

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.09.001

# 半夏再生体系的建立<sup>①</sup>

吴能表<sup>1</sup>, 曹瑞霞<sup>1</sup>, 吴思婧<sup>2</sup>, 杨 怡<sup>1</sup>

1. 西南大学 生命科学学院/三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学 附属中学, 重庆 400700

**摘要:**【目的】优化半夏再生条件, 以获得优质半夏种苗。【方法】筛选出适宜的外植体后, 使用 3 种激素 2,4-D, KT, IAA 利用正交设计法设置 9 个处理组对半夏愈伤组织进行诱导。选取长势良好, 大小均一的半夏愈伤组织接于 4 种培养基中进行愈伤组织增殖。选取半夏叶柄诱导出的愈伤组织将其接于 5 种培养基中进行愈伤组织分化, 观察不同培养基对半夏愈伤组织生根和出芽的影响, 最后进行炼苗与移栽。【结果】在叶柄、叶片及块茎 3 种外植体中, 叶柄是半夏愈伤组织诱导的最佳外植体; 最有利于半夏愈伤组织诱导的培养基为 MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA; 在暗培养条件下, 将半夏愈伤组织继代于 MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA 中生长最快; MS+0.2 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L 6-BA 培养基最有利于半夏愈伤组织的生根和出芽。

**关键词:** 半夏; 叶柄; 愈伤组织; 植物再生

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2018)09-0001-06

半夏[*Pinellia ternate* (Thumb) Breit.]是天南星科多年生草本植物, 是一种传统的中药材, 以块茎入药, 具有燥湿化痰、消痞散结、降逆止呕、抗早孕、抗衰老、去皱养颜和提高记忆力等多方面的功能<sup>[1-2]</sup>。其体内含有总生物碱、鸟苷、半夏蛋白、挥发油及无机元素等多种化学成分<sup>[3]</sup>。同时, 半夏有一定的毒性, 对有毒成份进一步研究, 可为一些植物杀虫剂的开发提供思路, 因此半夏在药材市场上供不应求<sup>[4]</sup>。为了满足市场需求, 人们对野生半夏大量采挖, 致使其野生资源日渐匮乏, 人工种植也因半夏自身条件的限制, 效果不十分理想。本研究利用现代生物学手段的组织培养技术获得半夏优质种苗, 提高其繁殖系数, 以期半夏大田栽培打下良好的基础, 为开展人工种子研究做好基础性工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

三叶半夏块茎(购自于重庆市北碚区)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 半夏种苗栽培

2015 年 9 月, 挑选大小均一、生命旺盛的块茎种子充分混匀的沙: 土(1:2)土壤中, 光照培养箱中萌发培养, 温度为(25±1)℃, 光照强度为 3 000 lx, 光照时间为 12 h/d, 待其长势良好后备用[以下各指标均采用此温度、光照强度和光周期进行, 愈伤组织除外(采用暗培养)]。

#### 1.2.2 外植体灭菌

分别取半夏块茎、叶柄和叶片, 先用流水洗去各外植体表面的灰尘及泥土等, 用洗衣粉漂洗 20 min,

① 收稿日期: 2017-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500041); 重庆市教委雏鹰计划项目(CY160204)。

作者简介: 吴能表(1969-), 男, 博士, 教授, 主要从事药用植物生理生化研究。

块茎需用手剥去表皮,再用流水冲洗 2 h(叶片可缩短,块茎需稍有延长).各外植体处理好后进行灭菌处理.用酒精消毒 30 s 后用无菌水冲洗 3 次,然后将外植体分成 4 组,分别加入 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒不同时间,时间分别为 8 min,10 min,12 min,15 min,(块茎分成 5 组,消毒时间分别为 8 min,10 min,12 min,15 min,20 min),随后每处理组倒入无菌水冲洗 5~6 次后进行接种.将块茎切成 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的立方体,叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 见方的小块,叶柄切成 0.5 cm 长的小段,叶柄接于半夏愈伤诱导培养基 MS+1.5 mg/L KT+2.0 mg/L 2,4-D<sup>[6]</sup>上,每个培养皿上接 6 块块茎于培养瓶中,每个培养瓶中接 3 块.15 d 后统计染菌率和成活率.

