维普资讯 http://www.cqvip.com

大花蕙兰外植体组培褐变的控制

赵 鹂，杨 晖
（丽水学院，丽水 323000）

摘 要：对大花蕙兰离体繁殖中外植体的褐变进行了研究，结果表明：①假鳞茎切块和花茎切段褐变严重，选用茎尖褐变较轻。②在MS、改良MS和1/2MS三种培养基中，以无机盐浓度较低的1/2MS培养基、采用液体培养方式抑褐效果最好，但分化率差异不大，采用固体培养的材料，其分化率略高于液体培养。③在培养基中加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硫代硫酸钠、活性炭和维生素C，均能减轻褐变程度，其中以500mg/L PVP效果最好。④对褐变严重的外植体，进行接种前的抑褐剂预处理是有必要的，试验中以PVP(2g/L)和硫代硫酸钠(2g/L)预处理20min效果较好。

关键词：大花蕙兰；离体繁殖；褐变
中图分类号：S682.31 **文献标识码**：A

Control in Tissue Culture Browning of *Cymbidium Grandiflorium* Explants

Zhao Li, Yang Hui
(*Lishui college, Lishui,* Zhejiang 323000)

Abstract: The browning of the explants in *Cymbidium grandiflorium* vitro propagation was studied, the results showed: ①Browning of pseudobulb cuts and stem segments was serious while browning of shoot tip was lighter. ②Among the three kinds of medium, such as MS, improved MS and 1/2 MS, inhibiting browning is best with 1/2 MS medium at low concentrations with inorganic salt and liquid cultivation, however, the difference of differentiation rate wasn't obvious, the differentiation rate by using solid training materials is slightly higher than that by using liquid. ③Browning could be reduced with the medium involved in polyvinylpyrrolidone (PVP),sodium thiosulfate, activated carbon and vitamin C, and the best effect was best with 500mg/L PVP. ④It was necessary that the pretreatment of inhibiting browning to serious browning. The effect of pretreatment with PVP (2g/L) and sodium thiosulfate (2g/L) for 20min was best.

Key words: *Cymbidium grandiflorium*, propagation in vitro, browning

大花蕙兰(*Cymbidium grandiflorium*)属兰科兰属植物。是近几年在中国花卉市场上流行的高档室内盆栽花卉，具有极高的观赏价值。由于大花蕙兰多为杂交品种，所以种子繁殖无法确保其品种的特性，同时结实率也相当低，分株能力又弱；因而繁殖系数低，繁殖速度慢，无法满足日益增长的市场需求。而且种苗大多从国外进口，价格较高。所以必须通过组培方法，进行工厂化生产，快速推广优良品种。自上世纪80年代以来，国内外就已经开始研究大花蕙兰的组培技术，不同学者先后报道大量元素、植物生长调节剂、糖浓度、天然复合物等对大花蕙兰组织培养的影响[1-3]。但笔者自2001年开始大花蕙兰快繁技术研究以来，发现褐变仍然是影响大花蕙兰快繁的主要因素之一。该试验是在前人研究经验的基础上，于2004年开始，针对影响大花蕙兰组培褐变的几个因素做了一些对比试验，旨在探求更简便、有效且对外植体的分化抑制较小的防褐措施。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料：采用丽水大洋山花圃的大花蕙兰(紫色

基金项目：浙江省丽水市一般科研资助项目"名优兰花快繁技术及产业化研究"(2002314)。
第一作者简介：赵鹂，女，1964年出生，浙江杭州人，副教授，硕士，研究方向：植物生理。通信地址：323000 浙江省丽水学院化学与生命科学学院。Tel：0578-2271458，E-mail：xyzhaoli@126.com。
收稿日期：2008-02-19，修回日期：2008-03-19。

