

青蒿组织培养体系建立的研究

穆胜玉 白志川 宋孝霞

(西南大学,重庆 400716)

摘 要:为建立青蒿品种改良及其快速繁殖技术体系,以青蒿试管苗子叶和胚轴、嫩叶、田间栽培青蒿的花序为外植体,研究其离体培养及试管苗再生途径。结果表明,以青蒿花序为外植体,以 MS+6-BA 0.5mg/l+NAA 1.0mg/l 为愈伤组织诱导培养基,愈伤组织在 MS+6-BA 4.0mg/l+NAA 0.05mg/l 培养基上分化,以 MS+6-BA 2.0mg/l+6-KT 2.0mg/l 为扩繁培养基,分化苗转到 MS+NAA 1.0mg/l 培养基上生根。可以用较低成本,较短时间,比较简便地得到大量青蒿再生试管苗。

关键词:青蒿;青蒿素;花序;愈伤组织

中图分类号: R931.2

文献标识码: A

文章编号: 1673-1980(2006)04-0021-04

中国是世界上青蒿素原料药最大生产国,仅重庆市酉阳地区的产量就约占全球产量的 80%,质量也是世界上最好的。从青蒿(*Artemisia annua* L.)中提取的青蒿素被世界卫生组织称为“世界上唯一有效的疟疾治疗药物”,是所有抗疟疾药中起效最快、效果最好、毒性最低的药物^[1-3]。目前,非洲每年有 2.5 亿人次需要这种药。预计未来 10 年内,青蒿素及其衍生物原料的需求量将达到 1 000~1 500t。然而,青蒿素目前虽已能人工合成,但成本高,难度和毒性大,未能投入实际生产。药用青蒿素原料仍然主要来自田间栽培的黄花蒿。但在天然植物中,青蒿素含量普遍偏低,且不稳定,又因受地理环境、采集时期、采集部位、气温和施肥等因素的影响,品质不易控制,而且青蒿素的加工和提取等环节较多,费时费力,所以,青蒿素及其衍生物的产量总和不到 32t,与市场需求相差甚远。培育含量高且稳定的新品种将有明显的应用价值。组织培养研究有不破坏自然资源、不受自然条件限制、能加速育种进程等优点,还可通过各种细胞及基因工程的手段获得高产青蒿素的新品系,对新品种的培育和推广将具有基础性的探索意义,具有其他方法无法替代的优越性^[1-3]。同时,可为重庆市地区青蒿生物技术研究的实施提供平台。

关于青蒿组织培养的研究,国内外均有报道^[2,4,5]。本文采用 MS 与不同激素组合的培养基,探讨青蒿植物体不同部位愈伤组织的诱导,芽的分化以

及快速繁殖的适宜培养基和激素种类与浓度等培养条件,旨在为青蒿素的开发利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

青蒿(*Artemisia annua* L.)种子和田间栽培的青蒿植株的花序均来自西南大学农场青蒿种植基地。

1.2 方法

(1)青蒿无菌试管苗的获得。取青蒿种子用水洗净后,放入浓度为 10%的 NaCl 溶液中消毒 10min,然后用无菌水冲洗 5 次,接种在 MS 基本培养基上无菌萌发,5 天后获得无菌幼苗。

(2)青蒿愈伤组织的诱导。将田间栽培的青蒿花序,青蒿无菌苗的子叶和胚轴,青蒿无菌试管苗幼叶切下,分别接种在附加不同浓度激素和不同激素配比的诱导培养基中,培养基中含蔗糖 3%,琼脂 0.65%,pH 值 5.8。培养条件为先暗培养 9 天,温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$,每天光照 16h,光强 2 000Lux。

(3)青蒿愈伤组织分化试验。把由花序诱导产生的青蒿愈伤组织切成小块,分别接种到附加不同浓度激素和不同激素配比的分化培养基中,培养基中含蔗糖 3%,琼脂 0.65%,pH 值为 5.8,培养条件为温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$,每天光照 16h,光强 2 000Lux。

