

五种抗褐化剂对杜鹃兰原球茎增殖培养的作用效果

叶睿华, 吕享, 李小兰, 田海露, 吉宁, 张明生*

贵州大学生命科学学院, 国家喀斯特石漠化防治工程技术研究中心, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳550025

摘要: 以杜鹃兰为试验材料, 研究了硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、维生素C (Vc)、谷胱甘肽(GSH)、活性炭(AC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对杜鹃兰原球茎褐化与增殖的影响。结果表明: 在培养基中分别添加以上5种抗褐化剂对杜鹃兰原球茎褐化具有不同程度的抑制效果, 且均能明显提高原球茎的增殖率。抗褐化效果以AC最佳, GSH次之; 增殖效果以PVP最佳, GSH次之。培养基中添加GSH时, 原球茎褐化率与多酚氧化酶(PPO)活性呈极显著正相关; 添加PVP时, 原球茎褐化率与总酚含量呈显著正相关。综合杜鹃兰原球茎生长状态、褐化和增殖指标的分析, GSH是5种抗褐化剂中较为理想的抗褐化剂。

关键词: 杜鹃兰; 原球茎; 抗褐化剂; 褐化; 增殖

杜鹃兰为兰科(Orchidaceae)杜鹃兰属(*Cremastra*)珍稀濒危药用草本植物, 具有清热解毒、润肺止咳、活血止痛、消肿散结和抗肿瘤等功效(Zhang等2006), 药用价值较大。然而, 因其有性生殖困难, 无性繁殖系数低, 导致其野生资源濒临枯竭。近年来, 有关杜鹃兰组织培养方面的研究逐渐增多(张明生等2009; Zhang等2010; 吴彦秋等2016; 王汪中等2017), 但制约其快速繁殖的关键技术问题尚未得到突破, 尤其是作为离体快繁主要限制因素之一的褐化问题急需解决。研究表明, 酶促褐化是组织培养中主要的褐化方式, 褐化程度与多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性和酚类物质含量有关(Saltiest 2000; He等2009), 褐化严重的植物种类通常组织内都含有较多的酚类化合物, 且酚类化合物的含量越高, 褐化越容易发生(赵伶俐等2006)。该研究以增殖阶段的杜鹃兰原球茎为试验材料, 通过添加5种抗褐化剂, 探究不同抗褐化剂对原球茎褐化和增殖的影响, 并分析不同抗褐化剂处理下原球茎褐化率与总酚含量及PPO活性的关系, 以筛选出杜鹃兰组织培养及离体快繁中适宜的抗褐化剂种类, 从而为杜鹃兰这一珍稀资源的可持续利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以增殖阶段的杜鹃兰[*Cremastra appendiculata* (D. Don.) Makino]原球茎为试验材料, 杜鹃兰原球茎培养体系由贵州大学生命科学学院植物生物技术实验室建立。

1.2 方法

1.2.1 原球茎培养

将增殖阶段的杜鹃兰原球茎分别接种于添加不同种类及浓度抗褐化剂的MS+2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+5.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖培养基(pH 5.8~6.0)上(表1), 以不添加抗褐化剂的处理作为对照(CK), 每个处理接种5瓶, 每瓶接种7个原球茎, 重复3次。培养条件为温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度15~20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间12 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。接种后42 d统计原球茎的褐化率和增殖率, 并测定不同处理下原球茎的总酚含量及PPO活性。

1.2.2 数据测定

采用Singleton等(1999)的Folin-Ciocalteu方法测定总酚含量。

PPO活性测定采用朱广廉等(1990)的方法。

褐化统计以原球茎边缘以及周围培养基颜色变褐为标准。褐化率(%)=褐化原球茎数/总接种原球茎数 $\times 100$ 。增殖率(%)=(培养后原球茎数目-接种原球茎数目)/接种原球茎数目 $\times 100$ 。

收稿 2017-12-04 修定 2018-05-31

资助 国家自然科学基金(81660627和81360613)、国家重点研发计划(2016YFC0502604)、贵州省科技计划重大专项(黔科合平台人才[2017]5411-06)、国家喀斯特石漠化防治工程技术研究中心建设(2012FU125X13)、贵州省科技创新人才团队建设专项资金(黔科合平台人才[2016]5624)、贵州省教育厅创新群体重大研究项目(黔教合KY字[2016]023)和贵州大学研究生创新基金(研理工2017025)。

* 通讯作者(mszhang@guz.edu.cn)。

表1 抗褐化剂种类及浓度

Table 1 The type and concentration of browning inhibitors

水平	Na ₂ S ₂ O ₃ 浓度/mg·L ⁻¹	V _c 浓度/mg·L ⁻¹	GSH浓度/mg·L ⁻¹	AC浓度/mg·L ⁻¹	PVP浓度/mg·L ⁻¹
1	5	15	25	100	500
2	15	25	50	200	1 000
3	25	50	75	300	3 000
4	50	100	100	400	5 000

