

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.24059

CSTR: 32231.14.PSJ.2095-0837.24059

江宇慧, 王萌, 陈雷, 陈庆梅, 徐建中, 姚林英, 森林, 余坤. 茅苍术组培苗继代过程的退化机制研究[J]. 植物科学学报, 2025, 43 (2): 273~282

Jiang YH, Wang M, Chen L, Chen QM, Xu JZ, Yao LY, Sen L, Yu K. Degradation mechanism of tissue culture seedlings during the subculture process in *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. [J]. *Plant Science Journal*, 2025, 43 (2): 273~282

茅苍术组培苗继代过程的退化机制研究

江宇慧¹, 王萌¹, 陈雷¹, 陈庆梅², 徐建中³, 姚林英³, 森林^{1*}, 余坤^{1*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 武汉 430060;

3. 湖北卫尔康现代中药有限公司, 湖北黄冈 438000)

摘要: 利用植物组织培养法, 收集茅苍术 (*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.) 第3、10和17代的无菌苗, 测定其外观形态与生理生化指标, 并利用转录组测序分析基因的差异表达情况。结果显示, 随着组织培养继代次数的增加, 茅苍术组培苗的增殖率下降, 生物量、株高、叶长宽比逐渐降低, 出现表型退化。生理指标测定结果显示, 端粒酶逆转录酶的活性降低, 叶绿素荧光参数 F_o 、 F_m 逐渐下降, 而可溶性糖含量、 H_2O_2 、MDA 含量及 SOD、POD、CAT 等抗氧化酶活性逐渐升高; 内源激素 IAA、CTK、 GA_3 含量也逐渐上升, 进一步提示随着继代次数增加, 组培苗退化程度加深。转录组分析结果表明, 脂肪酸降解被抑制, 乙酰辅酶 A 合成受阻, 影响萜类骨架合成; 赤霉素、乙烯通路基因表达下调, 脱落酸、生长素通路基因表达上调, 激素代谢出现紊乱, 进而引起相关生理生化过程失调, 造成茅苍术组培苗分子水平的退化。研究结果说明, 茅苍术组培苗长期继代培养发生形态退化, 代谢紊乱, 体内氧化胁迫加重, 影响了脂肪酸降解等初生代谢过程、萜类等次生代谢物生物合成及激素信号转导通路相关基因的表达, 最终导致退化发生。

关键词: 茅苍术; 无性繁殖; 继代培养; 生理生化; 转录组测序中图分类号: S567.21^{†1}

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837 (2025) 02-0273-10

Degradation mechanism of tissue culture seedlings during the subculture process in *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.

Jiang Yuhui¹, Wang Meng¹, Chen Lei¹, Chen Qingmei², Xu Jianzhong³,
Yao Linying³, Sen Lin^{1*}, Yu Kun^{1*}

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430060, China; 3. Hubei Weierkang Modern Chinese Medicine Co., Ltd., Huanggang, Hubei 438000, China)

Abstract: This study investigated the effects of prolonged subculture on *Atractylodes lancea* tissue culture seedlings by examining morphological, physiological, biochemical, and transcriptomic changes across the third, tenth, and seventeenth subculture generations. Results indicated that: (1) With increasing subculture generations, growth rates declined, and seedlings exhibited reduced biomass, height, and leaf length-to-width ratios, indicative of phenotypic degradation. (2) Telomerase reverse transcriptase activity and chlorophyll fluorescence parameters (F_o and F_m) decreased, while soluble sugar, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), and the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) increased. (3) Levels of endogenous hormones, including indole-3-acetic acid (IAA), cytokinin (CTK), and gibberellin (GA_3), also increased significantly with successive subcultures, indicating a progressive degree of hor-

收稿日期: 2024-03-25, 接受日期: 2024-04-20。

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目 (T2022020); 湖北省重点研发计划项目 (2023BBB151); 湖北省自然科学基金项目 (2022CFB576)。

作者简介: 江宇慧 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源品质评价与开发 (E-mail: 2423362687@qq.com)。* 通信作者 (Authors for correspondence. E-mail: 239011250@qq.com; yukun_hbtcm@163.com)。

monal dysregulation and degradation. (4) Transcriptome analysis revealed inhibition of fatty acid degradation, down-regulation of genes associated with the mevalonate (MVA) pathway, and blockade of acetyl coenzyme A synthesis. Genes associated with the gibberellin and ethylene pathways were down-regulated, while those related to the abscisic acid and auxin pathways were up-regulated. These disruptions in hormone metabolism and associated physiological processes contributed to metabolic imbalances and molecular-level degradation. Overall, prolonged subculture led to morphological atrophy, metabolic disturbances, accumulation of stress substances, inhibition of primary metabolic processes such as fatty acid degradation and secondary metabolite biosynthesis, and dysregulation of genes related to hormone signal transduction pathways. These combined effects culminated in the progressive degradation of *A. lancea* tissue culture seedlings.

Key words: *Atractylodes lancea*; Asexual reproduction; Subculture; Physiology and biochemistry; Transcriptome sequencing

植物组织培养是将离体器官、组织或细胞等在无菌条件下培养,使其重新分化发育成完整植株的技术,但有研究发现随着继代时间延长,继代培养物可能出现不同程度的退化现象^[1]。如薛美凤等^[2]研究发现,棉花(*Gossypium hirsutum* L.)胚性愈伤组织随着继代培养时间的延长,再生能力下降,不育率升高。王艳丽等^[3]研究发现,长期继代培养下,黑松(*Pinus thunbergii* Parl.)愈伤组织发生和植株再生能力下降。Wang 等^[4]研究表明,天麻(*Gastrodia elata* Bl.)幼苗在长期无性繁殖下出现了形态退化和产量下降。研究表明,许多植物材料在继代培养 1 年以上时,培养物的形态发生能力和遗传稳定性等都可能会有较大程度的退化。

