

橡胶树花药的培养

孙爱花* 李哲 黄天带

中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室, 海南儋州 571737

Anther Culture of Rubber Tree (*Hevea Brasiliensis* Muell. Arg)

SUN Ai-Hua*, LI Zhe, HUANG Tian-Dai

Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Tropical Crop Physiology, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

提要 文章介绍橡胶树的花药培养和影响其培养因素的研究进展, 并指出这项技术的应用前景。

关键词 橡胶树; 花药培养

自从1964年Guha和Maheshwari报道毛叶曼陀罗(*Datura innoxia*)花药培养获得单倍体植株以来, 花药培养已成为获得单倍体及纯合体的途径之一。由于橡胶树生命周期长, 又是异花授粉作物, 在遗传上高度杂合, 并且在农作物中行之有效的某些重要育种技术长期未能在橡胶树上得到应用。通过花药培养诱导花粉植株, 为橡胶树单倍体育种、多倍体育种, 充分利用杂种优势, 培育产量高、抗性强而生长快的优良品种, 展示了广阔的前景, 并为研究各种经济性状的遗传规律提供了优良材料。通过花药培养诱导二倍体植株, 可以获得自根幼态无性系, 排除不良砧木的影响, 提高产量; 可以获得抗寒性强而一致的优良砧木, 减少寒害; 也可获得均一的材料, 供科研使用, 并为橡胶树的良种繁育提供一条值得考虑的途径。

在分子生物技术迅速发展和日趋成熟的今天, 花药培养的应用领域不断扩大, 其研究意义日益突出。本文对国内外橡胶树花药培养的研究现状及影响花药培养的主要因素进行了概述, 并对花药培养存在的问题及其应用前景作了分析和探讨。

1 橡胶树的花药培养

20世纪70年代以来, 我国、马来西亚、印度尼西亚、斯里兰卡等国采用离体花药相继成功地培育出花粉单倍体及花药壁二倍体植株, 此后关于这方面的研究得到了迅速发展, 获得了来自

橡胶树花药壁的二倍体组织和花粉多细胞球, 并证明橡胶树的小孢子是可以启动发育的(Satchuthanathavale和Irugulbandara 1972; Satchuthanathavale 1973)。我国从1973年开始橡胶树花药培养的研究工作, 于1977年培养出数棵植株, 但经移栽未能成活; 1977~1978年, 有人先后从‘海垦2’和‘热研88-13’2个品种中诱导出161棵植株, 并移栽成活(王泽云等1978)。到1979年底, 已从‘海垦2’、‘海垦1’、‘热研88-13’等品种中诱导出完整植株137棵, 移栽成活率提高到69%, 组织学和细胞学研究证明, 花药植株起源于花药壁的体细胞(王泽云等1980, 1984)。

Paranjothy和Ghandimathi (1975, 1976)从花药培养试验中获得胚状体, 但未再生植株。陈正华等(1978, 1979)从三叶橡胶花药培养中获得5棵植株, 并证明来源于花粉。岑明等(1981)对花药胚状体和小植株根尖进行细胞学观察证明, 所获得的胚状体和小植株确实来源于花粉, 而且从胚状体到小植株这一段时间内, 染色体数有逐渐增加的趋势, 往往是以9的倍数增加。

