > 0.95$),蒸腾失水速率 T'_p 为一常数,由此可以计算出任意一天组培苗的蒸腾速率,并且外部因素如组培苗的继代次数和无机氮素水平对蒸腾失水速率 T'_p 影响较小。四参数 Logistic 方程能很好地拟合组培苗生物量 M 与培养时间 t 的模型 ($R^2 > 0.99$),能很好地预测植物的生长情况,这在前人的研究中已得到证实^[11]。组培苗生物量 M 与蒸腾失水量 T_p 的模型用非线性双曲线方程能较好地拟合 ($R^2 > 0.95$)。利用蒸腾失水速率 T'_p 与组培苗的生物量 M ,算出培养期间任一时间 t_i 的组培苗的蒸腾速率;利用式(7),计算出任意时间段的水分利用率 W_{t_i} ,如表 4 所示。

表 3 组培苗蒸腾作用、生物量、培养时间之间的各种模型 ($n=6, P < 0.001$)

Tab.3 Various models among transpiration, biomass of plantlet and culture time

处理号	T_p 与 t 的关系模型	M 与 t 的关系模型	M 与 T_p 的关系模型
1	$T_p = -0.6855 + 0.2210t$ ($R^2 = 0.9912$)	$M = 0.1342 + \frac{0.1412}{1 + (t/16.9499)^{-4.9056}}$ ($R^2 = 0.9967$)	$M = \frac{0.3393T_p}{1.7714 + T_p}$ ($R^2 = 0.9641$)
2	$T_p = -0.7613 + 0.2045t$ ($R^2 = 0.9764$)	$M = 0.1512 + \frac{0.0978}{1 + (t/17.9006)^{-4.4671}}$ ($R^2 = 0.9926$)	$M = \frac{0.2793T_p}{0.9830 + T_p}$ ($R^2 = 0.9559$)
3	$T_p = -0.7615 + 0.2330t$ ($R^2 = 0.9911$)	$M = 0.1262 + \frac{0.3992}{1 + (t/18.2100)^{-4.4553}}$ ($R^2 = 0.9982$)	$M = \frac{0.9701T_p}{6.7386 + T_p}$ ($R^2 = 0.9793$)
4	$T_p = -0.7511 + 0.2232t$ ($R^2 = 0.9894$)	$M = 0.1276 + \frac{0.3181}{1 + (t/20.5125)^{-3.9283}}$ ($R^2 = 0.9988$)	$M = \frac{0.7237T_p}{5.5629 + T_p}$ ($R^2 = 0.9839$)
5	$T_p = -0.9471 + 0.2323t$ ($R^2 = 0.9988$)	$M = 0.1060 + \frac{0.4544}{1 + (t/25.1827)^{-3.0220}}$ ($R^2 = 0.9988$)	$M = \frac{0.9649T_p}{9.4086 + T_p}$ ($R^2 = 0.9988$)
6	$T_p = -1.1369 + 0.2731t$ ($R^2 = 0.9850$)	$M = 1.9618 - \frac{1.8235}{1 + (t/23.3572)^{3.7732}}$ ($R^2 = 0.9988$)	$M = 0.1953T_p - 0.0463$ ($R^2 = 0.9917$)

表 4 组培苗蒸腾速率和水分利用率的计算方法

Tab. 4 Calculating method of transpiration rate and water using efficiency of plantlets

处理号	T_p	M'	W_t
1	0.221 0	$\frac{0.601 0}{(1.771 4 + T_p)^2}$	$\frac{0.601 0}{(0.085 9 + 0.221 0t)^2}$
2	0.204 5	$\frac{0.274 6}{(0.983 0 + T_p)^2}$	$\frac{0.274 6}{(0.266 7 + 0.204 5t)^2}$
3	0.233 0	$\frac{6.537 1}{(6.738 6 + T_p)^2}$	$\frac{6.537 1}{(5.977 1 + 0.233 0t)^2}$
4	0.223 2	$\frac{4.025 9}{(5.562 9 + T_p)^2}$	$\frac{4.025 9}{(4.811 8 + 0.223 2t)^2}$
5	0.232 3	$\frac{8.729 3}{(9.048 6 + T_p)^2}$	$\frac{8.729 3}{(8.099 7 + 0.232 3t)^2}$
6	0.273 1	0.195 3	0.195 3

表 5 茅苍术组培苗蒸腾速率和水分利用率的计算值

Tab. 5 Calculating values of transpiration rate and water using efficiency of *Atractodes lancea* plantlets in vitro

