

doi: 10.11707/j.1001-7488.20140406

云杉未成熟合子胚诱导体细胞胚胎发生*

张建伟¹ 王军辉¹ 李青粉¹ 马建伟²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所 国家林业局林木培育重点实验室 北京 100091; 2. 甘肃省小陇山林业科学研究所 天水 741022)

摘 要: 以云杉未成熟合子胚为外植体,研究球果采集日期、基因型、植物生长素和细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响,同时对影响体细胞胚分化和成熟的关键因素进行探讨。结果表明:合适的胚性愈伤组织诱导和增殖培养基为 1/2 LM + 2,4-D 2.2 mg·L⁻¹ + 6-BA 1.1 mg·L⁻¹ + 蔗糖 10 g·L⁻¹ + 凝胶 2 g·L⁻¹ + 酶解酪蛋白 1 g·L⁻¹; 合适的分化培养基为 1/2 LM + ABA 24 mg·L⁻¹ + PEG4000 50 g·L⁻¹ + 蔗糖 30 g·L⁻¹ + 活性炭 1 g·L⁻¹ + 凝胶 4 g·L⁻¹ + 水解酪蛋白 1 g·L⁻¹; 合适的萌发培养基为 1/4 LM + 蔗糖 20 g·L⁻¹ + 活性炭 1 g·L⁻¹ + 凝胶 4 g·L⁻¹ + 水解酪蛋白 1 g·L⁻¹。以上培养基中均附加谷氨酰胺 0.5 g·L⁻¹, pH 5.8。

关键词: 云杉; 体细胞胚胎发生; 胚性愈伤组织; 成熟体细胞胚

中图分类号: S718. 46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001 - 7488 (2014) 04 - 0039 - 08

Somatic Embryogenesis of *Picea asperata* Induced from Immature Embryos

Zhang Jianwei¹ Wang Junhui¹ Li Qingfen¹ Ma Jianwei²

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091; 2. Xiaolongshan Forestry Research Institute, Tianshui, Gansu Province Tianshui 741022)

Abstract: Immature zygotic embryos of *Picea asperata* were used as explants to investigate effects of cone collection dates, genotypes, different concentration of auxin and cytokinin on the induction of embryogenic callus. At the same time, the key factors affecting the differentiation and maturation of somatic embryos were also comprehensively investigated. The results showed that the optimal medium for induction and proliferation of embryogenic callus was 1/2 LM + 2.2 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.1 mg·L⁻¹ 6-BA + 10 g·L⁻¹ sucrose + 2 g·L⁻¹ gellan gum + 1 g·L⁻¹ casein hydrolysate. The best medium for differentiation of somatic embryos was 1/2 LM + 24 mg·L⁻¹ ABA + 50 g·L⁻¹ PEG4000 + 30 g·L⁻¹ sucrose + 1 g·L⁻¹ activated charcoal + 4 g·L⁻¹ gellan gum + 1 g·L⁻¹ casein hydrolysate. The suitable medium of germination was 1/4 LM + 20 g·L⁻¹ sucrose + 1 g·L⁻¹ AC + 4 g·L⁻¹ gellan gum + 1 g·L⁻¹ casein hydrolysate. All medium was supplemented with 0.5 g·L⁻¹ L-glutamine, and adjusted to pH 5.8.

Key words: *Picea asperata*; somatic embryogenesis; embryogenic callus; mature somatic embryos

植物体细胞胚胎发生作为一种高效的无性繁殖技术,是利用植物细胞工程手段实现植株再生的重要途径之一。自 Hakman 等(1985)首次利用欧洲云杉(*Picea abies*)未成熟合子胚为外植体实现针叶树体胚发生以来,体细胞胚胎发生技术对针叶树种的研究产生了重要影响。传统的针叶树种繁殖方法为种子繁殖和扦插繁殖;种子繁殖具有遗传变异大、性状遗传不稳定等缺点,而扦插繁殖存在繁殖系数低的不足。在针叶树种的育种工作中,通过体细胞胚胎发生和植物细胞超低温保存技术相结合的策略,可以在很大程度上解决这些难题(Nørgaard et

al., 1993; Touchell et al., 2002; Gale et al., 2008; Krajňáková et al., 2011)。这种策略具体为:首先获得大量的胚性细胞系,将某一个细胞系的一部分细胞分化成体细胞胚并形成植株,进行田间对比试验,筛选优良细胞系,同一个细胞系的另一部分细胞则进行超低温保存;对于筛选得到的优良细胞系,将遗传信息一致的超低温保存材料,通过体胚发生技术进行大规模繁殖,以实现良种的有效使用。而这种育种策略实现的前提,首先是获得高效的体细胞胚胎发生技术体系。利用体细胞胚胎发生技术,避免了针叶树种结实晚、种子遗传变异大和扦插繁殖

