

# 秦岭野生春兰组织培养过程中的褐化控制研究

王宝宁<sup>1</sup>, 张 显<sup>2</sup>, 宋军阳<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学 林学院 陕西 杨凌 712100 2. 西北农林科技大学 园艺学院 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以秦岭野生春兰为材料,选花梗和花萼作为外植体,以 1/2MS 作为基本培养基,运用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验研究处理对褐化的影响。结果表明:处理 4 是控制春兰外植体褐化的最佳的方法,即 1/2MS+活性炭(AC)1 g/L+PVP 5 g/L+暗培养 10 d。

**关键词:** 秦岭; 野生春兰; 组织培养; 褐化; 外植体

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)05-0169-04

国兰(中国兰)是指我国传统栽培的兰属(*Cymbidium*)植物,主要是指春兰、蕙兰、建兰、寒兰、墨兰等。国兰花香馥郁,叶姿飘逸,深受人民喜爱。随着人们生活水平的提高,兰花的市场需求旺盛,兰花产业也得到了

快速发展。但传统的分株繁殖,速度较慢,需至少 3 a 才能开花结实,繁殖系数极低,远不能适应国内外市场需要。植物组织培养技术是生产中得到最广泛应用和产生较大经济效益的一项生物技术,也是快速繁殖植物新品种的最重要的方法。在兰花组织培养中褐化现象特别严重,它是影响兰花组培成功与否的一个关键因素。然而到目前为止没有一种方法可以完全控制褐化,褐化的出现既与植物基因型、外植体大小、植物材料的部位有关,同时也与培养的外界条件,如培养基、光照、温度等有关。因此,对于不同的植物材料,有不同的降低和防止褐化的方法。所以研究兰花外植体褐变产生的原因和防止方法具有很重要的实践意义。

**第一作者简介:** 王宝宁(1985-),女,陕西宝鸡人,在读硕士,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail: wangbaoni001@163.com。  
**通讯作者:** 张显(1961-),男,陕西宝鸡人,教授,现主要从事园艺植物种质资源与利用研究工作。E-mail: zhangxian098@126.com。  
**基金项目:** 国家林业局社会公益资助项目(200704009);陕西省农业攻关资助项目(2009K01-11);西安市科技局攻关资助项目(NC09045-1)。  
**收稿日期:** 2010-12-13

在植物组织培养中,植物激素对器官分化的调节起着非常重要的作用,尤其是细胞分裂素与生长素的比值对组织的发育起着决定作用。不同浓度的组合对器官分化调节的结果不同,这种无性繁殖的方法,易于保持品种原有特性,使其保持优良的品性。

### 参考文献

[1] 张秋芳,张美寿.火龙果的特点与引种技术[J].福建果树,1999(4): 45.

[2] 熊月明,程明,刘友接.新兴水果—火龙果[J].植物杂志,2000(3): 13.  
[3] 苏成军.火龙果在河南商丘温室栽培表现及栽培技术[J].中国果树,2007(5): 51.  
[4] 蔡永强,郑伟,王彬.火龙果营养成分分析[J].西南农业学报,2010,23(1): 283.  
[5] 陈广超,谢晓明,林燕绒.火龙果组培快繁技术[J].中国南方果树,2003,32(3): 31.  
[6] 黄青峰,余成章.火龙果的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,38(5): 452.

## Rapid Propagation of *Hylocereus undatus*

YANG Hong-chao, ZHENG Ai-zhen, TANG Zheng-hui

(Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000)

**Abstract:** Taking stem sections of axillary bud of *Hylocereus undatus* pitaya with stem as explant, using method of tissue culture were studied. The results showed that the best medium for start was MS+5.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA, the induce rate was 70%; best medium for proliferation was MS+6.0 mg/L 6-BA+0.09 mg/L NAA, proliferation coefficient was 3.5; best medium for rooting was 1/2MS+0.30 mg/L IBA+0.20 mg/L NAA, rooting rate more than was 95%, the average number of rooting was 7.2 bar/plant, the length of root was 8.2 cm, the seedling grew more exuberant.

