

引用格式:

陈蓉, 罗景鸣, 胡辉亮, 申莹莹, 彭国平, 饶力群, 刘实, 汪启明. 山银花‘金翠蕾’愈伤组织诱导及植物生长调节剂2,4-D对愈伤组织中绿原酸质量分数的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(2): 44–50.
CHEN R, LUO J M, HU H L, SHEN Y Y, PENG G P, RAO L Q, LIU S, WANG Q M. Effect of callus induction and plant growth regulator 2,4-D on callus chlorogenic acid mass fraction of *Lonicera hypoglauca* ‘Jincuilei’[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(2): 44–50.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



山银花‘金翠蕾’愈伤组织诱导及植物生长调节剂 2,4-D 对愈伤组织中绿原酸质量分数的影响

陈蓉^{1,2}, 罗景鸣¹, 胡辉亮³, 申莹莹^{1,2}, 彭国平^{1,2}, 饶力群^{1,2}, 刘实⁴, 汪启明^{1,2*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.道地药用植物规范化栽培与综合利用湖南省工程实验室, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省邵阳市隆回县农业农村局, 湖南 邵阳 422200; 4.武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 为构建山银花‘金翠蕾’愈伤组织诱导体系并分析植物生长调节剂2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)对愈伤组织中绿原酸质量分数的影响, 以‘金翠蕾’幼叶为外植体诱导愈伤组织, 比较不同质量浓度生长调节剂组合对愈伤组织生长量的影响, 并分析不同质量浓度2,4-D对愈伤组织中绿原酸质量分数和绿原酸合成关键基因表达的影响。结果表明: 在0.6 mg/L激动素+ 1.0 mg/L 2,4-D+0.6 mg/L 6-苄基腺嘌呤组合下30 d‘金翠蕾’愈伤组织生长量最高, 为5.505 g。2,4-D对愈伤组织绿原酸质量分数的影响表现为低浓度促进、高浓度抑制, 当2,4-D质量浓度为1 mg/L时绿原酸质量分数最高, 为26.224 mg/g; 2,4-D处理能促进绿原酸合成关键基因HQT与CCoAOMT的表达, 说明施加适量植物生长调节剂2,4-D能提升山银花愈伤组织的绿原酸质量分数。

关键词: 山银花‘金翠蕾’; 愈伤组织; 2,4-二氯苯氧乙酸; 绿原酸

中图分类号: S567

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)02-0044-07

Effect of callus induction and plant growth regulator 2,4-D on callus chlorogenic acid mass fraction of *Lonicera hypoglauca* ‘Jincuilei’

CHEN Rong^{1,2}, LUO Jingming¹, HU Huiliang³, SHEN Yingying^{1,2},
PENG Guoping^{1,2}, RAO Liquan^{1,2}, LIU Shi⁴, WANG Qiming^{1,2*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Hunan Engineering Laboratory for Good Agricultural Practice and Comprehensive Utilization of Famous-Region Medicinal Plants, Changsha, Hunan 410128, China; 3.Agriculture and Rural Bureau of Longhui County, Shaoyang, Hunan 422200, China; 4.School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: In order to construct the callus induction system of *Lonicera hypoglauca* ‘Jincuilei’ and analyze the effect of plant growth regulator 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) on the mass fraction of chlorogenic acid in callus, the young leaves of *Lonicera hypoglauca* ‘Jincuilei’ were used as explants to induce callus. The effects of different mass concentrations of growth regulator combinations on callus growth were compared, and the effects of different mass concentrations of 2,4-D on the mass fraction of chlorogenic acid in callus and the expression of key genes involved in chlorogenic acid synthesis were analyzed. The results showed that with the combination of 0.6 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 0.6 mg/L 6-benzyladenine, the callus growth of ‘Jincuilei’ was the highest at 30 d, which was 5.505 g. The effect of 2,4-D on the mass fraction of chlorogenic acid in callus was promoted at low

收稿日期: 2024-04-27

修回日期: 2024-06-11

基金项目: 湖南省隆回县科技专家服务团项目(S2023NCKJFP0072); 湖南省高层次聚集工程创新创业人才项目(2021RC5006); 湖南省重点研发计划项目(2020NK2023)

作者简介: 陈蓉(1998—), 女, 湖南益阳人, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究, 2218437574@qq.com; *通信作者, 汪启明, 博士, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究, wqmymx21@126.com

concentration and inhibited at high concentration. When the mass concentration of 2,4-D was 1 mg/L, the mass fraction of chlorogenic acid was the highest, which was 26.224 mg/g. 2,4-D treatment could promote the expression of key genes *HQT* and *CCoAOMT* in chlorogenic acid synthesis. It shows that the application of appropriate amount of plant growth regulator 2,4-D can increase the chlorogenic acid mass fraction of *Lonicera hypoglauca* callus.

