

满天星应用生物反应器快繁增殖条件的研究

张 健

(黑龙江生物科技职业学院, 哈尔滨 150025)

摘 要:应用 2.5 L 柱状气升式生物反应器, 对影响满天星增殖的内部可控环境进行了研究, 认为接种密度 35 个比接种密度 25 个和 45 个更有利于满天星的增殖, 既充分利用了空间又获得了大量健壮的不定苗; 满天星增殖采用生物反应器培养时 4800 lx 光照强度对满天星增殖培养最为有效; 反应器底部采用孔隙 15 μm 的多孔喷头, 注入 0.10 vvm 空气, 上部接种 4d 后用圆形喷头通入 0.10 vvm 空气更有利于满天星增殖培养。

关键词:满天星; 生物反应器; 快繁; 增殖

满天星(*Gypsophila paniculata* L.), 又名霞草, 亦称重瓣丝石竹, 原产欧亚北部, 属于石竹科丝石竹属的多年生宿根草本植物。植株矮壮, 分枝甚多, 叶片窄长, 叶色浓绿, 生长速度快, 顶生复总状花序, 花朵小而多, 轻盈蓬松, 鲜艳俊秀, 花期长, 易栽培管理, 病虫害少。是当今世界十分流行的切花、花束和配花材料, 也广泛用于城市街道、公路隔离带、广场、公园、校园、居民庭院及机关单位绿化, 布置花坛、花境等供观赏; 还具有一定的食用和药用价值。

满天星以播种、扦插和组培繁殖为主。扦插法繁殖系数较低, 种苗品质参差不齐, 较难获得大批量的优质种苗。而种子繁殖要受时间条件的限制, 并且满天星在我国的气候条件下很难结籽, 繁殖系数也不高, 很难做到周年供应种苗。

采用组织培养技术, 经茎尖或茎段培养获得满天星脱毒苗, 并进行规模化繁殖是获得大量优质种苗的有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将满天星(*G. paniculata*) 仙女品种茎段剪去叶片, 用自来水冲洗 1 h 后, 用 5% 洗衣粉浸泡, 再用自来水冲洗干净, 在超净工作台内, 用 75% 酒精浸泡 30 s 后, 再用 0.1% HgCl_2 消毒 3 min, 用无菌水冲洗 3~5 次。将已消毒的无菌材料接种于附加 1.0 mg/L 的 BA(6-苄基腺嘌呤), 30.0 g/L 的蔗糖, 7.0 g/L 的琼脂粉(上海稼丰园艺用品有限公司), pH 调节为 5.8 的 MS 固体培养基中, 在温度(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 3200 lx, 每天光照 16 h 条件下培养。待外植体形成丛生苗时, 进行继代增殖培养, 以此获得大量材料后, 将通过组培增殖的丛生苗切成单株(株高约 2 cm)做为本试验的材料。

1.2 试验方法

1.2.1 培养密度的筛选

试验使用自制的 2.5 L 柱状气升式生物反应器($\phi \times h$: 14 cm $\times$ 27 cm)。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, 每个反应器内分别接种 25、35 和 45 个外植体, 注入 0.5 L 液体培养基(2.0 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L, pH 5.8), 并使用直径 2.4 cm, 长 4.7 cm, 孔隙为 60 μm 的多孔喷头, 注入

0.20 vvm (air volume/culture volume/min.) 的空气, 每个处理设置 3 次重复。在温度 25 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 3200 lx, 每天光照 16 h 培养 20d 后调查不定苗数、鲜物重、干物重等指标, 其中叶绿素含量用叶绿素测定仪 (SPAD-502, Minolta Camera Co. Ltd., Japan) 随机取每个外植体分化的不定苗中部 3 个叶片进行测定。

1.2.2 光照强度的筛选

依据上述试验结果, 每个反应器内接种 35 个外植体, 用环状日光灯调节光照强度为 400、1600、3200、4800 和 6400 lx, 其它条件同 1.2.1。

