

MS营养成分对橡胶树花药愈伤组织诱导效果的评价

桂明春[#], 李玲[#], 管艳, 唐敏, 田海, 孙小龙, 梁国平^{*}

云南省热带作物科学研究所, 云南景洪666100

摘要: 以橡胶树(*Hevea brasiliensis*)无性系品种‘RRII105’、‘RRIM600’、‘GT1’及‘热垦628’的花药为外植体, 采用正交试验法研究了MS营养成分大量元素(A)、微量元素(B)、有机成分(C)及铁盐(D)对花药愈伤组织诱导的影响, 结果表明: 4种营养成分对花药愈伤组织诱导率及胚状体诱导率的影响差异达极显著水平, 且两指标的影响效应及最优组合在品种间存在的差异较大, 对愈伤组织诱导率而言, ‘RRII105’的主次顺序为A>C>B>D, 最优组合为2/5 (大量元素+微量元素+有机成分)+铁盐; ‘RRIM600’的为A>B>C>D, 最优组合为2/5 (大量元素+微量元素+铁盐)+4/5有机成分; ‘GT1’的为D>A>B>C, 最优组合为4/5 (大量元素+微量元素)+2/5 (有机成分+铁盐); ‘热垦628’的为A>D>C>B, 最优组合为2/5MS。相对于胚状体诱导率来说, ‘RRII105’的主次顺序为B>A>C>D, 最优组合为MS; ‘RRIM600’的为B>A>D>C, 最优组合为4/5大量元素+微量元素+2/5有机成分+铁盐; ‘热垦628’的为C>D>B>A, 最优组合为2/5 (大量元素+有机成分+铁盐)+4/5微量元素。综合4种营养成分对两指标的影响情况, 可得出‘RRII105’花药愈伤组织诱导的最优组合为MS, ‘RRIM600’的为4/5大量元素+微量元素+2/5有机成分+铁盐, ‘热垦628’的为2/5 (大量元素+有机成分+铁盐)+4/5微量元素, ‘GT1’的为4/5 (大量元素+微量元素)+2/5 (有机成分+铁盐)。

关键词: 橡胶树; 花药; 愈伤组织; 胚状体; MS营养成分

橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是大戟科(Euphorbiaceae)橡胶树属多年生异花授粉乔木。因其具有胶乳产量高、质量好、易于获取、经济寿命长、种植管理简便及胶乳再生快等优点而成为天然橡胶的主要来源。天然橡胶是国防和工业建设不可或缺的战略物资, 与石油、煤炭、铁矿并称世界四大工业原料。天然橡胶具有独特的通用优越性能, 在某些重要的工业领域(航空、重型汽车制造业等)目前还无法被合成橡胶完全替代, 而且合成橡胶的产量终将随着其生产原料石油的消耗殆尽而降低, 因此天然橡胶的优越性能及其可持续性决定了其举足轻重的地位。我国作为世界上第一大天然橡胶消费国和进口国, 仅2010年消费总量就达363万t, 进口量为259万t, 自给率不足20%。随着我国经济及国防事业的快速发展, 天然橡胶的供需缺口正逐年扩大, 使得天然橡胶在国民经济中的战略物资地位越显重要。

云南是我国植胶大省之一, 肩负着提升天然橡胶产业的重任, 但宜植胶区域极其有限, 无法通过扩大植胶面积来增加产量。培育速生、高产的植胶材料是提升天然橡胶产业的有效途径之一, 亦是目前橡胶育种领域竞相研究的课题。相关研

究表明, 橡胶树自根幼态无性系作为天然橡胶产业发展的新一代种植材料, 具有生长速度快、胶乳产量高、经济寿命长、抗逆性强等特点(陈雄庭等2002; 杨加伟等2012)。我国对橡胶树组织培养技术研究较早, 1977年底至1978年春我国学者王泽云等首次在上诱导出体胚植株, 并于1978年初首次移栽成活, 移栽成活率达30%。尔后, 我国投入大量的人力物力对橡胶树体胚植株的培育展开深入研究, 目前已在花药(谭德冠等2011; 李玲等2014; 黄凤翔等2014)、子房(谭德冠等2005)、未授粉胚珠(梁国平等2016; 于静娟等2018)、内珠被(孙爱花等2012a)、叶片(孙爱花等2012b)及茎段(孙小龙等2009; 桂明春等2016)等培养方面取得较大进展。但橡胶树组织培养难易程度在基因型间存在较大差异(谭德冠等2005; 于静娟等2018), 目前仅有少数无性系品种(‘热研7-33-97’等)能实现规模化生产, 并在生产中推广应用, 大部分优良无

