

胡继文, 郭文冰, 邓乐平, 等. 湿地松及其杂种的体细胞胚胎发生与植株再生[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 107-115.
 HU Jiwen, GUO Wenbing, DENG Leping, et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus elliottii* and its hybrids[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 107-115.

湿地松及其杂种的体细胞胚胎发生与植株再生

胡继文¹, 郭文冰¹, 邓乐平², 钟岁英², 王为民¹, 赵奋成¹,
 黄婷², 吴惠珊¹, 李义良¹, 廖仿炎¹

(1 广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州, 510520;

2 台山市红岭种子园, 广东 江门, 529223)

摘要:【目的】明确适合湿地松 *Pinus elliottii* 及其杂种的体细胞胚胎发生条件, 建立体胚成熟萌发的技术。【方法】以 2016 年 6 月采集的 2 个湿地松家系 (EE1, EE2)、2 个湿地松杂交种家系 (EC, EH) 的未成熟合子胚 (含胚乳) 为材料, 从诱导、增殖、成熟到萌发配制 3 个系列培养基, 比较外植体采集时间、家系、基本培养基对胚性愈伤组织诱导的影响。用显微镜进行胚性愈伤组织鉴别后, 进一步挑选诱导形成的胚性愈伤组织进行增殖、成熟、萌发, 最终获得再生植株。【结果】湿地松及其杂交种合子胚的发育进程可划分为 8 个阶段, 阶段 II、III 为未成熟胚, 适合体胚发生, EC 最早出现阶段 III 合子胚。外植体诱导产生具有胚性胚柄团 (ESM) 结构的胚性愈伤组织, 可进一步增殖。诱导培养基对愈伤组织形成及胚性愈伤组织占比具有较大影响, 3 种诱导培养基 (T1、T2 和 T3) 产生愈伤组织效率最高的为 T1 培养基 (49.0%), 胚性愈伤组织所占愈伤组织的比例最高为 T2 培养基 (22.4%)。培养基配方的诱导率存在基因型间的差异, T1 培养基整体诱导率低; T2 培养基对家系 EE1 诱导率最高, 为 5.82%; T3 培养基对参试材料均能诱导成功, 且平均诱导率最高, 为 3.75%。随采样时间延后, 家系 EE1、EH 的体胚诱导率逐渐增加, 家系 EE2、EC 的体胚诱导率则随采样时间延后逐渐降低。体胚诱导率与合子发育阶段结果基本一致, 阶段 III 合子胚均出现较晚, 前期诱导率低。胚性愈伤组织继代 24 次以后, 胚活性逐渐降低。成熟培养基 T1S 和 T3S 可完成胚的成熟, 平均每克成熟培养基分别成熟 23.3 和 15.9 个子叶胚, 萌发率为 32.1%, 移栽保存率为 47.8%。【结论】诱导培养基 T3 对参试家系均能诱导成功, T3 具有较广泛适用性, 各家系在阶段 III 合子胚出现时表现出较大的诱导率, 阶段 III 合子胚可能为体细胞胚发生的最佳诱导阶段。建立了湿地松及其杂种体细胞胚发生方法并形成了再生植株。

关键词: 湿地松; 合子胚; 体细胞胚胎发生; 植株再生; 杂交; 胚性愈伤组织; 诱导培养基

中图分类号: S722.8

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)01-0107-09

Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus elliottii* and its hybrids

HU Jiwen¹, GUO Wenbing¹, DENG Leping², ZHONG Suiying², WANG Weimin¹, ZHAO Fencheng¹,
 HUANG Ting², WU Huishan¹, LI Yiliang¹, LIAO Fangyan¹

(1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry,
 Guangzhou 510520, China; 2 Taishan Hongling Seed Orchard, Jiangmen 529223, China)

Abstract: 【Objective】 To define the conditions suitable for somatic embryogenesis of *Pinus elliottii* and its hybrids, and develop a mature protocol for somatic embryogenesis maturation and germination. 【Method】 The immature zygotic embryos (with endosperm) of two *P. elliottii* families (EE1, EE2) and two *P. elliottii* hybrid

收稿日期: 2018-04-01 网络首发时间: 2018-12-28 14:39:04

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20181227.1104.020.html>

作者简介: 胡继文 (1991—), 男, 硕士, E-mail: hujuwen020@126.com; 通信作者: 郭文冰 (1981—), 女, 副研究员, 博士, E-mail: wbguo@sinogaf.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A020208032)

(EC, EH) were sampled in June 2016. Three series of medium from induction, proliferation maturation to germination were set to compare the effects of explant collection date, family and basal medium on embryogenic callus induction. The embryogenic callus were identified through microscopic observation, and chosen for proliferation, maturation and germination culture. Finally the regenerated plantlets were developed.

【Result】 The zygotic embryo development processes of *P. elliottii* and hybrids were divided into eight stages. The immature embryos at stage II and III were suitable for somatic embryogenesis. The embryos at stage III first appeared in EC. The embryogenic callus with embryonal suspensor mass (ESM) could be further proliferated. The induction mediums (T1, T2 and T3) played vital roles in callus formation and embryogenic callus proportion. T1 medium had the highest callus induction efficiency (49.0%), and T2 medium had the highest embryogenic callus proportion (22.4%). The mediums had genotype-specific induction rates. The overall induction rate of T1 medium was low, and T2 medium had the highest induction rate (5.82%) for EE1. T3 medium was suitable for all tested materials, with the highest mean induction rate of 3.75%. The somatic embryo induction rates of EE1 and EH gradually increased with the sampling time extension, while the somatic embryo induction rates of EE2 and EC gradually decreased. The results of somatic embryo induction rate were basically corresponded with zygote development stages. The stage III zygotic embryo appeared late, and its induction rate was low in early stage. After the embryogenic callus were subcultured for 24 times, the embryo activities progressively decreased. The maturation medium T1S and T3S could accomplish embryo maturation. Their average ripening efficiencies in per gram of mature medium were 23.3 and 15.9 cotyledons, respectively. The germination rate was 32.1% and the transplanting rate was 47.8%. **【Conclusion】** All tested materials can induce somatic embryo in T3 medium. T3 medium is widely applicable, and all materials have high induction rates when zygotic embryo appears at stage III, illustrating that stage III may be the optimal for somatic embryo induction. The experiment establishes the protocol for somatic embryogenesis and plantlet regeneration.

