

木本曼陀罗毛状根植株再生体系的建立

张继栋^{1, 2a, 2b}, 杨雪清³, 乔爱民^{2a*}, 孙敏¹,
何生根^{2b}, 雷桅¹, 尹彩霞^{2a}

(1. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715; 2. 仲恺农业工程学院, a. 农业与园林学院;
b. 生命科学学院, 广州 510225; 3. 洛阳理工学院附中, 河南 洛阳 471003)

摘要: 建立了木本曼陀罗(*Datura arborea* L.)毛状根的植株再生体系并对再生植株进行了初步检测。采用“一步法”诱导不定芽的适宜培养基为 MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹;采用“两步法”诱导不定芽时,先在 MS+6-BA 4.0 mg L⁻¹+KT 0.5 mg L⁻¹+2,4-D 0.5 mg L⁻¹上诱导愈伤组织,然后在 MS+6-BA 4.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹上诱导愈伤组织分化不定芽。诱导不定芽的最适宜生根培养基为 1/2MS+IBA 0.1 mg L⁻¹。用 PCR 技术从再生植株叶片中得到了 *rolB*、*rolC* 目的基因片段。HPLC 检测结果表明毛状根再生植株中莨菪烷类生物碱(Tropane alkaloids, TA)的含量较野生植株有明显的提高。

关键词: 木本曼陀罗;毛状根;再生;莨菪碱;东莨菪碱

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)05-0480-06

Plant Regeneration from Hairy Roots of *Datura arborea* L.

ZHANG Ji-dong^{1, 2a, 2b}, YANG Xue-qing³, QIAO Ai-min^{2a*}, SUN Min¹,
HE Sheng-gen^{2b}, LEI Wei¹, YIN Cai-xia^{2a}

(1. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2a. College of Agriculture and Landscape;
2b. College of Life Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
3. Attached Senior School of Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Plant regeneration system derived from hairy roots of *Datura arborea* L. was established. The optimum medium for inducing adventitious buds by ‘one-step method’ was MS+6-BA 2.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹. Using ‘two-step method’, callus was induced on MS medium supplement with 6-BA 4.0 mg L⁻¹+KT 0.5 mg L⁻¹+2,4-D 0.5 mg L⁻¹ at first, then adventitious buds were differentiated from the induced callus on MS medium supplemented with 6-BA 4.0 mg L⁻¹+NAA 0.2 mg L⁻¹. The optimum rooting medium for adventitious buds was 1/2MS+IBA 0.1 mg L⁻¹. By using PCR technique, the gene segments *rolB* and *rolC* were obtained from the leaves of regeneration plant. The results of HPLC showed that the contents of tropane alkaloids (TA) in regeneration plants was much more than those in the wild plants.

Key words: *Datura arborea* L.; Hairy roots; Regeneration; Hyoscyamine; Scopolamine

自 Ackermann 于 1973 年首次利用发根农杆菌成功转化高等植物以来,迄今已有 30 多科近 200 种植物实现了 Ri 质粒的遗传转化。利用发根农杆菌遗传转化植物主要用于: (1)通过毛状根培养生

产植物有用次生代谢产物(如药物、天然色素、香料、天然调味品等);(2)以 Ri 质粒为载体转入其他外源基因,获得转基因植株;(3)利用毛状根再生植株的特殊表型培育花卉新品种;(4)利用发根农杆菌

