

大车前体外再生体系的建立和优化

Establishment and Optimization of *in vitro* Regeneration System for *Plantago major* L.

李 平^{1,2} 陈 华¹ 李银心^{1*}

LI Ping^{1,2}, CHEN Hua¹ and LI Yin-Xin^{1*}

1 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室 北京 100093

2 中国科学院研究生院 北京 100039

1 Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093

2 The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039

摘 要 大车前不仅有很高的药用价值,在生态学研究方面也是重要模式植物。关于大车前的组培,目前报道很少。我们通过不定芽直接再生和愈伤组织诱导两种途径,建立了大车前(*Plantago major* L. 'Giant Turkish. ')的快速高效组培再生系统。完整的成熟种子培养在添加 IAA 和 TDZ 的 MS 培养基中,不经过愈伤的分化阶段,从子叶节的部位产生不定芽,直接不定芽的诱导频率达到 100%。在 0.2mg/L IAA 和 1.0mg/L TDZ 作用下,培养 4~5 周后平均每个外植体产生再生芽的数目达到 14.6 个。对同一个外植体诱导得到的 9 株再生植株进行的 RAPD 检测表明,部分植株在 DNA 水平上发生了变异。以叶片作为外植体,在添加 1.0mg/L NAA 的 MS 固体培养基中培养 3 周后,伤口处形成愈伤组织,产生愈伤的频率平均为 98%。愈伤组织在添加 4.0mg/L 6-BA 的 MS 固体培养基中分化得到再生芽,分化频率为 25%,平均每块愈伤产生再生芽 2.8 个。两种途径得到的再生芽转到 1/2 MS 培养基上均可生根、长成完整植株,小苗移栽到温室 90% 能够存活。

关键词 大车前(*Plantago major* L. 'Giant Turkish. ') 愈伤诱导 植株再生 不定芽

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0916-07

Abstract *Plantago major* is not only used as medicinal herb but also an important model plant of ecology. Little work has been reported on the tissue culture of *P. major*. A reproducible system for direct shoot morphogenesis and callus induction of *Plantago major* L. 'Giant Turkish. ' was described. Using seed as explants, the adventitious buds were obtained 4 to 5 weeks following incubation on MS medium supplemented with 0.2 mg/L IAA and 1.0 mg/L TDZ. The frequency of adventitious buds was as high as 100%. The average number of buds per explant was 14.6. Random amplified polymorphic DNA analysis on 9 regenerants indicated that somaclonal variation occurred at DNA level. Using leaves as explants, calli were easily induced on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA 3 weeks following inoculation. The frequency of callus induction can be as high as 98%. On MS medium containing 4.0 mg/L 6-BA, 25% of calli differentiated and the mean number of buds per piece of callus was 2.8. The buds developed roots on 1/2 MS medium and formed plantlets, 90% of which survived when transplanted to greenhouse.

Key words *Plantago major* L. 'Giant Turkish. ' callus induction plant regeneration adventitious shoots

Received: May 24, 2005; Accepted: August 23, 2005.

This work was supported by National Programs for High Technology Research and Development (No. 2003AA627010).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62836258; Fax: 86-10-82596139; E-mail: yxli@ibcas.ac.cn

国家高技术研究与发展项目资助 (No. 2003AA627010)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

车前属(*Plantago* spp.)植物在全世界有 190 余种 , 车前(*P. asiatica*) 大车前(*P. major* L.) 平车前(*P. depressa* Willd.)等历来被列为中药中的上品 , 全草及种子入药。车前属植物多数分布于受人为干扰强烈的生境中 , 该属中的许多种类属于典型的杂草 , 是理论生态学、生理生态学、进化生物学的理想材料^[1]。当前对车前属植物的研究主要集中在生态学方面 , 如大气中 CO₂ 浓度对植物生长的影响^[2]、车前属植物对臭氧的抗性^[3] , 以及植物规模依赖性的生殖配置^[4]。车前属的药用价值也有较多研究 , 传统医学认为 , 车前子有利水通淋、清肝明目的功效 , 用于治疗小便不利、水肿等^[5]。对车前属植物的现代药理学研究在不断地深入进行^[6]。关于大车前糖类和多羟基化合物运输的研究有相当多的积累^[7]。

