

引用格式: 刘珊珊, 杨剑飞, 沈海龙. 外源多胺对红松胚性愈伤组织增殖培养的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(X): 1-9. LIU Shanshan, YANG Jianfei, SHEN Hailong. Effects of exogenous polyamines on proliferation of embryogenic calli of *Pinus koraiensis*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(X): 1-9.

外源多胺对红松胚性愈伤组织增殖培养的影响

刘珊珊¹, 杨剑飞^{1,2}, 沈海龙^{1,3}

(1. 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学 森林生态系统可持续经营教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 东北林业大学 国家林业和草原局红松工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 【目的】阐明添加外源多胺(PAs)对红松 *Pinus koraiensis* 胚性愈伤组织生理生化的影响, 以提高红松胚性愈伤组织的增殖能力。【方法】在增殖培养基中分别添加不同质量浓度的腐胺、精胺和亚精胺, 统计红松胚性愈伤组织的增殖率, 分析细胞内的过氧化氢(H₂O₂)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、乙烯(ETH)以及腐胺、精胺和亚精胺水平的动态变化。【结果】外源多胺对红松胚性细胞增殖起到促进作用, 其中 5~30 mg·L⁻¹ 腐胺、40~50 mg·L⁻¹ 精胺和 10~20 mg·L⁻¹ 亚精胺促进效果最优, 增殖率分别提升了 2.22%~79.27%、80.56%~141.12%、61.25%~96.21%。此外, 外源添加多胺显著降低了细胞内 H₂O₂ 质量摩尔浓度和抗氧化酶活性($P<0.05$), 提高细胞内源多胺和激素水平。外源添加 50 mg·L⁻¹ 精胺能够显著提升细胞内源多胺水平和激素水平($P<0.05$), 外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺可显著提升细胞内乙烯和精胺质量浓度($P<0.05$), 而外源添加 20 mg·L⁻¹ 亚精胺则有效促进吲哚乙酸、腐胺和精胺质量浓度的增加。【结论】添加适当质量浓度的外源多胺能提高内源多胺水平、激素含量和抗氧化能力, 促进红松胚性愈伤组织的增殖。图 4 参 35

关键词: 红松; 胚性愈伤组织; 多胺; 活性氧代谢; 植物激素

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)00-0001-09

Effects of exogenous polyamines on proliferation of embryogenic calli of *Pinus koraiensis*

LIU Shanshan¹, YANG Jianfei^{1,2}, SHEN Hailong^{1,3}

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Sustainable Management of Forest Ecosystem, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 3. Korean Pine Engineering Technology Research Center of National Forestry and Grassland Administration, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To elucidate the physiological and biochemical effects of adding exogenous polyamines (PAs) on the embryogenic calli of *Pinus koraiensis*, which can enhance the proliferation ability of *P. koraiensis* embryogenic calli. [Method] By adding putrescine (Put), spermine (Spm) and spermidine (Spd) with different concentrations to the proliferation medium, the proliferation rate of embryonic calli were checked. The levels of hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), and indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), ethylene (ETH) were analyzed. Furthermore, the dynamic changes of Put, Spm and Spd levels response to exogenous PAs were also determined. [Result] Exogenous

收稿日期: 2025-03-12; 修回日期: 2025-09-15

基金项目: 林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学)创新项目(2022A01); 国家重点研发计划项目(2022YFD2201002); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2572022BA05)

作者简介: 刘珊珊(ORCID: 0009-0008-3990-7968), 从事林木组织培养在森林培育中的应用研究。E-mail: liussshan0302@163.com。通信作者: 沈海龙(ORCID: 0000-0002-9610-6285), 教授, 博士, 从事森林定向培育、林木种苗培育、组织培养研究。E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn

PAs had a positive effect on the proliferation of embryogenic calli, with 5–30 mg·L⁻¹ Put, 40–50 mg·L⁻¹ Spm, and 10–20 mg·L⁻¹ Spd exhibiting the most significant promoting effects. In the cultivation of three cell lines, 5–30 mg·L⁻¹ Put increased proliferation by 2.22%–79.27%; 40–50 mg·L⁻¹ Spm enhanced proliferation by 80.56%–141.12%; and 10–20 mg·L⁻¹ Spd boosted proliferation by 61.25%–96.21%. Additionally, exogenous addition of PAs significantly reduced intracellular H₂O₂ content and antioxidant enzyme activities ($P < 0.05$) while increasing endogenous PAs and hormone levels within the cells. Specifically, exogenous supplementation of 50 mg·L⁻¹ Spm could notably elevate the levels of endogenous PAs and hormones ($P < 0.05$). Exogenous addition of 10 mg·L⁻¹ Put significantly increased intracellular ethylene and Spm contents ($P < 0.05$), whereas exogenous supplementation of 20 mg·L⁻¹ Spd effectively promoted the increase in IAA, Put, and Spm contents. [Conclusion] The addition of exogenous PAs at appropriate concentrations can elevate endogenous PAs levels, hormone content, and antioxidant capacity, thereby facilitating the proliferation of embryogenic calli in *P. koraiensis*. [Ch, 4 fig. 35 ref.]

