

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202007022](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202007022)

樟叶越桔幼茎愈伤组织诱导和不定根的再生*

李 雪¹, 李国泽¹, 杨 玲², 唐军荣², 赵 平², 丁 勇^{1**}

(1. 西南林业大学, 云南省高校林木生物技术重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学, 西南地区林业生物质资源高效利用国家林业与草原局重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】建立樟叶越桔遗传转化体系, 并为其重要次生代谢产物熊果苷及其衍生物的生产提供材料参考。【方法】以樟叶越桔组培苗幼嫩茎段为外植体, 采用木本植物培养基(WPM)培养, 研究不同质量浓度的2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和噻苯隆(TDZ)搭配对樟叶越桔茎段愈伤组织的诱导, 并分析不同细胞分裂素及其质量浓度对愈伤组织再分化不定根的影响, 获得樟叶越桔茎段愈伤组织诱导和愈伤组织再分化不定根的理想配方。【结果】樟叶越桔茎段愈伤组织诱导最佳培养基配方为 WPM+2,4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L, 诱导出的愈伤组织呈乳白色且质地紧实, 诱导率可达 100%。樟叶越桔愈伤组织再分化不定根的最佳配方为 WPM+TDZ 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L, 不定根生根率高达 96.7%, 数量多、较长、整齐且均匀。【结论】成功建立了樟叶越桔幼嫩茎段愈伤组织诱导及愈伤组织再分化不定根的体系, 对以愈伤组织和不定根为材料的樟叶越桔重要次生代谢产物的生产具有一定的参考意义。

关键词: 樟叶越桔; 愈伤组织; 不定根; 诱导

中图分类号: Q 813.1

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 06-1009-08

Callus Induction and Adventitious Root Regeneration in Young Stem of *Vaccinium dunalianum* Wight

LI Xue¹, LI Guoze¹, YANG Ling², TANG Junrong², ZHAO Ping², DING Yong¹

(1. Key Laboratory of Forest Biotechnology in Yunnan, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Highly-efficient Utilization of Forestry Biomass Resources in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: [Purpose] To establish the genetic transformation system of *Vaccinium dunalianum* Wight, and to provide material reference for the production of important secondary metabolites such as arbutin and its derivatives in *V. dunalianum*. [Method] The young stem segments of the tissue culture seedlings of *V. dunalianum* was taken as the explants, and the woody plant medium (WPM) was used in this study, the effects of different mass concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and thidiazuron (TDZ) on callus induction and different cytokinins and mass concentrations on the differentiation of adventitious roots from callus were investigated in order to obtain the ideal formula of them. [Result] The optimal medium formula for callus induction in the stem section of

收稿日期: 2020-07-09

修回日期: 2021-03-30

网络首发时间: 2021-11-17 17:31:28

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960073, 31460076); 云南省高校林木生物技术重点实验室开放基金 (51700201)。

作者简介: 李雪 (1997—), 女, 云南昭通人, 在读硕士研究生, 主要从事植物组织培养与细胞工程研究。

E-mail: 1905380213@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 丁勇 (1979—), 男, 安徽霍邱人, 硕士, 副教授, 主要从事植物生物技术的教学与科研工作。E-mail: dingyong@swfu.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20211117.0909.001.html>



V. dunalianum was WPM+2,4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 5 g/L, the induced callus was milky white and firm, and the induction rate was up to 100%. In the stage of callus re-differentiation, WPM+TDZ 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 5 g/L was the best formula for the adventitious roots induction, the induction rate of adventitious roots was up to 96.7%, and adventitious roots were numerous, long, orderly and homogeneous. [Conclusion] This study successfully established a system of callus induction from the young stems of *V. dunalianum* and callus differentiated adventitious roots, to provided a reference for the research on the production of important secondary metabolites and plant nutrition of *V. dunalianum* in the later reserch using callus and adventitious roots.

Keywords: *Vaccinium dunalianum* Wight; callus; adventitious roots; induction

樟叶越桔 (*Vaccinium dunalianum* Wight) 为杜鹃花科 (Ericaceae) 越桔属 (*Vaccinium*) 多年生木本灌木或小乔木, 在中国多分布于云南、四川和贵州等地^[1]。全株药用, 具有祛风除湿和舒筋活络的功效^[2]; 其幼嫩叶芽经民间加工处理后可作为“雀嘴茶”品尝, 其制作工艺可追溯到明代^[3]。樟叶越桔化学成分丰富^[4], 尤其因富含熊果苷、绿原酸和 6'-O-咖啡酰熊果苷等重要天然次生代谢产物而具有多种生理活性^[5-7], 在高质量化妆品研发、食品与医药等方面具有重要的潜在研究价值。