处理号	参数	t/d							
		6	12	16	21	25	28	35	38
1	$T_R/g \cdot (d \cdot g)^{-1}$	1.636	1.416	1.134	0.925	0.859	0.836	0.820	0.810
	$W_t/mg \cdot g^{-1}$	103.3	43.0	28.1	18.3	13.8	11.4	9.0	6.7
2	$T_R/g \cdot (d \cdot g)^{-1}$	1.346	1.238	1.087	0.943	0.885	0.862	0.844	0.832
	$W_t/mg \cdot g^{-1}$	123.1	37.1	21.9	13.2	9.5	7.6	5.9	4.2
3	$T_R/g \cdot (d \cdot g)^{-1}$	1.806	1.294	0.864	0.602	0.521	0.491	0.470	0.456
	$W_t/mg \cdot g^{-1}$	120.2	84.9	69.4	55.3	46.9	41.8	36.2	29.7
4	$T_R/g \cdot (d \cdot g)^{-1}$	1.715	1.377	1.040	0.759	0.646	0.598	0.560	0.532
	$W_t/mg \cdot g^{-1}$	106.4	71.8	57.3	44.6	37.3	32.9	28.2	22.8
5	$T_R/g \cdot (d \cdot g)^{-1}$	2.176	2.076	1.552	1.173	0.853	0.702	0.629	0.564
	$W_t/mg \cdot g^{-1}$	96.9	73.6	62.5	51.8	45.1	40.9	36.2	30.5
6	$T_R/g \cdot (d \cdot g)^{-1}$	1.832	0.993	0.556	0.314	0.234	0.202	0.178	0.160
	$W_t/mg \cdot g^{-1}$	195.3	195.3	195.3	195.3	195.3	195.3	195.3	195.3

培养基中氮素含量过高或过低都会影响植物的生长,许多研究表明,在一定的氮素浓度范围内,植株的叶绿素含量和光合特性与氮素的含量呈正相关^[14-16]。植物光合作用的增强也会增加植物的自养能力和水分利用效率。在组织培养过程中,也有类似的情况,然而不同植物的氮素适应浓度范围有一定的差异性。本实验的结果也表明,培养基中氮素含量的增加会增加植物的自养能力,从而增加蒸腾速率和水分利用率,只是对茅苍术来说,培养基的无机氮减少到 2/3,对蒸腾作用和自养能力影响仍

2.2 组培苗蒸腾速率和水分利用率的计算值

表 5 中所有的样品测定的结果基本趋势是:蒸腾速率和水分利用率都随培养时间的增加而减小。一般认为,随着培养时间的延长和继代次数的增多,植株繁殖能力退化,从而影响植物对水分的吸收^[12-13]。本文的结果表明继代 10 次(处理 1、2、3、4)和继代 4 次(处理 5、6)的茅苍术组培苗的蒸腾速率和水分利用率存在一定的差异,继代 4 次的组培苗有着较高的蒸腾速率和水分利用率,处理 6 的茅苍术组培苗由于植株的生长处于对数生长期,因此在该生长期,组培苗生物量 M 与蒸腾 T_p 的模型可以用线性关系更好地拟合($R^2 = 0.9917$),因此其水分利用率为定值;加上处理 6 的继代次数少,培养基中氮素含量高,因此该时期内组培苗的水分利用率显著高于其他处理。

不显著,这与文献[17]的研究内容相吻合。

3 结束语

采用图像分析法和质量守恒定律分别获得组培苗生长信息和蒸腾失水量,并建立组培苗生长信息、蒸腾失水量与时间的模型,组培苗生长信息与蒸腾失水量之间的模型,通过对茅苍术组培苗的蒸腾速率和水分利用率的实际测定,表明利用本文方法可以实现对组培苗蒸腾速率和水分利用率的无菌动态检测。

参 考 文 献

- Gates D M. Transpiration and leaf temperature[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1968, 19: 211 ~ 238.
- Gupta D S, Ibaraki Y. Plant tissue culture engineering[M]. Dordrecht:Springer, 2006.

