

· 热带植物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.20240068



主持人:徐冉,张洪亮

利用间歇浸没式生物反应器进行橡胶组培快繁研究

董礼昊^{1,2}, 陈健妙^{1,2}, 王凯旋^{1,2}, 郭佳忻^{1,2}

(1. 海南大学 南繁学院/三亚南繁研究院, 海南 三亚 572024; 2. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737)

摘要:为了寻找橡胶树组培育苗的高效途径,以‘RRIM 600’橡胶果内珠被初萌体胚为材料,通过筛选激素配比、优化接种密度和间歇频率等培养条件,探索RITA®间歇浸没式生物反应器培养橡胶果内珠被体细胞胚的适宜条件。结果表明,‘RRIM 600’果内珠被初萌体胚间歇浸没培养的最佳条件为:MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+50 g·L⁻¹蔗糖,营养液间歇浸没频率为每6 h浸没处理1 min,接种密度为每个容器15个体胚。与固体培养相比,该条件下体胚再生植株的株高、茎粗、根长、生根数和单株鲜质量分别显著增加了30%、91.7%、34.8%、53.3%和97.2%;再生植株的SOD、CAT和POD协调作用能力更强。RITA®间歇浸没培养方式是提高橡胶树初萌体胚形成再生植株效率的有效途径,可缩短橡胶树体胚再生植株形成周期及提高体胚苗生长质量。

关键词:间歇浸没式培养; RITA®; 橡胶树; 体胚萌发; 植株再生

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054 (2024) 06-0737-08

董礼昊, 陈健妙, 王凯旋, 等. 利用间歇浸没式生物反应器进行橡胶组培快繁研究 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(6): 737-744. doi:10.15886/j.cnki.rdsxb.20240068

巴西橡胶树(*Heve brasiliensis*),隶属大戟科橡胶树属,是天然橡胶的主要来源。天然橡胶是一种用途广泛的通用橡胶,也是国家重要战略资源。全球共有2 000余种能分泌类天然橡胶的植物,目前已经从500余种植物中得到多种类型的橡胶,而目前应用最为广泛的是巴西橡胶树^[1]。橡胶树是异花授粉作物,具有高度杂合性,从种子播种、大田定植、初产期历经约9~11年,旺产期维持约20~25年,故用常规育种方法培养新品种时间长,导致传统的杂交选育方法使用(如杂种优势)严重受限。然而,随着橡胶树组织培养技术和遗传工程技术的迅速进步和应用,科研人员已经能够更快速、有效地优化和修饰橡胶树的遗传特性,如植株的生长势、产胶量、木材品质、抗逆性和抗病性,以及抗割面干涸病等^[2]。目前,以橡胶树花药、内珠被为外植体,经过体细胞胚发生途径形成的植株再生体系,不仅繁殖速度快、系数高,还具备染

色体稳定及单细胞起源的特点。其发育过程展现出双极性,这在植物再生领域具有显著优势,形成的再生植株具有主根、繁育效率高且亲本优良性状遗传稳定,是生产橡胶树自根幼态无性系优质种苗(组培苗)和构建依赖组织培养技术的遗传转化体系的关键基础技术。当前,橡胶树再生植株的研发和生产中,体胚苗再生植株的培养普遍应用传统的固体培养方式,李哲等^[3]利用诱导的橡胶体胚形成再生植株过程中发现,体胚萌发成苗过程中存在培养材料新陈代谢缓慢、代谢分泌物扩散受限易局部积累等,导致橡胶植株再生频率低,随着培养周期延长,组培苗易黄化、畸变,生产成本也增加。因此,寻求适宜、优化培养方式,改善培养微环境,是提高橡胶树离体培养植株再生频率的有效途径。

间歇浸没式系统(Intermittent immersion system)是一套利用间歇浸没生物反应器(temporary

收稿日期: 2024-04-18 修回日期: 2024-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(32360399)

