



帝王大丽花初始外植体褐变影响因素及控制措施研究

韩胜男¹,王璐¹,张映婵¹,梁娟²,牛善策^{1,3},
郝丽红¹,向地英¹,郑志兴⁴,陈段芬¹

(1. 河北农业大学园艺学院,河北保定 071001;2. 石家庄市植物园,石家庄 050073;3. 河北农业大学
华北作物改良与调控国家重点实验室,河北保定 071001;4. 张家口市农业科学院,河北张家口 075000)

摘要 针对帝王大丽花在组织培养时出现的初始外植体严重褐变问题,从取材部位、空气暴露时间、水插通氧和温度 4 个方面分析褐变发生的原因。结果表明,帝王大丽花枝条上部节位褐变程度高于下部节位,其中多酚氧化酶活性和苯丙氨酸解氨酶活性及总酚含量从枝条上端到下端逐渐降低,变化趋势与褐变程度呈现一致性;增加空气暴露时间、枝条水插通氧和高温下取样均可加剧褐变程度。分别采取不同环境下切割、接种前进行不同时间水插和低温处理、接种后进行不同时间黑暗和低温处理等褐变控制措施,结果表明,与空气中正常切割相比,在 1.0% 维生素 C 溶液中切割外植体褐变程度可减轻 4.08%;枝条水插 5 d+4℃ 低温处理 5 h 后接种的外植体褐变程度比空白对照降低 17.12%,且茎段外植体幼芽萌发和生长正常;对接种外植体进行 7 d 的暗处理+同时 4℃ 低温处理 6 d,外植体褐变程度比对照降低 31.25%,且茎段外植体幼芽萌发正常,叶片浓绿,长势健壮。

关键词 帝王大丽花;初始外植体;褐变;水插;低温;暗处理

帝王大丽花(*Dahlia imperialis*),又名树状大丽花,是菊科大丽花属多年生大型草本或半灌木植物,原产于墨西哥南部至哥伦比亚之间海拔 1 500~1 700 m 的山地,是近年来新引入国内的珍稀大丽花种类。帝王大丽花株高可达 5~6 m,是大丽花属中最高大的种类;其地下部分为大型棒状块根;茎具四棱;节膨大;2~3 回大型奇数羽状复叶对生^[1];在晚秋至初冬季节开花,大量头状花序自茎端及叶腋伸出,花序直径可达 7.5~15 cm,舌状花颜色为淡紫色或粉紫色,管状花颜色为橙黄色。因此,帝王大丽花因其株型高大、花繁叶茂成为园林绿化不可多得的优良材料。

帝王大丽花目前通过扦插和分根繁殖,但其球根萌芽率低、分枝数量少、扦插生根慢,所以繁殖系数较低,难以满足市场需求。并且随着扦插、分根等繁殖代数的增加,品种退化问题也会逐渐显现^[2]。针对上述问题,利用帝王大丽花各类器官或组织作为外植体,建立高效离体组培快繁体系,不仅能够加快帝王大丽花的繁殖速度,还能规

模化生产优质种苗,同时也为帝王大丽花种质资源的离体保存提供技术支持。但是,在切取帝王大丽花茎段外植体时,切口处存在极其快速的褐变现象,即使在取材后快速地浸入水中,在之后的消毒过程中或外植体接种到培养基后仍然会出现严重的褐变问题,导致后续组培试验不能正常进行。目前大丽花属植物在组培快繁方面围绕愈伤组织诱导^[3]、不定芽再生^[4]、试管苗生根^[5]、茎尖脱毒^[6]等做了大量研究,但鲜见有外植体褐变问题的报道。因此,研究帝王大丽花外植体褐变原因及影响因素,可为帝王大丽花组培快繁提供理论和技术支持,对推动大丽花产业健康发展具有十分重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2020 年 12 月—2021 年 10 月在河北农业大学西校区园艺学院进行。供试材料为栽植于河北农业大学东校区试验基地的 1 a 生帝王大

收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-05-24

基金项目:河北省重点研发计划项目(20326814D)。

第一作者:韩胜男,女,硕士研究生,研究方向为观赏植物栽培繁育。E-mail:1403934059@qq.com

通信作者:陈段芬,女,博士,教授。研究方向为观赏植物种质创新与利用。E-mail:chenduanfen@163.com

丽花枝条,取样时腋芽处于刚萌发状态,挑选的枝条直径不超过 1 cm,其长势一致、无病虫害、无机械损伤,取下后立即将基部切口浸入水中。

1.2 试验方法

外植体切割环境处理:将消毒处理后的不带芽茎段放在不同环境下进行切割,分别记为 A:空气中切割;B:无菌水中切割;C:在 1.0% 的维生素 C 溶液中切割。

枝条水插处理:将离体枝条放在 18℃ 的培养箱中进行不同时间的水插处理,期间每天定时换水,并及时剪掉枝条基部变色部分,分别记为 S1:水插 0 d;S2:水插 2 d;S3:水插 5 d;S4:水插 7 d。

水插枝条低温处理:将水插处理 5 d 后的枝条放在 4℃ 冰箱进行不同时间的低温处理,分别记为 W1:4℃ 处理 0 h;W2:4℃ 处理 5 h;W3:4℃ 处理 10 h;W4:4℃ 处理 15 h;W5:4℃ 处理 20 h;W6:4℃ 处理 24 h。

接种后黑暗处理:用黑布将接种后的外植体遮盖,分别进行不同时间的黑暗处理,分别记为 H1:暗培养 0 d;H2:暗培养 2 d;H3:暗培养 7 d;H4:暗培养 14 d。

接种后低温处理:将接种后的外植体放在 4℃ 的光照培养箱中进行不同时间的低温处理,同时在接种前 7 d 内进行黑暗处理,分别记为 Wa:暗+4℃ 处理 0 d;Wb:暗+4℃ 处理 2 d;Wc:暗+4℃ 处理 4 d;Wd:暗+4℃ 处理 6 d,外植体在黑暗和温度处理后转组培室正常培养。

