

正交设计在欧洲菘蓝组织培养中的应用

张菊红,谢 好,汪承刚,黄邦全

(湖北大学 生命科学学院,湖北 武汉 430062)

摘 要:以欧洲菘蓝下胚轴和子叶为外植体,应用正交设计方法,对愈伤组织的诱导和分化培养基进行了优化筛选.分析结果表明,6-BA 和 2,4-D 的交互作用对下胚轴愈伤组织的诱导有显著影响,结合直观分析确定下胚轴的愈伤组织最佳诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹(后同)+2,4-D 0.5;6-BA 和 NAA 的交互作用对子叶愈伤组织诱导有极显著影响,结合直观分析确定子叶最佳诱导培养基为 MS+6-BA 0.5+NAA 0.2.在不同培养基对欧洲菘蓝愈伤组织分化能力的影响试验中,各种因子在所试浓度范围内的作用均不显著,有待进一步试验.根据直观分析我们认为 MS+6-BA 2+NAA 1 诱导的愈伤组织更有利于分化.不定芽在转移到 MS+NAA 0.5 一个月后 80% 以上都能长出很好的根系.生根后的组培苗经过 3 天炼苗后移栽至花盆后 80% 以上可以存活.

关键词:欧洲菘蓝;正交设计;愈伤组织;植株再生

中图分类号:Q813 **文献标志码:**A

在植物组织细胞培养工作中,培养基的组成具有十分重要的作用.选择培养基最佳组成时,除了可以参考和借鉴以前的工作经验外,往往要依靠大量实验进行筛选,费时费力而且筛选出来的组合常常不能代表最佳组合.正交设计法可用最少的处理组合数研究较多的试验因素,已在农业研究中广泛应用.本实验以欧洲菘蓝(*Isatis tinctoria*)的下胚轴和子叶为外植体,采用正交设计法,对其下胚轴、子叶愈伤组织的诱导培养基进行了优化筛选.欧洲菘蓝为十字花科菘蓝属植物,原产欧洲,我国有引种栽培.其根叶供药用,功效同菘蓝(*Isatis indigotica*)^[1].与菘蓝相比,欧洲菘蓝受病虫害较轻,因此可以在国内广泛推广,并可通过基因工程手段改良其某些农艺性状,而进行基因工程的一个先决条件就是建立高效的组培体系,为此我们进行了本文的研究.

1 材料与方 法

1.1 材料 欧洲菘蓝种子由德国 IPK Genebank 提供.

1.2 培养方法 应用正交试验筛选诱导愈伤组织的适宜激素配比.依据 3 种因子和每一因子的 4 种状态选用 L₁₆(4³) 正交表,并考虑其中两组交互作用(表 1).按照正交设计配制好各种培养基.欧洲菘蓝种子经 70% 酒精浸泡 30~60 s 后 0.15% HgCl₂ 消毒 20 min,无菌水洗 3~5 次,接种于 MS 基本培养基上,25℃ 下培养 4 d,光照强度为 2 000 lx,光周期为 16 h·d⁻¹.4 d 后切下子叶和下胚轴接种于正交设计培养基上(激素浓度组合见表 2).25 d 后统计愈伤组织诱导结果并将愈伤组织转入 MS+6-BA 2(mg·L⁻¹,后同)+NAA 0.3 诱导分化,一个月后统计分化结果.不定芽在 MS+NAA 0.5 上生根以后移栽至花盆中.

1.3 数据处理 愈伤组织诱导率(出愈率)=(诱导出愈伤组织外植体数/接种的外植体总数)×100%.

表 1 正交试验表头设计

列号	1	2	3	4	5
因子	A	B	C	A×B	A×C

试验结果的统计分析参考李春喜等^[2].分析软件为正交设计助手

愈伤分化率 = (有芽形成的愈伤组织块数/愈伤组织总块数) × 100 %.

