

研究报告

Research Report

不同外植体对橡胶树原生质体分离和再生的影响

戴雪梅 黄天带 李季 杨先锋 黄华孙*

中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 国家橡胶树育种中心, 儋州, 571737

* 通讯作者, xjshhs@163.com

摘要 为了探寻橡胶树原生质体培养再生植株的较佳途径, 本研究以橡胶树热研 7-33-97 花药和内珠被为起始外植体分别诱导愈伤组织, 进行悬浮培养建立稳定的胚性悬浮细胞系, 并分别对其进行原生质体的分离和培养研究, 分析比较不同起始外植体来源原生质体的产量、活力及其在看护培养过程中的分裂生长、体胚发生及植株再生情况。结果显示, 在含 1.5%纤维素酶、0.15%果胶酶和 0.5%离析酶的酶液中酶解处理 12 h 后, 花药和内珠被来源的悬浮细胞原生质体产量分别为 7.6×10^6 个 /mL PCV 和 12×10^6 个 /mL PCV, 平均活力分别为 75.2%和 83.9%; 在看护培养基上这两种来源的原生质体均能发生持续分裂, 45 d 后从 5×10^5 个原生质体形成 2 mm 以上的小愈伤组织数分别为 247 个和 480 个; 经体胚诱导培养 60 d 后获得的体胚数分别为 56 个和 18 个, 最终花药来源原生质体发育的体胚约有 4.7%转化成完整植株, 而内珠被来源的原生质体没能得到正常的植株。研究结果表明, 经花药培养建立的胚性悬浮细胞系是获得具有植株再生能力原生质体的最佳材料, 可为进一步优化橡胶树原生质体培养体系及进行橡胶树品种间体细胞杂交提供依据和参考。

关键词 橡胶树, 胚性悬浮细胞系, 原生质体, 体胚发生, 植株再生

Effects of Different Explants on Isolation and Regeneration of Protoplast in Rubber Tree

Dai Xuemei Huang Tiandai Li Ji Yang Xianfeng Huang Huasun*

Rubber Research Institute, CATAS, Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, State Center for Rubber Tree Breeding, Danzhou, 571737

* Corresponding author, xjshhs@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.001259

Abstract To seek a better approach for plant regeneration from protoplast culture, in this research, anthers and inner integuments of rubber tree, a cultivar of Reyan 7-33-97, were respectively used as initial explants for inducing calli to establish stable embryogenic cell suspensions by suspension culture. Isolating and culturing of protoplast from these two kind of suspension cells were further studied. Protoplast yields and viabilities from different initial explants, protoplast division and growth during feeder layer culture, and subsequently somatic embryogenesis and plant regeneration were statistically analyzed. Results showed that embryogenic cell suspensions derived from anthers and inner integuments enabled to yield 7.6×10^6 protoplasts per mL PCV and 12×10^6 protoplasts per mL PCV, with mean viabilities of 75.2% and 83.9%, respectively, which was under the inoculation conditions in enzyme solution containing 1.5% cellulase R-10, 0.15% pectolyase y-23 and 0.5% macerozyme R-10 for 12 h. Sustained mitotic divisions were both observed when the two kind of protoplasts were cultured on feeder layer, and 247 and 480 microcalli with the size 2 mm above were respectively formed from 5×10^5 anther-derived and inner integument-derived protoplasts after 45 d nursing culture, from which 56 and 18 embryos were respectively obtained after 60 d culture on medium for somatic embryo induction. Finally 4.7% embryos

developed from anther-derived protoplast were regenerated to plantlets, whereas all embryos obtained from inner integument-derived protoplasts failed to plant regeneration. In conclusion, anther-derived embryonic cell suspension was the optimal material for isolating protoplast bearing regenerated capacity, providing basis and reference for further optimizing protoplast culture system and interspecific somatic hybridization in rubber tree.

