

# 花烛体细胞胚胎发生及植株再生研究

辛伟杰<sup>1</sup> 徐彬<sup>1</sup> 王广东<sup>1\*</sup> 郭维明<sup>1</sup> 文方德<sup>2</sup> 金剑平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; <sup>2</sup>珠海市园艺研究所, 广东珠海 519070)

**摘要:** 以花烛 (*Anthurium andraeanum* Lind.) 盆花品种无菌苗叶片、叶柄、根段为外植体, 对花烛体细胞胚胎发生及植株再生进行了研究, 建立了花烛体细胞胚胎发生体系。结果表明, 花烛叶片较其他外植体更适宜体细胞胚的诱导; 胚性愈伤组织及胚性结构诱导最适培养基为改良 MS + 2, 4-D 2.0~3.0 mg · L<sup>-1</sup> + KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 蔗糖 2% + 葡萄糖 1%, pH 5.5, 暗培养 40 d, 诱导率可达 90.3%; 体胚发育适宜培养基为改良 MS + 6-BA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + 蔗糖 3%, 光强 20 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, 培养 20 d 后体胚萌发率达 62.9%; 萌发的体胚在发育培养基上继续培养 30 d 后均能发育成完整植株。对不同阶段培养材料的组织结构及超微结构的观察证明了花烛体胚发生过程。

**关键词:** 花烛; 体细胞胚; 诱导; 发育; 植株再生

**中图分类号:** S 682.1<sup>+</sup>4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 06-1281-06

## Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Anthurium andraeanum*

Xin Weijie<sup>1</sup>, Xu Bin<sup>1</sup>, Wang Guangdong<sup>1\*</sup>, Guo Weiming<sup>1</sup>, Wen Fangde<sup>2</sup>, and Jin Jianping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; <sup>2</sup>Zhuhai Institute of Horticulture, Zhuhai, Guangdong 519070, China)

**Abstract:** A protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum* Lind. in vitro plants has been successfully developed. Leaf sections, petioles and root sections were used as explants, the results showed that leaf sections were suitable explants and expressed higher embryogenic potential than others. Up to 90.3% of explants produced embryogenic calli and embryogenic structures after 40 days culture on modified MS medium supplemented with 2.0 to 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 2, 4-D, 0.5 mg · L<sup>-1</sup> KT, 2% sucrose and 1% glucose; 62.9% of somatic embryos developed after 20 days culture on modified MS medium containing 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA and 3% sucrose under light conditions of 20 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> and converted into plantlets with shoots and roots after 30 days culture on the same medium. The observation of histological structure and ultrastructure proved the process of somatic embryogenesis of *Anthurium*.

**Key words:** *Anthurium andraeanum*; Somatic embryo; Induction; Development; Plant regeneration

花烛 (*Anthurium andraeanum* Lind.) 又名红掌、安祖花。花烛繁殖最早主要利用实生繁殖和分株繁殖, 但存在种子不易获得, 繁殖速度缓慢等缺点。自 1974 年 Pierik 等<sup>[1]</sup>成功建立花烛离体培养技术以来, 利用组织培养技术进行花烛种苗生产已成为一种快速有效的繁殖方式<sup>[2-4]</sup>。目前花烛组培快繁主要是通过器官发生途径由外植体分化不定芽然后再生植株, 具有增殖系数高等优点, 但仍存在外植体诱导愈伤组织周期较长、获得无菌苗速度较慢、且无菌苗长期连续增殖极易发生退化和变异等缺点。而相对于器官发生过程, 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结构, 然后发育萌发为完整植株。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花烛转基因植株。

目前国内外关于花烛属植物体细胞胚胎发生研究的报道较少, 且仅限于体胚诱导技术的研究

收稿日期: 2006-01-16; 修回日期: 2006-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300244)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: gdwang@njau.edu.cn)

