

橡胶树不同发育时期花药愈伤生长发育对低温的响应

王梦澳^{1,2}, 李娜^{2,3}, 吴日智², 周权男², 彭素娜², 杨先锋², 黄天带^{2*}, 曾长英^{1*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所/海口市热带植物种苗创新重点实验室/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 海南海口 571101; 3. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070

摘要: 橡胶树花药再生体系是我国最早建立的橡胶树体胚植株再生技术体系, 其产生的再生植株为自根幼态无性系, 兼具实生苗生长迅速、抗逆性强和芽接苗遗传同质的优点, 同时因发育时期从老态恢复至幼态, 产量提升 20%以上。然而每年花蕾采集期约为 60 d, 无法全年供应由花药壁细胞脱分化形成的愈伤组织, 造成依托于该材料的研究无法持续进行。本研究以橡胶树品种热研 73397 雄蕊为材料, 研究不同发育时期的花药愈伤 (0、7、14、21、28、35、42 d) 在 15、20 °C 两个低温下保存 15 d 其愈伤诱导和体细胞胚发生发育的情况。结果表明: 15 °C 和 20 °C 两个温度对低温保存后愈伤诱导、体细胞胚发生各阶段除胚性愈伤数显著低于对照组外, 其余无显著影响; 发育时期对低温保存后愈伤诱导、体细胞胚发生各阶段均有显著影响 ($P<0.05$), 对子叶胚形成阶段影响最大, 其中 21 d 和 35 d 花药愈伤组织经低温保存后其子叶胚数量分别显著高于和低于对照组子叶胚 ($P<0.05$); 15 °C 和 20 °C 低温保存 15 d 后不同发育时期花药愈伤组织与对照组相比, 可延长花药初代愈伤供应时间 15~60 d, 初代子叶胚供应时间 27~95 d。最优方案为发育时期 21 d 的花药愈伤在 15 °C 低温下保存 15 d, 可延长花药愈伤和初代子叶胚供应 60 d 和 60~95 d, 该处理虽降低了 46.61% 愈伤数, 但促进了子叶胚形成, 子叶胚数提高了 27.18%。本研究实现了橡胶树花药愈伤的短期保存, 有效解决了因花期短导致遗传转化受体来源不足的困难, 全年 3 个花季可开展实验时间由 60 d 延长至 240 d, 有助于加快橡胶树花药愈伤遗传转化体系优化研究。

关键词: 橡胶树; 遗传转化; 花药愈伤; 低温保存; 体细胞胚发生

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Response of Growth and Development of Anther Callus in Different Developmental Stages to Low Temperature in *Hevea brasiliensis*

WANG Mengao^{1,2}, LI Na^{2,3}, WU Rizhi², ZHOU Quannan², PENG Suna², YANG Xianfeng², HUANG Tiandai^{2*}, ZENG Changying^{1*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Haikou Key Laboratory of Tropical Plant Seedling Innovation / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Cultivation & Physiology of Tropical Crops / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation and Physiology of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 3. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract: The anther regeneration system is the earliest *in vitro* tissue culture regeneration plant system of *Hevea brasiliensis* established in China, and the regenerated plants were named self-rooted juvenile clone, which have the advantages of rapid growth, high resistance as seedlings and genetic homogeneity as grafted seedlings, and yield increase by

收稿日期 2024-01-12; 修回日期 2024-03-01

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32271915); 国家天然橡胶产业技术体系项目 (No. CARS33); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630022022001)。

作者简介 王梦澳 (1999—), 女, 硕士, 研究方向: 作物遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 黄天带 (HUANG Tiandai), E-mail: zhuanjiyinyuzhong@163.com; 曾长英 (ZENG Changying), E-mail: zengchangying@hainanu.edu.cn。

more than 20% due to rejuvenation. However, the buds collection period is only about 60 d per year, which does not allow for a year-round supply of callus formed by dedifferentiation anther wall cells, resulting in unsustainable research relying on this material. In this study, Reyan73397 stamens were utilized to study the callus induction and somatic embryogenesis of anther callus at different developmental periods (0 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 35 d and 42 d), which were stored at two low temperatures of 15 °C and 20 °C for 15 d. The results showed that temperature 15 °C and 20 °C had no significant effect on the stages of callus induction and somatic embryogenesis after preservation, except that the number of embryogenic callus was significantly lower than that of the control the developmental period had significant effect on callus induction and somatic embryogenesis after preservation, and showed the greatest effect on the stage of cotyledonary embryo formation, of which the anther callus at 21 d and 35 d responded strongly, the number of cotyledonary embryos of 21 d anther callus was significantly higher than that of the control, and the number of cotyledonary embryos of 35 d anther callus was significantly lower than that of the control after preservation; the preservation of anther callus with different developmental periods for 15 d at 15 °C and 20 °C could extend the supply time of anther callus for 15~60 d, and primary cotyledonary embryos for 27~95 d compared to the control; the optimal solution was to keep the anther callus with developmental periods at 21 d at 15 °C and 20 °C for 15days, which could prolong the supply of anther callus and primary cotyledonary embryo for 60 days and 60~95 days separately. Although the treatment reduced the number of callus by 46.61%, it promoted the formation of cotyledon embryo by 27.18% in number. In this study, the short-term preservation of *H. brasiliensis* anther callus was realized, which would greatly alleviate the difficulty of insufficient source of genetic transformation receptors due to the short flowering period, the study time could be carried out for the whole year from 60 days to 240 days, which could help to speed up the research on optimization of the genetic transformation system of anther callus in *Hevea brasiliensis*.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; genetic transformation; anther callus; low temperature preservation; somatic embryogenesis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.012

天然橡胶是重要的工业原料，更是不可或缺的战略物资，其主要来源于巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis*）。现代遗传工程的发展、基因组编辑手段的精准改良加速了培育转基因橡胶树新品种的脚步，随之而来的对于转基因优质受体初代花药愈伤和初代子叶胚的持续供应成为不可忽视的问题。