Key words: *Pinus koraiensis*; embryogenic calli; polyamine; reactive oxygen species metabolism; plant hormones

红松 *Pinus koraiensis* 是构成东北温带森林顶极群落红松阔叶林的建群种,也是东北林区人工栽培和研究历史最长、经济和生态价值最大的珍贵树种^[1]。在天然阔叶红松林中,红松不仅是乔木层的主要树种,还对维持森林生态系统的稳定性和生物多样性发挥着重要作用^[2]。然而,红松本身的生物学特性(如繁殖周期长、扦插繁殖系数低以及天敌危害)等原因,导致红松优良品种的选育进程较为滞后^[3]。体细胞胚胎发生是解决优质种源稀缺问题的有效方法之一^[4-5]。增殖阶段的胚性愈伤组织是体细胞胚胎生理生化研究、遗传改良和优良种质育苗等一系列实验的基础材料^[6]。培养基的条件和外界环境会影响胚性愈伤组织的生长状况及其胚性特征的保持^[7-9]。

多胺(PAs)中的腐胺(Put)、精胺(Spm)、亚精胺(Spd)和热精胺(Tspm)等是一类脂肪族小分子,在植物中含量丰富,并且可以与核酸、酶、蛋白质和带负电荷的细胞功能基团结合,参与DNA、RNA和蛋白质代谢的调控^[10]。多胺不仅在体细胞胚胎发育中发挥着重要作用,还参与植物衰老、芽分化以及生物和非生物胁迫反应的调控^[11]。在植物体细胞胚胎发生过程中,内源多胺的含量会发生不同程度的变化^[12]。SATHISH等^[13]研究发现:外源多胺可使甘蔗 *Saccharum spp.* 的体细胞胚胎发生率提高2倍以上。邢更妹等^[14]研究表明:维持一定水平的多胺对枸杞 *Lycium barbarum* 的体细胞胚发生至关重要。在对棉花 *Gossypium hirsutum* 体细胞胚胎发生时期的培养物进行多胺测定时发现:胚性愈伤组织形成后多胺含量显著上升^[15]。尽管已有研究在棉花等植物中揭示了多胺对体细胞胚胎发生的调控作用,但多胺在红松体细胞胚胎发生过程中的功能仍不明确。目前,关于外源多胺对红松胚性愈伤组织增殖效应及其生理机制尚缺乏研究。鉴于此,本研究以红松胚性愈伤组织为材料,通过在增殖培养基中添加不同质量浓度的多胺,探究外源多胺对红松胚性愈伤组织增殖的影响,旨在为优化红松体细胞胚胎发生体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养条件

前期以红松未成熟合子胚为材料,诱导产生胚性愈伤组织并超低温保存。诱导培养基为改良的利特维固体培养基(mLV),并添加 2.0 mg·L⁻¹ 1-萘乙酸(NAA)、1.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、0.5 g·L⁻¹ 酸水解酪蛋白、30.0 g·L⁻¹ 蔗糖和 4.0 g·L⁻¹ 结冷胶,灭菌前将培养基 pH 调至 5.8,灭菌后在超净工作台中加入 0.5 g·L⁻¹ 谷氨酰胺。将超低温保存的胚性愈伤组织接种到增殖培养基上复苏,初始用滤纸隔离愈伤组织与培养基,第3天更换1次滤纸和培养基,后续按正常继代周期更换培养皿(无需滤纸)。经过2个增殖周期的观察(1个周期为14 d),筛选出增殖状态优良的3个胚性细胞系(编号L-1、L-2、L-3,正常状态为松软且表面有蓬松丝状物)。增殖培养基选用mLV固体培养基^[16],添加 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA、2.0

mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、0.5 g·L⁻¹ 酸水解酪蛋白、30.0 g·L⁻¹ 蔗糖和 4 g·L⁻¹ 结冷胶, 灭菌前将 pH 调至 5.8, 灭菌后在超净工作台中加入 0.5 g·L⁻¹ 谷氨酰胺及不同质量浓度 (0、5、10、20、30、40、50、60 mg·L⁻¹) 的多胺, 包括腐胺、精胺、亚精胺分别添加到培养基中, 于温度为 (23±2) °C 条件下暗培养, 每组实验重复 3 次。

1.2 红松胚性愈伤组织增殖率测定

在超净工作台中用镊子分别夹取并称重 3 个胚性细胞系各 3 簇愈伤组织, 每簇鲜质量约 0.2 g, 添加到培养基上。每组培养皿处理进行 3 个重复, 增殖培养 14 d 后再次称取愈伤组织鲜质量, 并计算 14 d 时的增殖率 (V)。 $V=(G_1-G_0)/G_0\times 100\%$ 。其中: G_0 为初始愈伤组织鲜质量, G_1 为增殖 14 d 后愈伤组织鲜质量。

1.3 红松胚性愈伤组织相关生理指标测定

第 14 天时, 在外源添加不同多胺处理的细胞系中, 选择增殖率较好的 3 个细胞系愈伤组织为材料进行生理指标测定, 以不添加多胺的愈伤组织作为对照 (ck)。其中, 过氧化氢 (H₂O₂) 质量摩尔浓度和超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 等抗氧化酶活性均使用试剂盒 (苏州科铭) 测定; 吲哚-3-乙酸 (IAA)、脱落酸 (ABA) 和乙烯 (ETH) 按照 LI 等^[17] 的方法测定; 腐胺、亚精胺和精胺按照 DUTRA 等^[18] 的方法测定, 并使用酶联免疫吸附试剂盒 (上海酶联生物) 检测。红松愈伤组织生长状态使用光学显微镜拍摄记录。每个实验均重复 3 次。

1.4 数据处理

使用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和邓肯多重比较 (Duncan, $\alpha=0.05$), 并用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 外源多胺对红松胚性愈伤组织增殖率的影响