第一作者: 董礼昊(1998-),男,海南大学热带农林学院2021级硕士研究生。E-mail:492159023@qq.com

通信作者: 陈健妙(1974-),女,副教授。研究方向:遗传育种与生物技术。E-mail:cjm@hainanu.edu.cn

immersion bioreactors, TIBs)为培养装置,以间歇浸没式培养方式来进行植物组织培养的体系,通过调控,可使培养液间歇性地反复浸润植物培养材料,培养基的循环利用可有效防止营养沉积和有害物质的积累,从而更有效利用培养基的营养成分,确保培养材料对营养元素吸收到位、气体交换充足,可显著促进体细胞胚发生、增殖和成熟^[4],提高芽增殖和生根能力^[5],从而提高离体培养植株再生效率,且装置自动化程度相对高,能有效降低成本。目前,市场流通使用的间歇浸没式生物反应器TIBs,主要是利用气压泵产生的气压作为动力,双瓶式(The Twin Flasks system)的BIT[®]间歇浸没式生物反应器等^[6];RITA[®](Recipient for Automated Temporary Immersion)间歇浸没式生物反应器由上下2个容器构成,上部是专门用于培养的培养容器,而下部则作为营养液的储存容器。这2个容器之间通过管道紧密相连。当气压泵启动时,它产生的气压将驱使营养液从储存容器经过中心管道流入培养容器,确保培养材料能够完全浸没在培养液中,这一过程还促进了气体的流动,从而确保上下容器之间的通风透气效果达到最佳,另气体进入营养液储存器时经过孔径为0.22 μm的滤膜过滤灭菌,以防污染,且浸泡频率和时间可调整。至今,RITA[®]已经应用于多个具有药用价值的树种、经济树种、林学应用树种以及部分果蔬的大规模育苗,如Nasriet等^[7]发现,红叶李(*Prunus cerasifera Ehrh.*)在RITA[®]生物反应器中生根能力增强,组培苗移栽驯化时存活率达80%;同时,RITA[®]可提高油棕等的体胚发生效率^[8];对巨菌草(*Pennisetum giganteum*)而言,通过添加不同生长素组合对比,临时浸没生物式反应器系统比常规固体生根效率更高^[9]。许健民等^[10]的研究表明,马铃薯(*Solanum tuberosum*)组培苗在间歇式浸没培养的株高、茎粗、根数等方面均显著优于传统固体培养,董伟清等^[11]发现,当接种密度为10株·L⁻¹、浸没间歇频率为每6小时5 min,荔浦芋(*Colocasia esculenta*)组培苗株高和生根数均极显著高于固体培养。李淑雅等^[12]的研究表明,RITA[®]培养装置可促进橡胶树体细胞胚的成熟萌发。橡胶树再生体系是其离体快速繁育、基因遗传转化体系构建的基础技术,笔者从间歇浸没频率、接种密度、外源激素配比等,进一步研究间歇式生物反应系统对橡

胶材料高效快繁的可行性,旨在促进橡胶树组培苗工厂化育苗并加快基因工程育种进程。

1 材料与方法

1.1 实验材料 以中国热带农业科学院儋州橡胶树种质资源圃的‘RRIM 600’橡胶品种为材料,其橡胶果内珠被用于诱导体胚,待体胚在固体培养基上分化形成子叶形体胚,双子叶体胚诱导成熟萌发培养约30 d,选择肉眼可见约1 cm长的胚芽和胚根挑选发育形态相对一致的橡胶树体胚为材料,接种至间歇浸没培养容器 RITA[®] 中。并以间歇浸没式生物反应器 RITA[®] 为培养容器,总容量为1 L,液体培养基200 mL,通过定时开关设置浸没频率。

1.2 不同的6-BA和NAA浓度配比对RITA[®]培养的橡胶树再生植株生长的影响 以MS为基本培养基,添加不同浓度和配比的6-BA(1.0、1.5、2.0、3.0 mg·L⁻¹)和NAA(0.1、0.05 mg·L⁻¹);接种密度为每个培养容器10株;间歇浸没频率为1 min/6 h。

1.3 不同间歇浸没频率对橡胶树体胚苗生长发育的影响 间歇浸没循环和持续时间分别设置为1 min/4 h、1 min/6 h、1 min/8 h 和 1 min/12 h;培养基为以MS为基本培养基,添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA和0.1 mg·L⁻¹ NAA;接种密度为每个培养容器10株。

1.4 不同接种密度对橡胶树体胚苗生长发育的影响 接种密度分别设置为10、15、20和25个萌发体胚(体胚苗);培养基为以MS基本培养基,添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 和 0.1 mg·L⁻¹ NAA;间歇浸没循环和持续时间为1 min/6 h;

所有培养基均加入50 g·L⁻¹蔗糖,固体培养基添加2.4 g·L⁻¹凝胶,间歇浸没式培养为相同配方的液体培养基,pH5.8,温度(26 ± 2)℃,光照强度2 000 lx,光周期为12 h光照/12 h黑暗。

1.5 传统固体培养与RITA[®]培养的比较 采用培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+50 g·L⁻¹ 蔗糖,RITA[®]参数设置为间歇浸没频率1 min/6 h、接种密度为每个容器15个体胚。传统固体培养20 d继代1次,RITA[®]培养系统继代培养35 d,比较不同培养方法对体胚苗形成芽、形成根、成苗率、株高、茎粗等生理指标的影响。

1.6 不同培养方式下体胚植株再生和移栽 将具有胚芽和胚根的体胚苗,接种到植株再生培养基(MS+50 g·L⁻¹ 蔗糖+5% 椰子水+80 g·L⁻¹ 蔗糖+

2.3 g·L⁻¹ phytage)上,(26±2)℃条件下,在瓶内光照驯化培养1周,之后将长出2~3片真叶的橡胶苗移栽到提前拌好的基质中,第1次浇足水分,放在阴凉遮荫处,然后每天喷水保持基质湿润,直至长出新叶,可以确定移栽成活。20 d后统计固体培养与间歇浸没培养移栽存活率。移栽成活率=成活再生植株数/移栽再生植株总数×100%。

