

DOI:10.12171/j.1000-1522.20190196

杉木体细胞胚胎发生胚性愈伤组织诱导条件的优化

吴夏雷¹ 韩 超¹ 孙宇涵¹ 曹 森¹ 胡瑞阳^{1,2} 徐金良³ 郑会全⁴ 李 云¹

(1. 林木分子设计育种高精尖创新中心, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 林木育种国家工程实验室, 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中国林业科学研究院华北林业实验中心, 北京 102300; 3. 浙江省开化县林场, 浙江 开化 324300; 4. 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要:【目的】优化杉木体细胞胚胎发生过程中胚性愈伤组织的诱导条件, 探究基本培养基、供体母株基因型和外源添加剂对杉木体胚诱导的影响。【方法】以 3 个供体母株基因型(Z1、Z2、Z3)的杉木雌配子体(其未成熟合子胚处于裂生多胚期)为外植体, 采用 6 种基本培养基及不同浓度的外源添加剂塞苯隆(TDZ)和茉莉酸甲酯(MeJA)处理, 并对诱导培养过程中的愈伤组织进行细胞学观察。【结果】以 DCR 为基本培养基, 诱导培养效果最好, 愈伤组织诱导率达 70.74%, 胚性愈伤组织的诱导率达 17.36%; 供体母株基因型对胚性愈伤组织诱导有较大影响, Z1 基因型供体母株的雌配子体最适合用于诱导产生胚性愈伤组织, 诱导率为 14.73%; 诱导培养时以 DCR 为基本培养基, 添加蔗糖 30 g/L、活性炭 1 g/L、倍力凝 5 g/L 并附加植物生长调节剂 2,4-D 1.5 mg/L、KT 0.4 mg/L、MeJA 1.2 μ mol/L 和 TDZ 0.004 mg/L, 杉木胚性愈伤组织的诱导率最高, 达 19.83%; 仅需 4 d 就可诱导产生胚性愈伤组织, 不同阶段原胚团的结构和极性特征有明显差异。【结论】基本培养基、供体母株基因型和外源添加剂都会明显影响杉木体胚诱导培养, 以 Z1 供体母株基因型的杉木雌配子体为外植体、DCR 为培养基并组合添加 MeJA 和 TDZ 可明显提高杉木体胚诱导率。

关键词: 杉木; 体细胞胚胎发生; 胚性愈伤组织; 优化

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2020)02-0079-08

引文格式: 吴夏雷, 韩超, 孙宇涵, 等. 杉木体细胞胚胎发生胚性愈伤组织诱导条件的优化 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(2): 79-86. Wu Xiaolei, Han Chao, Sun Yuhuan, et al. Optimization of induction conditions for embryogenic callus of somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2020, 42(2): 79-86.

Optimization of induction conditions for embryogenic callus of somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata*

Wu Xiaolei¹ Han Chao¹ Sun Yuhuan¹ Cao Sen¹ Hu Ruiyang^{1,2} Xu Jinliang³
Zheng Huiquan⁴ Li Yun¹

(1. Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Bioengineering of Tree Flower Breeding of National Forestry and Grassland Administration, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, School of Biotological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Experimental Center of Forestry in North China, Chinese Academy of Forestry, Beijing 102300, China;

3. Kaihua Forestry Farm, Kaihua 324300, Zhejiang, China;

4. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: [Objective] This paper aims to optimize the induction culture of embryogenic callus in the somatic embryogenesis process of *Cunninghamia lanceolata* and explore the effects of basic medium, maternal genotype and exogenous additives on the induction of *Cunninghamia lanceolata* somatic embryo. [Method] Female gametophyte (the immature zygotic embryo is in the multi-embryo stage) of three

收稿日期: 2019-04-26 修回日期: 2019-08-29

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(BJFUKF201918), 中央高校基本科研业务费专项(2015ZCQ-SW-03), 广东省省级科技计划项目(2016B020201002), 北京林业大学科学技术研究项目(2018WS01)。

第一作者: 吴夏雷。主要研究方向: 经济林木良种繁育。Email: wuxiaolei1993@163.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号。

责任作者: 李云, 博士, 教授。主要研究方向: 经济林木良种繁育。Email: yunli@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

parental genotypes (Z1, Z2, Z3) were used as explants, and used six basic media, different concentrations of exogenous additives of TDZ and MeJA, cytological observation during the induction culture. [Result] With DCR as the basic medium, the induction culture was best, the callus induction rate was 70.74%, and the induction rate of embryogenic callus was 17.36%, which was the best choice for the induction of immature embryo culture of *Cunninghamia lanceolata*; the maternal genotype had a greater impact on embryogenic callus induction, and the female gametophyte of the Z1 genotype tree was most suitable for inducing embryogenic callus; with DCR as the basic medium, adding sucrose 30 g/L, activated carbon 1 g/L, plant gel 5 g/L and adding plant growth regulator 2,4-D 1.5 mg/L, KT 0.4 mg/L, MeJA 1.2 $\mu\text{mol/L}$ and TDZ 0.004 mg/L, for the embryogenic callus of *Cunninghamia lanceolata*, the induction rate was the highest, reaching 19.83%; embryogenic callus can be induced in only 4 days, and the structure and polarity characteristics of the proembryogenic masses in different stages were significantly different. [Conclusion] The basic medium, maternal genotype and exogenous additives all significantly affected the induction culture of *Cunninghamia lanceolata* somatic embryos. Female gametophyte with Z1 donor parental genotype as explants, DCR as the basic medium and adding MeJA and TDZ in combination can significantly improve the somatic embryos induction rate of *Cunninghamia lanceolata*.

