

技术与方法 Techniques and Methods

抗性赤松体胚发生细胞结构观察与增殖条件的优化

潘珺, 吴小芹*, 许建秀, 叶建仁

南方现代林业协同创新中心, 南京林业大学林学院, 南京210037

摘要: 为了更有针对性地优化原生抗性赤松体胚发生培养体系, 本研究通过体式镜定性观察种室中的合子胚分布、胚性胚柄细胞结构变化, 通过Image-Pro Plus软件定量分析胚性细胞团在不同生长调节物质配方下胚头胚柄的比例变化, 了解体胚发生的营养需求。结果发现, 抗性赤松裂生多胚更易形成胚性细胞团; 改变原有培养条件细胞团会出现胚头胚柄分离、胚头细胞颜色加深的反应; 使用低浓度的混合生长调节物质配比($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)能够提高体胚增殖速度; 表明抗性赤松胚性细胞团增殖速度加快的内在机理为增加胚性细胞团中胚头与胚柄的比例。

关键词: 赤松; 诱导; 增殖; 多胚现象; 胚性胚柄细胞团; Image-Pro Plus

赤松(*Pinus densiflora*)是中国东北部和东部沿海地区重要的荒山造林先锋树种, 但是受到松材线虫病(pine wilt disease)的严重威胁。本研究团队2004年从日本引进了一批珍贵的抗松材线虫病赤松种质资源, 并建立了基因库(张艺等2007)。由于基因库中的母树种子产量有限, 并且受到季节、环境等条件的限制, 所以从2013年开始了抗性赤松体细胞胚胎发生的研究(吴静等2015), 并于2014年初步建立了抗性赤松体胚发生体系(许建秀2015)。目前该体系仍存在胚性细胞团诱导率低、出胚率低的问题, 需要进一步优化。

在过去的30多年, 对松树体胚发生形态建成优化方面的研究很多, 但是Bonga等(2007)、甄艳等(2013)提出, 使体细胞恢复胚性潜能和胚性细胞团成熟前的调整具有更重要的意义。诱导与增殖分别是体细胞恢复细胞胚性潜能和复制胚性细胞团的过程, 这一早期阶段相比出胚后期, 难以通过直接观察判断适宜的培养条件。Image-Pro Plus (以下简称IPP)是Image-Pro Software®系列中的一款商业软件(<http://www.Mediacy.com>), IPP具有出色的图像识别能力, 并且能够通过图像提取选定区域的目标的个数、面积、光照强度等各种参数, 允许用户自行编写针对特定应用的宏程序(Nesic等2016)。IPP最早用于医学领域, 用来计数血细胞个数(朱永进和朱奇2012)、胸腔体积(吴涛等2013)及分析免疫组化化学反应(李小波等2016)。由于IPP具有普适性, 所描述图像特点可转化为比较的数据, 在其他领域也受到越来越多的运用(黄业恩等2015)。如在农林业,

余徐润等(2013)使用IPP观察不同处理小麦淀粉粒的形状差异; 周杰等(2015)使用IPP调查防护林的疏密度, 罗艳华等(2014)利用IPP计算林业小班面积。

对于抗性赤松体胚发生体系盲目优化会浪费时间、精力, 本文运用直接观察、染色观察和体式镜观察等方法, 描述培养材料的现实状况。除定性观察外, 本研究利用Image-Pro Plus 6.0软件对胚性细胞团(embryogenesis somatic mass, ESM)胚头和胚柄比例变化进行定量观察, 并进行针对性的体胚发生植物生长调节物质的优化, 分析2,4-D、NAA、6-BA与抗性赤松增殖速度变化的关系, 并进一步探讨细胞增殖速度与其内在胚性细胞团胚头与胚柄的比例变化的关系, 以期了解生长调节物质的变化是如何影响胚性细胞团的形态变化, 优化抗性赤松体胚增殖早期的培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料来源

抗性赤松(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)于2004年引种自日本九州种子园, 种植于江苏省句容市摇零口工区抗性松树种质资源库, 至今已培育成可供种子采集的母树。本试验使用的增殖材料为2013年吴静等(2015)诱导抗性赤松种子得到的具有胚性的细胞团, 编号22-1。

