

# 水芋体细胞胚胎发生及植株再生体系的建立

刘秀岩<sup>1,2</sup>, 顾地周<sup>2</sup>, 朱俊义<sup>2</sup>, 梁宇<sup>1,2</sup>

(1. 北华大学 林学院 吉林 吉林 132013; 2. 通化师范学院 生物系 吉林 通化 134002)

**摘要:**以水芋幼叶为外植体,应用均匀设计法筛选其最适合的胚性愈伤组织及胚性细胞复合体诱导、体细胞胚胎发育及植株再生的培养基,建立了水芋体细胞胚胎发生体系。对不同阶段培养材料的形态结构及超微结构的观察证明了水芋体细胞胚胎的发育过程。结果表明:水芋叶片胚性愈伤组织及胚性细胞复合体诱导最适宜培养基为:LS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L,诱导率为98.5%;体胚发育及植株再生最适宜的培养基为:LS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IAA 1.0 mg/L,体胚萌发率为96%,萌发的体胚在发育培养基上继续培养25 d后全部发育成完整植株。

**关键词:**水芋;均匀设计;胚性细胞复合体;体细胞胚;植株再生

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)04-0062-04

水芋(*Calla palustris* L.)别名野芋、水葫芦,天南星科水芋属水生草本植物,是长白山区野生珍稀濒危药用植物<sup>[1]</sup>,主治瘰疬、毒蛇咬伤、水肿、骨髓炎、风湿等症。其花葶直立,花序造型奇特,花洁白素雅,果实色泽艳丽,十分美观,可驯化为观花、观果园艺植物,用于湖畔、池边、河岸、湿地等浅水处的绿化。另外,其花期长,也可开发为鲜切花。因水芋种子不易获得,其常规繁殖主要靠分蘖方式,繁殖系数小,可操作性极差。体细胞胚胎发生途径是培养体细胞经历与合子胚发育相似的过程形成胚性细胞复合体,然后萌发进而发育为完整植株。不仅繁殖系数高,而且遗传稳定性强,可用于人工种子的制作,大大提高种苗生产效率,并可用于遗传转化,直接通过体胚发生途径获得水芋转基因植株。目前,国内外关于植物体细胞胚胎发生研究的报道较多<sup>[2-7]</sup>,现在前人报道的基础上,采用均匀设计法对其体胚诱发及发育的培养基进行筛选,研究水芋体细胞胚胎发生体系,以期明确高效、稳定的体胚诱导、发育及成熟萌发条件;同时对体胚发生发育过程的形态及超微结构进行研究,以期为深入了解水芋体胚发生的形态学及形态调控技术提供依据,并为提高种苗生产率和制作水芋

人工种子奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材

水芋新生幼叶。

### 1.2 方法

1.2.1 培养条件 以LS为基本培养基(由预试验可知LS较MS对胚性愈伤组织诱导效果好而快),附加蔗糖分别为20 g/L,琼脂8.0 g/L, pH 5.5,附加植物生长调节物质,温度控制在(26±2)℃,光照强度800 lx,光照周期10 h/d。

1.2.2 材料处理 将水芋新发幼叶剪下,在超净台上用70%酒精涮洗10 s,再用饱和次氯酸钠溶液浸泡10 min,无菌水冲洗8次,用无菌滤纸将外植体表面的水分吸干,切除受杀菌消毒剂损害组织后作为外植体备用<sup>[7]</sup>。

1.2.3 胚性愈伤组织及胚性细胞复合体的诱导 将外植体接种到附加不同浓度6-BA(由单因子试验可知浓度范围为0.1~1.0 mg/L)和2,4-D、IAA、NAA(由单因子试验可知生长素浓度范围均为0~2.0 mg/L)的培养基上进行胚性愈伤组织及胚性细胞复合体诱发培养,观察胚性愈伤组织及胚性细胞复合体产生情况。以筛选最合适的诱导培养基。

