

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 一种高效大规模组培方法——间歇浸没培养法

许亚良, 张家明\*

中国热带农业科学院热带技术研究所, 农业部热带作物学与遗传资源利用重点实验室, 海口571101

**摘要:** 本文综述了间歇浸没培养法的发展, 系统介绍其对植物微繁的积极作用, 并对其目前国内外的一些应用情况作简要介绍, 旨在增加相关领域的科研人员及企业对该方法的了解和重视, 进而加速其在国内的推广及应用, 促进相关产业的发展。

**关键词:** 间歇浸没培养法; 微繁; 应用现状

## An Efficient Method for Mass Tissue Culture—Temporary Immersion Culture Principle

XU Ya-Liang, ZHANG Jia-Ming\*

Key Laboratory for Tropical Crops Biology and Genetic Resources Utilization, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

**Abstract:** This review summarized the development of temporary immersion culture principle and systematically introduced its positive effects on plant micropropagation, and briefly introduced its application situation around the world, aiming at increasing the understanding and attention of related researchers and enterprises to this method, accelerating its application in our country, and promoting the development of related industry.

**Key words:** temporary immersion culture principle; micropropagation; application situation

生产的工厂化和自动化一直是一种趋势, 植物的生产也是如此。由于植物材料的缺乏及大田栽培中出现的各种害虫、病菌、线虫的存在, 导致植物生产中的损失率很高, 于是走上了无菌的试管繁殖阶段(Roels等2005), 即微繁。但由于生产成本过高, 微繁的产业化受到限制, 只有少数优良观赏植物品种(如兰花)、经济林木(如桉树)等实现了工厂化繁殖。在实现植物微繁产业化的过程中, 人们先后尝试了半固体培养和液体培养。这两种方法各有利弊: 半固体培养劳动力消耗大, 成本高, 但能获得较好的培养微环境; 而液体培养有氧气供应不足及植株玻璃化等问题, 但营养丰富, 易于进行自动化操作。这就促使人们开发出一种更适合植物大规模繁殖的方法。而间歇浸没培养法的出现为植物微繁提供了一种更好的思路和方法。

间歇浸没式培养法是通过将繁殖体进行间歇式的浸没来进行培养的方法。它是通过一系列的装置来实现繁殖体在液体培养基中的间歇浸没,

不仅有液体培养为繁殖体提供大量营养, 还有半固体培养保证充足氧气供应, 更重要的是能进行自动化管理, 大幅降低生产成本。它一般应用在组织培养中后期, 对由外植体获得的繁殖体进行继代培养, 通过改善培养环境, 提高其繁殖及生长速度, 最终实现植株产品品质及生产效益的提高。通常一个间歇浸没培养系统包括以下几个部分: 间歇浸没式生物反应器(temporary immersion bioreactor, TIB)、动力装置(气泵、蠕动泵或叶轮驱动)、定时装置、传导装置和虑菌膜等。间歇浸没培养的最初是为了解决液体培养中氧气缺乏的问题(Harris和Mason 1983)。由于其以液体培养为基础, 适合进行自动化操作, 因此逐渐发展并

收稿 2012-11-19 修定 2013-03-01

资助 科技部国际合作项目(2010DFA62040)和海南省农业财政专项(201301023)。

\* 通讯作者(E-mail: jmzhang@vip.163.com; Tel: 0898-66986190)。

应用到组培苗的大规模生产中。

间歇浸没培养在国外发展得比较早,相关实验较为丰富,已取得不少成果,不仅探明了其作用原理,同时也发现了更多的影响因子,一些物种在间歇浸没培养中的最佳因子配置也被摸索出来,并在1999年实现了菠萝组培苗的大规模生产(Escalona等1999)。在国内间歇浸没培养没有大规模推广,但在大规模组培中的优势是显而易见的。我国目前正处于转变经济发展方式的关键时期,新技术、新方法应得到关注,间歇浸没培养法对相关产业无疑会有较大推动作用。国内一些作者已经进行了相关报道(赵望锋和王力华2007),本文旨在新形势下加深相关研究人员对其了解,以期推动相关技术和产业的发展与进步。目前,国内的广西农业科学院已从古巴甘蔗研究中心引进间歇浸没培养系统并进行相关研究(刘丽敏等2009;杨柳等2010a, 2010b, 2011)。

