



Slutredovisning av partnerskapsprojekt 2008-2010

Teknisk utveckling av bioreaktorer för storskalig mikroförökning av elitplantor

Margareta Welander

Växtförädling och bioteknik SLU, Alnarp

Projektansvarig:

Margareta Welander, Professor SLU, Alnarp

Medsökande:

Elisabeth Nilsson, Verksamhetsledare på Elitplantstationen

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap

Rapport 2011:4

ISSN 1654-5427

ISBN 978-91-86373-55-9

Alnarp 2011



LANDSKAP TRÄDGÅRD JORDBRUK

Rapportserie

Slutredovisning av partnerskapsprojekt 2008-2010

Teknisk utveckling av bioreaktorer för storskalig mikroförökning av elitplantor

Margareta Welander

Växtförädling och bioteknik SLU, Alnarp

Projektansvarig:

Margareta Welander, Professor SLU, Alnarp

Medsökande:

Elisabeth Nilsson, Verksamhetsledare på Elitplantstationen

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap

Rapport 2011:4

ISSN 1654-5427

ISBN 978-91-86373-55-9

Alnarp 2011

Förord

Projektet ” Teknisk utveckling av bioreaktorer för storskalig mikroförökning av elitplantor” har utförts vid SLU, Institutionen för Växtförädling och Bioteknik i Alnarp. Målet har varit att utveckla en prisvärd och lättanvänd bioreaktor för storskalig mikroförökning för att göra mikroförökningen mer kostnadseffektiv. Elitplantstationen, som levererar mikroförökade elitplantor till de svenska plantskolorna, har varit mycket angelägen om att stötta vidareutveckling av mikroförökningen. Detta är ett mycket bra exempel på hur universitet och kommersiell partner kan samarbeta mot ett gemensamt mål. Projektet har varit oerhört stimulerande och givande och vi är mycket nöjda med vår produkt som kommer att leda till reducerade kostnader för mikroförökning men också ökad plantkvalité.

Ett varmt tack riktas till Elitplantstationen och Partnerskap Alnarp för ekonomiskt stöd. Vidare tackar vi Dr AJ Sayegh, TCpropagation Ltd, Bree, Enniscorthy, CO Wexford, Ireland som också bidragit både med kunskaper och ekonomiskt stöd.

Alnarp 01-17 -2011

Margareta Welander
Projektledare

Sammanfattning

Vi har nu utvecklat en prisvärd attraktiv bioreaktor för storskalig mikroförökning. Den är transparent, autoklaverbar, stapelbar och väger lite. Bioreaktorn är konstruerad så att näringstillförsel och gasutbyte kan kontrolleras automatiskt. Anslutningarna sitter på sidan av den yttre behållaren vilket gör att hela den inre delen kan utnyttjas till odling växtmaterialet. Både näringslösning och växtmaterial är i samma bioreaktor vilket sparar odlingsutrymme. Bioreaktorn kommer att leda till reducerade kostnader men också ökad plantkvalité genom att växterna kan avhärdas redan i bioreaktorn. En annan stor fördel är att bioreaktorn också kan användas till grundläggande forskning genom att näringsupptagning kan studeras under tillväxtfasen. Gjutformarna till de olika delarna som ingår i bioreaktorn tillverkas i Kina och har en kapacitet för 200 000 enheter.

Syfte

Syftet med projektet har varit att vidareutveckla bioreaktorer för storskalig mikroförökning. I tidigare projekt använde vi bioreaktorer baserade på 5l glaskärl där växtmaterialet odlades i ett kärl och näringslösningen i ett annat. Näringslösningen pumpades över till odlingskärl med växter under bestämd tid och därefter tillbaka. Nackdelen med dessa bioreaktorer är att de är tunga och otympliga att arbeta med eftersom bägge kärlen måste flyttas samtidigt till sterilbänken vid delning av skott och påfyllning av nytt näringsmedium. Vidare är botten på kärlet för liten för att större växter ska kunna breda ut sig. Dessutom är kärlen höga vilket gör att risken för infektion är stor när växtmaterialet ska tas ut och flyttas. Syftet med projektet har sålunda varit att försöka övervinna samtliga nackdelar listade ovan med de nya bioreaktorerna.

