

不同培养条件对铁皮石斛类原球茎生物反应器培养的影响

徐步青^{1,2}, 李振中², 张俊², 王芬¹, 刘幸佳¹, 崔永一^{3*}

1. 浙江农林大学园林学院, 浙江 临安 311300

2. 浙江农林大学林学基础省级实验教学示范中心, 浙江 临安 311300

3. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300

摘要: **目的** 研究不同培养条件对铁皮石斛类原球茎在生物反应器中培养的影响。**方法** 采用接种量、通气量、蔗糖浓度、光照强度等单因素试验设计, 烘干法测定生物量, 苯酚-硫酸法测定多糖量, 数据采用 SPSS16.0 软件分析。**结果** 在生物反应器培养条件下, 利于铁皮石斛类原球茎增殖和多糖积累的培养基组分为: 1/2 MS 基本培养基添加 1.0 mg/L NAA、5%椰乳、3%蔗糖, pH 值为 6.0。接种量为 40 g/L, 采用孔径为 15 μm 的多孔喷头, 通气量用 1.0 L/min 和 0.5 L/min 交替使用以及光照强度为 2 000 lx 等培养条件有效地提高类原球茎增殖系数和多糖量。**结论** 不同的培养条件对铁皮石斛类原球茎的生长、多糖的变化有显著影响, 适宜的培养条件对铁皮石斛类原球茎的生物量和主要药用成分的生产具有重要的实践意义。

关键词: 铁皮石斛; 类原球茎; 培养条件; 生物反应器; 增殖系数; 多糖

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)05-0-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.

Effect of different culture conditions on protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* in bioreactor culture

XU Bu-qing^{1,2}, LI Zhen-zhong², ZHANG Jun², WANG Fen¹, LIU Xing-jia¹, CUI Yong-yi³

1. School of Landscape Architecture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

2. Basic Experiment Teaching Center of Forestry, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

3. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of different culture conditions on protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium candidum* in bioreactor culture. **Methods** Inoculation quantity, ventilation, sucrose concentration, and light intensity were taken to carry out the single factor experiment design. Biomass was determined by drying method, polysaccharide content by phenol-sulfuric acid method and SPSS16.0 software was used for data analysis. **Results** Under the bioreactor culture, the nutrient media components for the proliferation of PLBs of *D. candidum* and accumulation of polysaccharide were 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA, 5% coconut milk, and 3% sucrose, 6.0 pH, was benefit for the proliferation and polysaccharide accumulation of the PLBs. The culture conditions such as inoculation with 40 g/L, 15 μm pore porous nozzle, aeration volumes by 1.0 and 0.5 L/min used alternately, and photon flux of 2 000 lx could improve the proliferation coefficient and polysaccharide contents of PLBs. **Conclusion** Different culture conditions have the significant effect on the growth of PLBs and the accumulation of polysaccharide. Suitable culture conditions have the very important practical significance to the biomass of PLBs and main medicinal ingredient production of PLBs.

Key words: *Dendrobium candidum* Lindl.; protocorm-like bodies; culture condition; bioreactor; proliferation coefficient; polysaccharides

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Lindl. 为兰科石斛属多年生附生草本植物, 主要分布于西南和江南各省, 是我国传统名贵药材之一。石斛的药用部分主要是新鲜或干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热

等功效, 因其极高的药用价值, 市场前景广阔, 一直以来都倍受消费者的青睐, 但野生铁皮石斛也因此遭到过度采挖, 野生资源几近濒危。目前铁皮石斛工业原料主要以大棚种植生产出的铁皮石斛为

收稿日期: 2013-7-12

基金项目: 浙江省中青年学科带头人培养资助项目 (2272000004); 浙江省温州科技局国际合作项目 (H20080049); 浙江农林大学科技创新项目 (100122); 浙江省农业科学院国际合作专项经费资助项目

作者简介: 徐步青 (1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究与开发。E-mail: xubuqing0228@126.com