### 1 间歇浸没培养系统的发展

间歇浸没培养系统是间歇浸没培养法的装置载体,所以其发展情况对该培养方法的效率有很大的影响,大致可分为四个阶段。第一阶段,1983年Harris和Mason发明了摇床机器系统,它是通过对培养瓶进行倾斜和摇晃来实现繁殖体与营养液的间歇接触。第二阶段,1985年Tesserat和Vandercook (1985)设计出的包括一个较大培养箱的培养系统,简称APCS系统(图1-A),它是通过叶轮驱动来实现培养箱内液体培养基的排出和重新补充的周期循环,进而达到繁殖体与营养液间歇接触的目的。第三阶段,这个阶段培养系统的最大特点是半自动化的实现,主要代表有Aitken-Christie和Jones (1987)在APCS系统基础上设计的由蠕动泵驱动的半自动培养系统(图1-B)和Simonton等(1991)设计的用电脑控制泵为4个培养板里的植株间歇提供营养液的培养系统。第四阶段,自动化程度、控制精确程度进一步提高,特别是气泵的使用不仅提出了一种新的作用原理,即通过气体来实现营养液的流动,还使培养瓶内的空气得到更新。目前应用的较多的是Alvard等(1993)设计的RITA<sup>®</sup>系统(图1-C)和Escalona等(1998)设计的BIT<sup>®</sup>系统(图1-D),也称双瓶系统(the twin flasks system)。

RITA<sup>®</sup>系统主要用来对诱导产生的体胚进行培养,较为精密;而BIT<sup>®</sup>系统多用来对较大的繁殖体进行培养,一些实验所用的间歇浸没培养系统也大都由BIT<sup>®</sup>系统改装而来。

### 2 间歇浸没培养对微繁的影响

间歇浸没培养结合了液体培养法和半固体培养法的优点,同时互相弥补了各自的缺点;既能为繁殖体提供充足的养分,同时还能避免或减少液体培养因缺氧引起的玻璃化对植株形态及生理的影响。另外,自动化操作的实现为植株的工厂化生产提供了条件。总的来说,在TIB中培养的繁殖体相比传统培养有更快的繁殖速度及更好的品质,移栽后的成活率更高。

#### 2.1 对培养环境的影响

间歇浸没培养对培养环境的改善及优化是其产生积极作用的关键之处,主要包括对培养装置内的空气组分、湿度和剪力等进行调节和控制。另外,保证营养的充足供应也是很重要的。

**2.1.1 改变植株与营养液的接触时间** 用营养液进行植物微繁,不仅能增加植物对营养的摄取,促进植物生长,还有利于进行自动化管理。但同时,植物材料的玻璃化现象也很普遍。植物的玻璃化被认为是与营养液长时间接触的结果。它的特征是,植物表现不同程度的形态和生理上的紊乱,比如出现透明的含水组织、芽的生长紊乱和一些特别的变态叶的产生。Krueger等(1991)发现,将花楸树(*Sorbus pohuashanensis*)的芽在液体培养基中培养时会产生严重的玻璃化现象,如产生透明的卷曲的加厚的叶子和茎。研究发现,通过增加容器内的空气流动及维持植物材料与营养液间的间歇接触,能减少植物的玻璃化。而大多数间歇浸没培养系统都具有这两个功能,因此间歇浸没培养可以阻止或减少玻璃化现象,这在一些实验中也得到了证明(Alvard等1993)。

**2.1.2 减少液体振动** 在悬浮培养和传统的生物反应器中,通常需要对培养液进行连续的震荡来满足植株生长与发育对氧气的需求。但另一方面,营养液的振动也是对植株产生伤害的一种剪力来源,会引起植物的发育问题。它对植物的消极作用在于对植物的极性分布产生影响,而极性分布

