

## EFFECT OF EGF ON GENE EXPRESSION PROFILE OF HUMAN FIBROBLASTS

MA Hong ZHANG Zong Yu TONG Tan Jun

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Health Science Center, Peking University 100083)

### ABSTRACT

A better understanding of the molecular effects of EGF on target cell can help to reveal important aspects of cellular proliferation, transformation and apoptosis, as well as embryonic and fetal development. In this study, we have examined differences in gene expression of cultured fibroblasts with EGF stimulation for 48 hours by using high-density cDNA microarrays. We found that EGF cause widespread alteration in gene expression. 855 genes, more than 40% of the assayed, showed changed expression, which are involved in various cellular process, such as, energetic metabolism, biosynthesis, the progress of cell cycle, and the signaling pathways of receptor tyrosine kinase (RTKs) and G protein-coupled receptors (GPCRs). The most striking finding is that long-term EGF treatment on cultured fibroblasts desensitize GPCRs to their physiological and nonphysiological stimuli by down-regulation of GPCRs and their associated proteins, which seems to be the slow-acting but permanent effect of EGF on GPCR signalling pathways.

**Key words:** EGF Fibroblasts cDNA array Gene expression profile G protein-coupled receptor

## 非洲菊组培快繁技术的优化

倪丹 杨世湖\* 徐士清 万建民

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室 江苏省植物基因工程研究中心 南京 210095)

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus and *Gerbera hybrid* Horf),又名扶郎花、灯盏花,原产南非,其花色艳丽,花茎高挺,只要温度适宜,四季都可开花,是世界六大切花之一,也是我国重要的商品切花。非洲菊虽是多年生,但长期栽培会退化而影响到切花的经济价值,因而生产上需定期更新。由于分株繁殖系数低等原因,国内外非洲菊的种苗生产均已采用组织培养技术<sup>[1]</sup>。随着切花生产的发展,如何更加高效率低成本地生产优质种苗已成为当前非洲菊科研和生产中的重要课题<sup>[2-8]</sup>。本文报道对非洲菊组培快繁进行材料和培养条件的优化研究结果,以提高非洲菊的种苗生产效率。

### 材料与amp;方法

#### 1. 材料

原初种苗为商品试管苗,购自上海花卉公司。参试材料为二年生切花生产大田母株,由灌南县农业局花卉基地移至南京农业大学盆栽,共6个品系,其商品名及花色分别为:浪儿(品系1),粉红花瓣、黄色花芯;西施(品系2),粉红花瓣、黑色花芯;红轮(品系3),花瓣、花芯全黑色;红海(品系4),火红花瓣、黑色花芯;瑞扣(品系5),洋红花瓣、黑色花芯和

黄莺(品系6),亮黄色花瓣、黄色花芯。

#### 2. 灭菌及接种程序

外植体经洗衣粉溶液和自来水洗涤干净后,用75%酒精浸泡60秒,蒸馏水洗3次。随后,在超净台内,用市售84消毒液配制20%~40%溶液并加2滴吐温20,浸泡30分钟,每隔10分钟搅动1次,倒掉溶液后直接将外植体放灭菌纸上吸干余液接种,无菌水冲洗与否不影响培养效果。此法操作简单,安全,本实验室已用于各种植物外植体表面灭菌,其效果与昇汞相当。

幼芽选0.5cm大小的芽尖。花托选尚未张口的幼蕾剥去花苞片,横向切去小花后将花托纵切成每块0.5cm×0.3cm左右。花梗、花苞片切成0.5cm长。再分化阶段将愈伤块切成0.5cm×0.5cm为一个接种单位,每处理8个接种单位。增殖阶段以单苗(芽)接种,每处理10苗。生根培养将苗丛分成单苗进行。所有试验重复4次以上。除特别注明的差别试验之外,数据为各个品系的总和。

