

日本五针松针叶胚性愈伤诱导及愈伤组织细胞学特性观察

王雪丽, 李萍萍, 吴坤阳, 石琨, 郑彩霞*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: 为建立日本五针松再生体系, 本文以其幼嫩针叶为材料, 在DCR基本培养基上分别诱导愈伤组织和胚性愈伤组织, 探索其最佳植物生长调节物质配比, 并在诱导过程中对愈伤组织进行细胞学特性观察。结果表明, 使用添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基, 愈伤组织的诱导率高达96.7%。胚性愈伤诱导培养基中添加 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 复硝酚钠、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, 可诱导细胞分化, 获得胚性愈伤, 诱导率可达53.3%, 而且其褐化率低, 生长较快。非胚性愈伤的细胞呈圆形和细长形两种, 不形成细胞团; 胚性愈伤的细胞结合紧密, 形成了胚性细胞团, 其主要由胚性细胞和胚柄细胞两种类型的细胞组成。研究结果为日本五针松再生体系建立奠定了重要的基础。

关键词: 日本五针松; 非胚性愈伤; 胚性愈伤; 形态学与细胞学特性

日本五针松(*Pinus parviflora* Sieb. et Zucc.)为松科常绿针叶乔木, 其针叶每五枚簇生为一小束, 小束簇生在枝顶和侧枝上, 枝叶短小、茂密苍劲, 树形挺拔秀丽(中国科学院中国植物志编辑委员会1978), 是观赏价值很高的造园树种, 也是盆栽或做盆景的重要树种(张万佛1999), 具有很高的经济价值。与其他针叶树类似, 日本五针松幼年期长, 成熟期的球果发育比较缓慢, 种子产量低, 不能满足生产中的急需。采用扦插扩繁成活率低, 嫁接繁殖缺乏合适砧木(徐兴友1998)。由于日本五针松繁殖和培育困难, 其优质苗木价格较高, 限制了这一树种资源在城市绿化中应用。因此, 建立日本五针松无性扩繁技术有助于该优良树种资源的推广和应用。

针叶树无性扩繁技术受到广泛重视, 目前已对50多种树种进行过离体培养研究, 所采用的外植体有合子胚(成熟胚或未成熟胚)、嫩茎、休眠芽、子叶、茎尖、雌配子体、不定芽、叶原基、下胚轴等(季孔庶等2015)。由于针叶树合子胚诱导脱分化比其他器官容易, 是许多研究者的首选。Hakman等(1985)利用挪威云杉(*Picea abies*)未成熟胚为外植体, 获得了体细胞胚; 朱晓丹等(2005)利用云南松(*Pinus yunnanensis*)成熟胚诱导出了愈伤和不定芽; 李清清等(2012)用黑松(*Pinus thunbergii*)未成熟胚诱导出了体细胞胚, 并且建立了植株再生体系; 王晓娜等(2015)利用沙松(*Abies holophylla*)成熟胚诱导出了不定芽。尽管利用合子胚建立再生体系比较容易, 但是由此所获得的再生株系性状存在不确定性, 即不能保证遗传母系的性状。以针叶等孢子体器官为外植体脱分化

获得的愈伤组织, 再经分化形成的再生株系, 理论上可保持所选择母体的性状(Ruaud等1992)。张德炎等(1997)曾以五针松(*Pinus strobus*)的幼嫩针叶为外植体诱导出了愈伤, 并筛选出了最优的愈伤继代培养基。Ruaud等(1992)则用一年生挪威云杉(*Picea abies*)的针叶诱导出了胚性愈伤。由于针叶树孢子体器官脱分化与再分化存在一定困难, 目前有关再生体系建立报道相对较少。

本文以日本五针松的针叶为外植体, 建立胚性愈伤诱导的实验条件, 并对愈伤组织进行细胞学观察, 为该树种针叶无性扩繁技术体系的建立奠定基础。

材料与方法

1 材料

实验材料为日本五针松(*Pinus parviflora* Sieb. et Zucc.)幼嫩针叶。

2 方法

2.1 愈伤组织的诱导

取日本五针松植株上当年生的幼嫩针叶, 在低浓度的洗衣粉溶液中漂洗5 min, 接着流水冲洗干净。在超净工作台上, 用75%酒精浸泡50 s, 无菌蒸馏水冲洗2~3次, 8%次氯酸钠浸泡5 min, 最后用无菌蒸馏水冲洗2~3次, 将针叶剪成3~5 mm长的切段。然后将处理好的针叶切段接种在诱导培养基上(表1), 每种诱导培养基接种40个外植体, 重复3