车前属中包括大约 20 种盐生植物 , 比如 *P. maritima* L. 能够耐受环境中 250 ~ 300 mmol/L NaCl ; *P. coronopus* L. 能够在 150 mmol/L NaCl 环境中生存^[8] ; 它们都可作为盐碱滩涂的先锋植物 , 对滩涂盐碱地的改造、防风固沙、水土保持、环境温度调节等方面具有积极作用 , 同时又是固碳、供氧和转化能量的良好材料的植物。但是 , 这些车前属植物生物量较小 , 要充分发挥它们的作用 , 需要产生足够大的生物量。与车前属其它种类相比 , 大车前生物量大 , 其园艺品种除了被作为药用和观赏植物外 , 正逐渐被作为蔬菜进行开发。根据我们的前期实验结果 , 大车前对盐分比较敏感 , 在 68.4 mmol/L (0.4%) NaCl 处理下其生长便受到抑制 , 用 111.2 mmol/L (0.65%) NaCl 处理 , 相对生长量只达到对照的一半 (数据未发表)。我们期望通过细胞工程技术 , 建立大车前体外培养和再生系统 ; 一方面 , 以大车前愈伤组织 (无性系) 作为基础研究的平台 , 同时 , 在保持高生物量产出的基础上筛选有价值的细胞系 , 获得能

够大量积累有效药用成分的突变体及大车前的耐盐突变体。

车前属植物的组织培养少有报道 , 涂芝声^[9]和王秀芝^[10]等分别用不同的外植体实现了国内常见野生种车前(*P. asiatica* L.)的愈伤组织诱导及其植株再生 ; 平车前的组织培养工作也有过报道^[11]。Mederos 等对大车前的微繁 (micropropagation) 作了研究^[12, 13]。这些工作为大车前的组织培养提供了重要的参考。但是同属不同种的植物虽然在进化上关系相近 , 但基因型不同 , 对组织培养条件的要求也相差很多 , 而微繁是以顶芽为外植体 , 可取的材料少 , 而且未得到培养细胞系。

本文以大车前无菌苗为材料 , 取叶片和种子为外植体 , 分别通过两种器官发生方式——愈伤组织再生和不定芽直接再生途径实现了大车前的体外再生 , 建立了高频率体外再生系统 , 为筛选具有高生物量的大车前抗盐突变体和基因转化建立了高效的体外再生系统和实验平台体系。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用材料为大车前的园艺品种 ‘ Giant Turkish. ’ , 种子购自 Horizon Herbs (Oregon , USA)。50℃催芽 1 h 的种子经过常规消毒 (70% 酒精消毒 30 s , 10% NaClO 消毒 15 min , 无菌水冲洗 4 ~ 5 次) 后接种在 MS 培养基 , 黑暗中培养。2d 后转移至光下培养 , 6 周后成苗 , 叶片作为外植体诱导愈伤组织。

1.2 培养基

组织培养的条件为 : 温度 (25 ± 1)℃ , 每天光照 12 h , 光照强度 3 000 lx。为了得到最佳诱导培养基 , 将叶片外植体剪成约 0.5cm² 大小 , 叶背紧贴培养基 , 分别接种到 20 种不同培养基上 (表 1) 以诱导愈伤组织。愈伤组织接种到含有 6-BA 的 MS 培养

表 1 大车前愈伤组织诱导培养基
Table 1 Media used for callus induction from *Plantago major*

Media	Phytohormones(mg/L)			Media	Phytohormones(mg/L)		
	6-BA	2 4-D	NAA		6-BA	2 4-D	NAA
CIM-1	1.0	0	0	CIM-11	0	2.0	0
CIM-2	1.5	0	0	CIM-12	0	3.0	0
CIM-3	2.0	0	0	CIM-a	1.0	1.0	0.5
CIM-4	3.0	0	0	CIM-b	1.5	1.0	0.1
CIM-5	0	0	0.1	CIM-c	1.0	0	0.5
CIM-6	0	0	0.5	CIM-d	1.5	0	0.1
CIM-7	0	0	1.0	CIM-e	1.0	1.0	0
CIM-8	0	0	2.0	CIM-f	1.5	1.0	0
CIM-9	0	1.0	0	CIM-g	0	1.0	0.5
CIM-10	0	1.5	0	CIM-h	0	1.0	0.1

The basal medium was composed of the ingredients of MS medium (pH 5.8).

