

橡胶树三倍体品种云研 73-46 花药愈伤组织诱导及体胚发生技术研究

桂明春, 方芳*, 唐敏, 李玲, 缪佳, 梁国平, 孙小龙, 柳颢, 田海**

云南省热带作物科学研究所/云南省天然橡胶可持续利用研究重点实验室, 云南景洪 666100

摘要: 为建立橡胶树三倍体品种云研 73-46 花药体胚植株再生技术体系, 本研究以其花药为外植体, 采用正交试验设计探讨不同激素组合对愈伤组织诱导及体胚发生效率的影响, 并比较不同培养时长下愈伤组织的形态特征与体胚发生能力。结果表明: (1) 激素对愈伤组织诱导至关重要, 无激素条件下花药无法脱分化产生愈伤并于 10 d 后褐化死亡, 而在含有 2,4-D、NAA、KT 及 TDZ 的培养基中, 花药可脱分化产生愈伤组织, 诱导率的变幅为 15%~91.56%, 均值为 $(69.41 \pm 30.37)\%$ 。4 种激素对愈伤组织诱导率及后续体胚发生率的影响差异极显著 ($P < 0.01$), 影响顺序为 2,4-D > TDZ > NAA > KT。综合筛选得到最优激素组合为 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.8 mg/L + TDZ 0.02 mg/L。经过验证, 其愈伤组织诱导率和后续体胚发生率分别为 $(86.15 \pm 1.14)\%$ 和 $(14.46 \pm 0.89)\%$, 相较于最佳试验组合 (G7) 分别显著提高 2.31% 和 5.40%; (2) 该品种体胚发生能力普遍较弱, 体胚发生率的变幅为 6.91%~19.31%, 均值为 $(10.58 \pm 3.95)\%$ 。6-BA、ABA、NAA 及 KT 对体胚发生率的影响差异极显著 ($P < 0.01$), 影响顺序为 ABA > 6-BA > NAA > KT, 最优组合为 6-BA 0.4 mg/L + ABA 0.2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + KT 0.2 mg/L (M9), 体胚发生率达 $(19.31 \pm 0.60)\%$, 显著高于其他处理; (3) 55 d 是愈伤组织适宜培养时长, 愈伤生长状态较佳, 无褐化, 且体胚发生能力最强, 体胚发生率为 $(30.83 \pm 1.67)\%$, 子叶形体胚发生率为 $(18.33 \pm 0.83)\%$, 平均体胚数为 (0.63 ± 0.03) 个, 极显著高于其他培养时长。通过优化云研 73-46 花药愈伤组织诱导以及体胚发生阶段的激素配比, 同时调整愈伤诱导培养时长, 能够显著提升该品种花药体胚植株的培育效率, 为构建橡胶树三倍体品种体胚植株规模化繁育体系提供技术支撑。

关键词: 橡胶树; 三倍体品种; 愈伤组织; 体胚发生; 培养时长; 诱导率; 激素

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

Anther Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Triploid Rubber Tree Variety Yunyan 73-46

GUI Mingchun, FANG Fang*, TANG Min, LI Ling, MIAO Jia, LIANG Guoping, SUN Xiaolong, LIU Jin, TIAN Hai**

Yunnan Institute of Tropical Crops / Yunnan Key Laboratory of Sustainable Utilization Research on Rubber Tree, Jinghong, Yunnan 666100, China

Abstract: To establish a regeneration system for somatic embryo-derived plants from the anthers of the triploid rubber tree clone Yunyan 73-46, this study utilized anthers as explants and employed an orthogonal experimental design to examine the effects of various hormone combinations on callus and somatic embryo induction efficiency. Furthermore,

收稿日期 2025-10-09; 接受日期 2025-11-17

基金项目 云南省农业联合专项 (No. 202401BD070001-127); 云南省热带作物科学研究所热带作物科技创新专项 (No. RF2025-2); 云南省科技人才与平台计划重点实验室项目 (No. 202405AG340001)。

作者简介 桂明春 (1985—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 橡胶树组织培养及育种; *同等贡献作者: 方芳 (1995—), 女, 学士, 助理农艺师, 研究方向: 种苗繁育及推广。**通信作者 (Corresponding author): 田海 (TIAN Hai), E-mail: 1113070249@qq.com。

the morphological characteristics and differentiation capacity of callus under different culture duration were analyzed. Hormones were crucial for callus induction. In the absence of hormones, anthers failed to dedifferentiate and underwent browning and necrosis after 10d. In media containing 2,4-D, NAA, KT and TDZ, anther dedifferentiation to produce callus occurred with induction rates ranging from 15% to 91.56%, with a mean of $(69.41 \pm 30.37)\%$. The impact of 2,4-D, NAA, KT and TDZ on callus induction rate and subsequent somatic embryogenesis rate were all highly significant ($P < 0.01$), with the order of influence being 2,4-D > TDZ > NAA > KT. The optimal combination identified through comprehensive screening was 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.8 mg/L + TDZ 0.02 mg/L. Upon verification, the callus induction rate and subsequent somatic embryogenesis rate was $(86.15 \pm 1.53)\%$ and $(14.46 \pm 0.89)\%$, respectively, marking significant improvements of 2.31% and 5.40% over the best experimental combination (G7). The somatic embryogenesis capacity of this clone was generally low, with somatic embryo formation rates ranging from 6.91% to 19.31%, with a mean of $(10.58 \pm 3.95)\%$. The effects of 6-BA, ABA, NAA and KT on somatic embryogenesis rate were highly significant ($P < 0.01$), with the order of influence being ABA > 6-BA > NAA > KT. The optimal combination was 6-BA 0.4 mg/L + ABA 0.2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + KT 0.2 mg/L (M9), achieving a somatic embryogenesis rate of $(19.31 \pm 0.60)\%$, which was significantly higher than other treatments. The optimal culture duration for callus was determined to be 55 d, which exhibited superior growth status without browning and the strongest somatic embryo differentiation capacity. The somatic embryogenesis rate was $(30.83 \pm 1.67)\%$, the cotyledonary embryo formation rate was $(18.33 \pm 0.83)\%$, and the average number of somatic embryos was (0.63 ± 0.03) , all of which were extremely significantly higher than those at other culture durations. By optimizing the hormone ratios during callus induction and somatic embryogenesis stages of Yunyan 73-46 anthers, coupled with adjusting the duration of callus induction culture, the production efficiency of anther-derived somatic embryo plantlets can be significantly enhanced. This approach would provide technical support for establishing a large-scale propagation system of somatic embryo plantlets for triploid rubber tree clones.

