

Induction of Callus from the Zygotic Embryo of *Pinus tabuliformis* Carr and Establishment of Suspension Cell Line

Xiaotong Teng, Jiaxin Li, Ying Li, Ziyi Cheng, Bin Yin, Yongzhuo Zhang, Hui Li, Hai Lu, Di Liu

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing
Email: smile_txt@163.com

Received: Mar. 3rd, 2018; accepted: Mar. 17th, 2018; published: Mar. 29th, 2018

Abstract

In vitro culture of *Pinus* is always the priority of research all over the world. *Pinus tabuliformis* Carr is an evergreen gymnosperm unique to China, which has economic value. In this study, *P. tabuliformis* zygotic embryos were used as the research subject. The key skills of how callus induce from zygotic embryos and obtain stable suspension cells were explored, by means of tissue culture with different medium and hormones. The results showed that *P. tabuliformis* could induce callus effectively on DCR medium with 2.0 mg/L 2,4-D + 0.63 mg/L 6-BA + 0.61 mg/L KT + 0.1 μM BR hormones. The induction rate of the medium was up to 82.9%. The subculture medium was DCR + 1.1 mg/L 2,4-D + 0.45 mg/L 6-BA + 0.43 mg/L KT. Stable proliferation callus is obtained by subculture medium and *P. tabuliformis* suspension cell line is obtained by liquid culture. The method can provide materials for the genetic transformation research of *P. tabuliformis* and provide ways for the tissue culture regenerated seedlings of *P. tabuliformis* in the future.

Keywords

Pinus tabuliformis Carr, Zygotic Embryos, Suspension Cell

油松合子胚愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立

滕晓瞳, 李嘉鑫, 李盈, 程子义, 尹玢, 张永卓, 李慧, 陆海, 刘頔

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京
Email: smile_txt@163.com

收稿日期: 2018年3月3日; 录用日期: 2018年3月17日; 发布日期: 2018年3月29日

摘要

松属植物的离体培养一直是国内外的研究重点,油松(*Pinus tabulaeformis* Carr)是我国特有的常绿裸子植物,具有丰富的经济价值。本研究以油松合子胚为研究对象,通过组织培养诱导出愈伤,多次继代得到稳定增殖的愈伤组织,继而液体培养得到油松悬浮细胞。结果表明,油松在DCR培养基上诱导愈伤组织效果较好,使用激素浓度为2.0 mg/L 2,4-D+ 0.63 mg/L 6-BA + 0.61 mg/L KT + 0.1 μM BR的培养基诱导率可达82.9%;继代培养基为DCR + 1.1 mg/L 2,4-D + 0.45 mg/L 6-BA + 0.43 mg/L KT,固体继代获得稳定增殖的愈伤,液体培养得到油松悬浮细胞系。该方法可以为油松的遗传转化研究提供材料,也为今后油松的组织培养再生成苗提供思路。

关键词

油松, 合子胚, 悬浮细胞

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

松属是针叶树各属中最大也是最重要的一个属,在北半球分布广泛,是世界上木材和松脂生产的重要原料,同时也广泛用于保护水域,为野生动物提供栖息之所。油松是我国森林中的主要树种,广布我国辽宁、内蒙古、河北和北京等省市,是我国北方重要的绿化树,也是我国华北及西北荒山绿化和生态林的先锋树种之一[1]。油松具有重要的经济价值、药用价值、观赏价值。研究油松的离体培养对于裸子植物的快速繁殖具有重要的理论和实践意义[2],是植树造林提供大量苗木的一个重要途径,尤其是繁殖优良树种以改造森林,同时也是通过松树的遗传操作获得转基因植物,从而改良松树品种的前提条件。

