

药蒲公英再生体系的建立和优化

Establishment and Optimization of the Regeneration System for Common Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber)

陈 华^{1,2}, 李 平¹, 刘 晶¹, 李银心^{1*}

CHEN Hua^{1,2}, LI Ping¹, LIU Jing¹ 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 Chinese Academy of Science, Beijing 100039

摘 要 通过愈伤组织诱导和直接不定芽再生途径, 建立了药蒲公英的快速高效再生系统。叶片外植体在含 0.2mg/L IAA 和 1mg/L TDZ 的 MS 培养基中培养 2 周后便产生大量的丛生芽, 在含有 0.5mg/L 2,4-D 和 2mg/L 6-BA 的 MS 培养基中培养 30 d 后, 形成明显的愈伤组织, 愈伤组织块在含 1.0mg/L 6-BA 的 MS 培养基中成功再生。对 9 株再生植株进行 RAPD 检测表明, 部分植株在 DNA 水平上发生了变异。与对照相比, 再生植株的主要抗氧化成分无明显变化, 保证了有效成分的稳定。

关键词 药蒲公英, 愈伤组织培养, 器官发生, RAPD

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0244-06

Abstract A protocol is presented for direct and indirect regeneration of common dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) from leaf and petiole explants. Multiple shoots were obtained on MS medium containing 0.2 mg/L IAA and 1 mg/L TDZ. For indirect regeneration, fragile calli were obtained from leaf and petiole explants on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 2.0 mg/L 6-BA. Regenerated plantlets were obtained when these calli were cultured on MS medium containing 1.0mg/L 6-BA. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of nine regenerated plantlets revealed 61 scorable bands from 10 primers, including three specific bands.

Key words common dandelion, callus culture, organogenesis, RAPD

通常, 我们将菊科 (*Compositae*) 蒲公英属 (*Taraxacum*) 的植物统称为蒲公英, 全属约 2000 余种, 主要产于北半球温带至亚热带地区。我国有 70 种, 1 变种, 广泛分布于东北、华北、西北、华中及西南各省区, 其中以 *Taraxacum mongolicum* 分布最广; 药蒲公

英 (*Taraxacum officinale* Weber) 主要分布于欧洲和北美, 在我国新疆也有少量分布^[1]。蒲公英是传统的中药材, 具有清热解毒, 消肿散结, 利尿通淋之功效^[2]。此外, 蒲公英作为一种优质的营养保健蔬菜, 越来越受到人们的青睐。蒲公英集食用和药用于一

Received: September 27, 2004; Accepted: December 15, 2004.

This work was supported by National High Technology Research and Development Program of China (No. 2003AA627010).

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

国家“863”高技术研究与发展计划项目资助 (No. 2003AA627010)。

身,人们称之为食疗蔬菜^[3]。

关于蒲公英属植物的研究过去主要集中在两个方面,即蒲公英的无融合生殖现象和蒲公英有效成分的研究。通过无融合生殖产生的个体在遗传上与母本相同,因此无融合生殖研究对作物改良过程中优良性状的保持意义重大。早期工作主要通过有性杂交将这一性状转入农作物,但结果并不理想;近年来,研究工作主要是从野生无融合生殖体(如药蒲公英的三倍体)中分离控制无融合生殖的基因,然后通过遗传转化转入作物中^[4],以期在目标作物中表达。无融合生殖现象是蒲公英属植物的重要生物学特征,其无融合生殖体主要为三倍体($2n = 3x = 24$)。良好的细胞系是研究药蒲公英无融合生殖的有效工具,可以从中直接分离相关基因,还能获得突变体来研究无融合生殖的机理和基因控制。蒲公英的化学成分复杂,其主要有效成分是抗氧化成分(保健作用,包括黄酮类物质和抗氧化酶等)和绿原酸(光谱抗菌作用)^[5]。最新研究发现,从药蒲公英根中提取的蒲公英甾醇(taraxasterol)具有抗肿瘤作用,使药蒲公英成为开发抗癌新药的又一个努力方向^[1]。

