

文章编号:1674-7054(2010)04-0307-07

橡胶树热研 88-13 品种珠心易碎愈伤组织 诱导及其胚状体发生

李哲¹, 戴雪梅¹, 孙爱花¹, 黄天带¹, 周权男¹, 黄华孙¹, 林位夫¹,
Ludovic Lardet², Pascal Montoro², Marc-Philippe Carron²

(1. 中国热带农业科学院 橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学重点开放实验室, 国家重要热带作物
工程技术研究中心, 海南 儋州 571737; 2. 法国农业研究国际合作中心, 法国 蒙彼利埃 34398)

摘要:以橡胶树热研 88-13 品种的幼嫩种子的珠心组织为材料, 诱导出胚性愈伤组织。对胚性愈伤组织诱导培养基、继代培养基中不同的影响因素如植物生长调节剂的种类和浓度、钙离子浓度等进行了研究, 筛选到了合适的影响因素。经过连续 5 个月的继代选择培养, 逐渐诱导出易碎的胚性愈伤组织。对易碎胚性愈伤组织进行了长期继代培养。组织学切片证明长期继代培养的愈伤组织维持了胚性的状态。取继代培养了 2 年多的橡胶树热研 88-13 品种的珠心易碎胚性愈伤组织诱导胚状体, 得到了 186 个胚状体, 正在诱导植株再生。

关键词: 橡胶树; 珠心; 易碎胚性愈伤组织; 长期继代培养; 胚状体

中图分类号: Q 943.1

文献标志码: A

天然橡胶是国家重要战略资源, 其主要来源于橡胶树(*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) 产生的胶乳。目前, 我国天然橡胶的消费量逐年增加, 天然橡胶的产量已不能满足消费的需求, 缺口逐年加大。橡胶树的产量和抗逆性状等都亟待提高。橡胶树育种周期长, 且遗传背景复杂, 重要性状受多基因控制, 因此, 应用常规的育种方法进行品种改良很困难。近 30 年来, 植物组织培养技术、细胞工程、基因工程技术的兴起和迅速发展为橡胶树品种改良创造了条件。

目前, 已报道的经过组织培养得到再生植株的橡胶树的不同外植体或材料有: 花药^[1-2]、胚珠^[3-4]、子房^[4]、内珠被^[5-6]、子叶^[7]、组织培养无菌根^[8]、原生质体^[9]等, 它们都是经过胚状体发生途径得到的再生植株, 其中用橡胶树花药进行培养得到再生植株的报道较多。通过组织切片观察和染色体计数实验, 王泽云等^[10]认为: 花药培养产生的全部胚状体来源于体细胞愈伤组织的外围; 花药培养产生的愈伤组织、胚状体和植株属二倍体; 花药植株的田间遗传表现表明植株起源于体细胞, 因此, 花药植株保持了母本的性状。

柑橘亚科植物珠心组织培养工作始于 20 世纪 70 年代初, 以色列研究者在培养柑橘属甜橙类品种的珠心组织时, 获得了可长期继代培养的胚性愈伤组织, 这些愈伤组织可以保持胚状体发生能力; 利用这些实验材料, 分离得到原生质体, 从原生质体形成了胚状体, 进而获得了再生植株^[11-12]。柑橘亚科一些植物材料的珠心组织具有强的胚性。

橡胶树易碎胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚发生植株再生(长期路线组织培养)研究起始于法国农业研究国际合作中心(CIRAD)。Montoro 等^[13]通过调节培养基中的钙离子浓度、植物生长调节剂等不同

收稿日期: 2010-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760128); 科技部国际科技合作项目(2008DFA32020); 海南省重点科技项目(070105); 行业科技专项子课题(nyhyzx07-033-6); 基本科研业务费专项资金项目(XJSY-WFZX2009-01); 农业部“948”项目(2010-S7)

作者简介: 李哲(1971-)男, 广东新兴人, 中国热带农业科学院橡胶研究所副研究员, 博士。

影响因素,从橡胶树品种 PB260 和 GT1 幼嫩种子内珠被诱导出易碎胚性愈伤组织。Etienne 等^[6]以长期继代培养的橡胶树 PB260 品种内珠被易碎胚性愈伤组织为材料,研究了不同因素对易碎胚性愈伤组织的长期继代培养、体细胞胚发生和植株再生的影响;每克鲜质量易碎胚性愈伤组织可产生 355 个体细胞胚,体细胞胚萌发率为 35%。这一研究工作路线的开展具有重要性。

