

凤仙花的组织培养与离体快繁

刘静, 丁兰*, 赵庆芳, 赵志强, 谢晖, 李董

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以凤仙的带芽茎段、茎尖、幼叶为外植体, 在附加不同种类及浓度的植物激素的 MS 培养基上进行快速繁殖, 诱导芽的最适培养基为 MS+0.5 mg·L⁻¹ BA+0.01 mg·L⁻¹ IAA+0.01 mg·L⁻¹ GA₃, 芽的增殖培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.01 mg·L⁻¹ IAA+0.01 mg·L⁻¹ GA₃; 增殖系数为 6~8 倍。根诱导最佳培养基为 MS+0.1~0.5 mg·L⁻¹ BA+0.005 mg·L⁻¹ IAA。

关键词: 凤仙花; 组织培养; 快速繁殖; 无性繁殖系

中图分类号: Q 943.1; S 681.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-988X(2008)01-0080-03

Tissue culture and rapid propagation of *Impatiens balsamine* L.

LIU Jing, DING Lan, ZHAO Qing-fang, ZHAO Zhi-qiang, XIE Hui, LI Jin

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: The clonal propagation of *Impatiens balsamine* L. is developed through culture of stem segment with lateral bud, shoot-tip and young leaf. The optimum medium of shoots induction is MS+0.5 mg·L⁻¹ BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA+0.01 mg·L⁻¹ GA₃. Proliferation medium of shoots is MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA+0.01 mg·L⁻¹ GA₃, proliferation coefficient of shoots can reach 6 to 8. Induction of roots is best in medium of MS+0.1~0.5 mg·L⁻¹ BA+0.005 mg·L⁻¹ IAA.

Key words: *Impatiens balsamine* L.; tissue culture; rapid propagation; clonal propagation system

凤仙花(*Impatiens balsamine* L.)为凤仙花科凤仙花属的一种草本植物, 分布于中国各地^[1-3]。凤仙具有药用和观赏价值, 凤仙全草及种子可入药, 有活血化瘀、利尿解毒之用^[4,5]。传统的繁殖方法是采用无行扦插或种子繁殖。长期无性扦插极易感染病毒, 难以保持其优良性状; 种子繁殖遗传稳定性差, 难以保证性状整齐划一, 降低了商品价值^[6]。而用组织培养技术既可除去病毒又可壮苗快繁, 可在短期内提供大量优质试管苗。因此, 选择适宜培养条件进行凤仙组织培养, 对推动其组培快繁及产业化生产具有重要意义。

1 材料及方法

1.1 实验材料

新西兰凤仙(*Impatiens balsamine* L.), 由兰

州市园林局提供。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌短枝扦插 取幼嫩植株茎段, 去叶、去顶芽后流水冲洗 12 h, 用体积百分数为 75% 的乙醇浸泡 30 s, 0.5 g·L⁻¹ 升汞溶液滴加吐温-80, 消毒 10 min(中途更换消毒液 1 次), 无菌水冲洗 5~6 次。

将枝条切成 1 cm 左右带 1~2 个腋芽的茎段, 近根部朝下, 插入 MS 培养基, 待侧芽长成 4 cm 的小枝条时, 将其切下, 除去叶片, 切成带 1~2 个腋芽的茎段, 插入增殖培养基, 待侧芽萌发生长成小枝条, 反复以上操作, 即可大规模快繁。

1.2.2 茎尖及叶的培养 取再生植株茎尖(约 0.5 mm)及叶片, 叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 接入茎尖及叶的诱导培养基中。

收稿日期: 2007-01-10; 修改稿收到日期: 2007-09-10

基金项目: 甘肃省教育厅科研资助项目(0601-27)

作者简介: 刘静(1978—), 女, 陕西西安人, 硕士研究生。主要研究方向为植物生理生态学。

* 通讯联系人, E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

1.3 培养条件

培养基为 MS 培养基^[7], 用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂固化, 蔗糖浓度 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 活性碳 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8, 培养温度 $(22 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 光照强度 $2\,000 \text{ lx}$, 光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$.

