

·综述·

橡胶树内珠被培养研究进展

黄天带, 孙爱花, 周权男, 戴雪梅, 黄华孙*

(中国热带农业科学院橡胶研究所 国家橡胶树育种中心 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室,
中国海南 儋州 571737)

摘要: 橡胶树自根幼态无性系是20世纪70年代末培育的新型种植材料,集中了实生苗和芽接苗的优点,具有生长快、产量高、茎干圆锥度大的特点,极有可能取代芽接苗成为第3代种植材料。内珠被培养是获得自根幼态无性系的重要手段,可经初级体胚发生或持续体胚发生再生植株。初级体胚/微繁植株长势好、产量高,但再生频率低;持续体胚发生再生频率高,但体胚/微繁植株变异、感病、产量低。利用持续体胚发生体系进行了超低温保存和遗传转化研究,均取得了成功。

关键词: 橡胶树; 内珠被; 直接体胚发生; 持续体胚发生

中图分类号: S794.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)02-0176-08

Advances in Study on Inner Integument Culture of *Hevea brasiliensis*

HUANG Tian-dai, SUN Ai-hua, ZHOU Quan-nan, DAI Xue-mei,
HUANG Hua-sun*

(State Center for Rubber Breeding/Ministry of Agriculture Key Laboratory of Tropical Crops Physiology /Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Rubber Research Institute, Danzhou 571737, Hainan, China)

Abstract: Self-rooting juvenile clone in *Hevea brasiliensis* was a new kind of planting material which was established in the late 1970s, combined the merits of seedlings and budded clones, and had a characteristic of fast-growing, high yield, large conical angle, was very likely to replace the budded clones as the third generation of planting material. Inner integument culture was the important approach to obtain self-rooting juvenile clone, regenerating plants by primary somatic embryogenesis and maintained somatic embryogenesis. Plants regenerated by primary embryos or microcutting grew more vigorously, produced higher rubber yield than the control, but showing low regeneration frequency; maintained somatic embryogenesis had high regeneration frequency, but regenerated/microcutting plants were abnormal, showing that they have poorer performance in growth, yield and disease resistance than the mature budded control. Researches on using maintained somatic embryogenesis on cryopreservation and genetic transformation was succeeded.

Key words: *Hevea brasiliensis*; inner integument; primary somatic embryogenesis; maintained somatic embryogenesis

(*Life Science Research*, 2011, 15(2): 176~183)

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)是多年生的异花授粉高大乔木,在植物分类学上属橡胶树属大戟科,具有特殊的乳管结构,其所分

泌的天然橡胶是热带地区的主要经济来源之一。生产上最早使用的橡胶树种植材料是实生苗,实生苗来自自由授粉的种子,具有生长快、经济寿

收稿日期: 2011-01-14; 修回日期: 2011-03-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960322); 现代农业产业技术体系建设专项(NYCYTX-34); 海南省自然科学基金资助项目(807043)

作者简介: 黄天带(1976-),女,广西柳州人,助理研究员,博士,主要从事橡胶树组织培养及遗传转化方面的研究; *通讯作者: 黄华孙(1963-),男,广东高州人,中国热带农业科学院橡胶研究所研究员,主要从事橡胶树种质资源的保存、鉴定及创新研究, Tel: 0898-23306585, E-mail: xjshhs@163.com.

命长、抗逆性强的优点,但存在株间差异大、平均产量低、不能保持母本优良性状的缺点。目前普遍使用的种植材料是芽接苗,是继实生苗后的第2代种植材料。芽接苗减少了株间产量差异,大幅度提高了产量,但也有生长慢、抗逆性差、经济寿命短的不足之处^[1],而且产量常常受到未加选择的砧木影响。自根幼态无性系是20世纪70年代末培育的新型种植材料,极有可能取代芽接苗成为第3代种植材料。自根幼态无性系集中了实生苗和芽接苗的优点,具有生长快、产量高、茎干圆锥度大的特点,花药植株产量较供体老态无性系增加了25.8%~42.6%^[2],内珠被初级体胚植株较芽接树产量提高了37%~41%^[3],而且克服了芽接苗中砧木的影响。目前获得自根幼态无性系主要依靠3种再生体系:通过花药或内珠被培养经初级体胚发生再生植株^[4,5],通过花药或内珠被经持续体胚发生再生植株^[6,7],通过次生体胚发生再生植株^[8]。

橡胶树的珠被由内外两层组成,外珠被发育成薄膜状外种皮,内珠被外表皮细胞发育成坚硬的“种壳”,外表皮以内的薄壁组织最后死亡解体,呈海绵状附在种壳内面^[9]。1980年,Carron尝试对内珠被进行离体培养^[10],1985年诱导出紧致愈伤组织,经体胚发生途径再生植株,紧致愈伤组织不能长期继代^[5],这一途径后来称为“初级体胚发生途径”;1993年,Montoro等从内珠被诱导出易碎胚性愈伤组织,该类愈伤组织可以长期继代增殖并保持胚性,长期继代的胚性愈伤组织可经体胚发生途径再生植株^[7],这一途径称为“持续体胚发生途径”。到目前为止,法国已将内珠被植株种植到法国象牙海岸、尼日利亚和泰国3个国家,布置约 $6.5 \times 105 \text{ m}^2$ 的田间实验^[3]。随后,CIRAD利用易碎胚性愈伤组织进行超低温保存和遗传转化研究并取得了一定进展。

