

白鹤芋胚性细胞悬浮培养和高效植株再生体系的建立

于波, 刘金梅, 刘晓荣, 刘小飞, 廖飞雄*

(广东省农业科学院环境园艺研究所, 广东省园林花卉种质创新综合利用重点实验室, 广州 510640)

摘要: 以白鹤芋 (*Spathiphyllum cannifolium*) 试管苗叶柄为外植体诱导获得胚性愈伤组织, 建立了胚性细胞悬浮培养系并高频率再生出植株。结果表明, 最优的悬浮培养条件为: 装有 20 mL 液体培养基的 100 mL 三角瓶中接种 0.3 g 胚性细胞团, 悬浮培养基为 MS + 0.5 mg · L⁻¹ TDZ + 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 30 g · L⁻¹ 蔗糖或麦芽糖, pH 5.8; 继代间隔 14 d; 每个继代周期, 胚性细胞团可增殖至接种量的 5 倍以上; 植株再生最优的分化培养基为 1/2MS + 0.3 mg · L⁻¹ 6-BA + 30 g · L⁻¹ 蔗糖 + 8.0 g · L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8, 平均每个胚性细胞团可分化再生出 25.1 株小植株; 胚性细胞的快速增殖和高频率植株再生的状态可保持 24 周。

关键词: 天南星科; 白鹤芋; 胚性愈伤组织; 液体培养; 再生

中图分类号: S 682.36

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 04-0721-10

An Efficient System of Embryogenic Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in *Spathiphyllum cannifolium*

YU Bo, LIU Jin-mei, LIU Xiao-rong, LIU Xiao-fei, and LIAO Fei-xiong*

(Environmental Horticulture Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Key Lab of Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This study established embryogenic cell suspension cultures of *Spathiphyllum cannifolium* through embryogenic calli induced from the petioles of plantlets *in vitro*, and further achieved high frequency of plant regeneration using the obtained suspension cultures. The results suggested that the optimal conditions of embryogenic cell suspension culture included: Inoculum amount was 0.3 g of embryogenic cell aggregates loaded with 20 mL fluid nutrient medium; Suspension culture medium was MS medium supplemented with 0.5 mg · L⁻¹ N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (TDZ), 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and 30 g · L⁻¹ sucrose or maltose (pH 5.8); Subculture interval was 14 days. Under these circumstances, the proliferation rate of embryogenic cell aggregates was 5-fold per subculture cycle. For plant regeneration, moreover, 25.1 plantlets in average developed (or generated) from each embryogenic cell aggregate on the optimal differential medium of 1/2MS + 0.3 mg · L⁻¹ 6-BA + 30 g · L⁻¹ sucrose + 8.0 g · L⁻¹ agar (pH 5.8). The status of rapid proliferation of embryogenic cells and

收稿日期: 2014-12-03; 修回日期: 2015-03-24

基金项目: 广东省国际合作项目 (2010B050600011, 2011B050500010)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fxliao@msn.com)

efficient regeneration of plantlets could maintain 24 weeks.

Key words: Araceae; *Spathiphyllum cannifolium*; embryogenic calli; submerged culture; regeneration

白鹤芋属 (*Spathiphyllum* Schott) 为天南星科 (Araceae) 植物家族, 原产热带美洲, 其中许多种或杂交种是重要热带花卉 (Bunting, 1960)。其叶色深绿, 花色洁白, 且耐阴性强, 深受人们欢迎而被广泛种植 (Chen et al., 2005; Dewir et al., 2006a)。

白鹤芋组织培养研究始于 20 世纪 70 年代末 (Fonnesbech & Fonnesbech, 1979), 主要是利用芽外植体获得丛生芽, 丛生芽增殖后生根培养并获得大量植株, 其主要目的是为满足育种和生产的需要 (Fonnesbech & Fonnesbech, 1979; 马国华 等, 1993; 曾宋君 等, 1996; 朱根发 等, 1997; 陈碧华 等, 1999; 丁运华和魏礼文, 1999; Ramirez-Malagon et al., 2001; 朱根发, 2003; Dewir et al., 2006b; Teixeira et al., 2006)。体细胞胚发生并再生植株是白鹤芋组织培养重要途径, 可通过幼嫩花器官诱导体细胞胚并再生植株 (曹静 等, 1995; Werbrouck et al., 2000; 秦静远, 2005)。由花器官上雌核诱导获得的体细胞胚被用于纯合体的培育 (Eeckhaut et al., 2001), 由花丝诱导获得的体细胞胚被用于多倍体育种 (Eeckhaut et al., 2004; Vanstechelman et al., 2010) 和原生质体分离 (Duquenne et al., 2007)。Zhao 等 (2012) 利用叶片和叶柄诱导出体细胞胚并成功再生植株。