Keywords: *Lonicera hypoglauca* ‘Jincuilei’; callus; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D); chlorogenic acid

山银花(*Lonicera hypoglauca*)是以灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬或黄褐毛忍冬为植物基源的大宗药用植物。‘金翠蕾’为灰毡毛忍冬的代表性品种,相较于其他品种不仅产量与绿原酸含量更高,且适应性更强,耐旱涝、寒热、土壤瘠薄^[1],在湖南、贵州等山银花产区广泛种植。山银花中含大量有机酸类、黄酮类、三萜及三萜皂苷类、挥发油类等次生代谢物质^[2]。山银花具有较好的抗菌、消炎^[3]、抗病毒、抗氧化等能力^[4],其中绿原酸是山银花的标志物和重要的功效成分,其含量是评价山银花品质的重要指标。利用植物生产代谢物时,会受到环境或气候的限制,但利用植物细胞的全能性,采用体外培养技术可以连续产生次生代谢物^[5]。诱导植物愈伤组织既可以为次生代谢物和体外细胞培养提供材料,也可以将其作为研究材料解析植物体内物质代谢机制。不同植物生长调节剂的质量浓度和比例以及培养基的pH都是影响愈伤组织诱导的关键因素。植物生长调节剂,尤其是生长素和细胞分裂素,在植物细胞和组织培养中对细胞生长和次生代谢产物的生物合成都起着关键作用^[6]。

目前针对山银花愈伤组织的研究主要集中在诱导新生芽及不定根进而快速繁殖方面,而有关山银花愈伤组织中绿原酸积累的研究较少。本研究以高绿原酸含量品种‘金翠蕾’为试验材料,通过改变培养条件优化愈伤组织诱导过程并研究植物生长调节剂对愈伤组织中绿原酸质量分数的影响,获得高生长量、高绿原酸含量的疏松愈伤组织,并优化绿原酸提取方式,以期解析植物生长调节剂2,4-D与植物体内绿原酸富集的调控机制、进一步构建悬浮细胞体系及高效生产绿原酸提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

从湖南省隆回县收集并鉴定山银花‘金翠蕾’材

料,之后在湖南农业大学道地药用植物规范化栽培与综合利用湖南省工程实验室进行培养。

1.2 山银花‘金翠蕾’幼叶的灭菌及愈伤组织接种

摘取‘金翠蕾’幼叶,用0.1%氯化汞浸泡消毒4 min,在超净工作台内用无菌水冲洗5~6遍,将叶片放置于无菌纸上并切成0.5 cm×0.5 cm大小,用刀片均匀划痕后,取5片外植体接种于不同处理的培养基中,每组处理接种5瓶,培养条件为完全黑暗培养,温度为(25±1) °C。

1.3 不同植物生长调节剂诱导愈伤组织的单因素试验

分别配置含不同质量浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L)的2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、激动素(KT)的MS培养基,每瓶培养基接种5片外植体,暗培养30 d后分别测定愈伤组织的诱导率及生长量。

1.4 不同植物生长调节剂诱导愈伤组织的正交试验

根据单因素试验结果设计3因素4水平的正交试验。因素A、B、C分别表示激动素、2,4-二氯苯氧乙酸和6-苄基腺嘌呤的质量浓度。因素A的4个水平依次为0.6、0.8、1.0、1.2 mg/L;因素B的4个水平依次为0.8、1.0、1.2、1.4 mg/L;因素C的4个水平依次为0.6、0.8、1.0、1.2 mg/L。根据正交试验设计方案配置MS培养基。

1.5 不同pH下的诱导愈伤组织试验

配置不同pH(5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0)的MS培养基,每瓶培养基接种5片外植体,每组处理接种5瓶,暗培养30 d后分别测定愈伤组织诱导率及生长量。