$$Ra = (Na/Nt) \times 100\%$$

$$Rs = (Ns/Nt) \times 100\%$$

式中, $Ra$ ,染菌率; $Rs$ ,成活率; $Na$ ,染菌外植体数; $Ns$ ,成活外植体数; $Nt$ ,接入的总外植体数.

### 1.2.3 最佳外植体筛选

将块茎、叶片、叶柄灭菌后接种于愈伤诱导培养基 MS+1.5 mg/L KT+2.0 mg/L 2,4-D 中,每种处理方式重复接 7 个板(块茎重复接 10 瓶),15 d 后统计愈伤组织诱导率,发芽率.

$$Rc = (Nc/Nt) \times 100\%$$

$$Rb = (Nb/Nt) \times 100\%$$

式中, $Rc$ ,愈伤组织诱导率; $Rb$ ,发芽率; $Nc$ ,形成愈伤组织的外植体数; $Nb$ ,发芽的外植体数.统计时假设污染率为 0.

### 1.2.4 半夏愈伤组织诱导

MS 培养基中添加 2,4-D,KT,IAA,利用正交设计法设置 9 个处理组,分组情况如表 1.将生长旺盛的半夏叶柄接于以下 9 种培养基中,观察不同质量浓度、不同激素配比的培养基对半夏愈伤组织诱导的影响.每个培养皿中接 6 个,每组重复接 5 个培养皿.培养 30 d 后统计半夏愈伤组织诱导率及生长情况.

表 1 植物激素 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)因素水平表

培养基号	因 素		
	2,4-D/(mg·L <sup>-1</sup> )	KT/(mg·L <sup>-1</sup> )	IAA/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	0.5	0.5	0
2	0.5	1.0	0.5
3	0.5	1.5	1.0
4	1.0	0.5	1.0
5	1.0	1.0	0
6	1.0	1.5	0.5
7	2.0	0.5	0.5
8	2.0	1.0	1.0
9	2.0	1.5	0

### 1.2.5 半夏愈伤组织增殖

选取长势良好,大小均一的半夏愈伤组织接于如下 4 种培养基中,Ⅰ:MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA;Ⅱ:MS+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT;Ⅲ:MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA;Ⅳ:MS+0.4 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA<sup>[6]</sup>.每个培养皿接 6 块愈伤组织,每种培养基共 5 个培养皿,每个处理做 3 次重复,30 d 后统计相对生长速率及生长情况.

$$Ro = (W - W0)/W0$$

式中, $Ro$ ,相对生长速率; $W$ ,收获鲜质量; $W0$ ,接种鲜质量.

### 1.2.6 半夏愈伤组织分化

选取半夏叶柄诱导出的愈伤组织将其接于如下 5 种培养基中,A:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA<sup>[6]</sup>;B:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA<sup>[6]</sup>;C:MS+0.2 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L 6-BA<sup>[2]</sup>;D:MS+0.2 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA;E:MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA.

观察不同培养基对半夏愈伤组织生根和出芽的影响. 每瓶接 3 块愈伤组织, 每种培养基 10 瓶, 每个处理做 3 次重复, 30 d 后统计出芽率、每块出芽平均数、生根率和每块生根平均数.

$$Rb = (Cb/Tc) \times 100\%$$

$$Rr = (Cr/Tc) \times 100\%$$

$$Ab = (Tb/Cb)$$

$$Ar = (Tr/Cr)$$

式中,  $Rr$ , 生根率;  $Cb$ , 出芽的愈伤组织块数;  $Cr$ , 生根的愈伤组织块数;  $Tc$ , 接入愈伤组织块数;  $Ab$ , 每块出芽平均数;  $Ar$ , 每块生根平均数;  $Tb$ , 分化出的芽总数;  $Tr$ , 分化出的根总数.