药蒲公英的组织培养工作有过报道,Booth 等人初步研究了不同的激素成分对药蒲公英再生的影响^[6];Bowes 将根段外植体接种于含 6.0mg/L 2,4-D 和 15% 椰乳的改良怀特培养基,6 周后,仅有 2 块外植体上形成愈伤组织^[7],将愈伤组织进行扩大培养后,在分化培养基上再生获得丛生芽,其中包括形态异常的畸形芽^[8]。药蒲公英的叶片基生,莲座状平铺于地面,自身不能进行营养繁殖,如果体外微繁成功,就可以建立药蒲公英的克隆群体。另一方面,为了对药蒲公英进行遗传转化和有效成分更加深入的研究,快速高效的再生系统是建立和开展这些工作所需要的基本实验平台,而已有的工作^[6,7,8]还不系统,再生频率较低。

本文以药蒲公英叶片和叶柄为外植体,通过两种器官发生方式——不定芽直接再生和愈伤组织再生途径实现了药蒲公英的再生,建立了高频率体外再生系统。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为药蒲公英 (*Taraxacum officinale* Weber) 无菌苗,种子购自意大利 SAIS 公司。种子经常规消毒后(70% 酒精消毒 30s, 10% NaClO 消毒 6min, 无菌水冲洗 4 次)接种在 1/2 MS 培养基,黑暗

中培养。4d 后多数种子已萌发,转移至光下培养,1 月后成苗,苗高 6~8cm。

1.2 培养基

整个组织培养过程中,培养条件为:温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,每天光照 12h,光照强度 3000lx。为了得到最佳诱导培养基,叶片外植体以 40~60 块为一组,分别接种到 7 种不同培养基上;将叶片和叶柄外植体接种到 1~12 号培养基 (Table 1) 以诱导愈伤组织。外植体的取材和接种都随机进行。获得的愈伤组织转移至培养基 CR1~4 (MS 基本培养基中分别添加 0.5, 1.0, 2.0, 3.0mg/L 6-BA) 以实现愈伤组织的再生,根据公式 $RGR = (FW_t - FW_i) / FW_i$ 计算出愈伤块在 CR1~4 的相对生长率 (RGR), FW_t 表示测定时的愈伤鲜重, FW_i 表示愈伤的原始重量。再生芽转移到生根培养基 (1/2MS 培养基) 以获得完整的再生植株。

表 1 药蒲公英愈伤组织诱导培养基

Table 1 Media used for callus induction of common dandelion

Medium No.	Phytohormones/(mg/L)			Medium No.	Phytohormones/(mg/L)		
	6-BA	2,4-D	NAA		6-BA	2,4-D	NAA
1	0	0	0.2	7	0	1.0	0
2	0	0	0.5	8	0	2.0	0
3	0	0	1.0	9	1.0	0.5	0
4	0	0	2.0	10	2.0	0.5	0
5	0	0.2	0	11	2.0	1.0	0
6	0	0.5	0	12	1.0	1.0	0

1.3 再生植株的 RAPD 检测

植物总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[9],RAPD 反应采用 12.5 μL 反应体系,不加矿物油,成分为引物 (8 $\mu\text{mol/L}$) (Sangon 产品) 1.25 μL , TaqDNA 聚合酶 (5 u/ μL , 一次性购自北京夏斯生物技术公司) 0.25 μL , MgCl₂ (25mmol/L) 1.25 μL , 10 \times buffer 1.25 μL , 基因组 DNA (17.6mg/L) 1.25 μL , dNTP (10mmol/L) 1.25 μL , 超纯水 7 μL 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30s; 36 $^{\circ}\text{C}$, 30s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2min, 40 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 7min。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,溴乙锭染色, Alphaimager 凝胶成像系统观察并记录结果。

1.4 再生植株叶片中总黄酮含量和 SOD、POD 活性的测定

总黄酮含量测定参照孟祥颖等^[10]的方法,超氧

化物歧化酶(SOD)活力测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[11], SOD活性以抑制NBT光化还原的50%作为一个酶活性单位;过氧化物酶(POD)活力测定采用愈创木酚显色法^[11], 活力大小以每克材料的光密度变化值($\Delta OD_{470}/g \cdot FW$)表示。每种抗氧化成分的测定各取三株温室栽培的药蒲公英植株、通过直接不定芽再生而来的植株和由愈伤组织再生而来的植株进行测定, 取平均值并计算标准误。愈伤再生植株选取RAPD分析无变异的单株, 以排除变异对抗氧化成分的影响。