2 结果与方法

2.1 愈伤组织的诱导及分化

2.1.1 正交试验结果的直观分析 从表 2 可以看出,将 6-BA 的浓度从 0 提高到 0.5 mg·L⁻¹可以提高下胚轴的愈伤组织平均诱导频率,进一步提高 6-BA 浓度则会降低下胚轴的愈伤组织平均诱导频率;NAA 浓度为 1 mg·L⁻¹时下胚轴的愈伤组织平均诱导频率最高,达到 50.61 %;将 2,4-D 的浓度从 0 提高到 0.5 mg·L⁻¹可以提高下胚轴的愈伤组织平均诱导频率,进一步提高 2,4-D 浓度则会降低下胚轴的愈伤组织平均诱导频率.6-BA 的浓度为 0.5 mg·L⁻¹时子叶的愈伤组织诱导最高;将 NAA 浓度从 0 提高到 0.5 mg·L⁻¹可以提高子叶愈伤组织平均诱导频率,进一步提高 NAA 浓度则会降低子叶的愈伤组织平均诱导频率;提高 2,4-D 浓度则会降低子叶的愈伤组织平均诱导频率.在一定范围内提高 6-BA 的浓度可以提高愈伤组织的分化能力(0~1 mg·L⁻¹);NAA 为 1 mg·L⁻¹的时候愈伤组织分化能力最强;提高 2,4-D 的浓度会降低愈伤组织的分化能力.极差分析表明,对下胚轴愈伤组织的诱导效应,依次是 6-BA × 2,4-D > 2,4-D > NAA > 6-BA × NAA > 6-BA;对子叶愈伤组织的诱导效应,依次是 6-BA × NAA > 2,4-D > 6-BA × 2,4-D > 6-BA > NAA;对愈伤组织分化能力的影响,依次则是 6-BA > NAA > 6-BA × 2,4-D > 2,4-D > 6-BA × NAA.

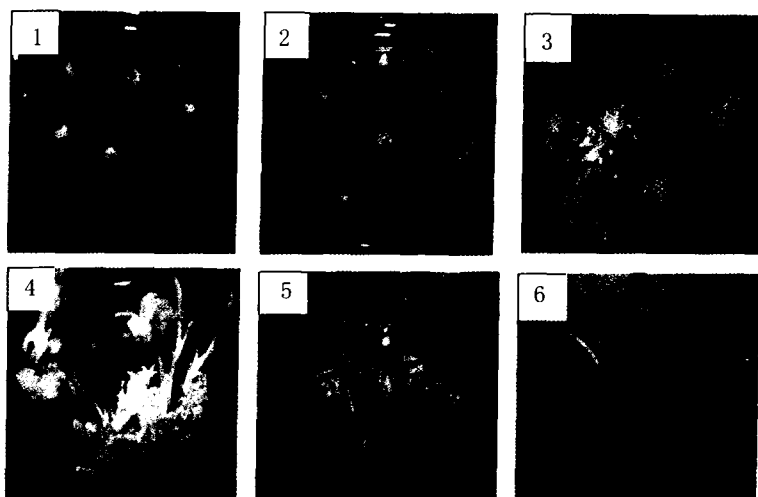
表 2 正交实验结果

培养基 编号	A(6-BA)/ (mg·L ⁻¹)	B(NAA)/ (mg·L ⁻¹)	C(2,4-D)/ (mg·L ⁻¹)	A × B	A × C	下胚轴愈伤组织 诱导率/%	子叶愈伤组 织诱导率/%	愈伤组织 分化率/%
1	1(0)	1(0)	1(0)	1	1	0.00	0	0.00
2	1(0)	1(0.2)	1(0.5)	2	2	50.00	28.57	0.00
3	1(0)	1(0.5)	1(1)	3	3	0.00	14.29	0.00
4	1(0)	1(1)	1(2)	4	4	80.00	21.43	0.00
5	2(0.5)	2(0)	2(0.5)	3	4	100.00	0.00	7.69
6	2(0.5)	2(0.2)	2(0)	4	3	12.50	100.00	20.00
7	2(0.5)	2(0.5)	2(2)	1	2	66.67	0.00	27.27
8	2(0.5)	2(1)	2(1)	2	1	25.00	33.33	4.00
9	3(1)	3(0)	3(1)	4	2	66.67	81.82	37.5
10	3(1)	3(0.2)	3(2)	3	1	9.09	18.18	20.00
11	3(1)	3(0.5)	3(0)	2	4	63.64	20.00	40.00
12	3(1)	3(1)	3(0.5)	1	3	30.77	0.00	25.00
13	4(2)	4(0)	4(2)	2	3	0.00	0.00	0.00
14	4(2)	4(0.2)	4(1)	1	4	0.00	0.00	0.00
15	4(2)	4(0.5)	4(0.5)	4	1	50.00	86.36	50.00
16	4(2)	4(1)	4(0)	3	2	66.67	40.00	50.00
下胚轴愈伤	K ₁	32.500	41.668	35.703	24.360	21.023		
	K ₂	51.043	17.898	57.693	34.660	62.502		
	K ₃	42.543	45.078	22.918	43.940	10.817		
	K ₄	29.168	50.610	38.940	52.293	60.910		
	R	21.875	32.712	34.775	27.933	51.685		
子叶愈伤	K ₁	16.072	20.455	40.000	0.000	34.468		
	K ₂	33.332	36.688	28.733	20.475	37.597		
	K ₃	30.000	30.163	32.360	18.117	28.572		
	K ₄	31.590	23.690	9.902	72.403	10.357		
	R	17.260	16.233	30.098	72.403	27.240		
愈伤分化	K ₁	0.000	11.297	27.500	13.067	18.500		
	K ₂	14.740	10.000	20.672	11.000	28.692		
	K ₃	30.625	29.317	10.375	19.422	11.250		
	K ₄	25.000	19.750	11.817	26.875	11.922		
	R	30.625	19.317	17.125	15.875	17.442		

