

巴西橡胶树胚性组织长期继代保存及增殖技术

赵 辉² 崔百明¹ 彭 明^{1*} 王科勇² 单国艳² 林崇忠²

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101

2 华南热带农业大学 海南 儋州 571737

摘 要 在橡胶树花药组织培养过程中,利用胚诱导过程后期产生的不同生理阶段的胚性组织进行继代增殖和成胚性研究,试验表明:1)心形胚及前期的胚性组织能继代增殖,多次继代增殖后的组织,经胚诱导过程 1~3 个月能成倍形成鱼雷胚,大大提高了橡胶花药组培的成胚率;2)胚性愈伤是适合长期继代和增殖保存的最好材料,经 2 a 的继代保存增殖率和成胚率不下降,其最大继代增殖能力还在测试中;3)在继代增殖培养基上,胚性组织按原有形态增殖,通过选取同一生理阶段的胚性组织进行继代,可控制体胚发育过程,促进体胚发育同步进行。

关键词 巴西橡胶树 花药组培 胚性愈伤 增殖培养

中图分类号 S794.1 Q813.1²

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)属大戟科橡胶树属为多年生乔木,常规育种周期长,选育种受到很大的限制。为了拓宽巴西橡胶树育种途径,从 20 世纪 50 年代以来,橡胶育种学家们即开始着手研究其组织培养技术,特别是 20 世纪 70 年代以来,我国、马来西亚、法国、印度、印度尼西亚、斯里兰卡等国投入大量的人力、物力、财力对这项技术进行广泛的研究^[1],目前在花药培养、未授粉胚珠和子房培养、茎尖及嫩茎培养、悬浮细胞培养、原生质体培养、体细胞植株的克隆增殖和遗传转化等方面都取得了一定的进展。花药培养是巴西橡胶树组织培养中研究较早和较多的一个方向,迄今,我国花药植株的大田栽培面积已有近千亩(约 66.67 hm²),与传统的芽接苗相比,花药植株具有生长速度快、干胶产量高、抗逆性强的特点,橡胶树花药植株未来可能成为主要的种植材料^[2,3]。目前,花药培养中存在的主要问题是:外植体取材受橡胶开花时间的限制,一些品种脱分化愈伤组织成胚率较低,易褐化死亡,难以长期继代保存,因而植株再生频率低,生产成本低,无法满足生产中对组织培养苗的大量需求和建立高效遗传转化体系的需要。为提高橡胶树组织培养效率,寻找更好的适于转化的受体,克服橡胶脱分化愈伤转化效率低等问题,本研究探索利用花药组织培养中经胚诱导过程后产生的不同生理阶段的胚性组织进行继代培养。本文报道研究结果。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本试验种植材料为巴西橡胶(*Hevea brasiliensis*)品种热研 7-33-97,橡胶花采自中国热带农业科学院试验农场。

1.2 方 法

1.2.1 脱分化愈伤组织诱导 以橡胶树的春花、夏花、秋花作为花药培养的外植体。选取发育阶段处于单核晚期的雄花,用纱布包好,75%(v/v)酒精表面消毒 30~60 s,再以 0.1%(g/v)升汞浸泡消毒 13 min,最后用无菌水清洗 4~5 遍,然后剥出花药,接种于愈伤组织诱导培养基上,培养温度为 28℃,暗培养 30~50 d 后转入胚状体诱导培养基。

1.2.2 胚性组织诱导 转入胚诱导培养基的脱分化愈伤组织经约 3 个月的暗培养后,从部分褐化的脱

国家自然科学基金项目《橡胶抗寒转基因种质研究》(批准号:30460114)

