

适合全周期间作的橡胶树品种热垦 628 花药再生体系研究

成 镜, 黄天带*, 戴雪梅, 徐正伟

中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室/热带林木种子种苗工程中心/海口市热带植物种苗创新重点实验室, 海南海口 571101

摘 要: 在橡胶树体胚发生再生体系研究中, 如何快速获得胚性愈伤组织是能否成功建立再生体系的关键。本研究基于课题组前期的研究基础, 以橡胶树花药为外植体, 通过正交试验设计方案研究了毒莠定、KT、6-BA、IAA 四种激素的不同浓度组合对橡胶树花药胚性愈伤组织诱导的影响, 结果表明: 橡胶树花药愈伤组织诱导的最优组合培养基为 MS 基础培养基, 硫胺素 0.4 mg/L、天冬酰胺 300 mg/L、水解酪蛋白 100 mg/L、脯氨酸 100 mg/L、精氨酸 100 mg/L、谷氨酰胺 100 mg/L、L-半胱氨酸-盐酸盐 50 mg/L、蔗糖 70 g/L、椰子水 50 mL/L、植物凝胶 2.2 g/L, 并添加毒莠定浓度 20 mg/L、KT 浓度 2 mg/L、6-BA 浓度 1 mg/L、IAA 浓度 0 mg/L, 愈伤组织诱导率达 73.3%~100%。所有处理在诱导愈伤组织 25~28 d 左右, 愈伤组织达到快速增殖时期, 对胚性愈伤组织的诱导起主要作用的是毒莠定浓度, 其浓度在 20~30 mg/L 之间时, 对胚性愈伤组织的诱导有促进作用。低浓度的毒莠定虽然也能诱导愈伤组织产生, 但是这些愈伤组织几乎为无胚胎发生能力的非胚性愈伤组织。同时用获得的 11 个体胚进行植株再生, 其中出苗 2 株, 7 个只长根不抽芽, 2 个既不抽芽也不长根, 植株再生率达 18%。因此, 在此研究的基础上, 对愈伤组织诱导培养基配方进行进一步优化, 使其能够更快地从花药中诱导出胚性愈伤组织, 缩短胚性愈伤组织的诱导时间, 降低变异几率, 可为 RITA 生物反应器提供更好条件的愈伤组织起始原料。

关键词: 橡胶树; 花药; 胚性愈伤组织; 植株再生

中图分类号: S794.1 文献标识码: A

Anther Regeneration System of Rubber Tree Variety Reken 628 Suitable for Whole Period Intercropping

CHENG Jing, HUANG Tiandai*, DAI Xuemei, XU Zhengwei

Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops / Engineering Center for Rapid Propagation of Tropical Woody Plants, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Haikou Key Laboratory of Innovation of Seedlings of Tropical Plants, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Quickly obtain embryogenic callus is the key step to successfully establish the regeneration system in the somatic embryogenesis regeneration system of rubber tree. Rubber tree anthers were used as explants in the study. The effects of different concentrations of picloram, KT, 6-BA, and IAA on the induction of rubber tree anther embryogenic callus were studied through an orthogonal experimental design. The results showed that the optimal combination medium for rubber tree anther callus induction was MS basic medium, 0.4 mg/L thiamine, asparagine 300 mg/L, hydrolyzed casein 100 mg/L, proline 100 mg/L, arginine 100 mg/L, glutathione amino amide 100 mg/L, L-cysteine-hydrochloride 50 mg/L, sucrose 70 g/L, coconut water 50 mL/L, vegetable gel 2.2 g/L, picloram 20 mg/L, KT 2 mg/L and

收稿日期 2022-08-29; 修回日期 2022-09-15

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2019YFD1001105); 中央级科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630022022008); 海南省国际科技合作研发项目 (No. GHYF2022013)。

作者简介 成 镜 (1986—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 橡胶树等热带林木组织培养快繁。*通信作者 (Corresponding author): 黄天带 (HUANG Tiandai), E-mail: zhuanjiyinyuzhong@163.com。