促进难生根木本植物生根。其中,通过毛状根培养生产植物有用次生代谢产物是目前利用发根农杆菌遗传转化植物的主要用途^[1]。Sevon 等^[2]通过对埃及莨菪(*Hyoscyamus muticus*)毛状根的再生转基因植株的分析,发现其莨菪烷类生物碱含量有大幅提高。木本曼陀罗(*Datura arborea* L.)系茄科(Solanaceae)曼陀罗属(*Datura*)植物^[3],其叶和花含莨菪碱(Hyoscyamine)和东莨菪碱(Scopolamine),是莨菪烷类生物碱(Tropane alkaloids, TA)的资源植物。临床主要用于治疗麻痹症、晕动症、胃肠痉挛性绞痛、三叉神经痛等症。木本曼陀罗自然繁殖受限因素多,生长慢,现存野生种群较少,且野生木本曼陀罗中莨菪烷类生物碱含量很低。利用植物遗传转化技术获取高产莨菪烷类生物碱的木本曼陀罗毛状根再生植株,是解决以上问题的有效途径。本研究对木本曼陀罗毛状根再生植株的培养条件进行研究,建立毛状根植株再生体系,为利用植物次生代谢工程技术实现木本曼陀罗莨菪烷类生物碱的代谢工程及利用转基因技术进行分子育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以野生木本曼陀罗(*Datura arborea* L.)的叶片为外植体,通过一步法再生获得丛生芽及其无菌苗^[4]。用带有 pRiA4 质粒的“解除武装”(disarmed)的重组 C58C1 工程菌采取“叶盘法”转化无菌苗叶片,获得木本曼陀罗毛状根单克隆,对 *rolB*、*rolC* 的 PCR 检测证实了发根型质粒 pRiA4 已整合到木本曼陀罗毛状根基因组内。

1.2 毛状根不定芽的诱导

“一步法”诱导不定芽 将毛状根单克隆转入附加不同浓度生长素和细胞分裂素的 MS 培养基,在 25℃、12 h d⁻¹光照条件下诱导不定芽,30 d 后统计不定芽诱导率(不定芽诱导率 = 出芽外植体数/接种外植体数)。

“两步法”诱导不定芽 第一步:愈伤组织诱导。将毛状根单克隆切成长约 2~3 cm,转入附加不同生长素和细胞分裂素浓度配比的 MS 固体培养基上(30 g L⁻¹蔗糖 pH 5.8),在 25℃、12 h d⁻¹光照条件下诱导愈伤组织,4 周后统计愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率 = 出愈外植体数/接种外植体数)。第二步:不定芽分化。从诱导出的毛状根愈

伤组织中选取生长良好,无褐化的部分毛状根愈伤组织转入附加不同生长素和细胞分裂素配比的芽分化培养基中培养,5 周后统计不定芽分化率(不定芽分化率 = 出芽数/接种愈伤组织数)。

1.3 不定芽抗性筛选及生根培养

不定芽形成后(约 2 cm)转至 MS + 100 mg L⁻¹ Km 选择培养基上生长,14 d 后将绿色芽转入 1/2MS + 0.1 mg L⁻¹ IBA 固体培养基中诱导根的产生,每周观察生长情况,35 d 后统计生根率。

1.4 再生植株的移栽

待再生植株长至 5~10 cm 左右时,于室温下炼苗 7 d,一个月后观察再生植株移栽成活情况。

1.5 再生植株的 PCR 检测

用 SDS 法^[5]提取再生植株叶片的基因组 DNA,PCR 检测 *rolB*、*rolC* 目的基因。

rolB(423 bp)的上游引物为 *FrolB*: 5'-GCTCTT-GCAGTGCTAGATTT-3',下游引物为 *RrolB*: 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3';*rolC*(626 bp)的上游引物为 *FrolC*: 5'-CTCCTGACATCAAACCT-CGTC-3',下游引物为 *RrolC*: 5'-TGCTTCGAGT-TATGGGTACA-3'。

反应体系均为 25 μl: ddH₂O 18 μl, 10 × PCR buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μl, 10 mmol/L dNTP mix 0.25 μl, 10 mmol/L 上游引物 0.25 μl, 10 mmol/L 下游引物 0.25 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μl (1.25 U), Template 基因组 DNA 1.5 μl。

PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 最后于 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 莨菪碱和东莨菪碱的提取及含量检测

毛状根再生植株(自然根、叶)60℃ 干燥 24 h 至恒重;研磨成粉,称取 100 mg 干粉加入 10 ml 甲醇超声振荡 40 min;过滤,回收滤液,挥干甲醇,残留物溶于 5 ml 200 mmol/L(pH 9.8)的 NH₄Cl;过柱(20 × 1 cm),填充物为 4.5 g Extrelut-20[®] (Merck);用 10 ml 氯仿饱和氨水洗柱,重复 3 次;洗脱液在 40℃ 用暖风吹干,残留物溶于 1 ml HPLC 流动相(17% V/V 乙腈,溶于 50 mmol/L KH₂PO₄,用磷酸调 pH 至 3.0);过滤,Millipor 0.2 μm 滤纸, -20℃ 保存待用。