王泽云等(1989)认为橡胶树花药体细胞植株集芽接树和实生树的优点于一体, 是一种幼态自根无性系, 表现出生长快、产量高和发育时期从老

收稿 2006-03-29 修定 2006-05-25

资助 农业部农业结构调整重大技术研究专项(05-09-2A)。

* E-mail: aaahs78@163.com, Tel: 0898-23301306

态恢复到幼态等优点,也是一种很有发展前途的新一代种植材料。吴胡蝶等(1994)研究 6-BA 和 ABA 影响橡胶花药体细胞胚形成及植株再生的结果表明,培养基中加入 6-BA 后,橡胶树体细胞胚和植株的诱导率提高。其作用可能是促进胚胎原始细胞的发育或是消除愈伤组织中残留 2,4-D 对胚胎原始细胞发育的抑制作用。但添加的浓度要适宜,浓度过高,活性太强,胚状体发育反而受阻,不能达到提高植株诱导率的效果,一般以 $2\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围的 6-BA 较适宜;添加 $0.2\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABA 也可明显提高胚状体的数量、质量以及植株的诱导率。可见,ABA 对橡胶花药体细胞的形成和植株再生也有良好的效应。杨少琼和莫业勇(1994)对生长在系比区内的 2 个巴西橡胶无性系的花药体细胞植株产量和生理特性进行初步检测和观察的结果表明,‘海垦 2’花药体细胞植株的第一割年的产量高于供体无性系 45.2%,与胶乳再生和排胶有关的 10 项生理参数的分析都显示其具有与高产相适应的生理基础;‘海垦 1’花药体细胞植株的产量高于供体无性系 20.6%,但此产量主要是通过胶乳严重长流获得的,有一定的缺憾。

Arokiaraj 等(1994, 1996, 1998)应用农杆菌介导和基因枪法,成功地将 β -葡萄糖苷酶(GUS)和新霉素磷酸转移酶(nptII)等基因导入橡胶树花药的愈伤组织,并获得完整植株。曾宪松等(1997)用 0.5% 的秋水仙素处理橡胶树二倍体花药体细胞愈伤组织(浸泡或滴渍) 1 d,可有效地从多倍性的细胞再分化成多倍性胚状体并再生植株。梁国平和肖三元(2004)对几个橡胶品系的花药进行离体培养,从中筛选出易获得诱导率高、质量好胚状体的橡胶品种‘云研 73-477’,其胚状体的诱导率达到 76.83%,诱导出完整植株 37 株,成苗率 16.9%,移栽成活 21 株,成活率 56.8%,为进一步开展橡胶树花药培养研究提供了较好的品种材料。

2 影响花药培养的因素

2.1 材料 用作花药培养的亲本植株的基因型、生理状态以及接种时花粉所处的发育时期等对植株的诱导频率有直接影响,因此在接种前应对所用的材料进行严格的选择。

2.1.1 基因型 供体植株的基因型是影响花药培养的关键因素,不同基因型植株的花药对培养的反应不同,表现在花药培养力如愈伤组织诱导率、分化率、胚状体诱导率及植株诱导率等,有些材料对某些培养基没有反应。目前培养成功的植物种类以茄科、禾本科和十字花科的植物所占比例较大,从大麦、小麦、大豆、亚麻等作物进行研究都证实,不同基因型植物的花药诱导能力和器官形成能力有差异,即存在明显的基因型效应(朱睦元等 1990; Kintzios 和 Fischbeck 1994; Kiviharju 和 Tauriainen 1999)。在橡胶树花药培养中,只有少数橡胶树无性系能通过花药培养产生大量植株,这些无性系有:‘PR107’、‘GT1’、‘海垦 2’、‘海垦 1’、‘热研 88-13’、‘热研 7-33-97’等(王泽云等 1978, 1980; Carron 等 1998)。黄德贵等(1982)研究不同花药材料对诱导反应的结果表明,不同材料对基本培养基的适应程度不同,而且对同一培养基不同附加成份的适应程度也有差异。许多抗寒力较强的材料诱导愈伤组织比较困难,而许多愈伤组织诱导率很高的材料又很难分化出胚状体或植株。因此认为,选择合适基因型的橡胶树无性系对花药离体培养诱导再生植株的成败起着重要作用。

2.1.2 生理状况 不同生长季节、栽培环境、不同部位的花蕾导致其花粉的生理状态均可能不同,诱导率有明显差异。一般认为,采集自适宜环境条件下的供体植株花药培养的胚诱导率和植株再生率高,从季节上看,冬春季较夏秋季更适于进行花药培养(Yang 等 1992)。王泽云等(1978, 1980)认为不同花期橡胶树的花药分化能力也不同,虽然春、夏、秋三季的花都能诱导出胚状体,但其数量则是秋花多于春、夏花。