收稿 2019-01-10 修定 2019-06-17

资助 云南省热带作物科技创新体系建设项目(RF2019)和农业农村部橡胶树种质资源保护项目(151721301354052002-01)。

[#] 并列第一作者。

^{*} 通讯作者(gpliang520@163.com)。

性系品种的自根幼态无性系培育技术尚未成熟,无法实现工厂化生产,这严重制约了橡胶树自根幼态无性系在生产中的推广应用。当前对于橡胶树组织培养的研究多侧重于外源激素(孙爱花等2012b; 李玲等2015)及培养条件(桂明春等2011a, b)等方面的探索,反而对作为通用基本培养基MS营养成分的研究罕见。本课题组于2015年开始对MS营养成分影响橡胶树组织培养效果展开研究,目前已摸清了MS营养成分对橡胶树幼态微型芽条培育的影响情况,并筛选出适合茎段及茎尖幼态微型芽条培育的营养成分最优组合(桂明春等2016),而对于MS营养成分影响花药愈伤组织的诱导未进行系统研究。据此,本研究以橡胶树无性系品种‘RRII105’、‘RRIM600’、‘GT1’及‘热垦628’的花药为外植体,着重研究MS营养成分对橡胶树花药愈伤组织诱导效果的影响,以期提高橡胶树花药愈伤组织的诱导率和质量,为橡胶树良种自根幼态无性系苗木规模扩繁提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以橡胶树(*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)无性系品种‘RRII105’、‘RRIM600’、‘GT1’及‘热垦628’的花药为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理

外植体处理方法与黄凤翔等(2014)报道的一致。

1.2.2 MS营养成分对橡胶树花药愈伤组织诱导率的影响

以MS培养基中大量元素(A)、微量元素(B)、有机成分(C)及铁盐(D)等4种营养成分为试验因子,按L₉(3⁴)正交试验表进行,各因子水平及浓度配比如表1和2所示。额外附加0.8 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、0.5 mg·L⁻¹萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)、0.8 mg·L⁻¹呋喃甲基腺嘌呤(*N*⁶-furfuryladenine, kinetin, KT)、60 g·L⁻¹蔗糖、2.0 g·L⁻¹植物凝胶(phytagel)。每种处理接20瓶,每瓶接10个雄蕊,暗培养,培养温度为(27±0.5)°C,培养45 d后统计花药愈伤组织

表1 L₉(3⁴)正交试验因子与水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experimental design L₉(3⁴)

水平	因子			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	4/5	4/5	4/5	4/5
3	2/5	2/5	2/5	2/5

表中“1”表示全量营养成分,“4/5”表示全量营养成分的4/5,“2/5”表示全量营养成分的2/5。表2同。

表2 L₉(3⁴)正交试验MS营养成分浓度配比表

Table 2 The concentration ratio of MS of the orthogonal experimental design L₉(3⁴)

培养基编号	因子			
	A	B	C	D
F1	1	1	1	1
F2	1	4/5	4/5	4/5
F3	1	2/5	2/5	2/5
F4	4/5	1	4/5	2/5
F5	4/5	4/5	2/5	1
F6	4/5	2/5	1	4/5
F7	2/5	1	2/5	4/5
F8	2/5	4/5	1	2/5
F9	2/5	2/5	4/5	1

的诱导率,并观察其生长情况,愈伤组织诱导率=愈伤组织总块数/(接种雄蕊总个数-污染雄蕊总个数)×100%。

1.2.3 MS营养成分对花药愈伤组织胚状体分化力的影响

将上述9种培养基中诱导出的愈伤组织分别转至同一种胚状体诱导培养基上进行胚状体的诱导,胚状体诱导培养基与管艳等(2015)报道的一致。80 d后统计胚状体的诱导情况,计算出胚状体诱导率,胚状体诱导率=胚状体总个数/(接种愈伤组织总块数-污染愈伤组织总块数)×100%。

1.2.4 数据分析

采用Excel 2007软件进行数据录入及整理,计算花药愈伤组织和胚状体诱导率的平均值、标准差,用变异系数表示指标的离散程度。采用SPSS 23.0软件进行方差分析及直观分析。

2 实验结果

2.1 MS营养成分对橡胶树花药愈伤组织诱导率的影响

2.1.1 离散程度

如图1所示, 剖离的雄蕊接种至愈伤组织诱导培养基中培养15~20 d后, 花药膨大脱分化产生疏松、淡黄色的愈伤组织; 随着培养时间的延续, 愈伤组织逐渐长大, 培养至第45~50天时, 可形成直径约为0.3~0.6 cm的疏松、淡黄色、表面凹凸不平、有小球状突起的成熟愈伤组织。表3统计了4

