

黄花蒿组培快繁与种质离体保存的研究

唐凤鸾, 韦记青, 蒋运生, 蒋水元, 黄宁珍*, 韦 霄

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘要: 以带侧芽的黄花蒿(*Artemisia annua* L.)茎段为外植体, 以 MS 为基本培养基, 进行组织培养和种质保存研究。结果表明, 培养基 MS+6-BA 1.0 mg L⁻¹+IBA 0.1 mg L⁻¹、MS+6-BA 0.5 mg L⁻¹+IBA 0.1 mg L⁻¹ 和 MS+NAA 0.1 mg L⁻¹+IBA 0.5 mg L⁻¹ 可分别用于黄花蒿的芽诱导、增殖和生根培养, 培养 20 d 的增殖倍数为 5.5 倍, 生根率 98.3%。培养基 MS+CCC 1.0 mg L⁻¹、MS+CCC 2.0 mg L⁻¹、MS+PP₃₃₃ 4.0 mg L⁻¹ 可用作离体保存, 连续保存 200 d 的存活率分别达 72.3%、77.0%、69.2%。活力检测表明, 黄花蒿种质经保存后的增殖、生根能力没有下降。因此, 可通过诱导腋芽增殖建立黄花蒿快繁体系, 及在培养基中添加 CCC 或 PP₃₃₃ 能使材料长期保存。

关键词: 黄花蒿; 组培; 快繁; 种质; 离体保存

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)05-0486-05

Rapid Propagation and Germplasm Conservation *in vitro* of *Artemisia annua* L.

TANG Feng-luan, WEI Ji-qing, JIANG Yun-sheng, JIANG Shui-yuan,
HUANG Ning-zhen*, WEI Xiao

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Science, Guilin 541006, China)

Abstract: The rapid propagation and germplasm conservation *in vitro* of *Artemisia annua* L. were studied using stem with axillary buds as explants cultured on Murashoga and Skoog (MS) basal medium. The buds could be induced successfully on MS medium supplemented with of 1.0 mg L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg L⁻¹ IBA. The suitable medium for bud multiplication was MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg L⁻¹ IBA. The buds could be proliferated by 5.5 times cultured for 20 days. The rooting medium was MS medium with 0.1 mg L⁻¹ NAA and 0.5 mg L⁻¹ IBA, accounting for 98.3% of rooting. The MS medium supplemented with CCC or PP₃₃₃ were found to be suitable for germplasm conservation *in vitro*. After preserved on MS+CCC 1.0 mg L⁻¹, MS+CCC 2.0 mg L⁻¹ and MS+PP₃₃₃ 4.0 mg L⁻¹ for 200 days, the survival rate of germplasm get to 72.3%, 77.0% and 69.2%, respectively, and the ability of propagating and rooting of the plantlets was not decreased. All these results indicated that the rapid propagation system of *A. annua* had been established by inducted axillary buds, and the germplasm could be conserved for a long time on MS medium supplement with CCC or PP₃₃₃.

Key words: *Artemisia annua* L.; Tissues culture; Rapid propagation; Germplasm; *In vitro* conservation

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)别名青蒿, 为菊科蒿属 1 a 生草本植物。其性寒味苦, 为传统清热解毒药物, 因含有青蒿素(Artemisini)而在药用植物中

占有重要地位。青蒿素是一种新型倍半萜内酯, 是继氯喹、乙氨嘧啶、伯喹和磺胺后最佳的抗疟特效药, 它具有起效快、效果好、毒性低等特性^[1-2], 对脑型

收稿日期: 2007-10-22 接受日期: 2008-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660222); 中国科学院农办项目(KSCXZ-YW-N-44-05); 广西区攻关项目(桂科攻 0663003); 广西区自然科学基金(桂科自 0640138)资助