标准品的配制:分别精密称取 2 mg 莨菪碱和东莨菪碱标准对照品,用甲醇(色谱级)溶解过滤,配成

终浓度为 1 000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 分别稀释成 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。

色谱条件: 色谱柱: Symmetry^R-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 粒径 5 μm); 流动相: 甲醇:醋酸缓冲液 (0.05 mol/L 醋酸胺, pH 4.6) = 58:42, 0.0025 mol/L SDS; 流速: 1 ml min⁻¹; 检测波长: 226 nm; 灵敏度: 0.08 AUFS; 柱温: 40℃; 进样量: 20 μl 。

2 结果和分析

2.1 毛状根不定芽的诱导

2.1.1 “一步法”诱导不定芽

将暗培养生长的毛状根转入附加不同生长调节剂的 MS 培养基中诱导不定芽, 10 d 后部分毛状根基部明显变粗, 开始膨大, 25 d 后形成芽点, 随着时间的延长, 部分毛状根长出不定芽。

表 1 不同生长调节剂对毛状根诱导不定芽的影响

Table 1 Effects of different growth regulator combinations on adventitious buds induced from hairy roots

6-BA (mg L^{-1})	NAA (mg L^{-1})	外植体数 Number of explants	不定芽分化率 Rate of bud differentiation (%)
1.0	0.1	25	25.5
1.0	0.2	25	35.5
2.0	0.1	25	30.0
2.0	0.2	25	38.5
3.0	0.1	25	32.0
3.0	0.2	25	34.5

由表 1 可知, 6-BA 是诱导不定芽分化的主要因素, 添加适当浓度的 NAA 可以提高不定芽的诱导率。适合毛状根直接诱导芽的培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} , 诱导率最高, 为 38.5%。通过“一步法”诱导毛状根不定芽虽然周期短, 但是不定芽诱导率相对较低, 分化的不定芽数较少。

2.1.2 “两步法”诱导不定芽

将克隆的毛状根转入不同浓度生长调节剂配比的 MS 培养基诱导愈伤组织, 第 7 天毛状根开始变粗, 膨大, 毛状根剪切的伤口处逐渐产生少量较致密的浅黄色愈伤组织, 第 15 天毛状根大部分愈

伤化, 随着培养时间延长, 愈伤组织体积迅速增大。

由表 2 及图版 I: 1~3 可看出, 培养基中所含生长调节剂种类和浓度不同, 愈伤组织诱导率和生长情况各不相同。在 MS 附加 6-BA 和 NAA 的培养基上, 愈伤组织诱导率较高, 可达 80% 左右; 在 MS + 6-BA 4.0 mg L^{-1} + KT 0.5 mg L^{-1} + 2,4-D 0.5 mg L^{-1} 上培养, 愈伤组织诱导率最高, 为 92.5%。结果表明, 在诱导外植体的脱分化过程中, 不仅应当控制植物生长调节物质的适宜浓度, 而且应当注意生长素(NAA、2,4-D 等)和细胞分裂素(6-BA 等)的配比。在脱分化过程中, 主要是生长素起作用, 但若配合一定浓度的细胞分裂素, 则效果更好。

选取生长良好的愈伤组织转入不定芽分化培养基上两周以后, 愈伤组织开始出现数个不定芽点, 随着培养时间延长, 不定芽点陆续分化出芽, 不定芽不断伸长, 并长出真叶。愈伤组织在不同培养基中的分化情况见表 3 及图版 I: 4~5。

从表 3 看出, 6-BA 浓度一定时, 不定芽分化率随 NAA 浓度的升高呈现先上升后下降的趋势, 说明不定芽分化需要生长素和细胞分裂素相配合, 而生长素浓度也不能过高, 否则会降低不定芽分化率, 这与李名扬等^[6]在柑桔(*Citrus sinensis*)毛状根的再生植株研究中植物生长调节剂对再生芽的影响是基本一致的。本试验筛选出培养基 MS + 6-BA 4.0 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} 为毛状根愈伤组织分化不定芽的最适宜培养基, 分化率达到 62.5%。

