

黑暗预处理对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响

赵伶俐^{1,2}, 范崇辉^{1*}, 葛红²

(1. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以蝴蝶兰 R4 品种叶片为外植体, 研究不同时间的黑暗预处理对褐化率、多酚氧化酶(PPO)活性和总酚含量的影响。结果表明: 黑暗预处理能减轻褐化, 其中以预处理 10 d 的褐化最轻; 未经暗处理的褐化最重且 PPO 活性最大, 总酚含量无一致变化规律, 各处理中褐化率与 PPO 活性显著相关。

关键词: 暗培养; 蝴蝶兰; 组培; 褐化

中图分类号: S681.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2006)05-0248-03

Effect of Darkness Pretreatment on Browning of *Phalaenopsis* Explants Cultured *in vitro*

ZHAO Ling-li^{1,2}, FAN Chong-hui^{1*} and GE Hong²

(1. Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers of Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: The variety R4 leaf of *Phalaenopsis* was used as explant, the effect of darkness pretreatment at different time on polyphenol oxidase(PPO) activity, total phenolic content and browning rate *in vitro* were studied. The results as follows: Darkness pretreatment may decrease brown, especially of pretreatment for 10 d, browning rate was the lightest. The activity of PPO was the biggest when explant without darkness pretreatment. Total phenolic content didn't have accordant change rule, there was significant correlation between the browning rate and the activity of PPO in each treatment.

Key words: Darkness pretreatment; *Phalaenopsis*; Tissue culture; Browning

目前, 组织培养已成为蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)的主要繁殖方式^[1], 而褐化一直是其组培中需解决的问题。有关研究表明导致褐化的主要原因是由多酚氧化酶(PPO)作用于天然底物酚类物质形成醌而引起的^[2~7]。细胞化学和细胞免疫化学分析表明, PPO 是一种质体酶, 存在于正常细胞的光合组织(如叶绿体类囊体的囊泡)和非光合组织质体(如马铃薯块茎细胞的造粉体)^[8]。多酚氧化酶属于植物体内的末端氧化酶系统, 光照明显促进了此酶的活性。本试验通过在培养前对外植体进行黑暗预处理, 观察褐化率, 测定不同时期不同处理中外植体的多酚氧化酶活性、总酚含量,

并对彼此间的相关性进行研究, 以期寻找通过对外植体进行黑暗预处理来减轻蝴蝶兰组培褐化率的有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为中国农业科学院蔬菜花卉研究所花卉组培室的蝴蝶兰 R4 品种(Dtps. "King Shiang's Rose×Jetgreen Firbird")。

1.2 黑暗预处理

CK 为常规组培室中光照培养; 黑暗预处理 5 d、10 d(均在 PQX-300B 智能人工气候培养箱

收稿日期: 2006-02-20 修回日期: 2006-03-10

基金项目: 国家科技攻关计划项目(2004BA516A10; 2004BA521B02)。

作者简介: 赵伶俐(1982-), 女, 湖北荆州人, 在读硕士, 研究方向: 园林植物生理生态。

* 通讯作者。

中进行。

1.3 组织培养

试验材料在上述处理后接种于 MS+6-BA₃ mg·L⁻¹, 琼脂 2.8 g·L⁻¹, 蔗糖 20%, pH6.0 ±0.2 的培养基中, 光照强度 2 000 lx~2 500 lx, 光照时间 12 h/d, 温度 25±2℃。外植体为 R4 植株叶片(1cm×1 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 块外植体做为组培中褐化率的观察。

1.4 指标测定

1.4.1 褐化率 接种后每 3 d 观察一次褐化情况, 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。

褐化百分数=褐化外植体数/总接种数×100%

1.4.2 多酚氧化酶活性测定 参考朱广廉等^[9]的方法。略做改进, 研磨浸提液为 0.05 mol·L⁻¹ pH5.8 磷酸缓冲液。在 UV-1601 型分光光度计上测定 525 nm 处的 OD 值。

酶活力($\Delta A/0.01 \text{mg} \cdot \text{g} = E_{525}/0.01 \times W \times t$)

1.4.3 总酚含量测定 参考 Folin-Denis 方法^[10]。略做改进, 研磨浸提液为 50% 乙醇盐酸(pH3.0)溶液。500 nm 处测定 OD 值。用没食子酸做标准曲线, 计算总酚含量, 以 mg·g⁻¹·FW 表示。

试验数据均采用“DPS 数据处理系统”分析。

2 结果与分析

2.1 黑暗预处理对褐化率的影响

接种第 3 天, 3 个处理中的外植体褐化即开

始出现, 褐化率均随培养时间延长而增加, 未经过黑暗预处理的外植体褐化率一直高于其他两处理, 到接种第 12 天时, 褐化率达到 34.4%。而黑暗预处理 10 d 的外植体褐化率相对最低, 为 24.4%。

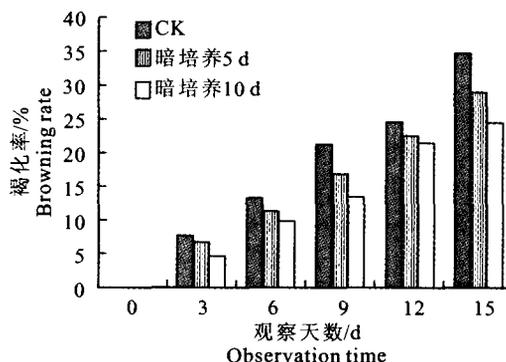


图 1 暗处理对蝴蝶兰外植体褐化率的影响

Fig. 1 Effect of darkness pretreatment on browning rate of *Phalaenopsis* explant