2.1.3 花粉的发育时期 选择合适的花粉发育时期是提高花粉植株诱导频率的重要因素。被子植物的花粉发育经历四分体时期、单核期(小孢子阶段)、双核期和三核期(雄配子阶段),单核期又可分为单核早、中、晚 3 个时期。在花药培养早期的研究中发现,并不是任何时期的花粉都可以培养产生愈伤组织或胚状体,只有花粉发育到一

定时期对离体的刺激才最敏感。然而, 对大多数植物而言, 单核中期至单核晚期的花粉最容易形成花粉胚或花粉愈伤组织(卫志明 2003)。在橡胶树育种中, 许多研究者也认为单核晚期(长度 3~4 mm)的花粉最容易培养(王泽云等 1978, 1980, 1984; 陈正华等 1978, 1979; 黄德贵等 1982)。

2.1.4 预处理 花药预处理对提高胚状体诱导频率有很好的效果, 不同作物所用的处理方法不同。一般采用 30~35℃ 高温或 3~10℃ 低温对花蕾进行处理的效果较好。其它预处理方法如浸泡和离心等也有人研究和尝试过(李靖等 2005)。目前, 低温处理花粉胚胎发生能力的机制有 2 种不同看法。Nitsch 和 Norreel (1973) 认为低温处理改变花粉粒第 1 次有丝分裂的轴向, 从而导致花粉朝着胚胎的方向发育; 而 Sunderland (1978) 则认为低温的作用不在于改变纺锤轴取向, 而是保持花粉的活力, 因而营养细胞得以完成细胞质的改组转向胚胎发生。此外, 低温预处理也能延缓花药壁组织的衰老和降低花粉的死亡率(王伟光和高亦珂 2005)。黄德贵等(1982)在探索低温处理对橡胶树花药形成愈伤组织的效应中见到, 经低温处理的花药愈伤组织诱导率有明显提高, 他们还观察到, 一般容易诱导愈伤组织的品种或是采用含生长调节物质较高的培养基, 低温处理的作用即不显著。

2.2 培养基

2.2.1 基本培养基 选择合适的基本培养基是花药培养技术的重要环节之一。林木花药培养所采用的基本培养基有 MS、Nitsch、B₅、BN、BH、MB、N₆、Miller、H。较为常用的是 MS、BN、H、MB 培养基(张冰玉等 2003)。许多研究者认为, 诱导橡胶树花药愈伤组织的基本培养基以 MS 或 MB (MS 培养基的大量元素和铁盐, 用 Bourgin 及 Nitsch 烟草培养的微量元素及有机生长物质)较好(王泽云等 1978, 1980, 1984; 陈正华等 1978, 1979)。黄德贵等(1982)认为诱导花药愈伤组织的基本培养基 MB 的效果比 MS 好。陈正华等(1986)也认为 MB 的诱导效果好。MS 培养

基是一种高盐培养基, 特别是含 NH₄⁺ 的浓度较高。有研究表明, 高浓度 NH₄⁺ 可促进橡胶树花药培养时的胚状体发生, 低浓度 NO₃⁻ 可提高其花粉胚状体的诱导率(陈正华 1986)。

2.2.2 碳源 林木花药培养主要以蔗糖为碳源。因树种不同, 所用蔗糖浓度有很大差别(2%~10%)。为了得到较高的橡胶树花药胚性愈伤组织诱导率和胚状体诱导率, 国内的很多学者单就不同浓度蔗糖效应作过探讨。陈正华(1988)研究三叶橡胶的花药培养的结果表明, 在脱分化培养基中添加 2%~10% 蔗糖均可促进花药愈伤组织分化, 但组织学观察表明, 接种 25 d 后的小孢子存活率是添加 10% 蔗糖比添加 3% 蔗糖高 1 倍以上, 最适浓度为 7%~8%。

