

睫毛萼凤仙花的组织培养及其愈伤组织的超微观察

王雪娟¹, 程新利², 柴瑞娟³

(1. 安徽科技学院 城建与环境学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 天津市园林开发建设有限公司, 天津 300203; 3. 安徽工程科技学院 生化工程系, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 试验以睫毛萼凤仙花无菌苗的叶片、茎和根为外植体进行离体培养, 并对两种具有不同再分化能力的愈伤组织进行电镜超微观察。结果表明: 在培养基 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 上愈伤组织诱导率最高, 叶片愈伤组织的诱导率为 100%, 茎的愈伤组织诱导率为 67%, 而根却没有愈伤组织的发生; 叶片愈伤组织在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 上培养 40 d 后有不定芽的发生, 而茎的愈伤组织却没有器官发生; 电镜观察表明, 具有再分化能力的愈伤组织的细胞排列不规则, 其表面有较明显的类似组织分化。

关键词: 睫毛萼凤仙花; 离体培养; 超微观察

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2011)02-0262-04

Tissue culture of *Impatiens blepharosepala* and ultrastructural observation of callus

WANG Xue-Juan¹, CHENG Xin-Li², CHAI Rui-Juan³

(1. College of Urban Construction and Environment, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 2. Landscape development and construction of tianjin co. Ltd, Tianjin 300203, China; 3. Department of Bioscience and Engineering, Anhui Technology and Science College, Wuhu 241000, China)

Abstract: Leaves, stem and root of *Impatiens blepharosepala* seedling were cultured *in vitro*, and two types of callus having different differentiation were observed by electron microscope. The results showed that the induction rate was highest on MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, the induction rate of leaves was 100% and the rate of stems was 67%, but the roots can't be induced. Callus of leaves can be induced buds on MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L after 40 d, but there was no organ generated from stems. Cells of callus having differentiation arrayed irregularly and there was obviously similar tissue differentiation by electron microscope.

Key words: *Impatiens blepharosepala*; culture *in vitro*; ultrastructural observation

睫毛萼凤仙花(*Impatiens blepharosepala*)为凤仙花科(Balsaminaceae)凤仙花属植物。凤仙花科全世界共4属900余种,中国产2属200余种,睫毛萼凤仙花为其一野生种。本种为一年生草本,高30~60 cm,叶互生,长7~12 cm,宽3~4 cm,叶基具两枚球形腺体,总花梗腋生,花1~2朵,花紫色,

侧生萼片2,卵形,唇瓣宽漏斗状,距长可达3.5 cm,产湖南、湖北、江西、贵州和安徽的长江流域,生于海拔500~1 600 m的山谷山坡阴湿处(陈艺林, 2001)。本种侧生萼片有明显的睫毛,有时完全无睫毛,而有疏齿,唇瓣长达3.5 cm,甚为特殊,颇具观赏价值。

收稿日期: 2010-08-11 修回日期: 2010-12-16

基金项目: 安徽省自然科学基金(KJ2009B166Z, KJ2008B07ZC); 安徽省高校自然科学基金(KJ2009B123Z); 安徽工程科技学院青年教师科研项目(2008RZR004)[Supported by Natural Science Foundation of Anhui Provincial Education Department(No. KJ2009B166Z, KJ2008B07ZC); College Natural Science Foundation of Anhui(KJ2009B123Z), Special Foundation of Anhui Technology and Science College(2008RZR004)]

作者简介: 王雪娟(1974-),女,江苏泗洪人,硕士,讲师,主要从事园林植物应用研究, E-mail: wxj005@126.com.

国内对凤仙花类 (*Impatiens* spp.) 植物的研究主要集中在组织培养(刘静等, 2008; 王越等, 2008)、化学分析(王发春, 2008)、系统进化研究(肖乐希等, 2009)和诱变育种(杨军等, 2008; 汤泽生等, 2006)及形态研究方面(蔡秀珍等, 2007)。目前国内对睫毛萼凤仙花的研究很少, 仅在形态和生长表型可塑性、生态特性方面有少量研究(樊梅英等, 2006, 2007), 并认为睫毛萼凤仙花适宜引种栽培, 但并无组织培养方面的报道。本文以睫毛萼凤仙花为材料, 进行离体培养, 并利用电镜扫描从超微结构来观察其愈伤组织的发育阶段, 从而了解其愈伤组织的发育状态对离体再生的影响。