Key words: *Pinus elliottii*; zygotic embryo; somatic embryogenesis; plant regeneration; hybridization; embryogenic callus; induction medium

湿地松 *Pinus elliottii* 原产于美国东南部^[1], 具有速生、干形通直、适应性强、抗旱耐瘠薄、松脂产量高且品质好等优点^[2-3], 其在原产地高可达 30 m, 胸径 90 cm。20 世纪 30 年代引进我国, 经不断改良和推广种植, 目前湿地松在我国的种植面积达到 300 万 hm^2 , 是中国南方主要的材脂两用树种之一^[4]。以湿地松为母本, 加勒比松 *P. caribaea* 为父本的杂交后代湿加松 *P. elliottii* × *P. caribaea* 杂种优势明显, 生长和产脂量均优于母本湿地松, 是华南地区经济效益较高的人工林树种之一^[5]。

在松树繁殖方面, 传统的种子繁殖存在育种周期长、杂合度高、种子萌发率低等难题; 而现有扦插繁殖方法存在受季节限制、需定期更换采穗母株、苗圃占地面积大等不足之处, 致使优良的家系和无性系不能规模化生产^[6]。体细胞胚胎发生是植物体细胞在人工控制的培养条件下分化产生体细胞胚胎(体胚), 按照类似合子胚的形态发生完成形态建成的过程^[7], 其与传统的种子繁殖和其他无性繁殖技术相比, 具有遗传稳定性高、繁殖效率高、同步化水平高等优点^[8]。在松树中, 影响体胚发生及植株

再生的主要因素有外植体基因型、合子胚成熟度、培养基组成等^[9]。通过前人试验研究, 湿地松、海岸松 *P. pinaster*、火炬松 *P. taeda* 及其与刚松 *P. rigida* 杂种均已突破体胚发生技术并获得再生植株^[10]。但湿地松体胚发生仍面临以下问题: 1) 大部分外植体的基因型未经遗传改良; 2) 前人研究湿地松体胚发生, 增殖培养基多为原诱导培养基^[6], 未考虑胚性愈伤组织在增殖阶段所需矿质元素及生长调节剂的特异性, 其愈伤组织的胚性可能受到影响, 不利于愈伤组织的增殖、成熟及萌发。本研究以广东改良湿地松及其杂交种为对象, 进一步优化其体细胞胚胎发生及植株再生方法, 为改良湿地松品种及其杂交种繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选取广东省台山市红岭种子园内生长良好、无病虫害的 4 个改良湿地松及其杂交种: EE1、EE2 为湿地松自由授粉家系, EH 为湿地松与洪都拉斯加勒比松 *P. elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis*

杂交 F2 代, EC 为湿地松与古巴加勒比松 *P. elliottii* × *P. caribaea* var. *caribaea* 杂交 F1 代, 其中, EC 母本是 EE2, 每个家系 3 株。分别于 2016 年 6 月 16、23、26 和 30 日采集球果, 每次每株树采集 3~5 个球果, 在冰盒中低温保存带回实验室, 放在 4 °C 条件下的冰箱里冷藏, 用于胚的发育阶段观察及体胚发生试验。

1.2 试验方法

1.2.1 合子胚成熟度的显微观察 将采集的球果对半切开, 逆种鳞拨开, 将种子取出, 除去外种皮, 得到含合子胚及胚乳的外植体。再将所取外植体移至体视显微镜下, 剥离胚乳, 在 20× 显微镜下观察合子胚的形态, 拍照记录合子胚的发育情况, 参照 Pullman 等^[11]的方法, 将合子胚发育划分为 8 个阶段, 统计各家系在不同球果采集时间各发育阶段的比例。

1.2.2 培养基的准备 2014—2015 年通过比较 DCR、LP 等 5 种培养基的胚性愈伤组织的诱导效果, 筛选出 3 个适宜参试材料的诱导培养基。在此基础上, 本试验于 2016 年进一步对合子胚的愈伤组织诱导、增殖、成熟、萌发, 试验采用相应的 3 个系列培养基配方, 具体如下:

系列 1 采用 Pullman 等^[10]的火炬松培养基配方。诱导培养基 (T1) 采用 2212 配方, 激素及部分添加物做了调整: NH_4NO_3 调整为 $603.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; CuSO_4 为 $0.173 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Na_2EDTA 调整为原来的 1/2; 蔗糖为 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 肌醇为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 生长调节剂 ABA 为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 激动素 Kinetin 为 $0.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时添加: 6-BA $0.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 油菜素内脂 $0.048 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。增殖培养基 (T1M) 采用 2212 配方; 成熟培养基 (T1S) 采用 1562 配方; 萌发培养基 (T1G) 采用 397 配方。

系列 2 采用 Klimaszweska 等^[12]北美乔松 *P. strobus* 培养基配方。诱导培养基 (T2) 采用 MLV 配方, 添加: 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 油菜素内脂 $0.048 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-D $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 增殖培养基 (T2M)、成熟培养基 (T2) 和萌发培养基 (T2G) 配方与文献^[12]相同。

