



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104381131 B

(45) 授权公告日 2016.06.29

(21) 申请号 201410573714.1

(22) 申请日 2014.10.24

(73) 专利权人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 35 号

(72) 发明人 张金凤 李慧 赵健 王晓琪
付双彬 康向阳 罗晓芳 张俊琦
胡冬梅

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务
所 11308

代理人 喻蓉

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

审查员 荆丹丹

权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

一种油松体细胞胚发生与植株再生方法

(57) 摘要

本发明公开了一种油松体细胞胚胎发生和植株再生方法,包括 1) 采集油松球果并进行表面灭菌,获得无菌合子胚;2) 将无菌合子胚接种到胚性愈伤组织诱导培养基上,进行愈伤组织诱导培养;3) 将获得的胚性愈伤组织接种于体细胞胚成熟培养基上,进行体细胞胚发生培养;4) 将成熟的体细胞胚接种于萌发培养基中进行萌发培养,获得体胚苗;5) 将体胚苗进行炼苗、移栽,即得。通过本发明的诱导方法,首次通过诱导胚性愈伤组织的途径获得了大量稳定生长的油松体细胞胚,并获得完整小植株。本发明方法中愈伤组织诱导率、体细胞胚发生率、萌发率高,可以在短期内形成大量优良的油松试管苗,可进行规模化、工厂化生产。

1. 一种油松体细胞胚发生和植株再生方法,包括如下顺序进行的步骤:

1)采集油松球果;

2)将油松球果进行表面灭菌后取出其合子胚,获得无菌合子胚;

3)将无菌合子胚接种到胚性愈伤组织诱导培养基上,进行愈伤组织诱导培养,获得胚性愈伤组织;

4)将胚性愈伤组织接种于体细胞胚成熟培养基上,进行体细胞胚发生培养,获得体细胞胚;

5)将成熟的体细胞胚接种于萌发培养基中进行萌发培养,获得体胚苗;

6)将体胚苗进行炼苗、移栽,

其中:

步骤3)中所述胚性愈伤组织诱导培养基是改良1/2LM培养基+2,4-D 1-6mg/l+6-苄氨基嘌呤0.5-2mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L;

步骤4)中所述体细胞胚成熟培养基是改良1/2LM培养基+PEG4000 50-100g/l+脱落酸50-100 μ g/ml+活性炭1-3g/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖50-70g/L+琼脂7g/L;

步骤5)中所述萌发培养基是WPM基本培养基+IBA 1-2mg/L+NAA0.2-0.5mg/L+活性炭1g/L+蔗糖10-20g/L+琼脂7g/L;

其中,所述改良1/2LM培养基是将LM培养基的中 NH_4NO_3 的成分去掉,其余成分保持不变,并且大量元素减半。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征是:所述的油松球果是处于油松开花散粉后6-9周时间段内的油松球果。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是还包括步骤3A)胚性愈伤组织增殖培养,将步骤3)获得的胚性愈伤组织接种于胚性愈伤组织增殖培养基上,进行愈伤组织增殖培养,获得增殖胚性愈伤组织,其中,所述胚性愈伤组织增殖培养基是改良 1/2LM培养基+2,4-D 0.1-1.0mg/l+6-苄氨基嘌呤0.05-0.5mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L,其中,所述改良1/2LM培养基是将LM培养基的中 NH_4NO_3 的成分去掉,其余成分保持不变,并且大量元素减半。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征是还包括步骤3B)胚性愈伤组织调整培养,将步骤3A)获得的增殖胚性愈伤组织接种于胚性愈伤组织调整培养基上,进行调整培养,获得调整胚性愈伤组织,其中,所述胚性愈伤组织调整培养基是改良1/2LM培养基+活性炭1-3g/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖50-60g/L+琼脂7g/L,其中,所述改良1/2LM培养基是将LM培养基的中 NH_4NO_3 的成分去掉,其余成分保持不变,并且大量元素减半。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤3)中所述愈伤组织诱导培养、步骤4)中所述体细胞胚发生培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

一种油松体细胞胚发生与植株再生方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物组织培养的方法,特别涉及油松离体培养和植株再生的方法,属于属林业行业中的细胞工程种苗繁育技术领域。

背景技术

[0002] 油松(*Pinus tabulaeformis* C.),又称红皮松、短叶松等等,为松科松属针叶常绿乔木。油松是我国特有的针叶树树种,为华北地区最主要的造林树种之一,其分布区跨越14个省区。油松姿态优美,主干嶙峋,侧干崎岖,四季常春,不畏风雪严寒,自古被人美誉为具有苍劲有力、刚正不屈的情操。因根系发达,油松具有耐旱、耐寒、耐贫瘠的抗性优势,在我国北方广大生境较差地区的造林中占有特殊地位,是绿化荒山不可取代的树种。油松木材富含松脂,耐腐,适作建筑、家具、枕木、人造纤维等用材,提取的松脂也是一种珍贵的工业原料。

[0003] 自从建国以来,我国不少学者开展了油松优树选择和营建种子园的工作,利用选择的优树进行营养繁殖,以使原植株的优良性状得以保持。但由于油松的营养繁殖很困难,生长周期长,目前能够用于林业生产的仅有嫁接方法。油松种子园投资大,结实晚,面积有限,而建立的种子园又普遍存在种子产量不稳定,球果虫害严重,出种率低等问题。这给油松良种的实生繁殖带来很大问题,不能满足生产的要求,极大的限制了良种的推广和应用,影响了造林质量。

[0004] 组织培养技术是解决良种繁殖的主要途径之一,也是实现遗传转化及转基因技术的前提。体细胞胚胎发生及其植株再生技术是20世纪90年代形成的高新林业生物技术的重要内容之一,可用于优良品种的大规模繁殖和用于遗传转化体系的建立。体细胞胚发生,是指二倍体或单倍体细胞在未经性细胞融合的过程,模拟合子胚发生的各个阶段而发育形成一个新的个体的形态发生和重建过程。这种经体细胞胚胎发生而形成的在形态结构和功能上类似于有性胚的结构被称之为体细胞胚或者胚状体。

[0005] 体细胞胚胎发生在保持遗传稳定性,提高繁殖率,缩短培养时间等方面与芽增殖或其他器官发生相比具有无可比拟的优势,尤其在常规营养繁殖困难的木本植物上,更显示出其巨大潜力。体细胞胚胎发生技术克服了传统育种方法的诸多缺点,已逐渐成为植物快速繁殖的重要手段。

