

## 不同有机添加物及柠檬酸钠组合对春兰根状茎增殖的影响

黄玮婷<sup>1</sup>, 曾丽婷<sup>1</sup>, 吴博文<sup>1</sup>, 方中明<sup>1,2\*</sup>

(1. 武汉生物工程学院应用生物技术研究中心, 武汉 430415; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

**摘要:** 通过添加不同浓度猕猴桃汁、香蕉汁、梨汁、苹果汁、白萝卜汁、胡萝卜汁、土豆汁、红薯汁等 8 种有机物及柠檬酸钠组合, 研究其对春兰根状茎增殖及抗褐化效果的影响。结果表明, 单独添加猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>、梨汁 100.0 g·L<sup>-1</sup> 或柠檬酸钠 1.0 g·L<sup>-1</sup> 比对照能显著促进根状茎增殖, 增殖中生长倍数分别为 3.9、2.4 和 2.2, 梨汁和猕猴桃汁处理中, 根状茎中细胞分裂相关基因 *CgCki*、*CgCKS*、*CgClins*、*CgE2F* 和 *CgRb* 表达量显著提高。1/2MS+NAA 5.0 mg·L<sup>-1</sup>+活性炭 1.0 g·L<sup>-1</sup>+猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+柠檬酸钠 1.0 g·L<sup>-1</sup> 组合对春兰根状茎增殖及抗褐化效果最好, 根状茎增殖的生长倍数为 4.2, 细胞分裂相关基因 *CgCDKS*、*CgCki*、*CgCKS*、*CgClins*、*CgE2F* 和 *CgRb* 表达显著提高。因此, 在春兰组培快繁过程中猕猴桃汁+柠檬酸钠组合可以有效地促进根状茎增殖, 并防止根状茎褐化。

**关键词:** 春兰; 根状茎; 增殖; 褐化

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-1112-07

### Effects of different organic additives and sodium citrate combination on rhizomes proliferation of *Cymbidium goeringii*

HUANG Weiting<sup>1</sup>, ZENG Liting<sup>1</sup>, WU Bowen<sup>1</sup>, FANG Zhongming<sup>1,2</sup>

(1. Center of Applied Biotechnology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415;

2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** Rhizomes of *Cymbidium goeringii* were treated with a variety of organic additives at different concentrations, including kiwifruit, banana, pear, apple, white radish, carrot, potato, sweet potato juice, and a combination with sodium citrate to assess the effects of these agents on rhizome proliferation. The results showed that the proliferation of *Cymbidium goeringii* rhizomes significantly increased when adding kiwifruit juice (100.0 g·L<sup>-1</sup>), or pear juice (100.0 g·L<sup>-1</sup>), or sodium citrate compared with the control and the growth rate reached to 3.9, 2.4 and 2.2, respectively. The expression of cell division related genes (*CgCki*, *CgCKS*, *CgClins*, *CgE2F* and *CgRb*) was significantly higher in kiwifruit juice and pear juice treatments compared with the control. The highest growth rate of the rhizome was 4.2 when cultured on 1/2 MS medium containing NAA 9.0 mg·L<sup>-1</sup>+activated charcoal 1.0 g·L<sup>-1</sup>+kiwifruit juice 100.0 g·L<sup>-1</sup>+sodium citrate 1.0 g·L<sup>-1</sup> with decreased browning and higher expression level of cell division related genes *CgCDKS*, *CgCki*, *CgCKS*, *CgClins*, *CgE2F* and *CgRb*. The results demonstrated that combination of kiwifruit juice+sodium citrate can effectively promote rhizome proliferation and prevent browning of the rhizome in micropropagation of *Cymbidium goeringii*.

**Key words:** *Cymbidium goeringii*; rhizome; proliferation; browning

春兰 (*Cymbidium goeringii*) 属于兰属 (*Cymbidium*) 中的地生种。春兰叶态飘逸、形态优美、花香馥郁、花色淡雅, 在兰科家族中是独特的种属<sup>[1-2]</sup>, 在中国兰属植物类群中资源丰富, 栽培

历史悠久<sup>[3]</sup>。春兰种子发育不完全, 常规条件极难萌发, 以往春兰靠分株进行繁殖, 但此法所需时间较长而且繁殖效率低, 不能大规模种植, 无法满足社会的需求<sup>[4]</sup>。在兰属植物组培过程中, 根状茎是

收稿日期: 2017-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(31301250), 湖北省教育厅科学技术研究项目(B2015392)和湖北省教育厅科学技术研究项目(B2017287) 共同资助。

作者简介: 黄玮婷, 讲师。E-mail: weitingpink@hotmail.com

通信作者: 方中明, 副教授。E-mail: zmfang@mail.hzau.edu.cn

国兰所特有的增殖阶段, 可由种子诱导出原球茎, 原球茎生长得到<sup>[5-6]</sup>。通过根状茎进行继代增殖, 是提高国兰快速繁殖的关键<sup>[3]</sup>。春兰根状茎增殖速度慢, 分化形成的苗少, 且培养过程中根状茎容易发生褐化或死亡, 限制了快速繁殖的进一步进行。所以, 探究春兰根状茎增殖培养的条件, 进一步对其进行调控和优化, 可以加快春兰快繁进程。