系列 3 采用 ArborGen 公司^[13]的针叶树体胚专利配方。诱导培养基 (T3) 激素及部分添加物做调整: 麦芽糖调整为 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; ABA 为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 添加: 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 油菜素内脂 $0.048 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其余步骤采用文献^[10]的火炬松培养基配方, 增殖培养基 (T3M) 采用 2212 配方; 成熟培养基 (T3S) 采用 1562 配方; 萌发培养基 (T3G) 采用 397 配方。

1.2.3 外植体表面消毒及诱导接种 以带有胚乳的胚为外植体, 按照“1.2.1”的方法将外植体从球果中挑出, 在超净工作台转移至灭菌的空瓶内, 倒入 ϕ 为 75% 的乙醇, 处理 45 s 后纱布过滤, 用无菌水冲洗 5 次; 再倒入 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HgCl_2 , 处理 15~20 min, 再用无菌水冲洗 5 次。处理后的外植体每次取 10 粒放到灭菌碟上, 剥离内外种皮后, 得到类似米粒状的外植体 (半透明或乳白色), 分别接种于 T1、T2 和 T3 诱导培养基上, $(24 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下暗培养。

1.2.4 胚性愈伤组织的鉴别与增殖维持 利用光学显微镜对诱导形成的愈伤组织进行胚性鉴别。用解剖刀片剥下 2~5 mm 愈伤组织, 放载玻片上, 加若干滴 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸洋红染色, 打散愈伤组织, 稍微加热, 盖上盖玻片, 清洗压片 2~3 次后, 再用 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 伊文思蓝染色 30 s, 清洗 2~3 次后拍照。这种情况下胚性愈伤组织的胚柄细胞染成蓝色, 胚团染成红色; 非胚性愈伤组织只显示伊文思蓝染成的蓝色细胞^[14]。选取诱导形成的胚性愈伤组织, 转移至 T1M、T2M 和 T3M 增殖培养基上进行暗培养, $(24 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下每间隔 14 d 继代 1 次。

1.2.5 体胚的成熟培养 将增殖培养的 200 mg 胚性愈伤组织悬浮于 20 mL 无激素液体成熟培养基中, 震荡以形成良好的悬浮体系, 获得成熟悬浮液; 再用移液器吸取 3 mL 成熟悬浮液, 放在装有定性滤纸的布氏漏斗上, 使用真空泵短、低脉冲 (5 s, 4.6 kPa) 真空抽滤, 得到吸附有薄薄一层胚团的滤纸, 将滤纸放在配制好的 T1S、T2S 和 T3S 成熟培养基上进行成熟培养, 培养温度为 $(24 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$, 每天光照 16 h, 采用 LED 光源 (红蓝光比例为 4:1), $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 微弱光照, 直至愈伤组织上陆续长出子叶张开的子叶胚。

1.2.6 成熟胚的萌发及移栽 将子叶胚接种至 T1G、T2G 和 T3G 萌发培养皿, 先在微弱光强下 ($1.6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 培养 1 周, 而后转到更高光强下 ($47 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 继续培养, $(25 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下, 每天光照 16 h。待萌发出子叶与根的胚插入新鲜萌发培养基中以后, 继续培养, 培养条件与高光强培养条件相同, 出现上胚轴与根系发育的植株, 即为萌发。将萌发植株转移到 $V(\text{泥炭}):V(\text{蛭石})=3:1$ 的混合基质中, 移至人工气候室炼苗, 光强为 $170 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为 $(25 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$, 起始湿度为 80%, 每天光照 16 h。逐步降至自然环境湿度, 2~4 周后, 转移至黄心土盆栽, 即可得到再生植株。2 周后, 统计再生植株的成活率。

1.3 数据计算与统计分析

愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$; 胚性愈伤组织比率=诱导出胚性愈伤组织的外植体数/诱导出愈伤组织的外植体数 $\times 100\%$; 胚性愈伤组织诱导率=诱导出胚性愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$; 成熟效率=胚性愈伤组织产生的子叶胚数/体胚成熟前胚性愈伤组织的鲜质量; 萌发率=萌发出上胚轴与根的植株数量/接种的子叶胚数量 $\times 100\%$; 移栽成活率=移栽 2 周后恢复生长的植株数量/移栽的植株总数 $\times 100\%$ 。

数据统计分析采用 SAS9.3 软件进行, 调用 GLM 进行方差分析, 使用 Excel 2013 进行作图。

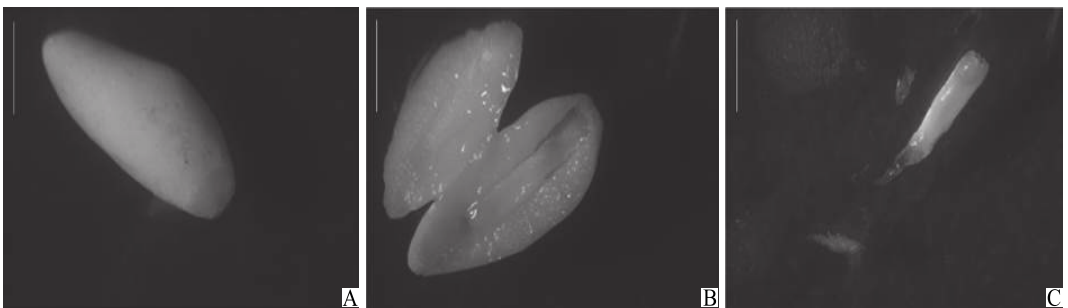
2 结果与分析

2.1 球果合子胚成熟度的显微观察

用解剖刀小心切开雌配子体, 可以观察到胚, 合子胚发育早期较难观察到, 中期较为明显, 可用解剖针小心挑出, 在体视显微镜下观察和拍照, 后期直接切开已经可以见到子叶的形态 (图 1)。