1.2.3 空气注入方式的筛选

选用 3 种空气注入方式, 喷头为孔隙 15 μm 的多孔喷头(A), 孔隙 60 μm 的多孔喷头(B)和内径 4 mm 的硅胶管(C)。依据上述试验结果, 每个反应器内接种 35 个外植体, 光照强度为 4800 lx, 其它条件同 1.2.1。

1.2.4 空气注入量的筛选

依据上述试验结果, 每个反应器内接种 35 个外植体, 光照强度为 4800 lx, 使用孔隙 15 μm 的多孔喷头, 通气量设置为 0、0.05、0.10、0.20、0.30 vvm, 其它条件同 1.2.1。

1.2.5 上部通气的调节

试验设置不通气(A_0), 内径为 4 mm 的硅胶管通气(A_1), 孔隙 60 μm 的多孔喷头通气(A_2) 3 种处理。依据上述试验结果, 每个反应器内接种 35 个外植体, 光照强度为 4800 lx, 使用孔隙 15 μm 的多孔喷头通气量调节至 0.10 vvm。接种后上部不马上通气, 4d 后开始通入 0.10 vvm 的空气。其它条件同 1.2.1。

2 结果与分析

2.1 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, 20d 后调查外植体的增殖情况。从表 1 可见, 接种密度为 35 个时, 增殖效果最好, 平均每个外植体分化的不定苗数为 17.2 个, 每个反应器可生产 602 个不定苗, 不定苗株高、鲜物重和干物重明显比其它两种接种密度处理高, 且植株健壮, 不呈现徒长现象。接种密度 35 个处理的叶绿素在接种密度 25 个和 35 个处理间差异不显著, 但均优于接种密度 45 个的处理。

表 1 培养密度对满天星增殖的影响

培养 密度	不定苗数 每个外植体	株高/ cm	鲜物重/mg (外植体)	干物重/mg (外植体)	叶绿素 (SPAD)
25	12.0 b	300.0 c	2.9 b	1532.3 c	121.7 c
35	17.2 a	602.0 a	4.6 a	2398.1 a	190.6 a
45	12.4 b	558.0 b	3.2 b	1867.0 b	160.6 b

注:为 0.05 显著水平的多重比较结果

2.2 光照强度对满天星增殖的影响

光照可诱导分化,它可激活某些酶的活性。光照直接影响植物的形态建造。光照强度对生物反应器内满天星增殖的影响见表 2,满天星增殖的不定苗数、不定苗的鲜物重和干物重在光照强度 4800 lx 时均达到最大值,而且没有玻璃化苗发生,这可能是由于增加光照强度可以促进光合作用,提高碳水化合物的含量,减小反应器内湿度,使玻璃化苗发生率降低。

表 2 光照强度对满天星增殖的影响

光照强度/ lx	不定苗数/个 (外植体)	株高/ cm	鲜物重/mg (外植体)	干物重/mg (外植体)	叶绿素 (SPAD)
400	15.3 a	4.8 a	1820.5 c	152.4 c	10.1 c
1600	15.1 a	4.7 ab	1978.0 bc	142.0 d	9.4 c
3200	15.3 a	4.5 b	2068.0 b	163.0 b	18.1 b
4800	14.7 a	3.6 c	2244.3 a	182.3 a	21.9 a
6400	12.3 b	2.1 d	1377.2 d	136.4 d	23.1 a

注:为 0.05 显著水平的多重比较结果

2.3 空气注入方式对满天星增殖的影响

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。接种 20d 后调查结果如表 4 所示,在给生物反应器培养基进行通气时,所采用的多孔喷头孔隙越小,产生不定苗的株高、鲜物重和干物重越高,其中,以 A 喷头效果最好,所产生的不定苗最多。这可能是由于 15 μm (A)的多孔喷头可喷射出大小一致的微细气泡,且散射范围较大,有利于与培养基充分混合;而 4 mm 的硅胶管(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。

表 3 空气注入方式对满天星增殖的影响

空气注入 方式	不定苗数/个 (外植体)	株高/ cm	鲜物重/mg (外植体)	干物重/mg (外植体)
A	15.3 a	4.9 a	2568.2 a	204.2 a
B	14.9 a	4.5 b	2039.4 b	183.3 b
C	11.6 b	3.9 c	1673.2 c	153.6 c