2 结果

2.1 直接不定芽再生体系的建立

菊科植物具有较高的再生潜能^[12], 预实验中, 药蒲公英无菌苗叶片被分为叶柄、狭部和无中脉的叶片3部分, 分别接种在不含激素的MS培养基上。23d后, 在光照或黑暗条件下, 3种外植体上都分化出不定芽(Fig 1. A-C)。将叶片外植体接种在分别含有0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0mg/L 6-BA的MS培养基中, 也产生丛生芽(Table 2), 但再生频率和平均诱芽数较低, 其中在含1.0mg/L 6-BA的培养基中, 平均诱芽数为3.4个。

表3 叶片外植体在1~7号培养基上形成不定芽

Table 3 Adventitious shoot formation from leaf explants of common dandelion on Medium 1~7

Medium	1(IAA0.2, 6-BA1.0)	2(IAA0.2, 6-BA2.0)	3(IAA0.2, 6-BA4.0)	4(IAA0.2, TDZ1.0)	5(IAA1.0, 6-BA1.0)	6(IAA1.0, TDZ1.0)	7(IAA0.2, TDZ2.0)
Number of shoots per explants	5.7 ± 0.4	6.5 ± 0.4	12.0 ± 1.3	14.6 ± 1.1	2.9 ± 0.5	7.5 ± 0.6	3.7 ± 0.6
Frequency of shoot formation%	51 ± 1.7	71 ± 3.6	70 ± 3.3	87 ± 2.2	57 ± 3.6	85 ± 2.4	84 ± 1.5

Data represent the mean values ± SE of three independent experiments. All data were scored after cultured for 3 weeks. Unit of phytohormone is mg/L.

2.2 愈伤组织诱导及植株再生

为了诱导愈伤组织, 将叶片和叶柄外植体接种在1~12号愈伤诱导培养基中。1至4号培养基中NAA浓度从0.2~2.0mg/L形成一个梯度。培养4周后, 叶片外植体的边缘发生极轻微的愈伤化, 大部分外植体上长出大量不定根, 生根能力从1号到4号明显递增, 说明NAA可高效诱导根的形成。5至8号培养基中2,4-D浓度从0.2~2.0mg/L形成一个梯度。培养两周后外植体两端开始愈伤化, 愈伤组织不明显。培养35d后, 5号和6号培养基中大部分叶柄外植体完全愈伤化, 而叶片外植体愈伤化程度低, 并且褐化。7号和8号培养基中绝大多数叶柄

表2 叶片外植体在含不同浓度6-BA的培养基上的分化
Table 2 Differentiation of leaf explants on MS medium containing 0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0mg/L of 6-BA

6-BA/(mg/L)	Shoot regeneration response/%	Number of shoots /explants	Average shoot height/cm
0 (i.e. MS medium)	0.17 ± 0.10	1.0 ± 0.0	2.87 ± 0.75
1.0	0.92 ± 0.12	3.4 ± 0.57	1.96 ± 0.28
1.5	0.74 ± 0.23	1.78 ± 0.16	1.74 ± 0.35
2.0	0.73 ± 0.18	1.80 ± 0.52	0.98 ± 0.18
3.0	0.35 ± 0.02	0.49 ± 0.07	0.35 ± 0.09

Data represent the mean values ± SE of three independent experiments.

All data were scored after cultured for 23 days.

为了建立更高频率的再生体系, 将叶片外植体接种在1~7号培养基中(Table 3)。接种2周后, 在3号培养基(MS + 0.2mg/L IAA + 4mg/L 6-BA)和4号培养基(MS + 0.2mg/L IAA + 1mg/L TDZ)中均分化出大量丛生芽(Fig. 1D-F), 但3号培养基中, 外植体的再生频率及平均诱芽数低于4号培养基; 2, 6, 7号培养基中分化频率也比较高, 但它们的平均诱芽数仅为3~7个, 远小于3, 4号培养基; 因此, 4号培养基是诱导药蒲公英叶片外植体再生大量丛生芽的最佳培养基。将种子(Fig. 1G)和叶柄(Fig. 1H)外植体接种在4号培养基上, 也获得了高频率的再生。

