

三峡库区消落带落羽杉茎段外植体扩繁的不定芽褐化抑制机理*

陈雪梅¹, 杨龙勇², 陈张婷¹, 陈春桦¹, 袁中勋¹, 李昌晓¹

(1. 西南大学 生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715;

2. 奉节县林业局, 重庆 奉节 404600)

摘要:【目的】研究不同抗褐化处理对三峡库区消落带原位生长的落羽杉(*Taxodium distichum*)茎段外植体扩繁不定芽褐化的影响。【方法】设置硫代硫酸钠(hypo)、抗坏血酸(Vc)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭(AC)和黑暗共5种抗褐化处理,以正常培养的落羽杉不定芽为对照,处理20 d并统计各处理的褐化率、多酚氧化酶(PPO)活性、过氧化物酶(POD)活性和总酚含量变化。【结果】1)降低褐化率效果最好的为PVP处理,然后依次为AC处理、hypo处理、黑暗处理和Vc处理。2)降低PPO活性效果最好的为PVP处理,然后依次为黑暗处理、hypo处理、Vc处理和AC处理。3)降低POD活性效果最好的为hypo处理,然后依次为AC处理、PVP处理、Vc处理和黑暗处理。4)降低总酚含量效果最好的为AC处理,然后依次为PVP处理、黑暗处理、Vc处理和hypo处理。5)hypo和Vc处理下的褐化率、PPO活性、POD活性和总酚含量两两之间呈统计学意义上的正相关关系($p < 0.01$);在PVP和AC处理中,褐化率分别与PPO活性、POD活性呈统计学意义上的正相关关系($p < 0.01$);和总酚含量的负相关关系无统计学意义;在黑暗处理中,褐化率分别与PPO活性、总酚含量呈统计学意义上的正相关关系($p < 0.05$),但与POD活性的正相关关系没有统计学意义。【结论】培养基中添加PVP是较为理想的落羽杉不定芽抗褐化处理,培养基中添加AC的抗褐化效果次之。

关键词:落羽杉;不定芽;抗褐化;酶活性;酚类物质;三峡库区

中图分类号:Q948.1

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)04-0048-09

2008年三峡工程正式运行,在“冬蓄夏排”的水位调度方式下,冬季蓄水发电水位为175 m,夏季防洪水位降至145 m,由此形成30 m水位落差,面积达348.93 km²的消落带^[1-2]。消落带是水域与陆地环境系统的过渡地带,受库区水位周期性涨落的影响,消落带将成为生态系统中物质能量输移和转化的活跃地带^[3-4]。三峡库区消落带和自然消落带不同之处在于前者具有反季节性、水淹的时间延长、水淹深度大等特点^[5-6]。长时间的完全水淹会改变植物的生境,从而影响植物的生长和生理节律^[7];因此三峡库区消落带原有的植物或被迁移,或被长期受到反季节的水淹而大量消失,生物多样性降低,生态屏障功能减退^[8]。目前,为保证三峡库区消落带生态服务功能的正常运行,库区消落带植被恢复已成为亟待解决的问题^[9]。

落羽杉(*Taxodium distichum*)是一种古老的孑遗植物,为杉科(Taxodiaceae)落羽杉属(*Taxodium*)的落叶性大乔木,能耐水淹,适合在较高海拔的消落带和河岸带生长,是消落带进行人工植被修建的优良物种^[10]。然而有关研究发现:落羽杉的种子败育率高,种子的生活力和萌发率低,且在繁殖的过程中极易产生变异,难以保存母本的基本性状^[11];同时落羽杉的扦插繁育对季节要求比较高,很容易对母树造成伤害,也可能因为插穗的短缺而造成用苗不足等问题^[12]。因此,利用环境制约因素少、繁殖速度快、能保存母本的全部优良性状且遗传性状稳定的组织培养技术对落羽杉进行种苗扩繁有着重大意义^[13-14]。笔者前期以生长于三峡库区消落带原位的10年生落羽杉茎段为外植体,通过起始培养、不定芽诱导获得了一定数量的不定芽;然而不定芽增殖培养进行一定时间后,落羽杉芽苗会逐渐枯黄死亡。许秀玉^[15]在墨西哥落羽杉(*Taxodium mucronatum*)组织培养过程中通过连同亲体一起伸长培养来解决上述问题。这一方法能延缓落羽杉不定芽死亡时间,但不能保持正常增殖生长状

* 收稿日期:2021-03-24 修回日期:2021-04-08 网络出版时间:2021-06-30 09:35

资助项目:国家自然科学基金(No. 31960038);宁夏重点研发项目(No. 2020BFG03006);重庆市科技兴林首席专家团队项目(No. TD2021-2);重庆市住房和城乡建设委员会项目(No. Chengkezi 2019-1-4-2);中央林业改革发展资金科技推广示范项目(No. 渝林科推2020-2)

第一作者简介:陈雪梅,女,研究方向为植物生态学,E-mail: xuemeichen_6@163.com;通信作者:李昌晓,男,教授,博士,E-mail: Lichangx@swu.edu.cn

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210629.1839.010.html>

态。不定芽的褐化严重制约着后续培养阶段的进行。目前的研究中大多认为褐化的发生与外植体组织中含有的酚类化合物含量和多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)的活性有直接关系^[15-17],适合不同物种的抗褐化处理各不相同。因此,笔者以落羽杉不定芽为实验材料,探究不同抗褐化处理对不定芽褐化率、PPO活性、POD活性和总酚含量的影响,并从中筛选出最适宜落羽杉组织培养的抗褐化处理方案,从而为落羽杉优株快速扩繁提供技术支撑,进而为三峡库区消落带的生态修复与重建的有关工作提供基础资料。