1.3 无菌外植体的获取与接种

2021 年 9 月 1 日取样后,截取第 2 节位的带芽茎段和靠近第 2 节位上下部分 1~2 cm 的不带芽茎段均剪成 3~4 cm 的长度,于洗洁精溶液中搅拌清洗 10 min 后,放在流水下冲洗 1 h,材料冲洗干净后放在超净工作台上进行消毒和接种。先采用 75% 酒精处理 30 s,无菌水冲洗 2 次;再用质量分数为 0.1% 升汞处理 6 min,无菌水冲洗 5 次,最后将冲洗干净的外植体浸泡在无菌水中待用。接种时用无菌手术刀切去切面与消毒剂接触的部分直至露出新鲜组织,按照形态学方向竖直接种到培养基中。初代培养时接种的培养基为启动培养基,培养基配方为:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂,pH 为 5.8。培养条件为:培养温度(25±2)℃,光照周期 16 h/d,光照度 1 500~2 000 lx。每瓶分装培养基 30 mL,接种 1 个外植体,每个处理接

种 30 个外植体,重复 3 次。接种后每隔 7 d 观察外植体的褐变情况,培养周期为 21 d 或 28 d。

1.4 测定指标及方法

用褐变指数表示外植体褐变的程度,将外植体的褐变程度分以下 4 级标准进行统计。褐变等级(L)=外植体褐变面积/外植体体积。0 级:外植体外表鲜绿色,无褐变(L=0);1 级:轻度褐变,外植体基本为绿色($L \leq 1/4$);2 级:褐变,外植体褐色($1/4 < L \leq 1/2$);3 级:较严重褐变,外植体红褐色($1/2 < L \leq 3/4$);4 级:严重褐变,外植体黑褐色($L > 3/4$)。

褐变指数 = $\sum(\text{褐变级数} \times \text{该级株数}) / (\text{总株数} \times \text{最高级数}) \times 100\%$

污染率 = $\text{污染的外植体数} / \text{接种的外植体数} \times 100\%$

多酚氧化酶(PPO)活力的测定采用儿茶酚法^[7],单位为 U/(g·min);苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力的测定采用巯基乙醇法^[8-9],单位为 U/(g·h);总酚的测定采用福林酚试剂法^[10],总酚含量单位为 mg/g。

色度测定:使用 CR410 型色差计于室温下测定,得出 L^* 值,分析不同取材部位纵切面的褐变程度(L^* 值为亮度指数,从 0~100 变化, $L^*=0$ 表示黑色, $L^*=100$ 表示白色,其值越大亮度越高,表面褐变越轻,反之褐变越严重)。

1.5 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2016 对试验数据进行统计整理,用 SPSS 20.0 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 枝条切口褐变的影响因素

2.1.1 枝条不同节位切口的褐变程度差异 将帝王大丽花不同节位切开后暴露在空气中,测定在不同时间点 L^* 值,结果发现不同节位 L^* 值随时间变化都呈下降趋势(图 1),其中以顶芽、2 节和 3 节下降的较多,分别下降 2.11、1.74 和 1.99,4 节和 5 节下降的少,分别为 0.92 和 0.79,说明帝王大丽花上端枝条比下端枝条褐变严重。

2.1.2 外界条件对枝条切口褐变的影响 空气暴露时间对枝条切口褐变的影响:将帝王大丽花枝条切开后暴露于空气中观察切口颜色变化,结果发现,切开后 5 s 枝条切口即发生轻微褐变,2 min 后切面全部变成浅褐色。随着切面在空气中暴露时间延长,褐变程度加重,由初期的浅褐色

变为红褐色,30 min 时全部变为黑褐色(图 2)。

浸水与浸水加氧处理对褐变的影响:分别选取帝王大丽花植株顶芽至第 5 节位的带芽茎段(从左到右),分别在浸水条件(图 3-a)和浸水加氧条件下(图 3-b)培养 24 h 后发现,两个处理的茎段上部幼嫩部分出现褐变的时间早于下部成熟部分,且枝条上端褐变程度高于下端褐变程度。其中,浸水处理除顶芽外其他茎段只有叶柄部位出现严重褐变,整体可以保持基本绿色,而浸水加氧处理的顶芽和茎段全部褐变死亡。综合比较 5 个节位的褐变程度,浸水加氧处理褐变比浸水处理更为严重(图 3)。由此可以初步确定,外界氧气可以加剧帝王大丽花的褐变程度,其切口褐变的类型为酶促褐变。

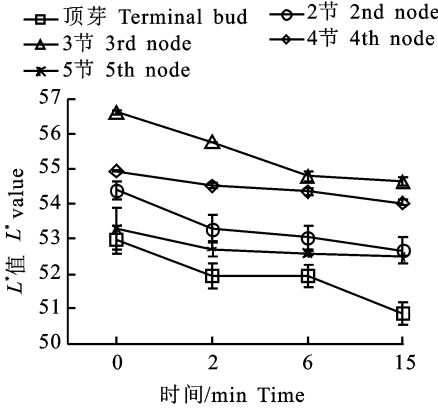


图 1 枝条不同节位切口的褐变程度差异
Fig. 1 Difference in browning degree of different nodal incisions on branches



图 2 帝王大丽花枝条切口在空气中暴露时间与褐变程度变化
Fig. 2 Exposure time and browning degree of branch incisions of *D. imperial*



图 3 浸水(a)和浸水加氧(b)处理 24 h 后不同节位茎段褐变情况
Fig. 3 Browning of stem segments at different nodes after water insertting (a) and water insertting with oxygen(b) for 24 hours