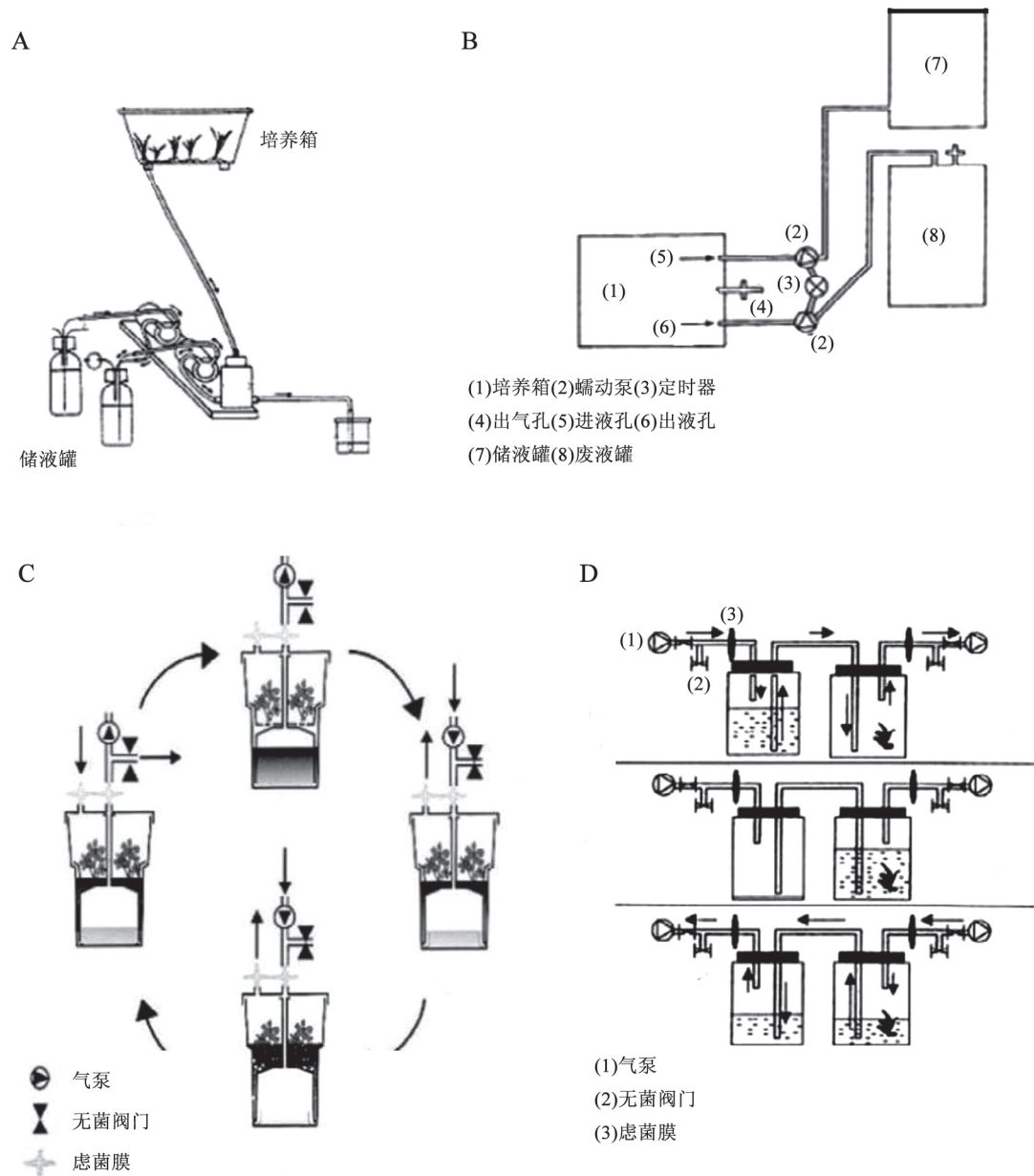


图1 几种不同类型的间歇浸没培养系统

Fig.1 Several kinds of temporary immersion culture system

引自Etienne和Berthouly (2002)。

是植物发育初期非常重要的一个环节(Liu等1993)。极性分布如果受到影响, 胚不能发育成正常植株或死亡。间歇浸没培养解决了这个问题, 使植株品质得到提升。

**2.1.3 改善通气状况** 容器内空气的成分一般包括 $\text{CO}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{C}_2\text{H}_4$ 、乙醇、乙醛及水蒸气等(Maes和Debergh 2003), 它们对繁殖体的生长、发育及品质有较大影响(Buddendorf和Woltering 1994)。容器

