

基于均匀设计优化绶草体细胞胚胎 发生发育体系及扫描电镜观察

顾地周¹, 高捍东², 王艳萍¹, 陈丹¹, 马秋月¹

(1 通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002; 2 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要:以绶草 *Spiranthes sinensis* 茎尖为外植体, 应用均匀设计法对各步骤各主要因子和水平的作用进行了试验探讨. 结果表明, 绶草茎尖胚性愈伤组织诱导的适宜培养基为: LS + 6-BA 0.78 mg · L⁻¹ + NAA 2.0 mg · L⁻¹, 诱导率为 98.7%; 体胚发育及植株再生的适宜培养基为: LS + 6-BA 1.00 mg · L⁻¹ + IAA 0.08 mg · L⁻¹. 在合适的培养条件下, 体胚萌发率达到 99%, 萌发的体胚成苗率达到 100%. 扫描电镜的观察证实了绶草体细胞胚胎再生的实质.

关键词: 绶草; 均匀设计; 体细胞胚胎发生; 植株再生

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)01-0060-05

Uniform Design for *in Vitro* Somatic Embryogenesis and Development of *Spiranthes sinensis* and Observation by Scanning Electron Microscope

GU Di-zhou¹, GAO Han-dong², WANG Yan-ping¹, CHEN Dan¹, MA Qiu-yue¹

(1 Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China;

2 College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Stem tips of *Spiranthes sinensis* were used as explants and the main *in vitro* culture factors with different levels were investigated through uniform design experiments. The results showed that the medium of LS + 6-BA 0.78 mg · L⁻¹ + NAA 2.0 mg · L⁻¹ was suitable for embryogenic callus induction, which embryo induction frequency was 98.7%; the medium of LS + 6-BA 1.00 mg · L⁻¹ + IAA 0.08 mg · L⁻¹ was suitable for somatic embryo development and plant regeneration. Under suitable culture conditions, the rate of somatic embryo germination was 99%, and the frequency of plant regeneration was 100%. Observation by scanning electron microscope proved that the regeneration was through somatic embryogenesis.

Key words: *Spiranthes sinensis*; uniform design; somatic embryogenesis; plant regeneration

绶草 *Spiranthes sinensis* 别名盘龙参. 是兰科绶草属草本植物, 为世界稀有植物, 国家二级保护植物, 是长白山区野生珍稀濒危药用植物^[1]. 绶草根或全草入药, 能滋阴益气、凉血解毒, 主治病后体虚、神经衰弱、肺结核咳血、咽喉肿痛、小儿夏季热、糖尿病、白带等症; 外用治毒蛇咬伤. 绶草花序造型奇特, 花

色艳丽, 花朵密集, 可驯化为观花园艺植物, 用于花坛及湖畔、池边、河岸等湿地的绿化.

绶草在长白山区数量非常稀少^[2]. 因其种子不易获得, 故其常规繁殖主要靠分蘖方式, 增殖系数极小. 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, 先形成胚性愈伤组织, 然后胚性

收稿日期: 2008-06-04

作者简介: 顾地周 (1973—), 男, 讲师, 在职博士研究生; 通讯作者: 高捍东 (1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: gaohd@njfu.edu.cn

基金项目: 国家科技攻关计划引导项目 (2005BA741C)

愈伤组织上的单一细胞经历球形胚、盾形胚、子叶胚等发育阶段,最终萌发为完整植株. 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绶草转基因植株.

目前,国内外关于植物体细胞胚胎发生研究的报道较多^[3-8],但关于绶草体胚发生的研究鲜见报道. 本课题组对绶草体细胞胚胎发生发育过程中的培养条件和培养物的形态及超微结构进行了研究,以期获得高效稳定的胚性愈伤组织诱导、体胚发生发育的最佳培养基;为深入了解绶草体胚发生的形态学及其调控技术提供依据,同时也为提高种苗生产率和制作绶草人工种子以及遗传转化奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试材

绶草新生茎尖.

1.2 方法

1.2.1 材料处理 将绶草新生茎尖剥离后,在超净工作台上用 $\varphi = 70\%$ 酒精涮洗 30 s,再用次氯酸钠(质量比为 0.5%)溶液浸泡 10 min,无菌水冲洗 8 次,无菌滤纸吸干表面的水分,切除损害部分,留 1.5 mm 锥状茎尖作为外植体备用.

