

文章编号:1000-2642(2006)03-0422-03

野葛(*Pueraria lobata*)愈伤组织诱导及组织培养魏世清<sup>1</sup>,张磊<sup>1\*</sup>,张琴<sup>1</sup>,李艳宾<sup>1</sup>,张超<sup>1,2</sup>

(1. 西南大学资源与环境学院,重庆 400715; 2. 重庆市果树研究所,重庆江津 402260)

**摘要:**以野葛茎尖分生组织为外植体,通过不同激素与MS培养基配比试验,筛选出野葛茎尖分生组织愈伤组织诱导与植株再生的最适培养基,建立野葛植株再生体系。试验结果表明:茎尖分生组织在MS+2,4-D 0.5 mg/L培养基上启动诱导愈伤组织,再转移到MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L继续诱导,愈伤组织诱导率高,繁殖能力旺盛。在MS+6-BA 1 mg/L培养基上愈伤组织分化率100%,生长能力较强。在MS+NAA 0.1 mg/L培养基上,诱导生根率达到60%。

**关键词:**野葛;茎尖分生组织;愈伤组织

中图分类号:S 567

文献标识码:A

CALLUS INDUCTION AND PLANTLET REGENERATION  
OF *PUERARIA LOBATA* IN TISSUE CULTUREWEI Shi-qing<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1\*</sup>, ZHANG Qin<sup>1</sup>, LI Yan-bin<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1,2</sup>

(1. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Chongqing Fruit Research Institute, Jiangjin, Chongqing 402260, China)

**Abstract:** The meristems of stem tips of *Pueraria lobata* were used as explants in *in vitro* culture. The optimum medium for callus induction from the meristems was MS + 2,4-D 0.5 mg/L. Then the calli were transferred to MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L for subculture. The differentiation rate of calli on MS + 6-BA 1 mg/L was as high as 100%. The shoots rooted readily on MS + NAA 0.1 mg/L, with a rooting rate of 60%.

**Key words:** *Pueraria lobata*; meristem of stem tip; callus

野葛(*Pueraria lobata*)属豆科蝶形花亚科葛属1种多年生落叶藤本植物,在我国除西藏和新疆外,全国各省区均有分布<sup>[1]</sup>。野葛适应性强,耐干旱、瘠薄,可在山坡、陡壁、荒谷沙地上旺盛生长,是世界各国极为重视的水土保持植物,被誉为“大地良医”<sup>[2]</sup>。同时野葛也是优良的饲草植物和药用植物,野葛的茎、叶是良好的饲料,其根、叶、花、果亦可入药<sup>[3]</sup>。

但野葛种子很难获得,且发芽率很低,给人工种植带来不便<sup>[4]</sup>。前人对野葛组织培养研究较少,多

集中在茎、幼叶愈伤组织的诱导,于树宏等<sup>[5]</sup>研究表明,野葛成熟叶最适宜诱导愈伤组织,但分化率偏低,最高仅能达到44.1%。王义强<sup>[6]</sup>报道了不同激素组合对野葛愈伤组织诱导及芽分化的影响,愈伤组织诱导率及分化率都偏低。参考施和平<sup>[7]</sup>的方法,对野葛茎段及叶柄进行愈伤组织的诱导,但诱导率极低,愈伤组织还易褐化,结果未列出。张雅琼<sup>[8]</sup>认为幼嫩茎尖分生细胞,代谢活性很高,不易受微生物的侵染,且茎尖分生组织带有叶原基,较易诱导愈伤组织。

收稿日期:2006-03-22

基金项目:国家“973”基金资助项目(001 CB 108905)

作者简介:魏世清(1980-),女,四川成都人,西南大学硕士研究生,从事微生物与植物营养研究。

\*为通讯作者

而利用野葛茎尖分生组织的组织培养未见报道,若采用野葛茎尖诱导愈伤组织,其效果如何,基于此,本试验选取野葛茎尖分生组织诱导愈伤组织,探讨其组织培养的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料取自重庆市北碚区漕上生长健壮的野葛 (*Pueraria lobata*), 采其幼嫩青绿茎尖作为外植体。

