

半夏试管块茎延缓生长保存技术

张延红^{1,2} 张亚萍¹ 王琳佳¹ 何春雨^{1,2,3*} 郭清毅^{1,2,3}

(1. 甘肃中医药大学药学院,兰州 730000; 2. 天然药用种质资源挖掘与新品种选育协同创新中心,兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学杏林百草园,兰州 730000)

摘要 为建立半夏(*Pinellia ternata*)试管块茎延缓生长保存技术体系,该研究采用不同蔗糖质量浓度、蔗糖和甘露醇配比、低温方法保存半夏试管块茎,360 d后恢复生长,观察统计其生长指标,并采用石蜡组织切片技术研究块茎中淀粉粒的变化,采用ISSR-PCR和RAPD分子标记技术检测保存后再生植株的遗传稳定性。结果表明:成熟块茎接种在新鲜的1/2MS+30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇的培养基上4℃保存360 d,恢复生长后块茎的成苗率高达96.67%,植株生长良好,保存效果最好;90 g·L⁻¹蔗糖处理的块茎恢复生长后成苗率高达90.00%,但因渗透压过高生长缓慢。成熟块茎在原培养基1/2MS+30 g·L⁻¹蔗糖中4℃保存360 d,恢复生长后块茎的成苗率最低,仅为36.70%。组织学研究表明,保存后死亡的块茎,叶原基少,细胞中几乎无淀粉粒,无黏液细胞。成苗率高和成苗率低的处理恢复生长的块茎中均储藏有大量的淀粉粒,但成活率高的处理茎尖叶原基层数更多,黏液细胞数量较少,植株生长更旺盛。采用分子标记技术共扩增条带1140条,均未检测到变异条带,表明延缓生长保存后再生植株遗传稳定。该研究建立了简便、高效的半夏延缓生长保存技术,为半夏种质资源中短期保存提供了一条可行途径。

关键词 半夏;试管块茎;延缓生长;再生植株;淀粉粒分布;遗传稳定性

中图分类号:Q944.5 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2026.01.009

Conservation Technology of *In Vitro* Tubers of *Pinellia ternata* by Delayed Growth

ZHANG Yanhong^{1,2} ZHANG Yaping¹ WANG Linjia¹ HE Chunyu^{1,2,3*} GUO Qingyi^{1,2,3}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 2. Collaborative Innovation Center of Natural Medicine Germplasm Resources Discovering and New Cultivars Breeding, Lanzhou 730000; 3. Xinglin Baicao Garden, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Abstract To establish a technology system for the delayed growth preservation of *Pinellia ternata* tubers *in vitro*, this study evaluated different sucrose mass concentrations, the ratio of sucrose to mannitol, and low-temperature methods to preserve the *in vitro* tubers. After 360 days, the tubers were allowed to resume growth, and the growth indicators were observed and statistically analyzed. Starch grain dynamics in the tubers were examined using paraffin sectioning technique. The genetic stability of regenerated plants after preservation was assessed using ISSR-PCR and RAPD molecular markers. Mature tubers were inoculated on fresh 1/2MS+30 g·L⁻¹ sucrose+60 g·L⁻¹ mannitol medium and stored at 4℃ for 360 days, the sprouting rate of tubers after recovery growth was as high as 96.67%, and the plants grew well with the best preservation effect. Tubers cultured on medium containing 90 g·L⁻¹ sucrose, showed reduced growth despite a sprouting rate of 90.00%, likely due to the excessively high osmotic pressure. When mature tubers were stored in the old medium of 1/2MS+30 g·L⁻¹ sucrose at 4℃ for 360 days, the sprouting rate of tubers after recovery growth was the lowest, only 36.70%. Histological studies showed that in the dead tubers after preservation, there were a few leaf primordia, almost

基金项目:甘肃省高等学校产业支撑计划项目(2020C-09);甘肃省联合基金项目(24JRRA877);甘肃省重点研发计划项目(24YFNA007);甘肃中医药大学成果转化培育项目(2023CGZH-18);甘肃中医药大学教学改革项目(ZHXM-2021-17)。

第一作者简介:张延红(1977—),女,博士,副教授,主要从事药用植物组织培养与资源保护研究。

* 通信作者:E-mail:hchy456789@163.com。

收稿日期:2025年6月24日。

no starch grains in the cells, and no mucilage cells. Both the high sprouting rate and low sprouting rate treatments had a large amount of starch grains stored in the tubers after recovery growth, but the treatment with high survival rate had more layers of leaf primordia in the stem tips and fewer mucilage cells, and the plants grew more vigorously. A total of 1 140 bands were amplified using molecular marker techniques, and no variant bands were detected, indicating genetic stability of regenerated plants after delayed growth preservation. This study established a simple and efficient technique for the delayed growth preservation of *P. ternata in vitro* tubers, providing a feasible approach for short-term preservation of *P. ternata* germplasm.

Key words *Pinellia ternata*; *in vitro* tuber; delayed growth preservation; regenerated plants; starch granule distribution; genetic stability

半夏(*Pinellia ternata*)为天南星科(Araceae)多年生草本植物,以干燥的地下块茎入药,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结等多种功效^[1],是我国常用大宗中药材之一,距今已有2 000多年的药用历史。近年来研究^[2]发现,半夏主要化学成分包括核苷类、生物碱类、有机酸类、甾醇类成分及挥发油等,具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗癫痫等多种重要作用。半夏需求量逐年增多,由于环境恶化和不节制地采挖,野生资源正逐渐减少。因此,半夏人工种植生产已成为满足市场需求的主要途径^[3]。半夏主要依靠珠芽进行无性繁殖,种质退化及混杂问题非常严重^[3]。种质资源是植物育种的物质基础,同时也是进行植物生物学研究的重要材料,因此开展半夏种质资源保存技术研究具有重要的价值。无性繁殖作物种质资源主要采用田间保存和延缓生长保存。田间保存需要占用大量的土地及人力资源,保存成本高,并且在保存过程中容易遭受各种自然灾害的侵袭。延缓生长保存通过改变离体培养的培养基和培养条件使培养物的生长减慢,又不致死亡,以达到中短期保存的目的。该保存方法不仅可以节省土地及劳动力,保存方法也比较简单,而且能够在保存过程中不受病毒等微生物的危害^[4]。采用延缓生长保存时常用的措施主要有3种:提高培养基的渗透压、向培养基中加入生长延缓剂和降低培养的温度^[4]。目前,延缓植物生长保存技术已在月季(*Rosa chinensis*)^[5]、百合(*Lilium*)^[6]、菊花(*Chrysanthemum*)^[7]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[8]等多种植物的种质资源保存中广泛应用。种质资源保存后的植株再生能力及其遗传稳定性是该技术能否应用于实践的关键所在。课题组前期建立了半夏试管块茎快速繁殖技术^[9],在此基础上,本研究采用低温和高渗透压方法保存试管块茎,并进一步对试管块茎延缓生长保存后的再生能力和遗传稳定性进行分析,旨在为半夏种质资源中短期保存提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