2.2 不定芽抗性筛选及生根培养

不定芽形成 14 d 后进行抗性筛选, 结果表明 28 d 后大多数再生芽可以在含有 Kna 100 mg L^{-1} 的抗性培养基上存活, 存活率达 85.6%。将筛选后的不定芽转入 1/2MS + 0.1 mg L^{-1} IBA 固体培养基中诱导生根, 5~6 d 后开始长出不定根, 逐渐形成完整的再生植株, 再生苗长势良好。大部分再生植株与普通植株在形态上有较大的差别, 主要为叶片皱缩、节间缩短、多根毛, 失去向地性, 有些根着生在培养基表面上(图版 I: 6~8)。

2.3 再生植株的移栽

待再生植株长至 5~10 cm 时, 于室温下炼苗 7 d, 移栽到放有蛭石的土壤中盆栽。开始一周, 再生植株中部以下叶片萎蔫变黄脱落, 顶端叶片生长旺盛, 适应期过后, 植株增高, 叶片增多, 一个月后, 生长成为健壮的本本曼陀罗苗(图版 I: 9)。

表 2 不同生长调节剂组合对毛状根诱导愈伤组织的影响

Table 2 Effects of different growth regulator combinations on callus induced from hairy root

生长调节剂 Growth regulators (mg L ⁻¹)	外植体数 Number of explants	愈伤诱导率 Rate of callus induction (%)	愈伤生长情况 Growth of callus
6-BA 2.0 + NAA 0.5	35	80.0	较疏松,浅绿色,开始分化 Relatively loose, fleet green, began to differentiate
6-BA 2.0 + NAA 1.0	35	82.0	较疏松,绿色,部分褐化 Relatively loose, green, partially brown
6-BA 4.0 + NAA 0.5	35	75.6	疏松,浅绿色,开始出现芽点 Loose, fleet green, bud spot began to appear
6-BA 4.0 + NAA 1.0	35	81.5	部分褐化,致密,无分化迹象 Partially brown, tight, no differentiation
6-BA 1.0 + 2,4-D 0.5	35	86.5	较疏松,白色,再生出多条毛状根 Relatively loose, white, and a few hairy roots regenerated
6-BA 1.0 + 2,4-D 2.0	35	79.6	疏松,灰白色,部分出现褐化现象 Loose, offwhite, partially brown
6-BA 3.0 + 2,4-D 0.5	35	78.8	部分绿色,分化出芽,并长出叶片 partially green, buds differentiated and new leaves emerged
6-BA 3.0 + 2,4-D 2.0	35	68.5	褐化严重,生长缓慢,无分化迹象 Brown badly, slowly grew, no differentiation
6-BA 2.0 + KT 0.5 + 2,4-D 0.2	35	88.5	暗绿色,再生出毛状根,生长良好 Dark green, a few hairy roots regenerated, grew well
6-BA 2.0 + KT 1.0 + 2,4-D 0.2	35	83.4	疏松,大部分呈绿色,分化出芽 Loose, most of callus became green, buds differentiated
6-BA 4.0 + KT 0.5 + 2,4-D 0.5	35	92.5	上部呈浅绿色,有芽分化 Upper part became aqua, and buds differentiated
6-BA 4.0 + KT 1.0 + 2,4-D 0.5	35	88.5	较疏松,部分褐化 Relatively loose, partially brown

表 3 不同生长调节剂组合对毛状根愈伤组织诱导不定芽的影响

Table 3 Effects of different growth regulator combinations on buds induced from callus

6-BA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	愈伤组织数 Number of callus	不定芽分化率 Rate of bud differentiation (%)
2.0	0	25	26.5
2.0	0.2	25	35.5
2.0	0.5	25	30.0
3.0	0	25	45.0
3.0	0.2	25	40.5
3.0	0.5	25	38.5
4.0	0	25	58.5
4.0	0.2	25	62.5
4.0	0.5	25	46.0

2.4 再生植株的 PCR 检测

取再生植株叶片进行 PCR 检测,均扩增出了 *rolB*、*rolC* 基因的目的片段,PCR 检测结果见图 1,说明发根型质粒 pRiA4 整合到木本曼陀罗再生植株基因组中。