樟叶越桔生长缓慢, 目前仍处于野生或尚未开发状态, 加上近年来人们对其关注度的日益提高, 其野生生境遭到严重破坏且程度日趋加剧, 给樟叶越桔重要次生代谢产物的生产和开发带来巨大困难, 而愈伤组织诱导和不定根分化是实现其重要次生代谢化合物生产和相关研究的重要途径。愈伤组织自身分裂能力强、生长快、周期短, 可用于细胞悬浮培养^[8]并大量生产次生代谢物; 此外, 愈伤组织在原生质体分离^[9]和遗传转化应用^[10-12]等方面也具有重要作用。不定根广泛应用于植物生物反应器培养, 在人参 (*Panax ginseng*)^[13]、丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)^[14]和何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.)^[15]等名贵中药材重要次生代谢产物的生产中取得理想结果, 为在工业水平生产重要次生代谢产物提供了可行性。近年来, 愈伤组织诱导不仅在枸杞 (*Lycium barbarum* L.)^[16]、泡桐 (*Paulownia*)^[17]和杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.)^[18]等木本植物取得进展, 也在矮丛蓝莓 (*V. angustifolium*)^[19]、高丛蓝莓 (*V. corymbosum*)^[20]和越桔 (*V. myrtillus*)^[21]等越桔属植物中取得突破。樟叶越桔作为一个新型民族资源植物, 虽然前期已经初步建立了其组培技

术体系^[3,22-23], 但还未建立其以茎段为外植体的愈伤组织诱导体系。茎段具有易培养、变异小、增殖快和成活率高等特点^[24], 因此, 本研究以樟叶越桔幼嫩茎段为外植体, 探究其愈伤组织诱导和不定根再生的最佳激素组合, 建立其愈伤组织诱导和不定根的再生体系, 为樟叶越桔种质资源保护和以其愈伤组织和不定根为材料的研究与应用提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试母本材料为樟叶越桔组培瓶苗, 最初由西南林业大学樟叶越桔研究课题组于 2013 年 5 月繁育^[3], 经多次继代培养, 现培养于西南林业大学云南省高校林木生物技术重点实验室。

试验中越桔属植物组织培养常用的木本植物培养基 (WPM) 干粉、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、噻苯隆 (thidiazuron, TDZ) 和玉米素 (zeatin, ZT) 均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料的增殖培养

取同一起来源、同一批次的樟叶越桔组培瓶苗, 切成带 2 个叶片的茎段, 在无菌操作台 (SW-CJ-2F) 上垂直接种于添加蔗糖 30 g/L、ZT 2.0 mg/L、琼脂 5 g/L 的 WPM (pH 5.8) 上, 每瓶培养基 40 mL、10 个茎段。经 7 d 暗培养后转于培养室培养, 培养温度 (25±2) °C, 光照强度 30~50 μmol/(m²·s), 每天光照 12 h, 培养 60 d 后用作下一次继代的增殖材料。经过 25 次继代增殖达到试验所需组培苗量后, 选取生长良好、长势基本一致的幼嫩樟叶越桔组培苗用于愈伤组织诱导试验。

1.2.2 不同激素及其质量浓度对樟叶越桔茎段愈伤组织诱导的影响

将樟叶越桔组培苗置于超净工作台上, 去除叶片, 取中部茎段, 切成长为 2~3 cm、带 3 个节点的茎段, 并在茎段上划 3~4 个伤口, 有伤口处朝上平行接种于添加不同质量浓度 2,4-D 和 TDZ 的愈伤组织诱导培养基 (WPM + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5 g/L) 上, 采用 $L_9(3^2)$ 正交试验设置 2 因素 9 组合正交试验激素配比 (表 1)。每个处理组接种 30 瓶, 每瓶 2 根茎段。先进行 7 d 暗培养处理, 之后转到培养室培养, 培养条件同 1.2.1 节。每天观察其生长情况, 于 30 d 时统计愈伤组织诱导率、外植体污染率、愈伤组织量和愈伤组织质地等指标。

表 1 樟叶越桔茎段愈伤组织诱导正交试验

Tab. 1 The orthogonal test of callus induction hormone combination of <i>Vaccinium dunalianum</i> mg/L		
处理 treatment	2,4-D质量浓度 mass concentration of 2,4-D	TDZ质量浓度 mass concentration of TDZ
T ₁	1.0	0.1
T ₂	1.0	0.2
T ₃	1.0	0.5
T ₄	2.0	0.1
T ₅	2.0	0.2
T ₆	2.0	0.5
T ₇	3.0	0.1
T ₈	3.0	0.2
T ₉	3.0	0.5