对于油松组织培养的研究国内已有诸多报道:郑钧宝等以成熟种子为材料使用 MS 培养基研究了不定芽的分化[3],以种胚为外植体通过器官发生途径建立体细胞无性系,获得完整小植株[4];周巧云等以种子段为材料使用 DCR 培养基研究了诱导愈伤组织[2];杨远媛等以雌配子体处于游离核时期的胚珠为材料使用 MS 培养基进行诱导愈伤组织并建立悬浮细胞系[5]。对于油松愈伤组织的研究表明,外植体、基本培养基都会影响诱导率,并且愈伤组织容易褐化。本文使用的油松合子胚做外植体,在加有激素的 DCR 培养基中培养愈伤组织、悬浮细胞,不仅获得了 82.9%的愈伤诱导率,而且愈伤组织不易褐化能够稳定增殖。为后续对油松的体细胞胚胎发生、胚胎发育及分化、转基因细胞等研究奠定了基础。

2. 材料与方

2.1. 实验材料

实验材料于 2015 年、2016 年采自北京林业大学校园内,未开裂的当年生绿色球果。剥开球果取出油松种子置于 4℃ 保存。

配置 pH 为 5.7 的固体、液体培养基(培养基配方见附录):油松愈伤组织诱导培养基 DCR + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.63 mg/L 6-BA + 0.61 mg/L KT + 0.1 μM BR + 15 g/L 麦芽糖+0.1 g/L D-木糖+6 g/L 琼脂;油松愈

伤组织继代培养基 DCR + 1.1 mg/L 2,4-D + 0.45 mg/L 6-BA + 0.43 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂；油松悬浮细胞培养基 DCR + 1.1 mg/L 2,4-D + 0.45 mg/L 6-BA + 0.43 mg/L KT。

2.2. 实验方法

2.2.1. 愈伤组织的培养

取出保存的种子经过 70% 酒精消毒 30 s 后无菌水冲洗，再以 4% 次氯酸钠消毒 7~10 min，无菌水冲洗 3~5 次。滤纸上吸干水分后沿种脊切开，剥离出切开的胚(图 1(a))，进行纵切，切口朝下接触培养基接种在诱导培养基上，每瓶接种 6~8 个处理，置于温度 25℃ 的培养室中进行暗培养。定期观察是否有愈伤出现，进行记录。

把诱导培养 1 个月左右的材料接种到继代培养基上同样条件暗培养，一方面继续诱导外植体产生愈伤，另一方面使已产生的愈伤组织快速增殖。两周后挑选组织松散的愈伤组织接种在新的继代培养基上，后续每两周继代一次。

2.2.2. 悬浮细胞的培养

固体培养得到的愈伤组织，选取组织松散的转移到悬浮细胞液体培养基中进行悬浮细胞培养。选取继代第 10 天的愈伤组织 5 g，放入盛有 45 mL 的液体培养基的 250 mL 三角瓶中，置于摇床 120 rpm、25℃ 暗培养。培养 5~7 天后，加入 50 mL 新鲜的培养基。培养 7 天后，进行继代，静置 20 分钟后，倒去上清，添加新的培养基。后续以 1 mL 细胞加 9 mL 培养基每周进行分瓶继代。

3. 实验结果与分析

3.1. 油松愈伤组织的培养

油松合子胚在诱导培养基上暗培养经过 30 天左右，下胚轴顶端会滋生出少量细胞团(图 1(b))，我们认为能滋生出细胞团的即为成功诱导出愈伤组织。2015 年的油松种子，接种数为 89 个，产生愈伤组织的为 77 个，诱导成功率为 86.5%；2016 年的油松种子，接种数为 75 个，产生愈伤数为 59 个，诱导成功率为 78.6%。综合两年的数据，以合子胚为外植体使用 DCR 培养基诱导率为 82.9%。

继代培养时，首次继代把合子胚连同少量的愈伤团(图 1(c))一同放置在继代培养基上，两周后只取愈伤组织进行继代，后续每两周继代。首次继代培养时能观察到下胚轴滋生的愈伤组织持续增大成团，而上部分的子叶逐渐变绿有分化成芽的趋势。后续时只取愈伤组织进行每两周的继代，连续培养 30 天左右，能够得到稳定增殖的愈伤组织，且愈伤组织没有出现褐化现象。