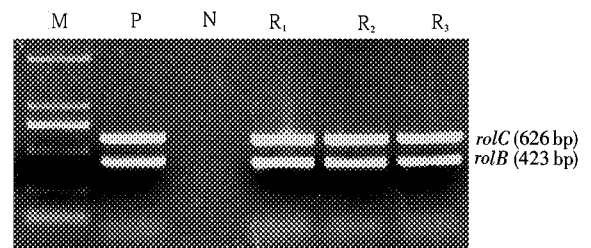


图 1 毛状根再生植株 *rolB*、*rolC* 的分子检测

Fig. 1 PCR analysis of *rolB* and *rolC* of regenerated plants from hairy roots

M: DL-2000 DNA Marker (100 ~ 2 000 bp); P: pRiA4 阳性对照 Positive control; N: 阴性对照 Negative control; R₁, R₂, R₃:毛状根再生植株 Regenerated plants of hairy roots.

2.5 再生植株的莨菪碱和东莨菪碱含量检测

用 HPLC 检测了 8 株不同毛状根系再生植株以及野生木本曼陀罗叶片和根的莨菪碱和东莨菪碱含量(图 2)。结果表明,在转化毛状根再生植株中莨菪碱和东莨菪碱的含量较野生植株有明显的提高。8 个单克隆毛状根再生植株中莨菪碱和东莨菪碱的含量均比野生木本曼陀罗叶片和根中高。其中, R₃ 所含莨菪碱的含量最高,为 105.052 μg g⁻¹ DW, 所含

东莨菪碱含量最高的是 R₇, 可达 218.122 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, 而野生木本曼陀罗根中莨菪碱和东莨菪碱的含量最低, 仅分别为 2.023 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW 和 12.69 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW。

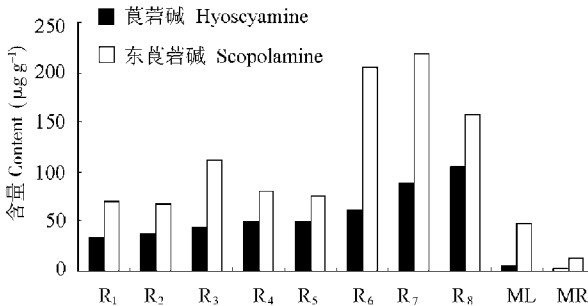


图 2 毛状根再生植株中的莨菪碱和东莨菪碱含量

Fig. 2 Hyoscyamine and Scopolamine contents in regenerated plants from hairy roots

R₁ ~ R₈: 毛状根再生植株 Regenerated plants from hairy roots; ML: 野生木本曼陀罗叶片 Leaves of wild *D. arborea*; MR: 野生木本曼陀罗根 Roots of wild *D. arborea*.

3 讨论

毛状根在 MS 培养基上继代培养时, 发现极个别毛状根单克隆可直接形成芽, 这与张汉明等^[7]报道四倍体菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的转化根能直接分化成芽的结果是一致的。于是我们采用“一步法”诱导芽, 筛选出最适宜直接诱导毛状根形成不定芽的培养基, 此种方法的不定芽诱导周期较短, 但不定芽诱导率较低。而采用“两步法”诱导毛状根分化形成不定芽, 分化率最高为 62.5%。一般毛状根在添加不同生长调节剂的培养基中才能诱导愈伤组织、不定芽, 且不同阶段所需的生长调节剂水平不同。在菘蓝毛状根诱导再生过程中, 6-BA 对再生芽作用最好, NAA 对毛状根的愈伤组织诱导效果较好, 但诱导根需 IAA 和 NAA。6-BA 单独使用或与 NAA 联用均能诱导菘蓝等产生不定芽, 混用时效果更好^[8-9], 这与本试验的研究结果相一致。

获得的毛状根再生植株之间表型差异不大。而木本曼陀罗再生植株同野生植株相比, 叶皱缩, 节间短, 叶幅宽, 根发达, 多根毛, 失去向地性, 自主生长, 有些根着生在培养基表面, 与李名扬^[6]、孙敏^[10-12]等的研究结果一致。

毛状根是由单细胞起源^[13-14], 我们把获得的毛状根逐一分开, 作为单克隆进行培养, 这样的培养物性能稳定, 有利于提供稳定的次生代谢产物^[8]。但单克隆与单克隆之间, T-DNA 插入的片段呈现多样性, 导致转化结果的不一致, 或在培养过程中发生 T-