根据前人对松属合子胚发育阶段划分标

准^[6, 11, 15], 将本试验湿地松及其杂种合子胚发育划分为 8 个阶段。阶段 I: 胚柄细胞为长形, 且高度液泡化透明细胞 (图 2A); 阶段 II: 多个胚明显发育, 胚体仍较为透明 (图 2B); 阶段 III: 胚头清晰, 胚体渐变为不透明 (图 2C); 阶段 IV: 胚头发育成圆形, 胚体整体在显微镜下清晰可见 (图 2D); 阶段 V: 胚头呈圆状, 胚体由头至下开始出现乳白色 (图 2E); 阶段 VI: 胚头开始子叶组织的发育, 圆状消失, 胚体一半呈乳白色 (图 2F); 阶段 VII: 胚体超过 2/3 为乳白色, 出现合子胚子叶 (图 2G); 阶段 VIII: 合子胚子叶进一步张开、伸长, 高过顶端分生组织 (图 2H)。显微观察显示, 6 月 16 日, 采集的球果合子胚均处于阶段 I~II; 6 月 23 日, 家系 EC 最早出现阶段 III 合子胚, 其余家系仍处于阶段 I~II; 6 月 26 日, 家系 EE2 的合子胚发育阶段分布最广, 包含阶段 I~V; 6 月 30 日, 家系 EH 的合子胚处于阶段 III (图 3D)。前人研究指出, 针叶树中未成熟合子胚诱导成功率优于成熟合子胚^[16], 其中阶段 I 胚龄较小; 阶段 II、III 为未成熟胚, 阶段 IV 以后为成熟胚, 胚龄过大。本试验选择多数合子胚处于阶段 II、III 的 6 月 23—30 日大量采摘球果, 并进行体胚诱导。

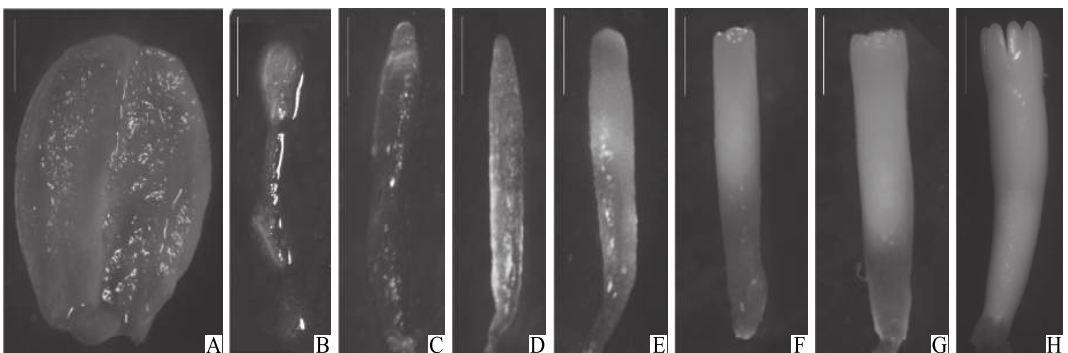


A: 米粒状雌配子体外观; B: 切开的米粒状雌配子体; C: 取出的胚; 标尺=1 mm

A: Appearance of grain-shape megagametophyte; B: The internal structure of grain-shape megagametophyte; C: Embryo taken out; Bar=1 mm

图 1 湿地松及其杂种雌配子体与相应的胚

Fig. 1 The megagametophytes and corresponding embryos of *Pinus elliottii* and hybrids



A: 阶段 I; B: 阶段 II; C: 阶段 III; D: 阶段 IV; E: 阶段 V; F: 阶段 VI; G: 阶段 VII; H: 阶段 VIII; 标尺=500 μm

A: Stage I; B: Stage II; C: Stage III; D: Stage IV; E: Stage V; F: Stage VI; G: Stage VII; H: Stage VIII; Bar=500 μm

图 2 湿地松及其杂种球果种子不同生长阶段的合子胚

Fig. 2 The zygotic embryos of *Pinus elliottii* and hybrids at different development stages