1 初级体胚发生途径

1982年,Carron和Enjalric证实巴西橡胶树的一种新的外植体:幼果内珠被与花药一样具有体胚发生能力,且与花药壁一样均来自体细胞,拥有与母树相同的基因型^[11]。1985年,Carron和Enjalric从内珠被愈伤组织分化的几千个体胚获得了几十株再生植株^[5]。整个再生过程包括取材和消毒、愈伤组织诱导、体胚诱导及成熟、胚状体萌发与植株再生。影响再生频率的主要因素包括

基因型、固化剂、激素、碳源和培养条件等。

1.1 再生过程

1.1.1 取材和消毒

橡胶树春花、夏花、秋花授粉45~75d的幼果均可作为内珠被培养的外植体。此时的果壳幼嫩,种皮未硬化,种子外观为乳白色。Carron等用的消毒程序为次氯酸钠(24°氯)20min,然后在酒精中浸一下^[12]。本实验室采用的消毒程序为75%酒精浸泡1min,再以0.1%升汞浸10min,最后用无菌水清洗4~5遍。消毒后在超净条件下将果皮切开,取出种子,切除外珠被和内珠被外表皮,将包含珠心的内珠被切成片状接种到愈伤诱导培养基。种子外面有厚厚的果皮包被,是天然的无菌材料,因此内珠被接种污染率很低。即使在白粉病严重的季节,花药污染率达到30%以上,内珠被污染率仍能控制在10%以内。

1.1.2 愈伤组织诱导(0~20d)

内珠被接种到诱导愈伤组织的培养基上,20d左右在外植体上产生黄色颗粒状愈伤组织^[13]。主要是内珠被内面靠近珠心和维管周细胞的部位增殖,因此尽量将外植体切成一边带珠心边缘的 $5 \times 3 \times 0.5 \text{ mm}$ 大小^[14]。硝酸银有助于减轻外植体褐化。通常经过5~10d的延迟期,细胞开始分裂。快速预处理5min使外植体稍干燥可有效缩短延迟期,促进体胚发生,减少褐化^[14]。将外植体置于浸泡了液体培养基的sorbarod cellulose blocks(以下简称sorbarod)形成愈伤组织较琼脂及凝胶凝固的培养基早,而琼脂凝固的培养基褐化率最高,凝胶凝固的培养基褐化率最低^[15]。Carron等研究了PB260、PR107、RRIM600、PB2354个品种的再生频率,其中愈伤诱导率在87%~99%之间。愈伤诱导率最高为PB235,最低为PR107^[16]。中国热带农业科学院橡胶研究所研究了国内品种热研7-33-97和热研88-13的内珠被再生体系,愈伤组织诱导率分别为84.9%、95.4%。15d开始看到原胚细胞形成^[14]。

1.1.3 胚胎发生表达(20~40d)

将愈伤组织转入胚性表达培养基,愈伤进一步发育,胚性愈伤诱导率在36%~51%之间。此阶段是整个再生过程最重要的,许多详细深入的研究在此阶段开展。基因型差异显著,胚性愈伤诱导率最高为PB260,最低为RRIM600^[16]。橡胶树内珠被体胚发生方式有两种,一种是单细胞起源,起源于分离的胚性细胞团,部分胚性细胞再

分裂形成小的球形原胚；另一种是多细胞起源，起源于愈伤表面突起，这些突起持续分裂，形成球形原胚。此时的球形原胚未累积淀粉和蛋白质，呈半透明状。特定基因型在特定培养条件下遵从特定的体胚发生方式。若最后的子叶形胚状体为多细胞起源，则单细胞起源的胚状体发育为球形原胚后降解。PB260、PB235 为多细胞起源，RRIM600、PR107 为单细胞起源^[14, 17]。25 d 愈伤状态最理想，如果不及时继代或继代到不适宜的培养基，薄壁细胞累积多酚，分生活性下降，原胚细胞降解，愈伤褐化^[13]。琼脂、凝胶和 sorbarod 愈伤诱导率相当，凝胶胚性愈伤诱导率最高(13.5%)，其次琼脂(11.7%)，sorbarod 最低(0.42%)，因此凝胶是较理想的培养基固化剂^[15]。在愈伤组织诱导阶段将 3, 4-D 和 6-BA 浓度由 9 $\mu\text{mol/L}$ 降至 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 更有利于胚状体诱导，研究表明此激素水平在 40~70 d 均能保持较高水平的腐胺、亚精胺及精胺，低水平的过氧化酶活性；而对照(9 $\mu\text{mol/L}$)早期检测到瞬时的高水平多胺产生，但同期也产生高的过氧化酶活性，导致愈伤褐化，体胚发生能力下降^[18, 19]。愈伤的相对含水量保持在 93%~95%，水势保持在 -0.9MPa 对于诱导体胚发生十分重要^[14, 20]。Etienne 等提取了这个阶段内珠被愈伤组织的内源 IAA 和 ABA，研究表明只有外源 ABA、内源 IAA 能维持胚性表达，内源 ABA 浓度过高反而抑制胚胎发生^[21]。继代的时间也很重要，在 MH1 培养基培养 20~30 d 必须继代一次，否则 20 d 左右产生的胚性细胞会降解，而频繁更换 MH1 或在 MH1 培养的累积时间少于 40 d 就转入 MH3 均无法形成胚性细胞^[13]。条件培养基（内珠被胚性悬浮系在含 19 $\mu\text{mol/L}$ A-BA 培养基培养 40 d 后的上清）加入 MH1 固体培养基可将胚性愈伤诱导能力从 4% 提高到 80%^[22]。供体树的年龄及繁殖方式影响胚性愈伤诱导率，7 年体胚植株 > 7 年芽接树 > 17 年芽接树^[23]。