不同温度下褐变程度差异:在不同季节取样后,5 min 时观察帝王大丽花相同节位切口伤口的褐变程度,以 7 月份取样后伤口褐变严重(图 4-a),颜色表现为黑褐色;12 月份取样后切面出现轻微褐变(图 4-b),相比 7 月份褐变程度显著降低,说明冬季较低的温度可能对褐变起到显著的抑制作用。

2.2 枝条不同节位切口褐变程度与相关酶活性的相关性

帝王大丽花枝条不同节位 PPO 活性的测定结果见图 5。从枝条形态学上端到形态学下端,

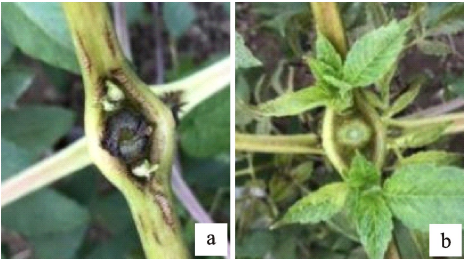
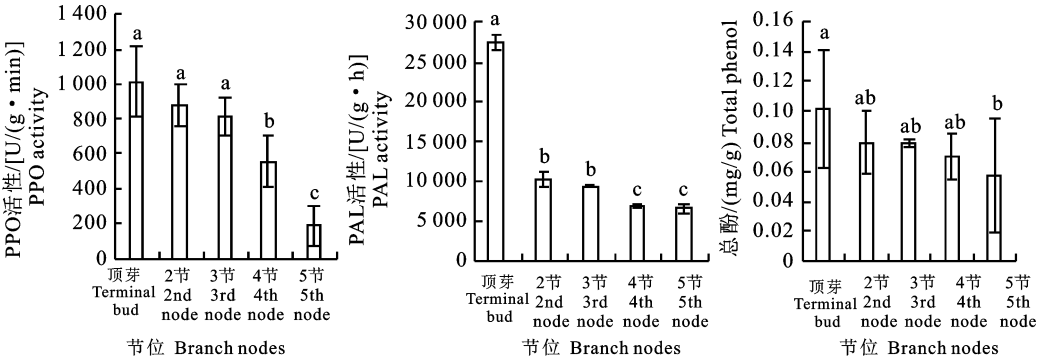


图 4 7 月(a)和 12 月(b)取样后切口的褐变情况
Fig. 4 Browning of incisions after sampling in July and December



不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异性显著

Different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$ level

图 5 帝王大丽花枝条不同节位 PPO、PAL 活性及总酚含量

Fig. 5 PPO and PAL activities and total phenol content in different nodes of branches of *D. imperial*

不同节位中 PPO 活性呈逐渐下降的趋势。其中, 顶芽与第 2、3 节的 PPO 活性均在 812.30 U/(g·min) 以上, 差异不显著; 第 4 节 PPO 活性为 552.90 U/(g·min), 与其上端或下端节位差异显著; 第 5 节位 PPO 活性最低, 为 190.30 U/(g·min), 与上端的所有节位差异显著。

帝王大丽花枝条不同节位 PAL 活性差异从枝条形态学上端到末端, PAL 活性呈下降趋势, 其中, 顶芽 PAL 活性最高, 与其下端部位之间具有显著性差异; 第 2 节与第 3 节之间酶活性无显著差异, 但与下端部位差异性显著; 第 4 节与第 5 节之间的 PAL 活性无显著性差异。

帝王大丽花枝条不同节位总酚含量从枝条形态学上端到末端, 总酚的含量呈下降趋势, 其中, 顶芽总酚含量最高, 为 0.10 mg/g, 但与第 2、3、4 节之间无显著性差异; 下端第 5 节位的总酚含量最

低, 仅有 0.05 mg/g, 与顶芽总酚含量差异显著。

2.3 不同处理措施对外植体褐变的影响

2.3.1 不同切割环境对外植体褐变的影响 由表 1 可知, 不同处理的外植体均在接种后出现不同程度的褐变, 其中, 在 1.0% 维生素 C 溶液中切割(C)褐化程度最轻; 虽然接种 2 d 时 1.0% 的维生素 C 溶液中切割(C)比正常切割(A)和在无菌水中切割(B)褐变指数高出 15.25% 和 19.30%, 但在接种 14 d 时, C 处理比 A、B 褐变指数分别低 4.86% 和 3.52%; 到接种 21 d 时, 与 A、B 相比, C 处理褐变指数最低, 且在整个培养期间, C 处理褐变指数增长幅度最小, 能够基本保持稳定状态, 但 A、B 处理的褐变指数随着时间延长一直呈增长趋势。虽然 B、C 处理的外植体污染率比 A 处理分别高出 25.93% 和 14.81%, 但污染率在培养期间内并未对外植体褐变造成影响。

表 1 接种时不同切割环境外植体褐变指数和污染率

Table 1 Browning index and contamination rate of explants under different cut environments during inoculation

不同切割环境 Different cutting conditions	接种后褐变指数/% Index after inoculation				接种后污染率/% Contamination rate after inoculation			
	2 d	7 d	14 d	21 d	2 d	7 d	14 d	21 d
A	73.75	88.33	90.00	91.88	0.00	13.33	45.00	67.50
B	71.25	82.50	88.75	89.38	10.00	40.00	65.00	85.00
C	85.00	85.00	85.63	88.13	0.00	30.00	62.50	77.50

对接种到培养基的外植体进行观察发现: A 处理后接种到培养基时, 外植体会立刻发生严重褐变, 褐变部分颜色逐渐加深, 直至表面全部变成黑褐色, 与培养基接触部分可见红褐色物质析出, 且面积相对较大; B 处理接种到培养基后, 外植体褐变程度相比 A 稍有减轻, 仅有少量红褐色物质