1.7 生长和生理指标观测 继代2次后,比较不同培养方式对株高、茎粗、叶片数、生根数和根长等指标的影响。其中,株高(cm)为用直尺量取植株基部(根茎交接处开始)至主茎顶部即主茎生长点之间的距离,茎粗(mm)用游标卡尺测定茎基部直径,叶片数以大叶柄着生1~3片小叶的均统计,生根数以肉眼可见的主根和侧根总数统计。

抗氧化酶活性测定:采用南京建成生物公司生产的试剂盒测定超氧化物歧化酶A001-3-2(SOD)活性、过氧化氢酶A0071-1(CAT)活性和过氧化物酶A084-3-1(POD)活性。

1.8 数据处理 每处理重复测定3次,实验数据采用Microsoft Excel 2019、SAS 6.2.9200软件进行数据处理及统计方差分析,用Origin 2022软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同的6-BA和NAA浓度配比对RITA®培养的橡胶树再生植株生长的影响 如表1所示,添加0.1 mg·L⁻¹或0.05 mg·L⁻¹ NAA时,随着6-BA浓度的

增加,橡胶树再生植株的株高逐渐增高,均在6-BA 3.0 mg·L⁻¹时株高最高,同一浓度的6-BA配以0.1 mg·L⁻¹或0.05 mg·L⁻¹的NAA,其处理间的株高均无显著差异;茎粗很大程度上能说明营养物质的合成与积累,在生长素NAA为0.05 mg·L⁻¹和0.1 mg·L⁻¹时,6-BA在1.0~3.0 mg·L⁻¹范围内,体胚苗的茎粗均随着6-BA浓度的增加显著减小;在同一浓度下,随着6-BA浓度的增加,生根数无明显变化,在相同6-BA浓度下,当NAA浓度为0.1 mg·L⁻¹时,体胚苗的生根数量显著多于添加0.05 mg·L⁻¹ NAA时的数量。然而,当NAA浓度保持不变时,随着6-BA浓度的增加,根的长度却逐渐缩短。从以上数据来看,进行间歇浸没培养橡胶树体胚再生植株,宜以6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹,其再生植株茎粗壮,生根数多,根长适度,虽然其株高低于3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA,但较其他2种6-BA浓度1.5、2.0 mg·L⁻¹无显著性差异,高浓度的6-BA虽然有利于株高生长,但对茎粗、生根数、根长有抑制作用,因此,宜选用低浓度的6-BA培养体胚苗。

2.2 不同间歇频率对橡胶树体胚再生植株生长的影响 从表2可知,浸润频率为1 min/4 h,萌发体胚再生植株的平均株高约8.5 cm,随着浸没频率的增加,株高明显降低;茎粗在1 min/4 h、1 min/6 h并无显著差异,但茎粗随着浸没频率减少持续显著下降;生根数呈现出先升后降趋势,以1 min/6 h的生根数最多,分别比1 min/4 h、1 min/8 h和1 min/12 h

表1 不同的6-BA和NAA浓度配比对RITA®培养的橡胶树再生植株生长的影响

Tab. 1 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on the growth of regenerated plants of rubber tree cultured in RITA®

| 激素浓度/(mg·L ⁻¹) Hormone | | 株高/cm Plant height | 茎粗/mm Stem diameter | 生根数/条 Number of roots | 根长/cm Root length |
|---------------------------------------|------|-----------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| 6-BA | NAA | | | | |
| 1.0 | 0.1 | 6.25±0.40 c | 1.96±0.13 ab | 5.87±0.62 a | 6.85±0.20 ab |
| 1.5 | 0.1 | 6.21±0.32 c | 1.68±0.08 cd | 5.97±0.20 a | 6.97±0.27 a |
| 2.0 | 0.1 | 6.84±0.25 bc | 1.56±0.16 d | 6.15±0.53 a | 6.52±0.25 bc |
| 3.0 | 0.1 | 8.06±0.28 a | 1.15±0.11 e | 5.90±0.54 a | 6.45±0.12 c |
| 1.0 | 0.05 | 6.17±0.25 c | 2.05±0.10 a | 4.60±0.91 b | 6.35±0.13 c |
| 1.5 | 0.05 | 6.62±0.24 bc | 1.85±0.12 bc | 4.62±0.82 b | 6.20±0.08 cd |
| 2.0 | 0.05 | 6.73±0.32 bc | 1.74±0.06 c | 3.92±0.47 b | 5.67±0.15 e |
| 3.0 | 0.05 | 7.58±0.31 ab | 1.23±0.11 e | 3.70±0.41 b | 5.86±0.11 de |

注:表中同一列数字不同小写字母表示差异达到显著水平($P < 0.05$),下同。

Note: Different lowercase letters in the same column of the table indicate a significant difference at $P < 0.05$, similarly hereinafter.