[0006] 科研人员发现:①外植体的选择对针叶树体细胞胚胎发生至关重要。外植体的类型及成熟程度决定着体细胞胚胎发生能否成功。同一植物不同组织,器官对相同的外界信号刺激的敏感程度不同,因此感受态也不同。一般来说,材料越幼嫩,其胚性感受态越高,即体胚发生越容易。外植体球果在接种前必须在低温条件下(0-4℃)冷藏一段时间,一般要冷藏1-2个月,没有低温处理不能启动。②外植体基因型的选择对针叶树体细胞胚发生存在明显影响。不同家系之间胚性愈伤组织的诱导率,体细胞胚的获得率均不同。③培养基的营养成分及含量对针叶树胚性愈伤组织及体细胞胚的诱导至关重要。

[0007] 在植物组织培养中,诱导体细胞胚胎发生和诱导器官发生相比具有显著的特点:

①针叶树胚性细胞的第一次分裂为不均等分裂,形成顶细胞和基细胞,具有两极性。其后体积较小的顶细胞继续分裂形成多细胞原胚,而体积较大的基细胞进行少数几次分裂成为胚柄部分,在形态上具有明显的极性。在针叶树中,胚细胞和胚柄细胞不断分裂发育形成一团细胞,即胚性愈伤组织,在松柏类植物中称为胚性胚柄团(embryonic suspensor mass, ESM)。ESM由细胞质浓,体积较小的胚头细胞和高度液泡化、伸长的胚柄细胞组成。②体细胞胚形成后与母体植物或外植体分离,出现所谓生理上的隔离现象。胚性细胞细胞壁加厚,很容易把它们与其它细胞分开。体胚与合子胚十分相似,从一开始就是完整的个体。③体细胞胚胎发生途径相比植物组织培养中器官发生,是最直接体现植物细胞全能性的方式,重演了合子胚形态发生的进程。目前有关植物组织培养技术的各类文献中,尚未见有油松(*Pinus tabulaeformis* C.)体细胞胚胎发生和植株再生的研究技术。

[0008] 本发明的主要目的是针对油松天然结实率低,扦插困难,种苗繁殖技术无法满足大面积植树造林需要的现状,寻找一种油松体细胞胚胎发生的技术,为油松的大规模无性繁殖育苗提供一种周期短、繁殖率高、成本低廉的方法。

发明内容

[0009] 本发明的首要目的是针对上述现有技术存在的问题提供一种新的油松体细胞胚发生和植株再生方法,该方法的油松体细胞胚诱导率高、体胚萌发率高,可以在较短时间内形成大量优良的油松试管苗,可进行规模化、工厂化生产,本发明为油松的大规模无性繁殖育苗提供一种周期短、繁殖率高、成本低廉的方法。

[0010] 为实现上述目的,本发明一方面提供一种油松体细胞胚发生和植株再生方法,包括如下顺序进行的步骤:

[0011] 1)采集油松球果;

[0012] 2)将油松球果进行表面灭菌后取出其合子胚,获得无菌合子胚;

[0013] 3)将无菌合子胚接种到胚性愈伤组织诱导培养基上,进行愈伤组织诱导培养,获得胚性愈伤组织;

[0014] 4)将胚性愈伤组织接种于体细胞胚成熟培养基上,进行体细胞胚发生培养,获得体细胞胚;

[0015] 5)将成熟的体细胞胚接种于萌发培养基中进行萌发培养,获得体胚苗;

[0016] 6)将体胚苗进行炼苗、移栽,即得。

[0017] 本发明中所述体细胞胚简称体胚。

[0018] 油松的外植体胚龄对愈伤组织的诱导率影响显著,过嫩或过熟的合子胚均不能得到理想的胚性愈伤组织诱导结果。本发明通过大量的实验发现,处于开花散粉后第6-10周时间段内的油松球果作为外植体,其胚性愈伤组织诱导效果相比于其它时间段内的球果有明显的提高;进一步的实验发现,采集处于油松开花散粉后第44天至第65天这一时间段内的球果作为外植体的合子胚处于球形胚和鱼雷胚阶段,其繁殖效果有进一步的提高,采用处于油松开花散粉后第44天至第58天这一时间段内的球果作为外植体的繁殖效果得到了更进一步的提高,采用处于开花散粉后第51天的油松球果作为外植体取得了最好的繁殖效果:采集油松开花散粉后第51天的球果中的未成熟合子胚在诱导培养基上的出愈率均高于其它时期的外植体,其胚性愈伤组织诱导率为6-10%、诱导得到的胚性愈伤组织生长速度

快,呈透明晶莹状,水分很大,松散状态,经多次继代仍能保持较高的活力;愈伤组织有胚性和非胚性的区别,其中胚性愈伤组织结构松散,半透明,非胚性愈伤组织结构致密,颜色发黄,之后的实验不能得到体胚;胚性愈伤组织发育成体细胞胚诱导率为100%,体胚萌发率达80%,均明显高于其它时段的外植体,所以本发明最优选采集处于开花散粉后第51天的油松球果作为外植体。

[0019] 其中,步骤2)中所述灭菌处理包括如下顺序进行的步骤:

[0020] A)将采集的油松球果首先用洗洁精清洗,接着用自来水冲洗;

[0021] B)吸干球果表面水分后从球果中取出种子;

[0022] C)种子首先用酒精浸泡,接着用无菌水进行第一次冲洗,然后用HgCl₂溶液浸泡种子,再用无菌水进行第二次冲洗,得到无菌种子;

[0023] D)吸干种子表面的水分后在无菌状态下,剥去无菌种子种皮,得到无菌合子胚。

[0024] 特别是,步骤A)中采用自来水冲洗油松球果至少10min;步骤C)中所述酒精的体积百分比浓度为75%;浸泡时间为1min;无菌水第一次冲洗3-5次;所述HgCl₂溶液的质量百分比浓度为0.1%;浸泡时间为3-15min,优选为10min;无菌水第二次冲洗5-6次。