KT 2 mg/L and 6-BA 1 mg/L, and the callus induction rate reached 73.3%–100%. In all treatments, the callus was induced for about 25–28 days, and the callus reached the stage of rapid proliferation. The main effect of the induction of embryogenic callus was the concentration of picloram. It could promote the induction of embryogenic callus. Although low concentrations of picloram could also induce callus production, the callus were basically non-embryogenic potential-*ie* non-embryogenic callus. At the same time, 11 somatic embryos were used for plant regeneration. Among them, two plants emerged, seven only had roots without sprouting, and two had neither buds nor roots. The plant regeneration rate was 18%. By observing the leaf morphology and plant height of the plants, there was no significant difference with the rubber tree tissue culture seedlings and seedlings in production. In the future, on the basis of the research, the formulation of the callus induction medium would be further optimized, so that it could induce embryogenic callus from anthers more quickly, shorten the induction time of embryogenic callus, and reduce variation. Probability, it could provide callus with better conditions for RITA bioreactors as starting material.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; anther; embryogenic callus; plant regeneration

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.007

橡胶树体胚植株具有生长快、产量高等优点,其产量较同源老态芽接无性系增加了 25.8%~66.3%^[1-3],生长快 10%~20%^[1],是天然橡胶产业发展的新一代种植材料。中国热带农业科学院橡胶研究所(以下简称“中国热科院橡胶所”)组培与转基因课题组建立了以花药为外植体的橡胶树热研 7-33-97 品种的体胚发生再生技术体系,目前能够实现规模化生产的橡胶树品种仅热研 7-33-97,橡胶树体胚植株品种覆盖度不足限制了其应用面积。因此,为了提高橡胶树体胚植株的推广应用面积,亟待研发其他优良品种的体胚再生技术体系。

橡胶树热垦 628 品种具有生长快、产量高、抗性强、冠幅小、宜植区域广的优点,是中国热科院橡胶所自主选育的农业农村部“十四五”主推品种。通过对海南、云南、广东 3 个区域试验点适应性试种的热垦 628 的系统观测,整体表现出了速生、产量高、抗逆性好的特性及良好的适应性,是具有较大推广应用价值的胶木兼优品种^[4]。胶园产值低是目前天然橡胶产业面临的难题,在橡胶林下间作耐阴作物可提高胶园产值,由于热垦 628 树型是单杆型,分支较少,是最适合林下间作的品种。常规胶园每 667 m² 种植 33 株(株行距 3 m×7 m),中国热科院橡胶所进行示范种植的宽窄行(株距 2 m,窄行距 4 m,宽行距 20 m)种植每 667 m² 种植 28 株,使用体胚苗理论上可以增产 20%,达到节本增效的效果。

为了成功地建立橡胶树体胚发生再生技术体系,首先需要获得较高质量的胚性愈伤组织,否则难以进行后续的体胚发生和植株再生过程。为了诱导出胚性愈伤组织,研究者们从基因型^[5]外植体类型^[6-7]植物生长调节剂^[8]、蔗糖、钙^[9-10]、

其他添加物^[11]等方面进行研究,但效果不明显。

本研究以橡胶树雄花花蕾为材料,通过改变培养基中的植物生长调节剂、蔗糖、氨基酸、钙含量、硝酸银等研究其对胚性愈伤组织诱导的影响,以期在较短的时间内获得胚性愈伤组织,为后续的体胚发生再生技术体系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以种植于中国热科院试验场三队的橡胶树热垦 628 品种的花药为材料,在春花期采集花蕾长度为 2.5~3.0 mm、显微镜观察花粉粒处于单核期且发育良好的雄花进行接种培养。

1.2 方法

1.2.1 花药愈伤的诱导 摘取新鲜的雄花花蕾,75%的乙醇处理 30 s,0.1%的 HgCl₂ 溶液浸泡 10 min,浸泡期间不停晃动,使灭菌彻底,无菌水冲洗 4~5 次,每次 5 min。解剖针剥开花蕾,将花药柱连同花药接种于试管中,每管接种 4 个花药外植体。灭菌和接种均在超净工作台上进行。