1.2.3 不同细胞分裂素及其质量浓度对愈伤组织再分化不定根的影响

将 1.2.2 节中获得的最优愈伤组织用手术刀从外植体上轻轻剥离, 尽量不损伤愈伤组织, 切

成直径约 1 cm 的块状, 分别接种于不同质量浓度 TDZ 和 ZT (表 2) 的愈伤组织再分化培养基 (WPM + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5 g/L) 上。每个处理组接种 20 瓶, 每瓶接种 5 块愈伤组织。先进行 7 d 暗培养, 之后转于培养室培养, 培养条件同 1.2.1 节。于 60 d 时观察并统计愈伤组织再分化不定根情况。

表 2 愈伤组织再分化诱导激素及其质量浓度

Tab. 2 Hormone and its concentration induced by callus redifferentiation mg/L		
处理 treatment	ZT质量浓度 mass concentration of ZT	TDZ质量浓度 mass concentration of TDZ
T ₁₀	0	0.5
T ₁₁	0	1.0
T ₁₂	0	1.5
T ₁₃	2.0	0
T ₁₄	3.0	0
T ₁₅	4.0	0

1.2.4 数据统计与分析

数据采用 Excel 统计, 并根据以下公式计算愈伤组织诱导率和愈伤组织再分化诱导率。

愈伤组织诱导率=(形成愈伤组织的外植体数/接种的总外植体数)×100%;

愈伤组织再分化诱导率=(再分化的愈伤组织数/接种的总愈伤组织数)×100%。

根据愈伤组织生长情况和愈伤组织量的多少, 将愈伤组织量描述为少、一般、较多和旺盛 4 个等级, 分别记为“+” “++” “+++”和“++++”。

2 结果与分析

2.1 樟叶越桔组培苗的继代增殖

如图 1 所示: 樟叶越桔组培苗在增殖培养基

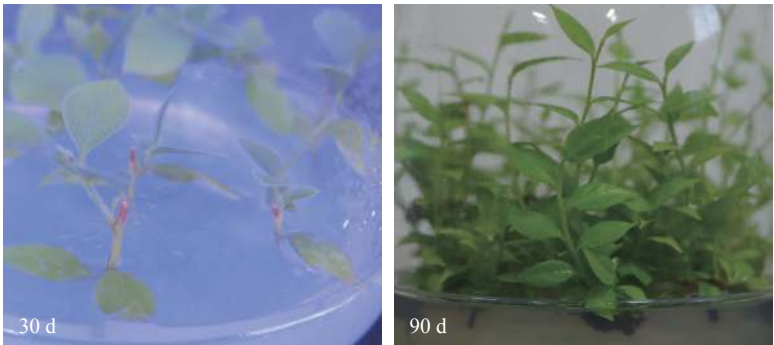


图 1 供试樟叶越桔材料的继代增殖培养

Fig. 1 Subculture and multiplication culture of test *Vaccinium dunalianum* material

上生长约 30 d 时可明显观察到幼嫩腋芽萌发; 随着培养时间的延长, 腋芽数量增加, 形成较多分支; 当培养到 90 d 时, 组培苗生长旺盛, 侧枝多, 颜色浓绿, 平均高度可达 5~7 cm, 可满足后续茎段愈伤组织诱导的供试材料要求。

2.2 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

由表 3 和图 2 可知: 2,4-D 和 TDZ 的 9 组不同质量浓度组合配比处理均可先后成功诱导樟叶越桔茎段长出愈伤组织, 但试验诱导愈伤组织的初愈伤时间和愈伤组织质地存在一定差异。培养 7 d 后观察到各处理组的茎段普遍增大变粗趋于透明状; T₄ 组茎段于培养 12 d 时诱导长出小颗粒愈伤组织, T₅~T₉ 组茎段在培养 15 d 时诱导出愈伤组织, T₁~T₃ 组茎段诱导出愈伤组织的时间最长, 为 20 d。培养至 30 d 时, T₁ 和 T₂ 组茎段诱导率较高, 分别为 90.0% 和 93.3%, 但愈伤组织量一般, 无明显差异。T₃ 组诱导率为 76.7%, 愈伤组织效果较差。T₄~T₆ 组诱导的乳白色愈伤组织生长迅速, 鲜活, 质地紧实, 长势好; 其中, T₄ 组诱导率达 100.0%, 且愈伤组织量旺盛; T₅ 组诱导率为 90.0%, 愈伤组织量较多; 而 T₆ 组诱导率低至 73.3%。T₇~T₉ 组诱导的乳白色愈伤组织虽然鲜活, 但质地疏松且长势缓慢; 其中, T₇ 组诱导率较低, 为 76.7%; T₈ 和 T₉ 组虽然诱导率较高 (分别为 100.0% 和 93.3%), 但生长

