

·组织培养简讯·

生物反应器在满天星快繁中的应用

张春华, 朴炫春, 廉美兰*, 王守明

延边大学农学院园艺系, 龙井 133400

摘要 利用2.5 L柱状气升式生物反应器采用接触法进行了满天星(*Gypsophila paniculata*)增殖培养。结果表明: 外植体接种密度(每个反应器接种外植体个数)为35比密度为25和45更有利于满天星的增殖生长, 平均每个生物反应器内可获得252株生长健壮的不定苗; 光强为 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 对满天星增殖培养最有利, 过高的光强对不定芽和株高有抑制作用; 通过小孔隙(15 μm)的多孔喷头注入0.1 vvm空气有利于满天星增殖培养。

关键词 生物反应器, 满天星, 增殖培养

张春华, 朴炫春, 廉美兰, 王守明 (2007). 生物反应器在满天星快繁中的应用. 植物学通报 24, 526–531.

组培技术目前被广泛应用于具商业化生产和重要经济价值植物的无性繁殖。然而, 随着对组培苗需求的不断增加, 常规的组培方法由于效率较低、成本高而较难满足大规模生产植物组培苗的需求, 因此迫切需要建立一种用简单的生产设备和技术便可大规模繁殖生产植物组培苗的新工艺和方法, 从而大大降低植物组培生产的劳动强度和生产成本。生物反应器是目前被认为可以使植物组织培养体系由小规模转向大规模, 同时大幅提高生产效率及降低生产成本和劳动强度的快速繁殖组培苗的生产装置(Paek et al., 2001)。

满天星(*Gypsophila paniculata*)在我国气候条件下不能结籽, 扦插成活率较低。而组织培养虽是其植株再生的有效途径, 但却存在成本高、规模小等问题而远不能满足市场需求。赵长新等(2005)发现, 采用生物反应器培养能有效实现大量扩繁满天星组培苗。生物反应器在植物细胞培养中应用较为广泛(Yuan et al., 2004; Attilio et al., 2006), 主要类型有搅拌式、气升式、鼓泡式和转鼓式(黄艳等, 2001a)。其中气升式生物反应器是以气体为动力, 靠导流装置的引导, 形成气液固混合物的总体有序循环, 具有混合效果好、结构简单、无运动部件、易清洗、不易染菌和传热传质效率高等特

点(张明菊, 2005)。目前在蝴蝶兰(Park et al., 2002)、百合(Lian et al., 2003)和菊花(Hahn and Paek, 2005)等植物器官培养方面得以应用, 并取得较好效果。但在满天星种苗的快速繁殖方面尚无研究报道。本文利用2.5 L气升式生物反应器进行满天星幼苗的快速扩繁, 探讨各种培养条件对满天星增殖和生长的影响, 以期今后运用气升式生物反应器进行放大培养, 实现满天星种苗的商业化生产奠定实验和技术基础。

1 材料与方法

将通过茎尖离体培养得到的满天星(*Gypsophila paniculata*)试管丛生苗切成单株(带4片叶)作为实验材料。

1.1 生物反应器和培养基

实验使用自制的2.5 L柱状气升式生物反应器($\phi\times h$: 14 cm $\times$ 16 cm), 其结构如图1。培养时, 在距离反应器底部3.0 cm处架一支持网, 通过定期补充培养基使接入反应器内的外植体在支持网上始终与培养基刚刚接触, 培养基量保持在0.5 L。所用的培养基为MS(Murashige

收稿日期: 2006-10-24; 接受日期: 2006-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(No.30560094)和国家教育部科学技术重点项目(No. 205035)

* 通讯作者。E-mail: lianmeilan2001@yahoo.com.cn

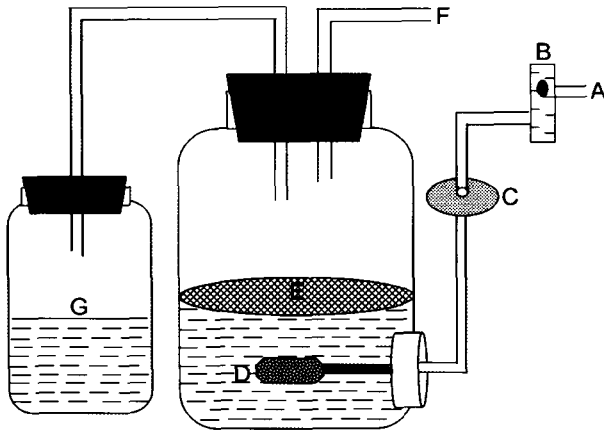


图1 生物反应器结构示意图

A: 进气口; B: 空气调节器; C: 薄膜过滤器; D: 喷头; E: 支持网; F: 出气口; G: 贮液瓶

Figure 1 Schematic diagram of bioreactor

A: air inlet; B: air flow meter; C: membrane filter; D: sparger; E: supporter net; F: air outlet; G: medium reservoir

and Skoog, 1962)加倍后的液体培养基, 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 值调至 5.8。

