

# 油松未成熟合子胚离体培养诱导胚性愈伤组织

马丽源<sup>1</sup>, 张 瑛<sup>1</sup>, 尚福强<sup>1,2</sup>, 姚荣升<sup>2</sup>, 崔建国<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁省森林经营研究所, 辽宁 丹东 118002)

**摘 要:**研究了油松未成熟合子胚不同发育时期和不同植物生长调节剂组合对油松胚性愈伤组织诱导的影响。结果表明:在沈阳地区,油松未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织的最佳采种时间为7月10日左右;以DCR为基本培养基,添加较低浓度的KT和较高浓度的2,4-D有利于油松胚性愈伤组织的诱导,其中以添加2,4-D 2 mg/L和KT 0.5 mg/L时诱导率最高,可达88.3%。

**关键词:**油松;胚性愈伤组织;未成熟合子胚;体胚发生

**中图分类号:**S 791.254 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)07-0126-04

油松(*Pinus tabulaeformis*)原产我国,广泛分布于我国北方地区。其作为北方主要造林树种之一,不仅是重要的松脂及木材生产资源,也是园林常用观赏绿化树种及行道树。油松良种繁育的主要途径是建立种子园,但存在投资成本高、结实较晚,种子产量低等问题。目前,组织培养技术,尤其是体胚发生技术在林木良种繁育中的应用越来越受到重视。体胚发生繁殖系数大、周期短,且不受季节环境等条件的影响,被广泛应用于产业化工程育苗、人工种子、植物的遗传改良和转化等领域<sup>[1-2]</sup>。据报道,国内外成功诱导出体胚的针叶树种已有30多种<sup>[3-6]</sup>。

目前油松组织培养以成熟合子胚培养为主,大多数诱导出的是非胚性愈伤组织<sup>[7]</sup>和不定芽<sup>[8-13]</sup>,而关于油松体胚发生及植株再生的研究较少,油松未成熟胚培养诱导体胚的研究尚未见报道。研究表明,胚性愈伤组织的诱导是体胚发生的关键<sup>[14]</sup>,而利于体胚诱导的最佳外植体应选用分化程度较低的组织<sup>[15]</sup>。因此,该试验采用油松未成熟合子胚(Immature zygotic embryos,以下简称IZE)为材料,旨在研究不同采种时间以及植物生长调节剂对油松胚性愈伤组织诱导的影响,为油松体胚发生体系的建立提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011年6月10日至8月9日在沈阳农业大学校园内选取生长健壮、无病虫害的优良结实油松采集球果,

每10 d采集1次。将每次采集到的油松球果随机混合放入透气的牛皮纸袋中,并将其放入4℃冰箱内保存48 h以上,备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 从球果中取出未成熟种子,流水冲洗2 h,之后在超净工作台上将其用70%酒精浸泡3 min,无菌水冲洗3次,再用0.1%升汞(HgCl<sub>2</sub>)消毒3~4 min,最后再用无菌水冲洗3~5次,用解剖刀去除种壳和种皮备用。

1.2.2 植物生长调节剂种类及最佳浓度配比的筛选试验 以DCR为基本培养基,同时添加(1、2 mg/L)2,4-D+(0.5、1.0、2.0 mg/L)KT和500 mg/L水解酪蛋白(CH)、500 mg/L L-谷氨酰胺,筛选出2,4-D和KT最佳浓度配比组合。每种培养基均附加3.0%蔗糖,0.6%琼脂,pH 5.8。

1.2.3 合子胚采样时期试验 将采摘的7批(6月10、20、30日,7月10、20、30日,8月9日)未成熟合子胚接种于1.2.2筛选出来的培养基上,暗培养。

### 1.3 培养及统计

每4个种胚接种至1个培养皿(90 mm),各个处理接种10皿(共40个外植体)。3次重复。培养室温度(25±3)℃,相对湿度60%~70%,将所有处理置于消毒后的纸箱内,使其密闭不透光,进行暗培养。每隔1周观察并记录外植体生长情况。4~5周后记录油松胚性愈伤诱导的情况,数据分析处理采用SPSS 13.0及Excel软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同采种时期对胚性愈伤组织诱导的影响

6月10日至7月10日采集的种子,颜色透明至浅黄色,长约0.3~0.5 mm,种胚处于发育早期,在接种过程中,由于其过于幼嫩,不能将体胚与大配子体分离,需

**第一作者简介:**马丽源(1986-),女,硕士,现从事林木生物技术研究工作。E-mail:ml\_y\_19861221@yahoo.com.cn。

**责任作者:**崔建国(1969-),男,博士,教授,现从事林木生物技术和林木遗传改良研究工作。E-mail:cjgsau@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2011-12-21