近年来, 对春兰根状茎增殖的探究已取得了一定进展, 如春兰根状茎培养适宜无机盐含量低的培养基如 1/2MS<sup>[7-8]</sup>, 激素一般使用生长素和细胞分裂素<sup>[9-10]</sup>, 有机添加物如香蕉<sup>[11]</sup>和椰汁<sup>[12-13]</sup>有利于春兰根状茎增殖。活性炭能有效防止春兰根状茎的褐化, 对根状茎增殖有促进作用<sup>[14]</sup>。固体培养基和光照培养有利于根状茎增殖<sup>[15]</sup>。在材料褐化控制方面, 柠檬酸等抗褐化剂能一定程度降低植物组织培养过程中的材料褐化。如龚晓洁<sup>[16]</sup>发现柠檬酸能减轻马铃薯的褐化率。方中明等<sup>[17]</sup>发现柠檬酸能够控制兰花珍珠矮根状茎培养中培养基的褐化, 并促进根状茎分化, 当柠檬酸浓度在 1.0 g·L<sup>-1</sup>时, PPO、POD 和 PAL 活性及总酚含量最低, SOD 和 CAT 活性提高, 根状茎的出芽数最高, 达到 4.48, 培养基未明显褐变。对于更多的添加物对春兰根状茎是否有促进作用, 目前报道较少。另外, 根状茎在生长的过程中伴随着细胞快速分裂。而细胞分裂相关的周期蛋白基因 (*cyclins*)、依赖周期蛋白激酶基因 (*cyclin-dependent kinase, CDKS*)、成视网膜细胞瘤蛋白 (*Retinoblastoma, Rb*)、Rb 结合蛋白基因 (*retinoblastoma-binding protein, E2F*) 和依赖周期蛋白激酶抑制基因 (*CDK inhibitor, CKi*) 等基因<sup>[18]</sup>均参与其中。

所以, 本研究以春兰根状茎为材料, 选择了猕猴桃汁、香蕉汁、梨汁、苹果汁、白萝卜汁、胡萝卜汁、土豆汁和红薯汁等 8 种有机添加物及与抗褐化剂柠檬酸钠组合对春兰根状茎增殖及抗褐化效果

的影响, 探讨了春兰根状茎增殖培养过程中细胞分裂相关基因表达量与根状茎增殖之间的相关联系, 以期为提高春兰根状茎快速繁殖的速度, 并控制材料褐化提供理论依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与方案设计

供试春兰 (*Cymbidium goeringii*) 为春兰野生型, 以其种子萌发后诱导的根状茎为材料。选取生长良好且一致的根状茎接种到各处理中。各个处理的基本培养基为 1/2MS+NAA 5.0 mg·L<sup>-1</sup>+活性炭 1.0 g·L<sup>-1</sup>, 在此基础上, 分别添加榨取的猕猴桃 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>)、香蕉 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>)、梨 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>)、苹果 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>)、白萝卜 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>)、胡萝卜 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>)、土豆 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>) 和红薯 (50.0、100.0、150.0 和 200.0 g·L<sup>-1</sup>) 等汁液, 以及柠檬酸钠 (0.5、1.0、2.0 和 5.0 g·L<sup>-1</sup>), 以不加上述有机添加物和柠檬酸钠的基本培养基为对照。在确定有机添加物或柠檬酸钠单独添加对根状茎增殖的效果后, 在上述基本培养基的基础上, 选取有机添加物最佳浓度、种类和柠檬酸钠进行组合, 进一步确定对根状茎增殖的影响。接种前每个处理根状茎为每瓶 0.5 g, 培养条件为温度 (25±1) °C、光照强度 2 000 lx、光照时间 16 h/8 h, 所有处理均培养 60 d 后观察, 并统计不同处理根状茎的重量和生长状态。每个处理接种 30 瓶, 实验重复 3 次, 根状茎增殖中的生长倍数=培养 60 d 后重量/接种前重量。各表中数据为平均值±标准差, 数据采用 SPSS 软件进行变量分析 (ANOVA), 以 Duncan's 在 0.05 水平上进行显著性差异分析, 不同组别间数据差异用小写字母表示。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因名称 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	扩增长度/bp Amplification length
<i>CgActin</i>	5'-AATCCCAAGGCAAACAGA-3'	5'-CCATyACCAGAATCCAG-3'	180
<i>CgCyclins</i>	5'-AAAGCCAGAAGTGGTCAT-3'	5'-AAGCACATAAGTTAGGGAGT-3'	122
<i>CgCDKS</i>	5'-CATTGCTTACTGCCATTC-3'	5'-TACACCCAAGTACCACA-3'	236
<i>CgE2F</i>	5'-TGGGTCTAATGACAATCC-3'	5'-GCTAATACAAGGCAGTTC-3'	286
<i>CgCKi</i>	5'-ACCTCAGTCTGCCGTTTC-3'	5'-TATGCTGCTCCTGTTGTT-3'	79
<i>CgCKs</i>	5'-CTCCAGAGGTTGCGAAGT-3'	5'-GTGGCTCAGGACGATGAA-3'	120
<i>CgRb</i>	5'-CACCTGCGAGGACATTTA-3'	5'-CGGGAGAAGGCTTTGACG-3'	171

