

# 大花蕙兰腋芽增殖体系的建立

陈芝华, 胡启灿, 夏朝水, 程天杰 (三明市农科所生物组培中心, 福建三明 365509)

**摘要** [目的] 建立大花蕙兰腋芽增殖体系。[方法] 以大花蕙兰的嫩芽为试材, 研究大花蕙兰腋芽增殖的最佳条件。[结果] 结果表明, 腋芽增殖的最佳培养基为 B5 + 6-BA 3.0 ~ 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + AD 2.0 mg/L + YE 100.0 mg/L; 生根阶段培养基为 1/2MS + 2.0 g/L AC + 0.3 mg/L NAA 生根效果好, 生根率为 90%, 根数 3 ~ 4 条, 6-BA 添加与否影响不大。[结论] 该试验通过腋芽增殖模式, 遗传稳定性较高。

**关键词** 大花蕙兰; 腋芽; 增殖体系

中图分类号 S682.31 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)35-15360-01

## Establishment of Axillary Buds Regeneration System of *Cymbidium hybridum*

CHEN Zhi-Hua et al (Sanming Institute of Agricultural Science, Sanming, Fujian 365509)

**Abstract** [Objective] The purpose was to establish regeneration system of *Cymbidium hybridum* axillary buds. [Method] With axillary buds of *Cymbidium hybridum* as experimental materials, the optimal conditions of *Cymbidium hybridum* axillary buds regeneration were researched. [Result] The results indicated that the optimum medium of *Cymbidium hybridum* axillary buds regeneration was B5 + 6-BA 3.0 ~ 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + AD 2.0 mg/L + YE 100.0 mg/L. Radication medium adding 2.0 g/L AC and 0.3 mg/L NAA would get well effect, radication rate was 90% and root number reached 3 ~ 4 items; whether adding 6-BA had not effect on radication rate. [Conclusion] This experiment used axillary buds regeneration model, which have higher genetic stability.

**Key words** *Cymbidium hybridum*; Axillary buds; Regeneration system

大花蕙兰是一种具有很高观赏价值的气生兰, 花大, 花型丰满, 色泽鲜艳, 花茎直立, 深受各国人民喜爱。每年春节前后开花, 花期持久, 在我国有极大的发展前景。因此, 笔者研究建立了大花蕙兰腋芽增殖体系, 为大花蕙兰的组培研究提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)的嫩芽。

### 1.2 方法

1.2.1 培养基。①启动培养基: B5 + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.4 mg/L。②增殖阶段培养基。B5 + 6-BA 3.0 ~ 4.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + AD 2.0 mg/L + YE 100.0 mg/L。③生根培养基。1/2 MS + NAA 0.3 mg/L + AC 2.0 g/L。

以上培养基均附加 3.0% 蔗糖, 0.6% 琼脂; pH 值为 5.4 ~ 5.6; 培养温度 (25 ± 2) °C, 光照强度 1 500 lx, 光照时间

12 h/d。

1.2.2 材料的无菌处理。将外界采来的大花蕙兰嫩芽, 用 70% 酒精表面擦拭并适当削去老组织, 只留 1 ~ 2 cm 幼嫩小芽, 再以 0.1% 升汞消毒 15 min, 最后用无菌水冲洗 5 ~ 6 次。接种到启动培养基中。

1.2.3 接种材料的生长。接种到启动培养基上的材料经 2 ~ 3 周开始冒小芽。待小苗长到 3 ~ 4 cm 时, 得到了供试验用的无菌试管苗, 材料的复幼工作完成之后可以除去老组织转接于增殖培养基。

## 2 结果与分析

2.1 腋芽增殖 试管苗前期增殖速度很慢, 需要一定的激素积累与驯化过程。经过 3 ~ 4 次转接试管苗增殖可达 2 ~ 3 倍(图 1, 2), 增殖阶段添加有机物有利于小苗粗壮成长, 可缩短培养周期, 以此提高增殖倍数。继代周期一般为 50 d 左右。



