

## 信息与资料 Information and Data

## 巴西橡胶树的组织培养

谭德冠 孙雪飘 张家明\*

中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101

Tissue Culture of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg

TAN De-Guan, SUN Xue-Piao, ZHANG Jia-Ming\*

State Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

**提要** 介绍了上世纪70年代以来巴西橡胶树的组织培养, 包括花药培养、未授粉胚珠和子房培养、茎尖及嫩茎培养、悬浮细胞和原生质体培养, 以及体细胞植株的克隆增殖的研究进展。并探讨其存在的问题以及未来的发展方向。

**关键词** 巴西橡胶; 组织培养; 花药培养; 研究进展

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)属橡胶树属大戟科, 是多年生的异花授粉乔木, 在热带地区广泛种植。其所产的橡胶是重要的工业原料和战略物资, 在国民经济中占有举足轻重的地位。巴西橡胶树的品种选育主要是用常规育种, 但育种周期长, 加上用于常规育种的材料均来源于魏克汉系统的品系及其衍生的无性系, 遗传基础较狭窄<sup>[1]</sup>。为了拓宽巴西橡胶树育种途径, 改良其品质, 从上个世纪50年代以来, 橡胶育种学家们即开始着手研究其组织培养技术, 特别是上个世纪70年代以来, 我国、马来西亚、印度尼西亚、斯里兰卡等国投入大量的人力、物力、财力对这项技术进行广泛的研究<sup>[2]</sup>, 取得了一定的进展。本文介绍了上个世纪70年代以来国内外巴西橡胶树的组织培养, 包括花药培养、未授粉胚珠培养、子房培养、体细胞植株的克隆增殖、茎尖及嫩茎培养、悬浮细胞培养和原生质体培养的研究进展。

### 1 花药培养

花药培养是巴西橡胶树组织培养的主要技术途径。1972和1973年, Satchuthananthavale等<sup>[3,4]</sup>从巴西橡胶树花药培养中获得了来自花药壁的二倍体组织。随后, Paranjothy和Ghadimathi<sup>[5,6]</sup>从花药培养试验中获得胚状体, 但未再生植株。1977年, 中国科学院遗传研究所和广东省农垦总局保亭热带作物研究所<sup>[7]</sup>获得了巴西橡胶树花药植

株。1978年, 王泽云等<sup>[8,9]</sup>也获得花药植株并移栽成活。到目前为止, 我国花药植株的大田栽培面积已有近千亩。花药植株有自己的根系, 摆脱了砧木的不良影响, 并能恢复其幼态特性, 因此与传统的芽接苗相比, 花药植株具有生长速度快、干胶产量高、抗逆性强的特点。同一品种已开割的花药植株比芽接苗的茎围增长9%~20%, 产量增加20%~50%, 抗台风、抗寒害能力显著增强<sup>[10,11]</sup>。因此, 橡胶树花药植株未来可能成为主要的种植材料。

**1.1 取材和消毒** 橡胶树的春花、夏花、秋花均可作为花药培养的外植体。外植体取材时间通常处于单核期和少数进入双核期的花药, 此时的花蕾长为2.5~3 mm, 颜色为黄绿色。常用的消毒程序是75%酒精浸泡数秒钟, 再以0.1%~0.2%升汞浸10~15 min, 最后用无菌水清洗4~5遍<sup>[12,13]</sup>。Carron等<sup>[2]</sup>认为花药在低温条件下保存数个小时后再进行消毒培养, 有利于其愈伤组织诱导和胚状体分化。