1 材料与方法

以增殖阶段的落羽杉不定芽为实验材料,不定芽由三峡库区消落带原位生长的10年生落羽杉茎段为外植体,经过起始培养和不定芽诱导切割后获得。

选取大小、生长状态基本一致的单个不定芽为外植体,均接种至含 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA及 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/2MS培养基(pH为5.8)中,培养温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,每日光照时间为12 h。实验处理具体设计如下:1) 设置两种抗氧化剂处理,即在培养基中分别添加已进行过过滤灭菌且质量浓度均为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代硫酸钠(hypo)和抗坏血酸(Vc);2) 设置两种吸附剂处理,即在培养基中分别添加质量浓度均为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和活性炭(AC),其中PVP在加入培养基前已进行过过滤灭菌,AC则直接加入培养基并与之一同灭菌;3) 对不定芽进行黑暗处理,分别在5, 10, 15和20 d后恢复到前文提及的正常光照培养状态;4) 以不加入抗氧化剂、吸附剂以及正常光照周期的培养处理作为对照(CK)。上述每种处理随机设置3个重复,每个重复接种10个外植体。分别在0, 5, 10, 15, 20 d后观察记录外植体生长状态并进行取样,计算外植体的褐化率并测定外植体中PPO、POD的活性和总酚含量。褐化率以褐化的不定芽个数除以接种的不定芽个数所得数值的百分数表示,PPO活性采用邻苯二酚比色法进行测定,POD活性采用愈创木酚法进行测定,总酚含量采用福林酚法进行测定^[18-19]。

实验数据均以“平均值±标准误”表示,采用Excel 2010软件进行常规计算,并用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,其中采用Duncan法进行同一指标数据间的多重比较,各指标间的相关关系采用Pearson相关系数来进行分析。当 $p<0.05$ 时,有关统计结果具有统计学意义。

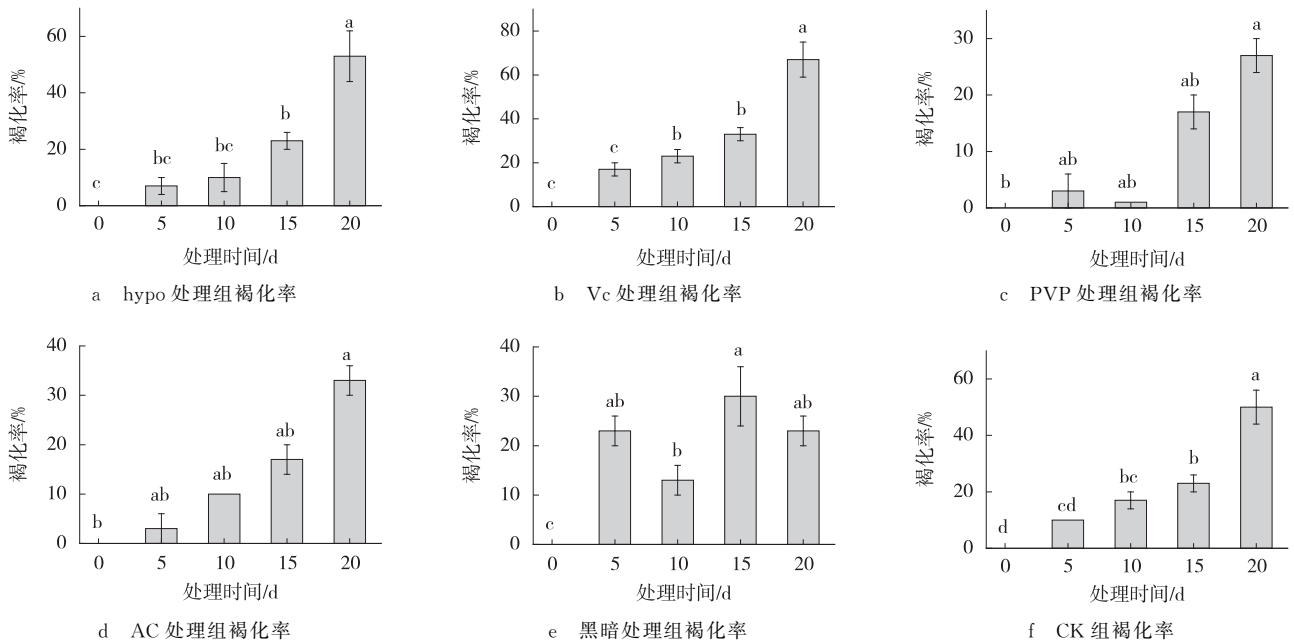
2 结果与分析

2.1 对褐化率的影响

5种抗褐化处理在降低落羽杉不定芽褐化率方面有着不同的效果(图1):1) 在培养基中分别添加hypo和Vc,随着处理时间的延长,落羽杉不定芽褐化率逐渐升高,均在20 d后达到最高值(分别为53.3%和66.7%),比此时的CK组褐化率分别高出3.3%和16.7%;且分别与hypo和Vc处理组在处理开始时(0 d)以及处理进行5, 10和15 d后的褐化率均具有统计学意义上的差异($p<0.05$)。2) 培养基中添加AC后,落羽杉不定芽褐化率随着处理时间的延长而逐渐升高,在20 d后达到最高值(33.3%),比此时的CK组褐化率低了16.7%,与AC处理组在5, 10和15 d后的褐化率无统计学意义上的差异,但与AC处理组在处理开始时的褐化率差异具有统计学意义($p<0.05$)。3) 在培养基中添加PVP后,落羽杉不定芽褐化率随着处理时间延长呈现先增加后降低再增加的趋势,在20 d后达到最高值(26.7%),比此时的CK组褐化率低了23.3%,与PVP处理组在5, 10和15 d后的褐化率无统计学意义上的差异,但与PVP处理组在处理开始时的褐化率差异具有统计学意义($p<0.05$)。4) 对落羽杉不定芽进行黑暗处理,随着处理时间的延长,不定芽褐化率总体上呈现“M”型变化趋势,在15 d后达到最高值(30%),比此时的CK组褐化率低了20%,与经过黑暗处理5和20 d后的褐化率无统计学意义上的差异,与黑暗处理开始时和经过黑暗处理10 d后的褐化率差异具有统计学意义($p<0.05$)。