(4)青蒿试管苗的扩大繁殖试验。挑选由花序愈伤组织诱导的长势好且生长均一的 8 号和 12 号分

收稿日期:2006-09-18

作者简介:穆胜玉(1979-),男,山东日照人,西南大学植物系硕士,从事药用植物生物技术研究。

化培养基上产生的丛生芽,切成 0.5cm 见方小块,分别接种到添加不同浓度 6-BA 和 6-KT 的培养基中,培养基中含蔗糖 3%,琼脂 0.65%,pH 值为 5.8,培养条件同上。两周后进行统计和分析。

(5)青蒿试管苗的生根试验。共设计了 7 种添加 IAA、NAA 及其组合的 MS 培养基,将由花序诱导的青蒿试管苗切成带 1~2 个节的茎段,接种,进行生根培养试验,培养基中含蔗糖 3%,pH 值为 5.8,培

养条件同上。在培养了 20 天后进行统计和分析。

2 结果与分析

2.1 青蒿愈伤组织的诱导

实验结果表明,不同激素组合的 MS 培养基对三种外植体愈伤组织的诱导有不同的影响。生长 20 天后,进行统计,结果分别见表 1、表 2 和表 3。

从表 1 中可以看出,对照组 1 号没有产生愈伤

表 1 青蒿花序外植体诱导愈伤组织实验

培养基	激素/(mg/l)			接种数	愈伤组织数	形成率/%
	6-BA	NAA	2,4-D			
1 号	0	0	0	36	0	0
2 号	0	1.0	0	36	7	19.4
3 号	0	1.5	0	36	20	55.6
4 号	0	2.0	0	36	23	63.9
5 号	0	2.5	0	36	26	72.2
6 号	0	1.0	1.0	36	2	5.56
7 号	0	1.5	1.0	36	26	72.2
8 号	0	2.0	1.0	36	29	80.6
9 号	0	2.5	1.0	36	29	80.6
10 号	0.5	1.0	0	36	32	88.9
11 号	0.5	1.5	0	36	24	66.7
12 号	0.5	2.0	0	36	20	55.6
13 号	0.5	2.5	0	36	2	5.6
14 号	0.5	1.0	1.0	36	25	69.4
15 号	0.5	1.5	1.0	36	30	83.8
16 号	0.5	2.0	1.0	36	31	86.1
17 号	0.5	2.5	1.0	36	30	83.3
18 号	1.0	0	0.1	36	31	86.1
19 号	1.0	0	0.5	36	30	83.3
20 号	1.0	0	1.0	36	8	22.2
21 号	1.0	1.0	0	36	30	83.3

组织,而其他激素组合都有愈伤组织产生。这说明激素在愈伤组织产生过程中起决定作用。从 2 号至 5 号,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织诱导率增加,形成的浅黄色颗粒状愈伤组织块也逐渐增大。6 号到 9 号,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织诱导率也增大,尤其是从 6 号至 7 号,8 号与 9 号之间几乎无差异。由 10 号至 13 号,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织诱导率却降低,形成的绿色颗粒状愈伤组织块也逐渐减小。说明不同激素组合的作用差别较大,NAA 浓度的增加并不一定总是提高愈伤组织的诱导率,其适宜浓度为 1.0 mg/l。在所有激素组合中,以 10 号激素组合形成的绿色颗粒状愈伤组织最大,生长最快。从 14 号到 17 号,随着 NAA 浓度的增加,

诱导率先增加后减小,形成的愈伤组织块也是先增大后减小。18 号至 20 号,随着 2,4-D 浓度的增加,诱导率减小,形成的愈伤组织块也是逐渐减小,说明高于 0.1 mg/l 的 2,4-D 不利于青蒿愈伤组织的产生。由 2 号、10 号和 21 号可以看出,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织诱导率先增大后减小,说明 6-BA 的适宜浓度是 0.5mg/l。

从表 2 中可以看出:愈伤组织很容易产生,说明以青蒿子叶和胚轴为外植体诱导愈伤组织,对激素的种类和浓度选择性不强,但是产生的愈伤组织大多数为致密愈伤组织。随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织更容易产生。说明适当浓度的 6-BA 有利于青蒿愈伤组织的产生。

