

蝴蝶兰组织培养中防褐化技术研究

王立娅¹, 方正¹, 李英丽¹, 王利娜², 宋朝辉³

(1. 河北农业大学 河北省生物无机化学重点实验室, 河北 保定 071001; 2. 河北省威县农业局, 河北 威县 054700;
3. 河北保定市园林绿化管理局, 河北 保定 071000)

摘要: 以蝴蝶兰‘Dps.Jet green Mantefon’品种为试材, 以继代培养获得的丛生芽为外植体, 系统研究了 2 种吸附剂—活性炭(AC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及不同预处理(外植体 4℃冷藏 24h、黑暗预处理 5d 和黑暗预处理 10d)对蝴蝶兰组培中组织褐化的影响。结果表明: 活性炭能有效防止褐化和促进生长, 综合效果最佳。除外植体 4℃冷藏 24h 处理外, 其余处理措施均可减轻组织褐化, 但效果均不及活性炭。

关键词: 蝴蝶兰; 外植体; 褐化; 预处理

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

Study on brownin gof *Phalaenopsis amabilis* in the tissue culture

WANG Li-ya¹, FANG Zhen-g¹, LI Yin-g-li¹, WANG Li-na², SONG Zhao-hui³

(1. Key Lab of Bio-inorganic Chemistry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. The Agricultural Bureau of Weixian County in Hebei Province, Weixian 054700, China;

3. Parks and Gardens Administration of Baoding, Baoding 071000, China)

Abstract: The clustered shoots generated from proliferation period of *Phalaenopsis amabilis* were used as ex plant in order to study the brownin gof tissue culture. The treatments included two adsorbents: active carbon, PVP, and three pretreatments: ex plants preserved at 4℃ for 24 hours, with darkness pretreatment for 5 days and 10 days. The results indicated that active carbon was the best one of all the treatments, which could control brownin gof and promote ex plant growth. Except for the ex plants preserved at 4℃ for 24 hours, the other treatments could decrease brownin gof, but the effects were not as good as active carbon.

Keywords: *Phalaenopsis amabilis*; ex plant; brownin gof; pretreatment

蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)又称蝶兰,属热带气生兰,是生长在热带及亚热带地区的兰科(Orchidaceae)植物,多产于亚洲,其株型美观、色彩艳丽、花期持久,在热带兰中有“兰花皇后”之美称,是兰科植物中栽培最广泛、最普及的种类之一,是国际上最具有商业价值的四大观赏热带兰之一^[1]。蝴蝶兰种类丰富,分布广,东起菲律宾、新几内亚,南达澳

大利亚北部,西苏门答腊,北到我国台湾、云南、四川西部均有原种(野生的蝴蝶兰)存在,约有 50 多种,其中我国有 7 种,全部为附生兰^[2]。蝴蝶兰商品化大规模栽培十分成功,在兰花市场上占有相当大的比例,主要用作切花和盆花栽培。蝴蝶兰属于单茎型气生兰,过去一般依靠摘心发出叶芽进行繁殖,但对植株损害很大,因而现较少被采用^[3]。蝴蝶兰植

收稿日期: 2007-12-03

基金项目: 河北省科技厅博士基金资助项目(00547001D-3)

作者简介: 王立娅(1981-),女,河北栾城人,在读硕士生,研究方向为植物营养化学与品质。

通讯作者: 方正(1963-),男,河北万全人,博士,研究员,主要从事植物营养研究工作。

E-mail: Fangzheng555@hebau.edu.cn.

株上极少发育侧枝,比其他种类的兰花更难于进行常规无性繁殖,组织培养是建立蝴蝶兰快速繁殖无性系的重要手段。蝴蝶兰和其他兰科植物一样,在组培快繁生产中存在着易褐化死亡的问题,因此如何克服褐变成了组培快繁生产成功与否的关键^[4]。本试验系统探讨了不同吸附剂和不同预处理措施对蝴蝶兰组培中褐化控制的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为蝴蝶兰,品种为'Dps.Jet greenMante - tefon',由北京三益公司提供。

1.2 方法

本试验在河北农业大学生物无机化学重点实验室组培室进行,以蝴蝶兰品种'Dps.Jet greenMante - fon'为试材,以继代培养获得的丛生芽为外植体,将大小一致的单芽接种于不同的处理中,记录褐化时间、褐化率和生长量。培养和观察 60d,30d 统计 1 次生长量。培养基均为 MS+6-BA5mg/L+NAA0.5mg/L,蔗糖 20 g/L,琼脂 3.5 g/L,椰汁 100 mL/L,光照强度 2000 ~ 2500lx,光照时间 13h/d,温度(25 ± 2)。

