

Study on Callus Induction and Tissue Culture Regeneration System of Tibetan Medicine *Malus toringoides*

Guozhen Zhang^{1,2}, Jie Xie³, Xiaobo Qin^{1,2,4*}, Bei Niu^{2*}, Xiaodong Shi², Lijuan Fan^{1,4}, Bingbing Zhang⁴, Xinyi Xu⁵, Yifei Qin⁶

¹Sichuan Natural Resource Institute, Chengdu Sichuan

²Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu Sichuan

³College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu Sichuan

⁴Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

⁵The Experimental High School Attached to UESTC, Chengdu Sichuan

⁶Chengdu Moziqiao Primary School, Chengdu Sichuan

Email: *qxb_2003@163.com, *365421402@qq.com

Received: Aug. 26th, 2019; accepted: Sep. 11th, 2019; published: Sep. 18th, 2019

Abstract

Through the study of callus culture, adventitious bud induction and tissue culture seedling regeneration from the leaves of Tibetan medicine *Malus toringoides*, the regeneration system with short culture cycle and high regeneration efficiency was developed. The design and analysis of multivariate experiments showed the optimum medium for callus induction was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D. By comparing the effects of cytokinin 6-BA, KT and TDZ on induction of adventitious bud differentiation, it was found that the optimum medium for adventitious bud regeneration was MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.15 mg/L IBA. Finally, adding 0.2 mg/L IBA to MS medium could effectively make regenerated seedlings produce roots, and the efficiency was more than 70%.

Keywords

Tibetan Medicine, *Malus toringoides*, Callus, Regeneration, Plant Growth Hormone

藏药俄色愈伤组织诱导与组织培养再生体系研究

张国珍^{1,2}, 谢洁³, 秦小波^{1,2,4*}, 牛蓓^{2*}, 时小东², 樊莉娟^{1,4}, 张冰冰⁴, 徐心艺⁵, 秦一菲⁶

*通讯作者。

文章引用: 张国珍, 谢洁, 秦小波, 牛蓓, 时小东, 樊莉娟, 张冰冰, 徐心艺, 秦一菲. 藏药俄色愈伤组织诱导与组织培养再生体系研究[J]. 植物学研究, 2019, 8(5): 403-409. DOI: 10.12677/br.2019.85050

¹四川省自然资源科学研究院, 四川 成都

²成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都

³四川师范大学生命科学学院, 四川 成都

⁴四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都

⁵电子科技大学实验中学, 四川 成都

⁶成都市磨子桥小学, 四川 成都

Email: qxb_2003@163.com, 365421402@qq.com

收稿日期: 2019年8月26日; 录用日期: 2019年9月11日; 发布日期: 2019年9月18日

摘要

通过对藏药俄色叶片产生愈伤组织的培养、不定芽的诱导及组培苗再生的研究, 建立了培养周期短、再生效率高的民族药俄色再生体系。利用多因子正交实验设计及分析, 筛选出最佳愈伤组织诱导培养基是 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D。通过比较细胞分裂素6-BA、KT和TDZ对诱导愈伤组织分化不定芽的效果, 发现最适的不定芽再生培养基为MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.15 mg/L IBA。最后, MS培养基添加0.2 mg/L IBA能有效地使再生苗产生根系, 效率达70%以上。