退化的发生可能与生理生化变化及遗传信息有关。都晓龙等^[5]的研究表明,长期继代培养下,水稻(*Oryza sativa* L.)的愈伤组织再生率与分化率显著下降,与抗氧化酶活性变化有关。王胤和姚瑞玲^[6]的研究发现,长期继代培养下,植物生长素与赤霉素比例失衡,造成马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)继代芽生根能力衰退。董静等^[7]的研究指出,在长期继代培养后,生理生化代谢活性下降,如可溶性糖、可溶性蛋白含量上升,淀粉酶活性下降,导致楸树(*Catalpa bungei* C. A. Mey.)愈伤组织分化再生困难。

苍术为菊科茅苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)或北苍术(*A. chinensis* (DC.) Koidz.)的干燥根茎^[8],具有燥湿健脾,祛风散寒,明目等功效。现代药理研究表明,茅苍术具有促进肠胃运动、抗缺氧、抗血糖、抗菌、抗病毒等作用^[9]。江苏茅山一带是茅苍术传统道地产区,

但自 20 世纪 80 年代以来,茅苍术野生资源受到掠夺性采挖,目前已难觅踪迹,无法为市场提供药材货源。栽培苍术夏季高温季节地上部分早枯,造成结实率较低,且种子育苗过程病害严重,种子苗产量低^[10]。因此,生产上多采取根茎切块无性繁殖,但多代无性繁殖易出现种质退化,造成药材产量降低、品质下降。

本研究以茅苍术组培苗为材料,在无菌环境下探究长期多代培养后,其组培苗的表型特征、生理生化与基因表达的改变,以期初步揭示茅苍术无性繁殖退化的可能机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于 2021 年 11 月采集江苏茅山的野生茅苍术种子,经湖北中医药大学刘合刚教授鉴定为菊科植物茅苍术的种子。将采集的茅苍术种子冲洗消毒,剥去种皮,将消毒之后的胚接种到灭菌培养基中,培养在适宜条件的培养箱中,生长 4 个月得到大小适宜的 0 代茅苍术组培苗。

在实验室无菌条件下,将 0 代组培苗取出,每株组培苗按不定芽生长方向分切,切成大小相近的多株组培苗,并接种到无菌培养基中。后续每 30 d 进行一次继代工作,并收集第 3、10、17 代苗龄 30 d 的茅苍术组培苗样本,液氮冷冻,于 -80 ℃ 保存待用。

1.2 测定方法

1.2.1 形态学指标

随机选取第 3、10、17 代的茅苍术组培苗,在苗龄 30 d 时,将组培苗从瓶中取出,用吸水纸吸干表面水分,测定外观形态特征数据。利用游

标卡尺直接测定组培苗的株高; 利用分析天平直接测定组培苗的生物量, 并计算增殖率; 利用纸片比重法测定组培苗的叶面积, 同时测量叶片长度与宽度, 计算长宽比, 每组 6 个重复。

1.2.2 生理生化指标

利用 Flour Pen 100 便携式叶绿素荧光仪测定叶绿素荧光参数, 取第 3、10、17 代茅苍术组培苗, 苗龄 30 d 时位于中部的完全展开叶, 将叶片暗处理 30 min 后测定 OJIP 值, 包括: 初始荧光 (F_0)、最大荧光 (F_m) 和最大光化学速率 (F_v/F_m), 每组设置 6 个重复。

利用蒽酮比色法^[11]测定可溶性糖的含量; 利用考马斯亮蓝-G250 法^[12]测定可溶性蛋白的含量。利用试剂盒 (北京盒子生工科技有限公司) 测定过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 的活性, 以及胁迫物过氧化氢 (H_2O_2) 与丙二醛 (MDA) 的含量。利用酶联免疫分析试剂盒 (江苏酶免实业有限公司) 测定植物生长素 IAA、植物总细胞分裂素 CTK、植物赤霉素 GA_3 含量与端粒酶逆转录酶活性。每组设置 3 个重复。

1.3 转录组测序

将第 3、10、17 代苗龄 30 d 的苍术组培苗用液氮冷冻, 每组设置 3 个重复。干冰保存运输至公司进行转录组测序。首先提取样品 RNA, RNA 样品检测合格后, 构建文库, 文库检测合格后, 使用高通量测序平台 Illumina Nova Seq 6000 进行测序。原始数据过滤掉低质量数据后得到 clean reads。利用 DESeq 2 软件进行差异表达分析, 筛选 $P\text{-adj}<0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}|>1$ 的差异表达

基因。利用 Cluster Profiler 软件进行差异表达基因富集分析, 实现差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。

1.4 数据处理

所有实验数据均采用 SPSS 26 软件进行显著性差异分析与相关性分析, 不同字母代表不同代数组培苗间在 $P<0.05$ 水平下具有显著差异。利用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行标准曲线的拟合与作图。

2 结果与分析

2.1 形态变化

本研究发现, 经过多次继代培养后, 茅苍术组培苗外观发生明显变化, 黄叶增多, 愈伤组织减小, 质地由坚韧转向酥脆易断 (图 1)。增殖率第 14 代下降较为明显, 14 代之后下降趋势较缓 (图 2: A)。生物量随着继代次数的增加出现梯度下降, 株高也呈现出相同的趋势, 叶面积梯度增加, 叶长宽比均呈现梯度下降的趋势 (图 2: B~E)。

