

# 珍稀濒危药用植物弄岗唇柱苣苔离体保存研究

张占江, 李 翠, 韦 莹, 黄宝优, 吕惠珍

(广西壮族自治区药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023)

**摘 要:**以弄岗唇柱苣苔为试材, 采用正交实验设计研究培养基、生长抑制剂、渗透压、光强等对其离体保存的影响, 并在此基础上确定常温下最适弄岗唇柱苣苔离体的保存条件, 以期建立弄岗唇柱苣苔种质资源离体保存技术体系。结果表明: 温度为 25℃ 时, 弄岗唇柱苣苔离体保存的最佳方法为 1/2MS+蔗糖 60 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 5 g/L+矮壮素(CCC) 1.0 mg/L; 最佳光照条件为 1 600 lx, 12 h/d。试验结果表明, 建立的弄岗唇柱苣苔常温离体保存体系, 经保存 300 d, 存活率在 50% 以上, 保存材料生长情况良好, 可以用于弄岗唇柱苣苔种质资源离体保存。

**关键词:**珍稀濒危; 弄岗唇柱苣苔; 种质资源; 离体保存

**中图分类号:**Q 949.778.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0136-03

1975 年 Henshaw 等<sup>[1]</sup>首次提出离体保存植物种质资源的策略, 开创了植物种质资源保存的新思路。药用植物种质资源, 不仅是保障人类良好的生活质量和衣食住行必不可少的财富, 更是关系到一个国家和民族竞争力的重要战略物质。由于人类对资源不科学的开发与利用, 导致自然环境不断恶化, 一些重要的药用植物资源日益减少甚至濒临灭绝, 直接影响着人类健康和医药

产业可持续发展。因此, 对离开原生境后品质下降甚至无法生存的珍稀濒危药用植物资源开展有效的离体保存研究将成为未来药用植物资源保存研究的必然趋势重要渠道。

弄岗唇柱苣苔(*Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guihaia)为广西特有的苦苣苔科药用植物, 其根状茎可用于跌打损伤、风湿关节痛<sup>[2-3]</sup>, 由于其生长环境要求十分苛刻, 适生的温度范围、湿度范围和土壤酸碱度范围比较小, 种子细小, 繁殖困难, 引种难成活<sup>[4-5]</sup>, 2004 年已经被收入《中国植物红皮书》<sup>[6]</sup>。该试验通过调节无机盐浓度、渗透压、光强及添加抑制剂等缓慢生长保存方法研究弄岗唇柱苣苔的长期常温离体保存方法, 以期能有效拯救弄岗唇柱苣苔种质资源, 进一步实现对其深入开发利用提供技术支持, 同时也为其它存在有性生

**第一作者简介:**张占江(1976-), 男, 博士, 助理研究员, 现主要从事药用植物生理生态等研究工作。E-mail:zzj1811@163.com.

**责任作者:**吕惠珍(1963-), 女, 主任技师, 现主要从事药用植物引种驯化及保存等研究工作。E-mail:luhzh2004@163.com.

**基金项目:**广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFA018203); 广西卫生厅自筹课题资助项目(Z2011160)。

**收稿日期:**2013-11-13

150 mg/L Pb<sup>2+</sup> solution concentration; Pb stimulated the seed germination at 50 mg/L and 150 mg/L concentrations, and restrained the seed germination at the higher concentrations (> 150 mg/L). All the seed germination potential, germination index, and vital index, as well as the seedling fresh weight showed out low-high-low tendency, and the crest value were at the 150 mg/L Pb<sup>2+</sup> solution concentration except the seedling fresh weight. The root and bud lengths of seedlings showed out the same tendency as the seedling fresh weight, but the crest values were at the 50 mg/L and 150 mg/L Pb<sup>2+</sup> solution concentration respectively. The malondialdehyde (MDA) content and chlorophyll content of seedling leaves increased with the Pb<sup>2+</sup> solution concentrations. The activities of SOD and POD also showed out low-high-low tendency, but they remained high levels under conditions of high Pb<sup>2+</sup> solution concentrations (> 600 mg/L). The results indicated that Pb stimulated the seed germination and seedling growth of *Arctium lappa* at the lower concentrations, and restrained the seed germination at the higher concentrations, but *Arctium lappa* seed still had higher germination rate and seedling could also be normal growth at the high concentrations. SOD activity and POD activity under high solution concentration of Pb stress still had a highly reactive. Through its antioxidant system against adversity, *Arctium lappa* had a certain resistance to Pb stress.