半夏试管苗由甘肃中医药大学植物组织培养实验室提供。以半夏试管苗1 cm长的叶柄段作为外植体,接种在1/2MS+8 g·L⁻¹琼脂、pH=5.8的基本培养基中,放置在人工气候箱(LRH-550-G,中国)中25 °C黑暗培养,诱导获得成熟块茎,即块茎形态完整但未萌发,成熟块茎萌发成苗即得到一代试管苗和一代块茎。

1.2 试验方法

1.2.1 成熟块茎低温保存

成熟块茎连同原有培养基放置在冰箱中4 °C保存360 d。保存期间观察统计茎尖萌动率、萌动茎尖的状态、生根率、成苗率、块茎的状态及培养基的状态。

1.2.2 一代试管苗(带块茎)低温保存

成熟块茎第1次萌发成苗(一代试管苗)后连同原有培养基放置在冰箱中4 °C保存360 d。低温保存期间,观察统计新鲜叶柄数量、干枯叶柄数量、再次萌动的茎尖数量、再次萌动的茎尖状态、块茎状态及培养基状态。

1.2.3 高渗透压结合低温保存成熟块茎

将成熟块茎转接到含有不同质量浓度的蔗糖(30 g·L⁻¹、60 g·L⁻¹、90 g·L⁻¹)及蔗糖与甘露醇配比使用(30 g·L⁻¹蔗糖+20 g·L⁻¹甘露醇、30 g·L⁻¹蔗糖+40 g·L⁻¹甘露醇、30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇、60 g·L⁻¹蔗糖+20 g·L⁻¹甘露醇、90 g·L⁻¹蔗糖+20 g·L⁻¹甘露醇)的1/2MS+8 g·L⁻¹琼脂、pH=5.8的培养基中。放置在冰箱中4 °C保存360 d。

1.2.4 再生植株形态学指标观察与测定

将延缓生长保存后的块茎接种在1/2MS+8 g·L⁻¹琼脂、pH=5.8的培养基上,在25 °C、光照强度1 500 lx、光照时间12 h·d⁻¹条件下恢复生长,观察统计不同处理保存后成苗块茎数量、恢复培养后

成苗率、叶柄数量/每块茎、平均叶柄长度及叶色。

1.2.5 再生植株分子水平遗传稳定性检测

1.2.5.1 基因组DNA的提取及检测

从恢复生长后存活率最高的2个处理(90 g·L⁻¹蔗糖和30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇)中随机取10株半夏试管苗的嫩叶,采用改良的CTAB法^[10]提取总DNA,取2 μL DNA用8 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测,DNA样品于-20℃保存备用。

1.2.5.2 RAPD及ISSR-PCR体系扩增

本试验从12条RAPD和ISSR引物中筛选出6条扩增条带清晰、多态性好及稳定性好的引物用于遗传稳定性分析,根据其理论退火温度筛选出最佳退火温度(表1)。PCR扩增体系^[5]为总体积25 μL,内含12.5 μL 2×Taq PCR Master Mix II(含染液)溶液、9.5 μL ddH₂O、1 μL引物、2 μL DNA混合均匀。扩增程序:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,50.2~60.6℃退火45 s,72℃延伸2 min,35个循环,结束后72℃延伸7 min,4℃保存。扩增完成后,在15 g·L⁻¹的琼脂糖凝胶上取5 μL扩增产物进行电泳,每80 mL加入2 μL绿色荧光核酸染料,电泳缓冲液为0.5×TBE,DL 2000 Marker作为分子量标准,电压110 V,电泳90 min,电泳结束后在凝胶成像仪上成像和拍照。

1.2.6 淀粉粒组织化学定位

采用石蜡组织切片技术和改良的高碘酸-希夫试剂进行制片和多糖染色并在显微镜下进行观察拍照。分析对比30 g·L⁻¹蔗糖处理保存后死亡的块茎和恢复生长的块茎及成苗率最高处理(30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇)恢复生长块茎的淀粉数量和分布部位及黏液细胞数量的差异。

表1 RAPD和ISSR引物序列及最佳退火温度

Table 1 Sequence of RAPD and ISSR primers and an optimum annealing temperature

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	退火温度 Annealing temperature/°C
Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	53.0
Em13	GACTGCGTACGAATTCTG	50.5
Lect7	GTTGCTGCTCGAGAGACGA	57.9
881	GGGTGGGGTGGGGTG	60.6
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	50.2
854	TCTCTCTCTCTCTCRG	56.0

1.3 数据处理

本试验采用单因素试验设计,每个处理5瓶,每个重复6个外植体,利用Excel 2016软件进行数据统计,IBM SPSS 26.0 Duncan新复极差法进行方差分析。对扩增的DNA电泳条带进行人工识别图谱条带,电泳图中有条带图谱记为“1”,无条带记为“0”,同一处理间出现条带的增多或缺失为变异条带。

2 结果与分析

2.1 低温黑暗条件下半夏成熟块茎的保存效果

成熟块茎连同原培养基于4℃黑暗条件下保存过程中发现,块茎生长速度十分缓慢(表2),40 d内芽尖没有萌动现象,保存80 d时萌动率为10.0%,萌动的芽尖细弱,呈灰白色;保存160 d后,芽尖萌动率达到26.7%,新萌动的茎尖状态同80 d的状态,前期萌动的茎尖部分干枯没有正常

