

## 马尾松幼胚体细胞胚胎发生研究

杨模华<sup>1,\*</sup>, 张冬林<sup>1,2</sup>, 李志辉<sup>1</sup>, 靳小翠<sup>1</sup>, 丁贵杰<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中南林业科技大学林学院, 长沙410004; <sup>2</sup>缅因大学植物、土壤与环境科学系, 美国奥罗诺04469; <sup>3</sup>贵州大学林学院, 贵阳550025

**摘要:** 本论文首次报道了马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)幼胚体细胞胚胎发生的完整发育过程, 并对影响马尾松胚性愈伤组织诱导的因素如球果采种期、球果冷藏处理时间、外植体处理方式等进行了探讨, 统计胚性愈伤组织诱导率, 进行增殖评价, 探讨ABA浓度梯度对马尾松体细胞胚分化成熟的影响, 试验数据用SPSS 16统计分析软件进行方差分析、差异显著性检验。结果表明: 1)2008~2009连续2年内15个采种期得到的幼胚, 胚性愈伤组织诱导和增殖有显著性差异, 最适宜的马尾松球果采种期是6月下旬至7月下旬, 诱导率在9.66%~22.59%之间; 2)球果冷藏处理时间, 对胚性愈伤组织诱导有显著性差异, 其中4℃冷藏球果15 d有利于幼胚胚性愈伤组织诱导; 3)雌配子体包含幼胚的接种处理方式是可取的; 4)胚性愈伤组织经稳定增殖培养后, 转入分化成熟培养基, 得到体细胞胚状体“爆发式”分化成熟, 数量多, 质量好。适宜体胚成熟转化的培养基为: 成熟LP培养基添加ABA 5.0 mg·L<sup>-1</sup>+60.0 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, 并附加L-谷氨酰胺和水解酪蛋白; 5)成熟体细胞胚在无激素萌发型LP培养基上正常萌发, 并转化为结构完整的小植株。本研究首次建立了马尾松幼胚体细胞胚胎发生技术平台, 为马尾松遗传改良种质创新、缩短育种周期奠定了研究基础。

**关键词:** 森林培育学; 马尾松; 幼胚; 体细胞胚胎发生; 胚性愈伤组织; 胚状体

## Somatic Embryogenesis with Immature Embryos of Masson Pine (*Pinus massoniana* Lamb.)

YANG Mo-Hua<sup>1,\*</sup>, ZHANG Dong-Lin<sup>1,2</sup>, LI Zhi-Hui<sup>1</sup>, JIN Xiao-Cui<sup>1</sup>, DING Gui-Jie<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; <sup>2</sup>Department of Plant, Soil and Environmental Sciences, University of Maine, Orono 04469, USA; <sup>3</sup>College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China

**Abstract:** Somatic embryogenesis (SE) from immature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) was achieved by megagametophytes containing zygotic embryos on LP medium. Factors influencing somatic embryogenesis (SE) in *P. massoniana* were studied, such as the cone collection dates, the time of cold treatment on the cone, the concentration of ABA. The initiation rates and the evaluation of embryonic callus were analyzed with SPSS 16.0. The results showed that: 1) The induction of SE were affected by different stages of immature embryos and there was statistically significant differences among the 15 cone collection dates. Considering the evaluation of embryonic callus, the cone collection date between June and July was appropriated with the initiation rates arranged from 9.66% to 22.59%. 2) There was also significant difference among the cold treatments time in initiation of embryonic callus, and the optimum cold treatment time was about 15 d at 4℃. 3) Some proliferation callus was fine and which was subcultured to maturation medium. 4) When the LP maturation medium containing 5.0 mg·L<sup>-1</sup> ABA and 60.0 g·L<sup>-1</sup> sucrose supplemented with both L-glutamine and casein, more mature somatic embryos with high quality were produced compared with 30.0–55.0 mg·L<sup>-1</sup> ABA. 5) The somatic embryos were placed on germination medium without PGRs, after 4 to 6 weeks they were germinated and developed into small seedlings. It is the first report about the somatic embryogenesis with immature embryos of masson pine and these findings provide foundation for breeding some elite clones within short period.

**Key words:** silviculture; *Pinus massoniana* Lamb.; somatic embryogenesis; embryonic callus; somatic embryo

针叶树无性系的建立是加速其品种改良和良种繁育的基础。体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis, SE), 简称为体胚发生, 是已分化的体细胞去分化、再分化、发育成具有胚芽、胚轴、胚根, 形成与合子胚相似的胚状体的过程。SE途径的植株再生, 具有数量多、繁殖速度快、结构

收稿 2011-07-26 修定 2011-08-27  
资助 湖南省自然科学基金项目(11JJ3038)、湖南省教育厅优秀青年基金项目(09B112)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20104321110002, 20060538004)、国家“863”计划课题、“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD24B0301)。

