

文章编号: 1009-0002(2008)02-0259-04

研究报告

黄花蒿组织培养研究

贾秀山, 廖宇静, 于飞飞, 杨燕池, 尹秋平

西南大学 农学与生物科技学院, 农业部生物技术与作物品质改良重点开放实验室, 重庆市作物遗传育种重点学科, 重庆 400716

[摘要] 目的: 筛选黄花蒿组织培养的配方, 以寻求黄花蒿生长的最佳自然条件。方法: 在 MS 基本培养基中添加不同激素, 制备不同培养配方, 筛选黄花蒿愈伤组织诱导与分化的最适培养基配方。结果与结论: 诱导黄花蒿愈伤组织形成的最佳培养基配方为 MS+6-苄氨基嘌呤(6-BA)(2.0 mg/L)+激动素(KT)(2.0 mg/L); 诱导黄花蒿愈伤组织分化的最佳培养基配方为 MS+6-BA(1.0 mg/L)+吲哚乙酸(IAA)(1.0 mg/L)。叶片诱导愈伤组织出愈时间最慢, 出愈率较低, 但其愈伤组织为胚性愈伤组织, 后期愈伤组织的分化率、出苗率都很高, 且不易产生褐变; 带腋芽的茎段诱导愈伤组织形成最快, 但分化率不及叶片愈伤组织, 易褐变, 适于快速转入生根培养基中直接用于快繁; 花序基本不形成肉眼可见愈伤组织, 直接形成幼苗。

[关键词] 黄花蒿; 组织培养; 愈伤组织; 分化; 外植体; 培养基; 药用植物

[中图分类号] Q943.1

[文献标识码] A

Research on Tissue Culture of *Artemisia annua*

JIA Xiu-Shan, LIAO Yu-Jing, YU Fei-Fei, YANG Yan-Chi, YIN Qiu-Ping

College of Agronomy and Biotechnology, SWU; Key Lab of Biotechnology & Crop Quality Improvement of Agriculture Ministry of China; Chongqing Key Subject Crop Genetics & Breeding; Chongqing Key Laboratory of Crop Quality Improvement; Chongqing 400716, China

[Abstract] **Objective:** To screen the formula of *Artemisia annua* tissue culture for the seeking of the best nature condition for *A.annua* growing. **Methods:** Adopt the MS basic culture medium with different hormone to screen the optimized culture medium formula for the induction and differentiation of callus. **Results & Conclusion:** MS+6-BA(2.0 mg/L)+KT(2.0 mg/L) and MS+6-BA(1.0 mg/L)+IAA(1.0 mg/L) were the optimized culture medium formula for the induction and differentiation of callus, respectively. With the leaf blade inducing to form callus, it recovered slowest and the induction rate was slowly. But its callus was embryogenic callus, and later period it showed high rate of differentiation and seedlings emergence, and also was not easy to have brown. While the stem sections with axillaries bud form callus were exactly on the contrary, and they were suitable to take into the culture medium for taking root fast, directly to use for rapid propagation. The rachis didn't form the callus that naked eye obviously and directly product seedling.

[Key words] *Artemisia annua*; tissue culture; callus; differentiation; explant; culture medium; medical plant

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中含有多种挥发性和非挥发性药用成分。挥发性成分主要为挥发油; 非挥发性成分主要有青蒿素, 青蒿甲素、乙素、丙素, 青蒿酸, 香豆素, 黄酮, 豆甾醇, 谷甾醇等。青蒿素是具有过氧基团的新型倍半萜内酯, 与以往的抗疟药物不同, 其结构中无 N 原子, 分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$ ^[1-2]。

中国药典中记载的中药青蒿为菊科植物青蒿(*A.apicea* L.)和黄花蒿, 具有清热截疟、驱风止痒的功效, 用于伤暑、疟疾、潮热、小儿惊风、热泻、恶疮疥癣等。青蒿素是从中药黄花蒿中分离出的抗疟有效单体, 是与已知抗疟药完全不同的新型化合物^[2-3], 被世界卫生组织称为“世界上惟一有效的疟疾治疗药物”^[4]。它不仅具有继氯喹、乙氨嘧啶、伯喹和磺胺后最佳的抗疟特效药, 并且是所用抗疟药中起效最快、效果最好、毒性最低的^[4-6]。传统中药多使用的是青蒿。目前, 药用青蒿素主要来自青蒿植物提取物, 其主要成分为青蒿素及其衍生物。制药行业中的青蒿原料主要来自田间栽培, 无论是人工栽培还是天然青蒿中, 青蒿素含量普