2.1.2.1 不同吸附剂对褐化影响试验 选用的吸附剂为活性炭和聚乙烯吡咯烷酮(PVP),分别设 4 个浓度:1、2、3、4 g/L,以不加吸附剂为对照。

2.1.2.2 外植体冷藏及黑暗预处理试验 外植体冷藏即将外植体在 4℃ 下冷藏 24h (处理 1);黑暗预处理 5d (处理 2),黑暗预处理 10d (处理 3),此处理均在 HPS-280 生化培养箱进行,以常规组培室培养的为对照。

2 结果与分析

2.1 不同吸附剂和预处理对褐化的影响

2.1.1 不同吸附剂对褐化影响 对照在接种后的第 7 天培养基与小苗接触部位开始变褐,随时间推移,褐色逐渐加深,并扩散至整个培养基,第 60 天整个培养基均呈褐色。与对照相比,加入活性炭的处理,从接种至第 60 天均无褐化现象产生,此处理的 4 个浓度水平之间防褐效果差异不显著,而对照在第 15 天和第 30 天时的褐化率分别为 72% 和 83%;PVP 作为吸附剂在培养的整个过程中降低了褐化率,其各浓度水平与对照相比均达显著水平,其中浓度为 1 g/L 的效果最好,与其余浓度水平差异显著,在第 15 天和第 30 天时其褐化率分别为 0 和 39%。

但随时间推移培养基的褐色逐渐加深,说明 PVP 有一定的防褐效果,但其效果不及活性炭(见图 1)。

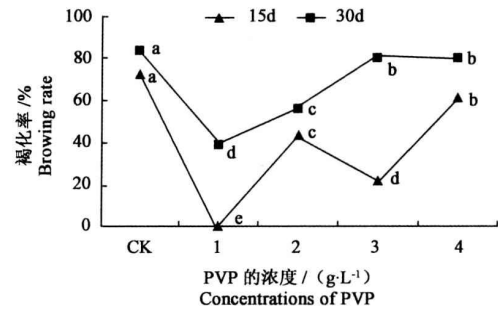


图 1 PVP 对褐化率的影响

Fig.1 Effect of PVP on browning rate

2.1.2 不同预处理对褐化影响 由图 2 可知:对照在第 7 天开始褐化,经预处理的各处理均推迟了褐化现象出现的时间,且与对照差异显著,其中以经黑暗预处理 10d 的效果最佳,褐化现象出现的最早时间比对照推迟了 5d。由图 3 结果表明:在所有处理中,褐化率均随培养时间的延长而增加。经黑暗预处理 5d 和 10d 的 2 种处理均降低了褐化率,尤以黑暗预处理 10d 的效果明显,在第 15 天和第 30 天时其褐化率分别为 25% 和 56% 分别比对照降低了 65% 和 32%,黑暗预处理 5d 的效果其次,在第 15 天和第 30 天时其褐化率分别为 38% 和 67%;而外植体 4℃ 冷藏 24h 的处理在第 15 天时褐化率显著低于对照,第 30 天时其褐化率为 85%,显著高于对照。