和叶片外植体褐化死亡, 说明高浓度的2,4-D能将外植体杀死。9~12号培养基为不同激素的组合, 培养4周后, 9号和11号培养基中外植体愈伤化程度明显低于10号和12号培养基, 后两者形成的愈伤组织比较疏松(Fig. 2A, B), 产生愈伤组织的频率均为100%。根据外植体对上述激素组合的反应, 10号培养被选为愈伤组织诱导培养基, 对诱导愈伤而言, 叶柄外植体要优于叶片外植体。

前人在诱导药蒲公英愈伤组织的研究中, 普遍使用根段为外植体, 而且在培养基中都加入了不同浓度的椰乳^[5, 6]。药蒲公英为直根系, 选择根段为外植体会受到材料数量的限制, 不利于大规模的组

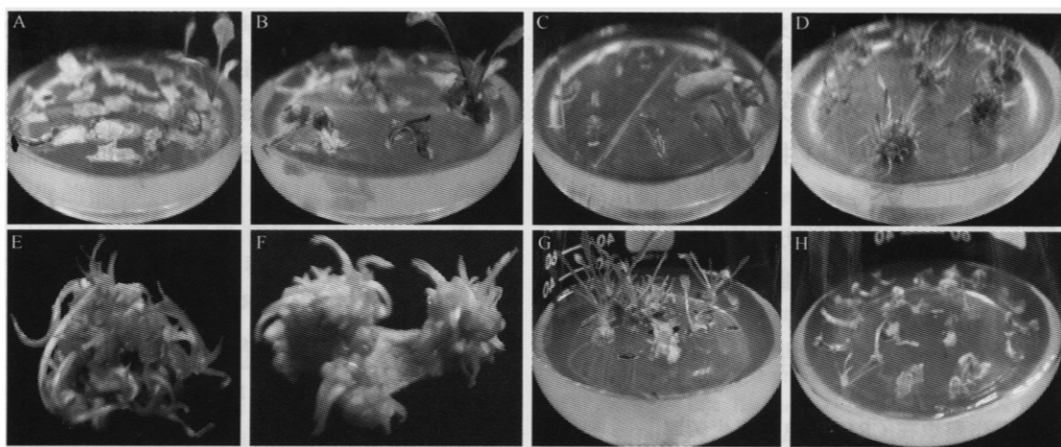


图 1 药蒲公英不同外植体的再生

Fig. 1 Plant regeneration from different explants of *Taraxacum officinale* Weber

A ~ C: indicates adventitious shoots from leaf, transition zone and petiole explants cultured on MS medium one month later; D and E: indicates adventitious buds from leaf explants after 17 days in Medium 4; F: adventitious buds from leaf explants after 17 days in Medium 3; G: adventitious shoots from seed explants after one month in Medium 4; H: response (short-time callus stage and a few adventitious shoots formation) of petiole explants cultured on Medium 4 for two weeks.

织培养工作;椰乳是一种有效的有机添加成分,在植物组织培养的早期被广泛使用,但由于其成分复杂,不利于对组织培养过程中脱分化及再分化机理的研究。本实验中,我们以叶片和叶柄为外植体,在不添加椰乳的培养基中成功实现了愈伤组织的诱导,与 Bows 的工作^[6]相比,愈伤组织形成的时间缩短了 20 多天。

将愈伤组织在 10 号培养基中继代,3 周 1 次。

继代 2 次后,转入再生培养基 CR1 ~ 4 及 1/2MS。3 周后,在培养基 CR1 ~ 4 中都有不定芽的形成 (Fig. 2C),在培养基 CR3 和 CR4 中,芽的形成频率比较低,而且大部分愈伤块褐化,说明较高浓度的 6-BA 抑制愈伤组织的再生 (Table 4)。在 1/2MS 培养基中培养 60d 后,少数愈伤组织 (约占 1/10) 也分化出芽。Bows 报道了愈伤组织再生过程中畸形芽的产生^[7],本工作中也观察到愈伤组织再生形成的形态异常的

