

· 技术方法 ·

银扇草再生体系的建立

曾浩^{1,2}, 李佩芳^{1,2}, 郭至辉^{1,2}, 刘春林^{1,3}, 阮颖^{1,2*}

¹湖南农业大学, 作物表观遗传调控与发育重点实验室, 长沙 410128; ²湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128; ³湖南农业大学农学院, 长沙 410128

摘要 为建立银扇草(*Lunaria annua*)体外再生体系, 以其真叶为外植体, 探讨消毒条件、植物生长调节剂组合及浓度对愈伤组织诱导、不定芽和不定根分化的影响; 进一步分析了生根方式对成苗和幼苗生长的影响。结果表明, 用75%乙醇消毒45秒配合0.1%升汞溶液消毒6分钟为银扇草叶片外植体最佳消毒处理; 真叶愈伤组织诱导及不定芽分化的最适培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D, 愈伤组织诱导率达93.37%, 不定芽分化率达84.08%; 最佳生根培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 从接种叶片外植体到获得再生植株约90天。该研究建立了银扇草稳定的再生体系, 为开发利用银扇草资源及挖掘功能基因奠定了基础。

关键词 银扇草, 愈伤组织, 组织培养, 再生体系

曾浩, 李佩芳, 郭至辉, 刘春林, 阮颖 (2024). 银扇草再生体系的建立. 植物学报 59, 433–440.

银扇草(*Lunaria annua*)是十字花科银扇草属植物, 因其角果外形酷似银质蒲扇而得名。银扇草原产于欧亚大陆, 主要分布在阿尔巴尼亚和塞尔维亚(Bailey, 1949)。其植株高度为60–100 cm, 叶片呈椭圆形, 被绒毛, 叶缘呈粗糙的锯齿状; 花冠呈十字形, 紫红色或白色, 可作干花和切花。授粉后, 其子房快速膨大, 形成扁平圆形角果, 直径为3–4 cm, 角果颜色从绿色转变为茶褐色, 完全成熟后呈银色, 极具观赏价值。银扇草种子富含神经酸, 在维持大脑功能方面具有重要作用(赖福兵, 2018)。银扇草还含有丰富的脂肪酸, 是一种亟待开发利用的资源植物。

目前, 国内外对银扇草的研究主要集中在次生代谢产物(Blažević et al., 2020)和脂肪酸组分分析(Guo et al., 2009)等方面, 而对其再生体系的研究尚未见报道。本研究以银扇草真叶为外植体, 通过愈伤组织诱导、不定芽和不定根分化、炼苗和移栽等过程, 建立了银扇草再生体系, 为开发和利用银扇草资源、挖掘功能基因及分子育种奠定了基础。

1 植物材料

以湖南农业大学作物表观遗传调控与发育湖南省重

点实验室2021年7月收获的银扇草(*Lunaria annua* L.)种子为实验材料。

2 培养基成分与培养条件

2.1 培养基成分

培养基以MS (Murashige and Skoog, 1962)为基本培养基, 添加7 g·L⁻¹琼脂和30 g·L⁻¹蔗糖, 调pH值至5.8, 121°C灭菌20分钟后分装。

2.2 外植体消毒

将种子置于清水中浸泡4小时, 至其下沉。将浸泡充分的种子播种于培养钵中, 表面覆盖1层草木炭基质, 保持土壤湿润。待真叶长至7 cm × 11 cm后, 取真叶在流水下冲洗干净, 用75%乙醇消毒45秒, 无菌水冲洗3遍, 然后用0.1%升汞溶液分别消毒4、6和8分钟, 再用无菌水冲洗3遍。将消毒后的叶片切割成1 cm × 1 cm的小块, 接种至愈伤组织诱导培养基中。30天后统计外植体的存活率和污染率。

2.3 愈伤组织诱导培养基的筛选及优化

将消毒后的叶片切割成1 cm × 1 cm的小块, 分别接

收稿日期: 2023-07-18; 接受日期: 2023-12-19

基金项目: 国家自然科学基金委联合重点项目(No.U20A2028)