DNA 的丢失^[15-16], 这些都可能导致后代再生植株次生代谢产物含量的差异。此外, 植物生长调节物质的作用不可忽视。不同的激素配比, 一方面导致植株的次生代谢途径发生过程的差异; 另一方面导致植株的生长发育速度不一致, 不同生长发育时期的植株其体内次生代谢产物含量有差异。

HPLC 测定结果表明, 再生植株中莨菪碱的含量最高为 105.052 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, 东莨菪碱含量最高为 218.122 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, 而野生木本曼陀罗根中莨菪碱和东莨菪碱的含量仅为 2.023 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW 和 12.69 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, 这说明在转化毛状根再生植株中莨菪碱和东莨菪碱的含量较野生植株有明显的提高, 证明通过发根农杆菌的遗传转化技术可以获取高产莨菪烷类生物碱的木本曼陀罗毛状根再生植株, 具有重要的研究意义和商业价值。

参考文献

- [1] Qin M B (秦明波), Li G Z (李国珍), Ye H C (叶和春), et al. Induction of hairy root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture *in vitro* [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1994, 36: 165-170. (in Chinese)
- [2] Sevon N, Drager B, Hiltunen R, et al. Characterization of transgenic plants derived from hairy roots of *Hyoscyamus muticus* [J]. Plant Cell Rep, 1997, 16: 605-611.
- [3] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agenda Academiae Sinicae Edita (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 67 [M]. Beijing: Science Press, 1978: 148-149. (in Chinese)
- [4] Yang X Q (杨雪清), Wang S F (王淑芳), Yang R (杨蕊), et al. Fascicular shoot induction and rapid propagation of *Datura arborea* L. [J]. J SW Univ (Nat Sci) (西南大学学报: 自然科学版), 2007, 29 (6): 140-142. (in Chinese)
- [5] Wang G L (王关林), Fang H J (方宏筠). Plant Gene Engineering [M]. Second ed. Beijing: Science Press, 2002: 742-744. (in Chinese)
- [6] Li M Y (李名扬), Luo J H (罗金华), Chen H (陈红). Transformation of *Citrus sinensis* L. Osbesk by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transformed plantlets [J]. SW China J Agri Sci (西南农业学报), 1996, 9(1): 90-95. (in Chinese)
- [7] Zhang H M (张汉明), Li B H (李博华), Xu T F (许铁锋), et al. Genetic transformation of autotetraploid *Isatis indigotica* Fort. induced by Ri T-DNA and plant regeneration [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2000, 25(11): 657-660. (in Chinese)
- [8] Xu T F (许铁锋), Zhang H M (张汉明), Zhang W (张威), et al. Establishing better lines and regenerating system of hairy roots of *Isatis indigotica* with Ri T-DNA [J]. Acad J Sec Milit Med Univ (第二军医大学学报), 2000, 21(10): 907-910. (in Chinese)
- [9] Fu C X (付春祥), Jin Z P (金治平), Yang R (杨睿). Establishment of *Saussurea involucreata* hairy roots culture and plantlet regeneration [J]. Chin J Biotechn (生物工程学报), 2004, 20(3): 366-368. (in Chinese)

- [10] Sun M, Chen M, Liao Z H, et al. Plantlet regeneration from hairy roots of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) [J]. J SW China Nor Univ (Nat Sci), 2000, 25: 543-546.
- [11] Zhang Y L(张荫麟), Song J Y(宋经元), Qi J J(祁建军), et al. Transfection by *Agrobacterium rhizogenes* and plant regeneration of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1997, 22(5): 274-275.(in Chinese)
- [12] Signs M W, Flores H E. The biosynthetic potential of plant roots [J]. Bio-Essays, 1990, 12: 282-285.
- [13] Zhang Y(张毅), Shen W H(沈文辉). New carriers of plant genetic engineering —The Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 1989, 5: 173-178.(in Chinese)
- [14] Dai J G(戴均贵), Zhu W H(朱蔚华). Application of hairy root culture technology to production of plant secondary metabolites [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 1999, 35(1): 69-75.(in Chinese)
- [15] Yadav P B S, Padmaja V. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea [J]. Plant Cell Tiss

Org Cult, 2003, 73: 197-199.