1.2.3 统计分析

所有试验数据均采用SPSS 22.0、Excel 2010和GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。

2 实验结果

2.1 不同抗褐化剂对增殖阶段的杜鹃兰原球茎褐化及增殖的影响

五种抗褐化剂对增殖阶段的杜鹃兰原球茎褐化具有不同的抑制效果(图1)。分别在培养基中添加不同浓度Na₂S₂O₃、V_c、GSH和AC后,增殖阶段的杜鹃兰原球茎褐化率均显著低于对照。随着Na₂S₂O₃、GSH、AC和PVP浓度的上升,褐化率先下降后上升,AC抑制褐化效果最佳。其中添加15 mg·L⁻¹ Na₂S₂O₃的原球茎的褐化率为34.92%,比对照下降了53.84%;添加75 mg·L⁻¹ GSH的原球茎的褐化率为25.40%,比对照下降63.36%;添加300 mg·L⁻¹ AC的原球茎的褐化率为23.81%,比对照下

降了63.49%;而PVP抑制褐化的效果并不理想,添加3 000 mg·L⁻¹ PVP的原球茎褐化率为61.14%,仅比对照下降了27.62%,可能与杜鹃兰原球茎中酚类物质的种类有关。随着V_c浓度的上升,褐化率先上升后下降再上升,添加50 mg·L⁻¹ V_c的原球茎褐化率最低,为31.75%,比对照下降了57.01%。

与对照相比,5种抗褐化剂对杜鹃兰原球茎的增殖均具有促进作用(图2),增殖阶段的杜鹃兰原球茎增殖率均显著高于对照,其中,添加PVP的原球茎增殖率明显高于其他抗褐化剂。随着Na₂S₂O₃和PVP浓度的上升,增殖率先上升后下降,其中添加15 mg·L⁻¹ Na₂S₂O₃的原球茎增殖率达到350.79%,比对照增加了269.84%;1 000 mg·L⁻¹ PVP处理下原球茎的增殖率高达580.95%,比对照增加了500.00%。原球茎的增殖率随着V_c和GSH浓度的上升而下降,15 mg·L⁻¹ V_c处理下原球茎的增殖率为301.59%,比对照增加了220.64%;25 mg·L⁻¹ GSH处理下原球茎