Keywords: rubber tree; triploid clone; callus; somatic embryogenesis; culture duration; induction rate; hormone

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.010

天然橡胶是重要的战略资源和工业原料，在保障国家经济发展与安全方面具有不可替代的作用。经过 70 多年的发展，云南省已成为我国最大的天然橡胶生产基地。然而，云南胶园多位于山地，面临“纬度偏北、海拔偏高、寒害偏重、旱季偏长”的生态劣势^[1]。为克服此生态约束，“抗寒高产”被确立为云南植胶区橡胶树育种的核心目标。云南省热带作物科学研究所经多年持续攻关，已成功选育出多个兼具抗寒、速生、高产特性的橡胶树三倍体良种^[1-2]，其中，云研 77-2 和云研 77-4 是全球首批大面积应用于生产的橡胶树三倍体品种^[3]。云研 73-46 是一个优良的橡胶树三倍体品种，由 GT1 与 PR107 杂交选育而成，其抗寒性优于母本 GT1，1~6 割年平均干胶产量达 1851.5 kg/hm^2 ，较母本 GT1 增产 77.90%，经济性状突出，于 2018 年被列入农业部主推品种^[1]，并于 2022 年入选云南农垦“十四五”天然橡胶推广级品种。

橡胶树体胚植株因其显著的速生和高产潜力^[4-6]，是公认的橡胶树优势种植材料。在种植面积无法扩大且缺乏更高产品种的背景下，以体胚植株替代传统芽接苗进行胶园更新，是提升胶园单位面积产能的有效途径。然而，体胚植株繁育技术

难度较高，且其培养效率高度依赖基因型^[5, 7-11]，目前仍是产业应用的关键瓶颈。截至目前，仅有中国热带农业科学院实现了热研 73397 和热研 917 等品种体胚植株的规模化生产^[12-13]；云南省热带作物科学研究所研发了云研 73-477 花药体胚植株再生技术^[8, 14]，但仅具备小规模生产的能力。多数优良品种（如热研 879、云研 80-1983 等）的花药体胚植株繁育技术尚未突破或难以实现规模化生产。特别是对于“抗寒高产”的三倍体品种（如云研 77-4、云研 77-2 和云研 73-46 等），其体胚植株繁育效果普遍不佳^[5, 8-10, 15]，迄今仅获得少量云研 73-46 和云研 77-4 的花药体胚植株^[5]。这一技术瓶颈严重制约了三倍体良种在云南植胶区的快速推广，进而阻碍了天然橡胶产业的可持续发展。因此，突破橡胶树三倍体品种体胚植株繁育技术已成为当前科研工作的迫切任务。

本研究以三倍体品种云研 73-46 花药为外植体，采用正交试验设计，系统评估了 2,4-D、NAA、KT 和 TDZ 4 种激素对花药愈伤组织诱导的影响，以及 6-BA、ABA、NAA 和 KT 4 种激素对体胚发生的作用。同时，通过比较不同培养时长下愈伤组织的形态特征与体胚发生能力，旨在提高该品

种花药愈伤组织诱导与体胚发生效率，为建立该品种高效、稳定的体胚植株再生技术体系提供支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究于 2021 年 4 月至 2024 年 12 月在云南省热带作物科学研究所橡胶研究中心进行。供试材料为橡胶树（*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.）优良三倍体品种云研 73-46 的未成熟雄花（黄绿色），采自云南省热带作物科学研究所江北实验基地。

试验所用激素及其他试剂的采购渠道，解剖刀等试验工具的灭菌方式，培养基中蔗糖、琼脂粉、椰子汁的添加量以及 pH 的调节方法均与桂明春等^[14]报道的方法保持一致；所有试验均采用直径 8 cm、带有透气膜的培养皿在暗培养室内进行，愈伤组织诱导温度为(26±0.5)℃，体胚发生温度为(24±0.5)℃，每皿分装 30 mL 培养基，试验重复 3 次。

1.2 方法

1.2.1 激素对愈伤组织诱导的影响 以 MS 为基础培养基，评估 2,4-D（A）、NAA（B）、KT（C）及 TDZ（D）4 种激素对花药愈伤组织诱导的影响。各激素设置 3 个浓度水平，采用 L₉(3⁴)正交试验设计，具体浓度组合见表 1。

表 1 愈伤组织诱导正交试验 L₉(3⁴)因素及水平配比
Tab. 1 Concentration ratio of exogenous hormones for inducing callus of the orthogonal experimental design L₉(3⁴)

处理 Treatment	因素 Factor/(mg·L ⁻¹)			
	A: 2,4-D	B: NAA	C: KT	D: TDZ
G ₁	0	0	0	0
G ₂	0	0.4	0.4	0.02
G ₃	0	0.8	0.8	0.04
G ₄	0.5	0	0.4	0.04
G ₅	0.5	0.4	0.8	0
G ₆	0.5	0.8	0	0.02
G ₇	1.0	0	0.8	0.02
G ₈	1.0	0.4	0	0.04
G ₉	1.0	0.8	0.4	0

将未成熟雄花经常规灭菌^[16]，用解剖针分离出完整雄蕊分别接种于 9 种含有不同激素配比的培养基中进行愈伤组织诱导。每处理接种 8 皿，每皿接种 15 个外植体。接种 50 d 后，统计愈伤

组织诱导率（愈伤组织块数/接种花药数×100%），并观察其生长状态。

将诱导出的愈伤组织继续培养 60 d，分别转接至体胚分化培养基^[8]中进行体胚分化，60 d 后统计体胚发生率（产生体胚的愈伤组织块数/接种愈伤组织块数×100%，下同），分析比较激素对后续体胚发生的影响。

1.2.2 激素对体胚发生的影响 以改良 MS（4/5 MS 大量元素+2 倍 MS 微量元素+MS 铁盐+MS 有机成分）为基础培养基，探究 6-BA（E）、ABA（F）、NAA（G）和 KT（H）4 种激素对愈伤组织体胚发生的影响。各激素设置 3 个浓度水平，采用 L₉(3⁴)正交试验设计，具体浓度组合见表 2。

表 2 体胚发生正交试验 L₉(3⁴)因素及水平配比
Tab. 2 Concentration ratio of exogenous hormones for inducing embryos of the orthogonal experimental design L₉(3⁴)