关键词

藏药, 俄色, 愈伤组织, 再生, 植物生长激素

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

俄色作为一种民族药植物, 目前认为是蔷薇科(Rosaceae)苹果属(Malus)植物变叶海棠 *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes 或花叶海棠 *Malus tiansitoria* (Batal.) Schneid [1], 其叶是一味民间藏药, 被广泛应用, 但暂未被药典收载。俄色主要生长在西南地区, 特别是青藏高原东南缘海拔 3000~3500 米的特色优势树种, 它含有丰富的维生素 C、维生素 B2、维生素 E、 β -胡萝卜素及硒、铁、锌、钙等微量元素, 并含有一种特殊的药用成分类黄酮。其具有降血脂、降血压, 降血糖、保护心脏的作用; 具有预防和治疗骨质疏松症的作用、具有清除体内自由基、延缓衰老的作用; 对皮肤癌有治疗作用。藏医学专著《藏药晶镜本草》和《藏汗大辞典》载其具有保肝利胆、攻坚化积等功效, 用于治疗消化不良、高血脂、高血压等[2]。俄色果道孚叫“跟秋”, 田边, 坡上到处都是, 深秋季节, 红红的果实挂在树上特别诱人, 从树上摘下来后用开水泡一会儿才能吃, 不然很涩口, 或者打霜的时候放在露天, 被霜打软的像葡萄干, 所以称它是高原葡萄。

俄色的应用仍依靠野生资源, 不利于这一特殊民族药植物的保护, 因此开展俄色树的组织再生研究是非常必要的, 是快速获得树苗, 推动人工种植的关键和基础。目前国内外未见有针对民族药俄色开展的组织培养研究。在植物植株再生上, 可采用多种外植体, 包括茎段、胚轴, 叶柄、子叶、叶片、腋芽, 经由愈伤组织或是直接再生的方式获得再生植株。但民族药俄色因其药用效果, 组织中含有丰富的次生代谢物,

对组织培养有多种未知影响, 同科植物的相关组织培养方法均不能有效实现其组织再生。本研究利用组织培养设计, 探讨不同植物生长激素及其不同浓度组合对俄色叶片愈伤组织诱导、生长及不定芽发生的影响, 对其培养条件进行筛选, 为建立民族药俄色组织再生体系, 规模化培养俄色树苗, 推进人工栽培奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 植物材料

试验所需植物材料来源于四川省阿坝州, 经鉴定为蔷薇科苹果属植物变叶海棠 *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes, 移依属近源种。

2.2. 外植体的处理

叶片用清水冲洗干净, 再用 75% (V/V) 酒精浸泡 1 min, 用无菌水清洗 3 次, 然后放入 0.5% 的氯化汞 (HgCl_2) 溶液浸泡 3 min, 最后用无菌水冲洗干净。

2.3. 愈伤组织的诱导和继代培养

将无菌的叶片切成 1 cm^2 的小块, 块中可带有中脉或是叶缘, 接入愈伤组织诱导培养基。愈伤组织诱导培养基配方为如下: MS [3] + 1.0~3.0 mg/L 6-BA, 或是 MS + 1.0~3.0 mg/L 6-BA + 0.05~0.2 mg/L 2,4-D。愈伤组织诱导培养基附加有 3% 蔗糖、0.7% 琼脂粉, pH = 5.8, 室温 26°C 。叶块分为 2 组, 一组置于光周期 16 h/8 h 中培养, 另一组暗培养, 均培养 20 d, 对比光培养与暗培养对愈伤组织的影响。愈伤组织诱导设计为 20 个叶块一个处理, 3 次重复。20 d 后, 将诱导出的愈伤组织切成 1.0 cm^3 的小块, 分成 2 组, 一组接入再生培养基诱导不定芽, 另一组转接入新鲜的愈伤组织诱导培养基中进行继代培养, 每 20 d 重复一次, 比较多次继代培养对愈伤组织的影响。

2.4. 不定芽的再生

将诱导出的愈伤组织接种到含有生长素 IBA (0.15 mg/L) 的再生培养基上, 再生培养基中的细胞分裂素(CTK)为 0.05~0.5 mg/L TDZ 或 0.1~1.0 mg/L KT 或 0.1~1.0 mg/L 6-BA, 或是 2 种 CTK 的组合(表 3)。再生培养基附加有 3% 蔗糖、0.7% 琼脂粉, pH = 5.8, 室温 26°C , 光周期 16 h/8h。20 个愈伤一个处理, 3 次重复, 1 个月后统计不定芽数量。