**Key words:** *Hylocereus undatus*; tissue culture; rapid propagation

1 材料与方法

1.1 试验材料

以秦岭野生春兰(*Cymbidium goeringii*)为试材,取自西北农林科技大学兰花种质资源圃。

1.2 试验方法

首先从春兰植株切取花序,立即带回实验室,将花梗切成5~8 cm的小段,每个小段带1个茎节,同时切取花萼,用酒精清洗,然后放在大烧杯中,杯口用塑料纱窗包好,用小流量的自来水冲洗12~24 h。其次把材料取出用洗洁剂清洗5 min左右,在流水下冲洗干净。然后把洗净后的材料用蒸馏水浸泡和冲洗2次,置于无菌滤纸上等待自然阴干。把阴干后的材料在超净台上用75%酒精擦洗外表面,再在0.1%升汞中浸洗5~6 min,最后用无菌水反复冲洗3~4次,晾干备用。

试验采用3种防褐剂的不同配比及不同暗培养时间作为处理。防褐剂分别为聚乙烯吡咯酮(PVP)、柠檬酸、活性炭,采用四因素三水平正交实验 $L_9(3^4)$ (表1)。培养基配方为:1/2MS+NAA 3 mg/L+TDZ 0.5 mg/L、蔗糖 20 g/L、琼脂 7.5 g/L, pH 5.4。吸附剂 PVP 设置3个水平为0.5、10 g/L;柠檬酸设置3个水平为0.0、1.0、2 g/L;活性炭设置3个水平为0.1、2 g/L。

外植体分别为春兰的花梗和花萼。花梗每处理接种12个外植体,花萼每处理接种8个外植体,3次重复。从接种之后的第10天开始记录完全褐化的外植体数,每隔10 d记录1次。

表1 正交实验 $L_9(3^4)$ 的处理方案

处理	活性炭	柠檬酸	PVP	暗培养时间
	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/d
1	0	0	0	5
2	0	0.1	5	7
3	0	0.2	10	10
4	1	0	5	10
5	1	0.1	10	5
6	1	0.2	0	7
7	2	0	5	10
8	2	0.1	10	5
9	2	0.2	0	7

1.3 数据统计

外植体褐化程度分为完全褐化和不完全褐化。不完全褐化包括出现褐化(切口有褐化物分泌)和部分褐化(褐化超过外植体的1/3但未完全褐化)。完全褐化率/%=完全褐化外植体数/接种外植体数×100%;不完全褐化率/%=(完全褐化外植体数+部分褐化外植体数)/接种外植体数。

2 结果与分析

2.1 各处理对春兰花梗外植体褐化的影响

从表2可看出,在接种后的10 d,处理8的外植体完全褐化率超过了30%;处理9的完全褐化率达到了

15%以上,相对较高;处理1和2的完全褐化率相对较低,完全褐化率均在10%以内,其余处理均没有出现完全褐化的外植体。接种后20 d的时候,处理8再次成为完全褐化率最高者,达到75%;处理7的完全褐化率从10 d的0%升高到33.3%,说明了处理7的褐化速度相对较慢;观察还发现外植体在前10 d只是出现褐化现象,并没有迅速褐化死亡。由此说明,前10 d实施一定的措施(转瓶),就可以有效的降低褐化。在接种后30 d,处理9相对变化大一点,完全褐化率达到66.7%;前20 d的完全褐化率为0%的处理3、4、5、6完全褐化率均达到了10%~20%,处理3达到30.6%。说明此前未出现完全褐化外植体都已出现褐化现象,只是速度相对较慢。其余处理较以前都有所升高,但都不显著;通过比较,处理4的完全褐化率相对较低,说明此处理较其它处理对降低褐化有较好的作用。