1.2.4 体细胞胚发生发育及植株再生 将含有胚性细胞复合体胚性愈伤组织接种到诱发体细胞胚包括发生发育和植株再生。胚性细胞复合体培养到一定时期后,将其接种到附加6-BA、NAA、IBA、IAA(由预试验可知植物生长调节物质浓度范围均为0.1~1.0 mg/L)的LS培养基中,筛选最佳的体胚发生发育培养基。待胚性愈伤组织表面产生鱼雷状突起时,将突起剥离下来,再转接到体胚发生培养基中继续培养,使体胚继续发育并萌

**第一作者简介:**刘秀岩(1983-),男,吉林白城市人,在读硕士,研究方向为森林培育。

**通讯作者:**顾地周(1973-),男,吉林通化人,讲师,现主要从事长白山珍稀濒危植物和珍稀濒危药用植物研究工作。E-mail: gudizhou@163.com。

**基金项目:**国家科技部“国家科技攻关计划引导资助项目”(2005BA741C)

**收稿日期:**2008-11-10

发后形成完整的植株。同时, 结合电镜观察体胚产生的部位及发育情况(球形胚、盾形胚、子叶胚和再生植株)。

1.2.5 结果观察 用数码相机对含外植体各阶段的形态变化进行拍摄。同时, 对不同阶段的培养物进行扫描电镜观察, 拍摄。

1.2.6 数据分析与处理 数据分析与处理采用均匀设计(Uniform Design)软件。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对含胚性愈伤组织及胚性细胞复合体诱导的影响

将水芋嫩叶接种于不同培养基中进行胚性愈伤组织诱导培养, 每个处理数为 30。为提高水芋胚性愈伤组织诱导的速度和诱导率, 采用均匀设计法<sup>[8]</sup>, 选用  $U_{10}(10^4)$  均匀表(见表 1), 考察了细胞分裂素 6-BA 和生长素 2,4-D、IAA、NAA 的浓度交叉配比对诱导率的影响, 其中,  $X_1$  为 6-BA 浓度,  $X_2$  为 2,4-D 浓度,  $X_3$  为 IAA 浓度,  $X_4$  为 NAA 浓度,  $Y$  为诱导率, 结果见表 2。

表 1  $U_{10}(10^4)$  因素及水平设计

Table 1  $U_{10}(10^4)$  factors and levels design

水平		因素 Factors/ mg · L <sup>-1</sup>			
Levels	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	
1	0.10	0.00	0.00	0.00	
2	0.20	0.10	0.10	0.10	
3	0.30	0.25	0.25	0.25	
4	0.40	0.50	0.50	0.50	
5	0.50	0.75	0.75	0.75	
6	0.60	1.00	1.00	1.00	
7	0.70	1.25	1.25	1.25	
8	0.80	1.50	1.50	1.50	
9	0.90	1.75	1.75	1.75	
10	1.00	2.00	2.00	2.00	

表 2  $U_{10}(10^4)$  均匀设计实验安排及结果

Table 2  $U_{10}(10^4)$  uniform design test plan and result

水平		因素 Factors/ mg · L <sup>-1</sup>			
Levels	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Y/ %
1	0.10	0.25	0.50	0.75	22.00
2	0.20	1.00	1.50	2.00	60.00
3	0.30	1.75	0.00	0.50	63.00
4	0.40	0.00	0.75	1.75	00.00
5	0.50	0.50	1.75	0.25	49.00
6	0.60	1.25	0.10	1.50	75.00
7	0.70	2.00	1.00	0.10	96.00
8	0.80	0.10	2.00	1.75	3.00
9	0.90	0.75	0.25	0.00	65.00
10	1.00	1.50	1.25	1.00	66.00

注: Y 值为培养 35 d 的诱导率, 10 瓶平均值。

将所得数据经均匀设计软件处理得回归方程:  $Y=18.8+4.91X_1+37.7X_2-0.761X_3-5.79X_4$ , 样本容量  $N=10$ , 显著性水平  $\alpha=0.01$ , 复相关系数  $R=0.9084$ , 检验值  $F_t=5.899$ , 临界值  $F_{(0.05, 4, 5)}=5.192$ ,  $F_t>F_{(0.05, 4, 5)}$ , 显著, 回归方程有意义。对方程项进行显著性检验可知: 检验值  $F_{(1)}=0.05362$ , 临界值  $F_{(0.05, 1, 6)}=5.987$ ,  $F_{(1)}\leq F_{(0.05, 1, 6)}$ , 此方程项不显著, 又因  $X_1$  与  $Y$  呈正相关, 不能剔除。通过优化后预报试验结果, 求得实验