1.2.2 胚性愈伤组织的诱导 以 LS 为基本培养基,添加蔗糖 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $8.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,附加不同浓度的 6-BA、NAA、IAA、2,4-D(由预试验可知:6-BA 质量浓度控制在 $0.10 \sim 1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,NAA、IAA、2,4-D 质量浓度均控制在 $0 \sim 2.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),调节 pH 为 5.5. 将锥状茎尖切面部朝下接种到附加不同浓度细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA、IAA、2,4-D 的 LS 培养基上,黑暗条件下进行胚性愈伤组织的诱导培养,观察胚性愈伤组织形成情况. 为了提高绶草胚性愈伤组织诱导的速度和诱导率,采用均匀设计法^[9],选用 $U_{10}(10^4)$ 均匀表,每处理设 30 个重复,考察细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA、IAA、2,4-D 的浓度交叉配比对诱导率的影响,以筛选最合适的诱导培养基.

1.2.3 体细胞胚发生发育及植株再生 以 LS 为基本培养基,内含蔗糖 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $8.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,附加不同浓度的 6-BA、NAA、IAA、2,4-D(由预试验可知:浓度范围与 1.2.2 相同),调节 pH 为 5.5,将含有胚性细胞团的胚性愈伤组织在温度 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、

光照强度 800 lx 、光照周期 11 h/d 条件下培养. 为了提高绶草体胚的发育及萌发速度和萌发率,采用均匀设计法,每处理设 30 个重复,考察细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA、IAA、2,4-D 的浓度交叉配比对萌发率的影响,筛选最佳的体胚发生发育培养基. 培养到胚性愈伤组织表面产生鱼雷状突起时,将突起剥离,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发后形成完整植株. 同时,结合电镜观察体胚产生的部位及球形胚、盾形胚和子叶胚等发育阶段的胚形.

1.2.4 结果观察 采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.

1.2.5 数据分析与处理 数据分析处理应用均匀设计软件(Uniform design 3.0V).

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对胚性愈伤组织诱导的影响

试验所得数据见表 1. 经均匀设计软件分析处理后(表 2)可知,检验值 $F > F_{(0.01,2,7)}$,回归方程显著. 根据回归方程求出 Y_1 的最优组合为: $X_1 = 1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $X_2 = 2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $X_3 = 0$, $X_4 = 0$. 对各方程项进行显著性检验可知, X_1 和 X_2 对 Y_1 值均影响显著. 在此组合基础上求得最优解: $y_1 = 99.5\%$,此解为回归方程的解析解,按公式 $Y_1 = y_1 \pm u_\alpha s(\mu_\alpha$ 为正态

表 1 胚性愈伤组织诱导中不同激素配比的 $U_{10}(10^4)$ 均匀设计试验安排及结果

Tab. 1 $U_{10}(10^4)$ Uniform design test plan of various hormone combinations in embryogenic callus induction and its result

处理 编号	因素/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$				诱导率 ¹⁾ / %	萌发率 ²⁾ / %
	6-BA (X_1)	NAA (X_2)	IAA (X_3)	2,4-D (X_4)	(Y_1)	(Y_2)
1	0.10	0.25	0.50	0.75	58.80	70.0
2	0.20	1.00	1.50	2.00	70.00	68.0
3	0.30	1.75	0	0.50	88.70	81.0
4	0.40	0	0.75	1.75	55.00	75.8
5	0.50	0.50	1.75	0.25	72.00	80.0
6	0.60	1.25	0.10	1.50	80.60	88.0
7	0.70	2.00	1.00	0.10	95.00	89.6
8	0.80	0.10	2.00	1.25	65.50	87.0
9	0.90	0.75	0.25	0	82.40	96.0
10	1.00	1.50	1.25	1.00	97.30	93.7