目前国内外还未见白鹤芋胚性细胞悬浮培养和植株再生的报道。本研究的目的旨在建立白鹤芋胚性细胞悬浮培养系, 利用其增殖迅速、植株再生频率高和植株发育同步等优点, 建立高效植株再生体系, 以期对白鹤芋细胞工程和基因工程研究提供良好技术支持。

1 材料与方法

1.1 胚性愈伤组织诱导

2012 年 6 月在广东省园林花卉种质创新综合利用重点实验室进行本试验, 供试材料为长期继代保存的白鹤芋 (*S. cannifolium*) 试管苗。

胚性愈伤组织诱导培养基成分参考 Zhao 等 (2012) 的并略作调整: MS + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 附加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8, 灭菌后分装到直径 9 cm 的培养皿中。将试管苗叶柄切成 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}$ 片段, 接种培养基上, $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 暗培养 6 ~ 12 周。接种 250 块, 统计愈伤组织诱导率。

1.2 胚性细胞悬浮培养

将叶柄诱导获得的胚性愈伤组织破碎, 用金属网筛成直径小于 2 mm 的细胞团, 转入盛有 20 mL 培养液的 100 mL 三角瓶, $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 散射光, $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 悬浮培养。培养基: MS + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8。

胚性细胞团接种量设置为: 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 g, 每隔 2 d 称鲜样质量, 根据增长情况确定适宜接种量与继代周期。以 MS + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基础培养基, 添加蔗糖或麦芽糖, 浓度均设置为: 15、30、45 和 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 悬浮培养 14 d 后, 称质量。

以 MS + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基础培养基, 添加 TDZ (0 、 0.25 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 2,4-D (0 、 1.0 、 2.0 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组合, 悬浮培养 14 d 后, 称质量; 悬浮继代 8、12、16、20、24、28 和 32 周后称质量; 比较不同碳源、不同生长调节剂组合及继代时间 (代数) 对胚性细胞团增殖的影响。

增长量测量: 悬浮液转入 50 mL 离心管, 离心 5 min ($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 吸净上清液, 称质量; 鲜样质量 (g) = 离心后离心管质量 - 离心管质量; 鲜样质量增长量 (g) = 离心后鲜样质量 - 接种量。以上每个处理各接种 3 瓶。

1.3 植株再生

将悬浮培养 8 周后获得的直径大于 2 mm 的胚性细胞团转移至分化培养基, 温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 $54\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期 12 h/12 h。

设置 4 种基本培养基浓度(培养基中大量元素无机盐即 NH_4NO_3 、 KNO_3 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和 CaCl_2 浓度): 1/4MS、1/2MS、3/4MS 和 MS, 附加蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $8.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8。6 周后, 根据植株再生效率确定适宜培养基。然后培养基中添加脱落酸 (ABA) 或 6-BA, 浓度均设置为: 0 (对照)、0.1、0.3 和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 6 周后比较生长调节剂对植株再生的影响。将悬浮继代培养 8、12、16、20、24、28 和 32 周后的胚性细胞团进行分化培养, 比较继代时间 (代数) 对植株再生的影响。每个处理接种细胞团 50 个。

1.4 统计分析

各试验处理均设置 3 次重复。使用 SAS V8.02 软件进行数据分析。采用 Duncan's 多重比较法进行差异显著性测验。

1.5 组织切片及显微观察

将各时期组织材料浸泡在 FAA 固定液 (70% 乙醇: 甲醛: 冰醋酸 = 85: 10: 5) 中, 制片过程参照帅焕丽等 (2011) 的方法并略有改动: 经 70%、85%、95% 和 100% 乙醇脱水 (每种乙醇脱水 20 min, 其中 100% 乙醇脱水分为两次, 每次 10 min)、浸蜡 (石蜡熔点 $58\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 浸蜡温度 $62\text{ }^{\circ}\text{C}$) 4 h、包埋、切片 ($15\text{ }\mu\text{m}$)、粘片、展片 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 h)、TO 透明剂脱蜡 (2 min); 然后 95% 乙醇浸泡 1 min, 用蕃红和固绿二重染色; 再经 100% 乙醇脱水 (2 min)、TO 透明剂浸泡 2 min、中性树脂封片和烘干 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 周) 做成永久制片。

活体显微观察采用 ZEISS 体视显微镜 (SteREO Lumar.V12, 德国); 组织切片观察采用 ZEISS 正置显微镜 (Axio Scope A1, 德国)。使用 AxioVision 软件进行图像捕捉和保存。

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导

白鹤芋叶柄外植体接种到诱导培养基 6 周后, 由伤口处 (图 1, A) 和叶柄表面 (图 1, B) 长出圆球形颗粒状的浅黄色胚性愈伤组织, 诱导率达 96.4%。

