

应用雾化营养液生物反应器繁殖脱毒马铃薯的研究

郝震龙 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所生化工程重点实验室 北京 100080)

耿玉轩 邓向东 胡赞民 陈正华

(中国科学院遗传研究所 305 课题组 北京 100101)

摘要 利用雾化营养液生物反应器(简称“雾化反应器”)对马铃薯(*Solanum tuberosum*)苗的培养和微型薯的诱导进行研究。分析了苗生长过程中生物量、营养雾传递和糖消耗的变化以及微型薯诱导的时间进程。培养结果表明:与液体或固体培养基相比,雾化反应器培养能提高苗的繁殖效率和促进微型薯的诱导。采用两步法提高了雾化反应器诱导微型薯的效果。

关键词 生物反应器,营养雾培养,马铃薯,苗培养,微型薯

分类号 Q942 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0355-61

病毒侵染是引起马铃薯的退化和减产的重要原因。采用茎尖培养技术获得脱毒的植株并用于生产,是克服马铃薯退化问题的途径之一^[1]。利用组织培养技术进行切段继代培养可以大量地繁殖无毒的试管苗,更换诱导培养基后可以生产无毒的试管薯(又称“微型薯”)^[1~3]。由于植物组织培养技术具有繁殖周期短、繁殖系数高、不占用耕地等优点,并且杜绝了病毒经昆虫、土壤等的传播,因此成为脱毒马铃薯扩大繁殖的重要工具。但是传统的组织培养技术操作繁琐、劳动力消耗大而且培养条件不容易统一控制,而生物反应器培养技术的建立将为繁殖规模的放大和最终走向工业化生产奠定基础。

由 Weathers 等^[4]提出的雾化营养液生物反应器是一种新的培养手段。许多研究表明雾化反应器可用于多种植物的培养^[4~7]。本工作对雾化反应器内马铃薯的繁殖进行了研究,并与传统的培养方法进行了比较。研究结果的获得将有助于加深对雾化反应器在植物组织培养中的作用的认识,并为更大规模的培养和反应器的设计奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料和培养基

马铃薯栽培品种“中薯三号”的脱毒试管苗由中国科学院植物研究所宋燕茹教授提供。脱毒苗切段后在固体繁苗培养基上继代培养。

苗繁殖培养基为含 30g/L 蔗糖的 MS 培养基^[8]。微型薯的诱导培养基为含 10mg/L BA 和 80g/L 蔗糖的 MS 培养基。用于继代培养和对照培养的固体培养基另外附加 6g/L 的琼脂。所有培养基用 NaOH 调到 pH5.8,然后高压蒸汽灭菌(121℃,20min)。

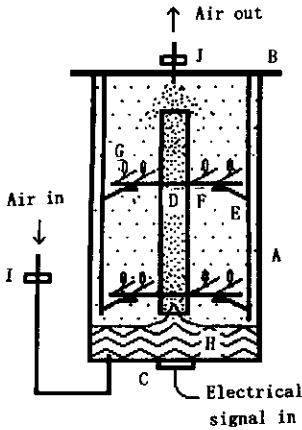


图 1 雾化反应器示意图

Fig. 1 Diagram of the nutrient mist bioreactor

A. Culture chamber, B. Flange plate, C. Transducer, D. Draught tube, E. Support, F. Culture screen, G. Cultures, H. Medium, I, J. Air filters, The points represent the mist

1.2 雾化反应器

图 1 是营养液雾化生物反应器的结构示意图。培养室(高 25cm 内径 10cm)由玻璃制成,内盛培养基 350mL/300mL。培养室上端用不锈钢法兰盘密封,支架与法兰盘相连,培养网放在支架上并可以活动。法兰盘开启后,可以连支架和培养网一并提起,以便进行接种和取出培养物称量。压电陶瓷换能片固定在反应器底部中央。导流筒(高 18cm 内径 2cm)位于培养基液面上方约 1cm,并与换能片正对。培养前,整个反应器经高压蒸汽灭菌。在培养过程中,当换能片接到由震荡电路而来的电信号后产生超声震荡。培养基在震荡的冲击下向上喷涌形成一段喷泉,并被击碎成雾。营养雾在导流筒内形成后沿导流筒上升,由导流筒上口溢出,然后在自身重力作用下沉降并扩散至整个培养空间内。当营养雾流经马铃薯培养物时,一部分在培养物表面重新凝结,为其生长提供养分。