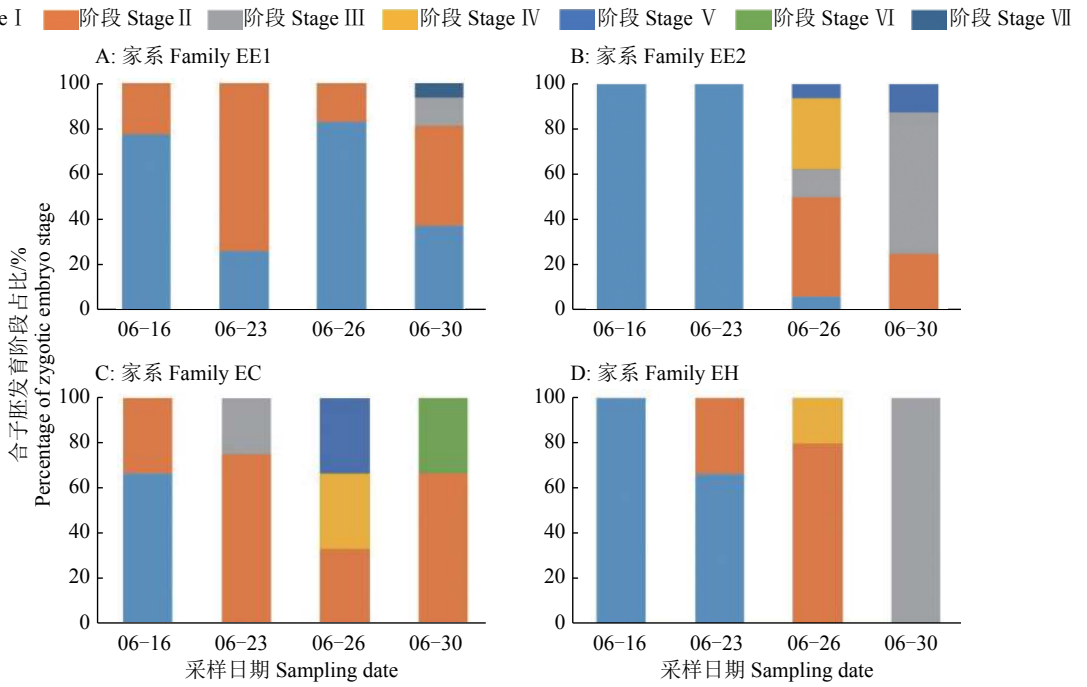


图 3 不同采球果时间各家系合子胚成熟情况

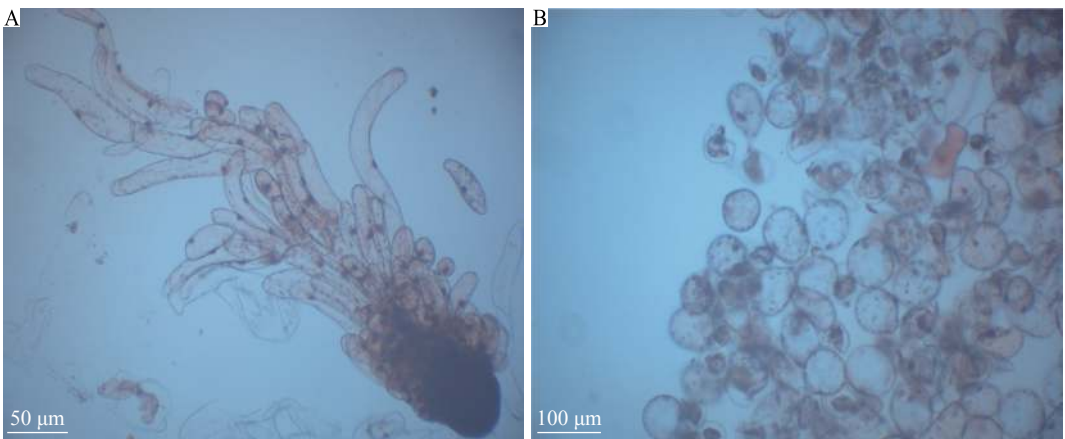
Fig. 3 The maturation conditions of zygotic embryos of each family on different sampling dates

2.2 胚性愈伤组织的诱导

外植体诱导培养 2~4 周后开始膨大, 通过胚性鉴定发现存在 2 种类型的愈伤组织。在显微镜下能观测到愈伤组织内有排列紧密的胚头和长条形细胞组成的胚性胚柄团 (ESM) 结构 (图 4A), 非胚性愈伤组织则无 ESM 结构 (图 4B)。继续培养 2~4 周, 具有 ESM 结构的愈伤组织发育成透明银耳状黏性愈伤组织, 可继续增长; 无 ESM 结构的愈伤组织逐渐呈褐色, 质感较硬, 生长缓慢, 直至停止生长。

不同诱导培养基上形成的愈伤组织及其胚性愈伤所占比例存在较大差异 (表 1)。其中, T1 培养

基上愈伤组织的诱导率相对最高, 为 49.0%, 但胚性愈伤组织占比相对最小; T2 培养基上接种 1 634 个外植体, 仅产生 223 个愈伤组织, 胚性愈伤组织占 22.4%。不同培养基配方对家系诱导率的影响各异 (表 2), EH 未能在 T1 培养基中形成胚性愈伤组织; T2 培养基对不同家系的诱导率具有显著影响, 该配方对家系 EE2、EH 无诱导作用; 家系 EE1、EC 在该配方中诱导率均高于其在其他配方中的诱导率, 且 EE1 的诱导率最高, 达 5.82%。参试的湿地松及其杂种在 T3 培养基中均能诱导成功, 平均诱导率最高, 为 3.75%。



A: 胚性胚柄团 (ESM) 结构; B: 非 ESM 结构

A: Structure of embryonal-suspensor mass(ESM) ; B: Structure of non-ESM

图 4 湿地松及其杂种的胚性及非胚性愈伤组织

Fig. 4 The embryonic and non-embryonic callus of Pinus elliotii and hybrids

表 1 各培养基上胚性愈伤组织的鉴别情况

Table 1 The identification result of embryogenic callus in each medium

| 培养基 Medium | 接种总数 (QI) Quantity of inoculation | 愈伤数 (CQ) Callus quantity | 胚性愈伤数 (ECQ) Embryogenic callus quantity | 比率/% rate | |
|---------------|--------------------------------------|-----------------------------|--|-----------|--------|
| | | | | CQ/QI | ECQ/CQ |
| T1 | 2 000 | 979 | 44 | 49.0 | 4.5 |
| T2 | 1 634 | 223 | 50 | 13.6 | 22.4 |
| T3 | 1 833 | 773 | 78 | 42.2 | 10.1 |
| 合计Total | 5 467 | 1 975 | 172 | 36.1 | 8.7 |

表 2 不同培养基配方对湿地松及其杂种诱导率的影响¹⁾

Table 2 The effects of different culture mediums on embryogenic induction rates of *Pinus elliottii* and its hybrids