\* 通讯作者(E-mail: ymh163@163.com; Tel: 0731-85623011)。

完整、植株再生率高、不受季节影响等特点,特别是与液氮冷冻保存技术结合后,对特定优良基因型拥有无限扩繁的潜力,国际上普遍认为SE是对针叶树良种基因型规模化扩繁的最佳途径(Park等2006);另外,SE发育初期中获得的胚性愈伤组织(embryonic callus, EC)是一种全能性干细胞,具有多向分化潜能,是基因工程遗传转化的良好受体细胞(Trontin等2007)。尤其是SE技术与传统杂交育种程序相结合,在林木种质创新,培育速生、优质、抗逆林木新品种方面,能极大地缩短育种周期、提高育种效率,从而为发展多目标品种林业(multi-varietal forestry, MVF)提供了强有力的生物技术工具(Klimaszewska等2007; Park 2004)。

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)是中国南方亚热带地区特有的、最重要的用材、采脂和松花粉等兼用的多用途人工造林树种,广泛分布于中国南方17个省、自治区和直辖市,它适应性强,耐干旱贫瘠,速生丰产,纤维优良和全树综合利用程度高(丁贵杰等2006)。自1980年以来,通过种源试验、营建种子园、子代遗传测定等方式在马尾松的遗传改良方面已经取得了显著的成果,并已选育出了大量优良家系和无性系;然而,营建的马尾松良种种子园种子产量低,马尾松扦插无性繁殖又具有年龄效应(季孔庶等1999),这些良种扩繁的技术瓶颈严重限制了马尾松良种效应的发挥。张宇等(2006)和Zhu等(2010)分别对马尾松成熟胚经过器官发生途径进行了组培快繁和植株再生的研究,黄健秋等(1995)报道以成熟胚为外植体经过SE途径获得了4株马尾松再生小苗,但至今还未见有利用以上器官发生或SE途径对马尾松良种进行规模化扩繁利用的报道。国内外松属树种成功的SE途径植株再生常以幼胚为外植体(Park等2006),杨艳等(2007)利用马尾松幼胚进行SE途径中EC诱导探讨的研究表明,添加一定浓度的NAA和6-BA,可以诱导产生EC,但未能获得EC的稳定保持;靳小翠等(2010)针对影响马尾松幼胚EC诱导的采种期、基因型等因素,重点探讨了不同发育时期、不同基因型的马尾松幼胚EC诱导的情况,初步提出了马尾松幼胚诱导产生EC的较适宜球果采种期,并对获得的EC进行了稳定的保持和增殖培

养。在此基础上,本研究通过2008和2009年连续2年的试验,进行了15个不同球果采种期马尾松幼胚诱导EC的试验,了解幼胚的不同发育阶段对EC诱导的影响,并研究了球果冷藏时间,EC的保持和增殖条件,ABA在体细胞胚成熟中的作用,以及胚状体正常萌发为体胚苗的环境条件要求等,获得了马尾松幼胚体细胞胚胎发育的完整过程,即胚性愈伤组织诱导、保持与增殖、成熟体细胞胚的转化与成熟、体细胞胚胎萌发这四个阶段,这为利用马尾松体胚发育途径进行良种扩繁,工厂化育苗与马尾松遗传改良定向育种、基因工程遗传转化奠定了坚实的研究基础和技术平台。

## 材料与方法

### 1 材料

马尾松(*P. massoniana*)球果采自湖南长沙天际岭林场(湖南省研究生创新基地)6个马尾松自由授粉家系,定期采集15~20个球果备用。

### 2 采种期

2008和2009两个年度共采种15次。2008年:7月23日、7月31日、8月6日、8月15日、8月25日;2009年:4月15日、4月25日、5月5日、5月15日、5月30日、6月13日、6月28日、7月8日、7月23日、8月3日。

### 3 外植体处理

#### 3.1 外植体消毒与接种处理

马尾松球果采回后,先用75%酒精仔细擦洗球果表面,稍稍晾干后装于不封口的塑料袋中,放于4℃冰箱冷藏。接种处理前,拿出球果,置于流水中先冲洗2h;再在超净工作台上对球果表面进行消毒灭菌处理,75%酒精30s,无菌水冲洗3次,0.1% HgCl<sub>2</sub>灭菌10min,无菌水冲洗3~4次;随后在超净工作台上用灭菌的枝剪沿着种鳞裂开方向剥开,用无菌镊子取出种子,置于湿润的无菌培养皿中备用。接种时无菌剥除内、外种皮,把雌配子体(带胚乳的幼胚)置于诱导培养基上,对于那些还不能剥掉种皮的幼嫩种子,则连同种皮一起接种。以下所有试验设计中,基本培养基均采用LP培养基,每处理3皿,每皿接种4~5个幼胚,3次重复;其中,对6月13日这一个采种期的外植体,去掉胚乳,仅接种幼胚。

### 3.2 球果冷藏时间对幼胚胚性愈伤组织诱导的影响

对2008年7月23日、7月31日、8月6日和8月15日这4个不同采种期的马尾松幼胚, 设定球果4 °C冷藏1 d、15 d和30 d, 分3批次接种于同一激素处理的LP诱导培养基上, 统计EC诱导率和增殖倍数。

## 4 培养基和培养条件

### 4.1 胚性愈伤组织诱导培养基

诱导培养基为: LP+2,4-D (0.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup>)+6-BA (0.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup>)+NAA (0~0.8 mg·L<sup>-1</sup>)+KT (0~1.0 mg·L<sup>-1</sup>), 附加蔗糖10 g·L<sup>-1</sup>、L-谷氨酰胺450 mg·L<sup>-1</sup>、水解酪蛋白500 mg·L<sup>-1</sup>、肌醇1 000 mg·L<sup>-1</sup>、琼脂(>900 g·cm<sup>-2</sup>) 8.0 g·L<sup>-1</sup>, pH 5.8, 23~24 °C暗培养。