1.6 ‘金翠蕾’愈伤组织生长曲线绘制

将‘金翠蕾’叶片在优化后的植物生长调节剂浓

度配比及最优pH下进行愈伤组织接种,每5 d测定其生长量,以愈伤组织质量为纵轴,诱导时间为横轴绘制生长曲线。

1.7 ‘金翠蕾’愈伤组织绿原酸提取方法的单因素试验及高效液相色谱条件

将生长30 d的‘金翠蕾’愈伤组织放入液氮速冻后手动研磨成粉末,放入-80 °C冰箱预冷60 min,然后放入-50 °C冷冻干燥机中冷冻干燥2 d,最后过孔径为250 μm的筛。分别用不同甲醇体积分数(10%、30%、50%、70%、80%、90%、100%),不同料液比(1:30、1:50、1:100、1:150、1:200),不同超声时间(10、30、60、90、120 min)对0.05 g愈伤组织粉末进行超声处理(40 kHz, 250 W),处理完成后室温静置120 min,然后使用孔径为0.45 μm的有机相滤膜过滤并放入棕色进样瓶中保存。使用配备有Pt-C18色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm)的Agilent 1100系列高效液相色谱仪。流动相为乙腈(A)和0.5%乙酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 12%~20% A; 10~20 min, 20% A; 20~25 min, 20%~12% A),流速1 mL/min,检测波长λ=330 nm; 温度30 °C,进样量10 μL。

1.8 ‘金翠蕾’愈伤组织绿原酸提取方式的正交试验

根据单因素试验结果设计正交试验,采用不同组合方式提取愈伤组织绿原酸(表1),利用1.7项所用HPLC高效液相色谱法对生长30 d的‘金翠蕾’愈伤组织进行绿原酸质量分数测定。

表1 愈伤组织绿原酸提取的组合方式

组合方式编号	甲醇体积分数/%	料液比	超声时间/min
1	75	1:80	45
2	75	1:100	75
3	75	1:120	60
4	80	1:80	75
5	80	1:100	60
6	80	1:120	45
7	85	1:80	60
8	85	1:100	45
9	85	1:120	75

1.9 绿原酸标准曲线建立

在1.7项的色谱条件下,用1.8项中优化后的处理方法,以0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.200 0、0.400 0 mg/mL为进样质量浓度,以进样质量浓度x和峰面积y进行回归分析,求得标品曲线回归方程

为 $y = 1\ 658.9x + 1.659$, $R^2 = 0.999\ 9$ 。

1.10 2,4-D对愈伤组织绿原酸质量分数的影响

分别配置含不同质量浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L)2,4-D的MS培养基,每瓶培养基接种5片外植体,每个质量浓度接种5瓶,暗培养30 d后提取愈伤组织,根据绿原酸标准曲线计算绿原酸质量分数。

1.11 不同2,4-D处理下愈伤组织中绿原酸合成关键基因的相对表达量

利用Trizol法分别提取0 mg/L与1 mg/L 2,4-D处理下生长30 d的‘金翠蕾’愈伤组织总RNA,使用紫外分光光度计以及1%琼脂糖凝胶电泳检测后,按iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit反转录说明书合成cDNA。使用Talent荧光定量检测试剂盒在Roche LightCycler 480平台进行实时荧光定量PCR,引物序列见表2。

表2 实时荧光定量PCR引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>18S rRNA-F</i>	CTTCGGGATCGGAGTAATGA
<i>18S rRNA-R</i>	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA
<i>qPAL-F</i>	ACTACATTGACGACCCATGC
<i>qPAL-R</i>	TGGAAGTGCTTGCATTCTTC
<i>qC4H-F</i>	AATTGGGAAGCACAAAGAGC
<i>qC4H-R</i>	AAGAACGTTGTCTCGTTGA
<i>qHQT-F</i>	GTCATTGGCGGTGTGTTTAG
<i>qHQT-R</i>	GAAGCCGAAGTACGAAATC
<i>q4CL-F</i>	ATTGCCGAAAGGGGTGATGT
<i>q4CL-R</i>	TCGAACACCACAGAGCGAAA
<i>qC3H-F</i>	GACTGCACCAATCCCATAA
<i>qC3H-R</i>	CATGAACCGCTTCCCAAATG
<i>qCCoAOMT-F</i>	GCCCTGCTCTCTCTGTTCTC
<i>qCCoAOMT-R</i>	GTTGTCCTTGTCAGCGTCCA

2 结果与分析

2.1 山银花‘金翠蕾’愈伤组织诱导条件优化

2.1.1 不同植物生长调节剂诱导愈伤组织的单因素试验结果

由表3可知:3种植物生长调节剂都对愈伤组织诱导有影响,且都表现为低浓度促进、高浓度抑制;3种植物生长调节剂均在质量浓度为1.0 mg/L时诱导出的愈伤组织生长量最高,且2,4-D对愈伤组织诱导影响最大,当培养基中不含2,4-D时愈伤组织诱导率不能达到100%;随着2,4-D质量浓度的增加,愈伤组织的颜色由绿白转为黄白且疏松度增加。

