

三角紫叶酢浆草的组织培养

胡国富, 李凤兰, 胡宝忠

(东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以三角紫叶酢浆草(*Oxalis triangularis* Subeg. triang)的叶片、叶柄为外植体进行组织快繁研究。通过正交试验设计并结合方差分析,探讨了三角紫叶酢浆草离体培养的最佳外植体及培养基,其试验结果表明:(1)叶片为最佳外植体,以叶片为外植体,MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 0.9%为愈伤诱导的最佳培养基,其诱导率为93.3%。(2)生根培养中以 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 0.8%为最好,生根率93.8%。

关键词:三角紫叶酢浆草;组培快繁;愈伤组织

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)06-0176-03

三角紫叶酢浆草(*Oxalis triangularis* Subeg. Triang)又名感应草、浅紫花酢浆草,为酢浆草科酢浆草属植物,多年生草本植物,原产热带美洲,叶色为深紫色,叶片中有人字形浅玫瑰红斑纹,白天似翩翩起舞的紫色蝴蝶,晚上叶片合拢,又似困倦的少女抱膝而眠,独具特色,趣味无穷。其花淡雅清香,花期4~11月,长达8个月,其艳丽的色彩及奇特的叶形,适作盆花及地栽于林缘、布置花坛、花台、草坪等。三角紫叶酢浆草繁殖多采用切分块茎的方法,但繁殖速度慢,也可用种子繁殖,但其结种率低,周期长。因此,通过对其进行离体培养,增加其繁殖效率,为其应用范围的拓广具有巨大的价值。由于酢浆草主要培养和栽培研究局限于安徽一带,和北方物候差异较大。所以,对其组织培养的研究主要集中在长江以南地区^[1,3,6,8],而对于北方地区酢浆草的快繁体系建立,还未见报道。研究利用组织培养建立适应北方物候的三角紫叶酢浆草快速繁殖体系,为三角紫叶酢浆草在北方园艺的绿化和妆扮中发挥更大的优势提高依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究取自盆栽的三角紫叶酢浆草,以叶片和叶柄作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体及消毒时间的筛选 取盆栽紫叶酢浆草叶片与叶柄,将每片叶剪成3小片、叶柄切成3~5 cm小段,采用1%升汞溶液进行消毒,时间分别为0.5、1、2、

3 min,切成1.5 mm×1.5 mm小块,上表皮向下接种在诱导培养基上。

1.2.2 愈伤诱导和分化培养基筛选 以MS为基本培养基,分别添加了不同浓度的6-BA和NAA,处理如表1。并以空白的基本培养基MS作为对照。重复3次。

表1 不同浓度6-BA及NAA培养基组合 mg/L

<div>NAA 6-BA</div>	0	0.1	0.2	0.5
0.1	1号	6号	11号	16号
0.5	2号	7号	12号	17号
1.0	3号	8号	13号	18号
1.5	4号	9号	14号	19号
2.0	5号	10号	15号	20号

1.2.3 不定芽的生根培养 以1/2 MS为基本培养基,分别添加了0.1、0.2、0.5 mg/L的NAA或0.1、0.2、0.5 mg/L的IBA,共6组培养基见表2。上述培养基均附加糖30 g/L,琼脂0.8%,pH 5.8。培养条件,均采用光照培养,培养的温度控制在22~25℃,光照强度2 000 lx左右,光照时间为12 h/d。

表2 不同浓度IBA或NAA培养基组合 mg/L

	21号	22号	23号	24号	25号	26号
NAA	0.1	0.2	0.5	—	—	—
IBA	—	—	—	0.1	0.2	0.5

1.2.4 驯化与移栽 当不定芽长出的4~5条的健壮的不定根时,室温下进行练苗,然后移栽,所用的土壤是1/2草炭土加1/2沙以及少量有机肥。一周内罩塑料布保湿并时常喷雾加湿,成活后移入盆中。

2 结果与分析

2.1 消毒时间对外植体无菌系建立的影响

取叶片与叶柄,分4组,每组清水冲洗时间和酒精浸泡时间相同,升汞浸泡时间不同。观察效果在接种第15天进行,表3为不同消毒时间外植体污染和启动情

第一作者简介:胡国富(1974),男,博士,副教授,主要从事植物学与分子生物学研究工作。E-mail: guofuh2003@yahoo.com.cn。
通讯作者:胡宝忠。
收稿日期:2008-02-02

况。试验证明外植体最佳消毒方法为: 流水洗净30 min, 移入无菌接种室, 用 70%酒精浸洗 15 s, 浸入 0. 1% Hg-Cl₂溶液中, 另加 1~2 滴吐温 80, 振荡消毒 2 min, 用无菌水中洗 3 次, 消毒效果更为显著, 并且萌动率高。

2. 2 外植体的选择

试验选择叶片和叶柄为材料, 接种于相同培养基内, 生长情况见表 4, 由表 4 可以看出叶片的愈伤组织形成时间短, 在 7 d 就有分化迹象, 并且很快形成了芽丛, 叶柄的分化较慢, 并且出现了不定根, 影响了芽的形成, 确定叶片为最佳外植体。