穆胜玉,白志川,宋孝霞:青蒿组织培养体系建立的研究

表2 青蒿子叶和胚轴外植体诱导愈伤组织实验

培养基	激素浓度/(mg/l)			愈伤组织产生情况
	6-BA	NAA	2,4-D	
1号	0.5	1.0	2.5	大部分产生致密愈伤组织,但较小,乳黄色,无褐化现象
2号	1.0	0	0.5	几乎全部产生致密愈伤组织,较大,多为绿色,少数乳黄色,少数褐化
3号	2.0	0.1	0	几乎全部产生致密愈伤组织,较大,绿色或者乳黄色,有些褐化
4号	2.0	1.0	0	几乎全部产生致密愈伤组织,较大,有的绿色,有的乳黄色,褐化较多

表3 青蒿幼叶外植体诱导愈伤组织实验

培养基	激素/(mg/l)			接种数	愈伤组织数	形成率/%
	6-BA	NAA	2,4-D			
1号	0.5	0	1.0	30	10	33.3
2号	0.5	1.0	1.5	24	0	0
3号	0.5	0	2.0	30	0	0
4号	1.0	0	0.5	28	18	64.3
5号	1.0	0	1.0	24	0	0
6号	1.0	2.5	2.0	24	0	0
7号	0.5	1.0	0	38	32	84.2
8号	0.5	2.0	0	32	12	37.5
9号	0.5	1.0	1.0	30	12	40.0
10号	0.5	1.0	1.5	32	0	0
11号	0.5	1.0	2.0	30	24	80.0
12号	1.0	6-KT	0.5	29	12	41.8

经观察发现,以青蒿幼叶为外植体,不同的激素及其浓度组合对其影响差别很大,其愈伤组织的形成率为0~84.2%。而且产生的愈伤组织均为致密愈伤组织,较小,颜色除了12号培养基的为绿色外,其余均为乳黄色。同时发现,12号培养基,有4个外植体由愈伤组织的上部直接产生分化苗,且长势较好。但是,2号、3号、5号、6号和10号培养基中均未有愈伤组织的产生。可能是较高浓度的2,4-D不利于愈伤组织的产生。

从以上试验可以看出,不同外植体和不同种类不同浓度的激素及其组合对青蒿愈伤组织诱导的影响存在明显差异。其中,以花序为外植体较容易诱导愈伤组织,一般7~8天即可产生淡黄绿色的愈伤组织。经观察,愈伤组织总是出现在总苞处,然后扩展到整个外植体。以青蒿子叶和胚轴为外植体也容易诱导出愈伤组织,但较花序次之,且大部分为致密型愈伤组织。叶片的愈伤组织生长最慢,仅在叶片上有凸起状愈伤组织,或者在叶片上有少数斑点状愈伤组织,这可能是因为青蒿的叶片深裂,不易切出较大的创伤面所致。由此可见,生成愈伤组织的能力为:花序大于子叶和胚轴,而子叶和胚轴大于幼叶。所以下面做愈伤组织的分化试验中只采用了青

蒿花序产生的愈伤组织。在激素对愈伤组织的影响方面,0.5mg/l的6-BA有利于愈伤组织的诱导,但是高于0.1mg/l的2,4-D不利于愈伤组织的产生。

2.2 青蒿愈伤组织分化

实验结果表明,不同激素组合的MS培养基对青蒿花序产生的愈伤组织的分化有不同的影响。分化20天,其统计结果见表4。

从表4中可以看出:随着6-BA浓度的增加,青蒿愈伤组织的分化率也增加,说明6-BA有利于青蒿愈伤组织的分化;随着IAA浓度的增加,青蒿愈伤组织的分化率先升高后降低,说明适宜浓度的IAA利于愈伤组织的分化,而高浓度的IAA反而不利于青蒿愈伤组织的分化,青蒿愈伤组织的分化IAA的适宜浓度为1.0mg/l;从10号到12号可以看出,随着6-BA浓度的增加,青蒿愈伤组织的分化率先升高后降低,但是经过观察,12号培养基产生的芽更多,长势更好,故12号培养基为最佳分化培养基。同时,8号培养基产生的分化苗也很多,长势旺盛,但是耗费的激素也很多。