2 结果及讨论

2.1 无菌扦插

2.1.1 侧芽的诱导 将消毒后的带腋芽茎段接种到表 1 所列的 4 种培养基中, 在不同浓度激素组合诱导下, 4~5 d 后侧芽开始萌动, 10 d 左右小芽可长到 $0.5 \sim 1 \text{ cm}$ 不等, 60 d 后侧芽可长至 3.0 cm 左右(图 1), 茎段基部有根生成. 激素对侧芽诱导的影响见表 1.

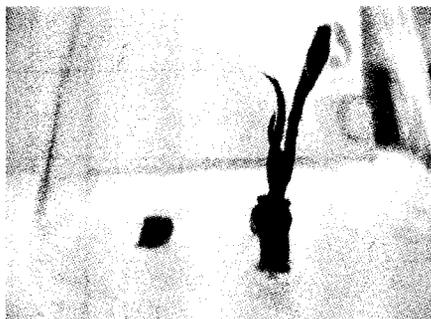


图 1 茎段诱导的芽

Fig 1 Adventitious buds differentiated from shoots

表 1 不同激素对比对侧芽诱导的影响

Tab 1 Effect of different plant hormones on the adventitious buds

培养基 No.	调节因子 Regulator/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$			芽诱导率 Rate of bulblets induced/%	生长状况 Growth
	BA	IAA	GA_3		
1	0.5	0.1	—	17	稍壮, 芽稍多, 生长慢
2	0.5*	0.01*	0.01	30	壮, 芽多, 生长慢
3	0.1	0.01	—	20	较壮, 芽稍多, 生长慢
4	0.05	0.01	—	26	较壮, 芽稍多, 生长较慢

注: * $P < 0.01$.

通过统计学分析, 1 号培养基和 2 号培养基的芽诱导率具有显著性差异, 当 BA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, IAA 浓度较低的组合较好, 诱导率为 30%, 对 2, 3, 4 号培养基进行统计学分析, 2 号培养基与 3 号和 4 号培养基芽诱导率均具有显著性差异, 当 IAA 浓度为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, BA 浓度高的

组合较好, 因此, 分裂素浓度高有利于芽的诱导. 综合来看 2 号培养基最好, 其它 3 种培养基中苗的生长速度及强壮程度均不如 2 号培养基. 因此, 选择 2 号培养基为初代培养基. 在相同培养条件下, 使用 GA_3 比不使用 GA_3 好, 侧芽生长快, 节间较长, 利于继代增殖.

2.1.2 试管苗的大量增殖 试管苗的增殖阶段, 取初代培养基中的无菌植株, 切去顶芽, 将茎段切成 1.5 cm 带芽茎段, 插入增殖培养基中; 再将切下的带顶芽茎段插入增殖培养基中培养, 此法可一次成苗, 因此在培养基筛选中, 须兼顾芽的长势及根的生长状况, 并且在茎段基部发根处无愈伤组织生长, 这对于保证低的变异率和移栽后的存活率尤为重要. 为此设计了 9 种增殖培养基及 3 种壮苗培养基, 表 2 中数据为继代 10 次的平均值.

由表 2 可以看出, 顶芽的芽增殖率高于侧芽的芽增殖率, 如 3 号培养基用于顶芽培养时平均出芽数为 10.2 ± 1.9 , 而用于侧芽时平均出芽数仅有 9.7 ± 1.8 . 但是顶芽培养基的激素 BA 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而高浓度的激素很容易引起变异, 不利于后继的大量快繁; 通过计算标准差并综合长势等因素, 选择 5 号培养基为最适继代培养基, 7 至 12 号培养基为壮苗生根培养基, 其芽增殖率为 0, 生根率为 100%. 7 至 9 号培养基中所含激素量少, 具有很好的生根率, 10 至 12 号培养基生根率也为 100%, 但芽的生长受到抑制. 因此, 选择 7 号、8 号、9 号培养基为生根培养基.

2.2 愈伤组织诱导

取无菌植株第三片叶, 切成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 小块放入愈伤组织培养基中培养. 激素对愈伤组织诱导的效果见表 3.