析出, 培养基红褐色面积较小; C 处理后接种到培养基, 外植体只出现轻微褐变, 与培养基接触部分颜色正常, 没有红褐色物质析出(图 6)。

2.3.2 水插和低温处理对外植体接种后褐变的影响 帝王大丽花枝条下部进行不同时间水插处理对外植体接种后褐变的影响见表 2。随着培养

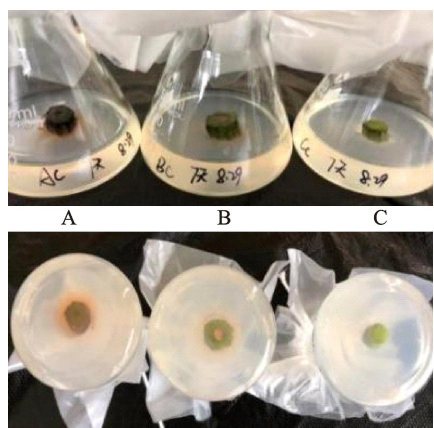


图 6 A、B、C 接种后正、底面褐变比较

Fig. 6 Comparison of browning on front and bottom surfaces of A, B and C after inoculation

表 2 不同的水插时间外植体褐变指数和污染率

Table 2 Browning index and contamination rate of explants under different waterinserttingtime

代号 Code	水插时间/d Water insertting time	接种后褐变指数/% Browning index after inoculation				接种后污染率/% Contamination rate after inoculation			
		7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
S1	0	60.23	67.05	73.86	82.95	59.09	68.18	81.82	81.82
S2	2	51.25	57.50	70.00	78.75	55.00	70.00	70.00	70.00
S3	5	51.25	57.50	66.25	72.50	70.00	70.00	70.00	75.00
S4	7	59.52	61.90	66.67	72.62	52.38	66.67	71.43	76.19



图 7 接种 21 d 时不同水插时间处理外植体褐变及幼芽长势情况

Fig. 7 Browning of explants and bud growth at 21 days after inoculation with different water insertting time

水插 5 d 后 4 ℃ 低温处理时间对外植体褐变的影响见表 3。结果表明,将帝王大丽花枝条先放在 18 ℃ 的培养箱中水插处理 5 d,然后放在 4 ℃ 冰箱低温处理 5 h 后抑制褐变效果最好,相比处理 W1 外植体褐变指数降低 5.17%,相比处理 S1 褐变指数降低 17.12%,但是随着 4 ℃ 低温处理时间的增加,褐变指数都快速升高,表现出比对照 W1 更明显的褐变。其中,4 ℃ 处理 10 h (W3)和 4 ℃ 处理 15 h (W4)褐变指数分别为 91.00%和 90.00%,4 ℃ 处理 20 h (W5)和 4 ℃ 处理 24 h (W6)褐变指数分别为 82.29%和 80.95%。污染率能够保持在 80% 以下,未对褐

时间的增加,所有处理的外植体在接种后褐变指数均呈现增加趋势。接种 28 d 时的统计结果表明,水插处理的外植体褐变指数均低于对照 S1 (未水插),其中以水插 5 d (S3)和水插 7 d (S4)处理效果好,与对照处理 S1 相比,褐变指数分别降低 12.60%和 12.45%,而水插 2 d (S2)比对照 S1 褐变指数仅降低 5.06%。所有接种的外植体污染率虽然保持在 70.00%~81.82%,但并未对褐变程度造成影响(表 2)。

接种 21 d 后,对照 S1 处理的带芽茎段褐变严重,颜色呈现黑褐色,其幼芽生长不正常,叶片蜷曲不能展开并伴有褐变;S2 和 S4 处理后的带芽茎段,新长出来的幼芽状态较 S1 好,整体褐变程度也低;S3 处理后效果最好,萌发的幼芽生长健壮,叶片浓绿,展开正常(图 7)。

变指数造成影响(表 3)。

培养 21 d 后比较不同处理下外植体的生长情况,W1 和 W2 处理后的带芽茎段其萌发的幼芽能够正常生长,且不发生褐变。W3 和 W4 处理后的带芽茎段在萌发的幼芽基部即发生褐变,并逐渐蔓延至全株;W5 和 W6 处理后的带芽茎段其幼芽生长停滞,并伴有轻微褐变现象(图 8)。

2.3.3 接种后暗处理和低温处理对外植体褐变的影响 接种后不同时间暗处理对外植体褐变的影响:由表 4 可知,随着暗培养时间增加,外植体褐变有减轻趋势。在不同时间节点对外植体褐变情况进行统计分析发现:暗培养 0 d (H1)和暗培

表 3 外植体进行不同时间的低温预处理褐变指数和污染率

Table 3 Browning index and contamination rate of explants after different time of low temperature pretreatment

代号 Code	4 ℃ 处理时间/h Treatment time at 4 ℃	接种后褐变指数/% Browning index after inoculation				接种后污染率/% Contamination rate after inoculation			
		7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
W1	0	51.25	57.50	66.25	72.50	70.00	70.00	70.00	75.00
W2	5	43.75	46.25	62.50	68.75	40.00	65.00	70.00	80.00
W3	10	59.00	71.00	86.00	91.00	60.00	80.00	80.00	80.00
W4	15	51.25	62.50	76.25	90.00	65.00	75.00	75.00	80.00
W5	20	58.33	63.54	71.88	82.29	50.00	62.50	70.83	70.83
W6	24	63.10	65.48	72.62	80.95	33.33	47.62	57.14	57.14