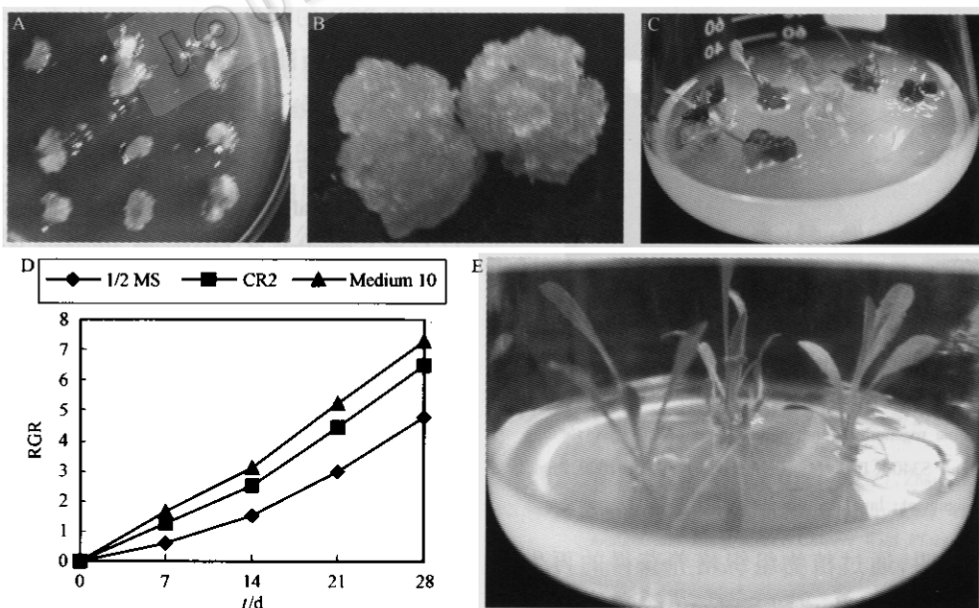


图 2 愈伤组织的诱导和再生

Fig. 2 Induction and regeneration of callus

A and B: calli subcultured on callus induction Medium 10; C: calli with regenerated shoots in CR2, arrow marks the abnormal shoot; D: relative growth rate in 1/2 MS, CR2 and Medium 10; E: elongated plantlets in rooting medium.

畸形芽,其中 CR3 和 CR4 中畸形芽的比列明显高于 CR1 和 CR2,而 CR2 中愈伤块的再生频率(50%)高于 CR1(43%),因此将 CR2 确立为愈伤最佳分化培养基。愈伤块在 CR2 中的相对生长速率低于在愈伤继代生长培养基(即 10 号培养基)中的生长速率,如 Fig.2D 所示,继代 28d 后,愈伤块在 10 号培养基中的相对生长率为 7,说明愈伤鲜重是继代前的 8 倍左右。将分化出的不定芽分离后接种在 MS 培养基中,10d 后生根,形成完整的再生植株(Fig. 2E)。

表 4 愈伤组织在 CR1~4 中的再生频率

Table 4 Frequency of regeneration of calli in CR1~4

Medium	No. of browned calli/total calli	No. of regenerated calli/total calli	No. of shoots/total regenerated calli	No. of abnormal shoots/total shoots
CR1	0.64 ± 0.13	0.43 ± 1.00	1.18 ± 0.19	0.49 ± 0.16
CR2	0.60 ± 0.11	0.50 ± 0.24	1.58 ± 0.48	0.32 ± 0.15
CR3	0.80 ± 0.19	0.28 ± 0.19	1.33 ± 0.58	0.53 ± 0.06
CR4	0.72 ± 0.10	0.12 ± 0.14	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00

Data represent the mean values ± SE of three independent experiments.

All data were scored after cultured for 3 weeks.

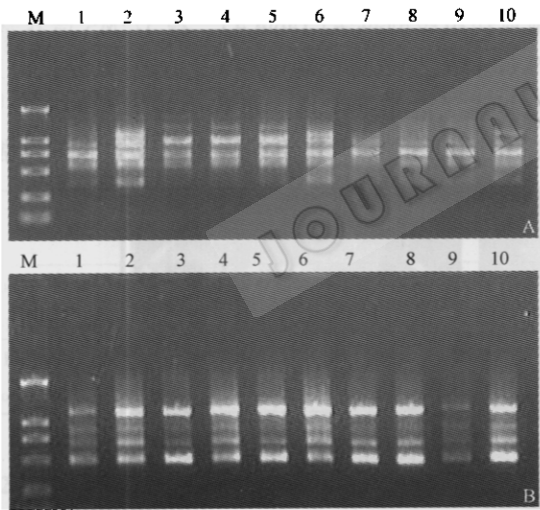


图 3 再生植株的 RAPD 分析

Fig.3 RAPD analysis patterns of the regenerated plantlets

RAPD patterns of nine regenerants and mother plant of *T. officinale* by primer S337 (A) and S340 (B). M: DNA Ladder (D, L-2000 from TaKaRa). Lane assignment: lane1 mother plant; lane2~10 regenerants.

