园 艺 学 报 2007, 34 (6): 1503 - 1508
Acta Horticulturae Sinica

凤仙花花逆转突变体的组织学研究

张秀丽[1], 李劲涛[1], 杨 军[1,2]*, 汤泽生[1]
([1] 西华师范大学生命科学学院, 四川南充 637002; [2] 西华师范大学珍稀动植物研究所, 四川南充 637002)

摘 要: 从经过卫星搭载的凤仙花种子后代中获得了可遗传的仅顶花叶化的花逆转突变体。该突变体保持了花的基本结构, 但是不同程度地出现了花瓣增厚, 变绿, 锯齿等现象, 雄蕊也片状化, 早衰或完全消失。组织学观察发现, 在叶化花瓣中出现了叶绿体和栅栏组织。统计分析结果表明, 叶化花瓣与正常花瓣相比, 组织结构上确实发生了显著变化。

关键词: 凤仙花; 花逆转; 石蜡切片; 雄蕊瓣化; 航天诱变

中图分类号: S 681.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2007) 06-1503-06

Histological Investigation on Floral Reversion of *Impatiens balsamina* L.

ZHANG Xiu-li[1], LI Jin-tao[1], YANG Jun[1,2]*, and TANG Ze-sheng[1]
([1]*College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan* 637002, *China*; [2]*Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong, Sichuan* 637002, *China*)

Abstract: The seeds of *Impatiens balsamina* L. were treated by space flight, and then heritable mutant plants with floral reversion occurring only in apical flower were obtained in the descendant generation. The mutants kept the basical floral structures, however, showed thicker green petals with serrate margin to some extent. Their stamens became petaloid, prematured even diminished. Histological investigation revealed that chloroplast and palisade tissue appeared in the leaf-like petals. Statistical analysis suggested that significant difference existed between the leaf-like petals and normal petals.

Key words: *Impatiens balsamina* L.; Flower reversion; Paraffin cut; Stamens stimulant of petal; Space-flight

开花逆转 (floral reversion) 也称成花逆转, 指已经开始花芽分化的分生组织在一定条件下重新转向叶片分化的现象 (吴存祥和韩天富, 2002)。

根据报道, 植物的开花逆转可分为4种类型: (1) 花逆转 (flower reversion): 花分生组织恢复到营养分生组织, 重新长叶, 上部形成带叶的营养茎, 下部为花器官。(2) 花序逆转 (inflorescence reversion): 花序轴上分生组织不再形成带苞花芽, 而是长出带叶的营养枝条。(3) 部分开花 (partial flowering): 开花植株上长出营养芽, 重新恢复营养生长。(4) 整株逆转 (whole-plant reversion): 已经开花的植株, 原有花果大量脱落, 恢复到旺盛的营养生长状态 (Battey & Lydon, 1990; 韩天富等, 1998; 白素兰 等, 2000)。

作者通过将种子搭载卫星的方法获得了可遗传的凤仙花花逆转突变体, 并且其表型不同于以上4种花逆转类型。作者对该突变体进行形态观察, 并选取具有代表性植株的花器官作组织学研究, 获得了一些有益的结果, 报道如下。

收稿日期: 2007-04-04; **修回日期**: 2007-06-18
基金项目: 四川省科技厅应用基础项目 (JY029-055-2); 四川省重点学科建设项目 (SZD0420)
* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yangjunlz@tom.com)

1 材料与方法

1.1 材料

将经过试种观察的凤仙花的干种子于2002年12月30日搭载“神舟4号”飞船，并保留一部分同种种子作对照。2003年种植SP_1、SP_2代，在2004年的SP_3代中发现有顶花叶化的花逆转突变体。经单株收种后于2005年种植SP_4代，2006年按2005年方法种植SP_5代。对试验材料进行常规施肥、喷水和管理。

1.2 形态学观察

将SP_5代的突变株与对照植株作形态学对比分析，然后选取两类具有代表性的突变株，对花器官作解剖分析，并根据花瓣位置及特征进行分组归类。

1.3 组织学研究

将以上分组归类的花瓣用卡诺固定液分别固定，常规石蜡制片，切片厚度10 μm，番红—固绿染色，MOTICAM2006显微成像系统观察、拍照。再用同样的方法对对照组花瓣、花萼、叶片分别处理，然后对比分析。

分别统计各组叶化花瓣（发生逆转的突变体的花瓣有向叶片发育的倾向，所以称这种花瓣为叶化花瓣）、正常花瓣和叶片中主脉维管的数量、维管组织之间的距离、横切面最宽处的厚度、叶绿体的大小（以长轴为准），然后用SPSS 13.0作统计学分析。