#### 3. 培养基及培养条件

基本培养基为MS,用食用白砂糖、普通琼脂条和自来水配制,pH5.8。诱导愈伤组织、再分化和小苗增殖培养基

本文2002年1月18日收到,7月18日接受。

\*联系人。

中,蔗糖和琼脂均为3%和0.6%,生根培养基中为1.5%和0.5%。培养温度25-28℃,日光灯照明12h/d,光照度1850lx。每3-4周继代一次。出瓶小苗假植的水培液每升含300mg KNO<sub>3</sub>, 240mg Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 130mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60mg NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 100倍N6培养基铁盐母液5ml, pH6.8, 自来水配制, 无需灭菌。

## 结果与讨论

### 1. 愈伤组织形成和直接成苗

植物激素组合试验表明:在4周之内,包括花苞片在内的各种外植体在合适的培养基上都能顺利地诱导出愈伤组织,但只有芽尖和花托可在4周内长出芽或无根小苗。

芽尖通常在接种后1周开始生长,2周后就能出现愈伤组织和白、绿色的点状物,在BA浓度6mg·L<sup>-1</sup>和10mg·L<sup>-1</sup>的培养基上4周内每芽尖都能成苗1-4株,最快的2周就能直接长出小苗。其中以1/2MS+BA10.0+NAA0.2培养基诱导效果最好(表1),植株叶大色深,基部愈伤组织呈黄绿色

并生长较快。在BA 3mg·L<sup>-1</sup>及以下的低浓度激素培养基上,芽尖能长出愈伤组织而不能直接成苗,且有BA浓度越低愈伤生长越慢的趋势。试验结果还表明,参试各品系芽尖的4周成苗率无明显差异。

如表2所示,非洲菊花托的起始培养也需要高浓度的BA,也以1/2MS+BA10.0+NAA0.2培养基的诱导效果最好。在此培养基上,通常1周时花托切块就明显膨大,接种时未除尽的小花逐渐开放并枯死,2周时在花托基部出现少量浅绿色点状物和少量的愈伤组织。4周时,花托边缘一般都有直接长出来的深绿色的芽,基部的愈伤组织也达3-5mm大小,少数愈伤组织上已出现浅绿色的芽丛,这种在高浓度BA培养基上诱导出的愈伤组织具有很好的芽再分化能力,在随后的培养中出苗好。在低浓度BA培养基上花托切块的直接出苗率低、愈伤组织生长量也小。在BA2.0+KT2.0+NAA0.2培养基上花托外植体块有褐化甚至死亡的倾向。可见非洲菊花托的起始培养必需在培养基中添加高浓度的外源激素BA。相同浓度KT与BA的比较试验表明,KT的效果远不如BA。

表1 非洲菊芽尖在不同培养基上的直接出苗

培养基	接种数	2周		4周	
		长苗块数	频率(%)	长苗块数	频率(%)
1/2MS+BA10.0+NAA0.2*	32	7	21.8±0.96	10	31±0.58
MS+BA6.0+NAA0.2	32	0	0	3	9.4±0.5
MS+BA3.0+NAA0.2	32	0	0	0	0
MS+BA2.0+NAA0.2	32	0	0	0	0
MS+BA2.0+KT2.0+NAA0.2	32	0	0	0	0

\* 激素单位为 mg·L<sup>-1</sup>。

表2 非洲菊不同品系的花托的4周成芽率(各处理的接种总数均为32个接种单位)

培养基	1/2MS+BA10+NAA0.2*		MS+BA6+NAA0.2		MS+BA2+KT2+NAA0.2		MS+BA3+NAA0.2		MS+BA2+NAA0.2	
	品系	有芽块数	出芽率(%)	有芽块数	出芽率(%)	有芽块数	出芽率(%)	有芽块数	出芽率(%)	有芽块数
1	21	65.7	4	12.5	2	6.3	0	0	0	0
2	10	31.0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	23	71.9	6	18.7	4	12.5	0	0	0	0
4	14	43.8	0	0	0	0	0	0	0	0
5	7	21.8	0	0	0	0	0	0	0	0
6	20	62.5	2	6.3	3	9.4	0	0	0	0