**1.2 愈伤组织诱导** 花药接种到诱导愈伤组织的培养基上, 20 d左右产生愈伤组织<sup>[12,13]</sup>。基本培养基采用MS或MB(含MS培养基的大量元素和铁

收稿 2004-12-09 修定 2005-04-22

资助 国家自然科学基金(30260062)。

\*通讯作者(E-mail: jmzhang@vip.163.com, Tel: 0898-66984866)。

盐, Bourgin和Nitsch烟草培养基中的微量元素, H培养基的有机物质), 陈正华等<sup>[12]</sup>认为以MB培养基为基本培养基诱导效果好。生长调节剂是诱导愈伤组织的关键性因素, 试验证明2, 4-D和KT对花药愈伤组织的形成来说是极需要的<sup>[8, 14]</sup>。椰乳和蔗糖对培养效果也有一定的影响。在培养基中加入椰乳(5%~10%)和高浓度蔗糖(8%~10%)对愈伤组织的生长虽有一定程度的抑制, 但此种愈伤组织在随后的分化培养中则有较强的分化成胚状体能力<sup>[8]</sup>。

**1.3 胚状体诱导** 愈伤组织培养45~50 d是最适的胚状体诱导时期。这阶段用改良的MS培养基, 微量元素增大1倍可大大提高胚状体的诱导率, 生长调节剂应用适量的KT(0.2~1 mg·L<sup>-1</sup>)、NAA(0.1~0.2 mg L<sup>-1</sup>), 蔗糖浓度略下降(7%), 培养基中添加5%~10%的椰乳、0.1%活性碳有利于胚状体的形成<sup>[8, 12, 15]</sup>。吴胡蝶等<sup>[16]</sup>认为在培养基中添加适量的6-BA(2~5 mg·L<sup>-1</sup>)或ABA(0.2~0.5 mg·L<sup>-1</sup>)能促进胚状体的形成。王泽云等<sup>[8]</sup>认为在培养基中添加GA<sub>3</sub>或水解DNA均不能提高胚状体的诱导率, 陈正华等<sup>[12]</sup>则认为GA<sub>3</sub>能显著地促进胚状体体积的增长。胚状体分化时间较长, 一般需要2~3个月, 陈正华等<sup>[12]</sup>认为在此期间更换1~2次新鲜的相同培养基能够提高胚状体诱导率。

**1.4 植株诱导** 从已有的报道来看, 胚状体比较容易诱导成苗的品系如“海垦2”、“热研88-13”, 其植株诱导率仅有4%~5%, 而其它品系都在1%以下, 因此植株诱导率极低是花药培养存在的主要问题, 也是制约花药体细胞植株工厂化生产的瓶颈<sup>[1, 8, 13, 17]</sup>。已有的试验表明, 基本培养基应用改良的MS培养基(大量元素下降至80%, 微量元素加倍); GA<sub>3</sub>对胚状体的萌芽、生根、抽茎十分重要; GA<sub>3</sub>与IAA配合使用对根分化有良好作用; 培养基中添加适量的5-溴尿嘧啶有利于植株抽茎; 蔗糖浓度适当下调, 以4%~6%为最佳; 活性碳能使植株的诱导率成倍增多<sup>[8, 12]</sup>。除了培养基成分外, 还应注意如下两方面对植株诱导的影响: (1)胚状体的转移时间不能过早。从球形胚发育至鱼雷胚需一段时间, 过早转移胚状体往往导致早期的胚状体不能发育成熟而不能成苗。王泽云等<sup>[8]</sup>将84个培养49~72 d的胚状体和96个培养

22~48 d的胚状体转移到植株诱导培养基中, 前者可得到3棵植株, 而后者没有出苗。(2)防止胚状体愈伤化。在分离胚状体时较易划伤胚状体, 其伤口处形成的愈伤组织会阻碍植株的形成, 因此, 操作时应尽量避免。另外, 温度也是花药培养的非常重要因子。王泽云和陈雄庭<sup>[18]</sup>找出各个阶段的最适培养温度: 诱导愈伤组织阶段以26℃、诱导胚状体阶段以24~25℃和诱导植株阶段以26~27℃为最好。

**1.5 花药植株移栽** 花药植株移栽是个难题。自马来西亚橡胶研究所(RRIM)于1977年报道花药植株诱导成功后, 直至1985年花药植株才移栽成活<sup>[19, 20]</sup>。我国于1979年移栽成功, 但移栽成活率只有30%<sup>[9]</sup>, 此后采用苗圃砂床移栽方法移栽, 成活率可提高到80%左右<sup>[21]</sup>。