橡胶树公开报道的遗传转化体系根据受体分为 5 种，原生质体^[1]、易碎胚性愈伤组织^[2]、花药愈伤组织^[3-5]、次生胚^[6]，其中原生质体再生效率低^[7]，易碎胚性愈伤组织再生植株生长势弱^[8]，只有花药愈伤组织和次生胚具有商业应用价值。随着技术的不断进步，橡胶树花药愈伤组织的遗传转化效率在不断提高。然而花药愈伤组织为脱分化愈伤，胚性愈伤与非胚性愈伤混合，不能通过继代增殖，需要不断采集外植体，但花蕾来源严重受季节限制，全年可供采花时期短，不能为相应研究提供长期稳定的受体来源。本文研究了不同发育时期花药愈伤在 15 °C 和 20 °C 低温保存 15 d 后，对其愈伤诱导、体细胞胚发生和子叶胚形成的影响，为今后利用低温保存橡胶树初代花药愈伤组织，延长优质胚性愈伤组织、初代子叶胚供应时间，妥善保存橡胶树种质资源提供理论依据，为以初代花药愈伤或初代体细胞胚为受体

的转基因研究供体保障提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大规模推广级品种橡胶树热研 73397 春季幼嫩雄花，采自位于海南省儋州市中国热带农业科学院橡胶研究所试验基地。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选择与接种 从健康的橡胶树上采集雄性幼花，将有花序的枝条用湿毛巾敷盖，塑料袋包裹储存，立即带回实验室。用镊子从花序中挑选黄绿色的胸花在 75% 的乙醇浸泡 1 min，期间摇晃数次，无菌水冲洗 1 遍，随后用 0.1% 升汞浸泡 10 min，期间晃动数次，无菌水冲洗 3~5 遍。无菌的超净工作台中，在显微镜下用解剖针剥开花蕾表皮取出完整雄花接种于培养皿中，每皿接种 7 个外植体。

1.2.2 橡胶树低温保存花药愈伤及保存后室温诱导愈伤组织/恢复 共设置花药愈伤发育时期、保存温度 2 个影响因素。CK 组为一直放置在室温 (25±2) °C 暗培养的花药愈伤组织。将经过无菌消毒的橡胶树雄花接种于 M1^[9]培养基中置于室温培养得到不同发育时期的花药愈伤组织 (0、7、14、21、28、35、42 d)，然后分别放置于 15 °C

及 20℃培养箱中暗培养 15 d, 观察低温处理前后花药愈伤的表型, 随后放置室温暗培养。跟踪不同处理橡胶树花药愈伤组织发生及恢复情况, 每 10 d 观察各发育时期的花药愈伤组织发生及恢复情况, 30 d 统计愈伤组织诱导率。CK 组室温暗培养 35 d 后统计愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率 = (花药愈伤组织数/低温培养的花药数) × 100%。愈伤组织延长保存时间(d) = 实验组花药从外植体接种至可转入至出胚培养基所需总天数 - 对照组花药从外植体接种至可转入出胚培养基所需总天数。每个处理 5 皿, 每皿 7 个外植体, 重复 3 次。

1.2.3 橡胶树低温保存花药愈伤组织体细胞胚诱导与成熟 将上述各组花药愈伤组织转至体细胞胚诱导培养基 M2^[9]中, 室温(25±2)℃暗培养 60 d 时统计再分化出体细胞胚的花药愈伤组织数(块), 继续培养至 120 d 时观察并统计胚状体及子叶胚数量(个)。以一直置于室温暗培养的花药愈伤为 CK 组。胚性愈伤诱导率 = (诱导出体细胞胚的愈伤数/接种愈伤数) × 100%; 体细胞胚诱导率 = (体细胞胚总数/胚性愈伤数) × 100%; 子叶胚获得率 = (子叶胚总数/体细胞胚总数) × 100%。体细胞胚延长保存时间(d) = 实验组从外植体接种至诱导出子叶胚所需总天数 - 对照组从外植体接种至诱导出子叶胚所需总天数。

1.3 数据处理

试验数据主要采用 Excel 2023 和 IBM SPSS Statistics 20 软件进行整理、统计和分析。

2 结果与分析

2.1 低温保存对不同发育时期橡胶树花药愈伤组织生长的影响

结果表明: (1) 不同发育阶段的花药愈伤组织在 15℃低温下保存 15 d, 低温保存期间, 发育时期为 0、7、14、21 d 的花药愈伤无生长迹象, 发育时期为 28、35、42 d 的花药愈伤有一定生长, 但较 CK 组均有不同程度延缓(表 1)。愈伤外观与 CK 组相似, 未出现明显冷害(图 1B1、B2); (2) 不同发育阶段的花药愈伤组织在 20℃低温下保存 15 d, 低温保存期间, 发育时期为 0、7 d 的花药愈伤无生长迹象, 发育时期为 14、21、28、35 d 的花药愈伤生长情况较 CK 组均有不同程度延缓, 发育时期为 42 d 的花药愈伤生长情况与

CK 组相当。愈伤外观与 CK 组相似, 未出现明显冷害(图 1B3、B4)。

2.2 低温保存后不同发育时期橡胶树花药愈伤组织诱导或恢复情况

室温条件下, 花药愈伤诱导数为 34.33 个, 诱导率为 98.10%(表 1)。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 15℃低温下保存 15 d, 结果表明, 在愈伤诱导阶段, 发育时期为 28、35、42 d 的花药愈伤诱导情况与 CK 组的差异不显著。发育时期为 7、14 d 的花药愈伤数及诱导率均显著下降($P < 0.05$), 分别较 CK 组降低 5~6 个, 15.24%和 19.05%。发育时期为 0、21 d 的花药愈伤数及诱导率均大幅度下降, 分别较 CK 组减少 16~18 个, 45.72%和 53.34%(表 1)。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 20℃低温下保存 15 d, 结果表明, 在愈伤诱导阶段, 发育时期为 21、28、35、42 d 的花药愈伤与 CK 组无显著差异。发育时期为 0、7、14 d 的花药愈伤数及诱导率均显著下降($P < 0.05$), 降幅分别为 4~9 个和 11.43%~25.72%(表 1)。