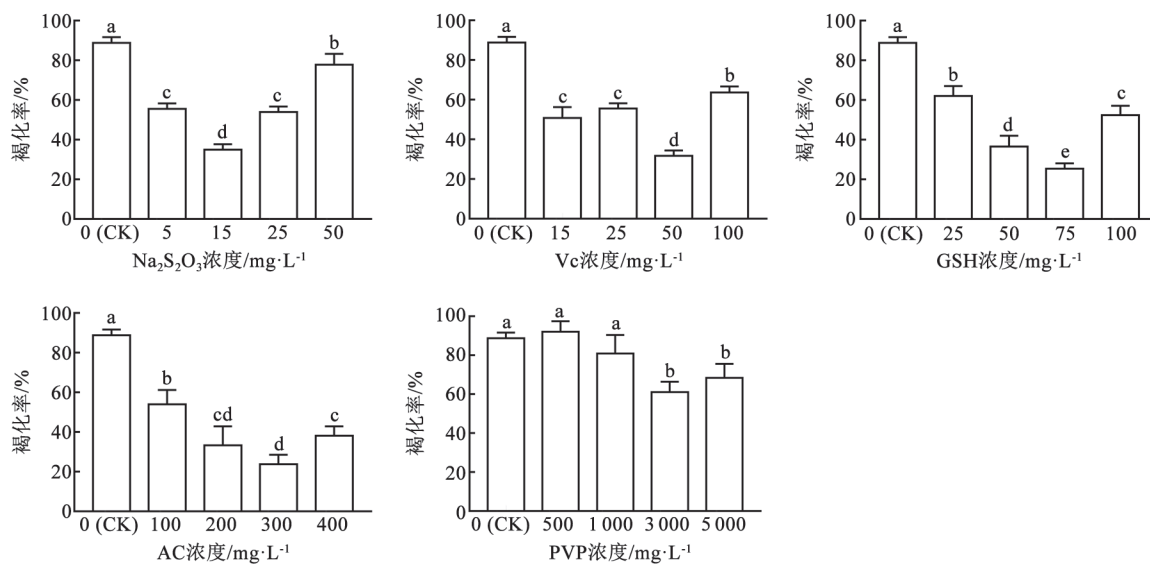


图1 不同抗褐化剂对原球茎褐化的影响

Fig.1 Effects of different browning inhibitors on protocorms browning

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下图同此。

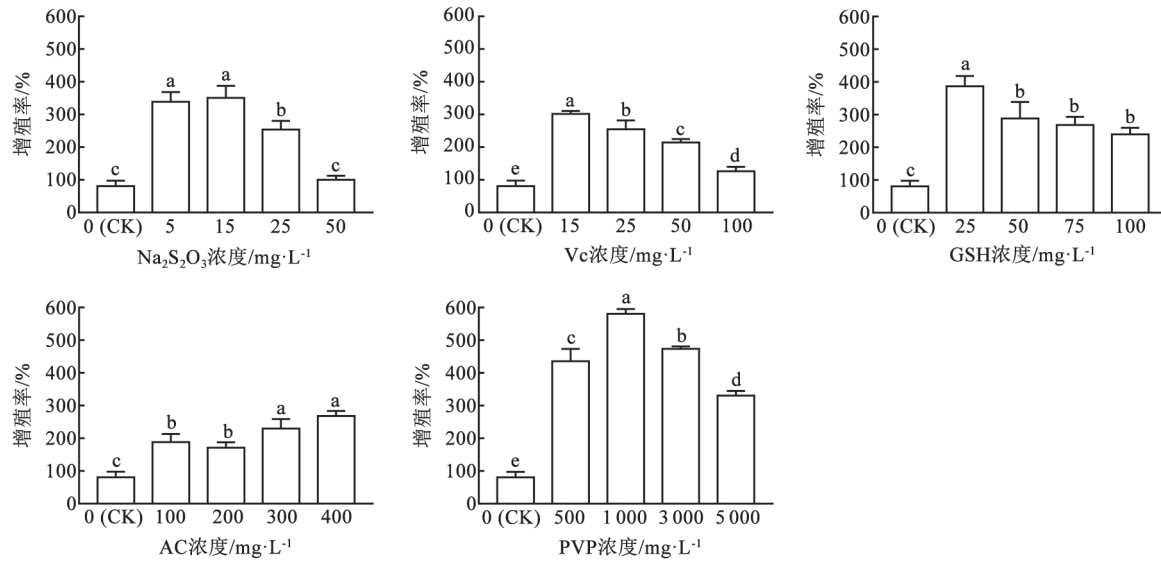


图2 不同抗褐化剂对原球茎增殖的影响

Fig.2 Effects of different browning inhibitors on protocorms proliferation

的增殖率为386.51%, 比对照增加了305.56%。随AC浓度的上升, 原球茎增殖率先下降后上升, 添加 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AC的原球茎的增殖率为268.25%, 仅比对照增加了187.30%。

抗褐化剂的种类和浓度对杜鹃兰原球茎的生长状态亦有影响(图3)。添加 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 后, 原球茎在处理初期生长状态不佳, 但后期的生长状态较好, 呈嫩绿色, 多数表面长有白色毛状物。

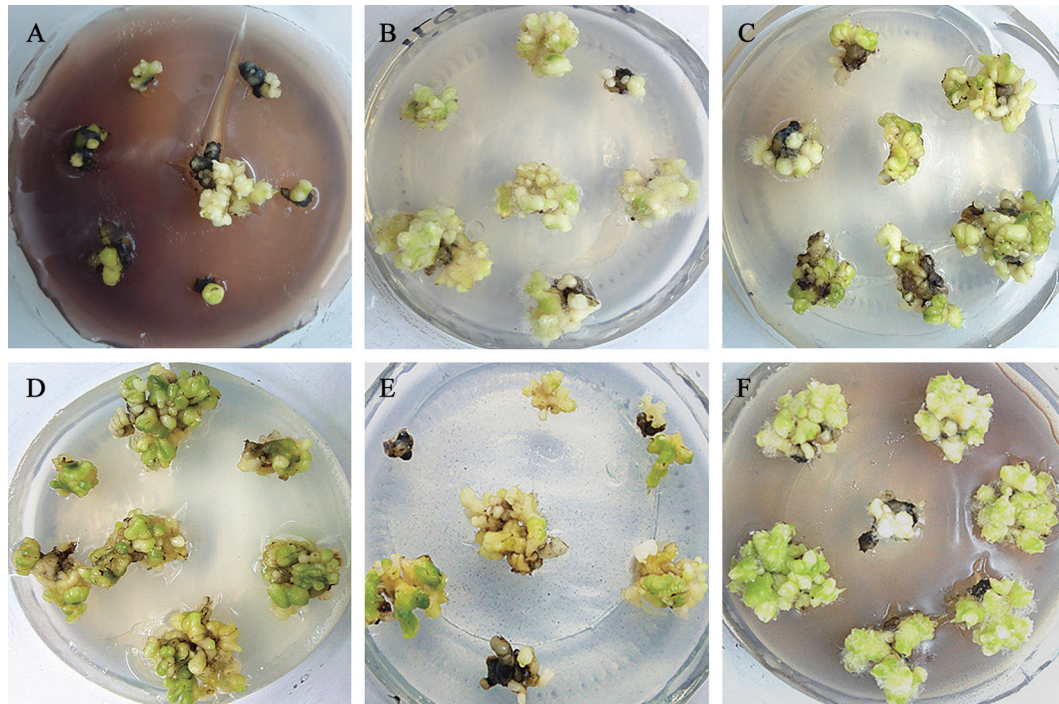


图3 不同抗褐化剂处理对原球茎生长的影响

Fig.3 Effects of different browning inhibitors on protocorms growth

A: CK; B: $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; C: $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Vc; D: $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH; E: $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AC; F: $3000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP.