赵 辉 女,1978 年生,硕士研究生,助研。E-mail: zhaohui78@sohu.com。

* 通讯作者,彭 明,男,1956 年生,博士,研究员。E-mail: mmpeng_2000@yahoo.com

收稿日期:2007-03-05 修回日期:2007-05-10

分化愈伤组织上长出新鲜、松散、深黄色、透明的胚性愈伤组织,之后从这些胚性愈伤组织中进一步分化出球形、心形、鱼雷形胚等,培养温度为 26℃。

1.2.3 胚性组织继代增殖 1) 选取生长良好的胚性愈伤组织和球形、心形、鱼雷形胚等不同生理阶段的胚性组织,接到继代增殖培养基上培养,每 30 d 继代 1 次,多次继代观察生长情况,着重比较胚性组织的增殖能力和继代能力;2) 将能够继代增殖的胚性组织经 3、6、9 次继代后的组织,接到胚诱导培养基上培养,观察出胚和成胚情况;3) 将经 6、9 次继代增殖培养的胚性愈伤组织接到胚状体诱导培养基上,30 d 继代 1 次,2~3 次继代后,再将愈伤组织接到继代增殖培养基上,观察继代增殖情况,再经 3 次继代,将愈伤组织接种到胚状体诱导培养基上,观察胚状体形成情况。培养温度为 26℃,暗培养。

1.3 培养基

脱分化愈伤组织培养基:改良的 MS 培养基(其中 1 600 mg/L KNO_3 、1 000 mg/L NH_4NO_3 、250 mg/L CaCl_2 、0.5 mg/L 叶酸、0.5 mg/L D-生物素、150 mg/L 谷氨酸、5 % (v/v) 椰汁、7 % (g/v) 蔗糖),激素选用 1.5 mg/L 2,4-D+1 mg/L Kt+0.5 mg/L NAA,0.25 % (g/v) phytagel。胚状体诱导培养基:改良的 MS 培养基,其中大量元素减半,微量元素加 1 倍,加 200 mg/L 水解酪氨酸,4 % (g/v) 麦芽糖,3 % (g/v) 蔗糖,0.1 mg/L ABA,激素选用 1 mg/L 6-BA+1 mg/L Kt+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L GA_3 +0.1 mg/L ABA,0.4 % (g/v) phytagel。胚性组织继代增殖培养基:改良的 MS 培养基(其中 170 mg/L KH_2PO_4 、167 mg/L CaCl_2 、7 % (g/v) 蔗糖、150 谷氨酸),激素选用 1.5 mg/L 2,4-D+1 mg/L Kt+0.5 mg/L NAA+0~0.2 mg/L TDZ,0.25 % (g/v) phytagel。

2 结果与分析

2.1 不同生理阶段的胚性组织继代增殖情况

将胚性愈伤组织和球形、心形、鱼雷形胚等不同生理阶段的胚性组织,接到继代增殖培养基上连续继代 3 个月后发现:胚性愈伤组织、球形胚、心形胚按原有形态增殖,即胚性愈伤组织仍增殖形成深黄色透明的愈伤组织,球形、心形胚增殖形成原有形状的胚,如心形胚继代增殖后依然为心形胚;鱼雷形胚在继代增殖培养基上表现为不直接增殖,从白色的子叶上产生脱分化愈伤组织。能够继代的胚性组织,最初的增殖能力都较强,增殖率达 300 % 以上。连续继代 4 个月后发现,球形、心形胚的增殖能力明显下降,胚性组织有老化趋势,而胚性愈伤组织增殖能力无多大变化,仍新鲜健康,但变得有些“水渍状”,之后在继代增殖培养基内加入 0.2 mg/L TDZ,再经几次继代增殖,可消除“水渍状”现象。

以上情况说明:橡胶组织培养中胚性组织在心形胚阶段及以前都可在继代增殖培养基上直接实现继代增殖;胚状体一旦形成鱼雷状白色胚后,其在增殖继代培养基上不能增殖,继代后产生脱分化愈伤组织。早在 1986 年陈正华等^[4]曾指出胚状体分化时间较长,一般需要 2~3 个月,在此期间更换 1~2 次新鲜的相同培养基能够提高胚状体诱导率,之后笔者在试验中进一步发现,在刚出现胚性愈伤组织的时候更换 1 次新鲜的胚诱导培养基,是采取此种措施最有效的时期。这一措施最直接的效果是明显增加了胚性愈伤组织的数量,与笔者用胚性愈伤组织进行继代增殖的效果一致。试验中不同生理阶段的胚性组织继代增殖情况的比较结果表明,胚性愈伤是最适于长期继代增殖保存的材料(图 1),目前笔者已进行了 2 a 的继代,其继代和增殖能力仍然良好。