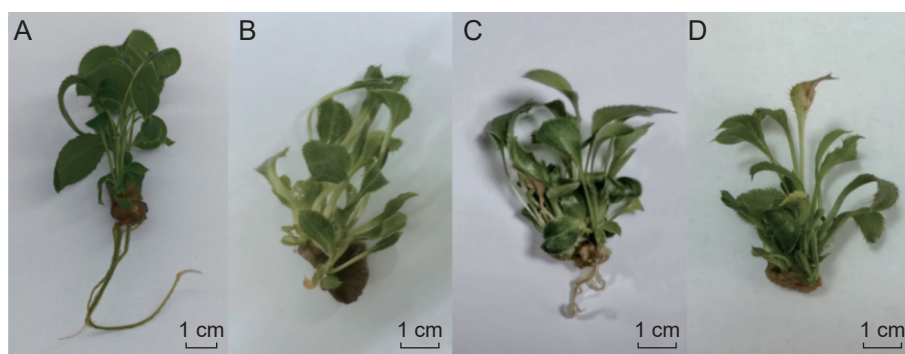
2.2 生理生化指标变化

2.2.1 叶绿素荧光参数

叶绿素荧光参数分析结果如图 3 所示, 随着继代次数的增加, 初始荧光 F_0 及最大荧光 F_m 呈现出相同的趋势, 继代早期显著下降, 后期变化不显著 (图 3: A、B)。随着继代次数的增加, 最大光化学速率 F_v/F_m 值增大 (图 3: C)。

2.2.2 可溶性糖、可溶性蛋白含量

第 3、10、17 代的可溶性糖、可溶性蛋白含量测定结果如图 4 所示, 在长期继代培养下, 可

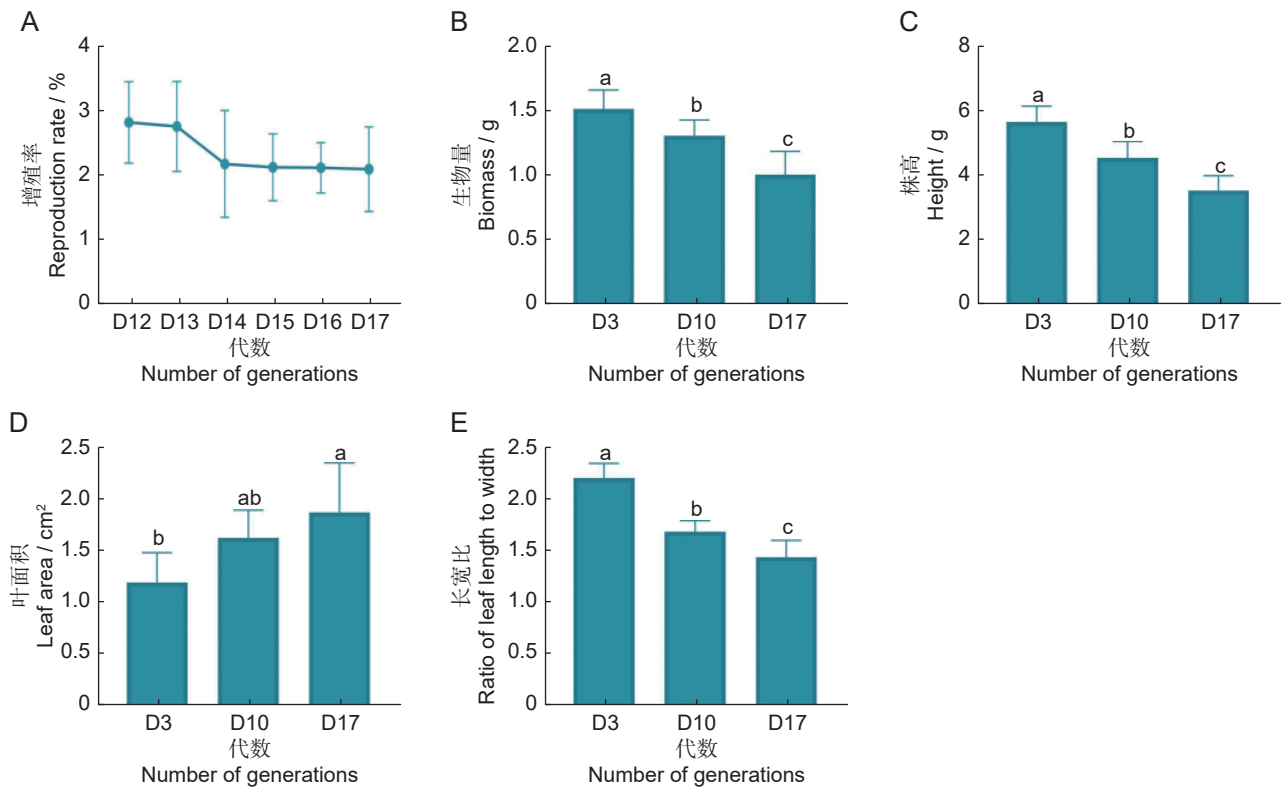


A~D: 第 0、3、10、17 代组培苗。

A-D: Tissue culture seedlings of initial, 3rd, 10th, and 17th generation, respectively.

图 1 4 个不同阶段茅苍术组培苗的形态特征

Fig. 1 Appearances of tissue culture seedlings in four distinct stages



数据为“平均值±标准差”；显著性分析在同一个无性系内开展，不同字母表示不同代数间差异显著 ($P<0.05$)，下同。
Data are mean±standard deviation. Significance analysis was carried out in the same clone, and different letters indicate significant differences between different generations ($P<0.05$), same below.

图 2 不同继代数茅苍术组培苗表型参数
Fig. 2 Phenotypic parameters of tissue culture seedlings from different generations