表 3 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的结果

Table 3 Results of callus induction by different plant growth regulators

植物生长调节剂	质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	愈伤组织 诱导率/%	生长量/g	愈伤组织 状态
2,4-D	0.0	88.8	(0.110 0±0.014 1)c	G, T
	0.5	100.0	(0.371 3±0.058 3)b	G, T
	1.0	100.0	(1.045 0±0.134 4)a	Y, L
	1.5	100.0	(0.970 0±0.127 3)a	Y, L
	2.0	100.0	(0.925 8±0.119 1)a	Y, T
6-BA	0.0	100.0	(0.641 5±0.082 7)b	G, T
	0.5	100.0	(0.715 0±0.077 7)ab	G, T
	1.0	100.0	(0.948 8±0.122 0)a	G, L
	1.5	100.0	(0.944 0±0.121 6)a	Y, L
	2.0	100.0	(0.504 3±0.064 7)b	G, T
KT	0.0	100.0	(0.825 0±0.106 1)bc	G, T
	0.5	100.0	(0.987 5±0.166 2)ab	G, T
	1.0	100.0	(1.265 0±0.162 6)a	Y, L
	1.5	100.0	(0.586 5±0.075 6)c	Y, L
	2.0	100.0	(0.580 0±0.113 1)c	Y, L

注：同列不同字母表示组内数据差异有统计学意义(P<0.05)；G表示愈伤组织颜色为绿白色；Y表示愈伤组织颜色为黄白色；T表示愈伤组织形成致密；L表示愈伤组织形成疏松。

2.1.2 不同植物生长调节剂诱导愈伤组织的正交试验结果

由表4可见：各因素最优组合为A₁B₂C₁，即KT质量浓度为0.6 mg/L，2,4-D质量浓度为1.0 mg/L，6-BA质量浓度为0.6 mg/L，各因素对愈伤组织诱导的影响按从大到小排列依次为2,4-D、6-BA、KT。

表 4 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的正交试验结果

Table 4 Orthogonal experimental results of callus induction by different plant growth regulators

处理	A/(mg·L ⁻¹)	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	生长量/g
1	0.6	0.8	0.6	4.956 7±0.812 2
2	0.6	1.0	0.8	5.106 7±1.118 4
3	0.6	1.2	1.0	3.000 0±0.641 5
4	0.6	1.4	1.2	3.550 0±0.531 1
5	0.8	0.8	0.8	3.510 0±1.377 2
6	0.8	1.0	0.6	4.573 3±1.040 0
7	0.8	1.2	1.2	3.046 7±0.685 0
8	0.8	1.4	1.0	3.176 7±0.565 0
9	1.0	0.8	1.0	4.030 0±0.520 0
10	1.0	1.0	1.2	3.890 0±0.060 0
11	1.0	1.2	0.6	2.963 3±1.083 1
12	1.0	1.4	0.8	3.683 3±0.793 4
13	1.2	0.8	1.2	3.133 3±0.140 4
14	1.2	1.0	1.0	4.246 7±0.497 4
15	1.2	1.2	0.8	2.950 0±0.500 0
16	1.2	1.4	0.6	3.766 7±0.345 0
K ₁	4.153	3.908	4.065	
K ₂	3.577	4.454	3.813	
K ₃	3.642	2.990	3.613	
K ₄	3.524	3.544	3.405	
R	0.629	1.464	0.660	

注：K_i(i=1, 2, 3, 4)表示因素在i水平下的生长量的平均值，R为极差。

由表5可知：2,4-D的P<0.05，表明2,4-D对灰毡毛忍冬愈伤组织生长量有显著影响。优化后30 d愈伤组织生长量为5.505 g，比其他处理下的高。

表 5 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的方差分析结果

Table 5 Variance analysis result of callus induction by different plant growth regulators

源	平方和	自由度	均方	F	P
KT	1.011	3	0.337	2.197	0.189
2,4-D	4.552	3	1.517	9.889	0.010
6-BA	0.952	3	0.317	2.069	0.206
误差	0.921	6	0.153		

2.1.3 不同pH对‘金翠蕾’愈伤组织诱导的影响

由表6可知：当培养基pH为5.4时，愈伤组织生长量最高，且能诱导出颜色为黄白色的疏松愈伤组织。

表 6 pH对愈伤组织诱导的影响

Table 6 Effect of pH on callus induction

pH	愈伤组织诱导率/%	生长量/g	愈伤组织状态
5.0	100.0	(2.421 7±0.528 6)b	G, T
5.2	100.0	(2.898 8±0.461 3)b	Y, T
5.4	97.2	(4.794 7±1.024 7)a	Y, L
5.6	100.0	(3.637 0±0.981 9)ab	G, L
5.8	97.2	(2.940 0±0.310 0)b	G, T
6.0	100.0	(2.890 5±0.695 5)b	G, T