橡胶树热研 88-13 品种是中国热带农业科学院橡胶研究所选育的中规模推广品种,生长迅速,产量较高,干胶含量较高,胶乳质量好。其花药培养胚状体的发生率和植株再生率与其他橡胶树品种或材料的相比较。本研究以其珠心组织为材料,诱导松软易碎的胚性愈伤组织,观察其胚性发生能力,探索经过长期继代培养诱导胚状体发生的条件,并开发其作为选育新的育种材料的应用潜力。

在橡胶树林中,幼果的形成经过了自然授粉,珠心组织内精子和卵子结合,形成受精卵,因此,珠心内遗传性状与母本植株不同。开花后约 8 个星期的橡胶树幼嫩果实的果皮幼嫩,易切割,可方便获取胚珠内的珠心组织(此时幼胚肉眼看不见;当幼胚肉眼可见时,果皮已硬,且较难切割)。通过珠心组织培养可得到再生植株,再生植株可以作为品种选育的新材料。目前尚未见选用橡胶树珠心组织进行组织培养的报道。

1 材料和方法

1.1 材料 橡胶树热研 88-13 品种的幼嫩果实为 2008 年 8 月取自海南省儋州市西庆农场附近的橡胶林,并取其珠心为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 珠心组织的接种 用自来水把幼嫩果实的果皮外表面冲洗干净。在超净工作台上用 $\varphi = 75\%$ 酒精浸泡 1 min,用无菌水冲洗;用 $\varphi = 0.1\%$ 升汞浸泡 10 min,用无菌水冲洗 6 遍,在无菌条件下用经过高温消毒的锋利解剖刀切开果实,去除果皮,取出胚珠(图版 1-A)。剖开胚珠,切取珠心组织(图版 1-B),将珠心组织切成 $2\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 的小片段,将珠心组织小片段放入愈伤组织诱导培养基中进行培养。

1.2.2 珠心胚性愈伤组织的诱导 愈伤组织诱导培养基 NIN1 参考文献 [5] 和 [13] 的方法,以 MH 为基本培养基,添加 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, $80\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $7\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉, pH5.8。在培养基 NIN1 中分别加入 $0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D, 观察生长素 2,4-D 对诱导出的珠心愈伤组织状态的影响。含 2,4-D 的各种 NIN1 培养基各配 1 L, 且每升分别分装于 30 个直径为 9 mm 的培养皿中, 在每个培养皿中接入 10 片 $2\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 的珠心组织小片段, 即每种培养基共接入 300 片珠心组织小片段。

愈伤组织诱导培养基 NIN2 参考文献 [5] 和 [13] 的方法, 以 MH 为基本培养基, 添加 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $80\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $7\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉, pH5.8。在培养基 NIN2 中分别加入 $0.05, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, 观察细胞分裂素 KT 对诱导出的珠心愈伤组织状态的影响。含 KT 的各种 NIN2 培养基各配 1 L, 且每升分别分装于 30 个直径为 9 mm 的培养皿中, 在每个培养皿中接入 10 片 $2\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 的珠心组织小片段, 即每种培养基共接入 300 片珠心组织小片段。

经过以上筛选, 确定橡胶树热研 88-13 品种的珠心胚性愈伤组织诱导的适宜培养基 NIN。配制 NIN 培养基, 接种热研 88-13 品种的珠心组织片段, 诱导出鲜黄色紧致颗粒状胚性愈伤组织, 转入珠心胚性愈伤组织长期继代培养基, 进行诱导易碎胚性愈伤组织的研究。

MH 基本培养基成分^[5]: $1\ 601\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4NO_3 , $2\ 022\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , $333\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $276\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $9.28\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3BO_3 , $16.9\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $11.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.37\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.83\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KI, $92.37\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2SO_4 , $5.4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ inositol, $0.46\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nicotinic acid, $0.62\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pyridoxine HCl, $0.67\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ thiamine HCl, $0.048\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ biotin, $0.37\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ glycine, $0.46\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Cysteine HCl, $0.17\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ascorbic acid, $80\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Sucrose; pH5.8。

