

文章编号: 1674-8085 (2024) 02-0073-07

粉葛再生体系建立的研究

刘慧敏¹, *高青海¹, 陈 甦¹, 李 帅¹, *罗 辉²

(1.安徽科技学院农学院, 安徽, 滁州 233100; 2.井冈山大学医学部, 江西, 吉安 343009)

摘要: 为建立高效粉葛组织培养再生体系, 以不同消毒方式、基本培养基、蔗糖浓度、外植体等处理, 研究其对粉葛初代培养、继代培养和生根培养的影响。结果表明, 以 75%酒精 30 s + 0.1%升汞 + 吐温-80 消毒 8 min 时, 外植体的成活率最高, 可达 83.33%。外植体的最佳取材部位为带芽茎段, 其平均株高可达 2.13 cm, 繁殖系数为 2。MS 为最佳的基本培养基, 繁殖系数为 1.26; 蔗糖浓度以 30 g/L 为最佳, 其平均株高为 1.69 cm, 繁殖系数为 1.55; 最佳初代培养基为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.2 mg/L + IBA 0.6 mg/L, 其平均株高为 3.13 cm, 繁殖系数为 3.17; 最佳的继代培养基为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.8 mg/L + KT 0.2 mg/L, 其平均株高为 1.86 cm, 繁殖系数为 3.44; 最佳的生根培养基为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + IBA 1.0 mg/L, 其生根率为 100%, 平均主根数达 7.1 根。通过组培条件优化, 初步建立粉葛的再生体系。

关键词: 粉葛; 植物组织培养; 再生体系

中图分类号: S567.239

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8085.2024.02.010

THE ESTABLISHMENT OF THE REGENERATION SYSTEM OF *PUERARIA THOMSONII* BENTH

LIU Huimin¹, *GAO Qinghai¹, CHEN Su¹, LI Shuai¹, *LUO Hui²

(1.College of Agriculture, Anhui University of Science and Technology, Chuzhou, Anhui 233100, China;

2.Health Science Center, Jianggangshan University, Ji'an, Jiangxi, 343009, China)

Abstract: In order to establish an efficient tissue culture regeneration system of *Pueraria thomsonii* Benth, the effects of different disinfection methods, basic medium, sucrose concentration and explants on the primary culture, secondary culture and rooting culture of *P. thomsonii* were studied. The results showed that the survival rate of explants was the highest when disinfected with 75% alcohol for 30 s + 0.1% mercury + Tween-80 for 8 min, reaching 83.33%. The best part of the explants was the stem segment with buds, the average plant height could reach 2.13 cm, and the reproduction coefficient was 2. MS was the best basic medium with a reproductive coefficient of 1.26, sucrose concentration was the best, the average plant height was 1.69 cm, the reproductive coefficient was 1.55, the optimal primary medium was MS + agar 5.5 g/L + sucrose 30 g/L + 6-BA 0.2 mg/L + IBA 0.6 mg/L, the average plant height was 3.13 cm, the reproductive coefficient was 3.17, and the optimal submedium was MS + agar 5.5 g/L + sucrose 30 g/L + 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.8 mg/L + KT 0.2 mg/L, the average plant height was 1.86 cm, the reproduction coefficient was 3.44, and the optimal rooting medium was MS + agar 5.5 g/L + sucrose 30 g/L + IBA 1.0 mg/L, the rooting rate was 100%, and the average number of taproots was 7.1. The regeneration system of *P. thomsonii* was established by optimizing tissue culture conditions.

Key words: *Pueraria thomsonii* benth; plant tissue culture; regeneration system

收稿日期: 2023-10-20; 修改日期: 2024-01-16

基金项目: 安徽省科技重大专项(202003b06020029); 滁州市重点研究开发类项目(2022ZN005);

作者简介: *高青海(1977-), 男, 山东金乡人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事瓜类蔬菜生产研究(E-mail:gaoqh1977@163.com);

*罗 辉(1971-), 男, 江西吉安人, 副教授, 硕士, 硕士生导师, 主要从事植物学研究(E-mail:luohui9898@163.com).