1.2 处理方法

生物反应器内接种密度对满天星增殖的影响实验设置3种处理, 每个反应器分别接种 25、35 和 45 个外植体, 并使用直径为 2.4 cm、长 4.7 cm、孔隙为 $60 \mu\text{m}$ 的多孔喷头, 注入 0.10vvm (air volume/culture volume/min) 的空气, 在光强为 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下培养。在探讨生物反应器内光照强度对满天星增殖的影响时, 每个反应器内接种 35 个外植体, 光强分别为 10、30、60、90 和 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 其它条件与密度实验相同。进行选择生物反应器适宜喷头实验时, 设置 A(多孔喷头, 孔隙 $15 \mu\text{m}$)、B(多孔喷头, 孔隙 $60 \mu\text{m}$) 和 C(硅胶管, 内径 4 mm) 3 种处理, 每个反应器接入 35 个外植体, 光强为 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 其它条件与密度实验相同。而在探讨生物反应器内通气量对满天星增殖的影响时, 使用孔隙为 $60 \mu\text{m}$ 的喷头, 通气量分别为 0、0.05、

0.1、0.2 和 0.3vvm , 其它条件同喷头实验。

1.3 培养条件及数据统计和处理

将接种后的生物反应器置于温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 每天光照 16 小时, 培养 20 天后统计幼苗增殖情况。其中叶绿素含量用叶绿素测定仪 (SPAD-502, Minolta Camera Co. Ltd., Japan), 随机取中部 3 片叶子进行测定。每个处理设置 3 个重复, 所得结果用 SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) 软件处理, 采用邓肯氏新复极差法进行分析比较, 显著水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 生物反应器内培养密度对满天星增殖的影响

将 25、35 和 45 个满天星外植体分别接入生物反应器内进行增殖培养, 20 天后统计记录外植体的增殖和生长情况。由表 1 可见, 接种密度为 35 时, 增殖效果最好, 平均每个外植体分化的幼苗数为 7.2 个, 每个反应器可生产 252 株幼苗, 明显多于接种密度为 25 和 45 的处理。接种密度为 35 的处理, 其幼苗的株高、鲜重和干重显著优于其它 2 种处理, 且植株健壮, 无徒长现象。叶绿素在接种密度为 25 和 35 时处理间差异虽不显著, 但均优于接种密度为 45 的处理。已有研究表明, 在植物组织培养过程中器官形成与发育受外植体数/培养基量、外植体数/空气量和外植体数/容器容积等比值的影响 (McClelland and Smith, 1990)。在植物器官的培养过程中发现接种密度影响培养体的生长, 适宜接种密度依据植物种类、培养方式等而不同 (Park et al., 2002; Hahn and Paek, 2005)。

在本实验中, 当接种密度为 35 时, 其增殖和生长效果均表现良好, 而当接种密度为 45 时, 由于植株过于拥挤, 导致部分幼苗死亡, 培养 20 天后只有 35 个外植体成活, 且大多数苗的基部变黄。而在接种密度为 25 时, 其外植体的增殖和生长情况均不良。实验结果表明, 在利用直径为 14 cm、高 16 cm 的 2.5 L 柱状生物反应器采用接触法进行满天星快速增殖培养时, 以接种密度为 35 的增殖效果最好。

2.2 光照强度对满天星生物反应器增殖的影响

光照强度对生物反应器内满天星增殖和生长的影响见表2。满天星增殖的幼苗数以光强为 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的处理最少,但其它各光照强度下培养的满天星外植体所产生的幼苗数目无显著差异,幼苗的株高则随生物反应器内光照强度的增加而逐渐下降。对比各光照强度培养下的满天星外植体所产生幼苗的鲜重和干重,以在 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照强度下效果最佳; $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的过强光照则对幼苗的鲜重和干重有抑制作用。在本实验中,随着光强增加,幼苗的叶绿素含量也升高,但在光照强度为90和 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,其幼苗的叶绿素含量无显著差异。本实验结果表明,较强的光照对生物反应器内满天星增殖培养是必需的,其中以 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强对满天星增殖培养最为有利,过高的光强对不定苗的形成和株高都有抑制作用。