2.3 青蒿试管苗的扩大繁殖试验

青蒿分化苗较容易扩增,扩繁试验结果见表5。从表5可以看出,从1号培养基中接种的丛芽

表 4 不同激素组合对由花序产生的愈伤组织不定芽分化的影响

培养基	激素/(mg/l)			接种愈伤组织数	分化愈伤组织数	形成率/%
	6-BA	IAA	NAA			
1号	0.1	0.2	0	26	2	7.7
2号	0.1	1.0	0	24	2	8.3
3号	0.1	10	0	28	0	0
4号	1.0	0.2	0	20	0	0
5号	1.0	1.0	0	28	2	7.1
6号	1.0	10	0	24	0	0
7号	8.0	0.2	0	24	0	0
8号	8.0	1.0	0	20	4	20.0
9号	8.0	10	0	22	2	9.1
10号	0.1	0	0.05	18	0	0
11号	1.0	0	0.05	24	3	12.5
12号	4.0	0	0.05	22	2	9.1

表 5 青蒿丛生芽繁殖培养基试验

培养基	激素/(mg/l)		接种数	成苗数
	6-BA	6-KT		
1号	2.0	1.0	20	68
2号	2.0	2.0	20	82
3号	2.0	3.0	18	40

继续长出的丛生芽数量较少,较细弱。2号培养基中继续长出的丛生芽数量最多,而且苗比较粗壮,长势好,很快长满整个瓶子。而3号培养基中继续长出的丛生芽数量最少,生长较差。但是,3种培养基中均未见畸形苗和变异苗,说明青蒿丛生芽繁殖遗传稳定性较好。从表5可以看出,青蒿试管苗的扩大繁殖的最佳培养基是MS+6-BA2.0mg/l+6-KT 2.0mg/l。

2.4 青蒿试管苗的生根试验

青蒿试管苗较容易生根,但不同浓度的激素组合对其影响较大,结果见表6。

表 6 青蒿试管苗生根培养基试验

培养基	激素/(mg/l)		接种数	生根数	生根率/%
	IAA	NAA			
1号	0	0.5	18	9 大量长根	50
2号	0	1.0	15	15 大量长根	100
3号	0.5	0	27	15 少量短根	55.6
4号	1.0	0	12	3 少量短根	25
5号	0.5	0.5	18	15 大量长根	83.3
6号	1.0	1.0	18	18 大量长根	100

从表6中可以看出:NAA的浓度对于青蒿试管苗生根影响很大,随着其浓度的增大,生根率明显增大,而且根也明显增长,增粗。而IAA对于青蒿试管苗生根影响不明显,随着其浓度的增大,生根率有减少的倾向。NAA和IAA的组合对于青蒿试管苗生根影响见上表,可见,NAA是青蒿试管苗生根的主要影响因子。故青蒿试管苗最佳生根培养基为2号培养基。

3 讨论

本试验首次以青蒿的子叶和胚轴为外植体诱导愈伤组织,很容易诱导产生。这说明以青蒿子叶和胚轴为外植体时,对激素的种类和浓度选择性不强,但是产生的愈伤组织大多数为致密愈伤组织。随着6-BA浓度的增加,愈伤组织更容易产生,说明适当浓度的6-BA有利于青蒿愈伤组织的产生。另外,通过青蒿的花序和幼叶为外植体诱导愈伤组织。研究发现,不同外植体和不同种类不同浓度的激素及其组合对青蒿愈伤组织诱导的影响存在明显差异。其中,以花序为外植体较容易诱导愈伤组织,一般7~8天即可产生淡黄绿色的愈伤组织。以青蒿子叶和胚轴为外植体也容易诱导出愈伤组织,但较花序次之,且产生的愈伤大部分为致密型愈伤组织。叶片的愈伤组织生长最慢,仅在叶片上有凸起状愈伤组织,或者在叶片上有少数斑点状愈伤组织。由此可见,生成愈伤组织的能力为:花序大于子叶和胚轴,而子叶和胚轴大于幼叶。在激素对愈伤组织的影响方面,适当浓度的6-BA有利于愈伤组织的诱导,但是较高浓度的2,4-D不利于愈伤组织的产生。