粉葛 (*Pueraria thomsonii* Benth), 豆科, 多年生藤本植物,《神农百草经》最早开始有记载, 粉葛的根、茎、叶均可入药, 根部含有葛根素等有效成分^[1-2]。粉葛常以扦插繁殖、压条繁殖、分根繁殖等营养繁殖的方式进行繁殖^[3]。传统的繁殖方法易导致种苗种性退化和产量品质降低等问题, 因此需要采用植物组织培养方式对粉葛种苗进行扩繁, 满足产业化发展对优质种苗需求^[4-5]。近年来, 葛属植物的相关研究也已经取得一定的进展, 初步建立葛属植物的组培再生体系, 华晓琴等研究了灭菌时间、MS 培养基大量元素、植物生长调节剂对大巴山粉葛组织培养的影响^[6]。黄宁珍等通过调整基本培养基、生长调节剂种类和配比等方法研究了泰国葛的组织培养与快速繁殖技术^[7]。王艳等利用正交试验, 总结出一套适合广西藤县粉葛组培苗生产的繁育技术^[8]; 但由于各个葛品种间生理特性不同, 外植体取材部位不同, 添加的激素类型和浓度不同, 以及适宜栽培方式及适宜种植的区域都存在一定差异等因素, 本地的品种葛不能照搬已有的植物组织培养快繁技术体系^[9-10]。基于此, 本研究以粉葛为试验材料, 探究不同的消毒方式、外植体类型、基本培养基、蔗糖浓度、初代培养、继代培养以及生根培养等各个环节的关键技术, 初步建立高效的粉葛再生体系, 为粉葛的优质种苗生产和种质保存提供指导和技术支撑。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为安徽省滁州市凤阳县康盛生态葛业有限公司提供的粉葛种苗, 取性状优良的单株种植在安徽科技学院四连栋大棚内, 截取生长健壮的部位作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒

在晴朗的上午, 选取粉葛生长健壮的幼嫩枝条, 将外植体放入洗洁精溶液中浸泡 30 min, 自来水冲洗 1.0 h, 然后清洗表面灰尘, 用纯水反复冲洗至无泡沫残留, 洗好后装入无菌瓶中置于超

净工作台上备用, 在无菌环境下采用 75%酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 4 次, 再用 0.1%氯化汞加或不加土温-80(6、8、10 min)组合的方式对外植体进行消毒, 共 6 种消毒处理组合(表 1)。期间不断晃动, 无菌水反复冲洗 4 次, 消毒完成后晾干水分, 接种至空白培养基, 每次处理接种 30 个外植体, 重复 3 次, 接种后每隔 7 d 开始观察污染状况, 15 d 后统计外植体污染率及成活率。

1.2.2 初代培养

1.2.2.1 不同取材部位外植体的筛选

分别选取生长健壮的茎尖、顶芽以及带芽茎段(表 3), 茎尖需在解剖镜下用解剖针进行幼叶和叶原基的剥离或切取等操作, 切成 0.5 cm 的茎尖生长点; 顶芽取植株生长幼嫩的顶端部位, 切成 0.5 cm 的顶芽; 带芽茎段取植株带有生长点的腋芽部位, 切成 0.5 cm 的带芽茎段。分别在超净工作台消毒灭菌后接入空白培养基, 每次处理接种 30 个外植体, 重复 3 次, 接种后每隔 7 d 开始观察生长状况, 于组培室培养 30 d 后记录并计算株高以及繁殖系数等相关数据。

1.2.2.2 不同基本培养基类型的筛选

分别以 WPM、MS、B5、N6 为基本培养基(表 4), 分别接入带芽茎段, 培养基均添加琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L, pH 为 5.8~6.0(下同), 每次处理接种 30 个外植体, 重复 3 次, 接种后每隔 7 d 开始观察生长状况, 于组培室培养 30 d 后记录并计算株高以及繁殖系数等相关数据。

1.2.2.3 不同浓度蔗糖的筛选

设置培养基的蔗糖浓度分别为 10、20、30、40、50 g/L 共 5 组处理(表 5), 分别接入带芽茎段, 每个处理接种 30 个外植体, 重复 3 次, 接种后每隔 7 d 开始观察生长状况, 于组培室培养 30 d 后记录并计算株高以及繁殖系数等相关数据。

1.2.2.4 6-BA 浓度的筛选

选取粉葛生长健壮的带芽茎段, 接种到基本培养基, 选择细胞分裂素 6-BA, 设置浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L 共 6 种处理组合(表 6), 每次处理接种 30 个外植体, 重复 3 次, 接种后每隔 7 d 开始观察生长状况, 于组培室培养 30 d 后记录并计算株高以及繁殖系数等相关数据。