[0025] 特别是,在对采集的油松球果进行灭菌处理之前,还包括将采集的油松球果于0-4℃冷藏1-2个月后,再进行所述灭菌处理。

[0026] 其中,步骤3)中所述胚性愈伤组织诱导培养基是改良1/2LM培养基+2,4-D1-6mg/l+6-苄胺基嘌呤0.5-2mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8;优选为:改良1/2LM培养基+2,4-D 2-3mg/l+6-苄胺基嘌呤1-2mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8;进一步优选为:改良1/2LM培养基+2,4-D 2mg/l+6-苄胺基嘌呤1mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8。

[0027] 特别是,步骤3)中所述胚性愈伤组织诱导培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为25±2℃;培养时间为50-60天。

[0028] 尤其是,胚性愈伤组织诱导培养过程中每20-25天继代培养一次;继代培养次数为2-3次。

[0029] 尤其是,胚性愈伤组织诱导培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0030] 特别是,还包括步骤3A)胚性愈伤组织增殖培养,将步骤3)获得胚性愈伤组织接种于胚性愈伤组织增殖培养基上,进行愈伤组织增殖培养,获得增殖胚性愈伤组织。

[0031] 其中,所述胚性愈伤组织增殖培养基是改良1/2LM培养基+2,4-D 0.1-1.0mg/l+6-苄胺基嘌呤0.05-0.5mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8;优选为改良1/2LM培养基+2,4-D 0.2-0.4mg/l+6-苄胺基嘌呤0.1-0.2mg/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖20-50g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8。

[0032] 特别是,步骤3A)中所述胚性愈伤组织增殖培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为25±2℃;培养时间为6-8周。

[0033] 尤其是,胚性愈伤组织增殖培养过程中每3-4周继代培养一次;继代培养次数为2-3次。

[0034] 尤其是,胚性愈伤组织增殖培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0035] 特别是,还包括步骤3B)胚性愈伤组织调整培养,将步骤3A)获得的增殖胚性愈伤

组织接种于胚性愈伤组织调整培养基上,进行调整培养,获得调整胚性愈伤组织。

[0036] 其中,所述胚性愈伤组织调整培养基是改良1/2LM培养基+活性炭1-3g/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖50-60g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8;优选为改良1/2LM培养基+活性炭2g/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖50-60g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8。

[0037] 特别是,步骤3B)中所述胚性愈伤组织调整培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$;培养时间为7-15天。

[0038] 尤其是,胚性愈伤组织调整培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0039] 其中,步骤4)中所述体细胞胚成熟培养基是改良1/2LM培养基+PEG400050-100g/l+脱落酸50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +活性炭(AC)1-3g/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖50-70g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8;优选为改良1/2LM培养基+PEG400060-80g/l+脱落酸50-90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +活性炭1-2g/l+水解酪蛋白500mg/l+谷氨酰胺500mg/l+蔗糖50-70g/L+琼脂7g/L,pH值为5.8;步骤5)中所述萌发培养基是WPM基本培养基+IBA 1-2mg/L+NAA 0.2-2mg/L+蔗糖10-20g/L+琼脂7g/L+AC 1g/L,pH值为5.8;优选为WPM基本培养基+IBA 1mg/L+NAA 0.5mg/L+蔗糖20g/L+琼脂7g/L+AC 1g/L。

[0040] 特别是,步骤4)中所述体细胞胚发生培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$;培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0041] 尤其是,步骤4)中所述体细胞胚发生培养过程中每3-4周继代培养一次;继代培养次数为2次;培养时间为40-50天。

[0042] 特别是,步骤5)中所述萌发培养在以下条件下进行:光照条件下,培养温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$;培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0043] 尤其是,步骤5)中所述萌发培养的培养时间为7-8天;光照强度为1500-2000lux,光照周期为10-16h光照/8-14h黑暗。

[0044] 其中,步骤6)中所述炼苗、移栽包括顺序进行的步骤:打开培养瓶盖,在移栽室内炼苗培养1天,取出植株,用自来水洗净试管苗根部残留的琼脂培养基,移栽到油松无土栽培基质(珍珠岩、蛭石,珍珠岩与蛭石的体积之比为1:1)中在移栽室进行容器培养。移苗后一周保持相对湿度为70-90%,培养温度为 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$,7-10天后获得油松幼苗。

[0045] 在试管苗移栽过程中,移入时不要损伤根系,用薄塑料膜套在容器上方,注意保持足够的湿度,精心管理。

[0046] 本发明的油松体细胞胚发生和植株再生方法具有以下优点:

[0047] 1、本发明利用油松幼胚作为外植体进行体细胞胚发生和植株再生繁殖,每个培养阶段所采用的基本都是改良的1/2LM培养基(除了萌发培养基之外,萌发培养的基本培养基是WPM),具有低盐的特征,研究表明,降低 NH_4^+ 对芥菜胚培养能提高存活率和生长量,椰子汁、水解酪蛋白、谷氨酰胺等是除了 NH_4^+ 外提供还原氮的主要来源。本发明去掉 NH_4NO_3 ,用谷氨酰胺和水解酪蛋白等提供有机形式的还原态氮,可起到明显的促进分裂的作用,可以为胚性愈伤组织生长提供合适的生长环境和所需营养成分,维持其胚性稳定性和快速增殖能力,能够让胚性愈伤组织发育成质量良好的体胚。

[0048] 2、本发明的其中体胚发生和植株再生方法是在大量试验的基础上,根据油松体胚的发育特征,在其各个培养阶段向基础培养基中添加不同的植物生长调节剂及有机化合物

所得,本方法所用的培养基利于油松胚性愈伤组织的诱导、增殖、调整以及体细胞胚发生、体细胞胚萌发,改良培养基的营养成分比例适宜,其中胚性愈伤组织的诱导率为3.9-10%,占愈伤组织总量的40-100%、体细胞胚发生率达90-100%、体细胞胚萌发率达53%以上。

[0049] 3、本发明方法繁殖的油松苗生长健壮、繁殖系数高,培养时间短,是工厂化大规模生产油松幼苗的简便、快捷的技术体系。

附图说明

- [0050] 图1是油松未成熟合子胚诱导培养的胚性愈伤组织;
[0051] 图2是油松胚性愈伤组织增殖阶段分化出胚头和胚柄结构;
[0052] 图3是油松胚性愈伤组织调整培养阶段表面有刺状突起;
[0053] 图4是油松胚性愈伤组织成熟培养的油松体细胞胚;
[0054] 图5是油松体细胞胚萌发培养的体胚苗;
[0055] 图6是油松体胚苗炼苗、移栽得到的油松幼苗。