随着多胺质量浓度的升高, 3 个细胞系愈伤组织增殖率均呈先上升后下降的趋势。其中, 外源添加 5~30 mg·L⁻¹ 腐胺显著促进了 L-2 和 L-3 细胞系的增殖 ($P<0.05$), 随着腐胺质量浓度的增加, 愈伤组织增殖率逐渐下降, 但在 60 mg·L⁻¹ 腐胺处理下略有回升。针对 L-1 细胞系, 所有处理均未达到显著水平, 但外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺对其增殖有一定的促进效果。说明 5~30 mg·L⁻¹ 腐胺是红松愈伤细胞系适宜的质量浓度, 在此质量浓度下, 3 个细胞系的增殖率为 158.33%~518.33%, 较对照增加了 2.22%~79.27% (图 1A)。相对于对照, 外源添加 10~60 mg·L⁻¹ 精胺显著促进 L-1 和 L-3 细胞系的增殖 ($P<0.05$), 外源 20~60 mg·L⁻¹ 精胺显著促进 L-2 细胞系的增殖 ($P<0.05$), 其中 40~50 mg·L⁻¹ 精胺是 3 个细胞系处理的最优质量浓度, 在此质量浓度下, 3 个细胞系的增殖率为 325.00%~586.67%, 相比对照增殖效果提升了 80.56%~141.12% (图 1B)。相对于对照, 外源添加 5~50 mg·L⁻¹ 亚精胺显著促进 L-1 和 L-2 细胞系的增殖 ($P<0.05$), 外源添加 5~30 mg·L⁻¹ 亚精胺显著促进 L-3 细胞系的增殖 ($P<0.05$), 其中 10~20 mg·L⁻¹ 亚精胺是 3 个细胞系的最优处理, 在此质量浓度下, 3 个细胞系的增殖率为 451.67%~693.33%, 相比对照增殖效果提升了 61.25%~96.21% (图 1C)。可见, 不同类型的多胺对红松愈伤组织的增殖效率具有不同程度的影响。其中, 外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺、50 mg·L⁻¹ 精胺以及 20 mg·L⁻¹ 亚精胺均能够显著促进不同红松细胞系中愈伤组织的增殖 ($P<0.05$)。因此, 在后续的研究中, 将重点围绕外源添加的 10 mg·L⁻¹ 腐胺、50 mg·L⁻¹ 精胺以及 20 mg·L⁻¹ 亚精胺进行分析。显微观察发现: 多胺处理后的红松胚性愈伤组织明亮清透、状态松软, 且表面有蓬松丝状物 (图 2), 表明外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺、50 mg·L⁻¹ 精胺以及 20 mg·L⁻¹ 亚精胺能够较好地促进愈伤组织的生长。

2.2 外源多胺对红松胚性愈伤组织抗氧化特性的影响

2.2.1 外源多胺对红松胚性愈伤组织过氧化氢质量摩尔浓度的影响 从图 3A 可见: 与对照相比, 外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺对 L-2 和 L-3 细胞系的过氧化氢质量摩尔浓度有显著影响 ($P<0.05$), 相比 ck 分别降低了 59.2% 和 54.8%。外源添加 50 mg·L⁻¹ 精胺对 L-2 和 L-3 细胞系的过氧化氢质量摩尔浓度影响显著 ($P<0.05$), 相比 ck 分别降低了 50.7% 和 61.3%。此外, 外源添加 20 mg·L⁻¹ 亚精胺对 L-1、L-2 和 L-

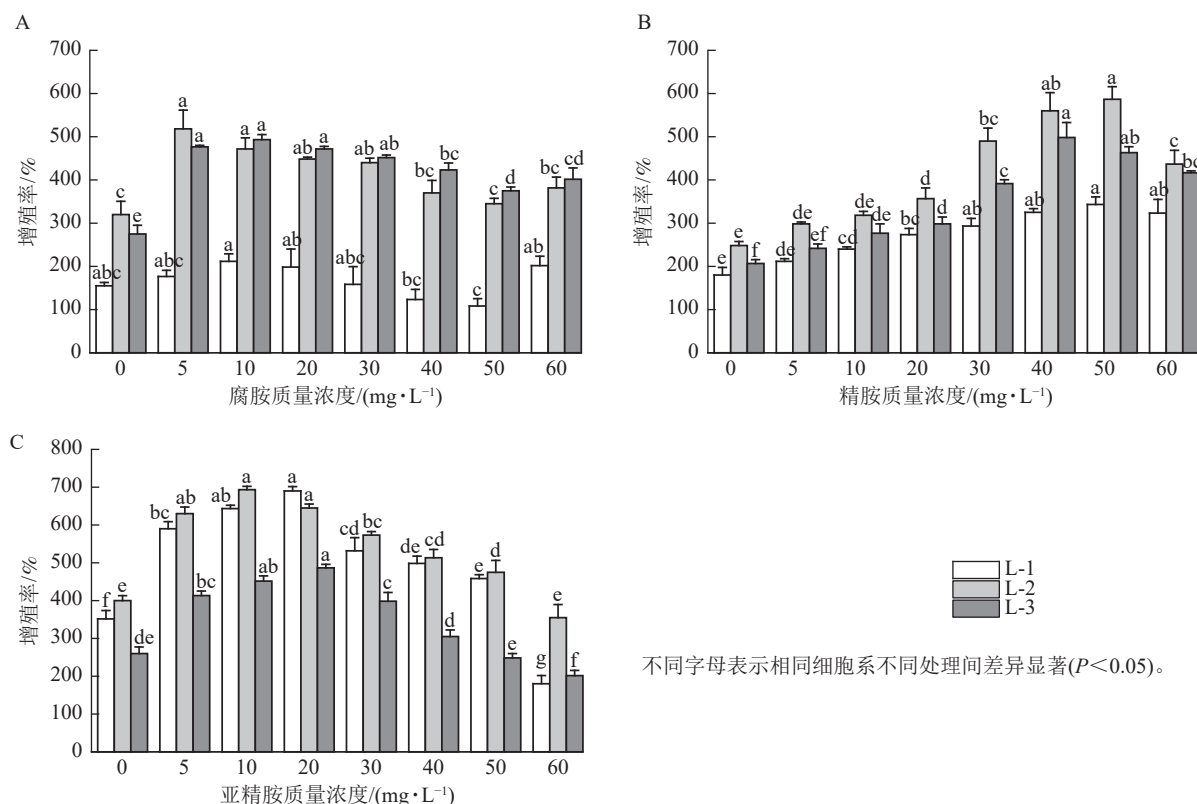
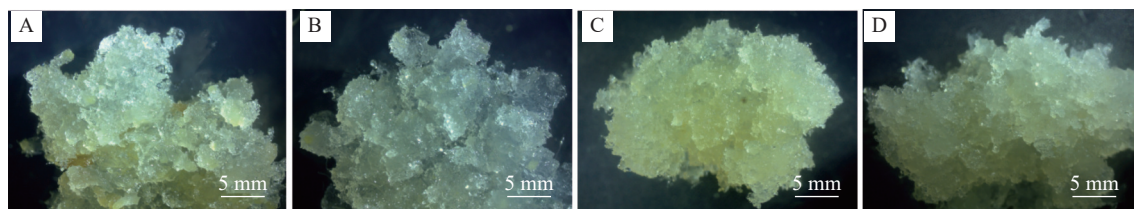


