

## 火炬松组织培养研究和应用进展

万婷, 孔冬梅\*

山西大学生命科学学院, 太原030006

**摘要:** 从离体再生途径、影响因素、遗传转化、存在问题等方面对火炬松组织培养研究和应用进展作了介绍和讨论, 以期对同类树种相关研究的开展提供参考。

**关键词:** 火炬松; 器官发生; 体细胞胚胎发生; 遗传转化

## Progress of Research and Application of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) Tissue Culture

WAN Ting, KONG Dong-Mei\*

College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** Recent progress in research and application of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) *in vitro* culture was introduced and discussed. This review focused on regeneration programs, influencing factors, genetic transformation and existing problems. It was aimed to provide references to related studies on other similar tree species.

**Key words:** *Pinus taeda* L.; organogenesis; somatic embryogenesis; genetic transformation

针叶树的离体培养和植株再生是植物组织培养研究中难度较大的一个领域。随着人们对无性系林业的日益重视, 世界各国对针叶树的组织培养给予了特别关注。经过近20年的发展, 针叶树已从组织、器官培养深入到细胞、原生质体培养, 逐步实现从理论研究到应用实践的跨越, 尤其在离体培养与植株再生各环节技术指标上取得了重大突破。然而纵观全球针叶树组织培养, 仅有少数几个树种的体胚发生技术在生产上得到应用, 大部分组织培养技术仍停留在实验室研究阶段, 尤其是在松属树种中仍存在不少困难。火炬松 (*Pinus taeda* L.) 是针叶树中少数几个组织培养技术相对成熟的树种之一, 系统了解其培养技术研究及应用进展, 对同类树种相关研究的开展具有借鉴意义。

火炬松原产美国东南部, 是世界南方松中分布最广、生长面积最大、木材年产量最高、蓄积量最多的绿化和造林用速生针叶树种, 上世纪30年代引入我国, 目前已成为我国南方省区大面积造林的重要经济树种。火炬松的组织培养研究始于上世纪70年代。1987年Gupta和Durzan首次从改良的MS培养基上, 以未成熟合子胚为外植体, 获得火炬松体细胞胚和再生植株。之后, 对火炬松不定芽诱导、体细胞胚发生和植株再生技术的研究

不断深入, 并取得了很大进展。

### 1 火炬松组织培养植株再生途径

通过组织培养获得火炬松再生植株有器官发生和体细胞胚胎发生2种途径。器官发生包括直接发生和间接发生2种方式, 直接器官发生耗时短, 操作简便。间接器官发生需先诱导愈伤组织, 再经器官分化形成再生植株, 愈伤组织培养不受季节限制, 污染率低, 诱导率高。体胚发生途径则多通过间接方式发生, 即先诱导生成胚性愈伤组织(胚性胚柄团), 再从胚性愈伤组织诱导体细胞胚并使其成熟和萌发, 进而得到完整植株。通过体胚发生获得再生植株的优点是, 在一个培养物上所能发生的胚状体数量往往比不定芽数多, 且发生速度快, 结构完整, 无需诱导生根环节, 成苗率高。对于火炬松, 这2种发生途径都有其重要意义。

#### 1.1 火炬松器官发生植株再生研究进展

火炬松的组织培养研究始于上世纪70年代。

收稿 2010-12-03 修定 2011-01-07

资助 山西省青年科技基金(2008021042)和山西大学青年科技基金(2007108)。

\* 通讯作者(E-mail: kdongmei@sxu.edu.cn; Tel: 0351-7010599)。

之后相继有研究以成熟合子胚为外植体直接诱导形成不定芽,并经根的诱导获得了再生植株(阙国宁等1997;唐巍等1997;Tang和Guo 2001)。唐巍和欧阳藩(1998)还通过成熟合子胚培养获得了器官性愈伤组织,从愈伤组织诱导不定芽,并诱导芽苗生根获得了再生植株,不定芽的诱导率达58.2%,生根率达46%。

### 1.2 火炬松体胚发生植株再生研究进展

1987年Gupta和Durzan以火炬松未成熟合子胚为外植体,首次经体胚发生途径获得再生植株。此后,有关研究大量开展,火炬松体胚发生再生植株成功的研究越来越多,生理生化及分子生物学方面的研究也得以深入(Becwar等1990;唐巍等1998)。其中唐巍等(1998)以24个火炬松基因型成熟种胚为外植体,获得完整植株,成活率最高达25%。在此基础上,生物反应器、低温冷藏技术及人工种子生产等应用研究也得以迅速发展。这些技术的发展也大大促进了火炬松体胚发生植株再生技术的应用。据报道,美国Weyerhaease公司和Westvaco公司已将火炬松体胚发生技术应用于苗木商业化生产。