## 1.2 细胞分裂相关基因相对表达量的分析

同时选择不同浓度有机添加物、柠檬酸钠单独处理和复合处理中根状茎增殖中生长倍数高、褐化率较低和生长状况良好的根状茎为材料,分析其中细胞分裂相关的 *CgCDKS*、*CgCki*、*CgCKS*、*CgClins*、*CgE2F* 和 *CgRb* 等 6 个基因的相对表达量,以不加上述有机添加物和柠檬酸钠为对照。实时荧光定量 PCR 的总 RNA 提取 Trizol、DNase I 酶、反转录试剂盒等为 TaKaRa 公司生产,购于大连宝生物公司。按 TaKaRa 公司的 cDNA 第一链合成试剂盒的方法合成 cDNA 第一链。反转录反应体系(20  $\mu\text{L}$ )为: 5 $\times$ RT Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、dNTP Mix 1  $\mu\text{L}$ 、oligo(dT)<sub>18</sub> 1  $\mu\text{L}$ 、反转录酶 MMLV 1  $\mu\text{L}$ 、RNA Inhibitor 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNA 量为 2  $\mu\text{g}$  (根据浓度计算体积),其余体积用无 RNase 的水补齐。根据 *CgCDKS* (cyclin-dependent kinase)、*CgCki* (CDK inhibitor)、*CgCKS* (CDK subunit)、*CgClins* (Cyclins)、*CgE2F* 和 *CgRb* (Retinoblastoma) 这 6 个基因在已有植物物种中均含有的一致保守氨基酸序列,然后找到相应的碱基序列,按照相对荧光定量 RT-PCR 引物设计原则,设计实时荧光定量 PCR 特异引物(表 1)。反应在 Invitrogen 公司 ABI7500 实时定量 PCR 仪上进行,方法参照全式金生物技术有限公司荧光定量试剂盒 TransStart Green qPCR SuperMix UDG 说明书。荧光定量 PCR 扩增体系为: cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、Forward Primer 0.4  $\mu\text{L}$ 、Reverse Primer 0.4  $\mu\text{L}$ 、2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix UDG 10  $\mu\text{L}$ ,加水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。扩增程序采用两步法: 50 $^{\circ}\text{C}$  UDG 孵育 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  10 min UDG 失活, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  复性 34 s,共 40 个循环,反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应 3 个重复,采用 ABI7500 分析软件中 Comparative CT ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ) 法分析结果。各图中数据为平均值 $\pm$ 标准差,数据采用 SPSS 软件进行变量分析(ANOVA),以 Duncan's 在 0.05 水平上进行显著性差异分析,与对照相比有显著性差异标为星号(\*)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同有机添加物对春兰根状茎增殖的影响

8 种不同种类有机添加物对根状茎增殖的影响结果见表 2。根状茎培养 60 d 后,其中 7 种有机添加物单独处理对春兰根状茎增殖均有一定的促进作用,增殖效果明显的依次为猕猴桃汁>香蕉汁>梨汁>苹果汁>胡萝卜汁>土豆汁>红薯汁,而白萝卜汁对根状茎增殖没有促进作用。由表 2 可知猕猴

桃汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时生长倍数最高,为 3.9,且此处理中根状茎状态为嫩绿色,生长快,褐化少(如图 1A—D)。其次是猕猴桃汁 150.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,生长倍数为 2.9;香蕉汁 50.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时生长倍数为 2.8,梨汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时生长倍数为 2.4;猕猴桃汁 200.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  增时值倍数为 2.4;梨汁 150.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时生长倍数为 2.4。以上处理根状茎均为嫩绿色,生长状态好。有些有机添加物浓度越高褐化现象越严重,以红薯汁 200.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  中根状茎褐化最为严重(如图 1-C)。以上表明,单独添加猕猴桃汁、香蕉汁和梨汁有利用春兰根状茎的增殖,并且使根状茎褐化程度减少。

### 2.2 不同柠檬酸钠浓度对春兰根状茎增殖的影响

比较了不同浓度柠檬酸钠对根状茎增殖的影响,结果见表 3。由表 3 可知,柠檬酸钠浓度为 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  处理时生长倍数最高,达到 2.2,生长倍数与低浓度或高浓度处理均达到显著差异,且此时根状茎状态为嫩绿色,生长快,褐化少。

