

间歇浸没式生物反应器在大规模组织培养中的应用研究

赵望锋^{1,2}, 王力华^{1*} (1.中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110016; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 介绍了组织培养中 4 种间歇浸没式生物反应器, 即叶轮驱动和蠕动泵驱动的间歇浸没式反应器及 2 种气体驱动的间歇浸没式生物反应器及其研究进展; 综述了农林业中实现商业化生产和正在研究的一些树种以及存在的问题。

关键词 间歇浸没; 生物反应器; 组织培养; 浸没频率; 污染

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)02-00317-04

Study on Temporary Immersion Bioreactor in Tissue Culture

ZHAO Wang-feng et al (Shenyang Applied Ecology Institute of Chinese Academy of Science, Shenyang, Liaoning 110016)

Abstract In this paper, 4 categories of Temporary Immersion Bioreactor were introduced, which were impeller pumps and rocker machines driven bioreactor and pneumatic driven transfer of liquid medium to temporary immersion and its study progress. Positive effects was described, and the commerce application of this method in tree's micropropagation and the existing problems were reviewed.

Key words Temporary immersion; Bioreactor; Tissue culture; Immersion frequency; Contamination

自 20 世纪 80 年代中期开始, 西方国家开始了大规模液体浸没组织培养的研究, 到 90 年代中后期取得了突破性进展, 为商业化生产苗木打下了坚实的基础。国内研究起步晚, 且主要集中在次生代谢产物的生产上, 而且目的在于降低成本。目前, 实现苗木商业化生产的大规模组织培养研究尚未有报道。间歇浸没式繁殖效率高, 成本低, 在林木育种方面具有巨大的应用潜力。为此, 笔者综述了间歇浸没式生物反应器在大规模组织培养中的应用研究。

1 间歇式浸没式培养系统概述

目前, 常用的半固体培养劳动力密集, 成本高; 而液体培养虽然具有更多特点适应大规模生产^[1], 降低成本, 但是玻璃化畸形等生理问题比较严重。因此, 2 种方法都无法实现提高效率和降低成本的商业化要求。因此, 改善培养工艺, 建立新的培养方法体系, 减少劳动力耗费, 实现自动化培养是降低成本实现商业生产的一种趋势。

最早使用微生物发酵罐来进行植物组织培养, 但是由于成本以及植物的特点的限制而失败。针对植物组织培养的特点, 经过 30 年的简化和完善, 出现了多种专用于植物组织培养生物反应器, 如筏式生物反应器, 喷雾式生物反应器等^[1]。其中间歇浸没培养应用最为广泛, 包括完全浸没间歇培养和半浸没间歇培养。

间歇浸没式生物反应器有多种类型, 在这些生物反应器中比较成熟的, 具有代表性的主要有以下几种。

(1) APCS 间歇完全浸没培养系统。最早的间歇式浸没系统出现在 1985 年^[2], 由 Tisserat and Vandercook 设计了植物自动培养系统, 简称为 APCS 系统。整个系统有 4 个部分组成: 营养液储存系统有 2 个营养蓄水池组成; 营养液驱动系统由 2 个叶轮推动器组成; 植物培养系统是 1 个大的玻璃培养腔; 营养液运输系统由硅胶树脂管组成(图 1)。整个系统在叶轮驱动下实现了液体的定期补充和排干, 获得了与手工培养同样的效果, 却没有了繁琐的更新操作。APCS 系统培养的兰花芽尖的数量是半固体培养的芽尖数量的 4 倍, 而且其中的植物生长更快更好。该系统培养明显减少了