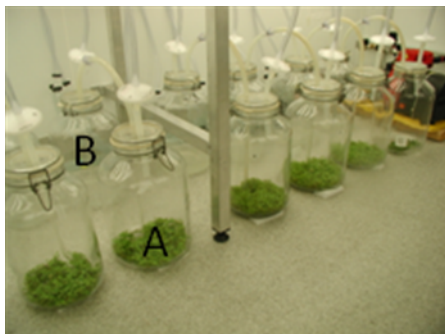
Bakgrund

Stiftelsen Trädgårdsodlingens Elitplantstation (EPS) är ett nationellt centrum för vegetativ förökning av sjukdomsrensade och sortäktade trädgårdsväxter. Elitplantstationen tillkom år 1983 på initiativ av lantbruksstyrelsen, numera jordbruksverket för att i nära samarbete med trädgårdssektorn utveckla förökningsmetoder för sunda och genetiskt definierade trädgårdsväxter med hjälp av mikroförökning. Målet med verksamheten var att förbättra sundhetsstatus och sortäktighet för hela distributionskedjan från förädling till konsumenterna. Elitplantstationen är organiserad i en utvecklings- och bevarandeenhet samt en produktionsenhet. På grund av ökad kostnadsutveckling tvingades EPS lägga ner sin plantproduktion genom mikroförökningen. För att i fortsättningen kunna förse trädgårdssektorn med sjukdomsfritt och sortäktat växtmaterial har vi ingått ett avtal med Elitplantstationen inom ramen för partnerskapet där vi ska utveckla en ny bioreaktor för storskalig produktion.

Mikroförökning är det mest effektiva sättet att producera sjukdomsfritt och sortäktat växtmaterial. Tekniken baseras på växters förmåga att bilda skott och rötter från i princip vilka växtdelar som helst om de odlas på definierade näringsmedier med tillsats av tillväxtreglerande ämnen under sterila förhållanden. Växtmaterialet odlas i små burkar eller flaskor med tillsats av agar för att göra mediet fast. Skott som bildas i burkarna delas för hand och flyttas över i nya burkar tills tillräckligt antal skott producerats. Därefter delas skotten på nytt och flyttas över till nytt näringsmedium för att stimulera rotbildningen. Plantorna flyttas sedan till jord där de aklimatiseras till normala växtförhållanden. Den största kostnaden för traditionell mikroförökning är arbetskostnader för delning och överföring till nya skottkulturer. Konventionell mikroförökning är arbetsintensiv och dyr. Användning av ett nytt system med odling i bioreaktorer har avsevärt reducerat arbetsinsatsen och därmed kostnaderna. Den nya tekniken baseras på flytande näringsmedium som temporärt befuktar växtmaterialet. Tekniken kallas TIS (Temporary Immersion System). Odling i flytande medium har ofta orsakat problem genom att växtmaterialet har tagit upp för mycket vätska och blivit vitrifierade. Detta har kunnat undvikas genom att optimera den tid växtmaterialet är

nedsänkt i näringslösningen. Rotning i bioreaktorer är också mycket tidsbesparande genom att många skott rotas tillsammans i ett odlingskärl utan att skotten behöver orienteras som på fast medium. Den första bioreaktorn som använde TIS utvecklades i huvudsak för somatisk embryogenes (referens 1). Den går att använda även för mikroförökning av olika växtslag men odlingskärlet har sina begränsningar (referens 2). Odlingsytan är liten, in/utgångar för luft sitter i locket och gör att odlingskärlet inte är stapelbara. Det finns bara 2 in/utgångar för att trycksätta kärlet vilket gör att separat ventilering inte är möjlig utan att näringslösningen flyttas. Odlingskärlet levereras utan filter och anslutningsslangar och kostar idag 62 EURO.

I tidigare projekt använde vi 5 liters glasburkar där växtmaterialet odlades i ett glaskärl (A) och näringslösningen förvarades i ett annat (B) (figur 1). Näringslösningen pumpades över från A till B med bestämda tidsintervall (referens 3).

