

蔗糖与肌醇对马尾松胚性细胞系增殖的影响

史昆^{1,2}, 杨模华^{1,2,*}, 李志辉², 张冬林^{2,3}, 丁贵杰⁴

中南林业科技大学¹林业生物技术湖南省重点实验室, ²林学院, 长沙410004; ³乔治亚大学, 美国乔治亚州30602; ⁴贵州大学林学院, 贵阳550000

摘要: 针对马尾松胚性细胞系增殖困难的问题, 本研究设定了2因素3水平的处理, 分析了增殖培养基中蔗糖与肌醇对马尾松胚性细胞系增殖的影响。研究表明, 胚性培养物的增殖倍数在9个处理间存在极显著性差异($P < 0.01$), 并初步选出马尾松胚性细胞系增殖倍数较高的3个培养基: 5号(蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +肌醇 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、7号(蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +肌醇 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和8号(蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +肌醇 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。胚性细胞在以上3个培养基具有不同分化发育反应, 其中培养基5号中, 培养基胚性细胞发育较慢; 培养基7号中, 胚性细胞发育较快且能形成具有完整结构的正常早期体细胞胚; 在培养基8号中, 胚性细胞易分化形成结构不完整、形态不正常的早期体细胞胚。综合考虑胚性细胞系增殖倍数与胚性细胞分化发育两方面的因素, 在增殖培养基中添加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和肌醇 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组合更适合马尾松胚性细胞系的增殖。

关键词: 马尾松; 胚性细胞系; 蔗糖; 肌醇; 增殖

Effects of Sucrose and Myo-Inositol on Proliferation of Embryonic Cell Lines in *Pinus massoniana*

SHI Kun^{1,2}, YANG Mo-Hua^{1,2,*}, LI Zhi-Hui², ZHANG Dong-Lin^{2,3}, DING Gui-Jie⁴

¹Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, ²College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; ³University of Georgia, GA 30602, USA; ⁴College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550000, China

Abstract: To address the reduction of embryonic cultures activity in masson pine (*Pinus massoniana*), three concentrations of sucrose and myo-inositol were applied in proliferation media with complete random design. The results indicated that proliferation rate had significantly difference among nine treatments ($P < 0.01$). Proliferation rates of three combinations of sucrose and myo-inositol were significantly higher than those of other combinations. Within the three media, the fifth (sucrose $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +myo-inositol $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), the seventh (sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +myo-inositol $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), and the eighth (sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +myo-inositol $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), embryonic cells development was the slowest in the fifth media. Well developed embryonic cells and the normal somatic embryos were found in the seventh media. In the eighth media, the structure and morphology of early somatic embryos were abnormal and uncompleted. The media of sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +myo-inositol $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ should be the most suitable for proliferation of embryonic cell lines in masson pine somatic embryogenesis.

Key words: masson pine (*Pinus massoniana*); embryonic cell lines; sucrose; myo-inositol; proliferation

马尾松属松科松属, 是我国南方亚热带地区分布面积最广的先锋造林树种, 它具有耐干旱瘠薄、适应性强, 纤维优良, 速生丰产等优点, 是我国南方地区最重要的绿化造林树种之一, 兼具木材、松脂等林产品收益, 经济价值高(丁贵杰等2006)。当前在马尾松的良种快速繁殖方面, 一是马尾松种子园种子产量低, 良种供应不足; 二是扦插繁殖比较困难并有明显的年龄效应(季孔庶等1999); 三是已有报道的马尾松快繁体系稳定性及效率较低(张宇2003; Zhu等2010; 杨模华等2011a), 因此, 其推广应用依旧存在诸多技术难题。自

Hakman等(1985)成功报道挪威云杉(*Picea abies*)体细胞胚胎发生植株再生以来, 近30年, 针叶树体细胞胚胎发生研究取得了较快的发展(唐巍等1997; Park等2006; Montalban等2012)。尤其是辐射松(*Pinus radiata*) (Hargreaves等2002)和海岸松(*Pinus pinaster*) (Klimaszewska等2007)的体胚苗已经应用

收稿 2013-12-13 修定 2014-04-01

资助 “十二五”国家“863”重点项目(2011AA100203)、国家自然科学基金青年项目(31200481)、湖南省自然科学基金(11JJ-3038)和教育部博士点基金博导类联合资助项目(2010-4321110002)。