收稿日期: 2013 - 05 - 27; 修回日期: 2013 - 10 - 09。

基金项目: “十二五”国家科技支撑项目“北方针叶树种高世代育种技术研究示范”(2012BAD01B01)。

* 王军辉为通讯作者。

系数低的风险,加快了良种的使用进程,同时对推动针叶树种无性系林业的发展也起到了重要作用。

云杉属(*Picea*)树种全世界约 40 种,我国云杉属树种资源丰富,有 16 种 9 变种(中国植物志编辑委员会,1978)。白云杉(*P. glauca*)(Lu *et al.*, 1987)、黑云杉(*P. mariana*)(Tautorus *et al.*, 1990)、红云杉(*P. rubens*)(Harry *et al.*, 1991)、欧洲云杉(Hakman *et al.*, 1985)、库页云杉(*P. glehnii*)(Ishii, 1995)、西加云杉(*P. sitchensis*)(Krogstrup *et al.*, 1988)、恩氏云杉(*P. engelmannii*)(Webster *et al.*, 1990)、塞尔维亚云杉(*P. omorika*)(Budimir *et al.*, 1992)等云杉属树种的体细胞胚胎发生技术已有报道。然而,尽管欧洲云杉、白云杉和黑云杉等树种的体细胞胚胎发生技术已经用于生产实践,云杉属仍然有很多树种的体胚发生技术不成熟。目前,以欧洲云杉为代表的云杉属树种的体细胞胚胎发生研究,被认为是针叶树体细胞胚胎发生研究的一类模式植物研究;已经开展了从细胞学水平到分子水平的全面探索,尤其是刚刚完成的欧洲云杉(Nystedt *et al.*, 2013)和白云杉(Birol *et al.*, 2013)的全基因组测序图谱,对阐明针叶树种的体细胞胚胎发生机制将发挥巨大作用。从 20 世纪 80 年代以来,国内相继对原产我国的云杉属树种的体细胞胚胎发生进行了研究,其中,青杆(*P. wilsonii*)(李映红等,1990)、白杆(*P. meyeri*)(杨金玲等,1997)、红皮云杉(*P. koraiensis*)(刘宝光等,2009)、沙地云杉(*P. mongolica*)(郭小兵等,2009)、丽江云杉(*P. likiangensis*)(陈芳等,2010)的体细胞胚胎发生研究已有报道;然而,上述研究通常存在胚性愈伤组织诱导率低、体细胞胚分化差且同步化程度不高不足。

云杉(*Picea asperata*)为我国特有种,其生长快、适应性强、材质优良,多分布在海拔 2 400 ~ 3 600 m 的高山丘陵地带(中国植物志编辑委员会,1978);云杉是川西高原、甘肃南部和陕西西南部等亚高山地区的主要造林树种,也是该地区森林演替的顶极群落和地带性植被的建群种(四川省粗枝云杉纸浆材协作组,2001;罗建勋等,2006)。目前,云杉的繁殖以种子繁殖和扦插繁殖为主(罗建勋等,2006;李奇等,2007)。关于云杉的体细胞胚胎发生的研究尚无报道。本文以云杉未成熟合子胚为外植体,研究了球果采集日期、基因型和植物生长调节剂对胚性愈伤组织诱导的影响,对影响体细胞胚分化的多个关键因素进行探讨,建立了稳定且同步化程度较高的云杉体细胞胚胎发生技术体系,为实现体细

胞胚的工厂化育苗奠定了理论基础并提供了切实可行的方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

云杉未成熟球果采自甘肃省小陇山林业实验局林业科学研究所,球果来源于云杉国家级种质资源库中结实量大、树干通直且生长相对一致的 3 株母树(即 3 个基因型),采集日期分别为 2011 年 07 - 17, 07 - 27, 08 - 07, 08 - 17, 08 - 27, 09 - 06, 09 - 16 和 09 - 26,每个单株每次采集 10 个球果,及时接种(图 1a, b, c)。

1.2 外植体消毒与接种

将未成熟球果在无菌条件下用 95% 的酒精浸泡 15 min,随后用无菌水冲洗 3 次,即完成消毒过程。在超净工作台上,用解剖刀从灭菌的球果中取出未成熟种子;在解剖镜下将未成熟的合子胚从种子中取出,直接接种在约有 35 mL 培养基的直径为 90 mm 的培养皿中,每个处理设置 3 个重复,一皿一个重复,每个皿中接种 10 个完整的未成熟胚。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 胚性愈伤组织诱导培养基 采用 1/2LM 培养基(Litvay *et al.*, 1985)为基本培养基,2,4-D 浓度分别为 1.1, 2.2, 3.3 mg · L⁻¹,6-BA 浓度分别为 0.55, 1.1, 2.2 mg · L⁻¹,培养基中附加蔗糖 10 g · L⁻¹,凝胶(Sigma#)2 g · L⁻¹,酶解酪蛋白(Sigma#)1 g · L⁻¹,谷氨酰胺(过滤灭菌, Sigma#)0.5 g · L⁻¹, pH5.8。生长调节剂的不同浓度、3 个基因型和 8 个采集日期间采用完全随机区组设计,共计 216 个处理。(23 ± 1) °C 下暗培养,7 周后统计诱导结果。

1.3.2 胚性愈伤组织保持和增殖培养基 1/2LM + 2,4-D 2.2 mg · L⁻¹ + 6-BA 1.1 mg · L⁻¹。蔗糖 10 g · L⁻¹,凝胶 2 g · L⁻¹,酶解酪蛋白 1 g · L⁻¹,谷氨酰胺 0.5 g · L⁻¹, pH5.8。继代转接时挑选最新生长的胚性愈伤组织,每 2 周转接 1 次,(23 ± 1) °C 下暗培养。

