

· 技术方法 ·

毛建草愈伤组织诱导及植株再生

田旭平*, 岳康杰, 王佳丽, 刘慧欣, 史子尹, 亢红伟

山西农业大学林学院, 太谷 030801

摘要 毛建草(*Dracocephalum rupestre*)是一种重要的药用植物。然而, 其叶片外植体再生系统尚未建立。以毛建草大田叶片和组培苗叶片为外植体, 探讨植物生长调节剂对愈伤组织诱导和分化、不定芽增殖及生根的影响, 建立了叶片离体再生体系。结果表明, 大田叶片愈伤组织诱导的最适培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ IAA, 诱导率达84.51%, 不定芽分化最佳培养基为MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ TDZ+0.5 mg·L⁻¹ IAA, 分化率为66.37%; 组培苗叶片愈伤组织诱导的最适培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ IAA, 诱导率达86.73%, 不定芽分化最佳培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ IAA, 分化率为53.48%。不定芽增殖适宜培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA, 增殖率为83.57%, 最适生根培养基为1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ IBA, 生根率为86.97%; 在草炭:蛭石=1:1 (v/v)的混合基质中组培苗长势最好。该研究建立了毛建草叶片离体培养再生体系, 为毛建草种质资源保存和种苗快繁提供了技术支持。

关键词 毛建草, 愈伤组织诱导, 分化, 增殖, 生根

田旭平, 岳康杰, 王佳丽, 刘慧欣, 史子尹, 亢红伟 (2024). 毛建草愈伤组织诱导及植株再生. 植物学报 59, 613–625.

毛建草(*Dracocephalum rupestre*)又名岩青兰, 是唇形科青兰属多年生草本植物, 花色呈蓝紫色, 在园林绿化中常用于花境及花坛(宗越, 2019)。毛建草含有黄酮和多糖等多种药用成分, 可全草入药, 具有抗菌、消炎和清热等功效; 也可用于治疗咳嗽等疾病(杨宇昊, 2023)。在自然环境中, 毛建草主要通过种子、分株(张彦广, 2006)及珠芽繁殖(田旭平等, 2021), 但这些繁殖方式效率低、耗时长, 易受自然环境影响, 极大地限制了毛建草产量提高。因此, 毛建草种苗繁育研究亟待加强。

目前, 国内外对毛建草组织培养的研究主要集中在种子萌发及愈伤组织诱导, 由于在愈伤组织再分化过程中仅分化出不定根, 难以分化出不定芽, 因此尚未建立完整的植株再生体系(刘俊等, 2017; 宗越, 2019; 桑晓霞, 2021)。本研究以毛建草大田叶片和组培苗叶片为外植体, 通过愈伤组织诱导、愈伤组织再分化不定芽、不定芽增殖及生根等过程, 建立了毛建草完整的植株再生体系, 为开发和利用毛建草资源,

实现其种质资源保存和种苗快繁奠定基础。

1 植物材料

本研究以毛建草(*Dracocephalum rupestre* Hance) 2种叶片为外植体。大田叶片采自山西农业大学林业站种植的毛建草植株。组培苗叶片取自毛建草带芽茎段在1/2MS培养基中培养30天、继代2次的组培苗, 以其顶部幼嫩叶片为外植体。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体处理

用清水洗去叶片表面灰尘, 在含洗洁精的水溶液中浸泡15分钟, 流水冲洗30分钟后, 在超净工作台上进行表面消毒。先用75%乙醇浸泡30秒, 无菌水清洗3次, 然后用0.1% HgCl₂浸泡4分钟, 无菌水冲洗5–6次。将处理后的叶片沿主脉切成0.5 cm²的小块, 接入含不同浓度植物生长调节剂的MS培养基中进行愈伤组织

收稿日期: 2023-12-29; 接受日期: 2024-05-13

基金项目: 山西农业大学科技创新基金(No.2020BQ37)

* 通讯作者。E-mail: txp8638@sina.com

诱导。

2.2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响

在MS培养基中分别添加6-苄基腺嘌呤(6-BA)、噻苯隆(TDZ)和6-糠基氨基嘌呤(KT), 浓度分别为0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹。取2种叶片沿主脉横切3次形成伤口, 切成0.5 cm²小块, 接种时叶面朝上。每处理接种20个叶片, 设3次重复。30天后统计并记录愈伤组织发生时间、诱导率及生长状态。

将6-BA (0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹)与2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、吲哚-3-乙酸(IAA) (0、0.1、0.5和1.0 mg·L⁻¹)进行组合。每处理接种20个叶片, 设3次重复。30天后统计并记录愈伤组织发生时间、诱导率及生长状态。

2.3 植物生长调节剂对愈伤组织分化的影响

将愈伤组织切成0.5 cm²小块后进行转接。MS培养基中分别添加6-BA (1.0、2.0和3.0 mg·L⁻¹)、TDZ (0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹)和IAA (0.05、0.5和1.0 mg·L⁻¹)或NAA (萘乙酸) (0.05、0.5和1.0 mg·L⁻¹)。每处理接种20块愈伤组织, 重复3次。30天后统计不定根及不定芽分化率。

2.4 植物生长调节剂对不定芽增殖的影响

将分化的不定芽切分成单芽, 接种至含6-BA (0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹)与NAA (0.01、0.05和0.1 mg·L⁻¹)组合的MS培养基中。每处理接种15个不定芽, 重复3次。30天后统计不定芽增殖率、增殖系数及株高。

2.5 植物生长调节剂对不定芽生根的影响

将增殖的不定芽切分成单芽, 分别转接至含有NAA (0、0.1、0.5和1.0 mg·L⁻¹)和吲哚丁酸(IBA) (0、0.1、0.5和1.0 mg·L⁻¹) 16种组合的1/2MS培养基中。每处理接种15个芽, 重复3次。30天后观察不定芽的生根情况, 统计生根率。

2.6 炼苗与移栽

当组培苗长至高3.0 cm、根长2.0 cm时, 开盖并倒入清水。室温下放置2天, 再转到室外培养3天, 取出苗用蒸馏水清洗, 将其移栽到装有已消毒基质(草炭土:

蛭石=1:1, v/v)的花盆中。

2.7 培养条件

基础营养培养基为MS、1/2MS培养基中添加30 g·L⁻¹蔗糖和7 g·L⁻¹琼脂。培养条件: 温度(25±1)°C, 光照强度3 000 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为16小时光照/8小时黑暗。

2.8 数据统计分析

愈伤组织诱导率=(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100%;

分化率=(分化的愈伤组织数/接种愈伤组织数)×100%;

不定芽增殖率=(增殖芽数/接种芽数)×100%;

成活率=(成活苗数/接种数)×100%;