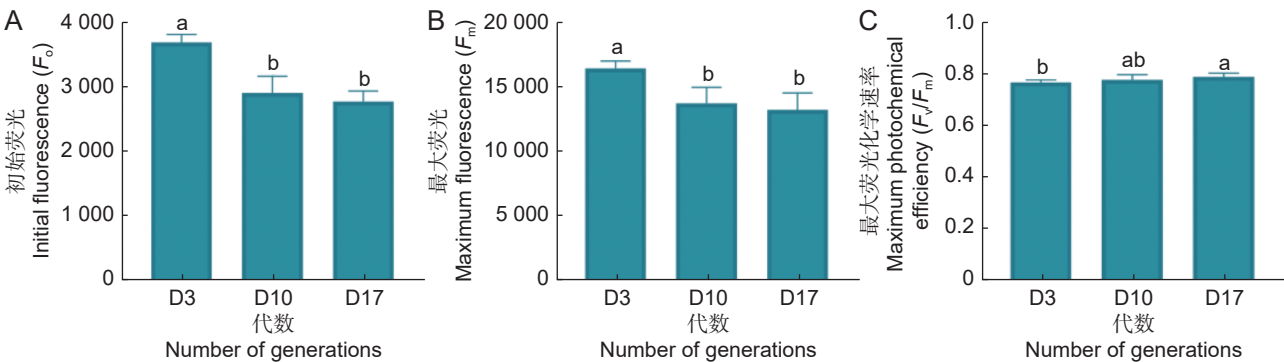


图 3 不同继代数茅苍术组培苗的叶绿素荧光参数
Fig. 3 Chlorophyll fluorescence parameters of tissue culture seedlings from different generations

溶性糖含量在继代后期显著上升，而可溶性蛋白含量呈现出先增加后降低的趋势。

2.2.3 抗氧化酶活性与胁迫物的含量

第 3、10、17 代的抗氧化酶活性与胁迫物的含量测定结果如图 5 所示。CAT、SOD 与 POD 活性均随着继代次数的增加呈现逐渐上升的趋势，CAT 活性在继代后期上升较显著，SOD 活

性在继代早期上升较为显著，而 POD 呈现梯度上升趋势（图 5：A~C）。MDA 含量的随着继代次数的增加而显著上升。H₂O₂ 含量的测定结果虽然呈现先上升后下降趋势，但第 17 代的活性显著高于第 3 代（图 5：D、E）。

2.2.4 内源激素含量

第 3、10、17 代茅苍术组培苗的内源激素含

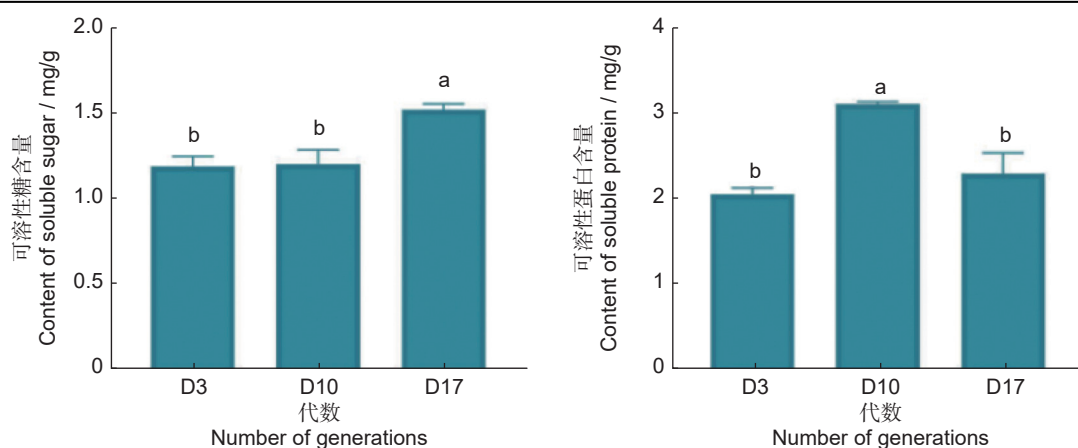


图 4 不同继代次数茅苍术组培苗的可溶性糖含量与可溶性蛋白含量

Fig. 4 Soluble sugar and protein content in tissue culture seedlings from different generations