(花烛体胚诱导率最高仅为 47.7%<sup>[5]</sup>, 火鹤体胚诱导率最高为 73.0%<sup>[6]</sup>), 未对体胚发育进行相关研究。作者在前人报道的基础上, 进一步研究了花烛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组织结构及超微结构进行研究, 为深入了解花烛体胚发生的形态学及形态调控技术提供依据, 为提高种苗生产率、制作花烛人工种子和通过遗传转化获得转基因植株奠定基础。

## 1 材料与方法

选取花烛品种 ‘Sonate’ 无菌苗叶片、叶柄、根段为外植体。叶片保留中脉, 切割成 0.5 ~ 1.0 cm × 0.5 ~ 1.0 cm 方块, 叶柄长 0.5 ~ 1.0 cm, 根段长 0.5 ~ 1.0 cm, 接种于附加不同浓度植物生长调节剂的培养基上。胚性愈伤组织及胚性结构诱导培养基为附加不同浓度 2,4-D 和 KT 的改良 MS 培养基 (MS 大量元素减半, 微量元素、铁盐和有机成分同 MS), 添加蔗糖 2% 和葡萄糖 1%, 琼脂粉 0.6%, pH 值调至 5.5。设置了 2,4-D 和 KT 的不同浓度配比处理。将外植体接种于加有 30 mL 诱导培养基的培养皿中, 每个培养皿接种外植体 6 ~ 8 个, Parafilm 封口, 25 °C 培养箱中暗培养。形成胚性愈伤组织后, 转至含有不同浓度 6-BA 的发育培养基 (添加蔗糖 3%, 其余条件同上) 上, 光照强度 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光照时间 16 h, 25 °C 条件下培养。

体胚发生过程中根据体视显微镜初步观察的结果, 取不同阶段的培养材料制作石蜡切片进行组织结构观察。样品用 FAA 固定液固定 24 h 以上, 70% 乙醇冲洗, 经过一系列脱水、透明和渗蜡, 石蜡包埋, 进行常规石蜡切片。番红—固绿法染色, 中性树胶封固。Olympus BX41 光学显微镜下观察并拍照。同时, 对不同阶段的培养物进行扫描电镜观察: 采用常规处理程序, 4% 戊二醛固定 4 h, 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液清洗 3 次, 各 30 min; 乙醇系列脱水 2 次, 各 15 min; 无水乙醇与醋酸异戊酯以体积比 1:1、1:2 置换, 各 30 min。纯醋酸异戊酯置换 1 次, 30 min 临界点干燥 (CPD), 粘台, 离子溅射仪喷金, SEM-505 Philips 扫描电镜观察, 拍照。

体胚诱导阶段统计形成胚性愈伤组织和胚性结构的外植体数, 体胚发育阶段统计从球形胚逐渐转绿开始发育的体胚个数, 分别计算诱导率和萌发率。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚性愈伤组织及胚性结构诱导

2.1.1 不同外植体胚性愈伤组织及胚性结构诱导的差异 不同外植体接种于相同的诱导培养基 (改良 MS+2,4-D 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup>) 上, 叶片外植体胚性愈伤组织诱导率最高, 达 86.7%; 叶柄、根段外植体诱导率较低, 分别为 31.0%、21.3%, 表明叶片外植体较其他外植体更适宜胚性愈伤组织的诱导 (表 1)。叶片外植体接种于诱导培养基一周后由绿逐渐转黄, 培养 30 d 时叶片四周切伤处有隆起的愈伤组织形成, 呈淡黄色, 10 d 后部分愈伤组织表面逐渐形成颗粒状的小突起, 通过体视显微镜观察确定这些小突起是体胚发育的前期即球形胚 (图版 1, 4)。叶柄作为外植体接种于诱导培养基时, 接种 10 d 后叶柄两端开始膨大, 培养一段时间后只在叶柄切伤的两端形成少量的愈伤组织 (图版 2), 培养时间超过 40 d, 诱导率只有 31.0%, 且产生的体胚数远远少于由叶片诱导的体胚数; 而叶片和叶柄连接处的外植体伤口处能产生较多的胚性结构。根段接种于

