

文章编号: 1000-5471(2008)01-0116-05

青蒿离体快繁技术研究

于飞飞, 廖宇静, 贾秀山

西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716

摘要: 为建立青蒿 (*Artemisia annua* L.) 快速繁殖技术体系, 以青蒿带腋芽茎段作为外植体, 以 MS、1/2MS 为基本培养基, 附加不同种类、不同浓度的植物激素进行青蒿离体快繁培养研究. 结果表明: 外植体在 MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 培养基上诱导丛生芽效果最好; 1/2MS+ NAA 0.5 mg/L 诱导生根效果最佳, 可达 90%.

关键词: 青蒿; 快繁; 带腋芽茎段; 培养基

中图分类号: Q949.9

文献标识码: A

青蒿的种植人工化进程开始不久, 在一般状态下以野外自然生长为主, 但随着青蒿素的应用研究开展, 人工种植青蒿在近几年中逐渐形成规模^[1]. 在种植过程中, 青蒿素含量差别很大, 差别在 0.01%~2% 之间, 这为育种的选择提供了可能, 也增加了难度. 本项研究的目的是利用植物组织快繁技术, 研究各种试验因素以及不同配比的植物激素, 对诱导离体培养的青蒿发生丛生芽及生根过程中的作用效果, 建立青蒿试管无性系, 以便进一步研究各因素对青蒿内青蒿素含量的影响提供技术依据. 为了选择青蒿素含量高的植株进行人工选育, 保证植株能够在一年四季中都能够获得, 加快人工选育的进程, 特做青蒿的快繁试验研究, 以期保存良好的品种^[2-7].

1 材料与方法

1.1 试验材料

青蒿叶柄幼嫩茎段, 取自金佛山青蒿种植区青蒿品种与西南大学校内野生青蒿品种.

1.2 方法

选取青蒿生长健壮的新生嫩茎, 剪去叶片留下一段 5 cm 长左右的叶柄, 用流水冲洗 30 min. 在超净工作台上, 用 75% 酒精浸泡 30 s 后, 放入 0.2% 的升汞溶液中, 然后用无菌水冲洗 5 次, 再用无菌滤纸将材料表面水分吸干, 并将材料切成 0.5~2 cm 左右的带有叶柄的单节茎段接种于消毒的丛生芽诱导培养基中, 生芽后转移到 1/2MS 生根诱导培养基中, 每瓶接种 5~8 个茎段, 每个材料重复接种 4~6 瓶, 丛生芽诱导培养基激素配比见表 1, 生根培养基的激素配比见表 2, 培养基中蔗糖为 30 g/L, 琼脂为 6 g/L, pH5.8~6.0, 接种后置于 (25 ± 1) °C、光照时间为 10 h/d、光照度 1 500 lx 的条件下进行培养, 无激素处理为对照, 并进行观察记录统计试验结果.

2 结果与分析

2.1 激素诱导丛生芽效应

不同激素配比诱导丛生芽的效果对于利用腋生分生组织诱导丛生芽的过程, 就是打破顶端优势从而激

收稿日期: 2007-01-19

作者简介: 于飞飞(1984-), 男, 山东东营人, 硕士研究生, 主要从事遗传学研究.

通讯作者: 廖宇静, 副教授, 硕士生导师.

发腋生分生组织进入器官发生途径的过程, 这一过程与外源激素类别、与浓度密切相关. 将腋芽茎段置于含有不同细胞分裂素和生长素水平的器官发生诱导培养基上, 经过 8 d 的诱导培养后其外植体明显膨大, 两端切口边缘均形成浅绿色愈伤组织, 但均未见分化, 而在外植体的叶腋处则出现有数量不等的浅绿色小突起, 腋芽开始萌动、分化. 培养 14 d 后, 对诱导效果进行调查, 结果见表 3, 高浓度诱导率低, 但膨大最快, 然后很快转入生长停滞状态.