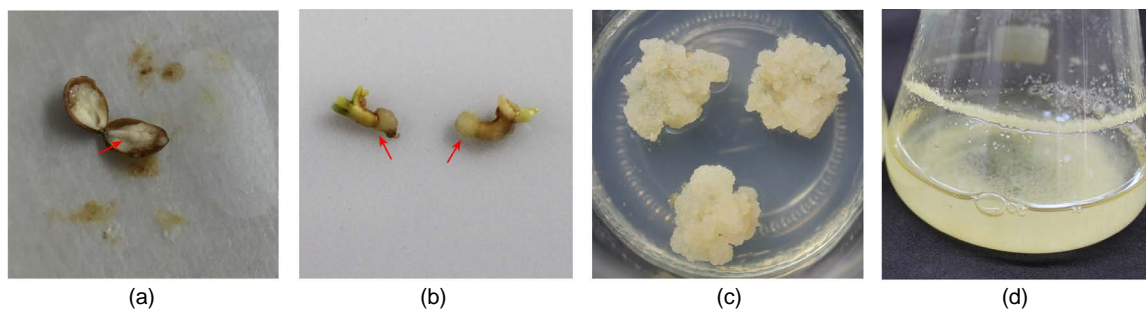


Figure 1. *Pinus tabulaeformis* callus induction: (a). Cut the seeds, the red arrow points to mature embryos in seeds; (b) two weeks after the induction medium is cultured, the red arrow points to the hypocotyls to breed out wounding; (c) stable callus obtained from subculture; (d) suspension cell line cultured in liquid medium

图 1. 油松合子胚诱导愈伤组织：(a) 切开的油松种子，红色箭头指向种子中成熟的胚；(b) 诱导培养基上培养 2 周后，红色箭头指向下胚轴滋生出愈伤团；(c) 继代培养得到的稳定的愈伤组织；(d) 液体培养的油松悬浮细胞系

3.2. 油松悬浮细胞的培养

进行悬浮细胞培养时，关键是挑选合适的愈伤组织进行培养。选取质地疏松易碎、小颗粒状、颜色较浅的愈伤组织，这类愈伤组织具有较强的胚胎发生能力，继代培养过程中分裂能力强，增殖速度快，最适合用于启动悬浮培养。首次培养 14 天后，能看到细胞明显增殖，每 7 天过筛进行继代培养，连续培养 30 天左右可以建立稳定油松悬浮细胞系(图 1(d))。

4. 小结与讨论

松属植物的组织培养国内外自上世纪 60 年代就已开始研究，但是由于不同物种发育差异性较大，培养使用的培养基及激素不同，对其研究进展缓慢。据初步统计，迄今已从 28 个树种成功地诱导获得了试管苗[6]，至少 24 种松科植物可以进行体细胞胚发生过程来扩繁[7]。对于松属植物组织培养的影响因素主要有外植体、培养基、激素、培养条件等。

4.1. 油松愈伤组织培养的影响因素

4.1.1. 外植体

根据大量文献报道，利用松树合子胚以及幼嫩子叶、下胚轴等胚性外植体可以取得最佳诱导效果。在已报道的油松组织培养研究中，主要是以针叶、芽、雌配子体[2] [5]、胚乳[8]为外植体，也有以种子[2] [9]为材料产生胚性愈伤的。其中使用未成熟的大型雌配子体胚珠[5]、种子进行诱导最成功。本研究使用的是油松的合子胚为外植体，把胚纵切处理后诱导，得到了滋生的愈伤细胞。比对使用油松胚珠诱导的愈伤组织，胚诱导的愈伤质地更为疏松，增殖速度更快(图 2)。

我们实验中发现，使用在 4℃ 保存近一年的种子进行诱导时，不会滋生出愈伤组织。这可能是种子贮藏时间长，膜结构被破坏，发生质膜过氧化作用有关，造成了种子老化，从而影响了种胚组织培养[10]。且有实验表明，松树种子在低温下(4℃)预处理 2 天至 1 周，会明显提高胚萌发率。Aitken 等发现辐射松种子在 1/2SH 培养基中预处理 7 天，会明显促进完整胚和切下的子叶的茎芽发生[11]。所以油松组织培养最好使用当年的低温预处理 2~7 天的新种子进行诱导效果最佳。