### 2.3 不同有机添加物与柠檬酸钠组合对春兰根状茎增殖的影响

在确定有机添加物和柠檬酸钠单独添加对根状茎增殖的效果后,选取单独添加的有机添加物或柠檬酸钠处理最佳浓度为猕猴桃汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、梨汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、香蕉汁 50.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、和柠檬酸钠 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,将这些处理进行组合,进一步确定对根状茎增殖的综合影响,结果(表 4)表明,猕猴桃汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +柠檬酸钠 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  对根状茎增殖效果最好,培养 60 d 后生长倍数达到 4.2(图 1-E)。添加了柠檬酸钠 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的处理均无褐化现象,说明柠檬酸钠对控制褐化效果较好。而梨汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +猕猴桃汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,梨汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +猕猴桃汁 100.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +香蕉汁 50.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1-F) 这 2 个处理有褐化现象,且根状茎生长倍数较低,可能的原因是有机添加物浓度较高,影响了根状茎的正常生长。将增殖正常的根状茎茎段切成 1 cm 左右,接在含 1/2MS+TDZ 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +柠檬酸钠 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的分化培养基中,60 d 后根状茎可正常分化成芽,在 1/2MS+香蕉汁 50.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  壮苗生根培养基中 30 d 以上,可移栽到室外。

### 2.4 不同有机添加物与柠檬酸钠组合对春兰根状茎增加相关基因表达的影响

从图 2 可以看出,梨汁和猕猴桃汁单独处理的根状茎中,*CgCki*、*CgCKS*、*CgClins*、*CgE2F* 和 *CgRb* 基因的表达量显著高于对照,只有 *CgCDKS* 基因的表达低于对照,其中猕猴桃汁处理下 *CgCDKS* 基因的表达与对照无显著差异,梨汁处理下 *CgCDKS* 基因的表达显著低于对照。从图 3 可以看出,猕猴桃

表 2 不同有机添加物对春兰根状茎增殖的影响

Table 2 Effects of different organic additives on rhizome proliferation of *Cymbidium goeringii*

有机添加物/g·L <sup>-1</sup> Organic additives	生长倍数 Growth rate	根状茎褐化状况 Browning status of rhizome
对照 Control	1.7±0.3 <sup>ghijklm</sup>	褐化 Browning
梨汁 Pear juice 50.0	1.9±0.3 <sup>defg</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 100.0	2.4±0.2 <sup>c</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 150.0	2.4±0.1 <sup>c</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 200.0	2.2±0.1 <sup>cde</sup>	轻微褐化 Slight browning
土豆汁 Potato juice 50.0	1.8±0.3 <sup>ghijkl</sup>	无褐化 No browning
土豆汁 Potato juice 100.0	1.8±0.1 <sup>fghijkl</sup>	无褐化 No browning
土豆汁 Potato juice 150.0	1.9±0.3 <sup>defghi</sup>	无褐化 No browning
土豆汁 Potato juice 200.0	1.4±0.1 <sup>lmn</sup>	轻微褐化 Slight browning
苹果汁 Apple juice 50.0	1.5±0.5 <sup>ijklm</sup>	无褐化 No browning
苹果汁 Apple juice 100.0	2.0±0.1 <sup>defg</sup>	轻微褐化 Slight browning
苹果汁 Apple juice 150.0	1.8±0.2 <sup>fghijk</sup>	轻微褐化 Slight browning
苹果汁 Apple juice 200.0	1.1±0.1 <sup>n</sup>	严重褐化 Serious browning
香蕉汁 Banana juice 50.0	2.8±0.6 <sup>b</sup>	无褐化 No browning
香蕉汁 Banana juice 100.0	2.2±0.2 <sup>cd</sup>	无褐化 No browning
香蕉汁 Banana juice 150.0	1.9±0.2 <sup>defg</sup>	无褐化 No browning
香蕉汁 Banana juice 200.0	2.2±0.2 <sup>cd</sup>	轻微褐化 Slight browning
白萝卜汁 White rabish juice 50.0	1.5±0.1 <sup>hijklm</sup>	无褐化 No browning
白萝卜汁 White rabish juice 100.0	1.5±0.4 <sup>klmn</sup>	无褐化 No browning
白萝卜汁 White rabish juice 150.0	1.4±0.1 <sup>mn</sup>	无褐化 No browning
白萝卜汁 White rabish juice 200.0	1.4±0.2 <sup>mn</sup>	轻微褐化 Slight browning
胡萝卜汁 Carrot juice 50.0	1.8±0.3 <sup>efghij</sup>	无褐化 No browning
胡萝卜汁 Carrot juice 100.0	1.9±0.1 <sup>defgh</sup>	无褐化 No browning
胡萝卜汁 Carrot juice 150.0	1.4±0.1 <sup>klmn</sup>	轻微褐化 Slight browning
胡萝卜汁 Carrot juice 200.0	1.4±0.3 <sup>ijklmn</sup>	严重褐化 Serious browning
红薯汁 Sweet potato juice 50.0	1.7±0.1 <sup>ghijklm</sup>	无褐化 No browning
红薯汁 Sweet potato juice 100.0	1.8±0.1 <sup>efghij</sup>	无褐化 No browning
红薯汁 Sweet potato juice 150.0	1.5±0.1 <sup>ijklmn</sup>	褐化 Browning
红薯汁 Sweet potato juice 200.0	1.4±0.1 <sup>mn</sup>	严重褐化 Serious browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 50.0	2.1±0.1 <sup>cdef</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0	3.9±0.31 <sup>a</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 150.0	2.9±0.3 <sup>b</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 200.0	2.4±0.2 <sup>c</sup>	轻微褐化 Slight browning

注: 同一系列上的不同字母表示差异显著。下同。Note: Different letters indicate significant differences. The same below.