的增加了24.5%、64.9%和144%;同时,根长随着浸没频率的减少,而显著增长;1 min/4 h、1 min/6 h间的平均植株鲜质量差异不显著,但随着浸没频率的减少,体胚苗株高、茎粗、生根数的明显降低,植株鲜质量大幅度下降,则苗木生长细弱,根细长。综合根茎和鲜质量等生长指标,选用1 min/6 h 浸

没循环进行间歇浸没培养对橡胶树体胚苗植株发育更有利,其植株粗壮,生根数多,株高和根长适度,虽然在1 min/4 h株高生长最好,1 min/12 h根长生长最佳,但这2种频率其他多个生长数值较低,综合来看,1 min/6 h各方面表型数据都较好,苗粗壮以及根系发达,有利于提高后续移栽成活率。

表2 不同间歇频率对间歇浸没培养(RITA[®])橡胶树萌发体胚植株发育的影响

Tab. 2 Effects of different immersion frequencies on the development of germinated somatic embryos of rubber tree in intermittent immersion culture (RITA[®])

| 间歇频率 Immersion frequency | 株高/cm Plant height | 茎粗/mm Stem diameter | 生根数/条 Number of roots | 根长/cm Root length | 鲜质量/g Fresh weight increase |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 1min/4 h | 8.5 ± 0.8 a | 1.9 ± 0.2 b | 4.9 ± 0.6 b | 4.2 ± 0.9 c | 1.4 ± 0.03 a |
| 1min/6 h | 7.8 ± 0.7 b | 2.4 ± 0.1 a | 6.1 ± 0.3 a | 6.3 ± 0.5 b | 1.5 ± 0.03 a |
| 1min/8 h | 5.4 ± 0.9 c | 1.7 ± 0.1 b | 3.7 ± 0.5 c | 6.2 ± 0.4 b | 1.0 ± 0.07 b |
| 1min/12 h | 3.6 ± 0.6 d | 1.3 ± 0.1 c | 2.5 ± 0.5 d | 7.8 ± 0.4 a | 0.6 ± 0.04 c |

2.3 不同接种密度对 RITA[®] 系统中橡胶体胚再生植株生长的影响 合理控制培养容器内接种密度,可避免密度过高对育苗产生不利影响。从表3可知,在间歇浸没培养(RITA[®])条件下,随着接种体胚个数的增加,橡胶体胚再生植株的株高呈逐渐下降趋势,接种体胚15个的株高与10个的无明显差别,但随着接种体胚数增加至20、25个时,株高比每瓶15株的分别显著降低了28.2%、47.4%;茎粗变化趋势与株高一样,但降低的程度更明显;与前两者不同,体胚再生植株的生根数在不同接种密度间并无明显变化,而根长

则随着接种胚数的增加呈现明显增长后显著降低趋势,以15、20个体胚接种时,均比10个接种时的根长显著增加,但两者间的根长无明显差别,接种25个体胚时有所减小但依然比10个体胚时的显著增长。体胚再生植株的鲜重随着接种体胚个数的增加,也呈现先增后降趋势,与接种10个体胚的鲜质量相比,15、20个接种的分别显著增加了11.1%和9.0%,后两者间无显著差异。综合各指标,以RITA[®]条件培养时,接种15~20个体胚时,再生植株生长旺盛,尤其以15个体胚的植株最强壮。

表3 不同接种密度对间歇浸没培养(RITA[®])橡胶树体胚植株发育的影响

Tab. 3 Effects of different inoculation densities on the development of somatic embryo plants of rubber tree in intermittent submerged culture (RITA[®])

| 每瓶接种密度/个 Inoculum density (somatic embryos) | 株高/cm Plant height | 茎粗/mm Stem diameter | 生根数/条 Number of roots | 根长/cm Root length | 鲜质量/g Fresh weight increase |
|---|-----------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 10 | 6.6 ± 0.85 ab | 2.0 ± 0.13 a | 5.6 ± 0.58 a | 3.0 ± 0.38 c | 1.34 b |
| 15 | 7.8 ± 0.46 a | 1.8 ± 0.14 a | 5.3 ± 0.15 a | 6.1 ± 0.68 a | 1.49 a |
| 20 | 5.6 ± 0.94 bc | 1.0 ± 0.12 b | 4.8 ± 0.66 a | 6.7 ± 0.41 a | 1.46 a |
| 25 | 4.1 ± 0.47 c | 0.5 ± 0.16 c | 4.5 ± 0.76 a | 4.7 ± 0.79 b | 1.27 b |

2.4 固体培养与 RITA[®] 比较对体胚形成再生植株的影响 如表4和图1所示,图1-C与图1-D是2种方式培养35 d后的生长情况。2种培养方式下,体胚器官分化程度与体胚苗形成再生植株的效率均有明显区别。与固体培养的体胚相比,间歇浸没培养条件下,体胚胚芽和胚根萌发效率显著提高,植株长势