缓慢且质地不理想。表明 2,4-D 质量浓度越高, 愈伤组织质地越趋于疏松; 质量浓度越低, 愈伤组织质地越紧实。另外, 随着培养时间的延长, 后期观测到随着 TDZ 质量浓度的增加, 愈伤组织越趋于褐化且程度加深。因此, 2,4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L (T₄ 组) 是樟叶越桔茎段愈伤组织诱导的最佳激素组合。此外, 培养 60 d 时 T₄ 组愈伤组织质地为乳白色大颗粒、紧实、鲜活, 相较于其他处理组仍长势最好, 因此, 将 T₄ 组的愈伤组织作为后续不定根再生的供试材料。

2.3 不同细胞分裂素及其质量浓度对愈伤组织再分化不定根的影响

愈伤组织在各组再分化培养基中培养 14 d 后, 乳白色愈伤组织普遍开始转变为嫩绿色, 随着培养时间延长到约 40 d 时, 愈伤组织表面开始产生一定数量的不定根。再随着培养时间增加到 60 d 时 (表 4、图 3), T₁₀ 组不定根萌发率最高, 可达 96.7%, 不定根较长、量较多且整齐均匀; T₁₁ 组效果次之, 不定根萌发率为 66.7%, 不定根数量中等且不均匀; T₁₂ 组不定根萌发率最差, 仅为 46.7%, 不定根数量较少且短。说明随着 TDZ 质量浓度的增加, 不定根萌发率和生长逐渐受到抑制。此外, T₁₅ 组的不定根萌发率最高, 为 76.7%, 量多但不均匀; T₁₄ 组效果次之, 不定根的萌发率为 53.3%; T₁₃ 组的不定根萌发率效果最差, 仅为 36.7%, 量少、稀疏且不

表 3 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响
Tab. 3 Effects of different hormone ratio on the callus induction of stem

处理 treatment	外植体数 number of explant	诱导率/% induction rate	愈伤组织质地 callus texture	愈伤组织量 callus quantity	初愈时间/d the time of the first callus
T ₁	60	90.0	乳白色颗粒, 鲜活, 质地紧密, 长势较差 milky white particles, fresh, tight texture, poor growth	++	20
T ₂	60	93.3	乳白色颗粒, 鲜活, 质地紧密, 长势较差 milky white particles, fresh, tight texture, poor growth	++	20
T ₃	60	76.7	乳白色颗粒, 鲜活, 质地紧密, 长势较差 milky white particles, fresh, tight texture, poor growth	++	20
T ₄	60	100.0	乳白色大颗粒, 鲜活, 质地紧密, 长势最好 milky white large particles, fresh, tight texture, the best growth	++++	12
T ₅	60	90.0	乳白色颗粒, 鲜活, 质地紧密, 长势较好 milky white particles, fresh, tight texture, good growth	+++	15
T ₆	60	73.3	乳白色颗粒, 鲜活, 密集, 质地紧密, 长势较好 milky white particles, fresh, tight texture, good growth	+++	15
T ₇	60	76.7	乳白色颗粒, 鲜活, 质地疏松, 长势一般 milky white particles, fresh, loose texture, general growth	++	15
T ₈	60	100.0	乳白色颗粒, 鲜活, 质地疏松, 长势一般 milky white particles, fresh, loose texture, general growth	++	15
T ₉	60	93.3	乳白色颗粒, 鲜活, 质地疏松, 长势一般 milky white particles, fresh, loose texture, general growth	++	15

注: “+” “++” “+++” 和 “++++” 分别为愈伤组织量少、一般、较多和旺盛。
Note: “+” “++” “+++” and “++++” indicate callus quantity few, general, more and exuberant, respectively.

