

不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响

赵伶俐^{1,2}, 葛红¹, 范崇辉², 印芳³, 李秋香¹, 周玉杰¹

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 西北农林科技大学, 陕西杨陵 712100;

3. 湖南农业大学植物激素重点实验室, 长沙 410128)

摘要: 本试验研究了不同光照强度培养下, 蝴蝶兰初代培养过程中外植体内多酚氧化酶(PPO)活性、总酚含量以及褐化百分率的变化规律。结果表明: 1 000Lx 和 3 000Lx 光强培养可降低褐化率, 2 000Lx 光强培养的外植体褐化严重且 PPO 活性高于其他两处理, 差异显著; 三处理间总酚含量差异不显著。二者相关性分析表明, PPO 活性与外植体中总酚含量呈中等相关。

关键词: 蝴蝶兰; 光照强度; 组织培养; 褐化

中图分类号: S682.2+9

文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2006)04-0160-02

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.) 是兰科蝴蝶兰属多年生常绿附生草本植物, 为单茎气生兰, 分株繁殖系数极低^[1]。因此, 国内外对其组培快繁做了大量研究工作, 但对其成活率的关键影响因素——褐化问题的研究未见系统报道。有研究表明导致褐化的主要原因是由多酚氧化酶作用于天然底物酚类物质形成醌而引起的^[2]。通过加入抗氧化剂和吸附剂可较好控制褐化发生^[3], 但对外植体生长不利, 而对外植体进行遮光处理可减缓酚类物质合成^[4]。这与酚类物质合成和氧化相关的酶都是光诱导型的有关。本试验通过在培养过程中给予外植体不同的光照强度处理, 研究外植体的总酚含量、多酚氧化酶活性以及褐化指数变化规律, 寻找通过控制光照强度来减轻蝴蝶兰组培褐化率的有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中国农业科学院蔬菜花卉研究所花卉组培室的蝴蝶兰 R4 品种。

1.2 培养过程中不同光照强度处理

均在 PQX-300B 智能人工气候培养箱中进行(宁波东

南仪器厂)。设置三种光照强度: 1 238 ± 180Lx; 2 180 ± 175Lx; 3 213 ± 160Lx。

1.3 组织培养

培养基为 MS+2.8g/L 琼脂+20% 蔗糖+3mg/L 6-BA, pH5.8, 温度 25 ± 2℃。外植体为 R4 植株叶片(1cm × 1cm), 每处理接种 20 瓶, 3 次重复, 共 180 株外植体, 用于测定 PPO 活性和总酚含量。另外每处理再接种 30 瓶, 共 90 株外植体作为组培中褐化率的观察。

1.4 指标测定

1.4.1 褐化率

$$\text{褐化百分数} = \frac{\text{褐化外植体数}}{\text{总接种数}}$$

1.4.2 多酚氧化酶活性测定 参考植物生理学实验(朱广廉等, 1990)^[5]。略做改进, 研磨浸提液为 0.05mol/L pH5.8 磷酸缓冲液。在 UV-1601 型分光光度计上测定 525nm 处的 OD 值。

$$\text{酶活力}(\Delta A/0.01\text{min} \cdot \text{g}) = \frac{E_{525}}{0.01 \times W \times t}$$

1.4.3 总酚含量测定 参考 Folin-Denis 方法^[6]。略做改进, 研磨浸提液为 50% 乙醇盐酸(pH3.0)溶液。500nm 处测定 OD 值。采用没食子酸做标准曲线, 计算总酚含量, 以 mg · g⁻¹ · FW 表示。

2 结果与分析

2.1 不同光照强度培养对褐化率的影响

接种第 3d, 褐化即开始出现, 且 3 000 Lx 光照下的外植体褐化严重, 1 000Lx 与 2 000Lx 光照处理的褐化水平相当。褐化率随培养时间延长而持续上升。但培养 12d 时, 处于 2 000Lx 光照强度下的褐化率明显高于其他处理。

2.2 不同光照强度对外植体 PPO 活性的影响



第一作者简介: 赵伶俐, 女, 1982 年生, 1999~2003 年就读于湖北农学院人文与教育系园艺专业, 获农学学士, 现为西北农林科技大学园艺学院在取硕士研究生, 专业方向为园林植物生理生态, 目前师从中国农业科学院蔬菜花卉

研究所葛红研究员。

* 基金项目: 科技部“863”项目, “特色花卉高效育种与快繁技术”(2004AA241200), 国家科技攻关计划“园艺作物现代化生产关键技术研究与示范”(2004BA521B02)。

收稿日期: 2006-01-10

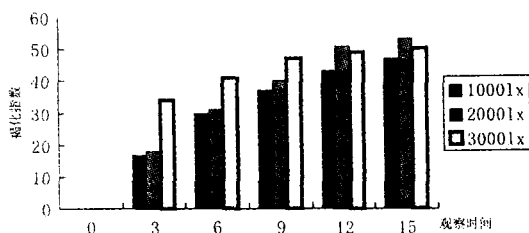


图1 不同光照强度培养对蝴蝶兰外植体褐化的影响

表1 不同光照强度培养对蝴蝶兰组培外植体 PPO 活性的影响

处理	不同接种天数培养外植体中 PPO 活性 $\Delta A/0.01, \text{min. g FW}^{-1}$					ΔPPO
	0	3	6	9	12	
$\pm 1000\text{Lx}$	6.445 a	5.861 a	7.250 a	6.472 a	8.084 b	1.639
$\pm 2000\text{Lx}$	6.472 a	5.805 a	6.611 a	7.167 b	9.056 a	2.584
$\pm 3000\text{Lx}$	6.589 a	6.528 a	8.695 a	7.361 b	8.028 b	1.439