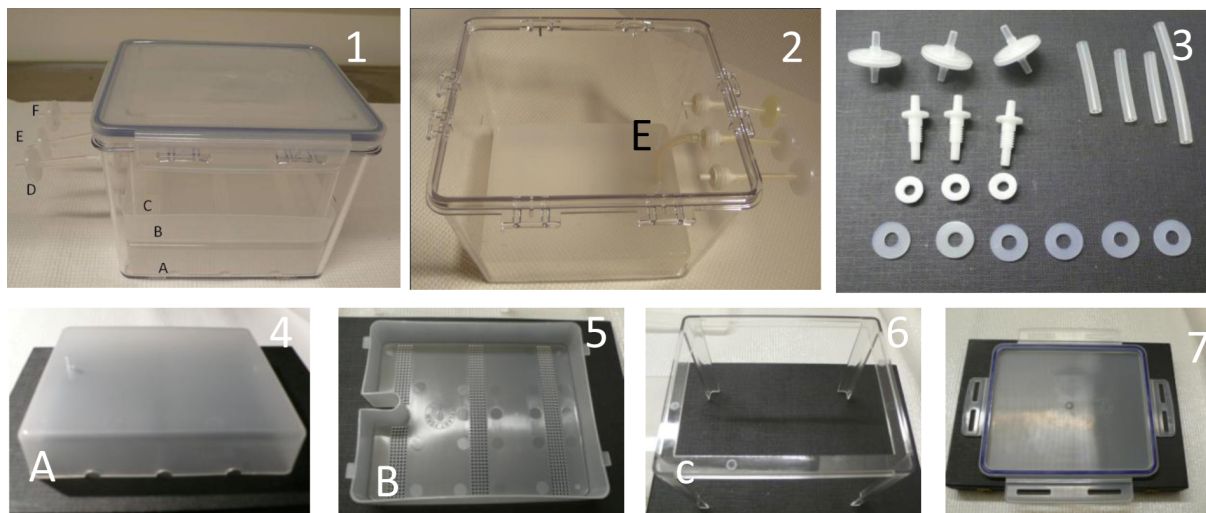


Figur 1. Bioreaktor-teknik baserad på två odlingskärl A och B.

Nackdelen med dessa bioreaktorer är att de är tunga och otympliga att arbeta med eftersom bägge kärnen måste flyttas samtidigt till sterilbänken vid delning av skott och påfyllning av nytt näringsmedium. Vidare är botten på kärlet för liten för att större växter ska kunna breda ut sig. Dessutom är kärnen höga vilket gör att risken för infektion är stor när växtmaterialet ska tas ut och flyttas. Vidare var det svårt att pumpa tillbaka all näringslösning från odlingskärlet med växtmaterial. Den största begränsningen är sålunda avsaknaden av effektiva och bra odlingskärl till ett rimligt pris. I den andra fasen har vi utvecklat ett nytt odlingskärl som beskrivs nedan.

Redovisning av teknisk utveckling och optimering av bioreaktortekniken.

Vi har nu utvecklat en kommersiellt attraktiv bioreaktor för storskalig mikroförökning. Formen för tillverkning av de olika delarna tillverkas i Kina och själva formen kan producera 200000 bioreaktorer. Bioreaktorn har konstruerats så att den är lätt att använda. Den väger lite, den är transparent och den är autoklaverbar vid 120⁰ C. Gasutbyte inkluderande syre eller koldioxid kan kontrolleras automatiskt med hjälp av en kontrollenhet och luftpumpar. De enskilda bioreaktorerna är stapelbara. Bioreaktorn kostar 350 SEK jämfört med 600 för RITA systemet. Figur 2 visar konstruktionen och detaljerna av bioreaktorn. Konstruktionen är patentsökt.



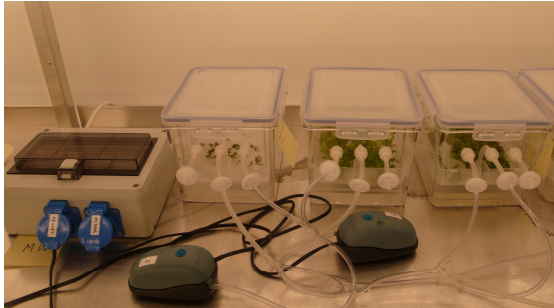
Figur 2.1: Bioreaktorn och dess olika delar numrerade från A-F, 2: 2 yttre behållare med 3 anslutningar för gasutbyte, 2E visar mittfiltret som är anslutet till ett plaströr på den inre kammaren, 2:3 filter, plaströr, muttrar, skruvar och silikonringar för anslutning av de 3 in/utgångarna på den yttre behållaren, 2:4A inre kammare med urgröpningar längs sidorna och anslutning till mittfiltret, 2:5B korg med tre rader av små hål, 2:6C ram med 4 ben, 2:7 lock med 4 flikar och en inre silikonring (blå).