表2 低温保存过程中成熟块茎的生长动态变化

Table 2 Dynamic changes of growth of mature tubers during cryopreservation

保存时间 Preservation time/d	保存块茎数量 Number of preserved tubers	芽尖萌动数量 Number of bud tips sprouting	萌动率 Sprouting rate/%	生根数量 Number of rooting	生根率 Rooting rate/%	成苗数量 Number of seedling	块茎状态 Status of tubers
40	30	0	0	0	0	0	饱满
80	30	3	10.0	0	0	0	饱满
120	30	4	13.3	2	6.7	0	饱满
160	30	8	26.7	5	16.7	0	略干缩
200	30	8	26.7	5	16.7	0	略干缩
240	30	8	26.7	5	16.7	0	略干缩
280	30	8	26.7	5	16.7	0	略干缩
320	30	8	26.7	5	16.7	0	略干缩
360	30	8	26.7	5	16.7	0	略干缩

生长成苗,此时培养基出现轻微干缩;保存 240 d 时,萌发的茎尖便全部干枯,且没有新的茎尖产生,此时培养基干缩严重(图 1A)。保存 360 d 后将块茎进行恢复培养,1 个月后,36.70% 的块茎萌发成苗,平均每个块茎抽生 3.27 个叶柄(图 2A)。

2.2 低温黑暗条件下半夏一代试管苗(带块茎)的保存效果

将半夏一代试管苗(带块茎)连同原培养基进行低温黑暗保存发现,保存前期叶柄干枯速度很慢(表 3),前 40 d 叶柄干枯率为 7.06%,说明试管

苗有较强的抗寒性,并且由于所处环境温度较低,培养基失水速度很慢,仍能够为试管苗提供营养和水分。但随着保存时间的延长,培养基失水加剧,同时叶柄的干枯速度加快,保存 120 d 时叶柄干枯率迅速增加至 45.88%,保存 200 d 时,叶柄已经全部干枯且此时培养基失水比较严重(图 1B),块茎的叶柄干枯后未见再次萌动。保存结束后将块茎进行恢复培养,培养 1 周后茎尖萌动率为 33.30%,1 个月后,50.00% 的块茎萌发成苗,平均每个块茎抽生 2.20 个叶柄(图 2B)。

表 3 低温保存过程中一代试管苗的形态变化

Table 3 Morphological changes of one generation of test tube seedlings during cryopreservation

保存时间 Preservation time/d	保存植株数量 Number of preserved plants	新鲜叶柄数量 Number of fresh petioles	干枯叶柄数量 Number of withered petioles	叶柄干枯率 Withered petiole rate/%
40	30	79	6	7.06
80	30	73	12	14.12
120	30	46	39	45.88
160	30	21	64	75.29
200	30	0	85	100.00
240	30	0	85	100.00
280	30	0	85	100.00
320	30	0	85	100.00
360	30	0	85	100.00



A. 成熟块茎低温保存后;B. 一代试管苗(带块茎)低温保存后;C. 成熟块茎高渗透压(30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇)结合低温保存后。

A. After cryopreservation of mature tubers; B. After cryopreservation of one generation of test tube seedlings; C. After high osmotic pressure(30 g·L⁻¹ sucrose+60 g·L⁻¹ mannitol) combined with cryopreservation of mature tubers.

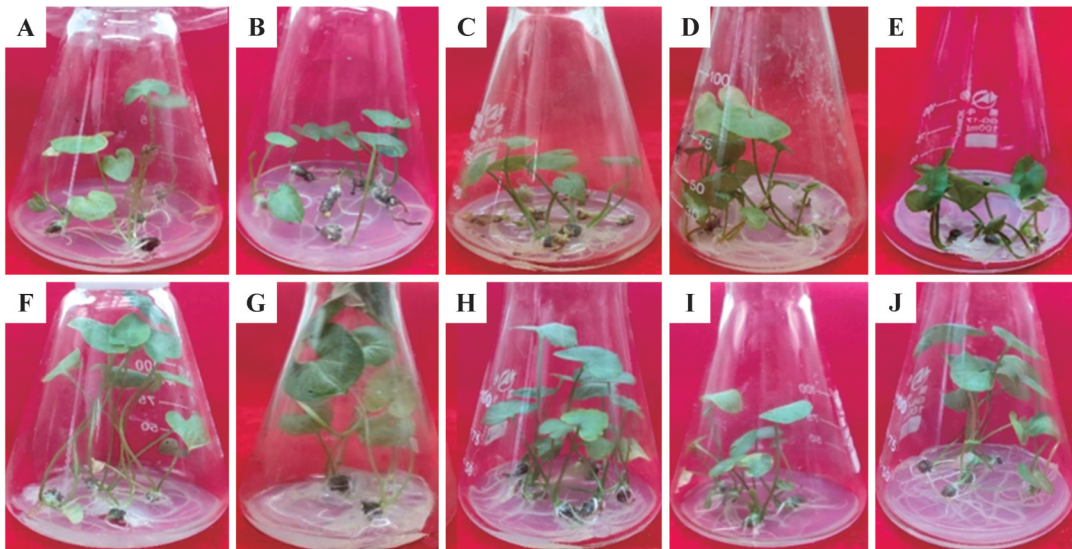
图 1 低温黑暗保存 360 d 后不同处理的块茎及培养基状态

Fig.1 Status of tubers and media with different treatments after 360 d preservation in low-temperature and dark conditions

2.3 低温黑暗条件下半夏成熟块茎高渗透压保存效果

将半夏成熟块茎转接在含不同质量浓度蔗糖或同时添加蔗糖和甘露醇的培养基中,于 4 °C 黑暗条件下保存 360 d 后进行恢复培养,块茎的成苗率、平均叶柄数量及叶柄长度均存在一定差异(表 4,图 2C~2J)。3 种蔗糖培养基中保存的成熟块茎恢复培养后,块茎成苗率及平均叶柄数量随着保存蔗糖质量浓度的升高总体呈上升趋势,平