图 1 外源多胺对 3 个红松胚性愈伤组织增殖率的影响

Figure 1 Effect of exogenous polyamines on the proliferation rate of the three kind embryonic calli of *P. koraiensis*



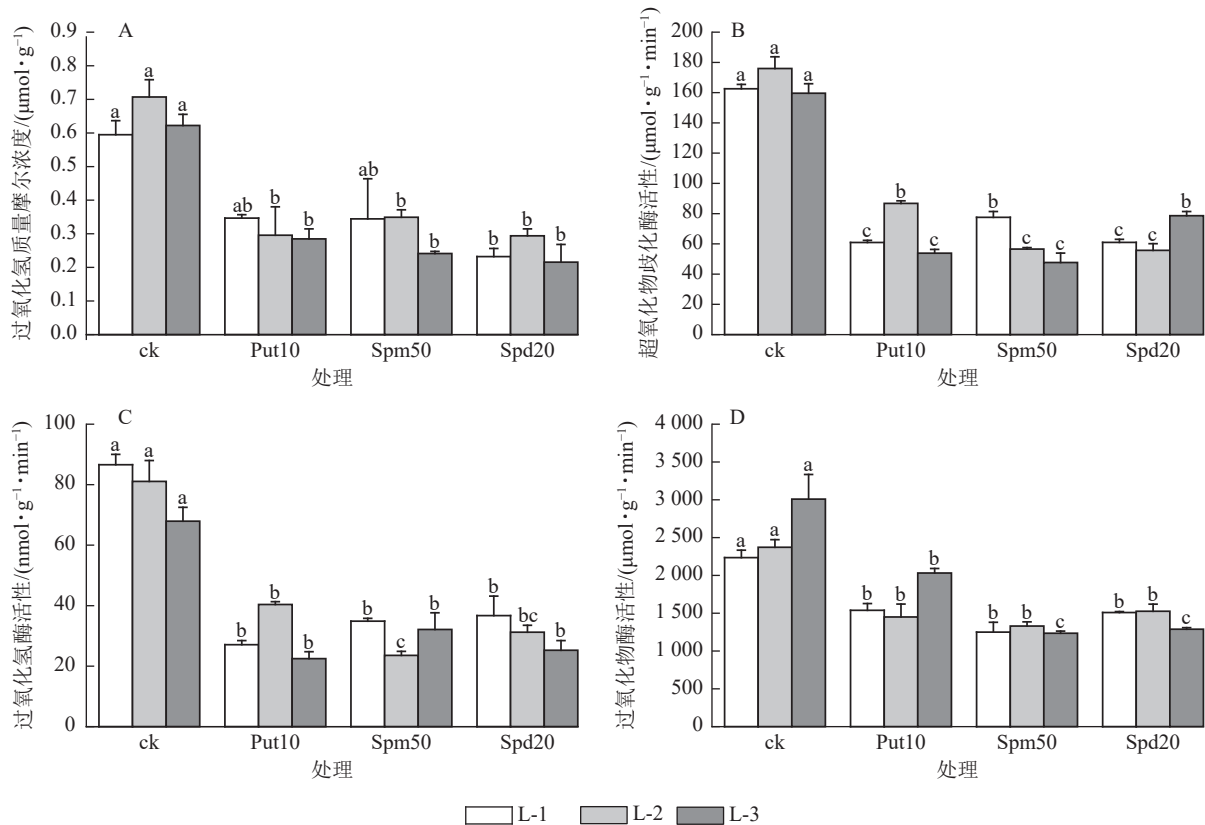
A. 10 mg·L⁻¹腐胺; B. 50 mg·L⁻¹精胺; C. 20 mg·L⁻¹亚精胺; D. 对照(ck)。

图 2 外源多胺处理 14 d 的红松胚性愈伤组织生长状态

Figure 2 Growth of embryonic calli of *P. koraiensis* under different exogenous polyamines