\* 激素单位为 mg·L<sup>-1</sup>。

试验结果表明,不同花色非洲菊品系花托的4周直接成芽率差异很大,虽然在BA10mg·L<sup>-1</sup>的诱导培养基上,参试6个不同品系的花托均能直接成芽,但品系间成苗率的差异可高达3倍以上。此前,已有从非洲菊花托愈伤组织诱导成芽时不同花色间有差异的报道<sup>[3]</sup>,但没有从不同花色花托外植体四周直接成

芽率差异的报道。当BA浓度降低时,花托外植体四周直接出芽率就大幅度降低,那些在BA10mg·L<sup>-1</sup>条件下出芽率较低的品系在4周内不能从花托上长出新苗。这表明,非洲菊基因型对花托外植体的初始离体培养响应有明显的差异,而且培养响应差的品系对培养基中激素浓度变化非常敏感。

由于非洲菊在旺盛生长时的芽状物有相当比例已经分化为幼花蕾,芽尖外植体取材的成功率不高。芽尖体积小且剥离和切割均较费工,从单个芽尖长出的愈伤组织或芽的数量远少于单个花托,4周成苗率也远比花托低。因而,从快繁时效率综合考虑,花托应是当前非洲菊组培快繁的最佳材料。

## 2. 芽的再分化及小苗增殖

在起始培养基上4周后,将小苗、愈伤及其邻近绿色组织一起从外植体上割下,将小苗和愈伤块分别转接到新鲜培养基上进行小苗增殖和芽、苗的再分化。结果表明花托愈伤组织的成苗率最高,是幼芽愈伤组织的成苗率的2倍左右。但在本文试验条件下,从愈伤组织再分化植株和小苗增殖阶段,参试各品系(花色)之间都没有明显差异。

试验中还发现,由较幼嫩花蕾的苞片切块诱导出的愈伤组织,部分能再分化出小苗,这表明花蕾的苞片也具有植株再生能力。因目前尚未见类似报道,其在非洲菊组培快繁上的潜在价值有待进一步的系统研究。

由叶片和花梗诱导的愈伤组织的形态与花托愈伤组织明显不同,呈墨绿色增生状,几无球状结构,经多次不同培养基继代未出现芽的再分化。

花托愈伤组织在不同培养基上出苗率的比较试验表明(表3),花托起始培养时效果最好的1/2MS+BA10+NAA0.2培养基并不适于小苗再分化,花托愈伤组织的4周出苗率仅21%。效果最好的是MS+BA3.0+NAA0.2,在此培养基上4周,97%的花托愈伤块均可出苗,每块愈伤组织平均得苗7株,而且苗壮、叶色油绿,愈伤块生长也快。在参试的其他培养基上,出苗率低,愈伤组织生长慢并易褐变和死亡。由此可见,在此阶段,BA 3 mg·L<sup>-1</sup>最适于花托愈伤出苗,这与前人报道不同<sup>[1-3,8]</sup>,在本试验中,BA浓度过高和过低以及用KT代替BA都会大大降低芽的再分化率。

表3 非洲菊花托愈伤组织在不同培养基上出苗(每处理均为32个接种单位)

处 理	2周		4周			
	有苗块数	出苗率	苗数/块	有苗块数	出苗率	苗数/块
1/2MS+BA10+NAA0.2*	3	9.4	2.3	7	21	2.5
MS+BA3+NAA0.2	19	59.4	4	31	97	7
MS+BA2+NAA0.2	3	9.4	1.6	3	9.4	1.6
MS+BA2+KT2+NAA0.2	15	47	2.8	17	53	4.9
MS+KT10+IAA0.5	0	0	0	0	0	0
MS+KT2+IAA0.5	0	0	0	0	0	0