- [16] McGranahan G H, Leslie C A, Dandekar A M. Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 634-638.

图版说明

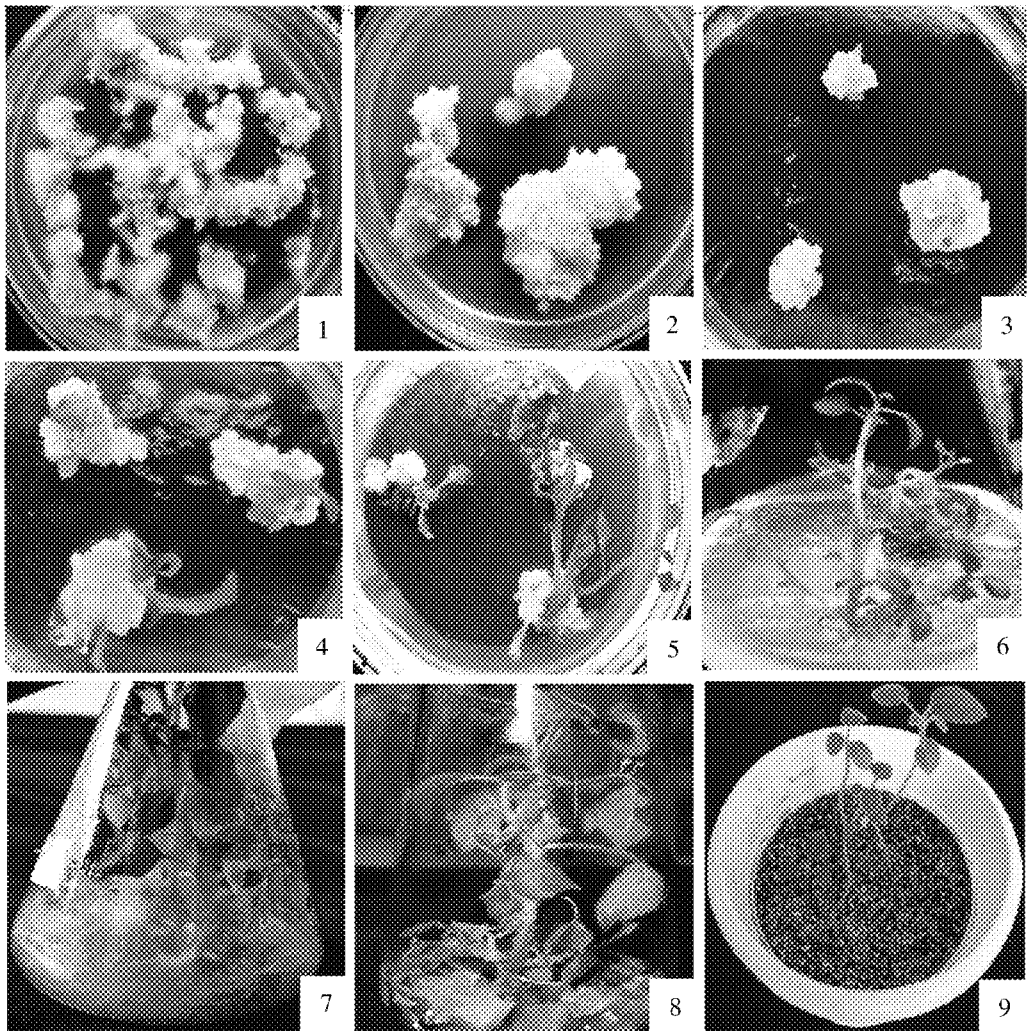
图版 I

1,2,3. 毛状根诱导的愈伤组织; 4. 愈伤组织分化的不定芽; 5. 不定芽生长; 6. 不定芽诱导生根; 7. 毛状根再生植株; 8. 非转化再生植株; 9. 毛状根再生植株的移栽。

Explanation of plate

Plate I

1,2,3. Calli induced from hairy roots; 4. Adventitious buds induced from calli; 5. Growth of adventitious buds; 6. Rooting induced from adventitious buds; 7. Regenerated plants of hairy roots; 8. Regenerated plant of non-transformed; 9. Transplant of regenerated plant from hairy roots.



张继栋等:图版 I

ZHANG Ji-dong et al.: Plate I