1 材料与方 法

睫毛萼凤仙花种子于 2007 年 6 月下旬采自安徽省岳西县鹞落坪国家级自然保护区。将睫毛萼凤仙花种子洗净后在培养箱内使其萌发, 待幼苗长到约 10 cm 时, 分别取其叶片 (5 mm × 5 mm), 茎 (1 cm) 和根 (1 cm) 为外植体, 自来水冲洗干净, 再用滤纸吸干表面水分, 用 0.1% 的升汞进行外植体消毒 5 ~ 8 min, 用无菌水清洗 3 遍后接种。试验中所用培养基为 MS, 附加一定浓度的 NAA 和 6-BA, 温度 25 °C, 光照强度 45 μmol · m⁻² · s⁻¹ 左右, 光照时间为 14 h/d。每种处理各选择 100 个接种成活的外植体统计愈伤组织诱导率, 并以 SPSS 数据处理系统用新复极差法 (SSR) 对试验数据作多重比较, 并观察愈伤组织在原培养基中自然分化出芽和根的情况, 愈伤组织扫描电镜观察方法为: 取愈伤组织, 用 5% 戊二醛固定 2 h, 梯度酒精脱水, 喷金, 扫描电镜观察。

2 结果与分析

2.1 睫毛萼凤仙花愈伤组织的诱导

不同浓度的激素组合对外植体愈伤组织诱导率的差异较大, 在 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 的情况下: 随着 NAA 浓度的增加, 愈伤组织的诱导率呈下降趋势, 当 NAA 浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L 时, 愈伤组织的诱导率与对照相比, 差异达到了极显著水平和显著水平 (表 1)。从表 1 可以看出, 在相同的培养基上, 不同的外植体类型愈伤组织诱导率差异也较大; 叶片诱导愈伤组织的时间最早, 在接种后 30 d 左右就有愈伤组织的发生, 诱导率也

较高, 最高可达 100%; 茎次之, 而根却没有愈伤组织的发生。综上, 以叶为外植体, 在培养基 MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 愈伤组织的诱导效果最好, 其次为茎。

表 1 不同浓度 NAA 和 6-BA 组合对愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effects of rate on callus induction at different NAA and 6-BA concentrations

组合 Treatment	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	愈伤组织诱导率 (%) Rate of callus induction		
			叶 Leaf	茎 Stem	根 Root
ck	0	0	69	32	0
1	0.5	0.5	100**	67*	0
2	1.0	0.5	93*	58	0
3	1.5	0.5	95*	60*	0
4	2.0	0.5	80	43	0
5	2.5	0.5	82	35	0
6	3.0	0.5	79	30	0
7	3.5	0.5	80	20	0
8	4.0	0.5	73	16	0
9	4.5	0.5	70	13	0
10	5.0	0.5	61	10	0
11	0.5	1.0	95*	55	0
12	0.5	1.5	95*	58	0
13	0.5	2.0	83	41	0
14	0.5	2.5	85	33	0
15	0.5	3.0	77	31	0
16	0.5	3.5	79	25	0
17	0.5	4.0	70	19	0
18	0.5	4.5	60	15	0
19	0.5	5.0	61	12	0
平均诱导率 Average (%)			80.9	33.4	0

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

此外, 在 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时, 随着 6-BA 浓度的增加, 愈伤组织的诱导率逐渐下降, 当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L 时, 愈伤组织的诱导率与对照相比差异达到了极显著水平和显著水平。在相同的培养基上, 不同来源外植体的愈伤组织诱导率差异也较大, 其中叶片愈伤组织的诱导率最高, 达 100%; 茎次之, 而根却没有愈伤组织的发生。综合表 1 和表 2 中的结果可以看出, 睫毛萼凤仙花的叶片较易诱导愈伤组织, 在 MS + NAA (0.5 ~ 5.0) mg/L + 6-BA (0.5 ~ 5.0) mg/L 培养基上均可以诱导产生愈伤组织, 且诱导率较高, 平均值均大于 80%。而茎虽然也可诱导出愈伤组织, 但愈伤组织的诱导率相对较低, 且得到的愈伤组织结构疏松, 不利于进一步的分化研究。故以离体再生为目的的睫毛萼凤仙花的组织培养, 应以叶片为外植

体,愈伤组织诱导的最适培养基配方为 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA0.5 mg/L。

2.2 睫毛萼凤仙花愈伤组织的分化

叶片诱导的愈伤组织在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 培养基上培养 40 d 左右时,有不

定芽的发生(图 1:A),培养 50 d 左右时,叶片愈伤组织在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.5 mg/L; MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA3.0 mg/L; MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 培养基上均有大量芽和根的发生(图 1:B)。而以茎为外植体诱导的



图 1 A. 叶片诱导的不定芽; B. 叶片诱导的不定芽和不定根。
Fig. 1 A. Buds from leaves; B. Buds and roots from leaves.