2.5. 生根培养

不定芽达 2~3 cm 后, 转移至生根培养基, 生根培养基配方为 MS + 0.05~0.4 mg/L NAA 或 MS + 0.05~0.4 mg/L IBA, 筛选出最佳生根培养基后, 再在其中添加 0.1% (w) 活性炭(AC)比较活性炭对生根的影响。20 个不定芽一个处理, 2 次重复, 1 个月后统计生根情况。

2.6. 再根苗的移栽

揭开三角瓶封口膜, 将生根的再生苗继续置于温室中培养 1 周。为避免培养基蒸腾失水, 需不定时向培养基加水。然后小心取出生根苗, 洗去依附于苗上的培养基, 将其移植于培养钵中, 基质为珍珠岩: 沙: 营养土 = 1:1:1 (V/V/V), 置于温室内, 用水浇透。待生根苗存活后, 再移出温室。

2.7. 计算方法

愈伤组织诱导率 = (愈伤组织块数/接种外植体数) \times 100%

不定芽分化率 = (分化不定芽的愈伤组织块数/接种外植体数) \times 100%

生根率 = (生根的不定芽数/接种的不定芽数) × 100%

对计算结果用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

3. 结果与分析

3.1. 愈伤组织的诱导

3.1.1. 植物生长素对愈伤组织的诱导

将叶片接种到愈伤组织诱导培养基后, 7 d 内就会产生愈伤组织。表 1 显示, 6-BA 是诱导民族药俄色叶片产生愈伤组织的关键植物生长调节剂, 培养基中添加 6-BA, 可顺利诱导叶片出愈。随着 6-BA 浓度的升高, 叶片出愈率随之升高, 但愈伤组织的质地变得松散。浓度 2.0 mg/L 的 6-BA 能诱导 $85.35\% \pm 2.1\%$ 的叶片产生瘤状愈伤组织, 3.0 mg/L 的 6-BA 虽然也能诱导愈伤组织大量产生, 但愈伤组织质地疏松, 瘤状结构稀少, 再生能力差。添加 2,4-D 后发现, 浓度 0.1 mg/L 的 2,4-D 对民族药俄色叶片形成愈伤有促进作用。2.0 mg/L 6-BA 与 0.1 mg/L 2,4-D 的组合对诱导民族药俄色叶片产生瘤状愈伤组织的效果最佳, 诱导率高达 $93.25\% \pm 2.2\%$ 。

Table 1. Effect of plant growth regulators (PGRs) on callus induction from leaf of *Malus toringoides*

表 1. 植物生长调节剂对俄色叶片愈伤组织诱导的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹		出愈率/% Callus induction rate (r/%)	愈伤组织形态 Morphology of callus
6-BA	2,4-D		
1.0	0	64.12 ± 4.0^b	紧实, 瘤状结构少
2.0	0	85.35 ± 2.1^a	紧实, 瘤状结构多
3.0	0	95.55 ± 4.2^a	疏松, 瘤状结构少
1.0	0.05	66.18 ± 1.1^b	紧实, 瘤状结构少
2.0	0.1	92.81 ± 2.1^a	紧实, 瘤状结构多
3.0	0.2	96.45 ± 1.9^a	疏松, 瘤状结构少
1.0	0.2	69.12 ± 1.3^b	紧实, 瘤状结构少
2.0	0.1	93.25 ± 2.2^a	紧实, 瘤状结构多
3.0	0.05	95.05 ± 2.0^a	疏松, 瘤状结构少