- 3 司建华,冯起,张小由,等. 植物蒸散耗水量测定方法研究进展[J]. 水科学进展,2005,16(3):450~459.
Si Jianhua, Feng Qi, Zhang Xiaoyou, et al. Research progress on surveying and calculation of evapotranspiration of plants and its prospects[J]. Advances in Water Science,2005,16(3):450~459. (in Chinese)
- 4 屈艳萍,康绍忠,张晓涛,等. 植物蒸发蒸腾量测定方法述评[J]. 水利水电科学进展,2006,26(3):72~77.
Qu Yanping, Kang Shaozhong, Zhang Xiaotao, et al. A review of methods for measurement of evapotranspiration from plants [J]. Advances in Science and Technology of Water Resource,2006,26(3):72~77. (in Chinese)
- 5 陈新明, Jay Dhungel, Surya Bhattarai, 等. 加氧灌溉对菠萝根区土壤呼吸和生理特性的影响[J]. 排灌机械工程学报, 2010,28(6):543~547.
Chen Xinming, Jay Dhungel, Surya Bhattarai, et al. Impact of oxygation on soil respiration and crop physiological characteristics in pineapple[J]. Journal of Drainage and Irrigation Machinery Engineering, 2010, 28(6): 543~547. (in Chinese)
- 6 张晓涛,康绍忠,王鹏新,等. 估算区域蒸发蒸腾量的遥感模型对比分析[J]. 农业工程学报,2006,22(7):6~13.
Zhang Xiaotao, Kang Shaozhong, Wang Pengxin, et al. Comparative analysis of regional evapotranspiration estimation models using remotely sensed data[J]. Transactions of the CSAE,2006,22(7):6~13. (in Chinese)
- 7 牛勇,刘洪禄,吴文勇,等. 基于大型称重式蒸渗仪的日光温室黄瓜蒸腾规律研究[J]. 农业工程学报,2011,27(1):52~56.
Niu Yong, Liu Honglu, Wu Wenyong, et al. Cucumber transpiration by large-scale weighting lysimeter in solar greenhouse [J]. Transactions of the CSAE,2011,27(1): 52~56. (in Chinese)
- 8 余冬立,邵明安,俞双恩. 黄土高原典型植被覆盖下 SPAC 系统水量平衡模拟[J]. 农业机械学报,2011,42(5):73~78.
She Dongli, Shao Ming'an, Yu Shuang'en. Water balance simulation in SPAC systems of slope lands covered with typical vegetations on loess plateau[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011,42(5): 73~78. (in Chinese)
- 9 强小嫚,蔡焕杰,王健. 波文比仪与蒸渗仪测定作物蒸发蒸腾量对比[J]. 农业工程学报,2009,25(2):12~17.
Qiang Xiaoman, Cai Huanjie, Wang Jian. Comparative study of crop evapotranspiration measured by Bowen ratio and lysimeter[J]. Transactions of the CSAE,2009,25(2): 12~17. (in Chinese)
- 10 Wu Y Y, Yang X Y, Li P P, et al. The technique of the acquiring dynamic information on the growth of plantlets in vitro[C]// FBIE 2009-Proceedings of 2009 International Conference on Future Biomedical Information Engineering, 2009: 13~16.
- 11 Wu Y Y, Li P P, Liang Z, et al. Acquiring the dynamic growth and development information on *Atractylodes lancea*[C]// Proceedings of the 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI 09), 2009: 1 676 ~ 1 679.
- 12 Meira Z I V, Meir G, Halevy A H. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1983, 2(1): 55~65.
- 13 Fay M F. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 1992, 28 (1): 1~4.
- 14 An H, Shangguan Z P. Specific leaf area, leaf nitrogen content, and photosynthetic acclimation of *Trifolium repens* L. seedlings grown at different irradiances and nitrogen concentrations[J]. Photosynthetica, 2008, 46(1): 143~147.
- 15 Guo H X, Liu W Q, Shi Y C. Effects of different nitrogen forms on photosynthetic irate and the chlorophyll fluorescence induction kinetics of flue-cured tobacco[J]. Photosynthetica,2006, 44(1): 140~142.
- 16 吴楚,王政权,范志强,等. 不同氮浓度和形态比例对水曲柳幼苗叶绿素合成、光合作用以及生物量分配的影响[J]. 植物生态学报,2003, 27(6):771~779.
Wu Chu, Wang Zhengquan, Fan Zhiqiang, et al. Effects of different concentrations and form ratios of nitrogen on chlorophyll biosynthesis, photosynthesis and biomass partitioning in fraxinus mandshurica seedlings [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2003,27(6):771~779. (in Chinese)
- 17 吴沿友,杨晓勇. 道地中药材茅苍术的品种选育原理与技术[M]. 镇江:江苏大学出版社,2009.