表2 春兰花梗培养褐化情况

处理	培养10 d			培养20 d			培养30 d		
	总接	完全	完全	总接	完全	完全	总接	完全	完全
	种数	褐化数	褐化率	种数	褐化数	褐化率	种数	褐化数	褐化率
	/个	/个	/ %	/个	/个	/ %	/个	/个	/ %
1	36	3	8.3	36	6	16.7	36	7	19.4
2	36	3	8.3	36	9	25	36	9	25
3	36	0	0	36	0	0	36	11	30.6
4	36	0	0	36	0	0	36	6	16.7
5	36	0	0	36	0	0	36	9	25
6	36	0	0	36	0	0	36	8	22.2
7	36	0	0	36	12	33.3	36	18	50
8	36	12	33.3	36	27	75	36	27	75
9	36	6	16.7	36	6	16.7	36	24	66.7

2.2 各处理对春兰花萼外植体褐化的影响

通过30 d的记录观察发现,花萼的褐化比花梗的褐化相对严重。从第1个10 d开始,除了处理4以外,其它处理均出现完全褐化的外植体,完全褐化率均达到50%~100%。说明花萼的褐化率本身就很高,而且在很短时间内外植体就达到完全褐化死亡。由表3可知,在培养20 d的时候,处理5的完全褐化率达到了100%,处理4开始出现完全褐化的外植体。而在培养30 d的时候其它处理的外植体均完全褐化,只有处理4相对较好。由此说明,处理4对降低花萼褐化率有很显著的影响。

2.3 暗培养时间对降低花梗外植体褐化的影响

由图1可知,就暗培养时间来看,暗培养10 d的完全褐化率在3个水平中最低,也就是说接种的外植体暗培养10 d后完全褐化率相对较低。由图2可知,暗培养5 d和暗培养10 d的外植体,在培养10~20 d的时间内完全褐化率急速升高,而在培养20~30 d的时间内,暗培养5 d的外植体完全褐化率没有很显著的变化,而且完全褐化的速度减慢。相反,在这段时间内暗培养7 d

和暗培养 10 d 的外植体的完全褐化率则迅速升高。由此说明, 相对较长的暗培养时间有利于降低褐化率, 但是否越长越好, 还要等具体试验数据验证。

表 3 春兰花萼培养褐化情况

处理	培养 10 d			培养 20 d			培养 30 d		
	总接	完全	完全	总接	完全	完全	总接	完全	完全
	种数	褐化数	褐化率	种数	褐化数	褐化率	种数	褐化数	褐化率
	/个	/个	/ %	/个	/个	/ %	/个	/个	/ %
1	24	24	100	24	24	100	24	24	100
2	24	24	100	24	24	100	24	24	100
3	24	24	100	24	24	100	24	24	100
4	24	0	0	24	3	12.5	24	12	50
5	24	12	50	24	24	100	24	24	100
6	24	12	50	24	12	50	24	24	100
7	24	24	100	24	24	100	24	24	100
8	24	12	50	24	12	50	24	24	100
9	24	24	100	24	24	100	24	24	100

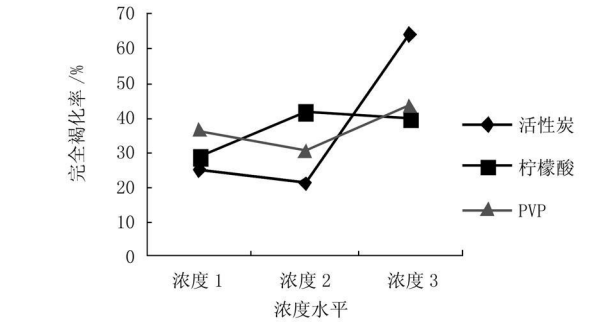


图 3 各因素影响褐化的直观分析

表 4 各因素影响褐化的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
活性炭	0.334	2	30.364	19.000	*
柠檬酸	0.030	2	2.727	19.000	
PVP	0.003	2	0.182	19.000	
暗培养时间	0.011	2	1.000	19.000	
误差	0.01				