Key words: *Cunninghamia lanceolata*; somatic embryogenesis; embryogenic callus; optimization

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是中国南方特有的常绿针叶树种,其木材特性优良,产量较高,已被种植了3 000多年^[1],总种植面积达到9 106 hm²,占中国林地面积的30%^[2],在经济和生活中都占有重要位置。

植物体细胞胚胎发生是指外植体经诱导培养形成胚性愈伤组织,胚性愈伤组织再通过成熟培养形成体细胞胚,体细胞胚继续生长发育成完整植株的过程^[3],体细胞胚的原胚团(Proembryogenic masses, PEM)主要分为PEM I、II和III 3个阶段^[4]。针叶树种体细胞胚胎发生的影响因素相对更加复杂,不同针叶树种在体细胞胚胎发生能力和最适培养条件方面都有明显的差异。席梦利^[5]和施季森^[6]最早进行杉木体胚发生的研究,利用杉木成熟合子胚、子叶和下胚轴等成熟材料为外植体进行体胚诱导,诱导率较低,不能达到大规模繁殖杉木优良种苗的要求。Zhou等^[7]利用液体培养研究了杉木未成熟的合子胚体细胞胚胎发生的体系,研究发现脱落酸(ABA)和聚乙二醇(PEG)能够相互影响,促进体胚的成熟,其中ABA主要促进体细胞团的生长,而PEG主要促进原胚结构的生长。Hu等^[8]较系统地研究了合子胚发育时期、外源添加剂等对杉木体胚发生的影响,结果表明处于裂生多胚期的雌配子体是最适宜诱导杉木胚性愈伤组织的材料,诱导率为12.44%,诱导率较低,仍具有进一步提高的潜力。

体胚诱导培养作为体胚发生的第一步在杉木体胚发生体系中具有重要地位,外植体和基本培养基的选择、供体母株基因型以及植物外源添加剂等都是影响体胚诱导的重要因素^[9-10]。不同基本培养基

之间自身的组分和浓度有较大差异,杉木体胚发生需要重点考虑基本培养基中还还原态氮特别是 NH_4^+ 和 NO_3^- 的含量^[11],但现有的杉木体胚发生体系研究中少有系统研究不同基本培养基对其影响的报道。植物激素对体胚发生有着至关重要的作用,研究表明生长素和细胞分裂素是最为关键的植物生长调节剂^[12-13],塞苯隆(TDZ)作为植物细胞分裂素与激动素(KT)有相似效果^[14],茉莉酸甲酯(MeJA)是与植物损伤相关的激素和信号分子,在组织培养外源添加时可以激发植物防御基因的表达,促使植物产生与受到机械损伤或被昆虫取食时相似的化学防御效果^[15]。近几年MeJA作为新型植物生长调节剂被运用到植物体细胞胚胎发生研究中,但还没有试验用于杉木的体胚诱导研究中。为提高杉木胚性愈伤组织诱导率,本研究以杉木未成熟合子胚为材料,针对杉木体胚发生诱导培养方面开展研究,以配制固体培养基进行培养的方式筛选最佳基本培养基,添加不同浓度的外源TDZ和MeJA组合处理,并对诱导过程中的愈伤组织进行细胞学观察,旨在进一步优化和提高杉木胚性愈伤组织诱导率,为选择诱导培养时添加合适的外源添加剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采集于2017年7月12日,浙江开化县林场(29°08'52"N, 118°24'55"E)的杉木种子园。外植体材料的供体母株基因型为中山039号、中山042号、中山047号(分别命名为Z1、Z2、Z3),这3个基因型已经过试验证明诱导效果较好。每个基

因型采集发育正常,无明显病虫害,大小基本一致的50个球果(球果中的未成熟合子胚经解剖后显微观察处于裂生多胚期),采集后立即放入装有冰袋的泡沫箱中并尽快带回实验室,在4℃温度下的冰箱中保存1~4周后用于试验。

1.2 外植体的处理

从4℃冰箱取出球果后于流水下冲洗3h,晾干。用灭菌的镊子剥离出种子,再将剥取的种子浸入75%乙醇中灭菌2min,无菌水清洗3次后转移到已进行紫外灭菌的超净工作台中,用稀释10倍的84消毒液浸泡15~20min,无菌水清洗5次,再将种子浸入到0.1%的升汞溶液中灭菌10min,无菌水清洗5次后,接种于诱导培养基。因处于裂生多胚期的合子胚小且脆弱,难以从雌配子体中完整剥离,故以雌配子体为外植体进行接种,再用灭菌后的剪刀平剪一伤口,将种子半埋于诱导培养基中培养。