收稿 2017-12-22 修定 2018-03-22

资助 江苏省科技支撑计划(BE2014405)和江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

* 通讯作者(xqwu@njfu.edu.cn)。

1.2 抗性赤松胚性细胞团增殖初始配方

增殖培养基初始配方(P0, 表1)为: LP基本培养基+4 mg·L⁻¹ NAA+2 mg·L⁻¹ 6-BA。所有培养基添加1 g·L⁻¹肌醇、0.5 g·L⁻¹水解酪蛋白、0.45 g·L⁻¹谷氨酰胺、15 g·L⁻¹麦芽糖和8 g·L⁻¹琼脂粉, 培养基pH调节为5.7~5.8。

1.3 抗性赤松胚性细胞团增殖培养基初步优化设计

改变增殖初始培养基中的生长调节物质配比, 具体见表1。其中P1、P2和P3相比初始配方P0降低生长调节物质整体浓度; P3-1、P3-2和P3-3改变生长素与分裂素的配比。

1.4 抗性赤松种室、胚性细胞团形态学观察

在Zeiss vero 20.0体式显微镜下切开种子染色, 观察不同发育阶段种室内合子胚布局及合子胚的形态, 染色采用醋酸洋红、伊文思蓝双染色法(刘楠和林植芳2011)。

将编号22-1的胚性细胞团转入增殖培养基上增殖培养, 每2周继代1次。挑取新增殖的细胞团进行形态学和细胞学结构鉴别是否为胚性细胞团。形态学观测即用肉眼观测正常条件下生长的细胞外部形态特征。

细胞学观察采用醋酸洋红和伊文思蓝双染色法。取约0.2 g细胞团在50 mL锥形瓶中加10 mL左右水打散备用, 使用时取1滴与载玻片上, 用1%醋酸洋红染色, 最后滴加0.05%伊文思蓝, 加盖玻片并吸去多余的染液, 并在Zeiss vero 20.0体式显微镜下观察并拍照。

1.5 抗性赤松胚性细胞团增殖倍数的测定

以抗性赤松22-1家系生长良好的胚性细胞团为材料, 在设计的不同培养基下培养一个周期15 d。使用精度0.001的分析天平(天平进行灭菌, 紫

外照射30 min、75%酒精擦拭3遍)称量培养前后每皿细胞团的重量, 并计数G1、G2, 每个处理至少检验4皿, 最后计算每皿的增殖倍数(K) [$K=(G2-G1)/G1$]。

1.6 抗性赤松胚性细胞团胚头胚柄比例测定

胚性细胞团的胚头胚柄比例测定通过使用IPP软件提取染成红色的胚头部分和染成蓝色的胚柄部分的面积数据, 求出两部分面积的比值即为红蓝比。为了减小误差, 测定过程中要注意定量和控制变量。

具体操作如下: (1)取不同处理下的细胞团各0.4 g、加水20 mL、用镊子打散、制成2%浓度的细胞分散液; (2)每个处理的细胞液使用胶头滴管吸取6滴于载玻片上, 使用1%醋酸洋红染色1 min, 再滴加0.05%伊文思蓝染色15 s; (3)调节Zeiss vero 20.0体式显微镜两侧可调LEDx白光灯(光照强度 $12.23 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 白光以波长 $\lambda=555 \text{ nm}$ 光能换算)、1×物镜、总放大倍率2×并拍摄保存染色细胞液的TIF无损照片; (4)然后使用Image-Pro Plus 6.0分析照片中染成红色和蓝色区域的面积比(简称红蓝比), 最后使用SPSS 17.0进行数据分析。

1.7 培养条件及数据处理

培养室温度为(23±2)°C, 进行暗培养, 每2个周观察一次, 及时清理污染。数据采用Excel 2007和SPSS 19.0软件进行方差分析和差异显著性检验。

2 实验结果

2.1 抗性赤松种子多胚现象的观察

通过种子切片染色后体式镜下观察, 发现抗性赤松存在简单多胚和裂生多胚共存的现象。简单多胚现象产生的原因是由于松树多个颈卵器中

表1 抗性赤松胚性细胞团增殖培养基的优化

Table 1 Medium optimization of disease-resistant *P. densiflora* embryogenic mass proliferation

