

粉葛叶片愈伤组织诱导及植株再生

曾文丹, 严华兵*, 肖亮, 尚小红, 曹升, 陆柳英, 赖大欣

广西壮族自治区农业科学院经济作物研究所, 南宁530007

*通信作者(h.b.yan@hotmail.com)

摘要: 以广西粉葛品种‘桂粉葛一号’组培苗叶片为外植体, 探讨不同植物生长调节剂、叶片取材部位、培养条件等对愈伤组织诱导及不定芽发生的影响。结果表明: 以2~5节位完全展开的幼嫩叶为外植体材料, 暗培养21 d为愈伤组织诱导的最适培养条件; 在仅含生长素的培养基中, 粉葛愈伤组织诱导率低, 且形成的愈伤组织无分化能力; 愈伤组织诱导最适培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)+1.0 mg·L⁻¹ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-D), 诱导率为94.7%; 愈伤组织分化不定芽的最适培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ 萘乙酸(naphthalene acetic acid, NAA), 分化率为9.2%。将诱导分化的不定芽转入MS+0.02 mg·L⁻¹ NAA培养基中生根率达98%以上; 将生长良好的再生植株进行移栽驯化, 存活率达96.7%。

关键词: 粉葛; 组培苗叶片; 愈伤组织; 不定芽; 植株再生

Callus induction and plant regeneration from leaves of *Pueraria thomsonii*

ZENG Wendan, YAN Huabing*, XIAO Liang, SHANG Xiaohong, CAO Sheng, LU Liuying, LAI Daxin

Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

*Corresponding author (h.b.yan@hotmail.com)

Abstract: The plantlet leaves of Guangxi variety *Pueraria thomsonii* ‘Guifenge No. 1’ were used as explants to study the effects of different plant growth regulators, sampling position of leaves and culture conditions on callus induction and adventitious buds formation. The results showed that the best explants were fully expanded young leaves at 2–5 nodes and the best condition for callus induction were dark culture for 21 days. In the MS medium containing auxin only, the callus induction rate was low, and the formed calli had no differentiation ability. The optimal callus induction medium was MS + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D, whose induction rate reached 94.7%. The optimal medium for adventitious buds induction was MS + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA, and callus differentiation rate was 9.2%. When the adventitious buds were transferred into rooting medium MS + 0.02 mg·L⁻¹ NAA, the rooting rate was more than 98%. The regenerated plants with good growth were transplanted and domesticated, and the survival rate reached 96.7%.

Key words: *Pueraria thomsonii*; plantlet leaves; callus; adventitious bud; plant regeneration

收稿 2021-02-07 修定 2021-04-20

资助 国家自然科学基金(31960420)、广西自然科学基金(2020GXNSFAA297187)、广西重点研发计划(桂科AB1850028)和广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科2021JM64和桂农科2021YT057)。

粉葛(*Pueraria thomsonii*)为豆科葛属植物,是国家农业部和卫健委共同认定的药食两用植物,素有“北参南葛”“亚洲人参”之美誉(杨旭东等2014)。粉葛块根含有葛根素、多糖、黄酮等多种药用成分,在降血糖血脂、抗感染、抗肿瘤等方面具有较高的药用特性,是重要的保健食品和紧俏出口产品(Shen等2009;朱校奇等2011;Wang等2013)。传统的粉葛种苗多通过扦插繁育,这一繁殖方式不仅成活率和繁殖系数较低,且受自然条件影响较大,而组织培养技术可有效地解决这些问题。特别是粉葛叶片愈伤组织诱导及再生技术方法的建立不仅为良种繁育提供一个高效的技术方法,同时也是开展遗传转化研究的重要技术手段,这将为葛根基因功能研究建立扎实的技术基础。目前,有关粉葛愈伤组织诱导研究较少,仅有周堂英等(2005)研究发现茎尖和茎段为较为理想的外植体材料;马崇坚等(2013)以幼嫩茎尖为试验材料,研究发现培养基MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D具有促进芽萌发、愈伤组织形成并高效分化丛生芽的综合特点。目前尚未见有关粉葛叶片为外植体材料诱导愈伤组织及其分化的研究报道。本试验以广西粉葛品种‘桂粉葛一号’组培苗叶片为外植体,研究不同影响因子对粉葛愈伤组织诱导及植株再生的影响,以期为种苗繁育和基因功能研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料‘桂粉葛一号’(*Pueraria thomsonii* Benth. ‘Guifenge No. 1’)组培苗来自于广西壮族自治区农业科学院经济作物研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 不同植物生长调节剂及其浓度对叶片愈伤组织诱导的影响