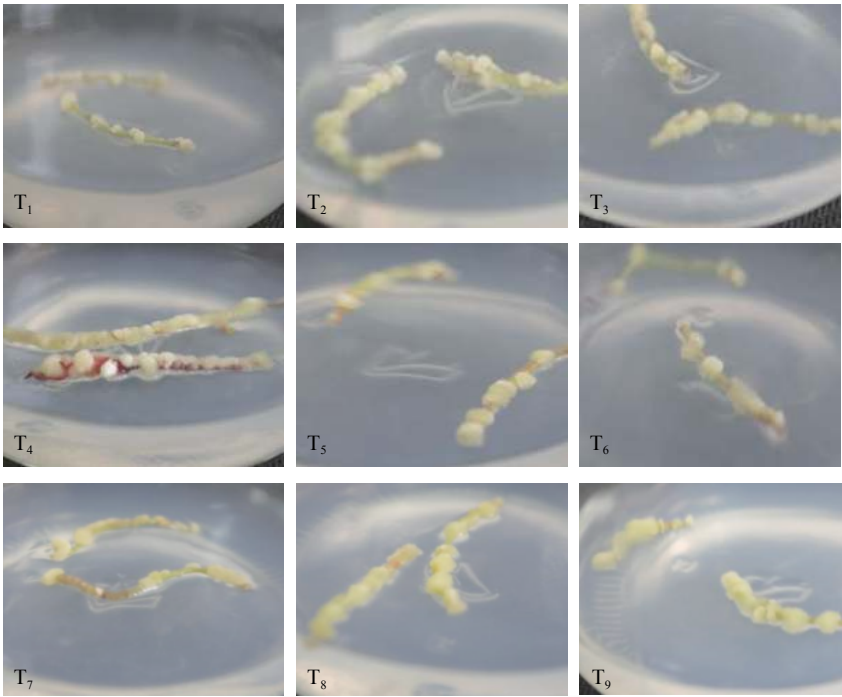


图 2 不同激素配比下愈伤组织的生长 (30 d)

Fig. 2 Growth of callus under different hormones ratio

表 4 不同质量浓度细胞分裂素对愈伤组织再分化不定根的影响

Tab. 4 Effects of different mass concentrations of cytokinin on the callus redifferentiation adventitious root

处理 treatment	生根愈伤组织数 number of rooting callus	生根率/% rooting rate	生长情况 growth condition
T ₁₀	29	96.7	根较长, 数量较多, 整齐, 均匀 the roots are longer, more numerous, neat and even
T ₁₁	20	66.7	根较细长, 数量中等, 出根不均匀 the roots are long and thin, the number is general, and the roots are not uniform
T ₁₂	14	46.7	根较短, 数量较少, 不齐 shorter roots, fewer in number, uneven
T ₁₃	11	36.7	根较短, 数量较少, 稀疏, 出根不均匀 the roots are short, few in number, sparse and uneven
T ₁₄	16	53.3	根细长, 数量少, 稀疏, 出根不均匀 the roots are slender, few in number, sparse and uneven
T ₁₅	23	76.7	根长度中等, 数量多, 出根不均匀 the root length is medium, the number is much, the root is uneven

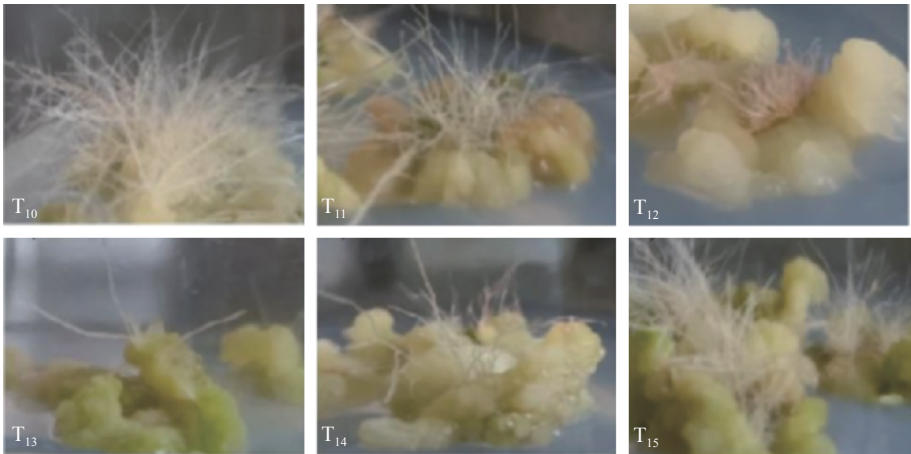


图 3 不同质量浓度细胞分裂素下愈伤组织再分化不定根的生长 (60 d)

Fig. 3 Growth of callus redifferentiation adventitious root under different concentrations of cytokinin

均匀。说明随着 ZT 的质量浓度越大,不定根的萌发率越高且数量越多。以上结果表明:TDZ 对樟叶越桔愈伤组织再分化不定根的促进作用显著优于 ZT,且质量浓度为 0.5 mg/L 时效果较好。

3 讨论

本研究以樟叶越桔幼嫩茎段为外植体,试验发现其愈伤组织诱导最佳培养基及配方为:WPM+2,4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L,愈伤组织诱导率高达 100%,乳白色颗粒,质地紧密,鲜活且生长旺盛,无褐化现象产生。愈伤组织在再分化培养基(WPM+TDZ 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L)上,不定根诱导率达 96.7%,根较长,量较多,整齐,均匀。MEINERS 等^[20]以越桔茎段为外植体,发现 WPM 培养基比 Anderson 和 MS 培养基更适合越桔属植物的组织培养。SEDLAK 等^[25]以高丛蓝莓为试验材料的研究结果也说明 WPM 培养基更适合越桔属植物组织培养的结论,所以本研究优先选用 WPM 为基本培养基。