基上分化 ,再生芽转移到生根培养基(1/2 MS 培养基)以生根 ,获得完整的再生植株。每次实验有 6 ~ 8 个平行样 ,各设 3 个重复组。用 SPSS 软件分析数据 ,以最小显著差数法(LSD)评价差异的显著性。

温室条件为 :温度(28 ± 3)℃、湿度(70 ± 5)%、自然光照。

1.3 再生植株的 RAPD 检测

植物总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[14]。RAPD 反应采用 20 μL 反应体系 ,成分为引物(8 pmol/L) (Sangon 产品) 2 μL ,Taq DNA 聚合酶(2.5 u/μL ,北京天为时代生物技术公司) 0.5 μL ,10 × buffer 2 μL ,基因组 DNA 1.5 μL ,dNTP(10 mmol/L) 0.5 μL(Sangon 产品) ,超纯水 13.5 μL。扩增程序 :94℃ 变性 4 min ; 94℃ ,1 min 36℃ ,1 min 72℃ ,2 min 40 个循环 ,最后 72℃ 保温 10 min。反应在同一 PCR 仪(Whatman Biometra® T-gradient PCR 仪)中完成。取 10 μL 反应产物进行琼脂糖凝胶(1.5%)电泳 ,溴化乙锭染色 ,Alphaimager 凝胶成像系统观察并记录结果。

2 结果

2.1 愈伤组织的诱导和分化

为了诱导愈伤组织 ,将叶片外植体接种在 CIM-1 至 CIM-12 号培养基上。CIM-1 至 CIM-4 号培养基中 6-BA 浓度从 1.0 ~ 3.0 mg/L 形成梯度。2 周后外植体切口处长出少量淡黄愈伤、生少量不定根 4 周

后长出少量淡黄或绿色致密愈伤团、外植体褐化 ,生不定根 ,随着 6-BA 含量增加 ,外植体褐化程度增加 ,产生愈伤组织的能力降低。说明增加 6-BA 的浓度不利于大车前愈伤组织的诱导。CIM-5 至 CIM-8 号培养基中 NAA 浓度从 0.1 ~ 2.0mg/L 形成梯度。2 周后大量生根(白色须状) ,有淡黄色愈伤 4 周后大量生根、愈伤成团状、有少量生活力弱的芽 ,愈伤团体积迅速膨大 ,随着 NAA 浓度增加 ,这种表现更加明显。说明 NAA 高效诱发不定根的分化 ,并促进愈伤产生。CIM-9 至 CIM-12 号培养基中 2 4-D 浓度从 0.1 ~ 2.0mg/L 形成梯度。2 周后长出少量白色团状愈伤 4 周后外植体难以存活、容易褐化 ,但仍可产生少量白色细胞团。随着 2 4-D 浓度增加 ,外植体存活能力逐渐变差 ,产生的白色细胞团越来越少。说明培养基里只添加 2 4-D 不能维持外植体的存活。

实验中共得到 3 种愈伤 ,第一种愈伤在添加 6-BA 的培养基上诱导得到 ,呈淡黄或绿色、致密、最大直径可达约 1cm、分化能力差 ,只能得到不定根(图 1A) ;第二种愈伤在有 2 4-D 的培养基上诱导得到 ,乳白色、松软、具有粘性、直径约 0.1 ~ 0.2cm、分化能力较弱 ,在分化培养基上可以分化出根 ,未得到再生芽(图 1B) ;第三种在含 NAA 的培养基上诱导得到 ,呈白色略透明、在分化培养基上可得到再生芽(图 1C)。