范围内的最佳条件为:  $X_1=0.5$ ,  $X_2=2.0$ ,  $X_3=0$ ,  $X_4=0$  在此组合基础上求得最优解:  $y=96.655$ , 此解为回归方程的解析解, 按公式  $Y=y\pm t_{\alpha}\cdot s$  计算出优化值区间估计为  $Y=96.655\pm 1.9600\times 17.7$ , 即  $61.963\sim 131.347$ 。用试验得到的优化值 6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 进行验证试验, 外植体接种到诱导培养基 10 d 后由绿逐渐转黄, 继续培养叶片逐渐增厚变形, 35 d 后完全形成愈伤组织, 表面光滑致密呈黄绿色(图 1, a), 培养至 50 d 时部分愈伤组织表面逐渐形成颗粒状的小突起(图 1, b)。通过电镜观察确定: 表面光滑致密呈黄绿色的愈伤组织是含有胚性细胞复合体的胚性愈伤组织(图 2, a, b), 这些小突起是体胚发育的前期即球形胚(图 2, c; 图 3, a)。统计诱导率达 98.5% 以上, 在估计区间范围内, 且比所有试验  $Y$  值都大。因此, 水芋幼叶诱导含胚性细胞复合体的胚性愈伤组织最佳培养基为: LS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L。

2.2 不同激素配比对体细胞胚发育及植株再生的影响

将含有胚性细胞复合体的胚性愈伤组织切割成适当大小的块, 接种于不同培养基中进行体细胞胚的发育及萌发培养, 每个处理数为 30。为了提高水芋体胚的发育及萌发速度和萌发率, 采用均匀设计法, 选用  $U_{10}(10^8)$  均匀表(见表 3), 考察了细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA、IBA、IAA 的浓度交叉配比对萌发率的影响, 其中,  $X_1$  为 6-BA 浓度,  $X_2$  为 NAA 浓度,  $X_3$  为 IBA 浓度,  $X_4$  为 IAA 浓度,  $Y$  为萌发率, 结果见表 4。

表 3  $U_{10}(10^4)$  因素及水平设计

Table 3  $U_{10}(10^4)$  factors and levels design

水平		因素 Factors/ mg · L <sup>-1</sup>			
Levels	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	
1	0.10	0.10	0.10	0.10	
2	0.20	0.20	0.20	0.20	
3	0.30	0.30	0.30	0.30	
4	0.40	0.40	0.40	0.40	
5	0.50	0.50	0.50	0.50	
6	0.60	0.60	0.60	0.60	
7	0.70	0.70	0.70	0.70	
8	0.80	0.80	0.80	0.80	
9	0.90	0.90	0.90	0.90	
10	1.00	1.00	1.00	1.00	

表 4  $U_{10}(10^4)$  均匀设计试验安排及结果

Table 4  $U_{10}(10^4)$  uniform design test plan and result

水平		因素 Factors/ mg · L <sup>-1</sup>			
Levels	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Y/ %
1	0.10	0.30	0.40	0.50	39.00
2	0.20	0.60	0.80	1.00	75.00
3	0.30	0.90	0.10	0.40	70.00
4	0.40	0.10	0.50	0.90	67.00
5	0.50	0.40	0.90	0.30	55.00
6	0.60	0.70	0.20	0.80	89.00
7	0.70	1.00	0.60	0.20	82.00
8	0.80	0.20	1.00	0.70	81.00
9	0.90	0.50	0.30	0.10	88.00
10	1.00	0.80	0.70	0.60	92.00