图 1 增殖瓶苗

Fig. 1 Test-tube seedlings proliferation

2.2 生根培养 生根阶段培养基中添加活性炭对生根很有好处。生根效果明显优于不加活性炭的培养基, 添加 2.0 g/L 效果好。6-BA 添加与否影响不大, 可不加。NAA 0.3 mg/L 效果好。3 个星期左右开始生根, 生根率为 90%, 根数 3 ~ 4 条(图 3)。

2.3 炼苗与移栽 将培养瓶置于温棚中炼苗 2 周后, 从培

养瓶中取出生根苗, 洗净附着的培养基, 在 1 000 倍多菌灵溶液中浸泡一下, 取出用水苔包裹根部, 种植于小盆中。1 个月后移栽, 成活率 80% 以上。

## 3 小结

目前国内外对于大花蕙兰的组培研究比较多。大多通过原球茎途径获得<sup>[1-2]</sup>, 也有报道通过高频丛芽途径<sup>[3]</sup>, 但都是在外植体切口处诱导原球茎或分化小芽丛, 遗传稳定性还未知。该试验通过腋芽增殖模式, 遗传稳定性较高。相关

作者简介 陈芝华(1980-), 男, 浙江苍南人, 研究实习员, 从事植物组织培养的研究。

收稿日期 2008-10-13

(下转第 15366 页)

基因作为一种新型的分子探针,正广泛地用于基因的表达与分布研究<sup>[9-10]</sup>。国外学者 Aizawa H 早在 1997 年将 *Dictyostelium* 的 cofilin 蛋白与 GFP 融合,观察 cofilin 在 *Dictyostelium* 中的定位,并证实过表达的 cofilin 能诱导肌动蛋白丝形成束状结构<sup>[11]</sup>。Ono S 等构建了鸡的 cofilin 蛋白的真核表达载体,转染 C2C12 细胞后,利用免疫荧光检测到 cofilin 在 C2C12 细胞中的表达,发现过量表达的 cofilin 弥散在细胞质中,并在一定的特异性诱导(如 DMSO、热激等)下细胞质中的肌动蛋白丝成为束状结构并断裂为棒状<sup>[12]</sup>。

猪 *CFL2b* 基因是笔者克隆的与猪肉品质性状相关的一个猪的新基因,它编码 166 个氨基酸的蛋白质,是 ADF/cofilin 家族的一种肌动蛋白结合蛋白。*CFL2b* 主要在不同肌肉的发育晚期表达,可能对于肌肉的生理或发育起到重要作用<sup>[13-14]</sup>。了解 *CFL2b* 基因在成肌细胞中的表达与定位,将有助于猪 *CFL2b* 基因功能的深入研究。笔者用 RT-PCR 技术将猪 *CFL2b* 基因通过基因重组技术置于 GFP 的上游,与 GFP 基因内实行框架内融合,重组质粒 pEGFP-N1-CFL2b 的构建及在 C2C12 细胞中的高效表达,为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 宋慧娟,曾瑞霞,赵微,等.猪 *CFL2b* 基因部分序列的克隆及组织表达谱分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2008,24(5):452-456.
- [2] NAGAOKA R, KUSANO K, ABE H, et al. Effects of cofilin on actin filamentous structures in cultured muscle cells intracellular regulation of cofilin action [J]. Cell Science, 1995, 108: 581-593.
- [3] ROSOCHACKI S J, MATEJEZYK M. Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology [J]. Acta Microbiol Pol, 2002, 51: 205-216.
- [4] DARADALHON V, NORAZ N, POLLOK K, et al. Green fluorescent protein as a selectable marker of fibronectin-facilitated retroviral gene transfer in primary human T lymphocytes [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10: 5-14.
- [5] 李朝军, 吕品, 张东才. 采用 GFP 标记技术研究钙调蛋白在活细胞中与细胞周期相关的分布 [J]. 中国科学 (C 辑), 1999, 29: 491-502.