比较6种处理下落羽杉不定芽分别在处理时间经过5, 10, 15和20 d后的褐化率差异可知(图2):1) 在5 d后,Vc处理组褐化率最高(12.5%),比CK组褐化率高了2.5%,与其他几种处理下不定芽的褐化率无统计学意义上的差异。2) 在10 d后,Vc处理组褐化率最高(23.3%),但与CK组褐化率相近,两者差异无统计学意义。3) 在15 d后,Vc处理组褐化率最高(33.3%),比CK组褐化率低了10%,与经过hypo和黑暗处理的不定芽褐化率无统计学意义上的差异,与经过PVP和AC处理的不定芽褐化率均具有统计学意义上的差异($p<0.05$)。4) 在20 d后,Vc处理组褐化率仍然最高(66.7%),比CK组褐化率高了10%,与hypo和黑暗处理组的褐化率差异无统计学意义,与PVP和AC处理组的褐化率相比具有统计学意义上的差异($p<0.05$)。

综上所述,5 种抗褐化处理中降低落羽杉不定芽褐化效果最好的是 PVP 处理,然后依次为 AC 处理、hypo 处理、黑暗处理和 Vc 处理。



注:不同小写字母表示某一处理在不同时间的数据差异具有统计学意义($p < 0.05$),下同

图 1 不同培养时间 5 种抗褐化处理对不定芽褐化率的影响

Fig. 1 Effects of five anti-browning treatments at different culture time on browning rate of adventitious bud

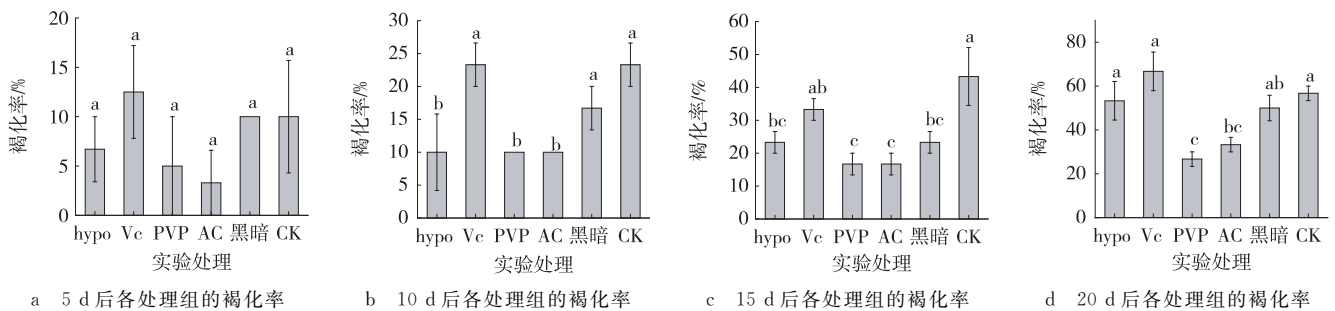


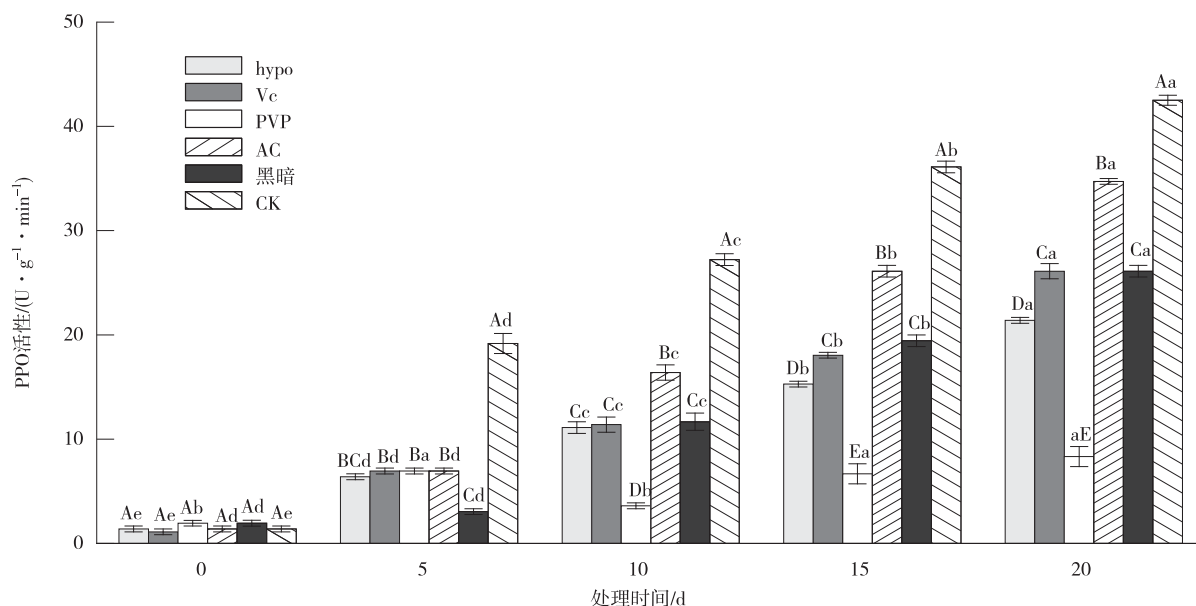
图 2 相同时间 5 种抗褐化处理对不定芽褐化率的影响

Fig. 2 Effects of five anti-browning treatments at the same time on browning rate of adventitious bud

