

三角紫叶酢浆草组培快繁技术的研究

王钰¹, 阮龙², 武廷章¹, 吴瑾华³, 谢继峰¹, 吴林¹, 吴飞¹

(1. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039; 2. 安徽省农业科学院烟草研究所, 凤阳 233100;

3. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要:以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 IBA、NAA、KT 和 BA 进行正交试验 $L_9(4 \times 2^4)$, 研究酢浆草组织培养、快速繁殖和壮苗的技术。结果表明: (1) 酢浆草叶片、叶柄分化的最优培养基为 MS + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种后 40 d 芽诱导率可达 40%; (2) 酢浆草试管苗快速增殖培养基为 MS + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 28 d 簇生苗新生叶可达 71.0 片; (3) 酢浆草试管苗壮苗培养基为 MS + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 酢浆草试管苗的叶片最宽达到 2.20 cm, 叶柄最粗达到 1.57 mm, 叶柄最长达到 12.00 cm, 并有根状茎生成。

关键词: 酢浆草; 组培快繁; 正交试验

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2006)02-0230-04

Tissue culture and multiplication of *Oxalis triangularis*

WANG Yu¹, RUAN Long², WU Ting-zhang¹, WU Jin-hua³, XIE Ji-feng¹, WU Lin¹, WU Fei¹

(1. School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039;

2. Anhui Tobacco Institute, Anhui Academy of Agricultural Science, Fengyang 233100;

3. School of Life Science and Technique, University of Science & Technology of Huazhong, Wuhan 430074)

Abstract: In the experiment, MS medium was used as basic medium, and orthogonal test of different IBA, NAA, KT and BA levels was designed to study tissue culture, multiplication and strengthening technique of *Oxalis triangularis*. The result shows: (1) The optimum medium is MS + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for induction, and 40% is induced after 40 days inoculation; (2) The optimum medium is MS + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for multiplication, and newly born leaves of fascicled seedling can add up to 71.0 after 28 days; (3) The optimum medium for rejuvenation is MS + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, *Oxalis* leaves width *in vitro* reach 2.20 cm, petiole thickness reach 1.57 mm, petiole length reach 12.00 cm, meanwhile, root form stems are also observed.

Key words: *Oxalis triangularis*; tissue culture; orthogonal test

三角紫叶酢浆草 (*Oxalis triangularis*) 是酢浆草科多年生常绿草本, 原产于热带美洲, 是一种优良的地被植物, 叶丛生, 具长柄, 三小叶阔倒三角形, 顶端凹缺, 紫红色; 到了晚上叶片合拢, 独具特色。与草坪相比, 地被植物的应用与生产一直未受到足够的重视。酢浆草叶片颜色十分鲜艳, 国外学者曾研

究过酢浆草叶片中花青素的提取及在食品中的应用^[1,2]。

酢浆草的繁殖, 过去一般都采用切分块茎的方法, 使每块块茎都具有突起的芽或茎叶, 带土扦插, 但这样的繁殖速度慢, 远远不能满足市场的需要。有关植物组织培养和快速繁殖的研究很多^[3,4], W L

收稿日期: 2005-08-26

基金项目: 安徽省科技攻关项目(03013003)资助。

作者简介: 王钰(1957-), 女, 教授。E-mail: yuwang800@hotmail.com

Teng 和李霖等人曾报道了紫叶酢浆草 (*Oxalisviolacea L.*) 的组织培养研究结果^[5,6]。对三角紫叶酢浆草组培快繁的研究尚少见报道,为此,作者对其组培快繁技术进行系统研究,具有一定的生产和应用价值。