### 1.2.7 半夏炼苗与移栽

待组培苗长至健壮后, 逐渐开盖放置 7 d, 待其适应外界环境后种于土壤与沙比例为 2:1 的土壤中, 放于阴凉的外界环境中, 每天浇水, 保持土壤湿润. 生长 2 个月后, 统计成活率.

$$Rs = (Fs/Ts) \times 100\%$$

式中,  $Fs$ , 炼苗后成活的组培苗总数;  $Ts$ , 炼苗前移栽的组培苗总数.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌时间对外植体染菌率、成活率的影响

以半夏叶片、叶柄及块茎作外植体, 不同灭菌时间对外植体的影响不同(表 2). 从染菌情况来看, 叶片、叶柄消毒时间超过 8 min 均未染菌, 块茎的染菌率也随着消毒时间的延长而减少, 在试验质量浓度范围内, 消毒时间越长外植体的染菌率越低. 块茎染菌率高, 较难消毒主要是因为块茎位于土壤中, 环境复杂, 接触细菌及霉菌较多, 不易清除. 从外植体死亡情况来看, 半夏叶片、叶柄的死亡数均随着消毒时间的延长而增加, 其中叶片的死亡数最多, 最高时达到了 25%, 说明半夏叶片组织细胞容易被  $HgCl_2$  杀死, 可见消毒时间越长对外植体伤害越大、这与文献[7]的结果一致. 叶片、叶柄的最佳消毒时间为 10 min, 块茎的最佳消毒时间为 20 min. 对外植体进行灭菌时, 在本试验设置的灭菌时间内, 灭菌时间与染菌率成反比, 与成活率成正比.

表 2 不同灭菌时间对外植体染菌率、成活率的影响

外植体	消毒时间/ min	指 标				
		总数	染菌数	死亡数	染菌率/%	成活率/%
叶片	8	40	4	4	10	85
	10	48	0	5	0	90
	12	42	0	8	0	81
	15	40	0	10	0	75
叶柄	8	40	2	0	5	95
	10	44	0	0	0	100
	12	44	0	3	0	93
	15	48	0	3	0	94
块茎	8	38	36	0	95	5
	10	36	30	0	83	17
	12	38	26	0	68	32
	15	36	24	0	67	33
	20	36	15	0	42	58

### 2.2 半夏外植体的选择

以半夏叶柄、叶片、块茎作外植体, 观察不同外植体愈伤组织诱导情况(表 3). 叶片第 3 d 时颜色鲜绿, 且边缘上卷, 第 8 d 时从伤口处长出愈伤, 第 15 d 时叶片伤口处均长出白色致密愈伤组织, 愈伤诱导率为 85%, 无芽长出, 其中部分叶片因消毒时间过长逐渐变黑死去; 叶柄 3 d 后颜色变得鲜绿, 并开始膨大, 第 7 d 时长出愈伤, 15 d 时愈伤呈白色晶体状颗粒, 且愈伤诱导率达 100%, 无芽长出; 块茎第 10 d 时长出白色致密愈伤, 但到第 15 d 时愈伤诱导率只有 50%, 且易出芽长成小植株, 可能是块茎上生有芽点, 不易切

除干净. 另外, 块茎作外植体还有难消毒、易污染等问题.

叶柄是半夏愈伤组织诱导的最佳外植体, 故本研究使用半夏叶柄作为外植体.

