

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201608016

引文格式: 陈琴, 陈代喜, 劳广杰, 等. 杉木未成熟胚性愈伤组织诱导影响因素探析 [J]. 广西植物, 2017, 37(5):587-591

CHEN Q, CHEN DX, LAO GJ, et al. Exploration and analysis of influence factors of embryogenic callus induction from immature zygotic embryos of *Cunninghina lanceolata* [J]. Guihaia, 2017, 37(5):587-591

杉木未成熟胚性愈伤组织诱导影响因素探析

陈琴¹, 陈代喜^{1*}, 劳广杰², 黄开勇¹, 梁机³, 莫勇德⁴

(1. 广西壮族自治区林业科学研究院, 广西优良用材林资源培育重点实验室, 南宁 530002; 2. 广西融安县西山林场, 广西柳州 545400; 3. 广西大学林学院, 南宁 530005; 4. 环江毛南族自治县川山镇林业工作站, 广西河池 547100)

摘要: 本研究从基因型、6-BA 浓度、外植体接种方式和合子胚发育阶段等方面, 分析杉木未成熟胚性愈伤组织诱导的影响因素。结果表明: 基因型、6-BA 浓度、外植体接种方式和合子胚发育阶段均对胚性愈伤组织诱导频率有不同程度影响。6 种基因型中, 有 3 种基因型诱导出胚性愈伤组织, 其中基因型 S18 胚性愈伤组织诱导频率最高, 为 11.7%。6-BA 浓度在 1.0~1.5 mg · L⁻¹ 范围内时, 基因型 S18 的胚性组织诱导频率较高。以在去皮种子的一端切开一个小口的接种方式为最优, 将合子胚剥出的方式易造成合子胚褐化死亡, 将未剥皮的种子切开一个小口后直接接入培养基的方式不利于愈伤组织生成。适合胚性愈伤组织诱导的合子胚发育阶段为受精至胚器官分化阶段, 合子胚进入成熟阶段后不利于胚性愈伤组织诱导, 合子胚易生长成完整植株。

关键词: 杉木, 未成熟胚, 胚性愈伤组织, 诱导

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)05-0587-05

Exploration and analysis of influence factors of embryogenic callus induction from immature zygotic embryos of *Cunninghina lanceolata*

CHEN Qin¹, CHEN Dai-Xi^{1*}, LAO Guang-Jie², HUANG Kai-Yong¹,
LIANG Ji³, MO Yong-De⁴

(1. Guangxi Key Laboratory of Superior Timber Trees Resource Cultivation, Forestry Research Institute, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530002, China; 2. Xishan Forest Farm of Rongan Country in Guangxi, Liuzhou 545400, Guangxi, China; 3. College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530002, China; 4. Forestry Working Station in Chuanshan Town of Huanjiang Maonan Autonomous County, Hechi 547100, Guangxi, China)

Abstract: *Cunninghina lanceolata* is a fast-growing and high-yield timber forest species endemic in China. It has many advantages of fast growth, high production, good quality and wide use, and plays an important role in the forestry production in South China. In this research, an experiment of embryogenic callus induction was carried out. In the experiment, six different genotypes of *C. lanceolata* improvement species were used as initial explant, and four factors affecting embryogenic callus induction were studied and analysed. These four factors were the key elements on embryogenic callus formation, and they were as follows: genotypes, 6-BA combination, inoculating ways and developmental stages of imma-

收稿日期: 2016-08-12 修回日期: 2017-01-03

基金项目: 广西优良用材林资源培育重点实验室开放课题(14B0302); 广西自然科学基金(2016GXNSFBA380112); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科转 1599004-9) [Supported by Guangxi Key Laboratory Open Program of Superior Timber Trees Resource Cultivation(14B0302), Guangxi Natural Science Foundation(2016GXNSFBA380112); Guangxi Science Research and Technology Development Program(1599004-9)].

作者简介: 陈琴(1986-), 女, 广西桂林人, 硕士, 工程师, 主要研究方向为人工林定向培育, (E-mail) jingqin_168@163.com.