表中不同字母表示邓肯氏最小显著差数测验差异显著($P \leq 0.05$)。下同。

3.1.2. 光周期对愈伤组织诱导的影响

外植体分别进行光培养与暗培养 20 d, 观察发现光培养与暗培养均能诱导愈伤组织形成。暗培养产生的愈伤组织出现早, 平均 5 d 就能观察到愈伤产生, 且体积大、质地松散、无法分化, 须在光下培养 2 周, 并转绿后才能恢复分化能力。光培养条件下, 至少 7 d 后才有愈伤组织生成, 但愈伤组织颜色墨绿, 质地紧密, 瘤状结构明显; 20 d 后即可转入分化培养基, 15 d 内就能产生不定芽。

3.1.3. 继代次数对愈伤组织的影响

多次继代培养会使愈伤组织的结构和颜色发生明显变化。表 2 显示, 随着继代次数的增加, 愈伤组织逐渐失绿褐化, 增殖能力下降, 质地变得松散, 瘤状结构消失, 不定芽再生率也随之下降。特别是第 4 次继代后, 愈伤组织严重褐化, 产生不定芽的能力下降明显。

Table 2. Effect of subculture times on callus and shoot regeneration of *Malus toringoides***表 2.** 继代次数对俄色愈伤组织形成和分化的影响

继代次数 Subculture times	愈伤组织形态 Morphology of callus	不定芽再生率/% Frequency of adventitious shoot formation (r/%)
1	绿白色, 瘤状结构丰富	68.45 ± 9.2 ^a
2	绿白色, 瘤状结构丰富	65.76 ± 5.5 ^a
3	绿白色, 较少瘤状结构	53.55 ± 2.1 ^{ab}
4	黄绿色, 较少瘤状结构	37.10 ± 1.3 ^b
5	黄绿色, 松散	17.22 ± 6.1 ^c
6	褐色, 松散	9.14 ± 3.8 ^c

3.2. 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响

诱导不定芽再生的实验发现, 3 种细胞分裂素(CTK)单一添加时, 随着 CTK 浓度增加, 不定芽再生率均呈现先增后降的趋势(表 3)。其中, 6-BA 效果最好, TDZ 其次, KT 最差。6-BA 的最佳浓度为 0.5 mg/L, 不定芽再生率高达 61.32% ± 3.6%, 每个愈伤组织平均产生 4.15 个芽。TDZ 的最佳浓度为 0.1 mg/L, 不定芽再生率为 62.43% ± 3.3%, 但诱导的芽玻璃化现象严重, 生长缓慢且基部产生较多愈伤组织; 继续培养 15 d 后, 愈伤组织生长过盛, 抑制了不定芽的伸长生长, 最后导致不定芽生长不良而死亡。3 种 CTK 最佳浓度的两两组合发现, KT 与 6-BA 组合的效果最好, 诱导不定芽再生率最高, 达 69.51% ± 2.5%, 不定芽数量多且健壮。同时, TDZ + 6-BA 和 KT + TDZ 的组合对不定芽诱导具有负作用, 诱导效果不如单一添加 6-BA 或 TDZ。因此, 不定芽再生的最佳培养基为: MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.15 mg/L IBA。将愈伤组织接种到最佳不定芽再生培养基上 7~15 d 可出现不定芽, 继续培养 7~15 d 不定芽可伸长至 2~3 cm。

Table 3. Effect of CTK on induction of adventitious shoots from calli of *Malus toringoides***表 3.** 细胞分裂素对俄色愈伤组织分化不定芽的影响

细胞分裂素/mg·L ⁻¹ Concentration of CTK			不定芽再生率/% Frequency of shoot formation (r/%)	每愈伤组织产生的平均芽数/个 Number of shoots
6-BA	KIN	TDZ		
0.1	0	0	15.15 ± 3.1 ^d	1.21 ^d
0.5	0	0	61.32 ± 3.6 ^a	4.15 ^a
1.0	0	0	50.10 ± 4.2 ^b	3.48a ^b
0	0.1	0	8.17 ± 2.8 ^d	0.85 ^d
0	0.5	0	35.30 ± 3.4 ^c	2.56 ^{bc}
0	1.0	0	32.57 ± 1.9 ^c	2.61 ^{bc}
0	0	0.05	38.77 ± 1.7 ^{bc}	1.22 ^d
0	0	0.1	62.43 ± 3.3 ^a	3.90 ^a
0	0	0.5	41.50 ± 2.4 ^{bc}	2.58 ^{bc}
0.5	0.5	0	69.51 ± 2.5 ^a	4.30 ^a
0.5	0	0.1	44.25 ± 6.8 ^{bc}	2.79 ^{bc}
0	0.5	0.1	32.48 ± 2.5 ^c	1.70 ^{cd}

