

蒙自凤仙花的离体保存^{*}

兰芹英, 殷寿华, 何惠英, 张艳军

(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

摘要: 对蒙自凤仙花茎尖的离体保存研究表明: 培养温度在 12℃、18℃和 24℃, 每天 12 h 光照(2 000 lx), 添加 1%~5% 甘露醇的 MS 培养基对茎尖的生长有抑制作用。最适保存条件为 12℃, 甘露醇含量为 3%, 保存 1 年后存活率为 100%; 存活的幼苗及茎尖接种于增殖培养基, 仍能正常生长、增殖和生根。
关键词: 蒙自凤仙花; 离体保存; 存活率; 甘露醇
中图分类号: Q943.1 文献标识码: A

In vitro conservation of *Impatiens mengtzeana*

LAN Qin-ying, YIN Shou-hua, HE Hui-ying ZHANG Yan-jun

(Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China)

Abstract: *In vitro* conservation of stem apex of *Impatiens mengtzeana* was studied in this paper. Growth was reduced by incubation at temperatures (12℃, 18℃ and 24℃) and 12 h photoperiod (2 000 lx) and by adding mannitol [1%~5% w/v] to the MS medium. Addition of mannitol (3.0% w/v) to the medium and incubation at low temperature (12℃) resulted in higher survival rate (100%) after one year of continuous storage. When surviving seedling and its stem apex were cultured on proliferation medium, they could normally multiply, root and regrowth.

Key words: *Impatiens mengtzeana*; *in vitro* conservation; survival rate; mannitol

云南西双版纳地区的凤仙花有 10 种, 其中野生种 7 种, 栽培种 3 种^[1], 花色多样, 鲜艳, 具有很高的观赏价值, 是一类很有开发潜力的野生花卉。但因生境片段化, 生存环境受到很大威胁, 而且其种子成熟时果壳爆裂, 野外很难收集种子, 故用种子保存的方法保存野生凤仙花种质资源, 难度较大。离体保存法将是有效的保存途径。国际上对野生花卉的离体保存研究较少, 国内亦未见报道。本实验以蒙自凤仙花为材料, 旨在研究它的离体保存条件和技术。

1 材料与方法

1.1 材料

蒙自凤仙花(*Impatiens mengtzeana* Hook. f.) 无菌试管苗用附加 BA 0.01 mg/L、NAA 0.1 mg/L、蔗糖 3%、琼脂 0.7%、pH 值 5.8±0.1 的 MS 培养基。在 24℃、2 000 lx (10 h/d) 的条件下培养 2 周, 取试管苗茎尖(1±0.1 cm, 具 3~4 片小叶)做离体保存实验。

1.2 离体保存条件

1.2 离体保存条件

保存培养基为甘露醇浓度 0、1%、3%、5% 的 MS 基本培养基。保存温度为 12℃、18℃、24℃。每个处理接种 32 个茎尖, 放置于 8 瓶培养基(40 mL/瓶)中, 用聚丙烯膜封口, 橡皮筋捆扎, 光照度 2 000 lx (10 h/d)。

1.3 存活率和恢复率的检测

保存后, 从第 3 个月开始, 每月观察存活率。植株从基部向上所有节间及叶片全部变黄的作死亡计算。将存活的苗或绿色的茎尖进行正常培养(增殖培

* 收稿日期: 2003-03-28; 修改稿收到日期: 2003-07-18
基金项目: 中国科学院“百人计划”项目; 中国科学院植物园工委资助项目(980 302)
作者简介: 兰芹英(1966-), 女(汉族), 实验师。

养), 能正常生长和增殖的, 作恢复率计算。

2 结 果

2.1 温度和甘露醇浓度对试管苗腋芽生长的影响

当保存温度为 12~24℃时, 对照的每个外植体新梢数随着温度的降低而减少。说明腋芽的萌动和生长需要较高的温度。低温则(如 12℃)明显地抑制腋芽的萌动和生长。甘露醇的浓度为 1%时, 每个外植体新梢数随着保存温度的降低而减少。但在相同

温度下, 与对照相比, 除 24℃保存 145 d 和 18℃保存 105 d 不同、每个外植体新梢数稍有下降外, 其他的都比对照高。尤其是在 12℃下, 保存培养 145 d, 每一外植体的新梢数比对照增加 72%。甘露醇的浓度为 3% 时, 与对照相比, 随着保存温度的下降, 新枝数或外植体下降不如对照那样明显; 5% 的甘露醇, 对腋芽的萌动和生长有较大的抑制效果, 这可能是甘露醇的浓度较高时, 会产生水分胁迫, 一方面抑制腋芽的萌动和生长, 另一方面又有低温保护作用。