Keywords Rubber tree, Embryogenic cell suspension, Protoplast, Somatic embryogenesis, Plant regeneration

巴西橡胶树为大戟科橡胶树属高大乔木,是非常重要的热带经济作物,其产出的天然橡胶是国防战略物资和不可或缺的工业原料。在自然条件下,威胁橡胶树生长及其产量的主要因素有低温、台风和病害。因此,培育具有抗寒、抗风、抗病等优良抗逆特征的橡胶树新种是橡胶树育种领域的主要研究方向。除了传统授粉杂交选育外,通过原生质体融合进行的体细胞杂交是转移多基因资源的有效技术路径。

橡胶树原生质体培养再生难度较大,目前国内外仅有 RR1105 (Sushamakumari et al., 2000)和热研 8-79 (戴雪梅等, 2013)两个品种报道获得成功。从嫩叶、茎尖和愈伤组织酶解分离的原生质体经过培养虽然能在前期观察到细胞分裂现象,但无法持续分裂及后续发育(Wilson and Power, 1989; Cazaux and d'Auzac, 1991);从胚性愈伤组织分离原生质体结合看护培养方法(Cazaux and d'Auzac, 1994)或从胚性悬浮细胞分离原生质体采用固体包埋培养方法(Suraninpong and Te-chato, 1999; Te-chato et al., 2002)均止步于得到肉眼可见的小愈伤组织;而只有采用胚性悬浮细胞作为分离原生质体的材料并采用看护培养的方法才有可能使细胞发生持续快速分裂并最终经体胚发生途径获得完整的再生植株(Sushamakumari et al., 2000; 戴雪梅等, 2013)。

本研究以橡胶树品种热研 7-33-97 为研究对象,分别从花药和内珠被培养两种途径建立橡胶树胚性悬浮细胞系,进行原生质体的分离和培养,分析比较不同起始外植体来源原生质体的产量、活力及其在看护培养过程中的生长发育、体胚发生及植株再生情况,为优化橡胶树原生质体培养植株再生体系及进行橡胶树品种间体细胞杂交提供依据和参考。

1 结果与分析

1.1 花药和内珠被来源胚性悬浮细胞系的建立

花药愈伤组织和内珠被愈伤组织在 M1 液体培养基振荡悬浮培养过程中,内珠被愈伤组织更容易分散,经持续的筛选和继代培养,约 70 d 后便可建立大小一致且生长快速的稳定悬浮细胞系,细胞团颜色呈鲜黄色(图 1A);同样条件下花药愈伤组织至少



图 1 花药和内珠被愈伤组织建立的胚性悬浮细胞系
注: A: 内珠被来源的胚性悬浮细胞系; B: 花药来源的胚性悬浮细胞系

Figure 1 Embryogenic cell suspension established from anther and inner integument calli, respectively

Note: A: Embryogenic cell suspension derived from inner integument; B: Embryogenic cell suspension derived from anther

需 90 d 左右才能建立均质稳定的悬浮细胞系,其细胞团颜色呈浅黄色(图 1B)。

1.2 原生质体的产量和活力

花药和内珠被来源的悬浮细胞新分离的原生质体在显微镜下均呈圆球形,大小相对一致且内含物丰富(图 2A)。经 FDA 染色后,具有活力的原生质体在荧光显微镜下发出绿色荧光(图 2B)。在相同的酶解条件下,内珠被来源的悬浮细胞能释放出更多较高活力的原生质体,其产量约为 12×10^6 个/mL PCV,平均活力约为 83.9%;而花药来源的悬浮细胞原生质

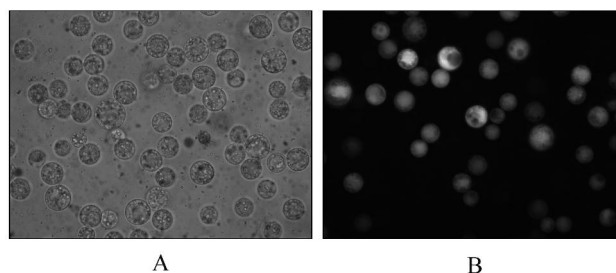


图 2 新分离的原生质体及 FDA 染色
注: A: 新分离的原生质体; B: FDA 染色后的原生质体(利用 Leica DFC365FX 拍摄)

Figure 2 Newly isolated protoplast and FDA stain
Note: A: Newly isolated protoplast; B: Protoplast stained by FDA (shot by Leica DFC365FX)

体的产量约为 7.6×10^6 个 /mL PCV, 平均活力约为 75.2% (表 1)。

1.3 原生质体的分裂和生长

在看护培养条件下, 第 5 天左右便可观察到细胞开始发生分裂(图 3A), 10 d 后分裂形成含 4~8 个细胞的小细胞团(图 3B), 20 d 后持续分裂形成含 10 个细胞以上的细胞团(图 3C), 30 d 天后开始出现肉眼可见的小愈伤组织(图 3D), 45 d 后从 5×10^5 个花药和内珠被起源的原生质体分裂形成 2 mm 以上小愈伤组织的数量分别约为 247 个和 480 个(表 2)。