2.2 接种量对胚性细胞团增殖的影响

将获得的胚性细胞团接种到液体悬浮培养基 2 周后, 胚性细胞团的数量和体积均明显增加, 其直径 $1\sim 3\text{ mm}$, 生长旺盛, 呈浅黄色颗粒状 (图 1, C)。

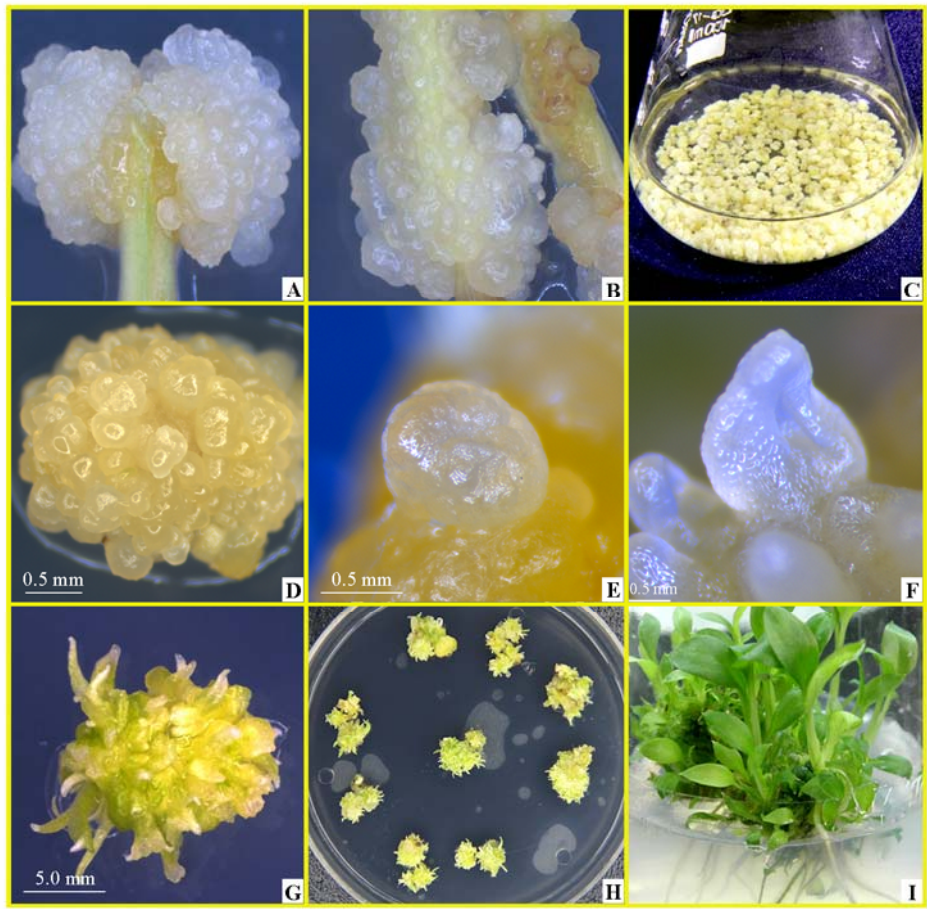


图 1 白鹤芋胚性愈伤组织的诱导和植株再生

A: 伤口处诱导获得的胚性愈伤组织; B: 叶柄表面诱导获得的胚性愈伤组织; C: 胚性细胞团; D: 球形胚; E: 梨形胚; F: 子叶形胚; G 和 H: 子叶形胚进一步发育变绿; I: 形成完整植株。

Fig. 1 Embryonic calli induction and plant regeneration in *Spathiphyllum cannifolium*

A: Embryogenic calli induced from the wound of petiole; B: Embryogenic calli formed on the surface; C: Embryogenic cell aggregates; D: Spherical embryos; E: Pear-shaped embryos; F: Cotyledonary embryos; G and H: Cotyledonary embryos turned green; I: Integral plantlets formed.

由图 2 可以看出，悬浮培养 0 ~ 6 d，处于伤口愈合和状态恢复时期，鲜样质量增长较慢，6 d 后增殖速率增大，12 ~ 18 d，细胞增殖速率变慢。不同初始接种量增殖效果不同，接种量为 0.1 g，培养基养分充足，增长倍数最大，达初始接种量的 7 倍，但鲜样质量增长总量最小，只有 0.6 g；接种量为 0.3 g 时，胚性细胞团鲜样质量增长量最高，达 1.06 g，增长倍数为初始的 4.5 倍；当接种量为大于 0.3 g 时，鲜样质量增长量则开始下降，当接种量为 0.9 g 时，胚性细胞团鲜样质量增长量降为 0.72 g。可见