具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0057] 本发明实施例中数据采用Microsoft Excel和SPSS10.0软件进行方差分析与多重比较(邓肯式检验, $P=0.01$);百分数经反正弦($y=\arcsin x_{1/2}$)转换后再进行分析和比较,邓肯式显著性检验结果存在显著差异。

[0058] 实施例1

[0059] 一、试验材料

[0060] 1、油松未成熟的合子胚

[0061] 本发明以北京林业大学林场(北京市海淀区,经度:116.34,纬度:40.00)良好、成熟,健康,无虫害,结实率高的10棵油松为取材资源,在2013年5月上旬至6月下旬期间,采集散粉后第4-11周的油松球果,每间隔7天采集一次,即采集散粉后30、37、44、51、58、65、72、79天的球果,每次每棵树采集30个球果,每次一共采集300个球果,将当天采集的球果在冰盒中低温保存带回实验室,之后放在0-4℃的冰箱里冷藏1-2个月,备用。

[0062] 2、植物生长调节剂

[0063] 本发明中所使用的植物生长调节物质采用国产6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)。

[0064] 3、培养基

[0065] (1)改良1/2LM培养基

[0066] 表1 改良1/2LM培养基配方

[0067]

大量元素母液成分	含量 mg/L	微量元素母液成分	含量 mg/L	有机化合物母液成分	含量 mg/L
KNO ₃	950	H3BO3	31	肌醇	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	925	MnSO ₄ ·H ₂ O	21	烟酸	0.5
KH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	43	维生素 B6	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	210	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	15	维生素 B1	0.1
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.50		
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.13		
		KI	4.15		
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	28		
		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3		

[0068] 改良1/2LM基本培养基,即将LM培养基中的NH₄NO₃的成分去掉,其余成分保持不变,并且大量元素减半。

[0069] (2)WPM培养基

[0070] 表2 WPM培养基配方

[0071]

大量元素母液成分	含量 mg/L	微量元素母液成分	含量 mg/L	有机化合物母液成分	含量 mg/L
NH ₄ NO ₃	400	MnSO ₄ ·H ₂ O	22.4	肌醇	100
K ₂ SO ₄	990	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	甘氨酸	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	烟酸	0.5
KH ₂ PO ₄	170	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	维生素 B6	0.5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80	维生素 B1	1.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	96	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.30		

[0072] 上述改良1/2LM培养基母液、WPM培养基母液配好后,分别进行标记,然后分别储存于温度为4℃的冰箱中,待用。根据配制培养基的体积,向去离子水中依次加入所需的大量元素母液、微量元素母液和有机成分母液和称量好的琼脂、蔗糖、水解酪蛋白,每加入一种都充分搅拌,最后加水定容至培养基最终体积,用pH计测试培养基酸碱度,用1mol/L的NaOH或1mol/L的HCl将pH调整至5.8。在温度121℃下恒温灭菌15分钟。待培养基冷却到50℃左右,在超净工作台中过滤灭菌谷氨酰胺,加入到培养基中混合摇匀。

[0073] (3)胚性愈伤组织诱导培养基:改良1/2LM培养基中添加2,4-D 1-6mg/L、6-BA 0.5-2mg/L、水解酪蛋白500mg/L、谷氨酰胺500mg/L、蔗糖20-50g/L、琼脂7g/L,调节pH值为5.8,在温度121℃下恒温灭菌15分钟。待培养基冷却到50℃左右,在超净工作台中过滤灭菌谷氨酰胺,加入到培养基中混合摇匀。

[0074] (4)胚性愈伤组织增殖培养基:改良1/2LM培养基中添加2,4-D 0.1-1.0mg/L、6-BA 0.05-0.5mg/L、水解酪蛋白500mg/L、谷氨酰胺500mg/L、蔗糖20-50g/L、琼脂7g/L,调节pH值为5.8,在温度121℃下恒温灭菌15分钟。待培养基冷却到50℃左右,在超净工作台中过滤灭菌谷氨酰胺,加入到培养基中混合摇匀。

[0075] (5)胚性愈伤组织调整培养基:改良1/2LM培养基中添加活性炭1-3g/L、水解酪蛋白500mg/L、谷氨酰胺500mg/L、蔗糖50-60g/L、琼脂7g/L,调节pH值为5.8,在温度121℃下恒

温灭菌15分钟。待培养基冷却到50℃左右,在超净工作台中过滤灭菌谷氨酰胺,加入到培养基中混合摇匀。

[0076] 由于胚性愈伤组织的内部吸收了许多生长素和细胞分裂素,对下一步体胚的分化不利,因此需要停止添加任何的植物生长调节剂,让胚性愈伤组织内部吸收的生长素和细胞分裂素的含量降下来。添加活性炭有助于吸附胚性愈伤组织中的生长调节剂,为下一步体胚的分化做准备。

[0077] (6)体细胞胚成熟培养基:改良1/2LM培养基中添加PEG400050-100g/l、ABA 50-100μg/ml、活性炭1-3g/l、水解酪蛋白500mg/l、谷氨酰胺500mg/l、蔗糖50-70g/L、琼脂7g/L,调节pH值为5.8,在温度121℃下恒温灭菌15分钟。

[0078] (7)体细胞胚萌发培养基:WPM基本培养基中添加IBA 1-2mg/L、NAA0.2-0.5mg/L、AC 1g/L、蔗糖10-20g/L、琼脂7g/L,调节pH值为5.8,在温度121℃下恒温灭菌15分钟。

[0079] 4、培养条件

[0080] (1)胚性愈伤组织诱导培养的培养条件:黑暗条件,培养温度(25±2)℃,培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0081] (2)胚性愈伤组织增殖培养的培养条件:黑暗条件,培养温度(25±2)℃,培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0082] (3)胚性愈伤组织调整培养的培养条件:黑暗条件,培养温度(25±2)℃,培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0083] (4)体细胞胚成熟培养的培养条件:黑暗条件,培养温度(25±2)℃,培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0084] (5)体细胞胚萌发培养的培养条件:培养温度为(25±2)℃,日光灯光源,光照强度为1500-2000lx,光照周期为10-16小时光照/8-14小时黑暗,培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0085] 实施例2