2.2 对 PPO 活性的影响

所有处理组的落羽杉不定芽 PPO 活性均随着处理时间的延长而提高,均在 20 d 后达到最高值,但 5 种抗褐化处理在降低 PPO 活性方面的效果不同(图 3):1) 在 5 d 后,PPO 活性最高的 CK 组($19.17 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)是 PPO 活性最低的黑暗处理组($3.05 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的 6.29 倍。2) 在 10 d 后,PPO 活性最高的 CK 组($27.22 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)是 PPO 活性最低的 PVP 处理组($3.61 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的 7.54 倍。3) 在 15 d 后,PPO 活性最高的 CK 组($36.11 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)是 PPO 活性最低的 PVP 处理组($6.67 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的 5.41 倍。4) 在 20 d 后,PPO 活性最高的是 CK 组($42.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),它是 PPO 活性最低的 PVP 处理组($8.3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的 5.1 倍。5) hypo, Vc, PVP, AC 和黑暗处理组的 PPO 活性分别是处理开始时的 15.39, 23.52, 4.29, 24.98 和 13.46 倍,CK 组 PPO 活性则是处理开始时的 30.56 倍。6) PVP 处理组在 10, 15 和 20 d 后的 PPO 活性与其他处理组的 PPO 活性相比差异均具有统计学意义($p < 0.05$),AC 处理组在 10, 15 和 20 d 后均是所有抗褐化处理组 PPO 活性最高的组,分别为 $16.39, 26.11$ 和 $34.72 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,但均低于 CK 组在上述处理时间的 PPO 活性(分别为 $27.22, 36.11$ 和 $42.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

综上所述,5 种抗褐化处理中降低落羽杉不定芽 PPO 活性效果最好的是 PVP 处理,然后依次为黑暗处理、hypo 处理、Vc 处理和 AC 处理。



注:不同大写字母表示同一时间不同处理数据间的差异具有统计学意义($p < 0.05$),下同

图3 不同抗褐化处理对PPO活性的影响

Fig. 3 Effect of different anti-browning treatments on PPO activity

2.3 对POD活性的影响

所有处理组中,除PVP处理组和CK组的落羽杉不定芽POD活性随着处理时间的延长而逐渐升高外,其余几个处理组的这一指标均在此期间呈先下降后升高的趋势,而且5种抗褐化处理对降低这一指标的效果也不相同(图4):1)在5d后,CK组POD活性最高($25.92 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),但与PVP处理组POD活性不具有统计学意义上的差异,与其他4个处理组POD活性的差异均有统计学意义($p < 0.05$),且是POD活性最低的hypo处理组($10.19 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的2.4倍。2)在10d后,CK组POD活性最高($52.19 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),与其他5个处理组POD活性相比差异均有统计学意义($p < 0.05$),且是POD活性最低的AC处理组($24.11 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的2.16倍。3)在15d后,黑暗处理组POD活性最高($74.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),与其他5个处理组POD活性相比差异均有统计学意义($p < 0.05$),且是POD活性最低的hypo处理组($42.58 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的1.75倍。4)在20d后,CK组POD活性又成为最高($84.22 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),与其他5个处理组POD活性相比差异均有统计学意义($p < 0.05$),且是POD活性最低的hypo处理组($55.25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)的1.52倍。5)和处理开始时相比,20d后,hypo,Vc,PVP,AC和黑暗5种处理组的POD活性分别是处理开始时的2.12,2.63,2.6,2.56和2.75倍,而CK组POD活性则是处理开始时的3.27倍。

综上所述,5种抗褐化处理中降低落羽杉不定芽POD活性效果最好的是hypo处理,然后依次为AC处理、PVP处理、Vc处理和黑暗处理。

2.4 对总酚含量的影响

所有处理组中,hypo和黑暗处理组与CK组的落羽杉不定芽总酚含量变化趋势相同,均随处理时间的延长逐渐增加,在20d后达到最高值;PVP和AC处理组的这一指标在此期间呈先增加后降低的变化趋势,分别在10和15d后达到最高值;Vc处理组的这一指标在此期间则表现为先降低后增加,20d后达到最高值(图5)。比较各处理组总酚含量在处理期间的差异,有如下结果:1)在5d后,黑暗处理组总酚含量最高($0.251 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),与CK组总酚含量无统计学意义上的差异,与其他4个处理组总酚含量的差异均有统计学意义($p < 0.05$),是总酚含量最低的Vc处理组($0.032 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的7.84倍。2)在10d后,CK组总酚含量最高($0.497 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),与Vc处理组总酚含量无统计学意义上的差异,与其他4个处理组总酚含量的差异均有统计学意义($p < 0.05$),是总酚含量最低的AC处理组($0.127 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的3.91倍。3)在15d后,CK组总酚含量最高($0.711 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),与其他处理组总酚含量的差异均有统计学意义($p < 0.05$),是总酚含量最低的PVP处理组($0.075 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的9.48倍。4)在20d后,Vc处理组总酚含量最高($1.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),与其他处理组总酚含量的差异均有统计学意义($p < 0.05$),是总酚含量最低的PVP处理组($0.073 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的16.71倍。5)hypo和Vc处理组的总酚含量

分别是处理开始时的 50.61 和 20.33 倍,CK 组总酚含量则是处理开始时的 9.11 倍,PVP,AC 和黑暗处理组的总酚含量分别是处理开始时的 1.59,0.95 和 4.19 倍。