2.3 生物反应器内喷头种类对满天星增殖的影响

生物反应器喷头种类对满天星增殖生长的影响见表3。在对生物反应器进行通气时,随着多孔喷头孔隙直径的减小,所产生幼苗的株高、鲜重和干重逐渐增加。其中,以A喷头效果最好,所产生的幼苗最多;B喷头所得

到的幼苗数虽与A喷头无显著差异,但所得幼苗的株高、鲜重和干重则差异显著。而当空气直接通过内径为4 mm的硅胶管(C喷头)生物反应器时,满天星外植体的增殖及其幼苗的生长均受抑制。

气升式生物反应器是利用喷头的喷射动能和流体在反应器内的重度差造成流体循环流动,从而实现培养液的搅拌、混合和溶氧。反应器内的溶氧量对植物细胞和器官生长影响很大,而溶氧率通常与搅拌强度、气泡分散程度、培养基的溶氧度和容器内水压等有关(黄艳等, 2001b)。Tanaka(1981)认为喷头孔隙对生物反应器内植物体的生长产生影响,喷头孔隙大,所注入空气的气泡大,从而使气体不能充分扩散到培养基中,造成培养基内的溶氧低而不利于植物体生长,这与本实验的结果类似。在本实验中,用可喷射出大小一致微细气泡的A和B两种处理进行通气培养的生物反应器增殖满天星的效果比较好,而只产生竖直的大气泡的C处理的增殖效果较差。这可能是由于A和B两种多孔喷头均可喷射出大小一致的微细气泡,且散射范围较大,能与培养基充分混合,而C处理只产生直径较大的气泡,它们在生物反应器内流体循环慢,不能很好地与培养基混合,因而使得满天星的增殖及其幼苗的生长受到影响。所以在应用

表1 反应器内接种密度对满天星增殖和生长的影响

Table 1 Effect of inoculation density in bioreactor on proliferation and growth of *Gypsophila paniculata*

Inoculation density (No. of explants /bioreactor)	No. of shoots /explant	No. of shoots /bioreactor	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (mg/explant)	Shoot dry weight (mg/explant)	Chlorophyll content**
25	5.0 b*	125.0 c	2.9 b	1232.3 c	99.7 b	25.5 a
35	7.2 a	252.0 a	4.6 a	1998.1 a	110.6 a	23.7 a
45	5.4 b	189.0 b	3.2 b	1567.0 b	80.6 b	18.0 b

*Different letters means significant at $P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test; **SPAD value

表2 光照强度对生物反应器内满天星增殖和生长的影响

Table 2 Effect of light intensity on proliferation and growth of *Gypsophila paniculata* in bioreactor

Light intensity ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	No. of shoots /explant	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (mg/explant)	Shoot dry weight (mg/explant)	Chlorophyll content**
10	5.3 a*	4.8 a	820.5 c	52.4 c	10.1 c
30	5.1 a	4.7 ab	978.0 bc	42.0 d	9.4 c
60	5.3 a	4.5 b	1068.0 b	63.0 b	18.1 b
90	4.7 a	3.6 c	1244.3 a	82.3 a	21.9 a
120	2.3 b	2.1 d	377.2 d	36.4 d	23.1 a

*Different letters means significant at $P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test; **SPAD value

表 3 生物反应器内喷头种类对满天星增殖和生长的影响

Table 3 Effect of sparger types in bioreactor on proliferation and growth of *Gypsophila paniculata*

Sparger types*	No. of shoots /explant	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (mg/explant)	Shoot dry weight (mg/explant)
A	5.3 a**	4.9 a	2068.2 a	104.2 a
B	4.9 a	4.5 b	1239.4 b	83.3 b
C	3.6 b	3.9 c	873.2 c	73.6 b

* A: lacunosis sparger of 15 mm; B: lacunosis sparger of 60 mm; C: silica gel tube of 4 mm inner diameter;

** Different letters means significant at $P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test

表 4 通气量对生物反应器内培养的满天星增殖和生长的影响

Table 4 Effect of air volume on proliferation and growth of *Gypsophila paniculata* in bioreactor