维普资讯 http://www.cqvip.com

小型花)为材料,取材前在室内漫射光下培养一周。

外植体的消毒处理:(1)取大花蕙兰侧芽,剥去外部叶片,在自来水下冲淋 1h 后,用 70%酒精浸 1min,再用 0.1%氯化汞溶液浸泡 10min,用无菌水冲洗 5~6 次,在解剖镜下剥取茎尖 6mm,作为接种材料;(2)取大花蕙兰假鳞茎,在自来水下冲淋 1h 后,用 70%酒精浸 30s,再用 0.1%升汞溶液浸泡 18min,用无菌水冲洗 5~6 次,切割成 0.5~1cm 的切段为接种材料;(3)取大花蕙兰幼嫩花茎,在自来水下冲淋 0.5h 后,用 70%酒精浸 10s,再用 0.1%升汞溶液浸泡 10min,用无菌水冲洗 5~6 次,切割成 0.5~1cm 的切段为接种材料。

1.2 试验方法

1.2.1 不同类型外植体褐变的差异 在预实验的基础上,以 MS+6-BA2.0g/L+NAA0.5g/L+ 水解酪蛋白 1g/L+ 琼脂 7g/L+ 蔗糖 2g/L 为基本培养基 MS0,另添加抗氧化剂 PVP0.5g/L。按上述取材方法获得大花蕙兰茎尖、幼嫩花茎和假鳞茎三种外植体,分别接种于该基本培养基,进行培养。

1.2.2 培养基成分及培养方式对褐变的影响 采用 MS、1/2 MS、改良 MS($CuSO_4$ 减半、KH_2PO_4 加倍)三种培养基的无机盐,以 PVP0.5g/L 为抗氧化剂,其他附加成分同基本培养基。以大花蕙兰茎尖为外植体,分别采用固体和滤纸桥液体培养两种方式进行培养。其中,液体培养的外植体于培养 25d 后,转接到相同成分的固体培养基中继续培养。观察它们的褐变程度和生长分化情况。

1.2.3 不同附加成分对抑制外植体褐化的影响 在基本培养基中,分别添加不同种类的抗氧化剂和酚类物质吸附剂,选择相对褐变较为严重的幼嫩花茎切段为外植体,接于培养基中,进行培养。以基本培养基 MS0 为对照,比较不同附加成分对抑制外植体褐化的影响程度。

1.2.4 外植体的不同预处理方法 以褐变程度相对较为严重的大花蕙兰假鳞茎切块为外植体,在常规消毒,分别立即投入无菌水、PVP (2g/L)、$Na_2S_2O_2$(2g/L)、Vc (10g/L)溶液中浸泡 20min,取出后,用滤纸吸干水分,接种于附加 PVP0.5g/L MS0 的基本培养基中,进行培养。以不做预处理为对照。

1.2.5 褐变程度统计方法 用褐变指数表示外植体褐化的程度。将外植体的褐化程度定为以下四级标准记载统计:一级:褐化部分在 20 %以上至 40 %以下;二级:褐化部分在 40 %以上至 60 %以下;三级:褐化部分在 60 %以上至 80 %以下;四级:褐化部分在 80 %以上。

$$褐变指数=\frac{\Sigma\ 褐变级别的外植体数\times该褐级别}{调查的外植体数\times最高褐变级别}\times100\%$$

以上培养基的 PH 值为 5.8,培养温度为 25±1℃恒温,光照强度约 36μmol/(m^2•s),光照时间为 12h/d。每管接种一块外植体,每处理接 10 管,重复 3 次。接种后,先采用 4℃低温暗培养 5d。观察 1~20d 内各外植体褐变度情况,40d 统计各外植体的分化率。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对褐变的影响

