

植物激素(或生长调节物质)在橡胶树组织培养中的应用

孙爱花^{1*}, 李哲¹, 黄天带¹, 杨福孙², 周权男¹

¹ 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; ² 海南大学农学院, 海南儋州 571737

Application of Plant Hormone (or Growth Regulating Substance) in Tissue Culture of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

SUN Ai-Hua^{1*}, LI Zhe¹, HUANG Tian-Dai¹, YANG Fu-Sun², ZHOU Quan-Nan¹

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

提要: 介绍了植物激素在橡胶树组织培养中的应用和研究进展。

关键词: 植物激素; 橡胶树; 组织培养; 愈伤组织; 体细胞胚

橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)属大戟科橡胶树属, 多年生异花授粉乔木。与其他植物一样, 其组织培养的成功与否, 除了要选择合适的外植体、基本培养基、适宜的环境条件以外, 最关键的影响因素就是适量的激素(或生长调节物质)和其浓度配比。尽管各类植物激素(或生长调节物质)的生理作用有相对的专一性, 但在植物激素(或生长调节物质)相互作用中, 彼此之间有重叠和互补效应(Bai 和 Qu 2001; 唐小艳等 2006)。选择合适的激素(或生长调节物质)较为复杂, 且难以掌握, 因此在植物组织培养的各个不同时期, 激素(或生长调节物质)种类及其浓度的筛选始终是组培工作的重点和难点。本文介绍植物激素(或生长调节物质)在橡胶树愈伤组织的诱导、体胚发生、植株再生以及不同外植体离体培养中的应用。

1 在花药培养和内珠被培养中的应用

1.1 愈伤组织的诱导 花药培养和内珠被培养是橡胶树组织培养研究较多的两个方向。在愈伤组织诱导培养基中, 细胞分裂素类物质与生长素类物质共同作用非常重要。经常使用的生长素类物质有 2,4-D、IAA 和 NAA, 细胞分裂素类物质 KT 及 BA, 其浓度范围有 0.5~2.0 mg·L⁻¹ 不等(孙爱花等 2006)。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(王泽云等 1978)。陈正华等(1978)研究激素种类和浓度对花药愈伤组织诱导的结果表明,

要成功地促使橡胶树花药愈伤组织化, 基本培养基中添加激动素和生长素类物质是必须的; 当 3 种生长素类物质(IAA、NAA 和 2,4-D)的浓度均为 2.0 mg·L⁻¹ 时, 以 2,4-D 的效果最好。王泽云等(1980)认为在 MS 基本培养基中添加 5% 椰乳、0.5~1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 和 0.5~1.0 mg·L⁻¹ KT, 蔗糖浓度提高到 7%~10%, 可以提高愈伤组织的诱导率。El-Hadrami 和 D'Auzac (1992a)的研究认为, 在培养的 20 d 内, 浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 的 3,4-二氯苯氧乙酸(3,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3,4-D)和 6-BA 的培养基可以提高橡胶树内珠被愈伤组织胚胎发生的潜力, 培养期间(40~70 d)的腐胺、亚精胺和精胺含量可以保持在一个较高的水平上, 而过氧化物酶活性则维持在一个低的水平上。Montoro 等(1993)认为, 在 MH 基本培养基上, 橡胶树品种 'PR107' 和 'RRIM600' 均可得到易碎的胚性愈伤组织, 而橡胶树品种 'PB260'、'PB235' 和 'GT1' 可得到紧致的胚性愈伤组织; 对于 'PB260' 来说, 3,4-D 或 KT 的浓度从 1.0 mg·L⁻¹ 下降到 0.1 mg·L⁻¹, 或者蔗糖浓度提高到 120 g·L⁻¹ 和 Ca²⁺ 浓度提高到 1.3 g·L⁻¹, 都可提高其愈伤组织易碎性。胚性愈伤组织的易碎性提高后, 胚状体诱导率即提高, 植株再生率也提