编号	基本培养基	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	细胞数量/团
P0 (初始配方)	LP	0	4	2	180
P+	LP	2	1	1	-
P1	LP	0	3	1.5	40
P2	LP	0	2	1	40
P3	LP	0	1	0.5	40
P3-1	LP	0	2	0.5	40
P3-2	LP	1	0	0.5	40
P3-3	LP	0.1	1	0.5	40

的卵子都受精发育形成合子胚(图1-A), 发现优势胚(图1-A, 箭头a)由珠孔上侧颈卵器中伸出, 而劣势胚(图1-A, 箭头b)则由珠孔下侧颈卵器中伸出; 裂生多胚是松树种子中常见的现象, 受精卵在开始分裂形成合子胚的初级阶段会形成4个或以上的胚头胚柄结构(图1-B), 优势胚(图1-B, 箭头d)沿腐蚀腔向种子内部深入, 而劣势胚(图1-B, 箭头c)与优势胚从同一孔洞伸出, 且由于竞争作用只能堆积在珠孔附近。

无论是简单多胚还是裂生多胚, 最终种子通过养分竞争只能有一个优势胚存活发育, 通过观察种室切面染色图(图1), 发现优势胚发育过程中由珠孔向种室深处伸入。所以可以断定, 在合适诱导的2~4阶段, 雌配子体中部及远离珠孔处多分布优势胚的胚体部分, 而雌配子体靠近珠孔处则多分布弱势胚和胚柄。

2.2 定性观察不同生长调节物质对抗性赤松胚性细胞团的影响

初始配方生长调节物质配比为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA。使用2,4-D部分替代NAA, 生长调节物质配比(P+, 表1)为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA。经过一个继代周期18 d, 观察细胞团, 进行形态学分析。如图2-A和C所示, 发现添加2,4-D后细胞团表面较原配方水渍化透明、褐化程度减轻, 增殖速度加快。

取适量细胞团进行细胞学染色观察(图2-B、D), 发现添加2,4-D后, 胚柄细胞液泡化畸形变粗变短, 而合子胚胚柄细胞修长。所以添加2,4-D具有整体促进细胞分裂增殖的作用, 但是可能会引起胚柄畸形, 造成营养分配不均匀, 胚性下降。改变增殖初始培养基中的生长调节物质配比(表1), 继代培养15 d后, 使用Zeiss vero 20.0体式显微镜染色

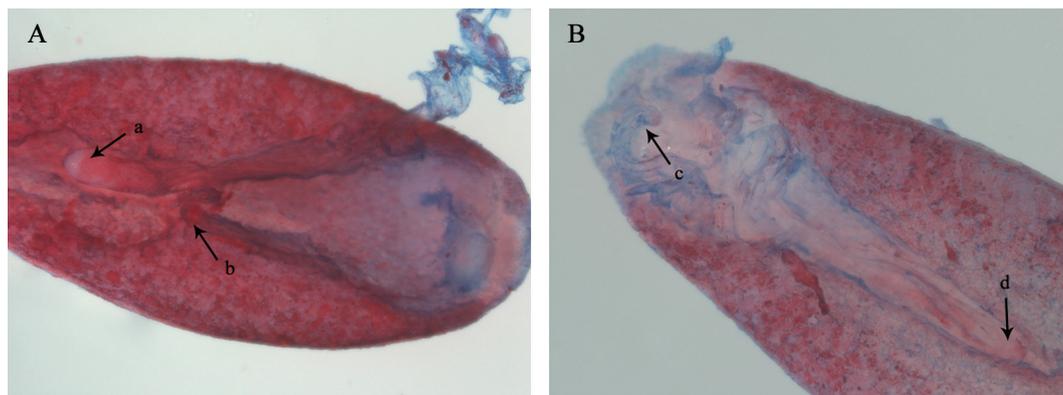


图1 抗性赤松雌配子体中的简单多胚与裂生多胚

Fig.1 Simple polyembryony and cleavage polyembryony in disease-resistant *P. densiflora* female gametophyte

A: 赤松种子简单多胚, 箭头a指向从一颈卵器中伸出的优势胚, 箭头b指向从另一颈卵器中伸出的弱胚; B: 赤松种子裂生多胚, 箭头d指向优势胚, 箭头c指向优势胚分裂形成的其他裂生多胚, 堆积在优势胚胚柄处。