内这些气体的积累, 特别是 $\text{CO}_2$ 、 $\text{C}_2\text{H}_4$ 及水蒸气的积累最终会对植株的光合作用及气体交换造成负面影响。

早期的液体培养装置是密闭的, 没有跟外界的气体交换。气泵驱动的间歇浸没培养系统(图1-C)很好地解决了这个问题, 通过容器内气体的更新, 将有害气体的浓度降到了对植株影响较小的状态, 同时避免了因水蒸气的饱和而造成的玻璃



化现象。

研究发现,在车前草(*Musa spp.*)的间歇浸没培养和半固体培养中,前者培养装置中最大CO<sub>2</sub>和C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>的浓度相比后者中要小,而最小O<sub>2</sub>浓度相比后者中的要大。其结果显示,间歇浸没培养中的繁殖体有较快的增殖速度,且茎长、叶数比半固体培养有优势(Roels等2006)。Roels等(2005)还发现,对于车前草,每个繁殖体平均25~100 mL的顶空体积是最合适的。

## 2.2 对植株的影响

由于间歇浸没培养对培养微环境有良好的改善作用,因此决定其对植株品质有一定的促进作用。

**2.2.1 对生理作用的影响** 间歇浸没培养对繁殖体发育过程中的一些生理过程有积极作用。香蕉和芭蕉的体胚在RITA<sup>®</sup>中进行间歇浸没培养时,原胚表皮细胞的二次胚胎发生得到促进。另外,在RITA<sup>®</sup>中产生的体胚转移到半固体培养基上培养时,会有较高的转化率(60%~70%)(Escalant等1994)。

通过比较几种不同培养系统对柑橘(*Citrus deliciosa*)体胚发育的影响发现,将近60%在半固体培养基上培养的体胚能发育到子叶阶段,但是处于玻璃化状态,在悬浮液中继续培养会阻碍子叶和表皮的形成,同时体胚不能发育到球形胚。而RITA<sup>®</sup>系统能促进体胚的发育,产生的体胚中有66%是可以产生子叶的,且在形态上与珠胚相似(Cabasson等1997)。

在菠萝(*Ananas comosus* L.)的半固体及间歇浸没培养中发现,在高光通量下,TIB中繁殖体的光合速率要低于培养皿中的,而对蔗糖和氮的吸收量及干物质和叶域中的蔗糖、氮含量都大大增加,意味着TIB中芽的生长并不完全依赖于光合作用提供的营养,甚至从光合作用获得的营养要少于从培养基中摄取的营养,此时的繁殖体即为光能混养型(Escalona等2003)。这为移栽后的光能自养提供了一个过渡阶段(González-Olmedo等2005)。

另外,TIB中由通气引起的相对湿度变化可能会刺激植物的蒸腾作用,而这会使植物更容易适应移栽后的环境,提高驯化率(Wardle等1983)。

**2.2.2 对产品品质的改善** 间歇浸没培养对植株品

质的改善通常表现在形态指标及生理指标的变化,如粗度、长度、干重、湿重、根数和叶数等的增加,最终表现为驯化率及存活率的提高。

乳树(*Mitragyna inermis*)的芽在TIB中比在半固体培养基中要长,且带有更多的子叶(Tisserat和Vandercook 1985)。花楸树经过间歇浸没培养获得的芽,要比常规培养获得的要长且重(Krueger等1991)。

咖啡(*Coffea arabica* L.)在一般锥形瓶或生物反应器中培养时能产生30%左右的鱼雷形胚(Zamarripa等1991; Noriega和Söndahl 1993);而Etienne等(1999)发现,通过间歇浸没培养,产生鱼雷形胚的比例在90%以上。将继续发育获得的小苗转移到半固体培养基或进行大田直播时成活率及驯化率显著提高。