均叶柄长度则显著降低:30 g·L⁻¹蔗糖培养基中保存块茎的成苗率为 76.67%,平均叶柄数量 2.81 个,平均叶柄长度 4.75 cm;90 g·L⁻¹蔗糖中保存块茎的成苗率为 90.00%,平均叶柄数量 3.05 个,而叶柄长度却显著降低至 3.05 cm。其原因是高质量浓度蔗糖条件下培养基中渗透压较高,结合低温条件减缓块茎的生理生化代谢,从而有效维持块茎活力,提高其恢复生长后的成苗率。



A~J 分别为成熟块茎低温保存、试管苗低温保存、30 g·L⁻¹蔗糖、60 g·L⁻¹蔗糖、90 g·L⁻¹蔗糖、30 g·L⁻¹蔗糖+20 g·L⁻¹甘露醇、30 g·L⁻¹蔗糖+40 g·L⁻¹甘露醇、30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇、60 g·L⁻¹蔗糖+20 g·L⁻¹甘露醇、90 g·L⁻¹蔗糖+20 g·L⁻¹甘露醇保存后恢复培养。

A~J were mature tubers cryopreserved, test tube seedlings cryopreserved, 30 g·L⁻¹ sucrose, 60 g·L⁻¹ sucrose, 90 g·L⁻¹ sucrose, 30 g·L⁻¹ sucrose+20 g·L⁻¹ mannitol, 30 g·L⁻¹ sucrose+40 g·L⁻¹ mannitol, 30 g·L⁻¹ sucrose+60 g·L⁻¹ mannitol, 60 g·L⁻¹ sucrose+20 g·L⁻¹ mannitol, 90 g·L⁻¹ sucrose+20 g·L⁻¹ mannitol preserved and then restored to culture, respectively.

图2 延缓生长不同处理恢复培养后的植株生长情况

Fig.2 State of plant growth by different pretreatments of mature tubers after restoring culture

表4 低温黑暗条件下半夏成熟块茎高渗透压保存360 d后恢复培养的效果

Table 4 Effect of high osmotic pressure preservation on recovery culture of mature tubers under low-temperature conditions for 360 d

高渗透压处理 High osmotic pressure treatment	保存块茎数量 Number of preserved tubers	保存后成苗块茎数量 Number of seedling after tubers preservation	恢复培养后成苗率 Seedling rate after recovery culture/%	每块茎的叶柄数量 Number of petioles per tuber	叶色 Leaf color	平均叶柄长度 Average length of petiole/cm
30 g·L ⁻¹ 蔗糖	30	0	76.67 ^c	2.81 ^{bc}	绿色	4.75 ^{ab}
60 g·L ⁻¹ 蔗糖	30	0	76.67 ^{bc}	2.87 ^b	绿色	3.72 ^{cd}
90 g·L ⁻¹ 蔗糖	30	0	90.00 ^{ab}	3.05 ^{ab}	绿色	3.05 ^d
30 g·L ⁻¹ 蔗糖+20 g·L ⁻¹ 甘露醇	30	0	70.00 ^{cd}	3.46 ^a	绿色	4.21 ^{bc}
30 g·L ⁻¹ 蔗糖+40 g·L ⁻¹ 甘露醇	30	0	73.33 ^{cd}	3.10 ^{ab}	绿色	3.36 ^{cd}
30 g·L ⁻¹ 蔗糖+60 g·L ⁻¹ 甘露醇	30	0	96.67 ^a	3.44 ^a	绿色	4.24 ^{bc}
60 g·L ⁻¹ 蔗糖+20 g·L ⁻¹ 甘露醇	30	0	60.00 ^{cd}	2.32 ^c	绿色	3.52 ^{cd}
90 g·L ⁻¹ 蔗糖+20 g·L ⁻¹ 甘露醇	30	0	66.67 ^{cd}	3.50 ^a	绿色	5.47 ^{ab}

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences among treatments ($P<0.05$).

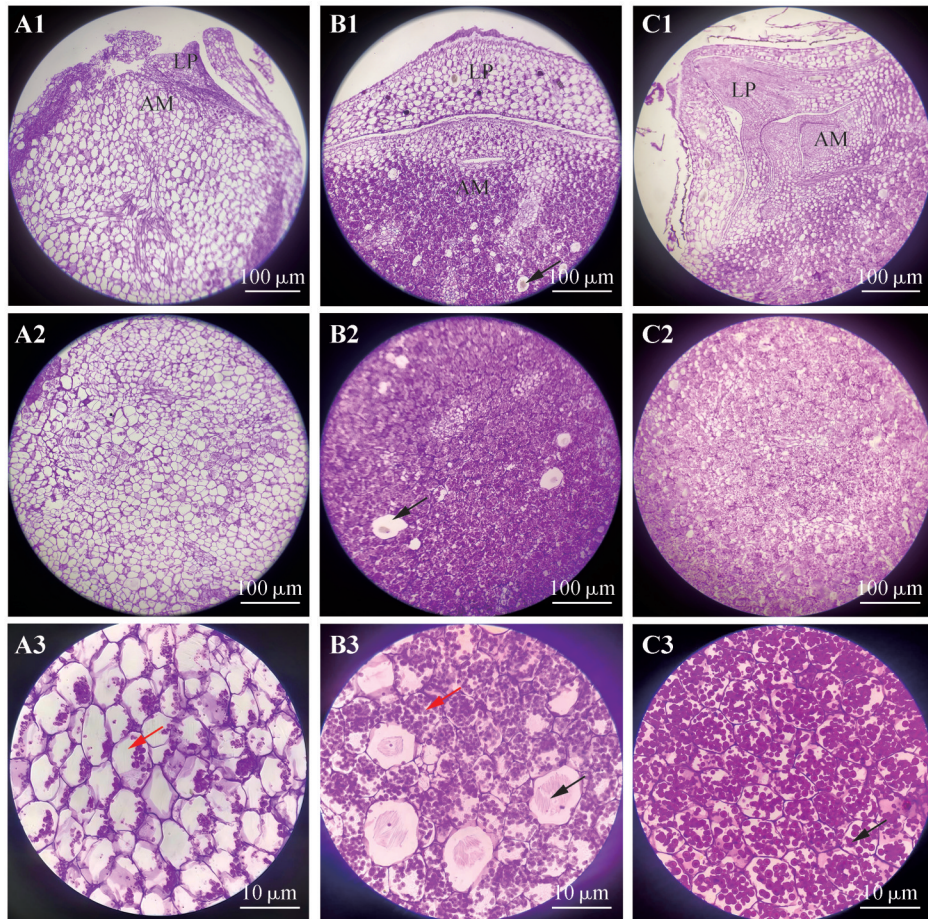
在30 g·L⁻¹蔗糖同时添加不同质量浓度的甘露醇处理中,成苗率随甘露醇质量浓度的增加而增加,其中30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇培养基中块茎的成苗率为96.67%,显著高于其他处理,且平均叶柄数量最多(3.44个),平均叶柄长度4.24 cm,仅低于30 g·L⁻¹蔗糖处理,说明恢复生长后试管苗生长良好。但90 g·L⁻¹蔗糖浓度保存块茎的植株生长受到一定的抑制,可能是过高渗透