1) 为培养 38 d 的诱导率, $n = 30$; 2) 为培养 40 d 的萌发率, $n = 30$

分布的双侧分位数, s 为剩余标准差)计算出优化值区间估计为 $Y_1 = 99.5\% (\pm 11.9\%)$,即 $87.6\% \sim 111.4\%$.由表1试验结果和回归方程及胚性愈伤组织诱导情况可知,6-BA超过 $0.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时胚性愈伤组织诱导率下降,通过计算 X_1 和 X_2 对回归的贡献值和贡献率可知(按偏回归平方和降序排列): $U_{(2)} = 1.14\text{e}^{+3}$, $U_{(2)}/U = 74.9\%$; $U_{(1)} = 147$, $U_{(1)}/U = 9.62\%$,即NAA对胚性愈伤组织诱导率 Y_1 的贡献远远大于6-BA,为了避免6-BA在 $0.70 \sim 0.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间有较高诱导率的峰值,又以6-BA为 $0.71, 0.72, 0.73, 0.74, 0.75, 0.76, 0.77, 0.78, 0.79$ 和 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,NAA $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 做了10个处理的试验,重复3次,发现6-BA为 $0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时胚性愈伤组织诱导

率最高.用实验得到的优化值6-BA $0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行验证试验,幼茎茎尖接种到诱导培养基7 d后逐渐增粗膨胀,继续培养至38 d后完全脱分化形成愈伤组织,表面光滑致密呈黄绿色(图1a),培养至52 d时部分愈伤组织表面逐渐形成颗粒状的小突起(图1b).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团的胚性愈伤组织(图2a、b),这些小突起是体胚发育的前期即球形胚(图2c).统计诱导率达98.7%以上,在估计范围内,且比所有实验 Y_1 值都大.因此,缙草幼茎茎尖诱导含胚性细胞团的胚性愈伤组织最佳培养基为:LS + 6-BA $0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

表2 缙草体细胞胚发生及植株再生各阶段的回归分析结果¹⁾

Tab.2 Regression analysis result of somatic embryogenesis and plant regeneration of *Spiranthes sinensis*

培养阶段	回归方程	复相关系数(R)	检验值(F)
胚性愈伤组织的诱导	$Y_1 = 53.2 + 13.6X_1 + 16.3X_2$	0.974 6	66.15
体细胞胚的发育及植株再生	$Y_2 = 69.4 + 31.4X_1 - 4.07X_3$	0.980 9	88.89

1) 显著性水平 $\alpha = 0.01$,样本容量 $N = 10$,临界值 $F_{(0.01,2,7)} = 9.547$

2.2 不同激素对比对体细胞胚发育及植株再生的影响

试验所得数据见表1.经均匀设计软件分析处理后(表2)可知,检验值 $F_t > F_{(0.01,2,7)}$,回归方程显著.据回归方程求出 Y_2 的最优组合为: $X_1 = 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $X_2 = 0, X_3 = 0, X_4 = 0$,同理,对各方程项进行显著性检验可知,各方程项均显著.在此组合基础上求得最优解: $y_2 = 101\%$,按公式 $Y_2 = y_2 \pm u_{\alpha}s$ 计算出优化值区间估计为 $Y_2 = 101\% \pm 7.40\%$,即 $93.6\% \sim 108.4\%$.虽然 X_3 的最小值为0,但对 Y_2 影响显著,因此,还需添加少量IAA以辅助体胚发育.为了明确IAA的显著性较准确浓度,又以IAA为 $0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, \dots, 0.24, 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 做了26个处理的试验,发现IAA在 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时体胚萌发率最高.用实验得到的优化值6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行验证试验.将含有胚性细胞团的胚性愈伤组织切割成适当的小块转接到附加6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和IAA $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LS培养基上进行体胚发育及萌发培养,胚性细胞团在此组合的培养基上培养18 d后开始呈现出明显的发育状态,由黄绿色逐渐转为浅绿色,继而转为翠绿色,继续培养至30 d后,有绿

色圆锥体出现(图1c).通过电镜观察确定:绿色圆锥体是胚性细胞团表面球形胚发育产生的盾形胚(图2d)和早期子叶胚(图2e),说明体胚开始转向植株萌发阶段.统计萌发率为99%,在估计范围内,且比表1中所有 Y_2 值都大.因此,缙草体细胞胚发育及萌发的最佳培养基为:LS + 6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

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 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中继续培养28 d,由鱼雷状变成小芽锥,40 d后小芽锥发育成完整的植株(图1d).同时通过电镜观察证实了小芽锥为子叶胚(图2e).