* 通讯作者 Corresponding author

疟疾和抗氯喹恶性疟疾患者疗效尤为显著^[1],被世界卫生组织称为“世界上唯一有效的疟疾治疗药物”。

利用现有技术人工合成青蒿素工艺繁杂,产量低且毒性大^[4]。因而,目前主要还是采用植物提取青蒿素,但原植物中含量普遍较低,一般品系为0.01%~0.5%,而优良的单株系含量可达1.2%~1.5%^[5-6]。黄花蒿主要利用种子进行繁殖,但种子繁殖可使青蒿素的含量下降^[7],在组织培养中通过调节培养基和培养条件即可有效地解决这一问题。对黄花蒿的愈伤组织培养^[8]、不定芽及发根培养^[4,9-10]已进行了探索,然而对诱导黄花蒿腋芽进行繁殖的报道很少,对种质离体保存研究则未见报道。

因此,本研究通过诱导黄花蒿带芽的嫩枝直接形成小植株,进行种苗克隆化快速繁育,以在短时间内繁育出优良品种种苗,并探索黄花蒿种质在常温下长期离体保存的适宜培养基,为快速繁殖黄花蒿优良种苗和优良种质资源长期保存提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)种子为广西植物研究所选育出的93004品系的种子。将种子播于塑料大棚中,当植株长到30~50 cm时,取其带侧芽的嫩茎段为外植体。

1.2 黄花蒿无菌材料的获得

取黄花蒿植株的嫩茎段用自来水冲洗干净后,在超净工作台放入75%酒精中浸泡30 s,转入0.1% HgCl₂溶液中消毒6 min,无菌水冲洗5遍,将材料切成1 cm左右的带侧芽小段,接入MS培养基中培养,以获取无菌材料。

1.3 培养基及培养条件

芽的分化、增殖诱导及试管苗的生根诱导均以MS为基本培养基,添加不同浓度的植物生长调节剂6-BA、IBA、NAA,并附加蔗糖30 g L⁻¹;种质离体保存培养基为MS添加不同浓度的CCC(氯化氯胆碱 Chlorocholine chlorid,俗称矮壮素)、PP₃₃₃(氯丁唑 Paclobutrazol,俗称多效唑)和蔗糖20 g L⁻¹。此外,所有培养基均添加0.5%的琼脂,pH值5.8。

将配制好的培养基分装于200 ml的玻璃瓶

中,每瓶50 ml,在121℃下灭菌20 min。材料接种后均在温度25±3℃,湿度70%,日光灯连续光照12 h d⁻¹,光强22.5~25.0 μmol m⁻² s⁻¹的条件下培养。

1.4 接种及统计

种质保存试验各处理接种15瓶,其它各试验每处理为10瓶。每瓶接种5个材料,设3次重复。继代增殖和生根试验分别在培养20、25 d时进行观测统计,种质保存试验为每隔30 d统计一次。使用SPSS统计软件进行数据的分析。

2 结果和分析

2.1 快繁体系的建立

2.1.1 芽的分化诱导

将在MS培养基上培养的黄花蒿无菌材料,接种于培养基MS+6-BA 1.0 mg L⁻¹+IBA 0.1 mg L⁻¹中进行初代培养。培养20~25 d后形成3~5 cm高的丛生芽丛。

2.1.2 芽的增殖诱导

将初代培养所得的黄花蒿丛芽切成长1 cm左右带一个芽的节段,接种于添加0.5~1.5 mg L⁻¹ 6-BA和0~0.4 mg L⁻¹ IBA的MS培养基中,培养20 d时的观测结果见表1。各培养基均能促进黄花蒿芽增殖,增殖速度与6-BA的浓度有关,6-BA浓度为0.5~1.0 mg L⁻¹时比1.5 mg L⁻¹的增殖快,此外添加IBA也能提高芽的增殖系数,但效果不显著。增殖系数最高可达5.54。6-BA还能影响黄花蒿芽的生长质量,低浓度的6-BA能显著提高芽的高度和粗壮度,以0.5 mg L⁻¹ 6-BA最佳。从表1还可看出,0.5 mg L⁻¹ 6-BA与0.1~0.4 mg L⁻¹ IBA联合使用能有效促进黄花蒿增殖和提高芽的质量,但在实际应用中,为了降低培养过程中可能出现的异常和突变,培养基中的生长调节剂浓度应尽可能地低,因此认为6-BA 0.5 mg L⁻¹与IBA 0.1 mg L⁻¹的搭配为最佳。