2.1.2 正交实验结果的方差分析 在方差分析中,如果误差项只选取一项,即自由度为3时,各项因素的 F 值均不显著,这是由于实验误差自由度太小,达到显著的临界 F 值过大所致.为解决这个问题,我们均适当增加了试验误差的自由度(把 F 值偏小的各项自由度和平方和与误差项的自由度和平方和合并),这样可以减少试验误差方差,提高假设检验的灵敏度.方差分析结果表明,6-BA 和 2,4-D 的交互作用对下胚轴愈伤组织的诱导有显著影响 ($F_{A \times C} = 5.886$, $F_{0.05} = 4.760$).又由直观分析中各实验因子的平均数可以看出 6-BA 取第二水平,2,4-D 取第二水平时为好.所以,当 6-BA 为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-D 也为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,下胚轴诱导频率最高.实验结果也证明上述培养基诱导下胚轴愈伤组织效果的确很好(版图 1);6-BA 和 NAA 的交互作用对子叶愈伤组织诱导有极显著影响 ($F_{A \times B} = 11.077$, $F_{0.01} = 6.990$),结合直观分析也可以

看出 6-BA, NAA 分别取第二水平时诱导效果最好,结合实验结果确定子叶最佳诱导培养基为 MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.2 (版图 2).在不同培养基对愈伤组织分化能力的影响试验中,各种因子在所试浓度范围内的作用均不显著,有待进一步试验.根据直观分析我们认为 MS + 6-BA 2 + NAA 1 诱导的愈伤组织更有利于分化(版图 3、4).

2.2 植株的生根 不定芽在转移到 MS + NAA 0.5 一个月后 80% 以上都能长出很好的根系.生根后的组培苗经过 3 d 炼苗后移栽至花盆后 80% 以上可以存活(版图 5、6).



版图 1. 下胚轴诱导出的愈伤组织 2. 子叶诱导出的愈伤组织 3. 愈伤组织再生出芽 4. 愈伤组织再生出芽 5. 不定芽诱导生根 6. 不定芽诱导生根

3 讨论

菘蓝属约有 30 种,分布在中欧、地中海地区、西亚及中亚,我国产 6 种和 1 变种^[1].我国以往的研究主要集中于菘蓝(*I. indigotica*). Song 等发现欧洲菘蓝能够降低肺部脓肿^[3]. Danz 等发现欧洲菘蓝叶片提取液中的 tryptanthrin 能够显著抑制环加氧酶活性从而抑制前列腺素的合成^[4].另外他们(2002)还发现 tryptanthrin 能够抑制脂加氧酶的活性^[5]. Maugard 等发现欧洲菘蓝幼叶中含有一种新的靛红——靛红 C (*isatan C*)^[6]. 日本学者 Naoya 提出欧洲菘蓝中存在的靛红为单胺氧化酶(MAO)的抑制剂,可增加小鼠尿及脑中的去甲肾上腺素(NE)和 5-羟色胺(5-HT)的浓度,喂食靛红 2 h 后的小鼠纹状体的乙酰胆碱(Ach)和多巴胺(DA)的水平也显著增加.作者认为靛红具有广谱生物活性,是多种酶、苯二氮类受体和 ANP 受体的抑制剂,能够抗抑郁,抗癫痫^[7].

