

DOI:10.11937/bfyy.201518045

珍稀濒危药用植物地枫皮 离体保存研究

张 乐^{1,2}, 李林轩², 韦坤华², 吕惠珍², 李旻辉^{1,2}

(1. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060; 2. 广西药用植物园 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:以地枫皮为试材, 采用正交实验研究了无机盐、生长调节素、渗透压等对地枫皮离体保存的影响, 建立地枫皮种质资源离体保存技术体系; 并通过生长恢复的考察对保存材料进行初步评价。结果表明: 无机盐、生长调节剂、渗透压等因素对地枫皮种质资源的离体保存均有显著影响, 最终确定地枫皮常温离体保存的最佳保存方法为 1/2 MS+蔗糖 50 g/L+琼脂 4.0 g/L+甘露醇 5 g/L+矮壮素(CCC) 1.0 mg/L, 培养条件为光照时间 12~14 h/d, 培养温度 25±2℃, 光照强度 2 000 lx, 在此条件下保存 300 d, 存活率在 50% 以上, 保存材料生长恢复情况良好。

关键词:珍稀濒危; 地枫皮; 种质资源; 离体保存

中图分类号:S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0168-04

地枫皮(*Illicium difengpi*) 属木兰科八角属珍稀名贵植物^[1], 又名钻地风、山八角, 1992 年被列为国家Ⅲ级

重点保护珍稀濒危植物^[1], 1999 年又被批准为国家Ⅱ级重点保护野生植物(国务院 1999 年 8 月 4 日批准)。地枫皮主要分布于广西靖西、天峨、都安、马山、龙州等县的岩溶石山山顶, 是广西特有中药材^[2-3], 具有祛风除湿、行气止痛等功效, 用于风湿痹痛、腰肌劳损^[4]等症。其生境分布区域非常狭窄, 野生资源蕴藏量稀少, 在自然环境中地枫皮的繁殖能力非常低弱, 资源更新速度非常缓慢, 且药用部位为其茎皮与根皮, 药用部位的采收为损伤性采收, 对资源的破坏严重。随着地枫皮药用需求量不断增加, 再加不合理的农业生产和盲目的资源开发利用, 导致岩溶地区环境遭受严重破坏, 野生自然资源不

第一作者简介:张乐(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物生药学。E-mail: 404074256@qq.com.

责任作者:李旻辉(1978-), 男, 博士, 教授, 现主要从事药用植物生药学等研究工作。E-mail: li_minhui@aliyun.com.

基金项目:广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科合 14125008-2-21); 广西医疗卫生重点科研资助项目(重 2012115); 广西医疗卫生重点科研资助项目(重 200908); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项资助项目(GZBZ14-14)。

收稿日期:2015-05-28

Sustainable Prevention and Control Technology Solutions on Pest and Disease of Organic Wolfberry

LIU Xiaoli¹, LI Feng¹, LI Xiaolong², MA Jianguo³

(1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Institute of Genetic Resources, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002; 3. Ningxia Agricultural Technology Promotion General Station, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The paper described the types of pests and diseases medlar, time and focused on prevention and control of hazards during the occurrence, listed the specific measures appropriate physical prevention, agricultural cultivation, cultivation and biological and ecological focus on the implementation period and notes from sustainable organic agriculture pest control and pesticide residues in the production process control perspective. The paper conducted a large-scale demonstration in wolfberry production, formatted the technical solution, developed job phonology calendar by wolfberry growth.

Keywords: organic wolfberry; pest and disease; sustainable prevention

断减少,地枫皮在很多地区濒临灭绝或已绝迹。

1975 年 HENSHAW 等^[5]首次提出离体保存植物种质资源的策略,开阔了种质资源保存的新思路。离体保存以占用空间小、无菌培养、人工和经费少,易于交流等特点得到世界各国的高度重视^[6]。药用植物种质资源是中医药事业发展的基础,是中药新药、植物药开发、优良品种选育的基因来源。为有效保护地枫皮这一珍稀濒危药用植物种质资源,进一步深入利用开发,保证其可持续利用。该研究通过调节无机盐浓度、添加抑制剂、筛选渗透压等延缓生长的方法进行地枫皮的常温长期离体保存研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取广西药用资源保护与遗传改良重点实验室离体保存库中地枫皮试管苗在继代培养基上培养 30 d 获得的丛生芽作为试验材料。

1.2 试验方法

培养温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照时间 12~14 h/d,光照强度 2 000 lx。试验材料存活率不低于 50% 的保存时间作为种质保存的评价指标。

1.2.1 无机盐对地枫皮丛生芽离体保存的影响 地枫皮组培快繁适用的基本培养基为 MS,试验设计 MS、1/2 MS、1/4 MS 3 种无机盐浓度水平,考察各无机盐浓度对试验材料生长状况的影响。