### 4.2 胚性愈伤组织保持和增殖培养基

胚性愈伤组织保持和增殖培养基与产生该EC的原诱导培养基相同。取诱导产生的新鲜的胚性愈伤组织, 每15~20 d转接1次, 24 °C暗培养。

### 4.3 胚状体分化成熟培养基

胚状体分化成熟培养基: LP培养基+肌醇(1 000 mg·L<sup>-1</sup>)+ABA, 其中ABA质量浓度分11个处理, 分别为0.0、2.0、5.0、7.0、15.0、25.0、32.0、40.0、45.0、50.0、55.0 mg·L<sup>-1</sup>; 另外添加蔗糖60 g·L<sup>-1</sup>、琼脂(>900 g·cm<sup>-2</sup>) 18.0 g·L<sup>-1</sup>、水解酪蛋白500 mg·L<sup>-1</sup>、L-谷氨酰胺450 mg·L<sup>-1</sup>, 调pH值5.8。把增殖培养的胚性愈伤组织, 先在液体培养基中悬浮分散, 然后通过布氏漏斗抽滤, 把胚性愈伤组织分散在滤纸上, 再置于分化培养基上24 °C暗培养12周左右。

### 4.4 体细胞胚萌发培养基

体细胞胚萌发培养基为成熟萌发LP培养基, 不添加任何激素, 附加蔗糖20 g·L<sup>-1</sup>和琼脂8.0 g·L<sup>-1</sup>, 调pH值5.8。挑取分化成型的马尾松胚状体, 平放在无激素萌发培养基上, 先暗培养10 d左右, 然后把培养皿呈45°斜放在培养架上, 漫射光培养, 进行成熟胚状体的伸长和萌发培养, 培养室温度24 °C。

## 5 数据统计

在愈伤组织诱导阶段: 从外植体接种处理的第2周开始, 直至12周的期间, 不时观察到有外植体被诱导产生愈伤组织, 分处理分细胞系逐一编

号。观察记录愈伤组织产生的时间、愈伤组织生长状况、形态、色泽等, 辨别其为胚性愈伤组织还是非胚性愈伤组织, 并对相关试验结果拍照, 12周后统计各处理的愈伤组织诱导率。愈伤组织增殖培养阶段: 每15~20 d转接继代1次, 仔细观察增殖培养EC的状态, 进行增殖培养潜力评价, 用增殖系数表示。增殖系数越大, 说明增殖培养生活力越强。体细胞胚转化与成熟培养阶段: 记录接种的胚性愈伤组织质量, 观察体细胞胚转化的形态形成过程, 记录成熟体细胞胚数量, 最后计算成熟体胚转化系数。获得的各处理及各重复的数据均利用SPSS 16.0软件进行方差分析、差异显著性检验。

## 实验结果

### 1 马尾松幼胚体细胞胚胎发生的过程

采用带胚乳的幼胚接种在含合适激素组合的诱导培养基上, 经胚性愈伤组织诱导、增殖, 胚状体分化与成熟、成熟体细胞胚萌发等环节, 顺利获得了马尾松幼胚体细胞胚胎发生完整过程。诱导产生的胚性愈伤组织呈白色、晶莹、粘性, 生活力强(图1-B、C); 而增殖培养的胚性愈伤则呈白色至淡黄色、晶莹、粘性, 同样也是生机勃勃(图1-E); 把进入分化培养的胚性愈伤组织分散、悬浮, 再经抽滤过程处理后, 连同滤纸置于分化培养基上进行胚状体诱导分化培养, 10~12周后, 在诱导分化培养基的滤纸上, 覆盖着厚厚一层白色、直立的纺锤形小棒状分化物, 即为分化为锥形的胚状体, 每一个培养皿内所分化出的胚状体数量多, 呈“爆发式”分化(图1-F); 其后拈出这些纺锤状胚状体继续培养, 数以百计的胚状体逐步分化, 发育成型, 出现可明显区分的胚芽与胚根两极(图1-G、H), 把这些胚状体置于萌发培养基上, 其胚根发育, 胚轴伸长, 子叶微张, 胚状体成熟萌发(图1-I), 这显示出马尾松体胚发生规模化扩繁的巨大潜力。对比图1-D和图1-E发现, 能正常增殖培养的胚性愈伤组织在短期内增殖表现突出, 愈伤组织蓬勃生长、体积急剧增大, 这进一步表明一旦诱导出胚性愈伤组织, 并建立了稳定增殖的胚性愈伤组织细胞系后, 该细胞系的增殖量和增殖速度都极为可观, 这也再次凸显了马尾松体胚发生