表 1 温度和甘露醇浓度对保存植株新梢增殖的影响

保存温度 Conservation temperature(℃)	保存时间 Conservation time(d)	甘露醇浓度 Concentration of mannitol (%)			
		0	1	3	5
		芽数(个/株) Number of shoots explant (No. / plant)			
24	105	1.85	2.00	1.33	1.04
	145	6.00	5.68	2.78	1.48
18	105	1.83	1.67	1.26	1.14
	145	4.75	5.09	2.47	1.14
12	105	1.72	1.91	1.62	1.05
	145	2.13	3.66	1.94	1.06

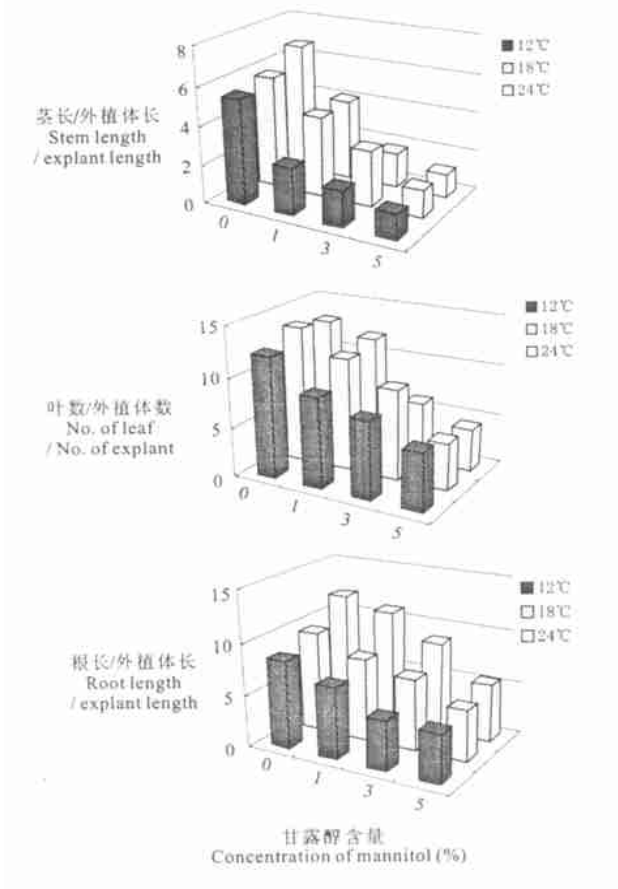


图 1 不同甘露醇浓度和温度对茎长度、叶片数和根数的影响 (保存 3 个月后)

Fig.1 Effects of mannitol and temperature on stem length, number of leaf and root of plant (after storage three months)

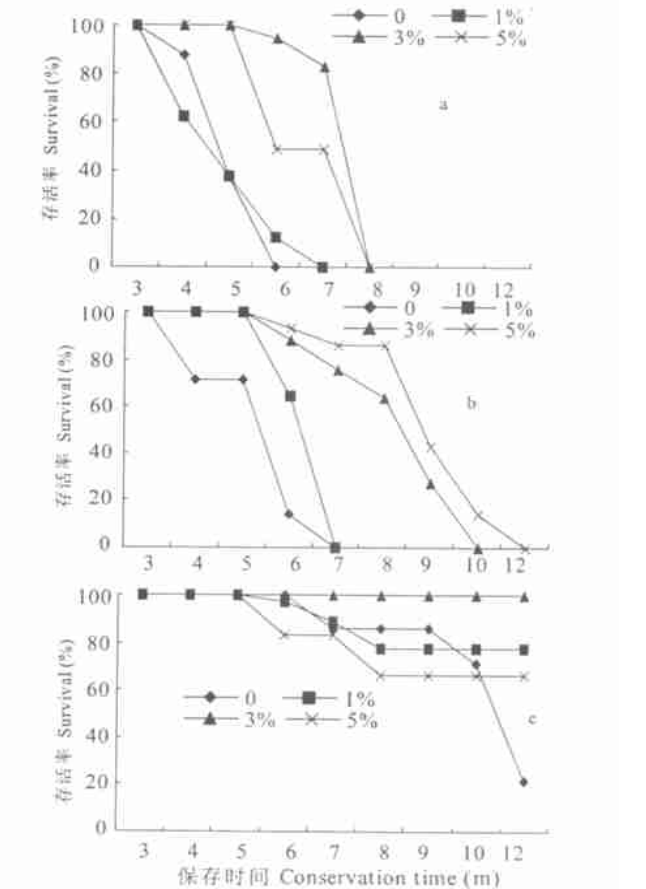


图 2 不同甘露醇浓度和保存温度对凤仙花植株存活的影响

Fig.2 Effects of mannitol and conservation temperature on survival of *Impatiens moutan* plant (a: 24°C; b: 18°C; c: 12°C)