[0086] 1、外植体的灭菌

[0087] 分别将于0-4℃储藏1个月的散粉后第30、37、44、51、58、65、72、79天的油松球果先用洗洁精洗去球果表面的油污,接着用自来水洗净后剖开球果,取出种子;然后在超净工作台上用体积百分比浓度为75%的酒精浸泡油松球果种子1min,接着用质量百分比浓度为0.1%的HgCl₂溶液浸泡油松球果种子3-10min(优选为5min),然后用无菌水冲洗数次(3-6次);然后将油松球果种子放在无菌干燥的滤纸上吸干表面水分后在无菌状态下剥去种皮,即得未成熟的合子胚,得到开花散粉后第30、37、44、51、58、65、72、79天的表面灭菌的油松未成熟合子胚,备用;2、胚性愈伤组织诱导培养

[0088] 1)在超净工作台中将表面灭菌的开花散粉后30、37、44、51、58、65、72、79天的油松未成熟合子胚的整体作为外植体接种于胚性愈伤组织诱导培养基中,在黑暗条件下进行胚性愈伤组织的诱导培养,每20天继代培养一次,即将灭菌的未成熟合子胚培养20天之后取出,置于另一新鲜的胚性愈伤组织诱导培养基中继续进行胚性愈伤组织的诱导培养,以保持培养基内含有充足的养料和水分,其中,培养温度为(25±2)℃,胚性愈伤组织诱导培养基中所用2,4-D的用量如表1所示、6-BA为1mg/L,天然复合物水解酪蛋白500mg/L,L-谷氨酰胺500mg/l,蔗糖40g/L,琼脂7g/L,培养过程中相对湿度为60-75%,诱导培养15天后,从珠

孔端长出的愈伤组织湿润,晶莹,愈伤组织颜色为半透明,结构松散(如图1),在解剖镜下观察,表面多丝状突起,水分含量多。

[0089] 培养过程中,在培养25天左右,有些外植体发生少许褐变,经继代培养后,胚性愈伤组织快速增殖,培养60天左右能形成直径1cm的胚性细胞团。培养60天后,统计胚性愈伤组织诱导率,分析结果见表3。

[0090] 在胚性愈伤组织诱导培养过程中每次处理接种未成熟合子胚10个,重复处理5次。

[0091] 胚性愈伤组织诱导率(%)=诱导出胚性愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%

[0092] 表3 2,4-D浓度和取材时间对胚性愈伤组织诱导率的影响

[0093]

外植体胚龄	2, 4-D 浓度 (mg/L)					
	1	2	3	4	5	6
散粉后 30 天	-	-	-	-	-	-
散粉后 37 天	-	-	-	-	-	-
散粉后 44 天	3.0%±0.012	5.6%±0.021	3.4%±0.015	2.0%±0.010	0.8%±0.008	0.6%±0.008
散粉后 51 天	3.6%±0.011	9.6%±0.415	6.2%±0.019	3.6%±0.011	1.8%±0.014	1.0%±0.007
散粉后 58 天	3.0%±0.012	4.8%±0.013	4.4%±0.011	2.6%±0.018	1.5%±0.011	0.8%±0.008
散粉后 65 天	1.3%±0.015	1.6%±0.011	1.2%±0.013	0.8%±0.008	-	-
散粉后 72 天	-	-	-	-	-	-
散粉后 79 天	-	-	-	-	-	-

[0094] -表示不能诱导体胚发生

[0095] 由表1的试验结果可知:

[0096] 1、本发明油松开花散粉后第44天至第65天这一时间段内的球果均可作为外植体进行繁殖,处于油松开花散粉后第44天至第58天这一时间段内的球果作为外植体的繁殖效果较高,处于开花散粉后第51天的油松球果作为外植体的繁殖效果最好。采集油松开花散粉后第51天的球果中的未成熟合子胚在诱导培养基上的出愈率均高于其它时期的外植体,其胚性愈伤组织诱导率为6-10%。

[0097] 2、2,4-D能诱导胚性愈伤组织产生,如果浓度过低,则胚性细胞生长太慢,不利于增殖,如果浓度过高,长势太快,胚性细胞中残留的生长素太高,则不利于后面的体胚的成熟,状态不易调整。结果表明,添加2.0或3.0mg/l浓度的2,4-D较为合适。

[0098] 3、合子胚发育阶段(球果采集时间)对体胚发生有关键性影响。表1说明油松球果采集时间即幼胚发育阶段,对体细胞胚胎的诱导起着至关重要的作用,球形期至子叶前期的幼胚对体胚诱导都有效。但是采集时间过早幼胚还未形成,采集过迟合子胚已经发育成熟,分化程度太高,都不利于体胚的诱导。

[0099] 实施例3

[0100] 1、外植体的灭菌

[0101] 将于0-4℃储藏1个月的散粉后第51天的油松球果按照实施例2的外植体灭菌方法处理,获得灭菌的油松未成熟合子胚;

[0102] 2、胚性愈伤组织诱导培养

[0103] 在超净工作台中将表面灭菌的开花散粉后51天的油松未成熟合子胚的整体作为外植体接种于胚性愈伤组织诱导培养基中,在黑暗条件下进行胚性愈伤组织的诱导培养,每20天继代培养一次,即将灭菌的未成熟合子胚培养20天之后取出,置于另一新鲜的胚性愈伤组织诱导培养基中继续进行胚性愈伤组织的诱导培养,以保持培养基内含有充足的养料和水分,其中,培养温度为(25±2)℃,胚性愈伤组织诱导培养基中所用2,4-D为2mg/L、6-BA为1mg/L,天然复合物水解酪蛋白500mg/L,L-谷氨酰胺500mg/l,蔗糖40g/L,琼脂7g/L,培养过程中相对湿度为60-75%,诱导培养15天后,从珠孔端长出的愈伤组织(如图1)。

[0104] 培养60天左右能形成直径1cm的胚性细胞团。统计胚性愈伤组织诱导率,数据分析结果见表4。

[0105] 3、胚性愈伤组织增殖培养

[0106] 将胚性愈伤组织分割成0.5cm×0.5cm的小块,接种到胚性愈伤组织增殖培养基上,在黑暗条件下进行油松胚性愈伤组织增殖培养,其中,培养温度为(25±2)℃,胚性愈伤组织增殖培养基中所用2,4-D为0.4mg/L,6-BA为0.2mg/L,天然复合物水解酪蛋白500mg/L,L-谷氨酰胺500mg/l,蔗糖50g/L,琼脂7g/L,培养过程中相对湿度为60-75%,在油松胚性体细胞胚增殖培养过程中每3-4周继代一次,即将胚性愈伤组织块培养3-4周后取出,置于另一新鲜的胚性体细胞胚增殖培养基中继续进行胚性体细胞胚培养,以保持培养基内含有充足的养料和水分,继代培养2次后,获得大量半透明的油松胚性增殖愈伤组织。用醋酸洋红压片镜检,可以清楚的看到胚头和胚柄的分化(如图2)。