Air volume (vvm)	No. of shoots /explant	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (mg/explant)	Shoot dry weight (mg/explant)
0	—*	—	—	—
0.05	3.5 c**	2.5 c	775.1 b	57.0 b
0.10	7.0 a	2.8 b	1298.9 a	97.1 a
0.20	4.7 b	3.3 a	880.0 b	51.8 bc
0.30	2.3 d	2.2 d	440.7 c	41.1 c

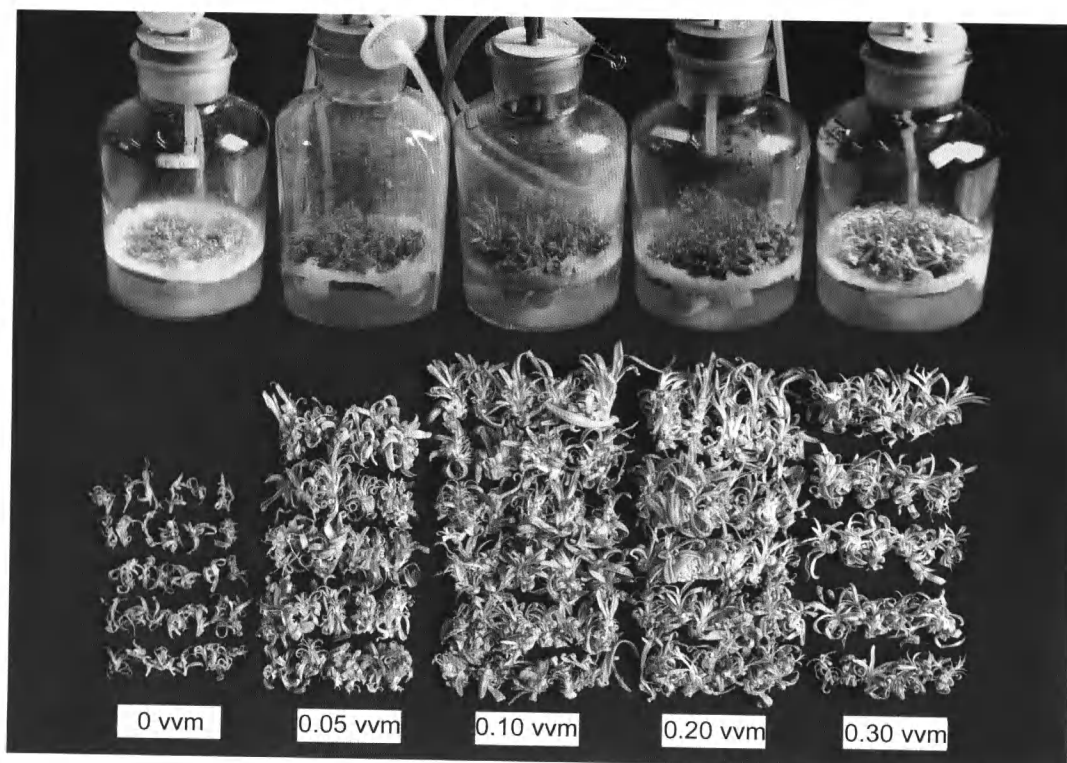
* Indicated not determine due to death of shoot; ** Different letters means significant at $P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test

图 2 生物反应器内不同通气量条件下满天星的增殖和生长

Figure 2 Proliferation and growth of *Gypsophila paniculata* under different air volume conditions of bioreactor
(vvm means air volume/culture volume/min)

气升式生物反应器快速增殖满天星幼苗时, 应选择孔隙小的多孔喷头, 不宜采用直接通过管子注入空气的通气方式。

2.4 通气量的影响

通气量对满天星生物反应器增殖和生长的影响见表4。不通气(0 vvm)时, 所接种的满天星外植体在2周内逐渐变黄直至死亡。而当通气量为0.1 vvm时, 所产生的幼苗不仅生长健壮, 而且幼苗的数目、鲜重和干重均显著优于其它处理; 但当通气量达0.3 vvm时, 外植体的增殖效果变差(图2)。实验结果表明, 生物反应器培养需要供给一定量的空气, 但较多的空气注入则因流体动力胁迫使植物生长受到抑制。空气的注入是进行生物反应器培养的重要参数(Schlatrmann et al., 1994)。Jeong等(2006)认为通气量与溶氧率有直接的关系, 是影响生物反应器培养效果的重要因素。在本实验中, 0.1 vvm是促进满天星增殖和生长的最适通气量, 超过0.3 vvm不利于满天星幼苗的增殖。