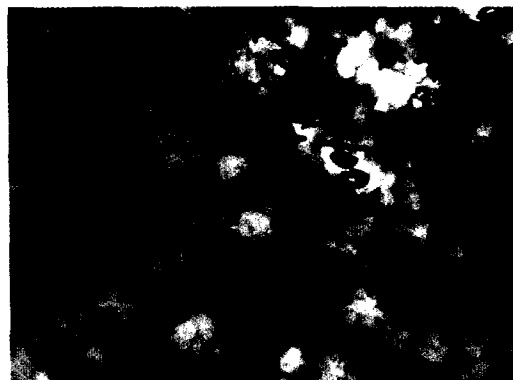


图 1 继代 1 a 的胚性愈伤生长情况

2.2 继代增殖的胚性组织诱导成胚情况

将在继代增殖培养基上继代达 3 个月的组织,接到胚诱导培养基上,1~3 个月后大量形成鱼雷胚,诱导成鱼雷胚的时间由快到慢顺序为:心形胚、球形胚、胚性愈伤。2004 年王亚丽^[5]从细胞学和组织学的角度指出花药愈伤组织在诱导成球形胚或心形胚时,大多数胚状体的发育停留在这一阶段,不能进一步形成鱼雷胚(正常胚)。虽然已有一些采用添加 ABA、GA₃ 等来控制畸形胚发生的报道^[4,6,7],但并未能从根本上解决问题。然而通过本实验,选取一定生理阶段、生长良好的胚性组织进行继代增殖,经适度继代次数后,胚性组织可快速和大量诱导成鱼雷胚和成熟胚,这是提高橡胶花药成胚率的重要途径。3~4 次继代是球形胚、心形胚最适宜的继代增殖次数,因为在继代增殖培养基上继代达 5 次后这些胚性组织表现出老化现象,不利于再次诱导成胚状体。

2.3 长期继代增殖的胚性组织的“复状”

胚性愈伤组织继代增殖 6 个月与继代增殖 3 个月后的愈伤,再次诱导成胚状体所需时间(1~2 个月)和成胚率相近;继代 9 个月后有些愈伤开始出现淡淡的绿色(老化现象)。将继代分别达 6 个月和 9 个月的愈伤转入胚状体诱导培养基内,经 1~2 个月的培养,将愈伤重新转入继代增殖培养基内,此种愈伤可再次长期继代保存,即通过胚状体诱导过程胚性愈伤恢复了继代增殖能力,达到了“复状”目的。并且,当将“复状”后的愈伤,再继代增殖多次后,转到胚状体诱导培养基上,1~3 个月内有大量胚长出(图 2)。此外,经长期继代增殖的愈伤组织在胚状体诱导培养基内也有较强的增殖能力。

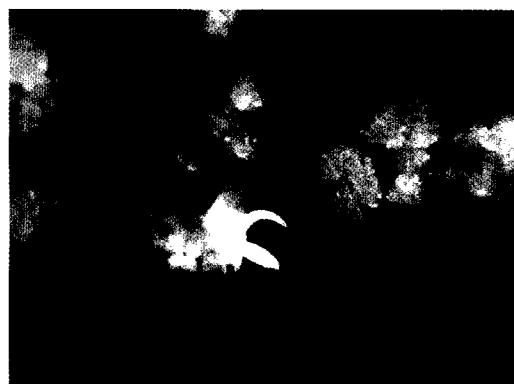


图 2 继代 9 个月的胚性愈伤转入胚诱导培养基 2 个月后的出胚情况

试验结果表明,经长期继代的胚性组织逐渐会有老化现象,可以采用“复状”方法来实现胚性组织“复状”的目的,以延长继代时间,保持增殖效率。“复状”方法:①缩短继代时间;②改变继代增殖培养基内 TDZ 的浓度;③将继代组织转入胚诱导培养基内培养后,再转入继代增殖培养基内继代。单独或结合运用上述复状方法来减少和消除老化现象,第 3 种复状方法或该方法与其它 2 种方法的组合是防止胚性愈伤组织老化,保持其继代和增殖能力的最有效方法。