个橡胶树无性系品种的花药在9种培养基中愈伤组织的诱导率。由表3可知, 花药愈伤组织诱导率总体均值达67.83%, 变幅为50.98%~91.08%。其中‘RRII105’的最高, 均值为91.08%, 随MS营养成分用量的改变而产生变化的幅度不大, 变幅为82.98%~95.85%, 变异系数仅为4.63%, 小于其他3个无性系品种; 其次是‘RRIM600’和‘热垦628’, 均值分别为67.02%和62.23%, 两者差异不大, 仅相差4.79%; ‘GT1’的最低, 均值仅为50.98%, 当MS营养成分用

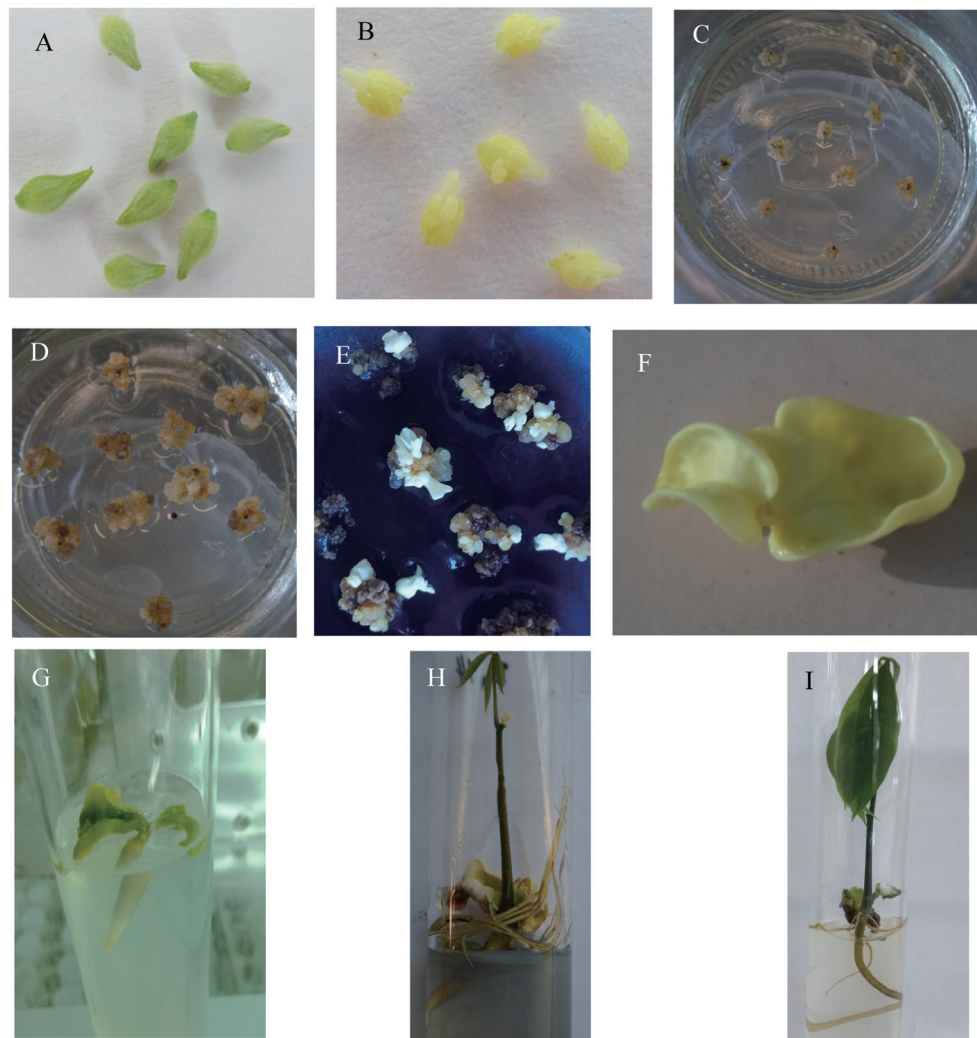


图1 橡胶树无性系品种‘RRII105’花药体胚植株的培育过程

Fig.1 The process of regenerated plants cultured by *H. brasiliensis* ‘RRII105’ clone anther

A: 花粉处于单核期(或少数进入双核期)的雄花; B: 剖离出的雄蕊; C: 花药在F1中培养20 d时诱导出的愈伤组织; D: 花药在F1中培养45 d时诱导出的愈伤组织; E: F1中诱导出的愈伤组织转接到胚状体分化培养基中培养50 d时胚状体的分化情况; F: 子叶形成成熟胚状体; G: 成苗培养基中培养10 d时胚根发育长出新根; H: 成苗培养基中培养20~30 d时得到的具有根茎叶的小苗; I: 花药体胚植株。