菠萝经过间歇浸没培养获得的芽在转移后有较强的适应性和较高的生根率,同时随着芽长度的增加,存活率也呈线性升高,超过6 cm的能直接在温室中生长,且有90%~100%的存活率(Escalona等1999)。另外,在菠萝的培养中也发现,通过间歇浸没培养的繁殖体性状在继代培养时会发生变化。正常的、腊片状的芽所占比例从第1个月的41%上升到第8个月的93%,在第9至12个收获期保持在97%(Aitken-Christie和Jones 1987)。

## 2.3 对微繁效益的影响

通过间歇浸没培养不仅可以提高植株品质,而且可以提高繁殖率和生长速度,来实现生产效率的大幅增加。另外自动化操作可以减少成本消耗,实现植株的工厂化生产,获得经济效益。

**2.3.1 生产效率的增加** 车前草在半固体培养中芽的增殖速度为4.3,在间歇浸没培养中则为6.4(Roels等2006)。而在香蕉芽尖的微繁中,间歇浸没培养也是显著促进了外植体的生长和增殖速度;同时将RITA<sup>®</sup>及其他三种液体培养方法与传统的半固体培养方法相比,在RITA<sup>®</sup>中获得最大的外植体增殖速度(Alvard等1993)。甘蔗(*Saccharum spp.*) 在BIT<sup>®</sup>系统中进行间歇浸没培养,其平均23.9个芽·30 d<sup>-1</sup>的增殖速度要比Jiménez等(1995)记录的标准增殖速度3.96个芽·30 d<sup>-1</sup>快近6倍。同时,明显促进芽的伸长(Lorenzo等1998)。菠萝的芽通过间歇

浸没培养, 增殖速度显著增加, 与传统的液体培养和半固体培养相比, 分别增加了300%和400% (Escalona等1999)。

**2.3.2 成本消耗的减少** 植物生产的成本消耗主要在于劳动力消耗、培养容器和营养液的消耗及工作区域的需求, 其中劳动力消耗占成本的40%~60% (Chu 1995)。间歇浸没培养法显著地减少了劳动力消耗, 同时工作区域和容器数量需求也减少, 使成本降低。虽然间歇浸没培养系统的单个成本较普通培养装置贵, 但就长远来看, 相比传统培养方法还是有较大的经济优势。

计算甘蔗芽的微繁成本发现, 采用间歇浸没培养比传统半固体培养能使成本减少46%, 主要是由于劳动力成本和工作空间的减少 (Lorenzo等1998)。Escalona等(1999)对菠萝进行4个月的间歇浸没培养, 发现菠萝芽的产量要比常规培养增长100倍。同时, 每个菠萝芽的成本减少20%。

### 3 影响间歇浸没培养效果的几个因子

#### 3.1 浸没时间和浸没频率

浸没时间及浸没频率是影响间歇浸没培养效果的一个重要因素, 不仅影响繁殖体对营养的摄取, 还与玻璃苗的出现与否有很大关系, 因此它的合适确定关系到微繁效率的高低。

由于植物种属、采用的组培方式及所应用的培养系统种类的差异, 不同物种组培过程所采用的浸没时间和浸没频率一般是不同的。合适的浸没时间和浸没频率不仅能减少或阻止玻璃化现象的出现, 还能使繁殖体有较快的生长速度及良好的品质。

对于花楸树, 在浸没时间为5 min/30 min (每隔30 min浸没5 min)时, 有玻璃化现象的出现, 但是在5 min/60 min处理的并没有玻璃化。另一方面, 前一种处理能增加芽的数量。同时还发现, 当浸没频率改变时, 植物材料会有一个适应阶段 (Krueger等1991)。

对于某些种属的植物, 一定范围内的浸没时间及频率的变化对其影响差别不大。如, 车前草在不同的浸没时间(4、12和22 min)及浸没频率(每3、5和7 h)下, 芽的繁殖速度没有显著变化。但在较长的间歇时间(7 h)下, 芽较长; 而在较长的浸没