* 通讯作者(E-mail: ymh163@163.com; Tel: 13875885952)。

于高效无性系人工林的营建。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,很多学者进行了相关研究,并陆续取得了一些新的进展(张宇2003;杨艳等2007;靳小翠等2010;杨模华等2011b)。但在马尾松体细胞胚胎发生的研究中仍存在很多关键技术问题,如胚性细胞系诱导率低、胚性细胞系增殖困难、体细胞胚成熟分化困难等。在马尾松胚性细胞系长期的继代过程中,如何既提高胚性细胞系的增殖倍数,又使其保持良好的体细胞胚成熟分化能力是研究者们共同面临的一个难题。

本研究组在前期的研究过程中发现,马尾松胚性细胞系在增殖培养过程中,胚性细胞易变形,导致组织降解。同样的现象也发生在落叶松体胚发生过程中,通过将培养物及时转接至合适的增殖培养基中,可以使胚性培养物恢复,保持正常生长(齐力旺2000)。增殖培养基中,蔗糖和肌醇作为针叶树体细胞胚胎发生中常用的渗透剂和营养成分,在培养基中除了作为碳源外,它们的合成与分解也会影响细胞及溶液的渗透势,从而影响细胞对于营养和水分的吸收。在针叶树体胚发生中关于蔗糖与肌醇影响胚性细胞系增殖的报道较少,红松(*Pinus koraiensis*)组织培养研究结果表明,不同的蔗糖浓度对红松愈伤组织的增殖和保持能力不同,在3%的蔗糖浓度时愈伤组织增殖比较稳定(曹焱2009)。刘宝光等(2010)对红皮云杉(*Picea koraiensis*)胚性愈伤组织保持与增殖的研究表明,适当提高肌醇的质量浓度有利于胚性愈伤组织的增殖(以5 g·L⁻¹为宜)。目前关于蔗糖与肌醇对马尾松胚性细胞系增殖方面的研究还尚未见报道。

本研究利用马尾松未成熟合子胚诱导产生的胚性细胞系为材料,通过测定胚性培养物的增殖倍数,结合显微照相技术观察和判断胚性细胞的分化能力,探讨增殖培养基中蔗糖与肌醇的浓度对马尾松胚性细胞系增殖的影响。旨在保障胚性细胞系的稳定增殖,建立完整稳定的马尾松体细胞胚胎发生体系,为马尾松优良无性系规模化扩繁提供技术支持。

材料与amp;方法

1 试验材料

2011~2012年分别在湖南省长沙市郊区与安

化县马尾松种子园采集自由授粉的马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)未成熟球果,剥取其未成熟合子胚为外植体诱导产生的胚性细胞系为材料。

1.1 外植体的处理

马尾松球果采回后,放于4℃冰箱冷藏1周。实验前,将球果置于流水中冲洗2 h,再在超净工作台中进行球果表面消毒。75%酒精处理30 s后无菌水冲洗3次;0.1% HgCl₂处理10 min后无菌水冲洗4次;随后用无菌枝剪剥开球果,并用无菌镊子取出种子置于湿润的无菌培养皿中备用。接种时剥除种子的内、外种皮,将包含未成熟合子胚的雌配子体整体置于诱导培养基上。

1.2 胚性细胞系诱导培养基及培养条件

诱导培养基采用改良Litvay's培养基(Careros等2009),即Litvay's基本培养基(Litvay等1985)附加蔗糖10 g·L⁻¹、L-谷氨酰胺500 mg·L⁻¹、水解酪蛋白500 mg·L⁻¹、肌醇0.1 g·L⁻¹和琼脂(>900 g·m⁻²) 10.0 g·L⁻¹,生长调节剂为1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA,高温灭菌前将培养基pH调至5.8, (23±1)℃暗培养。在接种6周后陆续产生胚性培养物。2011年试验用胚性细胞系标记为1-4-1,2012年试验用胚性细胞系标记为2-3-1和3-3-1。

2 胚性细胞系的保持和增殖培养

2.1 胚性细胞系在诱导培养基中增殖

以2011年诱导的胚性细胞系1-4-1为材料,基本培养基与诱导培养基基本成分相同,生长调节物质改为0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA。每15~20 d转接1次, (23±1)℃暗培养。

2.2 增殖培养基中蔗糖与肌醇浓度的初选

以在2.1节中继代培养5次后,已经初步显示出生长衰弱现象的胚性培养物为材料,采用蔗糖与肌醇二因素三水平完全随机试验设计(表1),共9个处理,每处理8个重复, (23±1)℃暗培养。15 d后,统计胚性培养物的生长状态,测定胚性培养物增