生根率=(生根苗数/成活苗数)×100%。

采用SPSS和Excel软件进行数据整理及统计分析。

3 结果与讨论

3.1 细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

将2种叶片切成0.5 cm²的小块, 叶面朝上分别接种于含不同浓度6-BA、TDZ和KT组合的愈伤组织诱导培养基中(表1)。接种时轻压叶片, 使其与培养基充分接触。

2种叶片愈伤组织的发生时间随细胞分裂素浓度(0.5–2.0 mg·L⁻¹)的增加而缩短(表1)。诱导大田叶片愈伤组织发生时间的先后顺序依次是KT>6-BA>TDZ; 诱导组培苗叶片愈伤组织发生时间的先后顺序依次是6-BA>KT>TDZ。

2种叶片的愈伤组织诱导率均随6-BA和TDZ浓度的升高而增加, 随KT浓度的升高呈先增后降趋势。三者比较, 6-BA诱导2种叶片愈伤组织诱导率最高。

叶片外植体在接种后第3天开始膨大, 随后在叶脉伤口处形成愈伤组织, 此时愈伤组织生长缓慢。培养20天后, 愈伤组织逐渐扩增, 直至叶片完全形成愈伤组织(图1)。不同植物生长调节剂诱导的叶片愈伤组织颜色及质地不一。对于大田叶片, 经6-BA诱导的愈伤组织呈淡黄或淡黄绿色(图2A), TDZ诱导的愈伤组织呈绿色, 伴白色斑点(图2B), KT诱导的愈伤组织呈褐色或褐黄色(图2C)。组培苗叶片经6-BA诱导的愈伤

表1 细胞分裂素对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of cytokinins on callus induction from leaves

Type	6-BA (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)	KT (mg·L ⁻¹)	Occurrence time (d)	Induction rate (%)	Callus growth state
Leaves of field planted individual	0.5	—	—	10.25±4.65 a	40.36±3.17 b	Yellow with a firm and dense texture
	1.0	—	—	7.58±1.29 b	65.21±9.94 a	Pale yellow-green, loose, and a softer texture
	2.0	—	—	6.92±1.17 b	67.07±9.05 a	Pale yellow, loose and watery in appearance, with a soft texture
	—	0.5	—	16.25±3.39 a	37.98±5.73 b	Green, loose, and soft in texture, with a loose consistency
	—	1.0	—	15.83±3.58 a	40.17±7.53 b	Green, loose, with white spots, a soft texture
	—	2.0	—	11.50±2.88 b	62.53±6.66 a	Green, loose, with white spots, a soft texture
	—	—	0.5	9.50±2.60 a	35.19±6.73 b	Yellow, compact, with a somewhat hard texture
	—	—	1.0	8.17±2.44 ab	57.06±9.06 a	Brownish-yellow, compact, with a soft texture
	—	—	2.0	6.67±1.45 b	42.53±5.84 b	Brown, loose, resembling water stains, with a soft texture
Leaves of tis- sue-cultured seedling	0.5	—	—	11.08±2.69 a	47.33±8.53 b	Yellow with a firm and dense texture
	1.0	—	—	10.33±1.48 a	55.76±7.85 ab	Yellow-green, loose, with a relatively soft texture
	2.0	—	—	8.17±1.27 b	68.01±6.46 a	Yellow-green, loose, with a relatively soft texture
	—	0.5	—	14.17±2.99 a	33.63±5.79 b	Green, loose, with a soft texture
	—	1.0	—	12.33±1.03 ab	45.36±9.64 ab	Green, compact, with a hard texture
	—	2.0	—	10.33±2.63 b	55.61±9.07 a	Green, loose, with a relatively soft texture
	—	—	0.5	12.92±3.62 a	40.75±8.32 b	Pale yellow, loose, with a hard texture
	—	—	1.0	11.25±2.65 a	63.59±7.07 a	Pale yellow, loose, with a softer texture
	—	—	2.0	8.83±1.58 b	52.29±9.41 ab	Pale yellow, loose, and loosely resembling water stains in texture

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。—表示未添加6-BA、TDZ或KT。
The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). — indicate that 6-BA, TDZ, or KT are not added.

组织呈黄色或黄绿色(图2D), TDZ诱导的愈伤组织呈绿色, 无白色斑点(图2E), KT诱导的愈伤组织呈淡黄色(图2F)。

3.2 6-BA与IAA组合对叶片愈伤组织诱导的影响

大田叶片在培养6–15天时形成愈伤组织。当6-BA浓度为0.5或1.0 mg·L⁻¹时, 大田叶片愈伤组织的发生时间随IAA浓度的增加呈先升后降趋势, 6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织的发生时间随IAA浓度的增

加呈推迟趋势。组培苗叶片在培养8–18天时形成愈伤组织。当6-BA浓度为0.5–2.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织的发生时间随IAA浓度的增加呈推迟趋势(表2)。

大田叶片的愈伤组织诱导率介于26.72%–67.55%之间, 组培苗叶片的愈伤组织诱导率在24.07%–68.73%之间。相同条件下, 大田叶片的愈伤组织诱导率显著高于组培苗叶片($P<0.05$)。不添加IAA时, 2种叶片的愈伤组织诱导率均较高, 但愈伤组织质量较差, 添加0.1 mg·L⁻¹ IAA后可改善愈伤组织的生长状态。

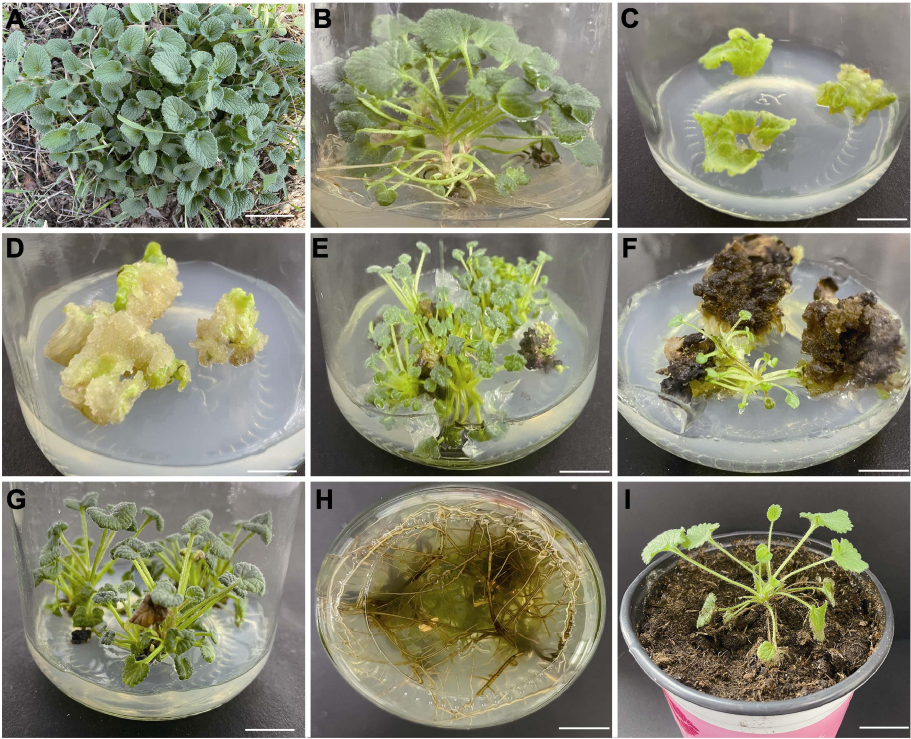


图1 叶片愈伤组织诱导及植株再生
(A) 大田叶片; (B) 组培苗; (C) 叶片膨大; (D) 愈伤组织诱导; (E) 大田叶片愈伤组织分化不定芽; (F) 组培苗叶片愈伤组织分化不定芽; (G) 不定芽增殖; (H) 根系状态; (I) 移栽。Bars=2 cm