1.3 基本培养基的筛选

配制6种基本培养基(GD、SH、DCR、BM、LM、MS)^[16-18],取供体母株Z1、Z2、Z3的雌配子体接种于诱导培养基上。基本培养基的筛选试验中,诱导培养以6种不同的培养基为基本培养基,附加相同的蔗糖30g/L、活性炭1g/L、倍力凝5g/L和相同浓度的植物生长调节剂2,4-D 1.5mg/L、KT 0.4mg/L,配制培养基时需调整pH值为5.8,将灭完菌后的培养基于超净工作台中分装入直径为6cm的一次性无菌培养皿,过夜凝固完全后使用。每种培养基在配制后分装入54个皿(3个系号各18个皿),每个皿接8个雌配子体。

1.4 植物外源添加剂处理

以筛选出的最适培养基为基本培养基,附加相同的蔗糖30g/L、活性炭1g/L、倍力凝5g/L、2,4-D 1.5mg/L、KT 0.4mg/L,再附加10种不同浓度组合的外源添加剂TDZ和MeJA处理进行诱导培养。每种培养基在配置后分装入24个皿,每个皿接6个雌配子体。

培养条件为(25±1)℃下遮光暗培养,每14d继代一次,每天进行观察,记录初次诱导出胚性愈伤组织的天数,利用体式显微镜(型号Leica M250A)和倒置显微镜(型号Leica DMI4000B)进行观察和拍照记录,30d后统计胚性愈伤组织的诱导率,愈伤组织继代两次后,挑选其中白色或白色略黄、松软、具有粘性的胚性愈伤组织进行增殖培养。

$$C = \frac{P}{T} \times 100\%$$

式中:C表示愈伤组织诱导率;P表示产生愈伤组织

的雌配子体个数;T表示接种存活的雌配子体总数。

$$EC = \frac{EP}{T} \times 100\%$$

式中:EC表示胚性愈伤组织诱导率;EP表示产生胚性愈伤组织的雌配子体个数。

1.5 数据统计与分析

对统计得到的数据用Excel 2013进行整理,并用软件SPSS 20对数据进行分析,包括数据平均值、方差分析和多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的选择

基本培养基的选择对杉木的体胚诱导有重要影响(表1),胚性愈伤组织诱导率最高的为DCR培养基,诱导率达17.36%。综合比较6种培养基发现,DCR和BM培养基具有较好的诱导效果,DCR培养基的愈伤组织诱导率为70.74%,与BM培养基差异不显著,但DCR培养基的胚性愈伤组织诱导率显著高于BM培养基($P < 0.05$),说明DCR培养基是杉木体细胞胚胎发生诱导培养的最佳选择。除DCR培养基外,BM培养基的胚性愈伤组织诱导率显著高于其他4种培养基($P < 0.05$),诱导率为16.14%,说明BM培养基也较适合杉木的体胚诱导培养。MS和GD培养基在愈伤组织诱导方面差异不显著,但GD培养基的胚性愈伤组织诱导率为12.02%,显著高于MS培养基,这两种培养基的诱导效果在6种培养基中属中等水平。SH和LM培养基的诱导效果较差,SH培养基的胚性愈伤组织的诱导率为6.94%,LM培养基为6.09%,胚性愈伤组织诱导率均较低且差异不显著,说明SH和LM培养基都不适合用于杉木的体胚诱导培养。

表1 不同基本培养基下的杉木胚性愈伤组织诱导率

培养基类型 Medium type	接种个数 Inoculation number	愈伤组织诱导率 Callus induction rate /%	胚性愈伤组织诱导率 Embryogenic callus induction rate /%
MS	430	46.99 b	9.76 c
DCR	428	70.74 a	17.36 a
LM	432	29.79 c	6.09 d
BM	430	72.72 a	16.14 ab
SH	427	34.73 c	6.94 d
GD	428	49.46 b	12.02 b

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。Notes: different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). Same as below.

2.2 基因型的选择

统计分析诱导培养效果较好的 4 种基本培养基下愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率, 结果表明供体母株基因型对杉木体胚诱导有一定影响(表 2), 其中 Z1 基因型供体母株的愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率最高, 分别为 62.87% 和 14.73%, 显著高于 Z2 和 Z3 供体母株基因型($P < 0.05$)。Z2 基因型的胚性愈伤组织诱导率为 13.34%, Z3 基因型为 13.39%, 经显著性检验, Z2 和 Z3 基因型胚性愈伤组织诱导率差异不显著。由结果可知, 这 3 个供体母株基因型都较适合用于杉木胚性愈伤组织诱导, 但还是存在差异, 其中 Z1 供体母株的体胚诱导能力最佳。

表 2 不同供体母株基因型的胚性愈伤组织诱导率

Tab. 2 Induction rates of embryogenic callus of different maternal genotypes			
供体母株 基因型 Maternal genotype	接种个数 Inoculation number	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	胚性愈伤组织诱导率 Embryogenic callus induction rate/%
Z1	576	62.87 a	14.73 a
Z2	570	57.43 c	13.34 b
Z3	571	59.14 b	13.39 b