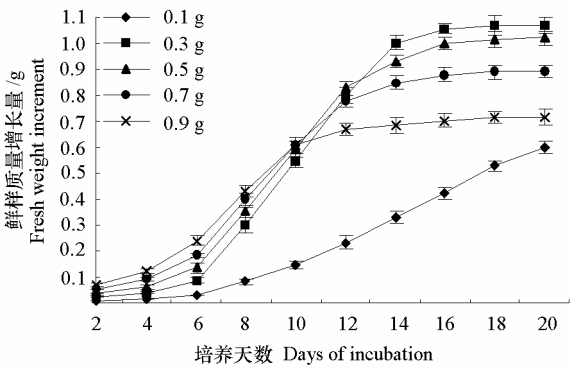


图 2 接种量对胚性细胞团增殖的影响

Fig. 2 Effect of inoculum size on propagation of embryogenic cell aggregates

接种量以 0.3 g 为宜。

由生长曲线可以看出, 接种量为 0.3 g 时, 悬浮培养 14 d 时, 增殖速率开始变缓, 此后, 细胞团鲜样质量增长量变化不大, 仅有 0.07 g, 因此, 继代间隔以 14 d 为宜。

2.3 碳源对胚性细胞团增殖的影响

由图 3 所示, 当培养基中不含任何碳源时, 细胞生长缓慢, 鲜样质量只增长了 0.18 g; 添加蔗糖和麦芽糖后, 胚性细胞团鲜样质量均有显著增长; 添加 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖或麦芽糖时, 胚性细胞团增长量均达到 0.83 g 以上; 添加 30 g 蔗糖或麦芽糖时, 胚性细胞团鲜样质量增长最多, 且两种碳源对胚性细胞团增长量的影响没有明显差别; 随着蔗糖或麦芽糖浓度进一步增加, 胚性细胞团增长量则开始显著下降; 添加 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖时, 胚性细胞团增长量降至 0.61 g; 添加 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖时, 胚性细胞团增长量降至 0.67 g。

由以上结果可以看出, 培养基中添加蔗糖或麦芽糖以 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。二者均可使胚性细胞团增殖达到最佳效果。

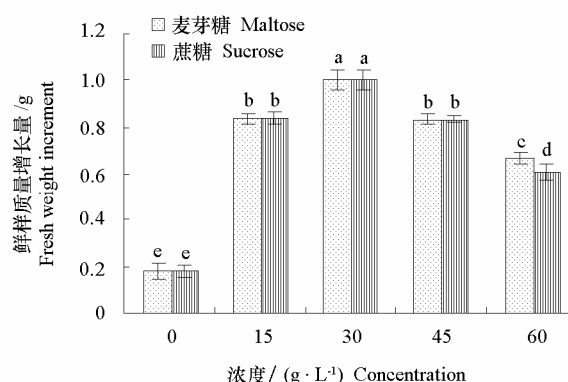


图 3 麦芽糖和蔗糖浓度对胚性细胞团鲜样质量增长量的影响

不同字母表示不同试验处理条件下的显著性测验 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Influence of maltose and sucrose concentrations on fresh weight increment of embryogenic cell aggregates

Different lowercases mean significant difference at 5% level.

2.4 2,4-D 和 TDZ 对胚性细胞团增殖的影响

由图 4 可看出, 当 TDZ 浓度一定时, 2,4-D 对胚性细胞团增长量的影响十分明显, 2,4-D 为 0 时, 胚性细胞团增长量最小; 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性细胞团增长量最大; 随着浓度继续升高, 增长量减小, 为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增长量降至 0.35 g。

当 2,4-D 浓度一定时, TDZ 对胚性细胞团增长量的影响也十分明显, 2,4-D 为 0 时, TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞团增长量较多; 当 2,4-D 为 $1.0 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 则是 TDZ $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胚性细胞团增长量均较大。

总体来看, 当培养基中含有 $2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TDZ } 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性细胞团增长量最大。

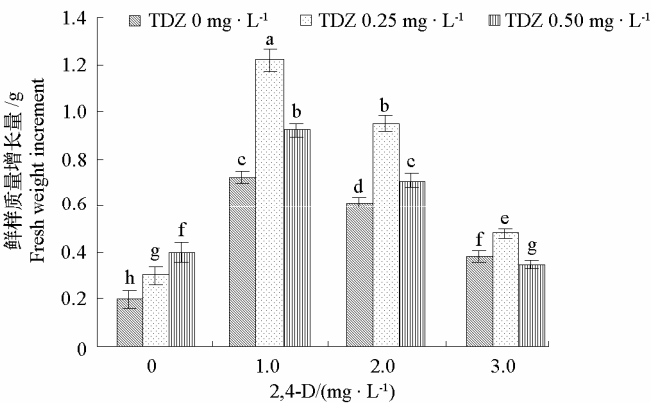


图 4 两种生长调节剂对胚性细胞团增殖的影响

不同字母表示不同试验处理条件下的显著性测验 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Influence of two growth regulators on propagation of embryogenic cell aggregates
Different lowercases mean significant difference at 5% level.