注：同列不同字母表示组内数据差异有统计学意义(P<0.05)；G表示愈伤组织颜色为绿白色；Y表示愈伤组织颜色为黄白色；T表示愈伤组织致密；L表示愈伤组织疏松。

2.1.4 ‘金翠蕾’愈伤组织生长曲线

‘金翠蕾’愈伤组织生长曲线见图1。由图1可知‘金翠蕾’愈伤组织20 d前生长较为缓慢，在20~35 d期间处于快速增殖期，在35 d后因为培养基营养物质有限且愈伤组织的褐化，增殖开始变缓。生长30 d

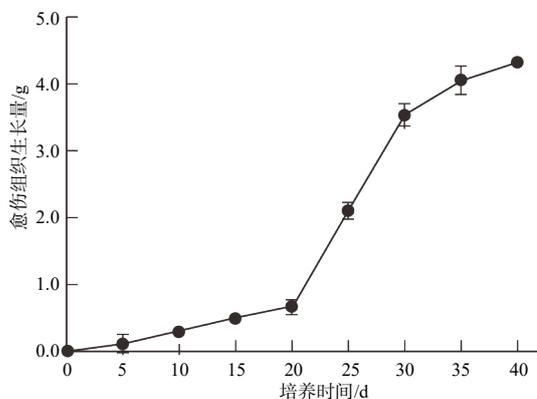


图1 ‘金翠蕾’愈伤组织生长曲线

Fig.1 Callus growth curve of ‘Jincuilui’

后的愈伤组织见图2。由图2可见优化培养条件后,诱导的愈伤组织为黄白色、疏松的愈伤组织。

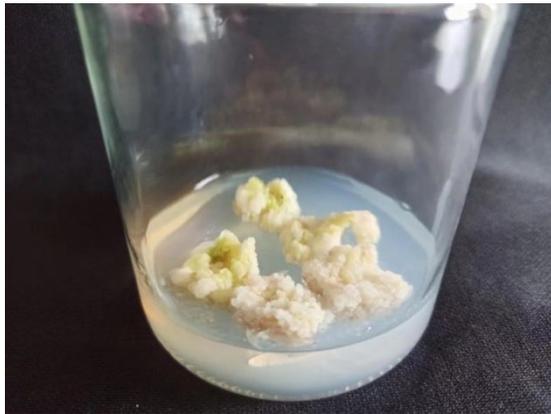
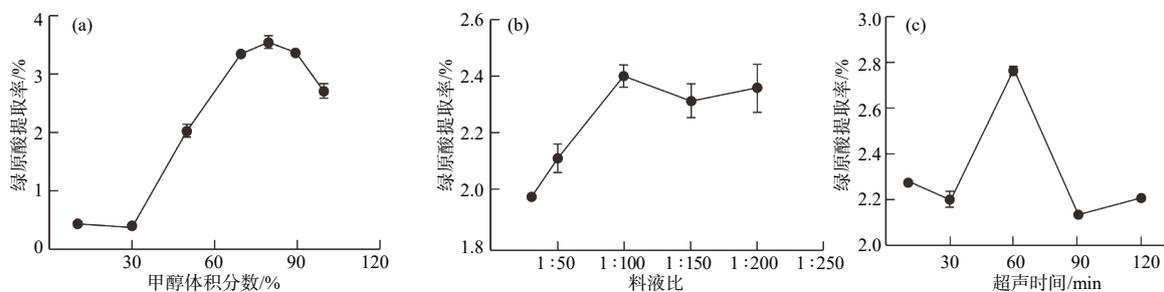


图2 ‘金翠蕾’生长30 d后的愈伤组织

Fig.2 The callus of ‘Jinculei’ after 30 days of growth



(a) 愈伤组织绿原酸提取率随甲醇体积分数的变化; (b) 愈伤组织绿原酸提取率随料液比的变化; (c) 愈伤组织绿原酸提取率随超声时间的变化

图3 不同提取因素对愈伤组织绿原酸提取率的影响

Fig.3 Effects of different extraction factors on extraction rate of chlorogenic acid from callus

表7 不同组合方式下愈伤组织绿原酸提取率

Table 7 Extraction rate of chlorogenic acid from callus after treatment with different combinations