3 细胞系的过氧化氢质量摩尔浓度影响显著 ($P < 0.05$), 相比 ck 分别降低了 61.0%、59.2% 和 66.7%。

2.2.2 外源多胺对红松胚性愈伤组织抗氧化酶活性的影响 在超氧化物歧化酶活性变化方面, 当添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺时, L-1、L-2 和 L-3 细胞系超氧化物歧化酶活性分别为 60.90、86.70 和 53.90 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 与 ck 相比分别下降了 62.54%、50.70% 和 66.20%; 添加 50 mg·L⁻¹ 精胺时, L-1、L-2 和 L-3 细胞系超氧化物歧化酶活性分别为 77.56、56.58 和 47.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 与 ck 相比分别下降了 52.30%、67.80% 和 70.10%; 添加 20 mg·L⁻¹ 亚精胺时, L-1、L-2 和 L-3 细胞系超氧化物歧化酶活性与 ck 相比下降了 50.76%~68.30% (图 3B)。在过氧化氢酶活性变化方面, 外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺使 3 个胚性愈伤组织的过氧化氢酶活性相较于 ck 显著下降了 40.69%~59.51% ($P < 0.05$); 添加 50 mg·L⁻¹ 外源精胺使愈伤组织的过氧化氢酶活性显著降低了 51.70%~57.50% ($P < 0.05$); 添加 20 mg·L⁻¹ 外源亚精胺对 L-1 和 L-3 细胞系的过氧化氢酶活性影响显著 ($P < 0.05$), 过氧化氢酶活性分别降至 36.72 和 25.20 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 与 ck 相比分别下降了 57.60% 和 63.83% (图 3C)。在过氧化物酶活性变化方面, 当添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺时, 3 个细胞系过氧化物酶活性相较于对照下降了 31.14%~38.90%; 添加 50 mg·L⁻¹ 精胺时, 3 个胚性愈伤组织的过氧化物酶活性降低了 43.93%~58.94%; 添加 20 mg·L⁻¹ 亚精胺时同样降低了愈伤组织的过氧化物酶活性, 下降了 32.47%~57.17% (图 3D)。



ck表示不添加多胺的愈伤组织；Put10表示添加10 mg·L⁻¹腐胺的愈伤组织；Spm50表示添加50 mg·L⁻¹精胺的愈伤组织；Spd20表示添加20 mg·L⁻¹亚精胺的愈伤组织。不同字母表示相同细胞系不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

图 3 外源多胺处理 14 d 对红松胚性愈伤组织抗氧化特性的影响

Figure 3 Effect of exogenous polyamines on antioxidation of embryonic calli of *P. koraiensis* after 14 days treatment

2.3 外源多胺对红松胚性愈伤组织激素质量浓度的影响

在不同多胺处理下，不同细胞系激素质量浓度的变化趋势表现出较高的一致性。当外源添加 50 mg·L⁻¹ 精胺和 20 mg·L⁻¹ 亚精胺时，均显著提高了 3 个细胞系内源吲哚乙酸质量浓度 ($P < 0.05$) (图 4A)；而添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺对 3 个细胞系吲哚乙酸质量浓度的变化无显著影响。

外源添加 50 mg·L⁻¹ 精胺显著提高了 L-1、L-2 和 L-3 细胞系中的脱落酸质量浓度 ($P < 0.05$)，与 ck 相比，分别提高了 39.99%，39.65% 和 26.92% (图 4B)；而外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺和 20 mg·L⁻¹ 亚精胺对 3 个细胞系脱落酸质量浓度无显著影响。

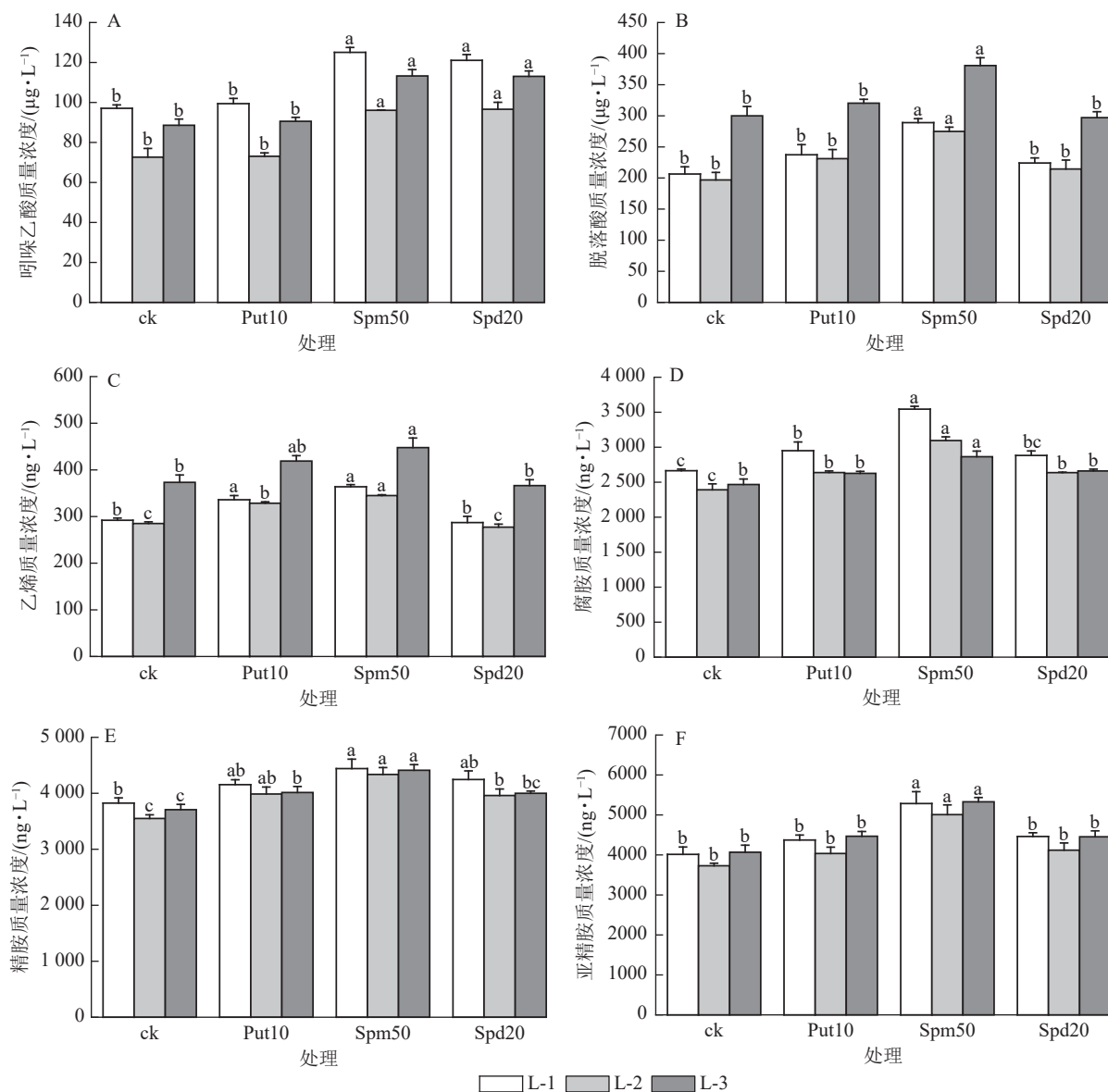
外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺和 50 mg·L⁻¹ 精胺显著提高了 L-1、L-2 和 L-3 细胞系的乙烯质量浓度 ($P < 0.05$) (图 4C)。而添加 20 mg·L⁻¹ 亚精胺对 3 个细胞系的乙烯质量浓度无显著影响。