添加50 mg·L⁻¹ Vc后,原球茎生长状态良好,原球茎呈嫩绿色,少数表面长有白色毛状物。添加75 mg·L⁻¹ GSH后,原球茎的生长状态最佳,原球茎呈绿色,多数表面长有白色毛状物。添加300 mg·L⁻¹ AC后,原球茎生长状态较差,呈浅绿色,极少数表面长有白色毛状物。添加3 000 mg·L⁻¹ PVP后,原球茎在处理后期生长状态较好,呈翠绿色,部分原球茎表面长有白色毛状物。而对照组原球茎生长状态较差,多数原球茎褐化死亡,多呈白色,少数呈浅绿色,极少数表面长有白色毛状物。此外,GSH、PVP和Na₂S₂O₃均有显著促进原球茎分化的效果。

在以上五种抗褐化剂中,抗褐化效果依次为AC (300 mg·L⁻¹)>GSH (75 mg·L⁻¹)>Vc (50 mg·L⁻¹)>Na₂S₂O₃ (15 mg·L⁻¹)>PVP (3000 mg·L⁻¹);而增殖效果依次为PVP (1 000 mg·L⁻¹)>GSH (25 mg·L⁻¹)>Na₂S₂O₃ (15 mg·L⁻¹)>Vc (15 mg·L⁻¹)>AC (400 mg·L⁻¹)。综合杜鹃兰原球茎的褐化率、增殖率和生长状态,可以看出,AC抗褐化效果最佳,GSH次之;而增殖效果最佳的为PVP,GSH次之;生长状态最佳的为GSH,Na₂S₂O₃次之。因此,在杜鹃兰原球茎增殖培养过程中,GSH是较为理想的抗褐化剂。

2.2 不同抗褐化剂对杜鹃兰原球茎总酚含量及PPO活性的影响

不同浓度Na₂S₂O₃处理后,原球茎中总酚含量均显著低于对照(表2)。总体上看,其总酚含量随

Na₂S₂O₃浓度的增加而逐渐上升,其中,Na₂S₂O₃浓度为5 mg·L⁻¹时,总酚含量相对较低,为248.45 μg·g⁻¹ (FW),显著低于对照,说明低浓度Na₂S₂O₃有利于抑制酚类物质的形成和积累。而PPO活性随Na₂S₂O₃浓度的增加先上升后下降,当Na₂S₂O₃浓度达50 mg·L⁻¹时,原球茎的PPO活性低于其他处理,为43.16 U·g⁻¹ (FW)·min⁻¹。

Vc处理后,原球茎的总酚含量和PPO活性均显著低于对照(表3)。其中,50 mg·L⁻¹ Vc处理下,原球茎中总酚含量最低,为227.51 μg·g⁻¹ (FW)。总体上看,PPO活性随Vc浓度增加先下降后上升,其中,25 mg·L⁻¹ Vc处理后PPO活性为30.23 U·g⁻¹ (FW)·min⁻¹,均显著低于对照和其他处理。

采用不同浓度GSH处理的原球茎,其总酚含量均显著低于对照组(表4)。75 mg·L⁻¹ GSH处理下的总酚含量最低,为242.86 μg·g⁻¹ (FW)。随着GSH浓度的升高,PPO活性呈先上升后下降再上升的变化,75 mg·L⁻¹处理后原球茎中PPO活性为30.59 U·g⁻¹ (FW)·min⁻¹,显著低于对照和其他处理。

添加不同浓度AC处理后,原球茎的总酚含量和PPO活性均显著低于对照(表5)。其中,300 mg·L⁻¹ AC处理后的总酚含量最低,为245.04 μg·g⁻¹ (FW);PPO活性在200 mg·L⁻¹ AC处理下达到最低,为45.23 U·g⁻¹ (FW)·min⁻¹。本试验结果说明AC对总酚含量和PPO活性均有较好的抑制作用。

表2 Na₂S₂O₃浓度对原球茎总酚含量及PPO活性的影响

Table 2 Effects of Na₂S₂O₃ concentrations on total phenol content and PPO activity in protocorms

处理	浓度/mg·L ⁻¹	总酚含量/μg·g ⁻¹ (FW)	PPO活性/U·g ⁻¹ (FW)·min ⁻¹
CK	—	347.64±1.18 ^a	72.30±2.14 ^a
Na ₂ S ₂ O ₃	5	248.45±3.41 ^c	52.15±1.48 ^c
	15	279.63±3.86 ^b	57.51±1.00 ^b
	25	282.65±3.79 ^b	68.70±3.89 ^a
	50	279.89±7.86 ^b	43.16±2.88 ^d