1. Bioreaktorn består av en yttre behållare (180 x 160x150) gjord av polykarbonat som är transparent och mycket hållbar. Gasutbytet kontrolleras via 3 in/utgångar (D,E, F) förankrade genom skruvar och muttrar genom hål på behållarens ena sida och tätade med silikonringar. Gaserna passerar genom sterila filter anslutna genom silikonslangar till ingångarna. Mittfiltret (E) är anslutet till ett plaströr på ovansidan av den inre kammaren. På bioreaktorns undersida sitter 4 fötter i hörnen för att göra bioreaktorn stapelbar.
2. En inre kammare (A) med tre urgröpningar på långsidan och 2 på kortsidan är placerad i botten på bioreaktorn. Den är konstruerad så att näringslösningen placerad under kammaren stiger när tryck appliceras.
3. En korg (B) som innehåller växtmaterialet är placerad ovanpå den inre kammaren. I botten på korgen finns 3 rader med små hål (1x1mm) placerade på sidorna och i mitten. Näringslösningen pressas upp genom dessa hål vid applicerat tryck och befuktar växtmaterialet effektivt. När trycket tas bort sjunker näringslösningen tillbaka under den inre kammaren. På korgens undersida sitter 4 små fötter (3mm höga) i hörnen som ger ett utrymme mellan inre kammare och korg. Detta behövs för att korgen ska kunna tömmas helt på näringslösning.
4. En ram med fyra ben (C) placeras ovanpå korgen för att pressa ner denna när tryck appliceras.
5. Bioreaktorn försluts med ett lock försett med 4 flikar som viks över öppningen på bioreaktorn. Runt lockets insida löper en urgröpning med en silikonslang som gör bioreaktorn lufttät. Delarna 2,3,4 och 5 är gjorda av polypropylen som är en mjuk och flexibel plast.

Efter autoklavering av alla delar är bioreaktorn färdig att tas i bruk. Den yttre behållaren fylls med 500 ml steril näringslösning under den inre kammaren. Sterilt växtmaterial (små skottspetsar eller noder) placeras i korgen. Ramen med 4 ben placeras ovanpå korgen och därefter försluts bioreaktorn med locket.

När bioreaktorn utsätts för ett tryck stiger näringslösningen upp genom korgen och befuktar växtmaterialet. Trycket åstadkommes genom att pumpa in luft med en luftpump. När sedan trycket stängs av sjunker näringslösningen tillbaka under den inre kammaren. Trycket appliceras till mittfiltret (E) som är anslutet till den inre kammaren. Hur många gånger

växtmaterialet ska befuktas och under hur lång tid regleras med ett tidur. Ventilering av bioreaktorn sker genom att en annan luftpump kopplas in på en av de andra anslutningarna. Den tredje anslutningen användes för att släppa ut luft som pumpas in. Tid och varaktighet på ventilering av bioreaktorn anpassas efter växtslag. För att kunna styra näringstillförsatt och ventilering har vi utvecklat en kontrollenhet som kan reglera över 100 bioreaktorer. Figur 3 visar hur bioreaktorerna är sammankopplade med kontrollenheten och luftpumpar.



Figur 3. Tre bioreaktorer sammankopplade med styrenheten och 2 luftpumpar. De ena pumpen kontrollerar nivån på näringslösningen och den andra ventileringen.

Fördelar med den nya bioreaktorn

Den nya bioreaktorn kommer att reducera produktionskostnaderna och förbättra plantkvalitén baserat på följande kriterier:

1. Användning av flytande näringsmedium eliminerar kostnaderna för agar som gör mediet fast i konventionell mikroförökning.
2. Storleken på bioreaktorn tillåter ett större antal plantor per enhet och reducerar kostnaderna för överföring av växtmaterial till nytt näringsmedium.
3. Koncentrationen av näringsämnen kan regleras baserat på olika tillväxtfaser.
4. I konventionell mikroförökning är luftflödet begränsat. Med ovanstående teknik kan mängden syre och koldioxid regleras. Vidare kan skadliga gaser som växten själv producerar elimineras. Reglering av gasfasen leder till bättre plantkvalité.
5. Rotning av skott underlättas i de nya bioreaktorerna. I konventionell mikroförökning sätts individuella skott ett och ett på fast medium medan i bioreaktorerna behövs ingen orientering eftersom skotten tar upp näring över hela ytan. Plantering i jord underlättas också eftersom det inte finns någon agar på rötterna som måste sköljas bort.
6. Anpassning av mikroförökade växter till jord och låg luftfuktighet har i kommersiell produktion ofta lett stora förluster. Med den nya tekniken kan växterna långsamt anpassas till yttre förhållanden genom att utesluta kolhydrater i mediet, öka mängden koldioxid och ljusintensitet .