将‘桂粉葛一号’组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小置于含有不同浓度的6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)、萘乙酸(naphthalene acetic acid, NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-D)(表1)的MS培养基中暗培养14 d,每个处理30个外植体,每个试验处理进行3次重复。

1.2.2 不同培养时间对叶片愈伤组织诱导的影响

将‘桂粉葛一号’组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小接种在MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA培养基中,分别进行暗培养14、21、28 d。每个处理30个外植体,进行3次重复。

1.2.3 不同光照条件对叶片愈伤组织诱导的影响

将‘桂粉葛一号’组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小接种在MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA培养基中,分别进行不同光照处理:暗培养14 d、先暗培养7 d再光照培养7 d、光照培养14 d。每个处理30个外植体,进行3次重复。

1.2.4 不同取材部位对叶片愈伤组织诱导的影响

分别将‘桂粉葛一号’组培苗顶端未完全展开的嫩叶、2~5节位完全展开的幼嫩叶、6节位以下组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小接种于MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA培养基中暗培养14 d。每个处理30个外植体,进行3次重复。

1.2.5 叶片不同放置方式对愈伤组织诱导的影响

将‘桂粉葛一号’组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小,分别以叶片正面朝上或叶片反面朝上的方式接种在MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA培养基中暗培养14 d。每个处理30个外植体,进行3次重复。

1.2.6 不同植物生长调节剂及其浓度对愈伤组织再分化的影响

将黄绿色质地较好的愈伤组织接种到含有不同浓度的6-BA、噻苯隆(thidiazuron, TDZ)、NAA(表6)的MS分化培养基中,每个处理接种20瓶,每瓶接5块愈伤组织。每个试验处理进行3次重复。密切观察并记录愈伤组织的分化状态,30 d后统计分化率。

1.2.7 生根培养及移栽

当诱导的不定芽长至2~3 cm时,将不定芽转接到生根培养基MS+0.02 mg·L⁻¹ NAA中光照培养25 d后统计生根率。将生长健壮、根系较发达的无菌瓶苗从培养室移入温室炼苗,放置3 d左右。拧松瓶盖,使瓶内的环境与外界一致,让组培苗在自然状态下驯化2 d后取出洗净附着的培养基,用0.1%高锰酸钾溶液清洗150株再生植株后栽入泥炭土+珍珠岩(体积比3:1)混合基质中。移栽30 d后统计成活率。

1.3 培养条件

除特殊说明, 培养条件均为培养温度(25±1)°C、光照18.75~25 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间16 h·d⁻¹。培养基均添加30.0 g·L⁻¹蔗糖和6.0 g·L⁻¹琼脂粉, pH为5.8。

1.4 数据处理及分析

愈伤组织诱导率(%)=出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数×100; 愈伤组织分化率(%)=分化出芽的愈伤组织外植体数/接种的外植体数×100; 愈伤组织褐化率(%)=褐化的愈伤组织外植体数/总愈伤组织的外植体数×100。试验数据采用SPSS 18.0和Excel 2010进行整理、统计和分析。