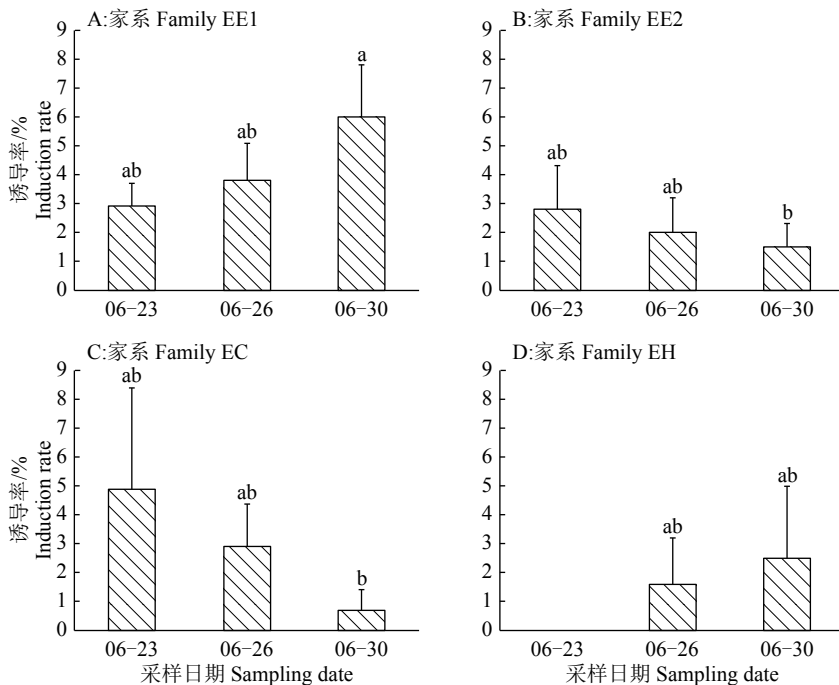
| 家系 Family | 诱导率/% Induction rate | | | 均值 Mean |
|--------------|----------------------|-------------|------------|---------|
| | T1 | T2 | T3 | |
| EE1 | 2.48±1.17a | 5.82±1.68a | 4.11±1.44a | 4.24 |
| EE2 | 2.51±1.50a | 0b | 3.79±1.27a | 2.10 |
| EC | 2.45±1.56a | 3.88±4.75ab | 2.14±1.56a | 2.82 |
| EH | 0b | 0b | 4.13±2.71a | 1.38 |
| 均值 Mean | 2.28 | 2.68 | 3.75 | |

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 法)

1) Different lowercase letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$, Tukey test)

不同采集时间的外植体愈伤组织诱导结果 (图 5) 显示, 家系 EE1、EH 随采样时间延后, 诱导率逐渐增加, 其中, EE1 在 6 月 30 日采摘球果诱导率达到最高, 为 5.99%, 明显高于其他家系, EH 平均诱导率最小, 6 月 23 日诱导率为 0。家系 EE2、

EC 则相反, 体胚诱导率随采样时间延后逐渐降低。体胚诱导率与合子发育阶段基本一致, 家系 EE1、EH 的阶段 III 合子胚均出现较晚, EE2、EC 则出现较早。



各图中, 柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 法)

In each figure, different lowercase letters on the bars indicated significant difference ($P < 0.05$, Tukey test)

图 5 不同采样时间的湿地松及其杂种的诱导率

Fig. 5 The somatic embryo induction rates of *Pinus elliottii* and hybrids on different sampling dates

2.3 胚性愈伤组织的增殖与成熟

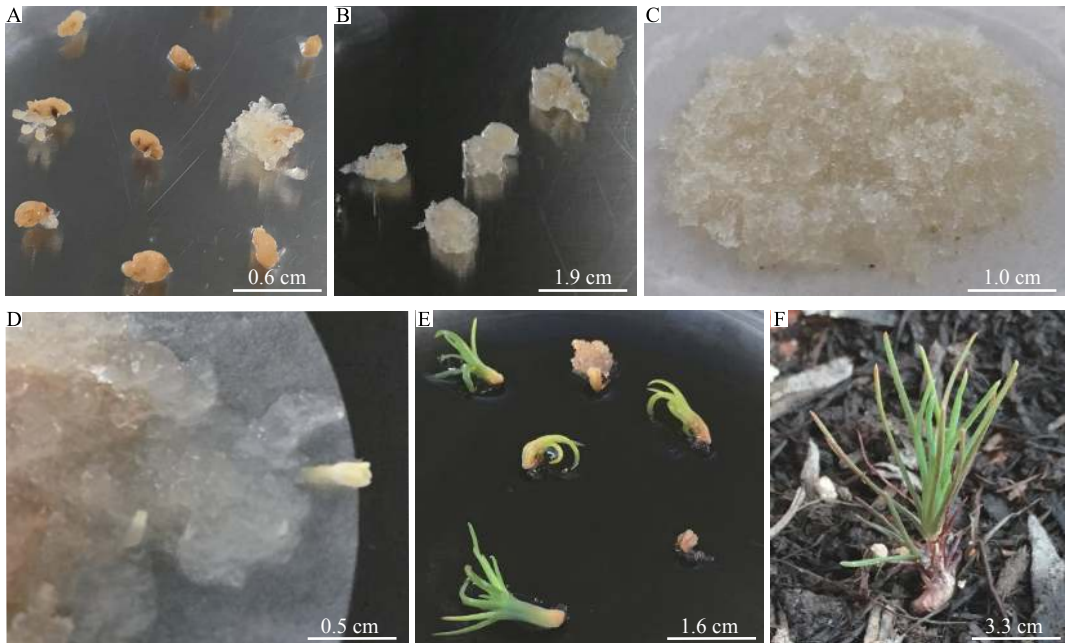
选取诱导产生的胚性愈伤组织进行增殖培养, 增殖过程产生的愈伤组织包括 2 种: 一种位于愈伤体的外侧, 呈透明银耳状, 可用于继代增殖; 另一种位于愈伤体的内侧, 呈褐色, 胚性低, 不适宜继代。继代 24 次后, 愈伤体内侧褐化严重, 外侧透明银耳状失去 (图 6B), 胚活性逐渐降低。

成熟培养 3 周后, 吸附在滤纸上薄薄一层胚体积增大 (图 6C); 继续在成熟培养基培养 6 周, 即可得到子叶张开的胚 (图 6D)。每克 T1S 成熟培养基平均成熟 23.3 个子叶胚, 每克 T3S 成熟培养基平均