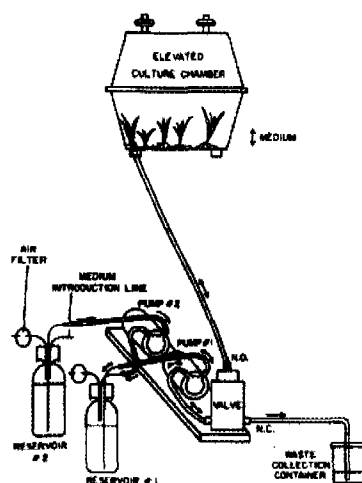


图 1 APCS 间歇完全浸没培养系统

劳动消耗。

(2) 蠕动泵驱动间歇半浸没培养系统。20 世纪 80 年代末, Aitken-Christie 等改进了 APCS 系统, 形成了 1 套半自动培养系统, 该系统使用了 1 个巨大的聚碳酸酯培养容器 (250 mm×390 mm×120 mm)(图 2)。在培养容器内, 辐射松首先在固体培养基上培养 1 个月, 然后利用蠕动泵和定时器达到营养液的自动化间歇更新, 最终实现了对辐射松的间歇半浸没培养。液体更新每次 30~40 ml, 需 6~7 h, 每周 2 次;

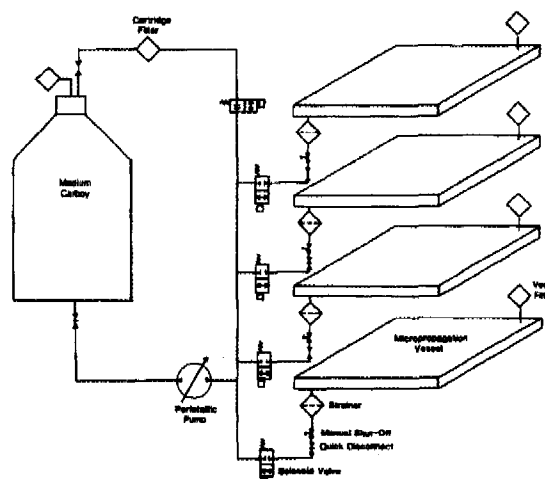


图 2 蠕动泵驱动间歇半浸没培养系统

基金项目 中国科学院创新项目资助。

作者简介 赵望锋 (1981-), 男, 辽宁沈阳人, 在读硕士, 研究员, 从事间歇浸没培养研究。* 通讯作者。

收稿日期 2006-10-18

在供给营养液的时候, 注意保持气体供应, 保证苗的需氧量, 通气培养比不通气培养效果好^[3]。

在此基础上, 1991 年, Simonton 等设计了 1 套计算机控制泵实现液体间歇供应的系统, 有 4 个培养容器, 用带孔聚丙烯作为支撑代替琼脂培养基, 这样能够控制营养液的高度, 使营养循环能够按照预定设计进行^[4]。

上述 3 种培养系统都是采用了外界机械动力作为驱动力, 利用控制程序实现营养液的间歇供给和排干, 减少了劳动力耗费, 降低了成本。但是由于营养周期长, 操作复杂, 污染和空间限制问题比较严重。

(3) 气泵驱动 RITA●间歇浸没式生物反应器。1993 年, Alvard 等设计了一套间歇浸没控制系统^[5], 该系统有 2 个容器组成, 下面的是营养液储存容器, 上面是培养容器。中间有管道相连, 利用气压泵产生的气压作为动力, 迫使培养液从营养液储存容器通过中心管道流入培养容器, 与整个培养物的完全接触, 同时引起气体流动, 实现培养容器空气的

更新。气体进入营养液储存器时, 都经过 22 μm 的滤膜防止污染。系统进入市场后正式命名为 the Recipient for Automated Temporary Immersion system, 简称为 RITA●(图 3)。应用该系统通过多种培养方式对香蕉培养, 发现间歇浸没培养的繁殖率最高, 为其他培养方法的 2~3 倍, 干重是其他培养方法的 2~5 倍, 整个系统简单易用。1995 年已经投入市场, 实现了多个植物物种的大规模。但是系统容器体积小, 构造复杂, 价格较贵, 这些都限制了这套培养控制系统在发展中国家的推广应用^[6]。

(4) BIT●间歇浸没式生物反应器。在 RITA 设计的基础上, Escalona 等设计了 2 个容器分开的气体驱动间歇浸没生物反应器, 称为 The Twin Flasks system, 商品名为 BIT●^[7](图 4)。培养容器的大小可以改变, 而且构造简单, 价格便宜。2 个容器通过玻璃管或者硅管连接, 气体通过 0.2 μm 的滤膜除菌; 使用了 2 个空气压缩机来实现营养液的供给和排干。使用该系统, 以 2 min/3 h 的浸没频率供给营养, 同时