2 实验结果

2.1 不同植物生长调节剂及其浓度对叶片愈伤组织诱导的影响

将组培苗叶片放入含不同浓度植物生长调节剂的诱导培养基上, 愈伤组织诱导率如表1所示。在不含任何植物生长调节剂的基本培养基MS上, 叶片愈伤组织诱导率为0。在仅含有2,4-D的培养基中, 大部分叶片不形成愈伤组织, 小部分叶片虽有愈伤组织形成, 但形成的愈伤组织团较小, 为水渍状(图1-A)且诱导率低, 最高诱导率仅为26.8%。当培养基中添加不同浓度的6-BA时, 愈伤组织诱

导率显著增加。在低浓度(0.1~0.5 mg·L⁻¹)生长素组合下, 愈伤组织诱导率随6-BA浓度的增加而逐渐升高; 在高浓度(0.5~2.0 mg·L⁻¹)生长素组合下, 随着6-BA浓度的增加, 愈伤组织诱导率呈先升高再降低的趋势。各种植物生长调节剂组合中以1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D添加2.0 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基愈伤组织诱导率最高, 为94.7%。

使用不同培养基配方获得了3种愈伤组织类型: 第一种类型为灰褐色或透明水渍状愈伤组织(图1-B和C), 这种愈伤组织结构松软, 且增殖速度较快; 第二种类型为边缘水渍状、中间为黄绿色、结构较松散的愈伤组织(图1-D); 第三种类型为黄绿色、结构较紧实的愈伤组织(图1-E)。

2.2 不同培养时间对叶片愈伤组织诱导的影响

将粉葛组培苗叶片暗培养5 d左右, 叶片切口部位开始膨大变为黄白色。随着培养时间的推移, 切口处继续膨大, 颜色逐渐变为浅黄色。14 d后愈伤组织形成。培养21 d愈伤组织诱导率最高, 为89.5% (表2)。但随着培养时间的推移, 愈伤组织边缘逐渐褐化死亡(图1-F)。培养28 d后, 愈伤组织褐化率为36.6% (表2)。因此, 粉葛愈伤诱导最佳培养时间为21 d。

2.3 不同光照条件对叶片愈伤组织诱导的影响

将粉葛组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小置

表1 不同植物生长调节剂对粉葛叶片愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effects of different plant growth regulators on callus induction of *P. thomsonii*

植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹			诱导率/%	植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹			诱导率/%
6-BA	NAA	2,4-D		6-BA	NAA	2,4-D	
0	0	0	0	3.0	0	2.0	34.5±6.7 ^{ef}
0	0	0.5	12.8±0.9 ^g	1.0	0.1	0	25.5±3.3 ^f
0	0	1.0	20.4±3.2 ^f	1.0	0.5	0	35.2±2.9 ^{ef}
0	0	2.0	26.8±2.7 ^f	1.0	1.0	0	62.7±4.2 ^c
1.0	0	0.5	38.6±1.4 ^c	2.0	0.1	0	48.6±2.7 ^c
1.0	0	1.0	40.9±3.4 ^c	2.0	0.5	0	75.8±5.5 ^b
1.0	0	2.0	57.1±2.2 ^d	2.0	1.0	0	92.5±6.7 ^a
2.0	0	0.5	42.8±1.9 ^c	2.0	2.0	0	86.4±11.0 ^{ab}
2.0	0	1.0	94.7±9.0 ^a	3.0	0.1	0	56.9±5.4 ^{cd}
2.0	0	2.0	60.7±6.1 ^c	3.0	0.5	0	71.2±6.7 ^b
2.0	0	3.0	62.3±3.2 ^c	3.0	1.0	0	78.2±12.3 ^b