1.2.2.5 IBA 浓度的筛选

选取粉葛生长健壮带芽茎段，接种到基本培养基，选择生长素 IBA，设置浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L 共 6 种处理组合（表 7），每次处理接种 30 个外植体，重复 3 次，接种后每隔 7 d 开始观察生长状况，于组培室培养 30 d 后记录并计算株高以及繁殖系数等相关数据。

1.2.2.6 6-BA 与 IBA 搭配浓度的筛选

选取粉葛生长健壮的带芽茎段，接种到基本培养基，选择细胞分裂素 6-BA（0.2、0.4、0.6 mg/L）分别与生长素 IBA（0.2、0.4、0.6 mg/L）组合搭配（表 8），每次处理接种 30 个外植体，重复 3 次，接种后每隔 7 d 开始观察生长状况，组培室培养 30 d 后，记录并计算株高及繁殖系数等相关数据。

1.2.3 继代培养

选取生长健壮的带芽茎段，接种到基本培养基中，选择 6-BA、NAA、IBA、KT 的不同梯度浓度为试验因素，进行 L₉（3⁴）正交试验（表 9），对粉葛芽的繁殖进行优化，每次处理接种 30 个外植体，重复 3 次，接种后每隔 7 d 开始观察生长状况，于组培室培养 30 d 后，记录并计算株高以及繁殖系数等相关数据。

1.2.4 生根培养

将材料接种到不同的生根培养基，设置激素基本配比分别为 NAA（0.2、0.5、1.0 mg/L）；IAA（0.2、0.5、1.0 mg/L）；IBA（0.2、0.5、1.0 mg/L）共 9 种处理组合（表 10），每次处理接种 30 个外植体，重复 3 次，接种后每隔 7 d 开始观察生长状况，于组培室培养 30 d 后记录并计算株高以及根长等相关数据。

1.3 培养条件

在组培室于温度 25 ~ 28℃，光照强度 2500 ~ 3000 lx，光照时长 12 h/d 的条件下培养。

1.4 数据分析

实验所得数据用软件 Excel2020 进行数据的处理及绘图；采用软件 SPSSPRO 和 SPSS Statistics 26 进行方差分析，极差分析，以及 ANOVA 显著性差异（LSD）检验，在 $P < 0.05$ 水平上开展分析，表中不同的字母表示差异显著，***、**、* 分别代表 1、5、10% 的显著性水平。

2 结果与分析

2.1 初代培养

2.1.1 不同灭菌方式对外植体的影响

在室外采集的外植体，处理不佳会导致培养基大量长菌而影响培养效率，因此需要采取一定的灭菌措施，如表 1 所示，在 75% 酒精 30 s + 0.1% 升汞 + 吐温-80 处理的组合下，外植体的污染率以及成活率均比 75% 酒精 30 s + 0.1% 升汞的处理状况要好。外植体污染率随着消毒时间的增加而有所下降，当消毒时间为 10 min 时，其污染率最低为 8.00%；而成活率则随着时间的增加而增加再下降的趋势，当消毒时间为 8 min 时，其成活率最高为 83.33%。从表 2 的方差分析对于 0.1% 升汞，水平上呈现显著性，对污染率有显著影响，存在主效应，对于吐温-80，水平上不呈现显著性，对污染率没有显著性影响，不存在主效应；而升汞和吐温-80，对于污染率和成活率水平上呈现显著性，均有显著性影响，存在主效应；综上所述，75% 酒精 30 s + 0.1% 升汞 + 吐温-80 消毒 8 min 的处理为最佳组合。

表 1 不同灭菌方式对粉葛外植体的影响

Table 1 Effects of different sterilization methods on the explants of *Pueraria thomsonii* Benth

处理	75%酒精/s	0.1%升汞/min	吐温-80	污染率/%	成活率/%
A1	30	6	✓	42.00 ± 0.57c	55.33 ± 0.68c
A2	30	8	✓	12.00 ± 0.89d	83.33 ± 0.52a
A3	30	10	✓	8.00 ± 1.26d	74.67 ± 0.47b
A4	30	6	\	74.00 ± 0.55a	24.67 ± 0.89e
A5	30	8	\	64.00 ± 0.63b	36.00 ± 0.64d
A6	30	10	\	48.00 ± 0.63c	49.33 ± 0.62c

表 2 不同灭菌方式对粉葛外植体影响的方差分析

Table 2 Analysis of variance of the effects of different sterilization methods on *Pueraria thomsonii* Benth explants