大量资料表明,通过植物组织培养获得的再生植株经常发生变异。Larkin 和 Scoworft 综述了在多种植物上的观察结果,把再生植株变异的现象成为体细胞无性系变异^[13]。已有报道通过 RAPD 分别检测了大蒜^[14]和小麦^[15]中由愈伤组织获得的再生植株中的变异。本实验中,我们用 10 条随机引物,

对由愈伤组织形成的再生植株进行 RAPD 分析以确定再生植株的变异(Fig. 3)。RAPD 扩增共得到 61 条电泳条带,平均每条引物可扩增得到 4.9 条,其中有 3 条为特异条带,表明了对照和再生植株在 DNA 水平上的差异(Table 5)。

表 5 再生植株的 RAPD 分析结果统计

Table 5 Results of RAPD analysis of callus-derived regenerated plantlets

Primer	Sequence	No of amplified bands	Polymorphic fragments	
			Number	%
S331	CTCAGTCGCA	6	1	16.7
S332	TCAACGGGAC	6	0	0
S333	GACTAAGCCC	7	0	0
S334	TGGGAGGTTC	4	0	0
S335	CAGGCCTTTC	6	1	16.7
S336	TCCCCATCAC	8	0	0
S337	CCTTCCCCT	7	1	14.3
S338	AGGCTCTGTG	6	0	0
S339	GTCCGAGCAA	7	0	0
S340	ACTTTGCCGG	4	0	0
Total		61	3	4.9

2.3 再生植株抗氧化成分分析

药蒲公英具有药用和营养保健价值,其有效成分非常复杂,而抗氧化物质(包括抗氧化物质和抗氧化酶)是主要有效成分之一,我们测定了药蒲公英再生植株中的总黄酮含量,并测定了抗氧化酶——SOD 和 POD 的活性(Table 6)。从表中可以看出,与温室栽培的药蒲公英相比,再生植株的抗氧化成分并无明显变化,保证了有效成分的稳定。

表 6 药蒲公英再生植株中抗氧化成分分析

Table 6 Analysis of anti-oxidant matters in regenerated plantlets of *Taraxacum officinale* Weber

Materials	Total flavonoids (mg/g·DW)	SOD (u/g·FW)	POD ($\Delta OD_{470}/g\cdot FW$)
WT in greenhouse	25.7 ± 0.15	142.51 ± 0.25	13.52 ± 0.32
Regenerated plantlets			
by direct shoot regeneration	27.1 ± 0.12	150.43 ± 0.22	15.23 ± 0.11
Regenerated plantlets from calli	23.9 ± 0.22	146.73 ± 0.14	12.51 ± 0.15

3 讨论

药蒲公英的组织培养工作具有重要意义。首先,药蒲公英愈伤组织(无性系)可以作为基础研究的平台,用于研究无融合生殖现象的机理,或从中分

离无融合生殖相关基因。其次,药蒲公英具有很高的再生潜能,可以用来研究组织培养过程中器官发生和体细胞无性系变异的机理;而从应用角度看,体外高效再生系统的建立对于突变体筛选和遗传转化都是必不可少的前提条件:在农杆菌介导的遗传转化过程中,由于农杆菌的侵染和抗生素的存在,都会使再生频率降低,因而一个高效的再生体系是转化成功的关键。

药蒲公英是一种重要的药用植物,已有关于愈伤组织诱导的报道^[16,17,18]大都与成分分析联系在一起。Akashi等^[18]对愈伤组织细胞、再生植株和野生型植株的三萜类化合物进行了比较:愈伤组织细胞中主要三萜类化合物是三萜酸,再生植株和野生型植株中则是三萜醇。我们获得的药蒲公英再生植株中,总黄酮含量及SOD、POD活性与温室栽培的药蒲公英无明显差别,并与文献[19,20]中记载的*Taraxacum mongolicum*(我国中药市场的主流品种和自然界的主要分布种)同类物质的含量相当。但药蒲公英的生物量更大,作为保健蔬菜具有更大的市场价值。