将除去种壳及种皮的带有大配子体的种胚作为外植体进行接种(图 1-a)。7 月 20 日以后采集的种子,肉眼可见胚发育成形,且易于与大配子体分离,接种时用解剖刀取出其 IZE 作为外植体(图 1-b、c)。

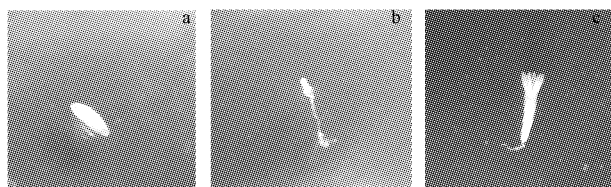


图 1 处于不同发育阶段的油松 IZE 接种的形态

Fig. 1 The morphology of immature zygotic embryo of *Pinus tabulaeformis* at different developmental stages

将采集的处于不同发育阶段的油松 IZE 作为外植体,接种至添加有不同浓度配比组合的 2,4-D 和 KT 的 DCR 培养基上,暗培养 30 d 后,均诱导出数量且形态不同的愈伤组织。从图 2 可看出,油松 IZE 各个采种时期的胚性愈伤诱导率差异较大。其中,6 月 30 日之前采集的种子诱导率最低,几乎为零,可能由于种胚尚未发育,无法诱导愈伤。7 月 10 日之后,随着采集日期的推移,诱导率降低,可能因为种胚发育程度越高,分化能力差,越不易诱导胚性愈伤。方差分析表明,不同采种时期对油松胚性愈伤的诱导存在显著差异,7 月 10 日采得的 IZE 的胚性愈伤诱导率最高,平均诱导率达到 53.3%。其次为 7 月 20 日和 6 月 30 日,诱导率分别为 42.7% 和 35.2%。

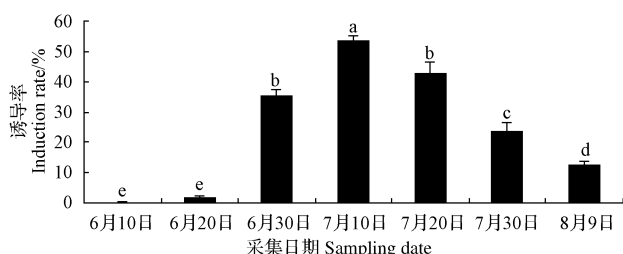


图 2 不同采种时期的胚性愈伤诱导率

Fig. 2 The induction rate of embryogenic callus at different sampling date

对接种后的外植体进行观察,结果表明,6 月 10~20 日的 IZE 接种 30 d 后,形体无明显变化,而大配子体表面也毫无愈伤形成;6 月 30 日接种的 IZE 在培养 30 d 后,大配子体体积增加,而在大配子体表面有少许因体积膨大造成的伤口,在伤口附近有少量的透明、水渍状愈伤,另有一部分外植体在珠孔附近有少量透明丝状愈伤组织。7 月 10 日接种的 IZE 在培养 30 d 后,可观察到大配子体珠孔附近产生大量的白色至透明的组织,这种组织具有黏性,从珠孔处喷射而出(图 3-a),将其放至显微镜下可观察到其中有长条状细丝组织,而这些组织具有明显的胚头及细丝状胚柄结构(图 4-a、b),这种胚

状体的胚头部分含有大量的细胞核,从而能够进一步分化成具有多个胚头的愈伤组织(图 4-c)。这种胚性组织常被称为胚性胚柄细胞团(Embryogenic Suspensor Mass,即 ESM),其形态结构与合子胚发育至 2~4 阶段的形态相似<sup>[16]</sup>。吴丽君<sup>[17]</sup>在对长叶松胚性愈伤的诱导研究中表明,若以未成熟合子胚为外植体,则种胚会先在大配子体内产生胚性组织后,再从珠孔末端伸出, Pullman G S 等<sup>[18]</sup>将此过程叫做 Extrusion,当胚性组织大量产生并聚集于珠孔附近时,称为 Initiation,并认为体胚将发生于接种后的 5~7 周,即 Extrusion 之后。对于 7 月 30 日和 8 月 9 日采集的这 2 批成熟度较高的合子胚而言,接种 1 周后观察发现,产生的愈伤组织主要集中在胚轴部分,且其分化能力较差,均呈现透明状、水渍化,而胚根处分化的愈伤极易褐化,属于非胚性愈伤。而其它处理培养基上接种的胚基本无愈伤形成,子叶呈乳白色至浅绿色,呈现扭曲生长,伸长至 1~2 cm。这可能是由于其发育程度较高,分化能力差,而造成胚的直接发育,而未形成愈伤。由以上分析可知,在沈阳地区,对油松胚性愈伤诱导的 IZE 的最佳采集期为 7 月 10 日前后。