*通信作者: 陈代喜, 教授级高级工程师, 主要从事林木遗传改良与栽培技术研究, (E-mail) chendx2016@163.com.

ture zygotic embryos including. The results showed that the factors of genotypes, 6-BA combination, inoculating ways and developmental stages of immature zygotic embryos all had significant effects on the induction rate of embryogenic callus, but the influence degree each were not identical. Three genotypes in six genotypes obtained embryogenic callus, and one of the genotype (S18) had the highest induction rate of embryogenic callus with 11.7%. When the range of 6-BA combinations was from $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the genotype S18 had the highest induction rate. The best method of inoculating was to peel and cut a small hole on end of seed. It was not a good inoculating way to take out zygotic embryos from endosperm, and the zygotic embryos were easy to die in that way. The inoculating method of only cutting a small hole on end of seed and non-peeling was unsuited for embryogenic callus induction. The suitable developmental stage for embryogenic callus induction was from fertilization stage to embryo organ differentiation stage, and it was difficult to obtain embryogenic callus when the zygotic embryos entered into the mature stage. The results indicated that the zygotic embryos which already entered into the mature stage were used as initial explants in the experiment of embryogenic callus induction, and they grew into a complete plant, not callus.

Key words: *Cunninghina lanceolata*, immature zygotic embryo, embryogenic callus, induction

随着传统生物技术快速向现代生物技术转变,体细胞胚胎发生已成为针叶树细胞工程植株再生的重要途径(施季森,2000;陈金慧等,2008)。植物体细胞胚胎发生是体细胞在人工无菌培养条件下,未经过受精过程而发育出新个体的形态发生过程(吕守芳,2003;温亚峰,2011)。目前,已从40多种针叶树种培养产生出体细胞胚,主要集中于云杉属和松属(Becwar et al, 1990;黄健秋等,1995;Salajova & Salaj, 2005; Felipe et al, 2008; Yildirim et al, 2006; Park et al, 2006; Zhang et al, 2007; Li et al, 2008)。

杉木(*Cunninghina lanceolata*)隶属于杉科杉木属,其生长好、产量高、木材纹理直、结构细、耐腐力强、用途广泛,是我国重要速生商品用材树种(黄安民等,2006)。关于杉木体细胞胚胎发生已开展部分研究工作,席梦利等(2005, 2006)分别以成熟合子胚、子叶和下胚轴为外植体诱导出胚性愈伤组织,成功实现植株再生,但其胚性愈伤组织最高诱导率仅有13.3%,且易褐化,大多不能长出形态健全的子叶胚或长出畸形子叶胚;郑仁华(2008)以不同发育阶段的未成熟合子胚为外植体进行胚性愈伤组织诱导,接种的3349个合子胚中,仅108个产生胚性愈伤组织,且诱导频率极低;温亚峰(2011)以杉木未成熟合子胚为外植体进行诱导试验,胚性愈伤组织诱导率最高为15.2%。从以上研究结果来看,胚性愈伤组织诱导十分困难,其诱导频率受基因型、激素浓度等多方面影响,而胚性愈伤组织诱导是体细胞胚胎发生的最初环节,这一环节完成的好坏决定了下一阶段是否顺利进行。因此,本研究以广西杉木不同基因型的未成熟胚为材料,从基因型、激素浓度、合子胚发育阶段和接种方式4个方面展开研究,

探析影响胚性愈伤组织形成的原因,为后期的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

采自广西柳州市融安县西山林场杉木第二代种子园。采种母树分别为杉木优良家系S18、杉木优良家系S26、杉木优良家系S17、杉木优良家系G21、杉木优良家系L39和杉木优良家系L9。球果采集时间分别为2014年6月18日(受精或原胚阶段)、7月24日(胚器官分化阶段)、8月20日(进入成熟期)。采下的球果用自封塑料袋密封并放入冰盒带回实验室,保存于4℃冰箱中备用。

1.2 外植体消毒

将球果洗净,用滤纸吸干表面水分,剥出未成熟种子,在超净工作台上,先用75%酒精消毒45s,用无菌水冲洗2次,然后转入0.1% HgCl_2 溶液中,震荡,消毒8min,无菌水冲洗6次,每次2min,接种备用。

1.3 接种

采用3种方式进行接种。方式一:用解剖刀将种子一端切开一个小口后直接接种于培养基上。方式二:剥去种皮,将去皮种子一端切开一个小口,将胚乳一起接种于培养基上。方式三:剥去胚乳挑出合子胚接种于培养基上。