变异来源	污染率			成活率		
	均方	F 值	P 值	均方	F 值	P 值
0.1%升汞	82.134	4.219	0.026**	238.385	14.093	0.000***
吐温-80	102.841	7.336	1	244.195	14.437	0.001***
0.1%升汞 + 吐温-80	32.273	1.035	0.018**	44.819	3.716	0.038**

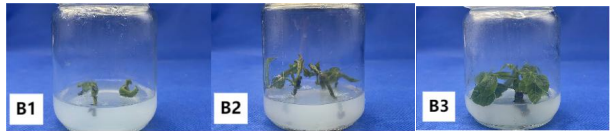
2.1.2 不同取材部位对粉葛组培苗的影响

不同取材部位的外植体对诱导条件的反应有所差异。由表 3 和图 1 所示，不同的取材部位对粉葛芽的诱导有所差异，其茎尖诱导的植株瘦小，顶芽诱导的植株叶片卷曲瘦弱，而带芽茎段诱导的植株生长健壮，枝繁叶茂，且其平均株高最高，可达 2.13 cm，繁殖系数最高为 2.00。因此，以粉葛的带芽茎段为最佳的取材部位。

表 3 不同取材部位对葛根外植体的影响

Table 3 Influence of different sampling sites on *Pueraria thomsonii* Benth explants

处理	取材部位	平均株高/cm	繁殖系数	生长状况
B1	茎尖	1.32 ± 0.06b	1.10 ± 0.56b	茎瘦弱，叶片细小
B2	顶芽	1.94 ± 0.16a	1.56 ± 0.72ab	茎伸长，叶片卷曲
B3	带芽茎段	2.13 ± 0.13a	2.00 ± 0.50a	茎粗壮，枝繁叶茂



(B1: 茎尖; B2: 顶芽; B3: 带芽茎段)

图 1 不同取材部位外植体的粉葛组培苗生长状态

Fig. 1 Growth state of *Pueraria thomsonii* Benth tissue culture seedlings with explants from different parts

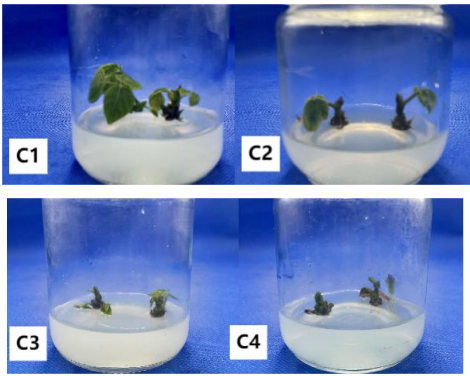
2.1.3 不同基本培养基类型对粉葛组培苗的影响

不同的培养基所含营养成分不同，而不同类型植物所需的营养元素也有一定的区别，由表 4 和图 2 可见，4 种培养基均可诱导粉葛发芽，其平均株高和繁殖系数均差异显著 ($P < 0.05$)，其中，以 MS 培养基中的粉葛组培苗生长状况最佳，平均株高和繁殖系数均分别可达 1.52 cm 和 1.26，显著高于其他培养基；WPM 培养基诱导的植株稍差，但 B5 和 N6 培养基的植株生长状况显著低于 MS 和 WPM 培养基。因此以 MS 培养基为最适合粉葛组培苗生长的基本培养基。

表 4 不同基本培养基类型对粉葛组培苗的影响

Table 4 Effects of different basic medium types on *Pueraria thomsonii* Benth tissue culture seedlings

处理	培养基类型	平均株高/cm	繁殖系数	生长状况
C1	MS	1.52 ± 0.11a	1.26 ± 0.15a	枝繁叶茂，少量生根
C2	WPM	1.12 ± 0.07b	0.93 ± 0.06ab	叶片偏黄，少量生根
C3	B5	0.77 ± 0.07c	0.47 ± 0.13c	较弱
C4	N6	0.87 ± 0.09bc	0.73 ± 0.15bc	一般



C1: MS 培养基; C2: WPM 培养基; C3: B5 培养基; C4: N6 培养基

图 2 不同基本培养基类型的粉葛组培苗生长状态

2.1.4 不同浓度蔗糖对粉葛组培苗的影响

由表 5 可见，不同浓度蔗糖对粉葛组培苗的繁殖效果不同。随着蔗糖浓度的逐渐升高，植株的长势随着蔗糖浓度的增高而增高，当浓度到达一定数值时，其生长速度开始减缓；当蔗糖浓度为 30 g/L 时，其平均株高与繁殖系数显著高于其他浓度，分别为 1.69 cm 和 1.50。因此，培养基添加的蔗糖最佳浓度为 30 g/L。