1.1.4 原胚发育(41~70 d)

将胚性愈伤转入改良的 MH1 培养基，去掉硝酸银，愈伤组织基本停止生长，开始褐化、死亡。组织学研究表明，体胚在这个阶段进一步分化，表皮形成，出现维管束，形成乳管系统，皮层区开始累积淀粉，使得胚状体外观由半透明变为乳白色，子叶、根原基开始形成，发育为根冠的部位贮藏大量淀粉，胚状体的液泡开始积累贮藏蛋白^[17]。部分已形成的球形原胚重新愈伤化从而消

失^[16]。肉眼可看到形状各异的胚状体，但是大部分为畸形胚，缺乏茎尖分生组织，部分具有 2 或 3 个乳管系统，部分多子叶或无子叶球形，无法正常萌发，只能形成根^[17]。平均每块胚性愈伤组织有 1.2~4.1 个胚状体。最多为 PB260，最低为 RRIM600。胚状体诱导率在 43%~209% 之间，品种间差异显著，最高为 PB260，最低为 RRIM600^[16]。在 0~20 d 的愈伤组织诱导阶段通过使用透气的试管或添加 KMnO_4 、AOA(氨基氧乙酸)、 AgNO_3 消除乙烯的影响^[24]，在 20~40 d 添加多胺至 MH1 培养基可提高双极胚的比例^[25]。Carron 等研究了 RRIM 600、RRIM 712、RRIM 703、RRIM 729、IRCA 18、IRCA 130、IRCA 109、RRIC 100、PB 254、PB 217、PB 280、PB 255、PB 310、PB 330、PB 260、PR 107、AVROS 2037、GT 1 等 18 个基因型体胚分化能力的差异及易碎胚性愈伤组织诱导能力的差异，其中 RRIM 600、IRCA 18、IRCA 109、RRIC 100、PB 254、PB 217、PB 280、PB 310、PB 330、PB 260、PR 107、GT 1 等 12 个基因型观察到体胚发生，但是有一半胚胎发生能力非常有限且重复性差，只有 RRIM 600、PB 217、PB 280、PB 310、PB 260、PR 107 等 6 个基因型可以重复获得大量体细胞胚^[26]。

1.1.5 体胚成熟(71~100 d)

将体胚分离出来，接种到改良的 MS 培养基，大量元素为 30%，微量元素为 2 倍，添加 MH1 培养基的维生素，351 mmol/L 蔗糖，0.5 g/L 活性碳，2 g/L 植物凝胶^[16]。通过体胚成熟阶段，部分胚状体可形成正常的二极结构，外观为白色梨形(子叶聚合)或子叶形^[17]。10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 促进胚状体由球形发育成鱼雷形^[27]。条件培养基加入 MH1 固体培养基可提高心形和鱼雷形胚状体的诱导率^[22]。正常胚状体诱导率为 24%~95% 之间，最高为 PR107，最低为 PB235^[16]。

1.1.6 体胚萌发(101~130 d)

将成熟的胚状体转入含萌发培养基的试管，诱导胚状体萌发。细胞分裂素和腺嘌呤促进体胚萌发，其中 7 $\mu\text{mol/L}$ 腺嘌呤的萌发率达到 74%^[27]。

1.1.7 植株发育(131~156 d)

将萌发的胚状体转入植株发育培养基，植株再生率在 2%~31%。最高为 PR107，最低为 PB235^[16]。

1.1.8 植株增殖

内珠被植株可以通过两种方式增殖：试管微

繁和作为接穗通过室外芽接增殖. 由于内珠被植株通过体胚发生实现重新幼态化, 两种增殖方式繁殖的植株大田种植时在长势、产量上表现一致, 均比老态的芽接树表现好^[3].