表 3 不同外植体诱导愈伤组织发生率

外植体	消毒时间/min	总数	愈伤诱导率/%	发芽率/%
叶片	10	40	85	0
叶柄	10	40	100	0
块茎	20	40	50	15

### 2.3 半夏愈伤组织的诱导

不同激素对比对半夏叶柄愈伤组织的发生和长势影响不同. 由表 4 可知, 9 种培养基均可诱导半夏愈伤组织发生, 且诱导率均较高. 培养初期, 各组培养基叶柄均出现膨大; 15 d 时 4 号开始褐化, 2, 3, 8, 9 号愈伤组织长势最好, 2, 3 号愈伤呈淡黄色疏松颗粒, 生长迅速, 8, 9 号呈白色晶体状颗粒, 生长缓慢; 30 d 时每种培养基中均有愈伤组织出现, 其中 2, 3, 9 号培养基中的激素配比最有利于半夏愈伤组织的诱导及生长, 愈伤组织诱导率分别为 94%, 100%, 97%. 2 号培养基中愈伤组织呈绿色, 结构致密表面生有多个白色芽点, 同时长出许多小块茎, 个别生有不定根和芽, 过一段时间后即可长出再生植株; 3 号培养基中, 半夏愈伤组织呈淡黄色疏松颗粒, 含水量大, 生长迅速; 9 号培养基中的半夏愈伤组织呈白色晶体状颗粒, 结构疏松, 但是生长缓慢; 8 号培养基愈伤组织诱导率高达 97%, 但是外植体到后期逐渐变黑且愈伤组织生长缓慢. 最有利于半夏叶柄愈伤组织诱导及生长的是 3 号培养基, 即 MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA.

表 4 不同激素组合对半夏愈伤组织发生的影响

培养基号	愈伤组织块数	总数	诱导率/%	长势	生长情况
1	25	29	86	++	长有芽和不定根
2	31	33	94	+++	多长小块茎, 个别有不定根和芽
3	28	28	100	+++	淡黄色疏松愈伤
4	28	31	90	++	个别褐化
5	22	27	82	+	多长不定根
6	25	28	89	++	少数长有不定根
7	20	26	77	-	褐化明显
8	32	33	97	++	白色晶体状愈伤
9	29	30	97	+++	白色晶体状愈伤, 但生长缓慢

注: - 差; + 一般; ++ 较好; +++ 旺盛.

### 2.4 半夏愈伤组织的增殖

本试验使用 4 种培养基研究了不同激素对比对半夏叶柄愈伤组织增殖的影响. 从表 5 可知, I, II, III, IV 这 4 种培养基均促进了半夏愈伤组织生长, 其中 I 号和 III 号增殖效果最好, 半夏愈伤组织相对生长速率分别为 2.3 和 2.4, 且长势良好. 但是, I 号愈伤组织在培养过程中易出现不定根, 并逐渐分化出芽点的情况, 可见 2,4-D 在质量浓度较低时不利于半夏愈伤组织的增殖, 易分化成芽和根形成再生小植株, 此结果与孙健玲<sup>[6]</sup>的结果相似. III 号愈伤组织生长迅速, 为淡黄色疏松愈伤, 因此 III 号培养基 (MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA) 在半夏愈伤组织增殖方面效果好.

表 5 不同激素组合对半夏愈伤组织增殖的影响

处理	总数	相对生长速率	长势	生长情况
I	30	2.3	+++	多长不定根
II	30	0.8	+	略出芽, 但较少
III	28	2.4	+++	淡黄色疏松愈伤
IV	28	1.9	++	易出芽生根

注: - 差; + 一般; ++ 较好; +++ 旺盛.

## 2.5 半夏愈伤组织的出芽生根

不同激素对比对半夏叶柄愈伤组织生根出芽的影响见表6.从表6中可看出,5种培养基均能诱导半夏愈伤组织生芽生根,但诱导情况各不相同.在诱导丛生芽方面,5种培养基的诱导率分别是56%,74%,81%,50%,56%.其中C培养基愈伤组织出芽率最高,每块愈伤组织上出芽数最多,且组培苗健壮.在诱导根方面,B,C培养基诱导效果均较好,诱导率分别为78%和77%,每块愈伤组织上分别生有7~9条和8~10条根,但是B培养基诱导出的根细弱,C培养基诱导出的根粗壮,可见C培养基最有利于诱导半夏愈伤组织生根.半夏基部若长有愈伤,在移栽炼苗时不易成活.所以,C培养基(MS+0.2 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L 6-BA)最有利于诱导半夏愈伤组织出芽生根.