表3 四个橡胶树无性系品种花药愈伤组织诱导率(%)
的统计结果

Table 3 The results of the callus induction frequency (%) from four clones of <i>H. brasiliensis</i> anther				
编号	‘RRII105’	‘RRIM600’	‘GT1’	‘热垦628’
F1	91.63	51.43	18.44	40.63
F2	86.26	57.14	54.41	45.79
F3	93.41	62.38	59.52	53.20
F4	82.98	75.83	60.48	63.05
F5	90.83	67.50	44.29	57.72
F6	89.93	72.50	66.41	55.60
F7	93.67	65.71	58.75	78.28
F8	95.15	69.05	69.87	83.38
F9	95.85	81.67	26.67	82.39
最大值	95.85	81.67	69.87	83.38
最小值	82.98	51.43	18.44	40.63
均值	91.08	67.02	50.98	62.23
变异系数	4.63	13.86	34.85	25.38

量改变时, 其愈伤组织诱导率变化的幅度较大, 变幅为18.44%~69.87%, 变异系数(34.85%)较其他3个无性系品种的大。由此可见, 在4个无性系品种中, ‘GT1’花药愈伤组织诱导率对于MS营养成分变化的响应最为敏感。

2.1.2 方差与直观分析结果

方差分析结果表明MS基本培养基中4种营养成分对4个橡胶树无性系品种花药愈伤组织诱导率的影响差异达极显著水平, 四种营养成分对花药愈伤组织诱导率的影响效应及最优组合在无性系品种间均存在较大差异(表4), 具体表现为, ‘RRII105’的因子主次顺序为A>C>B>D, 即大量元素的影响最大, 有机成分次之, 铁盐最小, 最优组合为A₃B₃C₃D₁; ‘RRIM600’的为A>B>C>D, 即大量元素的影响最大, 微量元素次之, 铁盐最小, 最优组合为A₃B₃C₂D₃; ‘GT1’的为D>A>B>C, 即铁盐的影响最大, 大量元素次之, 有机成分最小, 最优组合为A₂B₂C₃D₃; ‘热垦628’的为A>D>C>B, 即大量元素的影响最大, 铁盐次之, 微量元素最小, 最优组合为A₃B₃C₃D₃。

2.2 MS营养成分对花药愈伤组织胚状体分化力的影响

2.2.1 离散程度

将9种处理诱导出的成熟愈伤组织转入胚状

表4 愈伤组织诱导率(%)的直观分析结果

Table 4 The results of visual analysis of callus induction frequency (%)					
因子	水平	‘RRII105’	‘RRIM600’	‘GT1’	‘热垦628’
A	1	90.43 ^B	56.98 ^B	44.12 ^C	46.55 ^C
	2	87.92 ^C	71.94 ^A	57.06 ^A	58.79 ^B
	3	94.89 ^A	72.14 ^A	51.76 ^B	81.35 ^A
	R _A	6.97	15.16	12.94	34.80
B	1	89.43 ^C	64.33 ^B	45.89 ^C	60.66 ^B
	2	90.75 ^B	64.56 ^B	56.19 ^A	62.30 ^{AB}
	3	93.06 ^A	72.18 ^A	50.87 ^B	63.73 ^A
	R _B	3.63	7.85	10.30	3.07
C	1	92.24 ^A	64.33 ^B	51.57 ^B	59.87 ^B
	2	88.37 ^B	71.55 ^A	47.19 ^C	63.75 ^A
	3	93.64 ^A	65.20 ^B	54.19 ^A	63.77 ^A
	R _C	5.27	7.22	7.00	3.90
D	1	92.77 ^A	66.87 ^C	29.80 ^C	60.25 ^B
	2	89.95 ^B	65.12 ^B	59.86 ^B	59.89 ^B
	3	90.00 ^B	69.09 ^A	63.29 ^A	66.54 ^A
	R _D	2.82	3.97	33.49	6.65

同列愈伤组织诱导率数据后不同大写字母标识表示差异极显著($P<0.01$), R_A~R_D分别表示A~D因子水平间的极差。表6同。

体分化培养基中培养15~25 d后, 部分愈伤组织的表面可产生白色小胚; 培养50 d后, 生长较快的小胚可直接发育形成成熟胚状体, 而生长较慢的小胚不能一步发育形成成熟胚, 需转入胚状体成熟培养基中继续培养40~45 d后方可得到成熟胚(图1)。表5统计了4个橡胶树无性系品种花药愈伤组织的胚状体分化情况, 结果表明, 参试的4个无性系品种中, 仅有‘RRII105’、‘RRIM600’及‘热垦628’等3个无性系品种花药诱导出的愈伤组织能再分化产生胚状体, 诱导率总体均值仅为18.72%, 其中‘RRIM600’的最高(31.92%), 随MS营养成分用量的改变而发生变化的幅度较其他两个无性系品种的小; ‘热垦628’最低(5.57%); ‘GT1’的花药虽能脱分化产生一定数量的愈伤组织, 但其愈伤组织在胚状体分化过程始终无胚状体产生, 培养至40~50 d后完全褐化死亡。