收稿 2016-12-15 修定 2017-01-16

资助 国家自然科学基金(31170563)。

* 通讯作者(E-mail: zhengcx@bjfu.edu.cn)。

表1 愈伤诱导的因素与水平

水平	因素	
	2,4-D/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹
1	1	0.5
2	3	1.0
3	5	1.5

表2 胚性愈伤诱导的因素与水平

水平	因素	
	TDZ/mg·L ⁻¹	复硝酚钠/mg·L ⁻¹
1	0.6	0.25
2	1.3	0.50
3	2.0	1.00

次, 在(25±2)°C黑暗条件下培养, 1个月后可见愈伤组织产生, 60 d后终止培养, 统计愈伤诱导率, 并选出最佳的诱导培养基。诱导率(%)=出现愈伤的针叶个数/外植数×100。

2.2 胚性愈伤组织的诱导

将白色质地紧密的愈伤组织放在诱导培养基上进行胚性愈伤诱导, 诱导培养基中的6-BA和IBA浓度保持不变, 加入不同浓度的TDZ和复硝酚钠。TDZ浓度设置为0.6、1.3和2.0 mg·L⁻¹ 3个水平, 复硝酚钠浓度设置为0.25、0.5和1.0 mg·L⁻¹ 3个水平, 6-BA浓度设置为1.0 mg·L⁻¹, IBA浓度设置为0.2 mg·L⁻¹, 培养基pH调整为5.8。采用完全随机区组设计, 共9种处理, 每种处理6瓶, 每瓶接入5块0.5 cm³的愈伤组织, 每种组合设置3个重复组, 见表2。在每日16 h光照、8 h黑暗、(25±2)°C条件下培养进行胚性愈伤诱导, 60 d后统计胚性愈伤诱导率, 选出最佳的诱导生长调节物质配比。诱导率(%)=胚性愈伤数/原始愈伤数×100。

2.3 非胚性和胚性愈伤的形态与细胞学特性观察

非胚性愈伤和胚性愈伤组织块用相机拍照后, 制成临时装片, 在光学显微镜下(DM 2500 Leica)观

察, 并获得电子图像。采用Phenom (飞纳)台式扫描电子显微镜(Phenom ProX, 荷兰Phenom World), 将非胚性愈伤和胚性愈伤组织块放在样品台上, 快速抽真空后, 观察并获取扫描图像。

实验结果

1 愈伤组织的诱导

日本五针松针叶切段在诱导培养基上黑暗条件下培养约30 d后, 在切段的两端切口处出现肉眼可见的淡黄色愈伤组织(图1-A), 随着时间的增加, 愈伤组织逐渐增大, 使针叶切段呈哑铃型(图1-B)。研究结果表明适宜浓度的生长素和细胞分裂素有利于愈伤组织的诱导, 由于材料幼嫩, 大部分的针叶都能产生淡黄色的愈伤组织, 但是有少量针叶切段会变成褐色, 之后死亡。总体来看, 各处理均可获得愈伤组织, 诱导率都能达到50%以上(表3)。诱导率最高的是处理3, 但与处理6没有显著性差异, 从经济的角度考虑, 生长调节物质最佳的组合是5 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA。