## 2 未授粉胚珠培养

巴西橡胶未授粉胚珠离体培养可以产生单倍体植株。1982年, 郭发高等<sup>[22]</sup>从组培的“海垦-1”未授粉胚珠培养中获得一株完整的试管苗, 但未作细胞学鉴定。1984年, 陈正华等<sup>[23]</sup>从诱导多个橡胶品系的未授粉胚珠中仅获得4株完整植株, 经检测为单倍体。1994年, 肖三元和陈正华<sup>[24]</sup>以云南热带作物研究所自育的11个品系的未授粉胚珠进行培养, 结果仅从“云研74-1007”的胚珠获得完整植株。这些说明未授粉胚珠离体培养的难度较大, 植株再生频率极低, 品系间差别较大, 仅有极少数橡胶品系能够获得再生植株, 因此也就限制了这项技术的应用。如果在其受精胚珠的离体培养中能诱导胚乳成苗, 则由于胚乳是三倍体, 便可从中获得纯合的三倍体植株。在林木育种中, 三倍体的各种性状均认为是最好的<sup>[25]</sup>, 因此, 在橡胶育种中采用三倍体橡胶植株的实际意义是可想而知的, 但目前尚未见这方面的报道。

## 3 子房培养

肖三元和陈正华<sup>[24]</sup>从以子房培养的云南热带作物研究所自育的11个品系中获得了“云研73-477”、“云研74-1007”、“云研72-729”等品系的子房苗完整植株。不同品系间愈伤组织的诱导率及胚状体的发生率差异很大, 如在相同培养基和培养条件下, “云研74-1007”子房愈伤组织诱导率为52.7%, 而“云研2-775”仅为

8.8%,“云研73-477”的胚状体发生率最高,达22.7%,植株的诱导率和植株移栽成活率均较低。

#### 4 体细胞植株的克隆增殖

在花药培养中,植株再生频率较低,生产成本较高,无法满足生产中的大量需求。为此,陈雄庭等<sup>[26]</sup>从处于试管培养阶段的体胚植株上切取长0.5~1.0 cm顶芽和1~2 cm长的茎段(带有1个或几个腋芽),接种到增殖培养基上诱导萌发,可长成新枝,约40 d后,再从新枝上切取顶芽和带芽茎,以同样的培养条件和相似的培养基进行继代增殖,繁殖系数达2~3,从而解决了上述难题。

#### 5 茎尖和嫩茎培养

国外在这方面的研究开展较早。1975年,Paranjothy和Ghandimathi<sup>[5]</sup>从用无菌条件下培养2~3周的种子实生苗茎尖作外植体的实验中仅获得一些愈伤组织,随后,Mascarenhas等<sup>[27]</sup>、Carron和Enjalric<sup>[28]</sup>、Mendanha等<sup>[29]</sup>也做了大量工作,并获得了再生植株。我国这方面的研究较迟,但也有了一定的进展,也获得了再生植株。对此,可从外植体和培养基成分两方面加以介绍。

**5.1 外植体** 从已有的报道来看,外植体均来源于种子的实生苗<sup>[2,5,27~30]</sup>。对种子实生苗的培养有两种方式:一种是用酒精、升汞等常规消毒药品对种子进行消毒,然后转到MS基本培养基上培养,待种子萌发至一定高度后再取其茎尖或嫩茎进行培养;另一种则是将种子播到大棚沙床上,待其长至一定高度时取其外植体作常规消毒后进行培养。试验证明,第一种方式所取的外植体污染率较第二种的低,丛生芽萌发快,分化的数量也较多<sup>[30]</sup>,其原因可能有两方面:(1)培养基中培育的苗是无菌的,而取沙床培育的苗作外植体,由于其长期暴露在空气中,再加上生长环境影响复杂,外植体材料有内源微生物的污染,消毒有一定的困难,另外,消毒剂对外植体也有一定的毒害性;(2)培养基的营养成分较沙床丰富,在培养基中培养的苗,其贮藏的养分较多,植株较粗壮。