遍偏低且非常不稳定, 约为 0.1%~2%, 采集时因受地理环境、采集时期、采集部位、气温和施肥水平等因素的影响, 品质难以恒定, 这为青蒿的加工增大了难度。为了探求青蒿素合成的稳定条件, 已有多项对青蒿进行组织培养研究的报道^[12-18]。

1 材料和方法

1.1 材料

野生黄花蒿的嫩叶、带腋芽茎段及花枝, 采摘自西南大学校园内。

1.2 不同外植体诱导愈伤组织形成

1.2.1 消毒 采取黄花蒿嫩叶、带腋芽茎段及花枝, 在自来水下

[收稿日期] 2007-05-24

[作者简介] 贾秀山(1982-), 男, 本科学历

[通讯作者] 廖宇静, (E-mail) liaoyujingok@sohu.com

浸泡洗净 2~3 min,流水冲洗 30 min,用 75%的酒精浸泡 30 s,再用 0.1%的升汞处理 10 min,最后用无菌水冲洗 4 次,用无菌纸吸干,备用。

1.2.2 培养基 以 MS 为基本培养基,附以不同比例的激素[6-苄氨基嘌呤(6-BA),激动素(KT),吲哚乙酸(IAA),2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)],见表 1。pH6.0~6.5,121℃高温灭菌 20 min。

1.2.3 接种 在无菌条件下将已消毒的黄花蒿花序轴、花枝、带腋芽茎段及叶片剪成约 0.5~1.0 cm 见方的小块,分别接种于含不同激素组合的 MS 培养基上,每组 6 瓶,每瓶接 6~8 块,在 24~28℃弱光下培养 14 d,诱导愈伤组织的形成。以不加激素的 MS 培养基为对照。

1.3 愈伤组织诱导芽的分化

将所得愈伤组织分别转入含有 IAA+6-BA 及 IAA+KT 的不同激素组合(表 2)的芽分化培养基上,每日光照 10 h,分化出芽。以不加激素的 MS 培养基为对照。

表 1 诱导愈伤组织形成的不同激素的培养基

MS 处理	激素配比(mg/L)		
	6-BA	2,4-D	KT
1	1.0	0.5	0
2	1.0	1.0	0
3	1.0	2.0	0
4	1.0	0	0.5
5	1.0	0	1.0
6	1.0	0	2.0
7	2.0	0.5	0
8	2.0	1.0	0
9	2.0	2.0	0
10	2.0	0	0.5
11	2.0	0	1.0
12	2.0	0	2.0
13	3.0	0.5	0
14	3.0	1.0	0
15	3.0	2.0	0

表 3 6-BA 和 2,4-D 不同浓度组合对黄花蒿愈伤组织诱导效果的影响

激素(mg/L)		项目						
6-BA	2,4-D	外植体数(块)	萌发块(块)	诱导率(%)	观察时间(d)	大小	质地	
1.0	0.5	36	10	30	14	4~5 cm	浅绿透明	
1.0	1.0	43	14	33	14	2~4 cm	发白	
1.0	2.0	47	12	26	10	1~4 cm	浅绿带褐斑	
2.0	0.5	45	16	36	14	2~7 cm	浅绿	
2.0	1.0	39	12	31	14	2~7 cm	透明	
2.0	2.0	37	0	0	10	/	/	
3.0	0.5	41	10	24	14	1~2 cm	淡绿	
3.0	1.0	38	11	29	10	1~2 cm	浅绿	
3.0	2.0	42	0	0	10	/	/	

注:外植体块数不包括被污染的

表 4 6-BA 和 KT 不同浓度组合对黄花蒿愈伤组织诱导效果的影响

激素(mg/L)		项目						
6-BA	KT	外植体数(块)	萌发块(块)	诱导率(%)	观察时间(d)	大小	质地	
1.0	0.5	42	6	14	14	3~7 cm	浅绿	
1.0	1.0	45	10	22	14	1~2 cm	浅绿发白	
1.0	2.0	39	16	41	14	3~4 cm	浅绿	
2.0	0.5	37	14	39	14	4~5 cm	黄绿	
2.0	1.0	40	6	15	10	2~3 cm	浅绿	
2.0	2.0	39	22	56	14	6~12 cm	嫩绿	
3.0	0.5	38	6	16	14	2~3 cm	淡绿	
3.0	1.0	40	10	25	14	5~9 cm	淡绿	
3.0	2.0	42	12	29	14	3~5 cm	浅绿	