成熟 15.9 个子叶胚。

2.4 成熟子叶胚的萌发及移栽

成熟培养获得形态正常的子叶胚 (图 6D) 在萌发培养基 6~8 d, 可得到萌发出子叶与根的胚, 转移至新鲜萌发培养基中继续培养 6~8 周, 出现具上胚轴、根系发育的植株 (图 6E), 萌发率为 32.1%。将萌发植株转移到混合基质中炼苗 (图 6F), 最后转移至黄心土盆栽, 即可得到再生植株。移栽 2 周后, 再生植株的存活率为 47.8%, 本试验共移植 23 株, 存活 11 株。



A: 外植体在诱导培养基 T3 上培养 6 周后; B: 胚性组织继代 24 次后; C: 胚性愈伤组织在成熟培养基 T3S 上培养 3 周后; D: 产生子叶胚; E: 体胚苗在萌发培养基上培养 6 周后; F: 体胚苗移栽至黄心土 1 周后生长情况

A: Megasporophylls after six weeks' culture on the initiation medium T3; B: Embryogenic tissue after 23 cycles of subculture; C: Embryogenic tissue after three weeks of growth on the maturation medium T3S; D: The cotyledon of somatic embryos came out; E: Somatic embryos after six weeks' culture on the germination medium; F: Somatic seedlings after one week of growth in the yellow soil

图 6 湿地松及其杂种体胚发生过程

Fig. 6 The somatic embryogenesis stages of *Pinus elliottii* and hybrids

3 讨论与结论

利用体细胞胚胎发生体系进行种苗繁殖具有快速、高效、不受季节等自然条件制约等优点, 是林木优良基因型大规模繁殖的一种有效技术^[17]。体胚诱导是体胚发生植株再生最重要的环节^[18], 研究表明, 利用合子胚作为外植体诱导体胚的最直接因素是合子胚的发育阶段^[19], 同一类型外植体发育的不同阶段对体胚形成有显著影响^[20]。丛建民等^[21]研究发现, 水曲柳体胚发生最适宜的外植体发育阶段是刚进入子叶期的幼嫩合子胚。前人选取 2 个湿地松家系比较了其在 5 个球果采样时间的体胚诱导率,

结果发现, 2 个家系以处于 II、III、IV 发育阶段的未成熟合子胚诱导率最高^[6]。本试验中, 6 月 16 日, 采集的球果合子胚均处于阶段 I~II, 胚龄过小, 参试家系均未诱导成功; 6 月 23 日以后, 家系 EC 开始出现阶段 III 合子胚, 诱导率在所有家系中最高, 为 4.90%, 家系 EE1、EH 在 6 月 30 日出现阶段 III 合子胚, 诱导率也达到最高。家系 EE2 在 6 月 26、30 日也有阶段 III 合子胚出现, 但诱导率不高, 可能与该采样时间出现阶段 IV 及 V 合子胚、合子胚已成熟有关, 湿地松及其杂种胚龄过小或过大的合子胚的诱导率均较低, 甚至诱导不出胚性愈伤组织, 阶段 III 合子胚为体胚发生最佳诱导阶段。

此外,外植体的基因型是影响其体胚诱导的关键因素之一。徐春香等^[22]报道了香蕉“大矮蕉”品种 *Musa AAA cv. Grande Naine* 的体胚发生植株再生。同时,该研究团队的另一试验指出不同香蕉品种,建立胚性细胞悬浮系的难易程度有所不同,并且,基因组类型为 AAB 或 ABB 的香蕉品种未能获得胚性愈伤组织^[23]。前人研究了 10 个火炬松半同胞家系的体胚诱导过程,发现起始愈伤组织最高诱导率为 33%,最低仅为 3.3%,诱导出的愈伤组织家系平均存活率为 0~40%^[24]。本试验中,参试的 4 个家系在 3 种诱导培养基的平均诱导率存在明显差异,EE1 诱导率显著高于 EH,EE2 与 EC 的诱导率接近,EE1、EE2、EC 和 EH 的诱导率分别为 4.24%、2.10%、2.82% 和 1.38%。培养基成分中的激素和生长调节剂、矿质营养等是影响体胚发生的另外一关键因素^[25],前人以湿地松与洪都拉斯加勒比松杂种为试验材料,基于 DCR 培养基^[26]、MLV 配方^[27],添加不同种类、浓度的激素,设置 6 种诱导培养基,诱导率最高的是添加 BAP(4.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 2,4-D (9.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 MLV 配方,诱导率达到 10.22%;诱导率最低的是添加了吡效隆 (CPPU)(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 DCR 培养基,诱导率为 1.67%^[28]。本试验选取的 3 种培养基中,T3 对参试的湿地松及其杂种均能诱导成功,且平均诱导率最高,说明 T3 培养基具有广泛适应性。

有研究指出,植物的胚性愈伤也像其他生命体,存在着衰老的过程^[29]。本试验中,继代 24 次以后,胚活性逐渐降低。产生胚活性降低的原因可能是:一方面继代次数过多,导致胚体的基因缺失或者发生变异,细胞的全能性受损;另一方面,由于长期处于外界供给的激素及营养条件下,胚体自身的内源激素动态平衡被打破,再分化困难^[30]。当前有效保持细胞胚性的主要措施为超低温保存胚性愈伤^[31]。

前人报道,湿地松的离体再生存在较大难度,尽管对湿地松体胚发生体系研究报道较多,但只有少量报道实现了植株再生^[32]。Jain 等^[33]基于 DCR 培养基培养未成熟合子胚首次实现湿地松体胚发生植株再生。唐巍等^[34]报道了不同基因型及胚发育时期的湿地松体胚发生植株再生。然而,湿地松选择未成熟胚作为外植体时,普遍诱导率低,且受到基因型特异性控制。近年来,湿地松与加勒比松杂种也突破体胚发生形成再生植株^[28]。前期的研究结果表明,DCR、LP 常用配方对广东改良湿地松家系诱导效果不理想,而改良 MLV 也不能成功诱导家