为探索大花蕙兰不同取材方法的褐变程度差异,以及在培养过程中随着时间的积累外植体材料褐变程度的变化,将不同外植体材料接种于 MS +6-BA2.0g/L+NAA0.5g/L+PVP0.5g/L + 水解酪蛋白 1g/L+ 琼脂 7g/L+ 蔗糖 2g/L 培养基。花茎切段和假鳞茎切块接种第 1 天就有褐色物渗出现象,前 5d 每天将外植体转接到新鲜培养基中,假鳞茎切块和花茎切段分别培养到第 10 天、第 16 天就有褐变死亡现象,而茎尖接入第 15 天才有个别切块出现轻微褐变。从表 1 可以看出,几种外植体材料均发生了褐变,但不同外植体材料褐变发生的时间和程度差异还是很显著的,且褐变程度直接影响到后期的分化率(分化数 / 成活数×100%),如采用假鳞茎切块为外植体,到 20d 时,褐变指数高达 94.52%,其分化率则为 0,这在生产实践中无任何意义;选用茎尖、花茎切段为外植体,相比假鳞茎切块的 20d 褐变指数分别下降 76.39%、31.65%,40d 的分化率分别达 53.57%、10.34%。以上说明大花惠兰进行组织培养时褐变严重,选取褐变较轻的外植体材料是大花惠兰组培成功的关键。

表 1 不同外植体类型的褐变与诱导情况

序号	外植体类型	接种数	污染数	褐变指数 /%					分化率 /%
				1d	5d	10d	15d	20d	
1	幼嫩花茎切段	30	1	5.23	11.24	25.56	35.33	45.60	67.59
2	假鳞茎切块	30	0	8.67	32.70	58.71	81.24	94.52	0.00
3	茎尖	30	2	0.00	0.02	3.16	8.32	22.32	56.67

2.2 不同培养基成分及培养方式对褐变的影响

将同一类型褐变较轻的外植体(茎尖)接种在不同培养基中,并采用固体和液体两种培养方式,观察它们的褐变及分化情况,详见表 2。

就褐变情况来看,采用液体培养方式,褐化可以明显减轻,MS 和改良 MS 到 15d、1/2MS 则到 20d 才出

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 不同培养基成分及培养方式对大花蕙兰褐变指数及诱导分化的影响：

序号	培养基	培养方式	接种数	污染数	褐变指数					分化率 /%
					1d	5d	10d	15d	20d	
1	MS	固体	30	0	0.00	0.11	4.76	10.42	22.48	52.59
2		液体	30	0	0.00	0.00	0.00	0.36	8.12	48.67
3	1/2 MS	固体	30	1	0.00	0.06	3.46	8.68	18.37	62.62
4		液体	30	0	0.00	0.00	0.00	0.00	2.96	57.56
5	改良 MS	固体	30	2	0.00	0.02	2.88	10.12	23.77	70.98
6		液体	30	1	0.00	0.00	0.00	0.28	7.05	66.78

现轻微褐变，相对固体培养，它们的褐变指数分别下降63.88%、70.34%、83.89%；三种培养基中，以无机盐浓度较低的 1/2MS 培养基效果最好，尤其采用液体培养方式，培养到 20d 的褐变指数仅为 2.96，分别比 MS、改良 MS 的下降 63.55%、58.01%。但 40d 观察到的分化率，各处理间差异不大，采用固体培养的材料，其分化率略高于液体培养，其中，以改良 MS 为培养基的固体培养，分化率最佳，分别比 MS、1/2MS 高 34.97%、13.35%。

2.3 抗氧化剂和酚类物质吸附剂对大花惠兰褐变的影响

在培养基中添加不同抗氧化剂和酚类物质吸附剂对大花蕙兰均有不同程度的影响。从表 3 可以看出，PVP 对于抑制外植体褐变效果最好，后面依次为硫代硫酸钠、活性炭、维生素 C。从外植体的生长和分化来看，褐变程度轻的外植体生长分化率高；褐变程度重的外植体生长分化也较差。与对照相比，在培养基中添加不同抗氧化剂和酚类物质吸附剂均可有效降低大花蕙兰幼嫩花茎的褐变指数和不同程度提高分化率，在培养基中加入 500mg/L PVP，第 20 天观察褐变指数可降低 53.36%，40d 的分化率可达 67.59%，与对照相比差异明显。