## 2 影响火炬松离体培养植株再生的主要因素

火炬松组织培养过程受多种因素的影响,了解这些影响因素的作用规律将有利于火炬松的快速繁殖和工业化生产。

### 2.1 外植体的生理状况

到目前为止,火炬松成功的离体培养所使用的外植体均为合子胚。器官发生植株再生以成熟的合子胚为外植体,不定芽或器官性愈伤组织通常发生于子叶或下胚轴(Tang和Guo 2001;阙国宁等1997)。体胚发生多以幼嫩合子胚为外植体,发育早期太小的合子胚不容易剥离,此时可用包含合子胚的雌配子体接种(Gupta和Durzan 1987)。合子胚的发育阶段是影响体胚发生的一个主要因素,通常适合体胚诱导的发育阶段只是一个很短的时间。Becwar等(1990)研究发现,7月6日到8月3日取材的合子胚上获得体胚的最高诱导率,同时发现体胚诱导与合子胚的形态学密切相关,合子胚长度小于0.5 mm时(在子叶原基发育之前)最适合诱导体胚。唐巍等于1998年打破了幼嫩合子胚发育状态和取材季节的束缚,首次以成熟合子胚为外

植体建立了体胚发生和植株再生技术体系,尽管再生频率只有6.1%~18.4%。

### 2.2 基因型

不同基因型的外植体需要的最适培养条件不同,而在相同诱导条件下,其不定芽诱导和体胚发生情况有明显差异。

对3种基因型(Hb、Ma和Mc)火炬松不定芽诱导的研究发现,不同基因型不定芽的分化、伸长、生根情况有显著差异。其中,基因型Hb的不定芽分化率最高,达58.2%;不定芽的伸长生长速率以Ma最快,达 $0.05 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ ;Ma的生根频率最高,达46%。扫描电镜观察还发现,3种基因型不定芽原基的发生部位不同,Ma和Mc的不定芽原基主要发生在子叶上,Hb则在子叶和上胚轴部位都可形成大量不定芽原基(唐巍等1997)。间接器官发生的研究表明,基因型Ma的愈伤组织诱导率、不定芽分化率、伸长生长速率和生根率都高于另外2种基因型(唐巍和欧阳藩1998)。

对火炬松8个自由授粉家系体胚发生的研究发现,家系E-440单位体积培养物获得的胚性培养物数量最多。对3个家系进行的研究也表明在相同培养条件下,不同家系胚性愈伤组织的诱导率、体细胞胚的得率均有所不同(Tang等2001a)。MacKay等(2006)对火炬松不同家系体胚诱导的研究也得出上述相似的结论。同时还发现,在体胚发生起始时存在很强的遗传累积效应和母体效应,因此在取材时选择优良的亲本特别是母本至关重要。

### 2.3 培养基的营养成分

培养基是植物组培最重要的基质,不同培养基由于其营养成分及含量不同,培养效果也有所不同。

Tang等(1998)在使用不同倍性TE培养基(0.5、0.75、1.0、1.25和1.5倍TE培养基)诱导火炬松成熟合子胚不定芽的分化时发现,1.25倍的TE培养基上不定芽分化率最高(73.5%),每个胚上芽数最多(3.9个),在间接不定芽诱导研究中,也得出相似的结论(唐巍和欧阳藩1998)。阙国宁等(1997)研究发现,总含盐量、总含氮量以及 $\text{NH}_4^+$ 与 $\text{NO}_3^-$ 的比值对不定芽诱导效果至关重要,当培养基中盐分含量为0.45%,含氮量达到 $840.86 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-=1:2$ 时, 所有种胚均不能诱导愈伤组织和不定芽, 并逐渐死亡。适当降低盐分含量到0.21%, 总含氮量为 $186 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-=1:3$ 时, 分化情况明显改善。这表明高盐、高氮以及较高 $\text{NH}_4^+$  (例如目前常用的MS培养基) 不合适火炬松不定芽诱导。低盐培养基, 尤其是降低甚至完全去除 $\text{NH}_4^+$ 可促进不定芽发生的结论在其他多种松类树种中也有报道。