* 通讯作者。E-mail: yingruan@hotmail.com

种到以MS为基本培养基并添加不同浓度6-BA (0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹)+NAA (0、1.0和2.0 mg·L⁻¹)和6-BA (0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹)+2,4-D (0、1.0和2.0 mg·L⁻¹)的培养基中,进行愈伤组织诱导。每2周继代培养1次,30天后观察并统计愈伤组织的诱导情况。

愈伤组织诱导率=(愈伤组织形成数/外植体接种数)×100%。

2.4 不定芽分化培养基的筛选

将愈伤组织转移至分化培养基,诱导不定芽。分化培养基以MS为基本培养基,添加2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D和不同浓度6-BA (0.25、0.5、0.75和1.0 mg·L⁻¹)。每2周继代培养1次,30天后观察并统计不定芽的诱导情况。

不定芽分化率=(分化不定芽的愈伤组织数/愈伤组织接种数)×100%。

2.5 不定芽增殖

取分化培养基中高1 cm的不定芽,连同愈伤组织一起转移至增殖培养基中继续培养。不定芽增殖培养基以MS为基本培养基,添加0.5 mg·L⁻¹ 6-BA以及2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D。

增殖系数=增殖芽数/不定芽接种数。

2.6 不定根诱导方法的筛选

2.6.1 培养基诱导生根

待不定芽长至2 cm且具有2片叶时进行不定根诱导。不定根诱导培养基采用分别添加0.1 mg·L⁻¹ NAA及0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ IBA的MS培养基。40天后记录并统计生根情况。

2.6.2 预培养后在土壤中生根

用刀片切掉不定芽基部褐色组织,转移至生根培养基中分别培养0、5和10天,将不定芽基部浸入0.1 mg·mL⁻¹

IAA溶液中10秒,再转入装有湿润营养土的培养钵中进行生根。40天后记录并统计生根情况。

生根率=(生根数/不定芽接种数)×100%。

2.7 移栽对幼苗生长的影响

将生根培养基中生长健壮且根系发达的幼苗在组培室中炼苗2天,然后移栽至装有湿润营养土的培养钵中,盖上顶部打孔的一次性塑料杯。2周后统计移栽成活率。

2.8 数据处理

实验数据用Excel软件整理。采用SPSS 20.0软件进行数据分析。使用Photoshop软件作图。

3 结果与讨论

3.1 外植体处理与消毒

取7 cm × 11 cm银扇草真叶,用75%乙醇和0.1%氯化汞溶液消毒,可见叶片的主脉明显,侧脉支脉多,呈网状,表面覆有白色绒毛。将消毒后的叶片切成1 cm × 1 cm的小块,接种于愈伤组织诱导培养基中。培养30天后,结果显示随着消毒时间的延长,污染率逐渐降低;但消毒时间过长会对外植体造成伤害,使其存活率降低。用0.1%氯化汞溶液消毒4分钟,存活率为98.88%,但污染率高达47.33%;消毒6分钟,污染率为13.10%,存活率达86.70%;消毒8分钟,污染率为0,但存活率仅为3.01% (表1)。综合考虑外植体的污染率和存活率,我们认为75%乙醇消毒45秒配合0.1%氯化汞溶液消毒6分钟为最佳处理。

3.2 愈伤组织诱导

3.2.1 6-BA和NAA组合对叶片外植体愈伤组织诱导的影响

将切割成1 cm × 1 cm的叶片外植体接种于含不同浓

表1 氯化汞消毒时间对外植体消毒效果的影响

Table 1 Effect of the duration of HgCl₂ sterilization on the disinfection of explants

Number	75% ethanol (s)	0.1% HgCl ₂ (min)	Number of explants	Contamination rate (%)	Survival rate (%)
1	45	8	69	0.90±0.79 c	3.01±0.44 c
2	45	6	96	13.10±0.79 b	86.70±1.29 b
3	45	4	75	47.33±1.15 a	98.88±0.96 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($P<0.05$)。