1.2 驯化和移栽

移栽过程需要大约 4~6 个月的时间才能进行大田种植. 移栽过程可以分为 3 个部分: 1) 断乳期: 这个过程需要 4~6 周. 组培苗在这个阶段逐渐适应室外环境, 恢复茎尖生长, 开始自养. 在这个阶段管理上要注意定期喷水以保持温度在 20~30℃, 湿度接近 100%, 每两周喷一次试剂以杀死真菌, 盖上塑料网以遮挡 50% 的阳光; 2) 硬化期: 逐渐解除定期喷水和遮荫, 让组培苗完全适应室外环境. 一旦茎尖恢复生长, 就开始施肥, 因为相对实生苗组培苗营养储存不足, 施肥量不能高, 且每星期施一次: 头 4 周 1 g/L N-P-K 10-52-10, 然后在下一个 4 周 1 g/L N-P-K 20-20-20; 3) 幼苗期: 该阶段管理同常规芽条圃, 施肥 2 g/L N-P-K 28-14-14. 所需时间视组培苗获得足够的活力可以进行大田种植而定. 通常 20 cm 的植株可以种到大田^[16].

1.3 大田表现

1992~2002 年布置了大田实验, 以传统的老态芽接树作为对照. 大量的田间数据表明, 通过初级体胚发生(或微繁扩增)的自根幼态无性系整体长相与对照一样, 生长势与对照相同或好于对照, 产量高于对照; 以初级体胚植株(或微繁扩增)作为幼态芽条获得的幼态芽接树的长相也与对照一样, 生长势好于对照; 此外, 芽接成功率均高于对照^[3, 28, 29]. 通过初级体胚发生(或微繁扩增)的自根幼态无性系主、侧根发育良好, 与种子苗根系相似^[30].

2 持续体胚发生阶段

经直接体胚发生只能获得少量的再生植株, 并且必须不断采集果实以获得外植体. 1993 年, Montoro 等通过改变愈伤诱导培养基的成分(把 KT 或 3, 4-D 的浓度从 4.5 μmol/L 降到 0.45 μmol/L, 或是把蔗糖浓度提高到 351 mmol/L, 或是把 Ca²⁺ 浓度提高到 12 mmol/L)从橡胶树内珠被诱导出易碎胚性愈伤组织^[7]. 这种愈伤组织可以增殖, 长期继代达 5 年仍能诱导体胚发生, 有效避免了内珠被直接体胚发生体系必须不断采集外植体、消毒的繁重体力劳动, 从而不受季节等外界

条件的影响, 使得相关研究可以常年进行. 整个体系包括如下几个步骤: 获得可增殖的易碎胚性愈伤组织(4~18 个月), 胚性愈伤组织增殖(20 d 一代), 体胚发生及植株再生(6 个月), 炼苗移栽(6 个月), 大田实验. 胚性最好的 PB260 经此体系每个工人每年可生产几千株植株^[26].

2.1 易碎胚性愈伤组织的诱导

起始材料与内珠被直接体胚发生相同. 如上所述, 通过改变培养基的成分, 可以从内珠被愈伤组织上诱导易碎颗粒. 在愈伤诱导培养基转接 4~6 次, 这种现象能进一步诱导, 但阻止胚性表达. 仅仅易碎还不够, 愈伤还必须有很强的增殖能力. 通常只有 0~5% 的愈伤组织符合要求. 自 1993 年获得第一个可长期继代的胚性愈伤系后, CIRAD 又先后获得了 15 个易碎愈伤系, 但是部分由于增殖频率太低舍弃, 部分因再生能力有限舍弃, 最后只有两个易碎愈伤系有高的增殖能力及高的再生能力. 组织学表明, 使用适合的培养基可以保持易碎愈伤组织系的胚性. 易碎胚性愈伤组织的稳定需要通过在低激素的培养基进一步的继代获得, 稳定的材料结构一致, 继代过程具有持续增殖能力^[26]. 12 mmol/L 钙离子可以有效刺激易碎胚性愈伤组织及原胚的形成, 但是长期在此浓度培养则抑制胚状体进一步发育^[7]. 进一步研究发现, 愈伤在此条件下膨压、吸水力、氮的吸收及蛋白质合成降低, 而渗透压升高, 导致了愈伤结构及形态的改变^[7, 31].

2.2 愈伤组织的长期继代及增殖

易碎胚性愈伤组织通过固体^[26]和液体培养基^[32]长期保存, 通常采用固体培养基. 具体做法为每两周在低生长素、低细胞分裂素、高钙离子浓度的愈伤增殖培养基继代, 培养基命名为 MH, 包含如下成分: 30 mmol/L AgNO₃, 1.34 μmol/L 6-BA, 1.34 μmol/L 3, 4-D, 9 mmol/L CaCl₂, 0.5 μmol/L ABA, 234 mmol/L 蔗糖, 2 g/L Phytigel^[26]. 继代的同时实现愈伤组织的增殖, 增殖系数为每代 5~6. 在这个阶段, 愈伤结构一致, 由未分化的细胞、胚性细胞和正在降解的分化细胞组成. 将愈伤保存培养基的 CaCl₂ 浓度从 3 mmol/L 提高到 9 mmol/L, 体胚数量和体胚萌发率都提高了 2 倍^[33]. Martre 等研究了易碎愈伤组织在 RITA(Automated temporary immersion apparatus, CIRAD 发明的瞬时浸润装置^[34])保存的生理反应, 发现浸润 1 min 的愈伤相对生长率与固体和液体对照相当, 1、