收稿 2008-03-17 修定 2008-04-29

资助 国家自然科学基金(30760128)。

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

高。Kumari Jayasree 等(1999)认为, 橡胶树的花药愈伤组织诱导率最高的是培养基中加入 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT。Sushamakumari 等(2000b)的结果显示: 培养基中同时加入 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 的橡胶树花药愈伤组织的诱导率最高。

1.2 胚状体诱导及植株再生 橡胶树体细胞胚途径主要有3个阶段: 愈伤组织的诱导、胚状体诱导和植株再生。吴蝴蝶等(1994)研究 6-BA 和 ABA 影响橡胶花药体细胞胚形成和植株再生的结果表明: 培养基中加入 6-BA 后, 橡胶体细胞胚和植株的诱导率提高。其作用可能是胚胎原始细胞的发育受到促进, 或者是愈伤组织中残留的 2,4-D 对胚胎原始细胞发育的抑制得到消除所致。但添加的浓度要适宜, 一般为 $2\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 浓度过高, 活性太强, 胚状体的发育反而受阻, 不能达到提高植株诱导率的效果; 他们还发现, 添加一定浓度的 ABA 对橡胶花药体细胞的形成及植株再生也有良好的效应。这可能与 ABA 可降低培养基中腐胺水平, 从而抑制体细胞过早萌发, 增加贮藏蛋白质的积累量, 从而提高体细胞胚质量的缘故(崔凯荣等 1993)。吴蝴蝶等(1997)研究 GA_3 影响橡胶体细胞胚萌发成苗的结果表明, 低浓度 GA_3 比高浓度的培养效果好。较高浓度 GA_3 的培养基可促进较大的胚状体在短期内生长, 但易于褐化, 产生畸形胚, 早期夭亡也多, 以致成苗率低。而且植株的茎干细长, 叶片小, 不易移栽成活。因此, GA_3 的浓度以 $0.5\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 较合适, 不宜超过 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。El Hadrami 和 D'Auzac (1992b)认为, 外源多胺有利于巴西橡胶树体胚发生。在不影响巴西橡胶树愈伤组织生长的情况下, 多胺生物合成抑制剂 *DL*- α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)、*DL*- α -二氟甲基精氨酸(DFMA)和甲基乙二醛酸(MGBG)均可明显抑制其体胚发生, 这种抑制作用有时可为外加的亚精胺所解除。Etienne 等(1993a)认为, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 可极大提高胚的生长和胚向植株的转变。Cailloux 等(1996)认为, 增加 $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABA 可提高体细胞胚的成熟性。Etienne 等(1997)认为, 在含高浓度 CaCl_2 的培养基中, 加入适宜浓度的 6-BA 和 3,4-D 可提高胚状体诱导率和植株再生率。Linossier 等(1997)也报道: 添加少量的 ABA 于含有渗透剂的培养基中, 胚向鱼雷

形胚的转变加速, 但其形态并无变化。Kumari Jayasree 等(1999)的结果表明, 在改良的 MS 培养基中加入 $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 和 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, 橡胶树胚状体诱导率最高; Sushamakumari 等(1999)认为, 高浓度的 6-BA 和低浓度的 TDZ 都可促进体细胞胚中丛生芽的形成, 而对于丛生芽的伸长和生根是 6-BA 优于 TDZ。Sushamakumari 等(2000b)研究生长调节剂和蔗糖影响橡胶树体胚发生和植株再生的结果显示: 增加 $0.5\sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GA_3 可极大地促进体胚发生的进程, GA_3 与 ZT 的结合作用优于 GA_3 与 6-BA 或 KT 的结合。Kumari Jayasree 和 Thulaseedharan (2001)研究 GA_3 影响橡胶树体胚诱导和植株再生的实验也表明, 添加 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 的正常胚状体的诱导率提高, 畸形胚也较少。Jayashree 等(2003)比较 3 种多胺(腐胺、精胺和亚精胺)影响巴西橡胶树体细胞胚发生的结果表明, 在 3 种多胺中, 以 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 精胺的胚胎发生率为最高, 达到 58%; 其次是 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚精胺, 达到 40%。随着精胺和亚精胺浓度的进一步提高, 胚胎发生率反而减少。腐胺对体细胞胚发生的影响不明显。Das 等(2003)在以不同浓度的 KT 和 IAA 对 2 个不同品种橡胶树 'RRII105' 和 'SCATC93/114' 的花药愈伤组织诱导胚状体的试验中观察到, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 组合时的 'RRII105' 胚状体的诱导率最高, 达 70%, 比 'SCATC93/114' 高。