2.5 连续继代培养时间对胚性细胞团增殖的影响

由图 5 可以看出, 连续悬浮培养至 24 周 (继代了 11 次), 胚性细胞团一直保持良好的增殖效率, 增长量均在 1.22 g 以上, 即接种量的 5 倍以上。悬浮继代培养时间达 28 周时, 胚性细胞团增殖效率明显下降, 细胞团增长量降至 0.75 g, 悬浮培养至 32 周时增长量降至 0.15 g。

2.6 体细胞胚分化和植株再生

将胚性细胞团转移至分化培养基上培养。通过体视显微镜观察可以看到, 胚性细胞在分化成体细胞胚过程中, 依次经过球形胚 (图 1, D)、梨形胚 (图 1, E)、盾形胚 (子叶型胚, 图 1, F, G)。

组织切片更细微地观察了这一过程, 在胚性细胞团阶段, 细胞排列比较规则, 具有细胞小、形状规则、细胞核大、排列密集等明显的胚性细胞特征 (图 6, A), 分化培养过程中, 体细胞胚形成经历了早期的圆球形胚 (图 6, B)、独立的圆球形胚 (图 8, C) 和进一步发育形成具有胚芽鞘、胚芽生长点及胚根生长点的完整子叶型胚 (图 6, D) 阶段。

分化培养 4 ~ 6 周后, 体细胞胚陆续萌发出叶片和根, 由于体细胞胚密集, 众多小植株呈丛生状 (图 1, I)。

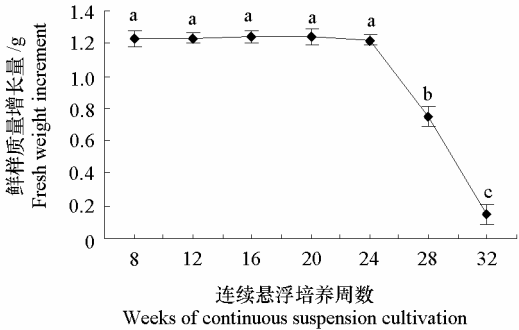


图 5 连续继代培养时间对胚性细胞团增殖的影响

Fig. 5 Effect of continuous suspension cultivation time on propagation of embryogenic cell aggregates

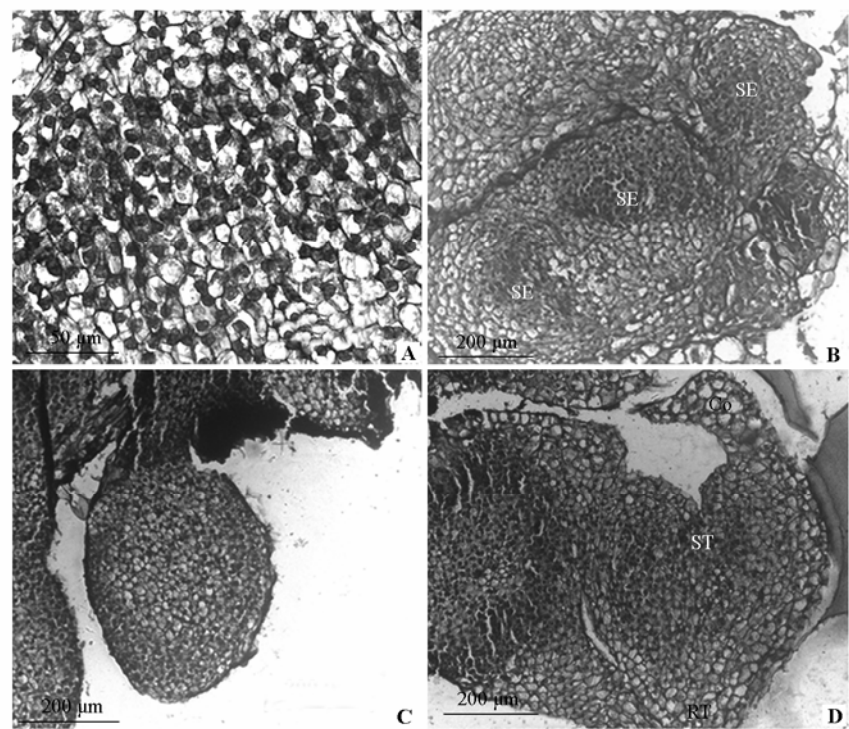


图 6 胚性细胞和体细胞胚发育的组织切片观察

A: 胚性细胞; B: 多个圆球形胚; C: 独立的圆球形胚; D: 完整子叶形胚。
SE. 圆球形胚; Co. 胚芽鞘; ST. 胚芽生长点; RT. 胚根生长点。

Fig. 6 Observation on histologic section of developing embryogenic cells and somatic embryos

A: Embryogenic cells; B: Multi-spherical embryos; C: Independent spherical embryos; D: Integral cotyledonary embryos.
SE. Multi-spherical embryo; Co. Coleoptile; ST. Shoot tip; RT. Root tip.