从表 3 可以看出凤仙叶片的愈伤组织诱导较为容易(图 2), 在上述培养基中诱导率均达到 100%. 高浓度 BA 与低浓度 IAA 的激素组合仅有愈伤组织生长而无芽或根的发生; 而高浓度 NAA 与低浓度 BA 的激素组合不仅能较好的诱导愈伤组织, 并且在 20 d 愈伤组织开始发小根, 说明较高浓度生长素利于凤仙花叶片愈伤组织分化成根.

2.3 试管苗的移栽

10~20 d 后增殖培养基中的试管苗长到 $4 \sim 5 \text{ cm}$, 根长至 4 cm , 芽发育良好时炼苗 3 d, 洗去琼脂, 小苗逐渐移至较强阳光下, 并注意勤浇水且保持通气良好, 移栽的存活率很高(图 3).

表2 不同激素对比对芽增殖的影响

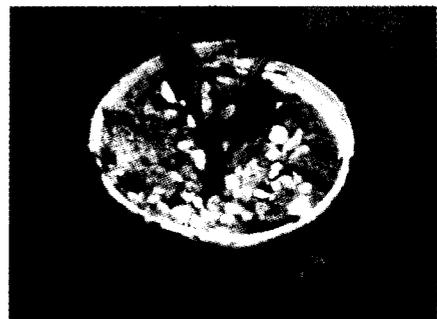
Tab 2 Influences of different plant hormones on the propagation from the adventitious buds

培养基 No.	调节因子 Regulator/(mg·L ⁻¹)			新增芽平均数 Average number of new shoots		生根率 Rooting rate /%	生长状况 Growth
	BA	IAA	GA ₃	顶芽	侧芽		
				Apical bud	Lateral bud		
1	2.0	0.01	—	8.4±1.9	—	100	生长慢, 叶细小, 芽多
2	2.0	0.01	0.02	5.8±3.2	—	100	生长慢, 茎伸长, 芽较多
3	2.0	0.01	0.01	10.2±1.9	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿芽多
3	2.0	0.01	0.01	—	9.7±1.8	100	壮, 茎伸长, 叶绿芽多
4	1.0	0.02	0.01	—	6.5±2.6	100	生长较慢, 茎伸长, 芽较多
5	1.0	0.01	0.01	—	9.5±1.4	100	苗较壮, 茎伸长, 叶绿
6	1.0	0.01	—	—	4.9±1.1	100	生长较慢
7	0.5	0.005	—	—	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿
8	0.2	0.005	—	—	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿
9	0.1	—	—	—	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿
10	1.0	0.05	0.01	—	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿芽抑制
11	1.0	0.2	—	—	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿芽抑制
12	2.0	0.5	—	—	—	100	壮, 茎伸长, 叶绿芽抑制

表3 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

Tab 3 Effect of different plant hormones on induction of callus

培养基 No.	调节因子 Regulator/(mg·L ⁻¹)			愈伤组织诱导率 Rate of callus Induced/%	生根率 Rooting rate/%	出芽率 Rate of bulblets induced/%	生长状况 Growth
	BA	NAA	IAA				
1	3.0	—	—	100	0	0	愈伤组织生长良好, 无芽或根的发生
2	2.0	—	0.2	100	0	0	愈伤组织生长良好, 无芽或根的发生
3	2.0	—	0.01	100	0	0	愈伤组织生长良好, 无芽或根的发生
4	0.5	—	0.1	100	0	0	愈伤组织生长良好, 无芽或根的发生
5	0.2	—	0.2	100	100	0	愈伤组织生长良好, 有小根生成
6	0.5	0.5	—	100	100	0	愈伤组织生长良好, 有小根生成
7	0.2	3.0	—	100	100	0	愈伤组织生长良好, 有小根生成
8	0.2	0.1	—	100	100	0	愈伤组织生长良好, 有小根生成
9	0.1	2.0	—	100	100	0	愈伤组织生长良好, 有小根生成

图2 叶片诱导的愈伤组织
Fig 2 Calli induced from leaves图3 凤仙花的再生植株
Fig 3 The infant shoot of *Impatiens balsamine* L.