2.2.3 激素 在花药培养的不同时期, 所用的生长调节物质种类和浓度不同。在脱分化培养基中细胞分裂素类物质与生长素类物质共同使用对诱导愈伤组织十分重要, 缺少其中之一, 花药诱导均不能成功。经常使用的生长素类物质有 2, 4-D、IAA、NAA, 细胞分裂素类物质有 KT、6-BA, 其浓度范围有 0.5~2.0 mg·L⁻¹ 不等。在分化培养基中, 细胞分裂素类物质对愈伤组织的分化有十分重要的作用, 也应与生长素类物质配合使用。一般而言, 加入 0.5~1.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D、0.5~1.0 mg·L⁻¹ KT 均可促进橡胶树花药胚性愈伤组织的诱导, 加入 0.1~0.2 mg·L⁻¹ NAA、0.2~1.0 mg·L⁻¹ KT、0~0.5 mg·L⁻¹ GA₃ 能显著促进胚状体增长(王泽云等 1978)。添加 0.2~0.5 mg·L⁻¹ 的 ABA 也可明显提高胚状体的数量、质量以及植株的诱导率(吴胡蝶等 1994)。刘桂珍和陈正华(1999)在悬浮培养基中加入 1.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D 即能促进胚胎发生。

2.2.4 活性炭 活性炭在花药培养中有普遍提高出苗率的作用(Fridborg 和 Eriksson 1975; Johansson 等 1982)。在橡胶树花药培养中, 添加适量的活性炭, 可以降低组织培养物产生的有害代谢物质的浓度, 从而有利于细胞生长。在脱分化培养基中增加生长调节剂的情况下, 再添加 0.05%~0.1% 活性炭, 可成倍提高 'RRIM600' 等品种的愈伤组织诱导频率; 在分化和出苗培养基中各添

加0.1%活性炭,可提高分化频率;有的胚状体可增长数倍,植株增长1倍(王泽云等1988)。

除了上述4种影响培养基效果的因素外,天然附加物椰子汁(coconut water, CW)对提高橡胶树花药胚性愈伤组织和胚状体诱导率也有作用。

2.3 培养方法和培养条件 花药培养的方式一般采用固体培养基培养,但近年来也有许多用液体培养基培养花药。还有人采用悬浮细胞培养获得巴西橡胶的胚状体(Wilson和Street 1975, Wilson等1976)。Veisseire等(1994)用类似方法虽然获得了胚状体,但均未得到小植株。刘桂珍和陈正华(1999)用悬浮细胞培养方法成功地获得巴西橡胶胚状体及再生植株。

培养条件中最重要的是温度。橡胶树花药培养的培养温度一般为25~28℃,诱导愈伤组织和胚状体阶段,应在黑暗条件下,而在胚状体诱导幼苗阶段则应照光,可用日光灯每天照明12 h,光强为45 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

2.4 植株的诱导和移栽 橡胶树花药培养植株诱导中有3个关键步骤:(1)花药接种在脱分化培养基中,促使花药愈伤组织化;(2)愈伤组织化的花药转移至分化培养基上,诱导产生胚状体;(3)肉眼可见的胚状体转入成苗培养基上,促使其生根、抽茎、生叶、成为小植株。促使花药植株移栽成活,一般需要注意以下几个问题:(1)要有发育良好的根系;(2)掌握适宜的时机,不可过早移栽;(3)移栽苗前锻炼;(4)室内温度、湿度和光照应适宜;(5)成活的苗应进行野外锻炼。

3 结语

花药培养是橡胶树组织培养中研究较早和较多的一个方向,也是橡胶树遗传转化的重要途径(谭德冠等2005)。至今,虽已获得了一定数量的花药植株,但与农作物相比,其发展比较落后。主要原因是花药植株的诱导率在总体上比较低,不能形成足够的选择群体;另外,橡胶树花药培养对基因型的依赖性较强,性状优良的某些品种很难诱导出花药植株。因此限制了花药植株在橡胶树育种及遗传研究中的进一步应用。

鉴于橡胶树花药培养的落后局面和巨大应用

潜力,除应加强这一领域的研究力度以外,以下几个问题值得今后研究与考虑:

(1)根据花药植株的利用目的不同,可选择具有代表性的品种进行花药培养,综合运用各种手段提高花药植株的诱导率。同时,应用分子生物学手段进行花药培养的基础性研究,从根本上找出基因型影响花药植株诱导率的原因。

(2)在提高花药植株诱导率的基础上,将花药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,培育高抗优质的橡胶树新品种。特别是以花药培养单倍体愈伤组织或单倍体植株作为转化受体,以实现外源基因的稳定转化。

(3)在提高花药植株诱导率的基础上,构建双单倍体群体,从而为分子标记、遗传图谱的构建、基因克隆以及各种遗传学研究提供理想的研究材料。

参考文献

- 岑明,陈正华,钱长发,王传华,何永陶,肖育玲(1981). 三叶橡胶花药培养过程中的染色体倍数研究. 遗传学报, 8 (2): 169~174
- 陈正华(1986). 木本植物单倍体诱导的成就与特点. 见:陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京:高等教育出版社, 75~91
- 陈正华(1988). 木本植物的花药培养. 见:胡含,陈英主编. 植物体细胞遗传与作物改良. 北京:北京大学出版社, 140~142
- 陈正华,陈发祖,钱长发,王传华,张世杰,许绪恩,区晓慧,何永陶,卢俊民(1978). 三叶橡胶花粉植株的诱导. 遗传学报, 5 (2): 99~107
- 陈正华,陈发祖,钱长发,王传华,张世杰,许绪恩,区晓慧,何永陶,卢俊民(1979). 三叶橡胶花粉植株的获得. 中国科学, (6): 617~624
- 陈正华,许绪恩,庞任声(1986). 橡胶树属的花药培养及花粉植株的研究. 见:陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京:高等教育出版社, 481~500
- 黄德贵,陈曼雅,吕美娜,林醒华,吴福生,林玉英(1982). 巴西橡胶花药培养的研究. 福建热作科技, (2): 1~11
- 李靖,李焕秀,李敏,王梅(2005). 蔬菜花药培养研究进展. 中国蔬菜, (6): 36~39
- 梁国平,肖三元(2004). 橡胶树花药离体培养及完整植株的诱导. 热带农业科技, 27 (1): 8~10, 27
- 刘桂珍,陈正华(1999). 巴西橡胶悬浮细胞培养胚胎发生与植株再生. 热带作物学报, 20 (4): 1~5
- 谭德冠,孙雪飘,张家明(2005). 巴西橡胶树的组织培养. 植物生