表 5 不同浓度蔗糖对粉葛组培苗的影响

Table 5 Effects of different concentrations of sucrose on tissue culture of *Pueraria thomsonii* Benth seedlings

处理	蔗糖/g/L	平均株高/cm	繁殖系数
D1	10	0.77 ± 0.11c	0.40 ± 0.16c
D2	20	1.27 ± 0.09b	1.00 ± 0.00b
D3	30	1.69 ± 0.13a	1.50 ± 0.16a
D4	40	1.19 ± 0.13b	1.00 ± 0.66b
D5	50	0.85 ± 0.33c	0.50 ± 0.16c

2.1.5 不同浓度 6-BA 对粉葛组培苗的影响

由表 6 显示，不同浓度 6-BA 对粉葛的繁殖效果不同。当添加了不同浓度的 6-BA 时，各组处理的平均株高和繁殖系数均高于未添加任何激素的对照组 CK，并且随着 6-BA 浓度的增高，其平均株高和繁殖系数呈现先增后减的趋势，当 6-BA 浓度为 0.4 mg/L 时，与其他 6-BA 浓度的平均株高以及繁殖系数有显著差异，分别达到了 3.03 cm 和 2.83，并且当 6-BA 的浓度为 0、1.0 mg/L 时，其平均株高与繁殖系数均较低，不添加 6-BA 和添加高浓度 6-BA 均不利于粉葛组培苗的生长。因此，适宜添加 6-BA 的最佳浓度为 0.4 mg/L。

表 6 不同浓度 6-BA 对粉葛组培苗的影响

Table 6 Effects of different concentrations of 6-BA on *Pueraria thomsonii* Benth tissue culture seedlings

处理	6-BA/mg/L	平均株高/cm	繁殖系数
CK	0	1.51 ± 0.10c	1.33 ± 0.14d
E1	0.2	2.41 ± 0.22ab	2.33 ± 0.24ab
E2	0.4	3.03 ± 0.27a	2.83 ± 0.29a
E3	0.6	2.29 ± 0.25abc	2.22 ± 0.25abc
E4	0.8	1.93 ± 0.29bc	1.83 ± 0.29bcd
E5	1.0	1.55 ± 0.36c	1.44 ± 0.33cd

2.1.6 不同浓度 IBA 对粉葛组培苗的影响

为了更好的获得粉葛的无菌材料，从表 7 可知，在 IBA 浓度保持 0.6 mg/L 的条件下，粉葛组培苗的平均株高以及繁殖系数最高，分别达到了 1.77 cm 和 1.58，比其他浓度条件下的粉葛组培苗长势旺盛，但当 IBA 的浓度为 1.0 mg/L 时，其繁殖系数最低，添加高浓度的 IBA 不适宜粉葛组培苗的生长。因此，适宜添加 IBA 的最佳浓度为 0.6 mg/L。

表 7 不同浓度 IBA 对粉葛组培苗的影响

Table 7 Effects of different concentrations of IBA on *Pueraria thomsonii* Benth tissue culture seedlings

序号	IBA/mg/L	平均株高/cm	繁殖系数
CK	0	1.28 ± 0.07b	1.10 ± 0.07ab
F1	0.2	1.41 ± 0.12ab	1.14 ± 0.13ab
F2	0.4	1.56 ± 0.16ab	1.28 ± 0.16ab
F3	0.6	1.77 ± 0.17a	1.58 ± 0.17a
F4	0.8	1.71 ± 0.11a	1.57 ± 0.11a
F5	1	1.17 ± 0.08b	0.95 ± 0.08b

2.1.7 不同浓度 6-BA 与 IBA 搭配对粉葛组培苗初代增殖的影响

基于 6-BA 与 IBA 均能诱导粉葛芽的生长，进一步开展了 6-BA 与 IBA 的搭配组合处理，如表 8 所示，粉葛植株的长势随着 6-BA 与 IBA 的浓度增加而有所增加，但当浓度达到一定程度时，又再逐步降低，其中 G3 处理的长势显著优于其他处理组，其平均株高和繁殖系数分别达到了 3.13 cm 和 3.00，而对照组不添加任何激素时，其平均株高和繁殖系数只有 1.38 cm 和 1.3。因此，适宜粉葛初代增殖的最佳组合配方为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.2 mg/L + IBA 0.4 mg/L。

表 8 不同浓度 6-BA 与 IBA 搭配对粉葛组培苗的影响

Table 8 Effects of different concentrations of 6-BA and IBA on *Pueraria thomsonii* Benth tissue culture seedlings