表 3 不同柠檬酸钠浓度对春兰根状茎增殖的影响

Table 3 Effects of different sodium citrate concentrations on rhizome proliferation of *Cymbidium goeringii*

柠檬酸钠/g·L <sup>-1</sup> Sodium citrate	生长倍数 Growth rate	根状茎褐化状况 Browning status of rhizome
0	1.8±0.1 <sup>b</sup>	褐化 Browning
0.5	1.8±0.1 <sup>b</sup>	无褐化 No browning
1.0	2.2±0.2 <sup>a</sup>	无褐化 No browning
2.0	1.8±0.1 <sup>b</sup>	无褐化 No browning
5.0	1.7±0.6 <sup>b</sup>	无褐化 No browning

汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+柠檬酸钠 1.0 g·L<sup>-1</sup>处理下细胞分裂相关基因 *CgCDKS*、*CgCki*、*CgCKS*、*CgClins*、*CgE2F* 和 *CgRb* 表达均比对照显著提高, 而梨汁 100.0

g·L<sup>-1</sup>+猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+香蕉汁 50.0 g·L<sup>-1</sup>处理下细胞分裂相关基因的表达也比对照明显增加, 但是不如猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+柠檬酸钠 1.0 g·L<sup>-1</sup>处理

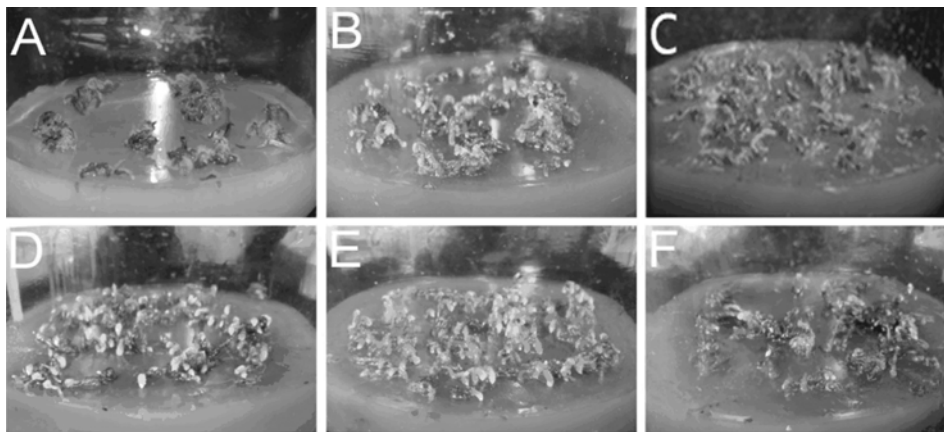
高。可见,适当浓度的猕猴桃汁与柠檬酸钠组合对春兰根状茎增殖及抗褐化效果最好,而有机添加物

浓度过高,根状茎增殖不会进一步增强,细胞分裂相关基因表达量也会下降。

表 4 不同有机添加物和柠檬酸钠组合对春兰根状茎增殖的影响

Table 4 Effects of combination of different organic additives and sodium citrate concentration on rhizome proliferation of *Cymbidium goeringii*

处理/g·L <sup>-1</sup> Treatment	生长倍数 Growth rate	根状茎褐化情况 Browning status of rhizome
对照 CK	1.8±0.2 <sup>ef</sup>	褐化 Browning
梨汁 Pear juice 100.0	2.4±0.2 <sup>d</sup>	无褐化 No browning
香蕉汁 Banana juice 50.0	2.2±0.2 <sup>de</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0	3.8±0.1 <sup>b</sup>	无褐化 No browning
柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0	2.1±0.1 <sup>de</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 100.0+香蕉汁 Banana juice 50.0	1.9±0.1 <sup>ef</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 100.0+猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0	1.9±0.2 <sup>ef</sup>	轻微褐化 Slight browning
梨汁 Pear juice 100.0+柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0	2.0±0.2 <sup>e</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 100.0+香蕉汁 Banana juice 50.0	2.0±0.2 <sup>e</sup>	无褐化 No browning
柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0+香蕉汁 Banana juice 50.0	2.8±0.1 <sup>c</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0+柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0	4.2±0.2 <sup>a</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 100.0+猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0+香蕉汁 Banana juice 50.0	1.6±0.2 <sup>g</sup>	褐化 Browning
梨汁 Pear juice 100.0+柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0+香蕉汁 Banana juice 50.0	2.0±0.1 <sup>e</sup>	无褐化 No browning
梨汁 Pear juice 100.0+猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0+柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0	2.0±0.1 <sup>e</sup>	无褐化 No browning
猕猴桃汁 Kiwifruit juice 100.0+柠檬酸钠 Sodium citrate 1.0+香蕉汁 Banana juice 50.0	2.0±0.1 <sup>e</sup>	无褐化 No browning