2.3 低温保存后不同发育时期橡胶树花药胚性愈伤诱导情况

室温条件下, 胚性愈伤数为 25.33 个, 诱导率为 73.84%(表 1, 图 1D)。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 15℃低温下保存 15 d, 结果表明, 在胚性愈伤诱导阶段, 发育时期为 28、42 d 的花药愈伤其胚性愈伤数、胚性愈伤诱导率与 CK 组无显著差异; 其余 5 个发育时期与 CK 组相比, 其胚性愈伤数与胚性愈伤诱导率均显著下降($P < 0.05$), 降幅分别为 6~15 个和 8.09%~33.26%(表 1, 图 1D1、D2)。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 20℃低温下保存 15 d, 结果表明, 在胚性愈伤诱导阶段, 发育时期为 21、42 d 花药愈伤的胚性愈伤数及胚性愈伤诱导率与 CK 组无显著差异; 发育时期为 28 d 花药愈伤的胚性愈伤数与 CK 组无显著差异, 胚性愈伤诱导率显著高于 CK 组($P < 0.05$); 发育时期为 0、7、14、35 d 的花药愈伤其胚性愈伤数及胚性愈伤诱导率均显著低于 CK 组($P < 0.05$), 降幅分别为 8~14 个和 9.68%~41.90%(表 1)。

2.4 低温保存后不同发育时期的花药愈伤组织体细胞胚发生情况

室温条件下, 体细胞胚数为 87.33 个, 体细

表 1 低温保存对不同发育时期的花药愈伤组织的生长发育情况影响

Tab. 1 Effects of low temperature preservation on growth and development of anther callus at different developmental stages

温度 Tem- perature /℃	发育时期 Devel- opmental stage/d	低温生长 状况 Low tempera- ture growth regime	愈伤诱导数 Number of callus induction	愈伤诱导率 Callus induc- tion rate/%	胚性愈伤数 Number of embryogenic callus	胚性愈伤诱 导率 Induc- tion rate of embryogenic callus/%	体细胞胚数 Somatic embryo number	体细胞胚诱导 率 Somatic embryo induc- tion rate/%	子叶胚数 Number of cotyledon embryos	子叶胚获得率 Acquisition rate of cotyle- don embryo/%
15	0	0	15.67±1.15 ^g	44.76±3.30 ^g	10.33±1.53 ^g	65.75±5.35 ^{cd}	31.00±3.00 ^{gh}	305.37±63.64 ^{ef}	11.67±1.53 ^{fg}	37.99±7.46 ^{bc}
	7	0	27.67±1.53 ^{cd}	79.05±4.36 ^{cd}	11.67±1.53 ^{fg}	42.45±7.77 ^f	33.00±2.65 ^g	284.53±22.65 ^f	11.67±2.89 ^{fg}	35.06±5.75 ^{bcd}
	14	0	29.00±1.00 ^{bc}	82.86±2.86 ^{bc}	19.00±1.00 ^c	65.53±3.01 ^{cd}	86.67±4.51 ^c	456.15±1.54 ^b	21.67±3.06 ^e	24.99±3.24 ^{de}
	21	0	18.33±0.58 ^f	52.38±1.65 ^f	11.00±1.00 ^{fg}	59.94±3.93 ^d	57.33±3.06 ^f	523.64±49.02 ^a	29.67±3.06 ^{bc}	51.87±6.16 ^a
	28	+	33.33±0.58 ^a	95.24±1.65 ^a	24.00±1.00 ^b	71.98±2.02 ^{bc}	74.33±5.51 ^d	310.59±33.78 ^{ef}	23.67±3.21 ^{cde}	32.09±6.13 ^{bcd}
	35	+	33.67±0.58 ^a	96.19±1.65 ^a	13.67±1.15 ^{ef}	40.58±3.12 ^f	25.33±3.06 ^h	185.98±25.55 ^g	4.00±2.00 ^{hi}	16.6±10.12 ^e
	42	++	32.67±1.53 ^a	93.33±4.36 ^a	23.67±3.06 ^b	72.28±6.25 ^{bc}	87.33±5.51 ^c	372.35±43.96 ^{de}	22.33±5.03 ^e	25.4±4.25 ^{de}
	20	0	30.33±1.15 ^b	86.67±3.30 ^b	15.33±1.53 ^{de}	50.50±3.76 ^e	67.33±3.06 ^e	440.75±25.17 ^{bc}	21.67±2.52 ^e	32.27±4.46 ^{bcd}
20	7	0	27.00±2.00 ^{de}	77.14±5.71 ^{de}	17.33±1.53 ^{cd}	64.16±1.28 ^d	65.67±2.52 ^e	381.6±47.06 ^{cd}	17.67±2.08 ^{ef}	26.86±2.22 ^{de}
	14	+	25.33±1.15 ^e	72.38±3.30 ^e	11.33±1.15 ^{fg}	44.66±2.59 ^{ef}	56.33±2.52 ^f	499.44±37.28 ^{ab}	9.67±2.08 ^{gh}	17.22±3.96 ^e
	21	+	34.33±1.15 ^a	98.10±3.30 ^a	27.33±0.58 ^a	79.65±2.36 ^{ab}	98.00±3.61 ^b	358.51±9.43 ^{de}	41.33±4.16 ^a	42.16±3.75 ^{ab}
	28	+	32.67±1.15 ^a	93.33±3.30 ^a	27.00±1.00 ^a	82.66±1.58 ^a	98.00±4.36 ^b	363.67±29.29 ^{de}	29.33±4.51 ^{bcd}	29.84±3.36 ^{cd}
	35	++	33.33±0.58 ^a	95.24±1.65 ^a	10.67±2.08 ^g	31.94±5.66 ^g	17.00±2.65 ⁱ	164.39±43.87 ^g	3.33±2.31 ⁱ	18.61±9.87 ^e
	42	++	34.67±0.58 ^a	99.05±1.65 ^a	25.00±1.00 ^{ab}	72.10±1.94 ^{bc}	125.0±7.94 ^a	500.68±39.71 ^{ab}	31.00±2.65 ^b	24.93±3.48 ^{de}
室温	CK	+++	34.33±0.58 ^a	98.10±1.65 ^a	25.33±1.53 ^{ab}	73.84±5.43 ^b	87.33±3.79 ^c	345.15±15.2 ^{def}	23.33±6.51 ^{de}	26.58±6.67 ^{de}