表6 不同激素组合对半夏愈伤组织出芽生根的影响

处理	出芽率/%	每块出芽平均数	生根率/%	每块生根平均数	生长情况
A	56	6~7	25	2~3	芽少苗弱,根少但粗,基部易长愈伤
B	74	8~10	78	7~9	芽健壮,根细,基部无愈伤
C	81	11~14	77	8~10	芽多根多且健壮,基部无愈伤
D	50	6~8	50	9~12	芽少但健壮,根粗但生根率低,基部长愈伤
E	56	9~11	60	3~5	芽多苗弱,根少且弱,基部长愈伤

## 2.6 炼苗

当半夏组培苗在自然环境中生长60 d后植株生长旺盛,根系发达,株高约6~8 cm,其成活率达到了98%,叶柄基部长有直径约为0.25 cm的小块茎.

## 3 讨论与结论

从理论上讲,植物体细胞具有发育成完整植株的潜能,植物任何组织都可作为组织培养的外植体,但不同部位组织脱分化和再分化难易程度不同,以及灭菌难度差异较大,所以在组织培养时外植体的选择十分重要.在半夏组织培养过程中,通常选用叶片、叶柄、块茎、茎尖、根及珠芽作为外植体<sup>[8]</sup>.罗成科等<sup>[9]</sup>使用叶片、叶柄、块茎及根作外植体培养1个月后观察愈伤组织诱导情况,3个月后统计再生苗,结果愈伤组织诱导及成苗均以叶片效果最好;夏海武等<sup>[10]</sup>将半夏叶片、叶柄和块茎接入愈伤组织诱导培养基后发现块茎最有利于愈伤组织的诱导.

本试验选用半夏叶柄、叶片及块茎作为外植体,发现叶柄的愈伤组织诱导效果最好,达到了100%;其次为叶片,诱导率为85%;最后为块茎.此结论与万美亮等<sup>[11]</sup>的结果一致,但与夏海武等<sup>[10]</sup>的研究结果有差异.另外,植物愈伤组织诱导所用选择材料的年龄、生长环境及基因型,对外植体愈伤组织的发生及成苗同样起着非常重要的作用,尽可能在植株生长旺盛的季节选择幼态的组织和器官.

器官发生途径和胚状体发生途径是半夏原生质体到再生植株的两种途径<sup>[12]</sup>.本试验采用的是器官发生途径,即愈伤组织在分化时,组织块内部发生组织分化,形成芽原基,在愈伤表面分化出芽,同时产生大量的不定根.研究表明,生长素与细胞分裂素的浓度配比是影响植物愈伤组织培养的一个重要因素,生长素和细胞分裂素的适当配合对愈伤组织诱导有增效效应<sup>[13]</sup>.

本研究发现2,4-D质量浓度对半夏愈伤组织的诱导及培养有非常重要的作用.当2,4-D质量浓度较低时,易诱导出黄绿色疏松愈伤组织,生长迅速,但是后期愈伤组织易分化成芽转化成小植株;当2,4-D质量浓度较高时,则抑制半夏愈伤组织中根芽的分化<sup>[6]</sup>,所诱导愈伤组织呈白色晶体状,生长缓慢,外植体易褐化.本试验选用有利于半夏愈伤组织生长的愈伤诱导培养基MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA,再将其转移至继代培养基MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA中暗培养,一方面可促进半夏愈伤组织快速生长,另一方面可抑制愈伤组织根芽的分化.