处理 Treatment	因素 Factor/(mg·L ⁻¹)			
	E: 6-BA	F: ABA	G: NAA	H: KT
M ₁	0.2	0.05	0.1	0.2
M ₂	0.2	0.1	0.2	0.4
M ₃	0.2	0.2	0.3	0.6
M ₄	0.3	0.05	0.2	0.6
M ₅	0.3	0.1	0.3	0.2
M ₆	0.3	0.2	0.1	0.4
M ₇	0.4	0.05	0.3	0.4
M ₈	0.4	0.1	0.1	0.6
M ₉	0.4	0.2	0.2	0.2

选取在 1.2.1 优选的激素组合培养基中诱导出的生长状态良好、呈淡黄色、疏松颗粒状的花药愈伤组织，分别接种于 9 种含有不同激素配比的分化培养基中进行体胚分化。每处理接种 6~8 皿，每皿接种 15 块愈伤组织，培养 50 d 后统计体胚发生率，探究激素对愈伤组织体胚发生的影响。

1.2.3 不同培养时长花药愈伤组织形态特征与体胚发生能力比较 将花药接种至同一种愈伤组织诱导培养基上（激素组合为 1.2.1 优选获得）进行愈伤组织诱导。分别于培养第 50、55、60、65 天，参照梁国平等^[9]的方法在体视显微镜下测量愈伤组织大小，并观察其形态结构。随后，将愈伤组织分别接种至同一种体胚分化培养基（激素组合为 1.2.2 优选获得）中进行体胚发生。培养 50 d 后统计体胚及子叶形体胚发生率（产生子叶形体胚的愈伤组织块数/接种愈伤组织块数）×100%

和平均体胚数（体胚总数/接种愈伤组织总数），通过比较不同培养时长下花药愈伤组织的形态特征及其体胚发生能力，确定转接至体胚分化培养基的最佳时间窗口。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Office Excel 2016 和 SPSS 23.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 激素对愈伤组织诱导的影响

2.1.1 愈伤组织诱导效率统计 由图 1 可知，花药培养 14~21 d 后，有肉眼可见的愈伤组织形成；继续培养至 45~50 d，可获得淡黄色、疏松的愈伤组织。云研 73-46 花药在 9 个处理的愈伤组织诱导率及后续体胚发生率见表 3。

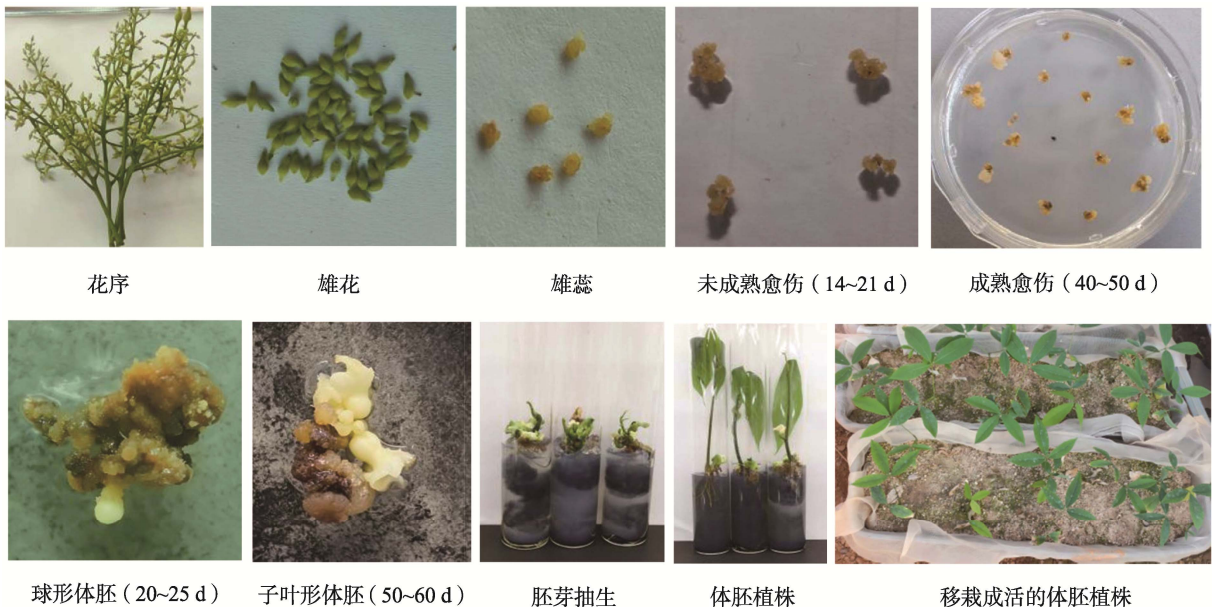


图 1 橡胶树三倍体品种云研 73-46 花药体胚植株再生过程
Fig. 1 Process of regenerated plants of Yunyan73-46 clone anther

表 3 愈伤组织诱导效率
Tab. 3 Callus induction efficiency of Yunyan73-46 clone anther %

处理 Treatment	愈伤组织诱导率 Callus induction rate	体胚发生率 Somatic embryogenesis rate
G ₁	0.00 ^H	
G ₂	15.00±1.02 ^G	0.00 ^D
G ₃	26.56±1.20 ^F	0.00 ^D
G ₄	83.75±1.02 ^{CD}	2.99±0.04 ^C
G ₅	80.31±2.13 ^E	0.00 ^D
G ₆	89.06±1.20 ^B	6.19±0.87 ^B
G ₇	83.44±2.13 ^D	8.61±0.63 ^A
G ₈	91.56±1.20 ^A	6.14±0.72 ^B
G ₉	85.63±0.72 ^C	6.21±0.76 ^B
最大值	91.56±1.20	8.61±0.63
最小值	0.00	0.00
均值	61.70±36.64	3.35±3.48
变异系数	59.38	103.84

注：同列数据后不同大写字母表示处理间差异极显著（ $P<0.01$ ）。
Note: Different capital letters after the same column of data indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