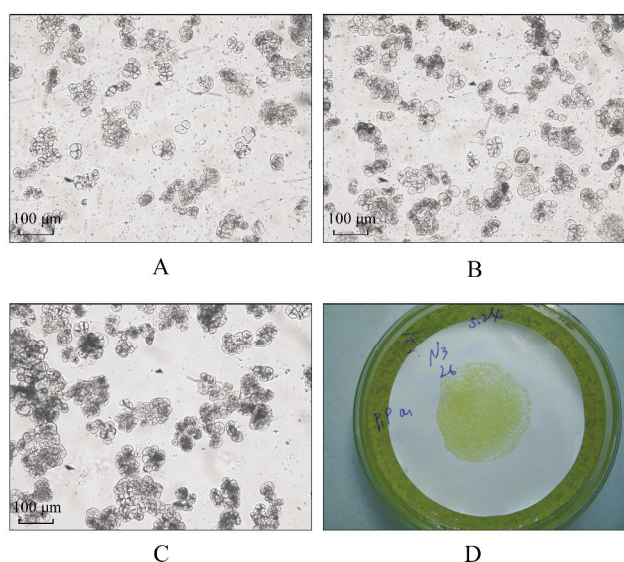


图 3 原生质体的分裂和生长

注: A: 看护培养 5 d 后观察的细胞分裂; B: 看护培养 10 d 后分裂形成的小细胞团; C: 看护培养 20 d 后分裂形成的细胞团; D: 看护培养 30 d 后长出小愈伤组织

Figure 3 Division and growth of protoplast

Note: A: Cell division observed 5 d after feeder layer culture; B: Cell colony obtained 10 d after feeder layer culture; C: Cell colony obtained 20 d after feeder layer culture; D: Microcalli obtained 30 d after feeder layer culture

表 1 原生质体的产量和活力

Table 1 The yields and viabilities of protoplast

原生质体来源	原生质体产量(10^6 个 /mL PCV)	原生质体活力(%)
Protoplast source	Protoplast yield (10^6 /mL PCV)	Protoplast viability (%)
花药	7.6b	75.2b
Anther		
内珠被	12a	83.9a
Inner integument		

注: 同列数据后不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著(Duncan 法)

Note: The different small letters followed the data in the same column indicated significant differences at the 5% level (Duncan's method)

表 2 原生质体持续分裂形成大小 2 mm 以上的小愈伤组织数
Table 2 The number of microcalli with the size 2 mm above formed by sustained mitotic division from protoplast

原生质体来源	再生小愈伤组织数(个 / 5×10^5 原生质体)
Protoplast source	Number of microcalli regenerated (/ 5×10^5 protoplasts)
花药	247b
Anther	
内珠被	480a
Inner integument	

注: 同列数据后不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著(Duncan 法)

Note: The different small letters followed the data in the same column indicated significant differences at the 5% level (Duncan's method)

1.4 原生质体体胚发生和植株再生

花药和内珠被起源的原生质体再生小愈伤组织在转入增殖培养基上培养 25 d 后, 均能快速增殖成约 1 cm 大小的愈伤组织团(图 4A); 分别转入体胚诱导培养基中培养 30 d 后, 均开始出现少量的白色球形胚(图 4B), 在相同培养基上继续诱导培养 30 d 后, 从 5×10^5 个花药起源原生质体再生的愈伤组织得到 56 个子叶形胚, 而相同数量内珠被起源原生质体再生的愈伤组织仅获得 18 个子叶形胚; 将其分别转入体胚萌发培养基培养 1 个月后前者约有 4.7% 的体细胞胚发育成正常的小植株(图 4C), 而后者在萌发过程中全部畸形化, 没能得到完整的再生植株(表 3)。

2 讨论

前人的研究表明, 胚性悬浮细胞是分离高产量和高活力原生质体的最佳起始材料(Wilson and Power, 1989; Cazaux and d'Auzac, 1991; Sushamakumari

表 3 原生质体体胚发生频率和植株再生率

Table 3 The frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration rate from protoplast