同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05), 下表同此。

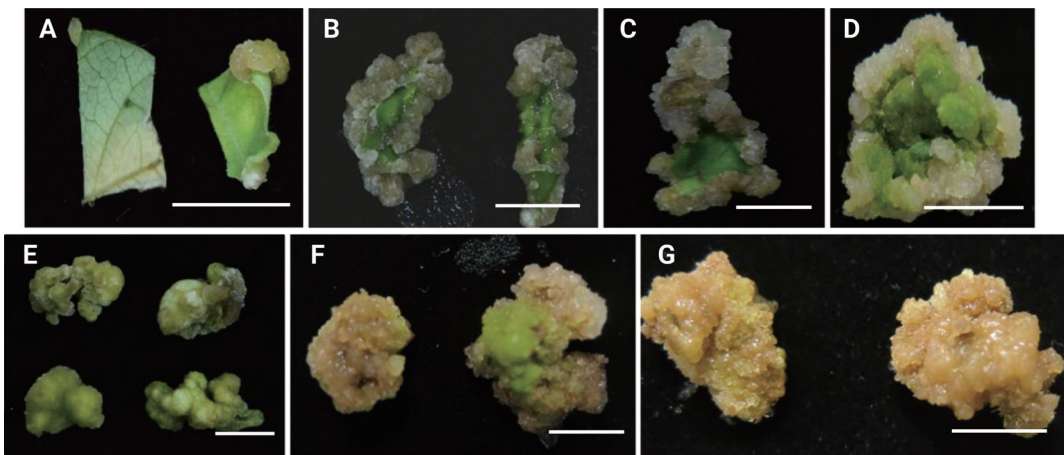


图1 粉葛叶片愈伤组织的不同形态

Fig. 1 Different types of calli from leaves of *P. thomsonii*

A: 无细胞分裂素培养基诱导产生的愈伤组织; B和C: 无分化能力的愈伤组织; D: 边缘水渍状、中间为黄绿色、结构较松散的愈伤组织; E: 质地紧密的黄绿色愈伤组织; F: 愈伤组织边缘褐化; G: 愈伤组织褐化。图中标尺为1 cm。

表2 不同培养时间对粉葛叶片愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effects of different culture time on callus induction from leaves of *P. thomsonii*

培养时间/d	外植体数	诱导率/%	褐化率/%
14	30	82.7±2.3 ^a	0
21	30	89.5±0.5 ^a	1.1±1.6 ^a
28	30	88.7±1.9 ^a	36.6±1.7 ^b

表3 不同光照条件对粉葛叶片愈伤组织诱导的影响
Table 3 Effects of different light conditions on callus induction from leaves of *P. thomsonii*

光照条件	外植体数	诱导率/%
光照培养	30	67.2±4.3 ^b
先暗培养后光照培养	30	71.5±2.2 ^b
暗培养	30	81.4±1.6 ^a

于不同光照条件下培养, 14 d后愈伤组织的诱导率如表3所示。在不同条件培养7 d, 各处理的外植体切口边缘均有膨大现象。在光照条件下, 随着培养时间的延长, 愈伤组织颜色由浅黄色逐渐变为黄绿色。但在光照条件下继续培养时, 愈伤组织又逐渐褐化死亡, 变为黄褐色(图1-G)。在暗培养条件下, 愈伤组织由白色变为浅黄色, 最后变为质地紧密的黄绿色愈伤组织, 愈伤组织诱导率最高, 为

81.4%。因此, 粉葛愈伤组织诱导的最佳培养条件为暗培养。

2.4 不同取材部位对叶片愈伤组织诱导的影响

以顶端未完全展开的嫩叶为外植体材料。培养14 d后, 少部分叶片形成黄色的愈伤组织, 但大部分叶片无明显反应, 或形成白色蓬松状愈伤组织; 继续培养则褐化死亡。以2~5节位完全展开的幼嫩叶和6节位以下组培苗叶片为外植体均能形成正常的愈伤组织, 但2~5节位完全展开的幼嫩叶愈伤组织诱导启动快, 且愈伤组织诱导率最高(表4)。

2.5 叶片不同放置方式对愈伤组织诱导的影响

将粉葛组培苗叶片切成0.4 cm×0.4 cm大小, 分别正放和反放入愈伤组织诱导培养基上。培养14 d后愈伤组织诱导率如表5所示, 叶片正放和叶片反放的愈伤组织诱导率分别为83.6%和84.5%, 差异不显著。