综上所述,5 种抗褐化处理中降低落羽杉不定芽总酚含量效果最好的是 AC 处理,然后依次为 PVP 处理、黑暗处理、Vc 处理和 hypo 处理。

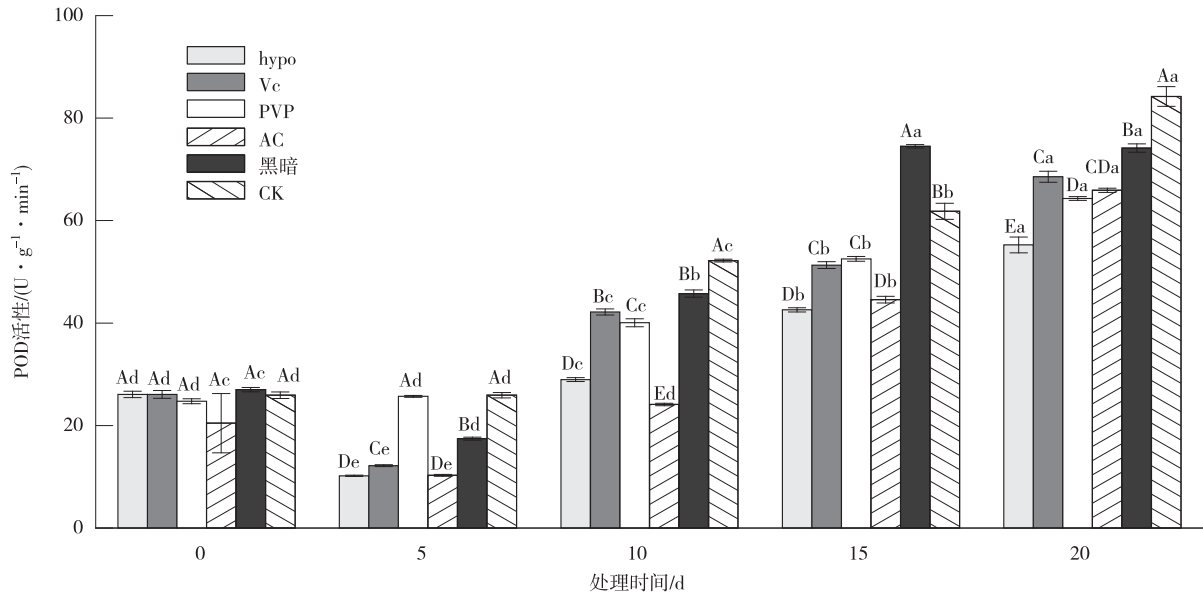


图 4 不同抗褐化处理对 POD 活性的影响

Fig. 4 Effect of different anti-browning treatments on POD activity

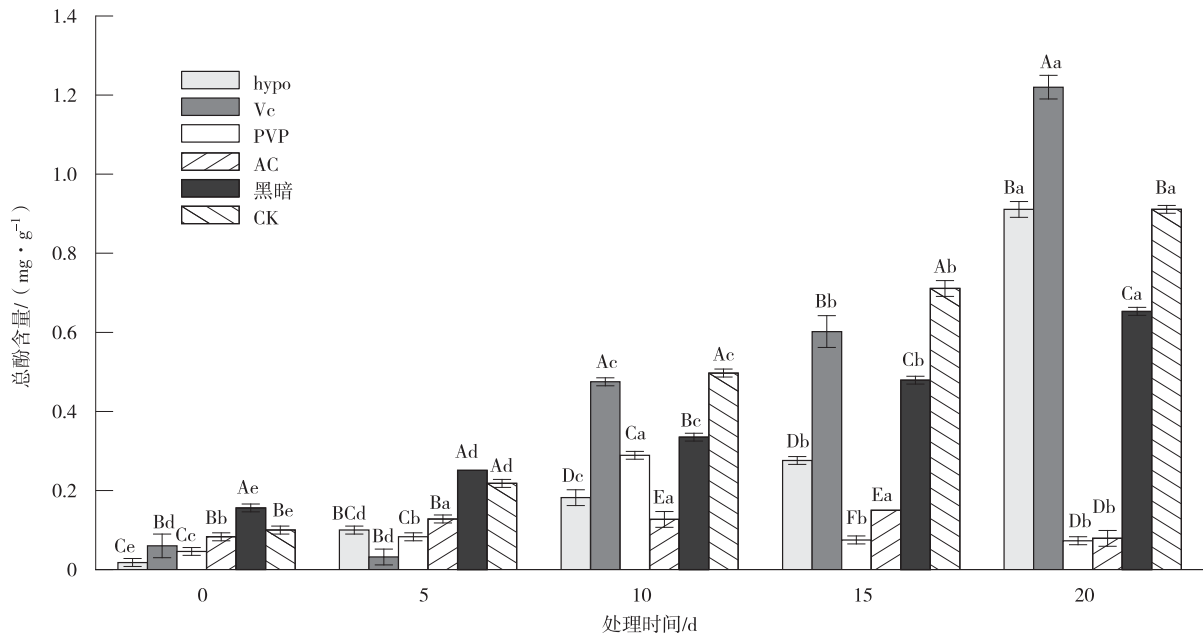


图 5 不同抗褐化处理对总酚含量的影响

Fig. 5 Effects of different anti-browning treatments on total phenols

2.5 褐化率、PPO 活性、POD 活性和总酚含量之间的相关性

对 5 种抗褐化处理下落羽杉不定芽褐化率、PPO 活性、POD 活性和总酚含量之间的关系进行相关性分析,结果如表 1 所示,其中:在 hypo 和 Vc 处理中,4 个指标任意两个在 $p < 0.01$ 水平上均具有统计学意义上的正相关关系;在 PVP 和 AC 处理中,褐化率分别和 PPO 活性、POD 活性在 $p < 0.01$ 水平上均具有统计学意义上的正相关关系,但与总酚含量呈不具有统计学意义的负相关关系;在黑暗处理中,褐化率分别和 PPO 活性、总酚含量在 $p < 0.05$ 水平上均具有统计学意义上的正相关关系,但与 POD 活性呈不具有统计学意义的正相关关系。

表 1 不同抗褐化处理下落羽杉不定芽褐化率、总酚含量、PPO 活性和 POD 活性的相关性
Tab.1 The correlation among browning rate, total phenol content, PPO activity, and POD activity of
adventitious buds of *T. distichum* under different anti-browning treatments

处理	指标	褐化率	PPO 活性	POD 活性	处理	指标	褐化率	PPO 活性	POD 活性
hypo 处理	PPO 活性	0.862**			AC 处理	PPO 活性	0.920**		
	POD 活性	0.822**	0.830**			POD 活性	0.887**	0.879**	
	总酚含量	0.904**	0.893**	0.830**		总酚含量	-0.114	0.034	-0.285
Vc 处理	PPO 活性	0.943**			黑暗处理	PPO 活性	0.534 *		
	POD 活性	0.825**	0.891**			POD 活性	0.510	0.954**	
	总酚含量	0.934**	0.962**	0.931**		总酚含量	0.616 *	0.979**	0.901**
PVP 处理	PPO 活性	0.726**			CK 处理	PPO 活性	0.908**		
	POD 活性	0.926**	0.609 *			POD 活性	0.922**	0.904**	
	总酚含量	-0.008	-0.271	0.000		总酚含量	0.948**	0.954**	0.981**