1.3.3 体细胞胚成熟培养基 以 2333 号胚性细胞系为分化材料,1/2LM 为基本培养基,设置脱落酸(ABA,过滤灭菌, Gibco#)8, 12, 16, 24 mg · L⁻¹;聚乙二醇(PEG4000, Merck#)0, 25, 50, 75 g · L⁻¹;蔗糖 10, 30, 60, 90 g · L⁻¹;活性炭(Sigma#)0, 1, 3, 5 g · L⁻¹;凝胶 2, 4, 6, 8 g · L⁻¹。附加水解酪蛋白(Sigma#)1 g · L⁻¹,谷氨酰胺 0.5 g · L⁻¹, pH5.8。试验采用 5 因素 4 水平的正交试验设计 L₁₆(4⁵)。每个培养皿中放置 1 张 Whatman 滤纸,将 1 g 左右的

胚性愈伤组织平铺到滤纸上; 每个处理设置4个重复, 一皿一个重复, (23 ± 1) °C下暗培养, 6周后统计体细胞胚的诱导结果。

1.3.4 体细胞胚萌发培养基 1/4LM 为基本培养基, 不添加激素, 附加活性炭 1 g·L⁻¹, 蔗糖 20 g·L⁻¹, 水解酪蛋白 1 g·L⁻¹, 谷氨酰胺 0.5 g·L⁻¹, 凝胶 4 g·L⁻¹, pH5.8。将发育正常的体细胞胚水平放置在培养基上, 培养皿倾斜 45° 放置。第1周黑暗培养; 第2周 20 μmol·m⁻²·s⁻¹光照下培养, 并用2层报纸遮盖; 之后 20 μmol·m⁻²·s⁻¹全光照培养; 光周期为 16 h 光照, 8 h 黑暗。(23 ± 1) °C下培养。

1.4 数据统计方法

胚性愈伤组织诱导频率(%) = 诱导出胚性愈伤组织的未成熟胚个数/接种的未成熟胚个数 × 100%; 分化接种量 = 接种胚性愈伤组织后的培养皿质量 - 接种前的培养皿质量 - 滤纸质量; 成熟体细胞胚的诱导率(胚·g⁻¹) = 培养皿中分化的体细胞胚数/分化接种量。百分率数据先进行反正弦转换再进行分析, 数据采用 SPSS 16.0 进行方差分析, 最小显著差数法(LSD法)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导

诱导试验采用对球果直接灭菌、然后剥取未成熟胚进行诱导的方法。该方法避免了对外植体的伤害, 可使污染率控制在1%以内。未成熟胚接种到愈伤组织诱导培养基中3天后, 合子胚开始启动, 具体表现为胚膨大, 胚轴基部有褐色突起出现, 子叶分化出“点状突起”; 1周后整个合子胚转变为愈伤组织, 2周后胚性愈伤组织开始出现, 随后胚性愈伤组织增殖连同非胚性愈伤组织逐渐长大, 6~7周后即可将胚性愈伤组织单独分开增殖。非胚性愈伤组织多由胚轴分化而来, 生长快速, 多数为褐色颗粒状, 分化时不能够产生正常的体细胞胚; 胚性愈伤组织多数由子叶分化的“点状突起”转化而来, 具体表现为白色、透明、黏稠、丝状, 且具备分化出发育正常的体细胞胚的能力(图1d, e)。所有诱导处理中, 愈伤组织诱导率近乎100%, 胚性愈伤组织诱导率差异显著。

2.1.1 球果采集日期对胚性愈伤组织诱导的影响 球果采集日期对云杉胚性愈伤组织诱导率有极显著($P < 0.01$)影响, 多重比较见表1。其中, 7月17日采集的球果获得的胚性愈伤组织诱导率和其他采集日期相比提高显著, 平均诱导率为35.25%, 最高可达到65%以上; 到7月27日时, 胚性愈伤组织诱导

率开始极显著降低; 9月16日开始, 诱导率极显著地降低到1%以下甚至不能诱导出胚性愈伤组织。由此可知, 云杉胚性愈伤组织诱导的最佳球果采集日期应该为7月17日, 即7月中旬, 最迟不能超过7月27日, 否则会极显著降低胚性愈伤组织的诱导效果。

表1 球果采集日期对胚性愈伤组织诱导的影响^①

Tab.1 Effect of cone collection dates on the induction of embryogenic callus

球果采集日期 Cone collection date	外植体数 Number of explants	诱导率 Induction frequency (±SD) (%)
07-17	810	35.25 ± 23.71 A
07-27	810	25.64 ± 17.62 B
08-07	810	12.19 ± 9.46 C
08-17	810	13.01 ± 12.68 C
08-27	810	15.46 ± 14.84 C
09-06	810	15.09 ± 14.80 C
09-16	810	0.25 ± 1.56 D
09-26	810	0 D

①不同大写字母表示0.01水平差异极显著, 相同字母不显著。下同。Different capital letters indicate significant differences at $P = 0.01$, and same letters are not different at a level $P > 0.05$. The same below.