Figure 1 Callus induction and plant regeneration from leaves
(A) Field planted leaves; (B) Tissue culture seedling; (C) Leaf blade expansion; (D) Induction of callus; (E) Adventitious bud differentiation of leaves of field planted individual; (F) Adventitious bud differentiation of leaves of tissue-cultured seedling; (G) Adventitious bud proliferation; (H) Root system status; (I) Transplanting. Bars=2 cm

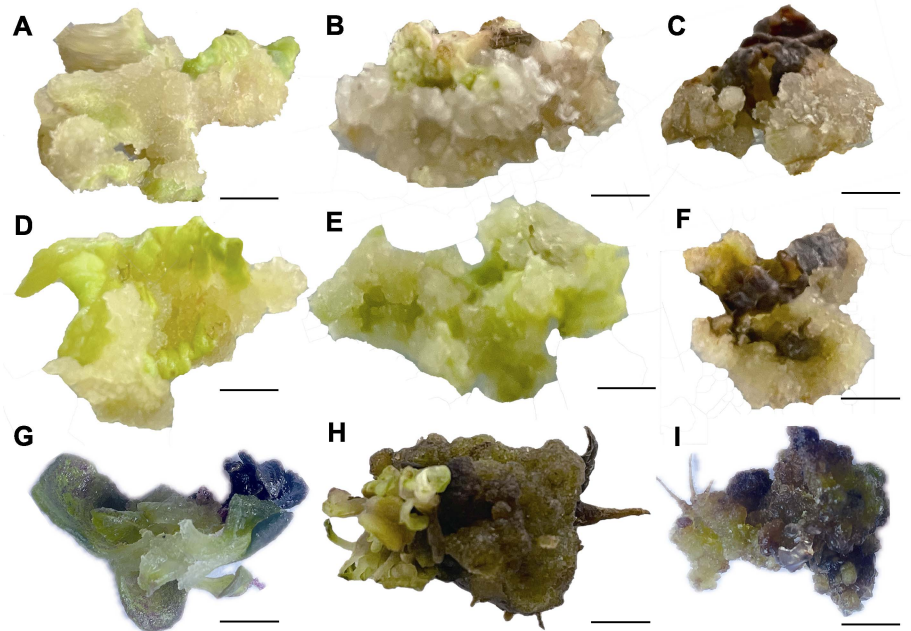


图2
Figure 2

图2 愈伤组织诱导及分化
(A) 6-BA诱导的大田叶片愈伤组织; (B) TDZ诱导的大田叶片愈伤组织; (C) KT诱导的大田叶片愈伤组织; (D) 6-BA诱导的组培苗叶片愈伤组织; (E) TDZ诱导的组培苗叶片愈伤组织; (F) KT诱导的组培苗叶片愈伤组织; (G) 不定芽畸形; (H) 同时分化不定芽和不定根; (I) 不定根分化。Bars=2 cm

Figure 2 Induction and differentiation of callus tissue
(A) Callus from leaves of field planted individual incorporating 6-BA; (B) Callus from leaves of field planted individual incorporating TDZ; (C) Callus from leaves of field planted individual incorporating KT; (D) Callus from leaves of tissue-cultured seedling incorporating 6-BA; (E) Callus from leaves of tissue-cultured seedling incorporating TDZ; (F) Callus from leaves of tissue-cultured seedling incorporating KT; (G) Adventitious bud malformation; (H) Concurrent differentiation of adventitious buds and roots; (I) Adventitious root differentiation. Bars=2 cm

表2 6-BA与IAA组合对叶片愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effects of combination 6-BA with IAA on the callus induction of leaves

Type	6-BA (mg·L ⁻¹)	IAA (mg·L ⁻¹)	Occurrence time (d)	Induction rate (%)	Callus growth state
Leaves of field planted individual	0.5	0	10.25±4.60 b	40.37±6.89 b	Yellow, compact, and with a hard texture
	0.5	0.1	15.25±3.72 c	39.09±8.97 bc	Green, loose, with a softer texture
	0.5	0.5	9.58±1.40 ab	33.28±7.29 bc	Pale yellow, loose, with a harder texture
	0.5	1.0	8.08±1.96 a	26.72±5.74 c	Yellow, resembling water stains, soft texture
	1.0	0	7.58±2.29 a	65.33±6.56 a	Pale yellow, loose, softer texture
	1.0	0.1	14.67±3.08 c	55.46±5.64 ab	Green, compact, harder texture
	1.0	0.5	10.83±3.33 b	47.51±6.74 b	Pale yellow, loose, soft texture
	1.0	1.0	9.58±2.39 ab	33.72±9.32 bc	Green loose, soft texture
	2.0	0	6.92±2.17 a	67.55±6.54 a	Pale yellow, loose, watery appearance, soft texture
	2.0	0.1	11.67±1.20 b	63.29±7.96 a	Pale green, loose, soft texture
	2.0	0.5	12.16±2.46 bc	54.29±8.57 ab	Yellow-green, loose, softer texture
Leaves of tissue- cultured seedling	2.0	1.0	14.00±3.43 c	41.31±9.03 b	Green, loose, softer texture
	0.5	0	11.08±2.69 b	47.81±5.75 b	Yellow, compact, hard texture
	0.5	0.1	12.00±3.38 bc	34.52±6.34 bc	Yellow-green, loose, soft texture
	0.5	0.5	13.00±3.43 bc	31.96±4.75 bc	Yellow-green, compact, softer texture
	0.5	1.0	18.08±4.17 c	24.07±7.22 c	Yellow-green, loose, soft texture
	1.0	0	10.33±2.48 b	55.67±4.21 ab	Yellow-green, loose, softer texture
	1.0	0.1	10.33±2.58 b	51.34±1.99 ab	Yellow-green, loose, soft texture
	1.0	0.5	11.33±3.42 b	46.21±11.23 b	Yellow-green, loose, softer texture
	1.0	1.0	15.42±3.22 c	39.14±9.41 bc	Yellow-green, loose, soft texture
	2.0	0	8.17±1.27 a	68.73±13.47 a	Yellow-green, loose, softer texture
	2.0	0.1	9.67±2.30 ab	55.24±6.91 ab	Yellow-green, loose, soft texture
	2.0	0.5	9.88±2.65 ab	51.33±13.54 ab	Green, loose, softer texture
	2.0	1.0	10.33±2.79 b	46.61±14.26 b	Yellow-green, loose, softer texture

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著(P<0.05)。
The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments (P<0.05).