2.1.3 试管苗的生根

黄花蒿试管苗较易生根,在附加不同浓度NAA、IBA的MS培养基上均可长根。从表2可知,在只加NAA的培养基上,植株生根的数量较少,且较细,叶缘向下弯曲。IBA处理的植株生根率、根数、根长及粗壮度都比NAA处理的好,并且叶片平展浓绿,而NAA和IBA联合使用的效果更明显,在含NAA 0.1 mg L⁻¹+IBA 0.5 mg L⁻¹培养基

上的生根率达 98.3%, 且根多而壮, 有利于试管苗的移栽(图 1A)。可见黄花蒿的生根培养以 MS +

NAA 0.1 mg L⁻¹ + IBA 0.5 mg L⁻¹ 为较理想的培养基。

表 1 6-BA、IBA 对黄花蒿芽增殖的影响

Table 1 Effects of 6-BA and IBA on bud proliferation of *Artemisia annua*

6-BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	增殖系数 Propagation coefficient	高度 Height (cm)	状态 Status
0.5		4.92bcd	4.8ab	粗壮 Strong
0.5	0.1	5.50ab	5.1a	粗壮 Strong
0.5	0.2	5.24abc	4.7ab	粗壮 Strong
0.5	0.4	5.40abc	4.5ab	粗壮 Strong
1.0		4.80cd	4.1b	中等 Middle
1.0	0.1	5.06abc	4.3ab	中等 Middle
1.0	0.2	5.54a	3.9bc	中等 Middle
1.0	0.4	5.53a	4.0bc	中等 Middle
1.5		4.40d	3.1c	纤细 Slim
1.5	0.1	4.80cd	3.8bc	纤细 Slim
1.5	0.2	4.86cd	3.9bc	纤细 Slim
1.5	0.4	4.98abc	4.0bc	纤细 Slim

同列数据后不同字母表示差异显著($P < 5\%$)。Data followed by different letters within same column are significantly different at 5% level.

表 2 NAA、IBA 对黄花蒿试管苗生根的影响

Table 2 Effects of NAA and IBA on rooting of *Artemisia annua*

NAA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	生根率 Rooting (%)	根数 No. of roots	平均根长 Root length (cm)	状态 Status
0.1		70.1	5.5	4.1	纤细 Slim
0.5		59.7	5.12	3.6	纤细 Slim
	0.1	78.2	6.7	5.8	中等 Middle
	0.5	81.5	6.5	4.9	中等 Middle
0.1	0.5	98.3	8.1	5.2	粗壮 Strong

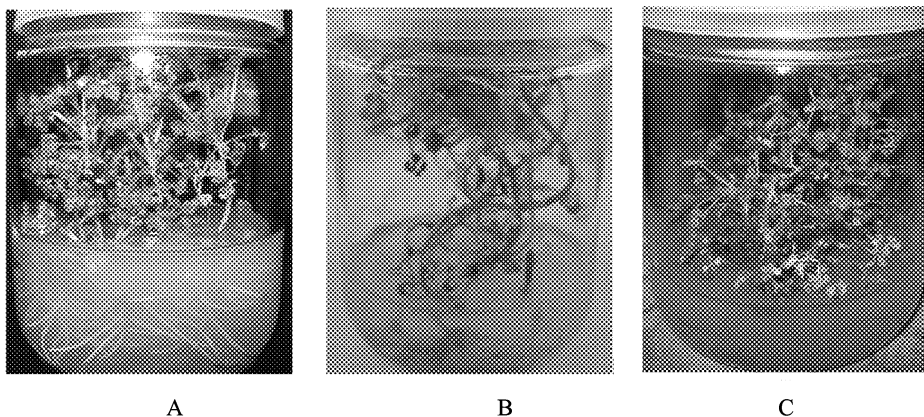


图 1 黄花蒿生根培养和种质离体保存培养的生长情况

Fig. 1 Rooting and germplasm conservation *in vitro* of *Artemisia annua* L.

A. 生根培养 Rooting; B. MS 上保存 60 d Conservation *in vitro* for 60 days on MS; C. 在 MS+CCC 2.0 mg L⁻¹ 上保存 200 d. Conservation *in vitro* for 200 days on MS supplemented with 2.0 mg L⁻¹ CCC.

