

# 夏堇悬浮细胞培养与植株再生研究

梁 峥, 李 厚 华, 阙 怡, 付 林 江, 李 玲, 郭 亦 博

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以夏堇品种“小丑”的组培苗幼嫩叶片为试材,进行愈伤组织诱导、细胞悬浮培养及植株再生诱导的研究。结果表明:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D 的培养基能够使叶片诱导为生长迅速、质地疏松的愈伤组织。愈伤组织最适宜的悬浮培养条件为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D 液体培养基,20 g/L 的起始接种量以及 100 r/min 的震荡培养。将继代 3~4 次的细胞悬浮颗粒转到 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的固体再生培养基上培养,3 周后可以诱导分化出芽,进而获得完整植株。悬浮培养有利于夏堇愈伤组织的再生,悬浮培养对提高以夏堇作为模式植物进行的相关研究具有重要的应用价值。

**关键词:**夏堇;悬浮培养;植株再生

**中图分类号:**S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0109-05

夏堇(*Torenia fournieri* L.)属玄参科蝴蝶草属 1 a 生观赏草本植物,不仅在园艺生产实践中占有重要地位,而且还具有很高的科研价值。夏堇具有特殊的裸露胚囊,适于进行授粉受精研究<sup>[1-2]</sup>。其不定根和不定芽非常容易被诱导,是优良的形态发生学研究植物<sup>[3]</sup>。夏堇基因组小、容易被转化,是一种实用的遗传转化模式植物<sup>[4]</sup>。夏堇可以在试管中开花、结种<sup>[5]</sup>,在组培条件下,能够在短周期内完成完整的生活史,而与同为模式植物的拟南芥相比,夏堇在一些观赏特征如花色、花形等方面更具有研究价值<sup>[4]</sup>。

悬浮培养是通过振荡或转动装置使细胞始终处于分散悬浮于培养液内的一种培养方法。植物细胞悬浮培养系统具有效率高、同步性和重复性好的特点,是研究细胞生理生化过程、器官发生和分化的理想体系<sup>[6-7]</sup>。悬浮细胞分散性好、易于分离,是进行原生质体分离的理想材料<sup>[8-12]</sup>。细胞悬浮培养有效的解决了诱变和转化嵌合体的问题,不仅可以用于筛选和诱发细胞突变体,更是进行体细胞杂交和遗传转化等研究的优良材料<sup>[13-15]</sup>。

迄今,已有许多植物建立了细胞悬浮培养与植株再生体系<sup>[16-19]</sup>,但夏堇细胞悬浮培养体系的建立及植株再

生的研究尚鲜见报道。该研究以夏堇品种“小丑”的组培苗幼嫩叶片为试材,进行愈伤组织诱导、细胞悬浮培养体系建立以及诱导植株再生等研究,以期对夏堇的育种、次生代谢产物生成和转基因工作提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试“小丑”夏堇组培苗由西北农林科技大学林学院分子生物学实验室培养(图 6-A)。每 30~40 d 取生长旺盛的带有顶芽 2~3 cm 茎段,转入加蔗糖 30 g/L、琼脂 7.0 g/L、IBA 0.2 mg/L 的 1/2MS 培养基进行继代培养,pH 5.8,温度(25±2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 16 h/d。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 愈伤组织的诱导** 取 3~4 周的夏堇组培苗顶端完全展开的前 4 片嫩叶,用解剖刀切成约 0.5 cm<sup>2</sup> 的叶盘,接种于愈伤组织诱导培养基中。以 MS+细菌水解酪素 1.0 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L 为基础培养基,分别以 0.5、1.0、2.0 mg/L 6-BA 与 0、0.1、0.2 mg/L 2,4-D 进行正交培养,共 9 种处理。每处理接种 20 片叶盘,重复 3 次。于(25±2)℃,暗处培养,每 2 周继代 1 次。4 周后观察统计愈伤组织诱导率、褐化率及其生长状态。

**1.2.2 细胞悬浮培养体系的建立** 将在 1.2.1 优化培养基中培养的生长旺盛、质地松散的胚性愈伤组织,用镊子夹碎,放入培养液中震荡培养(培养液配方为优化的培养基去除琼脂)。按照表 1 所列 3 组因素的顺序,进一步优化悬浮培养条件。试验采用 150 mL 三角瓶,每