较好,发育形成再生植株的成苗率显著增加1.76倍。如表5所示,RITA[®]系统培养下的株高、根长、茎粗、生根数等均高于固体培养,差异达到显著水平($P < 0.05$),间歇浸没式培养(RITA[®])的体胚苗再生植株的株高、茎粗、根长、生根数和单株鲜质量分别显著增加了30%、91.7%、34.8%、53.3%和97.2%。

表4 固体培养与间歇浸没培养(RITA[®])对体胚形成再生植株的影响Tab. 4 Effects of solid culture and intermittent immersion culture (RITA[®]) on plant regeneration from somatic embryos

| 培养方式 Culture system | 成芽率/% Shoots/% | 成根率/% Roots/% | 平均每株叶数/片 Leaf number/plantlet | 成苗率/% Rooted plants /% |
|--|-------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 固体培养 Solid medium | 26.0 ± 0.3 b | 51.2 ± 3.1 b | 1.2 ± 0.1 b | 21.3 ± 2.5 b |
| 间歇浸没式(RITA [®]) Temporary immersion systems(RITA [®]) | 63.2 ± 0.2 a | 72.3 ± 0.02 a | 2.1 ± 0.4 a | 58.8 ± 4.6 a |

图1 固体培养与间歇浸没培养(RITA[®])下的橡胶树体胚再生植株生长情况

A. 萌发体胚；B. 固体培养起始体胚；C. 固体培养35 d的橡胶树体胚生长情况；D. RITA[®]间歇浸没培养起始体胚；E. 间歇浸没培养35 d的橡胶树体胚生长情况。

Fig. 1 Growth of somatic embryo regenerated plants of rubber tree under solid culture and intermittent immersion culture (RITA[®])

A. Germinated somatic embryos; B. Solid culture initial somatic embryo; C. Growth of somatic embryos of rubber tree cultured in solid medium for 35 days; D. RITA[®] intermittent immersion culture initial somatic embryos; E. The growth of somatic embryos of rubber tree after 35 days of intermittent immersion culture.

表5 固体培养与间歇浸没培养(RITA[®])对体胚再生植株生长的影响Tab. 5 Effects of solid culture and intermittent immersion culture (RITA[®]) on plant regeneration from somatic embryos

| 培养方式 Culture system | 株高/cm Plant height | 茎粗/mm Stem diameter | 根长/cm Root length | 生根数/条 Root number | 单株鲜质量/g Fresh weight/plant |
|---|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|
| 固体培养 Solid medium | 4.0 ± 0.3 b | 1.2 ± 0.01 b | 4.3 ± 0.5 b | 3.0 ± 0.5 b | 0.72 ± 0.07 b |
| 间歇浸没(RITA [®]) Temporary immersion(RITA [®]) | 5.2 ± 0.2 a | 2.3 ± 0.02 a | 5.8 ± 0.6 a | 4.6 ± 0.6 a | 1.42 ± 0.04 a |

2.5 不同培养方式下橡胶体胚再生植株中的抗氧化酶活性比较 植物体内的抗氧化酶具有可将体内过多的活性氧和自由基转化为毒害较低或无害的物质的功效,平衡机体内的活性氧含量,其值升高可表明植物受到外界环境一定程度的胁迫,通常SOD、POD、CAT三者协同作用组成一个完整的防氧化体系。如图2所示,体胚萌发培养过程中,同一时间,与固体培养的体胚再生植株叶片中的SOD、CAT酶活性相比,间歇浸没培养(RITA[®])的分别显著增加48.8%和10.9%,而POD活性则明显减小73.8%。

2.6 体细胞胚发生途径植株再生及移栽成活率 如图3所示,通过不同培养方式将体细胞胚通过成熟诱导后,形成胚芽和胚根。可以发现,固体

培养下的橡胶体胚苗胚根生长较短,只有2~3条侧根,而间歇浸没培养下的体胚苗主根长且粗壮,侧根明显更多。从而可知,间歇浸没培养对比固体培养效果好,其体胚苗萌发速度更快,长势更好。将带有胚芽胚根的体胚苗接种到植株再生培养基中,胚芽逐渐萌发变大,胚根生长为主根,直至长成健壮完整的橡胶再生植株。将所获得的再生植株移栽至基质中,20 d后大部分移栽成活。从表6可知,间歇浸没式培养下的体胚苗移栽存活率明显高于常规固体培养达92.5%,对比固体培养有显著性差异,说明使用RITA[®]间歇浸没系统,可以有效减少体胚苗萌发及生根时间,同时增加再生植株的移栽存活率。