2.1.4 试管苗的移栽

将已生根的完整小植株试管苗,在室内打开瓶盖炼苗2~3 d,洗净根部的培养基后,以火烧土为移栽基质,于塑料大棚中移入营养杯中。4~5 d后,每天向叶面喷洒少量的水,30 d后成活率达100%。

表3 CCC、PP₃₃₃对黄花蒿种质离体保存的影响

Table 3 Effects of CCC and PP₃₃₃ on conservation of

Artemisia annua in vitro

浓度 Concentrations (mg L ⁻¹)	培养时间 Culture days	存活率 Survival rate (%)
Control	90	/
CCC	0.1	37.1
	0.5	50.6
	1.0	72.3
	2.0	77.0
PP ₃₃₃	0.1	38.5
	1.0	33.4
	2.0	58.1
	4.0	69.2

2.2 离体保存

2.2.1 植物生长延缓剂的影响

经延缓剂处理的材料比未处理的生长速度明显减慢,在未加延缓剂的MS培养基上,材料生长快,节间长,植株高,茎上部很快在瓶内卷曲成团,60 d后植株老化变黄逐渐枯死(图2B),到90 d时已无植株存活。而经延缓剂处理的植株较矮,节间短,茎增粗,叶色浓绿。可见延缓剂可降低黄花蒿试管苗的生长速度,从而减少营养消耗,延长保存时间。从表3可看出,培养基中CCC浓度 ≥ 1.0 mg L⁻¹时,植株生长缓慢,而小于1.0 mg L⁻¹时,植株生长速度加快,节间增长,茎变细,侧芽及根增多,但后期成活率降低。当CCC浓度为1.0、2.0 mg L⁻¹时,保存200 d的成活率仍可达70%以上,且苗生长较好(图3C)。当培养基中PP₃₃₃浓度为0.1~1.0 mg L⁻¹时,植株生长较快,茎细、根多,营养消耗快,以至叶片发黄,植株衰老较快,存活率较低。当PP₃₃₃浓度为4.0 mg L⁻¹时,植株生长缓慢,培养200 d的植株高度仅有5.0 cm左右,成活率为69.2%。

2.2.2 保存种质的活力检测

保存200 d后,对部分黄花蒿种质进行增殖、生根能力检测。结果表明:经保存后的黄花蒿种质由保存培养基转接到增殖培养基上,经8~10 d培

养,材料开始萌芽,20 d时芽的平均高度仅有4.0 cm左右,增殖率为3.5倍。再将增殖所获得的芽进行第二次继代培养,培养20 d后芽高平均达4.8 cm,增殖率达5.5倍。第二代即达到了没有经过保存培养材料继代增殖的效果,恢复了原有的繁殖能力。材料回接到生根培养基后,生根率达96.8%,与未经保存材料的生根率相近。可见,当植物生长延缓剂CCC ≤ 2.0 mg L⁻¹、PP₃₃₃ ≤ 4.0 mg L⁻¹对离体保存黄花蒿材料的生长影响不大,在恢复培养两代后即可消除,因此,CCC、PP₃₃₃能用于黄花蒿的离体种质的长期保存。