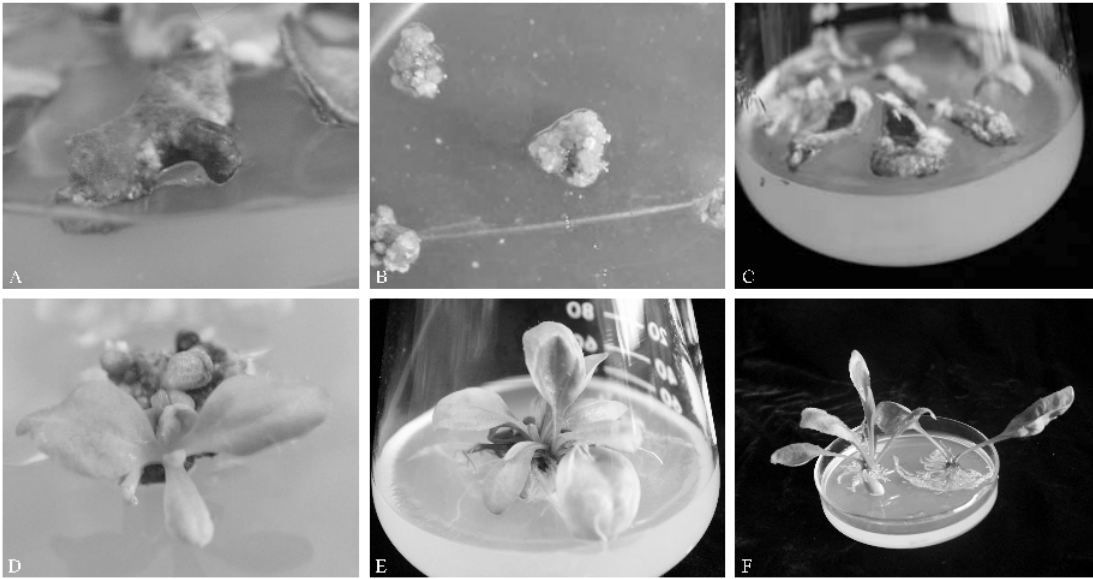


图 1 通过愈伤途径再生植株

Fig. 1 Calli formation and plantlet regeneration

A , B , and C indicate the first , the second , and the third kind of callus , respectively. D and E show differentiation of shoots from calli. F shows regeneration of plantlet.

CIM-a——CIM-h 是不同激素的组合。包含 3 种激素的组合(CIM-a、CIM-b)愈伤诱导效率都不高 , 只在伤口处长出少量第二种愈伤 2 周后就褐化了 ; 包含 6-BA 和 NAA 的组合(CIM-c、CIM-d)愈伤诱导效率高 , 其中 CIM-d 培养基最高 , 产生的第一种愈伤体积最大 , 细胞生长活跃 ; 包含 6-BA 和 2,4-D 的组合(CIM-e、CIM-f)愈伤诱导效率低 , 外植体和愈伤都容易褐化 ; 包含 NAA 和 2,4-D 的组合(CIM-g、CIM-h)在培养的早期使得外植体透明化 , 产生第二种愈伤。外植体在 CIM-h 培养基产生较多第二种愈伤 , 质地较软、具有粘性 , 在分化培养基上可以分化出根 , 未得到再生芽。

外植体在 CIM-5——CIM-8 培养基上产生第三种愈伤 , 愈伤为白色略透明、在分化培养基上可得到再生芽。最小显著差数法分析表明 , 诱导第三种愈伤的 4 种培养基的诱导效率存在显著差异 , 确定 CIM-7 培养基是产生胚性愈伤组织的最佳培养基 , 诱导频率最高可达 98% (表 2)。

表 2 愈伤组织的诱导

Table 2 Frequency of calli induction

Medium	No. of calli/explants
CIM-7	0.98 ± 0.02 a
CIM-8	0.81 ± 0.03 b
CIM-6	0.72 ± 0.04 c
CIM-5	0.63 ± 0.05 d

Data represent the mean values ± S.E. of 3 replicates recorded after 3 weeks. Means following the same letter for each line were not different statistically at 5% probability as determined by LSD multiple comparisons.

外植体在脱分化培养基上培养 21 ~ 25d 后 , 得到不规则形状的愈伤组织 , 将直径约 1 ~ 2mm 的愈伤组织块转入分化培养基。实验中选择含有 6-BA 的 MS 培养基为分化培养基 , 共设有 4 个梯度。愈伤组织在含有 6-BA 的 MS 培养基上能够存活 , 组织块逐渐膨大。2 ~ 3 周后可见绿色芽点(图 1D 和 E) , 每块愈伤组织块陆续产生 1 到 5 个芽点。愈伤在 SIM-B 培养基上分化效率最高(约 25%) , 平均每块愈伤得到的再生芽有 2.8 个(表 3)。最小显著差

表 3 愈伤组织在不同培养基上分化频率

Table 3 Frequency of regeneration of calli on different media

Medium	No. of differentiated calli/total calli	No. of shoots/ differentiated calli
SIM-B(MS + 6-BA4.0mg/L)	0.25 ± 0.05 a	2.8 ± 0.3 a
SIM-A(MS + 6-BA2.0mg/L)	0.19 ± 0.04 ab	2.3 ± 0.2 ab
SIM-C(MS + 6-BA0.5mg/L)	0.13 ± 0.03 bc	2.2 ± 0.2 b
SIM-D(MS + 6-BA1.0mg/L)	0.11 ± 0.02 c	1.4 ± 0.4 c

Data represent the mean values ± S.E. of 3 replicates recorded after 3 weeks. Means following the same letter for each line were not different statistically at 5% probability as determined by LSD multiple comparisons.