组合方式 编号	甲醇 体积分数/%	料液比	超声 时间/min	绿原酸 提取率/%
1	75	1:80	45	3.971 4±0.015 4
2	75	1:100	75	3.864 6±0.071 3
3	75	1:120	60	4.807 8±0.112 1
4	80	1:80	75	4.050 1±0.114 8
5	80	1:100	60	4.613 5±0.021 2
6	80	1:120	45	4.397 1±0.053 8
7	85	1:80	60	4.564 7±0.031 4
8	85	1:100	45	4.042 7±0.064 9
9	85	1:120	75	4.140 7±0.045 1
K_1	4.214 6	4.194 2	4.137 0	
K_2	4.353 6	4.173 6	4.662 0	
K_3	4.249 3	4.448 5	4.018 4	
R	0.139 0	0.274 9	0.643 51	

注: $K_i(i=1, 2, 3, 4)$ 表示因素在*i*水平下的绿原酸提取率的平均值, R 为极差。

2.2 不同植物生长调节剂对山银花‘金翠蕾’绿原酸质量分数的影响

2.2.1 山银花‘金翠蕾’绿原酸提取的最优方法

由图3可知山银花‘金翠蕾’绿原酸提取的最优单因素依次为: 甲醇体积分数为80%, 料液比1:100, 超声时间60 min。由表7可知绿原酸提取的最佳组合为: 甲醇体积分数为80%, 料液比1:120, 超声时间60 min。各因素对绿原酸提取率的影响按从大到小排序依次为: 超声时间、料液比、甲醇体积分数, 方差分析结果表明料液比的 $P<0.05$, 超声时间的 $P<0.01$, 两者均对绿原酸提取率有显著影响(表7和表8)。最优组合下的绿原酸提取率为4.877 3%, 比其他组合方式的高。

表8 不同提取因素处理后愈伤组织绿原酸提取率的方差分析结果

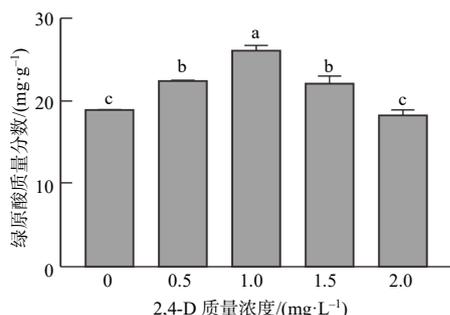
Table 8 Variance analysis result of the extraction rate of callus chlorogenic acid after treatment with different extraction factors

源	平方和	自由度	均方	F	P
超声时间	0.704	2	0.352	136.591	0.007 **
甲醇体积分数	0.031	2	0.016	6.093	0.141
料液比	0.140	2	0.070	27.200	0.035 *
误差	0.005	2	0.003		

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$)。

2.2.2 不同植物生长调节剂对愈伤组织绿原酸质量分数的影响

由图4可见: 2,4-D对‘金翠蕾’愈伤组织中绿原酸质量分数有明显影响, 随着2,4-D质量浓度增加, 绿原酸质量分数先增高后降低, 当2,4-D质量浓度为1.0 mg/L时绿原酸质量分数最高, 为26.224 mg/g(图4)。



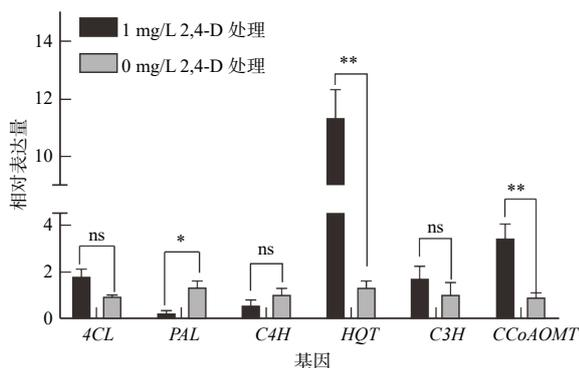
不同小写字母表示数据间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图4 植物生长调节剂 2,4-D 处理下‘金翠蕾’绿原酸质量分数的变化

Fig.4 Changes of chlorogenic acid mass fractions of ‘Jincui’ treated with plant growth regulator 2,4-D

2.2.3 2,4-D 处理对金翠蕾愈伤组织中绿原酸合成关键基因相对表达量的影响

由图5可知：与未经2,4-D处理的愈伤组织相比，经过 1 mg/L 2,4-D 处理后，愈伤组织中 *HQT* 与 *CCoAOMT* 相对表达量极显著升高，*PAL* 相对表达量显著降低，其余基因相对表达量无显著差异(图5)。



ns表示无显著差异；*表示差异显著($P < 0.05$)；**表示差异极显著($P < 0.01$)。

图5 不同2,4-D处理下愈伤组织中4CL、PAL、C4H、HQT、C3H、CCoAOMT的相对表达量

Fig.5 Relative expression of 4CL, PAL, C4H, HQT, C3H, CCoAOMT in callus with different 2,4-D treatments

