

珙菲亚组织培养条件的优化研究

李林轩, 凌征柱, 李翠, 彭凌, 韦坤华*

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: 目的 优化珙菲亚组织培养快速繁殖技术。方法 分别以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 采用正交设计研究植物生长调节剂多因素组合 (6-BA、NAA、IBA 和 IAA) 对珙菲亚继代增殖和诱导生根的影响。结果 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.2 mg/L 利于丛生芽继代增殖, 30 d 繁殖系数 6.0 以上; 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 适于诱导生根获得再生植株, 生根率 100%; 生根苗移栽于排水良好的沙床上, 成活率 98%。结论 本实验为保护珙菲亚的野生资源, 发展人工栽培和探讨育种新途径奠定基础。

关键词: 珙菲亚; 组织培养; 继代增殖; 正交设计; 丛生芽

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1334-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.025

Optimization of tissue culture conditions for *Pfaffia paniculata*

LI Lin-xuan, LING Zheng-zhu, LI Cui, PENG Ling, WEI Kun-hua

Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To establish and optimize the technique of tissue culture and rapid propagation of *Pfaffia paniculata*. **Methods** Using MS and 1/2MS basic media, the effects of various combinations of plant growth regulators (6-BA, NAA, IBA, and IAA) on the seedlings subculture and rooting culture were studied by orthogonal design. **Results** The effective medium for cluster buds-inducing and subculture was MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.2 mg/L, and the propagation coefficient was over 6.0 per 30 d; The best rooting medium was 1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L, and the rooting rate was 100%. The rooting seedlings were transplanted in well-drained sand bed and the survival rate was 98%. **Conclusion** The method in the experiment could provide a basis on protecting the mild resources of *P. paniculata* exploring the artificial resources, and discussing the new way breedings.

Key words: *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze; tissue culture; subculture; orthogonal design; clustered buds

珙菲亚 *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze 系茛科牛膝属多年生草本植物^[1], 俗称巴西人参, 在巴西主要分布在圣保罗、马托格罗索、巴拉那洲及巴拉那河流域^[2]。在南美洲作为稀有的名贵药材、以“Para Tudo” (适用于一切的万灵之药) 之名被当地人广泛使用, 媲美中国的野山参、冬虫夏草。其以根入药, 具有清热解毒、强精壮阳、抗炎镇痛等功效。主要用于治疗心血管、中枢神经、生殖、消化系统等疾病^[3]。珙菲亚是美国 FDA 批准的健康食品。现代实验科学的研究结果证明, 该药材在抗肿瘤方面、镰刀形血球贫血症的治疗方面作用明显。国外对其已有许多研究, 并开发出以珙菲亚为原料的多种药物在市场上销售, 国内已有企业进口野生

珙菲亚原料从事其功能食品和药品的研发^[4]。

2001 年由中国医学科学院和巴西独资瀚尔斯公司将珙菲亚初步引种到中国, 引起社会各界的广泛关注。为解决珙菲亚在引种栽培中种源短缺的问题, 本课题组利用现代生物技术通过正交试验优化珙菲亚组织培养条件, 为珙菲亚快速繁殖规模化生产育苗提供技术支撑, 从而更好地开发和利用珙菲亚药用植物资源。

1 材料

样品采集自广西药用植物园科研基地内野生健壮无病虫害的珙菲亚 *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze 植株, 经广西药用植物园凌征柱研究员鉴定, 选取其幼嫩茎尖为外植体。

收稿日期: 2012-11-29

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科研资助项目 (Z2006178)

作者简介: 李林轩 (1986—), 男, 本科, 助理研究员, 从事中药资源保护与开发利用研究。Tel: 18577195096 E-mail: starry1125@sina.com

*通信作者 韦坤华 (1983—), 女, 博士, 助理研究员, 从事药用植物生物技术研究。E-mail: divinek@163.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1117.005.html>

2 方法

2.1 样品的处理

将嫩茎置洗洁精水中浸泡 10 min, 用自来水流水冲洗 15 min, 在超净工作台上置于 0.1%升汞溶液浸泡消毒 8 min, 再用无菌水浸洗 4 次, 每次浸洗 5 min, 然后将带有嫩芽的外植体接种于 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上, 30 d 后将其诱导出的丛生芽作为实验材料。

2.2 丛生芽繁殖

取无菌丛生芽, 在基本培养基 MS+蔗糖 25 g/L+琼脂 4.0 g/L 中添加不同质量浓度的 6-BA (A)、NAA (B)、IBA (C), pH 5.8, 平均光强 2 000 lx 的光照度下培养, 光照时间 12 h/d, 温度 (25±3) °C。采用 L₉(3⁴) 正交试验, 考察不同激素组合对珙菲亚丛生芽繁殖系数的影响, 见表 1。