数法分析表明 4 种分化培养基之间 , SIM-B 与 SIM-C、SIM-D 诱导芽点产生的频率差异显著 , 与 SIM-A 差异不显著。

愈伤组织分化得到的芽长到约 2cm 高时 , 扦插到 1/2 MS 培养基 , 1 周后生根 , 长成完整植株(图 1F)。移栽到温室 , 以 1/2 MS 营养液浇灌 , 2 周后调查成活率在 90% 以上。

2.2 直接不定芽再生

完整的成熟种子经过常规消毒后 , 接种于直接再生培养基上(DRM-1)。4 ~ 5d 后发芽 , 3 周后下胚轴部分开始膨大、长出小芽 , 同时根不再向下伸长(图 2A)。之后苗与培养基接触的部分持续膨大、长出多个小芽。5 周后每个外植体再生芽的数目平均在 10 个以上 , 最多可达 20 个(图 2B)。5 ~ 6 周后扦插再生芽到 1/2 MS 培养基上 , 正常生根 , 长成完整植株。

种子外植体 5 周后在 4 种培养基上的再生率均达到 100% , 外植体在 DRM-1 培养基上培养 5 周后的再生芽数目最多 , 最小显著差数法分析表明 4 种培养基诱导不定芽再生的数目存在显著差异(表 4)。因此 , 确定 DRM-1(MS + TDZ 1.0mg/L + IAA 0.2mg/L)为大车前种子外植体再生的最佳培养基。

表 4 不同培养基上不定芽再生频率

Table 4 Regeneration ratio of shoots on different culture media

Direct regeneration media(DRM)	Phytohormones (mg/L)	Ratio of shoot formation	Number of shoots per explants
DRM-1	TDZ1.0 + IAA0.2	1.00	14.6 ± 0.2 a
DRM-2	TDZ2.0 + IAA0.2	1.00	13.8 ± 0.4 b
DRM-3	TDZ0.5 + IAA0.2	1.00	11.6 ± 0.5 c
DRM-4	TDZ4.0 + IAA0.2	1.00	8.7 ± 0.3 d

Data represent the mean values ± S.E. of 3 replicates recorded after 5 weeks. Means following the same letter for each line were not different statistically at 5% probability as determined by LSD multiple comparisons.

分别取发芽 6 周无菌苗的叶片和发芽 4 周无菌苗的下胚轴作为外植体 , 接种于直接再生培养基 DRM-1 上 , 4 周后有近半数外植体褐化死亡 ; 存活的外植体在伤口处产生小团绿色愈伤 , 直接出现再生芽的频率低于 5%(图 2C)。表明用叶片和下胚轴作为外植体来产生不定芽的效率较低。

植物体细胞无性系变异是植物组织培养中的普遍现象 , 但一般认为直接不定芽再生途径不容易发生变异^[15]。在本研究中 , 我们用 20 条随机引物 , 对由不定芽发生形成的再生植株进行 RAPD 分析以确定再生植株的变异(图 3)。RAPD 扩增共得到 115 条电泳条带 , 其中有 3 条引物检测到了对照和再生植株在 DNA 水平上的差异(表 5)。



图 2 不定芽再生

Fig. 2 Direct shoot regeneration

A : buds from seed explant cultured on DRM-1 medium for 3 weeks ; B : shoot regeneration from seed explant cultured on DRM-1 medium for 5 weeks ; C : buds from leaf explant cultured on DRM-1 medium for 5 weeks.

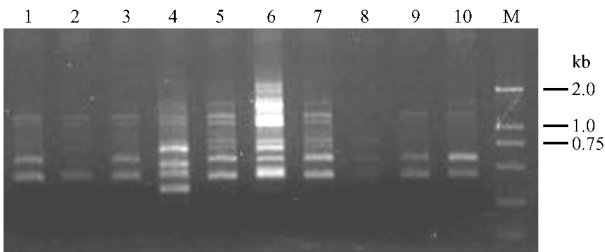


图 3 直接不定芽再生植株的 RAPD 分析(引物 S252)

Fig. 3 A profile of RAPD amplified from regenerants of *Plantago major* using primer S252

M : DNA ladder (DL-2 , 000 from TaKaRa); lane1 ~ 9 : regenerants ; lane10 : donor plant .