表 1 花烛不同外植体胚性愈伤组织诱导率差异比较

Table 1 Comparison of induction percentage of embryogenic calli of different explants of *Anthurium andraeanum*

外植体 Explant	接种数 Inoculated	诱导数 Induced	诱导率 Percentage (%)	愈伤组织状态 Status of callus
叶片 Leaf	60	52	86.7	量大, 淡黄色, 形成颗粒状突起 Bigger, yellow, form protuberance like grain
叶柄 Petiole	60	20	31.0	量小, 米黄色, 团状, 颗粒状 Smaller, yellowish color, like grains
根段 Root section	136	29	21.3	量小, 米黄色, 球状 Smaller, yellowish color, globular

诱导培养基时，外植体呈水渍状，部分根段外植体变白，未形成胚性愈伤组织。

2.1.2 植物生长调节剂对叶片胚性愈伤组织诱导的影响 以叶片为外植体，比较不同浓度的 2,4-D 和 KT 对比对胚性愈伤组织诱导的影响，结果如表 2 所示。当 2,4-D 浓度为 2.0、3.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，KT 浓度为 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，诱导率较高，分别为 90.3% 和 87.2%。2,4-D 浓度为 2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，可形成较大球形胚，且大小一致，胚性结构呈单

个或多个簇拥出现；2,4-D 浓度为 1.0、4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，诱导形成的球形胚体积较小，且大小不一致；当 2,4-D 浓度超过 4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，培养 1 周后叶片开始黄化，最终未能形成胚性愈伤组织。

## 2.2 体胚发育及植株再生

诱导形成的胚性结构转入不含 2,4-D 而只含有低浓度细胞分裂素的培养基上培养，比较不同浓度的 6-BA 对体胚发育的影响，培养两周后的体胚发育状况如表 3 所示。当 6-BA 浓度为 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，体胚萌发率最高，可达 62.9%。过高浓度的 6-BA 抑制体胚发育。体胚在发育培养基上培养 10 d 后开始呈现明显的发育状态，由淡黄色逐渐转为浅绿色，继而转为翠绿色（图版 3）；培养 20 d 后伴随体胚的发育，红色芽点出现（图版 5），开始转向植株萌发阶段。

萌发的体胚在发育培养基上继续培养 30 d 后，几乎都能萌发成完整植株。从胚性愈伤组织及胚性结构诱导到体胚发育成完整小植株（图版 7），周期较长，需 3 个月，但繁殖系数较高。试验中 1 个叶片（0.5 ~ 1.0 cm  $\times$  0.5 ~ 1.0 cm）可以发育成上百个小植株（图版 6、7、8）。

表 3 6-BA 对花烛体胚发育及萌发的影响

Table 3 Effects of 6-BA on the development and germination of somatic embryos of *Anthurium andraeanum*

6-BA ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	接种数 Inoculated	萌发率 Germination percentage (%)	胚发育状况 Status of somatic embryos development
0	25	0	体胚只长根，不能正常萌发 Somatic embryos only with root, fail to germinate
0.2	37	11.5	少数体胚发育，由淡黄逐渐转绿 A few somatic embryos developed, color changed from yellow to green
0.5	44	62.9	大部分体胚发育正常，成熟胚逐渐转绿，萌发正常 Most somatic embryos developed normally, mature embryos turn to green
1.0	28	0	不萌发，由胚性转为非胚性组织 No development, changed from embryogenic callus into non-embryogenic
2.0	30	0	不萌发，由胚性转为非胚性组织 No development, changed from embryogenic callus into non-embryogenic