处理	6-BA/mg/L	IBA/mg/L	平均株高/cm	繁殖系数
G1	1 (0.2)	1 (0.2)	2.13 ± 0.63ab	2.17 ± 0.65abc
G2	1 (0.2)	2 (0.4)	2.68 ± 0.54a	2.67 ± 0.55ab
G3	1 (0.2)	3 (0.6)	3.13 ± 0.41a	3.00 ± 0.44a
G4	2 (0.4)	1 (0.2)	2.7 ± 0.232ab	2.67 ± 0.45ab
G5	2 (0.4)	2 (0.4)	1.92 ± 0.34ab	1.67 ± 0.33 ^{abc}
G6	2 (0.4)	3 (0.6)	1.65 ± 0.46a	1.50 ± 0.5bc
G7	3 (0.6)	1 (0.2)	1.27 ± 0.21b	1.00 ± 0.25c
G8	3 (0.6)	2 (0.4)	1.93 ± 0.39ab	2.00 ± 0.44abc
G9	3 (0.6)	3 (0.6)	1.80 ± 0.32ab	1.83 ± 0.33abc
水平 1 总和 K ₁	7.84	5.84		
水平 2 总和 K ₂	5.84	6.34		
水平 2 总和 K ₃	4.83	6.33		
极差 R	3.01	0.5		
因素主次排序	1	2		
因素最优水平	1	3		

2.2 继代培养

2.2.1 不同激素浓度正交处理对粉葛组培苗继代增殖的影响

实验在初代培养的基础上，进一步扩大培养过程，从而发挥快速繁殖的优势，将粉葛无菌苗的新芽接种至不同的继代培养基上，培养 14 d 之后开始萌发新芽，有的处理组还产生了愈伤组织，

从表 9 可以看出，处理 2、4、8 的差异不显著，小苗长势也较差，植株拔高不明显且繁殖系数也较低，处理 6 的小苗长势不错，且与 2、3、4、5、7、8 处理的平均株高和繁殖系数存在显著性差异，分别为 1.86 cm 和 3.44。因此，粉葛组培苗的继代培养基最佳配方为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.8 mg/L + KT 0.2 mg/L。

表 9 6BA、NAA、IBA、KT 正交处理对粉葛组培苗的影响

Table 9 Effects of orthogonal treatment of 6-BA, NAA, IBA and KT on *Pueraria thomsonii* Benth lobata tissue culture seedlings

处理	6-BA/mg/L	NAA/mg/L	IBA/mg/L	KT/mg/L	平均株高/cm	繁殖系数
H1	1 (0.2)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1.92 ± 0.15ab	2.89 ± 0.30ab
H2	1 (0.2)	2 (0.05)	2 (0.4)	2 (0.1)	1.79 ± 0.20abc	2.78 ± 0.43abc
H3	1 (0.2)	3 (0.1)	3 (0.8)	3 (0.2)	1.27 ± 0.10d	1.78 ± 0.22d
H4	2 (0.4)	1 (0)	2 (0.4)	3 (0.2)	1.59 ± 0.16bcd	2.44 ± 0.37abcd
H5	2 (0.4)	2 (0.05)	3 (0.8)	1 (0)	1.17 ± 0.04d	1.56 ± 0.20d
H6	2 (0.4)	3 (0.1)	1 (0)	2 (0.1)	1.34 ± 0.08d	1.89 ± 0.20cd
H7	3 (0.6)	1 (0)	3 (0.8)	3 (0.2)	2.26 ± 0.16a	3.44 ± 0.34a
H8	3 (0.6)	2 (0.05)	1 (0)	2 (0.1)	1.40 ± 0.11cd	2 ± 0.28bcd
H9	3 (0.6)	3 (0.1)	2 (0.4)	1 (0)	1.38 ± 0.09cd	1.88 ± 0.20cd
水平 1 总和 K ₁	7.45	8.77	6.78	6.33		
水平 2 总和 K ₂	5.89	6.34	7.10	6.67		
水平 3 总和 K ₃	7.32	5.55	6.78	7.66		
极差 R	1.56	3.22	0.32	1.03		
因素主次排序	2	1	4	3		
因素最优组合	3	1	3	3		

2.3 生根培养

2.3.1 不同激素浓度对粉葛组培苗生根的影响

为了使组培苗能够更好地适应外界环境因子，实验对葛进行了生根培养，从表 10 和图 3 可以看出，不同激素浓度对粉葛组培苗的生根效果不同，培养基中添加 IAA 诱导生根，根细且侧根少，不利于根系的吸收功能，而在培养基中添加 IBA 时，