注:表中不同的小写字母表示处理间在 $P=0.05$ 水平上存在显著差异

结果表明:不同光照强度处理对蝴蝶兰组培外植体内 PPO 活性影响差异显著。三种处理在培养 3d 时, PPO 活性均有一个下降的趋势;培养 6d 时, 3000Lx 处理的外植体内 PPO 活性明显高于其他处理, 2000Lx 处理的最低;随后, 2000Lx 处理的外植体内 PPO 持续上升, 在培养 12d 时, 与其他两处理的差异呈显著水平。而 3000Lx 与 1000Lx 处理在此时几乎没有差异。

2.3 不同光照强度对外植体内总酚含量的影响

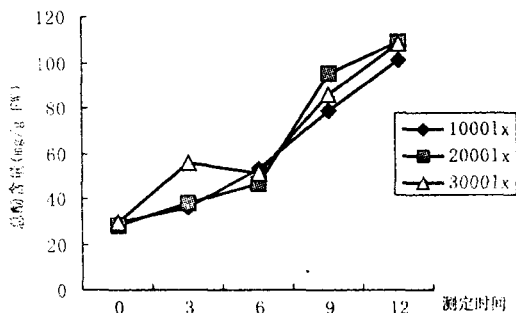


图2 不同光照强度培养对蝴蝶兰外植体内总酚含量的影响

不同光照强度影响培养外植体的总酚含量, 但各处理间差异不显著。3000Lx 光照培养的外植体总酚含量在培养 3d 时明显高于其他两个处理, 但其在培养 6d 时有一个下降过程, 此后持续上升。其他两处理从培养开始体内总酚含量就不断上升, 培养 6d 时, 三者体内总酚含量相当, 随后

2000Lx 处理的外植体总酚含量高于其他两处理, 但差异不显著。

3 讨论

PPO 活性受光照强度的影响。在本实验的三个光照处理中, 其表现最大活性的光照强度为 2000Lx, 处于这个条件下培养的蝴蝶兰叶片褐化严重。1000Lx 和 3000Lx 光照强度可能未完全激活 PPO 活性基因的表达, 所以褐化较轻, 而其中又以 1000Lx 的低光强控褐效果最好。这与杨博等人对玫瑰组培褐化^[7]的研究结果一致。

不同光照强度对外植体内总酚含量的影响无明显差异, 但其仍表现为 2000Lx 光强处理的外植体内总酚含量高于其他两处理, 这与三种处理的褐化指数对比结果也相一致。

研究还发现多酚氧化酶与总酚含量的相关性(1000Lx 中 $y = 25.955x - 117.55$, $R^2 = 0.5548$; 2000Lx 中 $y = 25.19x - 113.54$, $R^2 = 0.7432$; 3000Lx 中 $y = 13.018x - 30.821$, $R^2 = 0.1531$)表明: PPO 与总酚含量呈中等相关性。这与多酚氧化酶是促进酚类氧化成醌, 从而引起褐化的理论也相符合。

2000Lx 光照强度能加速 PPO 活性, 可能催化更多的酚类物质氧化形成醌, 从而导致褐化严重。因此, 我们在蝴蝶兰组培应用中, 早期培养时可先降低组培室的光照强度, 等切割伤口愈合, 开始膨大分化时, 更换新的培养基且转入 2000Lx 光强中培养, 这样就可以加速 PPO 在光合过程中对电子传递的协同作用, 从而利于外植体生长分化, 提高分化率。

参考文献:

- [1] 周志宏, 梁小敏, 吴森生. 蝴蝶兰试管生根实验研究[J]. 江西园艺, 2003(4): 37-38.
- [2] Alfred M. Mayer and Eitan Harel. Polyphenol Oxidase in plants, Phytochemistry, 1979, 18: 193-215.
- [3] Das s, Jha S. In vitro micropropagation of cashewnut. Plant cell Reports, 1996, 15: 615-619.
- [4] Bonga J M, Dvrzan D J. 树木组织培养[M]. 阙国宁, 郭达初, 李金田译. 北京, 中国林业出版社, 1988, 25-26.
- [5] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理实验[M]. 北京, 北京农业大学出版社, 1990, 37-39.
- [6] Kubota N. Phenolic content and L-phenylalanine ammonia-lyase activity. 1995, In Linskens H. F. and J. F. (Eds). Fruit Analysis, Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, 82-83.
- [7] 杨博, 韩振海, 张勇, 等. 不同光照强度对玫瑰组织培养中初代培养物褐化的影响[J]. 园艺园林科学, 2003, 19(6): 194-196.