

文章编号:1002-2090(2008)01-0028-04

蝴蝶兰叶片组织培养中抗褐化的研究

聂卫卓, 贝丽霞

(黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319)

摘要:研究了不同基本培养基、吸附剂、抗氧化剂对蝴蝶兰叶片组培过程中褐化的影响,结果表明:在叶片诱导类圆球茎过程中,VW培养基是最佳基本培养基,有效的降低了褐化率,类圆球茎的诱导率最高;培养基中添加活性炭 $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,褐化率最低为34.5%;添加抗坏血酸 $300\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,褐化率最低为40.6%。

关键词:蝴蝶兰;叶片;组织培养;抗褐化

中图分类号:S682.31

文献标识码:A

Research of Preventing Leaves Browning on the Tissue Culture of Phalaenopsis

Nie Weizhuo, Bei Lixia

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract: Different kinds of basic mediums, adsorbents and antioxidants which prevent vitro leaves from browning in tissue culture Phalaenopsis were studied. The results showed that: in the process of PLB (protocorm-like body) induced from leaves, VW medium was the best one that reduced effectively browning rate, and the inducing rate of PLB in VW mediums was the highest in the five ones. The browning rate as 34.5% was the lowest when the medium was added 2g/L activated charcoal and the browning rate as 40.6% was the lowest when was added 300mg/L vitamin C.

Key words: Phalaenopsis; leaves; tissue culture; prevent from browning

蝴蝶兰又名蝶兰,花姿高雅、花色艳丽、花期长,深受人们的喜爱,有“洋兰皇后”的美称。蝴蝶兰属于单茎性气生兰,植株上极少发育侧枝,靠自然分株的增殖系数很低,比其他任何兰花更难以进行常规的无性繁殖。此外,兰科植物种子非常细小,不含有为种子萌发提供营养的胚乳或其他组织,在自然条件下很难萌发^[1],因此,常规的繁殖方式无法满足市场的需要。鉴于上述原因,组织培养成为其主要的繁殖方式。但在组织培养过程中,经常遇到外植体的褐化,与污染、玻璃化并列为组织培养中的三大问题,严重影响培养材料的生长和分化。因而,在蝴蝶兰离体培养中,防止

外植体褐变死亡是其能否培养成功的关键。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为黑龙江八一农垦大学植物组培实验室的蝴蝶兰无菌苗。

1.2 试验方法

挑选大小一致、叶片长至2 cm左右的蝴蝶兰无菌苗,在超净工作台上将叶片边缘剪掉,垂直于叶片主脉切成 $0.5\text{cm}\times 0.5\text{cm}$ 大小的叶块,正面向上放置

收稿日期:2007-11-10

作者简介:聂卫卓(1982-),女,黑龙江八一农垦大学2005级硕士研究生。

于培养基上,放置在人工培养箱中培养,控制温度 25℃,光照 2 000 lx。

1.2.1 不同基本培养基对叶片褐化的影响

本试验设置了 MS、VW、1/2MS、1/4MS 和 MS 纸桥培养基 5 种基本培养基,每升各基本培养基均加入激素 6-BA5 mg, NAA0.5 mg。

MS 纸桥培养基不加琼脂;1/2MS、1/4MS 培养基只是大量元素减为 1/2 或 1/4,其它不变;以 MS 培养基为对照。

1.2.2 不同吸附剂对叶片褐化的影响

在 1.2.1 试验所用同样的加入激素的 VW 培养基基础上,添加活性碳(AC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)2 种吸附剂,每种吸附剂均分为每升添加 1、2、3 g 3 个水平。

1.2.3 不同抗氧化剂对叶片褐化的影响

在 1.2.1 试验所用同样的加入激素的 VW 培养基基础上,添加柠檬酸和抗坏血酸(VC)2 种抗氧化剂,每种抗氧化剂均分为每升添加 100、200、300 mg 3 个水平。