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

度6-BA和NAA组合的愈伤组织诱导培养基(表2), 接种时叶片外植体背面朝下, 同时轻轻按压形态学下端, 使其与培养基充分接触。培养30天, 叶片外植体的支脉和侧脉处产生松散的白色愈伤组织, 生长较缓慢; 37天后, 愈伤组织颜色由白色变为浅绿色, 质地由松散变紧密。结果表明, 不同浓度6-BA和NAA组合对愈伤组织诱导率有明显影响。当培养基中NAA浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着6-BA浓度的升高愈伤组织诱导率从40.89%升至75.60%, 之后又降至52.00%。当培养基中NAA浓度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着6-BA浓度的升高愈伤组织诱导率从32.74%升至78.04%后又降至35.52%。当6-BA浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA浓度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 诱导率达到最高值, 为78.04% (表2)。

3.2.2 6-BA和2,4-D组合对叶片外植体愈伤组织诱导的影响

将叶片外植体接种于含不同浓度6-BA和2,4-D组合的愈伤组织诱导培养基(表3)。10天后, 银扇草叶片外植体稍微卷曲, 叶脉处开始出现愈伤组织, 每个叶片外植体上可诱导产生多个愈伤组织(图1A, B); 20天后, 支脉处的愈伤组织开始膨大, 接触培养基, 形成紧密的绿色愈伤组织, 其中部分出现轻微的褐化。结果表明, 以MS为基本培养基, 添加不同浓度6-BA和2,4-D组合均能诱导银扇草叶片外植体产生愈伤组织。当

表2 6-BA和NAA组合对银扇草叶片外植体愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of 6-BA and NAA combination on callus induction of *Lunaria annua* leaf explants

Number	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Number of explants	Callus induction rate (%)
1	0.5	0	90	0.67±0.67 g
2	1.0	0	90	1.22±1.17 g
3	2.0	0	90	2.22±0.51 g
4	0.5	1.0	90	40.89±2.14 d
5	1.0	1.0	90	75.60±1.06 b
6	2.0	1.0	90	52.00±0.78 c
7	0.5	2.0	90	32.74±0.56 f
8	1.0	2.0	90	78.04±1.20 a
9	2.0	2.0	90	35.52±0.83 e

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

The values are means±SE from 3 replicates; different lower-case letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

2,4-D浓度固定不变时, 随着6-BA浓度的升高愈伤组织诱导率下降; 当6-BA浓度低于2,4-D时, 愈伤组织诱导率较高, 均达80%以上, 在添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D的培养基中愈伤组织诱导率最高, 达93.37%, 且生长状况较好。

相比6-BA和NAA组合, 6-BA和2,4-D组合诱导银扇草真叶产生愈伤组织的速度更快、质地更紧密, 更适合银扇草愈伤组织诱导。综上, 银扇草愈伤组织诱导的最佳培养基为MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, 愈伤组织诱导率达93.37% (表3)。

3.3 不定芽的诱导和增殖

将诱导产生愈伤组织的叶片外植体接种到分化培养基中。5天后, 愈伤组织接触培养基的部分变得更紧密, 颜色由绿转深绿, 且部分出现黑褐色, 此时愈伤组织上开始分化出芽点, 长出小的不定芽; 15天后, 分化的芽点长大, 形成幼嫩的不定芽(图1C, D)。结果表明, 不同浓度6-BA和2,4-D组合对银扇草不定芽诱导率有明显影响(表4)。在2,4-D浓度固定不变时, 随着6-BA浓度的升高出芽率先升高后降低, 在6-BA浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最高值, 为84.08%, 此时分化出的不定芽嫩绿且健壮。因此, 银扇草不定芽诱导的最佳培养基为MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, 诱

表3 6-BA和2,4-D组合对银扇草叶片外植体愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of 6-BA and 2,4-D combination on callus induction of *Lunaria annua* leaf explants