**Key words:** *Arctium lappa*; Pb; seed germination; seedling growth

殖障碍药用植物的离体保存提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为选取广西壮族自治区药用植物园离体保存库中弄岗唇柱苣苔试管苗在繁殖培养基上培养 20 d 获得的丛生芽。

### 1.2 试验方法

所有试验以材料存活率不低于 50% 的保存时间作为种质保存的评价指标。每处理接种 10 瓶,每瓶 5 株单芽。培养温度  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照时间 12~14 h/d,除光强试验外其余试验光照强度 1 600 lx。

1.2.1 单因素试验 弄岗唇柱苣苔组培快繁适用的基本培养基为 MS,试验设计 MS、1/2MS、1/4MS 3 种无机盐浓度水平,考察各无机盐浓度对弄岗唇柱苣苔试管苗生长状况的影响;分别以 0.5、1.0、1.5 mg/L 的矮壮素(CCC)、多效唑(PP<sub>333</sub>)、丁酰肼(B9)3 种植物生长抑制剂考察各个因素对弄岗唇柱苣苔试管苗生长状况的影响;弄岗唇柱苣苔组培快繁适用的光照条件为 1 600 lx,试验设计 0、800、1 600、2 400 lx 4 种光照强度,考察各光强对弄岗唇柱苣苔试管苗生长状况的影响。

1.2.2 正交实验设计 蔗糖和琼脂作为溶质,均易溶于水,改变培养基中蔗糖和琼脂的浓度,即是调节了渗透压,甘露醇为可发酵糖类可以调整渗透压,所以蔗糖、琼脂、甘露醇的 3 个水平设计正交实验,考察渗透压对弄岗唇柱苣苔试管苗离体保存影响,正交实验因素与水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

水平	因素		
	A 蔗糖/g · L <sup>-1</sup>	B 琼脂/g · L <sup>-1</sup>	C 甘露醇/g · L <sup>-1</sup>
1	30	4.0	0
2	60	4.5	5
3	90	5.0	10

1.2.3 离体保存的弄岗唇柱苣苔试管苗的生长恢复情况 将生长健壮的弄岗唇柱苣苔试管苗单芽切下,接种到最佳保存培养基上保存 300 d 后,存活的弄岗唇柱苣苔试管苗接种到 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基上,每 30 d 继代 1 次,继代 3 次后,以株高、形态、叶长、叶宽、芽增殖倍数、平均增长率、单株生根率为指标考察弄岗唇柱苣苔试管苗的恢复情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

2.1.1 无机盐水平对弄岗唇柱苣苔试管苗离体保存的影响 由表 2 可知,弄岗唇柱苣苔在 1/2MS 培养基上保存时间与 MS 培养基上生长植株相近,而 1/4MS 培养基中保存的离体材料颜色暗黑绿色,保存未到 200 d 培养基几乎消耗殆尽,材料开始干枯死亡,保存至 300 d 时,

死亡率达到 78%,从节约成本等综合考虑,弄岗唇柱苣苔组培离体保存适用的培养基为 1/2MS。

表 2 培养基对保存时间的影响

基本培养基	保存时间/d	生长状况
MS	332	芽株生长良好,植株嫩绿,5 个月月开始死亡,260 d 后培养基消耗殆尽
1/2MS	310	生长良好,植株嫩绿,4 个月月开始死亡,260 d 后培养基消耗殆尽
1/4MS	203	芽株生长缓慢,3 个月材料开始干枯死亡,200 d 后培养基消耗殆尽