以上培养基均加入 30 g·L⁻¹ 蔗糖、10 g·L⁻¹ 琼脂

(MS 纸桥除外),控制 pH 值为 5.8。每个处理接种 15 瓶,每瓶接种 4 片,接种 50 d 后观察。

褐化率(%)=(褐化的外植体个数/总的外植体数)×100

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对叶片褐化的影响

由表 1 可以看出,叶片在 VW、1/2MS、1/4MS、MS 纸桥四种培养基中的褐化率均低于对照 MS 培养基,黄化率时高时低。VW 培养基中叶片褐化率虽然不是最低的(低于对照 20%),但没有出现黄化现象,类圆球茎的诱导率高,为 38.26%,颗粒大而饱满,颜色深,生长健壮,是叶片诱导类圆球茎的最佳基本培养基;叶片在 1/2MS、1/4MS 培养基中的褐化率低于 MS,这与前人的许多研究一致^[2,3]。其原因大概是 MS 培养基中 P、K、Ca、S 等元素含量较高,促进酚氧化为醌类物质,改良后的 MS 培养基,其元素含量减半或者更少,因此褐化较轻。叶片在 MS 纸桥培养基上培养,黄花率最高,达 91.67%,大部分叶片死亡,无类圆球茎产生。

表 1 不同基本培养基对叶片褐化的影响

Table 1 Effect of different basic browning mediums on browning in Phalaenopsis leaves

培养基	接种数/个	褐化数/个	黄化数/个	褐化率/%	黄化率/%	诱导率/%	诱导情况
MS	60	53	40	88.33	66.67	2.83	褐化严重,诱导率极低
VW	60	41	0	68.33	0.00	38.26	圆球茎饱满,诱导率高
1/2MS	60	44	48	73.33	80.00	10.58	诱导率低,类圆球茎小
1/4MS	60	30	30	50.00	50.00	9.65	诱导率低,类圆球茎小
MS 纸桥	60	33	55	55.00	91.67	0.00	无类圆球茎产生

2.2 不同吸附剂对叶片褐化的影响

由表 2 可见,叶片诱导类圆球茎时,培养基中添加一定量的 AC、PVP 两种吸附剂都能够比较明显地抑制褐化率,从而促进类圆球茎的生长。

随着 AC 和 PVP 浓度的增大,外植体的褐化率都在降低。AC 浓度为 3 g·L⁻¹ 时,褐化率最低,浓度为 2 g·L⁻¹ 时,褐化率稍高。但是,AC 浓度为 3 g·L⁻¹ 时,培养基上生长的外植体,颜色发黄,类圆球茎诱导情况不佳,在加有 2 g·L⁻¹ 的 AC 的培养基上叶片颜色深绿,类圆球茎的诱导情况较好;3 g·L⁻¹ 的 PVP 均比 2 g·L⁻¹ 和 1 g·L⁻¹ 抗褐化效果好,褐化率为 41.67%。

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,因此 PVP 常被许多学者用于防止褐变。在本试验中,叶片在含有 PVP 培养基中的褐化率高于含有活性碳的培养基,这可能是与植物体内酚类物质有不同的类型,PVP 存在不同分子量有关^[4]。

方差分析结果表明,除 2 g·L⁻¹ AC 和 3 g·L⁻¹ AC 两个处理之间达到显著差异外,其他处理差异均达极显著。从外植体的生长状况、类圆球茎的诱导情况和褐化率的降低程度三方面综合看,添加 2 g·L⁻¹ 的 AV 对减轻蝴蝶兰叶片褐化效果最佳。

表2 不同吸附剂对叶片褐化的影响

Table 2 Effect of different adsorbents on browning in Phalaenopsis leaves

吸附剂	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数/个	褐化数/个	褐化率/%	差异显著性	
					0.05	0.01
AC	1	60	52	86.74	b	B
	2	60	22	36.63	f	F
	3	60	21	34.50	g	F
PVP	1	60	41	68.33	c	C
	2	60	31	51.67	d	D
	3	60	25	41.67	e	E
CK	-	60	55	91.67	a	A

2.3 不同抗氧化剂对叶片褐化的影响

抗氧化剂可以改变外植体周围的氧化还原电势,对酚类物质的氧化起到抑制的作用,从而减轻褐变。柠檬酸和抗坏血酸的作用机理是增强还原性,抑制多酚氧化酶(PPO)的活性,从而抑制褐化。

从表3可见,培养基中添加一定量的柠檬酸和VC两种抗氧化剂比较明显的抑制了叶片的褐化,从而促进类圆球茎的诱导。

抗氧化剂种类不同,其效果不同,VC的抗褐化效果最好,最低的为41.67%,低于对照的一半。柠檬

酸较差些,最低的为75.00%。

抗氧化剂的种类不同,效果也不同。两种抗氧化剂随着浓度的增大,褐化率降低。对于柠檬酸而言,添加 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸的培养基褐化率最低;对于VC而言,添加 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ VC的培养基褐化率最低。