1.3 培养方法

1.3.1 反应器培养: 苗的培养:将继代 3~4 周的马铃薯脱毒苗切成单节间茎段作为外植体,均匀接种于反应器内。培养基为 350mL 苗繁殖培养基,接种量为 70 个茎段/反应器。

25℃ 的条件下恒温培养 30d。采用 5min/2h 的供雾周期,在雾化间歇通气,每次 10min,气速 200mL/min。光照强度约 2000lx.,光周期为 12h/d。

微型薯的诱导: 一步法:将 90 个单节间茎段接种在盛有 300mL 诱导培养基的雾化反应器内,在 18~20℃ 和黑暗条件下培养 30d。供雾和通气条件同上。两步法:按照培养苗的方法将 90 个单节间茎段在雾化反应器内培养 10d。然后更换培养基为诱导培养基,在 18~20℃ 和黑暗条件下培养 30d。供雾和通气条件保持不变。

1.3.2 对照培养: 培养容器为高 8cm 内径 6cm 的玻璃瓶,每瓶盛有 40mL 培养基。苗的培养:固体对照培养和液体对照培养都是以单节间茎段作为接种材料,分别采用固体和液体的苗繁殖培养基。微型薯的诱导:一步法诱导的对照实验以单节间茎段为外植体,分别采用固体或液体的诱导培养基。由于更换固体培养基比较困难而且容易损伤苗,所以两步法诱导微型薯的对照实验只采用液体培养基,接种材料为含 2~3 个节间的茎切段。在苗繁殖培养基中的培养 3 周后转入诱导培养基。为进行比较,对照培养在单位体积培养基的外植体接种量、温度和光照条件等方面都与反应器培养保持一致。

1.4 测量方法

在培养过程中,定期取出雾化反应器内的培养物(连培养网,网重已知),用无菌滤纸吸干后测量鲜重(FW);然后放回反应器供雾 5min,再次取出称量;称量后放回反应器继续培养。以上操作均在无菌条件下进行。两次称量的结果相减再除以时间得到当前生物量下培养物获得的营养雾流量(Fa)。对培养基定期取样测定残糖,方法参照文献[9]。

2 结果与讨论

2.1 苗的培养

2.1.1 培养过程中苗的生长、营养雾的传递和糖的消耗: 单节间茎段接种到雾化反应器后, 茎段上的腋芽开始伸长, 逐渐长成苗。如图 2 所示, 马铃薯苗的生长在培养初期较慢, 然后逐渐加快, 至 20d 以后达到最快。培养过程中发现, 一周后苗上开始有气生根形成。气生根从茎上水平伸出, 增加了表面积并促进了营养雾的凝集。在 10~20d 之间, 气生根的生长最为旺盛, 这段时间内 Fa 的增加速度大于生物量的增长速度。营养雾传递量的增加使生长开始加快。到培养晚期 (20d 以

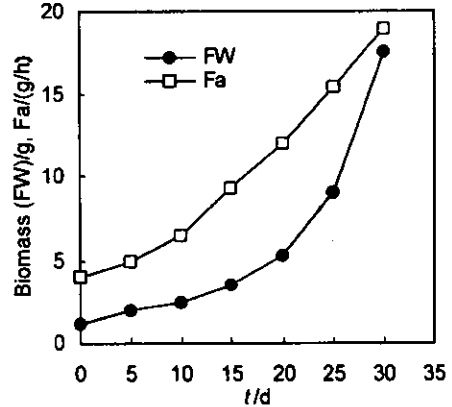


图 2 苗的生长和营养雾的传递

Fig. 2 Growth of shoots and transfer of nutrient mist

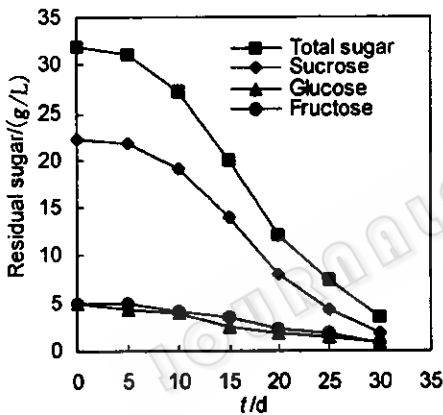


图 3 培养过程中残糖的变化

Fig. 3 Changes of residual sugars during the culture

后), 每棵苗的第二或第三茎节以下的所有的茎节上都有 3~4 根气生根形成。气生根呈水平伸展, 彼此交错并与垂直生长的茎形成一种空间网状结构。培养物的这种群体生长形态显著增强了它们对营养雾的捕获能力, 苗的生长也达到最快。