**第一作者简介:**梁峥(1987-),女,硕士,现主要从事植物基因工程和类黄酮次生代谢等研究工作。

**责任作者:**李厚华(1973-),男,博士,副教授,现主要从事植物基因工程和类黄酮次生代谢等研究工作。E-mail:lihouthua73@163.com

**基金项目:**西北农林科技大学引进人才经费资助项目(Z111020901);西北农林科技大学基础科研业务费资助项目(Z109021001)。

**收稿日期:**2012-12-13

瓶盛放 40~60 mL 培养基。每个处理同时接种 3 瓶,重复 3 次。于(25±2)℃,暗处培养。每 2 周继代 1 次,继代时三角瓶静置 10 min,再从中层吸取悬浮液,注入相同成分的新鲜培养基中,新旧培养液比例为 5:1。每隔 2 d 取悬浮培养物 15 mL,称量细胞鲜重<sup>[20]</sup>。取 1.0 mL 悬浮培养液加入已知重量为  $M_1$  的微量离心管中;在离心管底部切一条约 1.0 mm 深的裂缝,将该离心管插在另 1 支离心管中;将该装置放入 50 mL 离心管中,于 6 000 r/min 下离心 2 min,取出最初的离心管称重  $M_2$ ;悬浮细胞鲜重  $M=M_2-M_1$ 。

表 1 细胞悬浮培养变量设计

Table 1 Variables design for cell suspension culture

变量名称 Variable name	变量数值 Variable value
植物激素 Plant hormones	2,4-D 0,0.1,0.2 mg/L 6-BA 0.5,1.2 mg/L
摇床转速 Shaking speed	60,80,100,120,140 r/min
起始接种量鲜重 Fresh weight of initial inoculum (m/v)	20,40,60,80,100 g/L

1.2.3 悬浮颗粒的植株再生 吸取 1.2.2 优化的培养基中培养的悬浮颗粒,加入到夏堇诱导再生培养基上培养。以 1/2MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 为基础培养基,分别以 0.5、1.0、2.0 mg/L 6-BA 与 0、0.1、0.2 mg/L NAA 进行正交处理,共 9 种处理,对诱导夏堇植株再生的植物激素浓度配比进行优化。每处理接种 6 瓶,重复

表 2 不同的激素浓度组合对夏堇愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different hormone combinations on callus induction of *Torenia fournieri*

编号 No.	激素组合 Hormone combination/(mg·L <sup>-1</sup> )		愈伤组织分化率 Differentiation rate/%	褐化率 Browning rate/%	生长状况 Growth condition
	6-BA	2,4-D			
①	0.5	0.0	0.00	1.67±2.89	叶片分化出细长稀疏的芽,无愈伤组织
②	1.0	0.0	0.00	0.00	叶片分化出较矮小较密集的芽,无愈伤组织
③	2.0	0.0	0.00	0.00	叶片分化出矮小密集的芽,无愈伤组织
④	0.5	0.1	81.67±2.89	48.33±7.64	叶片局部生长愈伤组织,黄色疏松生长缓慢
⑤	1.0	0.1	80.00±10.00	25.00±8.66	叶片整体生长愈伤组织,淡黄色疏松生长快
⑥	2.0	0.1	78.33±2.89	11.67±7.64	叶片整体生长愈伤组织,白色紧密生长快
⑦	0.5	0.2	95.00±5.00	95.00±8.66	叶片局部生长愈伤组织,黄色疏松生长快,随后褐化
⑧	1.0	0.2	93.33±7.64	80.00±10.00	叶片整体生长愈伤组织,淡黄色疏松生长快,随后褐化
⑨	2.0	0.2	91.67±2.89	46.67±12.58	叶片整体生长愈伤组织,白色紧密生长快,随后褐化