2 胚性愈伤组织的诱导

将原始愈伤组织放在诱导培养基上诱导胚性

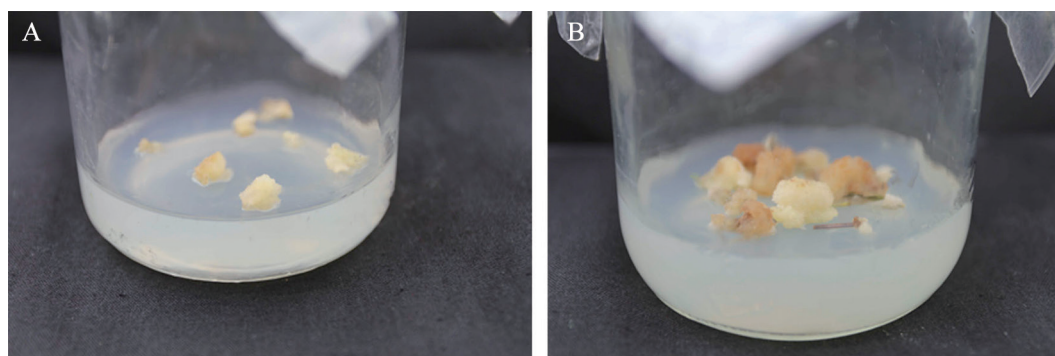


图1 日本五针松针叶的愈伤组织

Fig.1 Callus of *Pinus parviflora* sieb. et Zucc.

A: 诱导20 d的愈伤组织; B: 诱导30 d的愈伤组织。

表3 愈伤诱导的结果

Table 3 Results of callus induction

处理	因素		外植体	诱导率/%
	2,4-D/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹		
1	1	0.5	40	50.8±0.83 ^d
2	3	0.5	40	58.3±0.83 ^c
3	5	0.5	40	96.7±0.83 ^a
4	1	1.0	40	55.0±2.89 ^{cd}
5	3	1.0	40	54.2±2.20 ^{cd}
6	5	1.0	40	90.8±3.33 ^{ab}
7	1	1.5	40	50.0±3.82 ^d
8	3	1.5	40	54.2±2.20 ^{cd}
9	5	1.5	40	88.3±0.83 ^b

诱导率后字母表示不同激素组合下的诱导率多重比较结果, 标有相同字母表示无显著差异($\alpha=0.05$), 表4同此。

愈伤时, 发现使用不同种类和不同配比的生长刺激物, 胚性愈伤的诱导率和外形变化有明显的不同。有些愈伤组织在接入诱导培养基后2~3 d内长出了新生的嫩白色的组织。在前10 d的培养过程中, 愈伤组织生长较快, 白色的组织开始变成绿色, 随着培养时间的增加, 绿色逐渐加深, 愈伤表面开始出现白色的颗粒物; 但是有些愈伤在接入培养基之后, 并没有长出白色新生的愈伤, 这些组织逐渐褐化。由表4的统计结果可知, 最高的诱导率达到50%, 最低诱导率为24.4%。方差分析和多重比较可知, 复硝酚钠对胚性愈伤诱导有显著影响, 所

表4 胚性愈伤诱导的结果

Table 4 Results of embryonic callus induction

处理	因素		外植体	诱导率/%
	TDZ/mg·L ⁻¹	复硝酚钠/mg·L ⁻¹		
1	0.6	0.25	30	34.4±1.11 ^c
2	0.6	0.50	30	38.9±1.11 ^{bc}
3	0.6	1.00	30	50.0±1.92 ^a
4	1.3	0.25	30	24.4±1.11 ^d
5	1.3	0.50	30	33.3±1.93 ^c
6	1.3	1.00	30	33.3±1.93 ^c
7	2.0	0.25	30	31.1±2.22 ^c
8	2.0	0.50	30	34.4±1.11 ^c
9	2.0	1.00	30	43.3±1.93 ^b

以在研究过程中要注意复硝酚钠的浓度, 处理3和其他的处理有显著性差异, 所以最佳的诱导培养基为DCR+0.6 mg·L⁻¹ TDZ+1.0 mg·L⁻¹复硝酚钠+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA。

3 非胚性与胚性愈伤的形态与细胞学特征

3.1 非胚性与胚性愈伤的形态学特性

在诱导过程中对出现的两种愈伤组织进行观察。一种愈伤为浅绿色且疏松易碎(图2-A), 逯昀等(2010)在诱导华山松胚性愈伤组织时观察到一种结构疏松、表面粗糙的非胚性愈伤组织, 表明本文图2-A中的愈伤组织是非胚性愈伤组织。靳小翠等(2010)以马尾松幼胚为材料, 在光下诱导的胚性愈伤质地较硬、干燥, 颜色呈现黄绿色。本