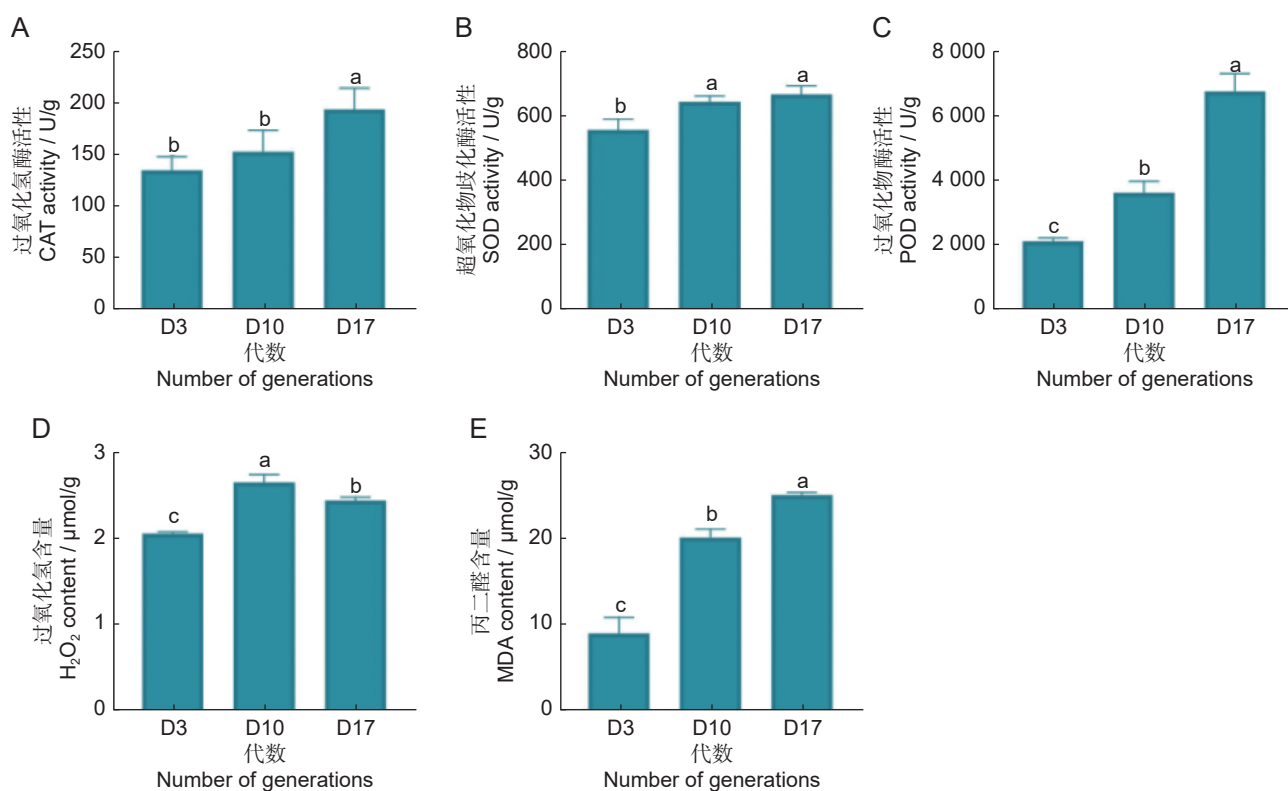


图 5 不同继代次数茅苍术组培苗的抗氧化指标

Fig. 5 Antioxidant indicators of tissue culture seedlings from different generations

量如图 6 所示。IAA 和 GA₃ 均呈现梯度上升趋势 (图 6: A、C), CTK 呈现出前期缓慢下降后期显著上升的趋势 (图 6: B)。第 17 代时的 IAA、GA₃ 含量显著高于第 3 代, 而 CTK 含量变化不显著。

2.2.5 端粒酶逆转录酶活性

端粒酶逆转录酶 (TERT) 的活性如图 7 所示,

随着继代次数的增加而显著下降, 同时相关性分析发现, TERT 活性与代数呈显著负相关。

2.3 转录组分析

2.3.1 差异表达基因筛选

本研究筛选 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$ 的基因为显著差异表达基因, 并进行了火山图分析 (图 8)。火山图中每一个点表示一个基因, 越

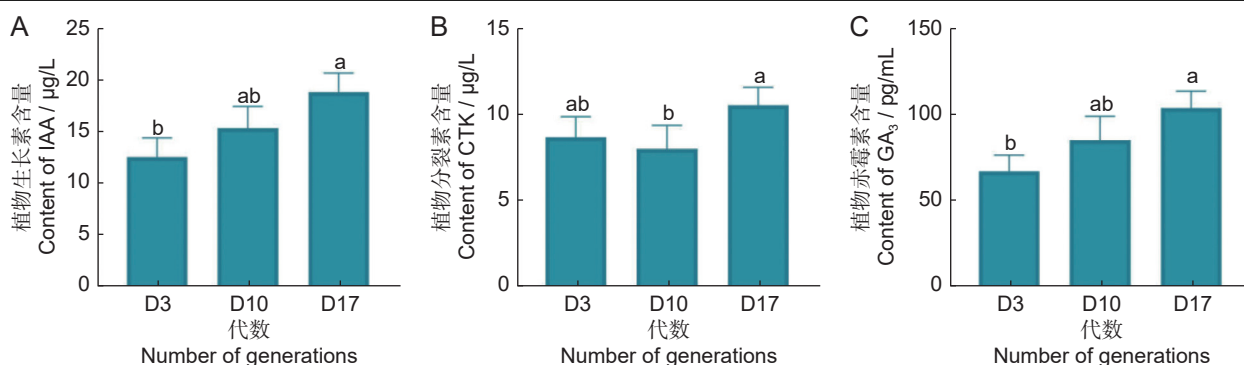
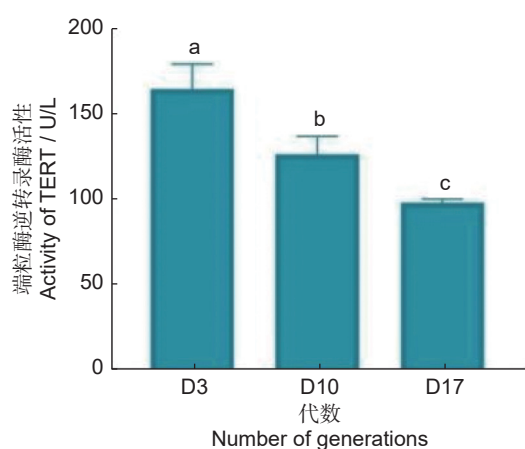


图 6 不同继代次数茅苍术组培苗的植物内源激素含量

Fig. 6 Plant endogenous hormone content in tissue culture seedlings from different generations

图 7 不同继代次数茅苍术组培苗的端粒酶逆转录酶活性
Fig. 7 TERT activity in tissue culture seedlings from different generations

靠近两端的基因，差异程度越大。本研究发现，随着继代次数的增加，差异基因数目增加，且分布更发散，显著差异增加，说明长期的无性繁殖，出现大量差异表达基因。

2.3.2 差异表达基因富集分析

GO 富集分析结果显示 (附图 1¹⁾)，组培苗各代差异表达基因在生物过程功能区富集数目最多的 term 是“防御反应 (Defense response, GO: 0006952)”和“信号转导 (Signal transduction, GO: 0007165)”。在细胞组分功能区富集数目最多的 term 是“细胞膜 (Integral component of membrane, GO: 0016021)”、“细胞核 (Nucleus, GO: 0005634)”和“细胞质 (Cytoplasm, GO: 0005737)”。在分子功能区下，“ATP 结合 (ATP binding, GO: 0005524)”、“金属离

子结合 (Metal ion binding, GO: 0046872)”和“DNA 结合 (DNA binding, GO: 0003677)”最为富集。

KEGG 富集通路分析发现 (附图 2²⁾)，显著富集且数目最多的 pathway 是代谢途径 (Metabolic pathways)，次生代谢物的生物合成 (Biosynthesis of secondary metabolites)，植物激素信号转导途径 (Plant hormone signal transduction)，MAPK 信号通路-植物 (MAPK signaling pathway - plant)。