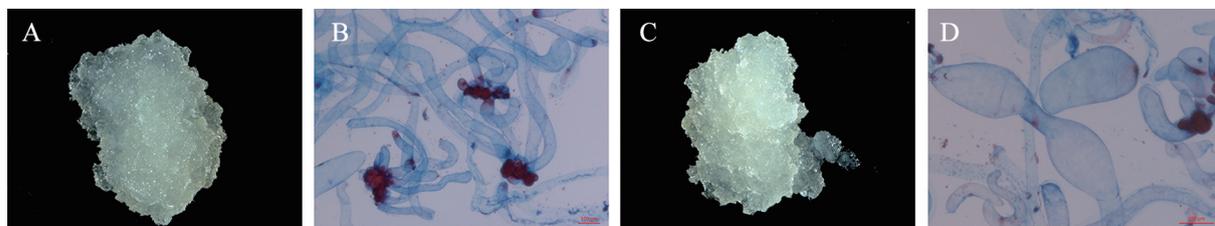


图2 添加2,4-D对抗性赤松胚性细胞团的影响

Fig.2 Influence of 2,4-D addition on resistant *P. densiflora* embryogenic mass

A: 初始培养基P0细胞团表面形态, 较致密胶连; B: 图A的ESM, 胚柄细胞纤长、结构正常; C: 添加2,4-D后的培养基P+细胞团表面形态, 较疏松; D: 图C的ESM, 胚柄粗短、畸形。

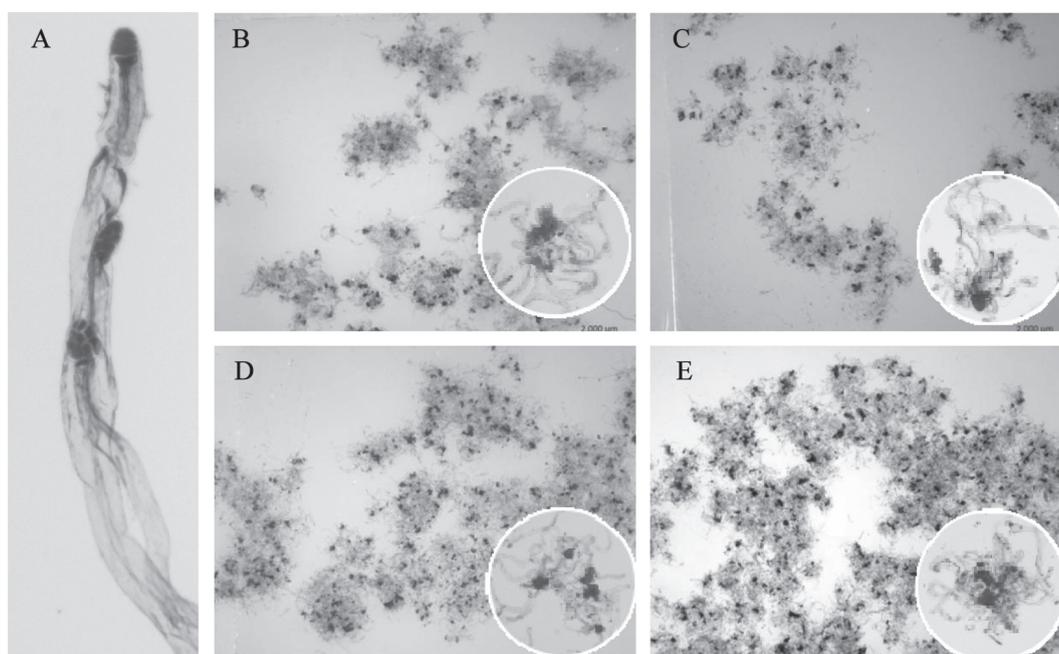


图3 不同生长调节物质浓度对抗性赤松胚性细胞团结构的影响

Fig.3 Influence of different concentrations of plant growth regulators on disease-resistant *P. densiflora* embryogenic mass

A: 种子体内合子胚的胚头胚柄结构, B-E: 分别为培养基P0~P3的胚性细胞团分散图和局部结构图。

观察并拍照, 结果见图3。相比初始培养基P0, 其他3个优化培养基P1~3逐步降低了生长调节物质整体浓度, 从细胞表面形态上看, 各处理间差异不大, 培养基P3的细胞团生长调节物质浓度降到原来的1/4时仍能继续正常增殖。