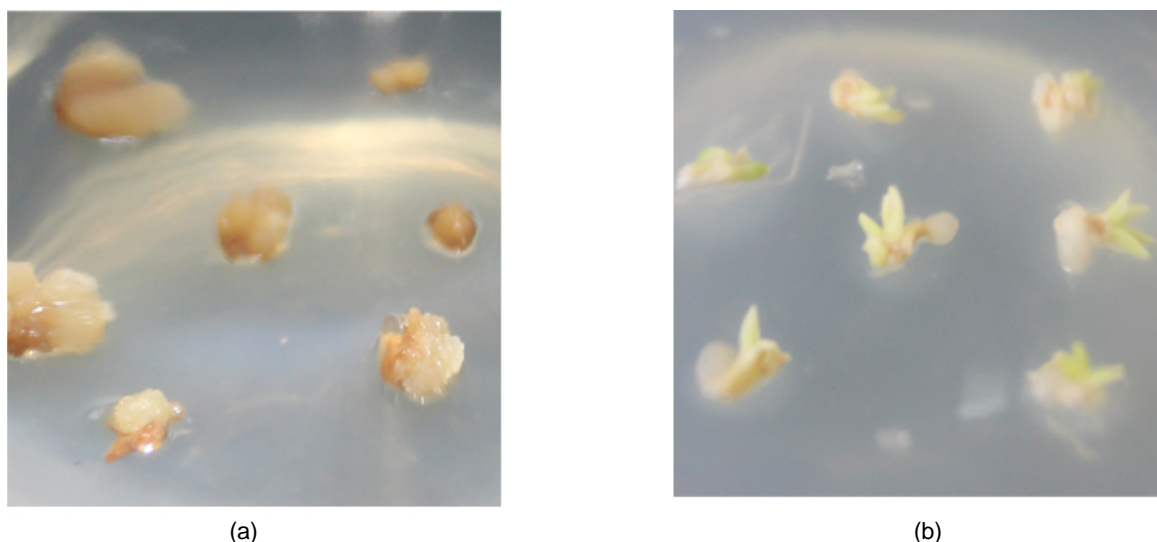


Figure 2. Different parts of *P. tabulaeformis* callus induction: (a) Callus induced from the ovules; (b) callus induced from embryos

图 2. 油松不同部位诱导愈伤组织：(a) 油松胚珠诱导愈伤组织；(b) 油松合子胚诱导愈伤组织

4.1.2. 培养基

大量研究表明,基本培养基的成分及使用浓度对松属树种的分化至为关键,而选择合适的培养基最为重要[6]。目前,松树组织培养最常用的培养基有SH、DCR和MS等。在湿地松胚培养分化研究中发现,只有明显降低 NO_3^- 和 NH_4^+ 的含量是,才能促进胚发育,当去掉 NH_4NO_3 时,可诱导产生更多地分化芽[12][13]。说明与培养基中氮元素含量有关,DCR的氮含量介于MS和SH培养基之间,含盐量适中有利于愈伤组织发生。周巧云等使用的DCR培养基诱导愈伤组织,诱导率达到66%[2]。本研究使用的DCR培养基,根据国外研究进行了改良[14](培养基配方见附录)。诱导培养基中,降低了硝酸铵的含量,加入了硝酸镁、硝酸银来提高硝酸根离子的含量,比使用原始DCR培养基诱导率高,达到了82.9%,比使用MS培养基的诱导率高。继代培养基中提高了硝酸铵的含量提供氮源维持增殖的状态。

对于外加激素的选择,目前国内诱导愈伤组织的研究一般为NAA和6-BA的组合[2][5][9]。我们根据国外对辐射松、火炬松培养愈伤组织的研究[14],设计使用了NAA、6-BA和Kt的组合,得到了较高的诱导率。其中Kt作为细胞分裂素,应用在不同物种的愈伤组织培养中。当细胞分裂素和生长素比值小于1时,容易诱导针叶树种产生愈伤组织[15]。本研究使用的激素浓度都是细胞分裂素小于生长素,能够诱导获得愈伤组织。同时在诱导培养基中加入了 $10\ \mu\text{M}$ 芸苔素内酯,根据文献报道其能够促进对针叶树种愈伤组织的诱导[16]。而继代培养基使用的激素为2,4-D、6-BA和Kt,能够进行稳定的增殖,并且不容易褐化。