表 1 不同激素丛生芽诱导培养基

培养基序号	激素配比/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			
	6-BA	NAA	KT	IAA
1	4.0	0.1		
2	2.0	0.1		
3	1.0	0.1		
4	0.5	0.1		
5	4.0	0.5		
6	2.0	0.5		
7	1.0	0.5		
8	0.5	0.5		
9	4.0	1.0		
10	2.0	1.0		
11	1.0	1.0		
12	0.5	1.0		
13	4.0	2.0		
14	2.0	2.0		
15	1.0	2.0		
16	0.5	2.0		
17			4.0	0.1
18			2.0	0.1
19			1.0	0.1
20			0.5	0.1
21			4.0	0.5
22			2.0	0.5
23			1.0	0.5
24			0.5	0.5
25			4.0	1.0
26			2.0	1.0
27			1.0	1.0
28			0.5	1.0
29			4.0	2.0
30			2.0	2.0
31			1.0	2.0
32			0.5	2.0

表 2 不同激素生根诱导培养基

培养基序号	激素配比	
	IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	0.1	
2	0.5	
3	1	
4	2	
5		0.1
6		0.5
7		1
8		2

表 3 野生青蒿外植体丛生芽诱导效果比较

培养基序号	接种外植体数 /个	发生丛生芽的 外植体数/个	丛生芽诱导率/%	试管苗生长状况
1	30	6	20	膨大快, 但出苗少, 部分愈伤组织有玻璃化现象
2	30	10	33	部分玻璃化, 苗较好
3	30	18	60	长势较好
4	30	20	66	长势较好
5	30	5	17	玻璃化较严重, 长势一般
6	30	12	40	生长较好
7	30	28	93	生长很好, 健壮
8	30	24	80	生长很好, 健壮
9	30	4	13	有玻璃化, 生长一般
10	30	9	30	生长较好
11	30	20	67	生长较好
12	30	17	57	生长较好
13	30	/	/	/
14	30	7	23	生长较好
15	30	14	47	生长较好
16	30	11	37	生长较好
17	30	5	17	生长一般
18	30	9	30	生长一般
19	30	16	53	生长较好
20	30	17	57	生长较好
21	30	4	13	生长一般
22	30	13	43	生长较好
23	30	23	77	生长很好, 短粗
24	30	20	67	生长很好, 短粗
25	30	4	13	生长一般
26	30	14	37	生长较好
27	30	26	87	生长很好, 健壮
28	30	23	77	生长很好, 健壮
29	30	2	7	生长一般
30	30	7	23	生长较好
31	30	14	47	生长较好
32	30	9	30	生长较好

从表 3 可以看出, 6-BA 与 NAA 组合优于 KT 与 IAA 组合, 但激素总体浓度过高不利于生长; 随着激素下降生长基本呈上升趋势, 诱导丛生芽效果最好的激素组合是 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 其丛生芽诱导率可达 90% 以上, 并且丛生芽发育健壮、整齐一致, 不发生玻璃化现象. 根据镜检观测, 丛生芽主要是由腋生分生组织直接分化而形成的. 这表明了 6-BA 是一种更适合于诱导青蒿腋芽器官形成丛生芽的细胞分裂素, 其中 7 号培养基尤为明显. 27 号培养基诱导芽启动比较早, 但是膨大后生长速度远远落后于 7 号培养基中的快繁苗. 由表 3 可以看出, 1 号、5 号和 9 号培养基中的组培苗发生玻璃化现象, 这主要与 6-BA 浓度过高有关, 这表明对于青蒿这种草本植物在诱导丛生芽的过程中 6-BA 的浓度不宜过高, 否则极易玻璃化导致失败. 当丛生芽长成不定苗, 再将其切成带一个腋芽的单节后, 可继代培养或直接转入生根培养, 可以快速形成完整植株, 有利于转入室外进行炼苗, 每次继代 10 d 左右可形成大量的不定芽和无根苗.

2.2 不同激素诱导生根的效应

不同激素诱导外植体基本都能够生根(表 4), 但激素在 0.5~1.0 mg/L 的效果更好一些, 总体上单一激素生根, 浓度适度增高影响不是很大, 后来的补充试验发现激素高于 2.5 mg/L 的效果反而降低生根率, 过高浓度具有抑制效应, 这充分反映了激素的双重性特点.