1.2.2 正交试验设计 将经过无菌消毒的橡胶树雄蕊接种于含有 MS 大量、MS 微量、MS 有机、肌醇 0.1 g/L,0.4 mg/L 硫胺素,不同毒莠定、KT、6-BA、IAA 浓度的培养基中,并补充天冬酰胺 300 mg/L、水解酪蛋白 100 mg/L、脯氨酸 100 mg/L、精氨酸 100 mg/L、谷氨酰胺 100 mg/L、L-半胱氨酸、盐酸盐 50 mg/L、蔗糖 70 g/L、椰子水 50 mL/L、植物凝胶 2.2 g/L,毒莠定、KT、6-BA、IAA 浓度采用五因素四水平正交表进行设计(表 1);培养容器为带透气膜的玻璃试管,pH 5.8,在温度为 28 ℃的条件下培养 30 d。采用五因素四水平 L₁₆(4⁵)正交表设计,

表 1 试验因素和水平
Tab. 1 Experimental factors and levels mg/L

水平 Level	因素 Factor			
	毒莠定浓度 Picloram concentra- tion	KT 浓度 KT con- centration	6-BA 浓度 6-BA concentration	IAA 浓度 IAA con- centration
1	1.0	0.0	0.0	0.0
2	10	1.0	0.5	0.5
3	20	1.5	1.0	1.0
4	30	2.0	1.5	1.5

分别设置毒莠定浓度（因素 A）、KT 浓度（因素 B）、6-BA 浓度（因素 C）、IAA 浓度（因素 D）的五因素四水平正交试验（表 2）。每个处理组合 40 个外植体，重复 3 次，接种 20 d 后统计愈伤诱导情况。

表 2 五因素四水平 $L_{16}(4^5)$ 正交设计
Tab. 2 Five-factor and four-level $L_{16}(4^5)$ orthogonal design

处理 Treatment	毒莠定 Picloram(A)	KT(B)	6-BA(C)	IAA(D)	第 5 列 Column 5
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

注：第 5 列为空列。

Note: The fifth column is empty.

1.2.3 体细胞胚的诱导 将上述愈伤组织转入体细胞胚诱导培养基中进行体细胞胚诱导以测试其是否为胚性愈伤，体胚发生为 25 °C 暗培养。体胚发生培养基配方参照黄天带等^[12]的配方。每个处理重复 3 次，每个处理 2 皿，每个处理共 20 个外植体，转入体细胞胚诱导培养基后 45 d，统计体胚诱导率。

$$\text{体胚诱导率} = \frac{\text{出胚外植体数}}{\text{接种外植体数}} \times 100\%$$

1.2.4 植株再生测试 将上述获得的正常体胚转入植株再生培养基中进行植株再生，植株再生培养基参考华玉伟等^[13]的配方及培养条件。

1.3 数据处理

实验数据用 Excel 2019 和 SPSS 16.0 软件进行处理和分析，用 Duncan's 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 正交试验设计结果分析

从表 3 可以看出，不同培养基配方对愈伤诱导率的影响不同，其中处理 8、12 愈伤诱导率最高，均达到 100%；其次分别是处理 9、10，愈伤诱导率均达 93.3%；处理 5 的愈伤诱导率最低，为 63.3%。结果表明，处理 8、9、10、12 与其余处理之间差异显著，而处理 1、2、3、4、6、7、14、16 之间无差异显著。

从正交试验结果的直观分析（表 4）可以看出，毒莠定浓度（因素 A）对愈伤诱导率的影响较大，而 KT 浓度（因素 B）和 6-BA 浓度（因素 C）以及 IAA 浓度（因素 D）对其影响次之。从表 4 的极值可确定 4 个因素对愈伤诱导率影响程度顺序为：A>B>C>D；根据表 4 中各因素水平均值的大小，可得愈伤组织诱导的最优组合为 $A_3B_4C_3D_1$ ，即毒莠定浓度 20 mg/L、KT 浓度 2 mg/L、6-BA 浓度 1 mg/L、IAA 浓度 0 mg/L。