3.3. 再生植株诱导生根分析

诱导植株生根的常用生长素有 NAA 和 IBA 等, 通过比较不同浓度的 NAA 和 IBA 对民族药俄色再生苗生根的影响(表 4), 发现 MS 培养基中添加 0.1 mg/L 或 0.2 mg/L 的 NAA 和添加 0.2 mg/L IBA 均能使 70% 以上的再生苗在 7 d 内产生根系, 20 d 内可移栽。其中, 0.2 mg/L IBA 能最早的诱导根系萌动, 平均 4 d 就有根系出现, 为最佳生根培养基。而浓度达 0.4 mg/L 的 IBA 和 NAA 仍能诱导根系产生, 但在根系与茎干的结合处会产生大量的愈伤, 且其旺盛生长反而抑制根系生长。移栽试验显示, 根系与茎干结合处有大量愈伤组织的生根苗存活率极低。添加 0.1% 的活性炭(AC)于生根培养基, 虽不能影响生根率和平均根数, 但能有效促进根系生长粗壮。

Table 4. Effect of IBA or NAA on rooting of the regenerated shoots of *Malus toringoides*

表 4. IBA 和 NAA 对俄色再生苗生根的影响

激素浓度/mg·L ⁻¹ Concentration of PGRs (mg·L ⁻¹)		生根率/% Rooting percentage (r/%)
IBA	NAA	
0.05	0	28.15 ± 2.0 ^d
0.1	0	53.28 ± 2.3 ^b
0.2	0	74.05 ± 2.4 ^a
0.4	0	44.16 ± 2.1 ^e
0	0.05	48.21 ± 2.1 ^{bc}
0	0.1	71.85 ± 1.9 ^a
0	0.2	73.52 ± 2.0 ^a
0	0.4	45.92 ± 2.2 ^{bc}

4. 讨论

本研究建立了民族药俄色叶片高效再生体系, 70 天内可完成从叶片培养到再生苗移栽整个过程。叶片再生率高达 69.51% ± 2.5%, 每个愈伤组织平均产生约 4 个芽。民族药俄色叶片产生瘤状愈伤组织的最佳培养基是 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D。不定芽再生的最佳培养基是 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 0.15 mg/L IBA。最佳生根培养基为 MS + 0.2 mg/L IBA。木本植物的叶片再生通常要经由愈伤组织途径, 前期的研究表明, 木本植物不定芽通常发生在愈伤组织的绿色瘤状结构处[4] [5], 瘤状愈伤组织具有分化出丛生芽的能力, 因此愈伤组织的质量决定丛生芽产生频率[6]。而植物生长调节剂的种类、浓度和配比是调控植物器官产生高质量愈伤组织的主导因素, 其中 6-BA 被认为是诱导外植体产生愈伤组织的最有效的外源激素[6], 2,4-D 也常用于诱导多种植物的外植体产生愈伤[7] [8] [9]。实验证明民族药俄色叶片愈伤组织的诱导必须依赖于植物生长调节剂的添加, 6-BA 是诱导叶片产生瘤状愈伤组织的关键外源激素, 2.0 mg/L 6-BA 产生的愈伤组织质量最好, 低浓度的 2,4-D 能辅助 6-BA 发挥更好的作用, 并且不会影响愈伤组织的质量与结构。