### 1.2 外植体处理

将野葛茎尖放于 1 000 mL 烧杯中,加入 2~4 滴 Tween 80, 自来水浸泡冲洗 30 min 左右,用 70% 的酒精消毒 30 s, 无菌水清洗 3~4 次,0.1% 的酸性升汞消毒 6~8 min, 无菌水清洗 5~6 次。用消毒镊子和解剖刀在体视显微镜下剥去茎尖外面的芽鳞和幼叶, 切取大小 0.4~0.6 mm 带有叶原基的分生组织接种到诱导愈伤组织的培养基上。

### 1.3 培养基配置

本试验采用 MS 培养基<sup>[9]</sup>, 不同阶段附加不同激素, 蔗糖 30 g/L, 琼脂粉 7~8 g/L, pH 5.8~6.0, 在 121℃ 采用高压蒸汽灭菌 20 min。

(I) 愈伤组织诱导培养基和继代培养基: MS + 2,4-D(0.2, 0.5, 0.8, 1) mg/L, MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA(0.5, 1) mg/L;

(II) 分化培养基: MS + 6-BA(1, 2, 3) mg/L;

(III) 生根培养基: MS + NAA(0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4) mg/L。

### 1.4 培养过程

将消毒茎尖分生组织接种于愈伤组织诱导培养基上, 每天光照 14~16 h, 光强度 2 500~3 000 lx, 培养期间温度保持在  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 。待茎尖分生组织诱导出愈伤组织, 将其转移到 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA(0.5, 1) mg/L 继续诱导愈伤组织, 经过 2 次继代之后, 愈伤组织长至 0.8~1.2 cm, 转移到分化培养基上, 愈伤组织分化出芽后, 再转移到生根培养基中, 待长出不定根, 幼苗生长健壮后移出培养瓶培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素浓度对诱导愈伤组织的影响

将无菌野葛茎尖分生组织接种到诱导培养基上, 愈伤组织的生长差异不大。试验结果表明: 分生组织接种后约 3 d 左右, 大部分分生组织颜色转绿, 从底端膨大(见图 1), 约 5~6 d 后, 将其转移到 MS + 6-

BA 0.5 mg/L + NAA(0.5, 1) mg/L 继续诱导愈伤组织。



图 1 2,4-D 启动诱导愈伤组织

Fig 1 Callus induction by 2,4-D

从表 1 可以看出, 在 0.2~1 mg/L 范围内, 2,4-D 均能启动诱导茎尖分生组织产生愈伤组织, 2,4-D 浓度在 0.5 mg/L 时, 愈伤组织诱导率达到 98.0%, 效果最明显。膨大的茎尖在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA(0.5, 1) mg/L 培养基上培养时, 约 12~14 d 后, 愈伤组织逐渐形成, 待长至 0.8~1 cm, 可以进行继代培养。6-BA 浓度保持 0.5 mg/L 不变, NAA 浓度为 0.5 mg/L 时, 愈伤组织形成时间约 12 d 左右, 色泽嫩绿, 结构致密, 继代培养时有旺盛的繁殖能力; NAA 浓度为 1 mg/L, 愈伤组织继代培养时出现褐化现象。试验结果表明: MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 为野葛愈伤组织较为适宜的诱导和继代培养基。

表 1 不同 2,4-D 浓度对诱导愈伤组织的影响

Table 1 The effect of different concentration of 2,4-D on inducing callus tissue

2,4-D 浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	外植体个数/个	出愈数/个	诱导率/%
0.2	45	40	88.8
0.5	50	49	98.0
0.8	47	38	80.9
1	42	34	81.0

### 2.2 愈伤组织的分化培养

将继代 2 次的愈伤组织转移到分化培养基 MS + 6-BA(1, 2, 3) mg/L 上, 约 1 周后, 开始分化(见图 2)。约 15 d 后, 从芽个体长至 1.2~1.5 cm 大小时, 按照出芽的数目将其分株切割, 转移到新鲜分化培养基上, 继代 20 d 后幼芽便分节, 株高达到 0.8~1.4 cm。在愈伤组织分化出芽的过程中, MS 培养基 6-BA 浓度分别为 0.8, 1, 2, 3 mg/L, 但出芽率并不是随着激素浓度升高而升高的, 由表 2 看出, 当 6-BA 浓度为 1 mg/L 时, 对于愈伤组织分化出芽最有利。

