

利用简易生物反应器大量生产玉花兰根状茎及绿芽¹⁾

金花 朴炫春 孙丹 修景润 廉美兰

(延边大学, 龙井, 133400)

摘要 以玉花兰的根状茎为外植体比较了在固态培养基培养、液态培养基振荡培养和生物反应器培养条件下根状茎增殖和绿芽分化情况。结果表明:在生物反应器中根状茎和绿芽分化效果最佳,固态培养次之,液态震荡培养不利于根状茎的增殖和绿芽的分化。通过调查生物反应器中接种密度、空气注入量的影响,发现3 L柱型气升式生物反应器内根状茎增殖和绿芽分化的最适接种量为200个外植体,培养8周后每个反应器可获得1 120.0个和1 779.8个健壮根状茎和绿芽;反应器中通气量为0.1 L/(L·min)时促进根状茎和绿芽分化。

关键词 玉花兰(*Cymbidium niveo-maginatatum*);组织培养;根状茎;绿芽;生物反应器

分类号 S682.31; Q943.1

Mass Production of Rhizome and Shoot in *Cymbidium niveo-maginatatum* using Simple Bioreactor/Jin Hua, Piao Xuanchun, Sun Dan, Xiu Jingrun, Lian Meilan (Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, P. R. China)//Journal of Northeast Forestry University. -2007, 35(7). -44~45, 48

Rhizome multiplication and shoot differentiation were studied under different culture conditions using the rhizomes of *Cymbidium niveo-maginatatum* as explants. Result shows that the effect of rhizome multiplication and shoot differentiation for bioreactor culture are better than that on solid-agar medium, and liquid shake culture is unsuitable for rhizome multiplication and shoot differentiation. The optimum inoculation density in a 3-L column-type airlift bioreactor is 200 explants in terms of the effects of inoculation density and air injection quantity, and 1 120.0 rhizomes and 1 779.8 shoots in a bioreactor were obtained after 8 weeks of culture. In addition, 0.1 L/(L·min) air volume in a bioreactor is optimal for mass propagation of *C. niveo-maginatatum*.

Key words *Cymbidium niveo-maginatatum*; Tissue culture; Rhizomes; Shoots; Bioreactors

玉花兰(*Cymbidium niveo-maginatatum*)是东洋兰属的一个种,原产于我国福建省,是细叶惠兰的代表品种,玉花兰花形奇特,姿态优美,素雅芳香,是深受人们喜爱的高档室内盆栽花卉。兰科植物一般以分株繁殖为主,但繁殖系数低^[1]。同时由于长期无性分株繁殖,带病毒植株逐年增多,导致品种退化,影响兰花的观赏价值和经济价值^[2]。利用植物组织培养技术可有效的克服病毒积累,大大提高繁殖,近年来植物组培技术已成为兰花生产的主要技术手段^[3]。但常规组培方法进行大规模生产植物组培苗时,还存在效率较低、成本高等问题。因此,需要一种用简单的生产设备和技術就能大规模繁殖生产植物组培苗的新工艺,从而降低劳动强度和成本。生物反应器是常被用来实现一组生物反应的容器,具有工作体积大、生产能力高、物理化学条件控制方便等优点^[4]。本研究利用一种简易生物反应器培养玉花兰的根状茎和绿芽,旨在探明提高繁殖系数,降低生产成本的一种新方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

取玉花兰即将开裂的蒴果在75%的酒精中浸泡1 min,再用0.1%的HgCl₂溶液消毒15 min后,用无菌水冲洗5~6次,在超净工作台上剖开蒴果,均匀播于1/2MS固态培养基中,90 d后形成原球茎,将形成的原球茎接种于MS+NAA 0.5 mg/L的固态培养基中,在温度(25±2)℃,相对湿度70%,光

照强度1 600 lx,每天光照16 h条件下培养,进一步诱导根状茎,待根状茎长至3~4 cm时,将其切成1 cm大小,做为本试验的材料。

1.2 试验方法

1.2.1 在固态和液态培养基中玉花兰根状茎增殖与绿芽分化

固态培养基培养:将6个根状茎外植体分别接入装有50 mL根状茎增殖培养基和绿芽分化培养基的200 mL柱状瓶中进行培养,根状茎增殖培养基为Hyponex-2+NAA 0.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.0 g/L+活性炭1.0 g/L(pH 5.0);绿芽分化培养基为Hyponex-2+BA 4 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.0 g/L(pH 5.0)。