2.4 通过胚性组织继代增殖技术可实现体胚发育的同步性

通过花药培养获得的花药体细胞植株,走过了类似于胚胎发育的途径,发育阶段回复到幼态^[8]。但体胚发育不像合子胚的发育那样是同步性、顺序性的,时间上也有明显的界限,其整个发育阶段是非同步性的,甚至在子叶胚的阶段,愈伤组织中仍然有胚性母细胞的分裂,在发生过程中存在各个时期的发育^[5]。

在继代增殖培养基上,胚性愈伤、球形胚、心形胚等按原有形态增殖,也就是继代增殖过程阻碍了体胚的进一步分化,促进了同类细胞和组织的增生。通过选取同一生理阶段的胚性组织进行继代,可控制体胚发育过程,促进体胚发育同步进行。

3 讨 论

(1) 胚诱导率和植株诱导率低是花药组织培养中存在的主要问题,也是制约花药体细胞植株工厂化生产的瓶颈,从已有的报道来看,胚状体比较容易诱导成苗的品系如“海垦 2”、“热研 88-13”,其植株诱导率仅有 4%~5%,而其它品系都在 1% 以下^[9-12],通过胚性组织直接继代增殖,可大大提高形成鱼雷胚的效率,从而解决了胚诱导率低的问题。

(2)此外,经常剥取花药接种费工、费钱,还受花期、气候等自然条件的极大限制。利用胚性愈伤组织继代增殖可以弥补以上不足,长期保存健康的可利用组织培养材料,提高实验和生产效率。

(3)胚性组织成功继代增殖为橡胶转化技术提供了新的技术路线。从1994年Arokiaraj等利用基因枪法轰击巴西橡胶脱分化愈伤组织获得了第1株转基因橡胶植株^[13]以来,利用脱分化愈伤组织进行基因枪和农杆菌转化成了巴西橡胶转化的基本技术路线。这类转化路线转化过程长(仅从脱分化愈伤组织诱导成胚状体就需3~4个月),脱分化愈伤组织的继代能力差,特别是农杆菌转化的抑菌、筛选过程中长期使用大量抗生素,对愈伤的生长、胚性组织的形成等都产生了较大的不良影响,转化后的愈伤成胚率极低。然而,通过胚性愈伤组织继代增殖技术可直接继代增殖胚性愈伤组织,这类愈伤组织在继代增殖和胚诱导培养基内都有很强的增殖能力,且保留胚性,转入胚诱导培养基后可较快(1~2个月)成胚。因此,利用继代增殖的胚性愈伤组织进行转化,可以提高成胚率,缩短转化后的成胚时间,为橡胶转化体系的建立开创了崭新的技术路线。

(4)胚性组织成功继代为建立橡胶花药悬浮培养和橡胶原生质体培养提供了大量的好材料。橡胶花药胚性愈伤组织是橡胶悬浮培养和原生质体培养的很好材料^[14]。大量实验结果表明,橡胶花药脱分化愈伤性质不稳定继代3次后就难以成胚。利用胚性愈伤组织细胞悬浮培养的方法,大规模培育体细胞胚苗是橡胶种苗繁育的趋势所在。选择继代增殖能力强,成胚率高的胚性愈伤组织代替脱分化愈伤进行悬浮培养,必将极大推进体细胞胚苗的商品化进程。1991年Cazaux和Auzac^[14]用橡胶叶、茎和胚性愈伤组织分离原生质体,发现只有来源于胚性愈伤组织的原生质体发生细胞分裂并形成愈伤组织。以后Sushamakumari等^[15]、Haris等^[16]、Suraninpon和Techato^[17]均有相似报道。由此可见,胚性愈伤组织继代增殖技术也能为大量制备橡胶树原生质体提供大量的好材料。