2.4 外源多胺对红松胚性愈伤组织内源多胺质量浓度的影响

外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺和 20 mg·L⁻¹ 亚精胺能显著提升 L-1、L-2 细胞系的内源腐胺质量浓度 ($P < 0.05$)，而对 L-3 细胞系的内源腐胺质量浓度无显著影响。当外源添加 50 mg·L⁻¹ 精胺时，L-1、L-2 和 L-3 个细胞系的内源腐胺质量浓度达到最高，分别为 3 544.68、3 095.13 和 2 864.58 ng·L⁻¹，与 ck 相比分别增加了 33.08%、29.40% 和 16.12% (图 4D)。

外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺和 20 mg·L⁻¹ 亚精胺能显著提高了 L-2 细胞系的内源精胺质量浓度 ($P < 0.05$)，分别为 3 988.23 和 3 961.29 ng·L⁻¹，与 ck 相比分别增加了 12.35% 和 11.59%。然而，L-1 细胞系中的内源精胺质量浓度虽有所提升，但与对照相比并无显著差异。当添加 50 mg·L⁻¹ 精胺时，L-1、L-2 和 L-3 细胞系的内源精胺质量浓度分别达 4 441.76、4 336.37 和 4 411.99 ng·L⁻¹，与 ck 相比分别提高了 16.11%，22.15% 和 19.02% (图 4E)。

外源添加 10 mg·L⁻¹ 腐胺和 20 mg·L⁻¹ 亚精胺对 3 个细胞系的内源亚精胺质量浓度均无显著影响。外源添加 50 mg·L⁻¹ 精胺则显著提高了 L-1、L-2 和 L-3 细胞系的内源亚精胺质量浓度 ($P < 0.05$)，与



ck表示不添加多胺的愈伤组织；put10表示添加10 mg·L⁻¹腐胺的愈伤组织；spm50表示添加50 mg·L⁻¹精胺的愈伤组织；spd20表示添加20 mg·L⁻¹亚精胺的愈伤组织。不同字母表示相同细胞系不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

图4 外源多胺对红松胚性愈伤组织激素和内源多胺质量浓度的影响

Figure 4 Effect of exogenous polyamines on the hormone and polyamine content of embryonic calli of *P. koraiensis*

ck 相比分别提高了 31.69%、34.24% 和 31.01% (图 4F)。

3 讨论

多胺通常被认为是一种植物体胚发生中的新型生长调节剂^[19]。研究发现：外源多胺能提高橡胶树 *Hevea brasiliensis* 体细胞胚胎发生及成株的概率^[20]。对荔枝 *Litchi chinensis* 的研究发现：在愈伤组织增殖培养基上添加腐胺、精胺和亚精胺可促进愈伤组织增殖并保持胚性^[21]。本研究通过添加一定质量浓度的外源多胺能促进红松胚性细胞系的增殖率，并且不同基因型的细胞系对多胺种类和质量浓度的响应不同，其中 10 mg·L⁻¹ 腐胺、50 mg·L⁻¹ 精胺和 20 mg·L⁻¹ 亚精胺对 3 个细胞系的增殖效果较好。

过氧化氢被认为是调节多种胁迫诱导反应的共同信号分子，可以通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联调节等胁迫特异性反应^[22]。氧化还原胁迫会提高胚性愈伤组织中的活性氧 (ROS) 水平，目前许多植物中的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶抗氧化基因和酶系统已经得到了很好的表征^[23-24]。有研究认为：胚性愈伤组织的再生能力与过氧化物酶活性的增加有密切联系^[25]，在白云杉 *Picea glauca* 研究中发现：胚性愈伤组织的过氧化物酶活性比非胚性愈伤组织低数倍，因此这些酶被认为是生化特性改变的

重要指标^[26]。胡忠等^[27]研究认为：不同的多胺及其抑制剂可影响宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 体胚中蛋白质和过氧化物同工酶的表达。本研究发现：与 ck 相比，外源添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺和 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺，能很好地降低过氧化氢质量摩尔浓度以及过氧化物酶活性。因此，推测多胺能够参与到植物的活性氧代谢相关进程中，以促进红松胚性愈伤组织的增殖，这与水曲柳 *Fraxinus mandshurica*^[28] 的研究结果相类似。