## 2.3 组织结构观察

叶片外植体在胚性愈伤组织诱导培养基上培养 30 d 后，叶片四周切伤处有隆起的愈伤组织形成，通过切片观察发现，叶片基部皮层的薄壁细胞恢复分裂能力，进行脱分化形成带状或团状的分生组织，并形成多个分生中心，分生中心的细胞排列紧密，比周围细胞小，细胞核明显（图版 1）；而未分化的细胞呈无规则状态。胚性愈伤组织在发育培养基上培养 10 d 后形成胚性细胞团，胚性细胞团继续分裂形成多细胞原胚（图版 2），其组织学特征是细胞质浓，细胞核较大，细胞排列紧密；随着多细胞原胚的细胞分裂，胚体逐渐增大为圆球形，即球形胚（图版 3）；进一步培养后，球形胚进行横向与纵向分裂形成盾形胚（图版 4）；盾形胚继续培养后，一端分化成芽原基，另一端分化出根原基，初步形成具两极分化的成熟胚。

## 2.4 扫描电镜观察

在扫描电镜下可以观察到诱导形成的胚性愈伤组织表面光滑，表面被有一层薄膜（图版 1）；愈伤组织形成后，表面的薄膜逐渐脱落，形成胚性细胞团（图版 2），胚性细胞团表面由多细胞

表 2 不同植物生长调节剂对花烛叶片胚性愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulators on embryonic

callus formation of <i>Anthurium andraeanum</i>				
浓度 Concentration	( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	接种数 Inoculated	诱导数 Induced	诱导率 Percentage (%)
2,4-D	KT			
1.0	0.5	60	18	30.0
2.0	0.5	62	56	90.3
3.0	0.5	39	34	87.2
4.0	0.5	59	31	55.9
5.0	0.5	40	0	0
6.0	0.5	50	0	0

构成, 胚性细胞团中单个细胞在适宜的培养基上继续发育形成球状突起, 这些突起是体细胞胚发育过程形成的球形胚 (图版 , 3); 随着培养时间的延长, 体细胞胚会经过球形胚、盾形胚、子叶胚 (图版 , 4) 等发育阶段, 最终萌发成完整植株。扫描电镜下观察到体细胞胚成簇分化和发育, 但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

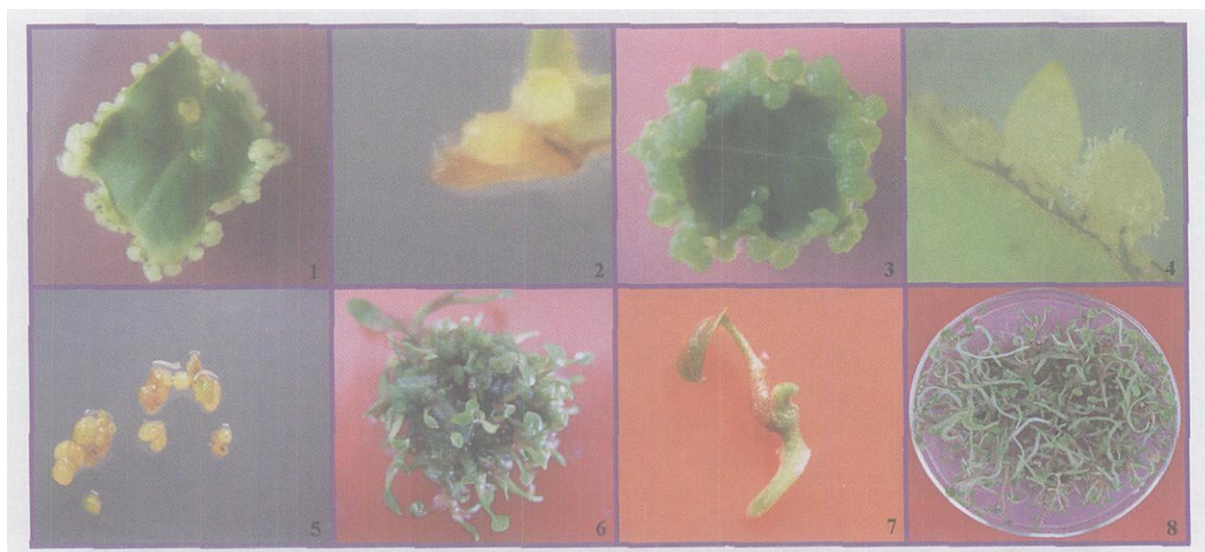
植物材料的内在因素和离体培养的外部条件都会影响体胚的发生和发育。本试验对影响体胚发生过程的外植体和植物生长调节剂因素进行了研究。关于体胚诱导的外植体因素, 在其他植物上已有较多研究, 大多数植物只有处于一定发育阶段的某些器官的外植体才易于诱导形成胚性结构。花烛体胚诱导仅有叶片作外植体的报道。本研究结果表明, 花烛叶片较适宜胚性愈伤组织及胚性结构诱导。火鹤体胚发生及植株再生中有部分类似结论<sup>[6]</sup>。