表 4 不同外植体的诱导分化情况

外植体	7 d	10 d	14 d	25 d	30 d
叶片	开始出现拱起, 颜色变淡	在叶片的切口边缘处开始出现白色点状的愈伤组织	在愈伤组织处开始生出白色的不定根, 不定根表面有白色绒毛覆盖, 此白色绒毛组织为组织培养中伴随小苗形成过程出现的愈伤组织	愈伤组织开始分化出卷曲的紫色幼芽, 继续培养生长发育出丛生叶, 每叶在长叶柄的顶端着生 3 片紫色小叶	叶片明显增多
叶柄	无明显变化	两端开始膨胀	逐渐透明, 两端切口膨大并出现白色愈伤组织	愈伤组织开始分化, 生出白色不定根(与叶片相似)	形成紫色小芽, 并始终保持紫色

2. 3 愈伤诱导和分化培养基筛选

对最适愈伤组织诱导培养基进行筛选, 在接种 1 个月时, 统计愈伤组织诱导率和叶片死亡率, 试验结果见表 5。在 20 种不同培养基上叶片均能诱导出愈伤组织和分化出根及芽, 13 号培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 0.9%最适宜愈伤组织诱导分化和芽的形成, 且此培养基上生出的白色不定根也较多。

表 5 不同培养基对愈伤组织形成和分化的影响

序号	接种数	诱导数	诱导率/%	序号	接种数	诱导数	诱导率/%
No. 1	30	5	16. 7	No. 11	30	20	66. 7
No. 2	30	5	16. 7	No. 12	30	23	76. 7
No. 3	30	5	16. 7	No. 13	30	28	93. 3
No. 4	30	7	23. 3	No. 14	30	22	73. 3
No. 5	30	5	16. 7	No. 15	30	20	66. 7
No. 6	30	18	58. 3	No. 16	30	10	33. 3
No. 7	30	20	66. 7	No. 17	30	12	40. 0
No. 8	30	18	58. 3	No. 18	30	17	56. 7
No. 9	30	15	50. 0	No. 19	30	20	66. 7
No. 10	30	13	43. 3	No. 20	30	24	80. 0

表 6 不同培养基对生根的影响

	NAA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	生根率/%
No. 1	0. 1	—	56. 3
No. 2	0. 2	—	93. 8
No. 3	0. 5	—	75
No. 4	—	0. 1	43. 8
No. 5	—	0. 2	81. 2
No. 6	—	0. 5	68. 8

2. 4 生根培养基筛选

处理激素为 IBA、NAA, 如表 6 所示, 将 4 cm 以上的丛生苗转入生根培养基进行生根培养, 结果表明, 在 6 种培养基上的苗都能长出一定数量的根, 但以 1/2MS+

表 3 消毒时间对外植体的影响

外植体类型	消毒时间 / min	接种外植体数	污染外植体数	污染率 / %	萌动外植体数	萌动率 / %
叶片	0. 5	30	20	66	9	90
叶柄		30	12	40	10	55. 55
叶片		30	13	44	17	100
叶柄	1	30	6	20	19	79. 17
叶片		30	2	6. 67	26	92. 86
叶柄		30	2	6. 67	25	89. 29
叶片	2	30	0	0	13	43. 33
叶柄		30	0	0	16	53. 33

NAA0.2 mg/L 培养基生根效果较好, 生根早、生根率高, 而且根较粗壮, 生根率达到 93.8%。同时发现有些苗的基部形成组织块(图 4), 此组织块以后可能发育成块茎, 这样的苗移栽较易成活。

2. 5 驯化与移栽

待生根苗长到 5~6 cm 时, 打开一半封口膜, 练苗 2~3 d 后取出小苗, 洗去根部的培养基, 移栽入以粗砂+营养土中, 成活率可达 98%以上。初移栽的三角紫叶酢浆草叶片为淡紫色或绿色略带紫色(图 5), 一段时间后, 叶片的颜色逐渐转变为紫色, 色泽鲜艳且具绒毛感(图 6)。

3 讨论

3. 1 外植体的选择

对三角紫叶酢浆草进行组织培养的研究中所采用的外植体较多, 有叶片和叶柄^[3 6, 8, 11], 地下鳞茎^[1]等, 其中采用地下鳞茎的研究中, 而诱导形成丛生芽的方法来完成快速繁殖, 但因其消毒困难、时间长, 诱导率低而不能提高效率。试验证明使用叶片作为外植体是较为适宜的, 而且叶片比叶柄取材方便, 萌动快、诱导分化效率高, 愈伤形成多、分化速度快等特点, 而且由叶片诱导愈伤组织的途径可以长时间的进行培养, 并可以降低组织培养对母体植株的伤害, 操作简单, 适于三角紫叶酢浆草的大量快速繁殖, 是一种较为合适的方法与途径。