1.4 胚性愈伤组织的诱导

胚性愈伤组织诱导基本培养基为MS,分别添加0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, 4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 谷氨酰胺, 500

mg · kg⁻¹ 水解酪蛋白, 7.0 g · L⁻¹ 琼脂, 30 g · L⁻¹ 蔗糖, pH 值 5.8。每个培养瓶接种 1 个外植体, 每个处理重复 3 次, 每个重复接种 10 瓶。培养室温度为 (24 ± 1) °C, 光照培养, 光照强度为 1 000~1 300 lx。培养 40 d 后, 统计胚性愈伤组织诱导率。

胚性愈伤组织诱导率(%) = 长出胚性愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 × 100%

2 结果与分析

2.1 基因型的影响

以 2014 年 6 月 18 日采集的 6 种基因型为材料, 将剥皮种子切开一个小口后接种于附加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA、4.0 mg · L⁻¹ 2,4-D、2.0 mg · L⁻¹ KT 的胚性愈伤组织诱导培养基上, 结果见表 1。接种 7 d 后, 合子胚开始膨胀, 15 d 后, 从切口处开始有白色或浅黄色愈伤组织膨胀出来。培养 40 d 后, 愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率在不同基因型之间存在一定差异, 参试的 6 种基因型中, 有 3 种基因型诱导出胚性愈伤组织。其中, 基因型 S18 表现较突出, 愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率均达最高值, 分别为 47.9% 和 11.7%; 其次为基因型 G21, 分别为 44.6% 和 10.6%; 基因型 S17、L39 和 L9 三种基因型生成了愈伤组织, 但未诱导出胚性愈伤组织。

2.2 分裂素 6-BA 的影响

以基因型 S18(7 月 24 日摘) 为材料, 将剥皮种子切开一个小口后接种于附加 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg · L⁻¹ 6-BA、4.0 mg · L⁻¹ 2,4-D、2.0 mg · L⁻¹ KT 的胚性愈伤组织诱导培养基上, 结果见表 2。添加 1.5 和 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 的两种处理, 培养 6 d 后外植体开始膨胀, 其他处理培养 8 d 后陆续开始膨胀, 16 d 后, 部分外植体开始有白色或浅黄色愈伤组织从切口处膨胀出来。6-BA 浓度在 0.0~1.5 mg · L⁻¹ 范围变动时, 愈伤组织诱导率随 6-BA 浓度的升高而提高。6-BA 浓度在 0.0~1.0 mg · L⁻¹ 范围变动时, 胚性愈伤组织诱导率随 6-BA 浓度的升高而提高, 6-BA 浓度为 1.0 mg · L⁻¹ 时, 胚性愈伤组织诱导率最高为 13.3%, 其次是 6-BA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 时; 当 6-BA 浓度在 1.0~2.0 mg · L⁻¹ 范围变动时, 胚性愈伤组织诱导率与 6-BA 浓度的变化均无明显相关性。

2.3 接种方式的影响

以基因型 S18(7 月 24 日摘) 为材料, 采用三种不同方式将外植体接种于附加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA、

表 1 杉木不同基因型未成熟胚的胚性愈伤组织诱导率
Table 1 Embryogenic callus induction rates of immature zygotic embryos from different Chinese fir genotypes

基因型 Genotype	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	胚性愈伤组织诱导率 Embryonic callus induction rate (%)
S18	47.9	11.7
S26	43.2	5.3
S17	34.0	0.0
G21	44.6	10.6
L39	41.6	0.0
L9	28.6	0.0