时间(22 min)下, 芽较小, 且叶数量也少 (Roels等2005)。

#### 3.2 均营养液体积

液体培养基体积的大小关系到每个繁殖体所能得到营养的多少(也即接种密度), 对其生长发育过程造成影响。营养液过少时, 繁殖体获得的营养就少, 生长及发育受影响; 营养液过多时, 植株产生的一些刺激芽形成的胞外化学物质被稀释, 对生理的促进作用也会降低 (Lorenzo等1998)。因此, 对于没有营养液循环的培养系统(如BIT<sup>®</sup>系统和RITA<sup>®</sup>系统), 需要根据繁殖体的种属及数量等来确定最适的营养液体积, 以均营养液体积为指标。

甘蔗在BIT<sup>®</sup>系统中进行间歇浸没培养时发现, 外植体的最适均营养液体积为50 mL, 繁殖系数可以达到23.9 (Lorenzo等1998)。车前草外植体的最适均营养液体积为30 mL, 在28 d内的增殖速度大于13。当外植体均营养液体积分别为10、20和30 mL时, 增殖速度分别为11.9、11.7和13.8; 均营养液体积为30 mL的芽长、叶数及根数是最好的 (Roels等2005)。果蔗进行间歇浸没培养时, 最适均营养液体积为80~100 mL (杨柳等2010b)。

#### 3.3 培养容器体积

间歇浸没生物反应器的体积比传统培养所使用的容器的体积都大, 为1~20 L不等, 这与间歇浸没培养对微繁的促进作用有关。培养容器体积的增大对植物微繁有多方面的好处, 主要表现在以下几个方面: (1)可以增加营养液的加入量, 为繁殖体提供充足的营养。另外, 还可以延长每次营养液加入对繁殖体的供应时间, 减少营养液更换次数, 减少劳动力消耗; (2)可以为植株生长提供更大的空间, 有利于繁殖体的伸长, 获得具有较好形态的植株产品; (3)使得繁殖体的均顶空体积增加, 对繁殖体的光合作用有一定的促进作用; (4)在一定情况下可以相对降低容器内水蒸气密度, 减少植株玻璃化出现的比率。

当然, 容器体积并不是越大越好, 不仅容易导致污染, 还对植株生理过程产生消极影响。Roels等(2005)发现, 当使用体积分别为250、1 000、5 000和10 000 mL的TIB对车前草进行培养时, 增殖速度在容积为250和1 000 mL时较大, 此后不断变小。

### 3.4 其它因子

此外, CO<sub>2</sub>浓度、光照强度和蔗糖含量等因素也会对植株品质造成影响。这三个因素的合理搭配对微繁植株品质有较大影响,特别是移栽后的驯化能力有大幅提升(Escalona等2003; Aragón等2005, 2010)。

培养容器目前的消毒方式为高温消毒及抗生素、杀真菌剂,其使用会对植株品质造成不良影响。目前发现Vitrofur (G-1)和Plant Preservative Mixture (PPM<sup>TM</sup>)等污染抑制剂不但对植株生长无不良影响,反而对其品质有促进作用,抑制污染能力也较强,因此得到了较好的推广(González-Olmedo等2005)。

另外,所采用的接种材料的继代数也对增殖效果有一定影响。如在对照蔗进行间歇浸没培养时发现,以经半固体培养诱导的第4代继代苗为接种材料时,蔗苗的增殖和生长较为理想(杨柳等2010b)。