3.3 6-BA与2,4-D组合对叶片愈伤组织诱导的影响
当6-BA浓度为0.5或1.0 mg·L⁻¹时, 大田叶片愈伤组织的发生时间随2,4-D浓度的增加呈先升后降趋势,

6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织的发生时间随2,4-D浓度的增加而推迟。当6-BA浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D延缓了组培苗叶片愈伤组织的发

生时间。

大田叶片愈伤组织诱导率为25.77%–67.52%，组培苗叶片愈伤组织诱导率为19.03%–68.23%。当6-BA浓度为0.5–2.0 mg·L⁻¹时，组培苗叶片愈伤组织的诱导率随2,4-D浓度的升高而降低。在添加2,4D时，大田叶片愈伤组织诱导率较高，但添加0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D诱导的愈伤组织质量较好(表3)。

3.4 6-BA与2,4-D、IAA组合对叶片愈伤组织诱导的影响

当6-BA浓度为0.5–2.0 mg·L⁻¹时，添加0.1–1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D或IAA对2种叶片愈伤组织的形成时间影响不显著。

当6-BA浓度为0.5 mg·L⁻¹时，添加0.1 mg·L⁻¹

2,4-D或IAA，大田叶片愈伤组织诱导率显著高于其它2种组合。当6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹时，添加0.1或1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D和IAA，愈伤组织诱导率显著高于0.5 mg·L⁻¹ 6-BA处理；大田叶片在MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ IAA培养基中愈伤组织诱导效果最好。

当6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时，添加0.1或0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D和IAA有助于缩短组培苗叶片愈伤组织的发生时间。当6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时，分别添加0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.5 mg·L⁻¹ IAA，组培苗叶片愈伤组织诱导率显著高于其它2种处理，以MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ IAA培养基上愈伤组织的诱导率最高，为86.73% (表4)。

表3 6-BA与2,4-D组合对叶片愈伤组织诱导的影响
Table 3 Effects of combination 6-BA with 2,4-D on the callus induction of leaves

Type	6-BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	Occurrence time (d)	Induction rate (%)	Callus growth state
Leaves of field planted indivi- dual	0.5	0	10.25±2.46 b	40.38±8.73 b	Yellow, compact, hard texture
	0.5	0.1	11.42±1.79 bc	25.77±6.33 c	Pale yellow, loose, soft texture
	0.5	0.5	10.67±2.65 b	41.83±6.86 bc	Brownish-yellow, compact, somewhat hard texture
	0.5	1.0	15.00±4.66 c	44.08±9.91 bc	Brownish-yellow, resembling water stains, soft texture
	1.0	0	7.58±2.29 a	65.38±13.16 a	Pale yellow, loose, softer texture
	1.0	0.1	10.08±3.20 b	43.33±12.02 b	Pale yellow, dense, softer texture
	1.0	0.5	12.92±3.71 bc	51.16±15.02 ab	Pale yellow, loose, softer texture
	1.0	1.0	12.00±2.76 bc	56.32±9.31 ab	Yellow, compact, somewhat hard texture
	2.0	0	6.92±2.17 a	67.52±13.25 a	Pale yellow, loose, resembling water stains, soft texture
	2.0	0.1	7.91±2.22 a	60.83±11.02 a	Yellow, resembling water stains, soft texture
	2.0	0.5	10.33±1.45 b	57.12±13.37 ab	Yellow, compact, softer texture
	2.0	1.0	13.67±2.05 bc	48.53±8.04 b	Pale yellow, loose, softer texture
Leaves of tis- sue-cultured seedling	0.5	0	11.08±3.69 b	47.51±11.05 b	Yellow, compact, hard texture
	0.5	0.1	16.42±3.08 c	44.17±9.31 b	Pale yellow, loose, soft texture
	0.5	0.5	11.08±2.44 b	39.98±8.74 bc	Pale yellow, loose, hard texture
	0.5	1.0	16.33±5.30 c	19.03±6.33 c	Yellow, loose, soft texture
	1.0	0	10.33±3.48 ab	55.62±10.15 ab	Yellow-green, loose, softer texture
	1.0	0.1	15.17±3.17 c	49.71±10.63 b	Green loose, softer texture
	1.0	0.5	10.42±3.44 ab	44.54±9.63 b	Yellow, compact, hard texture
	1.0	1.0	10.92±2.51 ab	38.05±8.94 bc	Pale yellow, loose, softer texture
	2.0	0	8.17±2.27 a	68.23±14.06 a	Yellow-green, loose, softer texture
	2.0	0.1	11.67±2.54 b	66.11±11.82 a	Green, loose, softer texture
	2.0	0.5	9.42±3.33 a	53.42±11.44 ab	Pale yellow, loose, softer texture
	2.0	1.0	9.83±3.44 a	50.76±14.13 b	Pale yellow, loose, softer texture

数值为3次重复的平均值±标准误；同列不同小写字母表示各处理间差异显著(P<0.05)。
The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments (P<0.05).

表4 6-BA与2,4-D和IAA组合对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of combination 6-BA with 2,4-D and IAA on the callus induction of leaves

Type	6-BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	IAA (mg·L ⁻¹)	Occurrence time (d)	Induction rate (%)	Callus growth state
Leaves of field planted individual	0.5	0.1	0.1	9.17±3.67 ab	60.33±13.05 b	Yellow-green, loose, soft texture
	0.5	0.5	1.0	12.32±3.63 bc	44.87±10.33 c	Brown, loose, soft texture
	0.5	1.0	0.5	12.58±2.42 bc	41.24±11.13 c	Brown, loose, soft texture
	1.0	0.1	1.0	10.16±2.21 b	84.51±14.22 a	Yellow-green, loose, softer texture
	1.0	0.5	0.5	11.00±2.52 b	61.39±12.65 b	Yellow, loose, soft texture
	1.0	1.0	0.1	7.69±2.44 a	77.59±14.25 a	Yellow, loose, softer texture
	2.0	0.1	0.5	7.42±1.09 a	79.08±17.24 a	Yellow, resembling water stains, soft texture
	2.0	0.5	0.1	8.38±3.87 ab	71.22±12.13 ab	Yellow with water stain, soft texture
	2.0	1.0	1.0	11.33±2.21 b	63.49±13.41 b	Pale yellow, loose, soft texture
Leaves of tis- sue-cultured seedling	0.5	0.1	0.1	13.08±2.42 bc	47.62±9.43 c	Green, compact, hard texture
	0.5	0.5	1.0	14.41±4.38 bc	53.41±13.22 bc	Green, compact, hard texture
	0.5	1.0	0.5	16.11±6.38 c	55.76±10.16 bc	Green, compact, somewhat hard texture
	1.0	0.1	1.0	9.33±2.46 ab	42.57±9.25 c	Yellow-green, loose, softer texture
	1.0	0.5	0.5	11.67±3.50 b	50.91±13.22 c	Pale yellow, loose, softer texture
	1.0	1.0	0.1	13.67±2.50 bc	44.59±11.17 c	Pale yellow, loose, softer texture
	2.0	0.1	0.5	8.58±2.12 a	86.73±11.29 a	Yellow-green, loose, softer texture
	2.0	0.5	0.1	7.32±3.31 a	70.23±17.05 b	Yellow, loose, soft texture
	2.0	1.0	1.0	11.33±2.22 b	67.15±13.21 b	Green, compact, hard texture