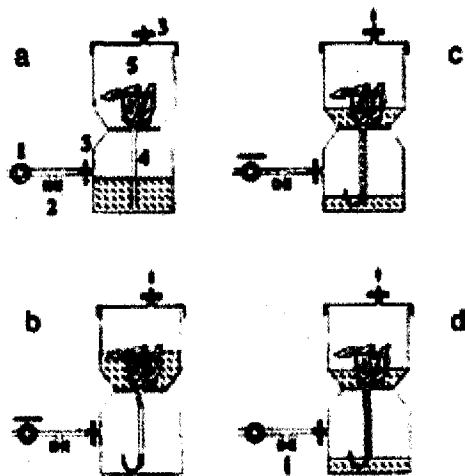


图 3 气泵驱动 RITA●间歇浸没式生物反应器

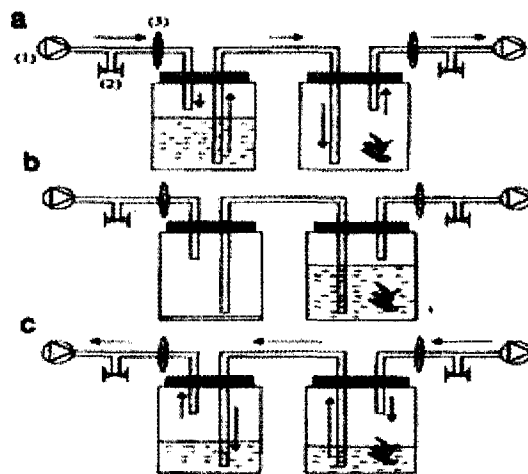


图 4 BIT●间歇浸没式生物反应器

也完成了气体更新, 在含有多效唑的培养基中培养 42 d 后, 明显提高了繁殖率, 增加了干重和湿重; 7 周后获得了最大的繁殖率。1999 年, 大规模培养获得的菠萝苗比用传统方法获得的苗成本减少了 20 %。

上述 4 种间歇浸没式生物反应器是不同时期具有代表性的成果。前 2 种由于污染和空间问题没有得到广泛应用, 后 2 种采用了双瓶式, 但原理上是一样的, 利用气压实现间歇浸没, 液体更换中保证无菌过滤, 大大降低了污染率, 在一定程度上降低了成本, 提高了效率, 已经应用于多个具有医药学价值的树种、经济树种和林学应用树种的大规模育苗研究。

2 间歇式浸没培养优势

大部分树种的培养试验, 都对间歇浸没培养和半固体培养、液体培养作了比较, 认为应用于组织培养的中后期效果较好。以半固体培养基获得的小苗或者芽为培养材料, 来进行芽分化增殖和驯化, 其优势有: ①在计算机程序的辅助下实现了营养液的自动化控制供应和排干, 增加了技术含量, 减小了劳动密度, 节约了大量的劳动力, 降低了成本; ②间歇浸没, 避免或者减少了液体培养中畸形苗和高度汗水态苗的比例; ③利用液体培养基的自动供给, 能够达到较为一致的培养环境和培养状态; ④与微生物反应器比较, 在控

制精度相似的情况下, 剪切力降低; ⑤污染减少; ⑥根据培养苗发育需要, 易于改变培养液成分, 实现连续培养; ⑦营养成分充分混合, 便于营养的吸收和利用; ⑧气体更新充分, 氧气充足; ⑨培养苗的质量提高, 干重, 湿重, 繁殖率都明显提高, 驯化成活率也高达 90 % 以上^[8-10]。

间歇浸没培养的 1 个重要的特点就是使培养物与营养液和气体间歇大面积接触, 既保证了合适的养分吸收, 又能提供充分的氧气供应, 保证了培养的生长速度和生长质量。培养过程中的其他参数, 如浸没频率、容器体积、营养液体积和培养时间等也是影响培养物质量的因素。