2 在细胞悬浮培养中的应用

植物细胞悬浮培养是植物细胞生长的微生物化。有分散性好、细胞形状及细胞团大小大致相同、生长迅速、重复性好、易于控制等特点(方文娟等 2005)。建立细胞悬浮系的前提是胚性愈伤组织的诱导。胚性愈伤组织结构松散、颜色新鲜、分裂能力强、增殖速度快, 而且有胚胎发生能力。由胚性愈伤组织建立的悬浮细胞系生长旺盛, 细胞内含物充实, 可以分离得到大量有活力的原生质体, 且容易培养, 试验重复性好(张志扬和陈信波 2006)。橡胶树细胞悬浮培养最早是以橡胶树幼苗嫩茎的愈伤组织进行悬浮培养(Wilson 和 Street 1975; Wilson 等 1976), 悬浮培养基中只加 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT, 最后得到类似胚状体的结构, 但没有得到再生植株。Veisseire 等(1994b)采用未成熟种子内珠被诱

导的愈伤组织进行悬浮培养, 研究不同细胞分裂素类物质和脱落酸对诱导体细胞胚的结果表明, MH1 增殖培养基中添加适量的 ABA, 更有利于胚状体的诱导; 然后将此培养基中诱导出来的胚转到含有不同浓度的细胞分裂素和腺嘌呤类物质的培养基中, 以生长在含有 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺嘌呤的培养基中的胚状体生长为最好。同年, 他又报道, 添加 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 于液体培养基中可以诱导体胚发生 (Veisseire 等 1994a)。

3 在原生质体培养中的应用

植物原生质体培养及其体细胞杂交是创造新物种、克服不亲和性和遗传转化的比较有效的手段 (汪静儿等 2007)。Cazaux 和 D'Auzac (1994) 在改良的 MS 培养基 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D、 $108 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和铵盐减半) 中采用固体包埋法培养橡胶树原生质体均用的是未成熟种子内珠被诱导的胚性愈伤组织, 结果只得到微愈伤组织, 但未得到再生植株。1995 年他们又报道: 多胺含量变化, 尤其是提高腐胺 / 亚精胺 + 精胺后, 乙烯增多, 可作为橡胶树茎段来源的原生质体培养阻滞的标记, 许多生理现象都与原生质体有丝分裂减少有关 (Cazaux 和 D'Auzac 1995)。还有人认为, 在培养基中添加 TDZ 以代替 6-BA, 原生质体的增殖数量即有较大提高 (Suraninpong 和 Techato 等 1999; 谭德冠等 2005)。Sushamakumari 等 (2000a) 用橡胶树胚性细胞悬浮培养得到的原生质体再进行培养得到了再生植株。

4 在微体繁殖中的应用

橡胶树微体繁殖技术是指将无菌苗切成带有腋芽或顶芽的 1~2 cm 的茎段接种到增殖培养基上, 新芽长到 3~5 cm 时, 再用同样方法切取顶芽或带腋芽的茎段接种到相同的培养基上进行芽的增殖 (黄华孙 2005)。陈雄庭等 (1998) 将橡胶花药苗切段接种在 $\text{MS}+2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基上, 1 周左右侧芽萌发, 30~40 d 新芽可长至 3~5 cm 高, 继代增殖 1 次后, 将增殖芽作为插条, 其基部以 $50\sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 预处理后再插到生根培养基上, 最快的 10 d 左右即可长出根系, 大部分在 20 d 左右长出根系, 生根率达 95%, 生根植株移栽成活率达 85% 以上。Seneviratne 等 (1993) 研究不同培养基组成影响根和苗的结果表明: 芽接种在 $1/2\text{MS}+2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的固体培养基