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。

The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$).

3.5 6-BA与TDZ组合对愈伤组织分化的影响

大田叶片愈伤组织在3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ TDZ培养基中不定芽分化率较高, 为16.71%; 组培苗叶片愈伤组织在3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ TDZ培养基中不定芽分化率为7.66%。

当TDZ浓度为0或0.5 mg·L⁻¹时, 随着6-BA浓度的增加大田叶片愈伤组织的不定芽分化率增高, 生根率降低; 当TDZ浓度为1.0或2.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织生根率随6-BA浓度的增加先升后降。不添加TDZ时, 组培苗叶片愈伤组织生根率随着6-BA浓度的增加而降低, 当TDZ浓度为0.5–2.0 mg·L⁻¹时, 生根率随6-BA浓度的增加先升后降(表5)。

3.6 6-BA、TDZ和NAA组合对愈伤组织分化的影响

大田叶片的愈伤组织在F2处理中只分化不定根, F6和F8处理只分化不定芽, 其它6个处理分化不定根和不定芽(图2H), 在F8处理(3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ NAA)中, 大田叶片的愈伤组织出

芽率较高, 为21.29%。组培苗叶片的愈伤组织在9个处理中难以分化出不定芽, 仅分化出不定根(图2I), 说明6-BA、TDZ与NAA组合不适合组培苗叶片愈伤组织分化不定芽。2种叶片的愈伤组织在F2处理(1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ TDZ+1.0 mg·L⁻¹ NAA)中生根率最高(表6)。

3.7 6-BA、TDZ和IAA交互作用影响愈伤组织分化

对于大田叶片的愈伤组织, F3和F8处理只分化不定芽, F1、F2和F4处理只分化不定根, 其它4个处理分化不定根和不定芽。F7处理(3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ TDZ+0.5 mg·L⁻¹ IAA)出芽率较高, 为66.37%。F9处理(3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ TDZ+1.0 mg·L⁻¹ IAA)生根率较高, 为28.91% (表7)。

对于组培苗叶片愈伤组织, F1、F2和F4处理只分化不定根, 其它6个处理分化不定根和不定芽。F6处理(2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ IAA)出芽率较高, 为53.48%。F2处理(1.0 mg·L⁻¹

表5 6-BA与TDZ组合对愈伤组织分化的影响

Table 5 Effects of combination 6-BA with TDZ on callus differentiation

Type	No.	6-BA (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)	Adventitious buds differentiation rate (%)	Adventitious roots differentiation rate (%)
Callus from leaves of field planted individual	F1	0	0.5	—	12.43±3.26 ab
	F2	0	1.0	—	7.41±2.12 c
	F3	0	2.0	—	3.94±1.12 d
	F4	1.0	0	—	15.61±4.36 a
	F5	1.0	0.5	3.07±1.04 b	—
	F6	1.0	1.0	—	3.41±1.27 d
	F7	1.0	2.0	—	12.37±3.75 ab
	F8	2.0	0	—	10.91±3.12 b
	F9	2.0	0.5	3.95±0.92 b	—
	F10	2.0	1.0	4.53±0.87 b	8.76±2.21 bc
	F11	2.0	2.0	—	7.55±1.32 c
	F12	3.0	0	4.66±1.41 b	6.38±2.63 c
	F13	3.0	0.5	16.71±5.22 a	—
	F14	3.0	1.0	—	4.21±1.21 c
	F15	3.0	2.0	4.39±1.21 b	—
Callus from leaves of tissue-cultured seedling	F1	0	0.5	—	—
	F2	0	1.0	—	4.52±0.95 bc
	F3	0	2.0	—	4.74±1.39 c
	F4	1.0	0	—	4.58±1.51 bc
	F5	1.0	0.5	—	1.92±0.82 c
	F6	1.0	1.0	—	9.17±2.42 a
	F7	1.0	2.0	—	6.11±2.21 b
	F8	2.0	0	—	3.43±1.02 c
	F9	2.0	0.5	3.44±1.32 b	8.32±2.31 a
	F10	2.0	1.0	—	6.41±2.13 b
	F11	2.0	2.0	2.91±0.71 bc	3.59±1.33 c
	F12	3.0	0	—	2.33±0.93 c
	F13	3.0	0.5	2.37±0.69 bc	7.15±1.12 ab
	F14	3.0	1.0	3.17±1.21 b	—
	F15	3.0	2.0	7.66±2.12 a	—

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。—表示愈伤组织未分化出不定芽或不定根。
The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). — indicate that the callus has not differentiated into adventitious buds or roots.

表6 6-BA、TDZ和NAA组合对愈伤组织分化的影响

Table 6 Effects of combination of 6-BA, TDZ and NAA on callus differentiation

Type	No.	6-BA (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Adventitious buds differentiation rate (%)	Adventitious roots differentiation rate (%)
Callus from leaves of field planted individual	F1	1.0	0.5	0.05	2.13±0.19 d	3.21±0.13 d
	F2	1.0	1.0	1.0	—	31.69±7.11 a
	F3	1.0	2.0	0.5	8.92±2.83 c	9.51±2.24 c
	F4	2.0	0.5	1.0	6.43±1.71 cd	23.49±11.31 b
	F5	2.0	1.0	0.5	11.21±3.02 c	6.91±2.17 cd
	F6	2.0	2.0	0.05	19.46±6.33 ab	—
	F7	3.0	0.5	0.5	5.64±1.91 d	2.02±0.17 d
	F8	3.0	1.0	0.05	21.29±9.12 a	—
	F9	3.0	2.0	1.0	15.82±3.64 b	4.09±1.22 d

表6 (续)
Table 6 (continued)

Type	No.	6-BA (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Adventitious buds differentiation rate (%)	Adventitious roots differentiation rate (%)
Callus from leaves of tissue-cultured seedling	F1	1.0	0.5	0.05	—	21.23±6.71 b
	F2	1.0	1.0	1.0	—	29.88±9.45 a
	F3	1.0	2.0	0.5	—	19.01±6.54 bc
	F4	2.0	0.5	1.0	—	12.56±4.32 cd
	F5	2.0	1.0	0.5	—	14.67±3.03 c
	F6	2.0	2.0	0.05	—	8.03±2.31 d
	F7	3.0	0.5	0.5	—	11.34±2.12 d
	F8	3.0	1.0	0.05	—	3.34±1.42 de
	F9	3.0	2.0	1.0	—	3.49±1.92 de

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。—同表5。
The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). — are the same as shown in Table 5.