注: 培养 45 d 的萌发率, 10 瓶平均值

将所得数据经均匀设计软件处理得回归方程:  $Y = 25.6 + 49.7X_1 + 20.8X_2 - 10.3X_3 + 27.6X_4$ , 样本容量  $N = 10$ , 显著性水平  $\alpha = 0.01$ , 复相关系数  $R = 0.9435$ , 检验值  $F_t = 10.13$ , 临界值  $F_{(0.05, 4, 5)} = 5.192$ ,  $F_t > F_{(0.05, 4, 5)}$ , 回归方程显著。通过回归分析可知:  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  对  $Y$  值影响显著,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_4$  与  $Y$  呈正相关,  $X_3$  与  $Y$  呈负相关, 对各方程项进行显著性检验可知: 检验值  $F_{(3)} = 1.251$ , 临界值  $F_{(0.05, 1, 5)} = 6.608$ ,  $F_{(3)} \leq F_{(0.05, 1, 5)}$ , 此方程项不显著, 第 3 方程项  $X_3$  对回归的贡献最小, 又因与  $Y$  呈负相关, 因此, 需要剔除。新建回归方程继续计算: 得回归方程  $Y = 21.0 + 46.2X_1 + 24.2X_2 + 25.5X_4$ , 复相关系数  $R = 0.9288$ , 检验值  $F_t = 12.56$ , 临界值  $F_{(0.05, 3, 6)} = 4.757$ ,  $F_t > F_{(0.05, 3, 6)}$ , 回归方程显著。同理, 对各方程项进行显著性检验可知: 各方程项均显著。根据回归方程求出  $Y$  的最优组合为:  $X_1 = 1.00$ ,  $X_2 = 0.5$ ,  $X_4 = 1.0$ , 在此组合基础上求得最优解,  $y = 104.8$ , 按公式  $Y = y \pm u_{\alpha} \cdot s$  计算出优化值区间估计为  $Y = 104.8 \pm 1.9600 \times 7.58$ , 即  $89.94 \sim 119.66$ 。用试验得到的优化值 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + IAA 1.0 mg/L 进行试验。胚性细胞复合体在此组合的培养基上培养 15 d 后开始呈现出明显的发育状态, 由淡黄色逐渐转为浅绿色, 继而转为鲜绿色(图 1, b), 继续培养至 30 d 后, 绿色芽锥出现(图 1, c), 通过电镜观察确定, 绿色芽锥胚性细胞复合体球形胚发育产生的盾形胚和早期子叶胚, 说明体胚开始转向植株萌发阶段。统计萌发率为 96%, 在估计区间范围内, 且比所有试验  $Y$  值都大。因此, 水芋体细胞胚发育及形成完整植株的最佳培养基为: LS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + IAA 1.0 mg/L。

植株再生可将胚性愈伤组织表面产生的鱼雷状突起剥离下来, 再转接到培养基: LS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + IAA 1.0 mg/L 中继续培养 25 d, 体胚全部发育成完整的植株(图 1, c, d)。通过电镜观察证实了植株的再生(图 2, e, f; 图 3, d, e)。

### 2.3 扫描电镜观察

由扫描电镜下可以观察到含胚性细胞复合体的胚性愈伤组织表面致密(图 2, a), 而胚性细胞复合体形成后呈颗粒状类圆形半埋于愈伤组织中(图 2, b), 其表面光滑(图 2, c)。胚性细胞复合体中的单一细胞继续发育形成球状突起并浮在胚性细胞复合体表面, 这些突起是体细胞胚发育过程形成的球形胚(图 2, c; 图 3, a), 随着培养时间的延长, 体细胞胚会经过球形胚(图 3, a)、盾形胚(图 3, b)、子叶胚(图 3, c, d, e)等发育阶段, 最终萌发成完整植株。另外, 还可观察到: 在很小块胚性细胞复合体上有不同阶段体胚发生和发育(图 2, e), 同一阶段的体胚密集成一簇发育(图 3, d)。每个体细胞胚的发育具有独立性, 每个体细胞胚最终都能独立发育成完整的植株。