2.7 基本培养基浓度对植株再生的影响

由图 7 可以看出, 基本培养基的浓度对植株再生效率具有显著的影响, 胚性细胞团在 1/4MS 培养基上分化培养, 平均每个细胞团可以再生出 12.7 株小植株; 当培养基浓度增至 1/2MS 时, 平均每个细胞团再生植株数最多, 达 16.7 株; 随着培养基浓度增加, 植株再生效率逐渐下降, 当培养基浓度增至 MS 时, 平均每个细胞团再生植株数最少, 只有 9.7 株。

2.8 6-BA 和 ABA 对植株再生的影响

由图 8 可看出, 分化培养基中 6-BA 浓度在 0.1 ~ 0.5 mg · L⁻¹ 范围内, 植株再生效率均显著提高; 浓度为 0.3 mg · L⁻¹ 时植株再生效率最高, 平均每个细胞团再生植株数达 25.1 株。

相反, 分化培养基添加 0.1 ~ 0.5 mg · L⁻¹ ABA 后, 胚性细胞团的植株再生效率显著降低, 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时, 平均每个胚性细胞团再生植株数最少, 只有 3.2 株, 说明 ABA 对体细胞胚发生具有抑制作用。

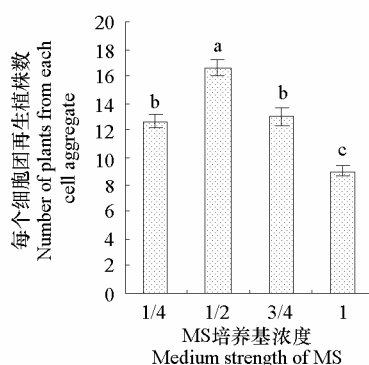


图7 培养基强度对植株再生的影响

Fig. 7 Influence of medium strength on plant regeneration

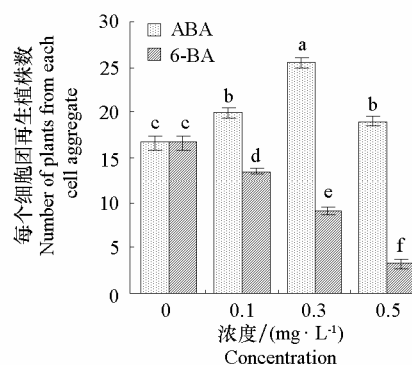


图8 6-BA 和 ABA 对植株再生的影响

Fig. 8 Influence of 6-BA and ABA on plant regeneration

2.9 连续悬浮继代培养时间对植株再生的影响

由图9可以看出,连续悬浮培养至24周,胚性细胞团一直保持良好的再生效率,平均每个胚性细胞团再生植株数均在25.1株以上。

随着细胞团增殖速率的降低,胚性细胞团植株再生效率明显下降,当悬浮继代培养时间达28周时,平均每个胚性细胞团再生植株数降至10.0株;悬浮培养至32周时,则降至1.2株。

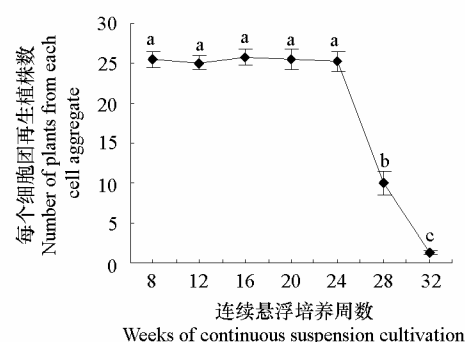


图9 连续悬浮继代培养时间对植株再生的影响

Fig. 9 Effect of continuous suspension cultivation time on plant regeneration

3 讨论

在天南星科其他物种中,如 *Alocasia micholitziana*, 诱导出的愈伤组织能够有效再生植株,但经过观察,发现其是通过器官发生途径获得植株再生 (Thao et al., 2003)。本研究中,通过组织切片观察,发现获得的大量细胞团中的细胞具有胚性细胞的一般形态特点;在其后的植株再生过程中进一步观察到单子叶植物体细胞胚发生过程和典型阶段,从而证实了该体系为体细胞胚发生途径植株再生体系。