原生质体来源	体胚发生频率(个/ 5×10^5 原生质体)	植株再生率(%)
Protoplast source	Frequency of somatic embryogenesis ($/5 \times 10^5$ protoplasts)	Plant regeneration rate (%)
花药	57a	4.7a
Anther		
内珠被	21b	0b
Inner integument		

注: 同列数据后不同小写字母表示在 5%水平上差异显著(Duncan 法)

Note: The different small letters followed the data in the same column indicated significant differences at the 5% level (Duncan's method)

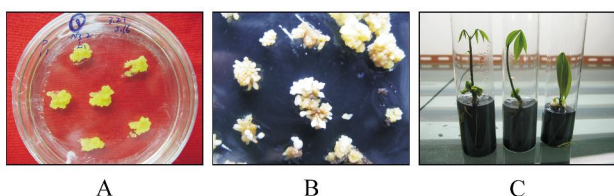


图 4 原生质体体胚发生和植株再生

注: A: 小愈伤组织的增殖; B: 白色球形胚; C: 再生的小植株

Figure 4 Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast

Note: A: Proliferation of microcalli; B: White globular embryos; C: Regenerated plantlets

et al., 2000)。在橡胶树中, 胚性细胞悬浮系的建立通常有以下两种途径: 一是采用单核期雄花蕾分离的花药为起始外植体诱导愈伤组织, 进行悬浮培养而成; 二是以未成熟果内珠被切段为起始外植体进行愈伤组织的诱导并进行悬浮培养而成。热研 7-33-97 经这两种途径诱导的愈伤组织在进行液体振荡培养时, 细胞的分散难易程度略有差异, 前者需持续筛选继代培养 90 d 以上才能获得稳定的悬浮系, 而后者仅需 70 d 左右便可建立稳定的悬浮系。而 Sushamakumari 等(2000)报道橡胶树品种 RRII105 花药和内珠被愈伤组织仅需液体悬浮培养 56 d 后即可用于原生质体的分离, 这可能是品种基因型差异所致。

在分离获得高品质的原生质体后, 采用看护培养的方法是获得橡胶树原生质体植株再生的必要条件。Cazaux 和 d'Auzac (1994)从橡胶树胚性愈伤组织中分离原生质体, 采用海藻酸盐包埋法结合看护培养的方法, 首次从橡胶树原生质体的培养中获得了愈伤组织, 并由此指出看护细胞是维持橡胶树原生质体活力和使其能持续分裂的关键因素。本研究 and Sushamakumari 等(2000)均从胚性悬浮细胞分离获得原生质体, 仅需选用合适的看护细胞对其进行看护培养便可持续分裂形成愈伤组织并最终获得完

整的再生植株。此外, 橡胶树原生质体的再生培养还受到众多因素的影响, 包括培养密度、看护细胞添加浓度和培养基成分等, 这些影响因素我们均已在对橡胶树品种热研 8-79 的研究中进行了优化(戴雪梅等, 2013)。本研究在对热研 7-33-97 原生质体的培养研究中直接应用我们之前的研究成果, 适用性表现良好。

Sushamakumari 等(2000)对橡胶树 RRII105 花药和内珠被来源的悬浮细胞进行原生质体的分离和培养表明, 两者的原生质体产量和活力均无显著差异, 但在其后的再生培养过程中, 花药起源的原生质体分裂频率和体胚发生及植株再生率均显著高于内珠被起源的原生质体。而本研究对热研 7-33-97 的研究结果显示, 尽管花药来源的悬浮细胞原生质体产量和活力及其经看护培养后形成的小愈伤组织数均低于内珠被来源的悬浮细胞, 但前者的体胚发生能力显著高于后者, 而且最终只有花药起源的原生质体获得了完整的再生植株。研究结果表明从花药来源的胚性悬浮细胞分离的原生质体具有更高的体胚发生能力和植株再生率。因此, 花药是建立橡胶树原生质体高效植株再生体系的最佳起始外植体。

3 材料与方法

3.1 材料

试验起始材料橡胶树热研 7-33-97 单核期雄花蕾和坐果约 40 d 后的幼果, 均取自国家橡胶树种质资源圃(海南儋州)。杂交种 B1 (*H. brasiliensis* × *H. nitida*)胚性悬浮细胞系为本实验室建立保存的实验材料, 作为看护细胞用于原生质体的看护培养。