**5.2 培养基成分** 在诱导培养中,采用的基本培养基一般为MS,6-BA(2~3 mg·L<sup>-1</sup>)是必需的,适量的KT、5%的椰乳也有促进芽分化的作用。Carron和Enjalric<sup>[28]</sup>认为加入活性碳可促进嫩茎腋芽分化,而Huang等<sup>[30]</sup>则认为加入活性碳可促进茎尖

分化,对嫩茎没有任何作用。为了促进芽的分化,Huang等<sup>[30]</sup>在培养中还添加了GA<sub>3</sub>、IAA或IBA,发现低浓度的GA<sub>3</sub>(0.1 mg·L<sup>-1</sup>)有促进作用,IAA比IBA作用的效果好。在增殖培养中,培养基配方与诱导培养基基本相同;在生根培养中,Mendanha等<sup>[29]</sup>认为在MS基本培养基上添加IBA和NAA(浓度均为5 mg·L<sup>-1</sup>)效果最好;而Mascarenhas等<sup>[27]</sup>则认为在White基本培养基上添加IAA或IBA、IPA、NAA(浓度均为10 mg·L<sup>-1</sup>)效果最佳;Carron和Enjalric<sup>[28]</sup>认为先用IBA和NAA(浓度均为5 mg·L<sup>-1</sup>)浸渍芽苗的基部一段时间后转到不含有生长激素的培养基中培养,生根率较高,Huang等<sup>[30]</sup>也证实了这一点。

橡胶树是异花授粉,其后代是高度杂合的个体,因此,采用种子苗的茎尖或嫩茎作为外植体时,其再生植株极有可能不能保持其亲本的优良性状,在生产中没有实际应用价值。如果能直接采用优良品种的腋芽作为外植体,其再生植株不仅能保持母本的优良性状,而且还可以消除砧木的影响,在生产中可能有很大的潜在应用价值,但目前尚未见这方面的报道。

#### 6 悬浮细胞培养

多年来,人们一直想用巴西橡胶树作为生物反应器(bioreactor)来生产除胶乳以外的其它珍贵物质,橡胶树悬浮细胞培养体系的建立是这一技术的基础。用悬浮细胞培养可大量生产人工种子,这对橡胶树良种繁殖来说是个重大变革,而且还可为遗传基因工程技术提供细胞水平上的理想材料。

关于这方面的研究,较早开始的Wilson等<sup>[31]</sup>和Veisseire等<sup>[32]</sup>的工作还只是停留在胚状体阶段。后来,刘桂珍和陈正华<sup>[33]</sup>不仅获得了胚状体,而且还得到再生植株。其成功的原因有以下几点:(1)愈伤组织的来源有异。Wilson等用的悬浮培养细胞愈伤组织来源于巴西橡胶树幼苗嫩茎,Veisseire等用的是来源于幼果内种皮诱导产生的愈伤组织,刘桂珍等用的则是来源于巴西橡胶树单核晚期花蕾(3~4 mm)诱导产生的愈伤组织。(2)培养基成分不同。Wilson等的悬浮培养基中只加2,4-D和KT;Veisseire的悬浮培养中除加入2,4-D外,还用6-BA代替KT,他们认为添加适量的ABA能促进胚状体形成;刘桂珍的悬浮培养基中除了

加有 2, 4-D 和 KT 外, 还添加 2% 的甘油以代替蔗糖作为碳源, 结果胚胎发生频率提高, 另外, 固体培养基中加入 ABA 也有利于正常的胚状体形成。

## 7 原生质体培养

植物原生质体是指已去除细胞壁的裸露的植物细胞, 具有细胞全能性, 可以进行细胞核或细胞质移植及对外源物(病毒、微生物、外源遗传物质)的摄取和转化、原生质体融合, 在植物育种领域中有十分广阔的前景。