2.3 植物外源添加剂组合的选择

外源添加不同浓度的 MeJA 和 TDZ 组合可有效提高杉木愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率(表 3)。只添加 MeJA 而不添加 TDZ 情况下(培养基 PM2、PM5、PM8), MeJA 的添加浓度对杉木愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率有较大影响, 诱导率总体表现出随着 MeJA 浓度的升高而升高的趋势, 添加 3 种浓度 MeJA 的杉木愈伤组织诱导率均差异

显著, 当 MeJA 浓度为 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 时愈伤组织诱导率比对照组高出 12.49%。在胚性愈伤组织诱导方面, MeJA 浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时与对照组相同, 而 MeJA 浓度为 0.8 和 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胚性愈伤组织诱导率相同, 均显著高于对照组。说明当只添加 MeJA 时, 较高浓度的 MeJA 对杉木体胚诱导培养的效果更佳。

在添加 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 MeJA 条件下(培养基 PM2 ~ 4), 有无添加 TDZ 对杉木愈伤组织的诱导率影响不显著, 但对胚性愈伤组织的诱导影响显著, 在 TDZ 浓度为 0.002 和 0.004 mg/L 时, 杉木胚性愈伤组织诱导率分别为 13.17% 和 16.50%, 显著高于不添加 TDZ 时的诱导率, 说明在低浓度 MeJA 条件下, 适当添加 TDZ 能促进杉木胚性愈伤组织诱导。

在添加 MeJA 浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 条件下(培养基 PM5 ~ 7), 添加 TDZ 的浓度对诱导率有较大影响, TDZ 浓度为 0.002 mg/L 时, 愈伤组织诱导率最高, 达 73.33%, 当 TDZ 浓度为 0.004 mg/L 时, 愈伤组织诱导率表现出下降趋势, 而胚性愈伤组织的诱导率表现出随 TDZ 的浓度升高而升高的趋势, 从 13.17% 升高到 17.33%, 3 种 TDZ 浓度下差异显著。添加 MeJA 浓度 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 条件下(培养基 PM8 ~ 10), TDZ 浓度的影响与上述表现相似, 当 TDZ 浓度为 0.002 mg/L 时, 愈伤组织诱导率最高, 达 79.17%; 当 TDZ 的浓度为 0.004 mg/L 时, 杉木的胚性愈伤组织诱导率达到最高 19.83%。说明在较高 MeJA 浓度下, 添加 TDZ 浓度为 0.002 mg/L 适合杉木愈伤组织的诱导, 而添加 TDZ 浓度为 0.004 mg/L 适合杉木胚性愈伤组织的诱导。

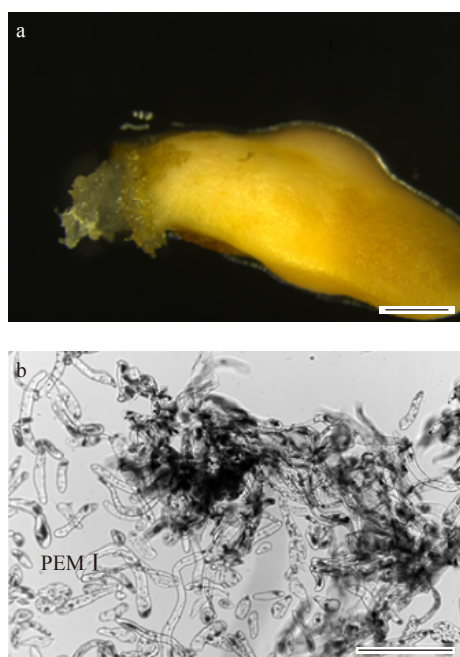
表 3 MeJA 和 TDZ 对杉木愈伤组织形成的影响

Tab. 3 Effects of MeJA and TDZ on callus formation of <i>Cunninghamia lanceolata</i>					
培养基编号 Medium No.	外源添加剂 Exogenous additive		首次产生天数 First generation days	愈伤组织诱导率 Callus induction rate /%	胚性愈伤组织诱导率 Embryogenic callus induction rate /%
	茉莉酸甲酯 MeJA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	塞苯隆 TDZ/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			
PM1	0	0	5	61.67 $\pm$ 1.03 d	12.33 $\pm$ 0.74 c
PM2	0.4	0	6	63.33 $\pm$ 0.50 cd	12.33 $\pm$ 0.57 c
PM3	0.4	0.002	5	64.17 $\pm$ 1.07 cd	13.17 $\pm$ 0.63 bc
PM4	0.4	0.004	4	67.50 $\pm$ 0.82 bcd	16.50 $\pm$ 0.47 ab
PM5	0.8	0	5	67.50 $\pm$ 0.67 bcd	13.17 $\pm$ 0.63 bc
PM6	0.8	0.002	5	73.33 $\pm$ 0.63 ab	14.00 $\pm$ 0.47 b
PM7	0.8	0.004	5	71.67 $\pm$ 0.68 abc	17.33 $\pm$ 0.92 ab
PM8	1.2	0	5	74.16 $\pm$ 1.20 ab	13.17 $\pm$ 0.63 bc
PM9	1.2	0.002	5	79.17 $\pm$ 0.83 a	14.83 $\pm$ 0.50 b
PM10	1.2	0.004	4	75.83 $\pm$ 0.57 ab	19.83 $\pm$ 0.74 a