2.6 不同植物生长调节剂及其浓度对愈伤组织再分化的影响

由表6可知, 在不含生长素(NAA)的情况下, 不同浓度(1.0~3.0 mg·L⁻¹)细胞分裂素(6-BA)均无法诱导愈伤组织分化出芽。在本试验范围内, 不同浓度TDZ和NAA组合下, 愈伤组织分化率为0, 未诱导出不定芽。低浓度6-BA (0.5 mg·L⁻¹)未成功诱导出不定芽; 随着6-BA浓度的升高, 愈伤组织分化率

表4 不同取材部位对粉葛叶片愈伤组织诱导的影响
Table 4 Effects of different sampling position of leaves on callus induction of *P. thomsonii*

取材部位	外植体数	诱导率/%
顶端未完全展开的嫩叶	30	23.7±4.4 ^c
2~5节位完全展开的幼嫩叶	30	88.6±1.8 ^a
6节位以下组培苗叶片	30	70.1±2.3 ^b

表5 粉葛叶片不同放置方式对愈伤组织诱导的影响
Table 5 Effects of different placement of leaves on callus induction of *P. thomsonii*

叶片放置方式	外植体数	诱导率/%
正放	30	83.6±2.1 ^a
反放	30	84.5±3.4 ^a

呈先上升后下降的趋势, 以2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA分化率最高, 为9.2%。

2.7 生根培养及移栽

将分化的不定芽转入生根培养基中, 5 d后开始形成根毛, 25 d左右形成3~4 cm的再生植株, 植株生长旺盛(图2)。将所获生根苗移栽至泥炭土+珍珠岩(体积比3:1)混合基质中, 30 d后组培苗移栽成活率达96.7%, 植株生长状态良好。

3 讨论

光照条件对愈伤组织诱导及其生长具有重要影响。李兴桃和任佼佼(2016)发现瞿麦外植体在黑暗条件下培养25 d后再进行光照培养, 愈伤组织

诱导率及其生长状态均优于直接光照培养条件下诱导的愈伤组织。蓖麻(邵志敏等2012)和橡胶树(李玲等2019)花药在黑暗条件下愈伤组织诱导率最高。但也有研究表明, 光照条件对荞麦(王鹏姬等2013)愈伤组织生长没有明显的影响; 间断性光照最有利于三叶青(彭昕等2012)愈伤组织的生长。本试验研究发现黑暗培养条件有利于粉葛愈伤组织诱导, 在光照条件下诱导的愈伤组织随着培养时间的推移逐渐褐化死亡, 变为黄褐色。由此可见, 光照条件对愈伤组织诱导及其生长状态的影响因植物种类不同而有所差异。

植物生长调节剂是影响外植体材料形态发生的最关键因素, 植物愈伤组织诱导及不定芽分化较大程度取决于植物生长调节剂的种类和浓度(Tokuji和Kuriyama 2003; 马艳等2019)。^{‘桂粉葛一号’}组培苗叶片在仅含不同浓度生长素的培养基中, 愈伤组织诱导率低, 且形成的愈伤组织状态为海绵状, 无法分化不定芽。但洪森荣等(2008)研究发现野葛叶片在不含细胞分裂素的情况下, 1.0 mg·L⁻¹ NAA和2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D生长素组合愈伤组织诱导率最高。这可能与野葛和粉葛的基因型和植物激素含量差异性较大有关。本实验中, 不同浓度6-BA与NAA或2,4-D组合均能成功诱导出愈伤组织, 且以添加2.0 mg·L⁻¹ 6-BA和1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D的培养基愈伤组织诱导率最高, 为94.7%。在不同培养基配方诱导下, 形成了水渍状愈伤组织, 边缘水渍状、中间黄绿色、结构较松散的愈伤组织及绿色、结构较紧实的愈伤组织三种愈伤组织形态。

表6 不同植物生长调节剂对粉葛愈伤组织分化的影响
Table 6 Effects of different combinations of plant growth regulators on callus regeneration of *P. thomsonii*