2.2.2 方差与直观分析结果

方差分析结果说明MS基本培养基中4种营养成分对胚状体诱导率的影响差异达极显著水平, 4种营养成分对胚状体诱导率的影响效应及最优组合在无性系品种间存在的差异较大(表6)。

表5 四个橡胶树无性系品种胚状体诱导率(%)的统计结果
Table 5 The results of the embryoid induction frequency (%)
from four clones of *Hevea brasiliensis* anther

编号	‘RRII105’	‘RRIM600’	‘GT1’	‘热垦628’
F1	83.71	49.32	0	0
F2	25.42	42.44	0	8.06
F3	0	23.91	0	6.67
F4	35.44	46.07	0	8.52
F5	14.90	49.23	0	6.19
F6	3.37	25.69	0	0
F7	0	35.89	0	8.10
F8	5.15	5.33	0	7.99
F9	0	9.44	0	4.60
最大值	83.71	49.32	—	8.52
最小值	0	5.33	—	0
均值	18.67	31.92	—	5.57
变异系数	147.13	52.47	—	60.80

表6 胚状体诱导率(%)的直观分析结果
Table 6 The results of visual analysis of embryoid
induction frequency (%)

因子	水平	‘RRII105’	‘RRIM600’	‘热垦628’
A	1	36.38 ^A	38.56 ^B	4.91 ^B
	2	17.91 ^B	40.33 ^A	4.90 ^B
	3	1.72 ^C	16.89 ^C	6.89 ^A
	<i>R_A</i>	34.66	23.44	1.99
B	1	39.72 ^A	43.76 ^A	5.54 ^B
	2	15.16 ^B	32.33 ^B	7.41 ^A
	3	1.12 ^C	19.68 ^C	3.76 ^C
	<i>R_B</i>	38.60	24.08	3.65
C	1	30.75 ^A	26.78 ^C	2.66 ^B
	2	20.29 ^B	32.65 ^B	7.06 ^A
	3	4.97 ^C	36.34 ^A	7.08 ^A
	<i>R_C</i>	25.78	9.56	4.42
D	1	32.87 ^A	36.00 ^A	3.60 ^C
	2	9.60 ^B	34.67 ^A	5.38 ^B
	3	13.53 ^C	25.10 ^B	7.72 ^A
	<i>R_D</i>	23.27	10.90	4.12

‘RRII105’的因子主次顺序为B>A>C>D, 即微量元素的影响最大, 大量元素次之, 铁盐最小, 最优组合为A₁B₁C₁D₁; ‘RRIM600’的为B>A>D>C, 即微量元素的影响最大, 大量元素次之, 有机成分最小, 最优组合为A₂B₁C₃D₁; ‘热垦628’的为C>D>B>A, 即有机成分的影响最大, 铁盐次之, 大量元素最小, 最优组合为A₃B₂C₃D₃。

2.3 最优组合的筛选

表4和6表明, 分别以愈伤组织诱导率及胚状体诱导率筛选出的MS营养成分最优组合不同, 需对每个无性系品种的两个指标逐一分析, 方可得到每个无性系品种花药愈伤组织诱导的最优组合。相对于‘RRII105’来说, 愈伤组织诱导率的最优组合为A₃B₃C₃D₁, 胚状体诱导率的最优组合为A₁B₁C₁D₁, 其中两指标D因子的最优水平均为D₁, 故总体上D因子的最优水平为D₁; 而A、B及C因子的最优水平不同(表3和5), ‘RRII105’花药胚状体诱导率的变异系数(147.13%)远大于愈伤组织诱导率的变异系数(4.63%), 且A因子的胚状体诱导率的极差(34.66)>愈伤组织诱导率的极差(6.97), B因子的胚状体诱导率的极差(38.60)>愈伤组织诱导率的极差(3.63), C因子的胚状体诱导率的极差(25.78)>愈伤组织诱导率的极差(5.27), 由此可知, 胚状体诱导率对A、B及C因子用量改变的响应更敏感, 故A、B及C因子的最优水平分别为A₁、B₁和C₁。据此, ‘RRII105’花药愈伤组织诱导的最优组合为A₁B₁C₁D₁, 该组合是试验中的F1培养基, 其愈伤组织诱导率高达91.63%, 与最大值仅相差4.22%, 胚状体诱导率为83.71%, 明显大于其他8个处理。同理得‘RRIM600’最优组合为A₂B₁C₃D₁; ‘热垦628’的最优组合为A₃B₂C₃D₃; 相对于‘GT1’来说, 其花药愈伤组织诱导率的最优组合A₂B₂C₃D₃, 无胚状体产生, 故其花药愈伤组织诱导的最优组合亦为A₂B₂C₃D₃。