2.1.2 基因型对胚性愈伤组织诱导的影响 基因型对云杉胚性愈伤组织诱导率有极显著($P < 0.01$)影响, 多重比较见表2。以基因型2的胚性愈伤组织诱导率最高, 平均达到21.78%。在胚性愈伤组织诱导能力方面, 基因型1号和3号无显著性差异, 且二者均比2号基因型低10%左右。说明开展云杉体细胞胚胎发生研究时, 应当加大基因型的选择范围, 以筛选得到较高胚性愈伤组织诱导能力的基因型, 进而加快体胚繁育进程。

表2 基因型对胚性愈伤组织诱导的影响

Tab.2 Effect of genotypes on the induction of embryogenic callus

基因型 Genotype	外植体数 Number of explants	诱导率 Induction frequency (±SD) (%)
1	2160	15.60 ± 14.08 A
2	2160	21.78 ± 21.32 B
3	2160	10.90 ± 14.20 A

2.1.3 2,4-D对胚性愈伤组织诱导的影响 2,4-D对云杉胚性愈伤组织诱导率有极显著($P < 0.01$)影响, 多重比较见表3。2.2 mg·L⁻¹ 2,4-D处理下的胚性愈伤组织诱导率最高, 平均为17.14%; 2,4-D浓度为2.2 mg·L⁻¹处理和3.3 mg·L⁻¹处理间无显著性差异, 但是二者与1.1 mg·L⁻¹处理下的胚性愈伤组织诱导率相比均有极显著升高。高浓度的植物生长素不利于胚性愈伤组织的增殖和分化, 本试验

选择 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为植物生长素 2,4-D 的最佳浓度。

表 3 2,4-D 对胚性愈伤组织诱导的影响

Tab. 3 Effect of 2,4-D on the induction of embryogenic callus

2,4-D 浓度 2,4-D concentration / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体数 Number of explants	诱导率 Induction frequency ($\pm \text{SD}$) (%)
1.1	2 160	10.70 \pm 14.20 A
2.2	2 160	17.14 \pm 20.43 B
3.3	2 160	16.0 \pm 17.53 B

2.1.4 6-BA 对胚性愈伤组织诱导的影响 6-BA 对云杉胚性愈伤组织诱导率有极显著 ($P < 0.01$) 影响,多重比较见表 4。其中,6-BA 浓度为 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理和 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理间无显著性差异,但是二者与 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下的胚性愈伤组织诱导率相比均极显著降低。以 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理下的胚性愈伤组织诱导率最高,平均为 16.58%。

表 4 6-BA 对胚性愈伤组织诱导的影响

Tab. 4 Effect of 6-BA on the induction of embryogenic callus

6-BA 浓度 6-BA concentration / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体数 Number of explants	诱导率 Induction frequency ($\pm \text{SD}$) (%)
0.55	2 160	13.87 \pm 17.60 A
1.1	2 160	16.58 \pm 19.13 B
2.2	2 160	13.39 \pm 16.39 A

2.2 胚性愈伤组织的保持与增殖

合子胚在诱导培养基中诱导 7 周左右后,胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织可以明显区分。此时,将胚性愈伤组织单独挑出增殖,增殖培养基为最佳的诱导培养基,即 1/2LM 基本培养基 + 2,4-D $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每次转接时,1 个培养皿中增殖 7~8 块直径 0.5 cm 的胚性愈伤组织,2 周转接 1 次,2 个月后即可形成一定规模的胚性细胞系(图 1f, g)。

2.3 体细胞胚的诱导成熟

胚性愈伤组织接种在分化培养基中 2 天后,球形胚开始出现,随后球形胚数量增多;7 天以后部分球形胚转变为鱼雷形胚,随后鱼雷形胚数量继续增多;3 周以后部分球形胚开始进入子叶胚状态,5 周以后,子叶胚明显,进入成熟状态;整个体细胞胚分化过程中未见到心形胚。成熟的体细胞胚健壮,胚轴明显,整个体细胞胚呈淡黄色(图 1h)。正交试验中,以处理 15 和 16 获得的体细胞胚数量最多,平均每克胚性愈伤组织分化的体细胞胚分别为 261 个

和 287 个。方差分析见表 5,分化结果见图 2。

表 5 不同分化处理方差分析

Tab. 5 Variance analysis of different differentiation treatments

来源 Source	自由度 df	均方 MS	F	Sig.
脱落酸 ABA	3	22 455.306	7.301	0.000
聚乙二醇 PEG4000	3	32 850.423	10.681	0.000
蔗糖 Sucrose	3	98 822.804	32.131	0.000
活性炭 Activated carbon (AC)	3	9 133.503	2.970	0.046
凝胶 Gellan gum	3	11 084.414	3.604	0.024
误差 Error	32	3 075.575		

2.3.1 ABA 对体细胞胚分化的影响 ABA 被广泛用于针叶树体细胞胚的诱导和成熟。ABA 对云杉体细胞胚的分化具有极显著影响,其中以 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 处理获得的发育正常的体细胞胚数量最多,每克平均有 138 个。

2.3.2 PEG4000 对体细胞胚分化的影响 作为一种重要的渗透调节剂物质,适当的聚乙二醇处理可以调节分化细胞的渗透压,对体细胞胚的分化有显著促进作用。PEG4000 对云杉体细胞胚的分化具有极显著影响,其中以 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PEG4000 处理获得的体细胞胚最多,每克平均有 122 个。

2.3.3 蔗糖对体细胞胚分化的影响 蔗糖作为重要的碳源和渗透调节剂物质,在体细胞胚分化过程中发挥着重要作用。蔗糖对云杉体细胞胚的分化具有极显著影响。 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个蔗糖浓度处理下几乎无成熟体细胞胚产生,推测可能是因为渗透压过高,抑制了体细胞胚的产生。 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个蔗糖浓度处理下获得的体细胞胚数量较多;尽管二者的处理获得的体细胞胚数量差异不显著,但是,低浓度蔗糖处理下获得的体细胞胚多细小,萌发率较低,推测可能是碳源不足、体细胞胚发育不正常所致;而 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖处理下获得体细胞胚健壮,萌发率高。因此,本试验中最佳的蔗糖处理浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,每克平均有 168 个。