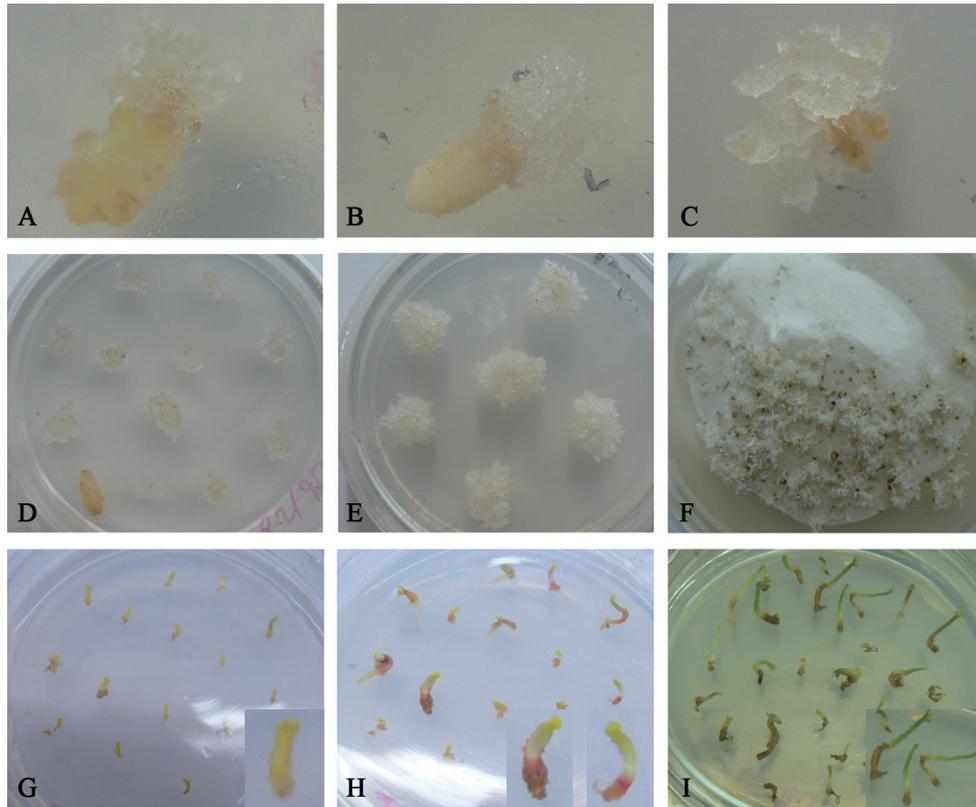


图1 马尾松幼胚体细胞胚胎发生过程

Fig.1 Somatic embryogenesis with immaturation embryos of *P. massoniana*

I: 马尾松幼胚胚性愈伤组织的诱导阶段(A~C), II: 胚性愈伤组织的增殖培养(D、E), III: 胚性愈伤组织的分化及体细胞胚成熟(F~H), IV: 成熟胚状体在无激素LP培养基上的萌发(I)。A: 难以增殖培养的胚性愈伤组织; B、C: 诱导出的良好的胚性愈伤组织; D: 刚刚继代增殖培养的胚性愈伤组织; E: 增殖培养2周后的胚性愈伤组织; F: 已分化出的雏形胚状体; G: 进一步分化成型的胚状体; H: 结构完整的胚状体(成熟体细胞胚); I: 成熟胚状体(体细胞胚)的正常萌发。

规模化扩繁的潜力所在。

## 2 不同发育阶段的幼胚胚性愈伤组织诱导状况

2008、2009两个年度内15个球果采集日期,能代表处于不同发育阶段的未成熟幼胚,对这些未成熟球果冷藏15 d,剥取带胚乳的幼胚,分别接种于激素组合不同的16个LP诱导培养基上,以同一采种期内同时在16个诱导培养基上产生的胚性愈伤组织总数占接种处理数的百分率来表征马尾松幼胚胚性愈伤组织的诱导率,在接种处理的2~12周的时段内,会陆续产生愈伤组织,分不同采种期观察记录产生愈伤组织的数量、色泽和质地,结合增殖培养状况,辨别其为胚性愈伤还是非胚性愈伤组织,所获得的试验数据统计结果如表1所示。

对表1中胚性愈伤组织诱导率的原始统计数据进行分析,进行SPSS 16.0方差分析、显著性检验,结果表

明,不同的采种期对胚性愈伤组织的诱导呈极显著性差异( $P < 0.001$ )。2008年以7月23日(9.66%)、7月31日(12.15%)采种诱导胚性愈伤组织质量好,增殖力强,增殖评价系数高(可达12.0以上);2009年4月中旬至8月上旬的10个采种期内,胚性愈伤组织的诱导率在4.76%~57.43%之间,但6月中旬以前的幼胚,胚性愈伤组织的诱导率尽管较高,但胚性愈伤组织的状态呈现晶亮、透明状(图1-A),这种胚性愈伤难以增殖保持,增殖评价为0.00。而增殖评价系数高的是6月28日、7月8日、7月23日这三个采种时期的幼胚,虽然诱导率仅在9.66%~22.59%之间,但增殖评价可达14以上,表现出增殖培养效果好,胚性愈伤组织质量好。这类胚性愈伤组织,均呈现晶莹的半透明白色、质地疏松、粘性湿润、团簇状从珠孔挤出,EC增殖生命力强(图1-B、C)。