2.2 不同处理愈伤组织诱导情况

从图 1 可以看出，处理 9、10、11、12 的愈伤组织表面有一些光滑且球形的愈伤组织，而其余处理中很少看见有这种类型的愈伤组织产生。

2.3 体细胞胚诱导结果分析

从表 5 可以看出，处理 1、2、3、4、5、6、7、8、13、15 均未诱导出体胚，体胚诱导率均为 0。处理 10 的体胚诱导率最高，显著高于其余处理，体胚诱导率由高到低依次为处理 10>处理 9>处理 11>处理 14>处理 12>处理 16，分别为 33.3%、18.3%、16.7%、13.3%、11.7%、6.7%。处理 11、12、14 之间无显著差异。

从图 2 可以看出，处理 9、10、11 虽然能长出体胚，但是多为不正常的体胚，仅有处理 14 能产生个别正常体胚。

表 3 橡胶树花药愈伤诱导正交试验结果
Tab. 3 Orthogonal test results of rubber tree anther callus induction

处理 Treatment	毒莠定浓度 Picloram concentration/ (mg·L ⁻¹)	KT 浓度 KT concentration/ (mg·L ⁻¹)	6-BA 浓度 6-BA concentration/ (mg·L ⁻¹)	IAA 浓度 IAA concentration/ (mg·L ⁻¹)	愈伤诱导率 Callus induction rate/%
1	1	0.0	0.0	0.0	84.2 ^b
2	1	1.0	0.5	0.5	80.0 ^b
3	1	1.5	1.0	1.0	85.8 ^b
4	1	2.0	1.5	1.5	79.2 ^{bc}
5	10	0.0	0.5	1.0	63.3 ^d
6	10	1.0	0.0	1.5	80.0 ^b
7	10	1.5	1.5	0.0	76.7 ^{bc}
8	10	2.0	1.0	0.5	100.0 ^a
9	20	0.0	1.0	1.5	93.3 ^a
10	20	1.0	1.5	1.0	93.3 ^a
11	20	1.5	0.0	0.5	73.3 ^c
12	20	2.0	0.5	0.0	100.0 ^a
13	30	0.0	1.5	0.5	73.3 ^c
14	30	1.0	1.0	0.0	80.0 ^b
15	30	1.5	0.5	1.5	73.3 ^c
16	30	2.0	0.0	1.0	80.0 ^b

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

表 4 正交设计试验结果及方差分析
Tab. 4 Orthogonal test design results and variance analysis

项目 Term	水平 Level	因素 A Factor A	因素 B Factor A	因素 C Factor C	因素 D Factor D
<i>K</i>	1	329.20	314.10	317.50	340.90
	2	320.00	333.30	316.60	326.60
	3	359.90	309.10	359.10	322.40
	4	306.60	359.20	322.50	325.80
<i>k</i>	1	82.30	78.53	79.38	85.23
	2	80.00	83.33	79.15	81.65
	3	89.98	77.28	89.78	80.60
	4	76.65	89.80	80.63	81.45
<i>R</i>		13.33	12.53	10.63	4.63
<i>S_j</i>		384.40	387.13	308.56	50.29
<i>f_j</i>		3.00	3.00	3.00	3.00
<i>S_j/f_j</i>		128.13	129.04	102.85	16.76
<i>F</i>		0.91	0.92	0.73	0.12

注：*K* 为每列因素各水平所对应的试验指标和；*k* 为每列因素各水平所对应的试验指标的平均值；*R* 为每列因素的极差；*S_j* 为离差平方和；*f_j* 是自由度；*S_j/f_j* 是均方；*F* 是 *F* 值。

Note: *K* is the sum of test indicators corresponding to different level of each factor; *k* is the average of the test indicators corresponding to different level of each factor; *R* is the range of each factor; *S_j* is the sum of squares of deviation; *f_j* is freedom; *S_j/f_j* is a mean square; *F* is *F* value.