表1 二因素三水平完全随机设计表

Table 1 Complete random design for two factors and three levels

水平	蔗糖浓度/g·L ⁻¹	肌醇浓度/g·L ⁻¹
1	10.0	0.1
2	20.0	1.0
3	30.0	5.0

殖倍数(增殖前后胚性培养物体积比), 并对增殖倍数利用SPSS 17.0进行单因素以及双因素方差分析。由于诱导培养基中蔗糖浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 肌醇浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此在该实验中, 蔗糖浓度 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇浓度 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合被视为实验对照组。

2.3 最佳蔗糖与肌醇浓度的确定

以2012年诱导的生长状态良好且基本一致的胚性细胞系2-3-1和3-3-1为材料, 并以2.2节中优选的3个处理作为增殖培养基处理, 每处理8个重复, (23 ± 1) °C暗培养。15 d后统计胚性培养物增殖倍数, 利用SPSS 17.0进行方差分析和多重比较。

对2个胚性细胞系2-3-1和3-3-1进行细胞显微观察, 判断细胞分化能力情况。细胞显微观察采用临时压片法进行实时观察, 具体方法如下: 首先在载玻片上滴一滴蒸馏水, 用尖头镊挑取小部分胚性愈伤并置于蒸馏水中, 盖上盖玻片, 尽可能将其压薄, 无需染色, 然后放置于电子显微镜下记录细胞状态。

实验结果

1 胚性细胞系1-4-1在诱导培养基上的保持与增殖

如图1所示, 胚性细胞系1-4-1在诱导培养基增殖过程中, 随着继代次数的增加, 胚性培养物增殖较明显, 从最初的微黄色逐渐变为白色半透明且松散的状态。在第5次继代时增殖能力明显衰退, 胚性培养物从白色、松散状开始变黄, 此时在胚性培养物底部有细胞液渗透呈水浸状, 尽管其表面有少许白色新鲜组织产生, 但整体增殖活力不足。

2 蔗糖与肌醇对胚性细胞系增殖倍数的影响

将出现生长衰弱的胚性培养物转接到不同蔗糖与肌醇浓度的增殖培养基中, 结果(表2)表明, 蔗糖和肌醇以及二者之间的互作对马尾松胚性细胞系增殖倍数均有极显著性影响($P<0.01$); 各个处理

表2 蔗糖与肌醇对胚性细胞系增殖的影响

Table 2 Effects of sucrose and myo-inositol on embryogenic callus proliferation

培养基	蔗糖浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	肌醇浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	平均增殖倍数
1	10	0.1	1.4699 ± 0.3637^c
2	10	1.0	1.7730 ± 0.1139^{bc}
3	10	5.0	1.7704 ± 0.1043^{bc}
4	20	0.1	1.4849 ± 0.0541^c
5	20	1.0	2.1436 ± 0.1599^{ab}
6	20	5.0	1.5295 ± 0.4762^c
7	30	0.1	2.4231 ± 0.2133^a
8	30	1.0	2.1709 ± 0.1778^{ab}
9	30	5.0	1.8326 ± 0.1213^{bc}

数据后的不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)。

间增殖倍数具有显著性差异($P<0.05$)。由表2可以看出, 培养基7号(蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)中胚性细胞系增殖倍数最高。蔗糖浓度为10或 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的同一水平下, 肌醇为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖倍数较高, 增加或降低肌醇浓度其增殖倍数均下降。当蔗糖浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着肌醇浓度从 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 增殖倍数逐渐降低。当肌醇浓度为 0.1 或 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的同一水平下, 增殖倍数随蔗糖浓度的增加而升高。当肌醇浓度为 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随蔗糖浓度的增加, 其增殖倍数先降低又升高。

在这9个处理中, 其中3个处理的增殖倍数较高, 分别为2.1436、2.4231、2.1709, 且之间无显著性差异, 由此初选出培养基5号(蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、培养基7号(蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和培养基8号(蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2012年将生长状态良好且一致的2个胚性细胞系接种于初选出的3个处理中。实验结果(表3)显示, 2个胚性细胞系均能在3个处理中稳定增殖, 综合分析2个胚性细胞系的增殖倍数, 3个处理间无显著性差异。与2011年胚性培养物增殖试验得到