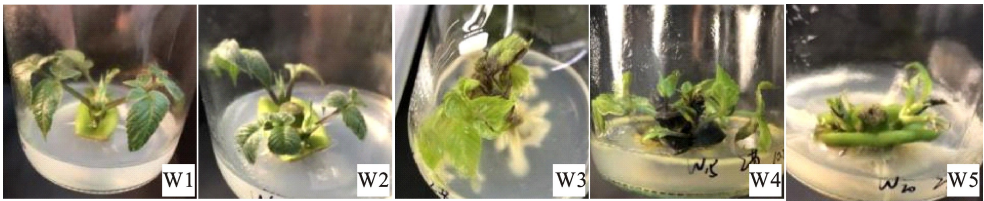


图 8 接种 21 d 时不同时间低温处理外植体褐变及幼芽长势

Fig. 8 Browning of explants and bud growth after different time of low temperature treatment at 21 days after inoculation

养 2 d(H2)随接种后培养时间变化褐变指数呈上升趋势。在接种 21 d 时,暗培养 7 d(H3)和暗培养 14 d(H4)褐变指数比对照 H1 分别降低 5.36%,H4 在暗培养结束后转正常培养,其褐变指数能基本保持稳定。H2、H3 的污染率高于 H1、H2。

植体,其接触培养基部分随着培养时间的增加一直呈现红褐色,且面积较大;经过暗培养 2 d(H2)的外植体,接触的培养基颜色为黑褐色;经过暗培养 7 d(H3)和暗培养 14 d(H4)的外植体,培养基颜色正常(图 9)。

接种培养 14 d 时,对照暗培养 0 d(H1)的外

表 4 接种后不同时间黑暗处理外植体褐变指数和污染率

Table 4 Browning index and contamination rate of explants treated with darkness at different time after inoculation

代号 Code	黑暗处理时间/d Dark treatment	接种后褐变指数/% Browning index after inoculation				接种后污染率/% Contamination rate after inoculation			
		7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
H1	0	82.50	90.83	91.67	93.33	6.67	20.00	43.33	53.33
H2	2	70.83	83.33	89.17	91.67	0.00	26.67	56.67	66.67
H3	7	—	83.33	85.00	88.33	—	36.67	73.33	73.33
H4	14	—	—	88.33	88.33	—	—	56.67	76.67

注:“—”表示该点未测定。

Note:“—” indicates that the time node is not measured.

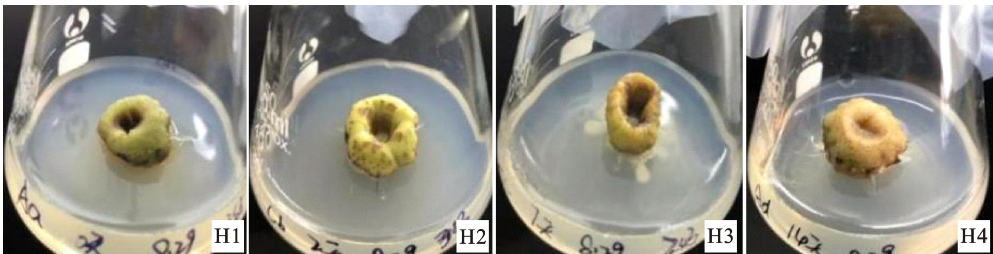


图 9 接种 14 d 时不同时间黑暗处理的外植体情况

Fig. 9 Dark treatment of explants at different time at 14 days after inoculation

接种后暗处理+低温处理对外植体褐变的影响:接种后暗处理+不同时间 4℃低温处理对外植体褐变的影响见表 5。结果表明,在黑暗条件下,所有经过 4℃低温处理的外植体在培养周期(28 d)内的褐变指数均呈现先增加后趋于稳定的变化趋势。暗处理+4℃ 0 d(Wa)和暗处理+4℃ 2 d(Wb)在培养 14 d 后褐变指数趋于稳定;暗处理+4℃ 4 d(Wc)在培养 21 d 后褐变指数趋于稳定;暗处理+4℃ 6 d(Wd)在培养 21 d 后褐

变指数不再变化。相同时间节点获得的数据表明,暗处理+4℃ 6 d(Wd)的褐变指数均低于其他处理,效果最好。接种 28 d 时发现,Wd 褐变指数比 Wa 低 31.25%,比 Wc 低 21.05%,比 Wb 低 18.42%。污染率数据表明,暗处理+4℃低温处理的时间越长,污染出现的时间越晚,所有处理在培养周期结束时(28 d)虽然全部污染,但污染未对外植体褐变程度产生影响。

表 5 接种后暗处理+4℃低温处理不同时间外植体褐变指数和污染率

Table 5 Browning index and contamination rate of explants dark treatment under +4℃ low temperature treatment time after inoculation

代号 Code	暗处理+4℃低温时间/d Dark treatment +4℃ low temperature time	接种后褐变指数/% Browning index after inoculation				接种后污染率/% Contamination rate after inoculation			
		7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Wa	0	83.75	98.75	98.75	100.00	65.00	100.00	100.00	100.00
Wb	2	65.79	81.58	81.58	81.58	84.21	100.00	100.00	100.00
Wc	4	52.63	76.32	78.95	78.95	42.11	94.74	100.00	100.00
Wd	6	46.25	61.25	66.25	68.75	0.00	75.00	100.00	100.00

研究发现,接种 6 d 时,外植体褐变情况以 Wa 褐变程度最严重,外植体几乎全部变褐,Wb 相比对照 Wa 褐变程度较轻,颜色较浅,Wc 和 Wd 的效果最好,褐变程度最浅,此时所有带芽茎段均未出芽(图 10);接种 28 d 时观察,Wa 处理

下的带芽茎段褐变死亡,幼芽始终处于萌发状态而不生长,Wb 和 Wc 处理下的外植体幼芽萌发生长,叶片呈现黄绿色,Wd 处理下的外植体幼芽萌发生长,并且叶片浓绿,展开正常,长势健壮(图 11)。