1980年, Rohani 和 Paranjothy<sup>[34]</sup> 尝试用各种橡胶树的材料来分离原生质体, 发现来源于花药愈伤组织的悬浮细胞是最好的材料。1991年, Cazaux 和 Auzac<sup>[35]</sup> 用橡胶叶、茎和胚性愈伤组织分离原生质体, 发现只有来源于胚性愈伤组织的原生质体发生细胞分裂并形成愈伤组织。以后, Sushamakumari 等<sup>[36]</sup>、Haris 等<sup>[37]</sup>、Suraninpong 和 Te-chato<sup>[38]</sup> 均有相似报道。由此可见, 制备橡胶树原生质体的最好材料为胚性愈伤组织或悬浮细胞体系。

游离原生质体用混合酶液处理效果较好, 一般采用 1% 纤维素酶和 1% 的果胶酶混合处理。Haris 等<sup>[37]</sup> 认为在酶液中添加 6.5%~10% 的甘露醇、0.1% CaCl<sub>2</sub> 和 0.05% MES 可明显提高游离原生体得率, 再用 20% 的蔗糖和 12% 的甘露醇漂洗原生质体, 纯化效果较好。在橡胶树原生质体培养中, 常用的是液体培养基, 必须加入 2, 4-D、KT 或 6-BA、蔗糖、椰乳等附加物, 用甘露醇调整培养基的渗透压。Suraninpong 和 Te-chato<sup>[38]</sup> 认为在培养基中添加 TDZ (塞苯隆) 以代替 6-BA, 原生质体的增殖数量可有较大提高。目前, 只有 Sushamakumari 等<sup>[36]</sup> 用橡胶树原生质体培养得到植株再生。

## 8 展望

花药培养是巴西橡胶树组织培养中研究较早和较多的一个方向, 是目前研究橡胶树遗传转化的主要途径。迄今, 虽已解决了愈伤组织出胚率低的问题, 但畸形胚仍然较多<sup>[17, 39]</sup>, 因而再生植株频率极低。王亚丽<sup>[40]</sup> 从细胞学和组织学的角度阐明其原因: 认为花药愈伤组织在诱导成球形胚或心形胚时, 大多数胚状体的发育停留在这一阶

段, 不能进一步形成正常胚(鱼雷胚等)。虽然已有一些采用添加 ABA、GA<sub>3</sub> 等来控制畸形胚发生的报道<sup>[12, 16, 39]</sup>, 但并未能从根本上解决问题。因此, 如果能用基因工程手段来研究橡胶的体细胞胚胎的发生, 找出并克隆其关键基因, 再培育出转基因植株, 则有可能从根本上解决这一难题。

目前, 橡胶树的新品种选育主要采用杂交授粉方法, 由于橡胶树是高度杂合体, 其座果率又较低(仅为 5% 以下), 又常受台风等自然因素的影响, 其后代选育时间较长, 因此效果不明显, 费用也较高<sup>[1]</sup>。如果能采用细胞融合技术, 将不同品种的细胞融合在一起, 其再生植株即有两个品种的优良性状, 或许能缩短选育品种的年限。但细胞融合技术的发展尚有赖于原生质体培养技术的完善与成熟。目前, 我国有关巴西橡胶的原生质体培养的研究尚欠深入, 国外虽有这方面的报道, 但其技术也不完善, 因此加强原生质体培养技术的研究显得十分重要。

由于橡胶树是异花授粉植物, 多数基因呈杂合状态。通过多代自交的方法培育纯系受到橡胶树生育期长(4~5年)的困扰, 因此, 传统的杂交育种及杂种优势的利用受到限制。通过组织培养获得单倍体植株, 再加倍成为二倍体, 是获得遗传纯合的育种材料的捷径, 也是使杂合基因分离, 再通过有性杂交使其优质基因重新组合的有效方法, 有望大幅度提高干胶的产量、品质和胶树的抗性。目前, 虽有通过花药培养得到单倍体植株的报道, 但所得的结果存在争议<sup>[14, 41]</sup>。小孢子培养是获取不具争议的单倍体植株的有效方法, 但目前还没有橡胶树小孢子培养成功的报道。