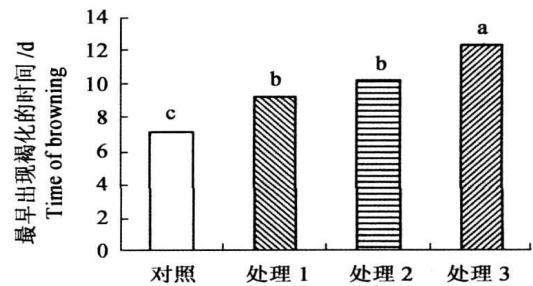


图 2 不同预处理出现褐化的时间

Fig.2 Time of browning in gold different pretreatments

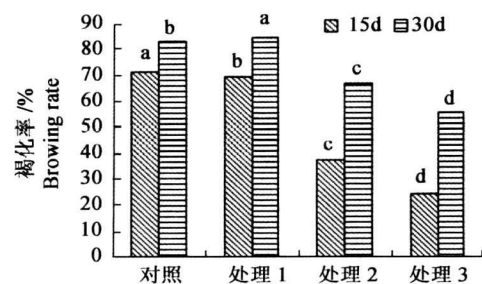


图 3 不同预处理的褐化率

Fig.3 Browning rate of different pretreatments

2.2 不同吸附剂和预处理对生长的影响

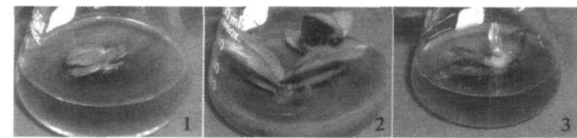
2.2.1 不同吸附剂对生长的影响 由表 1 可知:与对照相比,加入活性炭的各浓度水平长势均优于对照,与对照差异显著,但各浓度水平间无明显差异,在第 30 天和第 60 天时,加入活性炭的各浓度水平之间,植株的新叶数和株高增量均显著优于对照,可知活性炭能促进植株的生长,在培养期间,此各浓度水平的植株叶色浓绿、有光泽;加入 PVP 的各浓度

水平在第 30 天时的新叶数与株高增量均与对照差异显著,至第 60 天时新叶数均优于对照,与对照达显著水平,综合考虑蝴蝶兰的生长状况,说明 PVP 能显著促进蝴蝶兰生长,其中,以浓度为 1 g/L 的效果最好,不仅与其余浓度水平差异显著且与对照有显著差异。结合培养期间的观察,加入 PVP 的处理在长势、生长量大小,及光泽度方面不及活性炭处理(见图版 1)。

表 1 不同吸附剂对生长的影响
Table1 Effectofdifferentadsorbentson growth

处理浓度/ (g L ⁻¹) Treatment concentration	活性炭 Activecarbon				PVP			
	30 d		60 d		30 d		60 d	
	新叶/片 Numberof newleaves	株高增量/cm Increment heightof plantlets	新叶/片 Numberof newleaves	株高增量/cm Increment heightof plantlets	新叶/片 Numberof newleaves	株高增量/cm Increment heightof plantlets	新叶/片 Numberof newleaves	株高增量/cm Increment heightof plantlets
对照	0.90d	0.21e	2.00e	0.41c	0.90c	0.21d	2.00d	0.41b
1	1.60c	0.37a	3.33d	0.60a	1.50a	0.37a	2.33b	0.54a
2	2.00a	0.36b	4.30a	0.48c	1.30b	0.33b	2.80a	0.38c
3	1.80b	0.33c	3.50c	0.56ab	1.16b	0.22d	2.30b	0.37c
4	1.63c	0.24d	4.00b	0.52b	1.23b	0.28c	2.20c	0.43b

注:表中同列不同小写字母表示方差分析差异显著(P<0.05)。



1: 对照, 2: 活性炭 2 g/L, 3: PVP 1 g/L
图版 1 吸附剂处理第 60d 褐化和生长情况

Plate1 The brownin gand growthof Phalaenopsis plantlets culturedontreatmentsof adsorbentatsixty yday

2.2.2 不同预处理对生长的影响 由图 4 和图 5 可知:经黑暗预处理的 2 种处理在第 30 天和第 60 天时其新叶数和株高增量均大于对照。说明在整个培养期间,经黑暗预处理可促进植株生长。黑暗预处理 10d 的效果均优于黑暗预处理 5d 的效果,说明延长一定的黑暗预处理时间可促进植株的生长;而 4 冰箱冷藏的处理在第 30 天和第 60 天时的新叶数与株高增量均显著低于对照,说明此处理抑制了植株的生长,在培养期间观察到此处理的蝴蝶兰植株生长缓慢,苗小,叶片无光泽(见图版 2)。