上培养 4 周后, 根的诱导率、平均长度、质量以及苗的生长都是最好的。Huang 等 (2004) 用 2 周龄大的橡胶树无菌苗的茎尖和茎段进行增殖的结果显示, 培养中添加低浓度的 GA_3 可促进芽的分化, IAA 的效果比 IBA 好; $\text{MS}+2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基更有利于芽的增殖。

橡胶树的离体培养不仅限于花药、内珠被、细胞悬浮培养、原生质体和微繁技术, 还有未授粉的胚珠、子房和子叶等外植体的培养, 植物激素在这些方面的培养中也有一些应用 (郭高发等 1982; 肖三元和陈正华 1994; Huang 2005)。

5 结束语

迄今为止, 橡胶树的组织培养技术还比较落后, 只有少数无性系能通过体细胞胚途径获得再生植株, 且植株再生率较低, 这已经成为建立高效遗传转化体系、从分子水平上进行橡胶树遗传改良的障碍。有关外源的生长调节物质 (激素) 在橡胶树组织培养中的研究已很多, 但其组织培养中内源激素以及外源的生长调节物质与内源激素之间关系的研究还很少 (Etienne 等 1993b, c)。植物激素 (或生长调节物质) 都不是单独对橡胶树的生命活动起调控作用的, 而是彼此之间相互作用后才会达到一定的效果, 因此应该在进一步探明植物激素 (或生长调节物质) 之间相互作用生理机制的基础上, 有针对性地配合使用, 这样才可以提高橡胶树植株的再生率, 从而进一步建立合适的橡胶树遗传转化体系。

参考文献

- 陈雄庭, 王泽云, 吴蝴蝶, 谢玉萍, 郑文茹 (1998). 巴西橡胶自根幼态无性系的试管微繁. 作物学报, 24 (2): 225~230
- 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
- 崔凯荣, 陈克明, 王晓哲, 王亚馥 (1993). 植物体细胞胚胎发生研究的某些现状. 植物通报, 10 (3): 14~25
- 方文娟, 韩烈保, 曾会明 (2005). 植物细胞悬浮培养影响因子研究. 生物技术通报, (5): 11~15
- 郭高发, 贾学军, 陈伦兴 (1982). 离体胚珠诱导巴西橡胶植株 (简报). 遗传, 4 (1): 27~28
- 黄华孙 (2005). 中国橡胶树育种五十年. 北京: 中国农业出版社, 95~104
- 孙爱花, 李哲, 黄天带 (2006). 橡胶树花药的培养. 植物生理学通讯, 42 (4): 785~789
- 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
- 唐小艳, 易自力, 蒋建雄, 刘清波, 陈智勇 (2006). 植物激素在高羊