2.3 炼苗和移栽

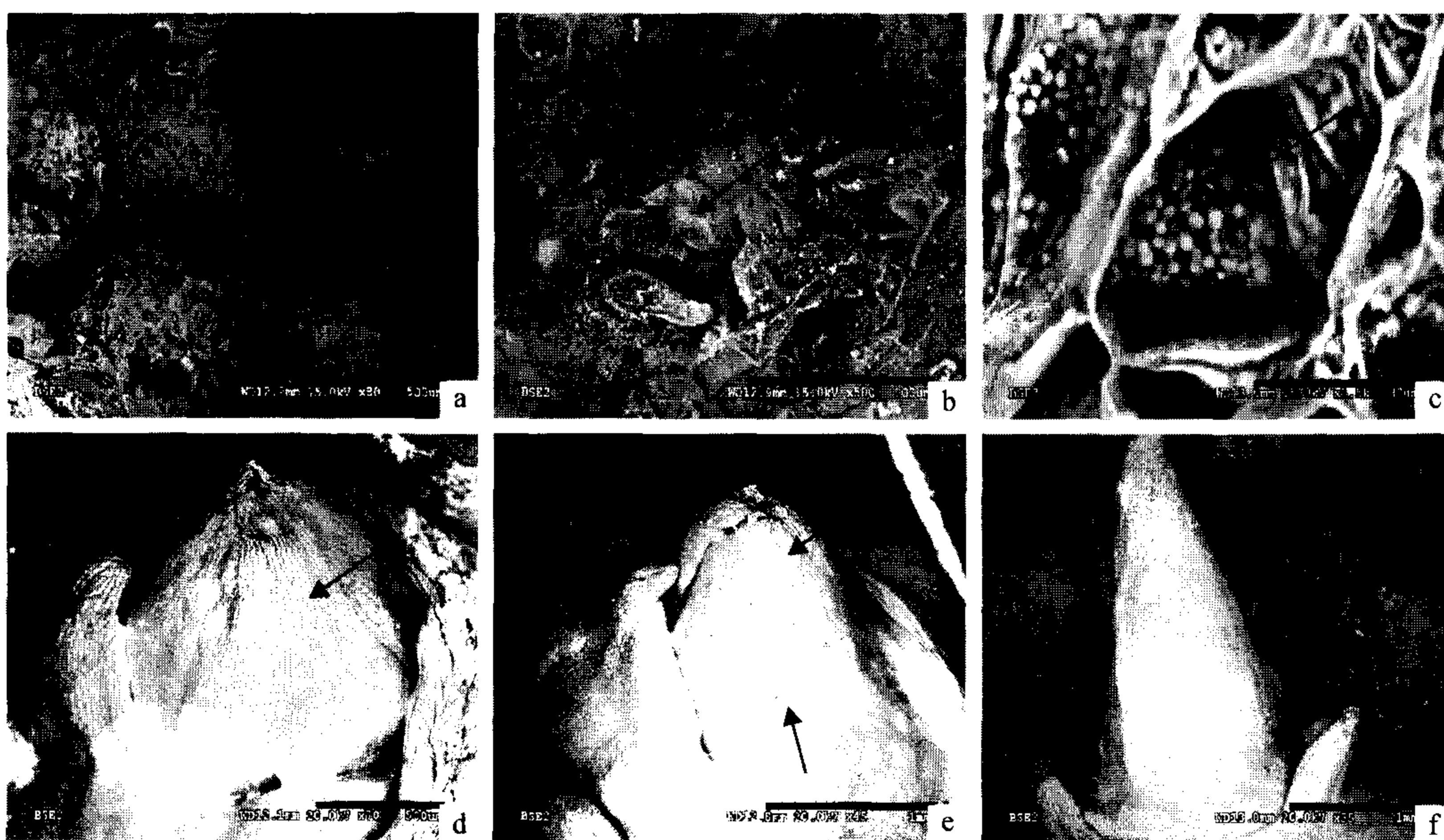
待苗根长至2.0 cm时,从培养瓶中取出试管苗,在含有 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 高锰酸钾溶液中洗去苗上残留的琼脂,然后植入经100倍杀毒矾(Oxadixyl mancozeb)消毒过的泥炭土、腐烂松针和河砂(质量比为3:2:1)混合的基质中,用薄膜覆盖以保湿保温,湿度保持在80%,温度控制在 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天自然光照8 h,3 d后通风换气,7 d后揭膜,每天早晚喷洒清水各1次.成活率达92%以上(图1e).