Becwar等(1990)在对火炬松胚性愈伤组织的诱导研究中发现, 在其他条件相同时, 降低盐浓度的改良MS培养基(MSG)上诱导率最高, 其次是DCR培养基。Li等(1998a)也发现, DCR1、LP和BM1三种培养基中, BM1培养基比DCR1诱导率高, 但LP对诱导无效。Tang等在2001(a)年深入研究了不同营养成分的培养基对火炬松体胚发生的影响, 研究中使用了DCR、B5、LP、MSG、改良MS、SH、TE和LOB等8种基本培养基, 结果发现, 在其他条件相同情况下, 胚性愈伤组织诱导的最高频率发生在改良MS培养基和LOB培养基上。

大量研究表明, 火炬松器官发生和体胚发生受培养基中无机盐浓度的影响较大。器官发生要求培养基中存在较高浓度的 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ , 较低浓度的 $\text{NH}_4^+$ , 且总盐浓度不宜过高, 中盐一般有利于不定芽的形成; 体胚发生则需要适当降低 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的浓度, 通常低盐浓度有利于体胚发生, 而高盐对于胚培养有不同程度的毒害作用。在促进火炬松体胚成熟、萌发的研究中, Pullman等(2003)也得出相似的结论, 即低盐的培养效果要好于高盐培养基。

## 2.4 植物生长调节剂

植物生长调节剂在离体培养形态发生过程中起着不可替代的作用。在火炬松不定芽的形成中使用较多的是6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, BA); 培养基中添加适宜浓度组合的2,4-二氯苯酚代乙醚(2,4-D)、BA和激动素(kinetin, KT)时, 体胚诱导情况较好, 而在体胚成熟阶段则必须有脱落酸(abscisic acid, ABA)的存在。Silveira等(2004)在研究与细胞生长有关的生物化学和生理参数时进一步从理论上证实了这一点。

**2.4.1 植物生长调节剂对器官发生的影响** 火炬松不定芽的诱导要求适当浓度的生长素与细胞分裂

素配合使用, 最常用的生长素是萘乙酸(1-naphthalic acid, NAA)和3-吲哚丁酸(3-indolebutyric acid, IBA), 使用浓度一般不超过 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 细胞分裂素则以BA最为有效, 适宜浓度为 $2\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (唐巍等1997; 阙国宁等1997)。NAA或IBA和BA组合条件下的直接不定芽分化频率明显高于不含BA的处理, 表明BA在直接不定芽的分化过程中起重要作用, 但培养基中BA浓度不宜过高。Tang等(1998)研究发现, 提高BA浓度虽然可以诱导较高的不定芽发生率, 但这些芽小, 发育慢, 当BA浓度达到 $8\sim 16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不定芽诱导率急剧降低, 发育明显缓慢。器官性愈伤组织的诱导以 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA和 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA组合效果较好, 将二者浓度降低为原来的1/4则有利于愈伤组织的增殖, 之后使用 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA与 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA组合能有效诱导不定芽的分化(唐巍和欧阳藩1998)。形成的不定芽通常需要转移到降低生长素浓度、去除细胞分裂素的培养基上进行伸长培养, 适当浓度的 $\text{GA}_3$ 有利于芽的伸长(唐巍等1997)。高度达到2 cm的健壮芽苗应及时转至低含量以至不含生长素的培养基中进行生根诱导, 适宜条件下经10~15 d培养就可长出3~5条白色的根, 生根率可达80%~85% (阙国宁等1997)。

**2.4.2 植物生长调节剂在体胚发生过程中的作用** 火炬松体胚发生也要求适当浓度的生长素和细胞分裂素配合使用, 2,4-D是诱导体胚发生最常用也最有效的生长素, 其次是IBA和NAA, 细胞分裂素多使用BA或KT (Li等1998a; Tang等2001a)。Tang等(2001a)对火炬松体胚发生不同阶段适合的调节剂做了具体研究, 发现在胚性愈伤组织诱导阶段,  $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D、 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA与 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  KT组合处理可获得最高诱导率16.9%, 当把2,4-D换成NAA或IBA (均为 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )时, 诱导率明显降低, 表明2,4-D是火炬松胚性愈伤组织诱导最有效的生长素。继代培养基中生长素和细胞分裂素的浓度都降低为诱导阶段的1/5, 胚性愈伤组织的增殖效果较好。