3 结论

采用无菌扦插的方式, 利用组织培养技术筛选出了凤仙花初代和继代培养的最适培养基. 该方法增值速度快, 成本低, 培养方法简单. 更重要的是

在激素浓度很低或无激素培养基能进行扩繁, 可保持原种的优良性状. 凤仙材料本身容易受细菌感染, 常规的消毒方法对其不适宜, 初代培养污染率极高, 在90%以上, 需进一步实验探讨. 从继代

(下转第87页)

而 NAA 则抑制愈伤组织的形成; 细胞分裂素 KT 和 BA 均能促进高乌头愈伤组织的形成. 较好的激素组合为 BA 和 2,4-D, 其诱导最佳培养基是 B5+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+BA 1.0 mg·L⁻¹. 徐秀泉, 于荣敏, 赵昱等人^[11] 在黄花乌头 (*Aconitum Coreanum*) 愈伤组织诱导中也发现较好的激素组合为 BA 和 2,4-D.

高乌头外植体被诱导出愈伤组织后, 需通过继代培养使愈伤组织增殖生长. 实验表明, 高乌头愈伤组织增殖率较低, 在 B5+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹ 培养基下, 增殖效果相对较高, 增殖率可达 197.5%. 但随着 2,4-D 浓度增大到 3.0 mg·L⁻¹ 以上, 愈伤组织的增殖生长受到抑制, 说明过高或过低均不利于愈伤组织的生长. 李琰, 姜在民等^[12] 在研究杜仲叶片愈伤组织诱导和生长的实验中也得出相同的结论.

参考文献:

- [1] 中国西北高原生物研究所编著. 青海经济植物[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 8.
- [2] 韦壁瑜, 孔宪武, 赵起远, 等. 高乌甲素的化学成分[J]. 中药通报, 1981(6): 26.
- [3] 彭崇胜, 王建忠, 简锡贤, 等. 高乌头和彭州岩乌头中生物碱成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,

1999, 12(4): 45-52.

- [4] 彭崇胜, 陈东林, 陈巧鸿, 等. 高乌头根中新的二萜生物碱[J]. 有机化学, 2005, 25(10): 1235-1239.
- [5] 肖尊按. 植物生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 3.
- [6] 肖培根, 王锋鹏, 高峰, 等. 中国乌头属植物药用亲缘学研究[J]. 植物学报, 2006, 44(1): 1-37.
- [7] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 6.
- [8] 于荣敏, 徐秀泉, 赵昱, 等. 不同理化因子对黄花乌头花药愈伤组织诱导的影响[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2003, 24(6): 109-114.
- [9] 林静, 何毅. 乌头组培快繁的技术探讨[J]. 贵州科学, 1998, 16(2): 120-123.
- [10] 瞿素萍, 陈伟, 屈云慧, 等. 组织培养法快速繁殖川乌头种苗[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(4): 62-63.
- [11] 徐秀泉, 于荣敏, 赵昱. 药用植物黄花乌头植株再生系统的建立[J]. 中药材, 2004, 27(11): 797-799.
- [12] 李琰, 姜在民, 唐锐. 杜仲叶片愈伤组织诱导的激素优化研究[J]. 植物研究, 2006, 26(2): 182-186.

(责任编辑 孙晓玲)

(上接第 82 页)

看, 芽的诱导极其容易, 本实验中初代培养很低的芽诱导率受到高污染率的影响, 因而不具有普遍性, 愈伤组织培养中, 愈伤组织的诱导实验很成功, 愈伤组织的分化仅有根产生, 芽的分化尚需进一步实验.

参考文献:

- [1] 徐耀良, 陈艺林. 浙江凤仙花属新分类群[J]. 植物分类学报, 1999, 37(2): 194-200.
- [2] 熊源新. 贵州凤仙花属二新种[J]. 植物分类学报, 1996, 34(1): 98-101.

- [3] 陈艺林. 国产凤仙花属新种[J]. 植物分类学报, 1999, 37(1): 88-89.
- [4] 危建安, 谢琪. 凤仙花研究进展[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(2): 164-165.
- [5] 韦毅刚. 广西之植物新资讯[J]. 广西植物, 1998, 18(3): 226-228.
- [6] 凤仙花茎段培养与快速繁殖[J]. 辽宁师专学报, 2006, 8(3): 107-108.
- [7] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 10-74.

(责任编辑 陈广仁)