A.对照处理的根状茎, B.梨汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>处理的根状茎, C.红薯汁 200.0 g·L<sup>-1</sup>处理的根状茎, D.猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>处理的根状茎, E.猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+柠檬酸钠 1.0 g·L<sup>-1</sup>处理的根状茎, F.梨汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+猕猴桃汁 100.0 g·L<sup>-1</sup>+香蕉汁 50.0 g·L<sup>-1</sup>处理的根状茎

A. Rhizomes of the control, B. Rhizomes treated with pear juice 100.0 g·L<sup>-1</sup>, C. Rhizomes treated with sweet potato juice 200.0 g·L<sup>-1</sup>, D. Rhizomes treated with kiwifruit juice 100.0 g·L<sup>-1</sup>, E. Rhizomes treated with kiwifruit juice 100.0 g·L<sup>-1</sup>+ sodium citrate 1.0 g·L<sup>-1</sup>, F. Rhizomes treated with pear juice 100.0 g·L<sup>-1</sup>+ kiwifruit juice 100.0 g·L<sup>-1</sup>+ banana juice 50.0 g·L<sup>-1</sup>

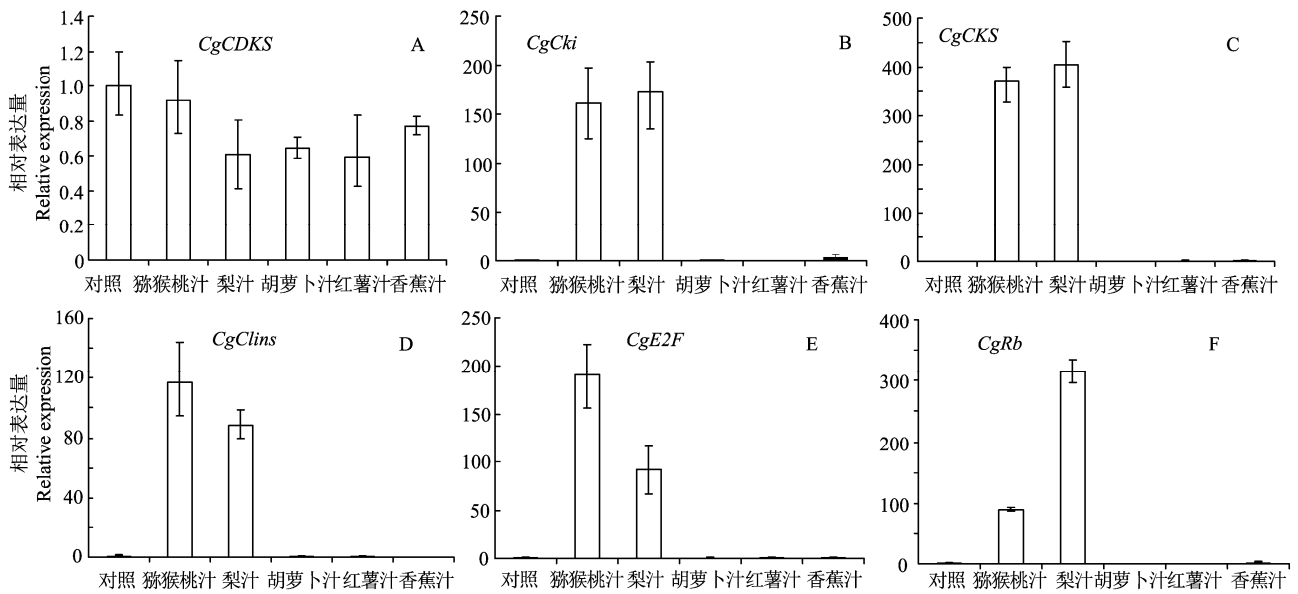
图 1 春兰根状茎在不同处理下增殖效果

Figure 1 Effects of different treatments on rhizomes proliferation of *Cymbidium goeringii*

### 3 讨论

国兰组织培养过程中常用的培养基有 KC、VW、White 和 MS 等,具体选用哪种培养基较为适宜与其品种有关<sup>[19]</sup>。有研究表明,对于墨兰、蕙兰来说培养基要求含量较高的无机盐,对于春兰则含量较低的无机盐更适于其生长<sup>[20-21]</sup>。孔凡龙等<sup>[10]</sup>研

究发现 6-BA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 5.0 mg·L<sup>-1</sup>对春兰根状茎增殖效果较好,孙芳等<sup>[8]</sup>研究发现 6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 5.0 mg·L<sup>-1</sup>对春兰根状茎增殖效果较好等基本一致。所以,在本试验中选用了 1/2MS 培养基,在此基础上添加了激素 NAA 5.0 mg·L<sup>-1</sup>作为探究春兰根状茎增殖的基本培养基。