## 2.2 细胞悬浮培养体系的建立

### 2.2.1 不同的激素浓度组合对悬浮细胞生长的影响

从表 3 可以看出,不同的激素浓度组合对悬浮细胞生长影响显著。与愈伤组织诱导试验结果类似,无 2,4-D 的组合中,悬浮细胞生长旺盛,但是当悬浮细胞形成细胞团后就变的难以保持松散的状态,极易形成淡黄色至黄绿色的悬浮颗粒,继而分化出芽;当 2,4-D 浓度为 0.1 mg/L 时,悬浮细胞生长旺盛,单细胞比例增大,悬浮颗粒呈淡黄色、约 16 d 后开始出现少量的褐化;当 2,4-D 浓度为 0.2 mg/L 时,悬浮细胞生长量明显下降,5~7 d 悬浮颗粒开始出现褐化现象,并且迅速扩散至全部悬浮颗粒,最终导致生长停滞。在 2,4-D 浓度一定的情况下,随着 6-BA 浓度的增加,悬浮细胞的生长量呈上升趋势,颗粒

3 次。于(25±2)℃培养,光照时间 16 h/d。30 d 后统计出芽率。将不同继代次数的悬浮颗粒分别进行固体培养基上的再生诱导(培养基配方为诱导出芽率最高的植株再生培养基)。每种处理接种 6 瓶,重复 3 次。置于(25±2)℃培养,光照时间 16 h/d。30 d 后观察统计出芽率。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

夏堇叶盘在愈伤组织诱导培养基中培养约 5~7 d 后可以观察到明显的膨大,10~12 d 后叶片开始出现不同程度的分化(图 6-B)。从表 2 可知,不同浓度 6-BA 和 2,4-D 组合对夏堇愈伤组织诱导的影响存在显著差异,随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤组织的分化率明显增大;在 2,4-D 存在的情况下,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织的分化率呈下降趋势,但并不明显。诱导 18~20 d 后部分组合开始出现不同程度的褐化现象,随着 2,4-D 的浓度增加,褐化率逐渐增加。随着 6-BA 的浓度增加,褐化率逐渐减小,愈伤组织的质地趋于紧密,颜色趋于变白。愈伤组织的生理状态表明,1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D 组合所得多为结构疏松、易于分散的淡黄色愈伤组织(图 6-C),且该愈伤组织生长速度快,再生能力强,适合用于悬浮细胞培养系的建立。

状态趋于紧密。从不同激素浓度组合影响下的悬浮细胞生长曲线(图 1)中可以看出,随 2,4-D 浓度的增加,细胞生长启动加速。相同 2,4-D 浓度情况下,随着 6-BA 的浓度增加,对数期的增殖速度提高,悬浮细胞的生长总量变大。综上所述,1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D 组合的悬浮细胞生长量大、单细胞比例较大,最适于建立良好的悬浮体系(图 6-D 左),显微镜下可以观察到分裂旺盛的细胞团(图 6-E),适于进行细胞形态观察和原生质体分离等研究。而 2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D 的组合悬浮颗粒活力旺盛、质地较紧密(图 6-D 右),继代 2~3 次后可以清晰的观察到直径 1~2 mm 的悬浮颗粒(图 6-F),最适于进行悬浮颗粒的植株再生。

表 3 不同激素浓度组合对夏堇悬浮细胞生长的影响

Table 3 Effect of different hormone combinations on suspended cells of *Torenia fourieri*

编号 No.	激素组合 Hormone combination/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		细胞鲜重 *	悬浮培养细胞生长状态
	6-BA	2,4-D	Fresh weight of cells/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Growth condition of suspension culture cells
①	0.5	0.0	50.53±11.30	单细胞较少、细胞团颗粒较多、淡黄色、出芽少量
②	1.0	0.0	52.72±9.85	单细胞较少、细胞团颗粒较多、淡黄色、出芽较多
③	2.0	0.0	55.17±5.05	单细胞较少、细胞团颗粒较多、黄绿色、出芽大量
④	0.5	0.1	38.76±8.12	单细胞多、细胞团颗粒较少、淡黄色、疏松
⑤	1.0	0.1	41.22±7.15	单细胞多、细胞团颗粒较少、淡黄色、疏松
⑥	2.0	0.1	44.75±10.51	单细胞较少、细胞团颗粒较多、淡黄色、紧密
⑦	0.5	0.2	20.43±2.23	单细胞少、细胞团颗粒少、褐化
⑧	1.0	0.2	22.29±4.72	单细胞少、细胞团颗粒少、褐化
⑨	2.0	0.2	26.43±1.43	单细胞少、细胞团颗粒少、褐化

注: \* 的数据取自继代培养 14 d。下同。

Note: Datas after \* were taken from the subculture of 14 days. The same below.