由表 3 可知，在未添加激素的 G₁ 处理中，花药未能脱分化形成愈伤组织，培养 10 d 后全部褐化死亡；而在添加一定浓度激素的 G₂~G₉ 处理中，花药均能脱分化形成愈伤组织。这表明激素是云研 73-46 花药愈伤组织诱导的必要条件；在含有激素的处理中，愈伤组织诱导率存在显著差异，变幅为 15.00%~91.56%，极差高达 76.56%，均值为(69.41±30.37)%，说明不同种类和浓度的激素组合对愈伤组织的形成有极大影响；除处理 G₂ 和 G₃ 外，其余 6 个含有激素的 G₄~G₉ 处理愈伤组织诱导率较高，变幅为 80.31%~91.56%，均值为(85.63±4.09)%；G₄、G₆、G₇、G₈ 和 G₉ 5 个处理诱导的愈伤组织具有体胚发生能力，但发生率普遍较低，变幅为 2.99%~8.61%，均值仅为(6.03±2.01)%，由此可见，尽管在含有适宜激素组合的培养基中，云研 73-46 的花药容易脱分化产生愈伤组织，但愈伤组织的体胚发生能力普遍较弱；体胚发生率的变异系数（103.84%）约为愈伤组织诱导率变异系数（59.38%）的 2 倍，表明在花药

愈伤组织诱导时, 后续体胚发生能力对激素种类、浓度及配比变化的响应更为敏感。

2.1.2 激素对愈伤组织诱导的影响效应 由表 4 可知, 愈伤组织诱导率随 4 种激素浓度的增加而上升, 但上升幅度因激素种类不同而异: 2,4-D 的变幅最大, 极差高达 73.02%, 表明其影响最为显著; KT 的变幅最小, 极差仅为 3.23%, 其影响相对较弱。体胚发生率的变化趋势则因激素种类而异: 随着 2,4-D 浓度的增加, 体胚发生率呈上升趋势, 在 1.0 mg/L 时达到峰值 (6.99%), 显著高于其他浓度; 随着 NAA 浓度的增加, 体胚发生率呈先下降后上升趋势, 在 0.4 mg/L 时降至最低 (2.07%); 随着 TDZ 浓度增加, 体胚发生率呈先上升后下降趋势, 在 0.02 mg/L 时最高 (4.93%), 且与其他浓度差异极显著; 而随着 KT 浓度的增加, 体胚发生率快速降低, 未添加 KT 时体胚发生率最高 (4.11%), 显著高于添加了 KT 的其他处理, 表明在花药愈伤组织诱导过程中不宜添加 KT。

表 4 激素水平间差异性分析
Tab. 4 Results of difference analysis of exogenous hormone levels during callus induction stage

指标 Index	水平 Level	因素 Factor			
		A: 2,4-D	B: NAA	C: KT	D: TDZ
愈伤组织诱导率	1	13.85 ^C	55.73 ^C	60.21 ^C	55.31 ^C
	2	84.38 ^B	62.29 ^B	61.46 ^B	62.31 ^B
	3	86.88 ^A	66.08 ^A	63.44 ^A	67.29 ^A
	极差	73.02	10.35	3.23	11.98
	变异系数	67.40	8.91	2.64	9.72
体胚发生率	1	0.00 ^C	3.87 ^B	4.11 ^A	2.07 ^C
	2	3.06 ^B	2.07 ^C	3.07 ^B	4.93 ^A
	3	6.99 ^A	4.13 ^A	2.87 ^B	3.04 ^B
	极差	6.99	2.06	1.24	2.86
	变异系数	104.60	33.42	19.87	43.46

注: 同列数据后不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: Different capital letters after the same column of data indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

表 5 最优激素组合验证结果
Tab. 5 Optimal hormone combination validation

处理 Treatment	愈伤诱导率 Callus induction rate				体胚发生率 Somatic embryogenesis rate			
	1	2	3	均值 Mean	1	2	3	均值 Mean
G ₇	83.09	84.33	84.09	83.84±0.66 ^{Ab}	9.52	8.14	9.52	9.06±0.80 ^{Bb}
G ₁₀	85.0	87.27	86.18	86.15±1.14 ^{Aa}	14.12	13.79	15.48	14.46±0.89 ^{Aa}

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$); 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference among treatments ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

方差分析结果显示, 2,4-D、NAA、KT 和 TDZ 4 种激素对花药愈伤组织诱导率及后续体胚发生率均有极显著影响 ($P<0.01$), 且 4 种激素对 2 个指标的影响顺序一致, 均为: 2,4-D>TDZ>NAA>KT。然而, 获得最高愈伤组织诱导率组合 (A₃B₃C₃D₃) 与最高体胚发生率的最优组合 (A₃B₃C₁D₂) 并不相同。2 个组合的因子 A 和 B 的最优水平均为 3, 但在因子 C 和 D 上存在差异, 愈伤组织诱导率最优水平为 C₃ 和 D₃, 体胚发生率则优选 C₁ 和 D₂, 结合表 3 和表 4 可知, 体胚发生率对激素种类和浓度变化的响应比愈伤组织诱导率更为敏感, 因此, 在确定最终优组合时, 应优先考虑对敏感指标 (体胚发生率) 更有利的 C₁ 和 D₂。

综上所述, 适宜云研 73-46 花药愈伤组织诱导的最优激素组合为 A₃B₃C₁D₂ (2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.8 mg/L、TDZ 0.02 mg/L), 该组合未包含在初始设计的 9 个组合中。为验证此最佳激素组合, 将云研 73-46 的花药分别接种于含有最优激素组合 (G₁₀) 及体胚发生率最高的试验组合 (G₇) 诱导愈伤组织, 以比较愈伤组织诱导效果。表 5 结果表明, G₁₀ 的愈伤组织诱导率与后续体胚发生率分别为(86.15±1.14)%和(14.46±0.89)%, 均显著高于 G₇。因此, G₁₀ 较 G₇ 更适宜云研 73-46 花药愈伤组织诱导。

2.2 激素对愈伤组织体胚发生的影响

培养 20~25 d 后, 9 种分化培养基中均有部分愈伤组织表面分化出白色球形小胚; 继续培养 50~60 d, 多数愈伤组织出现老化并转为褐色, 部分体胚已发育至可独立分离状态 (图 1)。

由表 6 可知, 云研 73-46 花药愈伤组织的体胚发生率普遍较低, 变幅为 6.91%~19.31%, 均值为(10.58±3.95)%。处理间体胚发生率差异显著。处理 M₉ 的体胚发生率最高, 为(19.31±0.60)%, 极显著高于其他 8 个处理 ($P<0.01$); 其次是处理 M₆ 和 M₈, 体胚发生率分别为(12.89±0.59)%