通过组织培养获得再生植株有两种途径,即器官发生和体细胞胚胎发生,器官发生途径又有两种方式:(1)外植体经过短暂的愈伤阶段或不经愈伤阶段而直接分化形成大量不定芽;(2)外植体先脱分化形成愈伤组织,然后由愈伤组织经过诱导分化形成再生植株。直接不定芽再生途径对母本的遗传物质具有“高保真性”,很少发生变异,是植物基因工程中最好的遗传转化系统^[21]。愈伤组织形成的再生植株常发生体细胞无性系变异,人为的定向筛选可以从体细胞变异体中选择有价值的细胞系。本文成功实现了两种器官发生途径,为药蒲公英的遗传转化提供了优良的转化系统,而通过药蒲公英的愈伤组织培养,可以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以及药蒲公英的耐盐突变体。

REFERENCES(参考文献)

- Zhao SX(赵守训), Hang BQ(杭秉倩). Chemical components and pharmacologic function of dandelion. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), 2001, **20** (3): 1-3
- Guo WY(郭文场), Xu QG(徐启国). Utilization and cultivation of dandelion. *Plants*(植物杂志), 2001, (1): 24-25
- Chen H(陈 华), Li YX(李银心). Biotechnological breeding for salt tolerance of dandelion. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2004, **21**(1): 19-25
- Molinari L, Busti A, Calderini O *et al.* Plant regeneration from callus of apomictic and sexual lines of *Paspalum simplex* and RFLP analysis of regenerated plants. *Plant Cell Rep.* 2003, **21**: 1040-1046
- Shao ZC(劭志广), Wu GR(吴国荣), Zhang WM(张卫明) *et al.* Effects on SOD activity of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz in different ecological environment. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), 2001, **20** (3): 20-21
- Booth BA, Satchuthananthavale R. Regeneration in root cuttings in *Taraxacum officinale*. *New Phytol.* 1974, **73**: 453-460
- Bowes BG. Preliminary observation on organogenesis in *Taraxacum officinale* tissue cultures. *Protoplasma*, 1970, **71**: 197-202
- Bowes BG. The occurrence of shoot teratomata in tissue culture of *Taraxacum officinale*. *Planta*, 1971, **100**: 272-276
- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, **8**: 4321-4325
- Meng XY(孟祥颖), Lu Q(鲁 歧), Zhao Y(赵 英) *et al.* Comparison of isoflavones in stem and root of *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi. *Journal of Plant Resources and Environment* (植物资源与环境), 1996, **5**: 26-28
- Li HS(李合生). *Experimental Principles and Techniques of Plant Physiology and Biochemistry* (植物生理生化实验原理和技术). Beijing: Higher Education Press (高等教育出版社), 2001
- Min SR, Kim YH, Jeong WJ *et al.* High frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in leaf explant cultures of *Ixeris sonchifolia* Hance, a newly proposed model plant for organogenesis. *J Plant Biotech*, 2003, **5**: 221-224
- Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation—a novel variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 1981, **60**: 197-214
- Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep*, 1999, **18**: 473-477
- Brown PTH, Lang FD, Kranz E *et al.* Analysis of single protoplast and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Mol Gen Genet*, 1993, **237**: 311-317
- Hook I, Sheridan G, Wilson G. Volatile metabolites from suspension cultures of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*, 1991, **30**: 3977-3980
- Furuno T, Kamiyama A, Akashi T *et al.* Triterpenoid constituents of tissue cultures and regeneration organs of *Taraxacum officinale*. *Plant Tissue Cult Lett*, 1993, **10** (3): 275-280
- Akashi T, Furuno T, Takahashi T *et al.* Biosynthesis of triterpenoids in cultured cells and regenerated and wild plant organs of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*, 1994, **36** (2): 303-308
- Zhang WM(张卫明), Wu GR(吴国荣), Ma SH(马世宏) *et al.* Study on skin-protection function of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), 2001, **20** (3): 15-17
- Lu CM(陆长梅), Rui HY(芮海云), Zhang WM(张卫明) *et al.* Detection and comparison of anti-oxidant matters in *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), 2001, **20** (3): 18-19
- Ibrahim R, Debergh PC. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). *Scientia Horticulturae*. 2001, **88**: 41-57