2.3 生根培养

单切丛生芽为单芽, 在基本培养基 1/2 MS+蔗糖 20 g/L+琼脂 5.0 g/L 中添加不同质量浓度的 NAA (A)、IBA (B)、IAA (C), pH 5.8, 平均光强度 2 000 lx 的光照下培养, 光照时间 12 h/d, 温

度 (25±3) °C。采用 L₉(3⁴) 正交试验, 考察不同激素组合对珙菲亚生根率的影响, 见表 2。

表 2 珙菲亚生根培养激素因素水平表

Table 2 Factors and levels of roots-inducing hormone in *P. paniculata*

| 水平 | A/(mg·L ⁻¹) | B/(mg·L ⁻¹) | C/(mg·L ⁻¹) |
|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 0.5 | 0.1 | 0 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | 0.2 |
| 3 | 1.5 | 1.0 | 0.5 |

3 结果分析

3.1 丛生芽培养体系的建立

将丛生芽接入继代增殖培养基 1 周后, 开始有新芽出现, 随后培养基中丛生芽大量繁殖, 30 d 后统计繁殖系数, 结果见表 3, 方差分析见表 4。

从表 3 中可以看出, 添加激素 6-BA 1.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L、IBA 0.2 mg/L 时繁殖系数最高, 增殖倍数达到 6.0 倍。方差分析对丛生芽增殖可以看出, 6-BA 与 NAA 对丛生芽增殖有极显著影响, IBA 也有显著影响, 各激素对丛生芽的增殖重要性为 6-BA>NAA>IBA, 增殖率主要受 6-BA 质量浓度的影响, 丛生芽数量随着 6-BA 质量浓度 (1.0~1.5 mg/L) 的增加而增多, 当 6-BA 高于 1.5 mg/L 时, 芽数量减少, 繁殖系数下降, 表明高质量浓度 6-BA 对丛生芽诱导有抑制作用。实验表明, 添加低质量浓度的生长素有利于丛生芽增殖和生长, 6-BA 质量浓度不变, 添加不同质量浓度的 NAA、IBA 对增殖率影响很大。其中 NAA 质量浓度的变化对珙菲亚

表 1 诱导珙菲亚丛生芽不同激素因素水平表

Table 1 Factors and levels of clustered buds-inducing hormone in *P. paniculata*

| 水平 | A/(mg·L ⁻¹) | B/(mg·L ⁻¹) | C/(mg·L ⁻¹) |
|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 1.0 | 0.1 | 0.1 |
| 2 | 1.5 | 0.2 | 0.2 |
| 3 | 2.0 | 0.4 | 0.4 |

表 3 珙菲亚丛生芽诱导繁殖 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 3 Results of clustered buds-inducing propagation of *P. paniculata* by L₉(3⁴) orthogonal test

| 编号 | A/(mg·L ⁻¹) | B/(mg·L ⁻¹) | C/(mg·L ⁻¹) | D(空白) | 繁殖系数 | 芽粗壮度 |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|------|------|
| 1 | 1.0 | 0.1 | 0.1 | (1) | 4.0 | 细 |
| 2 | 1.0 | 0.2 | 0.2 | (2) | 4.6 | 粗 |
| 3 | 1.0 | 0.4 | 0.4 | (3) | 3.4 | 粗 |
| 4 | 1.5 | 0.1 | 0.2 | (3) | 6.0 | 粗 |
| 5 | 1.5 | 0.2 | 0.4 | (1) | 5.6 | 粗 |
| 6 | 1.5 | 0.4 | 0.1 | (2) | 4.8 | 细 |
| 7 | 2.0 | 0.1 | 0.4 | (2) | 4.3 | 粗 |
| 8 | 2.0 | 0.2 | 0.1 | (3) | 3.8 | 细 |
| 9 | 2.0 | 0.4 | 0.2 | (1) | 3.8 | 粗 |
| K ₁ | 4.00 | 4.77 | 4.20 | 4.47 | | |
| K ₂ | 5.47 | 4.67 | 4.80 | 4.57 | | |
| K ₃ | 3.97 | 4.00 | 4.43 | 4.40 | | |
| R | 1.50 | 0.77 | 0.60 | 0.16 | | |

增殖率的影响要大于 IBA, IBA 主要影响芽的粗壮度。从表 3 可以看出 IBA 和 NAA 在最适质量浓度条件下联合使用能有效促进珙菲亚丛生芽的增殖和提高芽的质量,从平均值分析可知 A₂B₁C₂ 为最佳组合,珙菲亚继代增殖的最适培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L, 在此培养基上形成丛生芽的频率较高,繁殖系数为 6.0 植株健壮,芽苗质量好(图 1)。