注：实验中各组初始雄蕊数 35 个。低温生长状况为低温保存期间各实验组生长状况，室温对照为+++，正生长为+///+++，不生长为 0，负生长为-；数据为平均值±标准误（ $n \geq 3$ ）；不同小写字母表示处理间差异显著（ $P < 0.05$ ）。
Note: The initial number of stamens in each group was 35. The low temperature growth conditions were the growth conditions of each experimental group during the low temperature preservation period, the control at room temperature was +++, positive growth was +///+++ , no growth was 0, and negative growth was -. Data are mean ± standard error ($n \geq 3$); Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

胞胚诱导率为 345.15%（表 1，图 1D）。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 15℃低温下保存 15 d，结果表明，在体细胞胚发生阶段，发育时期为 14、42 d 的花药愈伤产生的体细胞胚数与 CK 组无显著差异，而其他 5 个发育时期花药愈伤产生的体细胞胚数较 CK 组显著下降，降幅为 13~62 个；发育时期为 14、21 d 的花药愈伤体细胞胚诱导率较 CK 组有显著提高（ $P < 0.05$ ），分别提高了 111%和 178.49%；发育时期为 35 d 的花药愈伤的体细胞诱导率显著降低（ $P < 0.05$ ），较 CK 组下降 159.17%，而其余 4 个时期的花药愈伤体细胞胚诱导率与 CK 组无显著差异（表 1，图 1D1、D2）。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 20℃低温下保存 15 d，结果表明，在体细胞胚发生阶段，发育时期为 21、28、42 d 的花药愈伤体细胞胚数显著高于 CK 组（ $P < 0.05$ ），增幅为 10~38 个；发育时期为 0、7、14、35 d 的花药愈伤体细胞胚数较 CK 组显著下降（ $P < 0.05$ ），降幅为 20~70 个；发育时期为 0、14、42 d 的花药愈伤体细胞胚诱

导率比 CK 组显著提高（ $P < 0.05$ ），增幅为 95.60%~155.53%；发育时期为 7、21、28 d 的花药愈伤体细胞胚诱导率与 CK 组无显著差异；发育时期为 35 d 的花药愈伤的体细胞胚诱导率对比 CK 组下降 180.76%，差异最为显著（ $P < 0.05$ ）（表 1，图 1D3、D4）。

2.5 低温保存后不同发育时期花药愈伤组织子叶胚获得情况

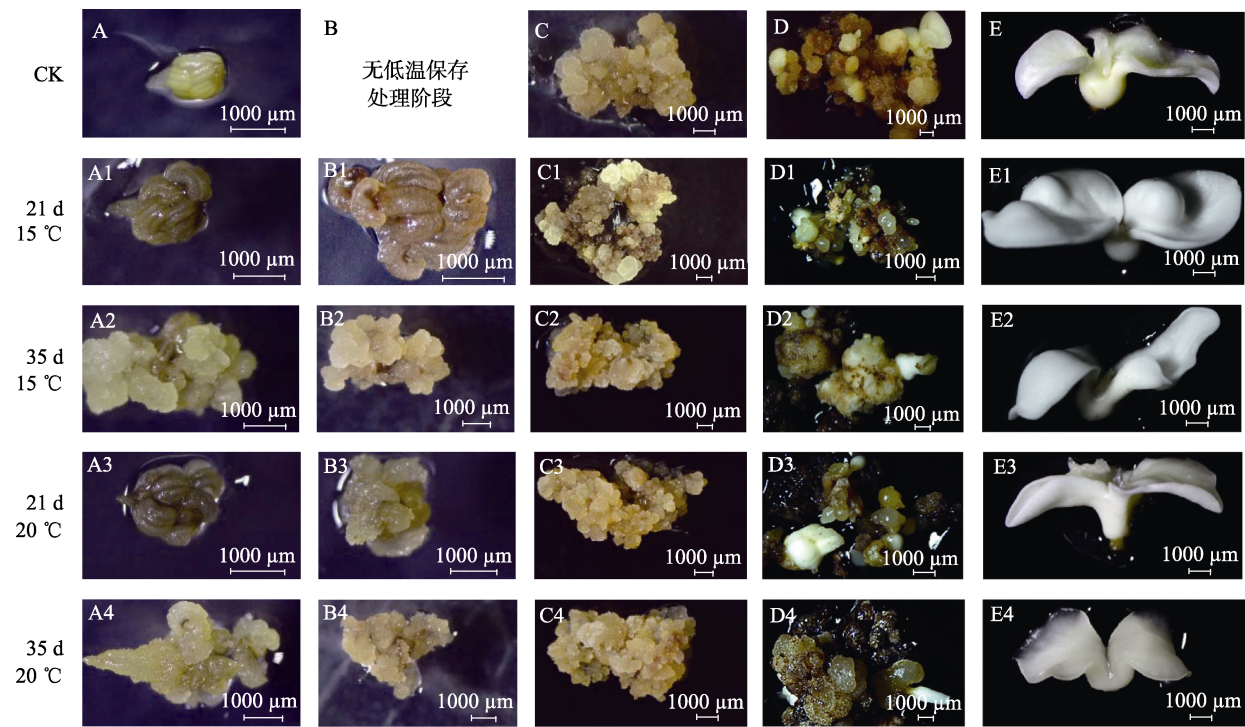
对照组的子叶胚数为 23.33 个，子叶胚获得率为 26.58%（表 1，图 1E）。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 15℃低温下保存 15 d，结果表明，在子叶胚获得方面，发育时期为 21 d 的花药愈伤子叶胚数比 CK 组显著提高（ $P < 0.05$ ），较 CK 组多约 6 个，发育时期为 14、28、42 d 的花药愈伤子叶胚数与 CK 组无显著差异，发育时期为 0、7、35 d 的花药愈伤子叶胚数较 CK 组显著下降（ $P < 0.05$ ），降幅为 11~19 个；发育时期为 0、21 d 的花药愈伤子叶胚获得率对比 CK 组显著提高（ $P < 0.05$ ），分别较 CK 组提高了 11.41%和 25.29%，而其余 5 个发育时期的