对比培养基 PM4、PM7、PM10 可知, 外源添加 MeJA 对杉木体细胞胚胎发生诱导有更显著的影响, 在添加相同浓度的 TDZ 条件下, 杉木愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率随着 MeJA 浓度的升高而升高, 说明外源添加剂 MeJA 的对其影响作用较大, 但同时添加 MeJA 和 TDZ 组合的诱导培养效果更好, 在较低浓度的 TDZ 条件下, 可适当提高 MeJA 添加浓度以促进杉木的体胚诱导。

2.4 细胞学及形态学观察

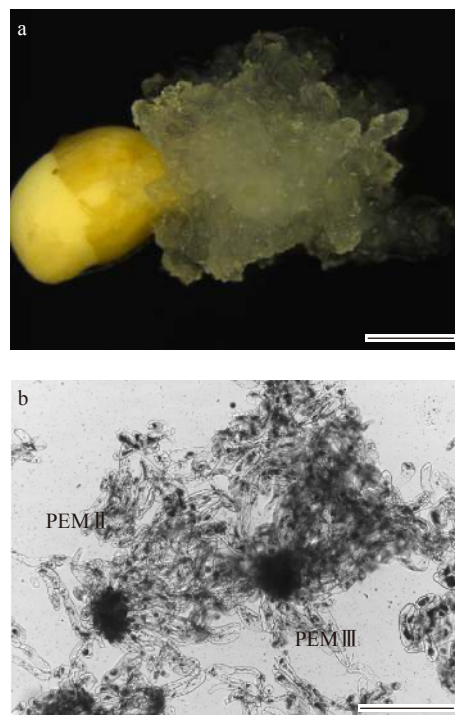
诱导培养过程中, 利用体式显微镜和倒置显微镜进行观察和记录, 以编号 PM10 培养基处理下, 培养 4 d 后就可诱导产生愈伤组织(图 1a), 此时雌配子体质地坚硬、体积膨大, 诱导出的胚性愈伤组织体积较小, 晶亮半透明。显微观察发现此时的胚性愈伤组织多为细长形细胞, 彼此开始联结形成致密的细胞团, 但数量不多, 原胚团多数处于 PEM I 时期(图 1b)。诱导培养到第 28 天时, 胚性愈伤组织形成较大的组织块, 质地粘连紧密且表面有突起结构(图 2a)。显微观察发现此时的胚性愈伤组织中细长形细胞进一步伸长且联结增多, 细胞质更加稠密, 围



a. 以 DCR 为基本培养基, 添加 MeJA 1.2 $\mu\text{mol/L}$ + TDZ 0.004 mg/L 诱导培养 4 d 时, 杉木雌配子体诱导产生的胚性愈伤组织形态结构, 标尺 = 1 mm; b. 显微观察下处于原胚团 I 时期(PEM I)的胚性愈伤组织细胞团结构, 标尺 = 500 μm 。 a, the morphological structure of embryogenic callus induced by female gametophyte of *Cunninghamia lanceolata* was induced by DCR as the basic medium and MeJA 1.2 $\mu\text{mol/L}$ + TDZ 0.004 mg/L for 4 days, bar = 1 mm; b, microscopically observed embryogenic callus cell mass structure in the proembryogenic masses I (PEM I), bar = 500 μm .

图 1 诱导 4 d 时雌配子体体式镜及显微镜观察

Fig. 1 Stereoscopic and microscopic observation of female gametophyte at 4 days induction