对比赤松合子胚形态(图3-A), 发现培养基P0上细胞团胚头细胞液泡化松散、胚柄细长(图3-B); 培养基P1处理下细胞团胚头明显、胚柄细长(图3-C); 培养基P2处理下细胞团胚头明显、胚柄细长(图3-D); 培养基P3处理下细胞团胚头明显、胚柄较短(图3-E)。

综上所述可以看出随着生长调节物质浓度的降低, 胚头变得明显和立体化, 但是胚柄细胞却出现畸形化, 说明营养向胚头细胞集中。然而自然界中合子胚的胚柄细长, ESM胚柄细胞的畸形膨大将影响后期体胚的出胚率和体胚的健康状况。

2.3 定量分析不同培养基对抗性赤松胚性细胞团的影响

通过Image Pro Plus定量分析不同配方比例对抗性赤松胚性细胞团的影响。结果如表2所示, 培养基P3-3的细胞团增殖倍数显著高于P3-1、P3-2, 其他的3组配方之间的增殖倍数没有差异。培养

基P3-3胚头胚柄细胞的比例都显著高于P3, 而P3、P3-1、P3-2之间没有差异。

继续深入分析胚头胚柄比例对增殖速度的影响, 根据图5可知, 增殖倍数与红蓝比的相关性系数 $r=0.964$ 大于0.8, 他们之间存在显著正相关, 表明当胚头和胚柄的比例上升时, 细胞团的增殖速度加快。

3 讨论

3.1 抗性赤松多胚现象及其对体胚发生诱导阶段的影响

多胚现象广泛存在于松科树种中, 是松树体

表2 不同生长调节物质处理下抗性赤松胚性细胞团的增殖倍数与红蓝比

Table 2 Proliferation multiple and embryo/suspensor ratio of resistant *P. densiflora* EM in medium with different plant growth regulators

培养基	增殖倍数	胚头与胚柄比例(红蓝比)/%
P3	3.84 ^{ab}	8.01 ^b
P3-1	3.66 ^b	9.33 ^{ab}
P3-2	3.71 ^b	8.52 ^{ab}
P3-3	4.61 ^a	15.12 ^a