表 5 体细胞胚诱导结果
Tab. 5 Somatic embryo induction results

处理 Treatment	外植体数 Number of explants	出胚外植体数 The number of explants producing somatic embryos	体胚诱导率 Somatic embryo induction rate/%
1	20	0.0 ^d	0.0 ^d
2	20	0.0 ^d	0.0 ^d
3	20	0.0 ^d	0.0 ^d
4	20	0.0 ^d	0.0 ^d
5	20	0.0 ^d	0.0 ^d
6	20	0.0 ^d	0.0 ^d
7	20	0.0 ^d	0.0 ^d
8	20	0.0 ^d	0.0 ^d
9	20	3.7±0.9 ^b	18.3±4.4 ^b
10	20	6.7±1.2 ^a	33.3±6.0 ^a
11	20	3.3±0.3 ^b	16.7±1.7 ^b
12	20	2.3±0.7 ^{bc}	11.7±3.3 ^{bc}
13	20	0.0 ^d	0.0 ^d
14	20	2.7±1.5 ^{bc}	13.3±4.4 ^{bc}
15	20	0.0 ^d	0.0 ^d
16	20	1.3±0.6 ^{cd}	6.7±1.7 ^{cd}

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

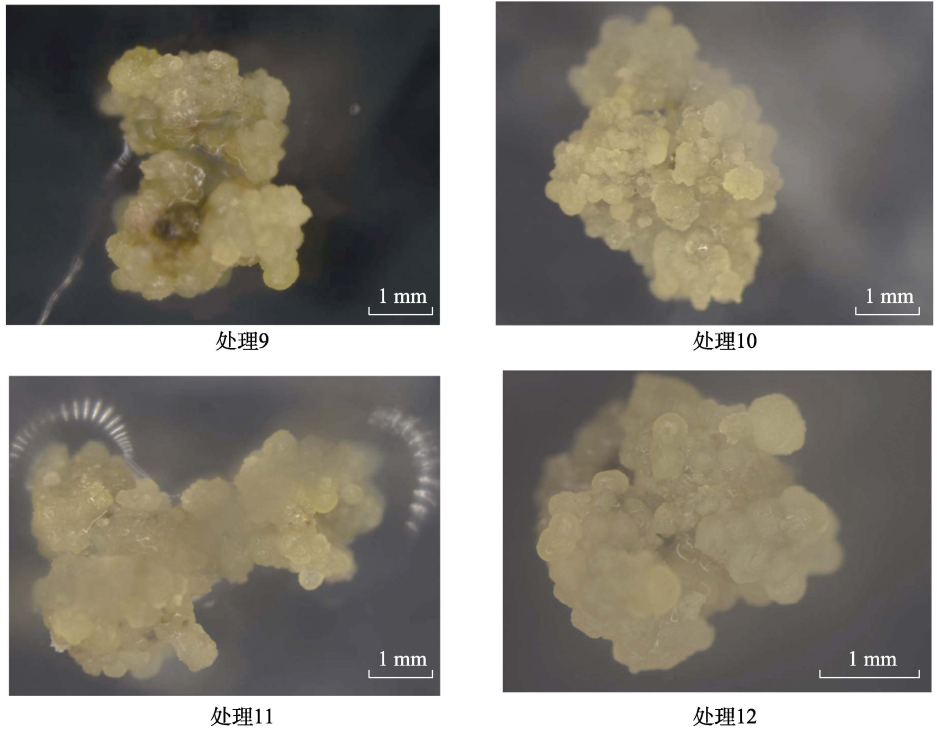


图 1 不同处理愈伤组织诱导情况
Fig. 1 Callus induction with different treatments

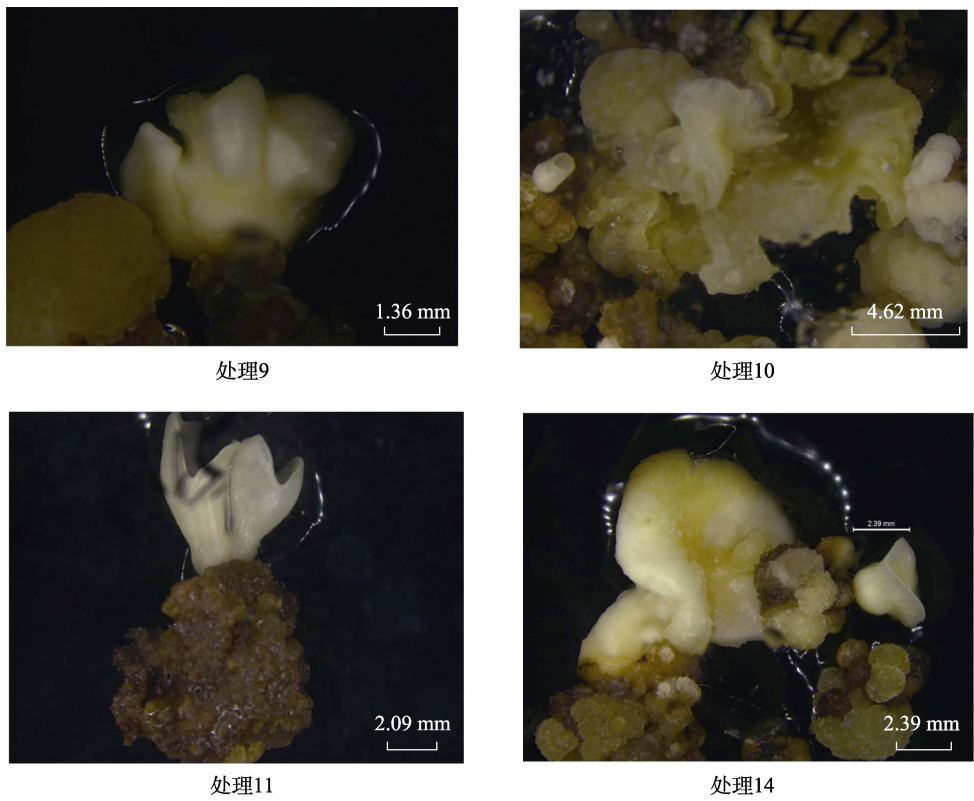


图 2 体胚诱导情况
Fig. 2 Somatic embryo induction

2.4 植株再生情况分析

从体胚发生培养基中挑选出 11 个较正常的

体胚，转入植株再生培养基中进行再生（图 3），其中出苗 2 株，7 个只长根不抽芽，2 个既不抽芽

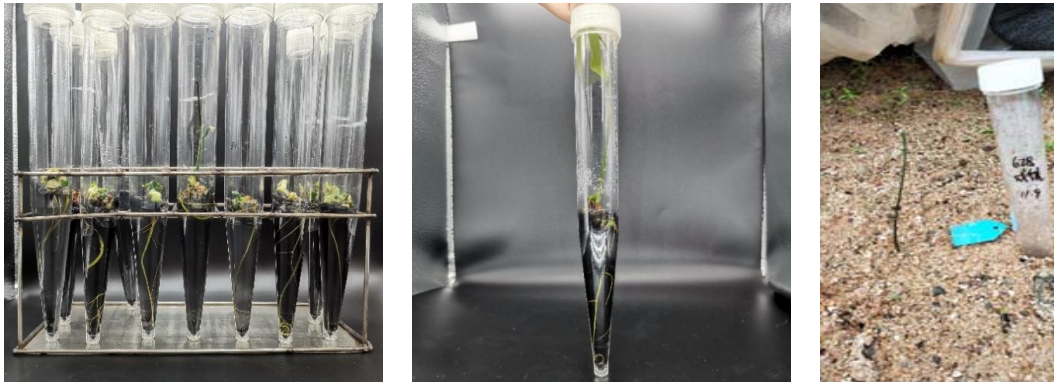


图3 植株再生及驯化过程

Fig. 3 Plant regeneration and acclimatization process

也不长根, 植株再生率为 18%。

3 讨论

在橡胶树中, 胚性愈伤组织的获得主要有花药培养和内珠被培养 2 种途径。其中, 花药培养是橡胶树离体培养中研究最多的一个方向, 也是橡胶树生物技术育种的主要途径^[14]。经由花药培养获得的易碎胚性愈伤组织可通过继代培养快速增殖, 再进行批量的体胚诱导和植株再生^[15], 或者进行悬浮培养建立胚性悬浮细胞系, 以此作为原生质体培养的最佳分离材料^[16]。因此, 如何获得良好的胚性愈伤组织对开展后续的研究具有重要的研究意义。