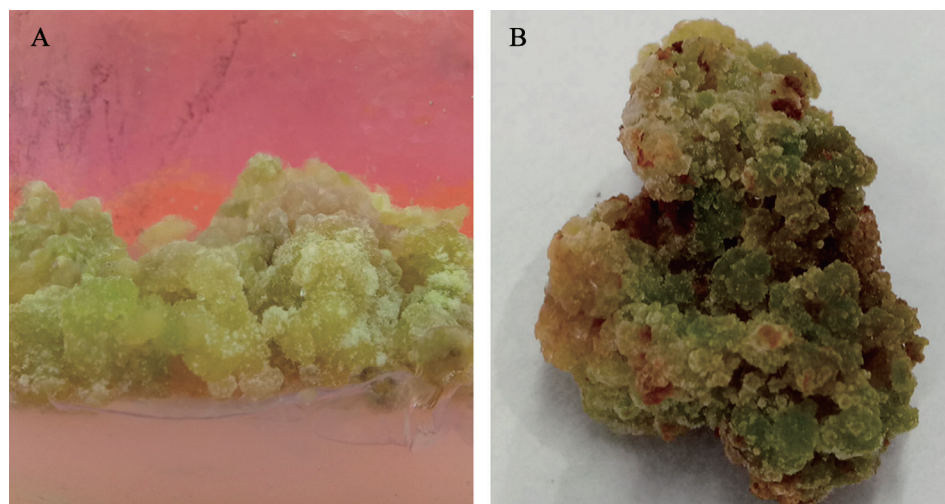


图2 非胚性愈伤和胚性愈伤

Fig.2 The non-embryonic callus and embryonic callus

A: 非胚性愈伤; B: 胚性愈伤。

文图2-B中愈伤呈现黄绿色且结构较紧密、不易分离, 表面有小球状凸起, 符合胚性愈伤的特征。

3.2 非胚性愈伤和胚性愈伤的细胞学特性

将非胚性愈伤组织和胚性愈伤组织制成临时装片后, 在光学显微镜下观察。通过比较发现, 非胚性愈伤是由许多近似球状的薄壁细胞组成, 排列疏松, 并没有形成团状体, 各个细胞之间差异不大(图3-A)。而胚性愈伤细胞排列较为紧密, 成团出现, 一部分细胞呈圆球形, 并且细胞表面有凹陷, 边缘有类似于柄状的细胞伸出(图3-B)。巴西松

[*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze]的未成熟胚经过诱导后形成的胚性细胞团在光学显微镜下可以看到两种细胞, 圆状的胚性细胞(embryogenic cell, EC)和长柄状的胚柄细胞(suspensor-like cell, SC), 处于PEM I时期的胚性细胞团是由多个胚性细胞和1个或2个的柄状细胞组成(Steiner等2016)。我们在光学显微镜下观察到细胞团是由多个胚性细胞和数个胚柄细胞组成(图3-B)的, 表明此时的胚性细胞团处于PEM I时期, 愈伤经过诱导之后, 细胞已经开始分化。