表3 Vc浓度对原球茎总酚含量及PPO活性的影响

Table 3 Effects of Vc concentrations on total phenol content and PPO activity in protocorms

处理	浓度/mg·L ⁻¹	总酚含量/μg·g ⁻¹ (FW)	PPO活性/U·g ⁻¹ (FW)·min ⁻¹
CK	—	347.64±1.18 ^a	72.30±2.14 ^a
Vc	15	239.56±4.37 ^c	38.21±3.59 ^c
	25	237.18±2.12 ^c	30.23±1.63 ^d
	50	227.51±2.32 ^d	45.73±1.63 ^c
	100	286.23±3.67 ^b	62.62±7.89 ^b

表4 GSH浓度对原球茎总酚含量及PPO活性的影响

Table 4 Effects of GSH concentrations on total phenol content and PPO activity in protocorms

处理	浓度/mg·L ⁻¹	总酚含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	PPO活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)·min ⁻¹
CK	—	347.64±1.18 ^a	72.30±2.14 ^{ab}
GSH	25	309.75±4.36 ^b	79.01±5.34 ^a
	50	263.50±7.17 ^c	41.09±8.99 ^c
	75	242.86±4.79 ^d	30.59±1.25 ^d
	100	270.71±7.36 ^c	64.99±2.98 ^b

表5 AC浓度对原球茎总酚含量及PPO活性的影响

Table 5 Effects of AC concentrations on total phenol content and PPO activity in protocorms

处理	浓度/mg·L ⁻¹	总酚含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	PPO活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)·min ⁻¹
CK	—	347.64±1.18 ^a	72.30±2.14 ^a
AC	100	262.00±7.37 ^b	56.37±4.78 ^b
	200	271.60±4.60 ^b	45.23±2.08 ^c
	300	245.04±3.36 ^c	50.13±2.92 ^c
	400	268.70±9.30 ^b	58.25±3.38 ^b

不同浓度PVP处理后,原球茎的总酚含量存在差异。由表6可知,500 mg·L⁻¹ PVP处理的总酚含量显著高于对照,而其余浓度PVP处理的总酚含量均显著低于对照,其中,3 000 mg·L⁻¹ PVP处理后的总酚含量最低,为250.81 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。随着PVP浓度的升高,PPO活性先上升后下降,其中,1 000和3 000 mg·L⁻¹ PVP处理的PPO活性均显著高于对照,而5 000 mg·L⁻¹ PVP处理的PPO活性最低,为55.30 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)·min⁻¹,显著低于对照,说明PVP对PPO活性的抑制作用并不明显。

在以上五种抗褐化剂中,Na₂S₂O₃、Vc、GSH和AC均能有效降低原球茎的总酚含量,添加50 mg·L⁻¹ Vc的总酚含量最低。而不同浓度的Na₂S₂O₃、Vc和AC处理后,原球茎的PPO活性均显著低于对照,添加25 mg·L⁻¹ Vc的PPO活性最低。

2.3 褐化率、总酚含量和PPO活性的相关性分析

表7显示,GSH处理下,原球茎褐化率与PPO活

性呈极显著正相关(相关系数达0.996);PVP处理下,原球茎褐化率与总酚含量呈显著正相关。总酚含量越高,褐化越严重,说明总酚含量是引起褐化的主要因素,这可能与PVP对酚类物质的吸附作用有关。

3 讨论

有关研究表明,添加抗褐化剂能有效降低植物的褐化率,利用该方法已在其他植物的褐化研究中取得成效,且添加不同抗褐化剂对不同种类植物的抗褐化效果及作用机理存在差异(马文卿等2010;郑超等2013;姚婧等2015)。刘霞等(2015)发现添加Na₂S₂O₃加重了乌头子根芽眼的褐化程度。但本试验结果表明,添加低浓度Na₂S₂O₃能有效降低杜鹃兰原球茎的褐化率和提高其增殖率,但褐化率与总酚含量和PPO活性之间的相关度较低,这说明了杜鹃兰原球茎褐化是多种因素共同作用的结果,或与酚类物质及PPO的区域性分布有关

表6 PVP浓度对原球茎总酚含量及PPO活性的影响

Table 6 Effects of PVP concentrations on total phenol content and PPO activity in protocorms

处理	浓度/mg·L ⁻¹	总酚含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	PPO活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)·min ⁻¹
CK	—	347.64±1.18 ^b	72.30±2.14 ^c
PVP	500	420.67±4.06 ^a	69.53±12.29 ^{bc}
	1 000	318.35±3.20 ^c	80.20±1.81 ^{ab}
	3 000	250.81±5.50 ^e	82.77±3.04 ^a
	5 000	310.32±1.18 ^d	55.30±1.71 ^d

表7 不同抗褐化剂处理下原球茎褐化率、总酚含量和PPO活性的相关性

Table 7 The correlation among browning rate, total phenol and PPO activity in protocorms under different browning inhibitors treatments