表 2 不同 6-BA 浓度对杉木未成熟胚胚性愈伤组织诱导的影响

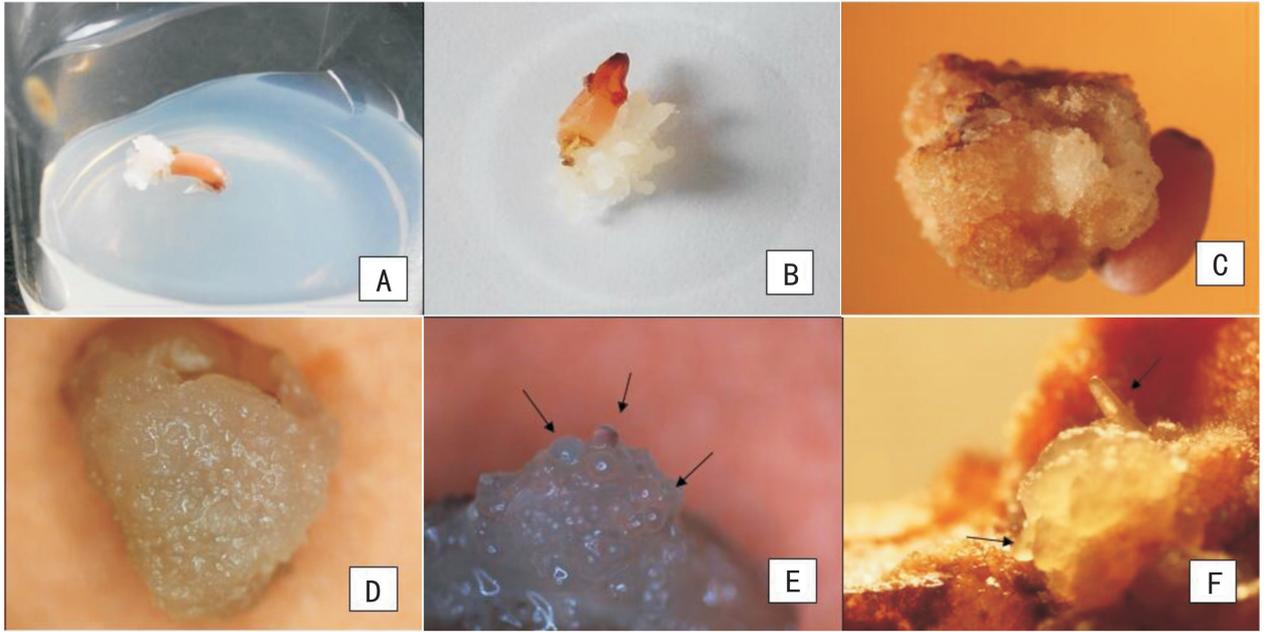
Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA on embryogenic callus induction of Chinese fir

基因型 6-BA 浓度 6-BA concentration (mg · L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	胚性愈伤组织诱导率 Embryonic callus induction rate (%)
0.0	36.7	3.3
0.5	40.0	6.7
1.0	53.3	13.3
1.5	56.7	13.3
2.0	53.3	10.0

4.0 mg · L⁻¹ 2,4-D、2.0 mg · L⁻¹ KT 的胚性愈伤组织诱导培养基上, 结果见表 3。三种接种方式对愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导均有影响。方式一: 接种 15 d 后外植体仍无明显变化, 仅种皮逐渐变褐色。培养 40 d 后, 部分外植体膨胀, 少部分外植体从切口处伸出一小段白色物体, 为种胚外伸, 所有外植体均无愈伤组织生成。方式二: 接种 15 d 后, 可见大部分外植体膨胀, 少数外植体从切口处产生白色或浅黄色愈伤组织。培养 40 d 后, 有 11.7% 的外植体生成胚性愈伤组织。方式三: 接种 15 d 后, 有 36.7% 外植体褐化死亡, 少部分外植体膨胀。培养 40 d 后, 极少数外植体生成白色愈伤组织, 仅有 1 个外植体生成的愈伤组织为胚性愈伤组织。

2.4 发育阶段的影响

以基因型 S18(6 月 18 日、7 月 24 日、8 月 20 日采摘) 为材料, 将剥皮种子切开一个小口后接种于附加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA、4.0 mg · L⁻¹ 2,4-D、2.0 mg · L⁻¹ KT 的胚性愈伤组织诱导培养基上, 结果见表 4。



图版 I 胚性愈伤组织诱导 A, B. 愈伤组织从种胚一端膨胀出来; C. 浅黄色, 结构紧密颗粒状非胚性愈伤组织; D. 半透明, 粘性胚性愈伤组织; E. 球形胚状体; F. 柱形胚状体。

Plate I Induction of embryogenic callus A, B. Callus were produced on end of the seed embryo; C. Light yellow, close structure and grainy callus, not embryogenic callus; D. Translucent and agglutinant embryogenic callus; E. Globular embryoid; F. Pillar embryoid.