\* 激素单位为 mg·L<sup>-1</sup>。

小苗增殖的比较试验结果表明,培养基MS+BA3.0+NAA0.2也是小苗增殖的最适培养基(表4),在此培养基上不仅增殖倍数最高而且小苗叶片较细长,株型整齐一致,苗、芽基部还常有具植株再生能力的黄绿色愈伤组织。在本试验中,此培养基上非洲菊小苗3周平均可增殖10倍以上;在稀植条件下,4周最高增殖率曾达到过40倍。

与花托起始培养阶段不同,小苗增殖时,前2周是芽、苗增殖最快的时期,此后芽丛迅速长高变壮,而总苗数却趋向于稳定。虽然统计值以4周增殖率为最高,但通常也总比2周时增加20%左右。所以从生产效率综合考虑,每一增殖周期以3周为宜,此时小苗多为4叶1芯、株高2cm左右,不仅分单株容易、损失小、接种后增殖快,而且基部所带的愈伤组织在转至新鲜培养基上仍能保持较高的植株再分化能力。为便于生根培养时的分株操作,最后一个增殖周期可延长1-2周,使植株稍高、稍老。

与前人报道<sup>[1,2,8]</sup>不同的是,在本试验中,以KT为主激素的培养基的增殖效果都不及以BA为主激素的培养基。在高浓度KT(10mg·L<sup>-1</sup>)时仅3cm±的苗能较好增殖,2cm以下小苗及芽容易变褐、变僵和死亡,超过3cm的大苗又极易长根、长大而很少增殖;低浓度KT(2mg·L<sup>-1</sup>)时,接种的小苗几乎不增殖而迅速长大、生根成为完整的大苗。在BA2、KT2 mg·L<sup>-1</sup>的培养基上,虽然小苗型态正常,整齐一致,但增殖倍数还不到最适培养基的一半。

表4 非洲菊小苗在不同培养基上的2周增殖倍数

培养基	接种小苗数	2周苗数	增殖倍数	长根苗数
MS+KT10+IAA0.5*	48	221	4.6±0.8	6
MS+KT2+IAA0.5	48	62	1.3±0.6	11
MS+BA3+NAA0.2	48	511	10.6±0.6	0
MS+BA3+NAA0.1	48	380	8±0.8	0
MS+BA2+NAA0.2	48	288	6±1.0	0
MS+BA2+KT2+NAA0.2	48	194	4±0.4	0

\* 激素单位为 mg·L<sup>-1</sup>。

## 3. 生根

将增殖培养基上的苗丛分成单株转移到生根培养基上1周即可见植株明显长壮并有个别单株开始出现白色根状突起,但此时不同培养基之间还无明显差异。10天后,根陆续长出、伸长,不同激素和浓度诱导长根的差异逐渐明显。经比较,非洲菊小苗生根以1/2MS+IAA1.0效果最佳,单株根数多而整齐,根白色,植株健壮,出瓶后发根快、易成活。在其它培养基上,非洲菊小苗基部容易产生愈伤组织或从愈伤组织上长根,有些还会只长1、2条绿色易

碎的根而叶片快速长大, 出瓶后不易成活。以 IAA 为根诱导激素时, 1/2MS 培养基的效果都比全量 MS 好(表 5)。

表 5 非洲菊小苗在不同培养基上的 3 周生根率

培养基	接种 单株数	平均 每株根数	平均根长 mm	生根率 %
MS+IAA0.5*	100	2.6±0.03	18±0.7	90
MS+IAA1	100	3.1±0.03	26±0.4	98
MS+NAA0.05	100	1.9±0.4	17.5±0.2	85
1/2MS	100	1.4±0.1	15.6±0.3	80
1/2MS+IAA0.5	100	3.8±0.03	24.7±0.4	95
1/2MS+IAA1	100	7.3±0.3	30.6±0.5	99
1/2MS+IAA1.2	100	5.9±0.02	30.1±0.9	98
1/2MS+NAA0.05	100	1.9±0.03	26.8±0.4	85

