

卡特兰组培褐变的产生因素及对策

□ 秦新惠



接种

卡特兰 (*Cattleya hybrida*) 为兰科卡特兰属多年生附生草本，在国际上有“洋兰之王”的美称。组织培养技术的应用大大促进了卡特兰的切花生产，不仅能加快新品种推广，而且能够获得可观的经济效益。但是卡特兰外植体在初代培养中易褐化死亡，是原球茎诱导成功的一大障碍。

影响因素

影响卡特兰组织培养褐变的因子很复杂，因植物的种类、基因型、外植体部位及生理状态等不同，褐变的程度也有所不同。

外植体种类 不同的外植体决定了不同的褐化程度。就品种褐化情况由轻到重分别是：大花卡特兰、蕾丽卡特兰、橙黄卡特兰、两色卡特兰等，主要与不同种类中多酚类物质含量的多少及多酚氧化酶 (PPO) 活性的差异有关。

外植体部位及生理状态 外植体的部位及生理状态不同，其褐化程度不同，同时，不同时期和不同年龄的外植体在培养中褐变的程度也不同。

培养基成分 培养基成分中的无机盐、蔗糖浓度、激素水平等对褐变程度的

影响尤为重要。另外，其 pH 值也与褐变程度有较大关系。

培养条件 温度过高或光照过强，均可加速被培养组织的褐变。不利的环境条件能造成细胞的程序化死亡，温度是诱导程序化死亡的主要因素。

褐变产生机理

非酶促褐变 非酶促褐变是由于细胞受胁迫或其它不利条件影响所造成的细胞程序化死亡或自然发生的细胞死亡，即坏死形成的褐变现象，并不涉及酚类物质的产生。

酶促褐变 目前认为植物组织培养中的褐变主要是由酶促褐变引起的，培养材料变褐主要是由伤口处分泌的酚类化合物引起。酶促褐变如同一般的酶促反应，其发生必须具备三个条件，即酶、底物和氧。引起褐变的酶有多酚氧化酶 (PPO)、过氧化物酶 (POD)、苯丙氨酸解氨酶等。从初次培养和继代培养过程中试管苗的褐变程度和 PPO 的活性来看，表明 PPO 活性的高低是引起培养材料褐变的关键。引起褐变的酶的底物主要是酚类化合物，按其组成可分成 3 类：苯基羧酸 (包括邻羟基苯酚、儿茶酚、没

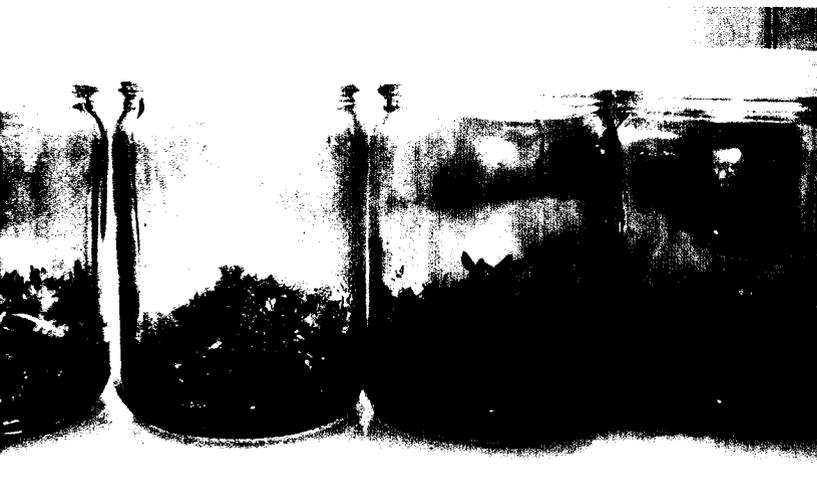
食子酸、莽草酸等)，苯丙烷衍生物 (包括绿原酸、肉桂酸、香豆酸、咖啡酸、单宁、木质素等)，第三类是黄烷衍生物 (包括花青素、黄酮、芸香苷等)，但并非所有的酚类物质都是 PPO 的底物。