从表1中幼胚污染死亡数一栏中发现,6月13

表1 马尾松球果不同采种期的幼胚诱导产生胚性愈伤组织状况

Table 1 Induction of SE in masson pine with different collection dates

采种年份	球果采集日期 (月-日)	接种幼胚 数/个	污染死亡 数/个	剩余粒 数/个	非胚性愈 伤数/个	胚性愈伤 数/个	胚性愈伤组 织诱导率/%	增殖系数
2008	7-23	360	8	352	183	34	9.66	14.00
	7-31	360	6	354	210	43	12.15	12.00
	8-6	360	7	353	190	30	8.49	6.00
	8-15	360	6	354	230	15	4.24	2.00
	8-25	360	12	348	156	3	0.86	0.00
2009	4-15	330	53	277	32	147	53.07	0.00
	4-25	296	87	209	64	97	46.41	0.00
	5-5	255	53	202	24	116	57.43	0.00
	5-15	148	58	90	32	37	41.11	0.00
	5-30	152	82	70	25	19	27.14	2.00
	6-13	215	152	63	0	3	4.76	6.00
	6-28	306	15	291	192	37	12.71	14.00
	7-8	370	69	301	230	68	22.59	15.00
	7-23	258	98	160	113	29	18.13	16.00
	8-3	174	47	157	86	23	14.65	10.00

日采种的幼胚死亡数偏高,得到了年度内最低诱导率4.76%。观察到已死亡的幼胚,均被剥除胚乳,即使有些被诱导产生了胚性愈伤,但量少,增殖培养困难,而同期接种雌配子体,有胚乳的幼胚死亡的很少。因此,采用带胚乳的幼胚接种,有利于马尾松体胚发育胚性愈伤组织的诱导。结合诱导率和增殖评价潜力,本研究得出6月下旬至7月下旬的马尾松幼胚比较适于诱导产生质量较好的、能稳定增殖培养的胚性愈伤组织。

### 3 不同的球果冷藏处理时间对马尾松幼胚胚性愈伤组织诱导的影响

不同采种期、不同冷藏处理球果的幼胚在LP诱导培养基中,胚性愈伤组织诱导和增殖的试验结果如表2所示。对诱导率和增殖系数用SPSS 16.0进行方差分析,差异显著性检验,发现,对诱导率而言,采种期对愈伤组织诱导呈显著性差异( $P=0.031$ ),不同冷藏处理也对幼胚胚性愈伤组织的诱导呈显著性差异( $P=0.012$ );对增殖系数的方差分

表2 不同采种期及冷藏时间处理的幼胚胚性愈伤组织诱导和增殖状况

Table 2 Induction and proliferation of SE in masson pine with different collection dates and cold treatments

采样期(月-日)	冷藏时间/d	重复1		重复2		重复3	
		诱导率/%	增殖系数	诱导率/%	增殖系数	诱导率/%	增殖系数
7-23	1	13.33	10.0*	0.00	0.0	16.67	10.0
	15	13.33	12.0	10.00	6.0	25.00	12.0
	30	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
7-31	1	8.33	20.0	8.33	6.0	8.33	8.0
	15	16.6	8.0	16.7	1.0	16.67	8.0
	30	8.33	3.0	8.33	5.0	0.00	0.0
8-6	1	8.33	5.0	0.00	0.0	0.00	0.0
	15	8.33	8.0	0.00	0.0	8.33	1.0
	30	0.00	0.0	0.00	0.0	8.33	1.0
8-15	1	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0
	15	8.33	4.0	0.00	0.0	0.00	0.0
	30	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0

\*表示胚性愈伤组织增殖倍数。

析表明, 采种期对胚性愈伤组织的增殖呈现极显著性差异( $P=0.001$ ), 而冷藏处理对增殖系数的方差分析差异不显著。从表2的直观分析结果表明, 冷藏15 d左右后的接种处理, 胚性愈伤组织的诱导率稍高, 增殖培养的状态也比较好, 增殖系数大, 而冷藏30 d后, 有两个采种期的幼胚几乎丧失了产生胚性愈伤组织的能力。增殖系数在4.0或4.0以下的胚性愈伤组织, 增殖培养中易出现褐化, 产生小黑点, 以至于完全死亡; 增殖系数在6.0或6.0以上的胚性愈伤组织, 能长期增殖培养, 褐化率比较低, 且数值越大, 表征其增殖速度越快。因此, 在本次试验的4个采种期中, 选择7月23日和7月31日采种能得到较好的诱导结果, 球果冷藏时间15 d左右后处理, 能一定程度地提高马尾松幼胚胚性愈伤组织诱导率和胚性愈伤的质量。

#### 4 马尾松胚性愈伤组织的保持和增殖

幼胚接种处理后2~12周期间, 可观察到部分外植体上从雌配子体的珠孔处产生胚性愈伤组织, 颜色质地呈现白色半透明、粘性、湿润、松软。把胚性愈伤组织及时切离雌配子体, 转接到与诱导培养基成分相同的新鲜增殖培养基中, 每15~20 d转接继代1次(图1-D)。体胚增殖力强的胚性愈伤组织, 在增殖培养过程中, 能一直保持湿润、粘性、乳白色和新鲜的增殖状态。仔细观察愈伤组织团, 能明显地看到新生长出的胚性愈伤凸出增生、结构蓬松、生长旺盛、且增殖速度快(图1-E)。其中有4个细胞系, 在50 d内增殖体积量达到60倍, 增殖系数大。体胚增殖力弱的胚性愈伤组织, 会逐步出现胚性愈伤的水渍化或变褐死亡的现象。水渍化即培养物表面呈水湿润润状, 随后愈伤组织逐渐消失死亡。来源于诱导培养基上2,4-D浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胚性愈伤组织比来源于 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胚性愈伤组织能更好地在增殖培养基上保持和生长。经过4~8周的增殖培养后, 得到的胚性愈伤组织呈大团状, 结构疏松, 颜色略显米黄色, 晶莹, 湿润(图1-E), 此时可转入分化培养基中进行胚状体分化培养。