三倍体育种在杨树<sup>[42]</sup>和桑树<sup>[43]</sup>等诸多林木中均表现出产量高、生长快、抗逆性强的优势, 因此开展橡胶树三倍体育种具有广阔前景。通过胚乳培养来获得三倍体植株在林木中已有许多成功的报道<sup>[44~46]</sup>。橡胶种子具有丰富的胚乳, 因此, 通过胚乳培养来获取橡胶三倍体植株是极有可能实现的。从二倍体橡胶树杂交后代产生基因分离来看, 能保持亲本优良性状的后代不多, 胚乳虽然是三倍体, 但它是有性杂交的产物, 也存在基因重组。通过大量培养和结合常规育种的方法对再生植株进行筛选, 很有可能获得遗传稳定、性状

优良的三倍体植株。

### 参考文献

- 广东省农垦总局、海南省农垦总局编著. 橡胶树良种选育与推广. 广州: 广东科技出版社, 1994
- Carron MP, Enjalric F, Lardet L et al. Rubber (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). *Biotechnol Agr Forest*, 1989, (5): 228~245
- Satchuthanathavale R, Irugalbandara ZE. Propagation of callus from *Hevea* anthers. *Quart J Rubber Res Inst Ceylon*, 1972, 49: 65~68
- Satchuthanathavale R. *Hevea* tissue culture. *Quart J Rubber Res Inst Ceylon*, 1973, 50: 91~97
- Paranjothy K, Ghadimathi H. Morphogenesis in callus cultures of *Hevea brasiliensis*. *Proceeding of the National Plant Tissue Culture Symposium*, 1975. 19~25
- Paranjothy K, Ghadimathi H. Tissue and organ culture of *Hevea*. *Pro Int Rubb Conf*, 1976, (2): 59~84
- 中国科学院遗传研究所, 广东省农垦总局保亨热带作物研究所. 三叶橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 花药育株成功(简讯). *遗传学报*, 1977, 4(2): 186
- 王泽云, 曾宪松, 陈传琴等. 从离体花药诱导巴西橡胶植株. *热带作物科技通讯*, 1978, (4): 1~7
- 华南热带作物研究院橡胶所橡胶花粉单倍体育种课题组. 橡胶花粉植株的移栽. *热带作物科技通讯*, 1979, (2): 1~3
- 王泽云, 陈雄庭, 吴胡蝶. 橡胶树新型种植材料——体胚植株. *热带农业科学*, 2001, (6): 11~15
- 陈雄庭, 王泽云, 吴胡蝶等. 橡胶树新种植材料——自根幼态无性系. *热带作物学报*, 2002, 23(1): 19~23
- 陈正华, 许绪恩, 庞任声等. 橡胶树属的花药培养及花粉植株的研究. 见: 陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986. 481~500
- 王泽云, 曾宪松, 陈伟琴等. 用离体花药诱导巴西橡胶植株的研究. *热带作物学报*, 1980, 1(1): 16~25
- 陈正华, 许绪恩, 张世杰等. 巴西橡胶花粉植株的培育. *热带作物科技*, 1981, (6): 6~12
- 王泽云, 吴胡蝶, 陈雄庭等. 活性炭在橡胶花药培养中的效应. *热带作物研究*, 1988, (1): 12~14
- 吴胡蝶, 王泽云, 陈雄庭. 6-BA、ABA对橡胶花药体细胞胚形成及植株再生的影响. *热带作物研究*, 1994, (3): 1~3
- Carron MP, Lardet L, Dea BG. *Hevea* micropropagation by somatic embryogenesis. *Plantations Res Dev*, 1998, (5): 187~192
- 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. *作物学报*, 1995, 21(6): 723~726
- Annual Report of RRIM. Malaysia, Kuala Lumpur, 1977, 67~68
- Annual Report of RRIM. Malaysia, Kuala Lumpur, 1985, 15~16
- 王泽云, 陈雄庭, 吴胡蝶等. 橡胶花药植株移栽技术的改进. *热带作物研究*, 1996, (1): 7~10
- 郭高发, 贾学军, 陈伦兴. 离体胚珠诱导巴西橡胶植株(简报). *遗传*, 1982, 4(1): 27~28
- 陈正华, 许绪恩, 廖小群等. 三叶橡胶未授粉胚珠培养获得再生植株. *中国科学院遗传研究所工作年报*, 1984: 42
- 肖三元, 陈正华. 三叶橡胶树未授粉子房、胚珠培养再生植株研究初报. *云南热带科技*, 1994, (3): 18~20
- 蔡旭主编. *植物遗传育种学*. 第2版. 北京: 科学出版社, 1988. 611~626
- 陈雄庭, 王泽云, 吴胡蝶等. 巴西橡胶树自根幼态无性系的试管微繁. *作物学报*, 1998, 24(2): 225~230