适当浓度的ABA对火炬松体细胞胚的成熟是必须的。研究发现, 低浓度的ABA ( $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )导致胚性组织过量增殖, 形成的第2阶段的胚较少, 没有第3阶段的胚形成;  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是子叶胚形成所需



要的最低ABA浓度; ABA为40 mg·L<sup>-1</sup>时产生的第2阶段和第3阶段的胚数量最多; 当ABA浓度为4 mg·L<sup>-1</sup>时, 形成前期子叶胚和子叶胚的频率最高; 5 mg·L<sup>-1</sup>的ABA可促进体胚萌发成植株(Li等1997; Pullman等2003; De Silva等2008)。由此可见, 火炬松体胚成熟早期需要较低浓度的ABA, 中期ABA浓度升高可促进后期萌发, 萌发时需要降低ABA浓度。

## 2.5 渗透压

糖类是培养基上最常用的渗透调节剂, 不同糖类在离体培养中会起到不同的效果。Tang等(2008)发现, 分化培养基中添加2%葡萄糖时火炬松不定芽诱导率最高(83.7%), 每个胚上不定芽数最多(5.8个), 诱导效果明显好于甘露糖、果糖和山梨糖。与糖类相比, 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是一种不发生胞质分离的渗透剂。改变肌醇浓度也可起到调节渗透压的作用。通常需将火炬松胚性组织转移到添加PEG或提高肌醇浓度的培养基上, 以促进体胚的成熟(Tang等1998)。有数据显示, 如果成熟培养基中不含PEG, 多数体胚停留在早期阶段不能进一步成熟, 促进体胚成熟的最适PEG浓度是5%~7.5% (Li等1997, 1998b); 而13% PEG 8000能够明显促进火炬松体胚萌发(Pullman等2003)。体胚在成熟后期到萌发之前, 对渗透压也有严格要求。体胚需通过机械方法或延长培养时间的来进行部分干化。若不经干化处理, 体胚很难形成功能性的芽分生组织, 植株的成活率低(Tang等2001a)。

## 2.6 培养基的物理状态

火炬松植株再生不定芽发生途径中一般以固体培养基为宜, 固化剂多使用0.7%琼脂, 而2 g·L<sup>-1</sup> Gelrite则是胚性培养物诱导的较适水平, 降低其浓度可导致诱导率降低, 褐化率增高, 而提高其浓度则可导致胚性培养物质量下降(Li等1998b)。

在火炬松体胚发生过程中, 用愈伤组织建立起的细胞悬浮培养系, 细胞可保持活性达4个多月, 细胞密度与体胚增殖速率有直接关系, 最适宜的密度是1 mL细胞压积(packed cell volume)(Tang 2001)。有研究认为, 在固体培养基上覆盖一层液体培养基时, 火炬松胚性愈伤组织的诱导率显著增加, 当将固体培养基中NAA的浓度从2 mg·L<sup>-1</sup>降

低至0.3 mg·L<sup>-1</sup>且覆盖液中含0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA和9 mg·L<sup>-1</sup> ABA时诱导率最高(Pullman和Skryabina 2007)。

## 2.7 附加物

很多附加成分以适当方式加入培养基后可以在一定程度上改善火炬松体胚培养效果, 而有的附加成分则是培养所必须的。例如, 在火炬松体胚发生中, 高浓度的肌醇、L-谷氨酰胺、水解酪蛋白和5.0 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>使胚性愈伤组织的诱导率和增殖率显著提高; 在培养基中添加一种由250 mg·L<sup>-1</sup> 2-(N-吗啉代)乙磺酸、0.5 mg·L<sup>-1</sup> 叶酸和0.05 mg·L<sup>-1</sup> 维生素H组成的缓冲液, 则可以通过维持培养基的pH值, 来改善体细胞胚的诱导和生长状况(Pullman等2005a); 0.1 mg·L<sup>-1</sup> paclobutrazol (一种赤霉素抑制剂)可显著提高胚性愈伤组织的诱导率(Pullman等2005b)。最新研究发现, 0.5~1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸可显著促进早期体胚的生长和增殖, 且当柠檬酸位于胚性组织表面时, 刺激作用更明显(De Silva等2008)。