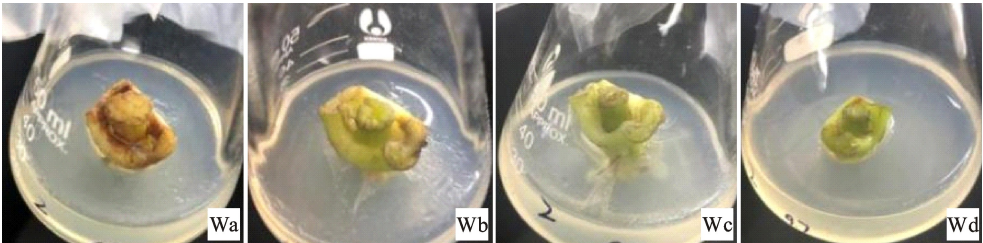


图 10 接种 6 d 时暗处理+4℃处理不同时间外植体褐变情况

Fig. 10 Browning situation of explants at 6 days after dark treatment of +4℃ low temperature at different time

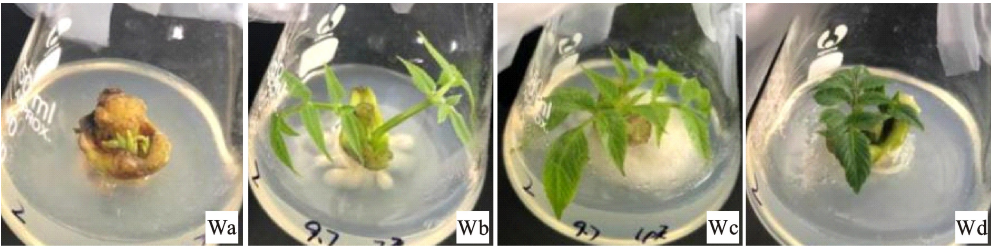


图 11 接种 28 d 时暗处理+4℃处理不同时间外植体褐变及幼芽长势

Fig. 11 Browning and bud growth of explants at 28 days after dark treatment of +4℃ low temperature at different time

3 讨论

褐变按其发生机理分为酶促褐变和非酶促褐变两大类^[11]。新鲜的植物组织受到损伤时多发生酶促褐变,即由于细胞膜结构破坏,组织中多酚氧化酶被激活,酚类化合物被氧化形成褐色的醌类物质,在酪氨酸酶作用下,与植物组织中的蛋白发生聚合,从而抑制很多代谢酶的活性,导致代谢紊乱,生长受阻,最终致使材料逐渐变褐死亡^[12]。引起酶促褐变的因素主要是氧、底物、酶等。本研究中,针对帝王大丽花枝条取材时切口严重褐化问题,比较枝条不同节位褐变程度的差异,探究枝条水插和低温预处理对褐变的影响,并对接种后的外植体进行黑暗和低温处理来减轻褐变的发生。

不同取材部位对外植体的褐变程度有着重要影响^[13]。程世平等^[14]研究不同取材类型对黄连木茎段褐化的影响时发现,外植体木质化程度与褐化程度以及腋芽的诱导发生密切相关,其中半木质化的茎段褐化率相对较低,幼嫩茎段褐变严重。本试验中也得出与上述一致的结论。帝王大丽花从枝条上端到下端木质化程度变化明显,取样时发现上端幼嫩部分比下部成熟部分褐变更严重。通过测定自上而下 5 个节位的 PPO 活性、PAL 活性和总酚含量,结合不同节位茎段切口的褐变程度,结果发现上端幼嫩部分 PPO 活性、PAL 活性和总酚含量明显高于下端老熟部分,这种变化趋势与枝条自上而下的褐变减轻相伴随,说明幼嫩组织中 PAL 活性较高,导致 PAL 诱导产生的酚类物质较多,而幼嫩组织中诱导酚类物质氧化形成醌类物质的关键酶 PPO 活性较高,从而导致醌类物质在幼嫩组织中的增加而出现组织褐变。随着取样部位从幼嫩到老熟的变化,木质化程度越高的老熟部位中 PAL 活性、PPO 活性和总酚物质含量的降低,因此褐变现象减轻。

外植体切割环境对帝王大丽花外植体的褐变程度有明显影响。王仁睿等^[15]将蝴蝶兰茎尖放在 1% 维生素 C 溶液切割,再接种到添加 0.2% PVP 的培养基上,防止蝴蝶兰茎尖褐化效果显著。本研究在培养周期结束后,相比于空气中切割外植体(A),无菌水中切割(B)和在 1% 的维生素 C 溶液中切割(C)对于减轻褐变都有效果,但以在 1% 的维生素 C 溶液中切割效果最好。B 处理比 A 处理效果略好,但仅比 A 降低 2.72%,原

因是在水中切割时减少了材料与空气之间的暴露时间,减少了酶促反应的发生^[16],但在接种时外植体不可避免地又会接触空气,所以效果并不理想;C 处理在接种到培养基 2 d 后,褐变指数能够基本保持稳定,原因考虑植物组织在遭到机械破坏时,其体内的多酚氧化酶会增多以保护自身,而维生素 C 并不能抑制多酚氧化酶活性^[17],因此在接种后褐变指数快速上升,但是维生素 C 具有还原性,能将褐变产生的有色物质邻二醌还原成无色物质邻二酚^[18],从而起到抑制褐变加剧的效果。