1.2.3 橡胶树珠心胚性愈伤组织长期继代培养 珠心胚性愈伤组织长期继代培养基 NLS 是以 MH 为基本培养基, 添加 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $80\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Phytagel (Sigma 公司),

pH5.8。在继代培养培养基 NLS 中分别加入 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 13.0 mmol · L⁻¹ 的 CaCl₂, 观察不同钙离子浓度对珠心愈伤组织的继代状态的影响。含不同钙离子浓度的培养基各配 1 L, 且每升分别分装于 30 个直径为 9 mm 的培养皿中, 在每个培养皿中接入 8 块从愈伤组织诱导培养基 NIN 中诱导出来的鲜黄色紧致颗粒状胚性愈伤组织, 即每种培养基共接入 240 块鲜黄色紧致颗粒状胚性愈伤组织, 诱导珠心易碎胚性愈伤组织。

1.2.4 石蜡组织切片制作 取经过 2 a 继代培养的珠心易碎胚性愈伤组织, 用 FAA 固定液固定, 按常规石蜡切片法切片^[14], 切片厚 6 ~ 8 μm, 苏木精染色(铁矾分色), 在德国 Leica AMI6000 生物显微镜下观察其细胞组织学状况并摄影。

1.2.5 易碎胚性愈伤组织胚状体诱导 取 60 个培养皿(2 L 培养基)经过 2 年多继代培养的珠心易碎胚性愈伤组织, 参考文献[15]的方法, 接入到胚状体诱导培养基。胚状体诱导培养基为在 MS 基础上添加 2 mg · L⁻¹ NAA, φ = 10% 椰子水, 80 g · L⁻¹ 蔗糖。在胚状体诱导培养基中分别加入 0, 1, 2, 3, 4 mg · L⁻¹ KT (每种培养基分装于 12 个直径为 9 mm 的培养皿)。1 个月换 1 次相同的培养基, 连续培养 2 个月。

1.2.6 培养条件 培养温度为(26 ± 1)℃。愈伤组织诱导、继代培养及诱导胚状体在黑暗条件下进行; 胚状体萌发时, 需光照培养, 光周期为 $L_h:D_h = 16:8$, 光强度为 1 000 lx; 但形成再生植株和试管苗生长时的光强度为 2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 对珠心胚性愈伤组织诱导的影响 在分别含 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 的培养基 NIN1 中, 橡胶树热研 88-13 品种的珠心片段经 1 个月的黑暗培养, 诱导出的愈伤组织的数量分别为 0, 175, 229, 241, 248, 257, 259 块, 愈伤组织诱导率分别为 0, 58.3%, 76.3%, 80.3%, 82.7%, 85.7%, 86.3%。在不含 2,4-D 的培养基中, 诱导不出愈伤组织。在 2,4-D 分别为 1.0, 2.0 mg · L⁻¹ 的培养基中, 愈伤组织呈鲜黄色颗粒状, 呈现胚性愈伤组织的外观(图版 1-C), 且含 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 的培养基中的鲜黄色颗粒状愈伤组织诱导率相对较高。在 2,4-D 分别为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg · L⁻¹ 的培养基中, 虽然愈伤组织诱导率有所提高, 但是愈伤组织逐渐膨大、湿胀, 胚性活性呈现下降的状态。故加入培养基的 2,4-D 含量以 2.0 mg · L⁻¹ 为宜。