表 6 9 种体胚分化培养基中体胚发生率
Tab. 6 Somatic embryo differentiation beyond nine kinds of differentiation medium

处理 Treatment	因素 Factor				体胚发生率 Somatic embryo- genesis rate/%
	E: 6-BA	F: ABA	G: NAA	H: KT	
M ₁	0.2	0.05	0.1	0.2	8.54±0.66 ^{DE}
M ₂	0.2	0.1	0.2	0.4	9.47±0.56 ^{CD}
M ₃	0.2	0.2	0.3	0.6	6.91±0.48 ^F
M ₄	0.3	0.05	0.2	0.6	7.50±0.74 ^{EF}
M ₅	0.3	0.1	0.3	0.2	10.32±0.69 ^C
M ₆	0.3	0.2	0.1	0.4	12.89±0.59 ^B
M ₇	0.4	0.05	0.3	0.4	7.46±0.69 ^{EF}
M ₈	0.4	0.1	0.1	0.6	12.82±0.56 ^B
M ₉	0.4	0.2	0.2	0.2	19.31±0.60 ^A
最大值					19.31±0.60
最小值					6.91±0.48
均值					10.58±3.95
k ₁	8.31 ^C	7.84 ^C	11.42 ^B	12.72 ^A	
k ₂	10.24 ^B	10.87 ^B	12.10 ^A	9.94 ^B	
k ₃	13.20 ^A	13.04 ^A	8.23 ^C	9.08 ^C	
R	4.89	5.20	3.87	3.64	

注：同列数据后不同大写字母表示处理间差异极显著（ $P<0.01$ ）。

Note: Different capital letters after the same column of data indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

和(12.82±0.56)%，二者之间差异不显著，但均极显著高于其余 6 个处理（ $P<0.01$ ）；处理 M₃ 的体胚发生率最低，仅为(6.91±0.48)%。

方差分析结果表明，6-BA、ABA、NAA 及 KT 4 种激素对体胚发生率的影响差异均达极显著（ $P<0.01$ ），影响顺序为 ABA>6-BA>NAA>KT（表 6）。不同激素浓度及其配比变化显著影响体胚发生率，体胚发生率随 4 种激素浓度及配比的变化呈不同变化趋势。体胚发生率与 6-BA 和 ABA 激素浓度呈正相关，分别在激素浓度为 0.40 mg/L 和 0.20 mg/L 时达到峰值（13.20%和 13.04%）；NAA 激素浓度对体胚发生率的影响则表现为先促进后抑制的双重效应，在激素浓度为 0.20 mg/L 时体胚发生率最高（12.10%）；KT 激素浓度的增加则对体胚分化产生抑制作用，表明低浓度的 KT 有利于体胚分化。最优激素组合为 6-BA 0.4 mg/L+ABA 0.2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + KT 0.2 mg/L，即 M₉ 处理。该处理体胚发生率为(19.31±0.60)%，极显著高于其余 8 个处理（ $P<0.01$ ），验证了该组合的有效性。

2.3 不同培养时长花药愈伤组织形态特征比较

由表 7 可知，不同培养时长对花药愈伤组织的大小和形态特征均产生显著影响。培养至 50 d 时，愈伤组织的大小仅为(3.71±0.05) mm，极显著小于其余培养时长（ $P<0.01$ ）；培养 50~55 d 时，愈伤组织进入快速生长阶段；培养至 55 d 时，显著增大至(5.21±0.08) mm（ $P<0.01$ ），此时愈伤组织保持淡黄色、疏松颗粒状的特征，未出现老化迹象；培养 55 d 后，生长速度明显减缓；培养 60 d 及 65 d 时，愈伤组织大小分别为(5.30±0.10) mm 和 (5.47±0.22) mm，二者无显著差异；培养至 55 d 与 60 d 时，愈伤组织仍保持淡黄色的疏松颗粒状形态，未见明显老化迹象；培养 65 d 的愈伤组织大小极显著大于培养 50 d 和 55 d（ $P<0.01$ ），颜色转为黄白色，质地变得致密，部分愈伤表面泛白或褐化，显示出明显的老化特征（表 7、图 2）。

表 7 不同培养时长花药愈伤组织形态特征
Tab. 7 Morphological characteristics of anther-derived calli under different culture duration

培养时长 Culture duration/d	形态特征 Morphological characteristics	
	愈伤大小 Callus diameter/mm	生长状态 Growth status
50	3.71±0.05 ^C	生长旺盛，淡黄色、质地疏松软糯，无褐化
55	5.21±0.08 ^B	生长旺盛，淡黄色，质地疏松呈颗粒状，无褐化
60	5.30±0.10 ^{AB}	生长缓慢，淡黄色，质地疏松呈颗粒状，无褐化
65	5.47±0.22 ^A	生长缓慢，黄白色，质地致密，部分愈伤表面泛白，部分愈伤褐化
均值	4.92±0.75	

注：同列数据后不同大写字母表示处理间差异极显著（ $P<0.01$ ）。

Note: Different capital letters after the same column of data indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

2.4 不同培养时长花药愈伤组织体胚发生能力比较

由表 8 可知，不同培养时长花药愈伤组织体胚发生能力存在极显著差异（ $P<0.01$ ）。体胚发生率、子叶形体胚发生率及平均体胚数均随培养时间的延长呈先升高后下降的趋势。其中，在培养 55 d 时，体胚发生率、子叶形体胚发生率、平均体胚数均达到峰值，分别为(30.83±1.67)%、(18.33±0.83)%和(0.63±0.03)个；培养 65 d 时，体胚发生率、子叶形体胚发生率、平均体胚数分别