其生根率、平均主根数以及平均株高差异显著，添加 IBA 1.0 mg/L 时，粉葛组培苗的主根健壮，侧根发达，生根率、平均主根数以及平均株高最高，分别为 100%、7.10 条和 2.86 cm；从方差分析可以看出，其对生根率、平均主根数、平均株高的差异均有显著影响。因此，最佳的根系诱导培养基配方为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + IBA 1.0 mg/L。

表 10 不同激素浓度对粉葛组培苗生根的影响

Table 10 Effects of different hormone concentrations on rooting of *Pueraria thomsonii* Benth seedlings in tissue culture

处理	激素类型	浓度/mg/L	生根率/%	平均主根数/条	平均株高/cm	生根效果
I1	NAA	0.2	73.33 ± 0.21bc	4.00 ± 0.36b	1.23 ± 0.26 ^c	主根粗，侧根少
I2		0.5	80.00 ± 0.70bc	4.20 ± 0.48b	1.36 ± 0.21 ^c	主根粗，侧根多
I3		1	100.00 ± 0.00a	3.20 ± 0.46b	1.27 ± 0.16 ^c	主根粗，侧根多
I4	IAA	0.2	66.67 ± 0.47c	3.00 ± 0.42b	1.57 ± 0.18 ^c	主根细，侧根少
I5		0.5	86.67 ± 0.54ab	4.10 ± 0.34b	1.78 ± 0.27b ^c	主根细，无侧根
I6		1	66.67 ± 0.35c	1.80 ± 0.35c	0.98 ± 0.05 ^c	主根细，无侧根
I7	IBA	0.2	83.33 ± 0.49abc	3.1 ± 0.17b	2.57 ± 0.38a ^b	主根粗，侧根多
I8		0.5	86.67 ± 0.70ab	4.70 ± 0.39b	2.67 ± 0.35 ^a	主根粗，侧根多
I9		1	100.00 ± 0.00a	7.10 ± 0.51a	2.86 ± 0.53 ^a	主根粗，侧根多
方差检验			$F = 4.464 \quad P = 0.000^{***}$	$F = 13.163 \quad P = 0.000^{***}$	$F = 5.596 \quad P = 0.000^{***}$	

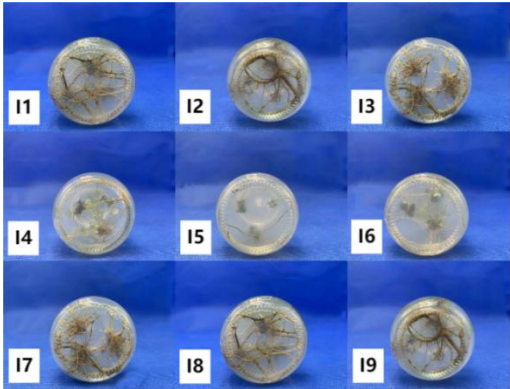


图 3 不同激素浓度粉葛组培苗的生根状况

Fig. 3 Rooting status of *Pueraria thomsonii* Benth seedlings cultured with different hormone concentrations

3 讨论

选择合适外植体进行消毒，是建立再生体系的第一步。本试验以粉葛带芽茎段为外植体进行消毒灭菌，结果表明以 75%酒精 30 s + 0.1%升汞 + 吐温-80 消毒 8 min 的消毒效果为最佳，外植体的取材部位不同，其细胞活力的强弱和带菌的多少

注：I1-I3:NAA (0.2、0.5、1.0 mg/L)；I4-I6:IAA (0.2、0.5、1.0 mg/L)；I7-I9: (0.2、0.5、1.0 mg/L)