营养雾培养过程中, 培养基中的总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖浓度的变化如图 3 所示。高压蒸汽灭菌使一部分蔗糖分解为葡萄糖和果糖。马铃薯苗的生长对蔗糖的利用速度最快。从总糖的利用来看, 糖的消耗 10d 以后显著加快, 这与气生根的旺盛生长的现象一致。20d 后, 糖消耗速度略有下降, 而生长速度却达到最大 (图 2)。这可能是由于糖浓度的

下降减缓了糖的利用速率。但同时随着苗的生长, 光合作用增强, 生长对培养基中碳源 (糖) 的依赖性降低。

2.1.2 培养结果与对照的比较: 图版 1、2 分别给出了供雾和非供雾条件下, 反应器内马铃薯苗的生长情况及其与液体和固体培养基中马铃薯苗的比较。表 1 显示, 雾化反应器和固体培养基培养的茎段外植体全部形成了苗。而液体培养基中的外植体成苗率只有 54.7%, 一部分外植体由于被液体培养基浸没, 呼吸受到抑制并发生玻璃化现象, 导致活力的下降以至于死亡。经过 30d 培养, 3 种培养方法获得的马铃薯苗在高度上差异不大。雾化培养苗在茎的直径上与存活的液体培养苗相近, 而大于固体培养苗。与固体培养基相比, 雾化反应器和液体培养基更有利于营养物质的扩散、传递。由以上结果可以看出, 采用营养雾培养既可以避免液体浸没造成的对气体交换的影响和玻璃化现象, 又能克

服固体培养基不利于营养物质扩散的缺陷,显著改善了培养物的生长环境,因此培养效果最好。30天培养结束后,雾化培养苗形成的节间数最多(表1),这意味着在下一轮继代培养时能提供的外植体数最多。因此,雾化反应器的繁殖效率最高。

表1 马铃薯苗在3种培养方法中的生长情况

Table 1 Growth conditions of potato shoots in the three methods

| Culture methods | Shooting rate /% | Shoot length /(cm) | Stem diameter /(mm) | Node number per shoot |
|-----------------|---------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Bioreactor | 100 | 11.1 ± 0.2 | 1.0~1.2 | 11.3 ± 0.2 |
| Solid medium | 100 | 11.5 ± 0.3 | 0.6~0.7 | 5.3 ± 0.3 |
| Liquid medium | 54.7 | 11.4 ± 0.5 | 1.0~1.2 | 7.9 ± 0.4 |

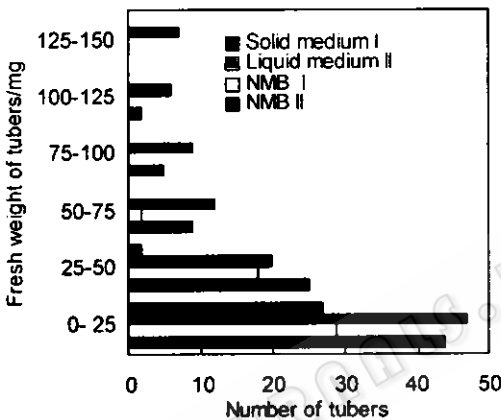


图4 微型薯诱导的时间进程

Fig. 4 Time course of the microtuber induction

2.2 微型薯的诱导和培养

2.2.1 雾化反应器中微型薯的形成:

采用一步法进行诱导,外植体不形成苗,微型薯由腋芽直接发育而成。在2步法诱导中外植体先长成苗,然后在诱导条件下苗上的顶芽或腋芽(主要是顶芽)形成微型薯(图版I-3)。图4显示的是雾化反应器内微型薯诱导的时间进程。可以看出,一步法诱导的微型薯的数量是随着时间逐渐增加,并且一部分外植体最终没有结薯。与之相比,两步法中大部分微型薯的形成都集中在诱导培养的早期。这一现象在摇瓶诱导^[2]和发酵罐