表 4 珙菲亚丛生芽诱导繁殖方差分析结果

Table 4 Variance analysis of clustered buds-inducing propagation in *P. paniculata*

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 方差 | F 值 | 显著性 |
|-------|--------|------|------|--------|--------|
| A | 4.40 | 2.00 | 2.20 | 104.26 | P<0.01 |
| B | 1.04 | 2.00 | 0.52 | 24.68 | P<0.01 |
| C | 0.55 | 2.00 | 0.27 | 13.00 | P<0.05 |
| D(误差) | 0.04 | 2.00 | 0.02 | 1.00 | |



图 1 珙菲亚继代培养

Fig. 1 Subculture of *P. paniculata*

表 5 珙菲亚丛生芽诱导生根 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 5 Result of clustered buds-rooting induction of *P. paniculata* by L₉(3⁴) orthogonal test

| 编号 | A/(mg·L ⁻¹) | B/(mg·L ⁻¹) | C/(mg·L ⁻¹) | D(空白) | 生根率/% | 苗的生长情况 |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|-------|--------|
| 1 | 0.5 | 0.1 | 0.0 | (1) | 90.0 | 短粗 |
| 2 | 0.5 | 0.2 | 0.2 | (2) | 95.0 | 健壮 |
| 3 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | (3) | 88.0 | 细长 |
| 4 | 1.0 | 0.1 | 0.2 | (3) | 95.0 | 短粗 |
| 5 | 1.0 | 0.2 | 0.5 | (1) | 100.0 | 健壮 |
| 6 | 1.0 | 0.5 | 0.0 | (2) | 92.0 | 细长 |
| 7 | 1.5 | 0.1 | 0.5 | (2) | 84.0 | 短粗 |
| 8 | 1.5 | 0.2 | 0.0 | (3) | 90.0 | 健壮 |
| 9 | 1.5 | 0.5 | 0.2 | (1) | 85.0 | 细长 |
| K ₁ | 91.00 | 89.67 | 90.67 | 91.67 | | |
| K ₂ | 95.67 | 95.00 | 91.67 | 90.33 | | |
| K ₃ | 86.33 | 88.33 | 90.66 | 91.00 | | |
| R | 9.33 | 6.67 | 1.00 | 1.33 | | |

3.3 再生苗的移栽

根据珙菲亚的生长特性将已生根的试管苗开盖炼苗 3~4 d,洗净根部的培养基后,移栽于消过毒的沙床上,每天向叶面喷洒少量的水,30 d 后移栽

3.2 丛生芽诱导生根实验

将生长健壮的芽苗单切接入珙菲亚生根培养基中,30 d 后统计生根率见表 5。珙菲亚试管苗在附加不同质量浓度 NAA、IBA、IAA 的 1/2 MS 培养基上均可生根。经 NAA、IBA 和 IAA 3 个水平 9 个质量浓度组合的正交试验,对实验结果进行直观分析,发现 IBA 主要影响苗的生长情况,IBA 为 0.2 mg/L 时苗生长健壮,质量最好。通过方差分析结果发现 NAA 与 IBA 对丛生芽生根都有极显著影响,见表 6。但 NAA 影响要大于 IBA,而 IAA 影响不显著,生根率随着 NAA 质量浓度(0.5~1.0 mg/L)增加而提高,当 NAA 质量浓度高于 1.0 mg/L 时生根率下降,表明高质量浓度 NAA 植株的生根有抑制作用。从表 5 可以看出 IBA 对苗的生长影响显著,在 0.2 mg/L 时生长得最健壮。对实验结果极差分析发现 NAA、IBA 的极差分别为 9.33、6.67,大于对照项极差 1.33,而 IAA 的极差 1.00 比对照项极差 1.33 小,说明 IAA 的效应是不可靠的,NAA、IBA 两因素的效应可靠,再结合方差分析(表 6) IAA 对生根率影响不显著,因此可以不考虑,减少激素对植株变异的影响。通过平均值分析可知,珙菲亚丛生芽生根诱导的最佳组合为 A₂B₂(最佳培养基 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L),用此培养基珙菲亚生根苗根相对粗壮,植株健壮,利于试管苗移栽(图 2)。

成活率达 98%。

4 讨论

培养基中添加的生长调节素,如生长素和细胞分裂素是植物组培快速生长所必须的因素,是诱导

表6 珙菲亚生根诱导实验方差分析结果
Table 6 Variance analysis of rooting induction
of *P. paniculata*