表 5 再生植株的 RAPD 结果统计

Table 5 RAPD analysis of direct shoot regenerated plantlets

Primer	Sequence	No. of amplified bands	Polymorphic fragments	
			Number	%
S251	AGACCCAGAG	8	0	0
S252	TCACCAGCCA	6	1	16.7
S253	GGCTGGTTCC	5	0	0
S254	TGGGTCCTC	6	0	0
S255	ACGGGCCAGT	5	0	0
S256	CTGCGCTGGA	8	1	12.5
S257	ACCTGGGGAG	8	0	0
S258	GAGGTCCACA	5	0	0
S259	GTCAGTGCGG	5	0	0
S260	ACAGCCCCCA	4	0	0
S401	GTGCTGGCT	6	0	0
S402	ACAACGCCTC	5	0	0
S403	GGGGGATGAG	7	0	0
S404	GGCGGTGTGTC	6	0	0
S405	GGGAACGTGT	8	1	12.5
S406	CTGGGCAACT	5	0	0
S407	CCGTGACTCA	5	0	0
S408	TCTGTTCCCC	4	0	0
S409	GTCTTGCGGA	5	0	0
S410	TCTGGCGCAC	4	0	0
Total		115	3	2.6

3 讨论

大车前不仅有很高的药用价值 ,在生态学研究

方面也是重要模式植物。近年来 ,关于大车前糖类和多羟基化合物运输的研究也有很多报道 ,已经克隆了 *PmSUC1*、 *PmSUC2* 和 *PmSUC3* (sucrose transporter)等 3 个调节蔗糖及麦芽糖的运输的基因和多羟基化合物的转运蛋白(polyol transporter)基因 *PmPLT1* 和 *PmPLT2* ,并对基因的功能作了初步的研究^[7]。要对大车前进行分子和细胞水平的深入研究 ,需要完善的组织培养体系作为重要辅助工具。

一般认为 ,较高的生长素和细胞分裂素比例有利于愈伤组织诱导和增殖^[16] ,Skoog 和 Miller^[17]提出的“ 激素平衡 ”学说认为 ,较高浓度的生长素有利于根的形成 ,而抑制芽的形成 ,较高浓度的细胞分裂素促进芽的形成 ,而抑制根的形成。车前属植物的组织培养目前报道的有 ,涂艺声^[9]以 2 ,4-D 诱导车前外植体脱分化 ,以 6-BA 诱导再生芽的分化 ;王秀芝^[10]等用 2 ,4-D 和 NAA 以及 ZT 诱导车前外植体脱分化 ,用 NAA 和 6-BA 诱导再生芽的分化。平车前的组织培养工作也有过报道^[11] ,以 2 ,4-D 和 ZT 诱导外植体脱分化和愈伤继代。我们建立的大车前愈伤途径再生中 ,以生长素 NAA 诱导愈伤的产生 ,以细胞分裂素 6-BA 诱导再生芽的分化 ,与其它许多植物组织培养的激素调控器官分化模式类似。

一般来说 ,在培养基里添加高浓度的细胞分裂素能促进芽大量形成 ,而极低浓度的 TDZ 就表现出芽再生效应 ,与细胞分裂素相当^[18]。在芽的诱导和植株再生方面 ,TDZ 类似细胞分裂素的活性已经在很多工作中得到证实 ,能够诱导多种植物产生直接不定芽^[19]。本文以种子为外植体 ,在 TDZ 和 IAA 的诱导下得到大车前的不定芽 ,表明 TDZ 在车前属植物组培中同样具有高效诱导不定芽的作用。

车前属植物的组织培养目前的报道中 ,涂艺声^[9]是以车前的下胚轴、茎尖、子叶柄和子叶作外植体 ,这四种外植体的愈伤诱导率差别不明显 ,但所得

到的愈伤诱导再生芽能力不同 : 下胚轴 > 茎尖 > 子叶柄 > 子叶 ; 王秀芝^[10]以车前的根段、叶片及叶柄作外植体 ; 王秀芝^[11]等以平车前的叶作外植体得到肿胀紧密型愈伤、以根段及受精胚珠诱导则得到疏松脆型愈伤 ; Mederos^[12, 13]以大车前的顶芽作外植体进行微繁。本研究以叶片作外植体诱导愈伤组织 , 以叶片为外植体进行离体再生和快繁 , 优势在于取材方便、可提供的材料充足。在直接不定芽再生体系里 , 我们比较了种子、叶片和下胚轴作外植体的诱导频率 , 结果表明 , 在同样的激素条件下 , 以叶片和下胚轴进行直接不定芽再生的频率远低于种子再生的频率。萌发种子在细胞分裂素作用下的再生已经在很多种植物中实现 , 一般认为再生的关键因素是种子直接在含有细胞分裂素的培养基上萌发、而且幼苗持续培养在同样的培养基上^[19]。我们在实验中的观察与上述结论相符合。与叶片、下胚轴等相比 , 种子用作外植体进行扩繁的优势在于取材不受时空的制约。