### 4 间歇浸没培养法应用现状及存在问题

西方国家自20世纪80年代便开始了大规模液体浸没组织培养的研究,到90年代中后期取得一些培养理念和培养载体方面的进展,如间歇浸没培养理念的提出及间歇浸没生物反应器的出现,这为组培的商业化奠定了基础。而国内研究则起步较晚,且主要集中在无糖组织培养和次生代谢产物生产上(丁永前和丁为民2002)。至今,多个物种的最适配置因子已经被陆续研究出来。目前国内外报道的利用间歇浸没培养法进行培养的品种主要有菠萝(González-Olmedo等2005)、香蕉(杨柳2010a; Roels等2005)、甘蔗(刘丽敏等2009; Angela等2009; 杨柳等2011)、辰星草(廉美兰等2004)、山药(Jova等2005)、木薯(Ospina等2007)、苹果(Zhu等2005)和咖啡(Etienne等1999)。至此,间歇浸没培养技术已经应用于一些花卉品种及具有较大经济和医疗价值植物的商业化生产中。近几年,国内科研人员对相关方面的研究有了一定的关注,开始利用间歇浸没生物反应器对星辰草(廉美兰等2004)、果蔗(杨柳等2010b)、香蕉(杨柳等2010a)及甘蔗(刘丽敏等2009; 杨柳等2011)等进行研究,探索其进行间歇浸没培养的最优因子配置,这对

国内利用该方法实现一些物种的大规模商业化生产有较大的推进作用。

但我们也应关注间歇浸没培养法目前存在的、亟待解决的问题,如一些物种并不适合间歇浸没培养、大规模培养中很难避免污染、培养系统造价高及一些物种进行组培的技术问题等等。特别是造价问题,使得该培养法推广缓慢,还需继续开发新的成本更低的培养系统。

### 5 展望

间歇浸没培养法对大规模组织培养的促进作用是毋庸置疑的,这种培养理念是人们不断实践和总结的成果。基于这种培养理念的培养装置在不断发展的过程中,作用原理发生了很大的变化,从机械驱动到气泵驱动,从最初较低的自动化发展到现在有精密时控装置及气动装置参与的较高水平的自动化,从结构的密闭到通过虑菌膜实现与空气的接触,在其发展历程中处处可以看到科技发展的影子。毫无疑问,在未来,间歇浸没培养系统还会凝结更多的科技化和信息化成果,各种作用因子(浸没时间、间歇时间、培养腔内的空气组分)及繁殖体的生长状况等都会受到计算机的严密监测及精密调控,实现生产效益的最大化,还会有更多的物种能通过间歇浸没培养实现其工厂化生产。另外,应该注意到其对植株生长的促进作用可以应用到基因工程及育种中,为成功转入目标基因或具有目标形状的植株的快速筛选提供服务。

### 参考文献

- 丁永前, 丁为民(2002). 组培环境CO<sub>2</sub>增施监控系统的设计与试验. 农业工程学报, 18 (1): 96-98
- 廉美兰, 朴炫春, 王颖, 赵长新, 金花(2004). 间歇浸没式生物反应器在辰星草培养苗扩繁中的作用. 园艺学报, 31: 532
- 刘丽敏, 谭裕模, 李松, 唐红琴, 刘红坚, 余坤兴, 淡明, 李翔, 戴又铭(2009). 利用间歇浸没式生物反应器进行甘蔗脱毒苗快繁研究. 西南农业学报, 22 (4): 1038-1041
- 杨柳, 秦钢, 粟靖, 杨丽涛, 罗瑞鸿, 李小泉, 林贵美, 邹瑜, 李杨瑞(2010a). 利用间歇浸没式生物反应器进行香蕉(*Musa AAA Cavendish* var. Williams B6)组培快繁研究. 果树学报, 27 (6): 1010-1013
- 杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 罗瑞鸿, 游建华, Ariel D, 魏源文, 李杨瑞(2010b). 利用间歇浸没式生物反应器进行果蔗组培快繁. 热带作物学报, 31 (4): 614-620