抗褐化剂	指标	褐化率	总酚含量	PPO活性
Na ₂ S ₂ O ₃	褐化率	1		
	总酚含量	0.001	1	
	PPO活性	-0.600	0.266	1
Vc	褐化率	1		
	总酚含量	0.778	1	
	PPO活性	0.251	0.803	1
GSH	褐化率	1		
	总酚含量	0.933	1	
	PPO活性	0.996**	0.930	1
AC	褐化率	1		
	总酚含量	0.436	1	
	PPO活性	0.577	0.042	1
PVP	褐化率	1		
	总酚含量	0.964*	1	
	PPO活性	0.128	0.061	1

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。

(Vaughn和Duke 1984)。同时, 本研究发现, 添加Na₂S₂O₃具有明显促进杜鹃兰原球茎分化的效果, 这与王小敏等(2009)的研究结果不一致, 该结果不一致可能是由于Na₂S₂O₃浓度设置不同引起的。不同浓度Na₂S₂O₃影响外植体分化的作用效果和作用机理还有待进一步研究。

Vc是一种常见的抗氧化剂, 本研究发现添加100 mg·L⁻¹ Vc处理的原球茎褐化率明显高于其他浓度, 这可能是由于Vc浓度过高时, 部分Vc会与某些氨基酸发生反应生成棕色物质, 从而增加了褐化程度(周永妍等2015)。此外, 本试验结果表明, Vc对总酚的形成和积累有一定的抑制作用, 该结果与岑忠用等(2016)的研究结果具有一定的相似性, 但Vc对PPO活性的影响结果不一致可能与设置的浓度有关。因此, 在通过添加Vc来抑制褐化时, 应该适当降低Vc的浓度。

GSH可直接和间接清除活性氧或自由基, 在植物体内发挥抗氧化和整合解毒作用。本试验通过在培养基中添加GSH有效降低了杜鹃兰原球茎的褐化率, 这与刘真华等(2005)的研究较为相似。同时, 本研究的相关性分析发现, 在GSH处理下, 原球茎褐化率与PPO活性极显著正相关, 可能是因

为PPO通常以非活性状态存在于类囊体中, 而酚类物质存在于液泡中, 只有这种区域性隔离被打破时, PPO才表现出酶活性(王曼玲等2005); 而在组织培养过程中, 当植物受到机械损害后, 体内活性氧浓度升高, 过多活性氧和自由基会损伤细胞生物膜(Dhindsa等1982), 故添加一定浓度的GSH有助于清除植物体内多余的活性氧, 维持植物体内酚类物质和PPO的区域性隔离, 从而降低褐化率。

AC能吸附植物在组织培养中分泌的酚类物质。本试验结果也证明了添加AC能明显降低杜鹃兰原球茎的褐化率, 且原球茎褐化率与总酚含量呈正相关。但添加AC的原球茎增殖率均低于添加其他抗褐化剂处理的, 这可能是由于AC在抑制褐化的同时吸附了原球茎生长所需营养物质(吴彦秋等2016), 因此, 在使用AC抑制褐化时, 其适宜浓度的选择尤为重要。

PVP是酚类物质的专一吸附剂。夏亚男等(2014)在研究对南荻外植体褐变时发现添加PVP能减轻外植体的褐化程度。本研究发现, 在培养基中添加PVP时, 褐化率与总酚含量呈显著正相关, 虽然褐化率有所降低, 但PVP对杜鹃兰原球茎褐化的抑制作用不佳, 这可能是由于不同植物中所含酚类物质的种类有所差异(饶慧云等2015), 而PVP对酚类物质的吸附作用具有选择性, 故PVP对不同种类植物抑制褐化的效果不同。目前, 引起杜鹃兰原球茎褐化的酚类物质种类尚不明确, 还需继续研究。而且, 高浓度PVP处理下杜鹃兰原球茎的增殖率低于低浓度PVP处理。酚类物质虽然会加剧褐化, 但酚类物质也是植物生长所必需的物质之一, 在植物的生长发育中发挥着十分重要的作用(华晓雨等2017), 故过度吸附酚类物质可能会导致植物生长状态不良。相比于其他四种抗褐化剂, PVP的抗褐化效果不佳, 即PVP并不是抑制杜鹃兰褐化的理想抗褐化剂。

综上所述, 添加Na₂S₂O₃和GSH能有效降低杜鹃兰褐化率, 且杜鹃兰原球茎增殖率得到明显提高, 是适宜杜鹃兰控制褐化的抗褐化剂, 但关于这两种抗褐化剂配合使用是否能更好地抑制褐化还有待进一步做组合试验。此外, 侯健华等(2015)在地涌金莲的褐化抑制问题研究中发现添加姜汁对褐化的抑制达到了很好的效果, 那么添加姜汁是