压对块茎造成一定的生理损伤而导致生长缓慢。因此,从块茎保存成苗率和试管苗生长的情况来看,90 g·L⁻¹蔗糖、30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇处理成苗率均较高,保存效果较好,再生植株与正常继代试管苗形态表现一致,所以半夏块茎延缓生长保存的适宜培养基为1/2MS+30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇+8 g·L⁻¹琼脂或1/2MS+90 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂。

2.4 低成苗率与高成苗率处理组半夏块茎组织学差异

淀粉粒、叶原基和黏液细胞数量与块茎是否成活及恢复生长状况密切相关。4℃黑暗条件下,成熟块茎在含30 g·L⁻¹蔗糖的原培养基中保存360 d后,成苗率仅为36.70%,多数块茎干缩严重,无法恢复生长(图1A)。死亡块茎的组织学观察表明,块茎表面虽具有鳞片,但茎尖仅由1个叶原基组成,茎尖和块茎中部细胞中几乎无淀粉粒分布,块茎中也未见晶簇、维管束(图3A)。其原因是成熟块茎比较幼小,抗寒和抗旱能力弱,加之,原培养基含水量低,长期的保存造成极度的干旱缺水,导

致淀粉粒解体,细胞内的碳源和能量耗尽,块茎死亡。30 g·L⁻¹蔗糖处理下恢复生长的块茎,茎尖具有2个叶原基,茎尖分生组织及其下方、块茎中部细胞中均储藏大量淀粉粒,黏液细胞数量多(图3B),说明成活块茎在新的培养基得到良好的营养物质供给,逐渐恢复正常生长。成苗率高(96.67%)的处理(30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇)块茎恢复生长后植株组织中均储藏大量淀粉粒,该处理茎尖叶原基层数更多,但茎尖分生组织及其下方的淀粉粒和黏液细胞数量较少,维管束也较少(图3C),说明成活率高的处理块茎保存良好,受到的损伤小,生长更加旺盛,而30 g·L⁻¹蔗糖处理的块茎在



LP. 叶原基; AM. 顶端分生组织; 红色箭头所指为淀粉粒, 黑色箭头所指为分泌细胞及内部针晶; A1、A2和A3分别为30 g·L⁻¹蔗糖保存后死亡块茎的茎尖、块茎中部和茎尖下方淀粉粒; B1、B2和B3分别为30 g·L⁻¹蔗糖保存后恢复生长块茎的茎尖、块茎中部和茎尖下方淀粉粒; C1、C2和C3分别为30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇保存后恢复生长块茎的茎尖、块茎中部和茎尖下方淀粉粒。

LP. Leaf primordium; AM. Apical meristem; the red arrows pointed to starch granules, and the black arrows pointed to secretory cells and internal needle crystals; A1, A2, and A3 represented the stem tips, middle parts of the tubers, and starch granules below the stem tips of the tubers after death preservation with 30 g·L⁻¹ sucrose; B1, B2, and B3 represented the stem tips, middle parts of the tubers, and starch granules below the stem tips of tubers that resumed growth after preservation with 30 g·L⁻¹ sucrose; C1, C2, and C3 represented the stem tips, middle parts of the tubers, and starch granules below the stem tips of the tubers that resumed growth after preservation with 30 g·L⁻¹ sucrose and 60 g·L⁻¹ mannitol.

图3 低成苗率与高成苗率处理下块茎组织学差异

Fig.3 Histological differences of tubers between low and high seedling rate treatments after low temperature preservation

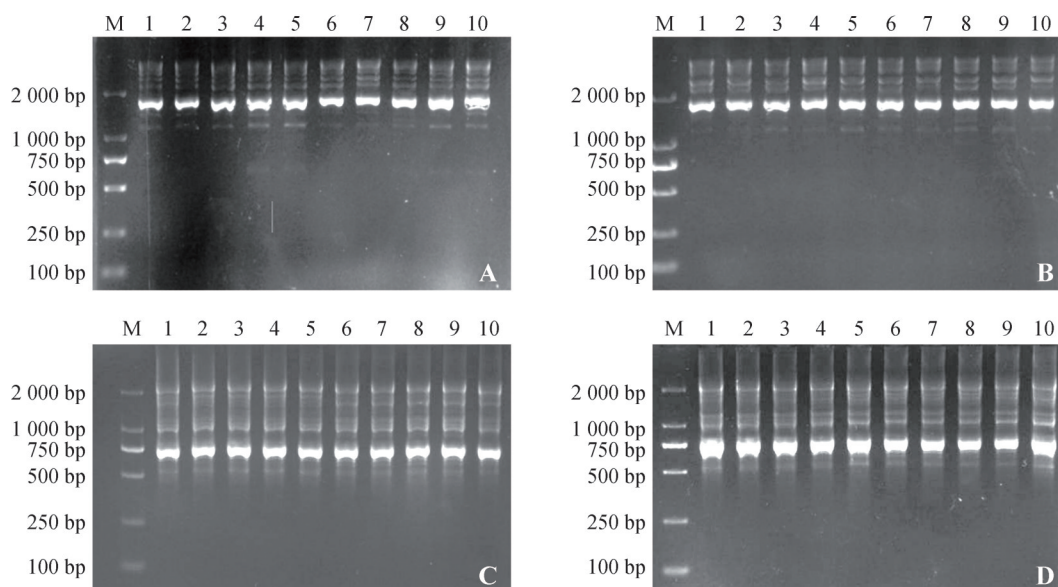
保存过程中受到的损伤严重,恢复培养成苗率低,且块茎叶原基数量少,黏液细胞数量多,植株生长缓慢。