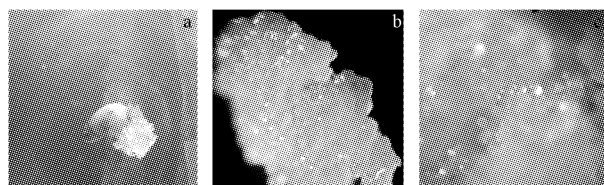


图 3 外植体上生长的胚性愈伤组织(a:1×;b:4×;c:10×)

Fig. 3 Calluses grown from zygotic embryo after 30 days culture(a:1×;b:4×;c:10×)



图 4 显微镜下观察到的 ESM(10×)

Fig. 4 Embryogenic suspensor mass under microscope (10×)

## 2.2 不同植物生长调节剂组合对胚性愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂种类和浓度对胚性愈伤组织的诱导起着至关重要的作用<sup>[20]</sup>。为此,以 DCR 为基本培养基,研究了不同植物生长调节剂组合对在最佳采种时期,即 7 月 10 日(图 2)采集的油松 IZE 胚性愈伤诱导的影响。从表 1 可看出,在 2,4-D 浓度相同,KT 浓度较低时,诱导率较高;而在 KT 浓度相同,2,4-D 浓度较高时,诱导率较高。说明较低浓度的 KT 和较高浓度的 2,4-D 配合有利于诱导油松胚性愈伤。不同植物生长调节剂(2,4-D 和 KT)配比对油松胚性愈伤的诱导存在显著差

异,以添加 2 mg/L 的 2,4-D 和 0.5 mg/L 的 KT 时的诱导率最高,达到 88.3%。

表 1 最佳采种时期不同激素配比对胚性愈伤组织诱导的影响

Table 1 The induction rate of embryogenic callus on medium with different concentrations and combinations of 2,4-D and KT at the optimal time of sampling the immature zygotic embryo

处理 Treatment	激素种类 Hormone type		诱导率 Induction rate / %
	2,4-D/mg · L <sup>-1</sup>	KT/mg · L <sup>-1</sup>	
1	1.0	0.5	48.4±3.2c
2	1.0	1.0	45.7±2.1e
3	1.0	2.0	27.3±1.9f
4	2.0	0.5	88.3±3.6a
5	2.0	1.0	63.1±2.4b
6	2.0	2.0	47.2±0.7d

注:同一列不同的字母表示显著差异( $P<0.05$ ,使用邓肯氏多重比较)。

Note: Significant differences ( $P<0.05$  using Duncan's multiple range test) among treatments in the same column are indicated by different letters.

### 3 结论与讨论

研究表明,外植体的种类和生理状态及发育程度直接影响体细胞胚的发生<sup>[20]</sup>,生理代谢旺盛且分化程度较低的外植体有利于体细胞胚的诱导。但松属作为针叶树中最重要的造林及用材树种,其体胚发生仍存在体胚发生频率低、不能达到同步化、发育过程中常常形成畸形或无根苗等困难。在我国,周巧云等<sup>[7]</sup>用油松成熟种胚诱导愈伤组织,诱导率达 66%<sup>[7]</sup>。近几年,也相继有红松、白皮松、长叶松等体胚诱导的报道<sup>[2,21]</sup>,但均未有成熟体细胞胚胎的发生。