不同小写字母表示不同培养基之间差异显著($P<0.05$)。

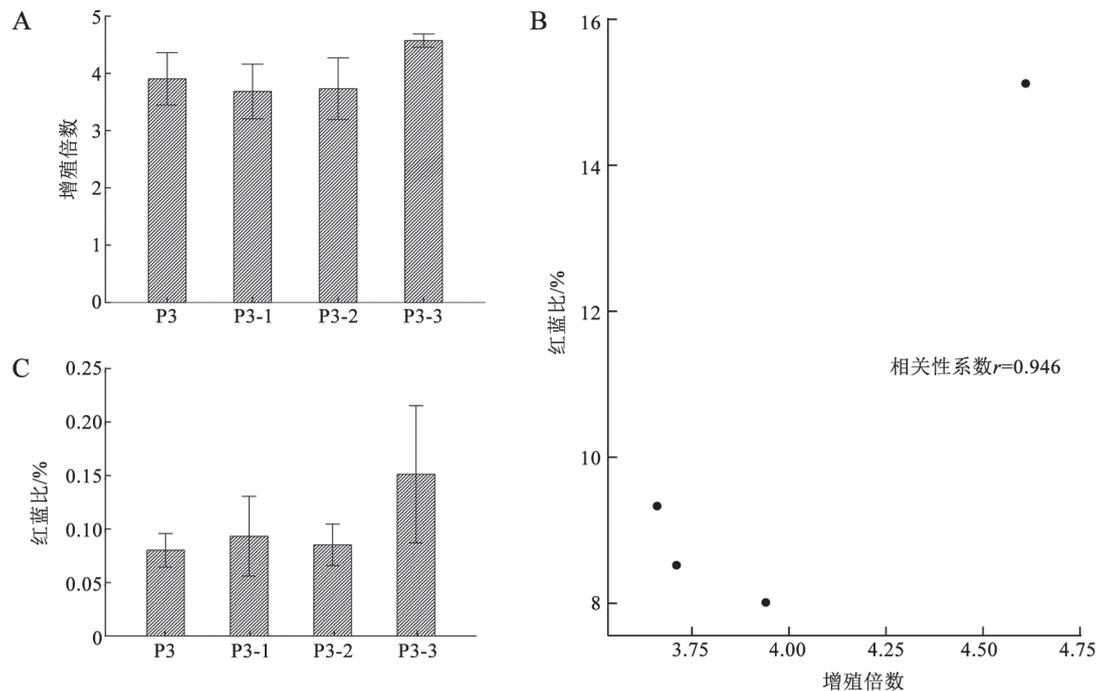


图4 抗性赤松胚性细胞团在不同增殖速度下胚头与胚柄比例的变化
Fig.4 Change of embryo/suspensor ratio in different proliferation speed of *P. densiflora* EM
A: 增殖倍数; B: 红蓝比; C: 红蓝比散点图。

细胞脱分化分裂增殖实现体胚发生的现实象征。在体细胞胚胎发生的直接前体方面一直存在争论, Cairney和Pullman (2007)认为珠孔处弱化的裂生多胚是诱导胚性胚柄细胞团的前体, Pullman和Bucalo (2014)又讨论了珠孔处的莲座细胞作为胚性胚柄细胞团诱导的前体的可能。本研究通过种室切片染色观察, 拍摄到了抗性赤松简单多胚与裂生多胚的染色剖面图, 发现: (1)简单多胚的多个合子胚早期共同生长, 由于营养和空间限制, 优势胚及弱胚活力都比较差, 相比裂生多胚更难以诱导成功; (2)在裂生多胚状况下, 优势胚深入雌配子体内且受到周围细胞的抑制, 难以形成可自由分裂的细胞团, 而弱胚堆积在珠孔处, 容易受到诱导形成脱分化的细胞团。所以体胚发生的直接前体更有可能是珠孔处弱化的弱势胚, 这支持了Pullman和Bucalo (2014)的观点。这对抗性赤松的诱导过程具有指导意义, 诱导过程中应注意保护珠孔处细胞不受伤害。

3.2 抗性赤松增殖过程中细胞团变化的定性分析

与NAA相比, 2,4-D更高效, 其效力是NAA的数倍。江波等(2004)提出2,4-D对松柏类植物的长

期增殖有害, 2,4-D与NAA虽然都属于生长素类物质, 但本试验使用等量的2,4-D替换NAA, 发现在添加2,4-D的培养基中细胞团增殖速度更快, 但是胚柄细胞出现了粗短、畸形的现象, 2,4-D对增殖细胞的伤害可能是使胚柄细胞畸形化。

生长调节物质的过多积累会影响后期细胞极性与出胚能力的丧失, 增殖阶段大部分都会降低培养基中的生长调节物质浓度, 如张彩云等(2016)湿地松增殖的生长调节物质浓度为诱导过程中的1/4。在逐渐降低生长调节物质整体浓度的试验过程中发现, 随着浓度下降到原来的1/4, 细胞团在外在形态上的差异仍然很小, 细胞团仍能正常增殖。从细胞形态上看, 随着生长调节物质浓度的下降, 胚头逐渐变的明显立体, 胚柄逐渐变粗短, 说明降低生长调节物质的浓度后, 细胞的反应是营养率先集中在胚头生长。

综上, 发现无论是改变生长调节物质的整体浓度, 还是增加某一生长调节物质的配比, 都会使胚头细胞更加明显、胚柄变得粗短, 说明改变环境后细胞的适应性反应会优先在胚头细胞集中营养物质。但是无法说明生长素类与分裂素类物质

各起到何种作用。如果需要了解某一生长调节物质的单一作用,应在多次培养继代后再进行观察,排除细胞团的适应性变化影响。

3.3 抗性赤松增殖过程中细胞团变化的定量分析

前期生长调节物质优化试验发现胚柄与胚头细胞比例的变化,可能影响胚性细胞团细胞营养的吸收分配,而合适的胚头胚柄比例可以最大限度的利用培养基养分、并做好成熟前的营养形态管理,提高增殖速度和细胞团质量。若要及时掌握胚性细胞团胚头胚柄比例变化,仅进行细胞学定性观察无法分辨细小的区别,同时也容易受到人为等因素的影响,而使用Image-Pro Plus 6.0对拍摄的图片分析胚头细胞和胚柄比例,可以得到定量的描述,发现其中细微的差异。使用IPP进行体胚细胞结构的研究尚未报道,类似的吴涛(2010)使用Image J软件对肝脏的CT扫描照片测量出肝脏体积;余徐润等(2013)使用IPP观察小麦切片的电镜照片,对淀粉粒的形状差异进行分析、粒径进行分类。