本试验从外植体和愈伤组织诱导、增值及分化培养等方面对半夏再生条件进行优化,建立了再生体系.使用叶柄、叶片及块茎作为外植体发现,叶柄是半夏愈伤组织诱导的最佳外植体.最有利于半夏愈伤组织诱导的培养基为MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA;在暗培养条件下,将半夏愈伤组织继代于MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA中生长最快;MS+0.2 mg/L 2,4-D+

1.5 mg/L 6-BA 培养基最有利于半夏愈伤组织的生根和出芽。优化半夏的再生条件,筛选出半夏愈伤组织诱导的最佳外植体和最有利于愈伤组织诱导的培养基,为大规模细胞培养半夏及其次生代谢产物的提取奠定较好的基础。

### 参考文献:

- [1] 张苏锋, 谢素霞. 半夏组织培养快速繁殖的研究 [J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 1998, 11(1): 86—88.
- [2] 罗光明, 刘贤旺, 姚振生. 半夏的组织培养和植株再生 [J]. 江西中医学院学报, 2000, 12(3): 125—126.
- [3] 李先端, 胡世林, 杨连菊. 半夏类药材氨基酸与无机元素分析 [J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 37—38.
- [4] 季旭明. 半夏毒性毒理研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2004, 28(1): 74—76.
- [5] 范美华, 周吉源, 彭 瑜, 等. 半夏愈伤组织的诱导及增殖效应 [J]. 山东中医杂志, 2005, 24(3): 168—171.
- [6] 孙健玲. 半夏的快繁及诱导子对其愈伤组织总生物碱积累的影响 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [7] 金 青, 蔡永萍, 林 毅, 等. NO 对石斛类原球茎内源激素水平及生物碱积累的影响 [J]. 核农学报, 2010, 24(6): 1291—1296.
- [8] 邱 萍, 张兴翠. 半夏茎尖组织培养的研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, 33(1): 77—81.
- [9] 罗成科, 彭正松. 半夏组织培养一步成苗技术的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2003, 31(5): 798—799.
- [10] 夏海武, 战克勤. 半夏组织培养研究 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(12): 720—721.
- [11] 万美亮, 周吉源. 半夏组织培养与快速繁殖研究 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(9): 526—529.
- [12] 吴伯冀, 肖 亮, 覃章铮. 从三叶半夏(*Pinellia ternate* Breit)叶肉原生质体再生植株 [J]. 中国科学(B辑), 1986(3): 267—272.
- [13] 杨 春. 生长素和细胞分裂素在马铃薯愈伤组织分化中的作用 [J]. 山西农业科学, 2008, 36(7): 40—42.

## A Regeneration System of *Pinellia ternate*

WU Neng-biao<sup>1</sup>, CAO Rui-xia<sup>1</sup>, WU Si-jing<sup>2</sup>, YANG Yi<sup>1</sup>

1. School of Life Science, Southwest University/Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;
2. High School Affiliated to Southwest University, Chongqing 400700, China

**Abstract:** 【Objective】 This study was conducted to build a regeneration system of *Pinellia ternate* and optimize the regeneration conditions so as to obtain high-quality plantlets for cultivation. 【Methods】 After screening out suitable explants of *P. ternate*, the experiment materials were divided into nine treatment groups according to the orthogonal design and treated with 2,4-D, KT and IAA to induce calli. Uniform healthy calli of *P. ternate* were selected and inoculated to four multiplication media. Petiole-derived calli were selected and inoculated to five differentiation media. Then, the effects of different media on the rooting and sprouting of *P. ternate* calli were observed. Finally, the regenerated plantlets were hardened and transplanted. 【Results】 Of the three explants studied (petiole, leaf and tuber), petiole was shown to be the best explant for callus induction. The best callus induction medium of *P. ternate* was MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA. When culture was made in the dark, the best callus induction medium of *P. ternate* was MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA. The best rooting medium of *P. ternate* was MS+0.2 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L 6-BA.

**Key words:** *Pinellia ternate*; petiole; callus; plantlet regeneration