1.2.2 植物生长抑制剂对地枫皮丛生芽离体保存的影响 以矮壮素(CCC:0、1.0、2.0 mg/L)、多效唑(PP₃₃₃:0、1.0、2.0 mg/L)、脱落酸(ABA:0、1.0、2.0 mg/L)3 种植

表 2 培养基对保存时间的影响

Table 2 Influence of medium on the preservation time

基本培养基 Basic medium	保存时间 Preservation time/d	芽的生长状况 The growth of buds
MS	153	单芽长势良好,植株嫩绿,130 d 后开始逐渐枯萎死亡 Single bud growing well and plants were tender green, after 130 days were gradually withered and death
1/2 MS	142	单芽长势良好,植株嫩绿,120 d 后开始逐渐枯萎死亡 Single bud growing well and plants were tender green, after 120 days were gradually withered and death
1/4 MS	117	芽株长势缓慢,植株暗绿,90 d 后材料开始干枯死亡 Bud growing slowly and plants were dark green, after 90 days the plant were withered and death

2.2 植物生长抑制剂对地枫皮丛生芽离体保存的影响

以矮壮素(CCC)、多效唑(PP₃₃₃)、脱落酸(ABA) 3 种植物生长调节剂的 3 个水平进行正交实验,存活率不低于 50% 的保存时间作为种质保存的评价指标。比较不同的植物生长调节剂配比对丛生芽生长的影响。

从表 3 可以看出,3 种生长调节剂对地枫皮丛生芽离体保存均有延缓作用,效果为矮壮素(CCC)>多效唑(PP₃₃₃)>脱落酸(ABA)。CCC 对试管苗的保存时间有显著影响。CCC 具有抑制细胞伸长而不抑制细胞分

物生长抑制剂的 3 水平设计正交实验,考察各个因素对试验材料生长状况的影响。

1.2.3 渗透压对地枫皮丛生芽离体保存的影响 以琼脂、蔗糖、甘露醇的 3 个水平设计正交实验,考察各因素对试验材料生长状况的影响,因素水平见表 1。

表 1 渗透压因素水平

Table 1	Osmotic pressure factor and level			g/L
	因素 Factor			
水平 Level	A 琼脂 Agar	B 蔗糖 Sucrose	C 甘露醇 Mannitol	
1	4.0	30	0	
2	5.0	50	5	
3	6.0	70	10	

1.2.4 离体保存的地枫皮试管苗的生长恢复情况考察 将生长健壮的地枫皮试管苗单芽切下接种到最佳保存培养基上保存 300 d 后存活的地枫皮试管苗接种到 MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 的培养基上,30 d 后进行增殖倍数及生根状况调查。

2 结果与分析

2.1 无机盐对地枫皮试管苗离体保存的影响

地枫皮在 MS 和 1/2 MS 培养基中芽的长势良好,植株嫩绿,保存时间相差不多,而离体材料在 1/4 MS 培养基上保存呈暗绿色,保存未到 90 d 培养基几乎消耗殆尽,材料开始干枯死亡,保存至 117 d 时,死亡率达到 78%,从节约成本等综合考虑,地枫皮离体保存最适用的基本培养基为 1/2 MS(表 2)。

裂,抑制茎部生长而不抑制性器官发育的作用,在 0~1.0 mg/L 范围内随着 CCC 浓度上升,地枫皮丛生芽保存时间越长,而当浓度达到 1.0 mg/L 保存时间有所下降。从表 4 方差分析可以看出,PP₃₃₃ 和 ABA 对离体保存的影响不显著($P>0.01$),PP₃₃₃ 具有延缓植物茎的伸长和枝叶的扩展,抑制细胞伸长的作用,效果与 CCC 相似;ABA 则是一种较强的生长抑制剂,可抑制整株植物或离体器官的生长,但对于地枫皮丛生芽离体保存影响不显著;因此在考虑到使用激素种类过多有可能造成离体保存材料变异的情况下,不考虑 PP₃₃₃ 和

ABA 2 种生长调节剂对材料保存的影响,地枫皮丛生芽在 1/2 MS+CCC 1.0 mg/L 培养基上保存效果最佳。

表 3 地枫皮种质保存培养基
筛选激素正交实验结果(生长调节剂)

Table 3 The results of orthogonal test of filtration of
germplasm conservation medium of *Illicium difengpi*

水平 Level	CCC /(mg · L ⁻¹)	PP ₃₃₃ /(mg · L ⁻¹)	ABA /(mg · L ⁻¹)	保存时间 Preservation time/d
1	0	0	0	142
2	0	1.0	1.0	178
3	0	2.0	2.0	217
4	1.0	0	1.0	216
5	1.0	1.0	2.0	269
6	1.0	2.0	0	247
7	2.0	0	0.5	226
8	2.0	1.0	0	260
9	2.0	2.0	1.0	233
K ₁	179.00	194.67	216.33	
K ₂	244.00	235.67	209.00	
K ₃	239.67	232.33	237.33	
R	65.00	41.00	28.333	