2.2 黑暗预处理对蝴蝶兰外植体 PPO 活性的影响

表 1 结果表明, 各处理外植体内 PPO 活性在刚接种培养时以未经过黑暗预处理的最高, 但差异不显著。整个培养过程中(12 d), 各处理 PPO 活性含量持续上升, 其中, 两个经过黑暗预处理的外植体中 PPO 活性在接种第 3 天时有个急剧上升, 随后增加速率趋于缓慢。接种第 12 天时以未经过黑暗预处理的外植体 PPO 活性增加了 4.188 个活力单位, 处于最高, 其次是暗培养 5 d 的处理。说明黑暗对 PPO 活性有很大抑制作用, 外植体经黑暗预处理后即使重新给予光照, PPO 活性也会下降。

表 1 黑暗预处理对蝴蝶兰组培外植体 PPO 活性的影响

Table 1 Effect of darkness pretreatment on activity of PPO of *Phalaenopsis* explant

处理 Treatment	不同接种天数培养外植体中 PPO 活性 ($\Delta A/0.01 \cdot \text{min} \cdot \text{g FW}$) The activity of PPO for explants at different time					Δ PPO
	0	3	6	9	12	
CK	8.750 a	8.750 b	9.750 ab	10.0 b	12.938 a	4.188
5 d	8.188 a	9.313 b	10.188 a	10.563 a	12.313 ab	4.125
10 d	8.438 a	9.438 a	9.438 b	10.438 a	11.063 b	2.625

注: 表中不同的小写字母表示处理间在 $P=0.05$ 水平上存在显著差异。

Note: Different small letter indicated the significant difference at 0.05 level.

2.3 黑暗预处理对外植体内总酚含量的影响

刚接种时, 3 个处理的外植体总酚含量表现为未经过黑暗预处理的最高, 但它们之间无显著差异, 接种第 3 天时均有一个下降, 但表现为经过

黑暗预处理的外植体中总酚含量显著高于未经过处理的。接种第 9 天时, 经过 5 d 黑暗预处理的外植体内总酚含量陡然升高, 增加趋势持续到接种第 12 天, 其值均显著高于其他两处理。

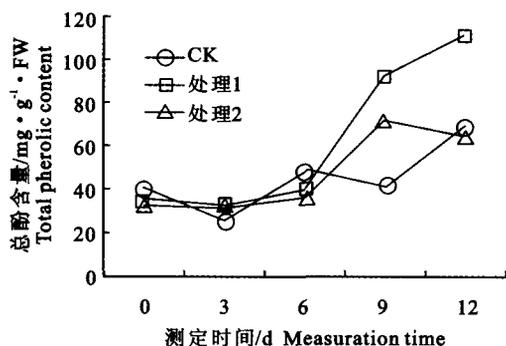


图2 暗培养对蝴蝶兰组培外植体总酚含量的影响

Fig. 2 Effect of darkness pretreatment on total phenolic content of *Phalaenopsis* explant

3 讨论与结论

3.1 PPO活性受光照强度的影响。在本试验的所有处理中,PPO最大活性表现在不经过任何暗处理的光照强度下。处于这个条件下培养的蝴蝶兰叶片褐化严重。各处理中褐化率与PPO活性均存在显著相关性(未黑暗预处理 $R_0 = 0.887$, 黑暗预处理 5 d $R_5 = 0.946$, 黑暗预处理 10 d $R_{10} = 0.982$),表明随培养时间延长,褐化率增加是由PPO活性加强引起的。黑暗预处理后再光照培养可能未完全激活PPO活性基因的表达,所以褐化较轻,而其中又以黑暗预处理 10 d 的控褐效果最好。

3.2 三处理中总酚含量并不表现一致的变化规律,而在接种 3 d 时均出现一个低谷,其原因有待进一步研究。在测定的各时期中,也并不是褐化最重的处理中外植体总酚含量一直最高。可见,

外植体在经过黑暗预处理后接种,褐化率并不与总酚含量绝对相关,总酚含量增加可能不是引起褐化加重的主要因素。

3.3 因此,在组培应用中,接种前对外植体进行黑暗预处理可以在很大程度上抑制PPO活性,从而有效减轻褐化。另外,黑暗预处理后,在接种的培养基中加入抑制PPO活性的物质,可能更好的起到控褐效果,这有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周志宏,梁小敏,吴森生. 蝴蝶兰试管生根实验研究[J]. 江西园艺,2003(4):37~38.
- [2] Alfred M. Mayer and Eitan Harel. Polyphenol Oxidase in plants[J]. Phytochemistry,1979,18:193~215.
- [3] 杨博,韩振海,张勇,等. 不同光照强度对玫瑰组织培养中初代培养物褐化的影响[J]. 园艺园林科学,2003,19(6):194~196.
- [4] 胡瑞波,田纪春. 小麦多酚氧化酶研究进展[J]. 麦类作物学报,2004,24(1):81~85.
- [5] 蒋益虹. 百合褐变与多酚氧化酶和过氧化物酶活性关系的研究[J]. 浙江大学学报,2003,29(5):518~522.
- [6] 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,1999,3:1~12.
- [7] 雷东锋,冯怡,蒋大宗. 植物中多酚氧化酶的特征[J]. 自然科学进展,2004,14(6):606~614.
- [8] 王曼玲,胡中立,周明全,等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报,2005,22(2):215~222.
- [9] 朱广廉,钟海文,张爱琴. 植物生理实验[M]. 北京:北京农业大学出版社,1990. 37~39.
- [10] Kubota N. Phenolic content and L-phenylalanine ammonia-lyase activity. In Linskens H. F. and J. F. (Eds). Fruit Analysis,Spinger-Verlag,Heidelberg,1995,82~83.