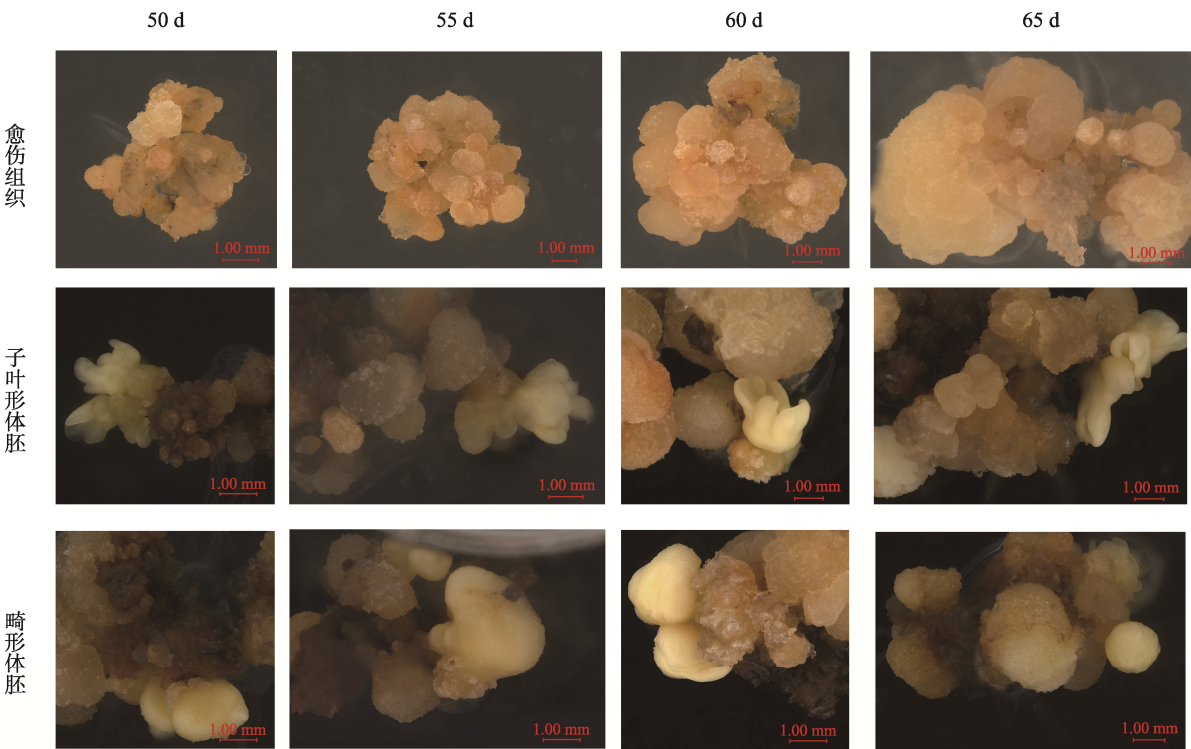


图 2 不同培养时长云研 73-46 花药愈伤组织形态及体胚发生能力

Fig. 2 Callus morphology and somatic embryogenic capacity of Yunyan 73-46 under different culture duration

表 8 不同培养时长花药愈伤组织体胚发生能力

Tab. 8 Somatic embryo differentiation capacity of anther-derived calli after different culture duration

培养时长 Culture duration/d	体胚发生率 Somatic embryogenesis rate/%	子叶形体胚发生率 Cotyledon somatic embryogenesis rate/%	平均体胚数 Average embryo number
50	26.67±2.21 ^A	16.94±1.27 ^A	0.49±0.07 ^B
55	30.83±1.67 ^A	18.33±0.83 ^A	0.63±0.03 ^A
60	27.50±2.21 ^A	17.22±1.73 ^A	0.51±0.04 ^B
65	15.56±1.27 ^B	8.61±1.27 ^B	0.40±0.03 ^B
均值	25.14±6.21	15.28±4.21	0.51±0.09

注：同列数据后不同大写字母表示处理间差异极显著（ $P<0.01$ ）。

Note: Different capital letters after the same column of data indicate extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

下降至(15.56±1.27)%、(8.61±1.27)%和(0.40±0.03)个，均极显著低于培养 55 d。尽管培养 65 d 的愈伤组织最大，但出现老化现象，其体胚发生能力显著下降。

综上所述，培养 55 d 为花药愈伤组织最适培养时长，此时愈伤组织生长状态良好，未出现褐化，且体胚发生效率最高。

3 讨论

橡胶树体胚发生及植株再生过程中，胚性愈

伤组织的诱导是关键起始步骤，其诱导效率直接决定后续能否成功获得体胚植株。已有研究表明，橡胶树胚性愈伤组织的诱导效率受多种因素综合影响，包括基因型^[5, 7-11]、外植体类型^[8-10, 17-20]及其发育状态^[14]、激素种类^[11-14, 17, 21-23]、培养基成分^[7]以及培养环境^[15]等，其中激素的作用尤为关键。在愈伤组织诱导过程中，激素的种类、浓度及其配比不仅能显著影响愈伤组织的形成与增殖^[11, 16-21]，还对后续的体胚发生能力产生深远影响^[11-12]。例如，2,4-D 作为一种核心生长素，在热研 73397 和热研 8813 等品种的花药及内珠被愈伤组织诱导中发挥重要作用^[16, 24-25]，其效果通常优于 NAA 和 IAA^[14]，且常与 KT 联合使用^[21]。细胞分裂素（如 6-BA、KT）的适宜浓度范围一般为 0.5~2.0 mg/L^[22]。此外，李玲等^[15, 23]的研究发现，低浓度 TDZ（≤0.20 mg/L）可促进花药愈伤组织的形成，但可能抑制后续体胚发生。成镜等^[12]的研究表明，高浓度 Picloram（20~30 mg/L）能有效提高热垦 628 花药的胚性愈伤组织诱导率。本研究结果表明，激素是启动细胞脱分化所必需的关键信号。在未添加激素的 G₁ 处理中，花药无法脱分化产生愈伤组织并最终褐化死亡，而添加激素的 G₂~G₉ 处理显著提高了愈伤组织的诱导率。其中，2,4-D 的促进作用最为显著，愈伤组织诱导

率及体胚发生率与其浓度呈正相关。值得注意的是, 本研究发现愈伤组织培养基中添加 0.02 mg/L 低浓度 TDZ 能显著提升后续体胚发生率, 这一结果与前期研究^[15, 24]的结果存在差异。此外, KT 虽有利于愈伤组织的形成与生长, 却对体胚发生表现出抑制效应, 因此, 在云研 73-46 花药愈伤组织诱导中不宜添加 KT。这一结果与在二倍体品种中的常见报道存在差异^[11-12, 16], 可能是由于激素调控机制在不同倍性品种间存在特异性所致。