3 讨论

在橡胶树花药自根幼态无性系培育中, 胚状体发生率及植株再生率低是制约其工厂化生产的瓶颈(谭德冠等2005)。获取足量优质愈伤组织是通过胚状体发生及植株再生建立自根幼态无性系规模化生产的前提条件, 如何通过培养基配方的优化来提高愈伤组织的质量及诱导率便成了首要解决的关键问题。在接种材料一定的情况下, 愈伤组织诱导率的高低直接决定了愈伤组织数量的多少, 胚状体发生率及植株再生率则决定了是否能够实现规模化生产。本试验所涉的4个橡胶树无性系品种的花药均能脱分化产生愈伤组织, 且

诱导率较高, 总体均值为67.83%; 而只有3个无性系品种(‘RRII105’、‘RRIM600’及‘热垦628’)的花药愈伤组织能分化出胚状体, 且诱导率普遍较低, 总体均值仅为18.72%。诱导率效果最好的是‘RRIM600’, 其诱导率也仅为31.92%, 其中‘RRII105’的花药最容易脱分化形成愈伤组织, 但其愈伤组织的胚状体分化能力并非最强, 其诱导率比‘RRIM600’低13.25%, 类似的现象在橡胶树未受精胚珠(梁国平等2016)及内珠被(黄天带等2012)培养中也发现过。有研究表明, 橡胶树愈伤组织可以分成两类: 可分化形成胚状体的胚性愈伤组织及无分化能力的非胚性愈伤组织, 并且胚性愈伤块中也存在极少数的没有胞核的非胚性细胞, 这类细胞不具备胚状体分化能力(谭德冠等2009)。可见愈伤组织诱导率的高低与胚状体分化能力的强弱之间并无严格正相关性, 后续研究橡胶树花药愈伤组织诱导时, 不应仅以愈伤组织诱导率的高低来评价诱导效果。胚状体诱导率能够作为一种愈伤组织的质量优劣的评定依据, 且调查方法较为简单。本研究将愈伤组织的诱导率及其胚状体分化能力(胚状体诱导率)相结合, 作为探索MS营养成分影响橡胶树花药愈伤组织诱导效果的评判依据更加合理科学, 实验结果更加可靠。

本研究结果还表明, 不同橡胶树无性系品种的花药愈伤组织的诱导所需的MS营养成分不同, ‘RRII105’的最优组合为MS, ‘RRIM600’的为4/5大量元素+微量元素+2/5有机成分+铁盐, ‘热垦628’为2/5 (大量元素+有机成分+铁盐)+4/5微量元素, ‘GT1’的为4/5 (大量元素+微量元素)+2/5 (有机成分+铁盐), 这也充分说明了橡胶树花药组织培养效果在品种间存在的差异较大。此外, 本研究中‘RRII105’的最优组合为F1, 即MS+0.8 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.8 mg·L⁻¹ KT+60 g·L⁻¹蔗糖+2.0 g·L⁻¹植物凝胶, 其愈伤组织诱导率高达91.63%, 胚状体诱导率为83.71%。而其他3个无性系品种在该培养基中的诱导效果并不理想, 特别是‘GT1’和‘热垦628’, 两者愈伤组织诱导率分别仅为18.44%和40.63%, 且诱导出的愈伤组织完全不具备胚状体分化能力。这可能是由于本研究采用的外源激素种类及浓度是以‘RRII105’的花药为材料筛选出来的(黄凤翔

等2014), 该外源激素的配比较适合‘RRII105’的花药愈伤组织的诱导, 而不适合其他3个无性系品种。因此, 在以橡胶树花药离体培养为基础的种苗繁育工作中, 需对每个无性系品种单独选择基础培养基以及外源激素种类和浓度。

MS培养基是一种在植物组织培养中应用最为广泛的基质配方, 是T. Murashige和F. K. Skoog为培养烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞而设计的, 因其硝酸盐、钾离子和铵离子含量较其他培养基丰富, 微量元素和有机成分比较全面而被广泛应用。本研究已摸清了MS营养成分对橡胶树花药愈伤组织诱导效果的影响情况, 但每种营养成分均由多种化学物质混和而成, 如微量元素是由KI、H₃BO₃、MnSO₄、ZnSO₄、Na₂MoO₄、CuSO₄、CoCl₂等7种化学物质组成, 本研究虽已证明微量元素对花药愈伤组织诱导率及胚状体诱导率的影响差异达极显著水平, 但其所含的7种化合物是否均对两个指标产生影响, 这种影响是否显著就不得而知了。因此, MS营养成分中各化学物质对花药愈伤组织诱导效果的影响有待进一步研究。

参考文献(References)