在正常发育的植物组织中，底物、氧气、PPO 同时存在并不发生褐变，是因为在正常的组织细胞内由于多酚类物质分布在细胞的液泡内，而 PPO 则分布在各种质体或细胞质中，这种区域性分布使底物与 PPO 不能接触。而当细胞膜的结构发生变化和破坏时，则为酶创造了与 PPO 接触的条件，在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌，进行一系列的脱水、聚合反应，最后形成黑褐色物质，从而引起褐变。

对策

从理论上讲，酶促褐变可以通过以下三种方法加以抑制：一是除去引起氧化的物质——氧；二是捕捉或减少聚合反应的中间产物；三是抑制有关的酶。

选择适当的外植体 选择适当的外植体是克服褐变的最主要的手段。取材时应注意选择分生能力较强的外植体。成年植株比幼苗褐变程度厉害，夏季材



正常苗(左)与褐变苗(右)



卡特兰花朵比较大

料比冬季、早春及秋季材料的褐变要严重。冬季培养物的存活率明显高于夏秋季节。因此,采芽时节尽可能避开生长旺盛期。

对外植体的处理 通过一定的预处理能减轻醌类物质的毒害作用。处理方法如下:将新茎切离母体,经流水冲洗干净或加洗涤剂漂洗,在2℃~5℃的低温下处理12~24小时,除去侧芽外的苞片,茎尖留一片叶子,用70%的酒精擦洗几秒或用纯酒精漂洗几秒,用小刀切去暴露的腋芽及茎尖,放入漂白粉溶液中灭菌5~10分钟,用无菌水冲洗干净,在培养皿上(或固定在橡皮塞上)切去直径0.5~2.0mm的茎尖,在无菌水中浸泡2分钟(注意尽量缩短在空气中的暴露时间),然后接种于只含有蔗糖的琼脂培养基中培养5~7天,使组织中的酚类物质部分渗入培养基中。取出外植体用5%漂白粉溶液浸泡5~10分钟,再接种到合适的培养基中。若仍有酚类物质渗出,3~5天后再次转移培养基2~3次,当外植体的切口愈合后,酚类物质减少,这样可使外植体褐变减轻或完全被抑制。或用抗氧化剂进行材料的预处理或预培养,可减轻醌类物质的毒害。

适宜的培养基 培养基的成分与褐变程度有关,要考虑所选培养基的状态和类型。

(1) 适当的无机盐浓度加适当、适量的激素。卡特兰的初代培养,不同的研究者使用的培养基及激素含量有所不同,角田(1975)使用MS附加NAA0.1mg/L、10%椰子汁及2%蔗糖,以200r/min转速进行液体旋转培养。市桥等人(1973)分别用KC、Hyponex和RM(1962)三种培养基,对三种卡特兰茎尖进行培养,其成功率最低为67%,大部分达到了100%,结果表明RM培养基好于其它两种培养基。同时,市桥等人还以RM为基本培养基附加不同的激素及附加物,比较了固体培养、液体静置及液体振荡培养的效果,结果以RM+NAA0.1mg/L的液体静置培养为最好。除此之外,还可用改良MS培养基(减去3/4KNO₃及3/4NH₄NO₃的量,去掉CoCl₂·6H₂O,烟酸及维生素类含量加倍)+BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L或者用VW增补25%椰子汁进行培养。结果证明低浓度的无机盐可促进外植体的生长与分化,减轻外植体褐变的程度。

(2) 培养基的硬度。在一定范围内,



雍容华贵的卡特兰盆花

琼脂用量大,培养基硬度大,褐变率低,这可能是培养基的硬度影响了酚类物质扩散速度的缘故。

(3) 培养基中水的硬度。硬度低的蒸馏水褐变率低,而使用硬度较高的自来水,褐变严重,甚至会出现褐变死亡。这可能是配制培养基的水改变了培养基中无机盐的浓度,间接地影响了植物外植体的褐变。