表 4 野生青蒿外植体生根效果比较

培养基序号	接种外植体数/个	生根外植体数/个	生根诱导率/%	试管苗生长状况
1	30	12	40	长势较好
2	30	27	90	长势很好
3	30	25	83	长势很好
4	30	15	50	长势较好
5	30	10	33	长势较好
6	30	24	80	长势很好
7	30	26	87	长势很好
8	30	16	53	长势较好

2.3 激素诱导金佛山青蒿品种的生芽效应

将金佛山人工青蒿种植园区的青蒿品种带腋芽的茎段作为外植体接种于 7 号、8 号、27 号和 28 号丛生芽诱导培养基中, 8d 后进行观察, 结果如表 5。

表 5 诱导金佛山青蒿外植体生芽的效果比较

MS 培养基序号	激素/(mg · L ⁻¹)	接种外植体数/个	生芽的外植体数/个	丛生芽诱导率/%	试管苗生长状况
7	NAA0.5+6-BA1.0	30	29	96.7	健壮、整齐
8	NAA0.5+BA0.5	30	28	93	健壮、整齐
26	KT1.0+IAA1.0	30	27	90	健壮、整齐
27	KT0.5+IAA1.0	30	28	93	健壮、整齐

由表 5 可知, 金佛山人工栽培的青蒿品种诱导丛生芽率要大于野生青蒿品种, 并且形成丛生芽时间明显要短, 金佛山人工种植的青蒿品种明显健壮于野生青蒿品种。因此, 可以认为快繁苗的诱导时间与外植体的健壮程度具有相关性。7、8、27、28 号诱导培养基的诱导率都在 90% 以上。其中 26 号培养基萌发启动最快, 而启动期过后 7 号培养基生长速度远远大于其他培养基, 因此可认为用 7 号培养基效果要好于其他培养基, 但统计分析试验差异不显著。

2.4 激素诱导金佛山青蒿快繁苗生根的效应

选取健壮、丛生芽旺盛且苗高为 2.5 cm 以上的金佛山青蒿品种无根苗接种于 2、3、6、7 号生根诱导培养基进行生根诱导, 经过 10 d 左右的培养即可形成完整的生根植株。这几种生根培养基都能够形成根, 其结果生根率在 80% 以上(表 6), 青蒿试管苗都形成了完整的植株, 可转入室外进行炼苗。

表 6 NAA 诱导青蒿试管苗生根的效果

1/2MS 培养基序号	供试苗数	生根苗数	生根率/%	根的生长状况
2	30	27	90	纤细均匀、健壮
3	30	24	80	纤细均匀、健壮
6	30	25	83	粗细均匀、健壮
7	30	26	87	粗细均匀、健壮

3 讨 论

青蒿带腋芽的茎段为离体快繁理想的外植体, 可以在短时间内快速形成试管苗, 基本上能够保持遗传的稳定性。激素促进青蒿茎段分化为丛生苗或生根, 浓度要求适中, 过高易导致植株畸形, 形成板状, 降低了试管苗的质量。细胞分裂素与生长素比例过高时, 易导致玻璃苗产生^[9]。张洪胜等认为在试管苗玻璃化过程中, 作为内源激素的乙烯从代谢调节上起了关键性启动作用。而乙烯的产生则取决于培养环境中的胁迫条件, 如水势不当, 通气不畅(造成缺氧)及培养基用 6-BA 量过高等, 均会导致乙烯产生。乙烯产生后引发了其他激素质和量上的改变及酶类的变化。因此, 发生蛋白质、纤维素和木质素的合成障碍及降解, 叶绿素分解黄化, 逐渐形成玻璃化症状^[10]。另外, 愈伤组织形成诱导、愈伤组织分化诱导、芽、根分化诱导、继代培养其外源激素在培养过程逐渐成下降趋势, 这与内源激素的形成有关, 多因素激素使用效果好于单一激素效果, 这与激素的协同作用有关。另外, 在试验过程中发现个别激素配比组合能够同时诱导生

成芽和根,重复试验正在进行进一步研究.