2 结果与分析

2.1 突变体的发现

花逆转突变体是在SP_3代中首次发现的，经单株收种种植，在SP_4代的群体中有52.8%的植株（72株中有38株）顶花有花逆转现象。而SP_4后代（SP_5代）有超过80%的植株表现出花逆转现象（图1，A）。

2.2 突变体的形态特征

正常花瓣没有主脉，但叶化花瓣有明显的主脉而且出现不同程度的绿化、加厚，有的甚至出现叶尖、锯齿（图1，B）。观察发现，花逆转的植株通常雄蕊出现早衰（花瓣展开后不久雄蕊枯萎），瓣化（雄蕊变成片状，且花药不同程度变黑）（图1，C），甚至完全消失的现象。

在SP_5代的突变体植株中随机取35株花逆转植株进行统计，有15株雄蕊发生早衰，占42.9%；有8株缺失，占22.9%；有12株瓣化，占34.2%。在所观察到的顶花逆转的凤仙花中，紫色花、粉色花、红花均可发生逆转。

选取具有代表性的两类花逆转突变株分别标记为T1和T2。其中T1类植株的叶化程度较高，花瓣较厚，雄蕊早衰；T2类植株的叶化程度较轻，花瓣较薄，除花瓣颜色变化外，其他特征与正常花无明显区别。

通过从外到内逐一解剖突变体的花瓣，发现T1类植株的外围花瓣的叶化程度均很高。根据叶化程度可以将T1类植株的花瓣分为3层，其中外层花瓣为深绿色，称为1A组；中间几层花瓣呈浅绿色，称为1B组；内层花瓣呈粉红色且花瓣上有绿色斑点分布，称为1C组。而T2类植株花瓣的叶化程度较轻，只能分为两层：外层花瓣为嫩绿色，称2A组；内层花瓣与正常花瓣基本类似，颜色稍显绿色，称2B组。

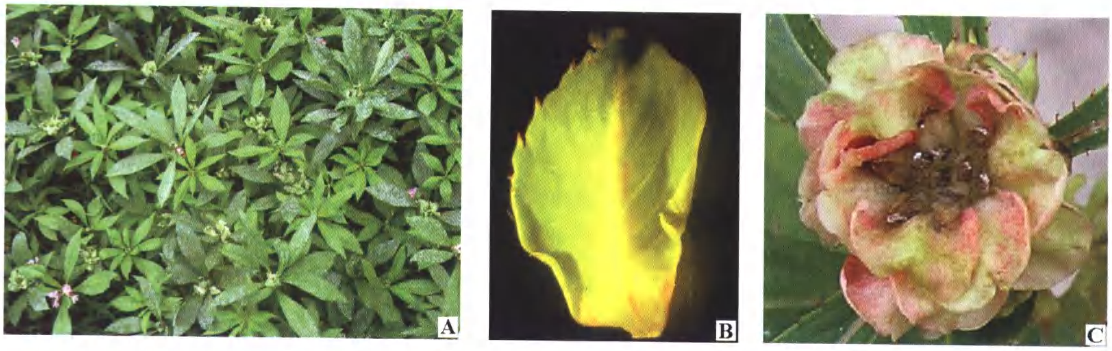

图 1 凤仙花的花逆转形态特征

A. SP_5代中的花逆转突变体；B. 叶化花瓣的叶尖、锯齿；C. 花叶化伴随的雄蕊瓣化。

Fig. 1 Floral reversion of *Impatiens balsamina* L.

A. Mutant plants wirh floal reversion in SP_5; B. Leaf apex and serrature of leaf-like petal; C. The petaloid stamen of reversed flower.