2.2 甘露醇对保存植株的伸长以及叶片和根生长的影响

在相同温度下,随着甘露醇浓度的升高,植株的茎长度、叶片数和根数明显下降,即茎的伸长生长、叶片和根的形成受到明显抑制(图1)。

如温度为 24℃时,甘露醇的浓度由 0 增加到 5%,芽长由 6.71 cm 降为 1.18 cm,根数由 12 条/株降为 5.54 条/株,叶片由 13.63 片/株降为 4.25 片/株。

2.3 存活率和恢复率

图2表明,适宜的温度和甘露醇浓度,能使凤仙花离体保存寿命延长,存活率增加。从图2可见 12℃、甘露醇 3% 的保存效果最好,对照保存 10 个月存活率为 71.43%,12 个月为 21.43%;而甘露醇浓度为 1%、3%、5%,保存 12 个月,存活率分别为 77.8%、100%、66.67%。保存 12 个月后,存活的小植株或其茎尖接种于 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基中,温度 24℃,光照度 2 000 lx(10 h/d)下培养,能正常生长(叶片大小及茎节的长度和保存前一样),增殖和生根恢复率达 100%。

3 讨论

离体保存成功的试验表明,降低保存温度能很好地抑制生长,延长保存时间,提高存活率^[2],而植物的低温耐性与植物的原产地和植物的生长状态密切相关。热带植物在 14℃下保存往往是致死的^[3],

一般在 15℃以上保存,最适温度为 18~20℃。产于西双版纳的蒙自凤仙花在 12℃及 3%甘露醇的条件下保存最好,12 个月后,存活率达 100%(图2),这可能与生长在林下的蒙自凤仙花是耐阴植物有关。

蒙自凤仙花离体保存温度在 12℃、18℃、24℃,添加 1%、3% 和 5% 的甘露醇对生长有抑制作用,甘露醇浓度为 5% 的抑制作用更为明显。这是由于甘露醇降低了细胞的膨压^[4],增加了细胞的渗透势,使水分和养分吸收受阻^[5],导致地上部分和地下部分生长受阻,减少营养消耗,从而延长保存时间。甘露醇对不同物种的离体保存效果差异较大。苹果在 4℃及黑暗条件下保存,0.5%~1% 的甘露醇效果最好,12 个月后存活率为 87%^[6];箭叶黄体芋保存在 MS+3%甘露醇、13℃条件下,3 年后存活率为 100%^[7]。蒙自凤仙花的离体保存培养中,甘露醇对生长的抑制作用是与保存温度密切相关的,相同浓度的甘露醇,在低温下的抑制作用比在高温下大(图1)。因此在离体保存试验中,选择甘露醇浓度时,除了考虑物种的原产地及植物的生长习性外,还应考虑保存的温度及保存的时限。

存活的小植株和茎尖的恢复率与生长率不受保存培养基中甘露醇浓度的影响,其恢复率为 100%。植株的再生也不受影响,其叶片大小、节间长短同保存前没有差别。

参考文献:

- [1] LI Y H(李延辉), PEI S H J(裴盛基), XU Z F(许再富), *et al.* List of plants in Xishuangbanna. Xishuangbanna tropical botanical garden and department of ethnobotany[Z]. Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, 1996: 118–119.
- [2] NEELAM S, CHANDEL K P S. Low-temperature storage of *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz.: an endangered, endemic medicinal plant[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 200–203.
- [3] HENSHAW G G, *et al.* Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germplasm[J]. Ingram D S, Helgeson J P, *et al.* Tissue culture methods for plant pathologists[C]. Blackwell Scientific Publications, 1980: 71–76.
- [4] WANG D Y(王大元), LI J ZH(李建知), PENG S L(彭素兰), *et al.* Study on tissue culture methods for the storage of citrus germplasm[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 1979, 6(2): 95–97(in Chinese).
- [5] HUANG J H(黄菊辉). *In vitro* propagation and preservation of ginger germplasm resources[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 1995, 28(2): 24–30(in Chinese).
- [6] SHI Y ZH(史永忠), DENG X X(邓秀新), WANG S H Y(万蜀渊), *et al.* *In vitro* preservation of apple germplasm resources[J]. *Crop Genetic Resources*(作物品种资源), 1996, 4: 42–43(in Chinese).
- [7] ZANDVOORT E A, HULSHOF M J H, STARITSKY G. *In vitro* storage of *Xanthosoma* spp. under minimal growth conditions[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1994, 36: 309–316.