液态培养基振荡培养:使用200 mL柱状瓶(培养基50 mL),接入6个根状茎外植体,所用根状茎增殖培养基和绿芽分化培养基同,但不加琼脂,在转速为100 r/min,振幅2.5 cm的摇床上培养。

液态培养基生物反应器培养:将120个根状茎接入3 L柱型气升式生物反应器中(图1),所用根状茎增殖培养基和绿芽分化培养基同,注入量为1 L,采用完全浸没培养法,空气注入量为0.1 L/(L·min)。试验设置3次重复,在温度(25±2)℃,光强400 lx,每天光照16 h条件下培养,8周后进行调查。

1.2.2 生物反应器培养

接种密度对根状茎增殖和绿芽分化的影响:将100、200、300个外植体接入3 L反应器中,分别进行根状茎增殖和绿芽分化培养,培养基及培养条件同1.2.1,培养8周后对根状茎增殖和绿芽分化情况进行调查。

反应器内空气注入量对根状茎增殖和绿芽分化的影响:在3 L反应器中接入200个根状茎外植体后,将反应器的空气注入量调节为0、0.05、0.10和0.20 L/(L·min),根状茎增

1) 国家自然科学基金项目(30560094);国家教育部重点项目(205035)。

第一作者简介:金花,女,1980年8月生,延边大学农学院园艺系,硕士研究生。

通讯作者:廉美兰。

收稿日期:2006年10月17日。

责任编辑:程红。

殖和绿芽分化培养基及培养方法及培养条件同上。

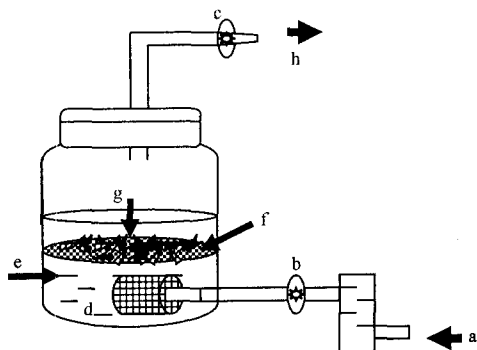


图1 生物反应器模型

a. 空气进口; b. 空气流量计; c. 薄膜滤器; d. 喷头; e. 培养基; f. 支持物(网); g. 培养物; h. 空气出口

数据分析: 数据分析利用 SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) 程序, 采用邓肯氏新复极差法进行比较, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 在固态和液态培养基中玉兰花根状茎增殖与绿芽分化

根状茎增殖: 将玉兰花根状茎分别进行固态培养基培养、液态培养基振荡培养和生物反应器培养, 培养4周和8周后进行根状茎增殖和绿芽分化情况的调查。结果发现, 在生物反应器中可诱导出大量的侧生根状茎, 而且诱导速度较快, 生长良好。从表1可知3种培养方式中生物反应器分化的根状茎数显著多于振荡和固态培养; 各处理在培养4周时已基本完成根状茎的分化, 与8周相比根状茎分化数无明显增加; 根状茎的长度在培养4周时振荡和反应器培养(液态培养方式)优于固态培养, 而两者间却无显著差异, 但8周时反应器中根状茎伸长效果明显, 超过振荡培养。根状茎鲜质量在培养4周和8周时, 反应器和振荡培养间无显著性差异, 而两者均明显好于固态培养; 干质量在振荡培养中好于反应器和固态培养, 但根状茎发肿发白, 不适合作培养材料。

表1 不同培养方式对根状茎增殖的影响

培养方式	根状茎数/个		根状茎长/mm		鲜质量/mg		干质量/mg	
	4周	8周	4周	8周	4周	8周	4周	8周
固态培养	0.5 c	1.3 c	6.5 b	26.7 b	21.6 b	40.4 b	4.7 b	5.5 c
振荡培养	2.8 b	3.3 b	17.7 a	26.4 b	41.9 a	64.5 a	8.9 a	33.0 a
生物反应器	4.1 a	4.6 a	18.0 a	56.8 a	36.4 a	67.6 a	5.4 b	11.6 b