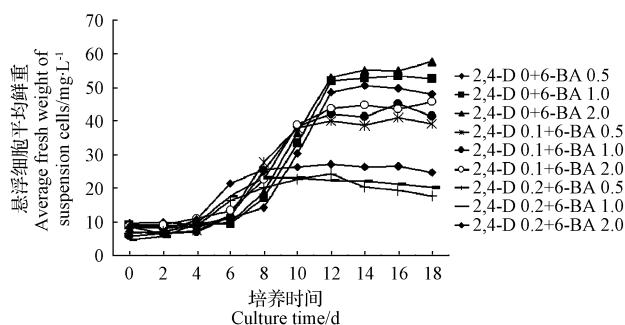


图 1 不同激素浓度组合影响下的悬浮细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curves of suspended cells under influence of different hormone combination

2.2.2 摇床转速对悬浮细胞生长的影响 从图 2 中可以看出,适当提高摇床的转速可以增加悬浮细胞的生长量。当摇床转速从 60 r/min 增加到 100 r/min 时,悬浮细胞的生长量逐渐增加到最大均值 41.2 mg/L。继续增大摇床转速,悬浮细胞的生长量明显下降,摇床转速 140 r/min 时,悬浮细胞生长量已经下降到了平均 20.9 mg/L。因此,100 r/min 的摇床转速最适合进行夏堇细胞悬浮培养。

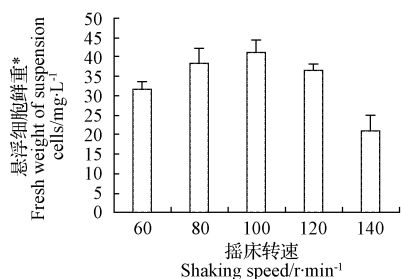


图 2 摇床转速对悬浮细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of shaking speed on suspended cells

2.2.3 起始接种量对悬浮细胞生长的影响 对比不同起始接种量样本的生长情况(图 3)可以看出,较大的起始接种量有利于细胞适应液体的悬浮培养环境,能够迅速启动生长增殖。当接种量鲜重为 5 g/L 时,细胞迟滞期需 14~16 d,随着接种量的增大,迟滞期明显缩短,当接种量鲜重达到 60 g/L 时,迟滞期缩短至 2~3 d。由图

4 可知,随着继代次数的增加,5 和 10 g/L 起始接种量的样本生长量逐渐增加,20 g/L 起始接种量的样本生长量基本稳定,而 40、60 g/L 的样本生长量呈下降的趋势。因此,鲜重 20 g/L 的起始接种量能够使悬浮细胞在短时间内获得较大的生长量,并且最有利于保持悬浮细胞的持续再生能力,最适合进行夏堇细胞悬浮培养。