2.5 半夏试管块茎延缓生长保存后再生植株遗传稳定性

2.5.1 试管块茎延缓生长保存后再生植株遗传稳定性 RAPD 检测结果

分别对存活率较高的 2 个处理(90 g·L⁻¹蔗糖、

30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇)保存块茎恢复生长后的试管苗进行 RAPD 检测,用筛选出的 3 条引物进行样品 DNA 扩增,结果表明,3 条引物在 20 份样品中共产生 420 条 RAPD 谱带,平均每个引物扩增出 140 条,这 2 个处理在所选用的引物中均未出现标记的缺失与增加(图 4),说明这 2 种延缓生长保存方法能够保持半夏种质的遗传稳定性。



A、B 分别为 90 g·L⁻¹蔗糖和 30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇处理 10 个植株的 DNA 扩增图谱,引物为 Em2;C、D 分别为 90 g·L⁻¹蔗糖和 30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇处理 10 个植株的 DNA 扩增图谱,引物为 Lect7。

A and B showed the DNA spectra of 10 plantlets treated with 90 g·L⁻¹ sucrose, 30 g·L⁻¹ sucrose +60 g·L⁻¹ mannitol, respectively, amplified by primer Em2; C and D showed the DNA spectra of 10 plantlets treated with 90 g·L⁻¹ sucrose, 30 g·L⁻¹ sucrose+60 g·L⁻¹ mannitol, respectively, amplified by primer Lect7.

图 4 半夏试管块茎延缓生长 360 d 后恢复生长植株的 RAPD 扩增图谱

Fig.4 RAPD amplification profile of plantlets recovered after *in vitro* tubers delayed growth for 360 days

2.5.2 试管块茎延缓生长保存后再生植株遗传稳定性 ISSR 检测结果

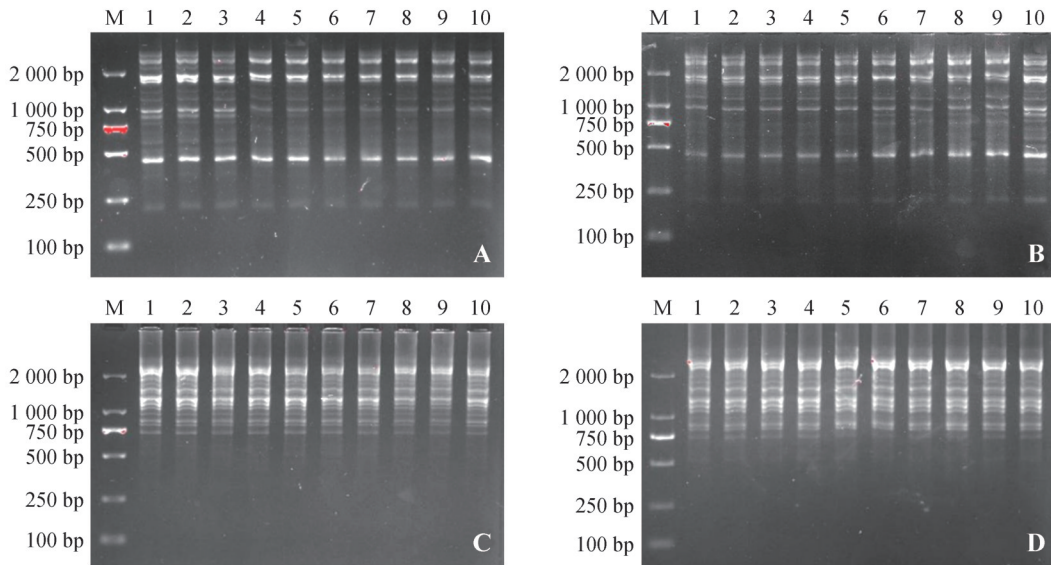
采用 ISSR 技术对 20 株半夏块茎延缓生长保存后恢复生长的植株 DNA 进行检测,经引物扩增共得到电泳图谱 1 140 条(图 5),没有变异条带产生,说明该延缓生长保存技术能够保持半夏种质的遗传稳定性。

3 讨论

3.1 低温和水分对块茎延缓生长保存的影响

温度、光照及其强度、生长延缓剂均能不同程度地影响植物器官或组织的离体生长,还可以产生协同效应,所有因素的相互作用将决定材料离体保存的最长时间^[11]。降低温度是延缓生长保存

最常用的方法,低于最适生长所需温度的培养会降低植物呼吸、失水、萎蔫和乙烯生成等代谢活动^[1]。兰伟等^[12]将那贺川野菊(*Chrysanthemum yoshinaganthum*)试管苗接种在 MS 培养基中,4℃下保存 360 d 后仍有 96.15% 的成活率。王晨等^[13]将苹果(*Malus domestica*)组培苗接种在培养基中,置于 8℃下,可保存 18 个月,且恢复培养后成活率为 100%。本研究将半夏成熟块茎及一代试管苗(带块茎)连带原培养基于 4℃下黑暗保存,发现成熟块茎保存结束进行恢复培养后,块茎的成苗率较低,其原因是由叶柄诱导形成成熟块茎需 30 d 左右,刚形成的块茎抗性较弱,加之,此时培养基失水较多,低温加上长期缺水导致块茎恢复生长后的植株成活率大大降低,仅为 36.70%。一代试管



A、B分别为 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理10个植株的DNA扩增图谱,引物为881;C、D分别为 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理10个植株的DNA扩增图谱,引物为854。

A and B showed the DNA spectra of 10 plantlets treated with $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose+ $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ mannitol, respectively, amplified by primer 881; C and D showed the DNA spectra of 10 plantlets treated with $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose+ $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ mannitol, respectively, amplified by primer 854.