表 4 地枫皮种质保存方差分析(生长调节剂)

Table 4 Variance analysis of
conservation time of *Illicium difengpi*

方差来源 ANOVA	离均差平方和 SS	自由度 df	方差 Variance	F 值 F value	P 值 P value
CCC	7 924.22	2	3 962.11	16.92	0.05 < P < 0.1
PP ₃₃₃	3 110.89	2	1 555.44	6.64	0.1 < P
ABA	1 297.56	2	648.78	2.77	0.1 < P
误差	468.22	2	234.11	1	

注: $F_{1-0.01}(2,2)=99.0$, $F_{1-0.05}(2,2)=19.0$, $F_{1-0.1}(2,2)=9.0$ 。下同。

Note: $F_{1-0.01}(2,2)=99.0$, $F_{1-0.05}(2,2)=19.0$, $F_{1-0.1}(2,2)=9.0$. The same as below.

2.3 渗透压对地枫皮试管苗离体保存的影响

由表 5 可知,3 种因素对地枫皮丛生芽离体保存时间的影响顺序为 C(甘露醇) > A(蔗糖) > B(琼脂),从极差分析可看出 A2B2C2 为最好,即 1/2 MS+CCC 1.0 mg/L+琼脂 5.0 g/L+蔗糖 50 g/L+甘露醇 5 g/L。表 6 方差分析结果表明,甘露醇对地枫皮丛生芽的保存时间具有极显著影响($0.01 < P < 0.05$),适当浓度的甘露醇可以延长材料的保存时间;同时蔗糖对延长材料保存时间也有显著影响($0.05 < P < 0.1$),糖类物质是丛生芽生长和生存的主要碳源^[7],添加适当蔗糖,可以为丛生芽的生长提供更多的营养成分,显著提高成活率,但添加蔗糖过多,会使渗透压过高,造成植株吸水困难,导致不良后果^[8]。在保存过程中,发现蔗糖浓度在 30 g/L 时,材料颜色淡绿,后期养分难以满足生长需要逐渐枯死;当蔗糖浓度上升时,植株颜色开始变深,材料枯萎时间也随着延后;但当蔗糖浓度达到 70 g/L 时,材料出现过早死亡的现象。因此,在培养基中添加 50 g/L 蔗糖最为合适。表 6 方差分析也表明了琼脂的浓度对材料影

响不显著($P > 0.01$),为节约成本选取最低浓度琼脂 4.0 g/L 作为培养基固体剂,因此,地枫皮丛生芽离体保存的最佳培养基为(A1B2C2);1/2 MS+CCC 1.0 mg/L+蔗糖 50 g/L+甘露醇 5 g/L+琼脂 4.0 g/L,在此培养基上地枫皮丛生芽保存时间为 316 d,保存效果良好。

表 5 地枫皮种质保存培养基
筛选渗透压正交实验 L₉(3⁴)

Table 5 The results of orthogonal test of filtration of
germplasm conservation medium of *Illicium difengpi*

因素 Factor				
水平 Level	A 琼脂 A Agar /(g · L ⁻¹)	B 蔗糖 B Sucrose /(g · L ⁻¹)	C 甘露醇 C Mannitol /(g · L ⁻¹)	保存时间 Preservation time/d
1	4.0	30	0	269
2	4.0	50	5	316
3	4.0	70	10	254
4	5.0	30	5	310
5	5.0	50	10	291
6	5.0	70	0	263
7	6.0	30	10	255
8	6.0	50	0	284
9	6.0	70	5	298
K ₁	279.67	278.00	272.00	
K ₂	288.00	297.00	308.00	
K ₃	279.00	271.67	266.67	
R	9.00	25.33	41.33	

表 6 地枫皮种质保存方差分析(渗透压)

Table 6 Variance analysis of conservation time of *Illicium difengpi*

方差来源 ANOVA	离均差平方和 SS	自由度 df	方差 Variance	F 值 F value	P 值 P value
琼脂 Agar	150.89	2	75.44	1.56	0.1 < P
蔗糖	1 042.89	2	521.44	10.76	0.05 < P < 0.1
甘露醇	3 032.89	2	1 516.44	31.30	0.01 < P < 0.05
误差	96.89	2	48.44	1	