植物生长调节剂的使用在很大程度上决定着愈伤组织诱导的效率、愈伤组织胚性及其分化方向^[26]。本研究选择不同质量浓度的 2,4-D 对樟叶越桔茎段愈伤组织进行诱导发现:当 2,4-D 质量浓度为 2.0 mg/L 时,诱导率可达到 100%。这一结果与白刺花(*Sophora davidii*)胚性愈伤组织诱导结果^[26]一致。一般认为高质量浓度的生长素有利于愈伤组织的生长,且 2,4-D 的诱导效果优于萘乙酸、吲哚乙酸和吲哚丁酸等^[27-29]。但当 2,4-D 质量浓度过高或过低时愈伤组织的生长和分化会受到严重影响,不利于外植体间接芽再生后期不定芽的分化^[21],且愈伤组织长期生长于含 2,4-D 的培养基上会逐渐丧失其胚性,极大地限制愈伤组织进一步分化出芽的能力^[26]。TDZ 是一种新型人工合成的高效细胞分裂素类植物激素^[30],对组织培养的效果因其质量浓度存在较大差异。本研究发现低质量浓度的 TDZ 更有利于樟叶越桔茎段愈伤组织的发生,这一结果与 KARAKAS^[16]对枸杞愈伤组织诱导的研究结果相符。愈伤组织用途众多,不仅是细胞原生质体培养的原材料来源^[31],还常用于工农业和医药生产中无性系的筛选以及重要次生代谢化合物的大规模生产^[32]。此外,不同部位诱导形成的愈伤组织,其次生代谢

物含量会存在差别^[33]。本研究以樟叶越桔茎段为外植体建立愈伤组织诱导体系,为后续进行不同部位愈伤组织合成次生代谢物能力比较奠定了基础;同时,也为开展愈伤组织合成次生代谢物的研究与应用提供了材料参考,并对日益匮乏的樟叶越桔植物种质资源保存、品种改良及遗传育种工作具有重要意义。

不定根在重要次生代谢产物生产与植物营养等方面具有重要意义^[13-15]。由于次生代谢物通常由专门的细胞或在不同的发育阶段才能合成,而未分化的植物细胞培养物通常会部分或全部丧失积累次生产物的能力^[34]。因此,通过诱导不定根获得次生代谢物也是一种重要的生物技术手段,不定根在培养过程中比细胞系更稳定,且次生代谢物的合成能力更强^[35-36]。本研究建立了以愈伤组织为材料分化不定根的技术体系,在愈伤组织再分化诱导阶段中发现:在不同种类的单一细胞分裂素作用下,愈伤组织的再分化程度存在差异。在 TDZ 作用下,不定根诱导率最高达 96.7%,而在 ZT 作用下诱导率与前者相比降低 20%,可见,TDZ 在促进樟叶越桔愈伤组织再分化不定根阶段中效果更佳。与以樟叶越桔组培苗叶片为外植体的不定根形成技术体系^[22]相比,愈伤组织因质地均一、分化能力强,诱导获得的不定根数量更多、长度更长、质量更佳,还解决了因个别叶片效果差异所导致的不定根相对平均偏差较大^[22]的问题。因此,本研究为实现利用樟叶越桔不定根植物生物反应器生产熊果苷和 6'-O-咖啡酰熊果苷等重要次生代谢化合物提供了稳定的材料来源。

有研究表明:TDZ 在越桔^[20]和高丛蓝莓^[37]等越桔属植物中具有显著的促进不定芽再生作用。在一定质量浓度范围内,提高 TDZ 的质量浓度可提高外植体不定芽的数量,但会抑制不定芽节间的伸长;降低其质量浓度有助于节间伸长但不定芽数量减少^[21,38]。本研究发现:樟叶越桔愈伤组织可直接再分化出大量不定根,这一现象与谭亚婷等^[39]的研究一致,而与其他越桔属植物愈伤组织再分化诱导易出芽^[40]相反,说明樟叶越桔愈伤组织易分化不定根,但不易出芽。这给以樟叶越桔愈伤组织为材料的遗传转化体系建立带来了困难。推测愈伤组织再分化不易出芽的原因主要有:(1)尽管 2,4-D 具有显著的促进愈伤组织生成的能力,但在某些物种愈伤组织再分化不定芽后

期具有抑制作用^[21]; (2) 2,4-D的作用具有阶段性,愈伤组织在含2,4-D的培养基上生长一段时间后会丧失再分化不定芽的能力^[26]; (3)愈伤组织再分化不定芽阶段不仅需要细胞分裂素的调节,也需要生长素的参与^[41]。针对樟叶越桔愈伤组织再分化不定芽过程中存在的问题,需要在后续研究中进行更深入的探索,如培养条件的优化、外源激素种类的选择与配比的合理使用等。