参考文献

- 1 Carron M P, Enjalric F, Lardet L, et al. Rubber (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) [J]. Biotechnol Agr Forest, 1989(5): 228~245
- 2 谭德寇,孙雪飘,张家明. 巴西橡胶树的组织培养技术[J]. 植物生理学通讯. 2005, 41 (5): 674~678
- 3 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, 2001, 94(6): 11~15
- 4 陈正华,许绪恩,庞任声,等. 橡胶树属的花药培养及花粉植株的研究[M]. 见: 木本植物组织培养及其应用, 北京: 高等教育出版社, 1986. 481~500
- 5 王亚丽. 巴西橡胶树体外体细胞胚发育的细胞学和组织学研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2004. 4
- 6 吴胡蝶,王泽云,陈雄庭. 6-BA、ABA对橡胶花药体细胞胚形成及植株再生的影响[J]. 热带作物研究, 1994(3): 1~3
- 7 吴胡蝶,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
- 8 陈雄庭. 橡胶速生高产新型种植材料的培育与试种 [C]. 热带作物产业带建设规划研讨会——天然橡胶产业发展论文集. 海南: 中国热带作物学会, 2006. 104~107
- 9 广东省农垦总局、海南省农垦总局编著. 橡胶树良种选育与推广. 广州: 广东科技出版社, 1994. 121~122
- 10 王泽云,曾宪松,陈伟琴,等. 从离体花药诱导巴西橡胶植株[J]. 热带作物科技通讯, 1978, (4): 1~7
- 11 王泽云,曾宪松,陈伟琴,等. 用离体花药诱导巴西橡胶的研究[J]. 热带作物学报, 1980, 1(1): 16~25
- 12 Carron M P, Lardet L, Dea B G. Hevea micropropagation by somatic embryogenesis[J]. Plantations Res Dev, 1998 (5): 187~192
- 13 Arokiaraj P, Jones H, Cheong K F, et al. Gene insertion into *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 425~431
- 14 Cazaux E, Auzac J D. Isolation and culture of *Hevea brasiliensis* protoplasts[J]. Physiol Plant, 1991, 82(1): 1~14
- 15 Sushamakumar S, Asokan MP, Anthony P et al. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2000, 61(1): 81~85
- 16 Haris N, Darussamin A, Dodd W A. Isolation of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg) protoplast from callus and cell suspension[J]. Menara Perkebunan (Indonesia), 1993, 61: 25~31
- 17 Suraninpong P, Te-chato S. Effect of cytokines on cell suspension culture, isolation and culture of protoplast of rubber [J]. Songklanakarin J Sci Technol, 1999, 21(2): 169~177

Proliferation Culture of Somatic Embryonic Tissues of *Hevea brasiliensis*

Zhao Hui² Cui Baiming¹ Peng Ming¹ Wang Keyong² Shan Guoyan² Lin Chongzhong²

1 Institute of Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences
Haikou Hainan 571101

2 South China University of Tropical Agriculture Danzhou Hainan 571737

Abstract Proliferation culture was conducted on the different stages of somatic embryonic tissue obtained from the anther culture of *Hevea brasiliensis*. The different stages of embryonic tissues were maintained under the same proliferation medium. The results showed that the somatic embryonic tissues at or before the stage of heart-shape embryo could be subcultured for proliferation and induced into torpedo embryos after several subcultures, highly increasing the rate of embryo formation during the whole anther culture. The embryonic calli on the first stage of embryo formation were found best for subculture and proliferation, and their growth was healthy after two years of subculture. During the proliferation culture, embryonic tissues proliferated at the same morphological stage as the original, indicating that the development of rubber embryo can be controlled by subculture of a given stage of embryonic tissues.

Key words *Hevea brasiliensis* anther culture embryonic callus proliferation culture