也有所不同,影响初代培养的污染程度^[11],75%酒精具有浸润和杀菌的双重效果,但对植物的杀伤力大,不宜浸泡时间过长,需跟其他杀菌剂搭配使用灭菌效果才更好,而升汞中的 Hg^{2+} 可以使细菌的蛋白质变性导致酶失活^[12],吐温-80 作为表面活性剂,与 0.1%升汞搭配使用,能够促进液体与外植体的接触面积^[13],因此本试验选择 75%酒精与 0.1%升汞再加两滴吐温搭配使用获得最佳的消毒方法;在试验过程中以粉葛带芽茎段为外植体进行组织培养效果最佳,这可能是由于茎尖与顶芽部位的生长时间短,营养物质积累不充分并且消毒步骤易对其产生损伤,这与龚维红研究大马士革玫瑰组培的结果相似^[14];不同培养基对植物的生长发育影响不同,选择适宜培养基是植物组织培养的关键^[15]。本试验选择 MS、WPM、B5、N6 为基本培养基,考察不同基本培养基对腋芽诱导的影响,结果显示以 MS 培养基最佳,这与孙小兵等对板栗的组培研究结果相似^[16];植物生长调节剂对植物分化苗的内源激素有着促进或者抑制作用,常用的有细胞分裂素(6-BA、KT)和生长素(2,4-D、NAA、IAA、IBA)^[17],本试验研究表明,适量的 6-BA、KT 和 IBA、NAA 对粉葛壮苗生根都有一定促进作用,这与杨柳等对粉葛丛生芽诱导的研究结果相似^[18]。

本试验通过对外植体消毒、初代培养、继代培养和生根培养等关键技术的研究,建立粉葛再生体系。以粉葛生长健壮的带芽茎段为外植体,酒精 30 s + 0.1%升汞 + 吐温-80 消毒 8 min, MS 为基本培养基,蔗糖浓度为 30 g/L,接种至 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.2 mg/L + IBA 0.6 mg/L 的培养基诱导腋芽的萌发;萌发后将新芽接种至配方为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 0.6 mg/L + IBA 0.8 mg/L + KT 0.2 mg/L 的培养基中进行继代增殖获得无菌苗;再将无菌苗的再生芽接种至配方为 MS + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 30 g/L + IBA 1.0 mg/L 的培养基进行生根培养。本试验研究结果为粉葛的组织培养、快速繁殖及工厂化育苗等提供参考和指导作用。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 周秋贵,张维军,曾红,等.粉葛素脉冲胶囊的制备及影响释药时滞的因素研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2021,42(6):97-100.
- [3] 范淑英,吴才君,杨寅桂,等.野葛繁殖方法的研究[J].江西农业学报,1997,9(3):59-62.
- [4] 尚小红,曹升,严华兵,等.广西粉葛产业现状分析及其发展建议[J].南方农业学报,2021,52(6):1510-1519.
- [5] 唐链,田爽琪.植物组织培养技术的应用进展[J].现代园艺,2022,45(18):24-26.
- [6] 华晓琴,刘高亮,张庆辉,等.大巴山粉葛组织培养技术[J].浙江农业学报,2016,28(7):1108-1114.
- [7] 黄宁珍,唐凤鸾,何金祥,等.泰国葛组织培养和快速繁殖体系优化研究[J].中国中药杂志,2008(19):2175-2179.
- [8] 王艳,张尚文,何海旺,等.广西藤县粉葛组培快繁技术研究[J].南方园艺,2018,29(6):1-6.
- [9] 林茜,覃换玲,高营营,等.‘桂粉葛 1 号’组织培养再生体系的建立[J].陕西农业科学,2023,69(7):11-17.
- [10] 王宁,王文静,杜丽,等.壬酸对克隆植物积雪草组培苗生长的影响[J].井冈山大学学报:自然科学版,2020,41(4):47-51.
- [11] 陈自华.杜仲组织培养外植体的选择和消毒[J].园艺与种苗,2023,43(5):19-21.
- [12] 袁应菊.香椿组织培养外植体的选择和消毒[J].安徽农学通报,2020,26(15):19-20,57.
- [13] 朱虹.红醋栗外植体的选择及消毒方法研究[J].林业科技,2021,46(3):15-17.
- [14] 龚维红.大马士革玫瑰组培与快繁技术研究[J].安徽农学通报,2022,28(1):19-21.
- [15] 解晓红,解红娥,王凌云,等.不同培养基及生长调节剂添加对丹参微扦插苗的影响[J].陕西农业科学,2023,69(2):66-69.
- [16] 孙小兵,郭素娟.成龄板栗组培快繁体系的建立及影响因素的研究[J].中南林业科技大学学报,2015,35(4):51-55.
- [17] EARI S, AGHDASI M, AHMADZADEH E, et al. Influence of plant growth regulators on callus induction, silymarin production and antioxidant activity in milk thistle under tissue culture medium[J].Journal of Medicinal Plants and By-products.2017(6):59-69.
- [18] 杨柳,廖宇娟,满建民.粉葛丛生芽诱导与增殖条件[J].分子植物育种,2021,19(12):4088-4099.