

文章编号: 1001 - 4829 (2010) 03 - 0981 - 02

药用植物金铁锁无性系保存

虞泓¹, 屈燕¹, 程治英², 龙春林², 马晓青²

(1. 云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室, 云南 昆明 650091; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

In vitro Preservation of *Psamm osilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu

YU Hong¹, QU Yan¹, CHEN Zhi-ying², LONG Chun-lin², MA Xiao-qing²

(1. Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Yunnan Kunming 650091, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Yunnan Kunming 650204, China)

金铁锁 *Psamm osilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 系石竹科 Caryophyllaceae 金铁锁属 *Psamm osilene* 单种属植物^[1], 是研究石竹科系统与进化非常重要的材料。金铁锁为中国西南地区所特有的民间草药, 500多年前就已广泛利用^[2]。金铁锁在“云南白药”、“百宝丹”、“癖痛宁”等中成药中均用作主要原料。由于长期过度采集, 加上分布区窄不连续, 仅分布于云南、贵州、四川和西藏局部地区, 1991年作为稀有濒危物种被列入《中国植物红皮书》第一册^[3]。

金铁锁野外自然居群开花个体数占总个体数的 47%, 种子结实率在 50% 以下, 仅每级顶花能正常结实, 且萌发率低, 在 42% 以下^[4]。研究发现, 利用培养皿进行金铁锁种子萌发试验, 发现种子潜在萌发力均较高, 萌发率在 85% ~ 96%。在水分条件充足的温室栽培条件下, 幼苗存活率均在 85% 以上。可见人工引种栽培金铁锁并不困难。金铁锁可以通过芦头作为无性繁殖材料, 利用植物的地上部分进行扦插繁殖^[5]。欧阳志勤等通过组培苗进行金铁锁的离体培养和快速繁殖^[6]。杨耀文等通过对金铁锁进行组培繁殖, 在诱导、增殖、生根等阶段

和规模培养等得到适宜的培养基和培养条件^[7]。

据调查统计, 金铁锁居群在形态表型、大小孢子发育、光合作用及水分利用率、繁殖适合度和生存适合度等方面表现出较大分化。根据直接扩增片段长度多态性 (DALP) 对 17 个居群进行检测发现其居群间基因分化系数高达 79%。通过繁育试验对 4 个不同金铁锁居群进行检测, 发现自交率在 40.3% ~ 76.2%。又如一些有趣的居群间多型现象, 丽江居群种子萌发均有一个休眠期, 越冬后才能萌发; 而昆明团结乡居群的种子几乎无休眠期, 当年就可形成幼苗。因此, 对于居群间分化明显的金铁锁而言, 应该选取来自不同地理种源的金铁锁居群进行离体保存的研究, 以全面保护该物种的遗传多样性, 探讨其离体保存的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从云南昆明长虫山和团结乡、白鱼口、宣威和香格里拉各地野生植株上采集芽和带腋芽的茎段, 建成 5 个居群、24 个单组无性系。

1.2 培养条件

基本培养基为 MS, 附加 BA 0.2 ~ 0.5 mg/L + NAA 0 ~ 0.2 mg/L。筛选出最适培养基后分别添加生长抑制剂矮壮素 (CCC)、多效唑 (PP333) 或脱落酸 (ABA), 试验浓度为 0.5, 1, 2, 5, 10 和 15 mg/L。糖浓度 3%, 琼脂固化, pH 值 5.8, 培养温度 (26 ± 2), 光照时间 12 h/d, 光强 40 μmol/m²/s, 保存时间确定以试管材料坏死 20% 为终止期。

收稿日期: 2009 - 09 - 24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370156); 科技部国家科技基础条件平台项目 (2004DKA30430); 国家自然科技资源共享平台建设 (2005DKA21006)

作者简介: 虞泓 (1962 -), 男, 云南思茅人, 现为云南大学生命科学学院教授, 博士生导师, 主要从事植物学和中草药生物资源开发与教学工作, E-mail: hongyu@ynu.edu.cn; herbfish@163.com。

2 结果与分析

2.1 植物生长激素及组合对金铁锁室温保存的影响

香格里拉 1 个无性系和白鱼口的 2 个无性系, 在 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上可维持 75 d; 而宣威 4 个无性系、昆明团结乡 9 个无性系和长虫山 8 个无性系均培养 60 d 必须继代。而在 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上, 所有无性系可延长继代时间为 90~105 d, 因此我们筛选这种培养基作为生长抑制剂实验的基本培养基。BA 和 NAA 单独使用 (浓度为 0.2 mg/L), 只能维持培养物生长 70~90 d。

2.2 生长抑制剂对金铁锁离体保存的影响

3 种生长抑制剂在低浓度时 (CCC 0.5 mg/L, PP333 0.5~1 mg/L 和 ABA 0.5 mg/L) 对 5 个居群 24 个无性系均有效。在室温下, 可延长继代时间为半年或半年以上。生长抑制剂浓度过高 (5, 10, 15 mg/L), 无性系培养 15 d 左右, 便表现褐变、死亡或者是不抽新芽、生长停止、伤害作用。

2.3 生长抑制剂损伤的鉴定

采用恢复培养物的再生长方式进行, 将培养在含低浓度生长抑制剂 (CCC、PP333 和 ABA) 的培养基上的无性系, 半年后转接到新鲜的 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上, 经约 10 d 培养, 无性系几乎 100% 恢复生长, 表现为生长加快, 茎节间延长; 约 30 d 植株高度由原来的 2~3 cm 长到 6 cm 左右。

2.4 遗传稳定性的鉴定

保存不同居群和不同基因型的无性系, 目的是

为了金铁锁可持续开发利用, 遗传种质特性的保持十分重要。我们进行生长抑制剂处理前后无性系染色体数的统计, 均为 $2n=28$ 。

3 讨论

本次对金铁锁 5 个不同生态地理种源无性系保存的成功, 为金铁锁不同生态地理种源的离体保存研究提供了参考。但要构建完善的金铁锁无性系离体种质库, 必须重视金铁锁居群分化剧烈之遗传特点, 结合各居群在形态、生理、繁育和遗传等多层次的分化趋势, 注重不同生态地理种源取样保存为主, 兼顾优秀单株取样保存为辅, 才能全面保存其遗传多样性。金铁锁不同生态地理种源无性系离体种质库建设, 将为保存这一珍稀濒危单种属植物提供一条好、快、省的途径。

参考文献:

- [1] 吴征缙. 云南植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1977.
- [3] 傅立国. 中国植物红皮书 - 稀有濒危植物 (第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [4] 谢 晖, 钱子刚, 杨耀文, 等. 金铁锁居群繁殖生物学初步研究 [J]. 中药材, 2003, 26(10): 702-703.
- [5] 王特文, 师红毅, 何承鹏, 等. 苗药金铁锁种质资源保存研究 [A]. 中国药学会学术年会 2004 年中国药学会学术年会论文集 [C]. 2004.
- [6] 欧阳志勤, 黄家林, 胡 虹. 金铁锁的离体培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 361.
- [7] 杨耀文, 钱子刚, 谢 晖, 等. 珍稀濒危药用植物金铁锁的组织培养和快速繁殖研究 [J]. 世界科学技术 - 中药现代化, 2003, 5(4): 56-60.

(责任编辑 谢晓慧)