3. 2 组织培养过程中的污染问题

污染是植物组织培养过程中三大难题(污染、褐化以及玻璃化现象)之一。通常污染是由于环境不洁、培养基和培养材料消毒不彻底、操作不当、操作人员或工具带菌等原因引起的^[4, 12]。一般的解决办法就是预先进行消毒剂种类、浓度以及消毒时间的筛选试验。同时,

经常对接种室和超净工作台进行消毒、灭菌;规范操作规程以及提高操作水平,来降低操作污染和环境污染^[9-10,13]。

该研究三角紫叶酢浆草叶片表面着生柔毛,在消毒剂的水溶液中,较容易产生气泡,阻碍消毒剂与外植体表面的接触,从而降低了消毒剂的灭菌效果。因此,首先进行了消毒处理的筛选工作,并筛选出最为适宜的处理方法。采用了0.1%升汞溶液作为消毒剂,并在其中加入表面活性剂吐温-80,减少叶片表面气泡的产生,辅助并促进消毒剂发挥作用,使消毒效果显著提高。处理可以在较短的时间内完成消毒过程,并降低幼嫩的叶片被消毒剂杀死的几率,同时降低了污染率。



图1 酢浆草愈伤组织



图2 愈伤组织生根



图3 愈伤组织生芽



图4 愈伤组织块根

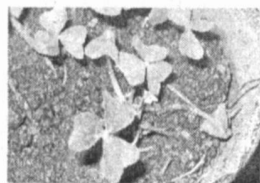


图5 驯化苗



图6 三角紫叶酢浆草成株

3.3 生长调节物质对诱导分化及生根的影响

在植物的组织培养中,生长调节物质对组织离体培养的形态建成及其调控起着十分关键的作用,培养基中所用的激素种类和浓度调节着培养物的再生方式及器

官分化类型。但内源激素对离体形态发生的诱导和调节往往是通过多种激素相互平衡及协同来实现的。在三角紫叶酢浆草外植体的离体培养中发现,外植体先膨大分化出少量愈伤组织,再进行不定根的分化,最后分化出芽。同时发现有些苗的基部形成组织块,此组织块以后可能发育成块茎,这样的苗移栽较易成活,以上结果与高贵珍、张兴桃等的研究结果相似^[2,3,11],这说明不同亚种的酢浆草之间组织培养的条件差异不是很大,而王利^[8]对其愈伤诱导和分化的研究中应用0.5 mg/L NAA,并且附加了0.5 mg/L KT和0.05 mg/L IBA,但诱导率和该试验大致相似。

参考文献

- [1] 邓小梅, 况小宝, 万小婷. 三角紫叶酢浆草的组培快繁技术研究[J]. 江西林业科技, 2003(6): 8-9.
- [2] 高贵珍, 张兴桃, 刘小阳, 等. 三角紫叶酢浆草的组织培养及快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 62-63.
- [3] 高贵珍, 张兴桃. 三角紫叶酢浆草叶片外植体组织培养研究[J]. 宿州学院学报, 2005, 20(6): 90-92.
- [4] 郝云凤, 李可伟, 张培宏. 植物组织培养操作过程中常见的污染问题及解决办法[J]. 内蒙古农业科技, 2004(52): 156-158.
- [5] 李霖, 宋宜颖, 鲁润龙. 紫叶酢浆草的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 360-360.
- [6] 刘建, 王永清, 王利, 等. 糖分对三角紫叶酢浆草叶片组培苗形成的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(7): 1348-1349.
- [7] Teng W L, Gai 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.
- [8] 王利, 王永清, 张帆. 三角紫叶酢浆草离体培养植株的再生研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 238-239, 315.
- [9] 王志成, 刘明稀, 易自力. 杀菌剂防治植物组织培养污染的初步研究[J]. 长沙电力学院学报(自然科学版), 2004, 19(1): 82-84.
- [10] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(1): 28-31.
- [11] 张兴桃, 高贵珍, 方雪梅. 激素水平对三角紫叶酢浆草组织培养的影响[J]. 安庆师范学院学报(自然科学版), 2006, 12(2): 96-98.
- [12] 赵佐敏, 艾勇. 植物组织培养过程中的污染原因及控制措施[J]. 贵州农业科学, 2004, 32(1): 61-62.
- [13] 郑春明, 赵麟, 徐礼根. 从事植物组织培养工作的点滴经验[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 396.

Tissue Culture in *Oxalis triangularis*

HU Guo-fu, LI Feng-lan, HU Bao-zhong

(Northeast Agricultural University, Life Science College, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: In this text, the leaves and leaf stalks of *O. triangularis* were used as explants to establish the system of tissue culture. Through orthogonal design, combination with analysis of variance and multiple comparisons, we investigated the best optimize explants and medium compositions. The results were as follows: (1) leaves were the optimize explants, when the leaves were used to explants, the optimize callus inducing medium compositions was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + sugar 30 g/L + agar 0.9%, and inducing rate was 93.3%. (2) The optimize medium of rooting was 1/2MS medium added NAA 0.2mg/L, sugar 30 g/L and agar 0.8%, and rooting rate was 93.8%.

Key words: *Oxalis triangularis* Subeg; Triang; Tissue culture; Callus