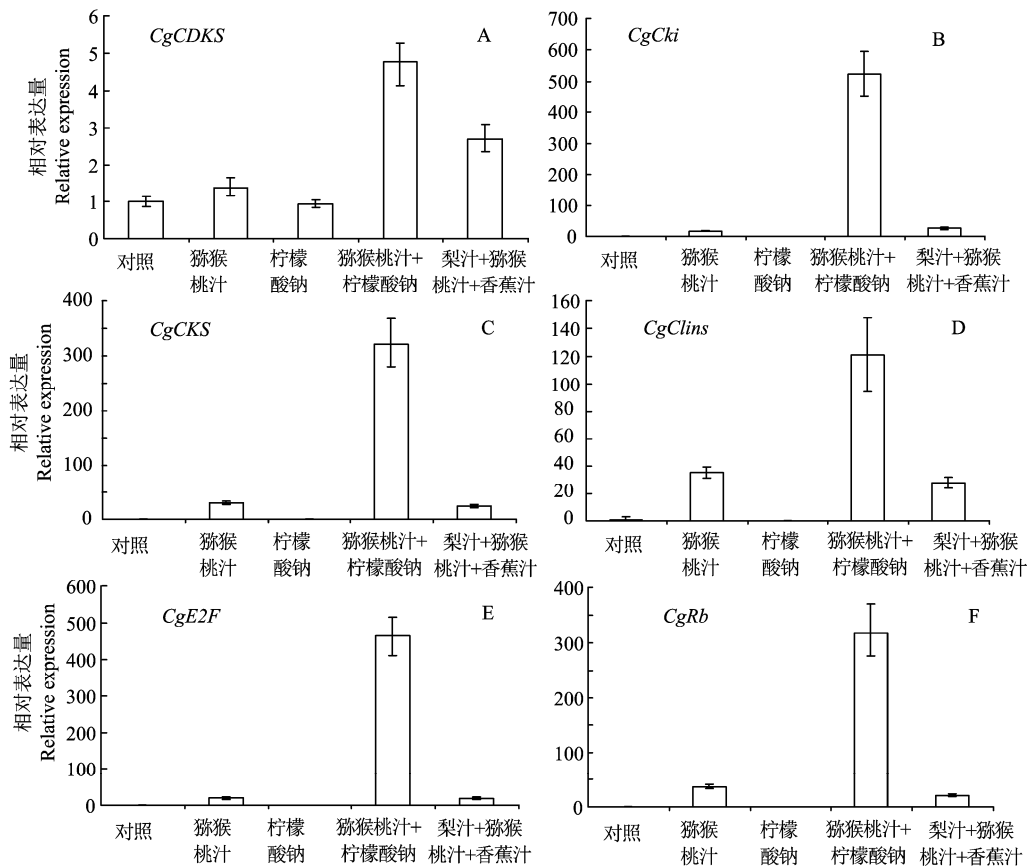


处理中猕猴桃汁、梨汁、胡萝卜汁、红薯汁和香蕉汁浓度均为  $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 相对表达量以对照为 1

The concentrations of kiwifruit juice, pear juice, carrot juice, sweet potato juice and banana juice were  $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, The relative expression was one for the control

图 2 有机添加物单独处理对春兰根状茎中细胞分裂相关基因表达的影响

Figure 2 Effects of organic additives on gene expression of cell division related genes in rhizomes of *Cymbidium goeringii*



处理中梨汁、猕猴桃汁浓度分别为  $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 柠檬酸钠浓度为  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香蕉汁浓度为  $50.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 相对表达量以对照为 1

The concentrations of pear juice and kiwifruit juice were  $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; the concentration of sodium citrate was  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; the concentrations of banana juice was  $50.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , The relative expression was one for the control

图 3 有机添加物和柠檬酸钠组合处理对春兰根状茎中细胞分裂相关基因表达的影响

Figure 3 Effects of combination of different organic additives and sodium citrate concentration on the expression of cell division related genes in rhizomes of *Cymbidium goeringii*

通过系统探究 8 种有机添加物对春兰根状茎增殖的影响,发现猕猴桃汁、梨汁和香蕉汁单独添加时都能有效促进春兰根状茎的增殖,且猕猴桃汁和梨汁中细胞分裂相关基因表达升高。这可能是有机添加物含有植物生长调节物质,如维生素 C、氨基酸和酶等,能明显地促进细胞和组织的增殖。王丰妍等<sup>[22]</sup>研究发现香蕉汁对杂交兰原球茎的增殖有极好的促进作用,周全和余平<sup>[9]</sup>与孔凡龙等<sup>[10]</sup>研究发现香蕉有利于春兰根状茎的增殖。胡燕梅等<sup>[23]</sup>研究表明香蕉汁有利于大花蕙兰类原球茎的增殖,而本研究中香蕉汁在一定浓度下能够促进根状茎增殖,但是生长倍数并没有达到最高。另有报道表明,高浓度的土豆汁  $200.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  能够促进兰花品种铁皮石斛类原球茎的增殖,且添加土豆汁  $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  还有利于铁皮石斛小苗生根<sup>[24]</sup>,而在春兰根状茎增殖中,土豆汁并不适合作为有机添加物使用。可见,不同兰花品种在快繁中有机添加物种类对其培养影响很大。本研究发现了猕猴桃汁在 8 种有机添加物中更有利用春兰根状茎增殖,其次是梨汁,目前暂未有相关报道,可用于国兰根状茎快繁的生产中应用。