花药愈伤子叶胚获得率较 CK 组无显著差异（表 1，图 1E1、E2）。

不同发育阶段的花药愈伤组织在 20 ℃低温下保存 15 d，结果表明，在子叶胚获得方面，发育时期为 21、42 d 的花药愈伤子叶胚数比 CK 组显著提高（ $P<0.05$ ），分别较 CK 组增加约 7 个和 18 个，发育时期为 0、7、28 d 的花药愈伤子叶胚

数与 CK 组无显著差异，发育时期为 14、35 d 的花药愈伤子叶胚获得数较 CK 组显著下降（ $P<0.05$ ），分别较 CK 组减少约 13 和 20 个；发育时期为 21 d 的花药愈伤子叶胚获得率对比 CK 组显著性提高（ $P<0.05$ ），较 CK 组提高了 15.58%，而其余 6 个发育时期的花药愈伤子叶胚获得率与 CK 组无显著差异（表 1，图 1E3、E4）。



CK: 室温对照组; A: 花药; B: 低温保存后愈伤; C: 刚转入出胚培养基花药愈伤; D: 胚性愈伤; E: 子叶胚。
CK: Room temperature control group; A: Anther; B: Anther callus after preservation; C: Anther callus just transferred to embryo induction medium; D: Embryogenic callus; E: Cotyledonary somatic embryo.

图 1 不同低温保存的花药愈伤在各发育阶段生长状况

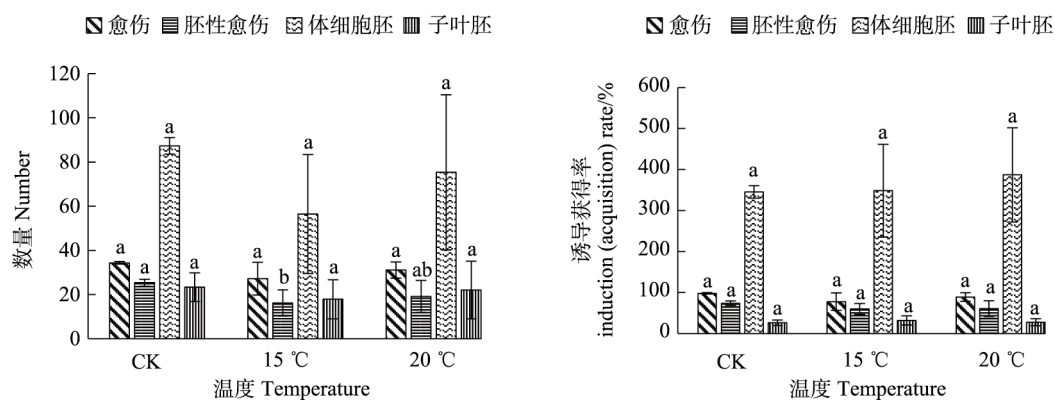
Fig. 1 Growth status of anther calli at different developmental stage under different preservation temperatures

2.6 低温保存温度与花药愈伤发育时期对低温保存后花药愈伤诱导、分化、发育影响

图 2 表明，不同低温保存的花药愈伤在各发育阶段生长状况，15 ℃低温保存后的花药愈伤组织在胚性愈伤诱导阶段的胚性愈伤数较 CK 组显著下降（ $P<0.05$ ），其余生长阶段与 CK 组无显著差异；20 ℃低温保存后的花药愈伤组织在各生长阶段与 CK 组均无显著差异。

图 3 表明，不同发育时期的花药愈伤低温保存后在各发育阶段生长状况，在愈伤诱导阶段（愈伤诱导数和愈伤诱导率），发育时期为 28、35、42 d 的花药愈伤组织与 CK 组无显著差异，而其余 4 个发育时期的花药愈伤组织较 CK 组显著下降；在胚性愈伤诱导阶段（胚性愈伤数和胚性愈伤诱导率），发育时期为 28、42 d 的花药愈伤组

织与 CK 组无显著差异，而其余 5 个发育时期的花药愈伤组织较 CK 组显著下降（ $P<0.05$ ），但其中发育时期为 21 d 的花药愈伤组织的胚性愈伤数显著下降（ $P<0.05$ ），胚性愈伤诱导率与 CK 组确无显著差异；在体细胞胚诱导阶段，发育时期为 14、21、28、42 d 的花药愈伤组织的体细胞胚数与 CK 组无显著差异，而其余 3 个发育时期的体细胞胚数较 CK 组显著下降（ $P<0.05$ ）、发育时期为 14、21 d 的花药愈伤组织的体细胞胚诱导率较 CK 组显著提高（ $P<0.05$ ），发育时期为 0、7、28、42 d 的花药愈伤组织的体细胞胚诱导率与 CK 组无显著差异，发育时期为 35 d 的花药愈伤组织的体细胞胚诱导率较 CK 组显著下降（ $P<0.05$ ）；在子叶胚形成阶段，发育时期为 21 d 花药愈伤组织的子叶胚数较 CK 组显著提高（ $P<0.05$ ），发育时