3 间歇式浸没培养参数的设置

3.1 培养时间, 浸没时间和浸没频率 不同物种对浸没时间和频率有不同的要求。由于每个物种的合适浸没频率不同, 所以使用间歇浸没系统继代 1 个物种前, 必须首先测定他的合适间歇频率。1985 年, Tisserat 在培养兰花的时候发现, 每天 12 个循环比每天 1、4、24 个循环的培养效果要好^[2]; Zhu Li-Hua 等在对苹果主根的培养中也发现, 每天浸没 16 次要比浸没 8 次的效果好^[11]。Alvard 在对辐射松的间歇培养中发现, 1 周 2 次的浸没频率比 1 周 1 次和 2 周 1 次的效果更好^[6]。因此, 浸没时间是间歇式培养中的重要技术环节, 对于系统功效是有决定意义的参数^[12]。

不同物种对合适浸没时间的要求也不一样。Albarra 对咖啡在间歇浸没式培养中的循环特征作了深入的研究,发现 15 min/4 h 的浸没时间会导致 90 % 的高度含水苗,而且生理结构不完整;而 1 min/4 h 的浸没则能够形成大量鱼雷胚,无高度含水态,75 % 的苗能够长成植物;三叶胶的最佳浸没时间应当更少^[13]。Charybdis 的最佳浸没时间是 5 min/24 h^[14];而对于山药的最佳时间则是 10 min/6 h^[15]。Damiano 等在对野生梨和梨的间歇培养中发现,对于野生梨的最佳浸没时间是 30 min/d,而梨最好是 60 min/d^[16]。此外,某些物种对一定范围的浸没频率的改变并不敏感。Roels 使用双瓶式间歇浸没系统培养车前草时发现,繁殖率在浸没时间(4、12、22 min)和频率(每 3、5、7 h)方面没有显著差异^[17]。Kongban 等对鲜白头(*Charybdis numidica*)研究中也发现,芽再生率在 5 min/24 h 和 5 min/12 h 2 种频率下,变化不显著^[17]。

对培养效果影响较大的因素,除了间歇频率和浸没时间外,培养时间也是一个重要因素。对车前草继代培养 6 代,繁殖系数显著降低^[14];对菠萝继代培养 7 周时繁殖率最大,但苗活力降低^[6]。这说明,培养时间不是越长越好,繁殖率不是越大越好,要同时兼顾培养苗的质量。

3.2 空间和通风 培养容器的空间显著影响间歇浸没培养的效率,为减少人工继代的次数,提高效率,一般采用较大培养容器,几个月甚至 10 个月以上^[13]才转移 1 次。与常规培养相比,间歇式培养营养供应充足,生长速度和繁殖系数都明显增加^[18],常用固体培养容器的体积无法满足间歇培养中组培苗对空间的要求,因此间歇培养一定要增加培养体积。采用较大空间,有利于进行通风处理,这样能够改善培养瓶内的气体成分,提高培养苗质量和繁殖系数^[19]。

Escalona 等发现培养液的体积对繁殖率、湿重、干重等也有明显影响^[7]。当由于培养物生长而导致拥挤后,培养物质量也急剧恶化^[3]。

此外培养瓶、培养基的体积对繁殖系数也有较大影响。因此,在间歇浸没培养中应该适当扩大培养体积,增加空气流通,减少环境对培养物的限制,提高培养物质量和数量。

3.3 激素调节 激素的灵活运用能够大幅度提高苗木的繁殖率。限制商业化生产的关键因素是单位产品成本高,而降低成本必须提高繁殖系数和驯化成活率。在菠萝的商业化生产中,就采用了多效唑(pb)增加腋芽的繁殖率^[6]。而在金丝猴属植物培养中,则用赛本隆提高繁殖率,再使用其他激素提高生根率和驯化成活率^[20]。对碟兰球茎培养则使用了含有不同激素组合的 3 种培养基^[21]。不同培养阶段,使用含不同激素培养基培养最终达到较高的繁殖率是降低成本的一个重要途径。此外光强,二氧化碳浓度也是重要因素^[22]。

4 间歇浸没培养的遗传稳定性和生理研究

4.1 遗传稳定性研究 间歇式浸没培养具有相对较高的繁殖系数,一般为半固体培养的 2 倍以上,为了更好地估计培养物的遗传稳定性,Chakrabarty 等对系统中的培养物和温室培养物的基因组进行了 RAPD 分析,结果显示遗传性比较稳定^[10]。Feuser 对静态培养和间歇浸没培养的菠萝苗进行了同功酶和 RAPD 分析,也没有监测到显著差异^[23]。由此可见,间歇培养虽然大大提高了繁殖系数,但并没有使变异程度增加,遗传稳定。