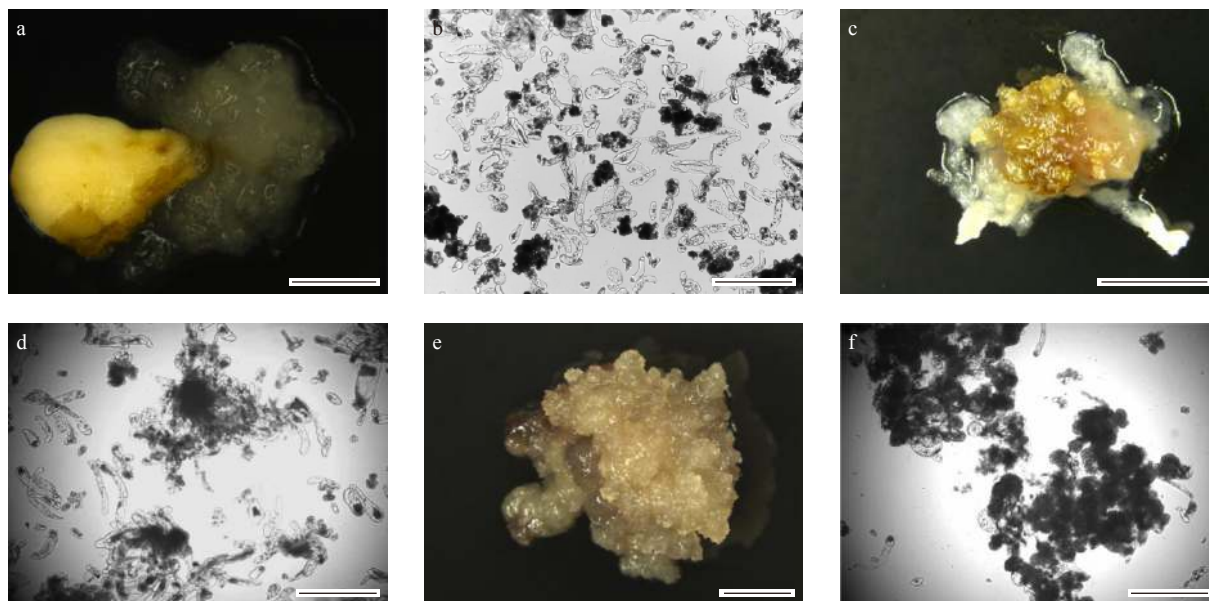
a. 以 DCR 为基本培养基, 添加 MeJA 1.2 $\mu\text{mol/L}$ + TDZ 0.004 mg/L 诱导培养第 28 d 时, 杉木雌配子体诱导产生的胚性愈伤组织形态结构, 标尺 = 2 mm; b. 显微观察下处于原胚团 II 和原胚团 III 时期(PEM II 和 PEM III)的胚性愈伤组织细胞团结构, 标尺 = 500 μm 。 a, the morphological structure of embryogenic callus induced by female gametophyte of *Cunninghamia lanceolata* was induced by DCR as the basic medium and MeJA 1.2 $\mu\text{mol/L}$ + TDZ 0.004 mg/L, bar = 2 mm; b, microscopic observation of embryogenic callus cell cluster structure in proembryogenic masses II and proembryogenic masses III (PEM II and PEM III), bar = 500 μm .

图 2 诱导 28 d 时雌配子体体式镜及显微镜观察

Fig. 2 Stereoscopic and microscopic observation of female gametophyte at 28 days induction

绕着细胞团中心形成辐射状, 具有明显极性特征, 原胚团多数处于 PEM II 和 PEM III 时期。说明以 DCR 为基本培养基且以编号 PM10 的培养基处理能够有效诱导杉木雌配子体产生胚性愈伤组织且对原胚团的发育和极性保持都具有较好的作用。

以 LM 为基本培养基, 诱导培养到 28 d 时, 得到的多为具有湿润、水状特点的非胚性愈伤组织, 形状无规则且表面无突起结构(图 3a)。显微观察发现非胚性愈伤组织的细胞排列杂乱无序, 大小不一, 细胞主要呈椭圆形或圆形, 空泡化的细胞较多(图 3b)。将得到的少量胚性愈伤组织继续培养, 会从组织中间出现褐化现象, 中心的组织质地变稀, 但边上的组织还保持着半透明乳白色, 仍具有突起结构(图 3c)。显微观察发现原本具有明显极性的细胞团变得松散, 细长形细胞数量和彼此间联结减少, 仅有少数原胚团处于 PEM II 时期, 胚性减弱(图 3d)。将这种愈伤组织继续培养到第 35 天时, 愈伤组织可继续增殖, 但已整体变成黄褐色, 质地稀疏易碎



a. 以 LM 为基本培养基培养得到的非胚性愈伤组织形态结构, 标尺 = 2 mm; b. 显微观察下非胚性愈伤组织细胞团结构, 标尺 = 500 μm ; c. 中心开始褐化的胚性愈伤组织形态结构, 标尺 = 5 mm; d. 中心褐化状态下胚性愈伤组织细胞团显微结构, 标尺 = 500 μm ; e. 完全褐化条件下的愈伤组织形态结构, 标尺 = 1 mm; f. 完全褐化条件下愈伤组织细胞团显微结构, 标尺 = 500 μm 。a, non-embryonic callus morphological structure obtained by culturing LM as the basic medium, bar = 2 mm; b, microscopic observation of non-embryonic callus cell cluster structure, bar = 500 μm ; c, the morphological structure of the embryogenic callus in which the center begins to brown, bar = 5 mm; d, microscopic structure of embryogenic callus cell clusters in a central browning state, bar = 500 μm ; e, callus morphological structure under complete browning conditions, bar = 1 mm; f, microstructure of callus cell clusters under complete browning conditions, bar = 500 μm 。

图 3 LM 培养基下杉木雌配子体的体胚诱导培养

Fig. 3 Somatic embryo induction culture of female gametophyte of *Cunninghamhamia lanceolata* under LM medium

(图 3e)。显微观察发现多为密集的细胞质聚集物团块, 呈折叠状粘附在一起, 基本不含细长状细胞, 细胞聚集物无极性结构, 失去胚性特征(图 3f)。说明在杉木体细胞胚胎发生诱导时会产生胚性和非胚性两种结构差异明显的愈伤组织, 且诱导过程中会出现褐化现象使胚性愈伤组织转变为非胚性或直接坏死, LM 培养基不适宜作为杉木体胚诱导培养的基本培养基。