其次,青蒿茎段中含有大量多酚类化合物,切芽时的创伤会激活组织中的多酚氧化酶.多酚氧化酶物质易被氧化为棕褐色的醌类物质,使外植体的切口处发生褐变,并渗透到培养基中,导致培养基褐化,严重影响培养物的生长和分化,甚至造成培养物的死亡^[8].及时的继代可有效防止褐变,有利于快繁苗的健康生长.

再次,近年来,大量研究学者如伍晓丽^[11]、王梦琼^[12]等探讨了青蒿组培苗诱导的激素配比.在实验中我们用组培苗诱导方式培养青蒿外植体作为对照进行验证,结果表明,在去分化、形成愈伤组织和再分化形成植株的标准式组培过程中,青蒿可以通过预培养手段提高愈伤组织的形成率,继而提高植株形成率,也可以直接生根,加快组培周期,便于快繁.但是通过这种方式培养,耗时较多,整个过程大约需要 2 个月左右,但可以不进行专门的生根培养.直接生根诱导培养,有利于在较短时间内快速形成完整植株,以供继续试验使用.

在本项研究的试验条件下,对于青蒿腋芽茎段来说,诱导丛生芽的培养基为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,生根培养基为 NAA 0.5 mg/L 时,其效果最佳.在此条件下,可以获得大量快繁苗,为工厂化培育优良无性系种苗提供了理论基础和一定的材料.

参考文献:

- [1] 陈海梅. 青蒿栽培技术 [J]. 特种经济动植物, 2006, 3: 26.
- [2] 贺锡纯, 陈和荣. 青蒿愈伤组织的诱导分化及青蒿素含量的变化 [J]. 植物学报, 1983, 25: 87-90.
- [3] 杨耀文, 李保军, 张廷襄. 黄花蒿组织培养的初步研究 [J]. 云南中医学院学报, 2001, 24(2): 8.
- [4] Weathers P J, Ramage C. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* [J]. Biotechnol. Lett., 1994, 16: 1281-1286.
- [5] 秦明波, 李国珍. 发根农杆菌诱导青蒿毛状根产生及其离体培养 [J]. 植物学报, 1994, 36(增刊): 165-170.
- [6] Ferreira J F S, Liu G S. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* [J]. plant cell Tiss. Org. Cult., 1996, 44: 211-217.
- [7] 赵兵, 王玉春, 欧阳藩. 生物合成青蒿素及其衍生物研究概况 [J]. 中药材, 1998, 21(12): 639-641.
- [8] 王蒂. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 55-56.
- [9] 曾少玲, 方良, 全古文, 等. 桉树组织培养中的玻璃化现象及克服措施 [J]. 桉树科技, 2002, 1: 30-31.
- [10] 张洪胜, 牟云官. 苹果离体培养中试管苗玻璃化现象发生机理的探讨 [J]. 果树科学, 1991, 2: 71-74.
- [11] 伍晓丽, 刘飞, 李隆云, 等. 青蒿叶片愈伤组织的诱导和植株再生 [J]. 时珍国医国药, 2007, 5: 105-106.
- [12] 王梦琼. 青蒿的组织培养及植株再生 [J]. 北京中医药大学学报, 2004, 3: 74-75.

Reserch on *Artesunate annua L.* with vitro Rapid Propagation Technology

YU Fei-fei, LIAO Yu-jing, JIA Xiu-shan

School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: In order to investigate the regeneration of the plant of *Artemisia annua L.*, the stem with axillary buds was used as explant. MS and 1/2MS was taken as the basic medium, adding different plant growth regulators of different concentrations. The results showed that the suitable medium for the buds was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L. The suitable medium for rooting was 1/2MS+NAA 0.5 mg/L, and the rooting induction rate is 90 percent.

Key words: *Artemisia annua L.*; in vitro rapid propagation; stem with axillary bud; culture medium

责任编辑 夏娟