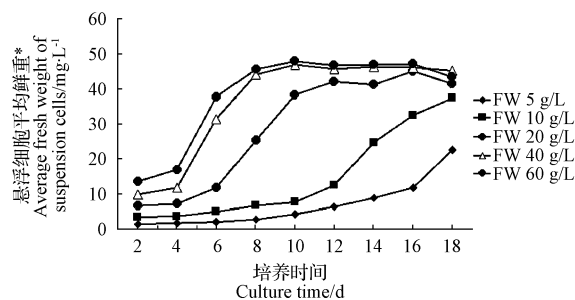


图 3 不同起始接种量影响下的悬浮细胞生长曲线

Fig. 3 Effect of initial inoculum on suspended cells

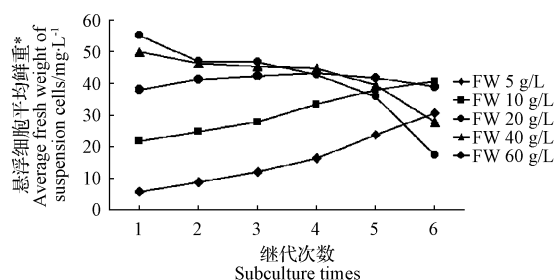


图 4 不同起始接种量对悬浮细胞持续再生的影响

Fig. 4 Effect of initial inoculum on continuous regeneration of suspended cells

## 2.3 悬浮颗粒的植株再生

2.3.1 不同的激素浓度组合对悬浮颗粒植株再生的影响 将悬浮颗粒置入固体再生培养基上进行诱导再生,最初颗粒体积渐渐膨大(图 6-G),2~3 周后出芽(图 6-H),随后株高增高并生根,最终形成完整植株(图 6-I),9 种不同激素浓度组合均能够有效的将悬浮颗粒诱导出芽。但在 NAA 浓度相同时,随着 6-BA 浓度的增大,再生颗粒的出芽率变大,出芽时间提前。NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,再生颗粒的平均出芽率高于相同条件下含有 0.2 mg/L



NAA 和不含 NAA 的组合,且出芽时间最早(表 4)。因此,1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的组合最适于进行悬浮颗粒植株的再生培养。

表 4 不同的激素浓度组合对悬浮颗粒植株再生的影响

Table 4 Effect of different hormone combinations on plant regeneration

序号 No.	激素组合 Hormone combination/mg · L <sup>-1</sup>		出芽率 Germination rate/%	起始出芽时间 Germination time/d
	6-BA	NAA		
①	0.5	0.0	81.5±3.47	21
②	1.0	0.0	85.3±6.22	20
③	2.0	0.0	91.4±2.13	16
④	0.5	0.1	88.7±8.25	14
⑤	1.0	0.1	93.4±9.76	12
⑥	2.0	0.1	92.7±11.26	12
⑦	0.5	0.2	77.6±7.79	15
⑧	1.0	0.2	82.5±5.32	15
⑨	2.0	0.2	85.6±12.67	14

2.3.2 继代次数对悬浮颗粒植株再生的影响 悬浮颗粒的继代次数与其再生的能力直接相关(图 5)。继代次数从 1~3 时,悬浮颗粒的再生出芽率从 11.7 %迅速升至 93.4 %,随着继代次数继续增加,悬浮颗粒的再生出芽率呈现下降的趋势。该结果表明,继代 3~4 次的悬浮颗粒大小均匀、再生能力强,最适合用于植株再生。