4 结论

本研究建立了樟叶越桔以茎段为外植体的愈伤组织诱导体系,诱导出的愈伤组织呈乳白色且诱导率理想,愈伤组织再分化阶段获得大量不定根,数量多、较长且均匀,愈伤组织和不定根在培养过程中比细胞系更稳定。因此,通过诱导愈伤组织和不定根再生来获得重要次生代谢产物也是一种重要的生物技术手段,这为樟叶越桔在工业水平生产重要次生代谢产物提供了可行性。

[参考文献]

- [1] LUO X L, LI N, XU M, et al. HPLC simultaneous determination of arbutin, chlorogenic acid and 6'-O-caffeoylarbutin in different parts of *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Natural Product Research, 2015, 29(20): 1963. DOI: [10.1080/14786419.2015.1013472](https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1013472).
- [2] LI N, ZENG W L, LUO X L, et al. A new arbutin derivative from the leaves of *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Natural Product Research, 2018, 32(1): 65. DOI: [10.1080/14786419.2017.1333993](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1333993).
- [3] 罗旭璐,唐军荣,李娜,等.樟叶越桔的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学报,2014,50(11): 1717. DOI: [10.13592/j.cnki.pj.2014.0410](https://doi.org/10.13592/j.cnki.pj.2014.0410).
- [4] ZHAO P, TANAKA T, HIRABAYASHI K, et al. Caffeoyl arbutin and related compounds from the buds of *Vaccinium dunalianum*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(18): 3087. DOI: [10.1016/j.phytochem.2008.06.001](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.06.001).
- [5] WANG Y S, ZHOU S S, SHEN C Y, et al. Isolation and identification of four antioxidants from *Rhodiola crenulata* and evaluation of their UV photoprotection capacity *in vitro*[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 56: 11. DOI: [10.1016/j.jff.2020.103825](https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103825).
- [6] WEI Y, ZHANG Z J, ZHANG Y T, et al. Simple LC method with chemiluminescence detection for simultaneous determination of arbutin and L-ascorbic acid in whitening cosmetics[J]. Chromatographia, 2007, 65(7): 443. DOI: [10.1365/s10337-007-0184-z](https://doi.org/10.1365/s10337-007-0184-z).
- [7] XU M, LAO Q C, ZHAO P, et al. 6'-O-caffeoylarbutin inhibits melanogenesis in zebrafish[J]. Natural Product Research, 2014, 28(12): 932. DOI: [10.1080/14786419.2014.883395](https://doi.org/10.1080/14786419.2014.883395).
- [8] ANUSHA T S, JOSEPH M V, ELYAS K K. Callus induction and elicitation of total phenolics in callus cell suspension culture of *Celastrus paniculatus* - willd, an endangered medicinal plant in India[J]. Pharmacognosy Journal, 2016, 8(5): 471. DOI: [10.5530/pj.2016.5.10](https://doi.org/10.5530/pj.2016.5.10).
- [9] ZHU L Q, WANG B C, ZHOU J, et al. Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 44(1): 1. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2005.05.002](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.05.002).
- [10] FRANKLIN C I, TRIEU T N, CASSIDY B G, et al. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(2): 74. DOI: [10.1007/BF00241938](https://doi.org/10.1007/BF00241938).
- [11] MANOHARAN M, DAHLEEN L S. Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus[J]. Plant Cell Reports, 2002, 21(1): 76. DOI: [10.1007/s00299-002-0477-5](https://doi.org/10.1007/s00299-002-0477-5).
- [12] BASNAYAKE S W V, MOYLE R, BIRCH R G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(3): 439. DOI: [10.1007/s00299-010-0927-4](https://doi.org/10.1007/s00299-010-0927-4).
- [13] 由香玲,谭啸,贾洪柏,等.小型生物反应器内人参不定根的人参皂苷累积[J].西北植物学报,2011,31(8): 1700.
- [14] 严硕,高文远,王娟,等.不同生物反应器对丹参不定根培养过程中有效成分的影响[J].中国中药杂志,2009,34(16): 2027. DOI: [10.3321/j.issn:1001-5302.2009.16.005](https://doi.org/10.3321/j.issn:1001-5302.2009.16.005).
- [15] 黄和平,高山林,王键,等.何首乌不定根的离体诱导及悬浮培养研究[J].中国中药杂志,2013,38(22): 3857. DOI: [10.4268/cjcm.20132212](https://doi.org/10.4268/cjcm.20132212).
- [16] KARAKAS F P. Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of goji berry (*Lycium barbarum* L.) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 146: 384. DOI: [10.1016/j.plaphy.2019.11.009](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.009).
- [17] FAN G Q, ZHAI X Q, ZHAI C J, et al. Callus induction from leaves of different *Paulownia* species and its plantlet regeneration[J]. Journal of Forestry Research, 2001, 12(4): 209. DOI: [10.1007/BF02856709](https://doi.org/10.1007/BF02856709).
- [18] GRAY E D. Establishment of a callus culture and measurement of seasonal changes in secondary compound production in *Eucommia ulmoides* Oliver[D]. Baton Rouge: Louisiana State University, 2003.
- [19] DEBNATH S C. Influence of indole-3-butyric acid and propagation method on growth and development of *in vitro*- and *ex vitro*-derived lowbush blueberry plants[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 51(3): 245. DOI: [10.1007/s10725-006-9164-9](https://doi.org/10.1007/s10725-006-9164-9).
- [20] MEINERS J, SCHWAB M, SZANKOWSKI I. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2007, 89(2/3): 169. DOI: [10.1007/s11240-007-9230-7](https://doi.org/10.1007/s11240-007-9230-7).