Förbättringar av bioreaktorn jämfört med tidigare system

Placering av in/ut gånger på sidan av bioreaktorn leder till jämn fördelning av luft inne i kammaren och jämn plantkvalitet. Näringsmedium och växtmateriel är i samma behållare samt att bioreaktorerna är stapelbara gör att betydligt fler plantor kan produceras per ytenhet i odlingskammaren. Korgen med växtmaterial är lätt att flytta vilket gör att infektionsrisken minskar när man byter näringsmedium. Hålen i korgen är konstruerade så att näringslösningen passerar korgen på ett effektivt sätt utan att små växtdelar fastnar eller åker igenom hålen.

Olika växtslag testade i de nya bioreaktorerna.

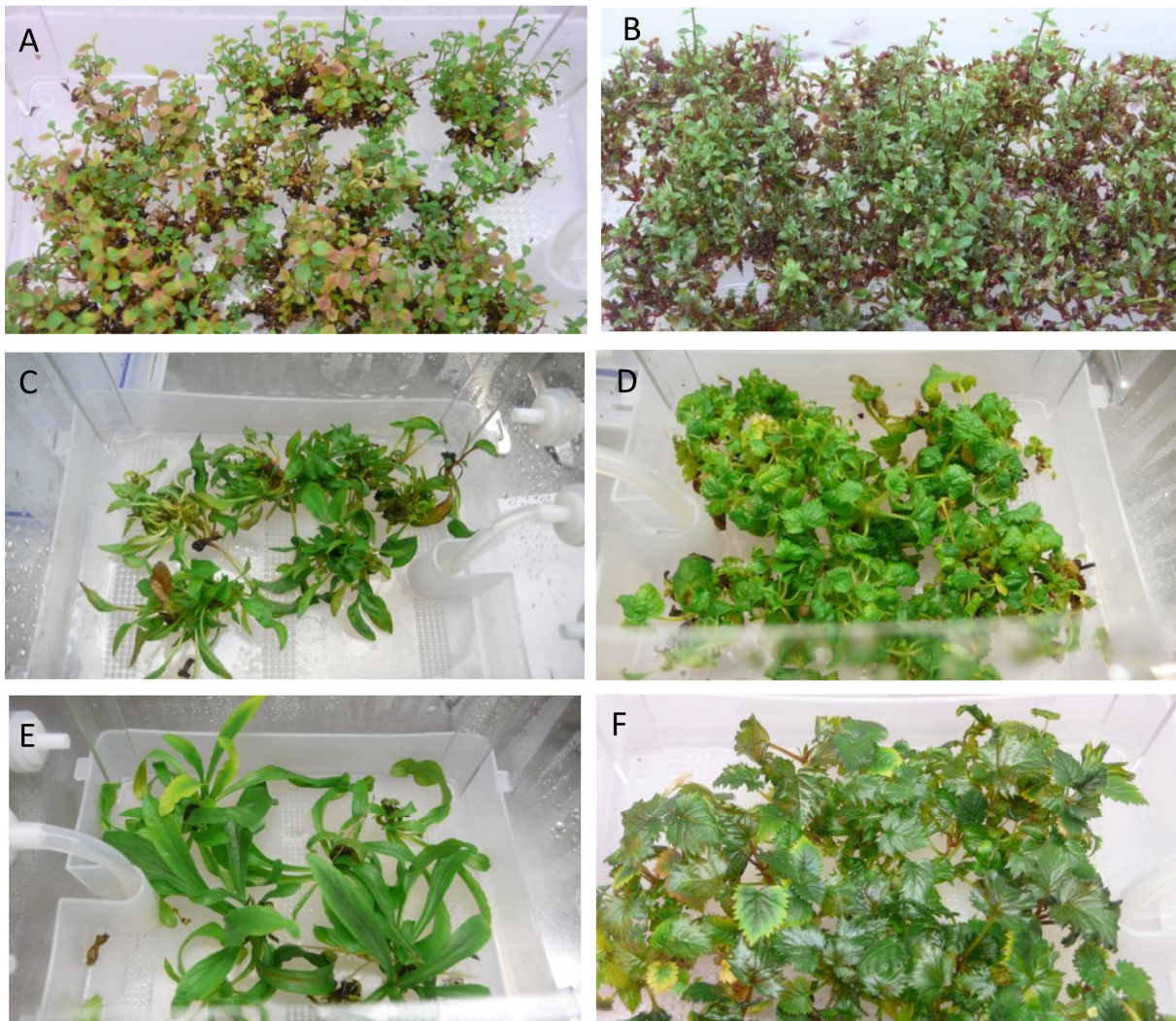
Elitplantstationen levererar sorttäckta och sjukdomstestade mikroförökade elitplantor till svenska plantskolor. Vi har under senare år etablerat och mikroförökat olika frukt- och bärsorter samt prydnadsväxter till Elitplantstationen. I stort sett har produktionen varit tillfredsställande med ett stort problem har varit den dåliga överlevnaden efter överföring av