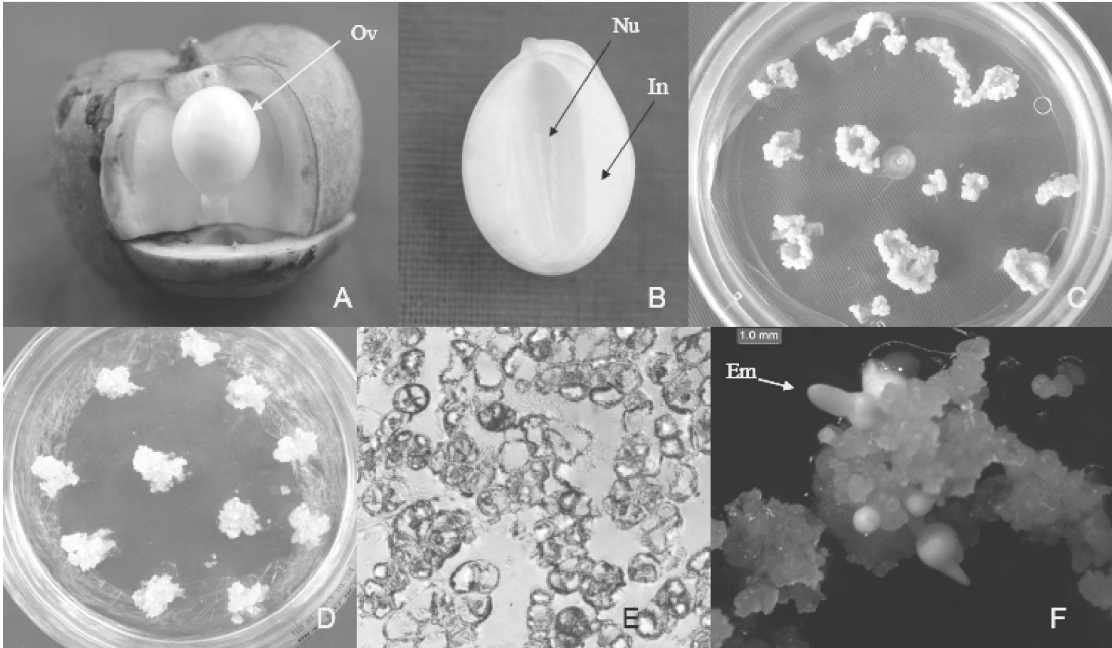
2.2 KT 对珠心胚性愈伤组织诱导的影响 在分别含 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg · L⁻¹ KT 的培养基 NIN2 中, 橡胶树热研 88-13 品种的珠心片段经 1 个月的黑暗培养, 诱导出的愈伤组织的数量分别为 25, 247, 220, 171, 146, 136 块, 愈伤组织诱导率分别为 8.3%, 82.3%, 73.3%, 57.0%, 48.7%, 45.3%。在不含 KT 的培养基中, 只诱导出少量的愈伤组织(8.3%)。在分别含 0.5, 1.0 mg · L⁻¹ KT 的培养基中, 诱导出鲜黄色颗粒状愈伤组织, 呈现胚性愈伤组织的外观, 其中含 0.5 mg · L⁻¹ KT 的培养基中诱导率较高(82.3%)。在分别含 2.0, 3.0, 4.0 mg · L⁻¹ KT 的培养基中, 愈伤组织诱导率下降, 愈伤组织较膨大而致密, 有器官化倾向。故加入培养基的 KT 含量以 0.5 mg · L⁻¹ 为宜。

经过以上研究, 确定橡胶树热研 88-13 品种的珠心胚性愈伤组织诱导的适宜培养基 NIN 为: 以 MH 为基本培养基, 添加 0.5 mg · L⁻¹ IAA, 0.5 mg · L⁻¹ KT, 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D, 80 g · L⁻¹ 蔗糖和 7 g · L⁻¹ 琼脂粉, pH5.8。

2.3 钙离子浓度对珠心胚性愈伤组织易碎性的影响 把橡胶树热研 88-13 品种的珠心鲜黄色紧致颗粒状胚性愈伤组织转到含 CaCl₂ 浓度分别为 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 13.0 mmol · L⁻¹ 的珠心胚性愈伤组织长期继代培养基 NLS 中, 连续继代培养 5 代(每代 25 d 左右)。在不含 CaCl₂ 及含 1.0 mmol · L⁻¹ CaCl₂ 的继代培养基中, 许多愈伤组织褐化死亡, 其余未死亡的愈伤组织长势不良, 保持紧致状态, 逐渐衰老。在含 CaCl₂ 浓度分别为 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mmol · L⁻¹ 的继代培养基中, 许多愈伤组织褐化死亡, 未死亡的愈伤组织中有一部分组织连续继代培养 5 代, 仍然保持紧致的状态。在含 11.0 mmol · L⁻¹ CaCl₂ 的继代培养基中, 许多愈伤组织褐化死亡, 未死亡的愈伤组织中多数组织保持紧致的状态, 但有 1 块愈伤组织逐渐变得松软易碎, 逐渐成为易碎胚性愈伤组织。易碎胚性愈伤组织经过连续多代继代培