维持激素的动态平衡在诱导体胚胎发生中有重要作用，内源吲哚乙酸、脱落酸和乙烯水平的动态变化是调节体胚发生能力的关键信号^[29-30]。在红松增殖阶段，胚性愈伤组织的优良生长为后期红松体胚的发育提供了更多机会。相关研究表明：柑橘 *Citrus reticulata* 愈伤中多胺的变化能够影响愈伤的体细胞胚胎发生能力^[31]。本研究表明：外源添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺和 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺能显著提高内源吲哚乙酸质量浓度，有利于胚性愈伤组织的生长，外源添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺能显著提高内源脱落酸质量浓度。在南洋杉 *Araucaria cunninghamii* 的研究中，外源多胺的添加也促进了内源吲哚乙酸和脱落酸的积累^[32]。这些结果表明：在红松胚性愈伤组织内多胺与植物激素有着密切联系，在多胺和乙烯合成途径中对相同底物 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 存在竞争^[33]。本研究发现：外源施用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺能够促进红松 L-1 和 L-2 细胞系的内源乙烯积累。同时，外源多胺的添加对 3 个细胞系内源多胺质量浓度具有普遍的促进作用。因此，推测通过添加外源多胺促进了细胞内源多胺和乙烯的竞争底物 SAM 从前体中的释放，从而导致内源多胺和乙烯质量浓度都有所提高。此外，外源多胺对胚性愈伤组织的增殖和体细胞胚胎发生具有显著的促进作用。如 PAUL 等^[34] 研究表明：外源腐胺可使苦瓜 *Momordica charantia* 胚性愈伤组织鲜质量和体细胞胚胎发生率分别增加 5.0 和 2.5 倍。SATISH 等^[35] 研究认为：外源亚精胺可有效促进小米 *Setaria italica* 胚性愈伤组织的增殖和体细胞胚胎的发生。本研究进一步证实：添加适当质量浓度的外源多胺可以提高红松胚性愈伤组织的内源多胺质量浓度，并在增殖过程中起着一定的促进作用。

4 结论

外源多胺对红松胚性细胞增殖起到一定积极作用， $5 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺、 $40 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺和 $10 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺对红松胚性愈伤组织的增殖促进效果较好。外源添加多胺，能够提高细胞内源多胺的水平、抗氧化能力和内源吲哚乙酸的水平，从而促进红松胚性愈伤组织的增殖。本研究结果有助于促进红松体细胞胚胎发生技术的改善，也为其他针叶树体胚发生技术的完善提供参考。

5 参考文献

- [1] 李虹谕, 杨会侠, 孙佳彤, 等. 中、幼龄红松人工林生长季非结构性碳水化合物和碳氮磷生态化学计量特征[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(3): 495-502.
LI Hongyu, YANG Huixia, SUN Jiatong, et al. Structural carbohydrate and carbon, nitrogen, phosphorus ecological stoichiometry in young and middle-aged *Pinus koraiensis* plantations during growing seasons [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(3): 495-502.
- [2] 龚艳宾, 郭建斌, 赵秀海, 等. 吉林蛟河天然阔叶红松林草本植物多样性及其与土壤因子的关系[J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(4): 620-628.
GONG Yanbin, GUO Jianbin, ZHAO Xiuhai, et al. Herbaceous species diversity as related to soil factors in a Korean pine broadleaved forest of Jiaohe, Jilin Province [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2016, 33(4): 620-628.
- [3] 董奕帆, 于海英, 王蛟, 等. 云杉花墨天牛与褐梗天牛在寄主红松上的生态位分布[J]. 浙江农林大学学报, 2024, 41(2): 362-368.
DONG Yifan, YU Haiying, WANG Jiao, et al. Niche distribution of *Monochamus saltuarius* and *Arhopalus rusticus* on host *Pinus koraiensis* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2024, 41(2): 362-368.
- [4] 申晓辉, 蒋湘宁, PARK Y S, 等. 红松体细胞胚胎培养技术体系的建立[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2005, 24(1): 11-14.
SHEN Xiaohui, JIANG Xiangning, PARK Y S, et al. Somatic embryogenesis (SE) in Korean pine (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) [J]. *Journal of Chengdu University (Natural Science)*, 2005, 24(1): 11-14.
- [5] HOSOI Y, MARUYAMA T E. Propagation of Ryukyu matsu (*Pinus luchuensis* Mayr.) via somatic embryogenesis[M]//