参考文献

- 黄艳, 赵德修, 李佐虎 (2001a). 利用生物反应器培养植物细胞的研究进展 (II). 植物学通报 18, 665-671.
- 黄艳, 赵德修, 李佐虎 (2001b). 植物细胞生物反应器培养的研究进展 (I). 植物学通报 18, 567-570.
- 张明菊 (2005). 生物反应器产业概况. 黄冈职业技术学院学报 7, 87-91.
- 赵长新, 廉美兰, 朴炫春 (2005). 应用生物反应器培养满天星幼苗的初步研究. 吉林农业大学学报 27, 10-12.
- Attilio C, Alessandra L, Adriana DB, Carlo S (2006). Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochem Eng J* 32, 13-18.
- Hahn EJ, Paek KY (2005). Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81, 301-306.
- Jeong CS, Chakrabarty D, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY (2006). Effect of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochem Eng J* 27, 252-263.
- Lian ML, Chakrabarty D, Paek KY (2003). Growth of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. *Sci Hortic* 97, 441-448.
- McClelland MT, Smith MAL (1990). Vessel type, closure and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience* 25, 797-800.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15, 473-497.
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001). Application of bioreactors of large scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37, 149-157.
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2002). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 63, 67-72.
- Schlatrmann JE, Fonck E, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ (1994). The negligible role of carbon dioxide and ethylene in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell suspension. *Plant Cell Rep* 14, 157-160.
- Tanaka H (1981). Technological problems in cultivation of plant cell at high density. *Biotechnol Bioeng* 23, 1203-1218.
- Yuan XF, Zhao B, Wang YC (2004). Cell culture of *Saussurea medusa* in a periodically submerged air-lift bioreactor. *Biochem Eng J* 21, 235-239.

Application of Bioreactors in Rapid Propagation of *Gypsophila paniculata*

Chunhua Zhang, Xuanchun Piao, Meilan Lian*, Shouming Wang

Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China

Abstract We investigated proliferation culture of *Gypsophila paniculata* by using a raft method in a 2.5 L air-lift bioreactor of the column type. Inoculation density of 35 explants in the bioreactor was more favorable than treatments of 25 and 45 explants for proliferation; 252 vigorous adventitious shoots were obtained for the 35 explants with the bioreactor. A light intensity of 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ was considered the most effective, but excessive light inhibited shoot formation and length. Furthermore, proliferation of *G. paniculata* in the bioreactor was more efficient with lacunaris sparger of small pore size (15 μm) and 0.1 vvm of air.

Key words bioreactor, *Gypsophila paniculata*, proliferation culture

Zhang CH, Piao XC, Lian ML, Wang SM (2007). Application of bioreactors in rapid propagation of *Gypsophila paniculata*. *Chin Bull Bot* 24, 526–531.

* Author for correspondence. E-mail: lianmeilan2001@yahoo.com.cn

(责任编辑: 白羽红)

新书介绍 —— 《细胞遗传学》

《细胞遗传学》是由李集临和徐香玲教授编著, 科学出版社出版(定价: 38.00 元)的新书。

本书以染色体遗传为重点, 在经典细胞遗传学基础上应用现代分子遗传学的研究成果, 探讨细胞遗传的机制。全书共分 10 章。第一章: 细胞遗传学的进展; 第二章: 染色体成分; 第三章: 染色体的结构; 第四章: 染色体组(基因组); 第五章: 细胞增殖、细胞周期与细胞分化; 第六章: 染色体功能; 第七章: 染色体水平的调控; 第八章: 染色体变异; 第九章: 细胞质遗传(重点介绍细胞质遗传研究的最新进展和细胞质雄性不育的机制); 第十章: 植物染色体工程(以小麦的染色体工程为重点, 理论联系实际, 经典的染色体工程与现代的染色体操作相结合)。

细胞遗传学是遗传学与细胞学的交叉学科, 它侧重于染色体(包括细胞质的基因组)的结构、功能、调控机制、染色体组、染色体操作等方面的研究, 通过染色体、染色体组、细胞质、细胞质基因组来研究遗传与变异的机制。细胞遗传学与普通遗传学、细胞生物学有着密切的关系。由于植物远缘杂交、染色体工程、单倍体、多倍体及雄性不育和杂种优势等研究成果广泛应用于农业生产, 因此细胞遗传学具有重要的理论意义和应用价值。

本书文字简练, 引用大量图表, 深入浅出, 可读性强。适于高等院校遗传学专业的本科生、研究生、教师以及从事育种的科研工作者参考。