

# 蝴蝶兰组培中 pH 和温度对外植体褐化的影响

赵伶俐<sup>1,2</sup> 葛红<sup>1\*</sup> 范崇辉<sup>2</sup> 印芳<sup>3</sup> 李秋香<sup>1</sup> 周玉杰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; <sup>3</sup> 湖南农业大学植物激素重点实验室, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 以蝴蝶兰 R4 品种叶片为外植体, 研究不同 pH 培养基、培养温度对褐化率、多酚氧化酶 (PPO) 活性和总酚含量的影响以及褐化率与 PPO、总酚之间的相关性。结果表明: 培养基 pH 6.5 或培养温度 20℃ 时外植体褐化率最低。在相同温度 (25℃) 下, PPO 活性、总酚含量高低并不与 pH 值大小成正比, 且褐化率与 PPO 无显著相关性, pH 5.0 时, 褐化率与总酚含量显著相关; 在相同 pH (6.0) 下, 温度越高, 褐化率越高, PPO 活性越强, 总酚含量越高, 且 20℃ 下, 褐化率与 PPO、总酚含量分别达到极显著、显著相关, 30℃ 下, 褐化率与总酚含量显著相关。

**关键词:** 蝴蝶兰; 褐化; pH; 温度

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 06-1373-04

## Effects of pH and Temperature on Browning of *Phalaenopsis* Explants Cultured in Vitro

Zhao Lingli<sup>1,2</sup>, Ge Hong<sup>1\*</sup>, Fan Chonghui<sup>2</sup>, Yin Fang<sup>3</sup>, Li Qiuxiang<sup>1</sup>, and Zhou Yujie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Phytohormones of Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** The variety 'R4' of *Phalaenopsis* was used for the study of pH and temperature effect on polyphenol oxidase (PPO) activity, total phenolic content, browning rate of the explants, correlation of browning rate and PPO activity with total phenolic content. The browning rate was the lowest at pH 6.5 or 20°C. Under the same temperature (25°C), the PPO activity and total phenolic content didn't have direct ratio with the bulk of pH, and there was no significant correlation between PPO activity and total phenolic content, but there was significant correlation between browning rate and total phenolic content at pH 5.0; Under the same pH (6.0), PPO activity, total phenolic content and browning rate increased while the temperature rose, and there were the best significant correlation between browning rate and PPO activity at 20°C, significant correlation between browning rate and total phenolic content at 20°C and 30°C.

**Key words:** *Phalaenopsis*; Browning; pH; Temperature

### 1 目的、材料与方法

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 是兰科蝴蝶兰属多年生常绿附生草本植物, 为单茎气生兰, 组织培养是主要的繁殖方式<sup>[1]</sup>, 但褐化影响其组培苗的成活率。有研究表明褐化主要是由多酚氧化酶 (PPO) 作用于天然底物酚类物质形成醌而引起的<sup>[2,3]</sup>。pH 是影响 PPO 活性的重要因素, 不同植物或同属不同种植物体内 PPO 活性的最适 pH 均不相同, 其变化幅度很大<sup>[4~6]</sup>。PPO 活性在不同植物中表现的最适温度也不一致, 其变化因植物体材料的不同呈现很大差异<sup>[7,8]</sup>。本试验通过培养基的不同 pH 和不同培养温度处理, 测定褐化率以及不同时期不同处理中外植体的总酚含量、多酚氧化酶活性; 研究褐化率与 PPO 活

收稿日期: 2006-02-17; 修回日期: 2006-04-22

基金项目: 国家 '863' 项目 (2004AA241200); 国家 '十五' 科技攻关计划项目 (2004BA521B02)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: gehong@mail.caas.net.cn)

性、总酚的相关性,以期通过控制培养基的 pH 以及培养温度来降低蝴蝶兰组培的褐化率。

试验材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所的蝴蝶兰 R4 品种 (Dtps. King Shiang's Rose × Jet-green Firbird)。培养基均为 MS + 6-BA  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 蔗糖 20%, 琼脂  $2.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 光照强度  $2\,000 \sim 2\,500 \text{ lx}$ , 光照时间  $12 \text{ h/d}$ 。pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0, 温度为  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 常规组培室中进行; 设 20、25 和  $30^\circ\text{C}$  3 种温度 (PQX-300B 智能人工气候培养箱中进行),  $\text{pH } 6.0 \pm 0.2$ 。R4 植株叶片 ( $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ ), 每处理接种 20 瓶, 3 次重复, 共 180 块外植体, 用于测定 PPO 活性和总酚含量。另外每处理再接种 30 瓶, 共 90 块外植体作为组培中褐化率的观察。