植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹			分化率/%	植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹			分化率/%
6-BA	TDZ	NAA		6-BA	TDZ	NAA	
1.0	0	0	0	2.0	0	0.10	9.2±1.3 ^a
2.0	0	0	0	2.0	0	0.50	5.7±1.5 ^{ab}
3.0	0	0	0	3.0	0	0.10	3.5±0.4 ^b
0.5	0	0.1	0	3.0	0	0.50	0
0.5	0	0.5	0	0	0.5	0.05	0
1.0	0	0.1	2.1±0.1 ^b	0	1.0	0.05	0
1.0	0	0.5	3.8±0.4 ^b	0	1.0	0.10	0

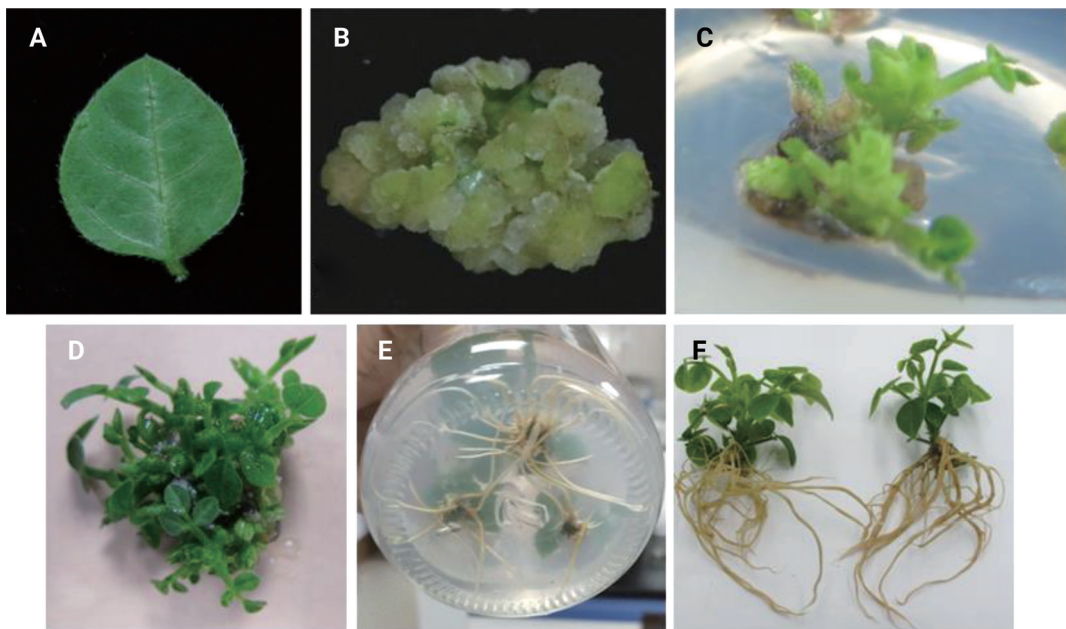


图2 粉葛叶片愈伤组织诱导及植株再生
Fig. 2 Callus induction and shoot regeneration from leaves of *P. thomsonii*

A: 叶片外植体; B: 愈伤组织诱导; C: 愈伤组织分化; D: 不定芽增殖; E: 不定芽生根; F: 再生植株。

其中第一种愈伤组织无分化能力, 第二种愈伤组织需及时继代, 并将生长速度较快的水渍状愈伤组织去除, 否则导致黄绿色愈伤组织发生褐化, 无法分化不定芽。TDZ被认为是活性较强的细胞分裂素, 在多种植物愈伤组织诱导不定芽中均发挥着重要作用(Dobranszk和da Silva 2013; 李晶等2016; 田歌等2020)。而在西洋梨叶片不定芽再生过程中发现, 细胞分裂素6-BA和TDZ之间不定芽分化率无显著差异, 且在不定芽增殖过程中, 6-BA比TDZ作用效果更佳(孙清荣等2018, 2020)。本研究中, 不同浓度TDZ均无法诱导粉葛品种‘桂粉葛一号’愈伤组织分化; 而较高浓度的6-BA可成功诱导愈伤组织分化, 产生不定芽。