3 结论与讨论

光照是植物生长中不可缺少的外界环境因素, 但是光能也能促进多种植物组织培养中酚的氧化<sup>[1-3]</sup>。光照条件对巨桉叶片渗出物形成的影响从低到高为黑暗、漫射光、短日照、长日照<sup>[4]</sup>。在低光照<sup>[1,5]</sup>或置于黑暗中<sup>[2,4,6,7]</sup>培养一段时间能减轻褐变。这说明对容易褐化的植物外植体在不影响正常生长的情况下适当的暗培养可以减轻褐化。余慧琳等<sup>[8]</sup>研究表明, 适当的暗培养有利于减轻外植体的褐变, 无论是花梗腋芽还是花梗节段的外植体, 暗培养 1 周后再转入光强 2 000 lx 下正常培养, 都比接种后直接放在 2 000 lx 的条件下培养, 外植体发生褐变的症状要轻, 并且发生褐变的时间会推迟。在试验中暗培养时间分为 5、7、10 d 其中培养时间 10 d 的处理褐化率最低(图 3)。在该试验的基础上相对延长暗培养时间, 植物外植体褐化相对减轻, 但外植体的白化和玻璃化相对严重, 所以适当的暗培养时间可以减轻外植体的褐化, 提高成活率。由图 4 可知, 外植体在最初培养 10 d 的时间内, 完全褐化率低, 褐化速度也相对较慢; 再继续的培养 20、30 d 当中褐化发生的速度非常快, 完全褐化率急速升高。所以, 在培养初期较及时的采取一些措施来减轻褐化可以起到很好的效果。

防褐剂一般可分为防止酚氧化的抗氧化剂和吸收醌类物质的吸收剂两大类。筛选适宜的抗氧化剂与吸收剂种类及含量是防止外植体褐变的常用方法。常用的吸附剂有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭(AC)等。吸附剂活性炭在试验中控制褐化的效果比较明显, 这与前人的研究<sup>[9-11]</sup>是一致的。活性炭在植物组织培养中是经常被用到的吸附剂, 它不但可以吸附植物分泌的褐化物质, 而且能吸附培养基中的生长调节物质<sup>[12-13]</sup>, 尤其是当活性炭浓度较高的时候常常抵消生长调节物质。

2.4 防褐剂与活性炭对兰花外植体褐化的影响

运用正交设计助手II软件对影响褐化的 4 种因素的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验进行分析得出, 从表 4 可看出, 活性炭在 α=0.05 的水平达到显著性, 也就是说活性炭在降低和防止兰花外植体褐化中起着非常重要的作用。由图 3 可知, 5 g/L 的 PVP 对降低兰花外植体褐化有很大作用; 在柠檬酸的 3 个水平中, 0 g/L 相对来说是比较好的处理方案, 说明柠檬酸在控制兰花褐化中作用不明显; 浓度 1 g/L 的活性炭对降低褐化的作用在 3 个水平中最佳。因此, PVP 5 g/L+活性炭 1 g/L 的组合可以有效的降低褐化。