而本文使用蔡司体式镜拍摄定量、规范的细胞染色照片,利用IPP软件(黄业恩等2015)提取照片中的红色胚头部分和蓝色胚柄部分的面积,可计算得到细胞团中胚头与胚柄细胞的比例(红蓝比)。通过红蓝比探究细胞增殖速度与胚头与胚柄细胞比例的关系,发现相关性系数 r 达到0.94,存在显著正相关关系,即存在胚头细胞占比越高细胞团的增殖速度越快的规律。这表明在抗性赤松增殖的现阶段,应该通过增加胚头的比例来提高抗性赤松的增殖速度,其中 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的生长调节物质配方可使抗性赤松胚性细胞团的增殖速度最快,其胚头胚柄比例也最高。

参考文献(References)

- Bonga JM, Klimaszewska KK, von Aderkas P (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 100 (3): 241–254
- Cairney J, Pullman GS (2007). The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytol*, 176 (3): 511–536
- Huang YE, An JH, Zhang SS, et al (2015). Image-Pro Plus and Image J: comparison and application in image analysis of biological tissues. *Chin J Stereo Image Analy*, 20 (02): 185–196 (in Chinese with English abstract) [黄业恩, 安建虹, 章思思等(2015). Image-Pro Plus与Image J图像分析功能比较及其在生物组织结构测试中的应用. *中国体视学与图像分析*, 20 (02): 185–196]
- Jang B, Yang YG, Guo YM, et al (2004). Advances in somatic embryogenesis of pine and cyprus plants. *Chin Bull Bot*, 21 (04): 495–505 (in Chinese with English abstract) [江波, 杨映根, 郭奕明等(2004). 松柏类植物体细胞胚胎发生的研究进展. *植物学通报*, 21 (04): 495–505]
- Li XB, Zhang H, Wang SB, et al (2016). Effect of erythropoietin on the differentiation of adult spinal cord-derived neural stem cells *in vitro*. *Acta Univ Med Anhui*, 51 (1): 14–17 (in Chinese with English abstract) [李小波, 张辉, 王少滨等(2016). 促红细胞生成素对脊髓源性神经干细胞分化能力的影响. *安徽医科大学学报*, 51 (1): 14–17]
- Liu N, Lin ZF (2011). Use of Evans blue for testing cell viability of intact leaves of plant. *Plant Physiol J*, 47 (06): 570–574 (in Chinese with English abstract) [刘楠, 林植芳(2011). 用伊文思蓝染色法检测植物整体叶片的细胞活性. *植物生理学报*, 47 (06): 570–574]
- Luo Y H (2014). Use scanner combined with Image J for calculation in forestry work area of the method and application. *J Green Sci Tec*, (07): 285–287 (in Chinese) [罗艳华(2014). 扫描仪结合Image J软件在林业工作中计算面积的方法和应用. *绿色科技*, (07): 285–287]
- Nesic AR, Kokunesoski MJ, Volkov-Husovic TD, et al (2016). New method for quantification of dye sorption using SBA mesoporous silica as a target sorbent. *Environ Monit Assess*, 188 (1603): 160–171
- Pan RC (2000). *Plant Tissue Culture*. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press (in Chinese) [潘瑞焱主编(2000). *植物组织培养*. 广州: 广东高等教育出版社]
- Pullman GS, Bucalo K (2014). Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forests*, 45 (3): 353–377
- Wu J, Zhu LH, Xu JX, et al (2015). Induction and proliferation of embryogenic callus in nematode-resistant *Pinus densiflora*. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 39 (01): 17–21 (in Chinese with English abstract) [吴静, 朱丽华, 许建秀等(2015). 抗松材线虫病赤松胚性愈伤组织的诱导及增殖. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 39 (01): 17–21]
- Wu T, Han SY, Zhang JH, et al (2013). Expression pattern of 18 miRNA during seed germination of *Larix Kaempferi*. *For Res*, 26 (F10): 9–17 (in Chinese with English abstract) [吴涛, 韩素英, 张俊红等(2013). 日本落叶松种子萌发过程中18个miRNAs的表达变化. *林业科学研究*, 26 (F10): 9–17]
- Xu JX (2015). *Somatic embryogenesis and optimization of rooting on disease-resistant Pinus densiflora* (dissertation). Nanjing: Nanjing Forestry University (in Chinese with English abstract) [许建秀(2015). 抗性赤松体细胞