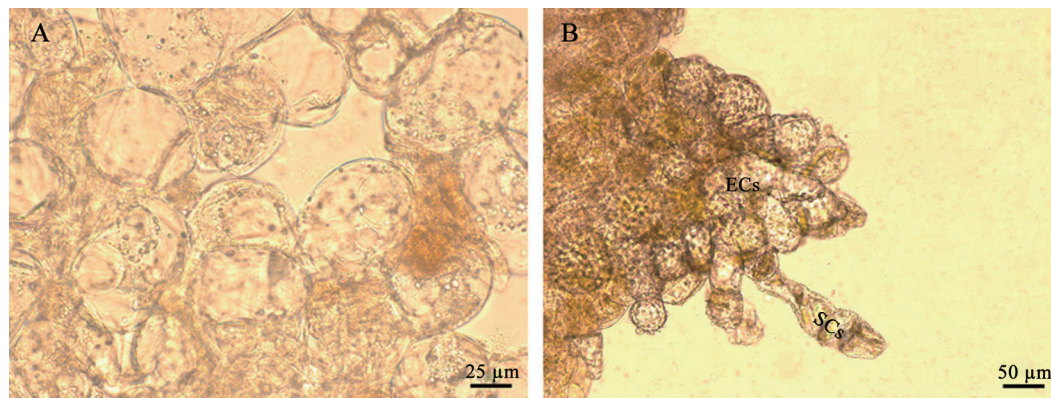


图3 非胚性和胚性愈伤的细胞

Fig.3 Cells of the non-embryonic and embryonic callus

A: 非胚性愈伤细胞; B: 处于PEM I时期的胚性细胞团(由ECs和SCs组成)。

3.3 非胚性愈伤和胚性愈伤的扫描电镜观察

将新鲜材料放置在样品台上, 抽真空后, 用Phenom台式扫描电子显微镜直接观察。发现非胚性愈伤和胚性愈伤组织细胞表面结构存在较大的差异。非胚性愈伤的细胞形状不规则, 有的是圆形, 有的呈长条状(图4-A), 而且表面光滑, 虽然有些细胞排列紧密, 能形成细胞团, 但细胞团之间有较大的空隙, 还观察到细胞之间有丝状物存在(图4-B)。有些非胚性愈伤的细胞呈不规则的圆形或者椭圆形(图4-C和D)。胚性愈伤的细胞之间形成团粒结构, 形成团粒的细胞之间几乎没有空隙, 图中出现了长柄状和圆形的细胞, 长柄状的细胞是胚柄细胞(SC), 圆形的细胞是胚性细胞(EC) (图4-E和F), 这些观察结果和光学显微镜下观察的结果一致。扫描电镜下观察到胚性愈伤组织表面粗糙, 具有明显的白色颗粒物(图4-F), 并且在光学显微镜下也能看到细胞表面有附着物, 胚性愈伤的细

胞紧密结合形成了细胞团(图4-G和H)。

讨 论

在针叶树的组织培养中多以合子胚为外植体, 通过体细胞胚发生, 建立再生体系。虽然其成功率较高, 但合子胚再生株系的性状具有不可预测性。而以孢子体器官如针叶等外植体所获得的再生体系的性状是可预测的, 但是其再生体系的建立存在一定的困难, 目前有关报道主要停留在愈伤组织阶段, 有关再生植株的研究鲜见报道。

植物生长调节物质的种类和浓度对外植体的生长态势和分化方向具有重要的调节作用。如诱导风铃玉(*Ophthalmophyllum fridrichiae*)愈伤组织时最合适的生长素和细胞分裂素的比是1:1(吴正景等2015), 但针叶树愈伤组织的诱导一般需要较高浓度的生长素和较低浓度的细胞分裂素(孙志强等2010)。本文中日本五针松针叶愈伤诱导的生长