12、24 h 处理则下降了 60%，浸润阶段所有处理的呼吸速率相当，然而非浸润阶段 12 h 和 24 h 两个处理的呼吸速率分别增加了 140%~164%，同时，总的腺苷酸浓度及 ATP/ADP 比值保持不变或下降。所有处理的腺苷酸能荷相当，SOD 活性及脂类过氧化反应随浸润时间延长而提高，尤其是 12 h 和 24 h 两个处理。非浸润时间超过 24 h 后则无论浸润时间长短均检测不到脂类过氧化反应。研究结果提示浸润阶段诱导了实质的氧化压力，浸润时间影响不大^[35]。肉眼很难区分胚性和非胚性愈伤组织，Charbit 等获得了 28 条差异表达的 cDNAs，其中 5 条可在诱导出胚前区分胚性及非胚性愈伤组织^[36]。Carron 等研究了 1.1.4 所述 18 个品种诱导易碎胚性愈伤组织的区别，其中 RRIM 600、RRIM 703、RRIC 100、PB 254、PB 280、PB 255、PB 260、PR 107、GT 1 等 9 个基因型能够诱导易碎愈伤组织，但只有 PB 280、PB 260、PR 107 能够形成胚性愈伤系，可长期继代，并保持体胚发生能力^[26]。

2.3 体胚发生和植株再生

每次增殖培养结束后获得的愈伤组织都可以通过逐步去除激素用于诱导植株再生。胚状体的诱导和成熟均在 RITA 完成。该装置间隔一段时间(体胚发生 12 h 萌发 6 h)释放液体培养基浸泡一会(体胚发生 1 min 萌发 15 min)胚性愈伤组织^[33]。Etienne 等比较了常规固体培养与 RITA 在体胚发生能力的区别。结果表明，RITA 在体胚发生、胚状体成熟、干燥及萌发均优于常规固体培养。在最好的培养条件下 RITA 的体胚产量是常规固体培养的 3~4 倍，即每克鲜重愈伤组织可诱导 400 个胚状体。在转入 RITA 前胚性愈伤组织必须先先在固体培养基诱导培养 10 d，且 6-BA 与 3, 4-D 的浓度必须降低。RITA 培养的体胚更一致、同步，并且使异常胚的比例降低了一半，促进体胚萌发。12 周不浸润可以使体胚保持很好的干燥状态。在萌发阶段瞬时浸润极大刺激根的发育(+60%)及胚轴的伸长(+35%)，同时增加了同步性，降低了工作量^[33]。Lardet 等比较了子叶形体胚和合子胚的生化特性及它们的成苗能力，发现子叶形体胚与成熟的合子胚(>16 w)的成苗能力相当(50%~60%)，两者的含水量、渗透压、膨压相当，水势则相当于 13 w 的合子胚；部分脱水有助于两者成苗；子叶形体胚的蛋白质、淀粉浓度与合子胚相当，然而体积却远小于合子胚(干重仅

为合子胚的 1/30)，储藏物比合子胚低 20 倍。这解释了体胚植株活力弱及发育成完整植株需时长^[37]。10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 对体胚发育有明显促进，2.5 $\mu\text{mol/L}$ ZIP 或 7 $\mu\text{mol/L}$ Adenine 提高鱼雷形胚状体变绿的频率^[27]。浸泡时间及频率是影响增殖效率最关键的因素，其次是培养基及容器体积，瞬时浸润有效减轻液体培养的玻璃化现象，获得的植株移栽成活率高于来自固体和液体培养的植株^[38]。在体胚诱导培养基添加麦芽糖较葡萄糖、果糖、蔗糖抑制愈伤组织生长，但是出现胚性细胞的时间早，胚状体数量多，而其它 3 种碳源促进愈伤组织的生长^[39]。研究表明，由于麦芽糖水解慢，造成碳缺失，使内源六碳糖维持低水平是促使愈伤向体胚发生方向转变的一个重要生化信号^[40]。140 g/L PEG 和 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 体胚发育最理想^[41]。研究表明，PEG 和 ABA 促进大量体胚分化及向鱼雷形胚转变，在鱼雷形胚阶段积累淀粉、贮藏蛋白和甘油三酰酯等贮存物质，同时呼吸速率下降^[42]。

2.4 大田表现

与老态芽接树相比，长期继代易碎胚性愈伤组织再生植株大田表现不甚理想：长势弱，树冠、分枝的结构及叶片的颜色和形状异于对照，易感 collar canker 和叶片疾病，虽然分子检测证实就是 PB260，但是部分植株或部分愈伤系的部分位点出现了变异，产量低于对照^[3]。通过对整个实验过程的分析，认为有几个方面的问题值得考虑：1) 炼苗过程活力低，根系变形；2) 早期诱导易碎愈伤组织存在体细胞变异的可能；3) 愈伤系保持在有植物生长调节剂的增殖培养基上长达几年^[3]。