培养中也有发现^[3]。显然,采用两步法诱导能提高诱导率和一致性。这是由于在第一阶段茎段外植体发育成完整苗的过程中,马铃薯苗进入了旺盛生长的状态,生活力得到提高。当转入诱导条件下后,大部分马铃薯苗能迅速适应新的诱导培养环境并作出反应,使微型薯的诱导呈现出同步化的趋势。

2.2.2 诱导效果与对照的比较:

微型薯的诱导率以结薯量与接种的外植体的数目的比值来计算。表2显示,与对照培养的一步法诱导相比雾化反应器中一步法的诱导率最高。说明雾化反应器内的培养环境比固体培养基和液体培养基更适于微型薯的诱导。

在两步诱导中,经过第一阶段培养马铃薯苗的生活力得到提高,对诱导条件的反应增强,因而诱导率得到提高(表2)。雾化反应器内每棵苗只结一个薯,这与以前的结果一致^[10]。除了一棵苗外,所有的苗都诱导出了微型薯。液体培养基中的诱导率超过了100%。这是由于接种的茎段含有多个节间,一部分茎段可长出2~3棵苗,而且部分苗上可诱导出2个或3个微型薯。但是,观察发现液体培养基中不是外植体上所有的腋芽都能长成苗,并且不是所有的苗最终都能结薯(这由表2也可以看出)。因此,从外植体上腋芽的利用程度来看,液体培养基不如雾化反应器。

表 2 雾化反应器和对照方法中微型薯诱导效果的比较

Table 2 Comparison of microtuber induction in the NMB and control methods

| Culture methods | Explant number | Shoot number | Tuber number | Induction rate/% | |
|-----------------|----------------|--------------|--------------|------------------|-------|
| NMB | I | 90 | — | 54.4 | |
| | II | 90 | 90 | 98.9 | |
| Liquid medium | I | 96 | — | — | |
| | II | 72* | 93 | 102 | 132.1 |
| Solid medium | I | 96 | — | 31 | 32.3 |

* All the explants were stem segments with 2~3 nodes.

I One step method; II Two-step method.

培养结束后,收获微型薯并称量鲜重。如图 5 所示,固体培养基上收获的微型薯最少而且小。在雾化反应器中两步法比一步法诱导的微型薯多而且大,说明两步法优于一步法。但与液体培养基中的两步法相比,营养雾培养获得的大的薯块相对较少。此外,与对照一样,雾化反应器中诱导的薯块在重量分布上均一性较差。这表明微型薯形成后在生长上还存在比较大的差异。因此,需要对培养条件进一步优化以促进微型薯的生长和提高微型薯的均一性。

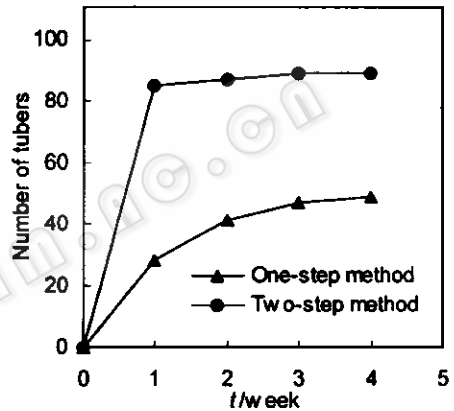


图 5 微型薯的鲜重分布

Fig. 5 Fresh weight distribution of microtubers

3 结 论

本工作在马铃薯繁殖的两个最主要的环节——苗的繁殖和微型薯的诱导——对应用

雾化反应器培养进行了研究。结果表明,雾化反应器培养技术成功地解决了植物组织培养中营养物质的输送、气体交换、液体浸没和光照等方面的问题,为苗的生长和微型薯的诱导提供了适宜的环境。