- Chen X, Wang Z, Wu H, et al (2002). A new planting material of *Hevea brasiliensis* — self-rooting juvenile-type clone. *Chin J Trop Crops*, 23 (1): 19–23 (in Chinese with English abstract) [陈雄庭, 王泽云, 吴胡蝶等(2002). 橡胶树新种植材料——自根幼态无性系. *热带作物学报*, 23 (1): 19–23]
- Guan Y, Li L, Liang G, et al (2015). Comparison of callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration from different clones of *Hevea brasiliensis* anther. *Chin Agr Sci Bull*, 31 (4): 40–44 (in Chinese with English abstract) [管艳, 李玲, 梁国平等(2015). 不同品种橡胶树花药愈伤组织诱导、分化及植株再生的比较. *中国农学通报*, 31 (4): 40–44]
- Gui M, Li L, Guan Y, et al (2016). Effects of MS elements on in vitro culture of micro-shoots of *Hevea brasiliensis*. *Chin J Trop Crops*, 37 (10): 1849–1854 (in Chinese with English abstract) [桂明春, 李玲, 管艳等(2016). MS营养成分对橡胶树幼态微型芽条培育的影响. *热带作物学报*, 37 (10): 1849–1854]
- Gui MC, Liang GP, Duan AA, et al (2011a). The effects of temperature on in vitro mini-type budding stick of *Hevea brasiliensis*. *Trop Agr Sci Technol*, 34 (3): 5–7 (in Chinese with English abstract) [桂明春, 梁国平, 段安安等

- (2011a). 温度对橡胶树微型芽条培育的影响. 热带农业科技, 34 (3): 5-7]
- Gui MC, Liang GP, Duan AA, et al (2011b). Effects of light intensity on induction of adventitious bud of *Hevea brasiliensis*. Trop Agr Sci Technol, 34 (4): 15-17 (in Chinese with English abstract) [桂明春, 梁国平, 段安安等(2011b). 光照强度对橡胶树不定芽诱导的影响. 热带农业科技, 34 (4): 15-18]
- Huang FX, Guan Y, Gui MC, et al (2014). Study on the callus from the anther of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg by orthogonal experiment. North Hortic, (18): 109-111 (in Chinese with English abstract) [黄凤翔, 管艳, 桂明春等(2014). 正交实验法优选橡胶树花药愈伤组织诱导的研究. 北方园艺, (18): 109-111]
- Huang T, Long Q, Zhou Q, et al (2012). The application of pedigree and cluster analysis in tissue culture of inner integument in *Hevea brasiliensis*. Chin J Trop Crops, 33 (6): 1018-1023 (in Chinese with English abstract) [黄天带, 龙青娥, 周权男等(2012). 系谱和聚类分析在橡胶树内珠被组织培养中应用研究. 热带作物学报, 33 (6): 1018-1023]
- Li L, Guan Y, Liang G, et al (2014). Effects of TDZ on callus induction and somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis* anther. Chin Agr Sci Bull, 30 (1): 20-25 (in Chinese with English abstract) [李玲, 管艳, 梁国平等(2014). TDZ对橡胶树花药愈伤组织诱导和体细胞胚发生的影响. 中国农学通报, 30 (1): 20-25]
- Li L, Gui M, Guan Y, et al (2015). Effects of plant hormones on maturation of secondary somatic embryos of *Hevea brasiliensis*. Chin Agr Sci Bull, 31 (31): 30-35 (in Chinese with English abstract) [李玲, 桂明春, 管艳等(2015). 激素对橡胶树次生体细胞胚成熟培养的影响. 中国农学通报, 31 (31): 30-35]
- Liang G, Guan Y, Li L, et al (2016). Studies on ovule in vitro and somatic embryo regeneration of *Hevea brasiliensis*. Trop Agr Sci Technol, 39 (3): 1-5, 47 (in Chinese with English abstract) [梁国平, 管艳, 李玲等(2016). 橡胶树胚珠离体培养与体胚植株再生的研究. 热带农业科技, 39 (3): 1-5, 47]
- Sun A, Hua Y, Huang T, et al (2012b). Effects of different hormone combination on callus induction of leaf explant from *Hevea brasiliensis*. Chin Agr Sci Bull, 28 (4): 24-27 (in Chinese with English abstract) [孙爱花, 华玉伟, 黄天带等(2012b). 不同激素对比对橡胶树叶片愈伤组织诱导的影响. 中国农学通报, 28 (4): 24-27]
- Sun A, Huang T, Zhou Q, et al (2012a). Effects of different factors on callus induction and somatic embryogenesis of inner integument from *Hevea brasiliensis*. Chin Agr Sci Bull, 28 (25): 15-19 (in Chinese with English abstract) [孙爱花, 黄天带, 周权男等(2012a). 不同因素对橡胶树内珠被愈伤组织诱导和体细胞胚发生的影响. 中国农学通报, 28 (25): 15-19]
- Sun X, He L, Liang G, et al (2009). Optimization of inducing system for stem segments of clone Yunyan77-2 of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) and its transplanting management. Chin J Trop Crops, 30 (11): 1638-1640 (in Chinese with English abstract) [孙小龙, 和丽岗, 梁国平等(2009). 橡胶树品种77-2茎芽诱导体系优化及移栽管理. 热带作物学报, 30 (11): 1638-1640]
- Tan D, Sun X, Fu L, et al (2011). Classification and improved cultural conditions for the somatic embryogenesis of *Hevea* anther. Chin J Trop Crops, 32 (7): 1290-1295 (in Chinese with English abstract) [谭德冠, 孙雪飘, 付莉莉等(2011). 巴西橡胶树花药体胚发生类型及其培养条件的改良. 热带作物学报, 32 (7): 1290-1295]
- Tan D, Wang M, Sun X, et al (2009). Morphogenesis and histology of calli derived from anthers of rubber clone Reyan7-33-97 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). Chin J Trop Crops, 30 (7): 970-974 (in Chinese with English abstract) [谭德冠, 汪萌, 孙雪飘等(2009). 橡胶树品种热研7-33-97花药愈伤组织形态发生和组织学研究. 热带作物学报, 30 (7): 970-974]
- Tan DG, Sun XP, Zhang JM (2005). Tissue culture of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Plant Physiology Commun, 41 (5): 674-678 (in Chinese) [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]
- Yang J, Huang T, Hua Y, et al (2012). Cold tolerance analysis of the self-rooting juvenile clones of *Hevea brasiliensis*. Chin J Trop Crops, 33 (7): 1235-1238 (in Chinese with English abstract) [杨加伟, 黄天带, 华玉伟等(2012). 巴西橡胶树自根幼态无性系耐低温分析. 热带作物学报, 33 (7): 1235-1238]
- Yu JJ, Gui MC, Li L, et al (2018). Study on induction of rubber tree unpollinated ovules callus in different years. Trop Agr Sci Technol, 41 (1): 1-4 (in Chinese with English abstract) [于静娟, 桂明春, 李玲等(2018). 不同年份橡胶树未受粉胚珠愈伤组织诱导的研究. 热带农业科技, 41 (1): 1-4]