## 2.8 环境条件

光照和温度是影响火炬松离体培养的主要环境因素。

在直接不定芽诱导中, 暗培养有利于不定芽原基的诱导, 不定芽的分化、伸长和生根等则需要光照, 培养温度以(23±1) °C为宜(唐巍等1997)。在间接不定芽发生途径中, 愈伤组织的诱导可在黑暗条件下进行, 不定芽的分化则在14 h·d<sup>-1</sup>的光照条件下发生, 温度以(25±1) °C为宜(唐巍和欧阳藩1998)。体胚发生中, 胚性愈伤组织的诱导和增殖在黑暗条件下进行, 温度23~25 °C, 之后的发育则在16 h·d<sup>-1</sup>的光照条件下进行, 温度23~28 °C, 光照强度40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (Tang和Guo 2001)。

## 3 再生植株的锻炼和移栽

与其他针叶树相似, 高度适宜、健康强壮的火炬松试管苗即可用于移栽。移栽前应先在自然光下瓶内炼苗数天, 移栽时小心清洗根部附着的培养基, 移栽后要注意温度、光照等环境条件的逐渐过渡, 特别是湿度条件。在移栽初期, 通常覆盖塑料薄膜以保持较高湿度, 之后逐渐撤除薄膜直至苗木完全暴露于自然条件下。移栽基质多选用珍珠岩:泥炭藓:蛭石=1:1:1 (V/V/V)的混合基

质。试管苗的成活率与其移栽前的生长状况和炼苗情况密切相关, 研究表明, 高于3 cm的健康植株, 驯化时间为16 d时, 再生植株的成活率最高(Tang等2001a)。

#### 4 利用组培体系进行基因转导

遗传转化是植物组织培养应用的一个主要方面, 但就针叶树而言, 成功获得转化目的基因植株的例子并不多, 火炬松也是如此。火炬松遗传转化上使用过的方法有两种, 即农杆菌介导和粒子轰击。目前, 由于限制条件较多且操作复杂, 粒子轰击的方法使用较少。

Sederoff等1986年首次成功进行了火炬松基因转化, 他们通过农杆菌介导法将细菌基因转入了火炬松。之后陆续有火炬松遗传转化的尝试, 但多数研究只获得转报告基因的瞬时表达。Tang等(2001b)通过土壤农杆菌与外植体共培养的方法首次从火炬松获得稳定转化的植株, 火炬松遗传转化的研究才有了突破性进展。使用根癌农杆菌株LBA 4404 [含有质粒pBIGM (带有*Mt1D*和*GutD*)]感染火炬松的成熟合子胚, 在含有15 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素的选择培养基上产生器官性的转基因愈伤组织和转基因再生植株, 耐盐性检测证实, 转基因愈伤组织和再生植株的耐盐性增加了(Tang 2002)。

火炬松转化基因的表达率受多种因素影响。Tang等(2001b)选择土壤农杆菌株GV3101 (含质粒pPCV6NFHyg-GUSINT)来转化火炬松的7个家系, 发现家系11-1029获得最高频率的*GUS*表达(100%), 每个胚上蓝斑数达300个。在共培养成熟胚的子叶、下胚轴、胚根和共培养成熟合子胚的愈伤组织和芽中发现了*GUS*报告基因的表达。通过PCR分析、Southern杂交, 结合DNA/T-DNA分析证实, 外源基因成功整合到了火炬松中。除外植体的基因型外, 转化率还受共培养时间、处理方法、农杆菌菌株的影响, 使用改良的农杆菌株EHA105与火炬松成熟合子胚共培养的研究发现, 共培养21 d, 使用pCAMBIA1301和pTOK47并用超声波处理的转基因植株中*GUS*表达率最高(Tang 2003; Tang等2004)。

Tang和Vanessa在2002年通过粒子轰击法对火炬松成熟合子胚进行转化的研究也取得了成功,

转基因愈伤组织和转基因植株的发生率因基因型不同而异; 在3种不同大小(0.6、1.0和1.1 mm)的金粒子中, 使用最小的金粒子, 基因转化的效率最高; 而不同水平的氦气压并不影响转化率。

#### 5 展望

火炬松组织培养已获得了较稳定的不定芽和体胚发生体系, 在此基础上进行的细胞悬浮培养及遗传转化等研究, 为通过基因工程进行火炬松的遗传改良打下了基础, 但仍存在一些问题阻碍相关技术的实际应用, 如: 不定芽虽能大量增殖但生根率低, 培养周期长; 外植体的选用仅局限于合子胚, 无法保持母本优良性状; 体细胞胚的诱导频率低, 在培养过程中一些细胞系会失去体胚发生能力; 体细胞胚发生不同步, 体胚苗生根困难等。如何克服这些问题将是下一步火炬松组培研究的重要内容。