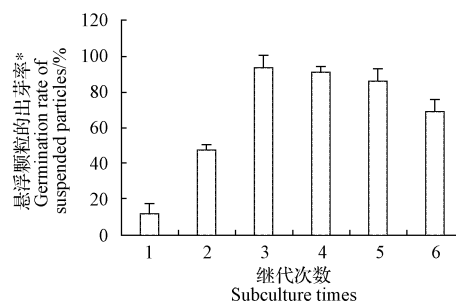


图 5 继代次数对悬浮颗粒植株再生的影响

Fig. 5 Effect of subculture times on plant regeneration

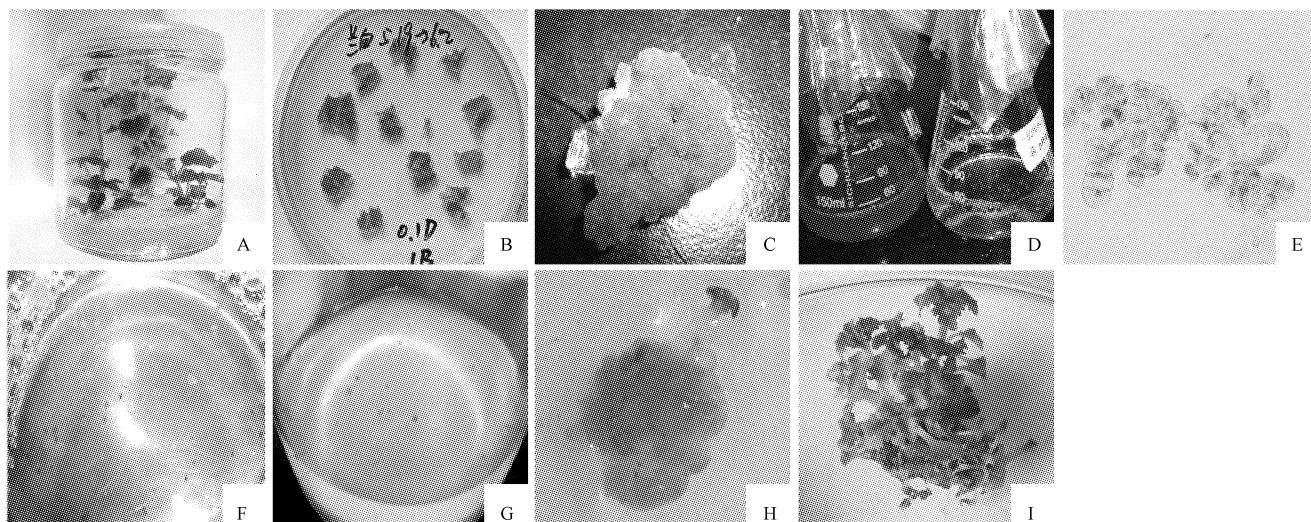


图 6 夏堇夏堇悬浮细胞培养与植株再生

注:A. 夏堇组培苗;B. 由叶片诱导愈伤组织;C. 生长旺盛质地疏松的夏堇愈伤组织;D. 细胞悬浮培养;E. 显微镜下分裂旺盛的悬浮细胞,×400;F. 悬浮培养颗粒;G. 悬浮颗粒诱导植株再生初期;H. 悬浮颗粒诱导出芽;I. 悬浮颗粒诱导植株。

Fig. 6 Cell suspension culture and shoots regeneration of *Torenia fourieri*

Note: A. *Torenia* tissue culture; B. Inducing callus with leaves; C. Rapid-growing and loose calli; D. Cell suspension cultures; E. Dividing cells in suspension culture, ×400; F. Suspended particles; G. Inducing regeneration with suspended particles; H. Suspended particles budding; I. Plants from suspended particles.

### 3 结论与讨论

能够保持良好分散性的悬浮培养细胞是分离原生质体,进行细胞融合、遗传转化等研究的理想材料,但是这些分散的单细胞并不易于建立快速的植株再生体系。只有当悬浮细胞形成聚集的细胞颗粒时,才能够用于植株再生。该试验筛选了 2 种不同激素浓度的培养液,分别用于保持分散的悬浮细胞和形成有利于再生的悬浮颗粒,在应用中可以根据不同的需要选择合适的培养液。

悬浮培养植株再生试验结果表明,第 1~2 次继代

的悬浮细胞植株再生率低,可能是由于培养初期的悬浮液中细胞团稀少,不利于植株再生。3 次继代后植株再生出芽率随着继代次数的增加逐渐降低,陈发棣等<sup>[21]</sup>在小菊悬浮细胞的植株再生研究中也发现了类似的现象。这可能是由于继代过程中,积累了有害的代谢物质而导致。虽然夏堇的再生出芽率在后续的继代培养过程中有所降低,但是连续继代 6 次后仍然能达到 70% 以上,完全能够满足一般组织培养植株再生研究的需要。如果要将夏堇细胞悬浮再生体系应用于细胞融合、诱变育种等研究,则最好选取继代 3~4 次的细胞系,以获得更

高的成功率。

按照一般方法运用愈伤组织建立悬浮细胞培养体系,通常需要花费几个月的时间,建立良好的悬浮培养和再生体系在有些植物中甚至十分困难<sup>[22]</sup>。而在该研究中,夏堇悬浮细胞系在6周左右就达到了良好的状态,植株再生则只需要3周即可出芽,且出芽率高,数量大,说明夏堇适合进行悬浮培养,可用作悬浮培养相关研究的模式植物。