Number	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Number of explants	Callus induction rate (%)
1	0.5	0	90	1.22±0.51 g
2	1.0	0	90	2.26±0.51 fg
3	2.0	0	90	3.00±0.62 f
4	0.5	1.0	90	82.48±1.08 b
5	1.0	1.0	90	69.08±0.63 c
6	2.0	1.0	90	25.19±1.19 e
7	0.5	2.0	90	93.37±1.07 a
8	1.0	2.0	90	81.26±1.14 b
9	2.0	2.0	90	31.63±0.56 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差异显著($P<0.05$)。

The values are means±SE from 3 replicates; different lower-case letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

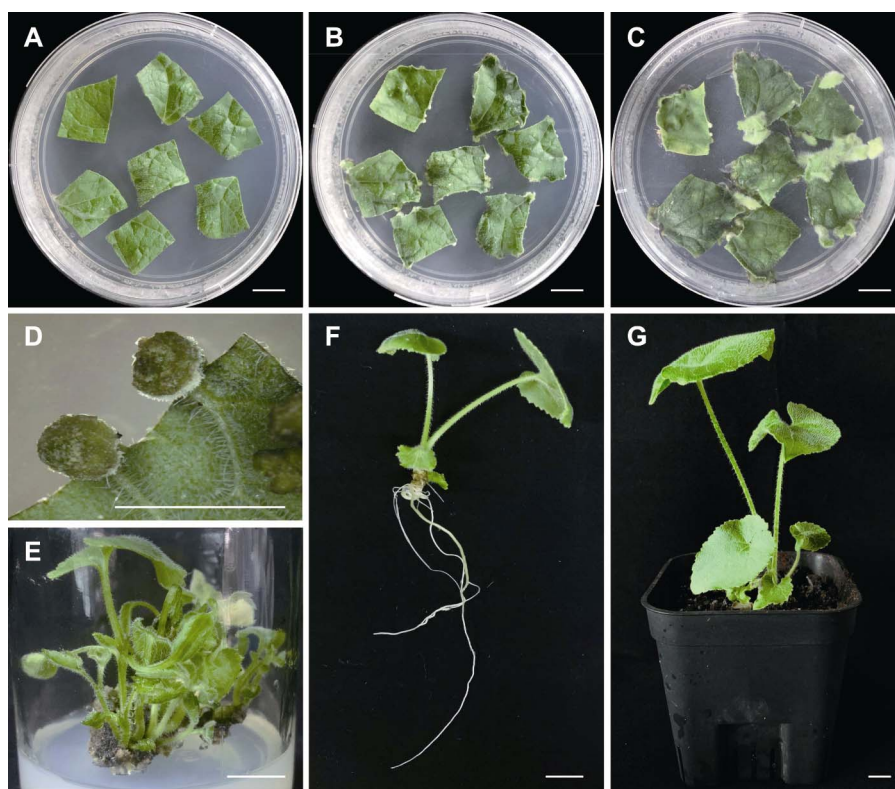


图1 银扇草再生体系的建立

(A) 刚接种的外植体; (B) 愈伤组织诱导; (C) 不定芽分化; (D) 不定芽; (E) 不定芽增殖; (F) 组培苗; (G) 移栽。Bars=1 cm

Figure 1 Establishment of regeneration system for *Lunaria annua*

(A) Freshly inoculated explants; (B) Induction of callus; (C) Differentiation of adventitious buds; (D) Adventitious buds; (E) Adventitious buds proliferation; (F) Seedlings from tissue culture; (G) Transplanting. Bars=1 cm

表4 不同植物生长调节剂组合对银扇草愈伤组织不定芽诱导的影响

Table 4 Effects of different combinations of plant growth regulator on the induction of adventitious bud in callus of *Lunaria annua*

