维普资讯 http://www.cqvip.com

兰花组织培养中常见问题及解决方法

陈少珍， 卜朝阳， 闭志强， 周嘉运， 蒋慧萍

（广西农科院生物技术研究所， 南宁 530007）

摘要：对从台湾引进的兰花品种在组培苗生产过程中出现的褐化、黄化、污染、死亡等问题的原因进行分析，并提出采用适宜的外植体材料和适宜的无机盐成分、蔗糖浓度和激素水平，适当调节pH、光照和温度，使用适当的外植体消毒剂种类、浓度和处理时间，按照获取无菌外植体的基本操作和外植体灭菌操作规程等措施，可有效减少兰花组培苗的褐化、黄化、污染和死亡现象的发生。

关键词：兰花；组培苗；褐化；黄化；污染；死亡；解决方法

中图分类号：S682.31 **文献标识码**：B **文章编号**：1002—8161(2006)01—0072—03

Common problems in tissue culture of orchid and their solutions

CHEN Shao-zhen, Bu Zhao-yang, Bi Zhi-qiang, ZHUO Jia-yun, JIANG Hui-ping

(*Institute of Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning* 530007)

Abstract: The paper analyzed the causes of common problems of browning, yellowing, contaminating and dying in the process of producing tissue-cultured plantlets of orchid varieties introduced from Taiwan. The measures of applying the proper explants, inorganic mineral elements, sucrose concentration, hormone levels, regulating the pH value, lighting and temperature; proper type and concentration of antiseptic, time of antiseptic treatment for explants etc. were recommended to reduce the occurrence of the mentioned problems.

Key words: orchid; tissue-cultured plantlet; browning; yellowing; contaminating; dying; solutions

20世纪70年代以后，随着兰花组织培养技术的日趋成熟和完善，世界各地的兰花组织培养研究和产业化应用进入了迅速发展阶段，目前我国兰花试管苗、温室大棚苗的产业化发展已成规模，组培快繁的商业性应用也正在全国各省市蓬勃发展。虽然兰花组织快繁技术已成熟，但在组培过程中常会出现许多问题，迫切需要解决。现就从台湾引进的兰花品种（蝴蝶兰、大花惠兰、文心兰、卡特兰、石斛兰等）在组培苗生产过程中出现的褐化、黄化、污染、材料死亡等问题的原因归纳如下，并提出解决方法。

1 外植体材料和增殖材料褐化问题

1.1 发生原因

1.1.1 品种（如：M811、M802、M8124、M8126等）。不同的兰花品种之间常有很大差异，一般来说，外植体材料中单宁类和多种羟酚类化合物含量高的品种易引起褐化。

1.1.2 外植体年龄。通常是幼嫩部位产生褐化较轻，随着组织的老龄化而褐化加重。

1.1.3 外植体取样时间和取材部位。一般在春夏季，尤其是在春季采取生长旺盛部位作外植体较好。

1.1.4 培养基成分。在初级培养阶段，选择适宜的无机盐成分、蔗糖浓度和激素浓度对防止褐化也能起到较好的作用。

1.1.5 外植体大小及受伤害程度。外植体组织受伤害程度直接影响褐变。在切取易褐变的兰花外植体时，应尽可能减小伤口面积，伤口剪切要尽可能平整；同时还要考虑外植体的粗、细度，材料切取以细短，粗长为原则。

1.1.6 环境pH。试验表明，pH5.5时的成活率明显比pH4.6～5.0时高。因此，在培养时培养基应保持较高的pH。

收稿日期：2005-08-08

基金项目：国家科技部资金项目（2005EA106—26）；广西农科院科技发展基金项目（2002006）

作者简介：陈少珍（1958-），女，广西博白县人，工程师，主要从事食用菌育种、栽培和植物组织培养工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.7 温度和光照。在培养初期，较高的温度和光照对易产生褐化的兰花培养不利。

1.1.8 培养方式。培养方式包括外植体在培养基中的放置方式和材料转瓶周期、材料接种密度等。

1.1.9 外植体表面消毒剂种类及使用浓度和消毒时间。

1.2 解决方法

1.2.1 采用适宜的外植体。在切取外植体之前对母株或枝条进行遮光处理20d左右，或把母株置于温室内培养，不要喷水(喷水易感染病菌)。因为酶在自然光照条件下生长的植物体内非常活跃，从这样的植株上取得外植体很容易发生褐变，而把取材母株设置在黑暗或弱光条件下生长，植株组织内光诱导的那些参与酚类合成的氧化酶活性就大大减弱，以致酚类化合物的合成减少，其氧化产物醌类也相应减少，使褐变得到控制[1]。