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。本研究结果表明, 较高浓度的 2,4-D 和一定浓度的 KT 在花烛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。原因可能是高浓度 2,4-D 会诱导外植体生成乙烯等气体, 加速外植体的衰老<sup>[7]</sup>。添加 KT 有利于外植体保持较高的活性, 不添加 KT, 外植体会逐渐黄化而失去脱分化能力。植物生长调节剂还影响体胚的发育进程, 体胚发育培养基中添加适当浓度的 6-BA, 一方面消除胚性愈伤组织中 2,4-D 的影响, 另一方面保持胚性愈伤组织的活性, 促使体胚进一步发育。这与在棉花体细胞胚胎发生研究中关于 2,4-D、KT 和 6-BA 作用的报道<sup>[8]</sup>一致。

体胚发生过程组织结构的观察表明, 花烛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结构形成后, 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。扫描电镜观察的结果进一步证明, 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。花烛体胚发生的形态学及组织结构和超微结构观察表明, 本研究初步建立了相对稳定的花烛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 Pierik R L M, Steegmans H H M, J A J van Der Meys. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. *Scientia Horticulture*, 1974, 2 (2): 193 ~ 198
- 2 Kuehnle A R, Sugii N. Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of *Hawaiian anthuriums*. *HortScience*, 1991, 26 (7): 919 ~ 921
- 3 岑益群, 蒋如敏, 邓志龙, 倪德祥. 安祖花离体增殖的形态发生与理化因子效应. *园艺学报*, 1993, 20 (2): 187 ~ 192  
Cen Y Q, Jiang R M, Deng Z L, Ni D X. In vitro propagation of *Anthurium andraeanum* morphogenesis and effects of physical and chemical factors. *Acta Horticulturae Sinica*, 1993, 20 (2): 187 ~ 192 (in Chinese)
- 4 赵云鹏, 郭维明, 王广东. 花烛不同愈伤组织解剖结构的观察. *园艺学报*, 2005, 32 (1): 60 ~ 64  
Zhao Y P, Guo W M, Wang G D. Observation on anatomic structure of eight kinds of calli in *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32 (1): 60 ~ 64 (in Chinese)
- 5 Adelheid R, Kuehnle, Chen F C, Nellie S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum*. *Plant Cell Reports*, 1992, 11 (9): 438 ~ 442
- 6 Hamidah M, Karim A G A, Debergh P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 1997, 48 (3): 189 ~ 193
- 7 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. *植物生理学通讯*, 2003, 39 (5): 508 ~ 512  
Yuan S, Jia Y J, Lin H H. Several physiological factors inducing somatic embryogenesis of plant. *Plant Physiology Communications*, 2003, 39 (5): 508 ~ 512 (in Chinese)
- 8 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. *生物技术通讯*, 2004, 15 (6): 577 ~ 579  
Wang Q L, Wang M, Shi H R. Plant growth regulators regulation on cotton somatic embryogenesis. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15 (6): 577 ~ 579 (in Chinese)