2.3 组织学观察

正常花瓣表皮有乳头状突起（图 2，A），叶化花瓣表皮乳头状突起不明显或者消失（图 2，C）。

正常花瓣表皮无表皮毛（图 2，A），花萼表皮有极少量的表皮毛；叶化花瓣表皮出现表皮毛（图 2，E）。

正常花瓣中没有质体（图 2，A），花萼有叶绿体（图 2，F）；叶化花瓣中不同程度地出现了叶绿体（图 2，B 和 C），但比正常叶片中的叶绿体（图 2，D）小。

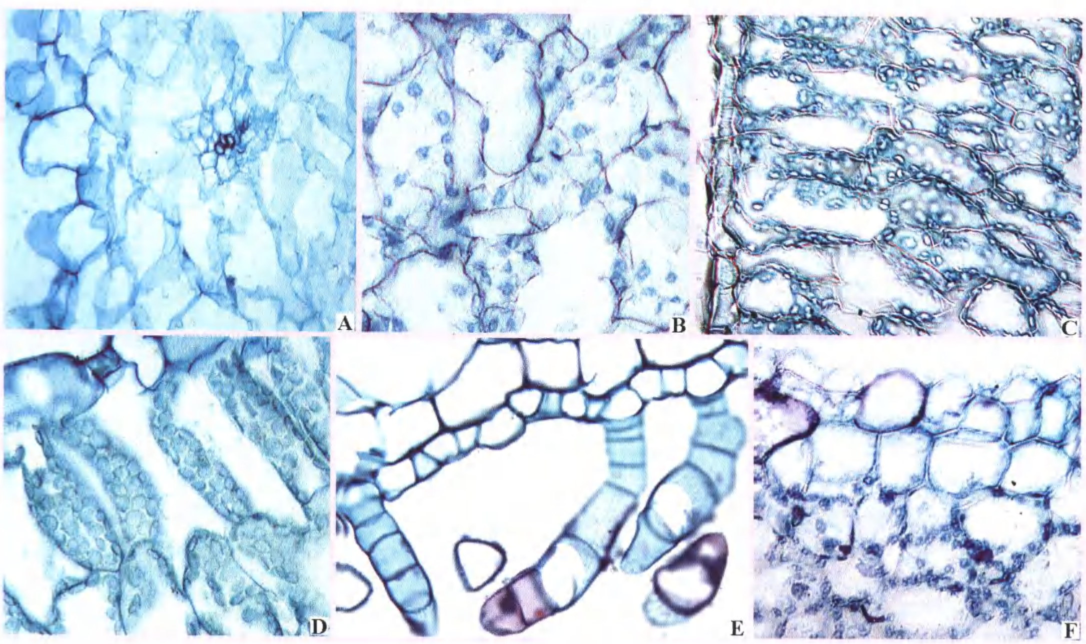

图 2 凤仙花花瓣的石蜡切片

A. 正常花瓣横切面结构；B. 叶化花瓣中的叶绿体；C. 叶化花瓣中的栅栏组织；D. 正常叶片的横切面；E. 叶化花瓣表皮的表皮毛；F. 正常花萼的横切面。

Fig. 2 Paraffin cuts of petals in *I. balsamina*

A. Structure of normal petal; B. Chloroplast of leaf-like petal; C. Palisade tissue of leaf-like petal; D. Structure of normal leaf; E. Epidermal hair of leaf-like petal's surface layer; F. Structure of normal calyces.

正常花瓣和花萼中只有薄壁组织，叶化花瓣有栅栏组织细胞出现或者已经有分化完全的栅栏组织（图2，C）。

通过比较各代表植株中各层花瓣的组织学特征发现，T1类植株花冠外层的1A组花瓣出现了栅栏组织，而中层和内层的1B组、1C组花瓣中无栅栏组织；1A、1B、1C中均出现了叶绿体，且1A中的叶绿体数量和大小均大于1B、1C两组。T2类植株花冠外层的2A组花瓣中出现了叶绿体，而内层的2B组花瓣中无叶绿体。

表1归纳了T1和T2类植株的组织结构的差异。从表1中可以看出，T1类的叶化程度大于T2类，这与形态学观察的结果相一致。

表1 突变体凤仙花花瓣的组织结构特征

Table 1 Histological characters of petals in mutant plants of *I. balsamina*

突变体 Mutant	分组 Group	乳头状突起 Mastoid protuberance	栅栏组织 Palisade tissue	叶绿体 Chloroplast	表皮毛 Epidermal hair
T1	1A	无 No	有，较明显 Yes, obvious	有（多且大） Yes (numerous and bigger)	无 No
	1B	无 No	无 No	有 Yes	有 Yes
	1C	无 No	无 No	有 Yes	有 Yes
T2	2A	有，但不明显 Yes, but not obvious	无 No	有 Yes	无 No
	2B	有，但不明显 Yes, but not obvious	无 No	无 No	无 No

2.4 组织学比较及分析

依次从外层到内层分别对T1类植株不同类型的叶化花瓣、正常叶片和正常花瓣中主脉维管的数量、维管组织之间的距离、横切面最宽处的厚度、叶绿体的大小等进行测量记数，用SPSS 13.0进行统计分析。