1.2.2 使用适宜的无机盐成分、蔗糖浓度(1%～2%)、激素水平、温度及在黑暗条件下培养可以减轻材料的褐化。

1.2.3 对那些褐化严重的品种，如M811、M802、M8124、M8126，最好在培养基中加入适量抗氧化剂和一些抑制剂，如：维生素C、柠檬酸、半胱氨酸盐酸盐、谷胱甘肽和巯基乙酸、蛋白质、蛋白质水解产物、硫脲、二氨基二硫代甲酸钠、亚硫酸氢钠、氰化钾、二硫苏糖醇多氨等，具体加入那种抗氧化剂和抑制剂视品种而定。

1.2.4 尽可能减少新鲜外植体材料切割、接种操作过程中在空气中暴露的时间，以减轻外植体的褐化。

1.2.5 降低环境的pH。因为多酚氧化酶的活性在pH6.5时最大，随着pH的降低活性下降[2]。在培养基中适量加入维生素C或柠檬酸等还原剂，也能降低pH，但不能低于5.5，因为培养基在pH5.2～5.8范围内兰花都能正常生长，以pH5.5为宜，所以加入还原剂在降低pH的同时，也能降低多酚氧化酶的活性，从而减轻材料的褐化。

1.2.6 对褐化严重的兰花品种，将材料反复转移(或连续转移)到新培养基上和在培养基中加入吸附剂活性炭(0.1%～2.5%)或5～20g/L的PVP或加倍Fe－EDTA(螯合铁)的用量，具体加入那种成分视品种而定。在使用吸附剂吸附兰花有毒酚类的同时，也会吸附培养基中的生长调节剂，因此在添加有活性炭的培养基中，生长调节剂的浓度也应适当提高，以利芽球分化。

1.2.7 使用适当的外植体消毒剂种类、浓度和处理时间。常用消毒剂有氯化汞和次氯酸钠，但氯化汞易引起褐化，次氯酸钠次之，其浓度与褐化程度呈正相关。处理时间越长，消毒效果越好，但褐化也越严重，因而要正确选择消毒剂浓度及消毒时间，才能保证较高的外植体存活率。

1.2.8 对褐化严重的兰花可适当降低培养温度，以15～25℃为宜，在此温度下培养7～14d。不能长期低温培养，长期低温培养虽然可以减少褐化现象，但是组培苗存活率低，分化率亦低。

1.2.9 大部分兰花品种对光照极为敏感，光照强芽球和苗生长粗壮，叶色绿、厚，质量好，但对褐化严重的品种的初级培养和增殖培养极为不利，因此对此类品种，在诱导外植体的初级培养和增殖培养阶段应先在200～500lx的光照强度下培养7～14d，然后逐渐增加到1500～2000lx光照培养。

2 黄化苗的问题

2.1 发生原因

引起黄化的主要原因是培养基中Fe含量不足，各种矿物质营养不均衡，培养环境通气不良，瓶内乙烯含量增高，激素配比不当，糖用量不足或长时间不转移，培养基内的糖已耗尽，pH变化过大，培养温度不适(时高时低)，光照不足，材料污染(特别是被细菌污染)等。

2.2 解决方法

首先检查母液配制是否正确，及时转接培养物(材料)，降低密度，使用透气的棉花塞或透气的封口纸(或膜)来改善瓶内通气状况，去除污染，控制培养温度，适当增加光照，适当调节pH、激素配比和无机盐浓度。另外，在培养基中加有抗生素的兰花组培苗有时也会出现幼苗黄化现象，如果黄化严重，应适当减少用量或停止使用。

3 污染问题

3.1 主要原因

微生物(细菌、霉菌、病毒)污染是研究工作者感到最棘手的问题，也是影响兰花组培苗成败的重要指标之一。在兰花组培过程中，细菌污染率高于霉菌污染率，占总污染率80%以上。细菌污染又分为外生细菌、内生细菌的污染，外生细菌污染多数是培养基、外植体接种、母瓶材料、接种工具、接种员工违反操作规程而引起，有人认为在组培中较常见的细菌