4.2 生理学基础研究 在应用间歇式浸没培养系统的过

程中,通过优化培养参数,可以大幅度提高繁殖率,生长速度和驯化成活率,为了深入了解间歇式浸没系统继代培养优势的原因,必须从生理发育的角度进行深入研究。

(1)离子浓度与生长发育的关系。Alvard 等对咖啡组培苗进行 15 min/4 h 浸没培养时发现:90 % 的培养物超度含水,与正常鱼雷形胚相比,高鲜重,高水含量,低水势,高钾浓度,而且没有规则的上皮细胞;但是当浸没频率降到 1 min/4 h,能够形成完整的鱼雷型胚,培养苗没有高度含水态,约有 75 % 的苗能够转化为植物^[13]。Agnieszka 认为,常规继代培养更换培养基,引起培养基 pH 值变化,离子浓度失衡,导致培养物和环境之间的 K 离子等流动,影响生长^[24]。

(2)通风对培养苗的生理影响。在对菠萝培养中发现,增加通气,改善环境气体质量,能够增加营养物质的吸收,提高叶绿素含量,加强小苗的蒸发作用和呼吸作用,改善光合自养能力^[18],一方面提高了生长速度,另一方面形成了一种近似自然的环境,间接驯化,提高了驯化成活率。

5 商品化研究状况

20 世纪 80 年代后期,间歇浸没试验就已经广泛开展,到 1999 年,将改进的双瓶式系统应用于菠萝商业繁殖^[7],经过 15 年的研究,充分证明了间歇式浸没培养的良好效果,优化了多个物种的浸没频率、培养体积、营养液体积等培养参数(表 1)。

表 1 进行间歇浸没培养试验的树种

培养植物	生物反应器系统	最佳浸没频率	繁殖材料	文章发表时间	分类	备注
菠萝	BIT●	2 min/3 h	芽	1999 ^[7] 2003 ^[25] 2005 ^[23]	经济作物	成本降低 20 %,已经实现商业化育苗
桉树	RITA●	10 min/4 h	小苗	2005 ^[18]	林业树种	成功繁殖
瓠瓜木	RITA●	3 min/3 h	芽	2004 ^[26]	观赏,医疗	44 % 细菌污染
茶	RITA●	1 ~ 2 min/6 h	芽	2000 ^[27]	经济作物	
香蕉	RITA●	20 min/2 h	芽	1993 ^[6] 2002 ^[28]	经济作物	
金丝猴属	RITA●	15 d 5 min/3 h 5 min/24 h	苗	2004 ^[9] 2003 ^[29]	医疗树种	
Charybdis numidica	TIS	5 min/12 或者 24 h	节点芽	2005 ^[14] 2003 ^[17]	医疗树种	成功繁殖了 9000 株
柑橘	TIS	1 min/4 h	体胚	1997 ^[20]	经济树种	促进体胚正常发育
紫薇科	RITA●	3 min/3 h	节点芽	2004 ^[26]	医疗树种	
梨树	BIT●	30 min/d	苗	2002 ^[16]	经济树种	
苹果	气球式反应器	615 min/6 h	茎节	2003 ^[10] 2005 ^[11]	经济树种	90 % 生根成活
橡胶	RITA●	1 min/12 h	小苗	2001 ^[20]	经济树种	
咖啡	TIS	1 min/4 h	体胚	2005 ^[13]	经济植物	生产晶胚

注:TIS 多是实验者自己改进的 BIT●系统。

在多个物种的微繁中,与半固体培养,液体培养相比较,间歇式浸没培养能够更好的提高繁殖系数,减少劳动力耗费,提高培养苗质量,增加驯化成活率,最终降低劳动成本。间歇浸没式生物反应器相对更适合于芽繁殖和继代培养,劳动力耗费仅为固体培养的一半^[12],成本能降低 20 %^[7]。