*通信作者 崔永一 E-mail: orchidcui@163.com

主, 然而传统的人工栽培生产铁皮石斛存在着移栽成活率低、栽培环境和管理技术要求高、种苗之间生长状况不一致、生产成本高、生长周期长等诸多问题。近年来经研究证明铁皮石斛类原球茎 (protocorm-like bodies, PLBs) 与铁皮石斛的药效相近^[1-2], 这几年对于铁皮石斛原球茎的研究越来越热门, 主要集中在增殖、贮藏、试管苗分化及生根壮苗等种苗培养方面^[3-5], 而对于铁皮石斛 PLBs 在生物反应器培养方面的研究甚少。生物反应器培养具有可以缩短生产周期、提高生产效率、降低生产成本、提高产量等优点, 并且这一技术也已在人参不定根^[6]、百合种球^[7]、菊花茎段^[8]、蝴蝶兰幼苗^[9]等植物材料上成功应用。本试验以铁皮石斛 PLBs 为材料, 探索影响铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的条件, 为构建铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养体系以及今后用植物生物反应器工厂化生产铁皮石斛工业原料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料经浙江农林大学楼焯教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的类原球茎。

1.2 方法

1.2.1 接种量的设置 将 PLBs 按 20、40、60、80 g/L 的接种量转入 500 mL 生物反应器中, 液体培养基为 400 mL, 培养基为 1/2 MS 基本培养基, 附加 30 g/L 蔗糖, 5% 椰乳, 1 mg/L NAA, pH 值为 6.0, 通气量为 1.0 L/min。

1.2.2 通气量的设置 将 PLBs 按 40 g/L 的接种量转入 500 mL 生物反应器, 培养基为 1/2 MS 基本培养基, 附加 30 g/L 蔗糖, 5% 椰乳, 1 mg/L NAA, pH 值为 6.0, 使用孔径 15 μm 的多孔喷头, 通气量设置为 0.5、1.0、1.5 L/min。

1.2.3 蔗糖质量分数的设置 将 PLBs 按 40 g/L 的接种量转入 500 mL 生物反应器, 培养基为 1/2 MS 基本培养基, 附加 5% 椰乳, 1 mg/L NAA, pH 值为 6.0, 使用孔径 15 μm 的多孔喷头, 通气量为 1.0 L/min, 蔗糖浓度设置为 1%、3%、5% 三个梯度。

1.2.4 光照强度的设置 将 PLBs 按 40 g/L 的接种量转入 500 mL 生物反应器, 培养基为 1/2 MS 基本培养基, 附加 30 g/L 蔗糖, 5% 椰乳, 1 mg/L NAA, pH 值为 6.0, 使用孔径 15 μm 的多孔喷头, 通气量为 0.10 L/min。光照强度设置为 0、500、1 000、2 000、3 000、4 000 lx。

以上各处理重复 3 次, 接种量、通气量和蔗糖等试验均为培养 40 d 后取样调查。调查时, 先滤去培养液, 将 PLBs 铺在滤纸上, 用滤纸吸干 PLBs 上面的水分, 在自动显示天平上称其鲜质量, 计算增殖系数; 然后, 将 PLBs 放于 105 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱内烘 20~30 min, 之后将温度调为 60~80 $^{\circ}\text{C}$ 烘至恒质量, 称得其干质量, 多糖提取采用苯酚-硫酸法^[4], 用 UV2550 紫外可见分光光度计 (上海第三分析仪器厂) 进行多糖的测定, 以多糖质量分数为纵坐标 (Y), 以峰面积为横坐标 (X) 绘制标准曲线方程: $Y=6.710\ 62\ X+0.005\ 49$, $r=0.999\ 65$ 。

1.3 数据处理

SPSS16.0 统计软件进行生物量和多糖的方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 接种量对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

在生物反应器培养中, 接种量对铁皮石斛 PLBs 生物量的增加和多糖的积累有较明显的影响。随着接种量的增加, PLBs 的鲜质量、干质量、多糖量以及增殖系数 [(培养后质量 - 接种量) / 接种量]; 都呈先升高后下降的趋势 (表 1)。当接种量为 40 g/L 时, 培养 40 d 后鲜质量、干质量、多糖量和增殖系

表 1 接种量对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

Table 1 Effect of different inoculum densities on biomass and polysaccharide of PLBs of *D. candidum* in bioreactor culture