试验结果表明, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的VC的抗褐化效果最好,其褐化率极显著低于其它处理。这是因为VC为多羟基还原物质,一方面可以使多酚氧化酶失活阻止酚类物质氧化;另一方面VC在酶的催化下能消耗溶解氧,使酚类物质因缺氧而无法氧化^[9]。

表3 不同抗氧化剂对叶片褐化的影响

Table 3 Effect of different antioxidants on browning in Phalaenopsis leaves

吸附剂	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数/个	褐化数/个	褐化率/%	差异显著性	
					0.05	0.01
柠檬酸	100	60	51	85.00	b	B
	200	60	45	76.67	c	C
	300	60	45	75.00	c	C
VC	100	60	50	83.33	b	B
	200	60	39	65.00	d	D
	300	60	25	41.67	e	E
CK	-	60	55	91.67	a	A

3 讨论

3.1 基本培养基对叶片褐化的影响

适宜的基本培养基对植物组织培养的成功起关键作用,通常不同的植物所需基本培养基不同,目前常用的有MS、B5、White、VW等,其中以MS最为广泛。由于MS培养基含盐量较高,是一种高盐培养基,不适宜蝴蝶兰的生长与发育,改良的MS培养基无机

盐浓度减半或者更少,有效地降低了无机盐的浓度,VW培养基是一种低盐培养基,较适合兰花的组织培养。

研究发现基本培养基对蝴蝶兰叶片诱导类圆球茎的褐化起着重要的作用。在MS、VW、1/2MS、1/4MS和MS纸桥培养基五种培养基中,VW培养基中叶片的褐化率虽不是最低的,但是诱导率是最高的,类圆球茎的生长状况佳,所以VW是蝴蝶兰叶片诱导类

圆球茎的最适培养基,可以通过勤转瓶来降低褐化现象。改良的MS培养基和MS纸桥培养基虽然可以有效地降低褐化率,但是黄化现象严重,MS纸桥培养基的黄化率高达91.67%,大概是由于叶片的整个切面无法完整的浸在培养基中,吸收养分不充足导致,不适宜类圆球茎的诱导。

3.2 吸附剂对叶片褐化的影响

吸附剂的主要作用在于通过氢键、范德华力等吸附力把有毒物质从外植体周围吸附掉。PVP是酚类物质的专一吸附剂,被许多学者用于防止褐变。活性炭是一种吸附性较强的无机吸附剂,尤其是粉末状的活性炭,能吸附各种微量元素和微小颗粒,但是活性炭的吸附没有选择性,除了吸附毒酚类,同时也吸附培养基中的生长调节剂。在试验中发现AC和PVP对叶片有一定的褐变防止效果,其中以 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的AC防止效果最好,添加PVP的培养基与对照相比,效果显著,但还是不如AC效果好。门福义认为活性炭的吸附能力是由其表面积决定,而不是由它在培养基中的含量决定^[6],这有待于进一步研究。

3.3 抗氧化剂对叶片褐化的影响

VC抑制酶褐变的作用机理还有不同观点,有人认为它能将酶中的 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} ;或者由于它降低酶反应液的PH,改变了酶的作用条件;或者是可以将醌类物质还原为酚,然而一旦VC被彻底氧化成脱氢,抗坏血酸醌就会积累而形成褐变。所以,随着VC添加量的增加,抗褐化效果逐步明显,当VC含量为 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,抗褐化效果最佳,褐化率为41.67%。

参考文献:

- [1] 卢思聪.兰花栽培入门[M].北京:金盾出版社,1990.
- [2] 王永清,汤浩茹,邓群仙.樱花离体培养芽外植体的建立[J].四川农业大学学报,1997,15(3):314-334,387.
- [3] 张妙霞,孔祥生,郭秀璞.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.
- [4] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,V21(3):78-84.
- [5] 宁正祥,赵谋明.食品生物化学[M].广州:华南理工大学出版社,1995.293-301.
- [6] 门福义.马铃薯的贮存物质[J].马铃薯杂志,1983,(1):6.