2.5 超低温保存

1997 年，Engelmann 等成功建立了经典和简化两种橡胶树胚性愈伤组织超低温保存方法。经典的超低温保存方法成功保存了 PB260 长期继代的易碎胚性愈伤组织，简化的超低温保存方法成功保存了 PB 260 和 PR 107 长期继代的易碎胚性愈伤组织。经典的超低温保存步骤如下：首先在含 1 mol/L 蔗糖和 10% DMSO 的溶液中预培养 1 h，然后转入程序冷冻仪以 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度逐步降至 -40°C ，最后将冻存管浸入液氮中。简化的超低温保存步骤如下：预培养及第 3 步同经典方法，第 2 步为转入一个简化装置，内含一个装着异丙醇的聚苯乙烯盒子，放入 -80°C 的 deep-freezer，这样就可获得 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速度并

逐步降至 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. 超低温保存可以有较高的存活率(经典方法 63%, 简化方法: PB260 $50\% \pm 14\%$, PR107 $80\% \pm 12\%$), 快速恢复生长的愈伤比例(经典方法 86%, 简化方法: PB 260 40%, PR107 60%~70%), 愈伤恢复生长后体胚分化能力与对照相差不大^[43]. 但几年后该技术超低温保存其他的易碎胚性愈伤系时无法重复. 2007年, Lardet 等重新研究了易碎胚性愈伤组织的超低温保存. 超低温保存采用 Engelmann 等的简化方法, 但重点研究了预培养对超低温保存的影响. 研究表明, 将预培养的钙离子浓度从 9 mmol/L 降到 1 mmol/L 或 0 mmol/L 能提高冻后复苏愈伤的生长, 1 mmol/L 也是诱导体胚发生的最佳钙离子浓度. 研究还表明, 用于超低温保存的初始重量与冻后愈伤的增殖成反比. 该方法在 39 个独立的易碎胚性愈伤系获得成功^[44].

2.6 遗传转化

法国 CIRAD 组织以内珠被诱导的长期继代的胚性愈伤组织为外植体开展了农杆菌转化研究, 2000 年发现易碎胚性愈伤组织在无钙的 MM 培养基预培养 2 周可以提高遗传转化效率^[45], 2006 年 Blanc 等建立了根癌农杆菌介导的遗传转化体系, 通过增殖易碎胚性愈伤组织系, 获得了来自 6 个独立胚性愈伤系的 374 株转基因植株, 并且发现共培养温度从 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降到 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 能大大提高转化率^[46]. 随后又构建了将不破坏植物材料的绿色荧光蛋白基因(GFP)代替 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase, GUS)基因的载体, 大大加快转化体系的优化, 获得转绿色荧光蛋白的橡胶树^[47, 48]; 2007 年开展了应用研究, 将功能基因铜锌超氧化物歧化酶基因(*CuZnSOD*)转入橡胶树中^[49]. 目前所有的转基因植株都来自 PB260, 未见其他无性系的转基因报道.

3 存在问题及展望

内珠被培养是继花药培养后研究较多的一个方向, 至今, 已获得了一定数量的内珠被植株, 并布置了较大规模的大田实验. 其建立的易碎胚性愈伤组织系是目前获得橡胶树转化植株最多的外植体. 但是内珠被培养仍然存在以下问题限制其发展及应用: 1) 直接体胚发生途径及易碎胚性愈伤组织诱导均受到基因型的限制. 目前只有 PB260 易碎胚性愈伤组织再生体系能够获得大量植株, 性状优良的某些品种很难诱导出植株. 2)

很有应用前景的易碎胚性愈伤组织经长期继代后植株畸形, 产量、抗性均比对照差, 极大地影响其应用价值. 但关于这一问题, 法国已采用两个办法解决: 以初级体胚为外植体诱导次级体胚发生从而快速诱导易碎愈伤组织; 将易碎胚性愈伤组织通过超低温的方法保存, 从而降低长期继代引起的变异^[44]. 3) 易碎胚性愈伤组织的诱导频率很低.

今后以下几个研究方向值得考虑:

1) 组织培养具有很强的基因型依赖性, 但是随着组培技术及分子生物学等相关学科的发展, 原来诱导频率低或无法诱导植株的品系也能提高诱导率. 因此, 对生产上大规模推广的无性系, 可综合运用各种组培手段及分子生物学方法提高内珠被植株的诱导率, 以便通过遗传转化技术改良优良品种, 缩短育种年限.

2) 易碎胚性愈伤组织的诱导频率在 5% 以下, 需要通过不断的继代来增殖, 如果提高易碎胚性愈伤组织的初次诱导率, 就可以降低不断继代带来的变异风险. 因此, 可通过外植体的采集、基本培养基、激素浓度及培养条件的调整等方面来提高诱导率.

3) 在降低易碎胚性愈伤组织再生植株变异的基础上, 将内珠被培养技术与细胞离体筛选、诱变、转基因技术相结合, 在短时间内培育高抗、高产、优质的橡胶树新品种.

国内一直未能建立成熟的内珠被再生体系, 经过多年的探索, 中国热带农业科学院橡胶研究所成功建立了较为成熟的橡胶树内珠被初级体胚发生及持续体胚发生植株再生体系.