- [21] SHIBLI R A, SMITH M A L. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (Ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) leaf explants[J]. Hortscience, 1996, 31(7): 1225. DOI: 10.21273/HORTSCI.31.7.1225.
- [22] 卜程洪, 张詠, 罗旭璐, 等. 樟叶越桔不定根培养体系建立[J]. 西南林业大学学报, 2018, 38(3): 200. DOI: 10.11929/j.issn.2095-1914.2018.03.029.
- [23] 赵展平, 何芳, 唐军荣, 等. 樟叶越桔组培苗生根和移栽技术研究[J]. 广西植物, 2019, 39(7): 965. DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201809011.
- [24] ZHAO X, ZHAN L, ZOU X. *In vitro* high-frequency regeneration of half-highbush 'Northland' blueberry[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2011, 39(1): 51. DOI: 10.1080/01140671.2010.524188.
- [25] SEDLAK J, PAPERSTEIN F. *In vitro* multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars[J]. Acta Horticulturae, 2009, 810: 575. DOI: 10.17660/actahortic.2009.810.76.
- [26] 吴丽芳, 魏晓梅, 陆伟东. 白刺花胚性愈伤组织诱导和植株再生体系建立[J]. 植物生理学报, 2019, 55(2): 218. DOI: 10.13592/j.cnki.ppj.2018.0418.
- [27] 赵洁, 程井辰. 生长调节物质对石刁柏愈伤组织诱导及根芽分化的影响[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(4): 253. DOI: 10.13592/j.cnki.ppj.1991.04.003.
- [28] 程佑发, 安黎哲, 浦铜良, 等. 枣愈伤组织诱导和再生植株[J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 353. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4025.2000.03.008.
- [29] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 南方红豆杉愈伤组织培养的研究[J]. 中草药, 2000, 31(2): 130. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2000.2.074.
- [30] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3466.2003.02.014.
- [31] 俞超, 杨潇, 王忠华, 等. 葡萄愈伤组织制备原生质体的影响因素研究[J]. 果树学报, 2013, 30(3): 433. DOI: 10.13925/j.cnki.gsx.2013.03.019.
- [32] 刘同祥, 何冬云, 张宗申. 植物生长调节剂对东北矮紫杉愈伤组织中次生代谢物质的影响[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2067.
- [33] 管延英, 滕忠才, 梁玉玲. 胀果甘草(*Glcyrrhiza inflat Bat*)组织培养物的有效成分分析[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(4): 34. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1573.2003.04.009.
- [34] KIM Y, WYSLOUZIL B E, WEATHERS P J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2002, 38(1): 1. DOI: 10.1079/ivp2001243.
- [35] 戴均贵, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 银杏再生根和不定根的形成及其中银杏内酯的产生[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 36. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6880.2000.02.009.
- [36] RAO S R, RAVISHANKAR G A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites[J]. Biotechnology Advances, 2003, 20(2): 101. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
- [37] SONG G Q, SINK K C. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)[J]. Plant Cell Reports, 2004, 23(7): 475. DOI: 10.1007/s00299-004-0842-7.
- [38] DEBNATH S C. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2009, 45(2): 122. DOI: 10.1007/s11627-008-9186-2.
- [39] 谭亚婷, 尚俊可, 罗旭璐, 等. 生长素对樟叶越桔离体培养物次生代谢物含量的影响[J]. 西部林业科学, 2020, 49(1): 133. DOI: 10.16473/j.cnki.xblykx1972.2020.01.021.
- [40] DEBNATH S C. Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.)[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2003, 39(5): 122. DOI: 10.1079/IVP2003458.
- [41] 林娅, 郑玉梅, 刘青林. 影响月季愈伤组织诱导和分化的因素[J]. 分子植物育种, 2006, 4(2): 223. DOI: 10.3969/j.issn.1672-416X.2006.02.013.

责任编辑: 何承刚