本研究明确了橡胶树花药愈伤组织诱导的最优组合为 A₃B₄C₃D₁, 即毒莠定浓度 20 mg/L、KT 浓度 2 mg/L、6-BA 浓度 1 mg/L、IAA 浓度 0 mg/L。本研究结果表明, 对胚性愈伤的诱导起主要作用的是毒莠定浓度, 其浓度在 20~30 mg/L 之间时, 对胚性愈伤组织的诱导有促进作用。低浓度的毒莠定虽然也能诱导愈伤组织产生, 但是这些愈伤组织几乎为无胚胎发生能力的非胚性愈伤组织。

在体胚诱导阶段所用培养基为橡胶树热垦 7-33-97 品种的体胚诱导培养基, 产生的多为不正常的体细胞胚, 可能是由于体胚发生的基因型依赖所致, 今后的研究中也需针对热垦 628 品种研发针对性的体胚诱导培养基。本研究所有处理在诱导愈伤组织 25~28 d, 愈伤组织达到快速增殖时期, 为了更好地确定愈伤组织的生长发育状态, 今后要更加关注 25 d 以前的愈伤组织状态, 在该研究的基础上优化愈伤诱导培养基配方, 使其能更快地从花药诱导胚性愈伤, 缩短胚性愈伤诱导时间, 降低变异发生机率, 以及为引进法国 RITA

培养系统提供更好的起始培养材料。本研究中植株再生率为 18%, 远低于热垦 7-33-97 的 70% 左右, 原因可能有以下两方面, 一是所使用的体胚还不够成熟, 二是所使用的植株再生培养基不适用于橡胶树热垦 628 品种植株再生。有 1 株移栽于沙床中进行驯化。但由于移栽时工人不慎将叶片弄掉以及后期管理不到位, 很遗憾最终没能移栽成活。由于初次诱导的植株较少, 且没有移栽成活, 所以未对其进行遗传变异检测, 但是从植株的叶片形态和株高上看, 无明显变异特征。

参考文献

- [1] 陈雄庭, 王泽云, 吴蝴蝶, 张秀娟. 橡胶树新种植材料-自根幼态无性系[J]. 热带作物学报, 2002, 23(1): 19-23.
CHEN X T, WANG Z Y, WU H D, ZHANG X J. A new planting material of *Hevea brasiliensis*-self-rooting juvenile-type clone[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2002, 23(1): 19-23. (in Chinese)
- [2] 李土荣, 张健珍, 王一承, 陈雄庭, 吴青松. 橡胶大丰 95 花药苗幼态无性系的优良性状初报[J]. 热带农业科学, 2010, 30(7): 1-3.
LI T R, ZHANG J Z, WANG Y C, CHEN X T, WU Q S. Desirable characteristics of rubber tree juvenile clone Dafeng 95 from anther culture[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2010, 30(7): 1-3. (in Chinese)
- [3] CARRON M P, LARDET L, LECONTE A, BOKO C, DEAB G, KELI J. Field growth and rubber yield of *Hevea brasiliensis* (Muell-Arg.) from budded versus *in vitro* micro-propagated plants from clone IRCA 18[J]. Acta Horticulturae, 2003, 616: 40.
- [4] 方家林, 李维国, 黄华孙, 张晓飞, 吴春太, 王祥军, 黄肖, 高新生. 橡胶树热垦 628 品种区域试验结果[J]. 热带农业科学, 2013, 33(10): 30-34.