### 3 讨论

植物离体培养的外部条件影响着体胚的发生和发育。该试验对影响体胚发生过程的植物生长调节剂因素进行了研究。关于体胚诱导的外植体因素, 在其他植物上已有较多研究, 大多数植物只有处于一定发育阶段的某些器官的外植体才易于诱导形成胚性细胞复合体<sup>[9]</sup>。该研究结果表明, 水芋叶片较适宜胚性愈伤组织及胚性细胞复合体诱导。体胚发生不同阶段所需植物生长调节剂种类和浓度存在差异, 较高浓度的 2, 4-D 和一定浓度的 6-BA 在水芋胚性愈伤组织诱导阶段是必需的, 但添加过高浓度的 2, 4-D 会导致外植体迅速黄化, 不能形成胚性愈伤组织。可能是高浓度 2, 4-D 会诱导外植体生成乙烯等气体, 加速外植体的衰老。添加 6-BA 有利于外植体保持较高的活性, 不添加 6-BA, 外植体会逐渐黄化而失去脱分化能力。体胚发生过程的扫描电镜观察表明, 水芋体细胞胚胎发生过程具有和合子胚发生相似的阶段, 胚性愈伤组织及胚性细胞复合体形成后, 继续发育经历球形胚、盾形胚、子叶胚等发育阶段。研究中发现球形胚形成后与其周围组织之间产生了结构上的隔离, 这正是体细胞胚胎发生的先决条件。球形胚形成后, 两极同时发育, 呈现明显的两极性; 且每个体细胞胚最终都能萌发成完整的植株, 具有相对的独立性。这两个特征是区分器官发生和体胚发生的标志。水芋体胚发生的形态学及组织结构和超微结构观察表明, 该研究初步建立了相对稳定的水芋体细胞胚胎发生体系, 为进一步完善体胚发生调控体系和阐明体胚发生发育机理提供了基础。

### 参考文献

- [1] 周麟. 长白山区野生珍稀濒危药用植物资源评价体系的初步研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 599-605.
- [2] Adelheid R, Kuehnle N, Nellie S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum*[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(9): 438-442.
- [3] Hamidah M, Karim A G A, Debergh P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1997, 48(3): 189-193.
- [4] Alramaneh E, Siskandarajah S, Serek M. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *schlumbergera truncata*[J]. Plant Cell Tiss Org, Cult, 2006, 84: 333-342.
- [5] Iantcheva A, Vlahova M, Bakalova E, et al. Regeneration of diploid annual medics via direct somatic embryogenesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine[J]. Plant Cell Rep, 1999(18): 904-910.
- [6] Reinert J. Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewebekulturen aus Karotten[J]. Naturwissenschaften, 1958, 45: 344-345.
- [7] Nohohay J S, Mariath E A, Winge H. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare* vulgate Poaceae[J]. Plant Cell Rep, 1999(18): 929-934.
- [8] 方开泰. 均匀设计—数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363-372.
- [9] 王清连, 王敏, 师海荣. 植物生长调节剂对棉花体细胞胚胎发生的诱导及调节作用[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(6): 577-579.

[ 10] 袁澍, 贾勇炯, 林宏辉. 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素[ J] . 植物生理学通讯, 2003, 39( 5): 508- 512

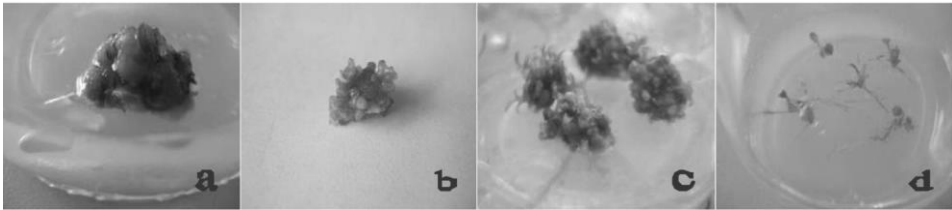


图1 水芋体细胞胚诱导及发生发育各阶段的形态结构

Fig.1 Morphostructure of inducing and developing somatic embryogenesis in various stages of *Calla palustris* L.  
注. a. 胚性愈伤组织; b. 含有球形胚的胚性细胞复合体; c. 体细胞胚萌发; d. 体细胞胚萌发后发育为完整植株

Note: a. embryonic Callus; b. Embryonic cell complex wth Globular embryo; c. Somatic cell embryo germination; d. Somatic embryos developing a complete plant after germination.