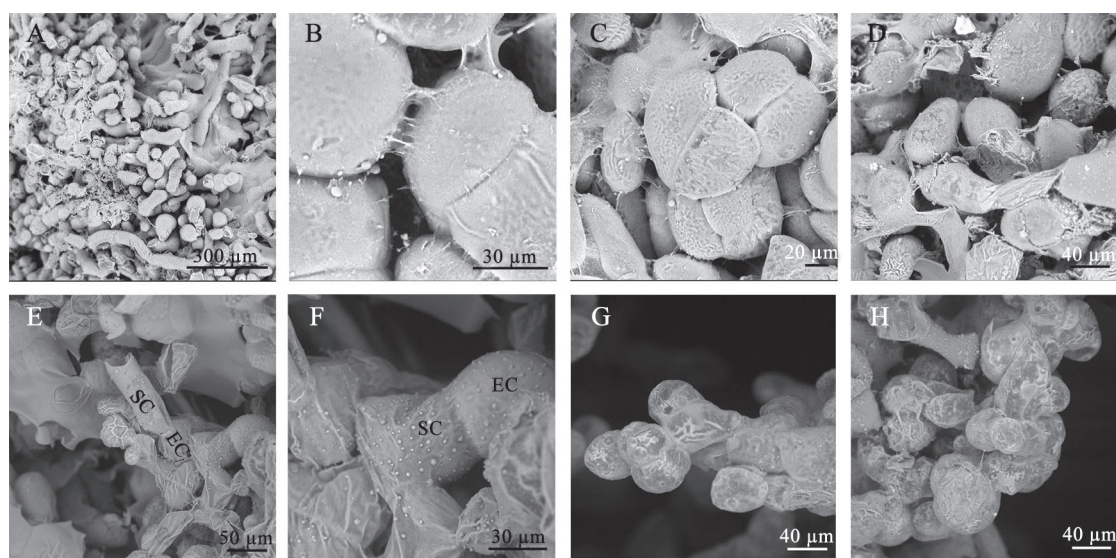


图4 非胚性和胚性愈伤的扫描电镜图

Fig.4 Scanning electron microscopy pictures of the non-embryonic callus and embryonic callus

A~D: 非胚性愈伤, A中的细胞呈长条状, B中可以看到细胞之间有丝状物的存在, C~D中细胞呈圆形; E~H: 胚性愈伤, E~F中可以看到EC和SC两种细胞, G~H中胚性愈伤的细胞紧密结合, 形成细胞团。

素和细胞分裂素浓度最佳组合比是10:1, 愈伤诱导率可达100%, 而张德炎等(1997)在五针松(*Pinus strlbus*)的愈伤诱导过程中生长素和细胞分裂素的比例为5:1, 诱导率为48%。在体细胞胚的诱导中, 通常需要高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素(孙志强等2010)。植物的生长发育对低浓度的TDZ敏感(林树燕等2015), 在合适的浓度下能诱导外植体形成愈伤组织或者体细胞胚(徐晓峰和黄学林2003)。复硝酚钠可促进细胞原生质流动, 提高细胞活力(刘兴宇2007)。在本研究中发现, 低浓度的复硝酚钠能促进愈伤的生长和抑制愈伤的褐化。体细胞胚诱导时, 培养基中细胞分裂素浓度和生长素浓度比为5:1, 再添加复硝酚钠和TDZ, 均可诱导出胚性愈伤, 诱导率可高达53.3%。

体细胞胚发生过程可划分为胚性细胞团、早期原胚、后期原胚和成熟胚四个时期。胚性细胞团是体细胞胚发生的开始, 细胞团由两部分组成, 一部分由数个球状的胚性细胞(EC)构成, 另一部分则为一个或者数个长柄状的胚柄细胞(SC)组成(Steiner等2016)。Filonova等(2000)根据细胞团两种细胞数量的多少和形态特征的变化, 将胚性细胞团进一步细分为PEM I、PEM II、PEM III三个时期。处于PEM III时期的细胞团, 各个细胞聚集

紧密, 是早期原胚的起始状态。在诱导过程中, 在光学显微镜下观察到了PEM III时期的细胞团。早期原胚发育成熟后, 开始进入后期原胚的发育阶段, 按先后发育顺序, 后期原胚经过球形胚、心形胚、鱼雷胚三种发育时期, 鱼雷胚最终发育成成熟胚(Steiner等2016), 成熟胚的形成标志着体细胞胚的成熟, 发生过程基本结束, 对这个时期的细胞进行萌发培养后, 即可得到完整植株。

在植物体细胞胚诱导过程中, 一般出现两种愈伤组织即胚性愈伤和非胚性愈伤, 该两种愈伤组织形态和细胞有明显的差异。钝叶草[*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze] (Li等2006)和陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.) (张宝红等2000)的非胚性愈伤组织细胞细长, 排列疏松, 而胚性愈伤组织细胞呈圆形或者椭圆形, 排列紧密, 形成细胞团。陈金慧等(2005)观察发现, 杂交鹅掌楸(*Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*)非胚性愈伤细胞都是体积较大的薄壁细胞, 大多单独存在, 不能形成细胞团结构, 愈伤组织表现为一种无规则的状态。其胚性愈伤组织细胞之间几乎没有空隙, 细胞形状也不规则, 也是以细胞团的形式存在。在本研究中, 日本五针松针叶经过诱导之后获得了淡黄色的愈伤组织, 愈伤组织经过诱导, 组织颜色

变绿, 表面有小球状的凸起, 细胞的形状和类型也发生了变化, 采用光学显微镜结合非损伤扫描电镜对胚性愈伤组织细胞进行观察, 发现胚性愈伤组织细胞形成细胞团, 其主要由胚性细胞(EC)和胚柄细胞(SC)两种类型的细胞组成。