2.3.4 活性炭对体细胞胚分化的影响 活性炭对云杉体细胞胚的分化具有显著影响。添加活性炭能够有效促进体细胞胚的分化,添加不同浓度活性炭的处理间体细胞胚的分化没有显著性差异,以 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的活性炭处理获得的体细胞胚数量最多,每克平均有 105 个。

2.3.5 凝胶对体细胞胚分化的影响 凝胶作为一种固化剂,在成熟培养基中适当提高凝胶浓度能够促进体细胞胚的分化。凝胶对云杉体细胞胚的分化具有显著影响。随着凝胶浓度的提高,体细胞胚的

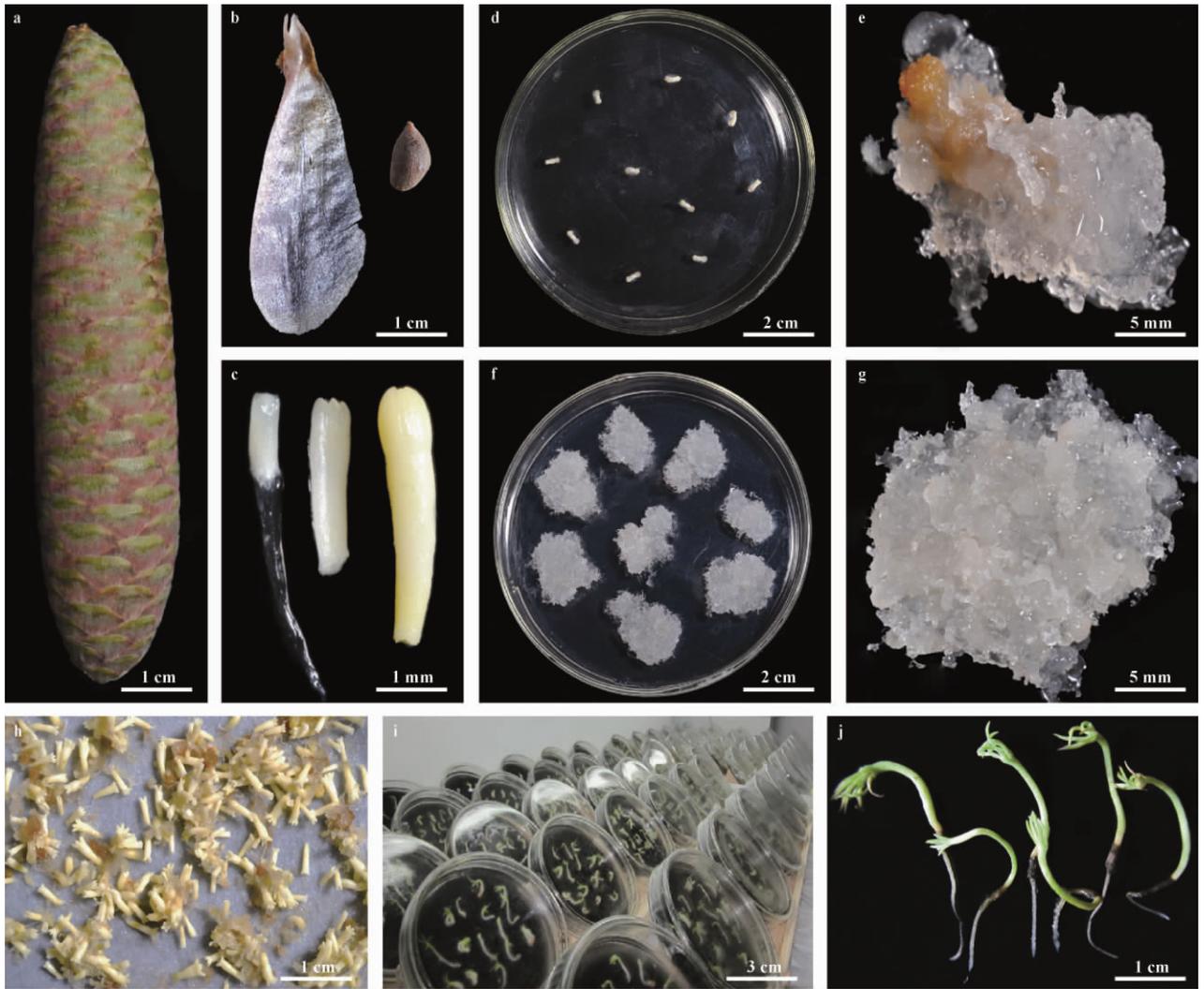


图1 云杉体细胞胚胎发生过程

Fig. 1 Somatic embryogenesis of *Picea asperata*

a. 未成熟球果; b. 种翅和未成熟种子; c. 未成熟合子胚; d. 刚接种诱导的合子胚; e. 6周后诱导产生的胚性愈伤组织; f. 规模增殖的胚性愈伤组织; g. 增殖过程中的胚性愈伤组织; h. 分化6周后产生的同步化程度较高的成熟体细胞胚; i. 萌发1周后的合子胚; j. 萌发3周后产生的健壮幼苗。

a. Immature cone; b. Seed wing and immature seed; c. Immature zygotic embryos; d. Immature zygotic embryos on initiating; e. Embryogenic callus induced after 6 weeks; f. Large-scale embryogenic callus on proliferating; g. Embryogenic callus on proliferating; h. High synchronized mature somatic embryos induced after 6 weeks; i. Zygotic embryos after germinating for 1 week; j. Robust plantlet after germinating for 3 weeks.