3 结论和讨论

通过对黄花蒿试管苗的继代增殖、生根培养,获得了黄花蒿优良株系试管快繁技术。在试管苗繁殖中,应用单节培养的方法可以较大幅度地提高黄花蒿的繁殖速度,真正达到大量克隆化生产的目的,同时可减小黄花蒿试管苗在扩大繁殖过程中发生变异,从而保持各株系的遗传稳定性。黄花蒿芽增殖培养以6-BA浓度为0.5~1.0 mg L⁻¹时的增殖速度快,并有利于株高和茎粗生长,这与罗桂芬等^[1]报道6-BA浓度为0.5~1.0 mg L⁻¹时,黄花蒿芽苗长势正常,整体效应好的结果一致;当浓度为1.5 mg L⁻¹时,繁殖速度下降,芽变细变矮(表1),这与寻晓红^[2]报道黄花蒿的腋芽茎段增殖以2.0 mg L⁻¹6-BA效果最佳的结果差异较大。黄花蒿试管苗较易生根,在附加不同浓度NAA、IBA的MS培养基上均可生根,且IBA的效果比NAA好(表2),这与罗桂芬的试验结果相同^[1]。在本研究建立的组织培养克隆技术条件下:黄花蒿试管苗增殖培养基以MS+BA 0.5 mg L⁻¹+IBA 0.1 mg L⁻¹最好,每20 d芽增殖5.5倍,且能显著改善试管苗的品质,培养基MS+NAA 0.1 mg L⁻¹+IBA 0.5 mg L⁻¹可明显提高生根率(98.3%),改善根的质量和苗的性状,提高移栽成活率,可在今后生产上有效地应用。培养基中添加植物生长延缓剂CCC、PP₃₃₃可有效地延长黄花蒿种质的离体保存时间,当CCC浓度为1.0、2.0 mg L⁻¹和PP₃₃₃浓度为4.0 mg L⁻¹时,保存效果好,保存200 d材料的成活率分别达72.3%、77.0%、69.2%。活力检测表明保存后的种质的增殖、生根能力没有下降,对黄花蒿种质的影响不大,在恢复培养第二代即可消除。保存过程中,随着保存时间的增加,培养基中营养成分

逐渐消耗,种质活力丧失,部分种质在保存过程中逐渐死亡。John 认为种质离体培养保存过程中,当保存率下降到 25% 时,应转接至增殖培养基,进行增殖培养以恢复种质数量^[13]。在本实验中,添加植物生长延缓剂 CCC 和 PP₃₃₃,保存 200 d 后存活率均高于 25%,尤其是 CCC 为 1.0、2.0 mg L⁻¹、PP₃₃₃ 为 4.0 mg L⁻¹时,保存时间还可延长。

参考文献

- [1] Liu C Z(刘春朝), Wang Y C(王玉春), Ouyang F(欧阳藩), et al. Advances in artemisinin research [J]. Prog Chem(化学进展), 1999, 11(1): 41-47.(in Chinese)
- [2] Geng S(耿飒), Ye H C(叶和春), Li G F(李国凤), et al. Physiological and biochemical characteristics of *Artemisia annua* and its research progress [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2002, 8(1): 90-97.(in Chinese)
- [3] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 6-9.
- [4] Cai G Q(蔡国琴), Li G Z(李国珍), Ye H C(叶和春), et al. Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 1995, 11(4): 315-320.(in Chinese)
- [5] 韦美丽, 崔秀明, 陈中坚, 等. 黄花蒿栽培研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(5): 60-64.
- [6] 李国栋, 周全, 赵长文, 等. 青蒿素类药物的研究现状 [J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(7): 385-389.
- [7] 雷红松. 黄花蒿组培苗的移栽 [J]. 特种经济动植物, 2004(2): 31.
- [8] He X C(贺锡纯), Zeng M Y(曾美怡), Li G F(李国凤), et al. Callus induction and regeneration of plantlets from *Artemisia annua* and changes of Qinhaosu contents [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1983, 25(1): 87-90.(in Chinese)
- [9] Qin M B(秦明波), Li G Z(李国珍), Yun Y(云月), et al. Induction of hairy root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture *in vitro* [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1994, 36(Suppl): 165-170.(in Chinese)
- [10] Paniago N B, Giuletti A M. *Artemisia annua* L.: Dedifferentiated and differentiated cultures [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 36: 163-168.
- [11] Luo G F(罗桂芬), Hu H(胡虹), Duan J Y(段金玉). Tissue culture of *Artemisia annua* [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 1995(3): 207.(in Chinese)
- [12] Xun X H(寻晓红), Jiang T W(蒋泰文), Peng X Y(彭晓英), et al. Studies on the ways of shoots regeneration and the technique to induce polyploidy of *Artemisia annua* [J]. J Hunan Agri Univ(湖南农业大学学报), 2003, 29(2): 115-119.(in Chinese)
- [13] John H D. *In vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources [M]. London: Chapman and Hall, 1991: 106-107.