养,数量逐渐增多,6 个月以后,每 1 代(25 d 左右)可以增殖 3 倍以上,逐渐得到了大量的易碎胚性愈伤组织(图版 1 - D)。在含 $13.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 的继代培养基中,愈伤组织褐化死亡,未得到易碎胚性愈伤组织。

2.4 珠心易碎胚性愈伤组织的切片观察和胚状体的诱导 取经过 2 年多继代培养的橡胶树热研 88 - 13 品种的珠心易碎胚性愈伤组织做组织学切片观察。从组织学切片可以看到,这些经过长期继代培养的愈伤组织中细胞核大且细胞质浓厚,细胞维持了胚性的特征(图版 1 - E)。把经过 2 年多继代培养的橡胶树热研 88 - 13 品种的珠心易碎胚性愈伤组织接入胚状体诱导培养基中,经过连续 2 代培养(每代约 30 d),于 2010 年秋天,在含 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 的胚状体诱导培养基中,诱导出 75 个胚状体;在含 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 的培养基中,诱导出 111 个胚状体(图版 1 - F)。目前正在诱导胚状体萌发和植株再生。



图版 1 橡胶树热研 88 - 13 品种珠心易碎胚性愈伤组织长期继代培养及其胚状体发生

注: A. 橡胶树幼嫩果实中的胚珠(Ov); B. 橡胶树胚珠剖面图,示珠心(Nu)和内珠被(In); C. 珠心诱导出的鲜黄色紧致颗粒状胚性愈伤组织; D. 继代培养 2 年多的橡胶树热研 88 - 13 品种珠心易碎胚性愈伤组织; E. 继代培养 2 年多的珠心易碎胚性愈伤组织的组织切片(×200),显示愈伤组织保持胚性; F. 珠心易碎胚性愈伤组织诱导出的胚状体(Em)。

3 讨 论

3.1 KT 对诱导橡胶树珠心胚性愈伤组织和长期继代培养的作用 在植物组织培养中,植物生长调节物质对细胞、组织和器官的形成和发育有广泛的调节作用。愈伤组织的生长与分化由生长素与细胞分裂素进行调控。细胞分裂素可以促进愈伤组织的细胞增殖以及芽形成和叶绿体发育,并在植物生长发育的各个时期有重要调节作用,它可以促进养分分配、延缓叶片衰老、促进侧芽生长、抑制茎和根部细胞延伸,调节营养代谢基因、叶绿体发育基因和其他功能基因的表达^[16]。细胞分裂素一般在幼嫩器官(如种子、幼果、嫩叶和根尖)中含量高。细胞分裂素在胚中含量最多,约为花组织中含量的 2 倍,为植株顶端分生组织、幼叶中含量的 5 倍^[17]。

在核桃的组织培养中^[18],离体幼胚在只添加 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 - BA 的改良 DKW 培养基中,经过 20 d 左右的黑暗培养,可以形成胚性愈伤组织或直接产生胚状体。在大花蕙兰的组织培养中^[19],作为一种细胞分裂素,KT 对其茎段诱导胚性愈伤组织和体细胞胚发生的影响均达极显著水平,其中对体细胞胚发生的作用比生长素 2,4 - D 和 NAA 的作用大。对小麦幼胚胚性愈伤组织的诱导研究表明^[20],在添加 2,4 - D 的培养基中附加不同浓度的 KT,KT 对小麦胚性愈伤组织的诱导率和生长量有显著的影响;有两种基因

型的小麦幼胚胚性愈伤组织随着培养基中 KT 浓度的提高,愈伤组织的平均鲜质量和胚性愈伤组织诱导率均逐步增加;而另外 1 种基因型小麦幼胚胚性愈伤组织则在 KT 质量浓度为 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的平均鲜质量和胚性愈伤组织的诱导率随 KT 质量浓度的提高而增加,之后则随 KT 质量浓度的提高而下降。

本研究也表明,一定浓度的 KT 对于橡胶树珠心胚性愈伤组织的诱导和易碎胚性愈伤组织筛选和长期继代培养有良好的促进作用,浓度较高则不利于胚性愈伤组织的诱导和长期继代培养。