1 材料与方法

1.1 供试材料

三角紫叶酢浆草 (*Oxalis triangularis*) 叶片和叶柄。

表 1 3 因素的正交试验方案

Table 1 Orthogonal test of three factors

试验号 Test No.	A/mg·L ⁻¹ 1	B/mg·L ⁻¹ 2	C/mg·L ⁻¹ 3	4	5
1	1(0.0:0.5)	1(0.0)	1(0.0)	1	1
2	1	2(1.0)	2(1.0)	2	2
3	2(0.5:0.0)	1	1	2	2
4	2	2	2	1	1
5	3(0.5:0.5)	1	2	1	2
6	3	2	1	2	1
7	4(1.0:0.5)	1	2	2	1
8	4	2	1	1	2

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 试验按 3 因素不等水平的正交设计进行,采用 L₈(4×2⁴) 混合表,A 因素为 IBA 和 NAA 的不同配比,设 4 个水平为(0:0.5)、(0.5:0)、(0.5:0.5)、(1.0:1.0);B 因素为 KT 的两个水平 0、1.0 mg·L⁻¹和 C 因素为 BA 的两个水平 0、1.0 mg·L⁻¹。试验方案如表 1。

1.2.2 培养基的配制 以 MS 为基本培养基,按以上 8 种处理进行配制。每升培养基加琼脂粉 6.5 g,蔗糖 25 g,pH 值调至 5.8,采用常规灭菌。

1.2.3 接种 研究酢浆草叶片、叶柄分化试验的材料,取盆栽紫叶酢浆草叶片与叶柄,流水洗净,用 70% 酒精浸洗 30 s,无菌水冲洗 1 遍,再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 4 min,无菌水冲洗 6~8 次,将叶片和叶柄切成小段后分别接种在 8 种培养基上,每个处理 10 管,每管接种 1 个外植体。

研究酢浆草试管苗快速增殖及壮苗试验的材料,取生长一致的酢浆草试管苗,剪去簇生苗叶片(便于酢浆草试管苗快速增殖试验中新生叶的统计),留下簇生苗基部,接种在 8 种培养基上,每个处理 10 瓶,每瓶接种 1 块材料(残留 10 支左右叶柄的簇生苗基部)。全部试验共做 3 次重复。

1.2.4 培养条件 将接种好的试管及培养瓶移入培养室,培养室温度保持在 25℃ 左右,光强 3 000 lx,光照时间 14 h。

1.2.5 观察记录 统计叶片和叶柄在 8 种培养基上分化出苗的情况和出芽率;簇生苗接种后 28 d 统计试管苗生长情况。数据分析采用 SAS6.0 软件。

2 结果与分析

2.1 不同因素处理对叶片、叶柄生长与分化的影响

将叶片分别接种在 8 种培养基上,在 1 号和 8 号培养基上的叶片颜色渐褪去,25 d 后,从叶片切口边缘出现白色愈伤组织,35 d 后开始由愈伤组织中生出大量根,45 d 后 8 号培养基上长出小苗。在 2 号培养基上的叶片只出现愈伤组织。在 3 号、4 号培养基上的叶片无明显变化。在 5 号、6 号、7 号培养基上的叶片 5 d 后颜色变浅,20 d 开始出现愈伤组织,40 d 后开始出现小苗。40 d 后叶片出芽率见表 2,6 号出芽率最高为 40%。

表 2 不同因素对酢浆草叶片和叶柄分化出芽率的影响

Table 2 Effects of different factors on germination rates of leaves and petiole of *Oxalis triangularis*

试验号 No.	叶片出芽率/% Germination rate of the leaves	叶柄出芽率/% Germination rate of the petiole
1	0	10
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	30	30
6	40	40
7	10	20
8	0	20

注:接种后 40 d 调查的出芽率。

Note: The germination rates are the results of 40 days after inoculation.