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 方差 | F值 | 显著性 |
|-------|--------|------|-------|-------|------------|
| A | 130.67 | 2.00 | 65.33 | 49.00 | $P < 0.01$ |
| B | 74.67 | 2.00 | 37.33 | 28.00 | $P < 0.01$ |
| C | 2.00 | 2.00 | 1.00 | 0.75 | $P > 0.01$ |
| D(误差) | 2.67 | 2.00 | 1.33 | 1.00 | |



图2 试管苗生根

Fig. 2 Rooting induction of test-tube plantlet

植物产生芽、根的关键因素^[5]。不同植物的组织培养体系所需的生长调节素的种类和质量浓度的配比也是不相同的。6-BA 是目前使用的最重要的细胞分裂素，能促进细胞分裂、非分化组织分化、侧芽生长等，但其质量浓度必须在适合的范围内才有利于植物的生长。本课题组在前期的研究中发现，6-BA 质量浓度过低，丛生芽较少，繁殖速度较慢，但6-BA 质量浓度过高，生长易受到抑制，叶片出现玻璃化和变形现象^[6]。NAA 是一种广谱的植物生长调节剂，具有促进细胞分裂与扩大、诱导形成不定根等作用，但是在组织培养过程中也容易致使材料老化和形成愈伤组织。本课题在前期研究中使用的0.5 mg/L 的NAA 与不同质量浓度的6-BA 配比，虽然也获得了较为理想的协同作用效果，但是在后续的继代培养中，发现虽然丛生芽数目较多，但试管苗瘦弱，愈伤组织较多，且部分试管苗出现玻璃化现象。因此认为需要对原来的培养基进行优化筛选，经过文献调研后，选择了IBA 作为培养基优化筛选的另一个生长调节素。IBA 是一种植物自身能够形成的内源生长素，能促进细胞分裂与细胞生长，诱导形成不定根。但在组织培养过程中，内源激素形成的速度较慢，无法满足植物生长的需求，需要从培养基中吸收。

研究表明多种生长调节素之间的协同作用效果要远大于一种激素的单独使用的效果^[7]。本实验的研究也表明，多种生长调节素组合可能产生更利于珙菲亚生长的交互作用效果。结果表明6-BA、

NAA、IBA 的配合使用对珙菲亚生长的均具有较大的影响，其中6-BA、NAA 对增殖有极显著影响，IBA 对增殖有显著影响。6-BA 的最适质量浓度为1.5 mg/L，与本课题组的前期报道一致^[8]。但NAA 的质量浓度不宜过高，过高反而抑制了材料的生长。同时IBA 的质量浓度也不宜过低或过高，过低丛生芽细弱，色泽偏淡，且较矮。过高丛生芽粗壮，但芽的数量较少，影响材料的繁殖速度。NAA 与IBA 均属于植物生长素，适当的质量浓度对比对珙菲亚的生长具有非常理想的促进效果。研究表明，珙菲亚继代培养的最适培养基生长调节素的种类和配比为6-BA 1.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L、IBA 0.2 mg/L。

在生根过程中也发现NAA 和IBA 的协同促进效果优于NAA 单独使用的效果，其中1.0 mg/L 的NAA 与0.2 mg/L 的IBA 联合使用生根效果最为理想，根系发育良好、粗壮、无愈伤，移栽后成活率较高。同时在实验中发现选苗是生根的关键因素。选苗的主要标准为苗的健壮程度，虽然苗的高度也具有一定的参考价值，但不是主要因素，细弱的苗生根移栽后是很难成活的。因此在生根时应选择健壮且有一定高度的组培苗来进行生根培养，生根后根部应没有愈伤组织形成，如果有愈伤组织即使根长的很好，移栽后也很难成活。

参考文献

- [1] 卞庆亚, 罗崇念, 马小军. 国外对珙菲西研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 1-2.
- [2] Pedersen T M. Studies in south American Almaranthaceae [J]. *Adansonia*, 1997, 19(2): 217.
- [3] 高辉. 巴西人蔘的化学成分研究 [D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [4] Ellis R H, Hong T D, Roberts E H. Comparison of the low moisture content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity in twelve species [J]. *Ann Bot*, 1989, 63: 601-611.
- [5] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [6] Schmülling T J. New Insights into the functions of cytokinins in plant development [J]. *Plant Growth Regul*, 2002, 21: 40-49.
- [7] 苏钰, 黄宁珍, 付传明. 匙羹藤组织培养条件优化研究 [J]. 广西植物, 2009, 29(1): 87-91.
- [8] 凌征柱, 刘园, 马小军, 等. 珙菲亚的组织培养快速繁殖研究 [J]. 种子, 2006, 25(10): 20-26.