现有的间歇式浸没培养技术主要应用于花卉及具有较大林业价值和经济医疗植物的大规模半自动商业化生产^[23]。对于林业树种的应用还比较少,目前只有桉树^[11]等几个树种实现了大规模间歇浸没繁殖。此外,还有很多具有较高经济价值花卉品种,经济作物也使用间歇浸没技术进行成功规模繁殖。

6 讨论

间歇式浸没生物反应器的大规模培养大大提高了培养繁殖效率,降低了劳动成本,有良好的商业应用前景,然而该方法仍然存在不少问题。

(1)并不适用于所有物种。不同物种对浸没要求不同,大部分在间歇浸没培养中生长良好,但是也有少量物种在持续浸没中生长较佳。Feuser 对马铃薯的培养发现,间歇式浸没培养物质量较好,但芽生长速度、繁殖率小于持续半浸没,因此成本相对较高^[2]。通过调节浸没频率和浸没程度可改善培养效果。

(2)污染限制了推广。在前期的试验中,采用较大营养液容器,利用蠕动泵或其他动力机械供营养,但最后因污染无法控制而失败^[2-4]。现在多采用双瓶式培养,进出营养液都通过严格无菌过滤,培养过程仍然没有脱离无菌环境,大规模应用受到污染限制,在校树的 RITA 培养中污染率甚至达到了 100%^[18]。用化学药物等微生物抑制剂杀菌剂代替高温灭菌,降低对无菌条件的要求是降低成本的重要因素,Vitrofur 和 ppm 2 种污染抑制剂得到了广泛应用^[2]。Vitrofur (G-I)和 Plant Preservative Mixture (PPM™)加入培养基中能够明显的抑制污染,但不抑制甚至促进了植物生长发育。试验证实,G-I 能够明显提高培养苗的质量,代替高温灭菌,节省劳动力^[2]。PPM™ 在多种植物的微繁中也得到了应用^[3]。山东农业大学孙仲序等对葡萄开展了开放试验,发现使用抑生剂能够代替高温处理和无菌操作台,在不影响植物生长条件下,把污染控制在 10%以内^[12-13]。Hvoslef-Eide 等在研究中发现,pH 值可以作为植物培养是否污染的指示参数,他认为生物反应器中污染物能够快速消耗营养液中的 NH₄⁺,引起 pH 值明显升高^[34]。

(3)自动化程度相对较低。现在,为了进一步的减小间歇式培养的劳动成本,研究重心越来越偏向于自动化程度的最大化^[35]。

(4)多应用于培养中后期。多数研究主要利用固体培养苗来进行间歇培养,但是对于细胞和体胚的培养还比较少,反应器需要进一步完善,精密化。2005 年,Kathrine 等对体胚微繁生物器进行了设计试验,主要是完善容器内的微环境调控,促进细胞发育^[34]。

在现有研究基础上,采用效果较好的污染抑制药品,把大规模间歇浸没培养与开放培养自动化结合起来,简化培养过程,会进一步提高林业用苗产量,降低单株成本,提高和拓宽组培养林业苗木的竞争力和市场化前景。

参考文献

- ETIENNE M H. Berthouly temporary immersion systems in plant micropropagation[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2002(69):215-231.
- TISSERAT B, VANDERCOOK C E. Development of an automated plant culture system [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1985(5): 107-117.
- AKITEN C, JONES C. Towards automation: Radiata pine shoot hedges in vitro[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1987(8):185-196.
- SIMONTON W, ROBACKER C, KRUEGER S A. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1991(27):211-218.
- ALVARD F D, COTE, TEISSON C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation effects of temporary immersion of explants[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1993(32):55-60.