植物体细胞无性系变异(somaclonal variation)是指植物细胞经组织培养产生的遗传变异^[20]。与愈伤再生途径相比 , 直接不定芽再生途径对遗传物质具有“高度保真性” , 一般不容易发生变异 , 但也有些例外报道 : 从 *Nicotiana glauca* 叶外植体不经愈伤组织培养直接再生的不定植株 , 在花形、叶形、株高、花粉活力和染色体数目上都存在很大的变异^[21] ; 烟草体细胞变异在直接不定芽再生得到的植株里也存在^[22] ; 马铃薯叶柄和叶盘外植体通过直接不定芽方法得到的再生植株 , 在茎、叶、花和表皮观察到表型的变异 , 产生变异的原因可能是培养基里的某种添加剂物质诱发变异、也可能以叶轴和叶柄作为外植体而导致本身的大量自发变异^[23] ; 在亚洲百合对照(未辐照)的不定芽再生植株中也发现了表型变异 , 认为这些变异可能是体细胞自发突变引起 , 也可能是环境条件异常引起^[24]。

影响体细胞变异的因素有很多 , 植物基因型是最主要的因素。体细胞无性系变异是基因型依赖性的 , 即随基因型不同 , 变异的数量和程度也不同^[25]。有文献指出 , 茄科(Solanaceae)植物(如烟草、番茄、马铃薯)发生体细胞变异的频率较高^[26] , 上述不定芽再生途径产生变异的例子大多数属于茄科。对大车前的变异潜力尚没有研究 , 其基因型可能也是组织培养条件下较容易发生变异的类型。通常认为不定芽是从单细胞或特定组织的少数细胞起源的^[27, 28]。外遗传型(epigenotypes)在多细胞外植体中

预先存在时 , 也会在单细胞起源的再生植株上保持 , 从而反映外植体预先存在的外遗传多样性^[29]。因此 , 不定芽再生表现的变异也可能只是外植体里预先存在变异的表现。

本文以种子为外植体 , 成功诱导不定芽的产生 , 进而得到再生植株 , 从种子到得到完整再生植株只需要 4 ~ 5 周时间 , 平均每个外植体得到 14.6 个丛生芽 , 提高了培养效率 , 也为在植物组织水平进行有关的研究提供了前提保证。本文还以大车前叶片作为外植体 , 成功通过愈伤途径得到再生植株。植物离体细胞存在自发的染色体变异 , 因此许多研究者认为用细胞或组织培养方法 , 可以获得丰富的遗传变异^[30]。在作物育种方面 , 能够利用组织培养体系筛选抗盐、抗旱、抗寒突变体 , 扩大大车前对环境逆境的生长适应范围 , 还可以在此基础上建立基因转化体系 , 把有利的农艺性状以及相关抗性基因转入大车前 , 从而提高大车前的品质和抗逆性。

REFERENCES(参考文献)

[1] Guo SL(郭水良). Advances in ecology and evolutionary biology of genus *Plantago*. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2002 , 19(5): 567 – 574

[2] Fonseca F , Bowsher CG , Stulen I. Impact of elevated atmospheric CO₂ on nitrate reductase transcription and activity in leaves and roots of *Plantago major*. *Physiologia Plantarum* , 1997 , 100 : 940 – 948

[3] Zheng Y , Lyons T , Ollerenshaw JH *et al.* Ascorbate in the leaf apoplast is a factor mediating ozone resistance in *Plantago major*. *Plant Physiology and Biochemistry* , 2000 , 38(5): 403 – 411

[4] Reekie EG , Budge S , Baltzer JL *et al.* The shape of the trade-off function between reproduction and future performance in *Plantago major* and *Plantago rugelii*. *Canadian Journal of Botany* , 2002 , 80 : 140 – 150