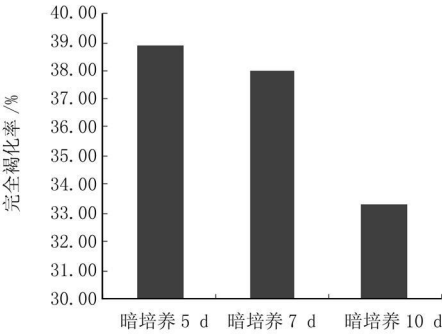


图 1 暗培养时间对褐化的影响

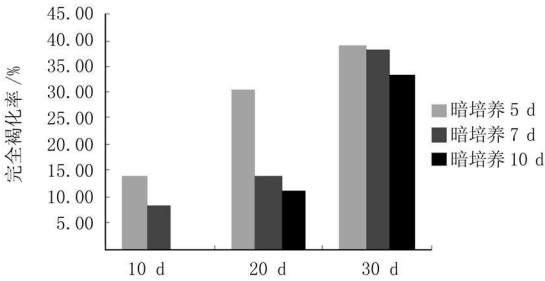


图 2 培养天数对褐化的影响

因此,在组织培养中运用适当的活性炭浓度是很重要的。

试验中,在活性炭(AC)的3个水平中,1 g/L的活性炭(AC)浓度对控制褐化的作用最佳(表4)。据文献统计,通常使用的浓度在0.1%~0.5%之间。说明该试验筛选的活性炭的浓度与文献数据相一致。从表4可知,活性炭(AC)是4个因素中唯一在 $\alpha=0.05$ 水平上有显著性的因素。PVP是酚类物质的专一性吸附剂,在生化制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂,可用于防止褐变<sup>[14]</sup>。在试验中PVP在5 g/L浓度时褐化率均值为30.6%,是3个水平中最低的,这说明对减轻兰花外植体褐化的效果PVP 5 g/L的浓度好于0.10 g/L的浓度。而抗氧化剂柠檬酸在浓度为0 g/L时的兰花外植体褐化率是3个水平中最低的,因此在试验中对控制褐化方面的作用不是很明显。

试验结果表明,在兰花外植体培养中,培养初期的暗培养和适当运用防褐剂能够减轻褐化,提高培养的成活率。以1/2MS为基本培养基,加入活性炭1 g/L, PVP 5 g/L, pH 5.4, 在外植体接种初期暗培养10 d对减轻兰花外植体褐化最为有效。

#### 参考文献

- [1] 于光远,夏镇澳,迟静芬. 番茄子叶原生质体再生植株[J]. 植物学报, 1989, 31(1): 7-11.
- [2] 贝奇 YPS. 林木和果树生物技术[M]. 张培荣, 译. 北京: 北京林业出版社, 1991: 179, 283-284, 362.

- [3] Sondahl M R, Monaco L C, Sharp W R. *In vitro* methods applied to coffee. In: Trevor AT (ed). Plant Culture Methods and Application in Agriculture[M]. New York: Academic Press, 1981: 325-348.
- [4] Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养[M]. 阙国宁, 郭达初, 李金田, 译. 北京: 中国林业出版社, 1988: 25-26, 141-143, 175.
- [5] Hu C Y, Wang P J, Meristem, et al. Handbook of plant Cell Culture (Volume I)[M]. New York: Macmillan Publishing Co, A Division of Macmillan Inc, 1983: 171-227.
- [6] 夏铭, 吴绛云, 张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J]. 生物技术, 1996, 6(3): 18-20.
- [7] 王定康, 王琼芳. 玉香梨的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 207.
- [8] 余慧琳, 王爱武, 赵辉. 蝴蝶兰花梗腋芽离体快繁控制褐变的研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(09): 195-196.
- [9] Nuraini I, Shaib J. Micropropagation of orchids using scape nodes as the explant material[J]. Acta Horticulturae, 1992, 292: 169-172.
- [10] Park S Y, Murthy H N, Paek K Y. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in Phalaenopsis[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63: 67-72.
- [11] Michio T, Munenori K. Optimal conditions for shoots production from Phalaenopsis flower-stalk cuttings cultured *in vitro*[J]. Scientia Horticulturae, 1998, 35: 117-126.
- [12] 卜学贤, 陈维伦. 活性炭对培养基中生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 401.
- [13] 刘用生, 殷桂琴, 汪涛. GA3, 6-BA, IBA与活性炭对李胚萌发及幼苗生长的影响[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(1): 32.
- [14] 黄丹莹, 江贵波. 植物组织培养褐变产生的因素及对策[J]. 广西轻工业, 2006(5): 31-32.

## Studies on Browning of Regenerated System of Wild *Cymbidium goeringii* in QinLing

WANG Bao-ning<sup>1</sup>, ZHANG Xian<sup>2</sup>, SONG Jun-yang<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** In this research, peduncle and calyx of *Cymbidium goeringii* were used as the explants, 1/2MS were used as the basic medium,  $L_9(3^4)$  orthogonal test were used to examine the impact of treatment on the browning. Polyvinyl Pyrrolidone (PVP), citric acid, activated carbon, and different time of dark cultivation were used to study the effect of the control on orchids browning. The results showed that treatment four was the best to control orchid browning and that was 1/2MS+AC 1 g/L+PVP 5 g/L+10 days cultivation in the dark.

**Key words:** Qinling; *Cymbidium goeringii*; tissue culture; browning; explants