分化数量呈现先增加后降低的现象,即在分化培养基中凝胶浓度过高或者过低都会显著抑制体细胞胚的分化。最佳的凝胶浓度为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,每克平均有126个。

2.4 成熟体细胞胚的萌发

分化的云杉体细胞胚成熟以后,挑选发育正常、生长健壮、子叶4枚以上的体细胞胚进行萌发,不添加激素。先黑暗培养1周,黑暗培养第3天时,体细胞胚开始明显萌动,整个体胚开始膨大;第7天时,子叶变绿,胚轴伸长,胚根生长点明显。转到光下第1周时,子叶展开,胚轴继续伸长,胚根开始伸长。待子叶正常伸展且白色胚根伸长大于0.5 cm

时,即可移栽到营养土壤中生长(图1i, j)。

3 结论与讨论

选择合适的外植体对针叶树胚性愈伤组织的诱导来说至关重要(Claudio *et al.*, 2003);事实上,同一树种的不同外植体类型,同一类型的外植体发育的不同阶段对离体培养条件的响应都存在显著差异(Ramarsandratana *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 1989)。针叶树体细胞胚胎发生过程中,合子胚是最常用的外植体;使用成熟合子胚为诱导外植体在黑云杉(Taurus *et al.*, 1990)、红云杉(Harry *et al.*, 1991)、杉木(*Cunninghamia lanceolata*) (席梦利等,

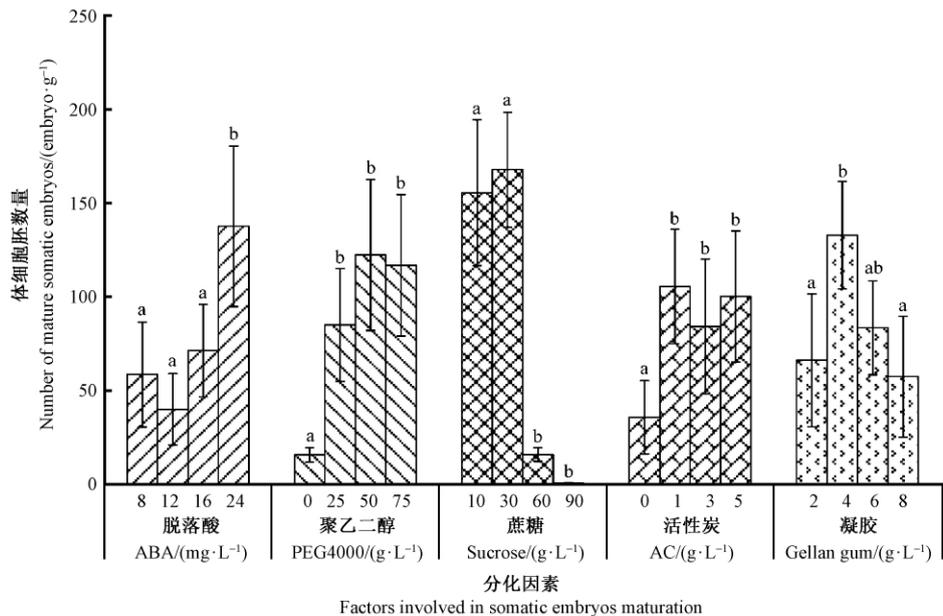


图2 不同分化因素处理下体细胞胚的分化结果

Fig. 2 Somatic embryos maturation results under different factors treatments

相同因素处理下不同字母表示 0.05 水平差异显著。误差限为标准误。Number of mature somatic embryos within different columns at one same factor followed by different letters showed significant difference from each other at a level $P = 0.05$. Error bars stand for standard error.

2006)、北美云杉 (*Picea pungens*) (孙敬爽等, 2010) 等树种体胚的研究上已有报道。尽管成熟的合子胚具有种子量大、诱导过程操作简单且试验不受时间限制的特点,但是上述研究表明,以成熟的合子胚为外植体获得的胚性愈伤组织诱导率普遍不高。

大量研究证实,以未成熟的合子胚为材料可以显著提高胚性愈伤组织的诱导率。Tautorus 等 (1990) 采用相同的诱导条件,使用黑云杉未成熟合子胚为外植体,胚性愈伤组织的诱导率比贮藏 13 年的成熟合子胚高 57%; 在对冷杉 (*Abies fraseri*) 进行胚性愈伤组织诱导时发现,最佳的合子胚诱导日期是 6 月下旬至 7 月上旬,随着合子胚成熟程度的不断增加,胚性愈伤组织的诱导能力显著降低 (Kim *et al.*, 2009); 吕守芳等 (2005) 以日本落叶松 (*Larix kaempferi*) 未成熟胚、成熟胚、胚根和胚轴等为外植体进行体胚研究时发现,只有未成熟合子胚能够诱导出胚性愈伤组织; 赵晓敏等 (2007) 以兴安落叶松 (*Larix gmelinii*) 不同发育时期的合子胚为诱导材料,表明处在子叶初期的合子胚诱导胚性愈伤组织的能力最强; 吴丽君等 (2008) 认为发育在第 2, 3, 4 阶段的火炬松 (*Pinus taeda*) 合子胚为胚性愈伤组织诱导的最佳外植体。本试验中,以未成熟的合子胚为材料,随着种子成熟程度的增加,胚性愈伤组织的诱导率呈现急剧下降的趋势,说明未成熟的合子胚比较适合云杉的胚性愈伤组织的诱导; 7 月中旬时胚