2.1.2 植物生长抑制剂对弄岗唇柱苣苔试管苗离体保存的影响 以矮壮素(CCC)、多效唑(PP<sub>333</sub>)、丁酰肼(B9)等 3 种植物生长抑制剂考察激素对弄岗唇柱苣苔离体保存效果。由表 3 可知,3 种植物生长抑制剂对弄岗唇柱苣苔离体保存均有抑制作用,效果为矮壮素(CCC) > 丁酰肼(B9) > 多效唑(PP<sub>333</sub>),CCC 对试管苗的保存时间影响最大,最适合浓度为 1.0 mg/L,在此浓度下,弄岗唇柱苣苔试管苗保存时间最长,能够控制植株伸长,苗株生长缓慢,植株矮壮,根系发达。多效唑和丁酰肼对试管苗保存也有影响,多效唑的抑制作用强于丁酰肼,其具有延缓试管苗生长,抑制茎秆伸长,缩短节间、促进植物分蘖、促进花芽分化,增加植物抗逆性能,提高产量等效果。故 1/2MS+CCC 1.0 mg/L 保存效果最佳。

表 3 激素对弄岗唇柱苣苔试管苗保存时间的影响

激素	浓度/mg · L <sup>-1</sup>	保存时间/d	生长状况
CCC	0.5	251	芽株生长良好,植株嫩绿,4 个月月开始死亡
CCC	1.0	317	芽株生长良好,植株嫩绿,8 个月月开始死亡
CCC	1.5	295	芽株生长良好,植株嫩绿,5 个月月开始死亡
PP <sub>333</sub>	0.5	131	芽株生长良好,植株嫩绿,3 个月月开始死亡
PP <sub>333</sub>	1.0	164	芽株生长良好,植株嫩绿,4 个月月开始死亡
PP <sub>333</sub>	1.5	201	芽株生长良好,植株嫩绿,5 个月月开始死亡
B9	0.5	168	芽株生长良好,植株嫩绿,3 个月月开始死亡
B9	1.0	205	芽株生长良好,植株嫩绿,5 个月月开始死亡
B9	1.5	201	芽株生长良好,植株嫩绿,5 个月月开始死亡

2.1.3 光照强度对弄岗唇柱苣苔试管苗离体保存的影响 由表 4 可知,组培苗在黑暗条件下生长缓慢,逐渐萎蔫死亡;在 800 lx 培养条件下,植株嫩绿,4 个月月开始死亡;弄岗唇柱苣苔组培快繁适用的光照条件为 1 600 lx,芽株生长良好,植株嫩绿,8 个月月开始死亡;在 2 400 lx 光照强度条件下,2 个月开始植株渐渐玻璃化,5 个月时候玻璃化苗开始褐化死亡。

表 4 光强对弄岗唇柱苣苔试管苗离体保存的影响

光照强度/lx	保存时间/d	生长状况
0	48	植株渐渐萎蔫死亡
800	187	植株嫩绿,4 个月月开始死亡
1 600	332	芽株生长良好,植株嫩绿,8 个月月开始死亡
2 400	221	2 个月植株渐渐玻璃化,5 个月月开始死亡

### 2.2 正交实验结果

由表 5 可知,渗透压对弄岗唇柱苣苔试管苗离体保存影响次序为蔗糖 > 甘露醇 > 琼脂。弄岗唇柱苣苔

试管苗离体保存以蔗糖 60 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 5 g/L 培养基保存效果最佳。

表 5 正交实验结果

序号	A 蔗糖	B 琼脂	C 甘露醇	D 空白	保存时间/d
1	1	1	1	1	109
2	1	2	2	2	176
3	1	3	3	3	244
4	2	1	2	3	291
5	2	2	3	1	316
6	2	3	1	2	330
7	3	1	3	2	282
8	3	2	1	3	218
9	3	3	2	1	254
K1	529	682	657	679	$\sum_{i=1}^9 \bar{y} = 1\ 933$
K2	937	710	721	788	CT=547 600 A>C>B