体胚发生率低、畸形胚比例较高以及植株再生效率有限是制约橡胶树体胚植株工厂化生产应用的主要技术瓶颈^[5, 11, 26]。因此, 获得足量、高质量的体胚是提升体胚植株再生效率的前提, 也是实现规模化生产的必要条件。为解决这一问题, 育种学家们已通过初生体胚发生^[8]、持久体胚发生^[27]、次生体胚发生^[28]等多种途径成功获得体胚植株。本研究进一步探讨了 6-BA、ABA、NAA 及 KT 在体胚发生中的作用, 表明了激素在体胚发生阶段具有不可或缺的作用。其中, 6-BA 与 ABA 的促进效应最为突出, 在试验浓度范围内, 体胚发生率随二者的浓度升高而增加, 但未出现拐点, 因此, 在后续研发中应考虑添加更高浓度, 以优选最优添加浓度。相比之下, KT 的添加浓度与体胚发生率呈负相关, 说明在体胚发生阶段, KT 添加浓度应控制在较低水平 (≤ 0.20 mg/L), 这与 HUSSIN 等^[29]的研究结果存在差异。

尽管“耐寒高产”的橡胶树三倍体品种的组织培养技术仍相对滞后, 但通过持续的技术攻关已取得显著突破。以云研 73-46 为例, 其花药初生体胚发生率已从 2015 年的 2.67%^[8]提升至 2022 年的 6.70%^[5]。本研究通过优选愈伤组织诱导、体胚发生阶段的激素组合及找到花药愈伤组织转接体胚分化培养基的最佳时间窗口, 进一步将该品种的体胚发生率提高至 $(30.83 \pm 1.67)\%$, 显著优于前人报道, 为建立该品种的高效体胚植株再生技术体系提供了有力的技术支撑。据此, 随着技术的不断迭代与资源的持续投入, 通过优化培养基和改进培养条件, 有望进一步提高橡胶树三倍体品种体胚植株再生效率, 最终建立高效的体胚植株规模化生产技术体系, 为云南天然橡胶产业的高质量发展提供坚实的种苗保障。