表7 6-BA、TDZ和IAA组合对愈伤组织分化的影响
Table 7 Effects of combination 6-BA, TDZ and IAA on callus differentiation

Type	No.	6-BA (mg·L ⁻¹)	TDZ (mg·L ⁻¹)	IAA (mg·L ⁻¹)	Adventitious buds differentiation rate (%)	Adventitious roots differentiation rate (%)
Callus from leaves of field planted individual	F1	1.0	0.5	0.05	—	8.97±2.34 c
	F2	1.0	1.0	1.0	—	17.83±5.09 ab
	F3	1.0	2.0	0.5	14.39±3.23 b	—
	F4	2.0	0.5	1.0	—	23.44±9.12 a
	F5	2.0	1.0	0.5	19.07±2.96 b	7.15±2.17 c
	F6	2.0	2.0	0.05	17.43±5.99 b	2.31±1.97 c
	F7	3.0	0.5	0.5	66.37±13.14 a	2.69±0.81 c
	F8	3.0	1.0	0.05	23.29±8.06 b	—
	F9	3.0	2.0	1.0	7.94±2.01 c	28.91±13.04 a
Callus from leaves of tissue-cultured seedling	F1	1.0	0.5	0.05	—	14.32±4.23 ab
	F2	1.0	1.0	1.0	—	23.64±9.34 a
	F3	1.0	2.0	0.5	22.35±9.33 b	4.52±1.96 c
	F4	2.0	0.5	1.0	—	17.61±3.22 ab
	F5	2.0	1.0	0.5	1.32±0.42 bc	9.02±2.83 c
	F6	2.0	2.0	0.05	53.48±9.89 a	6.49±2.02 c
	F7	3.0	0.5	0.5	9.46±2.31 bc	19.03±7.93 a
	F8	3.0	1.0	0.05	19.83±6.99 b	12.87±4.85 ab
	F9	3.0	2.0	1.0	9.10±2.41 bc	8.99±3.31 c

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。—同表5。
The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). — are the same as shown in Table 5.

6-BA+1.0 mg·L⁻¹ TDZ+1.0 mg·L⁻¹ IAA)生根率较高, 为23.64% (表7)。

3.8 6-BA与NAA组合对不定芽增殖的影响

将不定芽转接到9种增殖培养基后, 芽块体积增大,

生长速度快, 20天后在芽块周围增殖出不定芽。不定芽增殖率在29.33%–83.57%之间。Z8处理(2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA)不定芽增殖率为83.57%, 增殖系数在3倍以上, 不定芽增殖效果最好。当NAA浓度一定时, 不定芽增殖率、增殖系数和株高随6-BA浓

度的增加而升高。当6-BA浓度为0.5 mg·L⁻¹时,随着NAA浓度的增加,不定芽增殖率降低,增殖系数在1倍左右,株高逐渐增高。当6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹时,随着NAA浓度的增加,不定芽增殖率升高,株高降低。当6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时,不定芽增殖率和株高均先升后降(表8)。

3.9 不同浓度NAA和IBA对不定芽生根的影响

研究表明,不定芽生根率在43.67%–86.97%之间,生根率随NAA和IBA浓度的增加先升后降。当浓度相

同时,NAA对不定芽生根率的影响优于IBA。当NAA和IBA浓度为0.1 mg·L⁻¹时,不定芽生根率最高。根长随NAA或IBA浓度的增加先升后降。0.5 mg·L⁻¹ NAA促进不定芽根伸长。根数随NAA和IBA浓度的增加而增加,当浓度相同时,NAA比IBA促进根数增加效果更好。株高随NAA和IBA浓度的增加先升后降,当二者组合时,株高随NAA和IBA浓度的升高而下降。综上,NAA对不定芽生根效果优于IBA,不定芽生根的最适培养基为1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ IBA(表9)。

表8 不同浓度6-BA与NAA组合对不定芽增殖的影响

Table 8 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA combinations on adventitious bud proliferation

No.	6-BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Proliferation rate (%)	Coefficient of propagation	Plant height (cm)
Z1	0.5	0.01	38.21±6.27 cd	+	1.21±0.10 d
Z2	0.5	0.05	29.33±4.36 d	+	1.37±0.21 d
Z3	0.5	0.10	17.21±2.39 d	+	1.43±0.19 cd
Z4	1.0	0.01	53.69±5.49 bc	+++	2.36±0.14 bc
Z5	1.0	0.05	56.73±7.75 bc	++	2.04±0.17 c
Z6	1.0	0.10	67.21±3.27 b	++	1.96±0.16 c
Z7	2.0	0.01	79.06±7.40 a	+++	2.63±0.31 b
Z8	2.0	0.05	83.57±2.13 ab	+++	3.17±0.22 a
Z9	2.0	0.10	68.33±5.56 b	++	2.66±0.15 b

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。+++ 表示增殖系数在3倍以上; ++ 表示增殖系数为2倍; + 表示增殖系数为1倍。

The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). +++ means the proliferation coefficient is more than three times; ++ means the proliferation coefficient is about two times; + means the proliferation coefficient is about one times.

表9 不同浓度生长素对不定芽生根的影响

Table 9 Effects of different concentrations of auxins on adventitious bud rooting

No.	NAA (mg·L ⁻¹)	IBA (mg·L ⁻¹)	Rooting rate (%)	Root length (cm)	Number of roots	Plant height (cm)
S1	0	–	43.67±4.09 c	1.73±0.19 c	2.39±0.25 c	1.46±0.67 d
S2	0.1	–	60.71±8.33 b	1.97±0.23 c	2.76±0.77 c	2.69±0.42 c
S3	0.5	–	73.63±7.41 a	3.68±0.53 a	3.53±1.96 b	3.16±0.96 b
S4	1.0	–	57.41±5.31 bc	2.03±0.87 c	4.31±1.13 a	2.06±0.23 cd
S5	–	0.1	49.96±7.39 c	2.94±0.73 b	2.06±0.63 c	2.77±0.87 c
S6	–	0.5	53.21±4.36 bc	3.31±0.77 ab	3.04±1.21 bc	3.06±0.68 bc
S7	–	1.0	51.27±5.77 bc	2.32±0.66 bc	3.41±1.26 b	3.22±0.73 b
S8	0.1	0.1	86.97±6.96 a	3.22±1.07 ab	3.65±1.17 a	3.79±1.17 a
S9	0.5	0.5	34.21±8.41 c	2.21±0.42 bc	2.33±0.41 c	2.17±0.71 c
S10	1.0	1.0	21.19±2.79 d	1.53±0.39 c	1.61±0.19 d	1.93±0.29 d

数值为3次重复的平均值±标准误; 同列不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。

The values are means±SE of 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$).