3.2 愈伤组织的诱导和悬浮细胞系的建立

参照吴紫云等(2009)和孙爱花等(2012)的方法

分别对热研 7-33-97 单核期雄花蕾和幼果进行愈伤组织的诱导, 约 60 d 后选取易碎愈伤组织转入液体培养基 M1 中(改良的 MS 基本培养基, 1 mg/L 6-BA, 1 mg/L NAA, 1.5 mg/L 2,4-D, 0.2 g/L 天冬酰胺, 0.4 g/L 酸性水解酪蛋白, 75 ml/L 椰子水, 45 g/L 蔗糖, pH 5.8), 置于 100 rpm 摇床、28(±1)℃、黑暗条件下进行悬浮培养, 每 7~10 d 更换 1 次培养基, 每次继代操作时均筛除大的或褐化的细胞团, 持续筛选培养至建立稳定、均质的悬浮细胞系。

3.3 原生质体的分离和活性检测

分别对上述建立的花药和内珠被来源悬浮细胞系进行原生质体的酶解分离。于继代培养的第 5 d 分别吸取两种来源的悬浮细胞各 1 mL PCV (packed cell volume) 转入含 10 mL 酶混合液(1.5%纤维素酶, 0.15%果胶酶, 0.5%离析酶, 15 g/L KCl, 7.5 g/L CaCl₂, 1 g/L MES, 10%甘露醇, pH 5.7)的 100 mL 三角瓶中, 置于 50 rpm 摇床、28(±1)℃、黑暗条件下酶解 12 h。随后用 30 μm 的不锈钢筛网过滤, 以除去未消化完全的细胞团和细胞碎片, 吸取滤液转入 15 mL 的离心管中, 800 rpm 离心 6 min, 弃上清后用适量原生质体洗液(15 g/L KCl, 7.5 g/L CaCl₂, 1 g/L MES, 10%甘露醇, pH 5.7)漂洗 2 次, 重悬后用血球计数板进行产量的测定(李浚明, 1992, 北京农业大学出版社, pp.274-275), 并采用 FDA 染色法进行活性检测(Widholm, 1972), 在荧光显微镜下镜检时每个样品观察有代表性的 3 个视野, 统计存活原生质体数及总原生质体数, 并采用下列公式计算: 原生质体活性=(存活原生质体数 / 总原生质体数)×100%。

3.4 原生质体的培养

采用看护培养的方法对上述分离的原生质体进行培养, 看护培养基的详细制作过程参照戴雪梅等(2013)和 Sushamakumari 等(2000)描述的方法进行。用作看护细胞的杂交种 B1 (*H. brasiliensis*×*H. nitida*) 胚性悬浮细胞于继代培养的第 5 天收集, 添加到灭菌后温度降至约 35℃的看护培养基其余成分中, 使看护细胞的最终浓度为 5%(v/v), 立即混匀后分装至直径为 9.5 cm 的培养皿中, 待凝固后在其表面覆盖一层无菌混合纤维素滤膜(孔径 0.45 μm), 将花药和内珠被来源原生质体悬液的密度用液体培养基调至 5×10⁵ 个 /mL, 分别吸取 1 mL 原生质体悬液接种至混合纤维素滤膜上, 用石蜡封口膜封口, 于 28(±1)℃、黑暗条件下培养。每种材料培养平行重复 3 次。期间

每 2~3 周更新 1 次看护培养基, 直至长出原生质体持续分裂形成的肉眼可见的小愈伤组织。原生质体液体培养基的组成为: M1、2,4-D 3 mg/L、70 mg/L 葡萄糖、0.1 g/L MES、pH 5.7; 看护培养基的组成为: 改良的 MS 基本培养基、0.5 mg/l 6-BA、1.5 mg/L KT、2 mg/L NAA、2 mg/L 2,4-D、75 ml/L 椰子水、70 g/L 蔗糖、2.5 g/L 植物凝胶以及添加 5%看护细胞, pH 5.8。