Number	6-BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	Number of explants	Adventitious bud induction rate (%)	Proliferation coefficient
1	0.25	2.0	40	34.08±1.42 d	1.83±0.15 d
2	0.5	2.0	40	84.08±1.38 a	3.63±0.35 a
3	0.75	2.0	40	65.91±2.04 b	2.93±0.15 b
4	1.0	2.0	40	43.41±0.88 c	2.30±0.26 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差异显著($P<0.05$)。

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

导率达84.08%。

不定芽生长7天后, 将其连带叶片一起转移至组培瓶中进行增殖培养, 增殖培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D。培养15天, 愈伤组织上开始分化出新的不定芽, 部分愈伤组织分化出2个或多个

不定芽, 增殖系数达3.63, 此时不定芽呈鲜绿色且整体高度最高(图1E)。

3.4 不定根的诱导

将高2 cm的不定芽切掉底部的愈伤组织后转移至生

根培养基中。15天后, 1号培养基(表5)中的不定芽底部开始出现白色根尖; 30天后, 根尖伸长且根的基部开始分化出新根, 此阶段不定芽持续生长, 形成组培苗(图1F)。2号培养基(表5)中的不定芽则在培养22天开始分化出根尖。结果表明, 在2种培养基中不定芽均能诱导出不定根, 但2号培养基中产生的不定根较细, 且平均根长和根数均低于1号培养基, 而1号培养基中的生根率较高, 达91.63% (表5)。综上, 银扇草最佳生根培养基为1号培养基MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA。

此外, 我们还选取部分长势一致的不定芽在生根培养基中预培养后移入土壤中生根。结果显示, 在生根培养基中预培养后的银扇草用0.1 mg·mL⁻¹ IAA处理可直接在土壤中生根, 且在生根培养基中预培养的时间对生根率有一定影响, 即预培养时间越长生根率越高, 预培养10天生根率达95.83% (表6)。

3.5 2种不同生根方式下幼苗的生长情况

将生根的不定芽进行炼苗移栽, 转入装有湿润营养土的培养钵中, 14天后统计生长情况。结果表明, 培养基诱导生根和土壤中直接生根的银扇草存活率均很高, 分别达93.33%和98.67% (表7)。虽然预培养后在土壤中生根所需的时间较短, 但是用此方式生根的银扇草长势弱于培养基诱导生根。因此, 用培养基诱导生根更适合后续移栽与生长(图1G)。

3.6 讨论

外植体消毒是植物组织培养的基础环节。银扇草叶片密被表皮毛, 外植体难以彻底消毒, 而过高强度的消毒杀菌也会使外植体受到伤害甚至死亡(杜雪玲等, 2005; 牟亚萍, 2022)。韩素菊和张定珍(2022)研究表明, 班纳利音符矾根(*Heuchera micrantha*)的最适消

毒方法是用75%乙醇消毒45秒后再用2%次氯酸钠消毒7分钟, 叶片外植体的成活率可达80.7%; 当次氯酸钠消毒时间为9分钟时, 叶片外植体的存活率降至75.5%。不同材料达到最佳状态的消毒方法不同, 同一材料不同时期达到最佳状态的消毒方法也不同。刘莹(2022)研究发现, 娇媚三变玫瑰(*Rosa rugosa* cv. 'Jiaomei Sanbian')在春季生长期和冬季休眠期其茎段最佳灭菌处理均用75%乙醇处理30秒后再用0.1% HgCl₂处理20分钟; 而在夏季生长期为75%乙醇处理30秒加0.1% HgCl₂处理15分钟。本研究中, 银扇草外植体的最佳消毒方式为75%乙醇消毒45秒配合0.1%升汞溶液消毒6分钟, 在此条件下银扇草外植体的污染率为13.10%, 存活率达86.70%。