接种后每 3 d 观察 1 次褐化情况, 褐化统计以接种外植体边缘以及周围培养基颜色变褐为标准, 褐化率 (%) = 褐化外植体数/总接种数  $\times 100\%$ 。多酚氧化酶活性的测定参考朱广廉等的方法<sup>[9]</sup>, 略做改进, 研磨浸提液为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 5.8 磷酸缓冲液。在 UV-1601 型分光光度计上测定 525 nm 处的 OD 值。总酚含量的测定参考 Folin-Denis 法<sup>[10]</sup>, 略做改进, 研磨浸提液为 50% 乙醇盐酸 (pH 3.0) 溶液。500 nm 处测定 OD 值。采用没食子酸做标准曲线, 计算总酚含量, 以  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$  表示。试验数据采用 DPS 数据处理系统分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 pH、温度处理对褐化率的影响

不同 pH 与温度引起不同程度的褐化均在接种后第 3 天开始发生, 且褐化率随时间延长而增加。其中, pH 5.0 培养的外植体褐化率在整个培养过程中始终处于最高水平, 到接种第 12 天时, 其褐化率达到 32.2%; 而 pH 6.5 的褐化最轻, 仅为 4.4% (图 1)。可见, 中性偏酸的培养基对褐化有抑制作用。pH 5.0、5.5、6.0 的 3 种培养基中, 褐化开始时褐色物质就扩散至整个培养基, pH 6.5 和 7.0 中则主要集中在外植体边缘褐化且色深 (图版, 1~5)。在温度处理中, 接种第 3 天时, 处于  $25^\circ\text{C}$  条件下培养的蝴蝶兰外植体褐化最多, 为 23.3%。在随后的培养过程中, 褐化率的多少与温度的高低成正比。到接种第 12 天时, 以  $30^\circ\text{C}$  培养的外植体褐化最多, 达到 70%, 明显高于其他两处理 (图 2)。外植体在  $20^\circ\text{C}$  培养的褐化颜色最浅,  $25^\circ\text{C}$  下的褐化较重, 且培养基的褐化部分主要集中在外植体切口附近,  $30^\circ\text{C}$  条件下的外植体褐化最严重, 褐色最深, 且扩散到整个培养基 (图版, 6~8)。说明温度对褐化的影响比较明显, 温度越高, 褐化越严重; 低温可减轻褐化。

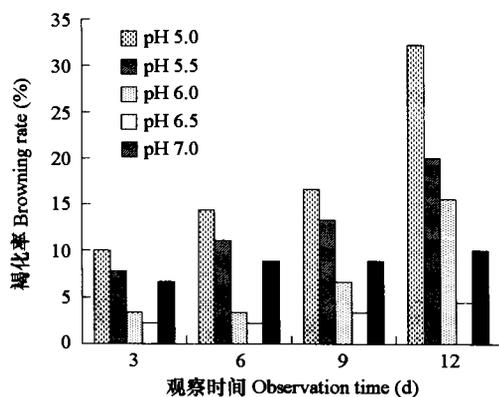


图 1 pH 处理对褐化率的影响

Fig. 1 Effect of pH on browning rate of explant

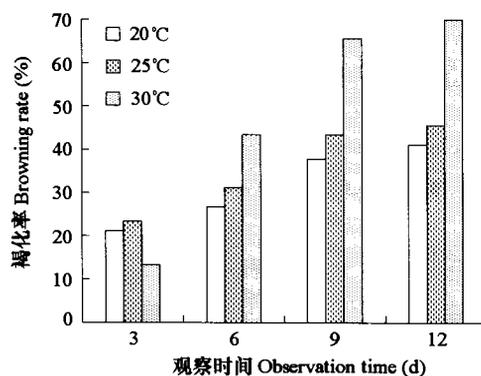


图 2 温度处理对褐化率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on browning rate of explant

### 2.2 不同 pH 与温度处理对蝴蝶兰组培外植体多酚氧化酶 (PPO) 活性的影响

表 1 显示不同 pH 导致 PPO 活性不同, 且在不同培养时间变化不一致。刚接种时, 各处理间 PPO 活性均无明显差异。各处理 PPO 活性并不随培养时间延长而绝对增加或减少, 但均在接种第 3 天时出现上升, pH 6.0 条件下 PPO 活性显著高于 pH 7.0 的; 接种第 6 天时, 各处理 PPO 活性均有下降,

到接种第 12 天时又上升, 其中以 pH 7.0 下的外植体 PPO 活性处于最高水平, 与 pH 5.5、6.0 的呈显著差异。不同温度对蝴蝶兰组培外植体中 PPO 活性的影响具体表现在两方面: 同一温度下, 随培养时间延长, 活性趋于增强; 温度越高, PPO 活性越大。20℃ 条件培养的外植体 PPO 活性一直低于其他两个处理。25℃ 和 30℃ 下培养的外植体 PPO 在接种第 9 天时均有 1 个下降且 30℃ 培养的与其他两个处理的在此时达极显著差异。接种第 12 天时, 以 30℃ 培养的比 20℃ 培养的外植体 PPO 活性多了 3.895 个活力单位, 呈极显著差异。