胚性悬浮培养系的增殖速率与初始细胞接种量密切相关,接种量过低或过高均不利于胚性细胞生长和增殖 (Kim et al., 2005)。本研究中,接种量低于0.3 g时,由于起始细胞数量太少,限制了增长量;而接种量超过0.3 g时,可能由于胚性细胞团过多造成培养基养分不足或过多有害分泌物积累而限制了细胞的快速分裂与生长。

糖类在组培过程中不仅作为碳源,还是主要渗透调节剂 (王欣 等, 2014)。本研究中,蔗糖或麦芽糖的最佳浓度均为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 尽管分解成单糖种类不同,但二者对细胞团增殖的影响没有显著差异。实践中,可根据具体情况选择使用。

一般认为,2,4-D 不仅能促进细胞生长,而且能够限制细胞进一步分化,使细胞长期维持脱分化状态 (Jheng et al., 2006);而 TDZ 则能有效促进体细胞胚的发生 (Liu et al., 2001)。本研究中,

尽管单独使用 $2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 就能维持胚性悬浮细胞稳定增殖, 但 $2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TDZ } 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合使用时, 细胞团增殖更快, 且仍然维持良好的脱分化状态。

连续悬浮继代培养 11 次 (24 周) 后, 胚性细胞团的增殖速率变慢, 肉眼可见细胞团出现部分畸形, 颜色变绿, 生长缓慢。这种现象可能是由于长时间悬浮培养的细胞逐渐非胚性化造成的。与细胞团增殖速率减慢相应的, 其植株再生效率也大幅降低。

在植株再生环节, 对分化培养基的浓度和生长调节剂进行优化, 最佳配方为: $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究中, ABA 在 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 明显降低了植株再生效率, 主要表现为细胞团变得深绿致密, 分化和生长缓慢。一般认为, 植株再生过程中 ABA 能够促进体细胞胚的成熟和萌发 (Jheng et al., 2006), 但也有研究结果恰恰相反, 认为 ABA 抑制体细胞胚发生 (Rohani et al., 2012)。本研究结果显然属于后一种, 可能其原有内源激素水平足以完成体细胞胚的分化, 而外源 ABA 却打破了内源激素的平衡, 反而成为一种严重环境胁迫, 阻碍体细胞胚的进一步发育。

References

- Bunting G S. 1960. A revision of *Spathiphyllum* (Araceae) - Mem. New York: Bot Gard: 10: 1 - 54.
- Cao Jing, Zhou Li-nong, Kuang Zhe-shi, Chen Jun-qiu, Ma Xue-jun. 1995. The somatic embryogenesis and plant regeneration in *Spathiphyllum floribundum*. Journal of Agricultural Biotechnology, 3 (3): 81 - 85. (in Chinese)
- 曹 静, 周丽依, 邝哲师, 陈俊秋, 马雪筠. 1995. 白鹤芋花序体细胞胚胎发生及植株再生的研究. 农业生物技术学报, 3 (3): 81 - 85.
- Chen Bi-hua, Yang Guo-hua, Yang Shao-wen. 1999. Tissue culture and rapid propagation of *Spathiphyllum palas*. Plant Physiology Communications, 35 (3): 208. (in Chinese)
- 陈碧华, 杨国华, 杨少文. 1999. 巴拉斯白鹤芋的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 35 (3): 208.
- Chen J, McConnell D B, Norman D J, Henny R J. 2005. The foliage plant industry//Janick J. Horticultural reviews. Hoboken, N J: Wiley: 31: 45 - 110.
- Dewir Y H, Chakrabarty D, Hahn E J, Paek K Y. 2006b. A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 42: 291 - 297.
- Dewir Y H, Hahn E J, Paek K Y. 2006a. In vitro flowering of *Spathiphyllum cannifolium*: Influences of gibberellic acid, culture type and sucrose concentration. Acta Horticulturae, 725: 107 - 116.
- Ding Yun-hua, Wei Li-wen. 1999. Tissue culture and propagation from petiole of *Spathiphyllum palls*. Acta Horticulturae Sinica, 26 (5): 345 - 346. (in Chinese)
- 丁运华, 魏礼文. 1999. 绿巨人叶柄的离体培养及其快速繁殖. 园艺学报, 26 (5): 345 - 346.
- Duquenne B, Eeckhaut T, Werbrouck S, Huylenbroeck J V. 2007. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 91: 165 - 173.
- Eeckhaut T, Werbrouck S, Dendaue J, van Bockstaele E, Debergh P. 2001. Induction of homozygous *Spathiphyllum wallisii* genotypes through gynogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 181 - 189.
- Eeckhaut T, Werbrouck S, Leus L, van Bockstaele E, Debergh P. 2004. Chemically induced polyploidization of *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78: 241 - 246.
- Fonnesbech M, Fonnesbech A. 1979. In vitro propagation of *Spathiphyllum*. Scientia Horticulturae, 10: 21 - 25.
- Jheng F Y, Do Y Y, Liauh Y W, Chung J P, Huang P L. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. Plant Science, 170: 1133 - 1140.
- Kim S W, In D S, Tea K H, Liu J R. 2005. Somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf and petiole explant cultures and cell suspension cultures of *Pinellia tripartite*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80: 267 - 270.
- Liu Q C, Zhai H, Wang Y, Zhang D P. 2001. Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweet potato. In Vitro Cellular &