通过对主脉维管的数量、维管组织之间的距离、横切面最宽处的厚度的统计数据进行齐性方差分析，发现3种因素均表现为方差不齐，因此不能采用最小差异显著法分析，而只能改用Tamhane法分析。

Tamhane法分析的结果：T1类植株的叶化花瓣与正常花瓣、正常叶片在主脉维管数量、最宽处厚度、维管组织之间的距离等方面都存在显著差异（$P<0.05$）。其叶化花瓣1A、1B、1C 3组之间在主脉维管数量、最宽处厚度方面也存在显著差异（$P<0.05$），但在维管组织之间的距离上没有显著差异。

T1类植株叶化花瓣主脉维管数多于正常花瓣，但远少于正常叶片主脉中的维管数；叶化花瓣从1A组到1C组，即从外层到内层，主脉中维管逐渐减少。

总体来说，T1植株叶化花瓣的厚度大于正常花瓣，但小于正常叶片；叶化花瓣1A、1B、1C组中，1B组的厚度远大于1A组和1C组，1A组的厚度又大于1C组，也就是说叶化花瓣从外层到内层的厚度并不是依次减小。

T1植株叶化花瓣的维管组织之间的距离小于正常花瓣，即叶化花瓣的维管组织比正常花瓣发达。

对叶绿体大小的统计数据作齐性方差分析，结果方差不齐；采用开平方的方法进行数据转换，取平方根进行方差分析，结果方差具有齐性，因此可采用最小差异显著法分析。

最小差异显著法的结果说明：叶化花瓣与正常叶片中叶绿体的大小存在显著差异。外层的1A组叶化花瓣分别与位于中层和内层的1B、1C组叶化花瓣在叶绿体大小上也存在显著差异，但1B组与1C组在叶绿体大小上没有显著差异。1A组叶化花瓣中叶绿体比1B组与1C组中的大（图3）。

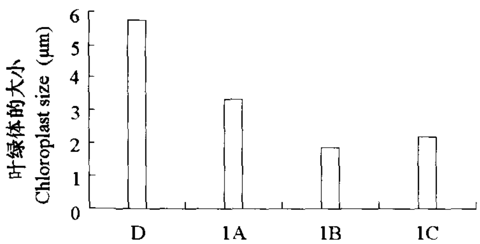

图3 叶绿体大小变化的趋势

D. 正常叶片；1A. 叶化花瓣1A组；1B. 叶化花瓣1B组；1C. 叶化花瓣1C组。

Fig. 3 The variance of chloroplast in size

D. Normal leaf; 1A. Leaf-like petal of 1A group; 1B. Leaf-like petal of 1B group; 1C. Leaf-like petal of 1C group.

3 讨论

为研究花发育的机理，通常采用改变光周期或者用激素处理的方法，使已经开花植株重新形成叶分生组织（吴存祥和韩天富，2002），这种方法的优越性是能够有效地控制使花器官发生逆转的外部条件，从而有利于探讨这种逆转过程与环境因素的关系。但是，通常通过这种方式得到的花逆转现象不能遗传。

作者从卫星搭载的种子萌发的后代中选育出了花叶化的突变体，其主要特征为顶花叶化（有时侧枝顶花也叶化），而其余部位的花器官正常，可以遗传。

花逆转现象说明花是茎的变态，花萼、苞片、花瓣、心皮是叶的变态（Arber，1937，1946；Li et al.，2005）。

通过卫星搭载获得的这种花逆转突变体保持了花的基本结构，即仍然具备花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊，但是不同程度地出现了花瓣增厚、变绿、出现锯齿等现象，雄蕊也瓣化、早衰或完全消失。通过组织学观察发现在叶化花瓣中出现了叶绿体和栅栏组织。统计分析的结果表明叶化花瓣与正常花瓣相比组织结构上确实发生了显著变化，并且花逆转程度与叶绿体直径、主脉维管的数量变化呈正相关，叶化花瓣与正常花瓣相比厚度增加，维管组织也变得发达。这不仅表明叶化花瓣与叶有很多的相似性，也说明花与叶是同源的。

Pouteau等（1997）通过改变光周期结合去除子叶或叶片的方法证明，子叶可产生开花信号诱导开花，当植株从短日照条件转移到长日照条件下时这种信号会逐渐减弱甚至消失；而且花逆转的发生与短日诱导处理的时间有关。