雾化反应器支持固定生长和多层培养,这为反应器规模的放大提供了基础。经测量,该反应器内培养基雾化的速率为 150~200g/h,而苗培养物获得的营养雾流量最高时不超过 20g/h(图 2),所以培养规模有扩大的潜力。如果提高供雾频率,培养规模还可以进一步放大。此外,反应器培养与传统的培养方法相比能够降低培养的成本。据 Weathers 等^[4]分析,营养雾培养降低成本(包括劳动力和原材料)最高可达 65%。因此,雾化反应器是一种十分有前途的生物反应器型式。

参 考 文 献

- [1] 王炳君, 刘宗燮. 见: 植物组织培养及其应用丛书. 第七分册. 北京: 高等教育出版社, 1990, 99. 44~62.
- [2] M. Akita, S. Takayama. *Abstr. Japan. Soc. Hort. Sci. Autumn Meeting*. 1987, 266~267.
- [3] M. Akita, S. Takayama. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1994, 36: 177~182.
- [4] P. J. Weathers, K. L. Giles. *In Vitro*. 1988, 24: 727~732.
- [5] A. A. Dilorio, R. D. Cheetham, P. J. Weather. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 37: 457~462.
- [6] S. H. Woo, J. M. Park. *Biotechnol. Techniq.* 1993, 7: 697~702.
- [7] S. H. Woo, J. M. Park, J. W. Yang. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, 66: 355~362.
- [8] T. Murashige, F. Skoog. *Physiol. Plant*, 1962, 25: 473~497.
- [9] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 北京: 科学出版社, 1985, 134~137.
- [10] Z. Hao, F. Ouyang, Z. Liu *et al.* Z. Proceeding of APBioChEC'97. 1997, pp. 213~216.
- [11] K. Kurarta, Y. Ibaraki, E. Goto. *ASAE.*, 1991, 34, 621~624.

Propagation of Virus-free Potato Using a Nutrient Mist Bioreactor

Hao Zhenlong Ouyang Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of
Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Geng Yuxuan Deng Xiangdong Hu Zanmin Chen Zhenghua

(305 Research Group, Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract Shoot culture and microtuber induction of potato (*Solanum tuberosum*) in a nutrient mist bioreactor (NMB) were studied. Changes of biomass, nutrient mist transfer and sugar consumption during the shoot culture and time course of tuber induction were investigated. Results showed that, compared with liquid or solid medium, the nutrient mist bioreactor improved the efficiency of shoot propagation and promoted microtuber induction. Using two-step method improved the effects of NMB on microtuber induction.

Key words Bioreactor, nutrient mist culture, *Solanum tuberosum*, shoot culture, microtuber

郝震龙等:应用雾化营养液生物反应器繁殖脱毒马铃薯的研究

图版 I

Hao Zhenlong *et al*: Propagation of virus-free potato using a nutrient mist bioreactor

Plate I

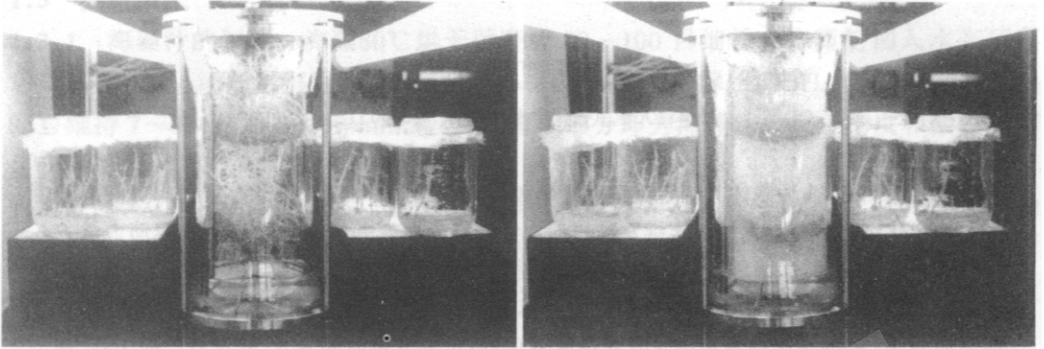


Plate I-1

Plate I-2



Plate I-3

Plate I - 1 Potato shoot culture in a nutrient mist bioreactor without mist supply

Plate I - 2 Potato shoot culture in a nutrient mist bioreactor mist supply

Plate I - 3 Tuber induction in the nutrient mist bioreactor