图5 半夏试管块茎延缓生长360 d后恢复生长植株的ISSR扩增图谱

Fig.5 ISSR amplification profile of plantlets recovered after *in vitro* tubers delayed growth for 360 days

苗恢复培养后与成熟块茎延缓生长保存后恢复培养相比有较高的成苗率,为50.00%,其原因可能是块茎成苗后其自身的生理发育更加完全,有更强的抗寒性,但形成一代试管苗约需60 d时间,培养基失水严重,低温加上长期缺水,成苗率也不高。因此,半夏成熟块茎和一代试管苗直接低温保存效果不佳。由上可知,材料生理年龄不同其抗旱性有很大差异,此外,低温保存的幼小材料需要一定的水分供给。

3.2 渗透压对块茎延缓生长保存效果的影响

本研究通过添加蔗糖和甘露醇升高培养基的渗透压对成熟块茎进行保存,甘露醇在延缓生长保存中常被当作渗透剂使用,而蔗糖有2种功能:适量蔗糖可以作为碳源供植物吸收利用,但是高浓度蔗糖会导致渗透压过高,抑制植物生长^[14]。本研究中,适宜半夏块茎保存的蔗糖质量浓度为 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,试管块茎恢复生长后表现为植株生长缓慢、矮小,但存活率高。延缓生长保存时,不同植物对蔗糖浓度的耐受性不一致。肖婉露等^[15]对韭菜(*Allium tuberosum*)缓慢生长离体保存研究中发现,最适合的蔗糖质量浓度为 $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,该质量浓度下试管苗生长明显缓慢,更高质量浓度可能导

致培养物死亡。兰伟等^[12]对那贺川野菊离体保存的研究结果表明, $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖处理时植株长势较弱。陈敏敏等^[16]将朱顶红(*Hippeastrum*)试管苗接种在添加 $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基中,即使是常温下也可成功保存5个月。陈辉等^[17]对百合进行延缓生长保存时发现,在培养基中添加 $50\sim 90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖均能保存11个月以上,但添加 $10\sim 50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇保存的百合试管苗基部有愈伤产生,保存效果并不理想。徐志微等^[18]在研究葡萄(*Vitis spp.*)种质的离体保存时发现,在含有 $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基中添加 $20\sim 30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇可使种质成功保存210 d,说明该方法可有效抑制植株生长,并且成活率高,可用于葡萄组培种质的保存。说明不同植物材料保存所需的蔗糖和甘露醇质量浓度不同。本研究中,高质量浓度蔗糖保存的半夏块茎恢复培养后成活率高但植株矮小,而低质量浓度蔗糖与较高质量浓度甘露醇配合使用不仅成活率高且植株生长旺盛。傅伊倩等^[19]在大花卷丹(*Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii*)的保存研究中提出,高质量浓度蔗糖保存的试管苗恢复培养后其株高明显降低,抑制效果显著;在加入蔗糖的基础上使用甘露醇,发现保存后再生植株存活率更高,生长状

态更好,本研究结果与之一致。

3.3 延缓生长保存块茎成活情况与组织结构和淀粉粒的关系

半夏块茎是储藏器官,其中含有大量的淀粉粒。李彦文等^[20]对栽培半夏块茎横切面进行显微观察发现,其薄壁细胞中含大量淀粉粒,黏液细胞含草酸钙针晶束。本研究发现,30 g·L⁻¹蔗糖低温保存后的成熟块茎干缩,块茎中淀粉含量极少,是由于失水严重块茎趋于死亡,几乎无淀粉粒分布,也未见针晶束。高成活率与低成活率处理组的块茎均储藏有大量淀粉粒,但高成活率处理组的块茎具有茎尖分生组织及其下方的淀粉粒和黏液细胞和晶簇数量少、维管束较少等组织及组织化学特征,说明淀粉粒分布部位、数量及黏液细胞和晶簇数量与试管块茎保存效果密切相关。

3.4 延缓生长保存后恢复生长植株的遗传稳定性

保持遗传完整性是种质保存成功的核心标志,本研究采用分子水平标记技术对延缓生长保存后接种到培养基上的再生植株进行遗传稳定性检测,并比较其形态学差异,经RAPD和ISSR技术检测发现,延缓生长保存后恢复生长的植株没有出现变异条带,说明材料稳定,没有发生遗传变异,且形态学指标与正常生长的植株相似。已有研究表明,延缓生长保存法已应用于樱桃(*Prunus pseudocerasu*)^[21]、百合^[22]、龙眼(*Dimocarpus longan*)^[23]和那贺川野菊^[12]等多种植物,延缓生长保存后再生后代均保持了良好的遗传稳定性。本研究结合RAPD和ISSR 2种检测方法,进一步证实半夏块茎在离体保存过程中能够保持遗传稳定。综上,本研究建立了高效稳定的半夏延缓生长保存技术体系,可为半夏种质资源的安全保存提供一条简便可行的途径。

4 结论

本研究建立了一种简易高效的半夏种质资源中短期保存方法,即采用组织培养方法诱导试管块茎,将其转接到1/2MS+30 g·L⁻¹蔗糖+60 g·L⁻¹甘露醇+8 g·L⁻¹琼脂、pH=5.8培养基中,置于冰箱中4℃保存360 d后取出,进行恢复培养,成苗率高达96.67%,再生植株长势良好且遗传稳定。半夏试管块茎延缓生长保存技术具有省时、省地、省空间和无病虫害侵染等优点,为半夏种质资源及脱毒苗保存提供一条简便可行的途径。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2020年版:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:123.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2020 Edition: Volume I [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2020: 123.
- [2] 罗强,梁晓宇,刘鑫,等.半夏化学成分及药理作用研究进展[J].特产研究,2020,42(5):54-60.
LUO Q, LIANG X Y, LIU X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Pinellia ternata* [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2020, 42(5): 54-60.
- [3] 陈黎明,何志贵,韩蕊莲.半夏种质资源研究进展[J].黑龙江农业科学,2020(2):131-135.
CHEN L M, HE Z G, HAN R L. Research progress on germplasm resources of *Pinellia ternata* [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2020(2): 131-135.
- [4] 兰伟,陈发棣.植物种质资源缓慢生长法保存研究进展[J].阜阳师范学院学报(自然科学版),2010,27(2):68-72.
LAN W, CHEN F D. Progress in techniques for slow growth conservation of plant germplasm resources [J]. Journal of Fuyang Normal University (Natural Science), 2010, 27(2): 68-72.
- [5] 刘芊.中国古老月季离体保存技术研究[D].北京:北京林业大学,2014.
LIU Q. *In vitro* conservation of Chinese old roses [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.
- [6] 傅伊倩.几种野生百合离体保存技术的研究[D].北京:北京林业大学,2012.
FU Y Q. *In vitro* conservation of wild lily [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [7] 王小乐,迟天华,王海滨,等.蔗糖和甘露醇复合处理对菊花低温离体保存的影响[J].分子植物育种,2019,17(5):1597-1604.
WANG X L, CHI T H, WANG H B, et al. Effects of sucrose and mannitol combined treatment on *in vitro* conservation of *Chrysanthemum* at low temperature [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(5): 1597-1604.
- [8] 陈汝豪,周艳华,赵喜娟,等.延长马铃薯种质资源低温保存条件的探究[J].中国马铃薯,2023,37(5):419-427.
CHEN R H, ZHOU Y H, ZHAO X J, et al. Study on conditions for extending the low temperature preservation of potato germplasm resources [J]. Chinese Potato Journal, 2023, 37(5): 419-427.
- [9] 张延红,何春雨,董婉琦,等.半夏试管块茎直接发生途