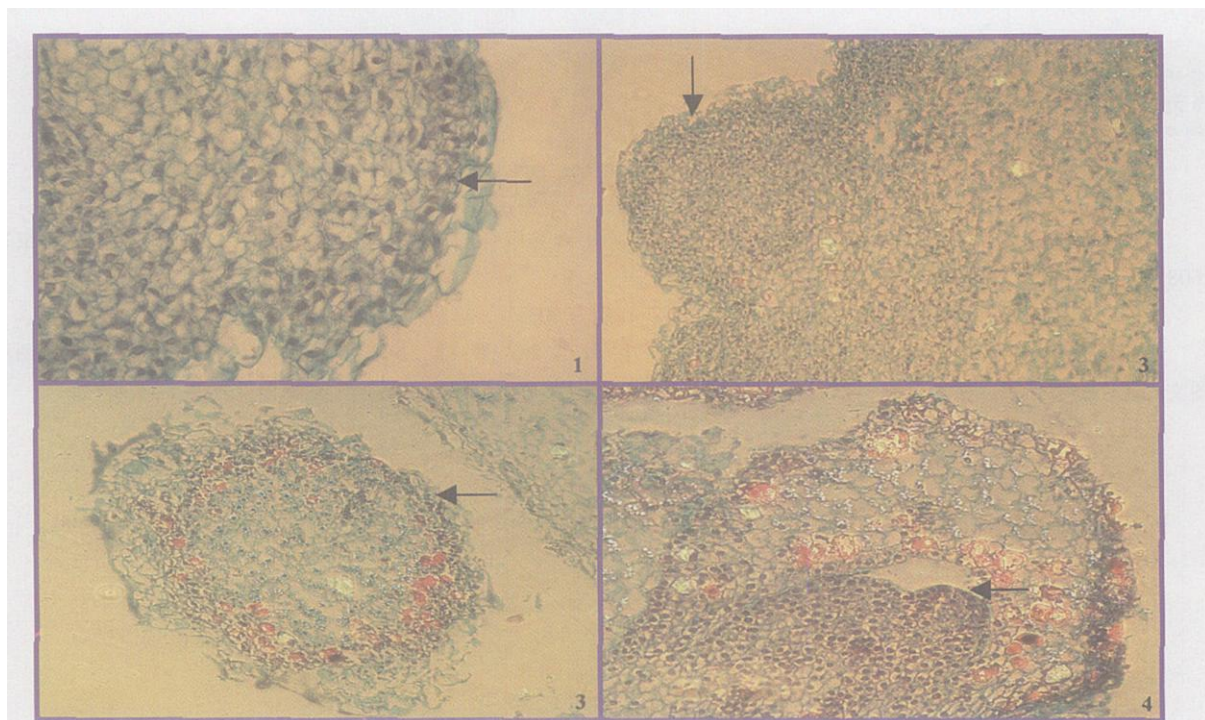


图版 说明：花烛体胚发生各阶段形态结构

1. 叶片外植体形成的胚性愈伤组织；2. 叶柄外植体形成的胚性愈伤组织；3. 叶片外植体形成的体胚发育；4. 体视显微镜下观察到的体胚（ $\times 20$ ）；5. 分离的胚性结构发育；6. 体胚萌发；7. 体胚形成的单个植株；8. 体胚萌发成完整植株。

**Explanation of plate** : Morphological structures of somatic embryogenesis during different stages in *Anthurium andraeanum*

1. Embryogenic callus induced from leaf explants; 2. Embryogenic callus induced from petiole explants; 3. Development of somatic embryos; 4. Microstructure of somatic embryo ( $\times 20$ ); 5. Development of separated somatic embryos from leaf explants; 6. Germination of somatic embryos; 7. Separated plantlet from somatic embryos; 8. Somatic embryos converted plantlets with shoots and roots