- 杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 吴建明, 罗瑞鸿, 魏源文, 李杨瑞(2011). 利用间歇浸没式生物反应器进行甘蔗组织快繁的研究. 华南农业大学学报, 32 (1): 37~41
- 赵望锋, 王力华(2007). 间歇浸没式生物反应器在大规模组织培养中的应用研究. 安徽农业科学, 35 (2): 317~320, 323
- Aitken-Christie J, Jones C (1987). Towards automation: radiata pine shoot hedges *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult, 8: 185~196
- Alvard D, Côte F, Teisson C (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell Tiss Org Cult, 32: 55~60
- Angela M, Mordocoo JA, Brumbley PL (2009). Development of a temporary immersion system (RITA) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp.interspecific hybrids). *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 45: 450~457
- Aragón CE, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodriguez R, Cañal MJ, Sandoval J, Roels S, Debergh P (2005). Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa* AAB) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 41: 550~554
- Aragón CE, Escalona M, Rodriguez R (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 46: 89~94
- Buddendorf JMC, Woltering EJ (1994). Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Regul, 15: 1~16
- Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C (1997). Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell Tiss Org Cult, 50: 33~37
- Chu I (1995). Economic analysis of automated micropropagation. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 19~27
- Escalant JV, Teisson C, Côte F (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 30: 181~186
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, Fundora Z, Borroto CG, Espinosa D, Arias E, Aspiolea ME (1998). New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). Pineapple News, 5: 5~7
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L.merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep, 18: 743~748
- Escalona M, Samson G, Borroto C, Desjardins Y (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 39: 651~656
- Etienne BD, Bertrand B, Vásquez N, Etienne H (1999). Direct sowing of *Coffea arabic* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell Rep, 19: 111~117
- Etienne M, Berthouly M (2002). Temporary immersion system in plant micropropagation. Plant Cell, 69: 215~231
- González-Olmedo JL, Fundora Z, Lusi A, Molina, Abdunour J, Desjardins Y, Escalona M (2005). New contributions to propagation of pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactor. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 41: 87~90
- Harris RE, Mason EB (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. Plant Sci, 63: 311~316
- Jiménez E, Pérez J, Gil V, Herrera J, García Y, Alonso E (1995). Sistema para la propagación de la caña de azúcar. In: Estrade M, Riego E, Limonta E, Tellez P, Fuente J (eds). Avances en Biotecnología Moderna. Elfos Scientiae, Cuba, 11.2
- Jova MC, Kosky RG, Pérez MB (2005). Production of yam microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tiss Org Cult, 83: 103~107
- Krueger S, Robacker C, Simonton W (1991). Culture of *Ame-lanchier*×*grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. Plant Cell Tiss Org Cult, 27: 219~226
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell, 5: 621~630
- Lorenzo JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell Tiss Org Cult, 54: 197~200
- Maes K, Debergh PC (2003). Volatiles emitted from *in vitro* grown tomato shoots during abiotic and biotic stress. Plant Cell Tiss Org Cult, 75: 73~78
- Noriega C, Söndahl MR (1993). Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactor. In: ASIC publishers (eds). 15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, France. Vevey, 73~81
- Ospina B, Segovia R, Bedoya A (2007). Micropropagation of cassava plants through the temporary immersion system and hardening of massive numbers of cassava vitroplants. Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for an Acient Crop, Bangkok
- Roels S, Escalona M, Cejas I, Noceda C, Rodriguez R, Canal MJ, Sandoval J, Debergh P (2005). Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. Plant Cell Tiss Org Cult, 82: 57~66
- Roels S, Nocedac, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R (2006). The effect of headspace renewal in a Temporary Immersion Bioreactor on plantain (*Musa* AAB) shoot proliferation and quality. Plant Cell Tiss Org Cult, 84: 155~163

- Simonton W, Robacker C, Krueger S (1991). A programmable micro-propagation apparatus using cycled medium. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 27: 211~218
- Teisson C, Alvard D (1999). *In-vitro* production of potato micro-tubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res*, 42: 499~504
- Tisserat B, Vandercook CE (1985). Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 5: 107~117
- Wardle K, Dobbs EB, Short KC (1983). *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Soc. Hortic Sci*, 108: 386~389
- Zamarripa A, Ducos JP, Tessereau H, Bollon H, Eskes AB, Petiard V (1991). Développement d'un procédé de multiplication de masse en masse du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide. In: ASIC Publishers (eds). 14th International Scientific Colloquium on Coffee, San Francisco, US. Vevey, 392~402
- Zhu LH, Li XY, Welander M (2005). Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 313~318