表2 不同6-BA浓度对出芽情况的影响

Table 2 The effect of different concentration of 6-BA on callus differentiation

6-BA 浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	出芽率 /%	平均株高 /cm	生长情况
0.8	87	0.4	叶片轻度弯曲,有褐化现象
1	100	1.3	颜色嫩绿,幼苗健壮,生长最好
2	100	0.9	叶片部分弯曲,高度不一
3	85	0.5	叶片瘦小,幼苗高低不一



图2 野葛愈伤组织分化情况

Fig 2 Differentiation of callus

### 2.3 生根培养基的筛选

待分化出来的芽长至 1.0 ~ 1.5 cm, 约有 3 片新叶后, 将幼芽转入生根培养基中。生根培养基以 MS 为基础培养基, 添加不同浓度的 NAA。幼芽在 NAA 浓度为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/L 培养基中均能诱导生根, 在没有添加 NAA 的 MS 培养基中则不能生根。当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时, 生根率最高, 达到 60%, 12 ~ 15 d 逐渐有侧根生成; NAA 浓度为 0.2, 0.3 mg/L 时, 幼芽形成的根粗短, 侧根较少; NAA 浓度为 0.4, 0.5 mg/L, 与幼芽基部易产生愈伤组织, 愈伤组织周围再长出根, 移栽时易脱落。

## 3 讨论

在组织培养中, 常用生长激素和细胞分裂素刺激和诱导细胞脱分化, 并控制植物的生长发育。本试验采用带有叶原基的野葛茎尖分生组织作为外植体, 从 2,4-D, 6-BA 和 NAA 3 种激素水平调控愈伤组织的诱导及分化, 提高了植株再生的频率。2,4-D 在诱导愈伤组织有良好的作用, 在有关草坪的报道中, 对愈伤组织的诱导多数选用 2,4-D, 浓度为 1 ~ 5

mg/L<sup>[10]</sup>。在本试验中发现: 2,4-D 浓度在 0.2 ~ 1 mg/L 范围内, 野葛茎尖分生组织就能诱导出愈伤组织, 当 2,4-D 浓度大于 0.5 mg/L, 诱导率开始下降, 可能 2,4-D 浓度过大, 会对愈伤组织细胞产生毒杀作用。

本试验结果证明: 采用带有叶原基的野葛茎尖分生组织作为外植体, 利用 2,4-D 对分生组织进行启动诱导愈伤组织, 然后将愈伤组织转移到含 6-BA 和 NAA 的培养基上继续诱导, 实现了野葛的植株再生。与前人野葛组织培养结果相比, 本试验有以下特点: (1) 提高了愈伤组织的诱导率; (2) 提高了愈伤组织的质量, 有效提高愈伤组织分化率; (3) 再生植株具有更好的幼苗素质; (4) 能有效缩短培养周期、节约成本。

### 参考文献:

- [1] 吴德邻, 陈忠毅, 黄向旭. 中国葛属的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(3): 12.
- [2] 杨月琴, 徐海涛. 水土保持新秀葛藤[J]. 河南农业, 2001(6): 11.
- [3] 陈默君, 贾慎修. 中国饲用植物[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 624 - 635.
- [4] 赵美清. 硫酸和热水浸种提高葛藤种子发芽率的研究[J]. 草业科学, 1989, 6(5): 50 - 51.
- [5] 于树宏, 李玲. 野葛的组织培养和植株再生[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(1): 63 - 64.
- [6] 王义强, 唐隆平, 蒋瞬村, 等. 野葛愈伤组织诱导与不定芽分化[J]. 经济林研究, 2004, 22(1): 19 - 21.
- [7] 施和平. 三裂叶野葛茎段和叶柄培养生成再生植株[J]. 中草药, 2000, 31(7): 550 - 552.
- [8] 张雅琼, 郭华春. 甘薯茎尖分生组织培养的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 74 - 76.
- [9] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 24 - 25.
- [10] 潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2001: 28 - 32.