2.3.3 差异基因代谢途径分析

根据 KEGG 富集结果对比基因表达差异，选取 *P* 值最小的 14 条通路分析组培苗经历持续的继代培养后基因表达差异 (表 1)。在长期的组织继代培养下，茅苍术组培苗的初生代谢、次生代谢以及信号转导途径均受到影响。初生代谢途径涉及光合作用-天线蛋白、光合作用、光合生物的碳固定等，次生代谢途径涉及次生代谢物的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、 α -亚麻酸代谢、苯丙素生物合成、类黄酮生物合成、单萜类生物合成、鬼臼毒素生物合成等，信号转导途径涉及 MAPK 信号通路-植物、植物激素信号转导等。

2.3.3.1 脂肪酸代谢途径

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 是许多代谢途径的关键节点。柠檬酸循环是绝大多数生物体的主要分解代谢途径，是糖、脂质以及氨基酸代谢的最后共同途径，是新陈代谢的中心环节，为细胞生理活动提供能量^[13]。脂肪酸降解途径 (ko00071)

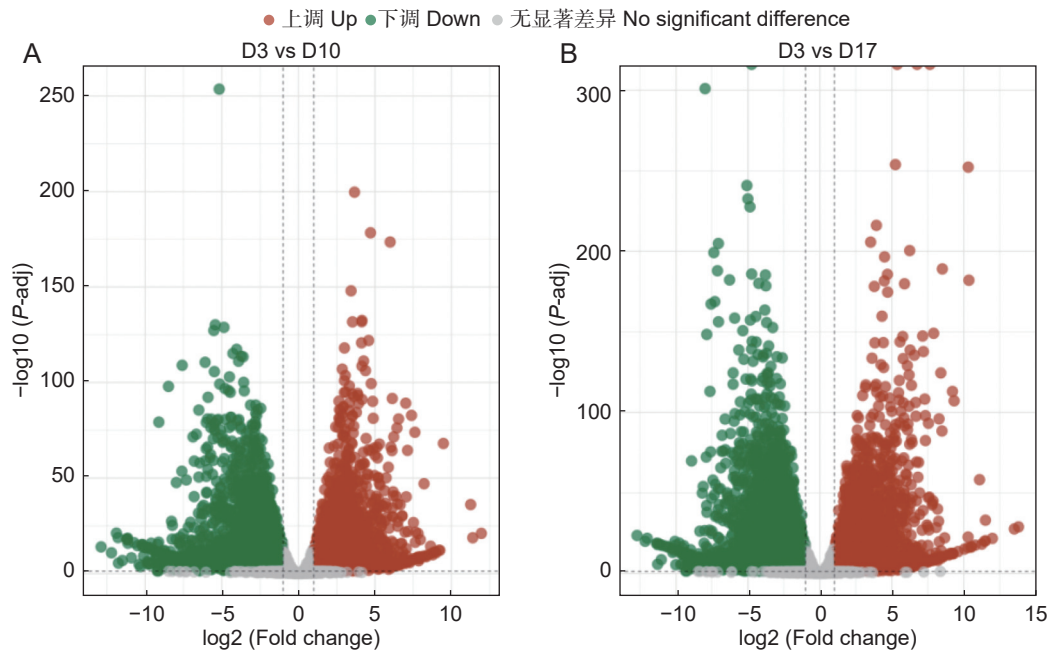


图 8 不同继代次数茅苍术基因表达差异比较

Fig. 8 Comparison of gene expression differences in tissue culture seedlings from different generations

表 1 不同代数差异基因代谢通路

Table 1 Differential gene metabolic pathways

路径编号 Pathway ID	相关通路 Relative pathway	D3 vs D10		D3 vs D17	
		下调 Down	上调 Up	下调 Down	上调 Up
ko04016	MAPK 信号通路-植物	98	156	123	141
ko01110	次生代谢物生物合成	523	400	538	448
ko00196	光合作用-天线蛋白	1	28	0	32
ko01100	代谢通路	842	668	892	728
ko00195	光合作用	5	57	8	50
ko01040	不饱和脂肪酸生物合成	45	22	61	0
ko00592	α-亚麻酸代谢	36	29	–	–
ko04075	植物激素信号转导通路	120	89	132	97
ko00940	苯丙素类生物合成	80	25	–	–
ko00941	类黄酮的生物合成	20	25	21	22
ko04712	昼夜节律-植物	–	–	18	32
ko00902	单萜类生物合成	–	–	17	16
ko00999	鬼臼毒素生物合成	24	41	28	50
ko00710	光合生物的碳固定	36	38	31	37

中（附图 3¹⁾），酰基辅酶 A 氧化酶、烯酰辅酶 A 水合酶、3-羟酰辅酶 A 脱氢酶、乙酰辅酶 A 酰基转移酶 1 表达下调，可能抑制脂肪酸分解代谢，乙酰辅酶 A 合成降低，柠檬酸循环受阻，脂肪酸的分解代谢受到严重影响。

2.3.3.2 萜类骨架合成途径

萜类骨架合成（ko00900）途径中（附图 4²⁾），随着继代次数的增加，MVA 途径中的羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、磷酸甲羟戊酸激酶、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶等多种蛋白酶表达下调，其中羟甲

1~2）如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站（<http://www.plantscience.cn>）查看本期文章。

基戊二酰辅酶 A 还原酶是 MVA 途径第一个限速酶。MEP 途径差异基因表达则较为复杂, 上游与下游部分多种酶表达上调, 但中游部分多种酶表达下调, 如异戊烯基二磷酸 δ 异构酶、异戊二烯合酶等。