- [6] HU T H, BEI L, QIAN Z M, et al. W-7 primes or inhibits the Fmlp-stimulated respiratory burst in human neutrophils by concentration-dependent dual expression of the formylpeptide receptor on cell surface [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1496: 243-251.
- [7] TANG L X, ZHANG Y, QIAN Z M, et al. The mechanism of Fe<sup>2+</sup>-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical [J]. Biochemical J, 2000, 352: 27-36.
- [8] QIAN Z M, SHEN X. Brain iron transport and neurodegeneration [J]. Trends in Molecular Medicine, 2001, 7: 103-108.
- [9] CORMACK B P, VALDIVIA R H, FALKOW S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) [J]. Gene, 1996, 173: 33-38.
- [10] ZHAO J, ZHOU Q, WIEDMER T. Palmitoylation of phospholipid scramblase is required for normal function in promoting Ca<sup>2+</sup>-activated transbilayer movement of membrane phospholipids [J]. Biochemistry, 1998, 37: 6361-6366.
- [11] AIZAWA H, FUKUI Y, YAHARA I. Live dynamics of Dictyostelium cofilin suggests a role in remodeling actin latticework into bundles [J]. J Cell Sci, 1997, 110(19): 2333-2344.
- [12] ONO S, ABE H, OBINATA T. Stimulus-dependent disorganization of actin filaments induced by overexpression of cofilin in C2 myoblasts [J]. Cell Struct Funct, 1996, 21(6): 491-499.
- [13] OBINATA T, NAGAOKA-YASUDA R, ONO S, et al. Low molecular-weight G-actin binding proteins involved in the regulation of actin assembly during myofibrillogenesis [J]. Cell Struct Funct, 1997, 22(1): 181-189.
- [14] 赵微, 苏玉虹, 巴彩凤, 等. cofilin 蛋白功能及活性调节 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(9): 706-710.
- [15] 武迪迪, 张杰, 具英花, 等. p21-EGFP 融合基因表达载体与卵母细胞的表达定位 [J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32(1): 5-8.
- [16] LI Y, LI J, LU C R, et al. The construction and identification of eukaryotic expression vector pEGFP-N1-hTERT [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 50-54, 91.
- [17] 纪新玲, 陈苏民, 陈南春, 等. 成纤维细胞中 hEra-EGFP 融合蛋白的表达定位 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(18): 1653-1655.
- [18] ZHANG W H, GUO H, WANG W L, et al. Designing primers for H5 and H7 subtypes of avian influenza virus and multiplex RT-PCR amplification [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 15-17.
- [19] 张新秀, 何守志, 郭维维, 等. PEDF-GFP 基因转染大鼠视网膜的实验研究 [J]. 眼科新进展, 2006, 26(4): 265-267.

(上接第 15360 页)

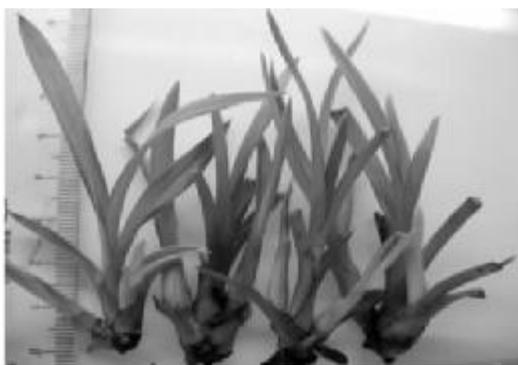


图 2 增殖小苗

Fig. 2 Small seedling proliferation

同类增殖方式未见报道。

#### 参考文献

- [1] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1995: 170-177.
- [2] 韩学颖, 徐艇, 周际, 等. 大花蕙兰组培快繁与生根培养的研究 [J]. 北方园艺, 2007(5): 203-204.
- [3] 张晨晨, 余家平, 蒋琳, 等. 大花蕙兰高频再生体系的研究 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(6): 1101-1104.
- [4] 张红. 大花蕙兰一步成苗组培快繁技术研究 [J]. 江苏农业科学, 2008(1): 121-122.



图 3 生根小苗

Fig. 3 Rooting of small seedling

- [5] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its *in vitro* rooting technique [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 47-49, 62.
- [6] 魏琴, 曾顺洪, 王丽, 等. 大花蕙兰原球茎一步成苗快速繁殖研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11392-11393.
- [7] LIU H M, LINGHU K Y, FANG X B. The study on induction and proliferation of tube bulbs in *Lilium brownii* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 18-20, 53.
- [8] 薛艳霞, 张慧英, 张耀华, 等. 大花蕙兰的快速繁殖 [J]. 北方园艺, 2007(4): 218-219.