胚性愈伤组织的诱导是体胚发生的前提条件。在体胚发生过程中,外植体的种类和发育阶段、外植体的基因型、培养基与激素的配比组合、添加物的种类和浓度、光照培养条件等均是重要的影响因素。针叶树的体胚发生需要较低的含氮量,因此诱导培养基常选用 DCR 培养基<sup>[22]</sup>,并且在诱导培养基中添加适量的 L-谷氨酰胺和 CH 有助于提高诱导率<sup>[23]</sup>。Pullman G S 等<sup>[18]</sup>研究表明,外植体接种前进行冷处理(2~4℃)1 周以上,也能够有效提高诱导率。因此,该试验以处于不同发育时期的油松 IZE 为材料,在冷冻预处理之后,接种至添加有 2,4-D 2 mg/L、KT 0.5 mg/L 以及 500 mg/L 的 L-谷氨酰胺和 CH 的 DCR 培养基中,同时在暗培养条件下,成功诱导获得 ESM。对于体胚发生而言,在以 IZE 为外植体时,胚的发育时期对体胚诱导起决定性作用,最适宜用作诱导胚性愈伤的外植体是早期 IZE(2~4 阶段),即处于胚顶端分生组织原基尚未能够明显可见的发育阶段<sup>[18]</sup>。该试验中油松 IZE 的胚性愈伤诱导率最高约为 88.3%,而李茜等<sup>[24]</sup>以白皮松 IZE 为材料,诱导率达到 97.2%,可能由于该试验未成熟胚采集间隔期约为 10 d,因为间隔期较长以至于错过最优采样时期,因此有必要

进一步缩短采集间隔期,并优化试验条件以提高油松的胚性愈伤诱导率。

### 参考文献

- [1] 孙志强,孙占育,席梦利. 针叶树体细胞胚胎发生研究进展[J]. 林业科技开发,2010,24(4):1-5.
- [2] 温伟,崔建国,张翌,等. 松属树种体胚发生研究进展[J]. 辽宁林业科技,2010(3):44-47.
- [3] 祝朋芳,罗凤霞,陈长青,等. 日本落叶松胚性愈伤组织的诱导及体胚的形成[J]. 辽宁农业科学,2001(5):46-47.
- [4] 贺凤美,王力,刘阳. 落叶松体细胞发生研究进展[J]. 辽宁林业科技,2000(6):33-35.
- [5] 郑均宝,王进茂,杜克久,等. 油松体细胞无性系的建立[J]. 遗传学报,2000,24(1):1-6.
- [6] 唐巍. 火炬松胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 林业科学,1998,4(3):115-119.
- [7] 周巧云,郑彩霞,赵程亮. 油松种胚愈伤诱导的初探[J]. 江西农业大学学报,2007,29(3):409-412.
- [8] 董丽芬,肖颖,邵崇斌. 氮、磷、钾元素形态配比及浓度对油松胚培养的影响[J]. 西北林学院学报,2006,21(3):64-66.
- [9] 贺娜,郑彩霞,周巧云. 油松成熟胚的不定芽诱导及植株再生试验[J]. 现代农业科技,2009(16):145-148.
- [10] 李慧,张茜,付文锋. 离体条件下油松成熟合子胚不定芽的形成[J]. 北京林业大学学报,2010,32(5):111-115.
- [11] Kong D M, Wan T. Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.) [J]. Bulletin of Botanical Research, 2010, 30(6):668-673.
- [12] 王海波,唐德瑞,马佩. 培养基和生长调节剂对油松离体胚不定芽诱导的影响[J]. 北方园艺,2010(12):149-151.
- [13] 温伟,林梅,魏爽,等. 油松成熟胚的不定芽诱导及植株再生[J]. 辽宁林业科技,2010(5):17-18.
- [14] 张朝军,李付广,张玲. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 棉花学报,2008,20(2):141-147.
- [15] 崔凯荣,陈克明,王晓哲,等. 植物体细胞胚发生研究的某些现状[J]. 植物学通报,1993,10(3):14-20.
- [16] 吴丽君,叶健仁. 火炬松体胚发生与几种专利培养基的应用[J]. 南京林业大学学报,2008,32(1):1-5.
- [17] 吴丽君. 长叶松优良家系的体胚发生研究[J]. 福建林学院学报,2008,28(1):42-47.
- [18] Pullman G S, Bucalo K, John M W. Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants [M]// Thorpe T A, Yeung E C. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2011: 267-285.
- [19] Jones N B, van Staden J. Plantlets production from somatic embryo of *Pinus patula* [J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 145: 519-525.
- [20] Mott R L, Amerson H V, Frampton J. Annual progress report: Special project on tissue culture [J]. Agriculture Research Service, 1987: 145.
- [21] 吴涛,陈少瑜,陈芳,等. 思茅松胚性愈伤组织的诱导[J]. 中南林业科技大学学报,2007,27(5):74-78.
- [22] Ellis D. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration [J]. Bio. Technology, 1993, 11: 84-89.
- [23] 唐巍,欧阳藩,郭仲琛. 火炬松胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 林业科学,1998,34(3):115-119.
- [24] 李茜,张存旭,郑瑞杰. 白皮松胚性愈伤组织诱导因素的研究[J]. 西北林学院学报,2006,21(2):80-83.