#### 5 马尾松体细胞胚成熟转化

对3个增殖培养好的细胞系, 在进行胚状体成熟分化培养过程中分别进行了ABA浓度梯度试验。取适量增殖培养的愈伤组织, 经过洗涤、抽

滤处理, 定量接种于11个不同浓度ABA的LP成熟分化培养基中,  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗培养, 每隔20 d转接一次。在分化与成熟培养的过程中, 观察到分化培养的胚性愈伤可呈现三种表现: (1)外观表现为白色, 蓬松、毛绒状生长、增殖, 有的呈丝状向外伸展; (2)在培养皿内一直保持湿润的、晶亮的状态, 随着培养时间的延长, 缓慢的增殖; (3)胚性愈伤组织干枯死亡。分化培养3个月后, 观察到在滤纸上覆盖着厚厚一层白色、小纺锤形棒状物, 是为逐渐分化成型的雏形胚状体(图1-F), 拈出这些棒状物后继续培养, 胚状体逐渐分化发育成型, 出现胚芽、胚轴与胚根的完整胚状体结构(图1-G、H), 即为成熟体细胞胚。不同ABA浓度11个处理获得成熟体细胞胚的试验结果如表3所示。表3的试验结果表明, 在ABA浓度组成不同的分化培养基上, 胚性愈伤组织转化为成熟体细胞胚的能力不一样。其中以 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA的浓度处理效果较好, 单个培养皿内获得了244个成熟胚状体, 成熟转化系数高(103.82), 体细胞胚结构完整, 质量好, 有些ABA浓度处理中仅形成了2~3个畸形胚, 而 $40.0\sim 55.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的较高ABA浓度处理中成熟体细胞胚的数量为0。

#### 6 成熟体细胞胚的萌发培养

挑选经分化、成熟培养所产生的白色纺锤棒状颗粒的马尾松雏形胚状体, 转至与原分化培养基相同的LP培养基上继续分化培养,  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗培养, 10 d后, 观察到白色纺锤棒状颗粒的雏形胚状体的胚轴逐渐伸长, 出现上胚轴芽的顶端, 胚轴伸长,

表3 不同ABA浓度处理获得马尾松成熟体胚的情况

Table 3 Maturation somatic embryos of masson pine with different concentration of ABA

处理号	ABA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种量/g	成熟体 胚数/个	分化系数
1	0.0	1.08	0	0.00
2	2.0	2.35	163	69.36
3	5.0	2.34	244	103.82
4	7.0	2.33	207	88.84
5	15.0	2.36	38	16.10
6	25.0	2.37	0	0.00
7	32.0	2.36	12	5.08
8	40.0	2.34	0	0.00
9	45.0	2.85	0	0.00
10	50.0	2.93	0	0.00
11	55.0	2.76	0	0.00

红色根尖正常分化,白色胚根向下延伸(图1-G、H)。再把结构完整的成熟胚状体转入无激素LP培养基上,把培养皿倾斜45°夹角置于培养架上,设定光强为600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,漫射光培养,15 d后,胚根、胚轴和微张的子叶继续分化,胚状体逐渐由黄绿色变为绿色,体细胞胚萌发生长(图1-I)。体细胞胚萌发后长1~1.5 cm,胚状体的萌发率可达100%。继续培养1个月,可观察到针叶开张,胚轴伸长变为绿色,主根呈褐色,移栽于广口瓶内生长为完整的小植株。

## 讨 论

针叶树种属于离体培养的顽拗型植物,而松属树种体细胞胚胎发生又比其他针叶树更难(Bonga等2010)。不同的针叶树种、甚至同一树种的不同母树基因型,其胚性愈伤组织诱导及体胚成熟转化都会有其特殊性(MacKay等2006; Niskanen等2004)。自黄健秋等(1995)首次报道马尾松体细胞胚胎发生植株再生以来,对马尾松体胚发育途径的植株再生一直鲜有成功的报道。而作为中国南方分布面积最大的人工造林松属树种马尾松,加速其良种扩繁的体细胞胚胎发生技术探讨和研究一直在进行(靳小翠等2010; 杨艳等2007),本试验中得到马尾松幼胚体胚发生的典型发育过程的结果表明,长期以来一直困扰马尾松胚性愈伤组织增殖,胚状体转化的瓶颈被攻破,这既对马尾松遗传改良定向育种提供了胚状体受体细胞操作平台,又为马尾松良种规模化扩繁体系的建立提供了一个成功的案例,研究成果具有极其深远的应用和基础研究价值。