3 结论与讨论

杉木体细胞胚胎发生诱导培养时, 选取处于裂生多胚期的未成熟合子胚雌配子体为外植体, 以 DCR 为基本培养基, 同时添加蔗糖 30 g/L、活性炭 1 g/L、倍力凝 5 g/L, 并附加植物生长调节剂 2, 4-D 1.5 mg/L、KT 0.4 mg/L、MeJA 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 和 TDZ 0.004 mg/L, 杉木胚性愈伤组织诱导率最高, 可达 19.83%, 高于陈琴等的研究结果^[19-20], 在诱导培养的第 4 天即可诱导得到胚性愈伤组织。

不同种类的基本培养基对杉木体胚诱导有较大影响, 其中以 DCR 为基本培养基时胚性愈伤组织诱导率最高, 为 17.36%, 除 DCR 培养基外, BM 培养基的胚性愈伤组织诱导率也较高, 为 16.14%, 有研究发现胚性愈伤组织的诱导主要与培养基中的大量元素氮的含量有关^[21-22], 本试验中 DCR 和 BM 培养基

的组分中含氮量均较低, 说明杉木的体胚诱导培养需低含氮量的培养基。

胡瑞阳等^[8]研究发现杉木体胚发生能力主要受母本影响, 父本的影响不显著。本试验结果显示 Z1 基因型供体母株(中山 039)的胚性愈伤组织诱导率最高, 为 14.73%, 显著高于其他基因型的供体母株, 与前人研究结果相符。由于 3 个供体母株基因型均为经过试验已知其效果较好的植株(分别为 13.72%、12.67% 和 12.33%), 且直接利用胡瑞阳等^[8]研究结论取未成熟合子胚处于裂生多胚期的杉木雌配子体为外植体, 因此试验结果显示 3 个基因型供体母株的胚性愈伤组织诱导率均较高, 达到 13% 以上, 可用于今后的取材选择。

外源添加 MeJA 和 TDZ 组合, 可提高愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率, 其中 MeJA 的浓度对诱导效果影响更大, 总体表现出随着 MeJA 浓度的升高而升高的趋势, 在施季森等^[23]对体胚诱导的研究中发现 MeJA 浓度超过一定值后, 体胚诱导率呈现下降趋势, 畸形胚发生率也逐渐升高, 本研究中外源添加的 MeJA 浓度较低, 最高添加浓度仅为 1.2 $\mu\text{mol/L}$, 因此诱导率随 MeJA 浓度升高的变化规律有所不同, 在今后的试验中, 可以进一步优化 MeJA 浓度梯度, 找到最适 MeJA 添加浓度。

胚性愈伤组织是杉木体胚发生的必要阶段, 杉

木的原胚团发育经历了 PEM I、PEM II 和 PEM III 3 个阶段, 3 个阶段的原胚团比例是体细胞胚胎发生潜力大小的关键。研究显示刚诱导出的胚性愈伤组织, 原胚团多数处于 PEM I 时期, 随着诱导培养时间延长, 原胚团逐渐发育到 PEM II 和 PEM III 阶段, 极性结构明显且数量多。在诱导效果较差的 LM 培养基上, 可以观察到差异明显的胚性和非胚性愈伤组织, 同时研究中还出现了胚性愈伤组织褐化现象, 可能与培养基组分、合子胚活力和吸附剂含量有关, 可进一步对褐化和胚性愈伤组织的胚性保持等方面开展研究。