研究发现, 民族药俄色叶片产生的愈伤组织经历多次继代培养后, 会逐渐丧失分化能力。也有报导过类似情况, 西洋白花菜的愈伤组织经过 5 次继代培养后失去了增殖的能力[10]。光周期也是影响愈伤组织诱导和生长发育的重要因素, 例如枣树的叶片需暗培养才能产生具有分化能力的愈伤组织[11], 而有些植物愈伤组织的诱导和生长必须在光下, 而有些则在光、暗条件下均可进行[12]。本研究证明民族药俄色叶片在光下和黑暗中均能产生愈伤组织, 光下产生的愈伤组织质地紧密, 瘤状结构丰富, 再分化时间短,

更有利高效再生体系的建立。细胞分裂素 CTK 能刺激细胞分裂, 促进不定芽形成[13], 本研究发现 6-BA 能较好的诱导民族药俄色的不定芽健壮, 且生长速度较快。

基金项目

四川省科技计划项目(2018NZ0091、2019YFS0107)、四川省级公益性科研院所基本科研业务费项目、农业农村部杂粮加工重点实验室开放基金资助(No.2018CC12)、四川省中医药管理局科研项目(2018KF007)共同资助。

参考文献

- [1] 王道清, 李敏, 石万银. 藏药“俄色”的资源调查及生药学研究[J]. 中药与临床, 2011, 2(3): 14.
- [2] 陈勇. 四川省藏药材标准[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2014.
- [3] Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [4] Sharma, V.K. and Kothari, S.L. (1993) High Frequency Plant Regeneration in Tissue Cultures of *Glycine clandestine*—A Wild Relative of Soybean. *Phytomorphology*, **43**, 29-33.
- [5] Meyers, J.R., Kysely, W., Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F. and Collins, G.B. (1989) Plant Regeneration of Wild *Glycine* Species from Suspension Culture-Derived Protoplasts. *Plant Cell Reports*, **8**, 112-115. <https://doi.org/10.1007/BF00716852>
- [6] 暨淑仪, 严学成, 王毅军. 茶叶片愈伤组织形成的细胞组织学观察[J]. 茶叶, 1995, 21(2): 11-13.
- [7] Morini, S., Onofrio, C.D., Bellocchi, G. and Fischella, M. (2000) Effect of 2, 4-D and Light Quality on Callus Production and Differentiation from *in Vitro* Cultured Quince Leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **63**, 47-55. <https://doi.org/10.1023/A:1006456919590>
- [8] Ma, G.H. and Xu, Q.S. (2002) Induction of Somatic Embryogenesis and Adventitious Shoots from Immature Leaves of Cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **70**, 281-288.
- [9] Shen, X.L., Michael, E., Kane and Chen, J.J. (2008) Effects of Genotype, Explant Source, and Plant Growth Regulators on Indirect Shoot Organogenesis in *Dieffenbachia* Cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, **44**, 282-288. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9112-7>
- [10] Rodriguez, R., Rey, M., Cuozzo, L. and Ancora, G. (1990) *In Vitro* Propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, **26**, 531-536. <https://doi.org/10.1007/BF02624097>
- [11] Gu, X.F. and Zhang, J.R. (2005) An Efficient Adventitious Shoot Regeneration System for Zhanhua Winter Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) Using Leaf Explants. *Plant Cell Reports*, **23**, 775-779. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0920-5>
- [12] Zheng, X.B. (2003) Studies on Callus Induction and Plantlet Regeneration of Triploid *Citrullus lanatus* Seedlings. Master Degree Dissertation, Henan Agricultural University, Zhengzhou.
- [13] Mithila, J., Hall, J.C., Victor, J.M.R. and Saxena, P.K. (2003) Thidiazuron Induces Shoot Organogenesis at Low Concentrations and Somatic Embryogenesis at High Concentrations on Leaf and Petiole Explants of African Violet (*Saint-paulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Reports*, **21**, 408-414. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0544-y>