# 蓝莓组织培养工厂化育苗技术

杨艳敏<sup>1</sup>, 陶承光<sup>2</sup>, 魏永祥<sup>1</sup>, 王兴东<sup>1</sup>, 刘成<sup>1</sup>, 魏鑫<sup>1</sup>

(1. 辽宁省果树科学研究所, 辽宁 熊岳 115009; 2. 辽宁省农业科学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**以“斯巴坦”、“北陆”、“伯克利”3个蓝莓品种为试材,研究了外植体最佳灭菌时间、增殖培养基及生根培养基,并研究了瓶外最佳海藻素生根浓度。结果表明:“斯巴坦”外植体处理最佳灭菌时间为  $\text{HgCl}_2$  7 min,灭菌效果好、伤芽少;蓝莓组培快繁以 WPM 为基本培养基,附加 ZT 0.5 mg/L、IBA 0.1 mg/L、 $\text{GA}_3$  0.5 mg/L 为最佳增殖培养基;1/2WPM+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L 培养基生根效果最好;瓶外生根最佳海藻素浓度为 667 mg/L。

**关键词:**蓝莓;组织培养;瓶外生根

**中图分类号:**S 663.203.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)07-0129-03

蓝莓果实中富含花青苷、鞣化酸等抗氧化物质,具有解除眼睛疲劳、改善视力、抗癌、延缓脑神经衰老、增强记忆力、防止心血管疾病、提高人体免疫力等功效<sup>[1]</sup>。颇受全球消费者青睐,被列为人类五大健康水果之一,堪称 21 世纪“世界水果之王”。因此,为了满足日益增长的市场需求,加快蓝莓产业的发展,常规的繁殖方式难以满足市场对苗木的需求,进而促进了对对其进行组织培养快繁技术的研究,并获得了理想的结果。

**第一作者简介:**杨艳敏(1975-),女,本科,助理研究员,现从事小浆果遗传改良及生物技术工作。E-mail:yymzcb@163.com。

**责任作者:**陶承光(1955-),男,研究员,博士生导师,现从事农业科研管理及花卉与蔬菜和小浆果研究工作。

**基金项目:**辽宁省科技攻关资助项目(2011204001);农业部公益性行业专项资助项目(201103037);科技部成果转化资金资助项目(2011GB2B000013)。

**收稿日期:**2012-01-14

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试蓝莓品种为“斯巴坦”、“北陆”、“伯克利”,在生长季节晴天上午采集当年生健壮枝条,去除叶片,剪成 1.5 cm 左右含单芽的茎段<sup>[2]</sup>,用流水冲洗 2~3 h,置超净工作台上用 75% 的酒精消毒 30 s 后,再用 0.1% 升汞( $\text{HgCl}_2$ )消毒,设置消毒时间为 3、5、7 和 10 min 4 个处理,无菌水荡洗 3 次,每处理 10 个茎段,3 次重复,2 周后观察处理效果。

### 1.2 试验方法

1.2.1 增殖培养 诱导培养基为 WPM+ZT(玉米素) 1.0 mg/L+ $\text{GA}_3$  0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L;增殖培养供试品种为“斯巴坦”、“北陆”、“伯克利”,培养基筛选,只加玉米素设 5 个处理, WPM+ZT (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mg/L);ZT 与 IBA 配合使用以“伯克利”为试材,设 5 个

## Induction of Embryonic Calluses by *in vitro* Culture of Immature Zygotic Embryo of *Pinus tabulaeformis*

MA Li-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, SHANG Fu-qiang<sup>1,2</sup>, YAO Rong-sheng<sup>2</sup>, CUI Jian-guo<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Liaoning Institute of Forest Management, Dandong, Liaoning 118002)

**Abstract:** Effects of different developmental stages of immature zygotic embryo of *Pinus tabulaeformis* and different combination of plant growth regulators on induction of embryogenic calluses were studied. The results showed that the optimal time of sampling the immature zygotic embryo for induction of embryogenic calluses in Shenyang region of China was around 10<sup>th</sup> of July; and when DCR was adopted as the basal medium, combination of low concentration of KT and high concentration of 2,4-D was favorable the induction of embryogenic calluses. The highest initiation rate was up to 88.3% on DCR medium when 2 mg/L of 2,4-D and 0.5 mg/L of KT were added.

**Key words:** *Pinus tabulaeformis*; embryogenic calluses; immature zygotic embryo; somatic embryogenesis