参考文献(References):

- [1] 广东省农垦总局橡胶选育种协作组. 橡胶选育种资料汇编[M]. 广州: 广东省农垦总局(Land Reclamation Bureau of Guangdong Province Rubber Selection and Breeding Cooperative Group. Rubber Selection and Breeding Compilations[M]. Guangzhou: Land Reclamation Bureau of Guangdong Province), 1975.44-45.
- [2] 王泽云, 陈雄庭, 吴胡蝶. 橡胶树新型种植材料——体胚植株[J]. 热带农业科学(WANG Ze-yun, CHEN Xiong-ting, WU Hu-die. New planting material in *Hevea brasiliensis*——plants regenerated from somatic embryos[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture), 2001, 21(6): 11-15.
- [3] CARRON M P, LARDET L, LCONTEL A, et al. Field trials network emphasizes the improvement of growth and yield through micropropagation in rubber tree (*Hevea brasiliensis*, Mu ̄ ll-Arg.) [C]// ROMANO A. Acta Horticulturae, IIIrd International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated

- Plants. Faro, Portugal: ISHS press, 2009. 485-492.
- [4] 王泽云, 曾宪松, 陈伟琴, 等. 用离体花药诱导巴西橡胶植株的研究[J]. 热带作物学报(WANG Ze-yun, ZENG Xian-song, CHEN Wei-qin, et al. Induction of rubber plants from anther of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. in vitro[J]. Chinese Journal of Tropical Crops), 1980, 1(1): 16-25.
- [5] CARRON M P, ENJALRIC F. Somatic embryogenesis from inner integument of the seed of *Hevea brasiliensis* (kuntz Müll. Arg.) [J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris), 1985, 300(3): 653-658.
- [6] 赵辉, 崔百明, 彭明, 等. 巴西橡胶树胚性组织长期继代保存及增殖技术[J]. 热带作物学报(ZHAO Hui, CUI Bai-ming, PENG Ming, et al. Proliferation culture of somatic embryonic tissues of *Hevea brasiliensis* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops), 2007, 28(4): 39-43.
- [7] MONTORO P, ETIENNE H, MICHAUX-FERRIERE N, et al. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 33(3): 331-338.
- [8] HUA Y W, HUANG T D, HUANG H S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Breeding, 2010, 129(2): 202-207.
- [9] 罗丽娟, 邱德勃, 谢石文. 巴西橡胶树果皮及种皮的发育[J]. 热带作物学报(LUO Li-juan, QIU De-bo, XIE Shi-wen. Development of pericarp and seed coat of *Hevea* fruit[J]. Chinese Journal of Tropical Crops), 1998, 19(4): 7-14.
- [10] CARRON M P. Induction et croissance de cals chez *Hevea brasiliensis* [J]. Revue Générale des Caoutchoucs et Plastiques, 1980, 57(597): 65-69.
- [11] CARRON M P, ENJALRIC F. Studies on vegetative micropropagation of *Hevea brasiliensis* by somatic embryogenesis and *in vitro* microcutting [C]// FUJIWARA A. Plant tissue culture. Tokyo: Maruzen Press, 1982. 751-752.
- [12] CARRON M P, ENJALRIC F, LARDET L, et al. Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [C]// BAJAJ YPS. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin: Allemagne Springer Press, 1989. 222-245.
- [13] MICHAUX-FERRITRE N, CARRON M P. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing [J]. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 19(3): 243-256.
- [14] CARRON M P, AUZAC J D, ETIENNE H, et al. Biochemical and histological features of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Indian Journal of Natural Rubber Research, 1992, 5(1&2): 7-17.
- [15] HADRAMI I E L, HOUSTI F, MICHAUX-FERRITRE N, et al. Effects of gelling agents and liquid medium on embryogenic potential, polyamines and enzymatic factors in browning in *Hevea brasiliensis* calli [J]. Journal of Plant Physiology, 1993, 141(2): 230-233.
- [16] CARRON M P, ETIENNE H, LARDET L, et al. Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) [C]// JAIN S, GUPTA P, NEWTON R. Somatic embryogenesis in woody plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. 2: 115-136.
- [17] MICHAUX-FERRITRE N, GROUT H, CARRON M P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) [J]. American Journal of Botany, 1992, 79(2): 174-180.
- [18] HADRAMI I E L, CARRON M P, AUZAC J D. Influence of exogenous hormones on somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Annals of Botany, 1991, 67(6): 511-515.
- [19] HADRAMI I E L, AUZAC J D. Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus [J]. Annals of Botany, 1992, 69(4): 323-325.
- [20] ETIENNE H, BERGER A, CARRON M P. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis [J]. Physiologia Plantarum, 1991, 82(1-2): 213-218.
- [21] ETIENNE H, SOTTA B, MONTORO P, et al. Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) [J]. Plant Science, 1993, 88(1): 91-96.
- [22] VEISSEIRE P, CAILLOUX F, COUDRET A. Effect of conditioned media on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Physiology Biochemistry, 1994, 32(4): 571-576.
- [23] LAEDET L, DESSAILLY F, CARRON M P, et al. Influences of aging and cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype [J]. Tree Physiology, 2009, 29(2): 291-298.
- [24] AUBOIRON E, CARRON M P, MICHAUX-FERRITRE N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis* [J]. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 21(1): 31-37.
- [25] HADRAMI I E L, MICHAUX-FERRITRE N, CARRON M P, et al. Polyamines (PA), a possible limiting factor in somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis* [J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris), 1988, 308(3): 205-211.
- [26] CARRON M P, LARDET L, DEA B G. *Hevea* micropropagation by somatic embryogenesis, technology [J]. Plantations, Recherche, Développement, 1998, 5(3): 187-192.
- [27] VEISSEIRE P, LINOSSIER L, COUDRET A. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 39(3): 219-223.
- [28] CARRON M P, DEA B G, TISON J, et al. Field growth of *Hevea brasiliensis* clones produced by *in vitro* culture [J]. Plantations, Recherche, Développement, 1997, 4(4): 264-273.
- [29] CARRON M P, BOKO C, LARDET L, et al. Field growth and rubber yield of *Hevea brasiliensis* (Muell. -Arg.) from budded versus *in vitro* micropropagated plants from clone IRCA 18 [C]// ECONOMOU A S, READ P E. Acta Horticulturae, I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Sani-Halkidiki, Macedonia, Greece: ISHS Press, 2003. 283-293.
- [30] CARRON M P, ROUX LE Y, TISON J, et al. Compared root system architecture in seedlings and *in vitro* plantlets of *Hevea brasiliensis*, in the initial years of growth in the field [J]. Plant and Soil, 2000, 223(1&2): 73-85.
- [31] MONTORO P, ETIENNE H, CARRON M P. Maintainable somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Revue de Cytologie et Biologie Végétales, le Botaniste, 1994, 17(1): 113-119.
- [32] CAILLOUX F, JULIEN-UERRIER J, LINOSSIER L, et al. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Science, 1996, 120(2): 185-196.
- [33] ETIENNE H, LARTAUD M, MICHAUX-FERRITRE N, et al. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*