[0107] 在胚性愈伤组织增殖培养过程中长时间添加高浓度的2,4-D对后期胚性细胞分化是不利,降低外源性植物生长激素的含量,愈伤组织细胞生长速度得到控制,有利于体胚极性的形成。研究显示,高浓度的2,4-D和BA有利于胚性愈伤组织的诱导,但不利于后期单胚的形成,如果长时间处于高浓度的2,4-D的培养基中,易造成体细胞胚成熟能力的丧失。所以,胚性愈伤组织增殖培养基中2,4-D和6-BA的浓度降低,胚性愈伤组织能够以一种健康的、稳定的状态分裂增殖,数量和体积增大,保持旺盛的增殖能力,为下一步得到大量的体胚做准备。

[0108] 4、胚性愈伤组织调整培养

[0109] 将油松增殖胚性愈伤组织整体转接到胚性愈伤组织调整培养基中,在黑暗条件下进行油松胚性愈伤组织调整培养,其中,培养温度为(25±2)℃,胚性愈伤组织调整培养基中所用活性炭为2g/l,天然复合物水解酪蛋白500mg/L,L-谷氨酰胺500mg/l,蔗糖50g/L,琼脂7g/L,培养过程中相对湿度为60-75%,将油松胚性增殖愈伤组织块调整培养2周后取出。培养2周后在愈伤组织的表面,可以观察到在愈伤组织的表面有刺状突起(图3)。

[0110] 由于胚性愈伤组织的内部吸收了许多生长素和细胞分裂素,这对下一步体胚的分化是不利的,所以需要停止添加任何的植物生长调节剂,让胚性愈伤组织内部吸收的生长素和细胞分裂素的含量降下来。添加活性炭有助于吸附胚性愈伤组织中的生长调节剂,为下一步体胚的分化做准备;在胚性愈伤组织调整培养过程中提高蔗糖浓度至50-60g/L、添

加浓度为2g/l的活性炭的目的是提高培养基的渗透压,在胚状体的形成初期,活性炭可以吸附多余的植物生长调节剂,降低胚性调整愈伤组织中的植物生长调节剂含量。

[0111] 5、体细胞胚发生培养

[0112] 将油松调整胚性愈伤组织整体转接到体细胞胚成熟培养基中,在黑暗条件下进行油松体细胞胚的发生培养,其中,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,体细胞胚发生培养基中所用PEG4000为50g/L,ABA为 $80\mu\text{g/ml}$,天然复合物水解酪蛋白500mg/L,L-谷氨酰胺500mg/L,蔗糖60g/L,琼脂7g/L,培养过程中相对湿度为60-75%,体细胞胚成熟培养过程中每3周继代一次,即将胚性调整愈伤组织培养3周后整体取出,置于另一新鲜的体细胞胚成熟培养基中继续进行培养。继代培养2次后,可以观察到体细胞胚由鱼雷型体胚发育到子叶胚阶段(如图4),获得成熟体细胞胚。胚性愈伤组织上会不断分化形成新的胚状体,繁殖系数大,在直径为1厘米的胚性愈伤组织上,通常可看到20个左右的子叶胚发育。

[0113] 渗透压对体细胞胚胎的形成起着重要的作用,随着渗透压的提高,愈伤组织含水量逐渐减少而变的干燥,紧密。培养一个月后,愈伤组织的表面形成鱼形胚状体,进而发育成子叶胚。说明随着渗透压的提高,体胚诱导能力增强。但是渗透压过高,超出一定范围,其诱导体细胞胚胎的能力反而下降。

[0114] 利用PEG4000提高细胞的渗透压,创造一个干燥的环境,可以抑制早期萌发,明显提高胚成熟的概率而获得同步成熟好、质量高的体细胞胚胎,贮藏物的水平也会显著增加。在脱落酸ABA的作用下,胚发育不正常的情况如子叶合生、早熟发芽等会受到抑制。

[0115] 6、体细胞胚萌发培养

[0116] 将成熟的体细胞胚从愈伤组织上分离下来,转接到体细胞胚萌发培养基上,置于 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下,在光周期为16h光照/8h黑暗,光照强度为1500-2000Lux条件下培养,萌发培养过程中的相对湿度为60-75%,萌发培养基中所述IBA为1mg/L,NAA为0.5mg/L,蔗糖10-20g/L,琼脂7g/L,成熟体细胞胚子叶很快变绿,下胚轴伸长生长,培养8周后成熟体细胞胚的顶端的子叶展开,另一端分化出明显的根生长端,形成体胚苗(如图5),统计获得的体胚苗,计算体细胞胚的萌发率,分析结果如表4。

[0117] 在体细胞胚萌发培养过程中,每次处理接种体细胞胚10个,重复处理3次。

[0118] 体胚萌发率(%) = 萌发的体细胞胚数/接种的体细胞胚数 $\times 100\%$

[0119] 7、体胚苗的炼苗、移栽、定植

[0120] 体胚苗长到2厘米高,根较粗壮时,打开培养瓶瓶盖,在移栽室中炼苗培养1天后,取出植株,用自来水洗净试管苗根部残留的琼脂培养基,移栽到油松无土栽培基质(珍珠岩、蛭石,珍珠岩与蛭石的体积之比为1:1)中在移栽室进行容器培养。移苗后一周保持相对湿度为70-90%,培养温度为 $25 \pm 5^\circ\text{C}$,7-10天后获得油松幼苗(如图6)。