- GIMÉNEZ C, SISTEMAS P. Para la micropropagación por inmersión temporal[J]. Rev Fac Agro(LUZ), 2004, 21(1):1-7.
- ESCALONA M, LORENZO J C, GONZALEZ B. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems[J]. Plant Cell Reports, 1999(18):743-748.
- ROELS S, ESCALONA M, CEJAS I, et al. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(82):57-66.
- ZOBAYED S M A, Murch S J, RUPASINGHE H P V. In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem')[J]. Plant Science, 2004(166):333-340.
- CHAKRABARTY D, HAHN E J, HOON Y J, et al. Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2003, 78(5):605-609.
- LI H Z, XUE Y L, WELANDER M. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(81):313-318.
- HANHINEVA K, KOKKO H, KARENlampi S. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria×ananas*) cultivars in temporary immersion bioreactor system[J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2005, 41(6):826-831.
- ALBARRA J, BERTRAND B, LARTAUD M. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2005(81):27-36.
- WAWROSCH C, KONGBANGKERO A. Shoot regeneration from nodules of *Charybdis* sp.: A comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(81):319-322.
- JOVAL M C. Production of yam microtubers using a temporary immersion system[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(83):103-107.
- DAMIANO C, FRATTARELLI A, GIORGIONI M. Micropropagation of Pear through Temporary Immersion[R]. ISHS Acta Horticulturae 596: VIII International Symposium on Pear, 2002.
- GKERD A K, WAWROSCH C. Improved shoot regeneration from nodules of *Charybdis numidica* in a temporary immersion system [J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2003, 78(5):650-655.
- MCALISTER B, FINNIE J, WATT M P, et al. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA_) for production of commercial eucalyptus clones in mondi forests (SA) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(81):347-358.
- ROELS S, NOCEDA C, ESCALONA M. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2006(84):155-163.
- ZOBAYED S M A, SAXENA P K. In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor[J]. Plant Science, 2003(165):463-70.
- YOUNG P S, MURTHY H N, YOEUP P K. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in phalaenopsis [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2000(63):67-72.
- JUSTO L, GONZALEZ O, ZAIDA F. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus*. merr) in temporary immersion bioreactors [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2005, 41(6):87-90.
- FEUSER S, MELER K, DAQUINTA M, et al. Nodari genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2003(72):221-227.
- AGNIESZKA I, TRAUD W, SIMON R. In vitro propagation of *hippeastrum 3 chmielii* Chm. influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(83):339-346.

(下转第 323 页)