综合来看,诱导油松合子胚产生愈伤组织适宜的培养基为DCR + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.63 mg/L 6-BA + 0.61 mg/L KT + 0.1 μM BR; 继代培养基为DCR + 1.1 mg/L 2,4-D + 0.45 mg/L 6-BA + 0.43 mg/L KT。

4.1.3. 其他因素

一般松树培养愈伤组织的问题在于继代时材料容易褐化,多采用添加活性炭在培养基来解决[14][17],同时也有采用缩短继代周期的方法[2]。前人曾在火炬松胚性细胞悬浮培养基中采用加入一定量火炬松种子胚乳粉的方法[18],对防止褐化也有一定的效果。但是油松组织培养的研究表明,胚培养过程中加入活性炭能减轻,但是不能解决褐化问题[8]。另外,活性炭的加入,一定程度上能够促进松树的器官分化,对于愈伤组织的增殖不利[4]。本研究培养基中加入活性炭时愈伤组织增殖速度减慢;另一方面,当继代周期大于两周时,会出现褐化的情况。所以本研究使用的培养基没有加入活性炭,而是采用短间隔继代来防止愈伤组织褐化。

4.2. 悬浮细胞的培养

油松悬浮细胞系的培养,主要难度在于选择合适的愈伤组织进行液体培养。一般质地疏松易碎、小颗粒状、颜色呈白色或黄色的愈伤组织,在继代培养过程中表现为分裂能力强,增殖速度快,最适合用于启动悬浮培养并且能快速建立稳定悬浮细胞系[19]。本研究得到稳定增殖、不易褐化的浅色愈伤组织进行了液体培养,使用的培养基与继代培养基相似。愈伤组织的起始接种密度对细胞的生长也有影响,密度过低悬浮细胞生长滞后缓慢极易褐化死亡,密度过高时细胞发育受限需要频繁更换培养基。本研究根据火炬松悬浮细胞培养的起始浓度设置,每周进行继代操作,能够得到稳定增殖的油松悬浮细胞。

后续对于油松悬浮细胞的培养还需要进一步的探索,对其胚发生能力以及胚胎是否变异进行实验。一般松树的体胚发生需要建立胚性的悬浮细胞系[7][20],但是随着时间推移悬浮细胞的生长和胚发生能力会下降,而且细胞易污染,重新起始新的胚性系也很费时。所以后续对于油松悬浮细胞还需要很多方面的研究。