与茎段或茎尖作为外植体相比, 以组培苗叶片作为外植体进行粉葛愈伤组织诱导及再生技术的研究具有来源广、操作简单且对组培苗伤害小、不影响其正常生长等方面的优势, 目前尚未见有关文献报道。且当前有关粉葛愈伤组织诱导的研究仅探讨植物生长调节剂对茎段或茎尖愈伤组织诱导及再生的影响。本研究通过优化植物生长调

节剂、培养时间、光照条件、叶片取材部位等影响因素, 建立了一套高效的愈伤组织诱导方法, 其诱导率可达94.7%。

参考文献(References)

Dobranszki J, da Silva AT (2013). *In vitro* shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors. J Hort Sci Biotech, 88 (1): 60–66

Hong SR, Yin MH, Shao XH (2008). Establishment of high-frequency regeneration system from leaves and stems of *Pueraria lobata*. Bull Bot Res, 28 (4): 458–464, 508 (in Chinese with English abstract) [洪森荣, 尹明华, 邵兴华(2008). 野葛叶片和茎段高频再生体系的建立. 植物研究, 28 (4): 458–464, 508]

Li J, Luo YJ, Zhang QL, et al (2016). *In vitro* culture system optimization and regeneration of date plum (*Diospyros lotus* Linn.) dormant bud and leaves. J Huazhong Agric Univ, 35 (4): 14–19 (in Chinese with English abstract) [李晶, 罗玉洁, 张青林等(2016). 君迁子休眠芽及叶片离体培养体系优化及植株再生. 华中农业大学学报, 35 (4): 14–19]

Li L, Gui MC, Guan Y, et al (2019). Effects of different factors on anther callus induction of rubber tree clone