- BETTAIEB T. *Micropropagation of Ornamental Plants*. New York: Nova Science Publishers, Inc. , 2018: 115–136.
- [6] TAUTORUS T E, FOWKE L C, DUNSTAN D I. Somatic embryogenesis in conifers [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1991, **69**(9): 1873–1899.
- [7] 任毓辉, 聂帅, 彭春雪, 等. 红松胚性愈伤组织增殖的激素配比、糖源类型和增殖周期效应研究[J]. *植物研究*, 2022, **42**(4): 704–712.
- REN Yuhui, NIE Shuai, PENG Chunxue, *et al.* Effects of hormone combinations, carbon source type and proliferation cycle on embryogenic callus proliferation of *Pinus koraiensis* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2022, **42**(4): 704–712.
- [8] GAO Fang, PENG Chunxue, WANG Hao, *et al.* Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis* [J]. *Journal of Forestry Research*, 2021, **32**(2): 483–491.
- [9] PENG Chunxue, GAO Fang, WANG Hao, *et al.* Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in *Pinus koraiensis* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2021, **144**(1): 185–194.
- [10] SEILER N, RAUL F. Polyamines and apoptosis [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2005, **9**(3): 623–642.
- [11] ALCÁZAR R, MARCO F, CUEVAS J C, *et al.* Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(23): 1867–1876.
- [12] SRIDEVI V, GIRIDHAR P, RAVISHANKAR G A. Endogenous polyamine profiles in different tissues of *Coffea* sp. , and their levels during the ontogeny of fruits[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, **31**(4): 757–764.
- [13] SATHISH D, THEBORAL J, VASUDEVAN V, *et al.* Exogenous polyamines enhance somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2020, **56**(1): 29–40.
- [14] 邢更妹, 黄惠英, 王亚馥. 枸杞体细胞胚发生过程中内源多胺代谢动态的研究[J]. *西北植物学报*, 2002, **22**(1): 84–89, 222.
- XING Gengmei, HUANG Huiying, WANG Yafu. Studies of polyamine metabolism in somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, **22**(1): 84–89, 222.
- [15] 程文翰, 朱华国, 李鹏飞, 等. 棉花多胺 HPLC 的测定方法优化及其在体细胞胚胎发生过程中的变化规律[J]. *棉花学报*, 2014, **26**(2): 138–144.
- CHENG Wenhan, ZHU Huaguo, LI Pengfei, *et al.* Method optimization of polyamine content by high-performance liquid chromatography and its changes in the process of somatic embryogenesis in cotton [J]. *Cotton Science*, 2014, **26**(2): 138–144.
- [16] GAO Fang, PENG Chunxue, WANG Hao, *et al.* Key techniques for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Pinus koraiensis* [J/OL]. *Forests*, 2020, **11**(9): 912 [2025-03-01]. DOI: [10.3390/f11090912](https://doi.org/10.3390/f11090912).
- [17] LI Qingfen, ZHANG Shougong, WANG Junhui. Transcriptomic and proteomic analyses of embryogenic tissues in *Picea balfouriana* treated with 6-benzylaminopurine [J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, **154**(1): 95–113.
- [18] DUTRA N T, SILVEIRA V, de AZEVEDO I G, *et al.* Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines [J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, **148**(1): 121–132.
- [19] CHEN Dandan, SHAO Qingsong, YIN Lianghong, *et al.* Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, **9**: 1945 [2025-03-01]. DOI: [10.3389/fpls.2018.01945](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945).
- [20] EL HADRAMI I, D' AUZAC J. Effects of polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1992, **140**(1): 33–36.
- [21] 王果, 刘耀婷, 李焕苓, 等. 外源多胺对荔枝愈伤组织增殖及体胚发生的作用[J]. *果树学报*, 2021, **38**(12): 2135–2147.
- WANG Guo, LIU Yaoting, LI Huanling, *et al.* Effects of exogenous polyamine application on callus proliferation and somatic embryogenesis in *Litchi chinensis* ‘Feizixiao’ [J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, **38**(12): 2135–2147.
- [22] MOSCHOU P N, PASCHALIDIS K A, DELIS I D, *et al.* Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco [J]. *The Plant Cell*, 2008, **20**(6): 1708–1724.

- [23] ZHOU Ting, YANG Xiyan, GUO Kai, *et al.* ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis *via* the regulation of auxin signaling in cotton [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, **15**(6): 2108–2124.
- [24] ELHITI M, STASOLLA C. ROS signalling in plant embryogenesis[M]// GUPTA K, IGAMBERDIEV A. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants. Signaling and Communication in Plants: Vol 23*. Cham: Springer, 2014: 197–214.
- [25] VARHANÍKOVÁ M, UVACKOVA L, SKULTETY L, *et al.* Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, **104**: 57–65.
- [26] KORMUTAK A, VOOKOVA B. Peroxidase activity in non-embryogenic and embryogenic calli and in developing somatic embryos of white fir (*Abies concolor* Gord. *et* Glend) [J]. *Plant Biosystems An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 2001, **135**(1): 101–105. .
- [27] 胡忠, 谢晴宜, 王仑山, 等. 外源多胺对宁夏枸杞离体形态发生过程中可溶性蛋白组分和过氧化物酶同工酶酶谱的影响 [J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 2003, **39**(1): 63–68.
- HU Zhong, XIE Qingyi, WANG Lunshan, *et al.* Effects of polyamines and its synthetic inhibitors on soluble protein components and isoperoxidase patterns during *in vitro* morphogenesis of *Lycium barbarum* [J]. *Journal of Lanzhou University (Natural Sciences)*, 2003, **39**(1): 63–68.
- [28] 谢添伊. 外源抗坏血酸和过氧化氢调控水曲柳褐化和体胚发生机制研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- XIE Tianyi. *Mechanism of Exogenous Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide Regulating Browning and Somatic Embryogenesis of Fraxinus mandshurica* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.
- [29] 蒋嘉伟. 百合体胚发生过程中内源生长素含量测定及 miR393b/TIR1 表达分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- JIANG Jiawei. *Determination of Endogenous Auxin and Expression of miR393b and TIR1 in Lilium during Somatic Embryogenesis* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018.
- [30] PESCADOR R, KERBAUY G B, de MELO FERREIRA W, *et al.* A hormonal misunderstanding in *Acca sellowiana* embryogenesis: levels of zygotic embryogenesis do not match those of somatic embryogenesis [J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, **68**(1): 67–76.
- [31] 李紫晨. 柑橘愈伤再生体胚过程及体胚发生影响因素探究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
- LI Zichen. *Study on the Process of Somatic Embryonic Differentiation from Callus and Influencing Factors of Somatic Embryogenesis in Citrus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024.
- [32] STEINER N, SANTA-CATARINA C, SILVEIRA V, *et al.* Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2007, **89**(1): 55–62.
- [33] 梁艳, 沈海龙, 李玉花, 等. 植物体细胞胚胎发生中乙烯和多胺作用的研究进展[J]. *林业科学*, 2012, **48**(9): 145–153.
- LIANG Yan, SHEN Hailong, LI Yuhua, *et al.* Role of ethylene and polyamines in plant somatic embryogenesis [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2012, **48**(9): 145–153.
- [34] PAUL A, MITTER K, RAYCHAUDHURI S S. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, **97**(3): 303–311.
- [35] SATISH L, RENCY A S, RATHINAPRIYA P, *et al.* Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn] [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, **124**(1): 15–31.