性愈伤组织的诱导能力最强,此时,合子胚发育处于早期子叶胚阶段,这与前人的研究结果相似。

体细胞胚胎发生过程中,基因型间由于存在遗传基础的差异,胚性愈伤组织的诱导能力常差异显著。以北美乔松 (*Pinus strobus*) 14 个基因型的未成熟合子胚为外植体进行诱导时发现,不同基因型间胚性愈伤组织的诱导能力存在极显著差异,并且基因型和采集日期的交互效应及基因型与培养基的交互效应对胚性愈伤组织的诱导均有显著性影响 (Klimaszewska *et al.*, 2001)。Lelu-Walter 等 (2006) 以海岸松 (*Pinus pinaster*) 控制授粉的 8 个基因型未成熟合子胚为外植体,发现胚性愈伤组织的诱导能力与杂交亲本双方及特定的基因型关系密切。本试验中,云杉不同基因型之间胚性愈伤组织的诱导能力存在极显著差异。因此,在开展云杉体细胞胚胎发生研究时,为获得诱导能力较强的单株,应该扩大优良基因型的筛选力度。植物生长调节剂是诱导合子胚产生胚性愈伤组织的关键外源激素,在细胞保持增殖过程中同样发挥着重要作用。其中,以植物生长素 2,4-D 和细胞分裂素 6-BA 最为常用。在云杉胚性愈伤组织的诱导中,2,4-D 和 6-BA 对胚性愈伤组织的诱导产生了极显著影响。增殖过程中,在 2,4-D 和 6-BA 的作用下,随着蛋白和淀粉等贮藏物质的积累,胚性细胞团不断增大 (Silveira *et al.*, 2004)。

诱导针叶树胚性愈伤组织分化产生体细胞胚的因素很多,脱落酸(ABA)是最为关键的因素。ABA不仅能够促使增殖的胚性愈伤组织进入分化状态,促进体细胞胚的成熟,而且对提高体细胞胚的质量,抑制体细胞胚的提前萌发也有重要作用(Pullman *et al.*, 2003; Rai *et al.*, 2011)。本文中,不同 ABA 浓度下云杉胚性愈伤组织的分化能力具有极显著差异。大量研究表明,在分化过程中,ABA 和聚乙二醇(PEG)联合使用,可以显著促进针叶树体细胞胚的成熟(Nørgaard, 1997; Stasolla *et al.*, 2002)。PEG 作为一种重要的渗透调节物质,能够调节培养基的渗透压,使待分化细胞处在一个相对适中渗透环境,从而有利于体细胞胚的分化。研究表明,PEG4000 对云杉体细胞胚的产生和成熟具有极显著促进作用。蔗糖除作为碳源外,也是一种重要的渗透调节物质,有利于体细胞胚干物质的积累,能够促进体细胞胚的正常发育尤其是子叶胚的形成(Krajňáková *et al.*, 2009)。本试验中,蔗糖能够极显著促进云杉体细胞胚的成熟。活性炭具有改变培养基的理化性质、吸附或者抑制有毒物质、降低组织内的激素水平等多重作用,尤其在分化阶段,能够促进细胞发育(von Aderkas *et al.*, 2002)。云杉体胚分化过程中,适量的活性炭能够有效提高胚性愈伤组织的分化能力。合适的凝胶浓度对植物体细胞胚的产生同样有重要作用,凝胶浓度过低会使待分化细胞水分含量增多,抑制体细胞胚的产生;而凝胶浓度过高,又会使待分化细胞失水严重,同样不利于体胚的分化和成熟;研究(Ramarosandratana *et al.*, 2001)表明,较高浓度的凝胶能够促进植物体细胞胚的成熟。本文中,与增殖培养基相比,凝胶浓度加倍能够显著促进云杉体细胞胚的分化和成熟。

植物体细胞胚胎发生是个极为复杂的发育过程,从外植体的选择到胚性愈伤组织的诱导,由胚性愈伤组织的增殖和分化到体细胞胚的萌发,其间涉及非常多的因素,而每一步的顺利实施与否,又影响着下一步的进行。本文成功建立了稳定且同步化程度较高的云杉体细胞胚胎发生技术体系,为云杉的工厂化育苗开辟了一条新途径;同时,获得了发育各阶段丰富的研究材料,为开展遗传转化研究建立了良好的试验体系,也为开展云杉的遗传改良研究提供了科学依据。为了获得更高的胚性愈伤组织诱导率和高度胚性的细胞系,今后应适当提早球果的采集日期,并进一步扩大基因型的筛选力度,以筛选出更为理想的球果成熟状态和一大批高胚性愈伤组织诱导能力的单株。同时,在实验室水平,通过构建