接种量 / (g·L ⁻¹)	培养后鲜质量 / g	培养后干质量 / g	增殖系数	多糖 / %
20	35.60 ± 3.23 dD	3.87 ± 0.052 cC	4.45 ± 0.050 bB	28.72 ± 1.13 bB
40	88.96 ± 3.48 aA	9.10 ± 0.024 aA	5.56 ± 0.063 aA	34.04 ± 1.45 aA
60	84.00 ± 4.04 bB	8.26 ± 0.029 aAB	3.50 ± 0.042 cC	19.10 ± 0.86 cC
80	68.78 ± 1.74 cC	7.16 ± 0.0114 bB	2.15 ± 0.038 dD	16.87 ± 0.94 cC

小写字母表示 $P < 0.05$, 大写字母表示 $P < 0.01$, 下同

Lowercase letters indicate $P < 0.05$, uppercase letters indicates $P < 0.01$, same as below

数均为最高, 分别为 88.96 g、9.10 g、34.04%、5.56, 且与其他处理相比较存在极显著差异。由此得出, 在生物反应器培养的条件下, 接种量为 40 g/L 时最适合铁皮石斛 PLBs 的增殖和多糖的积累。

2.2 通气量对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

由表 2 可知, 当通气量为 1.0 L/min 时, 铁皮石斛 PLBs 的鲜质量、干质量和增殖系数分别为 102.56 g、11.28 g 和 5.41, 与其他处理比较有极显著差异, 并且该条件下生长的 PLBs 状态优于其他处理; 当通气量为 0.5 L/min 时, PLBs 的增殖系数较低, 这可能是由于通气量小导致液体培养基内溶氧量少, 也使得氧的传递速度变慢, 从而影响 PLBs 的增殖; 而当通气量为 1.5 L/min 时, PLBs 的增殖效果最差, 这可能是因为通气量过大会带来较大的剪切力而抑制 PLBs 的生长^[7-8]。

铁皮石斛 PLBs 多糖量随通气量的增加呈下降

趋势, 0.5、1.0 L/min 处理下的多糖量分别为 26.53%、25.12%, 两者间无显著性差异。因此, 综合考虑通气量对 PLBs 的增殖和多糖量的影响, 可用二步法^[9]对铁皮石斛 PLBs 进行培养, 先在 1.0 L/min 的条件下进行增殖培养, 然后将通气量调整为 0.5 L/min, 最大限度促进多糖的积累。

2.3 蔗糖浓度对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

由表 3 可知, 蔗糖浓度的变化, 导致铁皮石斛 PLBs 的生物量的增加也发生变化。培养 40 d 后, 在蔗糖浓度为 1% 的处理中, PLBs 的生物量增加较少, 增殖系数为 2.70。而当蔗糖浓度升高到 3% 时, PLBs 的生物量增加最明显, 鲜质量、干质量、增殖系数和多糖量分别为 100.87 g、10.09 g、5.30 和 28.86%, 与其他处理相比较, PLBs 的鲜质量、干质量、增殖系数存在着极显著差异, 多糖量存在显

表 2 通气量对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

Table 2 Effect of different aeration volumes on biomass and polysaccharide of PLBs of *D. candidum* in bioreactor culture

通气量 / (L·min ⁻¹)	培养后鲜质量 / g	培养后干质量 / g	增殖系数	多糖 / %
0.5	81.92 ± 0.69 bB	9.01 ± 0.017 bB	4.12 ± 0.039 bB	26.53 ± 1.23 aA
1.0	102.56 ± 2.83 aA	11.28 ± 0.052 aA	5.41 ± 0.059 aA	25.12 ± 1.06 aA
1.5	69.28 ± 1.87 cC	7.62 ± 0.032 cC	3.33 ± 0.042 cC	21.98 ± 1.75 bB

表 3 蔗糖浓度对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

Table 3 Effects of different concentrations of sucrose on biomass and polysaccharide of PLBs of *D. candidum* in bioreactor culture

蔗糖浓度 / %	培养后鲜质量 / g	培养后干质量 / g	增殖系数	多糖 / %
1	59.20 ± 1.63 cC	5.98 ± 0.036 cC	2.70 ± 0.019 cC	26.77 ± 1.52 bcA
3	100.87 ± 2.78 aA	10.09 ± 0.097 aA	5.30 ± 0.043 aA	28.86 ± 2.34 aA
5	83.20 ± 1.34 bB	8.49 ± 0.082 bB	4.20 ± 0.032 bB	23.53 ± 1.84 cA