成功应用正交设计法的关键是参试因子和试验水平范围的正确选择.本试验中大多数参试因子产生的效应存在着明显的差异,而且筛选出来的培养基中各因子的水平基本在试验水平范围之内,能大体反映全部组合的实验效果,因此本试验对参试因子和试验水平范围的选择是比较适宜的.不过,分化试验需对部分因子增设浓度水平并考察其它因子的作用,进一步进行试验.

参考文献:

- [1] 周太炎. 中国植物志(33)[M]. 北京:科学出版社,1987:64-65.
- [2] 李春喜,王志和,王文林. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社,2000:149-156.

- [3] Song Z, Johansen H K, Moser C, et al. Effects of Chinese medicinal herbs on a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. APMIS, 1996, 104(5): 350 - 354.
- [4] Danz H, Stoyanova S, Wippich P, et al. Identification and isolation of the cyclooxygenase - 2 inhibitory principle in *Isatis tinctoria* [J]. Planta Med, 2001, 67(5): 411 - 416.
- [5] Danz H, Stoyanova S, Thomet O A, et al. Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis[J]. Planta Med, 2002, 68 (10): 875 - 880.
- [6] Maugard T, Enaud E, Choisy P, et al. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad) [J]. Phytochemistry, 2001, 58 (6): 897 - 904.
- [7] Naoya H. Pharmacological role of isatin, an endogenous MAO inhibitor[J]. Yakugaku Zasshi, 2000, 120(4): 352.

Application of orthogonal design in tissue culture of *Isatis tinctoria*

ZHANG Ju-hong, XIE Yu, WANG Cheng-gang, HUANG Bang-quan

(School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Orthogonal design was used to study callus induction and differentiation from cotyledons and hypocotyls of *I. tinctoria*. Our results indicated that the interaction between 6 - BA and 2, 4 - D had significant effect on the callus induction from hypocotyls and the best medium for callus induction from hypocotyls was MS + 6 - BA 0.5 mg · L⁻¹ (the same as follows) + 2, 4 - D 0.5. Interaction between 6 - BA and NAA had highly significant effect on callus induction from cotyledons and the best medium for callus induction from cotyledons was MS + 6 - BA 0.5 + NAA 0.2. The hormone concentrations tested had no significant effect on the regeneration ability of the calli and further experiment needs to be carried out. Based on direct analysis we suggested that calli induced on MS + 6 - BA 2 + NAA 1 were easier to be regenerated. The shoots regenerated were induced to form roots on MS + NAA 0.5 at a frequency higher than 80 %.

Key words: *Isatis tinctoria*; orthogonal design; callus induction; plantlet regeneration

(责任编辑 游 俊)

(上接第 182 页)

- [3] 许芳,冯建成,李洁,等. 纳豆激酶基因在大肠杆菌活性表达的比较研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(2): 10 - 13.
- [4] 罗素兰,田嘉璐,长孙东亭. 番茄高效再生体系的建立[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2002; 20(4): 314 - 323.
- [5] Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results[J]. Annu Rev Plant Physiol: Plant Molecular Biology, 1991, 42: 205 - 225.
- [6] 申琳,生吉萍,罗云波. 番茄外源基因转化系统的研究. 中国农业大学学报, 1998, 3(5): 103 - 105.
- [7] Hooykaas P J J, Shilperoort R A. Agrobacterium and plant genetic engineering[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19: 15 - 38.

Transformation of NK genes into tomato

YUAN Lin, LIU Hong-hai, WANG Yin, LI Xiao-xiang, YANG Yan-yan

(School of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Nattokinase (NK) is a fibrinolytic enzyme that is extracted from natto. In fact it has enzymatic property of protease. So nattokinase can be developed as a new fibrinolytic medicine. In this research, tomato plants will be transformed to express nattokinase gene. Hypocotyle were cut from 'xifen 3' (*Lycopersicon esculentum*), inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 containing *nk* gene. Plants were regenerated on selective media with Kanamycin. The presence of the *nk* gene in tomato's genome was confirmed by PCR in plants surviving sections. RT - PCR results showed that *nk* gene have been expressed at the transcription level. And this result haven't been reported in China so far.

Key words: nattokinase gene; tomato; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*

(责任编辑 游 俊)