注:表中数据为 Pearson 相关系数,* 和** 分别表示指标间的相关性在 $p<0.05$ 和 $p<0.01$ 水平上具有统计学意义

3 讨论

褐化是植物组织体内一个比较复杂的生化过程。有关研究表明,添加抗褐化剂能有效降低植物的褐化率,且对不同种类植物而言,添加不同抗褐化剂后产生的抗褐化效果及相关作用机理存在差异^[20-21]。在本研究中,添加吸附剂 PVP 和 AC 较添加抗氧化剂 hypo 和 Vc 对落羽杉不定芽褐化的抑制效果更好。5 种抗褐化处理中,添加 PVP 在降低不定芽的褐化率、PPO 活性和总酚含量方面均有较好表现,这与梁艳等人^[22]对黑皮油松(*Pinus tabulaeformis* var. *mukdensis*)休眠芽外植体褐化防止的结果一致。PVP 是一种酚类物质的专一性吸附剂,在生化制备中经常被用作细胞器的保护剂,PVP 与酚类物质的结合强于后者与酶蛋白质的结合,可以破坏酚-酶复合物结构而达到抑制褐化的效果^[23]。添加 AC 对降低不定芽的褐化率、总酚含量和 POD 活性的效果也比较好,这是由于 AC 拥有特殊的孔隙结构和独特的吸附性能,因而是一种吸附性比较强的无机吸附剂^[24-25]。AC 不仅可以吸收外植体释放的促进褐化的物质,还可以吸附一些琼脂中的杂质和高压灭菌过程中培养基成分降解产生的促进褐化的物质^[26-27],从而有效地防止外植体褐化,因此可以用来控制组织培养中外植体褐变的发生和发展。前人的研究也表明较强的光照会在一定程度上提高 PPO 的活性,如果在培养基中添加定量的 AC,它所具有的排光性能够有效地避免外植体褐化的加重^[28-30]。在本研究中,随着处理时间的延长,PVP 和 AC 处理中的不定芽生长较为缓慢,叶色偏黄绿色,但是将不定芽转入到新的添加有吸附剂的培养基中,不定芽生长状态则出现一定的好转。这可能是因为 AC 和 PVP 在吸收对不定芽生长有害物质的同时,也能够吸附培养基中的营养元素和植物生长调节剂,最终导致不定芽缺乏一定的营养供给而生长状态不佳^[31]。因此,在培养基中添加吸附剂抑制外植体褐化时应注意吸附剂的用量,避免它过多地吸附植物组织生长分化所需的营养物质。

本研究发现,添加抗氧化剂也能对落羽杉不定芽褐化起到一定的抑制效果。hypo 主要是通过改变外植体周围的氧化还原电位来抑制酚类物质的氧化,从而达到抑制褐化的效果,Vc 可以直接参与植物体内活性氧的清除,也可以通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环来清除过氧化氢,从而保护植物的正常代谢,防止氧化胁迫对植物造成伤害^[32-34]。在本研究中,hypo 在降低不定芽褐化率、PPO 活性和 POD 活性方面均比 Vc 有更好的表现,但在降低总酚含量方面中两者表现接近一致。这可能是因为添加 Vc 改变了培养基的 pH,而植物的生长对酸碱度要求比较严格,一般在 pH 为 5.0~6.2 条件下生长得比较好,而培养基 pH 过大或过小都会影响组织细胞的正常生长和分化^[35]。此外,已有研究发现在光照条件下,植物体内的酶非常活跃,酚类物质在光诱导酶的参与下更容易合成成为醌类物质^[36-37]。在本研究中,黑暗处理对落羽杉不定芽的褐化抑制效果不甚明显,这与有关蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*)^[38]和杜仲(*Eucommia ulmoides*)^[39]外植体抗褐化研究得到结果不一致。其中原因可能是在黑暗或弱光条件植株组织内受光诱导的相关酶的活性会大大减弱,酚类物质合成量减少^[40-41];同时一些组织生长发育所需的酶也会受到一定的限制,并且随着黑暗时间的延长,不定芽可能因长期缺乏光照而芽内叶绿素含量不足,从而影响了不定芽的生长,导致不定芽变黄。

本研究的 4 种添加抗氧化剂或吸附剂的抗褐化处理均只进行了单一剂量的实验,对不定芽褐化有一定的抑制效果,但不能完全控制不定芽褐化的发生发展。在接下来的研究中可以考虑设置抗褐化剂的剂量梯度,探索其中的最适剂量;或者同时添加两种及以上的抗褐化剂,使它们发挥协同作用,更好地控制不定芽褐化;还可以通过适当地缩短外植体转瓶周期,使醌类物质无法积累,从而减轻该类物质在褐化过程中造成的伤害。然而需要注意的是,过于频繁的转瓶虽然能让醌类物质无法大量积累,但是也会导致外植体细胞容易发生突变,失去分生能力。因此,对于特定物种而言,还是应该确定合理的转瓶周期。

参考文献:

- [1] 张虹. 三峡库区消落带土地资源特征分析[J]. 水土保持通报, 2008, 28(1): 46-49.
ZHANG H. Characteristic analyses of the water-level-fluctuating zone in the Three Gorges reservoir[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2008, 28(1): 46-49.
- [2] 苏维词. 三峡库区消落带的生态环境问题及其调控[J]. 长江科学院院报, 2004, 21(2): 32-34.
SU W C. Study on optimal operation model of water resources in irrigation area of water lack[J]. Journal of Yangtze River Scientific Research Institute, 2004, 21(2): 32-34.
- [3] 周明涛, 杨平, 许文年, 等. 三峡库区消落带植物治理措施[J]. 中国水土保持科学[J]. 2012, 10(4): 90-94.
ZHOU M T, YANG P, XU W N, et al. Plant management measures on water-level-fluctuating-zone in Three Gorges reservoir area[J]. Science of Soil and Water Conservation, 2012, 10(4): 90-94.
- [4] WANTZEN K M, ROTHHAUPT K-O, MÖRTL M, et al. Ecological effects of water-level fluctuations in lakes: an urgent issue [J] Hydrobiologia, 2008, 613: 1-4.
- [5] 樊大勇, 熊高明, 张爱英, 等. 三峡库区水位调度对消落带生态修复中物种筛选实践的影响[J]. 植物生态学报, 2015, 39(4): 416-432.
FAN D Y, XIONG G M, ZHANG A Y, et al. Effect of water-lever regulation on species selection for ecological restoration practice in the water-level fluctuation zone of Three Gorges reservoir[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2015, 39(4): 416-432.
- [6] ZHANG Q, LOU Z. The environmental changes and mitigation actions in the Three Gorges reservoir region, China[J]. Environmental Science & Policy, 2011, 14(8): 1132-1138.
- [7] LIU Z, CHENG R, XIAO W, et al. Effect of off-season flooding on growth, photosynthesis, carbohydrate partitioning, and nutrient uptake in *Distylium chinense*[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107636.
- [8] 黄瑛君. 重庆开县库区消落带植物景观设计研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
HUANG Y J. Study on plant landscape design of fluctuating zone in Kaixian reservoir area of Chongqing[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [9] 徐德星, 秦延文, 张雷, 等. 三峡入库河流大宁河回水区沉积物和消落带土壤磷形态及其分布特征研究[J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1337-1344.
XU D X, QING Y W, ZHANG L, et al. Phosphorus forms and its distribution characteristics in sediments and soils of water-level-fluctuating zone of the backwater reach from input river of Three Gorges reservoir[J]. Environmental Science, 2009, 30(5): 1337-1344.
- [10] 郝艳龙. 三峡水库消落区适宜植物配置模式研究[D]. 万州: 重庆三峡学院, 2019.
HAO Y L. Study on the suitable plant configuration model on water-level-fluctuating-zone in Three Gorges reservoir area[D]. Wanzhou: Chongqing Three Gorges University, 2019.
- [11] MURPHY J B, STANLRY R G. Increased germination rates of baldcypress and pondcypress seed following treatments affecting the seed coat[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 35(2): 135-139.
- [12] 吴落军. 落羽杉的扦插繁殖技术与生根机理研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
WU L J. Cutting propagation technique and rooting mechanism of *Taxodium distichum* (L.) [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2007.
- [13] 贺窑青, 冯改霞, 贺小青. 林木组织培养的应用与研究[J]. 河南林业科技, 2003(1): 27-29.
HE Y Q, FENG G X, HE X Q. Application and research of forest tissue culture[J]. Journal of Henan Forestry Science and Technology, 2003(1): 27-29.
- [14] 崔德才, 徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
CUI D C, XU P W. Plant tissue culture and industrial seedling raising[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.

- [15] 许秀玉. 墨西哥落羽杉组织培养的研究[D]. 南京:南京林业大学,2004.
XU X Y. Studies on tissue culture of *Taxodium mucronatum* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2004.
- [16] BRECHT J K, SALTVEIT M E, TALCOTT S T, et al. Fresh-cut vegetables and fruits [M]//JANICK J. Horticultural reviews. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004: 185-250.
- [17] DEGL'INNOCENTI E, GUIDI L, PARDOSSI A, et al. Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *acephala*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(26): 9980-9984.
- [18] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
GAO J F. Plant physiology experimental guidance [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [19] 李小芳, 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2016.
LI X F, ZHANG Z L. Plant physiology experimental guidance [M]. Beijing: Higher Education Press, 2016.
- [20] 罗晓芳, 田砚亭, 姚洪军. 组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 98-101.
LUO X F, TIAN Y T, YAO H J. Polyphenol oxidase activities and phenol contents in tissue culture [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1999, 21(1): 98-101.
- [21] 李萍, 成仿云, 张颖星. 防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(2): 71-76.
LI P, CENG F Y, ZHANG Y X. Effects of browning antagonists on antibrowning, growth and multiplication of tissue culture of tree peony [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2008, 30(2): 71-76.
- [22] 梁艳, 赵雪莹, 许昕, 等. 黑皮油松外植体的抗褐化处理与诱导培养[J]. 分子植物育种, 2020, 18(21): 7173-7178.
LIANG Y, ZHAO X Y, XU X, et al. Anti-browning treatments and induced culture on the explants of *Pinus tabulaeformis* var. *mukdensis* [J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(21): 7173-7178.
- [23] 冯代弟, 王燕, 陈剑平. 植物组培褐化发生机制的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(6): 1108-1116.
FENG D D, WANG Y, CHEN J P. Research progress of browning in the plant tissue culture [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(6): 1108-1116.
- [24] 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, 21(3): 81-87.
YAO H J, LUO X F, TAN Y T. Development of explant browning researches [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1999, 21(3): 81-87.
- [25] CHIANG H L, CHOA C G, CHEN S Y, et al. The reuse of biosludge as an adsorbent from a petrochemical wastewater treatment plant [J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2003, 53(9): 1042-1051.
- [26] ZHAO G F, BAI P, ZHU H M, et al. The modification of activated carbons and the pore structure effect on enrichment of coal-bed methane [J]. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 2008, 3(3): 284-291.
- [27] 杨瑞玮. 林荫银莲花组织培养过程中褐变控制技术及相关机理研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
YANG R W. Study on browning control technology and its mechanism tissue culture of *Anemone flaccida* Fr. Schmidt [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [28] GUR-REZNIK S, KATZ I, DOSORETZ C G. Removal of dissolved organic matter by granular-activated carbon adsorption as a pretreatment to reverse osmosis of membrane bioreactor effluents [J]. Water Research, 2008, 42(6/7): 1595-1605.
- [29] 董宇. 活性炭的吸附性能及表征方法[J]. 中国资源综合利用, 2020, 38(7): 64-66.
DONG Y. The adsorption performance and characterization method of activated carbon [J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2020, 38(7): 64-66.
- [30] 刘香江, 杨丽, 吴红芝. 山葵组培中抗褐化剂的筛选及其对增殖和生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(7): 33-36.
LIU X J, YANG L, WU H Z. Screening of anti-browning agents in wasabi tissue culture and its effect on proliferation and growth [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(7): 33-36.
- [31] 冯代弟. 宝莲灯组培褐化作用机制的初步研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2015.
FENG D D. Preliminary study on the mechanism of browning in tissue culture of *Medinilla magnifica* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015.
- [32] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(Z1): 481-486.
ZHOU J H, ZHOU J R, ZENG H S, et al. Advance of studies on browning and antibrowning techniques in the tissue culture of horticultural plants [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(Z1): 481-486.
- [33] 苏江, 岑忠用, 奉艳兰, 等. 抗坏血酸对岩黄连愈伤组织褐化及抗氧化酶活性的影响[J]. 北方园艺, 2015(20): 138-142.
SU J, CEN Z Y, FENG Y L, et al. Effect of ascorbic acid on browning and activity of antioxidant enzyme of *Corydalis saxicola* bunting callus [J]. Northern Horticulture, 2015(20): 138-142.
- [34] 张智, 邵菊芳, 滕婷婷, 等. 抗氧化剂对银杏愈伤组织褐变的影响[J]. 安徽农业科学, 2008(30): 13051-13052.