接种后进行暗处理能有效防止褐化现象的发生^[19]。余慧琳等^[20]研究表明,适当的暗培养有利于减轻外植体的褐变,当外植体暗培养 1 周后再转入光下正常培养,比接种后直接放在光下培养外植体发生褐变的程度要轻,并且发生褐变的时间会推迟。王宝宁等^[21]对春兰花梗外植体进行暗培养 10 d 后完全褐化率相对较低,但在培养后期完全褐化率比暗培养 5 d 快速升高,这与本试验暗处理的结果相似,即相对较长的暗培养时间有利于降低褐化率,其中以黑暗处理 7 d(H3)褐变指数最低;虽然暗处理 14 d 后(H4)的褐变指数和 H3 的相同,但 H4 茎段愈伤表现颜色比 H3 颜色深;在正常情况下,帝王大丽花外植体培养到第 2 天褐变指数就达到 82.50%,而通过黑暗处理,第 7 天后褐变指数才达到 83.33%,黑暗处理后褐化现象明显延迟,但随着时间增加褐化现象也随即产生,说明黑暗处理只是在短时间内抑制了褐化物质的产生。暗培养对外植体褐化起到了一定的抑制作用,可能是外植体在黑暗中减少了酚类物质的渗出,从而降低了褐变率^[22-23],因为在酚类化合物合成和氧化过程中,需要许多酶系统参与,其中一部分酶系统的活性是受光诱导的^[24],因此在前期暗培养时褐变会受到一定程度的抑制。

低温处理可在不同程度上降低植物材料的褐变率^[25]。张卫芳等^[26]将核桃茎尖接种到培养基后,置于 5℃ 冰箱中黑暗培养 7 d 后取出,置于 25℃ 无光照下培养,褐化率有所降低;李焕秀等^[27]将采集的苍溪梨外植体进行低温预处理对降低褐变有一定作用。本试验结果表明,无论是在取样后对帝王大丽花枝条进行低温处理,还是对接种后的外植体进行低温处理,均可明显降低褐变率,原因可能是低温抑制了酚类化合物的合

成,抑制了多酚氧化酶的活性,减少了酚类氧化,从而使褐变减轻^[28]。

本试验发现,取样时间、取样位置、外植体切割环境以及接种前后材料的低温和黑暗处理对帝王大丽花的褐变率均可产生不同影响,所采取的措施也一定程度上控制了褐变的发展,并获得了部分不褐变的瓶苗,但是,探索更加有效的防止褐变的措施组合仍然很有必要,而且不同因素对褐变的影响机理以及各因素间的交互影响仍有待深入研究。此外,试验获得的无菌瓶苗经过后期继代培养,并未再次出现褐变情况,其中原因尚待继续研究。

参考文献 Reference:

- [1] 包满珠. 花卉学[M]. 北京:中国农业出版社,2011:289.
BAO M ZH. Floriculture [M]. Beijing: China Agriculture Press,2011:289.
- [2] 任桂红,陈 杰,张芳芳,等. 大丽花组织培养及快繁技术研究[J]. 北华大学学报(自然科学版),2012,13(4):410-412.
REN G H, CHEN J, ZHANG F F, *et al.* On the technology of tissue culture and rapid propagation of *Dahlia pinnata* [J]. *Journal of Beihua University (Natural Science)*, 2012,13(4):410-412.
- [3] 曹明颜. 大丽花离体快繁和再生体系的建立[D]. 河北保定:河北农业大学,2012.
CAO M Y. Establishment of in vitro rapid micropropagation and regeneration system of *Dahlia pinnata* [D]. Baoding Hebei: Hebei Agricultural University, 2012.
- [4] 袁 震. 大丽花离体快繁技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2016.
YUAN ZH. Reseach of vitro propagation and regenration system of *Dahlia* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- [5] 田松青,袁茹优,韦庆华,等. 大丽花‘费罗加’组织培养和块根诱导[J]. 北方园艺,2020(7):79-85.
TIAN S Q, YUAN R Y, WEI Q H, *et al.* Tissue culture and root tuber induction of *Dahlia pinnata* ‘Filogo’ [J]. *Northern Horticulture*, 2020(7):79-85.
- [6] 杨 婷. 大丽花组织培养与脱毒技术研究[D]. 河北保定:河北农业大学,2014.
YANG T. Studies on tissue culture and virus-elimination technique of *Dahlia* [D]. Baoding Hebei: Hebei Agricultural University, 2014.
- [7] 朱玉芸. 酶促褐变对菊花品质的影响研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2018.
ZHU Y Y. Study on the effect of enzymatic browning on the quality of *Chrysanthemum* [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2018.
- [8] LIU Q, XI ZH M, GAO J M, *et al.* Effects of exogenous 24-epibrassinolide to control grey mould and maintain postharvest quality of table grapes [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016,51(5):1236-1243.
- [9] 申雨肖,姚晓芹,张世豪,等. 油菜素内酯对半夏品质及产量的影响[J]. 北方园艺,2021 (16):116-122.
SHEN Y X, YAO X Q, ZHANG SH H, *et al.* Influences of brassinolide on quality and yield of *Pinellia ternata* [J]. *Northern Horticulture*, 2021 (16):116-122.
- [10] 吴强盛. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2018:104-106.
WU Q SH. Experimental Instruction of Plant Physiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018:104-106.
- [11] 宁密密,张 群,刘 伟,等. 二氧化硫保鲜剂处理对‘阳光玫瑰’葡萄贮藏期褐变的影响[J]. 食品与发酵工业,2023, 49(8):75-83.
NING M M, ZHANG Q, LIU W, *et al.* Effect of SO₂ treatment on browning of ‘Sunshine Rose’ grape during storage [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(8):75-83.
- [12] HOLDERBAUM D F, GUERRA M P, KON T, *et al.* Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. [J]. *Horticultural Science*, 2010,45(8):1150-1154.
- [13] 周玉珍,张雨青. 金叶风箱果初代离体培养中影响外植体褐化的因素简报[J]. 植物生理学通讯,2001,37(2):122-123.
ZHOU Y ZH, ZHANG Y Q. Factors influencing the explant browning in preliminary culture in *vitro* of *Physocarpus opulifolius* ‘Lutein’ [J]. *Plant Physiology Journal*, 2001,37(2):122-123.
- [14] 程世平,施 江,史国安,等. 黄连木茎段组织培养中防褐化技术研究[J]. 河南农业科学,2010(8):110-113.
CHENG SH P, SHI J, SHI G A, *et al.* Study on preventing browning in stem tissue culture of *Pistacia chinensis* Bunge [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2010 (8):110-113.
- [15] 王仁睿,李明福,韩林波,等. 蝴蝶兰组织培养体系的建立及其关键技术研究[J]. 中国农学通报,2010,26(10):197-201.
WANG R R, LI M F, HAN L B, *et al.* Study on the tissue culture system and key technique of *Phalaenopsis amabilis* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(10):197-201.
- [16] XI Y K, ZENG B, HUANG H Y, *et al.* Resolving the browning during the establishment of the in *vitro* propagation of *Prunus avium* cv. ‘Fuchen’ [J]. *Horticultural Science*, 2022,49(1):1-9.
- [17] 李丽梅,冯云霄,程玉豆,等. 外源抗坏血酸对鲜榨梨汁褐变的影响[J]. 北方园艺,2018 (2):156-160.
LI L M, FENG Y X, CHENG Y D, *et al.* Effects of addition of ascorbic acid on browning of fresh pear juice [J]. *Northern Horticulture*, 2018 (2):156-160.