表 1 不同 pH 与温度对蝴蝶兰外植体中 PPO 活性的影响

Table 1 Effect of different pH and temperature on activity of PPO of *Phalaenopsis* explant ( $\Delta A/0.01 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$ )

处理 Treatment	接种天数 Inoculation time (d)				
	0	3	6	9	12
pH 5.0	6.000aA	9.250abA	5.083cC	8.000aA	9.500abAB
5.5	6.167aA	9.917abA	6.167bcBC	6.750abA	8.333bB
6.0	6.250aA	10.500aA	9.000aA	7.250abA	8.417bB
6.5	6.833aA	10.000abA	6.833bABC	5.333bB	9.750aAB
7.0	6.417aA	8.583bA	7.667abAB	5.917abA	10.417aA
20℃	4.588aA	6.729aA	7.500bB	8.158bB	9.563bB
25℃	4.708aA	6.825aA	11.425aA	8.096bB	11.454abAB
30℃	4.479aA	7.388aA	11.175aA	9.130aA	13.458aA

注: 邓肯氏显著性检验, 不同的大、小写字母分别表示在  $P=0.01$ 、 $0.05$  水平上存在显著差异。

Note: Duncan's multiple test, different capital and small letters indicate the significance at level of 0.01 and 0.05.

### 2.3 不同 pH 与温度对蝴蝶兰组培外植体总酚含量的影响

不同 pH 引起蝴蝶兰外植体内总酚含量在各测定时期变化不一致, pH 5.5 时总酚含量最低。各处理在接种第 3 天和第 9 天时均有下降, 整个接种培养过程结束时 (12 d), pH 5.0 条件下培养的外植体总酚含量增加了  $55.796 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 处于最高水平, 与 pH 5.5、6.5、7.0 条件下的呈显著差异 (图 3)。在 20℃ 和 30℃ 下培养的外植体, 其总酚含量随培养时间的延长而增加, 25℃ 下培养的外植体总酚含量在接种后的第 6 天有下降, 随后缓慢上升。刚接种时, 三处理的总酚含量之间无显著差异, 从接种第 6 天开始到整个培养结束时 (12 d), 30℃ 下培养的外植体总酚含量均与其他两处理呈显著差异 (图 4)。

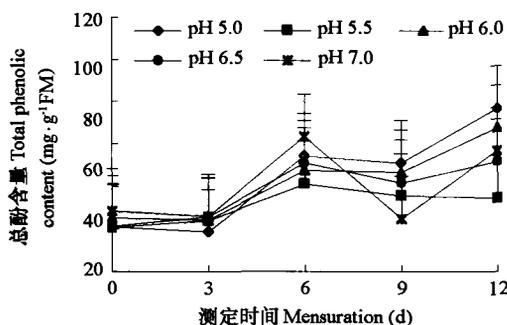


图 3 不同 pH 对外植体总酚含量的影响

Fig. 3 Effect of different pH on total phenolic content of explant

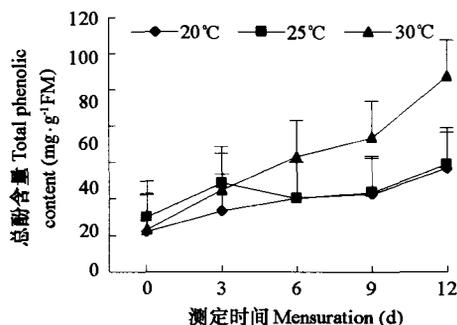


图 4 不同温度对外植体总酚含量的影响

Fig. 4 Effect of different temperature on total phenolic content of explant

### 2.4 褐化率与 PPO 活性、总酚含量之间的关系

从表 2 可看出, pH 各处理中, PPO 活性与褐化率均不存在显著相关性, 这说明在不同 pH 处理的蝴蝶兰组织培养中, PPO 活性可能不是引起其褐化的主要因素, 可能是由于切割导致膜完整性被破坏或者其他氧化酶作用, 从而引起褐化, 这还需进一步的验证。20℃ 下外植体褐化率与 PPO 活性存在极显著相关, 表明 20℃ 下, 随培养时间延长, PPO 活性增强是引起褐化率增高的因素。在 pH 5.0、20℃、30℃ 处理下, 褐化率与总酚达到显著相关水平, 表明在这些条件下, 随培养时间延长, 褐化率增高是与总酚含量增加有关的。