2.3.3.3 激素信号转导途径

植物激素信号转导路径 (ko04075) 中 (附图 5^[1]), 在生长素信号转导通路上, TIR1 节点上有 1 个差异表达基因上调, TIR1 是植物体内响应生长素的信号蛋白, 能抑制生长素的运输能力, 其对于植物抵抗胁迫作用具有重要作用^[14]。在赤霉素信号转导上, GID2 节点有 1 个差异表达基因下调, GID2 是 GA 信号转导途径中的正向调节因子之一, 在泛素化途径中帮助降解 DELLA 蛋白, 消除其对植物生长的抑制作用, 从而调节植物株高^[15]。在脱落酸信号转导中, ABF 节点有 4 个基因表达上调, ABF 蛋白参与了植物生长发育的多个阶段。在乙烯信号转导中, SIMKK 和 EIN1 节点各有 1 个差异基因, EIN2 节点有 3 个差异基因表达下调, 其中 EIN2 是乙烯信号转导过程中起正调控作用的关键因子, 同时也是核心调节因子^[16]。因此, 长期继代培养影响了苍术多种激素信号转导途径的基因表达。

3 讨论

在植物的生长发育过程中, 生物量、株高等特征都是判断植物生长状态的重要指标, 而叶片的大小和形状直接影响植物对光能的吸收^[17]。本研究通过茅苍术种子形成的根茎诱导出的组培苗在不断继代培养的过程中, 总体表现出增殖率、生物量、株高、叶长宽比逐渐下降, 证实长期的无性繁殖下出现了退化现象。

叶绿素荧光参数能快速、精准地反映植物对光能的吸收和利用状况^[18]。随着继代次数的增加, F_o 、 F_m 降低, 表明在光反应中非光化学能量耗散增加, PS II 反应中心受到损伤, 而 F_v/F_m 值升高预示 PS II 反应中心原初光能转化效率提升, 表明长期的继代培养影响了 PS II 反应中心活性, 但具体作用方式不明。可溶性糖可以调控植物的生长和发育; 可溶性蛋白可以调控细胞内代谢活动。

同时, 它们还能维持植物渗透压平衡, 其含量的变化也体现了植物抗逆性的强弱^[8]。在本研究中, 可溶性糖含量不断增加, 说明在继代培养的过程中, 可溶性糖不断积累, 影响组培苗的渗透压平衡与生长发育。可溶性蛋白含量先增加后降低, 说明在继代后期, 茅苍术组培苗可能受到胁迫增加, 蛋白的合成与代谢受阻, 代谢紊乱, 组培苗抗逆性下降。在逆境条件下, 植物体内会产生大量活性氧 (如 O_2^- 和 H_2O_2), 机体通过提高抗氧化酶活性如 SOD、CAT、POD 等, 来分解活性氧以维持自身的正常代谢, 而 MDA 是生物体内脂质过氧化反应的终产物, 其含量间接反映组织过氧化损伤程度^[19-21]。茅苍术组培苗的胁迫物质 MDA 与 H_2O_2 含量显著上升, 抗氧化酶活性均显著上升, 表明虽然继代过程中抗氧化酶活性提高以清除过量的活性氧, 但是胁迫物含量已经超过植物自身的清除能力, 产生大量的过氧化物, 形成了一定程度的氧化胁迫, 损伤细胞结构。植物内源激素是植物体内调节自身生理代谢的活性物质, 参与并调控植物整个生长发育过程^[22]。本研究中第 17 代时 IAA、CTK 与 GA_3 含量均显著高于第 3 代, 说明长期的继代培养使植物内源激素积累, 激素比例失衡, 导致植物体内代谢受阻, 生长发育减缓, 形态特征发生变化。端粒酶逆转录酶作为端粒酶核心蛋白亚基之一, 在体内具有维持端粒长度, 延缓植物衰老退化的作用^[23]。而茅苍术组培苗 TERT 活性随着代数增加而下降, 进一步证明长期的无性繁殖引起了茅苍术细胞的退化。

转录组分析结果表明, 不同代数的茅苍术组培苗基因表达差异较大。随着继代次数的增加, 脂肪酸代谢途径大量蛋白酶表达下调, 导致柠檬酸循环受阻, 影响苍术体内代谢活性; 在萜类骨架合成通路中, MVA 途径多种蛋白酶表达下调, 萜类骨架合成重要中间产物乙酰辅酶 A 的合成受阻, 抑制茅苍术萜类物质的合成。在激素信号转导途径中, 多种激素信号转导途径基因的差异表达, 导致激素运输能力受阻, 抑制植物各组织的生长分化。此外, 激素信号转导途径基因差异表达可能不仅影响苍术的形态发生能力, 还能调控植物的光合作用、营养物质积累与运输、抗氧化

1) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

系统等各项生理生化过程。

长期继代培养将影响组培苗生理生化过程,但是至今为止尚无茅苍术组培苗的相关研究,现有研究仅探究了茅苍术试管苗在长期继代培养过程中产生的基因表达变化^[10],并未进行系统全面的分析。本文首次对茅苍术组培苗的退化现象进行鉴定,揭示了长期继代培养下生理生化与分子水平的变化,并探讨了茅苍术无性繁殖退化的可能机制。本研究中,茅苍术组培苗在经历连续十余次的继代培养后,发生了形态特征上的退化,植物体胁迫水平增加,也发生生理水平上的退化。同时在长期无性繁殖下,茅苍术组培苗出现基因表达差异,初生代谢、次生代谢与激素信号转导途径等均受到影响。

本课题组前期研究初步断定苍术组培苗的退化的拐点位于10代之后,对茅苍术第3、10、17代组培苗的形态、生理、生化和转录组的变化进行了全面分析,进一步确定了退化拐点处于该区域。因此,后续应该深入拐点前后茅苍术组培苗形态特征、生理生化与分子水平指标的变化,并联系代数进行相关性分析,实现茅苍术代数鉴定,之后对次生代谢产物含量进行测定,并将其与相关基因表达变化建立关联,确定茅苍术质量等级优劣的代数范围,促进茅苍术无性繁殖培养与质量控制标准化。

参考文献:

- [1] 刘玲梅, 汤浩茹, 刘娟. 试管苗长期继代培养中的形态发生能力与遗传稳定性[J]. 生物技术通报, 2008(5): 22-27.
Liu LM, Tang HR, Liu J. Morphogenetic capacity and genetic stability of tissue in vitro cultures in long-term subculturing[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(5): 22-27.
- [2] 薛美凤, 郭余龙, 李名扬, 裴炎. 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 19-21.
Xue MF, Guo YL, Li MY, Pei Y. Effects of long-term subculture on embryogenesis capability of cotton callus and somatic variation[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2002, 15(4): 19-21.
- [3] 王艳丽, 孙婷玉, 沈李元, 吴小芹, 叶建仁, 朱丽华. 继代培养时间对抗性黑松体胚发生的影响[J]. 西南林业大学学报, 2019, 39(2): 78-85.
Wang YL, Sun TY, Shen LY, Wu XQ, Ye JR, Zhu LH. Effects of subculture time on somatic embryogenesis of nematode-resistant *Pinus thunbergii*[J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2019, 39(2): 78-85.
- [4] Wang X, Gao YG, Zang P, Zhang G, Yang XY, Liu Q. Decrease in beneficial bacteria and increase in harmful bacteria in *Gastrodia* seedlings and their surrounding soil are mainly responsible for degradation of *Gastrodia* asexual propagation[J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1334958.
- [5] 都晓龙, 孙春玉, 张美萍, 王义. 继代次数对吉梗88愈伤组织生理生化指标及细胞形态的影响[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(5): 155-158.
Du XL, Sun CY, Zhang MP, Wang Y. Effects of transgenerational times on rice (Jijing88) callus physio-biochemistry indexes and the cell morphology[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(5): 155-158.
- [6] 王胤, 姚瑞玲. 继代培养中马尾松生根能力及其与内源激素含量的相关分析[J]. 林业科学, 2020, 56(8): 38-46.
Wang Y, Yao RL. Rooting capacity of *Pinus massoniana* and the correlations endohormones levels during subculture[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(8): 38-46.
- [7] 董静, 段秋笛, 徐艳红, 周美琪, 梁宏伟. 长期继代培养过程中楸树愈伤组织的分化能力[J]. 西北农业学报, 2024, 33(2): 373-379.
Dong J, Duan QD, Xu YH, Zhou MQ, Liang HW. Differentiation ability of *Catalpa bungei* callus in long term subculture[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2024, 33(2): 373-379.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 168.
- [9] Zhao JH, Sun CZ, Shi FY, Ma SS, Zheng JS, et al. Comparative transcriptome analysis reveals sesquiterpenoid biosynthesis among 1-, 2- and 3-year old *Atractylodes chinensis*[J]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21(1): 354.
- [10] 高真. 茅苍术工厂化育苗技术体系及试管苗继代遗传稳定性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2022: 3.
- [11] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 202-204.
- [12] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 190-191.
- [13] Thomas VC, Kinkead LC, Janssen A, Schaeffer CR, Woods KM, et al. A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during β -lactam stress[J]. *mBio*, 2013, 4(4): e00437-13.
- [14] 李听儒, 高宇, 苗淑楠, 李腾, 董书言, 等. 油莎豆生长素受体 *TIR1* 基因家族鉴定及响应盐胁迫和外源 IBA 的表达分析[J]. 热带作物学报, 2023, 44(5): 894-904.
Li XR, Gao Y, Miao SN, Li T, Dong SY, et al. Identification of auxin receptor gene *TIR1* family in *Cyperus esculentus* and the expression analysis in response to salt stress and exogenous IBA[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023,

- 44 (5): 894–904.
- [15] 王恩莹, 晁琳珂, 郝素晓, 卢艳芬, 姚允聪. 苹果矮化中间砧“SH6”中 *GID2* 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49 (9): 104–108, 112.
- Wang EY, Chao LK, Hao SX, Lu YF, Yao YC. Cloning and bioinformatics analysis of *GID2* gene in apple dwarfing interstock “SH6” [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49 (9): 104–108, 112.
- [16] 吴丹丹, 胡容, 赵强. EIN2 蛋白的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2023, 59 (9): 1694–1700.
- Wu DD, Hu R, Zhao Q. Advances in research on EIN2 protein [J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59 (9): 1694–1700.
- [17] Tsukaya H. Leaf shape: genetic controls and environmental factors [J]. *Int J Dev Biol*, 2005, 49 (5-6): 547–555.
- [18] 邓平, 吴敏, 林丁, 赵英, 陆海娇, 岑英. 干旱-复水对桂西北喀斯特地区青冈栎幼苗叶片光合能力、叶绿素荧光和显微结构的影响 [J]. 西北植物学报, 2024, 44 (1): 63–76.
- Deng P, Wu M, Lin D, Zhao Y, Lu HJ, Cen Y. Effects of drought-rehydration on photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and microstructure of *Cyclobalanopsis glauca* seedling leaves in Karst area of northwest Guangxi [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44 (1): 63–76.
- [19] Zafari S, Niknam V, Musetti R, Noorbakhsh SN. Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*) [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34 (2): 561–568.
- [20] Zhao FY, Liu XX, Chen C, Cheng ZH, Wang WP, Yun JM. Successive mycelial subculturing decreased lignocellulase activity and increased ROS accumulation in *Volvariella volvacea* [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 997485.
- [21] Wu W, Wan XJ, Shah F, Fahad S, Huang JL. The role of antioxidant enzymes in adaptive responses to sheath blight infestation under different fertilization rates and hill densities [J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 502134.
- [22] 莫秋霞. 羽枝青藓的继代扩繁效率演变特征与定植适宜性代际差异 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023: 49.
- [23] De la Torre Espinosa Z, de Dios EÁ, Sánchez Teyer F, Castano E. AteqTERT expression and specific tissue activity in a 2-year-old complete plant in *Agave tequilana* in field conditions [J]. *Braz J Bot*, 2020, 43 (4): 869–881.

(责任编辑: 周媛)