注:为 0.05 显著水平的多重比较结果;A:孔隙 15 μm 的多孔喷头,B:60 μm 的多孔喷头,C:内径为 4mm 的硅胶管

2.4 空气注入量对满天星增殖的影响

氧气的需求是生物反应器的重要特征。因此生物反应必须不断的通气和搅拌,使培养液具有一定的溶氧浓度,以满足生物细胞生长的需要,在许多生物反应体系中,生物的生长往往受到液相中氧浓度的限制,因此氧从液相向外植体的传递至关重要。

从表 4 可以看出,当通气量为 0.10 vvm 时,不定苗生长

健壮,幼苗数目、鲜物重、干物重均显著优于其它处理;试验结果表明,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学胁迫使植物生长受到抑制。

表 4 空气注入量对满天星增殖的影响

通气量/ vvm	不定苗数/个 (外植体)	株高/ cm	鲜物重/mg (外植体)	干物重/mg (外植体)
0	—	—	—	—
0.05	13.5 c	2.5 c	1775.1 b	157.0 b
0.10	17.0 a	2.8 b	2298.9 a	197.1 a
0.20	14.7 b	3.3 a	1880.0 b	151.8 bc
0.30	3.3 d	2.2 d	640.7 c	51.1 c

注:为 0.05 显著水平的多重比较结果;“—”为因死亡未调查

2.5 上部通气对满天星增殖的影响

从表 5 可以看出,在经喷头通气的处理(A₂)中,不定苗分化最多;从株高看,A₀ 处理有些徒长,而 A₁ 和 A₂ 处理无此现象;鲜物重、干物重在 A₁ 和 A₂ 处理间无显著差异,但显著好于 A₀ 处理。这可能是由于上部用圆型喷头处理能很好的把气体分散开,使组培苗上部的气体能在最快时间内分布更均一,边缘的苗也能有很好的气体供应,所以通气时选择圆型喷头更利于满天星增殖。

表 5 上部通气对满天星增殖的影响

上部通气	不定苗数/个 (外植体)	株高/ cm	鲜物重/mg (外植体)	干物重/mg (外植体)
A ₀	11.0 c	4.7 a	1510.8 b	125.6 b
A ₁	13.7 b	3.5 c	1659.1 a	160.7 a
A ₂	15.7 a	4.1 b	1713.0 a	169.4 a

注:A₀:不通气,A₁:硅胶管通气,A₂:多孔喷头通气;为 0.05 显著水平的多重比较结果

3 结论

生物反应器快繁,利用 2.5 L 柱状气升式生物反应器,接种 35 个外植体,给予 4800 lx 光照强度,底部采用孔隙小的 15 μm 多孔喷头,注入 0.10 vvm 空气,上部用圆形喷头注入 0.10 vvm 空气对满天星的增殖效果好。

综上,应用生物反应器进行满天星组培苗的商业化生产仍需大量进一步的研究,如放大试验,空间利用率等。同时也应考虑到,用生物反应器培养在一定程度上也存在着一次性投入较大的问题,生物反应器培养要求操作人员必须技术熟练,一旦因操作不慎引起污染,在重要试验或者真正生产中会带来很大损失;而且通气期间,一旦断电而没能及时掐住出气口和进气口时也会引起污染甚至更大问题,这些都还有待进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 车代第,樊金萍. 满天星新品系的选育[J]. 北方园艺, 2002, (5): 57-57.
- [2] 王淑芬,衣彩洁. 霞草的组织培养[J]. 北京工业大学学报. 1999 (3): 68-53.
- [3] 孔祥峰,刘世兰. 满天星的促成栽培管理[J]. 中国花卉园艺, 2002, (14): 24-25.
- [4] 马成亮. 霞草的利用价值[J]. 特种经济动植物, 2003, 6 (7): 41-41.
- [5] 田森林,郑丽萍,白志良,等. 满天星切花周年栽培管理技术[J]. 山西林业科技, 2005, 9 (3): 35-37.