关于细胞分裂素的调控机理,目前已有一些研究,如已有研究者用生物化学方法分离出多种细胞分裂素结合蛋白,因此研究者推测在细胞分裂素信号转导途径中主要包括非激素依赖的 CKI1 途径和激素依赖的 CRE1 途径^[21]。这两个途径包括许多富含组氨酸的磷酸基团转移因子以及大量反应调节因子,它们都需要通过一系列由组氨酸到天冬氨酸的磷酸化才可以激活^[22]。

3.2 高钙离子浓度对橡胶树珠心易碎胚性愈伤组织诱导有良好作用 钙是影响植物细胞分化的重要培养因素,对胚状体发生起重要作用^[23-24]。钙离子是第二信使,它把细胞外的信号转导入细胞内,并对膜的稳定性和细胞壁的刚性起作用。有研究表明,钙离子对植物细胞中的多糖合成和分泌具有显著影响^[25-26]。钙参与了果胶酸离子键的建立,但若质外体中(包括细胞壁、细胞间隙、胞间层以及导管的空腔等)含有饱和浓度的钙离子,能转变离子平衡,引起果胶酸解聚。

Montoro 等^[13]用橡胶树 PB260 等品种内珠被进行培养,在含高浓度钙离子的培养基中,诱导出了易碎的胚性愈伤组织。他们发现,易碎愈伤组织主要由包埋于粘质基质中的胚性细胞和处于早期发育阶段的原胚组成,细胞间的中胶层富含多糖粘质;这些愈伤组织之所以松散易碎,是因为在高浓度钙离子的作用下,愈伤组织细胞之间发生解聚。

本研究以中国自主选育出来的橡胶树热研 88-13 品种珠心片段为材料,在高浓度钙离子($11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)及植物生长调节剂的作用下进行培养,也诱导出了鲜黄色松软易碎的胚性愈伤组织。从组织学切片可以看到,这些经过长期继代培养的愈伤组织中细胞的核大,细胞质浓厚,细胞维持了胚性的特征。它们能诱导出胚状体,诱导植株再生的实验正在进行。

3.3 培养易碎胚性愈伤组织可以为开展橡胶树生物技术研究提供重要基础条件 从不同植物的不同外植体可以诱导出松软易碎的胚性愈伤组织,经过长期继代培养,诱导出许多再生植株。松软易碎的胚性愈伤组织也有利于进行胚性细胞悬浮培养,从而进一步开展原生质体(单细胞)培养研究。这些为开展植物生物技术研究以及转基因研究提供了良好的植株再生体系。

松散易碎的胚性愈伤组织中含有大量胚性细胞,细胞呈球型,细胞核大,细胞质浓厚,细胞分裂能力强,胞间联系不紧密,结构松散,生长旺盛,色泽鲜艳(一般呈鲜黄色)。Ma 等^[27]用黑麦未成熟花序诱导出易碎的胚性愈伤组织,具有高度的植株再生能力;用这些易碎的胚性愈伤组织建立了胚性细胞悬浮系,游离得到了大量原生质体,从原生质体培养得到的小愈伤组织中有 7% 分化出再生植株。He 等^[28]用 2 个玉米基因型的花粉诱导出易碎的胚性愈伤组织,建立了胚性单倍体细胞悬浮系,可以长期保持胚性能力(2 a),从继代培养的易碎的花粉胚性愈伤组织中游离出原生质体,得到了再生植株。赖钟雄等^[29]用荔枝幼胚诱导和筛选出松散型胚性愈伤组织,以这种松散的胚性愈伤组织作为起始材料,建立了分散性良好的胚性悬浮细胞系,诱导出胚状体,得到了许多完整再生植株。李哲^[30]用大蕉未成熟雄花诱导出鲜黄色易碎胚性愈伤组织,这些松软易碎的愈伤组织经过 6 年多的长期继代培养,仍然保持胚性能力,且可以诱导出芽,得到了许多再生植株。法国农业研究国际合作中心(CIRAD)的 Blanc 等^[31]以长期继代培养的从橡胶树 PB260 品种内珠被诱导出的易碎胚性愈伤组织为材料,建立了根癌农杆菌介导的有效的遗传转化体系,从 6 个愈伤组织系得到了 374 株转基因植株。