Tooke和Battey（2000）认为逆转发生的能力与植株本身的幼嫩程度有关。本试验获得的材料未经过光周期诱导且在正常开花时期叶化顶花与侧花同时开放，不过只有顶花发生逆转，因此这种花逆转的发生与光周期处理无关，与植株的幼嫩程度也无关。

Battey（1985）的试验表明花逆转的发生与花色有关，在光周期诱导的条件下仅红色凤仙花可发生逆转。但Tooke等（1998）在光周期诱导的条件下通过移除叶片的方法使得紫色凤仙花发生了逆转。在本试验中，紫色和红色的凤仙花均可发生逆转，说明花逆转的发生与花色无关，这与Tooke（2005）通过杂交试验获得的结果一致。

关于凤仙花花逆转的分子机理方面，Pouteau等（1997）通过研究*Imp-squa*和*Imp-flo*基因在营养生长、开花和逆转3种状态植株中的表达状况发现：*Imp-squa*基因的转录与花瓣原基的形成有关，但与雄蕊原基及雌蕊原基的形成无关；在通过光周期诱导获得的逆转植株中*Imp-squa*基因的表达微弱，

甚至检测不到表达。需要说明的是，这些基因的克隆和表达均是在改变光周期的情况下获得的，而作者所获得的这种仅顶花叶化的花逆转突变体是可遗传的突变体，与光周期无关。这种现象是否与 *Imp-squa* 和 *Imp-flo* 基因有关，有待深入研究。

本试验通过组织学研究证实所获得的突变体为花逆转的突变体，表现出仅顶花叶化且是可遗传的，这将为进一步研究开花的分子机理提供良好的素材，也为进行原位杂交等分子生物学研究提供了参考资料。

References

Arber A. 1937. The interpretation of the flower: a study of some aspects of morphological thought. Biological Reviews, 12: 157 - 184.

Arber A. 1946. Goethe's botany. Chronica Botanica, 10: 67 - 124.

Bai Su-lan, Xie Zhong-wen, Liu Yong-sheng, Sun Jing-san. 2000. Flowering reversion of plants. Plant Physiology Communications, 36 (3): 252 -257. (in Chinese)

白素兰，谢中稳，刘永胜，孙敬三. 2000. 植物的成花逆转. 植物生理学通讯, 36 (3): 252 -257.

Battey N. 1985. Growth and development at the shoot apex of *Impatiens balsamina* L. during flowering and reversion [Ph. D. Dissertation]. Edinburgh: University of Edinburgh.

Battey N, Lydon R. 1990. Reversion of flowering. Botanical Review, 56: 162 - 189.

Han Tian-fu, Gai Jun-yi, Wang Jin-ling, Zhou Dong-xing. 1998. Discovery of flowering reversion in soybean plant. Acta Agronomica Sinica, 24 (2): 168 - 171. (in Chinese)

韩天富，盖钧镒，王金陵，周东兴. 1998. 大豆开花逆转现象的发现. 作物学报, 24 (2): 168 - 171.

Li Xiao-mei, Wu Cun-xiang, Ma Qi-bin, Zhang Sheng, Li Chun-lin, Zhang Xin-ying, Han Tian-fu. 2005. Morphology and anatomy of the differentiation of flower buds and the process of flowering reversion in soybean cv. Zigongdongdou. Acta Agronomica Sinica, 31 (11): 1437 - 1442.

李晓梅，吴存祥，马启彬，张 胜，李春林，张新英，韩天富. 2005. 大豆品种自贡冬豆花芽分化及开花逆转过程的形态解剖学研究. 作物学报, 31 (11): 1437 - 1442. (in English)

Pouteau S, Nicholls D, Tooke F, Coen E, Battey N. 1997. The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*. Development, 124: 3343 - 3351.

Tooke F, Battey N. 2000. A leaf-derived signal is a quantitative determinant of floral form in *Impatiens*. The Plant Cell, 12: 1837 - 1847.

Tooke F, Ordidge M, Chiurugwi T, Battey N. 2005. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. Journal of Experimental Botany, 56 (420): 2587 -2599.

Tooke F, Pouteau S, Battey N. 1998. Non-reversion of *Impatiens* in the absence of meristem commitment. Journal of Experimental Botany, 49: 1681 - 1688.

Wu Cun-xiang, Han Tian-fu. 2002. Progress in study of flowering reversion in plants. Chinese Bulletin of Botany, 19 (5): 523 -529. (in Chinese)

吴存祥，韩天富. 2002. 植物开花逆转研究进展. 植物学通报, 19 (5): 523 -529.