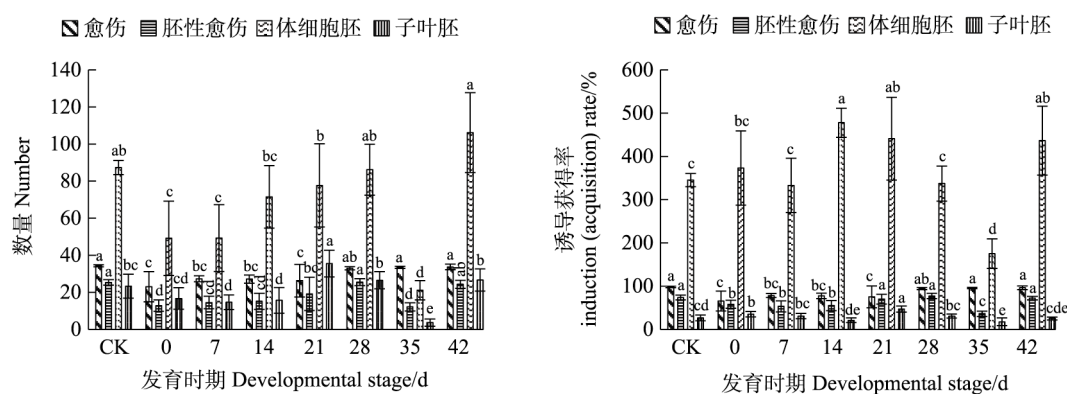


不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 2 不同发育时期的花药愈伤低温保存后在各发育阶段生长状况

Fig. 2 Growth of anther callus in different developmental stages after low temperature preservation



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 3 低温不同时期花药愈伤组织生长发育过程

Fig. 3 Growth and development of anther callus in different developmental stages after low temperature preservation

期为 0、28、42 d 的花药愈伤组织的子叶胚数与 CK 组无显著差异,其余 3 个发育时期的花药愈伤组织的子叶胚数较 CK 组显著下降 ($P<0.05$)、发育时期为 0、21 d 花药愈伤组织的子叶胚获得率较 CK 组显著提高 ($P<0.05$),发育时期为 7、14、28、42 d 的花药愈伤组织的子叶胚获得率与 CK 组无显著差异,发育时期为 35 d 的花药愈伤组织的子叶胚获得率较 CK 组显著下降 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 低温保存将全年花药愈伤供应时间从 60 d 延长至 240 d

花药愈伤组织是良好的遗传转化受体,马来西亚^[10-12]、印度^[4]、我国^[13]均通过转化花药愈伤组织获得了转基因植株。然而花药愈伤组织为脱分化愈伤组织,不能通过继代增殖,需不断采集外植体。橡胶树花期集中,不同地区橡胶树一年

开花 2~3 次,每次雄花花期 20 d 左右。室外采集外植体的另一个问题是污染率与气候密切相关,白粉病高发季节外植体污染率高达 50%以上,而晴天外植体污染率低于 10%。因此在晴天采集外植体诱导愈伤组织,并通过物理化学方式限制其生长,延长愈伤组织供应时间对遗传转化研究具有重要意义。

限制生长保存的方式有降低培养环境的氧气含量、添加渗透调节剂或生长抑制剂、胶囊化或脱水、降低培养温度^[14],其中降低培养温度减慢细胞代谢活动的同时,存活率高、操作简单、方便,使用较多。橡胶树不同愈伤发育时期(0、7、14、21、28 d)、低温保存温度(15、20 °C)可以延长花药初代愈伤供应时间 15~60 d,子叶胚供应时间 27~95 d。最优方案为发育时期为 21 d 的花药愈伤在 15 °C 低温下保存 15 d,可延长花药愈伤和初代子叶胚供应 60 d 和 60~95 d,该处理虽然

降低了46.61%愈伤数,但促进了子叶胚形成,子叶胚数提高了27.18%,达显著水平。说明以该处理低温保存的花药愈伤为侵染受体,在侵染量减少46.61%的情况下,其子叶胚数可提高27.18%,大大提高遗传转化工作效率。近年来,低温保存结合抗氧化剂、低含氧量等方法实现在胚性愈伤组织^[15-16]、茎尖培养物^[17]、花粉^[18]、种子^[19-20]、体细胞胚^[21]、微型块茎^[22]、带芽茎段^[23]等组织、器官、植株^[24]的中短期保存,保存温度在1~20℃,保存时间21 d至18个月。通过18℃+90 g/L蔗糖+2 mg/L ABA+10 μmol/(m²·s)低光照可保存枣椰体细胞胚10个月,存活率接近100%,体细胞胚增殖率高于室温^[21]。通过4~5℃+抗氧化剂可保存橡胶树易碎胚性愈伤25 d,存活率与室温相近,且恢复后愈伤细胞活力更强,植株诱导率高于对照组50%,达显著水平^[25]。但橡胶树易碎胚性愈伤组织诱导时间较长,再生植株生势弱,没有商业价值^[8]。

3.2 低温保存适当发育时期花药愈伤促进了子叶胚形成

在15℃和20℃低温保存后,发育时期为21 d的花药愈伤子叶胚获得数和子叶胚获得率与对照组相比均有显著提高,子叶胚数分别提高了27.18%和77.15%。子叶胚获得率分别提高了25.29%和15.58%。而35 d的花药愈伤,15℃和20℃低温保存后,在愈伤发生阶段与对照组无显著差异,但在体细胞胚发生和子叶胚形成阶段与对照组差异显著,特别是子叶胚形成阶段,子叶胚获得数分别下降了82.85%和85.73%,子叶胚获得率分别下降了9.98%和7.97%,几乎无法获得子叶胚。橡胶树花药愈伤诱导和体细胞胚发生对温度非常敏感,在愈伤诱导和分化为球形原胚的过程,26℃体细胞胚数是24℃的2.86倍,而在球形原胚发育为子叶胚的过程,24℃的体细胞胚数是22℃的1.60倍,是28℃的1.25倍,且28℃导致正常胚比例下降^[26]。橡胶树花药愈伤诱导子叶胚经历5步:外植体脱分化形成愈伤组织(0~21 d)、体细胞分化为胚性母细胞(21~28 d)、胚性母细胞经多次分裂为多细胞原胚(28~42 d)、多细胞原胚发育为球形胚(42~49 d)、球形胚进一步发育成子叶胚(52~72 d)^[27]。因此,21 d处于体细胞分化为胚性母细胞时期,此时进行低温处理,有助于筛选掉胚性弱或畸形的胚性母细胞,提高正常胚性母细胞比例,这些细胞在后续发育