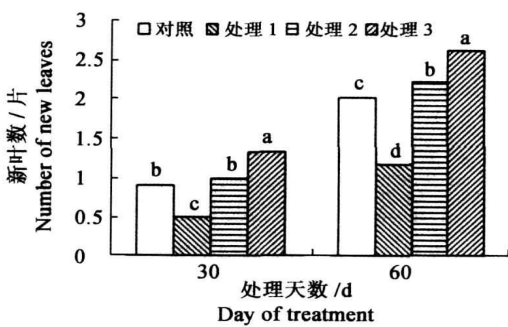


图 4 不同预处理的对叶片数的影响

Fig.4 Effectofdifferent pretreatments onthenumberofnewleaves

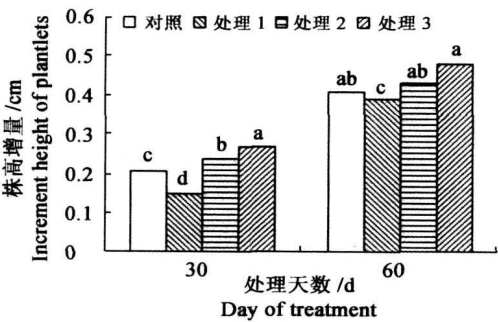
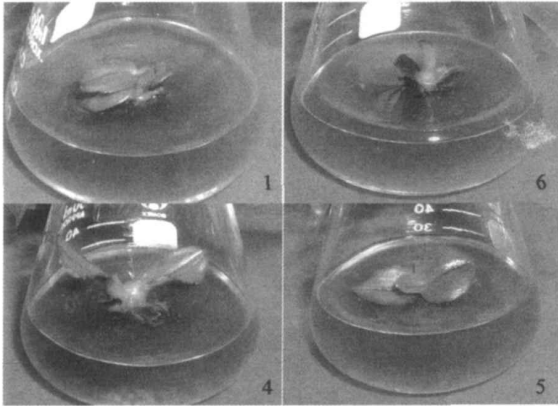


图 5 不同预处理对株高增量的影响

Fig.5 Effectofdifferent pretreatments onthe increment heightof plantlets



1: 对照, 4: 黑暗预处理 10d, 5: 黑暗预处理 5d, 6: 冷藏 24h

图版 2 各预处理第 60 天褐化和生长情况

Plate2 Thebrowningand growthof Phalaenopsis plantlets culturedon pretreatmentsatsixty ythday

3 讨论

外植体的褐变是指用于离体培养的无性系植物或进行组织培养时,从植物体上切取的切段组织中的酚类物质被氧化,生成棕褐色的醌类物质,逐渐扩散到培养基中,抑制其他的酶活性,以致培养的外植体受到毒害。活性炭具有强大的吸附能力,它主要吸附非极性分子和色素等大分子,可以减少一些有害物质的影响^[4],它可以促进花药培养时的雄核发育,形成单倍体植株^[5]。以活性炭 1% 的浓度可以使洋葱的生根数增加。在兜兰种子的培养^[6]、甘蔗的组织培养及试管苗的生根中^[7]都利用了活性炭防止植物自身的酚类物质排泌和变褐老化,对形态发生和器官形成有良好效应。本试验中活性炭防褐化效果最佳^[8],与对照相比能显著促进植株生长,在试验的 60d 内,组培苗均未出现褐化现象。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一吸附剂,在生化分离制备中常用于酚类物质和细胞器的保护剂。在柿树组织培养中可以有效防止褐变^[9]。在本试验中,PVP 处理有一定的防褐效果,亦能促进生长,以 1 g/L 的效果最佳,但其整体效果不及活性炭处理。

在预处理试验中,黑暗预处理能减轻褐化,亦能促进生长,其中以预处理 10d 的褐化率最低,可能与黑暗处理降低了多酚氧化酶(PPO)活性有关。另外,继续增加预处理的时间褐化率是否会进一步降

低;若在接种的培养基中加入活性炭或 PVP 后再经黑暗预处理,防褐效果是否会更好,这均有待于进一步研究。

外植体 4 下冷藏 24h 后离体培养,在接种后 15d 之内有一定的防褐效果,30d 后其褐化率高于对照,长势和生长量显著低于对照,而韩超研究表明丽格海棠中度成熟茎段经 4 下冷藏 20h,芽生长量大于对照^[10],这可能与试材的种类及品种不同有关。

参考文献:

- [1] 卢思聪. 中国兰与洋兰 [M]. 北京: 金盾出版社, 1994:96-105.
- [2] 赖本智. 中国兰花产业现状分析 [J]. 台湾花卉园艺月刊, 2004, 203: 25-26.
- [3] 周俊辉, 叶超宏, 陈旭高. 蝴蝶兰原球茎增殖培养的研究 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2002, 15 (3): 13-17.
- [4] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术 [M]. 中国林业出版社, 1997: 238-277.
- [5] Anagnostakis SL. Ha ploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal [J]. Planta, 1974, 115 (3): 281-283.
- [6] Ernst R. The use of activated charcoal in a symbiotic seedling culture of *Phaiophedilum* [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1974, 43: 35-38.
- [7] 王敬驹. 甘蔗的组织培养及应用 [M]. 北京: 农业出版社, 1985: 300-314.
- [8] Park So Youn g, Murth y HN, Paek Kee Yo eu p. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63 (1): 67-72.
- [9] 张妙霞, 孔祥生, 郭秀璞, 等. 柿树组织培养防止外植体褐变的研究 [J]. 河南农业大学学报, 1999, 33 (1): 87-91.
- [10] 韩超, 方正. 外植体和激素对丽格海棠组培不定芽分化的影响 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28 (3): 38-41.

(编辑: 宗淑萍)