愈伤组织是一类具有再生潜能的细胞, 其本质是在生长素诱导下由成体细胞转分化产生类根原基细胞(Sugimoto et al., 2010; Liu et al., 2018)。再生潜能细胞主要是形成层和维管薄壁细胞, 可通过产生伤口、添加激素及微生物诱发等方式改变细胞内关键基因的表达, 进而改变细胞命运(Guo et al., 2018)。在水稻(*Oryza sativa*)地上部组织中, 只有叶片的基部和茎节能够形成愈伤组织, 由于禾本科植物的叶片未保留再生潜能细胞, 水稻的维管束外鞘分化成为通气组织(Wan et al., 2023), 因而只能利用水稻叶片的基部或根诱导愈伤组织。本研究发现银扇草真叶产生愈伤组织的部位集中在叶脉处, 其原因为银扇草叶脉处的维管束周围有较多的再生潜能细胞, 这些再生潜能细胞在生长素的诱导下命运发生改变, 形成愈伤组织, 叶脉越大产生的愈伤组织越大, 质地越紧密。

在植物组织培养过程中, 常通过添加外源植物生长调节剂使之与植物内源生长素和细胞分裂素达到新的平衡(肖燕等, 2020)。添加植物生长调节剂对植

表5 不同培养基配方对银扇草不定根诱导的影响

Table 5 Effects of different formulation of culture media on adventitious root induction of *Lunaria annua*

Number	Medium formulation	Number of explants	Rooting rate (%)	Average root length (cm)	Average root number
1	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	15	91.63±1.67 a	8.14±0.26 a	8.67±1.54 a
2	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ IBA	15	81.78±1.56 b	5.73±0.71 b	6.33±0.88 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差异显著($P<0.05$)。

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

表6 预培养时间对IAA处理后银扇草不定芽生根的影响**Table 6** Effect of pre-incubation time on rooting of adventitious buds of *Lunaria annua* after IAA treatment

Number	Pre-incubation time (d)	Number of explants	Rooting rate (%)
1	0	8	0
2	5	8	20.83±7.22 b
3	10	8	95.83±7.22 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差异显著($P<0.05$)。

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

表7 银扇草再生植株炼苗与移栽**Table 7** Hardening-seedling and transplanting of the regenerated plantlet of *Lunaria annua*

Rooting method	Number of explants	Survival rate (%)	Growth situation
Medium induced rooting	25	93.33±0.58 a	++
Rooting in soil after pre-incubation	25	98.67±0.58 a	+

+: 长势一般; ++: 长势好。数值为3次重复的平均值±标准误；同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

+: General; ++: Good. The values are means±SE from 3 replicates; different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

物组织培养的各环节均有重要作用(Skoog and Miller, 1957)。不同外植体在不同培养阶段所需的激素种类和浓度不同(高亦珂等, 2001; 逯锦春等, 2022)。方平等(2022)研究发现4个品种的黄麻(*Corchorus capsularis*)愈伤组织诱导培养基均不相同。本研究以银扇草真叶为外植体, 发现银扇草愈伤组织诱导过程中生长素的作用非常重要, 在不添加生长素的培养基中, 银扇草外植体的出愈率均低于3%; 与NAA相比, 2,4-D更适合银扇草愈伤组织的诱导。在0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D组合下银扇草叶片外植体的出愈率最高, 为93.37%, 其中紧密的绿色愈伤组织比松散的白色愈伤组织生长更快, 有利于后续不定芽发生。愈伤组织分化也与激素密切相关。廖敏凌等(2023)以平潭野菊(*Chrysanthemum indicum*)混合瓣型株系叶盘为外植体, 发现NAA浓度为2.0 mg·L⁻¹时较适宜叶盘愈伤组织的分化。Lippmann和Lippmann(1984)以大豆(*Glycine max*)幼胚子叶为外植体, 添加生长素类似物2,4-D可使叶片外植体形成