\* 激素单位为  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 4. 假植和定植

直接将试管苗移到土壤或以土壤为主的混合基质中假植, 缓苗时间常达 1 周以上, 管理费工, 还容易死苗。生根培养结束后, 先把培养瓶移放室温 2 天再开瓶取苗洗净培养基, 在苗盘内用蛭石等软基质假植并浇水培液, 通常农膜覆盖保湿 3 天左右就能成活。假植时应使苗心露出, 每日浇水培液 1 次, 去膜后还应视气温每日适量补水。用软基质假植时不易伤根, 养分全面的水培液又为小苗从以蔗糖为养份的异养态到自养态的过渡提供了有利条件, 成活率很容易达到 100%。通常假植 10 天后, 即可见有白根从苗盘底孔钻出, 2-3 周后起苗。此时小苗根系已很发达, 定植到大田可 100% 成活。由于水培液浓度低、用量少、缓苗周期短, 不仅成本极低, 也减少了管理人工, 适于在非洲菊种苗生产上应用。

## 摘 要

6 个品系非洲菊的快繁技术优化试验结果表明, 花托是最好的外植体, 其起始培养需要高浓度的 6-BA, 基因型对其离体培养响应有明显影响。经优化的花托快繁条件为: 起始 4 周, 1/2MS + BA10 + NAA0.2 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下同); 愈伤组织出苗 4 周、小苗增殖 3 周, MS + BA3.0 + NAA0.2; 生根 3 周, 1/2MS + IAA1.0。花托的 4 周直接成芽率 71%, 花托愈伤组织的 4 周成芽率 97%, 小苗增殖倍数 10 倍以上, 生根率 99%, 平均每苗 7.4 条根、根长 30mm。

关键词: 非洲菊 组织培养 快速增殖

## 参 考 文 献

- [1] 黄济明、倪跃元、林满红, 1987, 园艺学报, 14(2): 125 - 128.
- [2] 李启任、王云强、夏从龙, 1998, 云南大学学报生物学专刊, 20: 560 - 563.
- [3] 鲁雪华、郭文杰、林勇, 1999, 植物生理学通讯, 35(5): 372 - 374.
- [4] Tosca, T., Arcara, L., Frangi, P. 1999, *Plant cell, tissue and organ culture*, 59(1): 77 - 80.
- [5] Orlikowska, T., Nowak, E., Marasek, A. et al., 1999, *Plant cell, tissue and organ culture*, 59(2): 95 - 102.
- [6] 郑秀芳、李名扬, 2001, 西南农业大学学报, 23(2): 171 - 173.
- [7] 徐立、李克烈、李志英等, 2000, 热带农业科学, 2: 26 - 27.
- [8] 黄衡宇、李鹏、杨胜辉, 2001, 吉首大学学报, 22(3): 4 - 6.

## OPTIMIZING FOR TISSUE CULTURE AND IN VITRO MULTIPLICATION TECHNIQUE OF GERBERA

NI Dan YANG Shi Hu XU Shi Qing WAN Jian Ming

(National Key Laboratory for Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

### ABSTRACT

Six *Gerbera* lines were used for experiments. Floral receptacle was the best explant and high concentration of BA was necessary for culture initiation but genotype evidently affected their culture response. Optimized requirements for in vitro multiplication of floral receptacle were: 1/2MS + BA10 + NAA0.2 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in 4 weeks for initiation; MS + BA3.0 + NAA0.2 in 4 weeks for shoot inducing from calli and in 3 weeks for plantlet multiplication; 1/2MS + IAA1.0 in 3 weeks for root formation. Rate of shoot formatted directly from initiation culture of floral receptacle in 4 weeks was 71%. Rate of shoot formatted in 4 weeks from callus of floral receptacle was 97%. Multiplication period of plantlets was 3 weeks and its multiplication times were over 10. Rooting rate was 99%, root numbers per plantlet and root length per root were 7.4 and 30mm separately.

Key words: *Gerbera* Tissue culture in vitro multiplication