3.10 讨论

植物再生体系建立的关键在于调节细胞分裂素和生长素的比例,以筛选出适宜愈伤组织诱导及分化的植物生长调节剂组合(逯锦春等, 2022)。添加植物生长调节剂实质上是重新建立植物体内细胞分裂素与内源生长素之间的平衡,从而促进植物细胞分化(罗虹等, 2020; 谢纯刚等, 2023)。唇形科植物愈伤组织诱导及不定芽分化常用的细胞分裂素是6-BA、TDZ和KT,生长素是NAA、2,4-D和IAA (Fallah et al., 2019)。张静等(2020)以狭叶黄芩(*Scutellaria rege-liana*)茎段为外植体,在含6-BA与2,4-D的培养基中愈伤组织诱导率较高,但愈伤组织难以分化出不定芽。宗越(2019)以毛建草茎段为外植体,在含6-BA与NAA的培养基中成功诱导出愈伤组织,其颜色为淡绿色,质地紧密,但再分化过程中,仅分化出不定根,难以分化出不定芽。桑晓霞(2021)以毛建草组培苗茎段为外植体,得出与上述研究相同的结论。本研究表明,大田叶片和组培苗叶片在单独添加细胞分裂素的培养基中,愈伤组织诱导率低且质量差,添加2,4-D或IAA后愈伤组织的质量明显改善,颜色呈淡黄色,质地疏松,但后期难以分化出不定芽,与前人的研究结论相似。本研究中,叶片在含6-BA、IAA与2,4-D的培养基中愈伤组织诱导率较高,颜色呈淡黄绿色,质地疏松。这与上述研究结论不同,其原因可能是多种植物生长调节剂的协同作用效果远大于单独使用一种(Jacobs, 1998),且其作用效果与外植体及愈伤组织内源激素的种类和浓度密切相关(胡佳卉和王小德, 2018)。本研究表明,高浓度6-BA和TDZ有利于愈伤组织分化出不定芽,随着6-BA和TDZ浓度的升高,再生芽出现玻璃化和畸形的现象增多(图2G),从而对芽的正常生长产生负面影响。贺美忠(2016)发现添加 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,黄芩(*S. baicalensis*)不定芽分化率随6-BA浓度的增加而增高。于盱等(2012)发现,当TDZ浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,薄荷(*Mentha canadensis*)不定芽分化率随IAA浓度的增加而降低。本研究表明,当NAA浓度为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大田叶片愈伤组织的不定芽分化率随6-BA和TDZ浓度的增加而增高;当6-BA和TDZ浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,组培苗叶片愈伤组织的不定芽分化率随IAA浓度的增加而降低,这与前人的结论相似。

植物组织培养中的继代次数与再生能力之间是一个动态平衡,继代次数的增加可能导致多种生物化学物质发生变化,进而直接或间接影响细胞的再生,最终降低植株的再生能力(Bakhtiar et al., 2016)。Karakas和Turker (2013)发现白菊(*Dendranthema morifolium*)田间植株的再生能力显著优于经多次继代的组培苗。黄娟等(2018)发现继代次数对杉木(*Cunninghamia lanceolata*)组培苗不定芽分化有明显的抑制作用,不定芽分化率随组培苗继代次数的增加而下降。经3次继代的美国薄荷(*Monarda didyma*)组培苗,不定芽再生能力降低,出现玻璃化及褐化现象(王莉, 2008)。本研究表明,继代2次的组培苗叶片能产生质量较好的愈伤组织,但再生能力显著弱于大田叶片,这与前人的研究结论相似。其原因可能是大田植株在自然环境下的遗传稳定性与多样性以及对自然环境的适应性较强;而对于组培苗,由于人工操作和非自然环境的限制,其遗传稳定性和生长适应性较弱,因而再生能力有所降低。此外,长期继代培养可能导致植物细胞遗传稳定性下降,细胞老化影响再生潜能,进而降低再生能力(Bakhtiar et al., 2016)。

植物组织培养中的不定芽增殖是组培苗能否大量繁殖的关键。细胞分裂素/生长素浓度比值高有利于芽的增殖,唇形科常用6-BA与NAA组合诱导芽增殖,二者最适比值因植物种类不同而异(Gharari et al., 2021)。当6-BA浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,狭叶黄芩芽增殖倍数随NAA浓度的增加而降低;当6-BA浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,芽增殖率较高,但黄叶苗也较多(张静等, 2020)。留兰香薄荷(*M. spicata*)不定芽增殖率随6-BA与NAA浓度比值的增高而升高,但比值太高,芽健壮度反而下降(吴雯雯等, 2018)。本研究发现,当6-BA浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽增殖率随NAA浓度的增加而降低;当6-BA浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽增殖率随NAA浓度的增加而增高,这与吴雯雯等(2018)的研究结果一致。

不定芽生根是决定再生体系成功的关键步骤。NAA和IBA常用于唇形科植物的生根培养,但不同植物生根所需的生长素浓度不同(Fallah et al., 2019)。赵佳佳等(2016)发现,当IBA浓度为 $0.3\text{--}1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,多花筋骨草(*Ajuga multiflora*)不定芽根系发达,但根过长影响炼苗,过短则影响水分吸收,不利于成活, $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA适宜生根移栽。匍枝筋骨草(*A.*

lobata)的根长和根数随IBA浓度的增加而增加,但株高呈先升后降,0.4 mg·L⁻¹ IBA适宜生根(赵晓杰等,2011)。庞艳菊(2019)发现NAA对丹参(*Salvia miltiorrhiza*)不定芽生根效果优于IBA。本研究表明,NAA对不定芽生根诱导效果优于IBA,低浓度NAA和IBA适宜根生长,当NAA浓度为1.0 mg·L⁻¹时,不定芽的各项生根指标呈下降趋势,说明高浓度NAA对不定芽生根不利,这与前人的研究结论一致。

本研究以毛建草大田叶片和组培苗叶片为外植体,通过筛选不同植物生长调节剂浓度配比,建立了毛建草离体培养再生体系,有效解决了毛建草愈伤组织再分化过程中难以分化不定芽的问题,为毛建草种质资源创新与遗传改良育种奠定了基础。