注: 同列中不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

绿芽分化: 在固态培养基、液态振荡和生物反应器中绿芽的诱导情况不同。培养4周时, 绿芽分化数在反应器中最多。随着培养时期的延长, 固态培养基中的根状茎迅速地分化出绿芽, 当培养时期达8周时与反应器中诱导的绿芽数没有显著性的差异, 明显好于振荡培养。生物反应器中诱导的绿芽生长良好, 既鲜绿又饱满。培养4周和8周绿芽直径和鲜质量均显著高于固态培养基和液态振荡培养, 而绿芽干质量在培养4周时各个处理间无显著性差异。培养8周时反应器培养优于固态培养和液态振荡培养(表2)。

2.2 生物反应器培养

2.2.1 接种密度对根状茎增殖和绿芽分化的影响

根状茎增殖: 将100、200、300个1 cm大小的外植体分别接入生物反应器中进行根状茎增殖与绿芽分化培养, 8周后

调查根状茎的增殖与绿芽分化情况。表3为根状茎的增殖培养结果, 每个根状茎外植体所诱导出的根状茎数在接种量处理间没有显著性的差异, 但反应器内总根状茎数显著优于其它两个处理; 根状茎鲜质量和干质量随接种密度的增加呈减少的趋势。

表2 不同培养方式对绿芽分化的影响

培养方式	绿芽数/个		绿芽直径/mm		鲜质量/mg		干质量/mg	
	4周	8周	4周	8周	4周	8周	4周	8周
固态培养	2.3 b	4.0 a	11.7 b	25.7 b	25.7 b	52.8 b	3.4 a	7.4 b
振荡培养	2.0 b	2.4 b	10.8 b	22.1 b	20.6 b	37.2 b	3.6 a	7.1 b
生物反应器	3.6 a	4.3 a	17.4 a	33.9 a	40.3 a	90.8 a	4.7 a	13.4 a

注: 同列中不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

表3 外植体接种量对玉兰花根状茎增殖的影响

接种量	根状茎数/个	生物反应器中根状茎数/个	鲜质量/mg	干质量/mg
100	6.3 a	630.0 c	70.6 a	7.1 a
200	5.6 a	1 120.0 b	49.6 b	5.6 b
300	5.3 a	1 590.4 a	39.0 b	4.2 c

注: 同列中不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

绿芽分化: 从表4可知, 每个根状茎外植体诱导的绿芽数在接种密度200时显著多于接种密度100和300处理, 而反应器内总绿芽数在200和300处理间为1 779.8个和1 619.8个, 两者间无明显差异优于100处理; 绿芽直径、鲜质量和干质量在接种量100处理显著好于200和300处理。

表4 外植体接种量对玉兰花绿芽分化的影响

接种量/个	绿芽数/个	生物反应器中绿芽数/个	绿芽直径/mm	鲜质量/mg	干质量/mg
100	6.0 b	600.4 c	28.9 a	101.3 a	8.9 a
200	8.9 a	1 779.8 a	17.1 b	77.7 b	7.1 b
300	5.4 b	1 619.8 a	14.4 c	57.8 c	6.2 b

注: 同列中不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

2.2.2 反应器内空气通气量对根状茎增殖和绿芽分化的影响

根状茎增殖: 在完全浸没式生物反应器中, 植物体的生长除了受外植体接种量的影响外, 还受到所注入的空气量的影响。本试验利用气量器调节通气量为0.05、0.10、0.20 L/(L·min), 培养8周后进行调查, 在没有注入空气的情况下(0 L/(L·min)), 根状茎不增殖, 而且随着培养时间的延长, 根状茎逐渐变褐死亡; 在注入0.1 L/(L·min)空气时诱导的根状茎数显著多于0.05 L/(L·min)处理, 但与0.2 L/(L·min)处理无显著性的差异。根状茎长在0.10 L/(L·min)处理最长, 培养8周后由于0 L/(L·min)处理中根状茎处于死亡状态, 故无法测量其生理指标, 根状茎鲜质量与干质量以处理0.10、0.20和0.05 L/(L·min)顺序呈显著递减的趋势(表5)。本试验结果, 通气量0.10 L/(L·min)处理所分化出的根状茎修长、健壮, 适合作大量扩繁的材料。