表2 不同处理中褐化率与PPO活性、总酚含量之间的相关系数

Table 2 Correlation modulus of browning rate and PPO activity with total phenolic content of different treatment

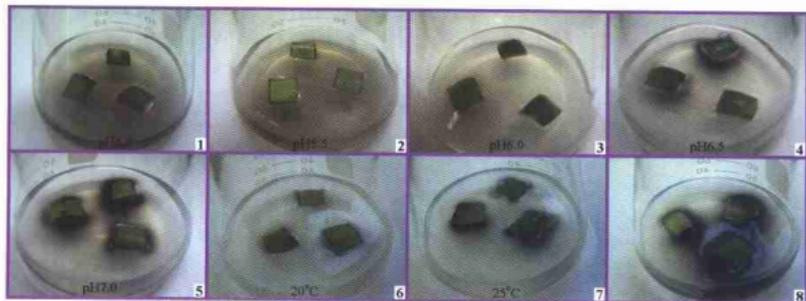
处理/Treatment	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	20℃	25℃	30℃
PPO	0.549	0.258	0.128	0.506	0.464	0.979**	0.779	0.861
总酚 Phenolic content	0.909*	0.724	0.867	0.764	0.504	0.937*	0.785	0.936*

\* 为1%显著性水平; \*\* 为5%显著性水平。

\* indicate significant level at 1%; \*\* indicate significant level at 5%.

## 参考文献:

- 周志宏, 梁小敏, 吴森生. 蝴蝶兰试管生根试验研究. 江西园艺, 2003 (4): 37-38
- Zhou Z H, Liang X M, Wu M S. Study on test of rootage of *phalaenopsis* in cuvette. Jiangxi Horticulture, 2003 (4): 37-38 (in Chinese)
- 巴兰春, 孙建设, 辛 蓓, 吕新琼. 苹果果实在促褐底物及多酚氧化酶活性的研究. 园艺学报, 2004, 31 (4): 502-504
- Nie L C, Sun J S, Xin B, Lu X Q. Studies on phenolic composition and polyphenol activity in apple fruits. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (4): 502-504 (in Chinese)
- 许传俊, 李 玲. 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD和PAL的关系. 园艺学报, 2006, 33 (4): 671-674
- Xu C J, Li L. Changes of total phenol content and the activities of PPO, POD and PAL during the browning in *Phalaenopsis* explant in vitro. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33 (4): 671-674 (in Chinese)
- 王 清, 王 蓓. 温度、pH对马铃薯多酚氧化酶活性的影响. 中国马铃薯, 2003, 17 (3): 157-161
- Wang Q, Wang D. The effects of temperature and pH on the polyphenol oxidase activity of potatoes. Chinese Potato Journal, 2003, 17 (3): 157-161 (in Chinese)
- 韩富根, 焦桂珍, 刘学芝, 路鹏翔, 姜富恩, 崔永军. 烟草叶片多酚氧化酶的提取及其特性研究. 河南农业大学学报, 1995, 29 (1): 98-102
- Han F G, Jiao G Z, Liu X Z, Lu P X, Jiang F E, Cui Y J. Study on the extraction of polyphenol oxidase from tobacco leaves and its characteristics. Acta Agriculturae Universitatis Henanensis, 1995, 29 (1): 98-102 (in Chinese)
- Wu H C, Chu H L, Kuo J M. The biochemical characteristics of polyphenol oxidase from browning tissue-cultures bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*). Food Sci. Agricul. Chem., 1999, 1 (4): 244-249
- 雷东峰, 蒋大宗, 王一理. 烟草中多酚氧化酶的生理生化特征及其活性控制的研究. 西安交通大学学报, 2003, 37 (12): 1316-1320
- Lei D F, Jiang D Z, Wang Y L. Physiological and biochemical characteristic of tobacco polyphenol oxidase and control way for its activity. Journal of Xi'an Jiaotong University, 2003, 37 (12): 1316-1320 (in Chinese)
- 黄 浩. 红豆杉细胞多酚氧化酶的性质研究初探. 江西科学, 1999, 17 (3): 158-162
- Huang H. A preliminary study on the properties of polyphenol oxidase from suspension cells of *Taxus chinensis*. Jiangxi Science, 1999, 17 (3): 158-162 (in Chinese)
- 朱广康, 钟海文, 张爱琴. 植物生理实验. 北京: 北京农业大学出版社, 1990. 37-39
- Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. Plant physical experiment. Beijing: Press of Beijing Agricultural University, 1990. 37-39 (in Chinese)
- Linskens H F, Jackson J F. Fruit analysis. Heidelberg: Spinger-Verlag, 1995. 82-83



图版说明: 接种15 d后外植体及培养基褐化情况。

Explanation of plates: Browning state of explant and medium after inoculation for 15 d.