mikroförökade plantor till jord speciellt för vissa växtslag. Detta har lett till att produktionskostnaderna har ökat. Vi har nu testat en del av det växtmaterialet vi mikroförökat tidigare i de nya bioreaktorerna.

Nedan följer odlingsprotokoll för olika växtslag (tabell 1) samt ett bildgalleri på olika växtslag förökade i bioreaktorerna (figur 4).

Tabell 1. Protokoll för olika växtslag förökade med de nya bioreaktorerna. Startmaterialet är in vitro kulturer på fast näringsmedium. Varje bioreaktor innehåller 500 ml näringslösning. Antal gånger växtmaterialet befuktas (BF), varaktighet i minuter (BV), ventileringsfrekvens (VF) och varaktighet i minuter (VV). MS (Murashige och Skoog) medium, WPM (WoodyPlant edium), LP (Lepoivre medium) BA (benzyladenin), IBA (indolsmörsyra), IAA (indolättiksyra) och NAA (naftylättiksyra).

Växtmaterial	BF tid	BV min	VF tid	VV min	Medium	Antal plantor per bioreaktor
Blåbär	3	5	11	3	WPM, 30g/l sackaros, 1mg/l Zeatin,	550
Björnbär	3	5	11	3	MS, 30g/l sackaros, 1mg/l BA	150
Hallon	2	6	13	4	MS, 30g/l sackaros, 0,5mg/l BA, 0.01mg/l IBA	150
Björk	2	6	13	4	WPM, 20g/l sackaros, 0,2mg/l BA, 0.01 mg/l NAA	300
Röd solhatt	2	6	13	4	LP, 30g/l sackaros 0,2mg/l BA,	200
Fingerborgsblomma	2	6	13	4	LP, 30g/l sackaros, 1mg/l BA, 0,1mg/l IBA	100
Silverax	3	6	11	3	MS, 30g/l sackaros, 2mg/l BA	200



Figur 4. A: Blåbär (*Vaccinium*, sort Putte) B: blåbär (*Vaccinium*, sort North Blue) C: röd solhatt (*Echinacea purpurea*, sort Magnus), D: hallon (*Rubus idaeus* sort mormorshallon), E: fingerborgsblomma (*Digitalis lutea* x *purpurea*) F: björnbär (*Rubus* ssp sort "Loch Maree")

Slutsatser

De nya bioreaktorerna är lättare att använda då både näringslösning och växtmaterial är i samma odlingskärl. De är tillverkade i plast och lättare att transportera. Odlingskärlet har större bottenyta vilket gör att fler plantor får bättre utrymme i korgen och lägre höjd reducerar infektionsrisken när växtmaterialet ska flyttas. Genom att anslutningar till luftningen är placerade på sidan av odlingskärlet kan hela korgen utnyttjas till odling av växtmaterialet. Genom att odlingskärlen är stapelbara kan utrymmet i odlingskammaren användas mer optimalt. Vi har designat och tillverkat en mycket användbar bioreaktor men det återstår mer arbete för att optimera tillsatts av koldioxid, eliminering av kolhydrater och ökad ljusmängd i innan växterna planteras i jord för att få maximal överlevnad. Vidare har vi gjort preliminära studier av ledlampor för att öka sträckningstillväxten men fler studier behövs.

Referenser

1. Etienne H., Lartaud M., Michaux-Ferriere N., Carron M. P., Berthouly M., Teisson C. (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea Brasiliensis* (Müll. Arg) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 33: 81-87.

2. Zhu L. H., Li X. Y., Welander M. (2005). Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 313-318.

3. Welander M., Zhu L.H., Li X.Y. (2007) Factors influencing conventional and semi-automated micropropagation. *Propagation of Ornamental Plants*. Vol.7, No 3: 103-111.