单独添加柠檬酸钠时  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  能较大抑制春兰根状茎增殖过程中的褐化现象,这可能是由于柠檬酸类物质增强了醌类化合物还原剂或抑制了多酚氧化酶的活性有关<sup>[25]</sup>。有报道表明,2%的柠檬酸处理板栗 10 min,能够控制板栗的褐化,有利于板栗的保鲜<sup>[26]</sup>。柠檬酸能够使葡萄愈伤组织褐化率显著下降<sup>[27]</sup>,但本实验中柠檬酸钠单独处理中细胞分裂相关基因表达并未上升,所以柠檬酸钠可以作为抗褐化剂使用,但是对组培中细胞增殖和分裂没有较大促进作用,不适合根状茎培养中单独作为添加剂使用。而猕猴桃汁  $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +柠檬酸钠  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  组合可以有效地促进根状茎增殖,并防止根状茎褐化,根状茎培养 60 d 生长倍数达到 4.2,细胞分裂相关基因 *CgCDKS*、*CgCki*、*CgCKS*、*CgClins*、*CgE2F* 和 *CgRb* 表达均显著提高。所以,在春兰根状茎增殖培养中可以作为推荐成分,从而加速国兰快速繁殖的进程。

## 参考文献:

- [1] SHIMASAKI K, UEMOTO S. Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs[J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1990, 22(3): 237-244.
- [2] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京:金盾出版社, 1994: 34-39.
- [3] 潘瑞焱, 叶庆生. 国兰生理[M]. 北京:科学出版社, 2006, 18.
- [4] 罗毅波. 国兰产业化发展中的几个问题[J]. 中国西部科技, 2006,(15): 14-17.
- [5] DUAN J Y, XIE Y H. Germination of seeds of *Cymbidium goeringii* and the effect of hormones on the differentiation of the rhizomes[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1983, 5(2): 197-200.
- [6] SHIMASAKI K, UEMOTO S. Rhizome induction of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures in vitro[J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1991, 25(1): 49-52.
- [7] 褚云霞, 张永春, 靖相密, 等. 春兰根状茎增殖与分化培养[J]. 上海农业学报, 2007, 23(3): 82-85.
- [8] 孙芳, 李承秀, 张林, 等. 春兰名品杂交后代快繁与分化研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(10): 189-193.
- [9] 周全, 余平. 春兰根状茎的增殖与分化条件优化[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(1): 27-30.
- [10] 孔凡龙, 贾玉芳, 柴明良, 等. 春兰离体根状茎生长和分化的研究[J]. 核农学报, 2009, 23(2): 253-255.
- [11] 于永畅, 张林, 王厚新, 等. 影响春兰杂交兰‘宋梅’×‘集圆’组培苗生根的因素[J]. 北方园艺, 2013(7): 66-68.
- [12] 宋丽莎, 邓伟, 黎骄凌, 等. 黔南野生春兰原球茎增殖培养影响因子的优化[J]. 种子, 2012, 31(9): 106-108.
- [13] 孙玉芬, 宁惠娟, 张韶伊, 等. 春兰与大花蕙兰杂交后代根状茎增殖与分化条件[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(1): 156-161.
- [14] 石兰蓉, 彭靖茹, 黎萍. 春兰根状茎离体培养的研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 51-53.
- [15] 陈锵. 春兰根状茎增殖与诱芽技术研究[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(7): 33-35.
- [16] 龚晓洁. 几种防褐剂对马铃薯愈伤组织培养褐化现象的抑制效应[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10410-10412.
- [17] 方中明, 黄玮婷, 吴坤林, 等. 柠檬酸抑制珍珠矮根状茎分化及其褐变机制研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2012, 44(4): 105-108.
- [18] 潘刚, 周永明. 植物细胞周期相关基因的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(2): 191-196.
- [19] 徐程, 詹忠根, 张铭. 中国兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 171-174.
- [20] 张菊野, 俞玲凤, 连宏坤. 几种影响春兰原球茎生长和分化的因素[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(3): 175-178.
- [21] 石乐娟, 张放, 张士良, 等. 植物生长调节剂对线艺春兰根状茎的增殖与分化的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 887-889.
- [22] 王丰妍, 李承秀, 王长宪, 等. 大花蕙兰与春剑杂交原球茎增殖及分化研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 327-330.
- [23] 胡燕梅, 郭云贵, 方中明. 5 种天然有机物对大花蕙兰类原球茎增殖与分化的影响[J]. 江苏科技大学学报(自然科学版), 2016, 30(4): 384-389.
- [24] 方中明, 白根祥, 曾祺森, 等. 天然添加物对铁皮石斛类原球茎增殖、分化及生根的影响[J]. 北方园艺, 2015(21): 107-110.
- [25] 王冬云, 王建亚, 蔡珩, 等. 蝴蝶兰组培不定芽增殖条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 856-858.
- [26] 方中明, 白根祥, 殷家俊, 等. 3 种化学保鲜剂对板栗储藏和营养品质的影响[J]. 广东农业科学, 2015, 42(10): 89-93.
- [27] 饶慧云, 邵祖超, 柳海宁, 等. 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[J]. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1322-1330.