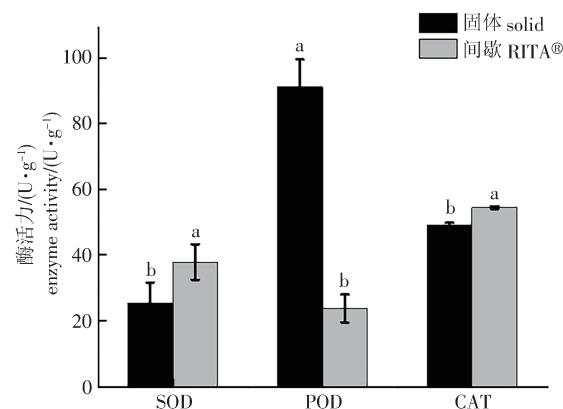


图2 固体培养与间歇浸没(RITA[®])培养的橡胶体胚再生植株中的SOD、POD、CAT酶活性比较

各指标于体胚萌发培养第45天时统计；同一指标柱间不同的小写字母a和b表示差异达到显著水平($P < 0.05$)。

Fig. 2 Comparison of SOD, POD and CAT activities in regenerated plants of rubber somatic embryos cultured in solid medium and intermittent immersion (RITA[®])

Each index was counted at the 45th day of somatic embryo germination culture; different lowercase letters a and b between the same index columns indicate that the difference is significant at $P < 0.05$.

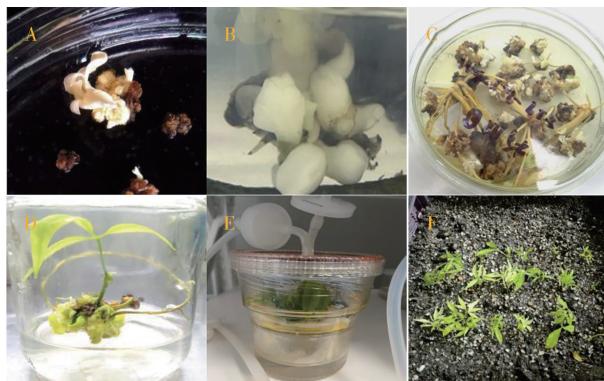


图3 固体培养和间歇浸没式培养下体胚萌发和植株再生
A. 体胚分化；B.C. 体胚成熟萌发；D. 固体培养形成再生植株；E. 间歇浸没培养形成再生植株；F. 再生植株移栽。

Fig. 3 Somatic embryo germination and plant regeneration under solid culture and intermittent immersion culture

A. Somatic embryo differentiation; B. C. Somatic embryo maturation and germination; D. Solid culture to form regenerated plants; E. Intermittent immersion culture to form regenerated plants; F. Regenerated plants.

3 讨 论

当前，橡胶树离体再生植株形成的主要方式也是体胚发生形式^[13]。尽管部分橡胶树品种已建立植株再生体系，但总体上橡胶树植株再生率低

表6 不同培养方式下的再生植株移栽成活率

Tab. 6 Transplanting survival rate of regenerated plants under different culture methods

| 培养方式 Culture method | 体胚成苗率/% Root plus epicotyl emergence | 移栽成活率/% Survival rate of transplanting |
|--|---|---|
| 固体培养 Solid medium | 21.3 ± 2.5 b | 79.6 ± 5.2 b |
| 间歇浸没(RITA [®]) Temporary immersion (RITA [®]) | 58.8 ± 4.6 a | 92.5 ± 3.6 a |

(约20%~40%)，是当前制约橡胶树组培苗工厂化生产、利用遗传转化体系进行功能基因研究和利用基因工程技术改良品质等的主要限制因素^[14]。植物体细胞胚的则是从成熟子叶形幼胚凹陷处基部分化出胚芽、幼胚基部分化形成胚根开始^[15]，橡胶树体胚在前期诱导分化率很高(通常可大于50%)，但大多数体胚无法经过一个完整的成熟培养阶段，未能生成完整植株，幼胚萌发困难或不能萌发，甚至坏死等问题，成为影响后阶段体胚发育形成再生植株的关键因素^[16]。

在体胚成熟萌发和体胚苗植株形态发生过程中，温度、光照、湿度和通气等各种物理环境条件，pH、植物生长调节剂等组成的培养基、渗透压等化学环境条件以及外植物种类和性质、体胚成熟培养适宜的发育时期等生物条件^[17-18]，都是影响体胚苗生长和发育重要的因素。RITA[®]生物反应器在培养过程中，可通过修改浸润频率和持续时间等参数来控制植物形态变化，如RITA[®]间歇浸没培养，改进了软木橡树体细胞胚性培养增殖、体胚发生效率等^[19]，成功缩短了体胚发生培养的成苗周期。

生长素和细胞分裂素是启动细胞分裂、脱分化和再分化的关键性激素，两者还有协同作用，其比例会影响植物细胞的发育方向，当细胞分裂素高于植物生长素时，促进茎的分化、生长，如桑树组培快繁中，6-BA在茎尖发育和茎叶伸长方面有很好的效果，NAA对根系的生长起到重要作用，当高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素结合使用时，能够有效促进再生植株发育^[20]；本试验中，则以6-BA 1.0 mg·L⁻¹配以NAA 0.1 mg·L⁻¹配比时，橡胶树体胚萌发发育形成再生植株的茎粗壮、生根数多、株高和根长适度，再生植株抗逆性显著增强。在RITA[®]系统中，可通过修改浸润频率和持续