a: 胚性愈伤组织; b: 含有球形胚的胚性愈伤组织; c: 体细胞胚萌发; d: 体细胞胚萌发后发育为完整植株; e: 移栽的植株

图 1 绶草体细胞胚的诱导形成及植株再生过程

Fig. 1 Induction of somatic embryos and the progress of plant regeneration in *Spiranthes sinensis*



a: 胚性愈伤组织 ($\times 80$, 标尺 = 500 μm); b: 胚性细胞团 ($\times 500$, 标尺 = 100 μm); c: 含球形胚的胚性愈伤组织 ($\times 1\ 500$, 标尺 = 30 μm); d: 盾形胚 ($\times 70$, 标尺 = 500 μm); e: 子叶胚 ($\times 45$, 标尺 = 1 mm); f: 体胚萌发为芽 ($\times 35$, 标尺 = 1 mm)

图 2 绶草体细胞胚诱发及发育各阶段的扫描电镜观察

Fig. 2 Scanning electron microscope observation of the induction and development of *Spiranthes sinensis* somatic embryos in different stages

3 讨论

体细胞胚胎也称为胚状体,对绶草等单子叶植物而言,它能像种子一样通过球形、盾形和子叶形的胚胎发育时期,最终形成可发育成完整小植株的成熟胚。迄今为止,近 300 种植物都产生了体细胞胚胎,并能进一步发育成完整植株。这表明体胚的发生

在高等植物中已普遍存在,而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团^[10]。本研究探讨了培养基中不同浓度的植物生长调节物质对绶草茎尖胚性愈伤组织诱导的影响,并对影响体胚发育及植株再生的 6-BA、NAA、IAA 和 2,4-D 等 4 个因素进行筛选。结果表明,绶草茎尖较适宜胚性愈伤组织诱导和体胚发生发育的不

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 NAA 和一定浓度的 6-BA 在缙草胚性愈伤组织诱导阶段是必需的,但添加过高浓度的 NAA 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 NAA 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. 而体胚的发生乃至进一步发育成完整植株却需要较高浓度的 6-BA,并辅以低浓度的 IAA 才能完成. 这可能是诱导体胚发生发育过程中,细胞的理化性能发生了较大的变化^[11].

体胚发生发育过程的扫描电镜观察结果表明,缙草茎尖诱导产生的体胚具有明显的两极性和相对的独立性. 在缙草体细胞胚胎发生体系的研究中发现,体细胞胚胎经过了球形胚、盾形胚和子叶胚全过程,说明其发育过程与合子胚的发育完全相同. 由此可知,本研究不仅建立了缙草体细胞胚发生发育体系,而且通过电镜观察结果还可看出体细胞胚同时源于胚性愈伤组织的表面和内部组织. 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. 缙草体胚发生的形态学和超微结构观察表明,本研究初步建立了相对稳定的缙草体细胞胚胎发生体系,通过缙草体细胞胚的诱发体系可进一步建立遗传转化系统,为基因工程技术在药用植物育种领域中的广泛应用开辟新的途径,也为提高其他濒危药用植物的遗传转化效率提供试验基础.

参考文献:

- [1] 周繇. 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] 周繇,于俊林,张本刚,等. 长白山区药用植物资源及其多样性研究[J]. 北京林业大学学报,2007,29(3):52-59.
- [3] KUEHNLE A R, CHEN F C, NELLIE S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids[J]. Plant Cell Reports,1992,11(9):438-442.
- [4] HAMIDAH M, KARIM A G A, DEBERGH P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1997,48(3):189-193.
- [5] AL-RAMAMNEH E, SRISKANDARAJAH S, SEREK M. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncata*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2006,84(3):333-342.
- [6] 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 Reports,1999,18(11):904-910.
- [7] REINERT J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten [J]. Naturwissenschaften,1958,45:344-345.
- [8] NOHOHAY J S, WINGE H, MARIATH J E A. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare* vulgare, Poaceae[J]. Plant Cell Reports,1999,18(11):929-934.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.

【责任编辑 李晓卉】

[1] 周繇. 长白山区野生珍稀濒危药用植物资源评价体系