著性差异。在蔗糖浓度为 5% 时, PLBs 的生物量、多糖量和增殖系数均下降, 这说明高浓度的蔗糖不利于铁皮石斛类 PLBs 的增殖和多糖的积累。因此, 在生物反应器培养条件下, 最适宜 PLBs 增殖和多糖积累的蔗糖浓度为 3%。

2.4 光照强度对 PLBs 生物反应器培养的影响

由表 4 可知, 不同的光照强度对铁皮石斛 PLBs 生物量的增加和多糖积累的影响较大。随着光照强度的增加, 生物量总体上呈递增趋势。其中, 相对弱光条件 (0~1 000 lx) 下的鲜质量、干质量和增殖系数与相对强光 (2 000~4 000 lx) 条件相比, 存在极显著差异; 在多糖量的变化中, 2 000 lx 的处理, 多糖量为 26.88%, 显著高于其他处理, 因此,

在生物反应器培养条件下, 最适宜 PLBs 增殖和多糖积累的光照强度为 2 000 lx。

而且实验中观察到 PLBs 干质量随培养时间的延长逐渐增加, 但培养 40 d 后, 干质量的增加趋势渐趋平缓; 多糖量随培养时间的延长则是先升高后下降, 培养 30 d 时多糖量达到最高值 (图 1), 说明 PLBs 生物量增加的高峰值和多糖量积累的最大值并不是同步的。可能于培养液中养分的大量消耗, 难以为 PLBs 的继续生长提供足够的营养, 从而消耗多糖等有机物促进植物体生长有关。

3 讨论

在生物反应器培养中适宜的接种量是影响培养物生物量增加的重要因素之一。接种量过少不利于

表 4 光照强度对铁皮石斛 PLBs 生物反应器培养的影响

Table 4 Effects of different photon fluxes on biomass and polysaccharide of PLBs of *D. candidum* in bioreactor culture

光照强度 / lx	培养后鲜质量 / g	培养后干质量 / g	增殖系数	多糖 / %
0	50.02±0.87 cC	5.0±0.051 dC	2.50±0.016 cC	20.29±0.97 dD
500	60.04±0.73 bB	5.8±0.062 cC	3.00±0.024 bB	24.58±1.56 bB
1 000	65.50±0.95 bB	5.9±0.085 cBC	3.28±0.031 bB	23.81±1.33 bcBC
2 000	82.70±1.61 aA	7.4±0.072 aAB	4.14±0.028 aA	26.88±0.86 aA
3 000	78.66±1.79 aA	6.6±0.059 bB	3.93±0.042 aA	23.04±1.60 cC
4 000	83.26±2.77 aA	7.5±0.091 aA	4.16±0.034 aA	24.39±1.38 bcBC

多糖量为 30 d 的取样调查数据, 其余指标均为 40 d 的取样调查数据

Polysaccharide content for 30 d sampling survey data, the other indexes for the sampling survey data of 40 d

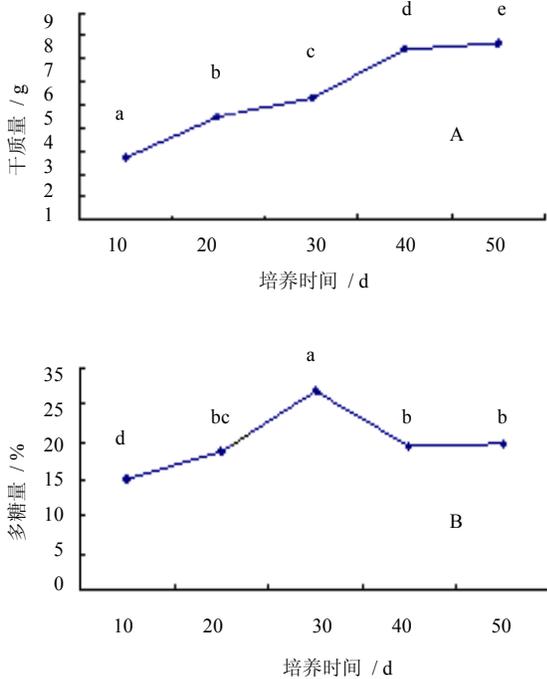


图 1 铁皮石斛 PLBs 在生物反应器培养过程中干质量 (A) 和多糖量 (B) 的变化

Fig. 1 Dry weight (A) and polysaccharide contents (B) of PLBs of *D. candidum* in bioreactor culture