Effects of MS medium nutrients on anther callus induction of *Hevea brasiliensis*

GUI Ming-Chun[#], LI Ling[#], GUAN Yan, TANG Min, TIAN Hai, SUN Xiao-Long, LIANG Guo-Ping^{*}
Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China

Abstract: The anthers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) clones ‘RRII105’, ‘RRIM600’, ‘GT1’ and ‘Reken 628’ were used as explants to study the effects of macronutrients (A), micronutrients (B), organic component (C) and iron salt (D) on the induction of anther callus by using orthogonal experiment. The results showed that: the effects of all four components on the induction frequency of callus and embryoid were significantly different, and there were apparent varietal differences in the main order and optimal combination when induced by the four components. The main orders and optimal combinations of callus induction frequency were: ‘RRII105’, A>C>B>D, 2/5 (macronutrients + micronutrients + organic component) + iron salt; ‘RRIM600’, A>B>C>D, 2/5 (macronutrients + micronutrients + iron salt) + 4/5 organic component; ‘GT1’, D>A>B>C, 4/5 (macronutrients + micronutrients) + 2/5 (organic component + iron salt); ‘Reken 628’, A>D>C>B, 2/5MS. While the main orders and optimal combinations of embryoid induction frequency were: ‘RRII105’, B>A>C>D, MS; ‘RRIM600’, B>A>D>C, 4/5 macronutrients + micronutrients + 2/5 organic component + iron salt; ‘Reken 628’, C>D>B>A, 2/5 (macronutrients + organic component + iron salt) + 4/5 micronutrients. Comprehensively, judging from the effects of four components on the anther callus and embryoid, the optimal combination of anther callus induction were MS for ‘RRII105’, 4/5 macronutrients + micronutrients + 2/5 organic component + iron salt for ‘RRIM600’, 2/5 (macronutrients + organic component + iron salt) + 4/5 micronutrients for ‘Reken 628’, and 4/5 (macronutrients + micronutrients) + 2/5 (organic component + iron salt) for ‘GT1’, respectively.

Key words: *Hevea brasiliensis*; anther; callus; embryoid; MS medium nutrients

Received 2019-01-10 Accepted 2019-06-17

This work was supported by the Yunnan Tropical Crop Science and Technology Innovation System Construction Program (RF2019), and the Conservation of Rubber Tree Germplasm Resources Program of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People’s Republic of China (151721301354052002-01).

[#]Co-first authors.

^{*}Corresponding author (gpliang520@163.com).