### 参考文献

- [1] Higashiyama, Yabe S, Sasaki N, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell[J]. Science, 2001, 293: 1480-1483.
- [2] Higashiyama T, Inatsugi R, Sakamoto S, et al. Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri* [J]. Plant Physiol, 2006, 142: 481-491.
- [3] Tanimoto S, Harada H. Wishbone flower [M]//In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Bajaj YPS (eds) Handbook of Plant Cell Culture, Vol 5 Ornamental Species [A]. New York: McGraw-Hill, 1990: 763-782.
- [4] Aiida R. *Torenia fournieri* (torenia) as a model plant for transgenic studies [J]. Plant Biotechnology, 2008, 25: 541-545.
- [5] Aida R, Shibata M. Transgenic *Torenia fournieri* Lind. (torenia) [M]//In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry [A]. Berlin: Springer Verlag, Transgenic Crops III, 2001, 48: 294-305.
- [6] Vasil I K. Molecular improvement of cereals [J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 925-937.
- [7] Guenzi A, Scheets K, Green L, et al. Development and characterization of a nonmorphogenetic cell line of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2004, 78: 23-28.
- [8] Vasil V, Rrdwayf, Vasil I K. Regeneration of plant from embryogenic suspension culture protoplast of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Biotechnology, 1990, 8: 429-433.
- [9] Li Z Y, Xia G M, Chen H M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic suspension culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1992, 28: 79-85.
- [10] Li H, Machii H, Hagio T, et al. Plant regeneration from protoplasts of

*Triticum aestivum* L. cv. Nakasoushu [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1999, 58: 119-125.

- [11] Yu C H, Chen Z, Lu L, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspensions [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2000, 61: 51-58.
- [12] Zhang L, Rybcayński I J, Langenberg W G, et al. An efficient wheat transformation procedure, transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 241-250.
- [13] Finer J J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment [J]. Plant Cell Rep, 1990 (8): 586-589.
- [14] Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Maugano M L. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants [J]. Plant Cell, 1990 (2): 603-618.
- [15] Fromm M E, Morrish F, Armstrong C. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants [J]. Biotechnology, 1990 (8): 833-839.
- [16] Mizuhiro M, Kenichi Y, Ito K, et al. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Primula malacoides* and *Primula obconica* [J]. Plant Science, 2001, 160: 1221-1228.
- [17] Patrizio C R. Callus induction and plant regeneration from gladiolus [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 42: 171-178.
- [18] Buttevekd J, Fransz P F, Creemers-Molenaar J. Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension culture of leak [J]. Plant Science, 1994, 100: 195-202.
- [19] Katsuhiko S, Magao M, Mitsuo, et al. Plantlet formation from cell suspensions of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis*) [J]. Scientia Horticulturae, 1988, 37: 123-128.
- [20] 孙盈盈. 测量培养细胞鲜重和干重的新方法 [J]. 生物技术通报, 1997 (2): 33-34.
- [21] 陈发棣, 蒋甲福, 郭维明, 等. 小菊悬浮细胞培养与植株再生研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (5): 1021-1026.
- [22] Vasil I K. Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and grass crops [J]. J Plant Physiol, 1987, 128: 193-218.

## Study on Cell Suspension Culture and Plant Regeneration of *Torenia fournieri* L.

LIANG Zheng, LI Hou-hua, QUE Yi, FU Lin-jiang, LI Ling, GUO Yi-bo

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Taking young leaves of *Torenia fournieri* 'Clown' series as material, the callus induction, suspension culture and plant regeneration were studied. The results showed that MS medium with supplement of 1.0 mg/L 6-benzylamino purine (6-BA) and 0.1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) efficiently induced rapid-growing and loose callus. The obtained callus was taken as suspension culture material. The most suitable conditions for the establishment of cell suspension culture were liquid MS medium with 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L 2,4-D, initial inoculum of 20 g/L, shaking speed of 100 r/min. The suspended particles which were subcultured 3~4 times then cultured on half strength minerals of solid MS medium with 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L 1-naphthylacetic acid (NAA) for inducing regeneration. The buds came out in 3 weeks and later complete plants would be obtained. The suspension culture system had important application value in improving study which taking *Torenia fournieri* L. as a model plant.

**Key words:** *Torenia fournieri* L.; suspension culture; plant regeneration