- 胚胎发生及器官发生根条件优化(学位论文). 南京: 南京林业大学]
- Yu XR, Zhou L, Jin YP, et al (2013). Application of Image-Pro Plus in analysis of wheat starch granule microscopic image. *J Chin Electr Microsc Soc*, 32 (4): 344–351 (in Chinese with English abstract) [余徐润, 周亮, 荆彦平等(2013). Image-Pro Plus软件在小麦淀粉粒显微图像分析中的应用. *电子显微学报*, 32 (4): 344–351]
- Zhang CY, Zhu LH, Tan JJ, et al (2016). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of disease-resistant Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) to brown spot needle blight. *J Northeast For Univ*, 44 (06): 17–22 (in Chinese with English abstract) [张彩云, 朱丽华, 谈家金等(2016). 抗松针褐斑病湿地松体细胞胚胎发生与植株再生. *东北林业大学学报*, 44 (06): 17–22]
- Zhang Y, Wu XQ, Wang J, et al (2007). Resistance determination and histopathological observation of induced *Pinus densiflora* families from Japan to *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 31 (04): 110–114 (in Chinese with English abstract) [张艺, 吴小芹, 王钰等(2007). 抗松材线虫病赤松家系的抗性测定及组织病理学观察. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 31 (04): 110–114]
- Zhen Y, Chen JH, Shi JS (2013). Research progress on reacquisition of embryogenic potentiality in plant somatic embryogenesis. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 37 (06): 147–152 (in Chinese with English abstract) [甄艳, 陈金慧, 施季森(2013). 植物体细胞胚发生胚性潜能恢复的研究进展. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 37 (06): 147–152]
- Zhou J, Lei JQ, Sun L, et al (2015). The feasibility analysis of Image-Pro Plus in calculating the optical porosity of windbreaks. *J Arid Land Resour Environ*, 29 (12): 109–114 (in Chinese with English abstract) [周杰, 雷加强, 孙琳等(2015). Image-Pro Plus数字图像分析软件计算防护林疏透度的可行性分析. *干旱区资源与环境*, 29 (12): 109–114]
- Zhu YJ, Zhu Q (2012). Advanced tutorial of using Image-Pro Plus count positive cells. *Medic Front*, 02 (8): 129–130 (in Chinese with English abstract) [朱永进, 朱奇(2012). Image-Pro Plus计数阳性细胞进阶教程. *医药前沿*, 02 (8): 129–130]

Early stage observation and conditional optimization for proliferation of resistant *Pinus densiflora* somatic embryogenesis

PAN Jun, WU Xiao-Qin*, XU Jian-Xiu, YE Jian-Ren

Collaborative Innovation Center of Southern Modern Forestry, Forestry Department, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract: In order to optimize the conditions of somatic embryogenesis of resistant *Pinus densiflora*, this study investigated the zygotic embryo distribution in the seed chamber and the changes of embryonic suspensor structure by qualitative observation with stereoscopic mirror; and investigated the change of embryo and suspensor ratio in different hormone condition for quantitative observation by Image-Pro Plus software, aiming at the nutritional needs at this stage. The results showed cleaved polyembryony were more easily differentiate into embryogenic cells. The change of the original culture environment would separate embryo from suspensor and the embryo would accumulate more material. The medium ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA) would improve the proliferation speed. It improved the mechanism of improve proliferation in resistant *P. densiflora* was the increase of the embryo and suspensor ratio.

Key words: *Pinus densiflora*; initiation; proliferation; poly embryos; embryonic suspensor cell mass; Image-Pro Plus

Received 2017-12-22 Accepted 2018-03-22

This work is supported by Science and Technology Support Program of Jiangsu Province (Grant No. BE2014405), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institution (PAPD).

*Corresponding author (xqwu@njfu.edu.cn).