- Mascarenhas AF, Hazara S, Potdar U et al. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In: Fujiwara A (ed). *Plant Tissue Culture. Proceedings of the 5th International Congress on Plant Tissue Cell Culture*, Tokyo, 1982. 719~720
- Carron MP, Enjalric F. Studies on vegetative micropagation of *Hevea brasiliensis* by somatic embryogenesis and *in vitro* microcutting. In Fujiwara A (ed). *Plant Tissue Culture. Proceedings of the 5th International Congress on Plant Tissue Cell Culture*, Tokyo, 1982. 751~752
- Mendanha ABL, Torres RAA, Freir AB. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Genet Mol Biol*, 1998, 21(3) (Published online)
- Huang TD, Li WG, Huang HS. Micropropagation of shoot apex and shoot stem with axils of cotyledon of *Hevea brasiliensis*. In: *Proceedings of the International Rubber Conference, Parallel Session 2, Kunming, China, Sept. 2004*
- Wilson HM, Eisa MZ, Irwin SWB. The effects of agitated liquid medium on *in vitro* culture of *Hevea brasiliensis*. *Physiol Plant*, 1976, 36: 399~402
- Veisseire P, Linossier L, Coudret A. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1994, 39(3): 219~223
- 刘桂珍, 陈正华. 巴西橡胶悬浮细胞培养胚胎发生与植株再生. *热带作物学报*, 1999, 20(4): 1~4
- Rohani O, Paranjothy K. Isolation of *Hevea* protoplasts. *J Rubb Res Inst Malaysia*, 1980, 28: 61~66
- Cazaux E, Azac JD. Isolation and culture of *Hevea brasiliensis* protoplasts. *Physiol Plant*, 1991, 82(1): 1~14
- Sushamakumari S, Asokan MP, Anthony P et al. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2000, 61(1): 81~85
- Haris N, Darussamin A, Dodd WA. Isolation of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg) protoplast from callus and cell suspension. *Menara Perkebunan (Indonesia)*, 1993, 61: 25~31
- Suraninpong P, Te-chato S. Effect of cytokinins on cell suspension culture, isolation and culture of protoplast of rubber. *Songklanakar J Sci Technol*, 1999, 21(2): 169~177
- 吴胡蝶, 王泽云, 陈雄庭等. 影响橡胶体细胞胚萌发成植株的几个因素. *热带作物研究*, 1997, (2): 5~8
- 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[硕士学位论文]. 广州: 华南热带农业大学, 2004
- 王泽云, 吴胡蝶, 曾宪松等. 巴西橡胶花药胚的发生和花药植株起源的研究. *热带作物学报*, 1984, 5(1): 9~13
- 李云. 杨树三倍体选育研究进展. *植物学通报*, 2001, 18(4): 451~456
- 郭展雄, 肖更生, 苏大道. 广东桑树多倍体及其育种研究的进展. *蚕业科学*, 1994, 20(2): 67~71
- 王元. 柑桔胚培养技术的研究. II. 多胚性品种未熟幼胚的早期离体培养. *园艺学报*, 1981, 8(1): 1~6
- 毋锡金. 苹果胚乳愈伤组织的诱导和植株分化. *中国科学*, 1977, (4): 355~359
- 韩礼星, 赵改荣, 李玉红等. 猕猴桃多倍体的研究. *果树科学*, 1988, 15(3): 273~276