胚性愈伤组织(EC)的诱导是建立其体胚发育体系的基础和前提,松属树种胚性愈伤组织诱导率常常比较低,本研究中获得马尾松胚性愈伤诱导率在0.86%~57.43%之间,但有些胚性愈伤组织色泽晶亮,随后难以得到继续保持和增殖(图1-A),而能增殖培养的胚性愈伤(图1-B、C)诱导率仅在8.49%~22.59%。Park等(2006)连续3年联合三个实验室同期对四种松树进行试验,在选择那些对胚性愈伤诱导比较敏感的基因型基础上,得到EC诱导的最好结果分别是:北美短叶松(*Pinus banksiana* Lamb.)为3.9%、北美乔松(*Pinus strobus*

L.)为54.6%、海岸松(*Pinus pinaster* Ait.)为76.2%、欧洲赤松(*Pinus sylvestris* L.)为19.7%,这也进一步说明,松属树种比其他针叶树种的体胚发生困难。大量的研究表明,在松属树种中,只有处于某一个发育阶段(又被称为“窗口期”)的幼胚才对诱导胚性愈伤组织的反应比较敏感(MacKay等2006)。Becwar等(1990)研究表明,松属树种子叶前期的合子胚有利于EC的诱导。比较北美乔松(*P. strobus*) (Klimaszewska等2001)、意大利石松(*Pinus pinea* L.) (Carneros等2009)、北美短叶松(*P. banksiana*)、海岸松(*P. pinaster*)、欧洲赤松(*P. sylvestris*) (Park等2006)等幼胚诱导胚性愈伤组织的球果采种期,发现处于6月下旬至7月上旬的幼胚为以上松属树种诱导EC的敏感期;对意大利石松(*P. pinea*)不同采种期诱导EC的同时,进行不同采种期合子胚发育进程细胞学观察的结果表明,处于子叶前期的合子胚的确对EC的诱导最为敏感(Carneros等2009),且不同的母树基因型其最适的采种期有时间前后的推移;本研究中得出6月下旬至7月下旬的马尾松幼胚为EC诱导的适宜期,这既与以上松属树种诱导EC的最佳采种期得到的结论一致,也可能此期为马尾松合子胚发育进程中的子叶前期,以后将可从马尾松合子胚发育的细胞形态学特征与胚性愈伤诱导相关关系方面进一步深入研究。本研究的球果冷藏试验结果表明,马尾松球果冷藏处理15 d,有利于马尾松胚性愈伤组织的诱导。申晓辉等(2005)在红松(*Pinus koraiensis* Siebold & Zucc.)中也报道冷藏处理能提高胚性愈伤组织的诱导率;Häggman等(1999)在欧洲赤松(*P. sylvestris*)球果被冷藏14、28、60 d的处理中,发现不同的冷藏时间对胚性愈伤的诱导没有显著性差异。这与本研究结果不太一致,可能不同的树种有其特殊性。而冷藏处理球果有利于幼胚胚性愈伤组织诱导的结论也为能在一个较长的时间内接种处理幼胚提供了时段上的便利。

本研究在诱导和增殖阶段,分别使用了2,4-D、6-BA、KT、NAA等激素,这些也是在针叶树体胚发生中常用的激素类型。不是所有被诱导产生的EC都能得到良好的增殖,但来源于0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2,4-D较低浓度处理的胚性愈伤组织,增殖培养状态好,增殖评价系数可在10.0以上,而来源于2.0

mg·L<sup>-1</sup>的2,4-D的胚性愈伤组织,虽然在诱导初期能获得大团状胚性愈伤,但随后的增殖培养比较困难,容易水滞化。这与其他研究中提出,在体胚诱导初期,需要较高浓度的2,4-D处理,而在增殖培养中需要降低2,4-D浓度才能获得正常增殖和分化的胚性愈伤组织的研究结论一致(Klimaszewska等2007)。而对那些能获得良好增殖的胚性愈伤组织,外观颜色呈现淡黄色,增殖培养1~2个月后,有的愈伤组织会出现一些黑点,此时,应适时进入下一步的分化培养阶段,因此,为提高胚性愈伤的增殖倍数,如何延长增殖培养时间以及如何促进和提高增殖培养的倍数,则是其后的研究需要进一步深入的研究课题。