- 茅组织培养中的应用与进展. 湖南农业科学, (3): 134~136
- 汪静儿, 孙玉强, 祝水金(2007). 棉花原生质体培养与体细胞杂交研究进展. 棉花学报, 19 (2): 139~144
- 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
- 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
- 吴胡蝶, 王泽云, 陈雄庭, 郑文茹, 谢玉萍(1997). 影响橡胶体细胞胚萌发成植株的几个因素. 热带农业科学, (2): 5~8
- 肖三元, 陈正华(1994). 三叶橡胶树未授粉子房、胚珠培养再生植株研究初报. 云南热作科技, 17 (3): 18~20
- 张志扬, 陈信波(2006). 亚麻生物技术研究进展. 生物技术通讯, 17 (5): 834~836
- Bai Y, Qu R (2001). Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. Plant Breed, 120: 239~242
- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linossier L, Coudret A (1996). Longterm somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. Plant Sci, 120 (2): 185~196
- Cazaux E, D'Auzac J (1994). Microcallus formation from *Hevea brasiliensis* protoplasts isolated from embryogenic callus. Plant Cell Rep, 13 (5): 272~276
- Cazaux E, D'Auzac J (1995). Explanation for the lack of division of protoplasts from stems of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*). Plant Cell Tiss Org Cult, 41 (3): 211~219
- Das K, Das G, Dey SK (2003). Optimisation of media components for somatic embryogenesis from anthers *Hevea brasiliensis*. Indian J Nat Rubber Res, 16 (1&2): 60~65
- Etienne H, Lartaud M, Carron MP, Michaux-Ferrière N (1997). Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). J Exp Bot, 48 (306): 129~137
- Etienne H, Montoro P, Michaux-Ferrière N, Carron MP (1993a). Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. J Exp Bot, 44 (267): 1613~1619
- Etienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E, Carron MP (1993b). Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.) during ontogenesis. Plant Sci, 92: 111~119
- Etienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E, Carron MP (1993c). Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.). Plant Sci, 88 (1): 91~96
- El Hadrami I, D'Auzac J (1992a). Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus. Ann Bot, 69 (4): 323~325
- El Hadrami I, D'Auzac J (1992b). Effects of polyamine biosynthetic inhibitor on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis*. J Plant Physiol, 140: 446~452
- Huang TD, Li WG, Huang HS (2004). Micropropagation of shoot apex and shoot stem with axils of cotyledon of *Hevea brasiliensis*. Kunming: Proceedind of IRRDB Conference. Beijing: China Agriculture Press, 58~62
- Huang TD, Li WG, Huang HS, Li Z (2005). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of *Hevea brasiliensis*. International Natural Rubber Conference India 2005, 79
- Jayashree R, Rekha K, Venkatachalam P, Uratsu SL, Danderkar AM, Kumari Jayasree P, Kala RG, Priya P, Sushma Kumari S, Sobha S et al (2003). Genetic transformation and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) transgenic plants a constitutive version of an anti-oxidative stress superoxide dismutase gene. Plant Cell Rep, 22 (3): 201~209
- Kumari Jayasree P, Asokan MP, Sobha S, Sankariammal L, Rekha K, Kala RG, Jayasree R, Thulaseedharan A (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.). Curr Sci, 76 (9): 1242~1245
- Kumari Jayasree P, Thulaseedharan A (2001). Gibberellic acid-regulated embryo induction and germination in *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.). Indian J Nat Rubber Res, 14 (2): 106~111
- Linossier L, Veisseire P, Cailloux F, Coudret A (1997). Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. Plant Sci, 124: 183~191
- Montoro P, Etienne H, Carron MP (1993). Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tiss Org Cult, 33 (3): 331~338
- Seneviratne P, Wijesekera GAS, de Zoysa GM (1993). Acclimatization of micropropagated plants of *Hevea*. J Rubber Res Inst Sri Lanka, 73: 20~30
- Suraninpong P, Te-chato S (1999). Effect of cytokinins on cell suspension culture, isolation and culture of protoplast of rubber. Songklanakarin J Sci Technol, 21 (2): 169~177
- Sushamakumari S, Asokan MP, Anthony P, Lowe KC, Power JB, Davey MR (2000a). Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. Plant Cell Tiss Org Cult, 61 (1): 81~85
- Sushamakumari S, Rekha K, Vinoth Thomas, Sobha S, Jayasree R (1999). Multiple shoot formation from somatic embryos of *Hevea brasiliensis*. Indian J Nat Rubber Res, 12 (1&2): 23~28
- Sushamakumari S, Sobha S, Rekha K, Jayasree R, Asokan MP (2000b). Influence of growth regulators and sucrose on somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence of *Hevea brasiliensis*. Indian J Nat Rubber Res, 13 (1&2): 19~29
- Veisseire P, Cailloux F, Coudret A (1994a). Effect of conditioned media on the somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. Plant Physiol Biochem, 32 (4): 571~576
- Veisseire P, Linossier L, Coudret A (1994b). Effect 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 cultures of *Hevea brasiliensis*. Ann Bot, 39: 671~682