参考文献

- CAS Flora of China Editorial Board (1978). Flora of China: Vol 7. Beijing: Science Press, 228–229 (in Chinese) [中国科学院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, 228–229]
- Chen JH, Shi JS, Gan XH, ZhuGe Q, Huang MR (2005). Observation of the somatic embryogenesis of *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera* by scanning electron microscope. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 29 (1): 75–78 (in Chinese with English abstract) [陈金慧, 施季森, 甘习华, 诸葛强, 黄敏仁(2005). 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生的扫描电镜观察. 南京林业大学学报(自然科学版), 29 (1): 75–78]
- Filonova LH, Bozhkov PV, Arnol S (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot*, 51 (343): 249–264
- Hakman I, Fowk LC, Arnolda SV, Eriksson T (1985). The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). *Plant Sci*, 38 (1): 53–59
- Ji KS, Wang PP, Wang JL, Ruan QQ, Pan T, Zhu PH, Guo TW, Liu J (2015). Review on *in vitro* culture of tree species in Pinaceae. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 39 (1): 142–148 (in Chinese with English abstract) [季孔庶, 王潘潘, 王金铃, 阮倩倩, 潘婷, 朱沛煌, 郭天玮, 刘靖(2015). 松科树种的离体培养研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), 39 (1): 142–148]
- Jin XC, Li ZH, Yang MH, Zhang DL, Ding GJ (2010). Embryonic callus induction of immature embryo of *Pinus massoniana*. *J Cent South Univ For Technol*, 30 (4): 80–84 (in Chinese with English abstract) [靳小翠, 李志辉, 杨模华, 张冬林, 丁贵杰(2010). 马尾松幼胚胚性愈伤组织诱导的研究. 中南林业科技大学学报, 30 (4): 80–84]
- Li QQ, Ye QR, Zhu LH, Wu XQ (2012). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature zygotic embryos of *Pinus thunbergii*. *Sci Silv Sin*, 48 (12): 39–44 (in Chinese with English abstract) [李清清, 叶建仁, 朱丽华, 吴小芹(2012). 黑松未成熟胚的体细胞胚胎发生和植株再生. 林业科学, 48 (12): 39–44]
- Li R, Bruneau AH, Qu R (2006). Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. *Plant Breeding*, 125 (1): 52–56
- Lin SY, Zhao R, Zheng X (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Bambusa gaucophylla*. *Plant Physiol J*, 51 (12): 2175–2180 (in Chinese with English abstract) [林树燕, 赵荣, 郑笑(2015). 马来箭竹的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 51 (12): 2175–2180]
- Liu XY (2007). The application of novel plant growth regulator compound sodium nitrophenolate. *Pesticide Market News*, (14): 35, 44 (in Chinese) [刘兴宇(2007). 新型植物生长调节剂复硝酚钠及其应用. 农药市场信息, (14): 35, 44]
- Lu Y, Sun JM, Hou J (2010). Induced research on the embryos callus of *Pinus armandii*. *Northern Hortic*, (11): 155–157 (in Chinese with English abstract) [逯昀, 孙景梅, 侯佳(2010). 华山松胚性愈伤组织的诱导研究. 北方园艺, (11): 155–157]
- Ruud JN, Bercetche J, Pâques M (1992). First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Rep*, 11 (11): 563–566
- Steiner N, Farias-Soares FL, Schmidt ÉC, Pereira ML, Scheid B, Rogge-Renner GD, Bouzon ZL, Schmidt D, Maldonado S, Guerra MP (2016). Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Protoplasma*, 253 (2): 487–501
- Sun ZQ, Sun ZY, Xi ML (2010). Research progress of conifer somatic embryogenesis. *Chin For Sci Technol*, (4): 1–5 (in Chinese) [孙志强, 孙占育, 席梦利(2010). 针叶树体细胞胚胎发生研究进展. 林业科技开发, (4): 1–5]
- Wang XN, Zhao RQ, Zhang L, Liu HJ, Cui CH, Zhang S, Zhou Y, Ren XG, Sun JH (2015). The mature embryo adventitious bud induction research of *Abies holophylla*. *J Jilin For Sci Technol*, 44 (4): 10–12 (in Chinese with English abstract) [王晓娜, 赵日强, 章林, 刘慧娟, 崔昌汉, 章森, 周勇, 任晓光, 孙景花(2015). 沙松成熟胚不定芽诱导研究. 吉林林业科技, 44 (4): 10–12]
- Wu ZJ, Huang XJ, Wang B, Peng T, Ma WY (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Ophthalmophyllum fridrichiae*. *Plant Physiol J*, 51 (11): 2013–2016 (in Chinese with English abstract) [吴正景, 黄雪娇, 王柏, 彭涛, 马文瑶(2015). 风铃玉的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 51 (11): 2013–2016]
- Xu XY (1998). Grafting of *Pinus strlbus* and *Pinus tabuliformis*. *Chin Flower Pengjing*, (1): 31 (in Chinese) [徐兴友(1998). 五针松与油松的嫁接. 中国花卉盆景, (1): 31]
- Xu XF, Huang XL (2003). TDZ: An efficacious plant growth regulator. *Chin Bull Bot*, 20 (2): 227–237 (in Chinese with English abstract) [徐晓峰, 黄学林(2003). TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 20 (2): 227–237]
- Zhang BH, Liu F, Yao CB, Wang HM, Feng XA (2000). Scanning observation with electron microscope on tissue culture and somatic embryogenesis of *Gossypium hirsutum* L. *Acta Agron Sin*, 26 (1): 125–126 (in Chinese) [张宝红, 刘方, 姚长兵, 王红梅, 冯新爱(2000). 棉花组织培养体细胞胚胎发生的扫描电镜观察. 作物学报, 26 (1): 125–126]
- Zhang DY, Li JM, Li XW, Xing M (1997). Inducement of calli from *Pinus strobes* and optimization of the medium. *J Qinghai Normal Uni (Nat Sci)*, (3): 55–60 (in Chinese with English abstract) [张德炎, 李建民, 李喜文, 邢苗(1997). 五针松针叶愈伤组织的诱导和培养基优化. 青海师范大学学报(自然科学版), (3): 55–60]
- Zhang WF (1999). Potted culture of *Pinus strlbus*. *Flower Plant Pengjing*, (6): 28–29 (in Chinese) [张万佛(1999). 盆栽五针松. 花木盆景, (6): 28–29]
- Zhu XD, Li TS, Deng LL (2005). *In vitro* culture of mature embryos of *Pinus yunnanensis*. *Guizhou For Sci Tech*, 33 (4): 28–30 (in Chinese with English abstract) [朱晓丹, 李桐森, 邓莉兰(2005). 云南松成熟胚的离体培养. 贵州林业科技, 33 (4): 28–30]