[5] Ji DH(季大洪) , Xiao ZY(肖振宇). Study and application of Chinese traditional medicine Plantain. *The Journal of Pharmaceutical Practice*(药学实践杂志) , 2001 , 19(6): 361 – 362

[6] Michaelsen TE , Gilje A , Samuelsen AB *et al.* Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction , PM II , from the leaves of *Plantago major* L. *Scandia. Journal of Immunology* , 2000 , 52 : 483 – 490

[7] Gleixner MR , Geiger D , Hedrich R *et al.* Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology* , 2004 , 134 : 147 – 160

[8] Vicente O , Boscaiu M , Naranjo MA *et al.* Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of*

- [9] Tu YS(涂艺声). Cultivation of *Plantago asiatica* in vitro and plantlet regeneration. *Jiangxi Science*(江西科学), 1995, **13**(3): 149 – 152
- [10] Wang XZ(王秀芝), Wang I(王琳), Hou XY(侯信营). Tissue culture and plantlet regeneration of *Plantago asiatica*. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 1998, **34**(3): 204
- [11] Wang XZ(王秀芝), Zhang QP(张谦鹏), Guo SL(郭善利). Tissue culture of *Plantago depressa* Willd. *Journal of Liaocheng Teachers College*(*Nature Science*)(聊城师院学报自然科学版), 1997, **10**(2): 82 – 85
- [12] Mederos S, Mendez M. Tissue culture studies on *Plantago major* L.: Use of shoot-tip explants. *In vitro plant.-In vitro Cell. Development Biology*, 1991, **27**(3, part 2): 386
- [13] Mederos S, Martin C, Navarro E *et al.* Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. *Biologia Plantarum*, 1997, **40**(3): 465 – 468
- [14] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, **8**: 4321 – 4325
- [15] Rout GR, Samantaray S, Das P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 2000, **18**: 91 – 120
- [16] Yan CJ(颜昌敬). Handbook of Plant Tissue Culture(植物组织培养手册). Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers (上海科技出版社), 1990
- [17] Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposium of Society Experimental Biology*, 1957, **11**: 118 – 140
- [18] Xu XF(徐晓峰), Huang XI(黄学林). TDZ: An efficacious plant growth regulator. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2003, **20**(2): 227 – 237
- [19] Malik KA, Ali-Khan ST and Saxena PK. High-frequency organogenesis from direct seed culture in *Lathyrus*. *Annals of Botany*, 1993, **72**: 629 – 637
- [20] Diao XM(刁现民), Sun JS(孙敬三). Cytological and molecular biological research progress in plant somoclonal variation. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 1999, **16**(4): 372 – 377
- [21] Evans DA. Applications of Somaclonal Variation. In: A. Mizrahi (ed.). *Biotechnology in Agriculture*, 1988, pp. 203 – 223
- [22] Barbier M and Dulieu H. Early occurrence of genetic variants in protoplast cultures. *Plant Science Letter*, 1983, **29**: 201 – 206
- [23] van Harten AM, Bouter H and Broertjes C. *In vitro* adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato(*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica*, 1981, **30**: 1 – 8
- [24] Zhang KZ(张克中), Zhao XY(赵祥云), Huang SW(黄善武) *et al.* Variations of adventitious bud plants initiated from cutting scales of irradiated Lily. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*(核农学报), 2003, **17**(3): 215 – 220
- [25] Liu JPC(刘进平), Zheng CM(郑成木), Hu XW(胡新文). Research progress in plant somaclonal variation. *Journal of South China University of Tropical Agriculture*(华南热带农业大学学报), 2001, **7**(2): 22 – 29
- [26] Jain SM. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 2001, **118**: 153 – 166
- [27] Broertjes C. Mutation of breeding of *Strepto carpus*. *Euphytica*, 1969, **18**: 333 – 339
- [28] Broertjes C, Keen A. Adventitious shoots: Do they develop from one cell? *Euphytica*, 1980, **29**: 73 – 87
- [29] Neuhuber F, Park YD, Matzke AJM *et al.* Susceptibility of transgene loci to hom-ology-dependent gene silencing. *Molecular General Genetics*, 1994, **224**: 230 – 241
- [30] Yue W(岳玮), Xia GM(夏光敏), Chen HM(陈惠民) *et al.* Study on salt-tolerance of calli of *Aflupopus Littoralis* VAR. *Sinesis* and selection for high salt-tolerant variant. *Journal of Shandong University*(山东大学学报自然科学版), 2000, **35**(3): 338 – 343