将叶柄切成小段后接种在8种培养基上,在1号、6号、8号培养基上的叶柄15 d后叶柄渐透明,两端膨大,25 d后,以膨大处为中心,生出大量的根,呈放射状分布,根的表面有白色绒毛覆盖,此白色绒毛组织即为组培途径中伴随小苗形成过程出现的愈伤组织,40 d后由放射状根部的中心长出小苗。在5号、7号培养基上的叶柄20 d后两端长出

愈伤组织,40 d后由愈伤组织处长出小苗。在2号培养基上的叶柄两端只长出愈伤组织。在3号、4号培养基上的叶柄无明显变化。40 d后叶柄出芽率见表2,6号出苗率最高为40%。

由上述结果可见,A因素中IBA和NAA的(0.5:0.5)浓度配比与KT(1.0)配合使用,对叶片、叶柄诱导长苗的效果都较好,出芽率也较高。

表3 不同因素对酢浆草快繁各性状的影响

Table 3 Effects of different factors on multiplication traits of *Oxalis triangularis*

试验号 Test No.	新生叶/片 New born leaves	叶片宽/cm Width of leaves	叶柄粗/mm Petiole thickness	叶柄长/cm Length of petiole	根状茎/个 Number of stem from root
1	18.7	2.20	1.57	12.00	3.7
2	61.0	1.57	1.34	6.67	0.0
3	18.7	1.57	1.00	7.33	2.7
4	71.0	1.87	1.24	9.33	0.0
5	61.0	1.73	1.21	11.33	0.0
6	21.7	1.67	0.95	7.33	3.3
7	62.7	1.83	1.21	8.33	0.0
8	28.0	1.53	1.03	7.33	2.7

表4 不同因素对酢浆草快繁各性状的方差分析

Table 4 Variance analysis of different factors on multiplication traits of *Oxalis triangularis*

因素 Factors	新生叶/片 New born leaves	因素 Factors	叶片宽/cm Width of leaves	因素 Factors	叶柄粗/mm Petiole thickness	因素 Factors	叶柄长/cm Length of petiole
A	2	A	1	A	1	A	1
	44.8 ^a		1.88 ^a		1.45 ^a		9.33 ^a
	4		2		2		3
	44.3 ^a		1.72 ^a		1.12 ^b		9.33 ^a
	3		3		4		2
	41.4 ^b		1.70 ^a		1.12 ^b		8.33 ^b
	1		4		3		4
	39.8 ^b		1.68 ^a		1.08 ^b		7.83 ^b
B	2	B	1	B	1	B	1
	45.4 ^a		1.83 ^a		1.25 ^a		9.75 ^a
	1		2		2		2
	40.3 ^b		1.66 ^b		1.14 ^b		7.67 ^b
C	2	C	2	C	2	C	2
	63.8 ^a		1.75 ^a		1.25 ^a		8.92 ^a
	1		1		1		1
	21.8 ^b		1.74 ^a		1.14 ^b		8.50 ^a

注:同列数值中带不同上标的字母表示在0.05水平上差异显著。

Note: The values with different upper script in the same column indicate there were significant different between them at 0.05 levels.

2.2 不同因素对酢浆草快繁及壮苗各性状的影响

将剪去叶柄和叶片的簇生苗基部分别接种在8种培养基上,28 d后的培养结果(见表3和表4)表明,不同因素不等水平的组合对酢浆草快繁各性状的影响明显不同。

2.2.1 新叶快速增殖 酢浆草试管苗繁殖速度取决于新生叶的速度,A因素的2、4水平对新叶的快速增殖明显高于1、3水平,差异达到显著,2水平新生叶平均44.8片,最高为71.0片;B因素的2水平对新叶的快速增殖明显高于1水平,差异达到显著,2水平新生叶平均45.4片,最高为71.0片;C因素

的2水平对新叶的快速增殖明显高于1水平,差异达到显著水平,2水平新生叶平均63.8片,最高为71.0片。

2.2.2 壮苗培养 提高酢浆草试管苗移栽成活率,壮苗培养是关键。

A因素的4个水平对叶片增宽的培养差异不明显;对叶柄增粗的培养,1水平明显粗于2、3、4水平,差异达到显著,1水平叶柄平均粗1.45 mm,最粗达到1.57 mm;对叶柄增长的培养,1、2水平明显长于3、4水平,差异达到显著,1、2水平叶柄平均长9.33 cm,最长达12.00 cm。