液体悬浮增殖体系和液体中体细胞胚发生技术体系,模拟生物反应器实现云杉体细胞胚胎发生的研究有待进一步深入。

参 考 文 献

- 陈芳,陈少瑜,吴涛,等. 2010. 丽江云杉体细胞胚胎发生. 林业科学,46(8): 162-167.
- 郭小兵,娄迎春,叶东梅,等. 2009. 沙地云杉胚性细胞悬浮培养研究. 内蒙古农业大学学报,30(2): 274-277.
- 李奇,张可,罗建勋. 2007. 粗枝云杉无性系种子园生长性状变异和无性系选择初步研究. 四川林业科技,28(5): 21-27.
- 李映红,郭仲琛. 1990. 青杆在不同条件下的体细胞胚胎发生及苗的形成. 植物学报,32(7): 568-570.
- 刘宝光,李成浩,王伟达,等. 2009. 红皮云杉胚性愈伤组织诱导技术研究. 植物研究,29(1): 69-73.
- 罗建勋,孙鹏,王乐辉,等. 2006. 云杉种源苗期性状变异及种源选择初步研究. 西南林学院学报,26(4): 14-18.
- 吕守芳,张守攻,齐力旺,等. 2005. 日本落叶松体细胞胚胎发生的研究. 林业科学,41(2): 48-53.
- 四川省粗枝云杉纸浆材协作组. 2001. 粗枝云杉纸浆材种源林分区划研究. 四川农业大学学报,19(1): 34-36.
- 孙敬爽,贾桂霞. 2010. 北美蓝云杉体细胞胚发生技术研究. 北京林业大学学报,32(1): 1-8.
- 吴丽君,叶建仁. 2008. 火炬松体胚发生与几种专利培养基的应用. 南京林业大学学报:自然科学版,32(1): 1-5.
- 席梦利,施季森. 2006. 杉木成熟合子胚器官发生和体胚发生. 林业科学,42(9): 29-34.
- 杨金玲,桂耀林,杨映根,等. 1997. 白杆体细胞胚胎发生及其植株再生. 植物学报,39(4): 315-321.
- 赵晓敏,沈海龙,杨玲,等. 2007. 兴安落叶松胚性愈伤组织诱导影响因子的研究. 植物研究,27(5): 538-543.
- 中国植物志编辑委员会. 1978. 中国植物志:第七卷. 北京:科学出版社,123-133.
- Birol I, Raymond A, Jackman S D, *et al.* 2013. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics*, 29(12): 1492-1497.
- Budimir S, Vujicic R. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* Purk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(2): 89-94.
- Stasolla C, Yeung E C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(1): 15-35.
- Gale S, John A, Harding K, *et al.* 2008. Developing cryopreservation for *Picea sitchensis* (Sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. *Cryoletters*, 29(2): 135-144.
- Hakman I, Arnold S V. 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *Journal of Plant Physiology*, 121(2): 149-158.
- Harry I S, Thorpe T A. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Botanical Gazette*, 152(4): 446-452.
- Ishii. 1995. Somatic embryogenesis in *Picea glehnii* and *P. jezoensis* //

- Mohan Jain S, Gupta P K, Newton R J. Somatic embryogenesis in woody plants. vol 3. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 55 – 65.
- Kim Y W, Newton R, Frampton J, *et al.* 2009. Embryogenic tissue initiation and somatic embryogenesis in Fraser fir (*Abies fraseri* [Pursh] Poir.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45 (4) : 400 – 406.
- Klimaszewska K, Park Y S, Overton C, *et al.* 2001. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37 (3) : 392 – 399.
- Krajňáková J, Häggman H, Gömöry D. 2009. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96 (3) : 251 – 262.
- Krajňáková J, Sutela S, Aronen T, *et al.* 2011. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: recovery, maturation and genetic fidelity. *Cryobiology*, 63 (1) : 17 – 25.
- Krogstrup P, Eriksen E N, Möller J D, *et al.* 1988. Somatic embryogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Plant Cell Rep*, 7 (7) : 115 – 123.
- Lelu-Walter M A, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K. 2006. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Reports*, 25 (8) : 767 – 776.
- Litvaj J D, Verma D C, Johnson M A. 1985. 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.). *Plant Cell Reports*, 4 (6) : 325 – 328.
- Lu C Y, Thorpe T A. 1987. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. *Journal of Plant Physiology*, 128 (3) : 297 – 302.
- Nørgaard J V, Duran V, Johnsen Ø, *et al.* 1993. Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Canadian Journal of Forest Research*, 23 (12) : 2560 – 2567.
- Nørgaard J V. 1997. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Science*, 124 (2) : 211 – 221.
- Nystedt B, Street N R, Wetterbom A, *et al.* 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 497 (7451) : 579 – 584.
- Pullman G S, Johnson S, Peter G, *et al.* 2003. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports*, 21 (8) : 747 – 758.
- Rai M K, Shekhawat N S, Gupta A K, *et al.* 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106 (2) : 179 – 190.
- Ramarosandratana A V, Harvengt L, Bouvet A, *et al.* 2001. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37 (1) : 29 – 34.
- Ramarosandratana A V, van Staden J. 2003. Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74 (3) : 249 – 255.
- Roberts D R, Flinn B S, Webb D T, *et al.* 1989. Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-Page and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 8 (5) : 285 – 288.
- Silveira V, Floh E I S, Handro W, *et al.* 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, Tissue and Organ Culture*, 76 (1) : 53 – 60.
- Stasolla C, Kong L, Yeung E C, *et al.* 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38 (2) : 93 – 105.
- Taurus T E, Attree S M, Fowke L C, *et al.* 1990. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and embryo regegeration from protoplasts in Black spruce (*Picea mariana* Mill). *Plant Science*, 67 (1) : 115 – 124.
- Touchell D H, Chiang V L, Tsai C J. 2002. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Reports*, 21 (2) : 118 – 124.
- von Aderkas P, Label P, Lelu M A. 2002. Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. *Tree Physiology*, 22 (6) : 431 – 434.
- Webster F B, Roberts D R, McInnis S M, *et al.* 1990. Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. *Canadian Journal of Forest Research*, 20 (11) : 1759 – 1765.

(责任编辑 徐 红)