表 3 培养基附加物对大花惠兰花茎切段的诱导率及褐变率的影响

序号	附加物	浓度 /mg•L^{-1}	接种数	污染数	褐变指数					分化率 /%
					1d	5d	10d	15d	20d	
1	对照(ck)	0	30	1	7.88	24.99	64.67	82.79	97.78	0.00
2	维生素 C	250	30	2	4.15	18.23	38.28	55.19	61.27	46.07
3	硫代硫酸钠	1000	30	0	5.98	13.12	28.45	37.03	52.65	54.33
4	PVP	500	30	1	5.23	11.24	25.56	35.33	45.60	67.59
5	活性炭	3000	30	0	2.45	13.49	26.12	41.3	53.02	48.67

表 4 外植体的不同预处理方法对大花惠兰褐变及诱导分化的影响

序号	处理方法	浓度 /(mg•L^{-1})	接种数	污染数	褐变指数					分化率 /%
					1d	5d	10d	15d	20d	
1	对照	0	30	0	8.67	32.70	58.71	81.24	94.52	0.00
2	无菌水	0	30	3	6.15	25.32	46.46	67.68	81.47	0.00
3	Na2S202	2000	30	3	0.00	7.06	28.12	46.13	62.78	40.00
4	PVP	2000	30	1	0.00	6.21	24.63	40.25	58.50	46.67
5	维生素 C	10000	30	4	1.04	17.49	32.12	55.30	72.02	31.25

2.4 培养材料的不同预处理对大花蕙兰褐变的影响

从表 4 可以看出，外植体接种前的预处理相比对照，它们的褐变指数均存在不同程度的降低，褐变现象得到一定的控制；诱导率则除无菌水处理以外，也有所改善；以可溶性聚乙烯吡烙咯烷酮(2g/L)和硫代硫酸钠(2g/L)预处理 20min 效果较好，它们的 20d 褐变指数分别比对照下降 38.11%、33.58%，且 40d 分化率达可 46.67%、40.00%；其次为维生素 C，而无菌水的效果不明显。这说明接种材料消毒后的预处理，对抑制大花蕙兰组织褐变起着重要作用。但接种前增加外植体预处理操作程序，均不同程度提高了污染率，加大了无菌操作的难度。

3 讨论

在植物组织培养中，外植体的褐变是导致培养失败的主要原因。褐变与植物材料的生理状态有密切关系，材料本身的生理状态不同，接种后褐变程度也不

维普资讯 http://www.cqvip.com

同。陈正华[4]、曹孜义[5]等认为褐变随母株年龄和组织木质化程度而增加，幼龄材料比成年材料褐变轻；从大花蕙兰不同外植体类型的褐变情况来看，在此研究中，无论何种处理方法，几种类型的外植体材料均有不同程度的褐变，特别是随着时间的推移外植体的褐变无一例外地加深，严重的导致死亡，其中，尤以假鳞茎、花茎切段最为严重。笔者认为外植体的生理状态可能是造成褐变程度差异的主要原因，这与许多资料显示结果一致；同时也说明大花蕙兰是一种极易褐变的植物，要完全消除褐变现象比较难，需进一步探明大花蕙兰褐变机理，采取有效方法，减轻其影响[6,7]。