- [18] MAREE W R, MAGDALENA P, TONETTO D F S, *et al.* Seasonal variation in calcium and ascorbic acid content at harvest related to internal browning in 'Braeburn' apple during controlled atmosphere storage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 297: 110943. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.110943.
- [19] 邱璐, 陈善娜, 夏跃明, 等. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, 22(1): 78-80.
- QIU L, CHEN SH N, XIA Y M, *et al.* Study on the browning during tissue culture of *Morus alba* L[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2000, 22(1): 78-80.
- [20] 余慧琳, 王爱武, 赵辉, 等. 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(9): 192-195.
- YU H L, WANG A W, ZHAO H, *et al.* Study of rapid propagation axillary browning control about butterfly orchids stems in vitro[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(9): 192-195.
- [21] 王宝宁, 张显, 宋军阳. 秦岭野生春兰组织培养过程中的褐化控制研究[J]. 北方园艺, 2011(5): 169-172.
- WANG B N, ZHANG X, SONG J Y. Studies on browning of regenerated system of wild *Cymbidium goeringii* in Qinling[J]. *Northern Horticulture*, 2011(5): 169-172.
- [22] 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 plant tissue culture[J]. *Plant Physiology Journal*, 1999, 35(6): 501-506.
- [23] MITSUKURI K, MORI G, JOHKAN M, *et al.* Effects of explant position and dark treatment on bud formation in floret culture of *Ponerorchis graminifolia* Rehb. f[J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121(2): 243-247.
- [24] 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. Studies on browning control technology and its mechanism in tissue culture of *Anemone flaccida* Fr. Schmidt[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [25] WANG J W, ZHOU X, ZHOU Q, *et al.* Low temperature conditioning alleviates peel browning by modulating energy and lipid metabolisms of 'Nanguo' pears during shelf life after cold storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 131: 10-15.
- [26] 张卫芳, 高疆生, 欧勇慧, 等. 核桃组培中抑制褐化现象初探[J]. 中国农学通报, 2003, 19(5): 43-46.
- ZHANG W F, GAO J SH, OU Y H, *et al.* Primary study on browning control in tissue culture of pellicular walnut [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2003, 19(5): 43-46.
- [27] 李焕秀, 乔霓娇. 降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(6): 524-526.
- LI H X, QIAO N J. Approaches for reducing explant browning of 'Cangxili' pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in tissue culture[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, 23(6): 524-526.
- [28] WANG Q CH, TANG H R, QUAN Y, *et al.* Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured in vitro[J]. *Journal of Horticultural Science*, 2015, 69(5): 833-839.

Effects of Factors and Control Measures on Browning of Initial Explants in *Dahlia imperialis*

HAN Shengnan¹, WANG Lu¹, ZHANG Yingchan¹, LIANG Juan², NIU Shance^{1,3},
HAO Lihong¹, XIANG Diying¹, ZHENG Zhixing⁴ and CHEN Duanfen¹

(1. College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding Hebei 071001, China; 2. Shijiazhuang Botanical Garden, Shijiazhuang 050073, China; 3. State Key Laboratory of Crop Improvement and Regulation, Hebei Agricultural University, Baoding Hebei 071001, China; 4. Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

Abstract In this study, severe browning of initial explants in *Dahlia imperialis* during tissue culture was analyzed from four aspects: sampling position, air exposure time, water oxygen penetration, and temperature. The results showed that the activity of PPO and PAL and content of total phenol decreased with the decrease of sampling position of shoot initial explants in the whole plant, resulting in decreased browning. Browning was found to be more severe when sampling at longer air exposure time, higher water oxygen penetration, or higher temperature. The measures for inhibiting browning were further studied, including sampling under different environments, water insertion at different processing time, low temperature treatment before inoculation, and dark treatment and low temperature treatment after inoculation. Compared with normal cutting in air, explants cutting in 1.0% vitamin C solution reduced the browning rate by 4.08%. The browning rate of the inoculated explants pretreated with five days of water inserting and low temperature at 4 °C for five hours was 17.12% lower than that in blank control, and the germination and growth of explants were normal. Dark treatment for seven days and low temperature at 4 °C for six days resulted in a 31.25% reduction in browning rate compared to the control, with the explants germinating and growing normally with dark green leaves.

Key words *Dahlia imperialis*; Initial explants; Browning; Water inserting; Low temperature; Dark treatment

Received 2022-05-10 **Returned** 2022-05-24

Foundation item Key R&D Plan of Hebei Province (No. 20326814D).

First author HAN Shengnan, female, master student. Research area: ornamental horticulture cultivation and breeding. E-mail: 1403934059@qq.com

Corresponding author CHEN Duanfen, female, Ph. D, professor. Research area: ornamental horticulture germplasm innovation and utilization. E-mail: chenduanfen@163.com

(责任编辑:史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)