(4) 培养基pH值较高有利于成活,试验表明pH值为5.5时的卡特兰茎尖成

活率明显比 pH 值为 4.5~5.0 时高。一般来说,酸性环境(pH 值为 4.5~5.0)不利于褐变过程的发生。

(5) 培养条件如温度过高或光照过强,光照会提高 PPO 的活性,促进多酚类物质的氧化,从而加速被培养的组织褐变。高浓度 CO₂ 也会促进褐变,其原因是环境中的 CO₂ 向细胞内扩散,细胞内 CO₃²⁻ 增多,CO₃²⁻ 与细胞膜上的 CO₂²⁻ 结合,使有效 CO₃²⁻ 减少,导致内膜系统瓦解,酚类物质与 PPO 相互接触,产生褐变。卡特兰初期培养应保持较低的温度(15℃~20℃),进行暗培养。

添加褐变抑制剂和吸附剂 褐变抑制剂主要包括抗氧化剂和 PPO 抑制剂。在培养基中加入偏亚硫酸钠、L-半胱氨酸、抗坏血酸、柠檬酸、二硫苏糖醇等抗氧化剂都可以与氧化产物醌发生作用,使其重新还原为酚。由于其作用过程均为消耗性的,在实际应用中应注意添加量,其中 L-半胱氨酸和抗坏血酸均对外植体无毒副作用,在生产应用中可不受限制。试验证明,在卡特兰初代培养基加入 L-半胱氨酸和抗坏血酸具有明显的抑制褐变能力,在静置的液体培养基中加入比在固体培养基中效果要明显得多。

常用的吸附剂有活性炭和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。活性炭是一种吸附性较强的无机吸附剂,能吸附培养基中的有害物质,包括琼脂中的杂质、培养物在培养过程中分泌的酚、醌类物质以及蔗糖在高压消毒时产生的 5-羟甲基糠醛等,从而有利于培养物的生长。粉末状的活性炭与颗粒状的活性炭相比吸附性更强,在卡特兰初代培养基中加入 0.1%~0.5% 的活性炭对酚类物质的吸附效果明显。在使用过程中应注意,尽量用最低浓度的活性炭来对抗褐变的发生,因为活性炭的吸附作用是没有选择性的,在吸附物质的同时,也会吸附培养基中的其它成分,对外植体的诱导分化会产生一定的负面影响。而聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一性吸附剂,在生化制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂,可用于防止褐变。

进行细胞筛选和连续转移 在卡特兰组织培养过程中,经常进行细胞筛选,可以剔除易褐变的细胞。在外植体接种 1~2 天后应立即转移到新鲜培养基中,能减轻酚类物质对培养物的毒害作用,降低抑制作用,使外植体尽快分生,连续转移 5~6 次,可基本解决外植体的褐变问题。■



自自然界中,红掌适宜生长在遮荫的环境中,且需要较高的温度和湿度。因此,在规模化栽培时一般安装两层遮荫网来保证红掌的正常生长,夏季温度一般控制在 30℃ 以下,冬季不可低于 18℃,晴天时湿度一般保持在 70%,不可低于 50%,阴天时一般保持在 70%~80%,光照一般控制在 20000~25000lux。

近年来,随着我国花卉产业的快速发展,切花红掌栽培面积迅速扩大,品种越来越多,质量也有大幅提高。切花红掌目前在国内的市场已逐步打开,需求量正逐渐扩大,但生产技术相对落后。

下面结合笔者的生产实践,简要介绍切花红掌的种植管理技术。

种 植

生产企业收到的切花红掌种苗一般是纸箱包装,内包有保温膜。在收到种苗后应在第一时间开箱,打开保温膜,并检查到货的品种和数量。确认无误后,将种苗按品种摆在待种植区域,尽快组织人工种植,为了防止种苗带菌,不可将纸箱直接摆在种植床上。一般收到的切花红掌种苗根部都带有基质,种植时只要将种苗固定在花泥中,不可太深或太浅,亦不可挤压,以栽培基质将种苗根部所带



卡特兰