维普资讯 http://www.cqvip.com

性潜在污染可能是由器具消毒不彻底，带有半致死性细菌引起[3]。而内生细菌污染情况比较复杂，可能是外植体材料本身携带，所以选择适宜的外植体材料常常是生产兰花组培苗成败的关键。

3.2 解决方法

3.2.1 定期对培养器皿和接种工具进行高压灭菌消毒。消毒出锅后的接种纸最好放入烘箱烘干水分后2d内用完，刀、剪、镊子等金属用具，在每次操作(接种)开始前需要在75%酒精中浸泡5～10min，再在酒精灯的火焰上灼烧消毒或在带有石英砂的消毒器内高温消毒5～10min，冷却后使用。在接种期间接完一瓶母瓶材料，器具消毒一次。切割完一瓶母种材料后及时更换无菌纸，以免材料间交叉污染。定期检查无菌纸是否有破损如洞眼、破裂等，对已破损的无菌纸及时更换。

3.2.2 定期检查超净工作台污染情况。检查方法是将真细菌培养基的培养皿数个，放在台面不同部位，开启超净工作台5～10min后将皿盖打开，放置30min，然后盖上培养皿，用透明胶将培养皿封好，放入35℃恒温箱中恒温培养3～7d，如果无细菌和霉菌生长即表明无菌效果良好。

3.2.3 定期用高锰酸钾和甲醛熏蒸接种室，使用浓度按常规。做好培养环境管理，定期(一个月)开臭氧发生器对培养室灭菌消毒一次，消毒时间1～2h。接种前，无菌室用紫外灯照射消毒30min以上，并开超净工作台紫外灯照射消毒15～20min，然后启动超净工作台，吹风10～15min后使用。接种完毕后塞紧内瓶盖，及时盖上外套(塑料套)，避免内瓶盖上的棉花滋生霉菌。

3.2.4 检查和监督接种员工遵守接种操作规章，避免接种工具碰到污染物，造成不必要的交叉污染。专人专门负责检查母瓶材料是否有细菌、霉菌感染，对已污染的母瓶材料及时进行处理和淘汰。

3.3 避免内生细菌污染的方法

3.3.1 从室内盆栽兰花中选取洁净、无病虫害、比较细嫩、生长能力较强部位且经多次接种易获得无菌材料的兰花作为外植体，将接种的外植体严格按照获取无菌外植体的基本操作程序和外植体灭菌操作程序对其进行接种。

3.3.2 正确选用表面消毒剂、消毒浓度和消毒时间。一瓶培养管放入一块材料，避免互相污染。对灭菌接种在半个月以上仍未污染，且已成活的灭菌外植体要及时转入诱导培养基内，每2～3d观察细菌、霉菌污染情况，及时消除污染试管。

3.3.3 在培养基内加入适量经过滤杀菌后的抗生素。

4 组培苗死亡问题

培养材料死亡在各个阶段都可能发生，尤其在增殖阶段中材料大量死亡，会导致增殖材料减少，损失惨重，因此在兰花组培过程中要加以重视。

4.1 避免材料死亡的方法

4.1.1 在初级培养阶段，外植体选用比较温和的灭菌剂，降低药剂浓度，减少消毒时间，选择在生长季节取芽。

4.1.2 根据不同的兰花品种准确配制各种激素、母液培养基，选用含盐量较低的培养基，也可试用1/2或1/4培养基，并调整各种激素的配比和用量，在培养基中适当添加抗生素、活性炭(0.2%～0.5%)以及必需的有机营养成分。

4.1.3 减少杂菌(真菌、细菌)污染，特别是细菌污染。

4.1.4 控制温度在25℃左右，及时转接和分瓶。培养室要定期通风换气，保持培养室有充足新鲜空气，以利于兰花组培苗生长。

4.1.5 加强组培苗的过渡管理。作好每天温度、光照的记录工作。发现温度变化大，应及时采取控温措施。

参考文献：

[1] 程广有编. 名优花卉组织培养技术(第1版)[M]. 科学技术文献出版社，2001. 102.

[2] 程家胜编. 植物组织培养与工厂化育苗技术(第1版)[M]. 金盾出版社，2003. 63～64.

[3] 熊丽，吴丽芳主编. 观赏花卉的组织培养与大规模生产(第1版)[M]. 化学工业出版社，2003. 81.

(责任编辑 麻小燕)