- 径的离体快繁研究[J].时珍国医国药,2022,33(10):2512-2515.
- ZHANG Y H, HE C Y, DONG W Q, *et al.* Studies on rapid propagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *in vitro* tuber via direct organogenesis[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2022, 33(10):2512-2515.
- [10] 唐顺莉,张延红,何春雨,等.留兰香超低温保存再生植株遗传稳定性研究[J].时珍国医国药,2022,33(7):1712-1715.
- TANG S L, ZHANG Y H, HE C Y, *et al.* Studies on genetic stability of regenerated plants after cryopreservation of *Mentha spicata* L. [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2022, 33(7):1712-1715.
- [11] BENELLI C, TARRAF W, IZGU T, *et al.* *In vitro* conservation through slow growth storage technique of fruit species: an overview of the last 10 years [J]. Plants, 2022, 11(23):3188.
- [12] 兰伟,陈素梅,尹冬梅,等.那贺川野菊的离体保存[J].园艺学报,2010,37(12):2007-2016.
- LAN W, CHEN S M, YIN D M, *et al.* Studies on *in vitro* conservation of *Chrysanthemum yoshinaganthum* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(12):2007-2016.
- [13] 王晨,师校欣,杜国强,等.温度和渗透压对苹果试管苗延缓生长法种质保存的效应[J].中国农学通报,2008,24(12):335-338.
- WANG C, SHI X X, DU G Q, *et al.* Effect of incubation temperature and osmotic pressure in subculture media on retardant growth of explants during conservation *in vitro* in apple [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(12):335-338.
- [14] 黄靖.黑果腺肋花楸种质资源的离体保存及果实花色苷的研究[D].长春:吉林农业大学,2022.
- HUANG J. The study on preservation of germplasm resources *in vitro* and anthocyanins in the fruit of *Aronia melanocarpa* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.
- [15] 肖婉露,马培芳,李延龙,等.韭菜缓慢生长法离体保存技术研究[J].中国瓜菜,2021,34(7):71-75.
- XIAO W L, MA P F, LI Y L, *et al.* Study on slow growth conservation *in vitro* of Chinese chive [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2021, 34(7):71-75.
- [16] 陈敏敏,张永春,蔡友铭,等.朱顶红试管苗离体保存及恢复生长研究[J].江西农业学报,2022,34(5):69-75.
- CHEN M M, ZHANG Y C, CAI Y M, *et al.* Study on *in vitro* conservation and recovery growth of *Hippeastrum tube* seedlings [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2022, 34(5):69-75.
- [17] 陈辉,陈晓玲,陈龙清,等.百合种质资源限制生长法保存研究[J].园艺学报,2006,33(4):789-793.
- CHEN H, CHEN X L, CHEN L Q, *et al.* Studies on germplasm conservation of lily (*Lilium* L.) by restricting growth method [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(4):789-793.
- [18] 徐志微,杨丽丽,杜国强,等.培养基渗透压和生长调节剂对葡萄种质离体保存的效应[J].分子植物育种,2014,12(4):720-725.
- XU Z W, YANG L L, DU G Q, *et al.* Efficacy of osmotic pressure and plant growth regulators in media on conservation of grape plantlets *in vitro* [J]. Molecular Plant Breeding, 2014, 12(4):720-725.
- [19] 傅伊倩,孔滢,刘燕.大花卷丹的组织培养及限制生长保存[J].植物生理学报,2012,48(3):277-281.
- FU Y Q, KONG Y, LIU Y. *In vitro* propagation and restrict growth preservation of *Lilium leichlinii* var. *maximowiczii* Baker [J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(3):277-281.
- [20] 李彦文,周凤琴,张守平,等.掌叶半夏的形态组织学研究[J].中药材,2008,31(2):206-209.
- LI Y W, ZHOU F Q, ZHANG S P, *et al.* Studies on morphology and histology of *Pinellia pedatisecta* Schott [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(2):206-209.
- [21] 宋常美,李庆宏.樱桃缓慢生长保存及遗传稳定性检测[J].种子,2019,38(9):67-72.
- SONG C M, LI Q H. Preservation by slow growth and genetic stability test of *Prunus pseudocerasu* L. [J]. Seed, 2019, 38(9):67-72.
- [22] 万珠珠,牛来春,谭秀梅,等.三种食用百合种质资源限制生长保存及遗传稳定性研究[J].北方园艺,2016(13):89-92.
- WAN Z Z, NIU L C, TAN X M, *et al.* Study on *in vitro* limited growth conservation and genetic stability of three edible lily [J]. Northern Horticulture, 2016(13):89-92.
- [23] 林秀莲,张梓浩,赖钟雄.龙眼限制生长保存EC体胚再生植株的RAPD分析[J].亚热带农业研究,2013,9(2):127-132.
- LIN X L, ZHANG Z H, LAI Z X. RAPD analysis of plantlets regenerating from embryogenic callus after minimal growth conservation in *Dimocarpus longan* Lour. [J]. Subtropical Agriculture Research, 2013, 9(2):127-132.