分生组织, 说明一定浓度的生长素及类似物有利于诱导愈伤组织的分化。李颜方等(2020)研究表明, 晋谷21、长农35和长生06三个品种谷子(*Setaria italica*)的愈伤组织在添加2,4-D的培养基中均能分化出不定芽, 其中晋谷21的分化率最高, 达54.23%。Goldstein和Kronstad(1986)以春大麦(*Hordeum vulgare*)开花8天后的幼胚为外植体, 其在添加2,4-D的B5培养基中具有良好的愈伤组织生长和不定芽萌发能力, 其中紧密且呈淡黄色的愈伤组织产生大量的绿色芽原基和新芽。本研究经过多次重复实验, 发现0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D组合能诱导银扇草愈伤组织产生不定芽, 说明生长素类似物2,4-D对部分植物愈伤组织分化不定芽具有促进作用, 这可能是植物内源激素与外源植物生长调节剂共同作用的结果。后续我们将继续关注高浓度细胞分裂素和低浓度生长素组合对银扇草不定芽的诱导效果。

外植体生根是决定再生体系成功的关键步骤, 通常在培养基中添加不同浓度的生长素诱导生根。外植体生根诱导所需的植物生长调节剂种类及浓度不同。严欣等(2022)研究发现1.6 mg·L⁻¹ IBA能促进海州常山(*Clerodendrum trichotomum*)试管苗生根。在0.8 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA处理下, 文心兰(*Oncidium hybridum*)生根效果最佳, 生根率达100% (李雪青等, 2020)。本研究表明, 银扇草最佳生根培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 预培养后浸泡在0.1 mg·mL⁻¹ IAA溶液中, 再移栽到土壤中生根也是一种适宜的方法。

作者贡献声明

曾浩: 完成实验并撰写论文; 李佩芳: 分析数据并参与实验; 郭至辉: 分析数据; 刘春林: 指导实验设计和数据分析; 阮颖: 构思并设计实验, 指导论文写作。

参考文献

- 杜雪玲, 张振霞, 余如刚, 符义坤 (2005). 植物组织培养中的污染成因及其预防. 草业科学 22, 24–27.
- 方平平, 王建勇, 祁建民, 陶爱芬, 徐建堂, 张立武 (2022). 黄麻组培再生体系的研究. 中国麻业科学 44, 133–142.
- 高亦珂, 赵勃, 丁国勋, 张启翔 (2001). 菊花茎叶外植体再生体系的研究. 北京林业大学学报 23, 32–33.
- 韩素菊, 张定珍 (2022). 彩叶矾根“班纳利音符”组培再生体

- 系建立及快繁技术研究. 绵阳师范学院学报 **41**(8), 81–86.
- 赖福兵 (2018). 蒜头果油中高纯神经酸的制备研究. 硕士论文. 南宁: 广西大学. pp. 1–70.
- 李雪青, 盛玉辉, 付瑛格, 周扬, 赵莹, 凌鹏, 宋希强, 王健 (2020). 文心兰高效再生体系的建立. 南方农业学报 **51**, 1169–1175.
- 李颜方, 王高鸿, 杜艳伟, 赵根有, 赵晋锋 (2020). 2,4-D和干燥处理对谷子成熟胚离体再生体系的影响. 生物技术进展 **10**, 304–310.
- 廖敏凌, 蒲娅, 武晓云, 马朝峰, 王文奎, 戴思兰 (2023). 平潭野菊混合瓣型株系再生体系的建立. 植物学报 **58**, 449–460.
- 刘莹 (2022). ‘娇媚三变’玫瑰快繁体系的建立及再生体系的初步研究. 硕士论文. 泰安: 山东农业大学. pp. 1–74.
- 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.
- 牟亚萍 (2022). 牡丹再生体系建立的研究进展. 温带林业研究 **5**(3), 7–11, 20.
- 肖燕, 王振兴, 李东明, 齐艳华, 恩和巴雅尔 (2020). 羊草成熟胚诱导愈伤组织及植株再生系统的优化. 植物学报 **55**, 192–198.
- 严欣, 胡蝶, 贾瑞瑞, 华雅洁, 岳远征, 王良桂, 杨秀莲 (2022). 海州常山组培再生体系的建立. 分子植物育种 **20**, 1297–1303.
- Bailey LH (1949). *Manual of Cultivated Plants*. New York: The MacMillan Company. pp. 443.
- Blažević I, Đulović A, Čikeš Čulić V, Popović M, Guillot X, Burčul F, Rollin P (2020). Microwave-assisted versus conventional isolation of glucosinolate degradation products from *Lunaria annua* L. and their cytotoxic activity. *Biomolecules* **10**, 215.
- Goldstein CS, Kronstad WE (1986). Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. *Theor Appl Genet* **71**, 631–636.
- Guo F, Zhang HD, Liu W, Hu XM, Han N, Qian Q, Xu L, Bian HW (2018). Callus initiation from root explants employs different strategies in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **59**, 1782–1789.
- Guo YM, Mietkiewska E, Francis T, Katavic V, Brost JM, Giblin M, Barton DL, Taylor DC (2009). Increase in nervonic acid content in transformed yeast and transgenic plants by introduction of a *Lunaria annua* L. 3-ketoacyl-CoA synthase (KCS) gene. *Plant Mol Biol* **69**, 565–575.
- Lippmann B, Lippmann G (1984). Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep* **3**, 215–218.
- Liu J, Hu XM, Qin P, Prasad K, Hu YX, Xu L (2018). The *WOX11-LBD16* pathway promotes pluripotency acquisition in callus cells during *de novo* shoot regeneration in tissue culture. *Plant Cell Physiol* **59**, 734–743.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–497.
- Skoog F, Miller CO (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118–130.
- Sugimoto K, Jiao YL, Meyerowitz EM (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* **18**, 463–471.
- Wan QH, Zhai N, Xie DX, Liu W, Xu L (2023). *WOX11*: the founder of plant organ regeneration. *Cell Regen* **12**, 1.