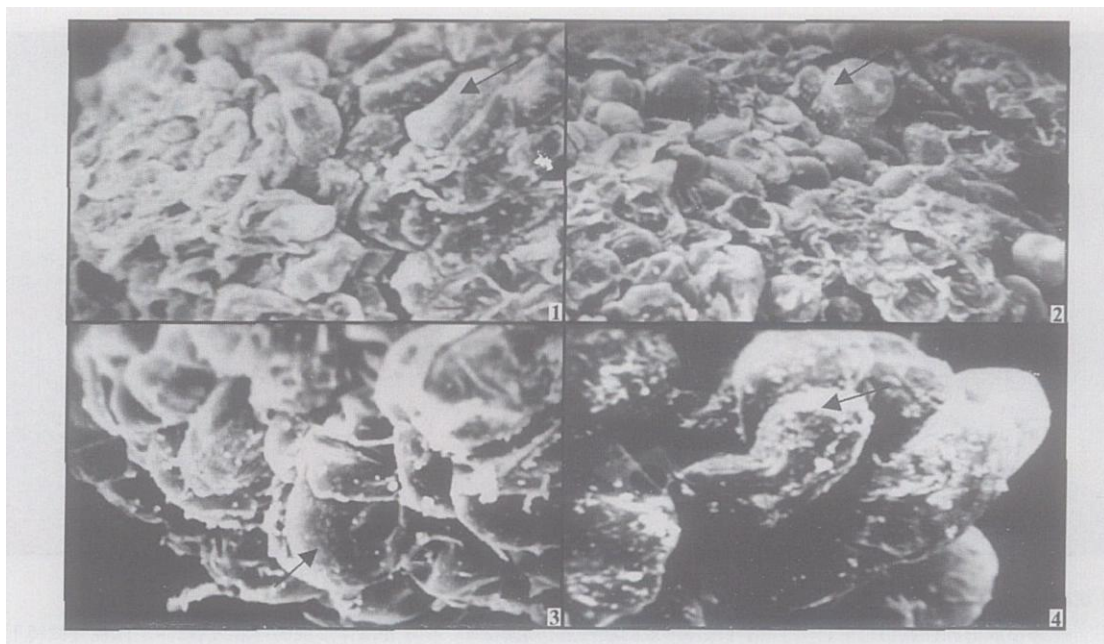
图版 说明：花烛体胚发生各阶段的组织结构

1. 胚性愈伤组织初期（ $\times 400$ ）；2. 原胚（ $\times 100$ ）；3. 球形胚（ $\times 100$ ）；4. 盾形胚（ $\times 100$ ）。

**Explanation of plate** : Histological structures of somatic embryogenesis during different stages in *Anthurium andraeanum*

1. Early embryogenic callus ( $\times 400$ ); 2. Proembryo ( $\times 100$ ); 3. Globular embryo ( $\times 100$ ); 4. Scutellate embryo ( $\times 100$ ).





图版 说明：花烛体细胞胚诱导及发育的扫描电镜观察

1. 胚性愈伤组织 (×150); 2. 胚性细胞团 (×207); 3. 球形胚 (×573); 4. 子叶胚 (×1150)。

Explanation of plate : Scanning observation on induction and development of somatic embryos of Anthurium andraeanum

1. Embryogenic calli (×150); 2. Embryogenic cell group (×207); 3. Globular embryo (×573); 4. Cotyledonary embryo (×1150).

## 新书推荐

### 《中国花卉病虫原色图鉴》 吕佩珂等主编

该图鉴共有彩版 208页, 彩色生态照片 1664幅, 病原墨线和电镜扫描图片 171幅, 文字 137万, 含花卉病虫害 1608种, 其中病害 1321种, 虫害 287种, 分上下两册。

上册包括草本花卉、木本花卉、仙人掌与多浆类花卉病害 903种, 彩色照片 896幅, 彩版 112页, 文字 68万。

下册重点介绍 115种鲜切花和草坪草病害 418种, 花木害虫 287种, 文字 69万, 含彩色生态照片 768幅。该图鉴图文并茂、内容新颖、实用性强, 是我国第一部花卉病虫害识别与防治大全, 是观赏植物植保重要工具书。

定价: 158元 (上、下册, 含邮资)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。