人工种子生产是体胚发生技术应用的一个重要方面。Gupta和Durzan (1987)已可以在液氮中短期保存的体细胞胚恢复活力, 并将其用海藻酸钠包裹制成了人工种子, 但这方面仍有很大的研究空间, 如研究长期保存技术, 简化操作过程, 降低成本等。

结合分子生物学技术, 探讨火炬松组织培养形态发生的生理生化机制, 进一步进行基因转化的研究, 分离形态发生相关基因等, 将会促进火炬松组培技术发展及其在商业生产上的应用, 同时对促进其他针叶树离体培养研究, 推进整个无性系林业的发展具有积极意义。

#### 参考文献

- 阙国宁, 房建军, 葛万川, 张守英, 毛秋娟(1997). 火炬松、湿地松、晚松组培繁殖的研究. 林业科学研究, 10 (3): 227~232
- 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛(1997). 火炬松成熟合子胚培养直接器官发生和植株再生. 云南植物研究, 19 (3): 285~288
- 唐巍, 欧阳藩(1998). 火炬松 (*Pinus taeda* L.)合子胚愈伤组织的器官发生和植株再生. 实验生物学报, 31 (1): 87~93
- 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛(1998). 火炬松成熟合子胚直接体细胞胚胎发生和植株再生. 应用与环境生物学报, 4 (2): 103~106
- Becwar MR, Nagmani R, Wann SR (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Can J For Res, 20: 810~817
- De Silva V, Bostwick D, Burns KL, Dioham CD, Skryabina AM, Sullards C, Wu D, Zhang YL, May SW, Pullman GS (2008). Isolation and characterization of a molecule stimulatory to growth of somatic embryos from early stage female gametophyte tissue of

- loblolly pine. *Plant Cell Rep*, 27: 633~646
- Gupta PK, Durzan DJ (1987). Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Biol/Technology*, 5: 147~151
- Li XY, Huang FH, Edward E, Gbur JR (1997). Polyethylene glycol promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 33: 184~189
- Li XY, Huang FH, Gbur JrEE (1998a). Effect of basal medium, growth regulators and Phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Cell Rep*, 17: 298~301
- Li XY, Huang FH, Murphy B, Edward E, Gbur JR (1998b). Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 34: 22~26
- MacKay JJ, Becwar MR, Park YS, Cordero JP, Pullman GS (2006). Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genet Genomes*, 2: 1~9
- Pullman GS, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N (2003). Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination and gene expression. *Plant Cell Rep*, 21: 747~758
- Pullman GS, Johnson S, Tassel V, Zhang Y (2005a). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 80: 91~103
- Pullman GS, Mein J, Johnson S, Zhang Y (2005b). Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep*, 23: 596~605
- Pullman GS, Skryabina A (2007). Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep*, 26: 873~887
- Sederoff R, Stomp AM, Chilton WS, Moore LW (1986). Gene transfer into loblolly pine by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biol/Technology*, 4: 647~649
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 76: 53~60
- Tang W (2001). Enhanced somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic cultures derived from mature loblolly pine zygotic embryos by suspension culture and medium selection. *J For Res*, 3 (2): 1~9
- Tang W (2002). Regeneration of transgenic loblolly pine expressing genes for salt tolerance. *J For Res*, 13 (1): 1~6
- Tang W (2003). Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens* mediated loblolly pine transformation. *Plant Cell Rep*, 21: 555~562
- Tang W, Guo ZC (2001). *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regul*, 33: 25~31
- Tang W, Guo ZC, Ouyang F (2001a). Plant regeneration from embryogenesis cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 37: 558~563
- Tang W, Sederoff R, Whetten R (2001b). Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta*, 213: 981~989
- Tang W, Luo HS, Ronald J, Newton (2004). Effects of antibiotics on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo explants and on transgenic plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 70: 71~81
- Tang W, Ou YF, Guo ZC (1998). Factors affecting adventitious bud differentiation of loblolly pine from mature zygotic embryos cultured *in vitro*. *Dev Reproduc Biol*, 7 (1): 49~54
- Tang W, Vanessa S (2002). Genetic transformation of *Pinus taeda* by particle bombardment. *J For Res*, 13 (2): 91~97