作者贡献声明

田旭平:构思并设计实验及修改论文;王佳丽,史子尹:完成实验;刘慧欣,亢红伟:分析数据并提供技术支持;岳康杰:撰写论文。

参考文献

- 贺美忠 (2016). 黄芩组织培养与快速繁殖条件的研究. 农业科技通讯 (4), 79–80.
- 胡佳卉, 王小德 (2018). 羊角槭愈伤组织诱导、增殖与分化. 浙江农林大学学报 35, 975–980.
- 黄娟, 吴鹏飞, 程浩, 马祥庆 (2018). 杉木愈伤组织的继代增殖与植株再生. 森林与环境学报 38, 20–26.
- 刘俊, 孙瑞芬, 耿牡丹, 王冬霓, 张艳芳, 孙钟 (2017). 毛建草离体培养快繁体系的建立. 北方农业学报 45(6), 102–106.
- 逯锦春, 曹丽娜, 佟冠杰, 王鑫颖, 张利英, 喻铎, 李荟芳, 李彦慧 (2022). 大花银莲花愈伤组织诱导及再生体系的建立. 植物学报 57, 217–226.
- 罗虹, 温小慧, 周圆圆, 戴思兰 (2020). 芳香堆心菊离体再生体系的建立. 植物学报 55, 318–328.
- 庞艳菊 (2019). 丹参快速扩繁与遗传转化体系建立的研究. 硕士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 34–36.
- 桑晓霞 (2021). 药茶原料毛建草快繁体系建立及功能成分研究. 硕士论文. 太原: 山西大学. pp. 17–21.
- 田旭平, 郭庆浩, 孙鸣屿, 李倩, 路通 (2021). 不同种源的毛建草珠芽形成比较研究. 草地学报 29, 1357–1362.

- 王莉 (2008). “草原”美国薄荷的组织培养及挥发油成分研究. 硕士论文. 雅安: 四川农业大学. pp. 27–34.
- 吴雯雯, 陆兵, 李文清, 邵元健 (2018). 留兰香薄荷离体快繁技术研究. 江苏农业科学 46(4), 47–49.
- 谢纯刚, 刘哲, 章书声, 胡海涛 (2023). 手指柠檬茎段离体再生体系建立. 植物学报 58, 926–934.
- 杨宇昊 (2023). 毛建草药茶黄酮类物质的提取纯化及活性研究. 硕士论文. 太原: 山西大学. pp. 5–9.
- 于盱, 梁呈元, 刘艳, 王海棠, 李维林 (2012). 薄荷茎段不定芽离体诱导影响因素分析及植株再生体系的建立. 江苏农业科学 40(12), 56–59.
- 张静, 牛喆, 范卫芳, 高鹏飞, 吴建慧 (2020). 狭叶黄芩组织培养再生体系的建立. 植物研究 40, 50–57.
- 张彦广 (2006). 河北省野生花卉调查及部分种的引种栽培研究. 博士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 19–24.
- 赵佳佳, 宇佳, 迟德富 (2016). 多花筋骨草高频再生体系的建立. 湖南师范大学自然科学学报 39(1), 30–34.
- 赵晓杰, 迟德富, 李晓灿 (2011). 匍枝筋骨草再生体系构建. 中国农学通报 27(4), 120–124.
- 宗越 (2019). 毛建草茶饮习俗及组织培养研究. 硕士论文. 晋中: 山西农业大学. pp. 32–37.
- Bakhtiar Z, Mirjalili MH, Sonboli A (2016). *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breed Appl Biotechnol* 16, 48–54.
- Fallah M, Farzaneh M, Yousefzadi M, Ghorbanpour M, Mirjalili MH (2019). *In vitro* mass propagation and conservation of a rare medicinal plant, *Zhumeria majdae* Rech.f & Wendelbo (Lamiaceae). *Biocatal Agr Biotechnol* 17, 318–325.
- Gharari Z, Bagheri K, Karimkhanlooei G, Sharafi A (2021). Study of tissue culture and *in vitro* organogenesis of *Scutellaria bornmuelleri* using benzylaminopurine, isopentenyl adenine and thidiazuron. *South Afr J Bot* 139, 458–469.
- Jacobs WP (1998). Hormone transport and action in the green shoot: long-term studies of a clonal stock of *Coleus blumei* (Labiatae). *Am J Bot* 85, 1353–1363.
- Karakas FP, Turker AU (2013). An efficient *in vitro* regeneration system for *Bellis perennis* L. and comparison of phenolic contents of field-grown and *in vitro*-grown leaves by LC-MS/MS. *Ind Crops Prod* 48, 162–170.

Callus Induction and Plant Regeneration of *Dracocephalum rupestre*

Xuping Tian*, Kangjie Yue, Jiali Wang, Huixin Liu, Ziyin Shi, Hongwei Kang

Forestry College of Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Abstract *Dracocephalum rupestre* is an important medicinal plant. However, its leaf explant regeneration system has yet to be established. Here we investigated the impact of plant growth regulators on callus induction, differentiation, adventitious bud proliferation, and rooting using field planted leaves and tissue-cultured seedling leaves of *D. rupestre* as explants. We found that the optimal medium for inducing callus from field planted leaves was MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ IAA, achieving an induction rate of 84.51%. For adventitious bud differentiation, the preferred medium comprised MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ TDZ+0.5 mg·L⁻¹ IAA, resulting in a differentiation rate of 66.37%. Similarly, for inducing callus from tissue-cultured seedling leaves, the optimal medium included MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ IAA, with an induction rate of 86.73%. The medium conducive to adventitious bud differentiation consisted of MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ IAA, yielding a differentiation rate of 53.48%. Furthermore, the appropriate medium for adventitious bud proliferation was MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA, achieving a proliferation rate of 83.57%. The rooting medium was 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ IBA, resulting in a rooting rate of 86.97%. Tissue-cultured seedlings exhibited optimal growth in a mixed substrate of peat and vermiculite at a ratio of 1:1 (v/v). This study successfully established a leaf explant regeneration system for *D. rupestre*, providing valuable technical support for the conservation and rapid propagation of its germplasm resources.

Key words *Dracocephalum rupestre*, callus induction, differentiation, proliferation, rooting

Tian XP, Yue KJ, Wang JL, Liu HX, Shi ZY, Kang HW (2024). Callus induction and plant regeneration of *Dracocephalum rupestre*. *Chin Bull Bot* 59, 613–625.

* Author for correspondence. E-mail: txp8638@sina.com

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者/团队简介

田旭平, 山西农业大学林学院副教授, 硕士生导师。长期从事园林植物栽培应用和植物资源学研究。以通讯作者或第一作者身份先后在生态学报、草地学报、干旱区研究等期刊上发表论文20余篇。目前其研究团队聚焦解析毛建草、绒毛白蜡和石竹等植物的表型及繁殖对环境的适应性, 为栽培及选育优良种质提供技术支持。