- ZHANG Z, SHAO J F, TENG T T, et al. Effects of antioxidants on browning of the ginkgo callus[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2008(30): 13051-13052.
- [35] 李欣怡, 李加好, 韩占江. pH胁迫下三种越橘组培苗的生理反应[J]. 北方园艺, 2015(15): 107-111.
- LI X Y, LI J H, HAN Z J. Effect of pH stress on physiological responses of three tissue culture seedlings in blueberry[J]. Northern Horticulture, 2015(15): 107-111.
- [36] 周晓鹿. 降低皂质芦荟诱导愈伤组织褐化的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2007(4): 539-544.
- ZHOU X L. A primary study on reducing browning of callus induced from *Aloe saponaria* haw callus[J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2007(4): 539-544.
- [37] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501-506.
- GAO G X. Browning in tissue culture[J]. Plant Physiology Communications, 1999, 35(6): 501-506.
- [38] 周利利. 蝴蝶兰组培快繁体系的建立[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
- ZHOU L L. Establishment of rapid propagation system for *Phalaenopsis* tissue cultures[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2017.
- [39] 邱晓芳, 朱笃, 张志斌, 等. 杜仲愈伤组织继代培养及抑制褐化的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 307-309.
- QIU X F, ZHU D, ZHANG Z B, et al. Study on callus subculture and darkening inhibition of *Eucommia ulmoides*[J]. Food Science, 2007, 28(8): 307-309.
- [40] DAVIES M E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's scarlet rose[J]. Planta, 1972, 104(1): 50-65.
- [41] MARKS T R, SIMPSON S E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance[J]. Journal of Horticultural Science, 1990, 65(2): 103-111.

Resources, Environment and Ecology in Three Gorges Area

Inhibition Mechanism of Adventitious Bud Browning in Stem Explant Propagation of *Taxodium distichum* in Water Level Fluctuating Zone of Three Gorges Reservoir Area

CHEN Xuemei¹, YANG Longyong², CHEN Zhangting¹,
CHEN Chunhua¹, YUAN Zhongxun¹, LI Changxiao¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research in Three Gorges Reservoir Region, Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715; 2. Fengjie Forestry Bureau, Fengjie Chongqing 404600, China)

Abstract: [Purposes] The effects of different anti-browning treatments on the browning of adventitious buds of explants grown *in situ* in the water-level fluctuation zone of Three Gorges reservoir area were studied. [Methods] Five anti-browning treatments were set up, namely: sodium thiosulfate (hypo), ascorbic acid (Vc), polyvinylpyrrolidone (PVP), activated carbon (AC), and dark. Normally cultured adventitious buds were used as the control group. After 20 days of treatment, the changes in browning rate, polyphenol oxidase (PPO) activity, peroxidase (POD) activity and total phenol content of each treatment were counted. [Findings] 1) The best effect of reducing browning rate is PVP treatment, followed by AC treatment, hypo treatment, dark treatment and Vc treatment. 2) The best effect of reducing PPO activity is PVP treatment, followed by dark treatment, hypo treatment, Vc treatment and AC treatment. 3) The best effect of reducing POD activity is hypo treatment, followed by AC treatment, PVP treatment, Vc treatment and dark treatment. 4) The best effect of reducing the total phenol content is AC treatment, followed by PVP treatment, dark treatment, Vc treatment and hypo treatment. 5) In hypo and Vc treatments, the browning rate and the total phenol content, PPO and POD activity were extremely significantly positively correlated with each other ($p < 0.01$); In PVP and AC treatments, the browning rate was statistically positively correlated with PPO activity and POD activity ($p < 0.01$); There was no statistically significant negative correlation with total phenol content; In the dark treatment, the browning rate was respectively positively correlated with PPO activity and total phenol content ($p < 0.05$), but the positive correlation with POD activity was not statistically significant. [Conclusions] Adding PVP to the culture medium is an ideal anti-browning treatment for the adventitious buds of *T. distichum*, and the anti-browning effect of AC added to the culture medium is the second.

Keywords: *Taxodium distichum*; adventitious buds; anti-browning; enzyme activity; phenolics; Three Gorges reservoir area

(责任编辑 方 兴)