分别于看护培养后的第 5 d、10 d 和 20 d 在显微镜下观察原生质体的分裂情况, 并于 45 d 后分别统计大小为 2 mm 以上的小愈伤组织数。

3.5 体胚诱导和植株再生

在添加看护细胞的看护培养基中培养 60 d 后, 挑取原生质体持续分裂形成的小愈伤组织(大小约 2 mm 以上)转接至增殖培养基中, 置于相同温度、黑暗条件下进行扩增培养, 20~25 d 后将其转接至体胚诱导培养基中进行体细胞胚的诱导, 每 30 d 左右更新 1 次培养基, 直至体胚发育为成熟的子叶形胚, 其后将成熟胚转接至体胚萌发培养基上, 先黑暗培养一段时间, 待抽出 2 cm 左右的嫩茎后, 再将其移至光周期为 8L/16D 的条件下继续生根壮苗培养, 直至发育成为完整的小植株。原生质体小愈伤组织增殖培养基的组成为: 改良的 MS 基本培养基、1 mg/L 6-BA、1 mg/L NAA、1.5 mg/L 2,4-D、50 mL/L 椰子水、70 g/L 蔗糖和 2.5 g/L 植物凝胶, pH 5.8; 体细胞胚诱导培养基的组成为: 改良的 MS 基本培养基、0.05 mg/L 6-BA、0.04 mg/L NAA、1 mg/L ABA、1 mg/L GA3、50 mL/L 椰子水、70 g/L 蔗糖、2.5 g/L 植物凝胶和 1.5 g/L 活性炭, pH 5.8; 体细胞胚萌发培养基的组成为: 改良的 MS 基本培养基、0.5 mg/L KT、0.5 mg/L IAA、1 mg/L GA3、50 mL/L 椰子水、70 g/L 蔗糖、2.5 g/L 植物凝胶和 1.5 g/L 活性炭, pH 5.8。

3.6 统计与分析

利用 Microsoft Excel 2003 进行数据整理; 利用 DPS 7.05 进行统计分析。

作者贡献

戴雪梅是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 黄天带、李季和杨先锋参与实验设计、论文的写作与修改; 黄华孙是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(1630022013002)资助。感谢国家橡胶树种质资源圃提供试验材料。

参考文献

- Cazaux E., and d'Auzac J., 1991, Isolation and culture of *Hevea brasiliensis* protoplasts, *Physiol. Plantarum*, 82(1): 1-14
- Cazaux E., and d'Auzac J., 1994, Microcallus formation from *Hevea brasiliensis* protoplasts isolated from embryogenic callus, *Plant Cell Rep.*, 13(5): 272-276
- Dai X.M., Li Z., Hua Y.W., Huang T.D., Sun A.H., Zhou Q.N., and Huang H.S., 2013, Plant regeneration from protoplast culture of Reyan 8-79 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), *Nanfang Nongye Xuebao (Journal of southern agriculture)*, 44(12): 2040-2045 (戴雪梅, 李哲, 华玉伟, 黄天带, 孙爱花, 周权男, 黄华孙, 2013, 橡胶树热研 8-79 原生质体培养再生植株, *南方农业学报*, 44(12): 2040-2045)
- Sun A.H., Huang T.D., Zhou Q.N., Dai X.M., Hua Y.W., and Huang H.S., 2012, Effects of different factors on callus induction and somatic embryogenesis of inner integument from *Hevea brasiliensis*, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 28(25): 15-19 (孙爱花, 黄天带, 周权男, 戴雪梅, 华玉伟, 黄华孙, 2012, 不同因素对橡胶树内珠被愈伤组织的诱导和体细胞胚发生的影响, *中国农学通报*, 28(25): 15-19)
- Suraninpong P., and 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 M.P., Anthony P., Lowe K.C., Power J.B., and Davey M.R., 2000, Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber, *Plant Cell Tiss. Org.*, 61(1): 81-85
- Te-chato S., Niyagij C., and Suraninpong P., 2002, Callus formation from protoplast derived from cell suspension culture of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), *Thai Journal of Agricultural Science*, 35(2): 165-173
- Widholm J.M., 1972, The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells, *Stain Technol.*, 4(47): 189-194
- Wilson Z.A., and Power J.B., 1989, Elimination of systemic contamination in explant and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), *Plant Cell Rep.*, 7(8): 622-625
- Wu Z.Y., Hua Y.W., and Huang H.S., 2009, Optimization for cell suspension culture media of *Hevea* rubber by uniform design, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant physiology Communications)*, 45(2): 163-168 (吴紫云, 华玉伟, 黄华孙, 2009, 均匀设计优化橡胶树细胞悬浮系培养基, *植物生理学通讯*, 45(2):163-168)