培养基的有效利用, 在一定的培养时间内, PLBs 对培养基的消耗不能达到最大化, 造成培养基的部分浪费; 接种量过多, 则容易造成在短时间内将培养基中的一种或几种元素大量吸收, 导致 PLBs 的生长延缓或者抑制 PLBs 的生长, 如磷元素是霍山石斛 PLBs 增殖和多糖合成的限制因子^[6]。适宜的接种量既能最大化的利用培养基又能更好的促进 PLBs 生物量和多糖量的增加。魏明等^[10]认为 100 g/L 的接种量最有利于霍山石斛 PLBs 的悬浮培养, 宋径元对铁皮石斛 PLBs 悬浮培养研究发现, 密度

为 61.94 g/L 的 PLBs 生长势较好。而在本实验中, 40 g/L 的接种量对铁皮石斛 PLBs 的生长最有利, 可能与不同培养方式或培养材料有关。

液体培养基的流动状况对铁皮石斛 PLBs 营养吸收的影响。在气升式生物反应器中, 反应器内培养液的传质和传热主要是依靠通入大量气体来实现的, 反应器内的传质速率与通气量的大小有密切联系^[10]。通气量小, 培养基不能充分流动, 溶氧量小, 影响 PLBs 对氧气和养分的吸收与利用, 从而影响细胞生长和多糖合成^[7,11]; 反之, 通气量过大, 易引起溶氧量激增, 会带来较大的剪切力, 导致细胞损伤, 对 PLBs 的生长不利。本实验结果显示, 适合铁皮石斛 PLBs 增殖和多糖量积累的生物反应器通气量为 1.0 L/min^[8,12]。另外, 张春华等^[13]通过试验认为, 喷头也是影响生物反应器内植物体生长的重要因素, 喷头孔径大小决定了注入空气的气泡大小, 从而影响气体能否在培养液中充分扩散, 继而对植物的生长速率产生影响。本实验中, 为了避免气泡过大, 采用小孔径喷头, 有利于 PLBs 的培养。

在植物组织培养和细胞培养中, 培养物在培养过程中通常会逐渐失去叶绿素, 而需依赖外界的碳源而生长^[14]。碳源又是影响细胞生长和代谢产物产率的重要营养因子之一, 在培养过程中起着重要的作用。本试验结果表明, 较高的蔗糖浓度不利于 PLBs 的增殖, 这可能与培养基的渗透压有关, 高渗透压对培养基中其他营养物质的吸收起抑制作用, 致使细胞生理胁迫、失水, 导致细胞生长缓慢, 也影响了细胞内某些代谢功能的正常进行^[15-17]。当蔗糖浓度为 5% 时, 铁皮石斛类原球茎多糖量也降低, 这可能是因为高渗透压培养环境中, PLBs 的糖代谢受阻, 影响了多糖的积累。

光是植物组织和细胞培养中次生代谢物合成的

一个重要调控因子, 很多研究表明光影响培养材料生理生化代谢相关酶的活性和次生代谢产物的积累, 多数植物细胞在光或暗培养条件下都能正常生长, 但次生代谢物的产量却有较大区别^[12]。本试验表明: 在暗培养条件下, 由于缺少光照, 类原球茎出现黄化现象, 不利于光合作用和生物量的增加, 同时, 有可能较多的消耗 PLBs 内部的有机成分, 从而导致干物质的增加十分缓慢; 而过高的光照强度会对其产生光抑制, 减少光合产物。因此, 只有适宜的光照强度才有利于 PLBs 生长, 能够提高 PLBs 的光合速率, 从而提高 PLBs 的光能利用率和同化物的积累^[18]。