参考文献

- [1] 吴裕, 张凤良, 毛常丽, 李国华. 云南山地橡胶树三倍体育种回顾[J]. 热带农业科技, 2020, 43(3): 37-40.
- [2] 李惠波, 周堂英, 宁连云, 李国华. 橡胶树新品种云研 77-2 和云研 77-4 的细胞学鉴定及育种过程[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(6): 602-605.
- [3] 张源源, 吴桂海, 龙青娥, 黄肖, 高新生, 李维国. 橡胶树三倍体品种的 2n 雌配子形成途径再鉴定[J]. 热带农业科学, 2025, 45(1): 1-6.
- [4] 陈雄庭, 王泽云, 吴胡蝶, 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.
- [5] 顾晓川, 彭素娜, 戴雪梅, 周权男, 孙小龙, 桂明春, 黄华孙, 华玉伟, 黄天带, 张源源. 不同基因型橡胶树花药体胚发生能力的差异分析[J]. 林业科学研究, 2022, 35(4): 143-152.
- [6] 杨加伟, 黄天带, 华玉伟, 黄华孙. 巴西橡胶树自根幼态无性系耐低温分析[J]. 热带作物学报, 2012, 33(7): 1235-1238.
- [7] 桂明春, 李玲, 管艳, 唐敏, 田海, 孙小龙, 梁国平. MS 营养成分对橡胶树花药愈伤组织诱导效果的评价[J]. 植物生理学报, 2019, 55(8): 1239-1246.
- [8] 管艳, 李玲, 梁国平, 桂明春, 黄凤翔, 王亚, 田海. 不同
- [9] WU Y, ZHANG F L, MAO C L, LI G H. Breeding experience for *Hevea brasiliensis* triploid clone in Yunnan mountainous region[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2020, 43(3): 37-40. (in Chinese)
- [10] LI H B, ZHOU T Y, NING L Y, LI G H. Cytological identification and breeding courses of *Hevea* 'Yunyan77-2' and 'Yunyan77-4'[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2009, 17(6): 602-605. (in Chinese)
- [11] ZHANG Y Y, WU G H, LONG Q Y, HUANG X, GAO X S, LI W G. Formation pathway reidentification of 2n female gametes of *Hevea* triploid varieties[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2025, 45(1): 1-6. (in Chinese)
- [12] 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)
- [13] GU X C, PENG S N, DAI X M, ZHOU Q N, SUN X L, GUI M C, HUANG H S, HUA Y W, HUANG T D, ZHANG Y Y. Differential analysis of anther embryogenesis between different genotypes of *Hevea brasiliensis*[J]. Forest Research, 2022, 35(4): 143-152. (in Chinese)
- [14] YANG J W, HUANG T D, HUA Y W, HUANG H S. Cold tolerance analysis of the self-rooting juvenile clones of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(7): 1235-1238. (in Chinese)
- [15] GUI M C, LI L, GUAN Y, TANG M, TIAN H, SUN X L, LIANG G P. Effects of MS medium nutrients on anther callus induction of *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(8): 1239-1246. (in Chinese)
- [16] 管艳, 李玲, 梁国平, 桂明春, 黄凤翔, 王亚, 田海. 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[J]. 中国农学通报, 2015, 31(4): 40-44.
- GUAN Y, LI L, LIANG G P, GUI M C, HUANG F X, WANG Y, TIAN H. Comparison of callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration from different clones of *Hevea brasiliensis* anther[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(4): 40-44. (in Chinese)
- [9] 梁国平, 管艳, 李玲, 桂明春, 孙小龙, 田海. 橡胶树胚珠离体培养与体胚植株再生的研究[J]. 热带农业科技, 2016, 39(3): 1-5, 47.
- LIANG G P, GUAN Y, LI L, GUI M C, SUN X L, TIAN H. Studies on ovule *in vitro* and somatic embryo regeneration of *Hevea brasiliensis*[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2016, 39(3): 1-5, 47. (in Chinese)
- [10] 于静娟, 桂明春, 李玲, 田海, 梁国平, 唐敏, 管艳. 不同年份橡胶树未受粉胚珠愈伤组织诱导的研究[J]. 热带农业科技, 2018, 41(1): 1-4.
- YU J J, GUI M C, LI L, TIAN H, LIANG G P, TANG M, GUAN Y. Study on induction of rubber tree unpollinated ovules callus in different years[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2018, 41(1): 1-4. (in Chinese)
- [11] 张源源, 王祥军, 高新生, 蔡海滨, 黄华孙, 李维国. 不同品系橡胶树花药愈伤诱导和体胚发生研究[J]. 中国农学通报, 2018, 34(3): 70-75.
- ZHANG Y Y, WANG X J, GAO X S, CAI H B, HUANG H S, LI W G. Induction of anther callus and somatic embryogenesis of different rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) clones[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(3): 70-75. (in Chinese)
- [12] 成镜, 黄天带, 戴雪梅, 徐正伟. 适合全周期间作的橡胶树品种热垦 628 花药再生体系研究[J]. 热带作物学报, 2023, 44(9): 1794-1800.
- CHENG J, HUANG T D, DAI X M, XU Z W. Anther regeneration system of rubber tree variety Reken 628 suitable for whole period intercropping[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(9): 1794-1800. (in Chinese)
- [13] 彭素娜, 徐正伟, 华玉伟, 顾晓川, 成镜, 黄华孙, 黄天带. 橡胶树体胚苗质量调查与分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(6): 1219-1225.
- PENG S N, XU Z W, HUA Y W, GU X C, CHENG J, HUANG H S, HUANG T D. Quality investigation and analysis of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) somatic embryo plantlet[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(9): 1219-1225. (in Chinese)
- [14] 桂明春, 于静娟, 方芳, 罗荣惠, 缪佳, 李玲, 梁国平, 孙小龙, 柳颀. 橡胶树优良无性系品种云研 73-477 不同发育阶段体细胞幼胚成熟培养效率比较[J]. 热带作物学报, 2025, 46(7): 1608-1617.
- GUI M C, YU J J, FANG F, LUO R H, MIAO J, LI L, LIANG G P, SUN X L, LIU J. Comparison of somatic embryo maturation efficiency at different developmental stages of rubber tree variety Yunyan 73-477[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2025, 46(7): 1608-1617. (in Chinese)
- [15] 李玲, 桂明春, 管艳, 田海, 梁国平, 段安安, 吴裕, 唐敏. 不同因素对橡胶树‘云研 77-2’花药愈伤组织诱导的影响[J]. 分子植物育种, 2019, 17(8): 2607-2613.
- LI L, GUI M C, GUAN Y, TIAN H, LIANG G P, DUAN A A, WU Y, TANG M. Effects of different factors on anther callus induction of rubber tree clone ‘Yunyan 77-2’ (*Hevea brasiliensis*)[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(8): 2607-2613. (in Chinese)
- [16] 黄凤翔, 管艳, 桂明春, 梁国平, 李玲, 田海. 正交实验法优选橡胶树花药愈伤组织诱导的研究[J]. 北方园艺, 2014(18): 109-111.
- HUANG F X, GUAN Y, GUI M C, LIANG G P, LI L, TIAN H. Research on *in vitro* tissue culture of pear rootstocks OH × F51[J]. Northern Horticulture, 2014(18): 109-111. (in Chinese)
- [17] 孙爱花, 黄天带, 周全男, 戴雪梅, 华玉伟, 黄华孙. 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[J]. 中国农学通报, 2012, 28(25): 15-19.
- SUN A H, HUANG T D, ZHOU Q N, DAI X M, HUA Y W, HUANG H S. Effects of Different factors on callus induction and somatic embryogenesis of inner integument from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(25): 15-19. (in Chinese)
- [18] 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* (Müll. Arg.) clone Reyan 7-33-97[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(6): 1124-1130. (in Chinese)
- [19] 王泰桦. 橡胶树腋芽体细胞胚再生体系的建立及嫩叶愈伤组织诱导[D]. 海口: 海南大学, 2023.
- WANG T H. Establishment of somatic embryo regeneration system in axillary buds of *Hevea brasiliensis* and callus induction of young leaves[D]. Haikou: Hainan University, 2023. (in Chinese)
- [20] 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)
- [21] 孙爱花, 华玉伟, 黄天带, 周权男, 戴雪梅, 黄华孙. 不同激素配比对橡胶树叶片愈伤组织诱导的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(4): 24-27.
- SUN A H, HUA Y W, HUANG T D, ZHOU Q N, DAI X M, HUANG H S. Effects of different hormone combination on callus induction of leaf explant from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(4): 24-27. (in Chinese)
- [22] 孙爱花, 李哲, 黄天带, 杨福孙, 周权男. 植物激素(或生长调节物质)在橡胶树组织培养中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 593-596.
- SUN A H, LI Z, HUANG T D, YANG F S, ZHOU Q N. Application of plant hormone (or growth regulating substance) in tissue culture of rubber tree (*Hevea brasiliensis* müll. Arg.)[J]. Plant Physiology Communications, 2008, 44(3): 593-596. (in Chinese)
- [23] 李玲, 管艳, 梁国平, 黄凤翔, 桂明春, 田海. TDZ 对橡胶树花药愈伤组织诱导和体细胞胚发生的影响[J]. 中国农学通报, 2014, 30(1): 20-25.
- LI L, GUAN Y, LIANG G P, HUANG F X, GUI M C, TIAN H. Effects of TDZ on callus induction and smatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis* anther[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(1): 20-25. (in Chinese)
- [24] JAYASREE P, ASOKAN M, SOBHA S, AMMAL L S, REKHA K, KALA R G, JAYASREE R, THULASEE-DHARAN A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.)[J]. Current Science, 1999, 76(9): 1242-1245.
- [25] SUSHAMAKUMARI S, ASOKAN M P, ANTHONY P, LOWE K C, DAVEY J B P R. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 61(1): 81-85.
- [26] 谭德冠, 孙雪飘, 付莉莉, 马帅, 张家明. 巴西橡胶树花药体胚发生类型及其培养条件的改良[J]. 热带作物学报, 2011, 32(7): 1290-1295.
- TAN D G, SUN X P, FU L L, MA S, ZHANG J M. Classification and improved cultural conditions for the somatic embryogenesis of *Hevea* anther[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(7): 1290-1295. (in Chinese)
- [27] 黄天带, 戴雪梅, 周权男, 孙爱花, 华玉伟, 黄华孙. 通过继代培养提高橡胶树体胚诱导频率的研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(10): 1829-1834.
- HUANG T D, DAI X M, ZHOU Q N, SUN A H, HUA Y W, HUANG H S. Improvement of somatic embryogenesis induction frequency via subculture in *Hevea*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(10): 1829-1834. (in Chinese)
- [28] 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.
- [29] HUSSIN N M C. Effects of zeatin and kinetin on *in vitro* regeneration of *Hevea brasiliensis* RRIM 2025[J]. Journal of Rubber Research, 2015, 18(3): 127-138.