时间来控制培养物细胞形态变化过程,相比于其他的浸没频率,1 min/6 h 浸没循环培养,橡胶树体胚苗的茎最粗壮,生根数最多,株高和根长适度,选用1 min/4 h时,株高虽然最高,但苗相对细弱,生根数也明显减少,可能是因为浸润频繁,培养物表面营养富集、残留多或培养器内湿度大,一定程度上造成苗木徒长、侧根和毛根生长受抑制。

另接种密度可影响 RITA® 培养室中养分和氧气的供给,也是调节植物生长的重要调控参数,如慈姑组培苗因接种数量过多,造成空间不足、相互挤压而严重影响植株正常生长发育,以10个组培芽接种时则生长最好^[21],本研究中,则以15~20个橡胶树体胚接种,体胚苗生长量大,植株根系伸长、生长加快,尤其以15个体胚接种更合适,体胚苗植株健壮,生根旺盛,提高苗木抗逆能力,后续将更能适应外部环境^[22];而通过对比固体与间歇浸没移栽存活率可以发现间歇浸没培养的体胚成苗率与移栽存活率均显著高于固体培养,由此可见,在间歇浸没培养的橡胶苗拥有更强壮的根系,对外部环境适应力更强。

抗氧化酶系统的SOD、POD、CAT等可将植物体内过多的活性氧(ROS)和自由基转化为毒害较低或无害的物质,使机体内ROS动态平衡^[23~24]。本研究中,在体胚接种后35 d时,相对于固体培养的再生植株,间歇浸没培养 RITA® 植株体内的SOD、CAT能维持更高的活性,抗氧化平衡能力更强,相反,POD活性则显著低于固体培养植株体内的。POD可作为组织老化的一种生理指标,在早衰减产的水稻根系中、干旱胁迫下的人参属植物中的POD活性均显著增加,促进了内源IAA和叶绿素的分解,抑制组培苗的生长发育^[25],结合橡胶体胚在固体和间歇浸没培养中根的生长形态和细胞活性的对比,间接表明在同样的培养基、光照和温度等条件下,在橡胶树体胚再生植株生长发育培养中,以间歇浸没式培养 RITA®,通过合理的外源植物生长调节剂配比、间歇浸没频率和接种密度等,能一定程度上减缓培养过程中可能遭受起的氧化胁迫、组织老化等,提高体胚形成再植株的效率。后续可进一步优化浸没时间、等参数,以建立稳定、高效的橡胶树体胚植株再生间歇浸没培养体系 RITA®。

相比固体培养方式,使用 RITA® 生物反应器进行间歇浸没培养有利于体细胞成熟萌发和再生植

株生长。以1 min/6 h 浸没循环、1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹NAA组合配比,加快体胚成熟萌发,接种密度以15个体胚/容器时,再生植株生长最强壮。其中,抗氧化酶系统维护稳定是间歇浸没式培养显著提高体胚植株再生效率和移栽成活率的主要影响因子之一;集成的内珠被体胚植株再生体系可为基因遗传转化提供高效再生的受体系统和橡胶树离体快繁提供技术方法。可进一步优化 RITA® 生物反应器培养参数,集成橡胶树体胚植株再生更为高效、稳定的技术方法。

参考文献:

- [1] 谭德冠,孙雪飘,张家明.巴西橡胶树的组织培养[J].植物生理学通讯,2005(5): 125~129.
- [2] 高新生,黄华孙,张晓飞,等.5个自主培育橡胶树无性系适应性初探[J].热带作物学报,2012,33(11): 1921~1925.
- [3] 李哲,孙爱花,黄天带,等.橡胶树品种热研88-13易碎胚性愈伤组织的诱导及其植株再生[J].热带作物学报,2010,31(12):2166~2173.
- [4] RAMÍREZ-MOSQUEDA M A, RODRÍGUEZ-DEMÉNECHI M V, MEDORIO-GARCÍA H P, et al. Large-scale micro-propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* jacks.) in a temporary immersion bioreactor (TIB) [J]. Methods in Molecular Biology, 2024, 2759: 45~52.
- [5] 杨柳,秦钢,杨丽涛,等.利用间歇浸没式生物反应器进行甘蔗组培快繁的研究[J].华南农业大学学报,2011,32(3): 37~41.
- [6] 张杰,张本厚,贾明良,等.利用间歇浸没植物生物反应器进行半夏组培快繁的研究[J].科技通报,2018,34(1): 95~100.
- [7] NASRI A, BAKLOUTI E, BEN ROMDHANE A, et al. Large-scale propagation of Myrobalan (*Prunus cerasifera*) in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 245: 144~153.
- [8] GOMES H T, BARTOS P M C, BALZON T A, et al. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors [J]. Industrial Crops and Products, 2016, 89: 244~249.
- [9] POŻOGA M, OLEWNICKI D, WÓJCIK-GRONT E, et al. An efficient method of *Pennisetum×advena*'rubrum' plantlets production using the temporary immersion bioreactor systems and agar cultures [J]. Plants, 2023, 12(7): 1534.
- [10] 许建民,王永平,王宇.马铃薯组培苗液体间歇浸没培养初探[J].江苏农业科学,2013,41(1): 53~55.
- [11] 董伟清,何芳练,江文,等.基于间歇浸没式生物反应器的荔浦芋组培快繁体系优化[J].南方农业学报,2018,49(6): 1164~1170.
- [12] 李淑雅,陈健妙,张骐飞,等.三种培养方式对橡胶树