外植体的褐变也与培养方式及培养基的成分有关。试验表明液体培养采用滤纸做纸桥可有效克服外植体褐变。滤纸具有一定的吸附作用，可吸附外植体溢出的在液体培养基中迅速扩散的酚类物质[8,9]，而固体培养基中的酚类物质则聚集在外植体周围，易导致褐变。然值得注意的是，采用纸桥液体培养的材料后期诱导分化率不如相应的国体培养的高，这可能与滤纸桥的吸附作用有关，外植体在固体培养基上对营养物质的吸收比通过相应的滤纸桥吸收更好。该试验三种培养基中，以改良 MS($CuSO_4$ 减半、KH_2PO_4 加倍)的诱导分化率最高；较低无机盐浓度的 1/2MS 可有效减轻或抑制大花蕙兰茎尖褐变现象，这与很多植物的组织培养研究结果[8-11]相符，但钟士传等[2]则认为较高的无机盐浓度可防止大花蕙兰茎尖褐变，这可能与不同大花蕙兰品种对无机盐的适应性不同有关，因此，针对不同的大花蕙兰品种，如何选择合适的无机盐浓度的培养基来减轻其褐变、提高诱导分化率，还应做进一步的探索和研究。

在植物组织培养中，常利用抗氧化剂、抑制剂和吸附剂或加入培养基或作为外植体的预处理剂来抑制外植体的酶促褐变[12-14]。据李焕秀登[15]报道，在苍溪梨组织培养中，接种前作 20min 8- 羟基喹啉和苯甲酸钠(浓度分别为 0.002mol/L 和 0.2mol/L) 浸泡处理对降低褐变和提高成活率均有较为理想的效果。张卫芳等[16]等发现每 L 培养基中添加 5ml 20%硫代硫酸钠能有效抑制核桃组织培养中的褐变现性且不影响植株生长。李娟等的认为在肉苁蓉细胞培养中，Vc 随浓度的增大对多酚氧化酶的抑制作用显著，当浓度达 0.6mg/L 时，多酚氧化酶的酶活降低为最适酶活的 5.1%，有效抑制了细胞褐变。但在此研究中，无论预处理试剂还是作为培养基添加剂，PVP 防止大花蕙兰组培中褐变的效果都是最佳，其次为硫代硫酸钠，而 Vc 的作用与 PVP 相比则显著降低。这说明抗氧化剂、抑制剂和吸附机种类很多，效果却有所不同，外植体不同，采用的浓度和方法是不一样的，防治组织培养中外植体褐变没有固定的模式。

参考文献

[1] 宋仪农,杜启兰,陈景秀,等.植物激素和大量元素对大花蕙兰组织培养的影响[J].山东林业科技,2001,136(5):16-17.

[2] 钟士传,郑亚琴,王侠礼,等.大量元素、激素和糖的对大花蕙兰组织培养的影响[J].中国农学通报,2000, 16(3),48-50.

[3] 徐宏英, 王芳. 大花蕙兰组培快繁影响因素分析 [J]. 园艺学报, 2002,29(2):183-185.

[4] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社, 1986:456-466.

[5] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,2001.

[6] 徐振标,傅作中,袁亚萍,等.植物组织培养过程中的褐化现象[J].国外农学:杂粮作物,1997,(1):55-56.

[7] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社, 1991:71.

[8] 高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理通讯,1999,35(6): 501-506.

[9] 梅兴国,董妍玲,潘学武.红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J].天然产物研究与开发,2001,13(4):8-11.

[10] 周俊辉.植物快速繁殖中存在的问题和对策[J].仲恺农业技术学院学报,1999,12(4):64-70.

[11] Zaid A. In vitro browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures——Areview[J].Acta Hort,1987,212:561-566.

[12] Walkey D G A. Production of apple plantlets from a axillary-bud meristems. Canadiam Journal of plant Science,1972,52 (6): 1085-1091.

[13] Lchihashi S, Kako S.Studies on donal propagation of Hattleya through tissue method. II.Browing of cattleya.J Jap Soc Hort Sci, 1977,(46):325-328.

[14] 崔唐兵,郭勇,张长远.植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J].广东农业科学,2001,(3):16.

[15] 李焕秀,乔霓娇.降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J].西南农业大学学报,2001,23(6):524-526.

[16] 张卫芳,高疆生,欧勇慧,等.核桃组培中抑制褐化现象初探.中国农学通报,2003,19(5):43-46.