[0121] 实施例4

[0122] 除了胚性愈伤组织诱导培养过程中愈伤组织培养基所述的2,4-D为3mg/L,6-BA为2mg/L;胚性愈伤组织增殖培养过程中胚性愈伤组织增殖培养基所用2,4-D为0.2mg/L,6-BA为0.1mg/L;胚性愈伤组织调整培养过程中胚性愈伤组织调整培养基中所用活性炭为1g/l,蔗糖为60g/L;体细胞胚发生培养过程中体细胞成熟培养基中所用PEG4000为80g/L,ABA为 $50\mu\text{g/ml}$,活性炭为2g/L,蔗糖60g/L;体细胞胚萌发培养过程中萌发培养基中所述IBA为2mg/L,NAA为0.2mg/L,蔗糖10g/L之外,其余与实施例1相同,数据分析结果如表4所示。

[0123] 实施例5

[0124] 除了胚性愈伤组织诱导培养过程中愈伤组织培养基所述的2,4-D为4.0mg/L,6-BA为2mg/L;胚性愈伤组织增殖培养过程中胚性愈伤组织增殖培养基所用2,4-D为1.0mg/L,6-BA为0.2mg/L;胚性愈伤组织调整培养过程中胚性愈伤组织调整培养基中所用活性炭为3g/L,蔗糖为55g/L;体细胞胚发生培养过程中体细胞成熟培养基中所用PEG4000为100g/L,ABA为100 μ g/ml,活性炭为3g/L,蔗糖60g/L;体细胞胚萌发培养过程中萌发培养基中所述IBA为1mg/L,NAA为0.2mg/L之外,其余与实施例1相同,数据分析结果如表3、4所示。

[0125] 实施例6

[0126] 除了胚性愈伤组织诱导培养过程中愈伤组织培养基所述的2,4-D为1.0mg/L,6-BA为0.5mg/L;胚性愈伤组织增殖培养过程中胚性愈伤组织增殖培养基所用2,4-D为0.2mg/L,6-BA为0.2mg/L;胚性愈伤组织调整培养过程中胚性愈伤组织调整培养基中所用活性炭为2g/L,蔗糖为55g/L;体细胞胚发生培养过程中体细胞成熟培养基中所用PEG4000为50g/L,ABA为50 μ g/ml,活性炭为1g/L,蔗糖60g/L;体细胞胚萌发培养过程中萌发培养基中所述IBA为2mg/L,NAA为0.3mg/L之外,其余与实施例1相同,数据分析结果如表3、4所示。

[0127] 实施例7

[0128] 除了胚性愈伤组织诱导培养过程中愈伤组织培养基所述的2,4-D为2.0mg/L,6-BA为2.0mg/L;胚性愈伤组织增殖培养过程中胚性愈伤组织增殖培养基所用2,4-D为0.1mg/L,6-BA为0.1mg/L;胚性愈伤组织调整培养过程中胚性愈伤组织调整培养基中所用活性炭为2g/L,蔗糖为60g/L;体细胞胚发生培养过程中体细胞成熟培养基中所用PEG4000为80g/L,ABA为70 μ g/ml,活性炭为2g/L,蔗糖50g/L;体细胞胚萌发培养过程中萌发培养基中所述IBA为1mg/L,NAA为0.4mg/L之外,其余与实施例1相同,数据分析结果如表3、4所示。

[0129] 表4 油松植株再生的愈伤组织诱导率、体胚萌发率

	愈伤组织诱导率 (%)	体胚萌发率 (%)
实施例 3	9.6	80.0
实施例 4	6.0	60.4
[0130] 实施例 5	4.8	53.2
实施例 6	5.0	61.0
实施例 7	3.9	55.0
对照例 1	2.8	64.5

[0131] 对照例1

[0132] 除了胚性愈伤组织诱导培养基、胚性愈伤组织增殖培养基、胚性愈伤组织调整培养基、体细胞成熟培养基中采用1/2LM培养基之外,其余与实施例3相同,数据分析结果如表3、4所示。

[0133] 本发明具体实施方式中以开花散粉后51天的油松球果中未成熟合子胚为例进行描述,其他开花散粉后44-65天的油松球果中未成熟合子胚均可用于本发明。本发明的油松体胚发生和植株再生方法为制作油松人工种子大规模工厂化无性繁殖育苗提供一种周期