- (Mull Arg) using the temporary immersion technique[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1997, 33(April-June): 81-87.
- [34] TEISSON C, ALVARD D, BERTHOULY B, *et al.* Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion [C]// KOZAI T. International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems. Nartia, Japan: ISHS Press, 1996. 521-526.
- [35] MARTRE P, LACAN D, JUST D, *et al.* Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, 67(1): 25-35.
- [36] CHARBIT E, LEGAVRE T, LARDET L, *et al.* Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of *Hevea brasiliensis* calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(8): 539-548.
- [37] LARDET L, PIOMBO G, ORIOL F, *et al.* Relations between biochemical characteristics and conversion ability in *Hevea brasiliensis* zygotic and somatic embryos[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1999, 77(8): 1168-1177.
- [38] ETIENNE H, BERTHOULY M. Temporary immersion systems in plant micropropagation[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 69(3): 215-231.
- [39] BLANC G, MICHAUX-FERRITRE N, TEISSON C, *et al.* Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 59(2): 103-112.
- [40] BLANC G, LARDET L, MARTIN A, *et al.* Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(373): 1453-1462.
- [41] LINOSSIER L, VEISSEIRE P, CAILLOUX F, *et al.* Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development[J]. *Plant Science*, 1997, 124(2): 183-191.
- [42] COURTY C, DUCHER M, COUDRET A. Starch, storage protein and triglyceride accumulation and respiration in developing embryos in *Hevea brasiliensis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1999, 154(5&6): 686-690.
- [43] ENGELMANN F, LARTAUD M, CHABRILLANGE N, *et al.* Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*[J]. *Cryo Letters*, 1997, 18(2): 107-116.
- [44] LARDET L, MARTIN F, DESSAILLY F, *et al.* Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(5): 559-569.
- [45] MONTORO P, TEINSEREE N, RATTANA W, *et al.* Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(9): 851-855.
- [46] BLANC G, BAPTISTE C, OLIVER G, *et al.* Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 24(12): 724-733.
- [47] LECLERCQ J, MARTIN F, MONTORO P. Genetic transformation of *Hevea brasiliensis* by using a non-destructive visual marker (GFP)[R]. Ho Chi Minh, Vietnam: International Rubber Conference, 2006.
- [48] LECLERCQ J, LARDET L, MARTIN F, *et al.* The green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(5): 513-522.
- [49] LECLERCQ J, MARTIN F, LARDET L, *et al.* Genetic transformation and regeneration of plant over-expressing CuZnSOD gene to control oxidative stress in rubber tree [R]. Siem Reap, Cambodia: International Rubber Conference, 2007.

(上接第 157 页)

- [7] CHEN X, JOHNS D C, GEIMAN D E, *et al.* Krüppel-like factor 4 (Gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (32): 30423-30428.
- [8] KATZ J P, PERREAULT N, GOLDSTEIN B G, *et al.* Loss of klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4): 935-945.
- [9] ZHANG Wen, CHEN Xi, KATO Yoichi, *et al.* Novel cross talk of krüppel-like factor 4 and β -catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(6): 2055-2064.
- [10] MARAMBAUD P, SHIOI J, SERBAN G, *et al.* A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(8): 1948-1956.
- [11] KATZ J P, PERREAULT N, GOLDSTEIN B G, *et al.* The zinc-finger transcription factor klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon[J]. *Development*, 2002, 129(11): 2619-2628.
- [12] SEGRE J A, BAUER C, FUCHS E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(4): 356-360.