验,探讨超低温保存的可行性,建立种质资源库将是超低温保存研究的趋势。

参考文献

- [1] NI J J, PETER M, COLOWIT, et al. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers[J]. Crop Science, 2003 (43): 601-608.
- [2] GU J T. Conservation of plant diversity in China: achievements, prospects and concerns[J]. Biological Conservation, 1998, 85(3): 321-327.
- [3] REED B M, DENOMA J, LUO J, et al. Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm[J]. In Vitro Cellular & Development Biology, 1998, 34(3): 256-260.
- [4] 肖洁凝, 黄学林. 茎尖和芽的超低温保存[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 46-51.
- [5] 赵艳华, 周明德. 马哈利樱桃离体茎尖超低温保存德研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(6): 402-403.
- [6] TAKAGI, THINH N T, KYESMU P M. Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification[J]. Acta Hort, 1998(161): 485-491.
- [7] TAKAGI H, TIEN N, ISLAM O M, et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) by vitrification[J]. Plant Cell Rep, 1997(16): 594-599.
- [8] 赵艳华, 吴雅琴, 李春敏. 梨离体茎尖超低温保存方法的比较研究[J]. 河北农业情报, 2004, 8(4): 93-95.
- [9] MATSUMOTO T, SAKAI A. Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol[J]. Euphytica, 2003(131): 299-304.
- [10] TAHTAMOUNI R W, SHIBLI R A. Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (*Pyrus syriaca*) [J]. Adv Hort Sci, 1999(13): 156-160.
- [11] HIRAI D, SAKAI A. Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification[J]. Plant Cell Reports, 1990(19): 150-155.
- [12] SHIBLI R A, HAAGENSEN D M, CUNNINGHAM S M. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration[J]. Plant Cell Rep, 2001(20): 445-450.
- [13] LANGIS R L, STEPONKUS P. Cryopreservation of rye protoplasts by Vitrification[J]. Plant Physiol, 1990(92): 666-671.
- [14] 张玉进, 张兴国, 庞杰, 等. 魔芋茎尖玻璃化法冻存研究[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 96-101.
- [15] 王君晖, 黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 277-283.
- [16] TANNOURY M, RALAMBOSA J, KAMINSKI M. Cryopreservation by vitrification of coated shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured in vitro [J]. CR Acad Sci (Paris), 1991 (313): 633-638.
- [17] MATSUMOTO T, SAKAI A, YAMADA K. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristem of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration [J]. Plant Cell Reports, 1994(13): 442-446.
- [18] HIRAI D, SHIRAI K, SHIRAI S, et al. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of strawberry (*Fragaria × ananassa* duch.) by encapsulation-vitrification[J]. Euphytica, 1998, 101(1): 109-115.
- [19] SAKAI A, MATSUMOTO T. In vitro conservation of plant genetic resources [J]. Plant Biotechnology Lab UKM, Malaysia, 1996(2): 105-118.
- [20] GNANAPRAGASAM S, VASIL I K. Ultrastructural changes in suspension culture cells of *Panicum maximum* during cryopreservation[J]. Plant Cell Reports, 1992(11): 169-174.
- [21] BENSON E E. The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: Consequences for post-thaw survival[J]. Plant Science, 1992(85): 107-114.
- [22] 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306.
- [23] SAKAI A, KOBAYASHI S, OLYAMA I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. Plant Cell Reports, 1990(9): 30-33.
- [24] 苗琦, 谷运红, 王卫东, 等. 植物组织培养物的超低温保存[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 350-354.
- [25] WANG Q C, BATUMAN O, LI P, et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-dehydration[J]. Plant Cell Rep, 2002(20): 901-906.
- [26] ULRICH J M. Responses of six rice callus cultures to deep-frozen temperatures[J]. Crop Science, 1984(24): 82-85.
- [27] WU Y, ENGELMANN F, ZHAO Y, et al. Cryopreservation of apple shoot tips: Importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants[J]. Cryo-Letters, 1999(20): 121-130.
- [28] MARUYAMA E, KINOSHITA I, ISHII K, et al. Germplasm conservation of guazuma crinita, a useful tree in the Peru-Amazon, by the cryopreservation of in vitro-cultured multiple bud clusters[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997(48): 161-165.
- [29] DIETRICH B, HAACK U, LUCKNER M. Cryopreservation of digitalis lanata cells grown in vitro. precultivation and recultivation[J]. Plant Physiol, 1986(126): 63-73.
- [30] WITHERS L A. Long-term preservation of plant cells, tissue and organs[J]. Oxf Surv Plant Mol Cell Biol, 1987(4): 221-272.
- [31] SCOCCHI A, FALOCI M, MEDINA R, et al. Plant recovery of cryopreservation apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability [J]. Euphytica, 2004(135): 29-38.
- [32] URAGAMI A, LUCAS M O, RALAMBOSA M R. Cryopreservation of microspore embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.) by dehydration in air with or without alginate encapsulation[J]. Cryo-letters, 1993 (14): 85-90.
- [33] MARTRE P, LACAN D, JUST D, et al. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2001(67): 25-35.
- [34] COMPTON M E, KOCH J M. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco [J]. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant, 2001, 37(2): 259-261.
- [35] 崔刚, 单文修, 秦旭, 等. 植物开放式组织培养研究初探[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2004, 35(4): 529-533.
- [36] 崔刚, 单文修, 秦旭. 孙仲序葡萄开放式组织培养外植体系的建立[J]. 农业生物技术科学, 2004, 20(6): 36-38.
- [37] HVOSLEF-EIDE A K, PREIL W. Bioreactor design for propagation of somatic embryos [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005 (81): 265-276.
- [38] PAEK K Y, CHAKRABARTY D, HAHN E J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005(81): 287-300.

(上接第 320 页)

- [25] ARTILES P E. Temporary immersion bioreactor as a tool for pineapple transgenic plants selection[J]. ISB News Report, 2003(2): 1667-1674.
- [26] MURCH S J, LIU C Z, ROSAURA M. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *crescentia cujete*[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2004(78): 63-68.
- [27] AKULA A, BECKER D, BATESON M. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion[J]. Plant Cell Reports, 2000(19): 1140-1145.
- [28] RAFAEL G K, DEF S M, LAISYN P P, et al. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2002(68): 21-26.
- [29] CABASSON C, ALVARD D, DAMBIER D. Improvement of citrus somatic embryo development by temporary immersion[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1997(50): 33-37.