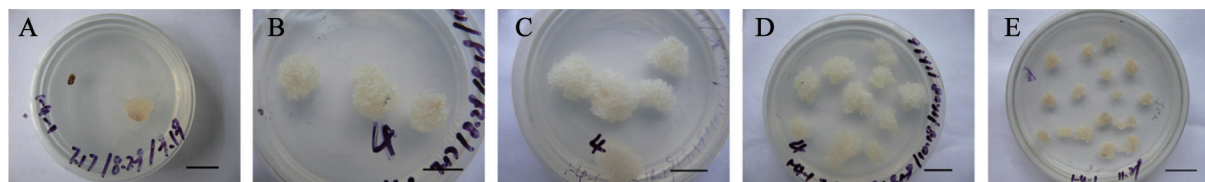


图1 胚性细胞系1-4-1在诱导培养基中的增殖

Fig.1 Proliferation of embryogenic cell line 1-4-1 on the initiation media

A~E: 马尾松胚性细胞系1-4-1第1~5次增殖后胚性培养物的状态。图中培养皿直径均为6 cm, 所有标尺均表示1 cm。

的增殖倍数(表2)相比,增殖倍数明显增大,其中细胞系2-3-1最大增殖倍数可达4.677倍(表3)。这说明优选的3个培养基均能使马尾松胚性细胞系稳定增殖,但对于胚性细胞的分化还需要通过显微观察鉴定,旨在选出既有利于增殖,又能较好地促进马尾松胚性细胞分化发育的蔗糖与肌醇组合。

表3 2个胚性细胞系在不同培养基中的增殖
Table 3 Proliferation of two embryogenic cell lines on different media

培养基	蔗糖浓度/ 肌醇浓度/ g·L ⁻¹		平均增殖倍数	
	g·L ⁻¹	g·L ⁻¹	2-3-1	3-3-1
5	20	1.0	4.263±0.295	2.965±0.103
7	30	0.1	4.416±0.227	3.651±0.293
8	30	1.0	4.677±0.279	3.512±0.254

3 蔗糖与肌醇对胚性细胞分化能力的影响

针叶树体胚发生过程中,正常的胚性细胞在增殖过程中通过不均等分裂为两种类型的细胞,高度液泡化的长形胚柄细胞和有浓密细胞质的圆形分生组织细胞,二者形成极性结构并聚合为胚性胚柄细胞团(proembryogenic masses, PEMs)。PEMs主要有3个阶段:原胚团I (PEMI)、原胚团II (PEMII)和原胚团III (PEMIII) (Filonova等2000)。

在马尾松胚性细胞系增殖过程中,也观察到PEMs的3个阶段(图2),其PEMI是由较小的分生组织细胞团与分裂产生的单个胚柄细胞形成一种极性聚合物(图2-A);通过持续的不断分裂,胚柄细胞增加,并逐渐形成具有明显轮廓的极性结构PEMII(图2-B和C);细胞继续增殖分裂,随着细胞数的增加,胚性细胞团结构的极性逐渐消失,此时进入PEMIII期,并从PEMIII上分化形成早期体细胞胚(somatic embryos, SE) (图2-D和E)。正常的早期SE结构一般由球状聚合的胚团(embryonal mass, EM)、包被在胚团周围的类表皮原层(proderm-like layer, PD)、长形胚管细胞(embryonal tube cells, ET)和高度液泡化的胚柄细胞(suspensor, S)这4个部分构成,这4个部分呈束状紧密排列在一起形成子弹头状的早期SE (Filonova等2000)。正常的增殖状态好的胚性培养物,呈白色半透明、松软且具有粘性,在其表面具有大量的丝状突起,当有早期体细胞

胚分化时,表面有乳突状突起结构(图2-F)。

从图3中可以看出,在培养基5号中,胚性培养物呈松软水浸状,表面丝状突起较少,表明此时培养物生长不旺盛,早期体细胞胚还未完全形成。在培养基7号中,胚性培养物质地松软且具有粘性,但不呈水浸状,表面有大量丝状突起和乳头状突起,这表明此时胚性培养物增殖状态好,并且有大量早期体细胞胚形成。在培养基8号中,胚性培养物质地相对较硬且无粘性,丝状突起较少,但有大量乳头状突起,表明已形成了大量的早期体细胞胚,但由于渗透压较高,胚性培养物出现了失水现象,使其变硬且无粘性。