- 花药胚性悬浮细胞团再生体系构建的影响[J].植物生理学报, 2022, 58(7): 1236–1244.
- [13] 李明, 王树香, 冯大领. 植物体细胞胚发生及发育研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(3): 237–241.
- [14] 栾林莉, 宋玉凤, 侯辛辛, 等. 巴西橡胶树体胚胚性愈伤组织悬浮系的建立和植株再生[J]. 分子植物育种, 2019, 17(8): 2614–2621.
- [15] 李辉亮, 郭冬, 彭世清. 巴西橡胶树体细胞胚发生过程中DNA甲基化分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(5): 527–533.
- [16] 周广振, 栾林莉, 张盛敏, 等. 橡胶树胚性愈伤组织对添加外源抗氧化剂低温冷藏的响应[J]. 分子植物育种, 2018(8): 2677–2685.
- [17] 秦公伟, 曹小勇, 徐皓, 等. 西洋参体细胞胚成熟萌发研究[J]. 北方园艺, 2015(24): 84–87.
- [18] 吴丽芳, 魏晓梅, 陆伟东. 白刺花胚性愈伤组织诱导和植株再生体系建立 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(2): 218–224.
- [19] PÉREZ M, BUENO M A, ESCALONA M, et al. Temporary immersion systems (RITA[®]) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production [J]. Trees, 2013, 27(5): 1277–1284.
- [20] 李瑞雪, 汪泰初, 胡飞, 等. 6-BA、IBA、NAA对桑组培苗继代增殖的影响[J]. 农学学报, 2012, 2(11): 37–39.
- [21] 高美萍, 林志城, 张驰, 等. 利用间歇浸没式生物反应器进行慈姑组培快繁研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29(11): 2704–2708.
- [22] 许亚良, 张家明. 一种高效大规模组培方法——间歇浸没培养法[J]. 植物生理学报, 2013, 49(4): 392–399.
- [23] 杨舒贻, 陈晓阳, 惠文凯, 等. 逆境胁迫下植物抗氧化酶系统响应研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2016, 45(5): 481–489.
- [24] 廖振锋, 刘寒, 沈瑗瑗等. 逆境胁迫下药用植物抗氧化酶系统响应研究进展[J/OL]. 分子植物育种, (2021-06-13) [2024-04-10]<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230613.1233.006.html>.
- [25] 左应梅, 杨维泽, 杨天梅, 等. 干旱胁迫下4种人参属植物抗性生理指标的比较[J]. 作物杂志, 2016(3): 84–88.

Rapid propagation of rubber tree by using intermittent immersion Bioreactor

DONG Lihao^{1,2}, CHEN Jianmiao^{1,2}, WANG Kaixuan^{1,2}, GUO Jiaxin^{1,2}

(1. School of Breeding and Multiplication /Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572024; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: The integument somatic embryos of rubber tree of clone RRIM 600 were cultured in an intermittent immersion bioreactor RITA[®], and the suitable conditions for somatic embryo culture of rubber tree were established. The types of hormones were screened and the culture conditions were optimized. The experimental results showed that the best condition for intermittent immersion culture of RRIM 600 rubber integument primordium-derived somatic embryos were: MS + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA + 50 g·L⁻¹ sucrose as the medium, with the intermittent immersion frequency of nutrient solution being 1 min/6 h, and the inoculation density being 15 individual embryos / container. Compared with solid culture, the intermittent immersion culture under this condition increased significantly the plant height, stem diameter, root length, root number and fresh weight per plant of somatic embryo regeneration plants by 30%, 91.7%, 34.8%, 53.3% and 97.2%, respectively. The coordination ability of SOD, CAT and POD in regenerated plants was higher under this condition, which was an effective way to improve the efficiency of regeneration plant formation from primary somatic embryos of rubber tree. All these results showed that the use of intermittent immersion culture method RITA[®] could shorten the formation cycle of somatic embryo regeneration plants and improve the growth quality of somatic embryo plants of rubber tree.

Keywords: intermittent immersion culture; RITA[®]; rubber tree; somatic embryo germination; plant regeneration

(责任编辑:潘学峰)