为子叶胚过程,少了畸形胚的竞争,营养供应更充分,因此,21 d花药愈伤经低温处理后子叶胚数及子叶胚获得率大幅提高。而35 d的花药愈伤处于多细胞原胚阶段,对温度非常敏感,推测低温不利于胚性母细胞发育为多细胞原胚,因此低温处理后,35 d的花药愈伤体细胞胚数和子叶型体胚数及体细胞胚诱导率和子叶型体胚诱导率大幅下降。低温提高正常胚比例在牡丹^[28]、水曲柳^[29]、大豆^[30]、鸭茅草^[31]也有发现。后续将通过解剖学进一步验证。

4 结论

(1)在15℃和20℃低温保存15 d后愈伤诱导、体细胞胚发生各阶段除胚性愈伤数显著低于对照组外,其余指标与对照组无显著差异,15℃低温保存各阶段指标均低于20℃,但差异不显著;(2)发育时期对低温保存后愈伤诱导、体细胞胚发生各阶段均有显著影响,对子叶胚形成阶段影响最大,其中21 d花药愈伤组织经低温保存其子叶胚数量显著高于对照组,35 d花药愈伤组织经低温处理后子叶胚数量显著低于对照组($P<0.05$)。(3)15℃和20℃低温保存15 d不同发育时期花药愈伤组织与对照组相比,可延长花药初代愈伤供应时间15~60 d,初代子叶胚供应时间27~95 d。最优方案为发育时期为21 d的花药愈伤在15℃低温下保存15 d,可延长花药愈伤和初代子叶胚供应60 d和60~95 d,该处理虽然降低了46.61%愈伤数,但促进了子叶胚形成,子叶胚数提高了27.18%。本研究实现了橡胶树花药愈伤的短期保存,有效解决了因花期短导致遗传转化受体来源不足的困难,全年3个花季延长受体(花药愈伤)供应时间180 d,加上花季60 d,全年可开展实验时间由60 d延长至240 d,有助于加快橡胶树花药愈伤遗传转化体系优化研究。

参考文献

- [1] FAN Y, XIN S, DAI X, YANG X, HUANG H, HUA Y. Efficient genome editing of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) protoplasts using: CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 146, 112146.
- [2] BLANC G, BAPTISTE C, OLIVER G, MARTIN F, MONTORO P. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. plants[J]. Plant Cell Reports, 2006, 24:

- 724-733.
- [3] AROKIJARAJ P, JONES H, CHEONG K F, COOMBER S, CHARLWOOD B V. Gene insertion in *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 425-431.
- [4] JAYASHREE R, REKHA K, VENKATACHALAM P, URATSU S L, DANDEKAR A M, KUMARI P, KALA R G, PRIYA P, SUSHMA KUMARE S, SOBHA S, ASHOKAN M P, SETHURAJ M R, THULASEED- HARAN A. Genetic transformation and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) transgenic plants with a constitutive version of an anti-oxidative stress superoxide dismutase gene[J]. Plant Cell Reports, 2003, 22: 201-209.
- [5] 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 genetic transformation system of rubber tree anther callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. The Crop Journal, 2010, 36(10): 1691-1697. (in Chinese)
- [6] HUANG T D, LI J, LI Y T, HUANG H S, HUA Y W. Somatic embryo an alternative target tissue for *Agrobacterium*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Rubber Research, 2015, 18(3): 171-188.
- [7] 戴雪梅, 黄天带, 孙爱花, 周权男, 李哲, 华玉伟. 橡胶树原生质体培养研究进展[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1973-1976.
- DAI X M, HUANG T D, SUN A H, ZHOU Q N, LI Z, HUA Y W. Research progress on protoplast culture of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(10): 1973-1976. (in Chinese)
- [8] CARRON M P, LARDET L, LECONTE A, DEA B G, KELI J, GRANET F, JULIEN J, TEERAWATANASUK K, MONTORO P. Field trials network emphasizes the improvement of growth and yield through micropropagation in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)[J]. Acta Horticulturae, 2009(812): 485-492.
- [9] HUA Y W, HUANG T D, HUANG H S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Breed, 2010, 129(2): 202-207.
- [10] AROKIJARAJ P, JONES H, JAAFAR H. *Agrobacterium* mediated transformation of *Hevea* anther calli and their regeneration into plantlets[J]. Journal of Natural Rubber Research, 1996, 11(2): 77-87.
- [11] AROKIJARAJ P, RUKER F, OBERMAYR E, SAMSUL BARI A, HAFASH J, CARTER D C, YEANG H Y. Expression of human serum albumin in transgenic *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Rubber Research, 2002, 5(3): 157-166.
- [12] AROKIJARAJ P, LEELAWATHY R, YEANG H Y. The super virulence plasmid pToK47 from *Agrobacterium tumefaciens* A281 improves transformation efficiency of *Hevea brasiliensis*[J]. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2009, 5: 137-141.
- [13] 黄天带, 孙爱花, 杨加伟, 华玉伟, 黄华孙. 几丁质酶及 β -1,3-葡聚糖基因转化橡胶树的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(28): 28-33.
- HUANG T D, SUN A H, YANG J W, HUA Y W, HUANG H S. Studies on the transformation of chitinase and β -1,3-glucanase gene in *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(28): 28-33. (in Chinese)
- [14] 伊华林, 邓秀新. 植物种质离体保存技术研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 574-581.
- YI H L, DENG X X. Research progress on *in vitro* preservation of plant germplasm[J]. Bulletin of Botany, 1999, 16(5): 574-581. (in Chinese)
- [15] 庄飞云, 赵志伟, 廖开志, 王翠. 常低温离体保存胡萝卜种质资源研究初探[J]. 中国蔬菜, 2005(3): 19-20.
- ZHUNG F Y, ZHAO Z W, LIAO K Z, WANG C. Study on preservation of carrot germplasm resources *in vitro* at normal low temperature[J]. China Vegetables, 2005(3): 19-20. (in Chinese)
- [16] 冯莹, 林庆良, 潘东明. 青钱柳愈伤组织的离体保存[J]. 林业科学, 2020, 56(9): 58-66.
- FENG Y, LIN Q L, PAN D M. Preservation of callus of Willow *Cycas in vitro*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2020, 56(9): 58-66. (in Chinese)
- [17] EL-DAWAYATI M M. *In vitro* conservation of date palm shoot tip explants and callus cultures under minimal growth conditions[J]. Date Palm Biotechnology Protocols Volume II, 2017: 49-59.
- [18] 于海, 唐晓杰, 孙萍, 魏春媛. 杨树花粉低温贮藏技术[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2010, 11(6): 563-565.
- YU H, TANG X J, SUN P, WEI C Y. Storage technology of poplar pollen at low temperature[J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2010, 11(6): 563-565. (in Chinese)
- [19] 田立功. 麻栎种子小型冷库贮藏技术研究[J]. 河南林业科技, 2007(2): 9-20.
- TIAN L G. Study on storage technology of *Quercus quercus* seeds in small cold storage[J]. Journal of Henan Forestry Science and Technology, 2007(2): 9-20. (in Chinese)
- [20] 陈义堂. 贮藏方法和时间对台湾肖楠种子发芽率的影响[J]. 福建林业科技, 2021, 48 (2): 73-82.
- CHEN Y T. Effects of storage method and time on seed germination rate of *Nana formosana*[J]. Journal of Fujian