- Developmental Biology-Plant, 37: 564 - 567.
- Ma Guo-hua, Zhu Xi-ru, Zhang Yun-kai, Huang Hong-shu. 1993. High speed propagation of *Spathiphyllum* shoots in liquid shake culture. Acta Horticulturae Sinica, 20 (3): 307 - 308. (in Chinese)
- 马国华, 朱西儒, 张云开, 黄鸿枢. 1993. 液体振荡培养高速繁殖白鹤芋丛芽. 园艺学报, 20 (3): 307 - 308.
- Qin Jing-yuan. 2005. Induction of somatic embryogenesis on the anther filament and rapid propagation of *Spathiphyllum cannifolium* L. Chinese Agricultural Science Bulletin, 21 (9): 67 - 69. (in Chinese)
- 秦静远. 2005. 白鹤芋花丝体细胞胚的诱导及快繁技术. 中国农学通报, 21 (9): 67 - 69.
- Ramirez-Malagon R, Borodanenko A, Barrera-Guerra J L, Ochoa-Alejo N. 2001. Shoot number and shoot size as affected by growth regulators in *in vitro* cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. Scientia Horticulturae, 89: 227 - 236.
- Rohani E R, Ismanizan I, Noor N M. 2012. Somatic embryogenesis of *Mangosteen*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 110: 251 - 259.
- Shuai Huan-li, Yang Tu-xi, Wei An-zhi, Wang Jia, Li Xiao, Zhang Ying. 2011. A modified technique of paraffin section for apricot flower buds. Journal of Fruit Science, 28 (3): 536 - 539. (in Chinese)
- 帅焕丽, 杨途熙, 魏安智, 王佳, 李晓, 张莹. 2011. 杏花芽石蜡切片方法的改良. 果树学报, 28 (3): 536 - 539.
- Teixeira da Silva J A, Giang D T T, Tanaka M. 2006. Novel photoautotrophic micropropagation of *Spathiphyllum*. Photosynthetica, 44: 53 - 61.
- Thao N T P, Ozaki Y, Okubo H. 2003. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 285 - 289.
- Vanstechelman I, Eeckhaut T, van Huylenbroeck J, van Labeke M. 2010. Histogenic analysis of chemically induced mixoploids in *Spathiphyllum wallisii*. Euphytica, 174: 61 - 72.
- Wang Xin, Yan Hui, Gu Xiang-hua, Ma Dai-fu, Li Qiang. 2014. Embryogenic suspension culture of Xushu 55-2. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 23 (1): 1 - 6. (in Chinese)
- 王欣, 闫会, 顾向华, 马代夫, 李强. 2014. 徐薯 55-2 的胚性细胞悬浮培养. 西北农学报, 23 (1): 1 - 6.
- Werbrouck S, Eeckhaut T, Debergh P. 2000. Induction and conversion of somatic embryogenesis on the anther filament of *Spathiphyllum* Schott. Acta Horticulturae, 520: 263 - 269.
- Zeng Song-jun, Zhang Jing-ling, Zhao Feng-pan, Guan Li. 1996. Tissue culture and rapid propagation of *Spathiphyllum floribundum*. Plant Physiology Communications, 33 (4): 274 - 275. (in Chinese)
- 曾宋君, 张京丽, 赵逢畔, 关丽. 1996. 绿巨人白鹤芋的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 33 (4): 274 - 275.
- Zhao J T, Cui J, Liu J X, Liao F X, Henny R J, Chen J J. 2012. Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Spathiphyllum* 'Supreme' and analysis of regenerants using flow cytometry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 110: 239 - 249.
- Zhu Gen-fa. 2003. Tissue culture and propagation of *Spathiphyllum*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 19 (3): 75 - 76, 88. (in Chinese)
- 朱根发. 2003. 白鹤芋属观赏植物的组织培养和快速繁殖技术研究. 中国农学通报, 19 (3): 75 - 76, 88.
- Zhu Gen-fa, Zhang Yuan-neng, Zou Chun-ping, Zhang Zhi-min, Luo Si-qiong. 1997. Tissue culture and rapid propagation of *Spathiphyllum* 'Xiangshui'. Plant Physiology Communications, 34 (10): 438. (in Chinese)
- 朱根发, 张远能, 邹春萍, 张志民, 罗思琼. 1997. 香水白掌的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 34 (10): 438.