橡胶树花期短(只有 10 多天),给取材带来很大困难。开展橡胶树生物技术研究受到其生殖特性的严重限制。由于植物松散易碎的胚性愈伤组织能长期继代培养,大量增殖,并保持胚性,能经过胚状体发生途径得到再生植株,在悬浮培养过程中易于分散,适合进行悬浮培养。开展橡胶树易碎胚性愈伤组织的诱导和长期培养植株再生研究,将为开展其生物技术研究提供方便。

参考文献:

- [1] 陈正华, 陈发祖, 钱长发, 等. 三叶橡胶花粉植株的诱导[J]. 遗传学报, 1978, 5(2): 99–107.
- [2] 王泽云, 曾宪松, 陈传琴, 等. 从离体花药诱导巴西橡胶植株[J]. 热作科技通讯, 1978, (5): 1–7, 19.
- [3] 郭高发, 贾学军, 陈伦兴. 离体胚珠诱导巴西橡胶植株[J]. 遗传, 1982, 4(1): 27–28.
- [4] 肖三元, 陈正华. 三叶橡胶树未授粉子房、胚珠培养再生植株研究初报[J]. 云南热作科技, 1994, 17(3): 18–20.
- [5] CARRON M P, ENJALRIC F, LARDET L, et al. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) [M]// Bajaj YPS (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin: Springer-Verlag, 1989:222–245.
- [6] ETIENNE H, LARTAUD M, CARRON M P, et al. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48 (306): 129–137.
- [7] HUANG T D, LI W G, HUANG H S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of *Hevea brasiliensis* [C]// MATHEW N M, JACOB C K, NAIR M G S, et al. Theses Compilation of the International Natural Rubber Conference. International Natural Rubber Conference, India, 6–8 November 2005, Kottayam, Kerala, India; Rubber Research Institute of India, 2005:79.
- [8] ZHOU Q N, JIANG Z H, HUANG T D, et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*; Preprints of Proceedings of IRRDB International Rubber Conference 2010, Sanya, Hainan, China, October 18–19, 2010[C]. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, 2010.
- [9] SUSHAMAKUMARI S, ASOKAN M P, ANTHONY P, et al. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 61: 81–85.
- [10] 王泽云, 吴胡叶, 曾宪松, 等. 巴西橡胶花药胚的发生和花药植株起源的研究[J]. 热带作物学报, 1984, 5 (1): 9–13.
- [11] KOCHBA J, SPIEGEL-ROY P, SAFRAN H. Adventive plants from ovules and nucelli in citrus [J]. Planta, 1972, 106: 237–245.
- [12] VARDIA, SPIEGEL-ROY P, GALUN E. Plant regeneration from *Citrus protoplasts*; Variability in methodological requirements among cultivars and species [J]. Theor Appl Genet, 1982, 62: 171–176.
- [13] MONTORO P, ETIENNE H, MICHAUX-FERRIERE N, et al. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1993, 33: 331–338.
- [14] 郑国锷, 谷祝平. 生物显微技术[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1992: 381–383.
- [15] 吴蝴蝶, 王泽云, 陈雄庭, 等. 影响橡胶体细胞胚萌发成植株的几个因素[J]. 热带作物研究, 1997(2): 5–8.
- [16] SCHMÜLLING T, SCHAFFER S, ROMANOV G. Cytokinin as regulators of gene expression [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100: 505–519.
- [17] SÁENZ L, JONES L H, OROPEZA C. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.) [J]. Plant Growth Regulation, 2003, 39:205–215.
- [18] 袁巧平, 董茂山, JAY-ALLEMAND C. 离体培养条件下核桃器官发生和体细胞胚胎发生[J]. 林业科学, 1990, 26(6): 495–499.
- [19] 李杰, 黄敏仁, 王明麻, 等. 植物外源激素对大花蕙兰体胚发生影响的研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(4): 65–68.
- [20] 王睿辉, 陈耀锋, 高秀武, 等. 激素对小麦幼胚胚性无性系高频率诱导的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29 (1): 33–36.
- [21] HWANG I, SHEEN J. Two component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal Transduction [J]. Nature, 2001, 413: 383–389.
- [22] BRANDSTATTER I, KIEBER J J. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10: 1009–1019.
- [23] ROBERTS A W, HAIGLER C H. Tracheary-element differentiation in suspension-cultured cells of *Zinnia* requires uptake of extracellular Ca^{2+} [J]. Planta, 1990, 180: 502–509.
- [24] TANIMOTO S, ISHIOKA N. Studies on bulblet differentiation in bulb-scale segments of *Lilium longiflorum* [J]. Bulletin Faculty of Agriculture, Saga University, 1991, 71: 61–70.
- [25] BRUMMELL D A, MACLACHLAN G A. Calcium antagonist interferes with auxin-regulated xyloglucan glycosyltransferase levels in pea membranes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 1014:298–304.
- [26] MORRIS M R, NORTHCOOTE D H. Influence of cations at the plasma membrane in controlling polysaccharide secretion from sycamore suspension cells [J]. Biochemistry Journal, 1977, 166: 603–618.
- [27] MA R, GUO Y D, PULLI S. Somatic embryogenesis and fertile green plant regeneration from suspension cell-derived protoplasts of rye (*Secale cereale* L.) [J]. Plant Cell Rep, 2003, 22(5): 320–327.