Inducement of embryonic callus from needles of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. and observation of cytological characteristics of callus

WANG Xue-Li, LI Ping-Ping, WU Kun-Yang, SHI Kun, ZHENG Cai-Xia*

College of Biological Science and Technology, Beijing Forest University, Beijing 100083, China

Abstract: In order to establish the regeneration system *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc., the young needles were used to induce callus and embryonic callus in DCR medium and the best plant stimulus ratio was explored. In the process of induction, the tissues were observed by optical microscope and scanning electron microscope. The results indicated that the induction rate of callus was high as 96.7% with the addition of $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D and $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA. Embryonic callus induction medium, including $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ compound sodium nitrophenolate, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, could induce cell differentiation and obtain embryonic callus. The induction rate reached 53.3%. At the same time, the browning rate of embryonic callus was low and the tissues grew faster. The cells of the non-embryonic callus were round and thin, and no cell clusters were formed. The cells of embryonic callus bound with each other tightly and formed the embryonic cell clusters which were mainly composed of embryogenic cells and suspensor-like cells. These results laid an important foundation for the establishment of regeneration system for *P. parviflora*.

Key words: *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc.; non-embryonic callus; embryonic callus; morphological and cytological characteristics

Received 2016-12-15 Accepted 2017-01-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31170563).

*Corresponding author (E-mail: zhengcx@bjfu.edu.cn).