表 6 弄岗唇柱苣苔种质保存方差分析

方差来源	方差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	27 842.00	2.00	13 921.00	13.48	0.05<P<0.1
B	4 002.67	2.00	2 001.33	1.94	P>0.1
C	5 884.67	2.00	2 942.33	2.85	P>0.1
D	2 064.67	2.00	1 032.33	1.00	
SE=SC+SD	7 949.33	4.00	3 974.66		

### 2.3 离体保存的弄岗唇柱苣苔试管苗的生长恢复情况考察

由表 7 可知,保存材料经 3 次继代后,株高、平均生长率和芽增殖倍数略低于正常水平,但无显著差异,生根率也都变化不大,根系发达,根长和根数与正常相近,材料生长旺盛,颜色浓绿,生长没有因保存而受到不良影响,这表明 1 600 lx,12 h/d,1/2MS+蔗糖 60 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 5 g/L+CCC 1.0 mg/L 培养基常温下适合保存弄岗唇柱苣苔。

表 7 离体保存后恢复的试管苗和保存前试管苗的比较

材料	平均生长率/%	繁殖倍数	生根率/%	株高/cm
正常	7.15±0.32	7.11±0.57	99.6±0.31	8.42±0.48
保存	6.85±0.29	6.67±0.33	99.1±0.27	7.74±0.43

### 3 讨论与结论

苦苣苔科植物离体保存研究鲜有报道,且不够深入系统<sup>[7-8]</sup>,该试验首次建立了弄岗唇柱苣苔的常温离体保存体系,保存周期长且生长恢复良好,为资源保护和开发利用提供基础资料。常温下弄岗唇柱苣苔离体保存最佳培养基为 1/2MS+蔗糖 60 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 5 g/L+CCC 1.0 mg/L;最佳条件为最佳光照为 1 600 lx,12 h/d;离体保存弄岗唇柱苣苔在外观形态、生长发育均与未经过离体保存处理材料无显著差异;表明该保存方法适合弄岗唇柱苣苔的种质资源保存长期保存。

### 参考文献

- [1] Villalobos V M,Engelman F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. Biotechnol,1995,11:375-382.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1991.
- [3] 李振宇,王印政. 中国苦苣苔科植物[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2004.
- [4] 刘演. 广西苦苣苔科濒危植物的现状[C]//中国植物学会,中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编,北京:高等教育出版社,2003:484-485.
- [5] 韦毅刚. 华南苦苣苔科植物[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2010.
- [6] 汪松,解焱. 中国物种红色名录(第 1 卷):红色名录[M]. 北京:高等教育出版社,2004.
- [7] 汤正辉. 苦苣苔科植物的快速繁殖、离体保存及耐阴性研究[D]. 成都:四川大学,2007.
- [8] 李佳. 苦苣苔科植物的组织培养和离体保存[D]. 北京:中国科学院植物研究所,2009.

## *In vitro* Conservation Technique of Rare or Endangered Germplasm in *Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guihaia

ZHANG Zhan-jiang, LI Cui, WEI Ying, HUANG Bao-you, LV Hui-zhen

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Nanning, Guangxi 530023)

**Abstract:** Taking *Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guihaia germplasm as material, using orthogonal to research the effects of medium, growth inhibitor, phytohormone, osmotic pressure, and the growth recovery were evaluated after *in vitro* conservation to establish the optimal *in vitro* conservation technology system of *Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guihaia germplasm. The results showed that the best conservation condition in 25℃ was 1/2MS basal medium+60 g/L sucrose+4.0 g/L agar powder+5 g/L mannite supplemented+1.0 mg/L CCC, in an illuminated chamber under 12 h photoperiod of 1 600 lx light intensity, more than 50% conservation material survived after 300 days, most of them could growth well on propagation medium. The results of this study could be used for medium-term germplasm preservation *in vitro* of *Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guihaia.

**Key words:** rare or endangered; *Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guihaia; germplasm resource; *in vitro* conservation