Establishment of a Regeneration System for *Lunaria annua*

Hao Zeng^{1,2}, Peifang Li^{1,2}, Zhihui Guo^{1,2}, Chunlin Liu^{1,3}, Ying Ruan^{1,2*}

¹Key Laboratory of Crop Epigenetic Regulation and Development, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

²College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ³College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract In order to establish an *in vitro* regeneration system for *Lunaria annua*, its true leaves were used as explants to study the effects of sterilization conditions, combinations and concentrations of plant growth regulator on the induction of callus and on the differentiation of adventitious buds and roots; The effect of rooting methods on the growth of seedlings and young plants was further explored. The results showed that the best disinfection treatment for leaf explants was a combination of 75% alcohol for 45 seconds and 0.1% HgCl₂ solution for 6 minutes. The most suitable medium for induction of callus and differentiation of adventitious buds was MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D. The induction rate of callus reached 93.37% and the differentiation rate of adventitious buds reached 84.08%. The best rooting medium was MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA, and the time from inoculating leaf explants to obtaining regenerated plants was about 90 days. In this study, a stable regeneration system was established, which laid a foundation for the development and utilization of *L. annua* resources and digging for functional genes.

Key words *Lunaria annua*, callus, tissue culture, regeneration system

Zeng H, Li PF, Guo ZH, Liu CL, Ruan Y (2024). Establishment of a regeneration system for *Lunaria annua*. *Chin Bull Bot* 59, 433–440.

* Author for correspondence. E-mail: yingruan@hotmail.com

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者/团队简介

阮颖, 湖南农业大学生物科学技术学院二级教授, 博士生导师, 作物表观遗传调控与发育湖南省重点实验室主任, 植物遗传与分子生物学湖南省高等学校重点实验室主任; 兼任国家自然科学基金外围评审专家, 国家科技奖励专家库专家, 教育部博士后基金评审专家, 湖南省植物学会常务理事, 担任 *Frontier in Plant Science*、*Current Genomics* 等杂志的审稿专家。近5年, 共发表研究论文35篇, 其中SCI收录16篇, 申请授权发明专利4项, 编写教材3部。目前研究团队主要以油料作物油菜、蓖麻、银扇草等为材料, 重点研究植物开花及品质性状的表观遗传调控机制, 为提高作物产量和改良作物品质提供理论依据。