表 3 不同接种方式下的胚性愈伤组织诱导

Table 3 Embryogenic callus induction by different ways of inoculation of initial explants

接种方式 Ways of inoculation	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	胚性愈伤组织诱导率 Embryonic callus induction rate (%)
种子切开小口 Cutting a small hole on end of seed	0.0	0.0
剥去种皮, 切开小口 Peeling and cutting a small hole on end of seed	47.9	11.7
剥出合子胚 Taking out zygotic embryo from endosperm	16.7	3.3

以处于受精或原胚阶段(6月18日采摘)的合子胚为外植体, 接种7d后外植体开始膨胀, 16d后可见愈伤组织从切口处膨胀出, 40d后愈伤组织发生频率为53.3%, 胚性愈伤组织发生频率为13.3%。以处于胚器官分化阶段(7月24日采摘)的合子胚为外植体, 接种7d后外植体开始膨胀, 16d后可见愈伤组织从切口处膨胀出, 40d后愈伤组织发生频率为47.9%, 胚性愈伤组织发生频率为11.7%。以处于进入成熟期阶段(8月20日采摘)的合子胚为外

表 4 不同发育阶段的合子胚胚性愈伤组织诱导

Table 4 Embryogenic callus induction on different developmental stages of immature zygotic embryos

采样时间 Sampling time	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	胚性愈伤组织诱导率 Embryonic callus induction rate (%)
2014-06-08	53.3	13.3
2014-07-24	47.9	11.7
2014-08-20	26.7	0.0

植体, 接种9d后外植体开始膨胀, 23d后可见愈伤组织从切口处膨胀出, 40d后愈伤组织发生频率为26.7%, 无胚性愈伤组织生成, 有36.7%外植体发芽生长成植株。

3 讨论与结论

本研究基因型、6-BA浓度、外植体接种方式和未成熟合子胚的发育阶段均对胚性愈伤组织诱导频率有不同程度的影响。同一培养基上, 不同基因型诱导胚性愈伤组织发生的难易程度不同, 这与郑仁华(2008)和温亚峰(2011)的研究结果一致。每一

种基因型对激素种类及浓度的反应程度不同,为实现试验的重复性及为今后规模化育苗,必须对某一基因型的培养体系进行筛选,做到基因型与培养体系精确配对。建议通过对大量优良基因型展开试验,筛选胚性愈伤组织诱导相对容易的基因型作为后续研究材料,在此基础上优化某一基因型的培养体系,最终获取适应该基因型的稳定培养体系。

本研究对基因型 S18, 分裂素 6-BA 浓度在 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时, 胚性愈伤组织诱导频率较高, 激素浓度继续增加时, 胚性愈伤组织诱导频率变幅较小, 但外植体玻璃化频率增加。外植体接种以剥去种皮, 在去皮种子的一端切开一个小口的方式最优, 这可能是合子胚在胚乳保护下, 接种过程中受到伤害程度较小, 合子胚褐化死亡的几率较小, 同时胚乳可持续为合子胚提供营养, 使合子胚维持活力, 分化能力更强。从剥出合子胚的方式来看, 合子胚褐化死亡率较高, 说明在接种过程中易受到机械伤害, 有效外植体数量减少, 降低了胚性愈伤组织诱导效率。不剥除种皮, 直接将种子切开一个小口接入培养基的方式, 可能由于种皮的阻碍作用, 合子胚难以接触培养基中的养分和激素, 难以生成愈伤组织。

合子胚的发育阶段以进入成熟期之前为宜, 在受精阶段和原胚阶段愈伤组织诱导频率较高, 合子胚进入成熟期后, 外植体直接生长成植株的频率较高, 胚性愈伤组织的诱导难度较大。这与温亚峰(2011)的研究结果相一致, 研究表明参试的 6 个基因型中, 有 5 个在受精阶段胚性愈伤组织诱导率最高, 原胚阶段次之。而席梦利和施季森(2006)从成熟合子胚上成功诱导出胚性愈伤组织, 这与本研究结果相反。本研究将趋于成熟的合子胚接种后, 多数直接生长成一颗完整的植株, 少部分生成愈伤组织, 但未从愈伤组织上看到胚状体形成。这可能是由于接种方法不同或培养基中激素使用不同而造成的。对于趋于成熟或者已成熟的合子胚, 是否可以通过横切或截断合子胚来破坏其完整结构, 或在激素使用上进行针对性调整等方式, 使合子胚难以发展成完整植株, 而是分化成愈伤组织, 进而形成体胚, 这些猜想可通过进一步研究来证明。