- [28] HE G Y, ZHANG J R, LI K X, et al. An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2006, 86(1):15-25.
- [29] 赖钟雄, 黄浅, 林秀莲, 等. 荔枝胚性悬浮细胞系的快速建立及其体胚植株的再生[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(1): 28-32.
- [30] 李哲. 大蕉幼雄花易碎胚性愈伤组织长期继代培养及其植株再生[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(1): 27-31.
- [31] 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 Rep*, 2006, 24: 724-733.

Nucellus Friable Callus Induction and its Embryoid Ontogeny from Rubber Tree Clone Reyan 88-13

LI Zhe¹, DAI Xue-mei¹, SUN Ai-hua¹, HUANG Tian-dai¹, ZHOU Quan-nan¹, HUANG Hua-sun¹
LIN Wei-fu¹, Ludovic Lardet², Pascal Montoro², Marc-Philippe Carron²

(1. Rubber Research Institute, CATAS; Key Laboratory of Rubber Biology, Ministry of Agriculture; State Engineering and Technology Research Center for Key Tropical Crops, Danzhou 571737, China; 2. UMR-1098 Biologie du développement des Espèces Pérennes, CIRAD, TA 80/03, Avenue d'Agropolis, Montpellier Cedex 5 France 34398)

Abstract: The nucellar tissue from the young seeds of rubber tree clone Reyan 88-13 was used to induce embryogenic callus. The different culture parameters such as the different types and concentrations of plant growth regulators and different calcium concentrations in embryogenic callus induction media and subculture media had been analyzed and the optimal culture parameters had been determined. Through continuous subculture and selection for 5 months, friable embryogenic callus had been gradually obtained. Long term subculture had been carried on for the friable embryogenic calli. Histological sections proved that the calli proliferated by long term subculture maintained the embryogenic characters. The nucellar friable and embryogenic calli of rubber tree clone Reyan 88-13 that had been subcultured for more than 2 years were used for inducing embryoids, and 186 embryoids were obtained, which were being used to induce plant regeneration.

Key words: *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.; nucellus; friable embryogenic callus; long-term subculture; embryoid

(上接第306页)

Study on Optimization of ISSR Reaction System for Carrot

QIU Feng-yan¹, DENG Yong-chuan², LIN Qi-feng², LIU Guo-min¹

(1. Institute of Kudingcha, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Institute of Biology Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The improved CTAB method was used to extract genomic DNA of *Daucus carota* L. var. *sativa*, which were used as the template for ISSR-PCR. A optimal ISSR-PCR reaction system suitable to *Daucus carota* L. var. *sativa* DC. was established via single factor experiments. The optimal ISSR-PCR system was that 25 μ L reaction solution contained 2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 2.5—3.0 mmol $\cdot$ L⁻¹ Mg²⁺, 200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs, 1.5U *Taq* polymerase, 0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ primers, 20ng DNA template. The optimized amplification program was that pre-denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 4min, then denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 40 s, primer annealing at 48 $^{\circ}$ C—58 $^{\circ}$ C for 45 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 2 min, for 35 cycles, extension at 72 $^{\circ}$ C for 8min. The products were stored at 16 $^{\circ}$ C. 24 effective primers were screened out.

Key words: *Daucus carota* L. var. *sativa* DC.; ISSR; optimization