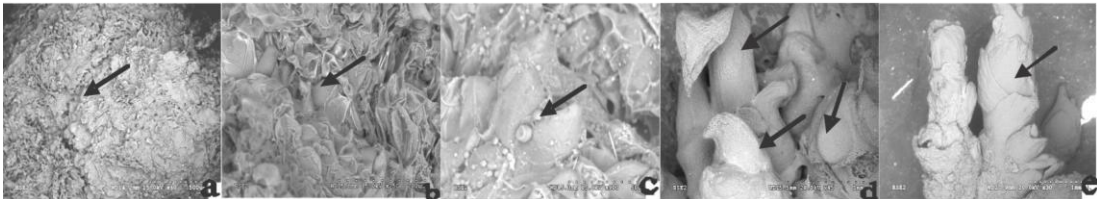


图2 水芋体细胞胚诱发及发育各阶段组织结构扫描电镜观察

Fig. 2 Showing scanning electron microscopical observation of induction and development of *Calla palustris* L. Somatic embryo in different stages  
注. a. 含胚性细胞复合体的胚性愈伤组织(× 60); b. 胚性细胞复合体(× 250); c. 含球形胚的胚性细胞复合体(× 900); d. 含不同发育阶段体胚的胚性细胞复合体(× 45); e. 再生植株 (× 30).  
Note: a. embryonic Callus with embryonic cells complex (× 60); b. Embryonic cell complex(× 250); c. Embryonic cell complex with Globular embryo (× 900); d. Embryonic cell complex with embryo in different stages(× 45); e. Regeneration plants (× 30).

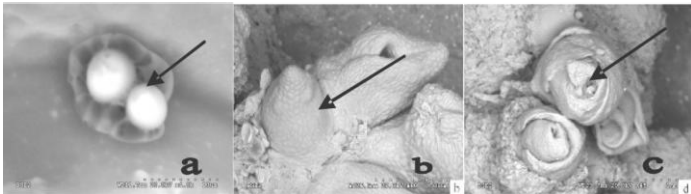


图3 水芋体细胞胚发育各阶段的扫描电镜观察

Fig.3 Showing a scanning electron microscopical observation of development of *Calla palustris* L. Somatic embryo in different stages  
注. a. 球形胚(× 4. 0k); b. 盾形胚(× 80); c. 子叶胚(× 45).  
Note: a. Globular embryo(× 4. 0k); b. Scutellate embryo(× 80); c. Cotyledonary embryo (× 45).

Establishment of *in vitro* Somatic Embryogenesis and Plant  
Regeneration System of *Calla palustris* L.

LIU Xiu-yan<sup>1,2</sup>, GU Di-zhou<sup>2</sup>, ZHU Jun-yi<sup>2</sup>, LIANG Yu<sup>1,2</sup>

(1. Forestry College, Beihua University, Jilin, Jilin 132013, China; 2. Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002, China)

**Abstract:** Young leaves of *Calla palustris* L. were used as explants in this experiment. Uniform Design for the most suitable media for Embryogenic callus induction and Embryogenic cell complex, Development of Somatic embryo and plant regeneration were screened. *in vitro* plants has been successfully developed. The results showed that LS+6-BA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+2,4-D 0.2 mg · L<sup>-1</sup> was fit for Embryogenic callus and Embryogenic cell complex induction, Percentage was 98.5%; the medium of Development of Somatic embryo and plant regeneration was LS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+IAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>, Percentage was 96%, and converted into plantlets with shoots and roots after 25 days culture on the same medium. The observation of and ultrastructure proved the process of somatic embryogenesis of *Calla palustris* L.  
**Key words:** *Calla palustris* L.; Uniform Design; Embryogenic cell complex; Somatic embryo; Plant regeneration