否有助于抑制杜鹃兰原球茎培养中的褐化也值得探究。本试验仅仅是通过添加抗褐化剂来抑制杜鹃兰原球茎褐化, 但引起杜鹃兰原球茎培养过程中褐化的发生因素尚不十分明确, 尚有待继续深入研究。

参考文献(References)

- Cen ZY, Su J, Deng XC, et al (2016). Study on total phenolic content and correlation between PPO activity and browning of *Corydalis saxicola* bunting callus. *Crop*, (1): 149–153 (in Chinese with English abstract) [岑忠用, 苏江, 邓晰朝等(2016). 总酚含量及多酚氧化酶活性与岩黄连愈伤组织褐化的相关性研究. *作物杂志*, (1): 149–153]
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa PL, Reid DM (1982). Leaf senescence and lipid peroxidation: effects of some phytohormone and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol Plant*, 56: 456–457
- He Y, Guo XL, Lu R, et al (2009). Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 98: 11–17
- Hou JH, Li ZH, Ma H, et al (2015). Studies on anti-browning during tissue culture of *Musella lasiocarpa*. *For Res*, 28 (2): 217–221 (in Chinese with English abstract) [侯健华, 李正红, 马宏等(2015). 地涌金莲组织培养中的褐化抑制. *林业科学研究*, 28 (2): 217–221]
- Hua XY, Tao S, Sun SN, et al (2017). Research progress on phenolic compounds of plant secondary metabolites. *Biotechnol Bull*, 33 (12): 1–6 (in Chinese with English abstract) [华晓雨, 陶爽, 孙盛楠等(2017). 植物次生代谢产物-酚类化合物的研究进展. *生物技术通报*, 33 (12): 1–6]
- Liu X, Yu M, Shu XY, et al (2015). Selection of antioxidant in the bud eye cultures of *Aconitum carmichaelii* Debx. *J Chin Med Mater*, 38 (10): 2035–2037 (in Chinese) [刘霞, 余马, 舒晓燕等(2015). 乌头子根芽眼组织培养中抗褐化剂的筛选. *中药材*, 38 (10): 2035–2037]
- Liu ZH, Ge H, Guo SX, et al (2005). Studies of anti-browning in the tissue culture of *Phalaenopsis*. *Acta Horti Sin*, (4): 732–734 (in Chinese with English abstract) [刘真华, 葛红, 郭绍霞等(2005). 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究. *园艺学报*, (4): 732–734]
- Ma WQ, Li Q, Liu Y (2010). Studies on browning during the test-tube proliferation of *Cymbidium Hybridum*. *Chin Agric Sci Bull*, 26 (7): 186–190 (in Chinese with English abstract) [马文卿, 李青, 刘燕(2010). 大花蕙兰试管苗增殖过程中的褐化研究. *中国农学通报*, 26 (7): 186–190]
- Rao HY, Shao ZC, Liu HN, et al (2015). Effect of browning inhibitors on callus subculture of phenolic compounds, enzyme and gene expression of grape. *Plant Physiol J*, 51 (8): 1322–1330 (in Chinese with English abstract) [饶慧云, 邵祖超, 柳海宁等(2015). 抗褐化剂对葡萄愈伤组织继代培养过程中酚类物质、相关酶及其基因表达的影响. *植物生理学报*, 51 (8): 1322–1330]
- Saltiest ME (2000). Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biol Technol*, 21 (1): 61–69
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152–178
- Vaughn KC, Duke SO (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol Plant*, 60: 106–112
- Wang ML, Hu ZL, Zhou MQ, et al (2005). Advances in research of polyphenol oxidase in plants. *Chin Bull Bot*, (2): 215–222 (in Chinese with English abstract) [王曼玲, 胡中立, 周明全等(2005). 植物多酚氧化酶的研究进展. *植物学通报*, (2): 215–222]
- Wang WZ, Zhang MS, Lü X, et al (2017). Media screening on seeds germination of *Cremastra appendiculata*. *North Hortic*, (11): 157–161 (in Chinese with English abstract) [王汪中, 张明生, 吕享等(2017). 杜鹃兰种子萌发适宜培养基的筛选. *北方园艺*, (11): 157–161]
- Wang XM, Wu WL, Li HY, et al (2009). Analysis of influence factors on browning of blackberry explants and selection of suitable culture condition. *J Plant Res Environ*, 18 (3): 63–68 (in Chinese with English abstract) [王小敏, 吴文龙, 李海燕等(2009). 黑莓外植体褐化影响因素分析及适宜培养条件筛选. *植物资源与环境学报*, 18 (3): 63–68]
- Wu YQ, Lü X, Li XL, et al (2016). Culture conditions of protocorms proliferation of *Cremastra appendiculata*. *North Hortic*, (19): 124–128 (in Chinese with English abstract) [吴彦秋, 吕享, 李小兰等(2016). 杜鹃兰原球茎增殖培养条件. *北方园艺*, (19): 124–128]
- Xia YN, Jiang JX, Yi ZL, et al (2014). Effect of three antioxidants on browning of explant and callus induction rate of *Miscanthus lutarioriparius*. *North Hortic*, (17): 93–96 (in Chinese with English abstract) [夏亚男, 蒋建雄, 易自力等(2014). 三种抗褐化剂对南荻外植体褐变及愈伤诱导率的影响. *北方园艺*, (17): 93–96]
- Yao J, Liu F, Huang MZ, et al (2015). *In vitro* regeneration and browning of *renanthera coccinea loureiroi* stem buds. *Chin J Trop Agri*, 35 (3): 18–22 (in Chinese with English abstract) [姚婧, 刘帆, 黄明忠等(2015). 火焰兰茎段侧芽离体再生及褐化的研究. *热带农业科学*, 35 (3): 18–22]
- Zhao LL, Ge H, Fang CH, et al (2006). Effects of pH and temperature on browning of *Phalaenopsis* explants cultured in vitro. *Acta Horti Sin*, (6): 1373–1376 (in Chinese with English abstract) [赵伶俐, 葛红, 范崇辉等(2006). 蝴蝶兰组培中pH和温度对外植体褐化的影响. *园艺学报*, (6): 1373–1376]
- Zhang MS, Peng SW, Wang W (2010). Macro research on growth and development of *Cremastra appendiculata* (D.