- 理学通讯, 41 (5): 674~678
- 王伟光, 高亦珂(2005). 花药培养的研究进展. 内蒙古大学学报(自然科学版), 20 (3): 280~284
- 王泽云, 吴胡蝶, 陈雄庭(1989). 橡胶树花药体细胞植株的优良性状. 热带作物学报, 10 (2): 17~22
- 王泽云, 吴胡蝶, 陈雄庭, 赖康(1988). 活性炭在橡胶花药培养中的效应. 热带作物研究, (1): 12~14
- 王泽云, 吴胡蝶, 曾宪松, 陈传琴, 李琼英(1984). 巴西橡胶花药胚的发生和花药植株起源的研究. 热带作物学报, 5 (1): 9~13
- 王泽云, 曾宪松, 陈传琴, 吴胡蝶, 李琼英, 范高俊, 卢文娟(1978). 从离体花药诱导巴西橡胶植株. 热作科技通讯, (5): 1~7, 19
- 王泽云, 曾宪松, 陈传琴, 吴胡蝶, 李琼英, 范高俊, 卢文娟(1980). 用离体花药诱导巴西橡胶植株的研究. 热带作物学报, 1 (1): 16~26
- 卫志明(2003). 花药和花粉培养. 见: 余叔文, 汤章诚主编. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 16~29
- 吴胡蝶, 王泽云, 陈雄庭(1994). 6-BA、ABA对橡胶花药体细胞胚形成及植株再生的影响. 热带农业科学, (3): 1~4
- 杨少琼, 莫业勇(1994). 两个巴西橡胶无性系的花药体细胞植株胶乳的生理特性. 热带作物学报, 15 (2): 13~20
- 曾宪松, 张树珍, 张银东, 郑学勤, 陈惠吟, 郑楷(1997). 离体培养橡胶树体细胞诱导纯多倍性无性系方法的研究初报. 热带作物学报, 18 (2): 15~20
- 张冰玉, 苏晓华, 周祥明, 纪丽丽, 黄秦军, 张香华(2003). 林木花药培养研究进展及展望. 植物学通报, 20 (6): 656~663
- 朱睦元, 徐阿炳, 袁妙葆, 黄纯农, 黄培忠(1990). 基因型和培养条件对大麦花药培养的影响. 植物学通报, 7 (1): 8~21
- Arokiaraj P, Jones H, Cheong KF, Coomber S, Charlwood BV (1994). Gene insertion into *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Rep, 13 (8): 425~431
- Arokiaraj P, Jones H, Jaafar H, Coomber S, Charlwood BV (1996). Agrobacterium-mediated transformation of *Hevea* anther calli and their regeneration into plantlets. J Nat Rubber Res, 11 (2): 77~87
- Arokiaraj P, Yeang HY, Cheong KF, Hamzah S, Jones H, Coomber S, Charlwood BV (1998). CaMV 35S promoter directs β -glucuronidase expression in the laticiferous system of transgenic *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Plant Cell Rep, 17 (8): 621~625
- Carron MP, Lardet L, Dea BG (1998). *Hevea* micropropagation by somatic embryogenesis. Plantations Res Dev, 5 (3): 187~192
- Fridborg G, Eriksson T (1975). Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. Physiol Plant, 34: 306~308
- Guha S, Maheshwari SC (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, 212: 497~498
- Johansson L, Andersson B, Eriksson T (1982). Improvement of anther culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium elevated CO₂ concentration. Physiol Plant, 54: 24~30
- Kintzios S, Fischbeck G (1994). Anther culture response of *Hordeum spontaneum*-derived winter barley lines. Plant Cell Tiss Org Cult, 37 (2): 165~170
- Kiviharju EM, Tauriainen AA (1999). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and kinetin in anther culture of cultivated and wild oats and their interspecific crosses: plant regeneration from *A. sativa* L. Plant Cell Rep, 18 (7~8): 582~588
- Nitsch C, Norreel B (1973). Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture. Basic Life Sci, 2: 129~144
- Paranjothy K, Ghandimathi H (1975). Morphogenesis in callus cultures of *Hevea brasiliensis*. In: Malaysia (ed). Proc Natl Plant Tissue Cult Symp, 19~25
- Paranjothy K, Ghandimathi H (1976). Tissue and organ culture of *Hevea*. Proc Int Rubber Conf, (2): 59~84
- Satchuthanathavale R (1973). *Hevea* tissue culture. Quart J Rubber Res Inst Ceylon (Sri Lanka), 50 (1~2): 91~97
- Satchuthanathavale R, Irugulbandara ZE (1972). Propagation of callus from *Hevea* anthers. Quart J Rubber Res Inst Ceylon, 49 (3~4): 65~68
- Sunderland N (1978). Strategies on the improvement of yield in anther culture. Proc Symp Plant Tiss Cult. Beijing: Science Press, 65~86
- Veisseire P, Linossier L, Coudret A (1994). Effects of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tiss Org Cult, 39 (3): 219~223
- Wilson HM, Eisa M, Irwin SWB (1976). The effects of agitated liquid medium on *in vitro* cultures of *Hevea brasiliensis*. Physiol Plant, 36: 399~402
- Wilson HM, Street HE (1975). The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension culture of *Hevea brasiliensis*. Ann Bot, 39: 617~682
- Yang Q, Chauvin JE, Hervé Y (1992). A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Plant Cell Tiss Org Cult, 28 (3): 289~296