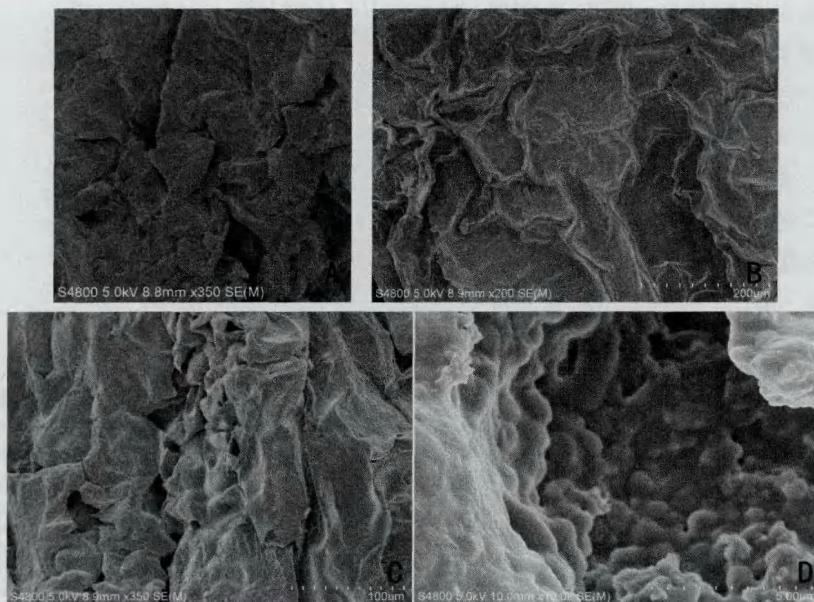


图 2 A. I型愈伤组织的扫描电镜图; B. I型愈伤组织表面的扫描电镜; C. 分化愈伤组织的扫描电镜图; D. II型叶愈伤组织扫描电镜图。
Fig. 2 A. PSEM of type I callus from leaves; B. PSEM of type I callus surface; C. PSEM of differentiated callus; D. PSEM of type II callus from leaves.

愈伤组织没有芽、也没有根的分化。

2.3 睫毛萼凤仙花愈伤组织的电镜观察

分别取叶和茎在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5mg/L 培养基上诱导的愈伤组织做扫描电镜观察。依据 Armstrong 标准,肉眼观察到叶片诱导出的愈伤组织致密,呈颗粒状,定为 I 型;茎诱导出的愈伤组织,定为 II 型,肉眼观察其结构为颗粒状,表面湿润。电镜扫描结果如图 2:A-D,从图中可以看出 I 型愈伤组织细胞与细胞之间排列比较紧密,表

面光滑,细胞形状不规则,其部分表面已经形成了细胞较为规则的表皮结构(图 2:B),内部细胞大小和形状不一致,已经出现了类似组织的分化(图 2:C)。II 型愈伤组织(图 2:D)细胞形成了团粒结构,细胞形状圆形或类圆形,较规则。

3 结论

试验中分别以睫毛萼凤仙花的叶片、茎和根为

外植体进行愈伤组织的诱导和植株再生研究。结果表明,在合适的培养基配方上叶片和茎都可以诱导出愈伤组织,但叶片的诱导率较高,且形成的愈伤组织能够再生出不定芽和不定根。因此,对于离体再生为目的的睫毛萼凤仙花组织培养来说,叶片是最适的外植体。在 MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 培养基上,叶片诱导的愈伤组织可以直接再生出植株。

对叶片和茎诱导的愈伤组织进行超微结构观察,发现在愈伤组织阶段,出现再分化和未出现再分化的组织在超微结构上就有明显差异,所以在愈伤组织再生研究中,可以根据超微结构初步判断其再生能力,从而减少试验所需时间,增加成功的机率。

本试验首次对睫毛萼凤仙花进行离体培养,并再生出了植株,但对于商业化大规模生产来说,其再生体系还需要进一步的系统化研究。

参考文献:

- 陈艺林. 2001. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 47(2): 186-187
- Cai XZ(蔡秀珍), Liu KM(刘克明), Cong YY(丛义艳), et al. 2007. *Impatiens* L. of 10 species of *Ipomoea* by Scanning Electron Microscope(SEM)(凤仙花属(*Impatiens*) 10种植物花粉形态的扫描电镜观察)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 27(3): 279-283
- Fan MY(樊梅英), Xia RH(夏日红), Cao WY(曹万友), et al. 2006. Zinitial study of ecology characteristics of *Impatiens blepharosepala*(睫毛萼凤仙花生态特性的初步研究)[J]. *J Huangshan Univ*(黄山学院学报), 8(5): 61-63
- Fan MY(樊梅英), Xia RH(夏日红), Cao WY(曹万友). 2007. A comparative study on the growth of cultivated *Impatiens blepharosepala* and of the wild *I. blepharosepala*(栽培与野生睫毛萼凤仙花生长的比较研究)[J]. *J Huangshan Univ*(黄山学院学报), 9(5): 52-53
- Liu J(刘静), Ting L(丁兰), Zhao QF(赵庆芳), et al. 2008. Tissue culture and rapid propagation of *Impatiens balsamine* L.(凤仙花的组织培养与离体快繁)[J]. *J Northwest Normal Univ: Nat Sci Edi*(西北师范大学学报·自然科学版), 44(1): 80-82
- Tang ZS(汤泽生), Yang J(杨军), Chen DC(陈德灿), et al. 2006. Morphological variation in SP2 *Impatiens balsamina* induced by space flight(航天诱导凤仙花 SP-2 代形态变异的研究)[J]. *Acta Laser Biol Sin*(激光生物学报), 15(1): 31-34
- Wang CF(王发春). 2008. Fatty acid compositions of *Impatiens balsamina* Linn seed oil(凤仙花籽油脂脂肪酸组分分析)[J]. *China Oils and Fats*(中国油脂), 33(6): 78-79
- Wang Y(王越), Liu Y(刘燕). 2008. Tissue culture and rapid propagation of *Impatiens macrovexilla*(大旗瓣凤仙花的组织培养与快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 44(3): 510
- Xiao LX(肖乐希), Liu KM(刘克明). 2009. Floral traits and pollination system of *Impatiens chinensis* (Balsaminaceae)(华凤仙花部特征和传粉系统研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 29(2): 164-168
- Yang J(杨军), Li JT(李劲涛), Tang ZS(汤泽生), et al. 2008. Comparison on three mutant lines with different floral color in SP4 generation *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae) induced by spaceflight(航天诱导凤仙花 SP-4 代三种不同花色突变系比较)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 30(2): 221-226
- Yang YH(杨应华), Li L(李蕾), Yu DN(余诞年). 2002. Research on the seed abortion and fruit development in a seedless litchi strain(温敏无核荔枝的种子败育和果实发育研究)[J]. *J Hainan Normal Univ: Nat Sci Edi*(海南师范学院学报·自然科学版), 15(2): 71-74
- Zhang J(张健), Lv LX(吕柳新), Ye MZ(叶明志). 2006. Microscopic and submicroscopic observations on the abnormal embryonic development of embryo abortive litchi (*Litchi chinensis* cv. Luhebao)(胚胎败育型荔枝胚胎发育异常的显微及亚显微观察)[J]. *J Henan Agric Univ*(河南农业大学学报), 40(2): 194-197
- Zhang QS(张青闪), He YR(何永睿), Wen SH(文尚华), et al. 2006. A preliminary cytological study of the seedless and few-seeded lines of Hongjiangcheng(*Citrus sinensis*)(红江橙无核(少核)选系的细胞遗传学初步研究)[J]. *J Southwest Agric Univ: Nat Sci Edi*(西南农业大学学报·自然科学版), 28(6): 937-940
- Grosser JW, Ollitraul TP, Olivares-Fuster O. 2000. Somatic hybridization in citrus; An effective tool to facilitate variety improvement[J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 36(6): 434-449
- Talon M, Zacarias L, Primo-Millo E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins [J]. *Plant Physiol*, 99(4): 1 575-1 581
- Yamamoto M, Tominaga S. 2002. Relationship between seedlessness of keraji(*Citrus keraji* hort. ex Tanaka) and female sterility and self-incompatibility [J]. *J Jpn Soc Hortic Sci*, 71(2): 183-186
- Ye WJ, Qin YH, Ye ZX, et al. 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar 'Wuzishatangju' (*Citrus reticulata* Blanco) [J]. *Plant Sci*, 177: 19-27

(上接第 261 页 Continue from page 261)