系 EE2、EH,本研究利用系列 3 配方,成功诱导 4 个家系。成熟阶段中发现,每克 T1S、T3S 培养基能平均成熟 23.3、15.9 个子叶胚,均大于前人研究的湿地松杂种的最小成熟效率(每克培养基平均成熟 9.95 个子叶胚),但与最大成熟效率(每克培养基平均成熟 320.90 子叶胚)存在一定的差距^[28],成熟培养基可能需要做进一步改良。本研究最终获得 23 株再生植株,其中,11 株健康苗木移栽至苗圃。利用体胚发生实现良种湿地松及杂种的规模化生产仍需突破产业化技术。

参考文献:

- [1] 李彦杰, 栾启福, 沈丹玉, 等. 湿地松自由授粉家系松脂组分遗传变异研究[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(6): 773-779.
- [2] WEN X, KUANG Y, SHI M, et al. Biology of *Hylobius xiaoi*(Coleoptera: Curculionidae), a new pest of slash pine, *Pinus elliottii*[J]. *J Econ Entomol*, 2004, 97(6): 1958-1964.
- [3] MEANS D B, PALIS J G, BAGGETT M. Effects of slash pine silviculture on a florida population of flatwoods salamander[J]. *Conserv Biol*, 1996, 10(2): 426-437.
- [4] 张帅楠. 湿地松材性测定技术与多性状联合选择[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [5] 宗亦臣, 郑勇奇, 马锡权, 等. 湿加松良种‘中林 1 号’[J]. *湖南林业科技*, 2017, 44(1): 76-77.
- [6] 吴丽君. 湿地松、火炬松离体培养植株再生技术的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [7] 姜福星, 魏丕伟, 寇亚平, 等. 探析植物体胚发生的关键基因[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(4): 1304-1311.
- [8] QUIROZ-FIGUEROA F R, ROJAS-HERRERA R, GALAZ-AVALOS R M, et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 86(3): 285-301.
- [9] KIM Y W, MOON H K. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese red pine (*Pinus densiflora*)[J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8(3): 259-266.
- [10] PULLMAN G S, BUCALO K. Plant embryo culture[M]. New York: Humana Press, 2011: 267-291.
- [11] PULLMAN G S, MEIN J, JOHNSON S, et al. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(9): 596-605.
- [12] BONGA J M, PARK Y S, OVERTON C, et al. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L.[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2013, 37(3): 392-399.
- [13] BECWAR M, CLARK J, SWINTON L S, et al. Liquid-based method for producing plant embryos: US 8313946B2[P]. 2012-11-20.
- [14] GUPTA P K, HOLMSTROM D. Protocol for somatic

- embryogenesis in woody plants[M]. Dordrecht: Springer, 2005: 573-575.
- [15] 李清清, 叶建仁, 吴小芹. 黑松合子胚和体细胞胚发育阶段的形态特征比较[J]. *林业科技开发*, 2012, 26(5): 21-23.
- [16] LIAO Y K, AMERSON H V. Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) somatic embryogenesis: I: Initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos[J]. *New Forest*, 1995, 10(2): 145-163.
- [17] 吴涛, 陈少瑜, 陈芳, 等. 云南松合子胚发育及形态特征[J]. *西北林学院学报*, 2008, 23(6): 91-93.
- [18] 吕守芳, 张守攻, 齐力旺, 等. 日本落叶松体细胞胚胎发生的研究[J]. *林业科学*, 2005, 41(2): 48-52.
- [19] 张建伟, 王军辉, 李青粉, 等. 云杉未成熟合子胚诱导体细胞胚胎发生[J]. *林业科学*, 2014, 50(4): 39-46.
- [20] RAMAROSANDRATANA A V, STADEN J V. Tissue position, explant orientation and naphtha aleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*)[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2003, 74(3): 249-255.
- [21] 丛建民, 沈海龙, 李玉花, 等. 水曲柳体胚发生过程中不同状态类型外植体的生理生化状态[J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(1): 48-52.
- [22] 徐春香, PANIS B, STROSSE H, 等. 体胚发生途径‘大矮蕉’植株的再生[J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(2): 63-66.
- [23] 徐春香, PANIS B, STROSSE H, 等. 香蕉胚性愈伤组织的诱导及胚性细胞悬浮系的建立[J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(1): 70-73.
- [24] PULLMAN G S, NAMJOSHI K, ZHANG Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate[J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(2): 85-95.
- [25] PULLMAN G S, BUCALO K. Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development[J]. *New Forest*, 2014, 45(3): 353-377.
- [26] GUPTA P K, DURZAN D J. Shoot multiplication from mature trees of douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*)[J]. *Plant Cell Rep*, 1985, 4(4): 177-179.
- [27] LITVAY J D, VERMA D C, JOHNSON M A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.)[J]. *Plant Cell Rep*, 1985, 4(6): 325-328.
- [28] NUNES S, MARUM L, FARINHA N, et al. Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii*×*P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2018, 132(1): 71-84.
- [29] 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2003, 27(1): 75-80.
- [30] 杨玲. 花楸种子生物学和体细胞胚发生体系研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [31] 王高. 红松体细胞胚胎发生及超低温保存技术研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [32] NEWTON R J, TANG W, JAIN S M. Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.)[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2005: 1-10.
- [33] JAIN S M, DONG N, NEWTON R J. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured *in vitro*[J]. *Plant Sci*, 1989, 65(2): 233-241.
- [34] 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛. 湿地松体细胞胚胎发生和植株再生[J]. *植物资源与环境学报*, 1997, 6(2): 8-11.

【责任编辑 李晓卉】