3 讨论

植物愈伤组织诱导是获取次生代谢产物的有效途径，植物生长调节剂与pH对愈伤组织的诱导影响较大，且影响细胞内次生代谢产物的合成。通过优化植物生长调节剂质量浓度组合及改变培养基pH可获取更高生长量的愈伤组织，添加不同植物生长调节剂则可以提高愈伤组织次生代谢产物的含量。

本研究通过预试验选取2,4-D、6-BA、KT这3

种植物生长调节剂与不同pH处理培养基诱导‘金翠蕾’愈伤组织生长，发现不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导存在差异，适量添加植物生长调节剂都能促进愈伤组织生长量的增加，浓度过高则抑制其生长。2,4-D与6-BA质量浓度过高时愈伤组织会愈加致密，不利于后续悬浮细胞培养，这与前人研究结果相符^[7]。随着2,4-D质量浓度的增加，愈伤组织疏松度开始提升，且愈伤组织颜色转为黄白，但当质量浓度为2 mg/L时愈伤组织又变得致密，表明适量的2,4-D能诱导出疏松的愈伤组织，且添加2,4-D可以加速愈伤组织生成；未添加2,4-D的培养基中愈伤组织生长缓慢甚至停滞。这表明2,4-D在‘金翠蕾’愈伤组织诱导中有显著作用。愈伤组织诱导时，细胞分裂素与生长素质量比例接近于1:1，有利于愈伤组织诱导，而在0.6 mg/L KT+1.0 mg/L 2,4-D+0.6 mg/L 6-BA组合下愈伤组织生长量最高，这也与其他忍冬属植物研究结果相符^[8]。已有研究表明，酸性条件更利于植物愈伤组织的生长，如玉竹培养基最佳pH为5.6^[9]，辣椒愈伤组织诱导时较低pH(5.5)不仅有利于愈伤组织生长，还可以降低愈伤组织褐化率^[10]。本研究结果表明‘金翠蕾’愈伤组织诱导培养基最佳pH为5.4，pH过高或低时会使愈伤组织颜色加深且愈加致密，颜色加深会使后期愈伤组织褐化，如白檀种子愈伤组织在pH过高或过低时褐化率就会增加^[11]。

绿原酸是忍冬属植物重要的次生代谢产物之一。对忍冬属中绿原酸的研究主要集中在绿原酸提取优化方面，可通过植株直接提取^[12]；忍冬属愈伤组织中也含有绿原酸且愈伤组织相较植物体本身生长周期更短。如金银花愈伤组织中每100 g愈伤组织含有57 g绿原酸^[8]。已有研究表明，利用超声波加70%乙醇的方法提取金银花中的绿原酸能获得最高收率^[13]。本研究则通过改变提取时间、料液比与甲醇体积分数来建立‘金翠蕾’愈伤组织绿原酸提取方法，发现甲醇体积分数80%、料液比1:120、超声时间60 min为最优组合，该条件下绿原酸提取率为4.877 3%。除环境因素外，植物生长调节剂的添加是增加愈伤组织中次生代谢产物含量的有效方法。

不同植物生长调节物质浓度与种类对植物愈伤组织中次生代谢产物的影响也不同，吲哚丁酸(IBA)影响鬼臼不定根中鬼臼毒素的积累^[14]，IBA质

量浓度为3 mg/L时鬼臼毒素积累量最高;在添加了6.0 mg/L萘乙酸(NAA)和0.6 mg/L 6-BA的巨峰葡萄果皮愈伤组织中的白藜芦醇质量分数最高,为11.184 $\mu\text{g/g}$ ^[15]。2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT则适用于半夏愈伤组织中生物碱的积累^[16]。2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)是一种常用的植物生长调节剂,已有较多研究表明通过2,4-D的处理可以增加愈伤组织内次生代谢物含量,如在含有27.1 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D的MS培养基中川芎愈伤组织中总酚最高,总黄酮含量在补充4.5 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D培养基中最高^[17]。在含有1.5 mg/L 2,4-D培养基中诱导胡椒愈伤组织也能提高黄酮的含量^[18]。本研究通过在培养基中添加不同质量浓度2,4-D诱导愈伤组织并测定绿原酸质量分数,发现添加2,4-D后愈伤组织绿原酸质量分数呈先增高后降低的趋势,在2,4-D质量浓度为1 mg/L时愈伤组织绿原酸质量分数最高,为26.224 mg/g;采用质量浓度为1 mg/L的2,4-D处理的愈伤组织内绿原酸平均质量分数明显比未添加2,4-D愈伤组织的高。此结果与采用2,4-D对灰毡毛忍冬‘渝蕾一号’愈伤组织处理后的结果相符^[19],表明2,4-D可以影响山银花愈伤组织中绿原酸的合成。