表5 反应器内通气量对玉兰花根状茎增殖的影响

通气量/L·L ⁻¹ ·min ⁻¹	根状茎数/个	根状茎长/mm	鲜质量/mg	干质量/mg
0	—	—	—	—
0.05	2.9 b	8.8 b	31.49 c	5.57 c
0.10	5.2 a	24.1 a	112.53 a	18.69 a
0.20	4.7 a	5.2 c	54.57 b	10.29 b

注: 同列中不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

绿芽分化: 通气量对绿芽分化的影响列于表6。在通气量为0.10 L/(L·min)的处理中, 每个根状茎外植体可分化出8.2个绿芽, 是0.05 L/(L·min)处理的1.7(下转48页)

中ZR继续上升,此时组培苗叶子生长较快,光合作用增强,为ZR合成提供大量原料,使得内源ZR质量分数增加,同时芽和愈伤组织旺盛生长也是导致ZR质量分数增加的原因。

ABA在植物生长发育过程中起抑制生长并促进休眠与衰老的作用,ABA是CTK的拮抗物,它的消长过程与外源6-BA质量浓度完成相反^[11]。通过试验可以看出:在培养5~15 d时,ABA的质量分数明显下降,尤其是处理3其下降幅度最大;培养15~20 d时,处理1 ABA的质量分数小幅度下降,处理2和处理3则略有升高。芽的生长速度与ABA质量分数呈负相关,ABA质量分数越低芽的生长越快。有关内源ABA在组织培养中作用的研究报道很少,随着培养时间延长,内源ABA呈下降趋势,外源6-BA会加快这一进程。

高质量浓度6-BA会诱导组培苗玻璃化已达成共识,通过试验可以看出:处理1组培苗玻璃化率为0,而处理3高达95%。通过处理1和处理3的各内源激素比较来看,在培养初期正常苗(处理1)与玻璃化苗(处理3)各内源激素质量分数之比IAA为1:1.42,GA₃为1.33:1,ZR为1:1.49,ABA为1.27:1;到培养20 d时,各激素质量分数比IAA为1:2.05,GA₃为1:1.43,ZR为1:1.69,ABA为1.13:1。从培养5 d时开始,正常苗内源IAA和ZR质量分数低于玻璃化苗IAA和ZR质量分数;20 d时,二者差距进一步加大,IAA从1:1.42增加至1:2.05,ZR从1:1.49增加至1:1.69。而正常苗内源GA₃和ABA质量分数在培养5 d时均高于玻璃化苗,到培养20 d时GA₃质量分数比发生巨大变化,从1.33:1降低至1:1.43,ABA从1.27:1降低为1.13:1。总体来看,高质量浓度6-BA导致组培苗内源IAA、GA₃和ZR质量分数的上升和内源ABA质量分数的下降。植物体内IAA、GA₃和ZR具有促进植物细胞生长、分裂和分化等生理作用,而ABA具有抑制生长作用。通过正常苗和玻璃化苗内源激素质量分数的比较可以看出,