- FANG J L, LI W G, HUANG H S, ZHANG X F, WU C T, WANG X J, HUANG X, GAO X S. Report on regional trial of *Hevea brasiliensis* clone Reken 628[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(10): 30-34. (in Chinese)
- [5] PASCAL M, HERVE E, NICOLE M F, CARRON M P. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. Tissue and Organ Culture, 1993, 33: 331-338.
- [6] 李哲, 戴雪梅, 孙爱花, 黄天带, 周权男, 黄华孙, 林位夫, LUDOVIC L, PASCAL M, MARC-PHILIPPE C. 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[J]. 热带生物学报, 2010, 1(4): 307-313.
- LI Z, DAI X M, SUN A H, HUANG T D, ZHOU Q N, HUANG H S, LIN W F, LUDOVIC L, PASCAL M, MARC-PHILIPPE C. Nucellus friable callus induction and its embryoid ontogeny from rubber tree clone Reyan 88-13[J]. Journal of Tropical Biology, 2010, 1(4): 307-313. (in Chinese)
- [7] 欧阳超, 莫廷辉, 曾丽星. 热研 7-33-97 袋装苗叶片愈伤组织诱导培养研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(6): 1124-1130.
- OUYANG C, MO T H, ZENG L X. Callus culture from bagged seedlings leaves of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.) clone Reyan 7-33-97[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(6): 1124-1130. (in Chinese)
- [8] WUTTHICHAJ S, SOONTREEYA K, YUPAPORN S, SOMPONG T. Callus induction and somatic embryogenesis from anther cultures of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.)[J]. Kasetsart Journal (Natural Science), 2014, 48: 364-375.
- [9] PASCAL M, HERVE E, CARRON M P. Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.): relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters[J]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46(283): 255-261.
- [10] HERVE E, LARTAUD M, CARRON M P, NICOLE M F. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.)[J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(306): 129-137.
- [11] 戴雪梅, 黄天带, 李季, 杨先锋, 辛士超, 黄华孙. AgNO₃ 对橡胶树花药愈伤组织形态及体胚发生的影响[J]. 广西植物, 2016, 36(12): 1426-1431.
- DAI X M, HUANG T D, LI J, YANG X F, XIN S C, HUANG H S. Effects of AgNO₃ on morphology and somatic embryogenesis of anther callus of *Hevea brasiliensis*[J]. Guihaia, 2016, 36(12): 1426-1431. (in Chinese)
- [12] 黄天带, 李哲, 孙爱花, 周权男, 华玉伟, 黄华孙. 根癌农杆菌介导的橡胶树花药愈伤组织遗传转化体系的建立[J]. 作物学报, 2010, 36(10): 1691-1697.
- HUANG T D, LI Z, SUN A H, ZHOU Q N, HUA Y W, HUANG H S. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated anther calli transformation system in *Hevea brasiliensis*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(10): 1691-1697. (in Chinese)
- [13] 华玉伟, 黄天带, 孙爱花, 黄华孙. 橡胶树体胚再生试管改进及其对植株再生和移栽的影响[J]. 热带农业科学, 2013, 33(7): 1-3, 16.
- HUA Y W, HUANG T D, SUN A H, HUANG H S. Effects of improving test tube on plant regeneration and transplantation in *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(7): 1-3, 16. (in Chinese)
- [14] 谭德冠, 孙雪飘, 张家明. 巴西橡胶树的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 674-678.
- TAN D G, SUN X P, ZHANG J M. Tissue culture of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.)[J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41(5): 674-678. (in Chinese)
- [15] HUA Y W, HUANG T D, HUANG H S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Breeding, 2010, 129(2): 202-207.
- [16] 戴雪梅, 黄天带, 李季, 杨先锋, 黄华孙. 不同外植体对橡胶树原生质体分离和再生的影响[J]. 分子植物育种, 2014, 12(6): 1259-1264.
- DAI X M, HUANG T D, LI J, YANG X F, HUANG H S. Effects of different explants on isolation and regeneration of protoplast in rubber tree[J]. Molecular Plant Breeding, 2014, 12(6): 1259-1264. (in Chinese)