其中图3-D显示培养物仍处于PEMI、PEMII阶段,主要是由与图2-A~C中相似的结构组成,有部分早期SE还未完全形成。图3-E显示培养物已处于PEMIII阶段,并有与图2-D和E中相似的正常的早期SE从PEMIII表面分化成形且数量较多。图3-F显示的是一个早期SE,将其与图2-E中正常早期SE的结构相比较,该结构无PD层或PD层不明显,胚头顶端不圆滑,呈三角形尖头状,在后期的成熟培养中不易分化形成子叶,以致难以萌发形成正常的体胚苗。

在胚性细胞分化方面,2个胚性细胞系2-3-1和3-3-1对于3个处理的反应一致,即同一个细胞系在培养基5号中发育较慢;在培养基7号中,培养物处于PEMIII阶段,并有大量正常的早期SE形成;在培养基8号中,培养物处于PEMIII阶段,但形成的大多数早期SE在结构和形状上与正常的早期SE差异较大。因此,综合考虑胚性细胞系增殖倍数和胚性细胞分化发育两方面的情况,增殖培养基中添加蔗糖30 g·L⁻¹和肌醇0.1 g·L⁻¹的处理更适合马尾松胚性细胞系增殖和胚性保持。

讨 论

在前期的研究中发现马尾松胚性细胞系在诱导培养基中継代培养,胚性培养物总会生长衰弱现象。因此,探讨合适的継代培养条件对维持马尾松胚性细胞系持续增殖并保持其胚性,对建立稳定的马尾松体胚发生体系具有重要意义。

糖类的合成与分解影响细胞及培养基的渗透势,从而影响养分的运输。作为一种常用的糖类,

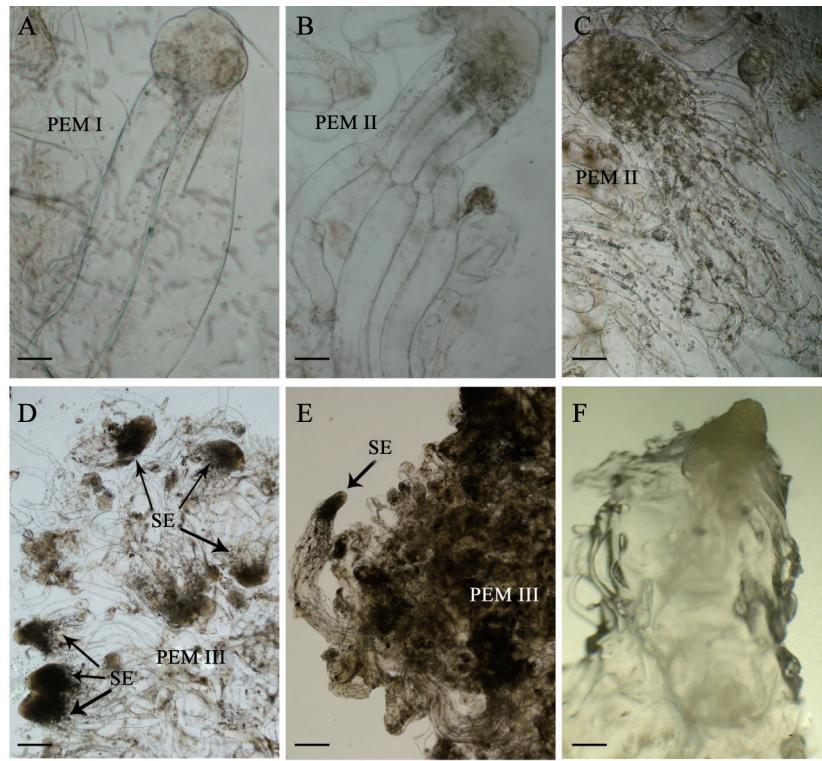


图2 马尾松的胚性细胞增殖发育

Fig.2 Development of masson pine embryogenic cells in proliferation

A: PEM I结构, 标尺100 μm ; B、C: PEM II结构, 标尺100 μm ; D、E: PEM III结构以及从PEM III表面形成的早期体细胞胚结构, 标尺200 μm ; F: 胚性培养物表面的乳头状突起结构, 标尺0.5 mm。