- ‘Yunyan 77-2’ (*Hevea brasiliensis*). *Mol Plant Breed*, 17 (8): 2607–2613 (in Chinese with English abstract) [李玲, 桂明春, 管艳等(2019). 不同因素对橡胶树‘云研77-2’花药愈伤组织诱导的影响. *分子植物育种*, 17 (8): 2607–2613]
- Li XT, Ren JJ (2016). Effects of different culture conditions on callus inductions of *Dianthus superbus* L. *South Chin Agric*, 10 (24): 123–124 (in Chinese) [李兴桃, 任佼佼(2016). 不同培养条件对瞿麦诱导愈伤组织的影响. *南方农业*, 10 (24): 123–124]
- Ma CJ, Zheng SY, Zhuo HB (2013). Study on micropropagation of *Pueraria thomsonii* Benth *in vitro*. *Guangdong Agric Sci*, 40 (15): 28–30, 35, 4 (in Chinese with English abstract) [马崇坚, 郑声云, 卓海标(2013). 粉葛种苗离体繁殖技术初步研究. *广东农业科学*, 40 (15): 28–30, 35, 4]
- Ma Y, Wang JF, Liu T, et al (2019). Study on tissue culture technology of hybrid leaves of *Populus euphratica*. *Chin Wild Plant Res*, 38 (4): 1–6, 12 (in Chinese with English abstract) [马艳, 王静飞, 刘婷等(2019). 胡杨杂种叶片组培技术研究. *中国野生植物资源*, 38 (4): 1–6, 12]
- Peng X, Lin YN, He JY, et al (2012). Influence of culture conditions on the growth of callus and content of total flavonoids in *Tetrastigma hemsleyanum*. *Chin J Pharm Biotech*, 19 (2): 138–141 (in Chinese with English abstract) [彭昕, 林言娜, 何军邀等(2012). 培养条件对三叶青愈伤组织生长及总黄酮含量的影响. *药物生物技术*, 19 (2): 138–141]
- Shao ZM, Chen YS, Huang FL, et al (2012). Effects of cold pretreatment and light conditions on castor anther callus induction. *J Inner Mongolia Univ Nationalities (Nat Sci)*, 27 (2): 189–193 (in Chinese with English abstract) [邵志敏, 陈永胜, 黄凤兰等(2012). 低温预处理与光照条件对蓖麻花药愈伤组织诱导的影响. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 27 (2): 189–193]
- Shen JG, Yao MF, Chen XC, et al (2009). Effects of puerarin on receptor for advanced glycation end products in nephridial tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Biol Rep*, 36 (8): 2229–2233
- Sun QR, Guan QZ, Sun HY, et al (2018). Tissue culture and shoot regeneration from leaf explants of cold-hardy and semi-dwarf apple rootstock ‘54-118’. *Shandong Agric Sci*, 50 (11): 28–32 (in Chinese with English abstract) [孙清荣, 关秋竹, 孙洪雁等(2018). 西洋梨品种‘红考密斯’的组织培养及离体叶片不定梢再生. *山东农业科学*, 50 (11): 28–32]
- Sun QR, Guan QZ, Tao JH, et al (2020). Tissue culture and shoot regeneration from leaf explants of red-skinned cultivar ‘Starkrimson’ of *Pyrus communis*. *Plant Physiol J*, 56 (4): 771–778 (in Chinese with English abstract) [孙清荣, 关秋竹, 陶吉寒等(2020). 红色西洋梨品种‘红星’的组织培养及离体叶片不定梢再生. *植物生理学报*, 56 (4): 771–778]
- Tian G, Peng LC, Qu SP, et al (2020). Studies on the adventitious buds induction from *in vitro* leaves of *Rhododendron delavayi* var. *delavayi* and histocytological observation on the buds formation. *Acta Hort Sin*, 47 (10): 2019–2026 (in Chinese with English abstract) [田歌, 彭绿春, 瞿素萍等(2020). 马缨杜鹃离体叶片高效再生不定芽及其组织细胞学研究. *园艺学报*, 47 (10): 2019–2026]
- Tokuji Y, Kuriyama K (2003). Involvement of gibberellins and cytokinin in the formation of embryogen cell clumps in carrot (*Daucus carota* L.). *J Plant Physiol*, 160 (2): 133–141
- Wang PJ, Gao JF, Su W, et al (2013). Influence of culture condition on callus growth and flavonoids biosynthesis of buckwheat. *Acta Agric Nucl Sci*, 27 (5): 591–597 (in Chinese with English abstract) [王鹏姬, 高金锋, 苏旺等(2013). 培养条件对荞麦愈伤组织生长及黄酮合成的影响. *核农学报*, 27 (5): 591–597]
- Wang Y, Wang WL, Xie WL, et al (2013). Puerarin stimulates proliferation and differentiation and protects against cell death in human osteoblastic MG-63 cells via ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation. *Phytomedicine*, 20 (10): 787–796
- Yang XD, Wang AQ, He LF (2014). Research progress of radix *Puerariae* germplasma and its utilization. *Chin Agric Sci Bull*, 30 (24): 11–16 (in Chinese with English abstract) [杨旭东, 王爱勤, 何龙飞(2014). 葛根种质资源及其开发利用研究进展. *中国农学通报*, 30 (24): 11–16]
- Zhou TY, Li HB, Xiang SQ, et al (2005). Tissue culture and induction of autotetraploid of *Pueraria thomsonii*. *Chin Trad Herb Drugs*, 36 (8): 114–117 (in Chinese with English abstract) [周堂英, 李惠波, 向素琼等(2005). 粉葛组织培养及同源四倍体诱导. *中草药*, 36 (8): 114–117]
- Zhu XQ, Zhou JM, Huang YN, et al (2011). Chinese *Pueraria lobata* resources utilization. *Subtrop Agric Res*, 7 (4): 230–234 (in Chinese with English abstract) [朱校奇, 周佳民, 黄艳宁等(2011). 中国葛资源及其利用. *亚热带农业研究*, 7 (4): 230–234]