上述内源激素比例会造成酸樱桃组培苗的快速生长,笔者认为酸樱桃组培苗芽和愈伤组织的徒长是产生玻璃化现象的一个重要原因。

参考文献

- [1] 林宝山. 欧洲酸樱桃品种伊温斯引种栽培试验初报[J]. 中国果树, 2005(6): 36-38.
- [2] 唐晓杰, 孟庆繁, 杨振国, 等. 酸樱桃组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2004, 5(4): 355-357.
- [3] 丰锋, 李洪波, 谢建英. 芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(5): 449-451.
- [4] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳, 等. 绿巨人组织苗继代过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究[J]. 广西林业科学, 1999, 28(1): 16-19.
- [5] 李任珠, 杨跃标. 美国芦荟离体培养中玻璃苗的复壮及快速繁殖的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2001, 19(3): 240-245.
- [6] 陶静, 詹亚光, 由香玲, 等. 白桦组培再生系统的研究(Ⅲ)——组培过程中内源激素的变化[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(6): 6-9.
- [7] 朱青松, 梅康风, 王沙生. 外源生长素烟草髓愈伤组织分化和内源IAA含量的影响[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 22-25.
- [8] Vanden E, Cross A F, Kemp A, et al. Development of flower buds in the layer cultures of floral stalk tissue from tobacco: role of hormones in different stages[J]. Physiol Plant, 1984, 61: 114-118.
- [9] R Zhang, X Zhang, J Wang, et al. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene[J]. Planta, 1995, 196: 84-94.
- [10] Little C E A, Savidge R A. The role of plant growth regulator in forste tree cambial growth[J]. Plant Growth Regulation, 1987(6): 137-169.
- [11] 刘桂丰, 杨传平, 温绍龙, 等. 盐逆境条件下三个树种的內源激素变化[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(1): 1-3.

(上接45页)倍, 0.20 L/(L·min)处理的1.3倍, 其差异非常明显; 绿芽直径、鲜质量和干质量也在0.10 L/(L·min)处理显著优于0.05和0.20 L/(L·min)处理, 而0.05和0.20 L/(L·min)处理无差异。故通气量0.10 L/(L·min)适合绿芽分化和生长。

表6 反应器内通气量对玉花兰绿芽分化的影响

通气量/L·L ⁻¹ ·min ⁻¹	绿芽分化数/个	绿芽直径/mm	鲜质量/mg	干质量/mg
0.05	4.8 c	3.9 b	88.47 b	7.21 b
0.10	8.2 a	17.1 a	107.46 a	13.94 a
0.20	6.1 b	4.6 b	72.67 b	7.30 b

注: 同列中不同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

3 结语

近年来百合^[5-6]、人参^[7]、马铃薯^[8]等在生物反应器培养中已获得成功, 然而由于植物器官培养的复杂性, 阻碍着植物器官培养生物反应器的发展进程。故利用多种植物, 通过调节反应器的理化因素使反应器内环境达到最佳, 同时开发植物器官培养专用生物反应器显得非常重要。从本试验结果可知, 利用生物反应器进行玉花兰根状茎和绿芽的诱导效果显著好于传统组织培养方式, 3 L柱型气升式生物反应器内接入200个根状茎外植体, 注入空气0.01 L/(L·min)时有利于根状茎的增殖和绿芽的分化。生物反应器培养是一种比较好的培养方式, 它不但可以提高玉花兰根状茎增殖速度, 在短期

内获得大量的外植体, 而且也可培养出健康的幼苗。因此, 生物反应器培养可为商业化生产提供一种新的途径。目前, 虽然能应用生物反应器阶段性的完成每个生长过程, 但关于从根状茎的增殖到幼苗的生长阶段的一体化, 还需要更进一步的研究。

参考文献

- [1] 卢思聪. 兰花栽培入门[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 罗林会, 曹小路, 董毅. 兰花植物组织快繁研究[J]. 遵义科技, 2003, 31(3): 13-15.
- [3] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 182.
- [4] 周立刚, 邦光植. 植物细胞大量培养的工艺学[J]. 生物工程进展, 1991, 11: 29-35.
- [5] Lian M L, Chakrabarty D, Paek K Y. Growth of *Lilium oriental* hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture[J]. Sci Horti, 2003, 97: 441-448.
- [6] Seon J H, Kim Y S, Son S H, et al. The Fedbatch culture system using bioreactor for the bulblet production of Oriental lilies[J]. Acta Hort, 2000, 520: 53-59.
- [7] Asakai I, Li L, Hirotani M, et al. Production of ginsenoside saponin by culture of ginseng (*Panax ginseng*) embryonic tissues in bioreactors[J]. Biotech Lett, 1993, 15: 1259-1264.
- [8] Akita M, Ohta Y A. Simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration[J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 284-247.