基金项目

国家自然科学基金项目(31370590, 31570582, 31500161)。

参考文献

- [1] 莎仁图雅, 田有亮, 郭连生. 大青山区阳坡油松人工林土壤水分特征研究[J]. 干旱区资源与环境, 2009, 23(3): 162-165.
- [2] 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.
- [3] 郑均宝, 陈正华. 油松离体胚子叶的组织分化和无根试管苗的形成[J]. 河北林果研究, 1994(2): 97-101.
- [4] 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, 1996(4): 307-314.
- [5] 杨远媛, 贺寄青, 郑彩霞. 油松胚珠愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立[J]. 植物生理学报, 2005, 41(5): 591-594.
- [6] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养[J]. 植物学报, 1994, 11(1): 34-42.
- [7] Klimaszewska, K., Trontin, J.-F., Becward, M.R., *et al.* (2007) Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, **1**, 11-25.
- [8] 顾淑荣, 陈正华. 白皮松和油松雌配子体愈伤组织的诱导和分化[J]. 植物生态学报(英文版), 1995(3): 217-221.
- [9] 高春智, 田有亮, 白玉娥, 等. 油松种胚组织培养激素组合[J]. 干旱区资源与环境, 2013, 27(10): 191-194.
- [10] 林涛, 白玉娥, 魏青芸, 等. 光照、温度和水分条件对沙地云杉种子萌发影响的研究[J]. 干旱区资源与环境, 2005, 19(2): 188-191.
- [11] Aitken, J., Horgan, K.J. and Thorpe, T.A. (1981) Influence of Explant Selection on the Shoot-Forming Capacity of Juven. *Revue Canadienne De Recherche Forestière*, **11**, 112-117. <https://doi.org/10.1139/x81-015>
- [12] Pullman, G.S., Zeng, X., Copeland-Kamp, B., *et al.* (2015) Conifer Somatic Embryogenesis: Improvements by Supplementation of Medium with Oxidation-Reduction Agents. *Tree Physiology*, **35**, 209-224. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu117>
- [13] Tret'yakova, I., Voroshilova, E., Tret'yakova, I., *et al.* (2014) Embryo Initiation from *Pinus sibirica* Megagametophytes in *in Vitro* Culture. *Russian Journal of Developmental Biology*, **45**, 93-100. <https://doi.org/10.1134/S1062360414020064>
- [14] Pullman, G.S. and Bucalo, K. (2011) Pine Somatic Embryogenesis Using Zygotic Embryos as Explants, *Plant Embryo Culture*. Humana Press, New York, 267-291.
- [15] 齐力旺, 杨云龙, 韩素英, 等. 油松封顶芽的组织培养[J]. 植物生理学报, 1995(1): 40-41.
- [16] Ma, X., Bucalo, K., Determann, R.O., *et al.* (2012) Somatic Embryogenesis, Plant Regeneration, and Cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a Highly Endangered Coniferous Species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, **48**, 324-334. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9433-4>
- [17] 刘永红, 孔令亚, 王娟娟, 等. 针叶树离体培养研究进展[J]. 陕西林业科技, 2005(2): 52-56.
- [18] 唐巍, 欧阳藩, 郭仲琛. 火炬松胚性细胞悬浮培养物的生长参数变化[J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(1): 30-34.
- [19] 陈婷, 栾恒淳. 水稻悬浮体细胞胚胎发生及其特异蛋白[J]. 东北师大学报(自然科学), 2000, 32(4): 52-58.
- [20] Tautorus, T.E., Fowke, L.C. and Dunstan, D.I. (1991) Somatic Embryogenesis in Conifers. *Canadian Journal of Botany*, **69**, 1873-1899. <https://doi.org/10.1139/b91-237>

附录(Appendix)

Table 1. *Pinus tabulaeformis* callus initiation, maintenance medium components

表 1. 油松悬浮细胞培养培养基配方表

组成成分(mg/L)	诱导培养基	继代培养基	悬浮细胞培养基
NH ₄ NO ₃	200	603.8	603.8
KNO ₃	909.9	909.9	909.9
KH ₂ PO ₄	136.1	136.1	136.1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236.2	236.2	236.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5	246.5	246.5
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	256.5	256.5	256.5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	101.7	101.7	101.7
KI	4.15	4.15	4.15
H ₃ BO ₃	15.5	15.5	15.5
MnSO ₄ ·H ₂ O	10.5	10.5	10.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14.4	14.4	14.4
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125	0.125	0.125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.125	0.125	0.125
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.125	0.125	0.125
AgNO ₃	3.398	0	0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9	6.95	6.95
Na ₂ EDTA	18.65	9.33	9.33
麦芽糖	15000	0	0
蔗糖	0	30000	30000
D-木糖	100	0	0
肌醇	20000	1000	1000
酪蛋白氨基酸	500	500	500
L-谷氨酰胺	450	450	450
盐酸硫胺素	1.0	1.0	1.0
盐酸吡哆醇	0.5	0.5	0.5
烟酸	0.5	0.5	0.5
甘氨酸	2.0	2.0	2.0
MES	250	250	0
生物素	0.05	0.05	0
叶酸	0.5	0.5	0
Vitamin B ₁₂	0.1	0	0
Vitamin E	0.1	0	0
α-酮戊二酸	100	0	0
NAA	2.0	0	0
2,4-D	0	1.1	1.1
6-BA	0.63	0.45	0.45
KT	0.61	0.43	0.43
BR	0.1μM	0	0

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2168-5665，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：br@hanspub.org