有研究表明植物生长调节剂可以通过调节次生代谢产物合成关键基因从而调控次生代谢物,如细胞分裂素可以上调红肉苹果中*MdCHS*、*MdCHI*、*MdMYB10*、*MdbHLH13*等基因的表达,抑制*MdMYBL2*的表达,从而促进红肉苹果中花色苷积累^[20],推测2,4-D也可通过调节绿原酸合成关键基因的表达来调控愈伤组织绿原酸含量。因此,本研究比较了0 mg/L与1 mg/L 2,4-D处理下生长30 d后‘金翠蕾’愈伤组织的绿原酸合成关键基因的相对表达量,发现经过1 mg/L 2,4-D处理后愈伤组织中*HQT*与*CCoAOMT*相对表达量显著增加,分别为未经2,4-D处理的愈伤组织的11.32倍与3.43倍,而*PAL*基因的相对表达量却显著下降。目前植物中已有3条绿原酸合成途径被证实,不同植物的主要合成途径存在差异;羟基肉桂酰辅酶A奎尼酸羟基肉桂酰转移酶(*HQT*)催化途径被认为是最主要的合成途径^[21],也是忍冬属植物中的重要合成途径^[22]。苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)是3条绿原酸合成途径中都需要的酶,且在合成第一步产生作用,从合成途径来看2,4-D的添加虽然使*PAL*基因相对表达量下降,但后

续关键基因的表达却无下降现象,推测2,4-D能抑制*PAL*基因的表达,但愈伤组织中绿原酸合成途径中关键基因可以通过差异表达及蛋白翻译后修饰等方法弥补2,4-D对*PAL*表达的负面影响,从而最终抵消其对绿原酸合成的影响。*HQT*与*CCoAOMT*都在绿原酸合成途径的下游且处于同一条合成途径中,两者表达量的显著上升表明2,4-D可能通过直接调控*HQT*与*CCoAOMT*的表达来促进‘金翠蕾’愈伤组织中绿原酸富集。对愈伤组织细胞响应植物生长调节剂的研究,一方面有利于阐明植物激素与绿原酸含量的关联机制,为解析绿原酸的合成代谢机制提供了新的研究方向,但是2,4-D如何影响绿原酸合成代谢酶的活性从而提高绿原酸含量的机制还有待进一步研究;另一方面,也可为创制高绿原酸含量愈伤组织、构建悬浮细胞培养体系提供参考,为建立高效的山银花悬浮细胞培养体系提供指导。

参考文献:

- [1] 孙卫文. 金翠蕾[J]. 湖南农业, 2012(2): 5.
- [2] 姚桃女, 吴慧, 何嘉娜. 山银花中化学成分分离及鉴定[J]. 中国药师, 2022, 25(6): 1076-1081.
- [3] 曾安琪, 华桦, 陈朝荣, 等. 金银花、山银花抗炎药理作用研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3938-3944.
- [4] 肖作为, 谢梦洲, 甘龙, 等. 山银花、金银花中绿原酸和总黄酮含量及抗氧化活性测定[J]. 中草药, 2019, 50(1): 210-216.
- [5] 陈佳. 荞麦无菌苗培养条件优化及离体再生体系研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.
- [6] 张睿, 王秀娟, 高伟. 植物激素对次生代谢产物的调控研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4205-4210.
- [7] 武丽娜. 金银花疏松愈伤组织诱导及细胞悬浮培养研究[J]. 北方园艺, 2012(20): 107-109.
- [8] 胡昭君, 罗秋水, 李冬梅, 等. 金银花愈伤组织诱导及绿原酸含量测定[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(3): 549-556.
- [9] 王争艳, 王霞, 王欢. 玉竹愈伤组织诱导及其细胞悬浮培养体系的建立[J]. 福建农业学报, 2017, 32(9): 963-968.
- [10] 康德贤, 王益奎, 王红, 等. 辣椒不育系子叶愈伤诱导过程中减少褐化的研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 2066-2070.
- [11] 陈思羽, 李斯濛, 唐巧玉, 等. 白檀种子胚愈伤组织诱导过程中褐化影响因素研究[J]. 种子, 2024, 43(1): 150-156.

(下转第96页)