参 考 文 献

- [1] 林幼丹, 张晨曦. 杉木在中国的栽培历史简述[J]. [自然辩证法通讯](#), 2007, 29(1): 79–82.
Lin Y D, Zhang C X. The brief history of cultivating *Cunninghamia lanceolata* in China[J]. *Journal of Dialectics of Nature*, 2007, 29(1): 79–82.
- [2] Lu Y, Coops N, Wang T, et al. A process-based approach to estimate Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) distribution and productivity in southern China under climate change[J]. *Forests*, 2015, 6(2): 360–379.
- [3] 宋跃, 甄成, 张含国, 等. 长白落叶松胚性愈伤组织诱导及体细胞胚胎发生[J]. [林业科学](#), 2016, 52(10): 45–54.
Song Y, Zhen C, Zhang H G, et al. Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Larix olgensis*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(10): 45–54.
- [4] 曹焱, 孟庆峰, 刁秋实, 等. 植物生长调节物质对成熟红松合子胚愈伤组织诱导的影响[J]. *中国林副特产*, 2015(3): 10–12.
Cao Y, Meng Q F, Diao Q S, et al. Plant growth regulators effect on callus induction from mature zygotic embryos of *Pinus koraiensis*[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2015(3): 10–12.
- [5] 席梦利, 施季森. 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](#), 2005, 3(6): 846–852.
Xi M L, Shi J S. Organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledons and hypocotyls of *Cunninghamia lanceolata* Hook[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(6): 846–852.
- [6] 席梦利, 施季森. 杉木成熟合子胚器官发生和体胚发生[J]. [林业科学](#), 2006, 42(9): 29–33.
Xi M L, Shi J S. Organogenesis and somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Cunninghamia lanceolata*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2006, 42(9): 29–33.
- [7] Zhou X, Zheng R, Liu G, et al. Desiccation treatment and endogenous IAA levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook[J]. [Frontiers in Plant Science](#), 2017, 8: 2054.
- [8] Hu R, Sun Y, Wu B, et al. Somatic embryogenesis of immature *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook zygotic embryos[J]. [Scientific Reports](#), 2017, 7(1): 56.
- [9] 蔡正旺, 刘静, 杨松杰. 植物体细胞胚胎发生影响因素研究进展[J]. [安康学院学报](#), 2014(4): 101–104.
Cai Z W, Liu J, Yang S J. Advances for influencing factors of plant somatic embryogenesis[J]. *Journal of Ankang Teachers College*, 2014(4): 101–104.
- [10] 黄娟, 吴鹏飞, 魏志超, 等. 杉木愈伤组织及再生芽分化的细胞学观察[J]. *福建林学院学报*, 2017, 37(4): 392–397.
Huang J, Wu P F, Wei Z C, et al. Cytohistological observation on callus and regeneration bud differentiation of *Cunninghamia lanceolata*[J]. *Journal of Forest and Environment*, 2017, 37(4): 392–397.
- [11] 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.
Dong L F, Xiao Y, Shao C B. The effect of form and concentration of nitrogen, phosphorus, potassium on inducing embryos of Chinese pine[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(3): 64–66.
- [12] 齐力旺, 韩一凡, 韩素英, 等. 麦芽糖、NAA 及 ABA 对华北落叶松体细胞胚成熟及生根的影响[J]. [林业科学](#), 2004, 40(1): 52–57.
Qi L W, Han Y F, Han S Y, et al. Effects of maltose, NAA and ABA on somatic maturation and radicle rooting of *Larix principis-rupprechtii*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2004, 40(1): 52–57.
- [13] Ray J R, Sheahan M B, Tiew W Y. Connecting stress to development in the induction of somatic embryogenesis[J]. *Somatic Embryogenesis and Gene Expression*, 2013: 146–165.
- [14] 韩登媛, 李旦, 赵健, 等. 华北落叶松胚性愈伤组织诱导影响因子的研究[J]. [林业科学研究](#), 2013, 26(4): 454–458.
Han D Y, Li D, Zhao J, et al. Factors affecting induction of embryogenic callus of *Larix principis-rupprechtii*[J]. *Forest Research*, 2013, 26(4): 454–458.
- [15] Kepczynska E, Rudus I, Kepczynski J. Absciscic acid and methyl jasmonate as regulators of ethylene biosynthesis during somatic embryogenesis of *Medicago sativa* L[J]. [Acta Physiologiae Plantarum](#), 2009, 31(6): 1263–1270.
- [16] 彭星妍, 孔国才, 张丽英, 等. 不同诱导条件对尾巨桉愈伤组织及体胚诱导的影响[J]. *分子植物育种*, 2016(7): 1809–1814.
Peng X Y, Kong G C, Zhang L Y, et al. The effect on *E.uroqhylla*×*E.grandis*'s callus and embryogenic induction by different inductive condition[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016(7): 1809–1814.
- [17] 项伟波, 赵金凯, 吴家胜, 等. 香榧体细胞胚发生、发育的形态与细胞学观察[J]. *园艺学报*, 2015, 42(8): 1477–1486.
Xiang W B, Zhao J K, Wu J S, et al. Morphological and cytological observation of somatic embryogenesis and development in *Torreya grandis* 'Merrillii' [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(8): 1477–1486.
- [18] 孙婷玉, 王艳丽, 沈李元, 等. 培养基成分对黑松体胚发育成熟的影响[J]. *林业科学*, 2019, 55(4): 181–189.
Sun T Y, Wang Y L, Shen L Y, et al. Impact of medium components on somatic embryo maturation in *Pinus thunbergii*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2019, 55(4): 181–189.

- [19] 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 D X, Lao G J, 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.
- [20] 江涛, 刘伯斌. 杉木愈伤组织诱导的防褐变及去分化技术研究[J]. *中国园艺文摘*, 2016, 32(8): 21–24.
Jiang T, Liu B B. Study on anti-browning and dedifferentiation technology induced by callus of *Cunninghina lanceolata*[J]. *Chinese Horticulture Abstracts*, 2016, 32(8): 21–24.
- [21] Pullman G S, Zeng X, Copelandkamp B, et al. Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents[J]. *Tree Physiology*, 2015, 35(2): 209–224.
- [22] 宋跃, 李淑娟, 张含国, 等. 落叶松胚性愈伤组织悬浮培养体系的优化[J]. *林业科学*, 2018, 54(7): 146–154.
Song Y, Li S J, Zhang H G, et al. Establishment and optimization of embryogenic callus suspension culture system of *Larix*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2018, 54(7): 146–154.
- [23] 成铁龙, 孟岩, 陈金慧, 等. 茉莉酸甲酯对杂交鹅掌楸体胚发育的影响[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2017, 41(6): 41–46.
Cheng T L, Meng Y, Chen J H, et al. Effects of methyl jasmonic acid on somatic embryogenesis of *Liriodendron hybrid*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 41(6): 41–46.
- (责任编辑 范 娟 崔艳红
责任编辑 卢孟柱)