杨耀文^[2]等以黄花蒿幼嫩花序作外植体,在MS+6-BA₈+IAA₁₀培养基上一步分化成苗,在MS+6-BA₁₅+IAA₀₂培养基上增殖,20天可继代一次,分化出的苗在1/2MS+IAA₀₅+NAA₀₅培养基上迅速生根。王梦琼^[9]以青蒿花枝为外植体,以MS+6-BA₁₀+2,4-D₀₅培养基诱导愈伤组织,并以MS+IAA₀₁+KT₁₀和MS+IAA₀₁+6-BA₁₀+NAA₁₀分别分化出芽及根。本试验证明,以青蒿花序为外植体,以MS+6-BA0.5mg/l+NAA1.0mg/l为愈伤组织诱导培养基,愈伤组织在

(下转第35页)

间,然后上部继续砌砖,不影响进度,保证砌体强度,更免去了开槽的人工费及修复费,且外观墙体整洁美观。如图3所示。

7 结语

综上所述,施工与设计密不可分,施工现场能反馈给设计者较多的实际信息,便于及时调整设计方案,设计的指导性就能够更准确更实用地得到落实。结构设计人员如能到施工现场,了解具体的施工工

艺及存在与设计相悖的实际问题,就能不断积累经验,优化设计,提高设计水平。

参考文献

- [1] 袁锦根,虞焕新,高莲娣.工程结构[M].上海:同济大学出版社,2006.32-35.
- [2] 陈岱林,金新阳,张志宏.钢筋混凝土构件设计原理及算例[M].北京:中国建筑工业出版社,2005.13-63.
- [3] 李明,朱永红,王正霖.高温下预应力筋和非预应力筋的力学性能[J].重庆建筑大学学报,1994(4):73-77.

On Problems and Structural Design in Building Construction

RUAN Dong-feng

(Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 400050)

Abstract: This article introduces some quality problems usually happened in the building construction, and gives some suggestions and measures to structural design.

Key words: building construction; structural design; engineering quality

(上接第24页)

MS+6-BA4.0mg/l+NAA 0.05mg/l 培养基上分化,以MS+6-BA2.0mg/l+6-KT2.0mg/l 为扩繁培养基,分化苗转到MS+NAA1.0mg/l 培养基上生根。可以用较低成本、较短时间、比较简便地得到大量青蒿再生试管苗。从而以较低的成本建立起优良的青蒿组织培养体系。本试验与以上两者的试验结果有较大差别,这可能是由于不同地区、不同基因型甚至于不同苗龄、不同采集时间的外植体引起的。但是重庆市是青蒿之乡,其产量约占全球产量的80%,本试验对于青蒿的组织培养具有重要科研意义。同时,也为重庆市地区青蒿生物技术研究的实施提供了一个良好的平台。

参考文献

- [1] 刘春朝,王玉春,欧阳藩.青蒿素研究进展[J].化学进展,1999,11(1):41-47.
- [2] 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.
- [3] 耿颀,叶和春,李国风.中药青蒿的生理生化特征及研究进展[J].应用与环境生物学报,2002,8(1):90-97.
- [4] 王梦球.青蒿的组织培养及植株再生[J].北京中医药大学学报,2004,27(2):74-75.
- [5] Fulzele D P, Sopahimalam AT, Heble MR. Tissue Cultures of *Artemisia Annua*: Organogenesis and Artemisinin Production[J]. Phytother Res, 1991, 5: 149-153.

Study on the Building of the *Artemisia Annua* L. Cultivation System

MU Sheng-yu BAI Zhi-chuan SONG Xiao-xia

(Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: In order to investigate the callus induction and the regeneration of the plant of *Artemisia annua* L., the cotyledon, hypocotyl, lamina and anthotaxy are used as explants. The result shows that the anthotaxy is placed on MS+6-BA0.5mg/l+NAA1.0mg/l to induce callus, which differentiates on MS+6-BA4.0mg/l+NAA0.05mg/l. The croud buds is propagated on +6-BA2.0mg/l+6-KT2.0mg/l, finally, croud buds can root on MS+NAA1.0mg/l. Hence, we can get plenty of regeneration test-tube buds easily with low cost and less time.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; anthotaxy; callus