参考文献:

BECWAR MR, NAGMANI R, WANN SR, 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. Can J For Res, 20: 810-817.
CHEN JH, WANG HY, ZHU GQ, et al, 2000. Technical progress

of plant somatic embryogenesis [J]. Chin For Sci Technol, 14(3): 9-11. [陈金慧, 王洪云, 诸葛强, 等, 2000. 林木体胚发生技术进展[J]. 林业科技开发, 14(3): 9-11.]
FELIPE A, POUPIIN MJ, MATUS JT, et al, 2008. Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata* [J]. Biotechnol Lett, 30: 1847-1852.
HUANG AM, FEI BH, LIU JL, 2006. Advances in research on the wood property of Chinese fir [J]. World For Res, 19(1): 47-52. [黄安民, 费本华, 刘君良, 2006. 杉木木材性质研究进展[J]. 世界林业研究, 19(1): 47-52.]
HUANG QJ, WEI ZM, 1995. Review on somatic embryogenesis of coniferous tree [J]. Chin For Sci Technol, 31(2): 85-90. [黄健秋, 卫志明, 1995. 针叶树体细胞胚胎发生的研究进展[J]. 植物生理学通讯, 31(2): 85-90.]
LI CH, LIU BG, KIMTD, et al, 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis* [J]. Plant Biotechnol Rep, 2: 259-265.
LÜ SF, ZHANG SG, QI LW, et al, 2003. Application of somatic embryogenesis in woody species [J]. World For Res, 16(6): 6-11. [吕守芳, 张守攻, 齐力旺, 等, 2003. 体细胞胚胎发生在林木树种中的应用[J]. 世界林业究, 16(6): 6-11.]
PARK YS, LELUW, HARVEGNT L, et al, 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France [J]. Plant Cell Tiss Org, 86: 87-101.
SALAJOVA T, SALAJ J, 2005. Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue Initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines [J]. Biol Plant, 49(3): 33-339.
SHI JS, 2000. The challenges to forestry biotechnology and tree breeding in the 21st century [J]. J Nanjing For Univ, 24(6): 1-6. [施季森, 2000. 迎接 21 世纪现代林木生物技术育种的挑战[J]. 南京林业大学学报, 24(6): 1-6.]
WEN YF, 2011. The research of initiation and subculture of embryogenesis tissue of *Cunninghina lanceolata* (Lamb) Hook based on the immature zygotic embryo [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University: 5-19. [温亚峰, 2011. 基于未成熟合子胚的杉木胚性组织诱导和继代的研究[D]. 福建: 福建农林大学: 5-19.]
XI ML, SHI JS, 2005. Organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledons and hypocotyls of *Cunninghamia lanceolata* Hook [J]. Mol Plant Breed, 3(6): 846-852. [席梦利, 施季森, 2005. 杉木子叶和下胚轴的器官发生与体胚发生[J]. 分子植物育种, 3(6): 846-852.]
XI ML, SHI JS, 2006. Organogenesis and somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Cunninghamia lanceolata* [J]. Sci Silv Sin, 42(9): 29-33. [席梦利, 施季森, 2006. 杉木成熟合子胚器官发生和体胚发生[J]. 林业科学, 42(9): 29-33.]
YILDIRIM T, KAYA Z, ISIK K, 2006. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* Ten [J]. Plant Cell Tiss Org, 87: 67-76.
ZHANG CX, LI Q, KONG LS, 2007. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.) [J]. Plant Cell Tiss Org, 91: 273-280.
ZHEN RH, 2008. The researches of tissue culture and somatic embryogenesis on Chinese fir duperior clones [D]. Xiamen: Xiamen University: 46-53. [郑仁华, 2008. 杉木优良无性系组培快繁及体胚发生试验研究[D]. 福建: 厦门大学: 46-53.]