图 1 长期保存的地枫皮

Fig. 1 Long-term preservation of *Illicium difengpi*

2.4 离体保存的地枫皮试管苗的生长恢复情况考察

将保存材料接种到 MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 繁殖培养基上恢复生长,对

第3次继代培养的材料进行芽增殖倍数考察。同时将第3次培养所得的丛生芽单切接入生根培养基中对生根率进行考察见表7。由图2可知,保存材料经3次继代后,芽增殖倍数比正常水平略低,但无明显差异,生长旺盛,颜色浓绿,生根率则变化不大,根数、根长与正常相近,根系也同样发达,生长没有因长期保存而受到不良影响,证明地枫皮在1/2 MS+蔗糖50 g/L+琼脂4.0 g/L+甘露醇5 g/L+CCC 1.0 mg/L培养基常温下保存较为合适。

表7 离体保存后恢复的
试管苗和保存前试管苗的比较

Table 7 compared the recovered after *in vitro* conservation and the preservation tube plantlets

材料 Material	繁殖倍数 Reproduction multiples	生根率 Rooting rate/%
正常	3.21±0.53	99.7±0.21
保存	2.67±0.23	99.2±0.17

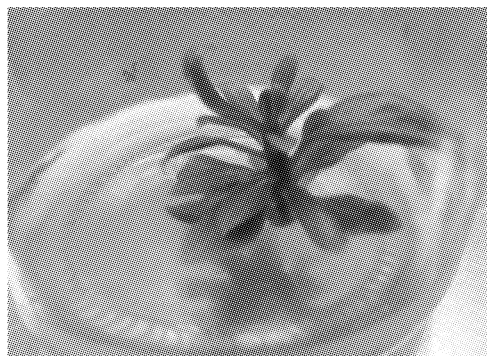


图2 长期保存地枫皮的恢复效果

Fig. 2 Recovery effect of long-term preservation of *Illicium difengpi*

3 讨论与结论

离体保存技术由于具有占用空间小、无菌培养、无病虫害、省时、省地及易于交流等特点,目前得到广泛的

应用^[9]。药用资源是重要的战略资源,而珍稀濒危药用植物是国家研究和保护的重点。运用离体保存技术将使珍稀濒危物种得到保存或改善,挽救物种,缓和药用植物资源的品种短缺、产量减少,并在一定程度上提高药材品质。

地枫皮作为国家Ⅱ级重点保护野生植物,又是传统瑶药,目前其离体保存研究未见报道,该研究首次建立了地枫皮的常温离体保存体系,能够长期保存其无菌丛生芽,为种质资源保护和开发利用提供基础。地枫皮常温下离体保存最佳培养基为:1/2 MS+蔗糖50 g/L+琼脂4.0 g/L+甘露醇5 g/L+CCC 1.0 mg/L;离体保存的地枫皮丛生芽外观形态、生长发育均与未处理材料无显著差异;该保存技术适合地枫皮种质资源的长期保存。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书-稀有濒危植物(第1册)[M]. 北京:科学出版社,1992:62.
- [2] 黄宝优,吴庆华,柯芳. 中药地枫皮的研究概况[J]. 大众科技,2008(1):126-127.
- [3] 唐辉,史艳财,孔德鑫,等. 岩溶特有植物地枫皮的种质资源调查及地理分布[J]. 广东农业科学,2011(12):113-117.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [5] VILLALOBOS V M, ENGELMAN F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology[J]. Biotechnol, 1995, 11: 375-382.
- [6] SUNDHERSAN C, ABOEL-NI M, HUSSAIN J. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants[J]. J. Arid Env, 2003, 54: 133-147.
- [7] 史永忠,邓秀新,万蜀渊,等. 苹果种质资源的离体保存[J]. 作物品种资源, 1996(4): 42-43, 39.
- [8] KARTHA K K. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems[J]. Plant Sci Lett, 1981, 22(2): 301-307.
- [9] 洪森荣,郭连金. 离体保存技术在植物种质资源保存中的应用[J]. 上饶师范学院学报, 2006, 26(3): 92-97.

In vitro Conservation Technique of *Illicium difengpi* Germplasm

ZHANG Le^{1,2}, LI Linxuan², WEI Kunhua², LYU Huizhen², LI Minhui^{1,2}

(1. Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014060; 2. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract: Taking *Illicium difengpi* as test material, to explore a method for the germplasm conservation *in vitro* of *Illicium difengpi*, the single buds were used as experimental materials to study the effects of inorganic salts, phytohormone and osmotic pressure, and the growth recovery was evaluated after *in vitro* conservation. The results showed that the best conservation condition was 1/2 MS basal medium containing 50 g/L sucrose, 4.0 g/L agar powder and 5 g/L mannite supplemented with 1.0 mg/L CCC, in illuminated chamber, 12~14 hours light/12~10 hours dark photoperiod of 2 000 lx light intensity at 25±2°C, the survival rate was 50% after ten month conservation, and most of them could growth well on propagation medium.

Keywords: rare or endangered; *Illicium difengpi*; germplasm resource; *in vitro* conservation