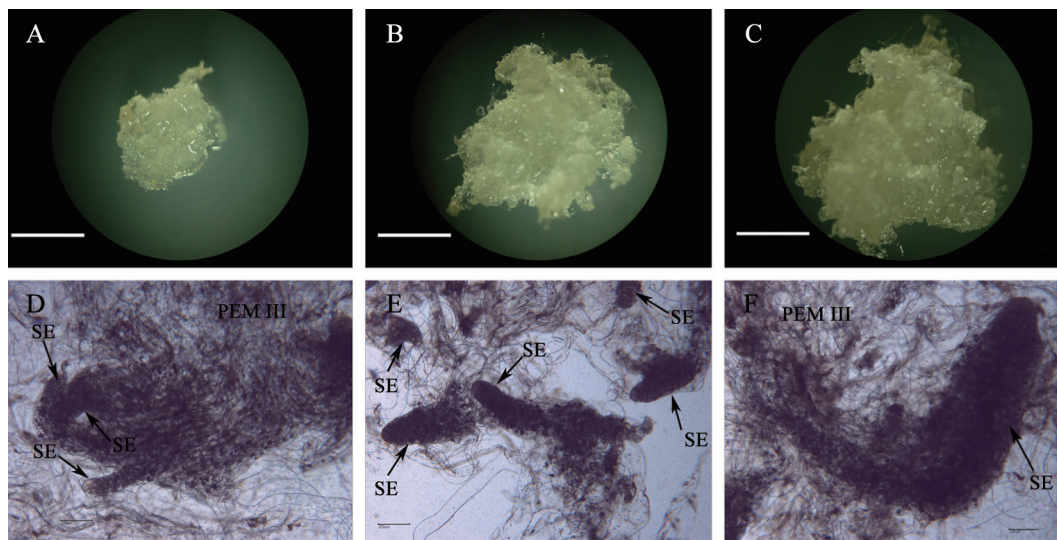


图3 不同处理下胚性培养物表现及其细胞分化状态

Fig.3 Appearances of embryonic cultures and differentiation of embryogenic cells under different treatments

A、D: 培养基5号下马尾松胚性培养物体视显微照片及细胞结构显微照; B、E: 培养基7号下马尾松胚性培养物体视显微照片及细胞结构显微照; C、F: 培养基8号下马尾松胚性培养物体视显微照片及细胞结构显微照。A、B和C中标尺表示1 cm, D、E和F中标尺表示200 μm 。SE: 体细胞胚(somatic embryo)。

蔗糖对白云杉和黑云杉、北美乔松以及挪威云杉胚性培养物增殖阶段影响的研究结果一致表明,水解蔗糖产生的己糖对胚性培养物的快速生长是必需的(Iraqi和Tremblay 2001; 范建芝2007; Konrádová等2002)。在白云杉和黑云杉胚性培养物增殖的研究中发现,在整个增殖阶段,高比率的己糖/蔗糖和高的蔗糖转化酶活性与细胞活跃的生长代谢相一致(Iraqi和Tremblay 2001)。蔗糖主要是由转化酶催化蔗糖分解为果糖与葡萄糖而被细胞吸收利用,该过程是不可逆的,较高浓度的外源蔗糖可以有效促进蔗糖转化酶的活性,使得细胞内有较高浓度的己糖,从而促进细胞的活跃生长,在本研究中也发现,马尾松胚性细胞系的增殖倍数随蔗糖浓度的增加而增加。

在红皮云杉的胚性愈伤组织的增殖过程中发现,适当提高肌醇的质量浓度有利于胚性愈伤组织的增殖率和增殖量,且 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,红皮云杉胚性愈伤组织增殖量最大,降低或增加肌醇浓度,胚性愈伤组织增殖量均会下降(刘宝光等2010)。与其结果一致,本研究发现肌醇对马尾松胚性培养物增殖的影响明显,在浓度较低的蔗糖水平下,肌醇在 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与肌醇 0.1 和 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比,胚性细胞系增殖倍数最高,说明在增殖培养基中肌醇浓度一定要适中,过高或过低都会影响胚性培养物的生长。但当蔗糖浓度为 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,增加肌醇浓度反而使得增殖倍数降低,且在最低的肌醇浓度 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,增殖倍数最高。这是由于蔗糖同样是调节渗透压的重要物质,当蔗糖浓度较高时,培养基本身渗透压较高,再添加高浓度的肌醇会使总体渗透压大大提高,过高的渗透压对马尾松胚性细胞系增殖也不利。