种子发育生物学的研究表明,成熟脱水是种子发育的末端事件,渗透胁迫和脱水环境有利于合子胚的发育、成熟与萌发(Chen和Arora 2011; 宋松泉等2008)。在本研究马尾松幼胚体胚发育的不同阶段,人为调整了培养基中的蔗糖和琼脂浓度,如蔗糖从诱导培养过程中的10.0 g·L<sup>-1</sup>增加到成熟培养基中的60.0 g·L<sup>-1</sup>,琼脂也从诱导阶段的8.0 g·L<sup>-1</sup>增加到分化成熟时的18.0 g·L<sup>-1</sup>,结合生理浓度的ABA在植物组织培养体细胞胚成熟中发挥的关键作用(Rai等2011),人为构建胚状体发育所需的渗透胁迫及脱水环境,获得了马尾松人工胚状体的转化和成熟。Lelu-Walter等(2008)在研究促进欧洲赤松(*P. sylvestris*)胚状体成熟的研究中发现,ABA浓度分别为80 μmol·L<sup>-1</sup>和120 μmol·L<sup>-1</sup>的处理,当蔗糖浓度从0.1 mol·L<sup>-1</sup>提高到0.2 mol·L<sup>-1</sup>时,在两种不同ABA浓度处理上获得的成熟胚状体数量分别由差异不显著变为差异显著,且蔗糖浓度为0.2 mol·L<sup>-1</sup>时,ABA浓度为80 μmol·L<sup>-1</sup>的处理所得到的成熟胚状体数量是120 μmol·L<sup>-1</sup>处理时的1.4倍,这说明提高蔗糖浓度对欧洲赤松(*P. sylvestris*)体胚成熟有促进作用。Stasolla等(2002)的研究也表明,ABA与渗透压调节剂PEG的配合使用,能极大地促进针叶树胚状体的分化与成熟。本研究中添加浓度为5.0 mg·L<sup>-1</sup>的ABA和60.0 g·L<sup>-1</sup>的蔗糖,同时琼脂用量达到18.0 g·L<sup>-1</sup>的较高的培养基硬度,成功获得了马尾松幼胚SE途径的成熟分化的胚状体,在此,蔗糖既是作为碳源,又作为一种渗透压调节剂在起作用,而通过琼脂浓度高低的调节可

对培养基中的水分及营养的可利用性加以控制,从而使培养基能对胚状体的成熟转化形成一种生理胁迫环境,这与Klimaszewska等(2000)通过提高培养基中碳水化合物浓度和培养基硬度,促进北美乔松(*P. strobus*)胚状体的成熟和体胚质量提高所采用的措施相似。

## 参考文献

- 丁贵杰,周志春,王章荣,谌红辉,温佐吾,周运超,季孔庶,夏玉芳,杨章旗,王鹏程等(2006). 马尾松纸浆用材林培育与利用. 北京: 中国林业出版社, 1~10
- 黄健秋,卫志明,许智宏(1995). 马尾松成熟合子胚的体细胞胚胎发生和植株再生. 植物学报, 37 (4): 289~294
- 季孔庶,王章荣,陈天华,王明麻(1999). 马尾松扦插繁殖年龄效应及继代扦插复壮效果. 浙江林学院学报, 16 (4): 341~345
- 靳小翠,李志辉,杨模华,张冬林,丁贵杰(2010). 马尾松幼胚培养胚性愈伤组织诱导的研究. 中南林业科技大学学报, 30 (4): 80~84
- 申晓辉,蒋湘宁, Park YS, Mahedrapa MK (2005). 红松体细胞胚胎培养技术体系的建立. 成都大学学报, 24 (1): 11~14
- 宋松泉,程红焱,姜孝成(2008). 种子生物学. 北京: 科学出版社, 85~88
- 杨艳,李志辉,丁贵杰,杨模华,唐效蓉(2007). 马尾松幼胚培养愈伤组织诱导的初步研究. 湖南环境生物职业技术学院学报, 13 (1): 6~9
- 张宇,卫志明,席梦利,施季森(2006). 马尾松高效再生体系的建立(简报). 分子细胞生物学报, 39 (3): 271~275
- Becwar MR, Nagmani R, Wann SR (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). Can J For Res, 20: 810~817
- Bonga JM, Klimaszewska KK, Aderkas PV (2010). Recalcitrance in clonal Propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tiss Org Cult, 100: 241~254
- Carneros E, Celestino C, Klimaszewska K, Toribio M, Park YS, Bonga JM (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult, 98: 165~178
- Chen K, Arora R (2011). Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in spinach (*Spinacia oleracea*). Plant Sci, 180: 212~220
- Häggman H, Jokela A, Krajinakova J, Kauppi A, Niemi K, Aronen T (1999). Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. J Exp Bot, 50 (341): 1769~1778
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr DR, Sutton BCS (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. In Vitro Cell Dev-PL, 36: 279~286

- Klimaszewska K, Park YS, Overton C, MacEacheron I, Bonga JM (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. In *Vitro Cell Dev-PL*, 37: 392~399
- Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Lelu-Walter MA (2007). Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree For Sci Biotech*, 1: 11~25
- Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2008). Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* L. through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 92: 31~45
- MacKay JJ, Becwar MR, Park YS, Corderro JP, Pullman GS (2006). Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genet Genomes* 2: 1~9
- Niskanen AM, Lu J, Seitz S, Keinonen K, von Weissenberg K, Pappinen A (2004). Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiol*, 24: 1259~1265
- Park YS (2004). Commercial implementation of multi-varietal forestry using conifer somatic embryogenesis. In: Proc. IUFRO joint Conf. of Div. 2 (ed). *Forest Genetics and Tree Breeding in the Age of Genomics: Progress and Future*. Charleston, SC. 139
- Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 86: 87~101
- Rai MK, Shekhawat NS, Harish, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K, Jaiswal U (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 106 (2): 179~190
- Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev-PL*, 38: 93~105
- Trontin JF, Walter C, Klimaszewska K, Park YS, Lelu-Walter MA (2007). Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. *Transgenic Plant J*, 1: 314~329
- Zhu LH, Wu XQ, Qu HY, Ji J, Ye JR (2010). Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 102:121~128