B 因素的两水平对叶片宽的培养差异明显,1 水平明显宽于 2 水平,差异达到显著,1 水平叶片平均宽 1.83 cm,最宽达到 2.20 cm;对叶柄粗的培养,1 水平明显粗于 2 水平,差异达到显著,1 水平叶柄平均粗 1.25 mm,最粗达到 1.57 mm;对叶柄长的培养,1 水平明显长于 2 水平,差异达到显著,1 水平叶柄平均长 9.75 cm,最长达到 12.00 cm。

C 因素的两水平对叶片宽的培养差异不明显;对叶柄粗的培养,2 水平明显粗于 1 水平,差异达到显著,2 水平叶柄平均粗 1.25 mm,最粗达到 1.34 mm;对叶柄长的培养差异不明显。

IBA、NAA 单独使用可培养出根状茎,IBA、NAA 和 KT(1.0) 配合使用也可培养出根状茎,但和 BA(1.0) 配合使用后无根状茎形成。

3 小结与讨论

各因素不同水平的组合中 $A_3B_2C_1$ 对酢浆草叶片、叶柄的分化效果最好,即 IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 这个组合为酢浆草叶片、叶柄分化的最优组合,接种后 40 d 芽诱导率可达 40%。

各因素不同水平的组合中 $A_2B_2C_2$ 对酢浆草试管苗快速增殖培养效果最佳,即 IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 这个组合为酢浆草试管苗快速增殖的最优组合,28 d 新生叶最高可达 71.0 片。

各因素不同水平的组合中 $A_1B_1C_1$ 对酢浆草试管苗壮苗培养效果最佳,即采用 NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 这个组合为酢浆草试管苗壮苗培养的最优组合,酢浆草试管苗的叶片最宽达到 2.20 cm,叶柄最粗达到 1.57 mm、叶柄最长达到 12.00 cm,并有根状茎生成。带有根状茎的试管苗移栽成活率 100%。

本试验以酢浆草的叶片、叶柄及酢浆草的试管苗为供试材料,采用的 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交试验研究其组织培养、快速繁殖和壮苗的技术,结果较好,选择出适宜酢浆草叶片、叶柄分化培养基,快速增殖培养基,以及壮苗培养基。根据前人研究结果^[1],试验中只选取了对酢浆草组织培养中影响较大的 IBA、NAA、KT 和 BA 4 个因素,以及几个经验的水平^[2,3],是否还有更适宜的培养基有待进一步试验。

本试验所用试管苗接种材料为 6 号培养基中培养的酢浆草试管苗,剪去簇生苗叶柄及叶片是为了调查的方便,是否对试验结果有影响以及其它培养基中培养的试管苗是否具有同样结果,有待于进一步试验。

参考文献:

- [1] Torgils Fossen, Saleh Rayyan, Maya H Andersen. Acylated anthocyanins from leaves of *Oxalis triangularis* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(10): 1133-1140.
- [2] Alexandra Pazmiño-Durán E, Mónica Giusti M, Ronald E Wrolstad, et al. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants [J]. *Food Chemistry*, 2001, 75(2): 211-216.
- [3] 颜昌敬. 植物组织培养手册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1990.
- [4] 王钰, 阮龙, 严平. 速生杨 110 的组培快繁技术的研究 [J]. *植物组织培养与试管育苗*, 2004(2): 146-149.
- [5] Teng W L, Ngai Y W. Regeneration of *Oxalis triangularis* ssp. *triangularis* from suspension cells cultured in three different systems (solid, liquid-flask and bioreactor cultures) [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18: 701-706.
- [6] 李霖, 宋宜颖, 鲁润龙, 等. 紫叶酢浆草的组织培养 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(4): 360-360.