增殖阶段培养环境对胚性培养物的分化十分关键(Yeung 1995),合适的增殖培养基对早期体细胞胚胚头组织的正常分化有重要意义,并可以缩短体细胞胚的成熟时间(Stasolla和Yeung 2003)。针叶树体细胞胚胎发生增殖阶段随着培养基渗透压的增加,早期体细胞胚的数量也增加(Gupta和Pullman 1995)。挪威云杉体细胞胚胎发生发育过程的研究表明,不同发育阶段的PEMs对ABA的反应不同,PEMI和PEMII期的培养物在ABA的作用下会逐渐衰亡,只有处于PEMIII期的培养物在

ABA的作用下会继续分化形成体细胞胚,不正常的早期体细胞胚在ABA的作用下易形成畸形的体细胞胚(Filonova等2000; Egertsdotter和von Arnold 1995; Salajova和Salaj 2005)。与上述研究结果一致,本研究发现培养基5号(蔗糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、7号(蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和8号(蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +肌醇 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)这3个培养基对马尾松胚性细胞分化表现出了不同的反应。在增殖倍数无显著性差异的前提下,培养基5号渗透压相对较小,胚性细胞的发育缓慢,大多数细胞结构仍处于PEMI和PEMII阶段;培养基7号渗透压适中,胚性细胞分化发育较快,能形成较多的正常完整的早期SE;培养基8号渗透压最高,胚性细胞可以分化形成早期SE,但与正常SE相比,大多数早期SE不正常。因此,通过调节蔗糖与肌醇的比例形成适中的培养基渗透压,不仅影响马尾松胚性细胞系的增殖倍数,对胚性细胞的分化发育同样具有重要意义。

参考文献

- 曹焱(2009). 红松合子胚愈伤组织诱导及不定芽发生的研究[学位论文]. 黑龙江: 东北林业大学
- 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
- 范建芝(2007). 北美乔松胚性组织成熟胚形成潜力差异的生化基础研究[学位论文]. 上海: 上海交通大学
- 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, 王明庶(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
- 刘宝光, 李成浩, 张含国(2010). 红皮云杉胚性愈伤组织保持与增殖阶段影响因子的筛选与分析. 东北林业大学学报, 38 (07): 56~60
- 齐力旺(2000). 华北落叶松体细胞胚胎发生与遗传转化系统建立研究[学位论文]. 北京: 中国林业科学研究院
- 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛(1997). 针叶树体细胞无性系研究和应用进展. 生物工程进展, 17 (4): 1~9
- 杨模华, 李志辉, 张冬林, 黄振, 丁贵杰(2011a). 马尾松嫩茎愈伤组织保持、增殖与不定芽分化培养. 中国农学通报, 27 (10): 12~17
- 杨模华, 张冬林, 李志辉, 靳小翠, 丁贵杰(2011b). 马尾松幼胚体细胞胚胎发生研究. 植物生理学报, 47 (9): 904~912
- 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(2003). 马尾松组织培养研究[学位论文]. 南京: 南京林业大学
- Carneros E, Celestino C, Klimaszewska K, Park YS, Toribio M, Bonga JM (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 98 (2): 165~178
- Egertsdotter U, von Arnold S (1995). Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol Plant*, 93: 334~345
- Filonova LH, Bozhko PV, von Arnold S (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot*, 51 (343): 249~264
- Gupta PK, Pullman GS (1991). Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. US Patent, No.5036007
- Hakman I, Fowke IC, von Arnold S, Eriksson T (1985). The development of somatic embryos in tissue culture initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci*, 38: 53~59
- Hargreaves CL, Grace LJ, Holden DG (2002). Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep*, 21: 40~45
- Iraqi D, Tremblay FM (2001). Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot*, 52 (365): 2301~2311
- 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 Biotechnol*, 1 (1): 11~25
- Konrádová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D (2002). Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzyme activities. *J Plant Physiol*, 159: 387~396
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985). Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep*, 4: 325~328
- Montalban IA, Diego ND, Moncalean P (2012). Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. *Acta Physiol Plant* 34 (2): 451~460
- Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobes*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 86 (1): 87~101
- Stasolla C, Yeung EC (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 74 (1): 15~35
- Salajova T, Salaj J (2005). Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines. *Boil Plant*, 49 (3): 333~339
- Yeung EC (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 205~247
- Zhu LH, Wu XQ, Qu HY, Ji J, Ye JR (2010). Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 102 (1): 121~128