- Don.) Makino (Orchidaceae). *J Med Plant Res*, 4 (18): 1837–1842
- Zhang MS, Peng SW, Yang XR, et al (2009). Preparation technique of *Cremastra appendiculata* synthetic seed. *Chin J Chin Mater Med*, 34 (15): 1894–1897 (in Chinese with English abstract) [张明生, 彭斯文, 杨小蕊等(2009). 杜鹃兰人工种子技术研究. *中国中药杂志*, 34 (15): 1894–1897]
- Zhang MS, Wu SJ, Jie XJ, et al (2006). Effect of endophyte extract on micropropagation of *Cremastra appendiculata* (D. Don.) Makino (Orchidaceae). *Propag Ornament Plant*, 6 (2): 83–89
- Zheng C, Xu S, Xia B, et al (2013). Effects of three antioxidants on callus browning and its related substance contents in *Taxus media* Rehder. *Plant Physiol J*, 49 (3): 259–263 (in Chinese with English abstract) [郑超, 徐晟, 夏冰等(2013). 三种抗氧化剂对曼地亚红豆杉愈伤组织褐化及相关物质含量的影响. *植物生理学报*, 49 (3): 259–263]
- Zhou YY, Li Y, Yu AN (2015). Study on intermediate product and browning intensity from ascorbic acid/glutamic model system. *J Hubei Univ National (Nat Sci Ed)*, 3 (1): 80–84 (in Chinese with English abstract) [周永妍, 李亚, 余爱农(2015). 抗坏血酸/谷氨酸Maillard反应体系中间产物和褐变程度的研究. *湖北民族学院学报(自然科学版)*, 3 (1): 80–84]
- Zhu GL, Zhong HW, Zhang AQ (1990). *Plant Physiology Experiment*. Beijing: Peking University press, 37–39 (in Chinese) [朱广廉, 钟海文, 张爱琴(1990). *植物生理实验*. 北京: 北京大学出版社, 37–39]

Effects of five browning inhibitors on protocorms proliferation culture of *Cremastra appendiculata*

YE Rui-Hua, LÜ Xiang, LI Xiao-Lan, TIAN Hai-Lu, JI Ning, ZHANG Ming-Sheng*

School of Life Sciences / State Engineering Technology Institute for Karst Desertification Control, Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: With *Cremastra appendiculata* as materials, the effects of sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), vitamin C (Vc), glutathione (GSH), activated carbon (AC) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) on browning and proliferation of the protocorm were studied. The results showed that the effects of the above five kinds of browning inhibitors on preventing protocorm browning were different and the proliferation rate of protocorm increased significantly. AC was optimal to prevent browning of protocorm, GSH followed. However, the best browning inhibitor for proliferation was PVP, GSH followed. The browning rate of the protocorm and the activity of PPO were significantly positively related under GSH treatment. There was a significant positive correlation between the protocorm browning rate and total phenol content under PVP treatment. Based on the analysis of the growth state, browning and proliferation index of the protocorm, the GSH was the most ideal browning inhibitors.

Key words: *Cremastra appendiculata*; protocorm; browning inhibitor; browning; proliferation

Received 2017-12-04 Accepted 2018-05-31

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81660627 and 81360613), the National Key Research and Development Program of China (2016YFC0502604), the Major Special Project of Science and Technology Program in Guizhou (2017-5411-06), the Construction Project of State Engineering Technology Institute for Karst Desertification Control (2012FU125X13), the Innovation Talents Team Construction of Science and Technology in Guizhou (2016-5624), the Major Research Project of Innovation Group in Guizhou (2016-023) and the Graduate Innovation Fund of Guizhou University (2017025).

*Corresponding author (mszhang@guz.edu.cn).