短,繁殖率高的方法,突破了油松营养繁殖困难,生长周期长,种子园投资大,结实晚,面积有限等限制,成为林木良种保持、快繁和品种改良的一条新兴途径。

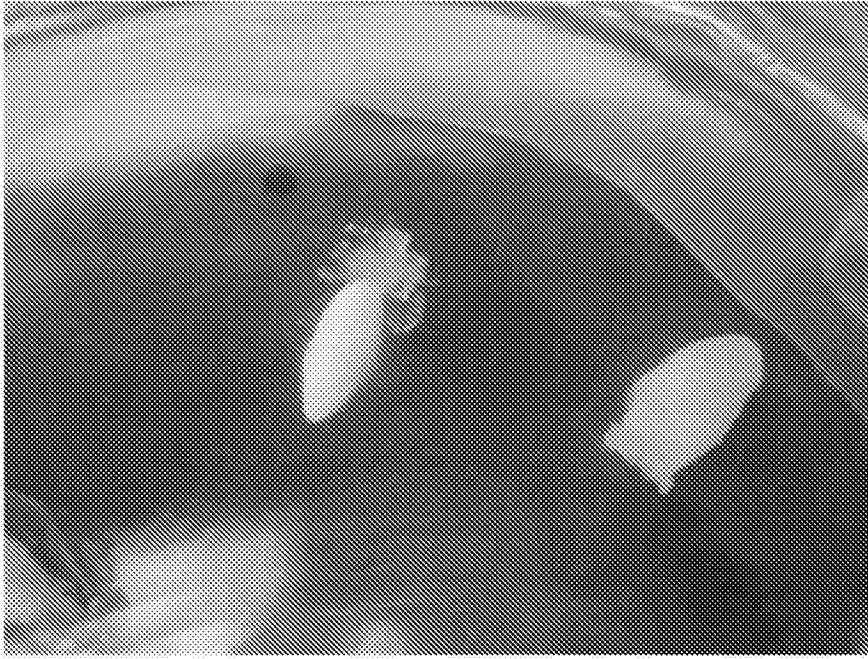


图1

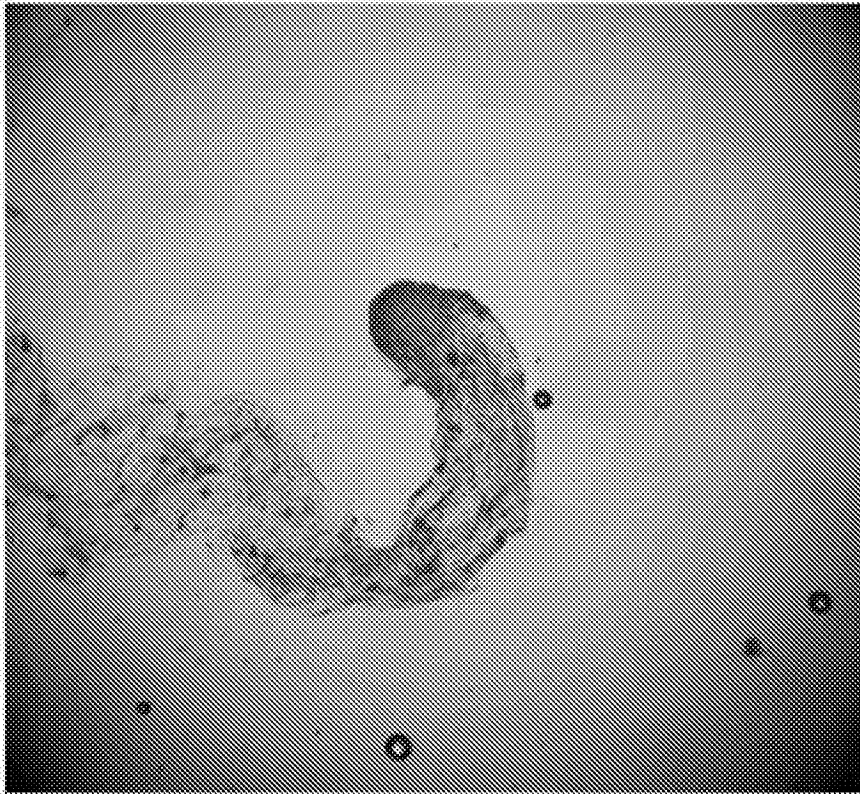


图2

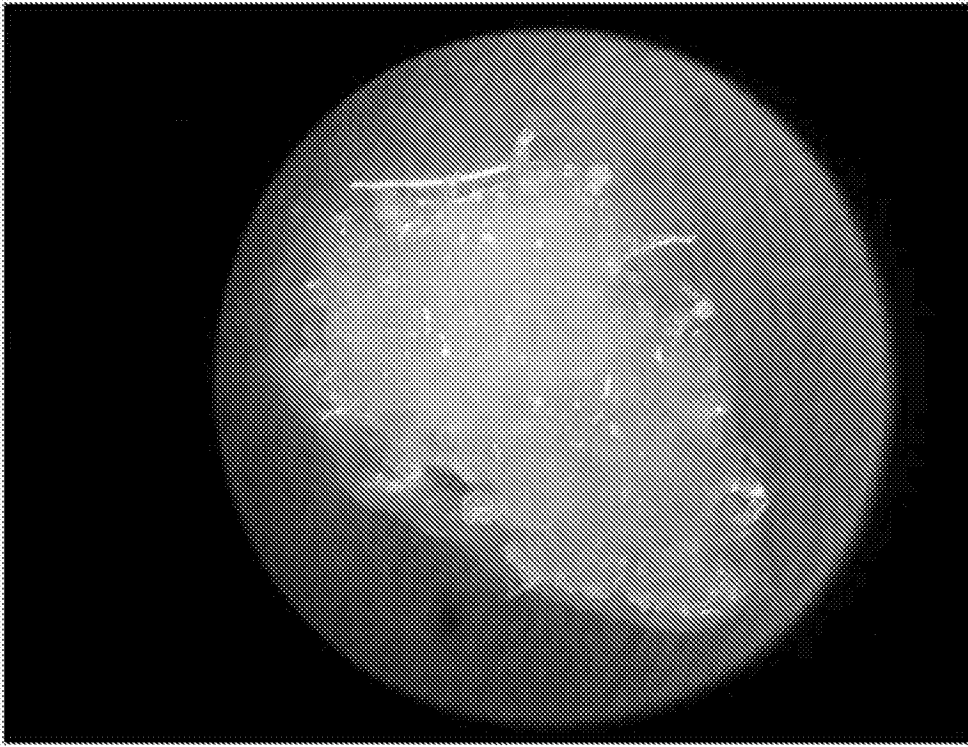


图3



图4

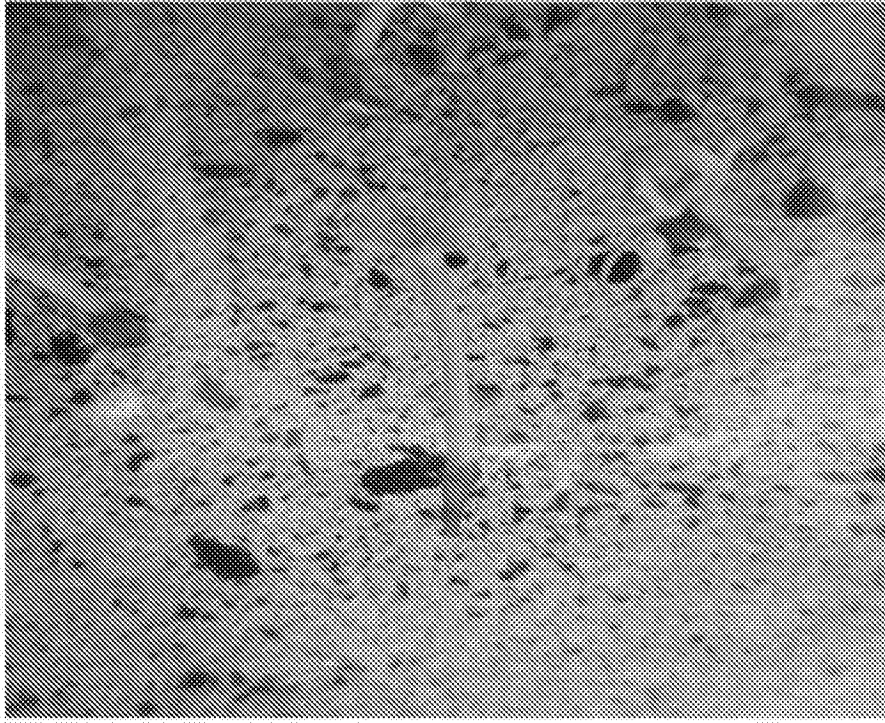


图5



图6