在植物种苗规模化生产中, 多用固体培养来大量繁殖种苗, 或通过中间产物来提取有效物质, 实现工业化生产, 但由于固体培养营养释放较慢, 增殖系数低, 且在具体操作方面也浪费时间和人力。据研究报道, 百合^[19]、人参不定根^[20-21]、丹参^[22]等已在生物反应器中培养获得成功。而本试验通过对铁皮石斛 PLBs (的) 固体培养、液体悬浮培养、生物反应器培养等这三种培养体系的初步研究, 表明 PLBs 的最大增殖系数分别为 3.56、4.81、5.56。从中可以得出, 生物反应器培养相对固体培养和液体悬浮培养更利于 PLBs 的增殖。说明通过植物生物反应器培养, 生产铁皮石斛 PLBs 的方法具有一定的可行性。

参考文献

[1] 高建平, 金若敏, 吴耀平, 等. 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究 [J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.

[2] 黄民权, 卢应京. 石斛愈伤组织培养物的药用前景探讨 [J]. 中药材, 1998, 21(11): 543-545.

[3] Wu C H, Murthy H N, Hahn E J, et al. Establishment of adventitious root co-culture of *Ginseng* and *Echinacea* for the production of secondary metabolites [J]. *Acta Physiol Plant*, 2008, 30: 891-896.

[4] 廉美兰, 朴炫春, 白基焯. 应用生物反应器扩繁 'Casa Blanca' 百合鳞茎 [J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 479-481.

[5] Hahn E J, Paek K Y. Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems [J]. *Plant Cell*, 2005, 81(3): 301-306.

[6] Young P S, Murthy H N, Paek K Y. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis* [J]. *Plant*

Cell, 2000, 63(1): 67-72.

[7] 魏明, 杨超英. 磷限制培养中霍山石斛 PLBs 增殖和多糖合成的动力学研究 [J]. 安徽农业大学, 2009, 37(24): 11430-11431.

[8] 黄艳, 赵德修, 李佐虎. 植物细胞生物反应器培养的研究进展 [J]. 植物学通报, 2001, 18(6): 665-671.

[9] 刘春朝, 王玉春, 康学真, 等. 利用气升式内环流生物反应器培养青蒿毛状根生产青蒿素 [J]. 植物学报, 1999, 41(2): 181-183.

[10] 魏明, 姜绍通, 罗建平. 霍山石斛类原球茎二步法培养细胞生长和多糖合成的动力学研究 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(1): 79-84.

[11] Neves J M, Teixeira H A, Simoes N. Effect of airflow rate on yields of *steinernema carpocapse* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72: 369-373.

[12] Ballica A, Ryu D. Effect of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: Production of tropane alkaloids [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 42: 1181-1189.

[13] Paek K Y, Hahn E J, Son S H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants [J]. *In Vitro Cell*, 2001, 37: 149-157.

[14] 张春华, 朴炫春, 廉美兰, 等. 生物反应器在满天星快繁中的应用 [J]. 植物学通报, 2007, 24(4): 526-531.

[15] 郭胜娟, 刘树楠, 冯玲玲, 等. 黑暗和光照对长春花培养细胞生长和生理生化特性的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(2): 136-139.

[16] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 蔗糖对铁皮石斛原球茎生长与多糖积累的影响 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3817-3819.

[17] 苏江, 岑忠用, 何铁光. 中途添加不同浓度蔗糖对铁皮石斛原球茎多糖积累的影响 [J]. 广东农业科学, 2010, 9: 65-67.

[18] 查学强, 罗建平. 霍山石斛原球茎液体培养的营养调节 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2004, 27(1): 53-57.

[19] 丑敏霞, 朱利泉, 张玉进, 等. 光照强度对石斛生长与代谢的影响 [J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 380-382.

[20] Lian M L, Chakrabarty D, Paek K Y. Growth of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture [J]. *Sci Hortic*, 2003, 97: 441-448.

[21] 由香玲, 谭啸, 贾洪柏, 等. 小型生物反应器内人参不定根的人参皂苷累积 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(8): 1700-1705.

[22] 朴炫春, 廉美兰, 王守明. 利用生物反应器大量生产人参不定根 [J]. 林业科技, 2007, 32(6): 54-56.

[23] 邱德友, 宋经元, 马小军, 等. 丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究 [J]. 分子植物育种学, 2004, 2(5): 699-703.