- Forestry Science and Technology, 2021, 48(2): 73-82. (in Chinese)
- [21] HASSAN M M. *In vitro* conservation of date palm somatic embryos using growth-retardant conditions[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1638: 61-70.
- [22] 洪森荣, 吴辉, 钟露, 熊思敏, 罗霞, 刘行. 黄独微型块茎低温离体保存的转录组分析[J]. 植物研究, 2018, 38(1): 100-109.
- HONG S R, WU H, ZHONG L, XIONG S M, LUO X, LIU H. Transcriptome analysis of microtubule of *Rhizoma solanum* preserved *in vitro* at low temperature[J]. Plant Research, 2018, 38(1): 100-109. (in Chinese)
- [23] 成晓华, 徐志微, 王莉, 师校欣, 杜国强. 葡萄种质离体保存中低温和矿物油覆盖延长继代间隔的效应[J]. 园艺学报, 2021, 48(3): 477-486.
- CHENG X H, XU Z W, WANG L, SHI X X, DU G Q. Effect of low and moderate mineral oil covering on extension of subgeneration interval in *in vitro* preservation of grape germplasm[J]. Horticultural Plant Journal, 2021, 48(3): 477-486. (in Chinese)
- [24] 王小乐, 迟天华, 王海滨, 张飞, 陈发棣, 房伟民. 蔗糖和甘露醇复合处理对菊花低温离体保存的影响[J]. 分子植物育种, 2019, 17(5): 1597-1604.
- WANG X L, CHI T H, WANG H B, ZHANG F, CHEN F D, FANG W M. Effect of sucrose and mannitol combined treatment on low temperature *in vitro* preservation of chrysanthemum[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(5): 1597-1604. (in Chinese)
- [25] 陈健妙, 何朝族, 栾林莉, 宋玉凤. 橡胶树胚性愈伤组织的低温保存培养基及其低温保存方法: CN107517851B [P]. 2017-12-29.
- CHEN J M, HE C Z, LUAN L L, SONG Y F. Cryopreservation medium and cryopreservation method of rubber tree embryogenic callus: CN107517851B[P]. 2017-12-29. (in Chinese)
- [26] 王泽云, 陈雄庭. 橡胶雄蕊培养及体细胞植株再生中的温度效应[J]. 作物学报, 1995, 21(6): 723-726.
- WANG Z Y, CHEN X T. Effect of temperature on stamen culture and somatic cell plant regeneration[J]. The Crop Journal, 1995, 21(6): 723-726. (in Chinese)
- [27] 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.
- WANG Y L. Cytological and histological studies on somatic embryo development *in vitro* of *Hevea brasiliensis*[D]. Danzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2004. (in Chinese)
- [28] 程雨飞, 季雯, 王建文, 冯立国, 朱向涛. ‘凤丹白’牡丹体细胞胚的诱导及萌发[J]. 分子植物育种, 2021, 19(17): 5775-5781.
- CHENG Y F, JI W, WANG J W, FENG L G, ZHU X T. Somatic embryo induction and germination of ‘Fengdanbai’ peony[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(17): 5775-5781. (in Chinese)
- [29] 李楠, 孔冬梅, 沈海龙. 低温预处理对水曲柳体细胞胚胎发生的影响[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(6): 579-582.
- LI N, KONG D M, SHEN H L. Effect of low temperature pretreatment on somatic embryogenesis of *Aspergillus manchus*[J]. Plant Physiology Journal, 2009, 45(6): 579-582. (in Chinese)
- [30] 王萍, 卫居香, 李宜程, 吴颖, 王昱. 低温预处理对大豆未成熟子叶胚胎发生影响的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(3): 27-29.
- WANG P, WEI J X, LI Y C, WU Y, WANG G. Effect of low temperature pretreatment on embryogenesis of immature cotyledon of soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2002, 24(3): 27-29. (in Chinese)
- [31] TOMASZEWSKI J, KUKLINA, SAMSC, C-ONGER B V. Influence of low temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchard grass leaves[J]. Plant Growth Regul, 1994, 14: 229-234.