注:外植体块数不包括被污染的

表 2 诱导愈伤组织芽分化的培养基

MS 处理	激素配比(mg/L)		
	IAA	6-BA	KT
1	0.1	0	0.5
2	0.1	0	1.0
3	0.1	0	2.0
4	0.5	0	0.5
5	0.5	0	1.0
6	0.5	0	2.0
7	1.0	1.0	0
8	1.0	2.0	0
9	1.0	3.0	0
10	1.0	0	0.5
11	1.0	0	1.0
12	1.0	0	2.0

2 结果

2.1 黄花蒿愈伤组织诱导

结果表明,在没有外加激素培养的情况下,外植体很快就会死去。外加激素培养 7 d 后,从外植体近轴面基部出现启动迹象,形成一些淡绿色的小突起,随培养时间的延长,小突起进一步膨大,为浅绿色、簇生、形状不规则。培养 14 d 后进行统计,见表 3 和表 4。可以看出,当培养基中存在 2,4-D、6-BA 或 KT、6-BA 时,诱导作用明显不同。当 6-BA、KT 都为 2.0 mg/L 时,诱导率最高,效果最好。在一定范围内,高浓度的激素促进愈伤组织快速分化,但浓度过高时促进作用减弱,甚至出现玻璃化褐化现象。所以,从试验结果中选择,相对适合黄花蒿愈伤组织诱导的培养基为 MS+6-BA(2.0 mg/L)+KT(2.0 mg/L);随后进行了重复稳定性试验,效果很好。

2.2 黄花蒿愈伤组织诱导芽的分化

试验发现,同时附加不同浓度的 6-BA 和 IAA 时,对芽诱导有效,结果见表 5,相对适合青蒿芽分化诱导的培养基是 MS+6-

BA(1.0 mg/L)+IAA(1.0 mg/L)。

表5 IAA和6-BA不同浓度组合对黄花蒿芽分化诱导效果的影响

组别	愈伤组织(块)	诱导率(%)	芽分化(个/块)
1	34	30	1~2
2	32	15	1~2
3	36	32	2~3
4	33	11	1~2
5	37	24	1~2
6	34	30	2~3
7	31	42	3~4
8	32	17	1~2
9	37	30	1~2
10	35	19	2~3
11	39	17	1~2
12	38	21	2~3

3 讨论

不同学者利用黄花蒿和青蒿的不同外植体进行诱导,发现黄花青蒿组织培养以花枝及花序轴诱导效果较好^[39]。本研究也得出基本相同的结论,带腋芽的茎段最宜诱导愈伤组织,花枝较次,叶片最差。但是在试验观察中发现,叶片诱导愈伤组织虽然很慢,但一旦诱导愈伤组织形成就长势良好,且不易出现褐化现象,其后期的分化效果也较好;而茎段诱导的愈伤组织茎段膨大较快,但后期分化较差;花枝则在其原有器官基础上直接生长发育,并很快形成组培苗,愈伤组织形成过程不是很明显。导致这些现象的原因有如下几方面。

3.1 胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织差异

植物组培诱导经历了去分化、愈伤组织形成和再分化过程,在去分化形成愈伤组织时经历了启动期、分裂期和分化期。青蒿叶片去分化过程中启动期缓慢,一旦启动后分裂期很好,形成的愈伤组织致密且组织块大,分化时芽点多;通过镜检观察发现叶片诱导形成的愈伤组织属于胚性愈伤组织,细胞大小均匀、致密,后期分化是在愈伤组织基础上形成胚状体细胞团再分化形成植株的过程^[10-11]。茎段去分化形成愈伤组织时启动期快,分裂形成好,茎段膨大迅速,茎段内愈伤组织充分,但在培养基上形成的愈伤组织块并不是很大,在后期分化效果也不是很好,分化芽点较少,镜检观察发现其愈伤组织属于非胚性愈伤组织,愈伤组织的细胞致密度不如叶片愈伤组织,大小均匀度也不够一致,愈伤组织块比较松散。试验中把茎段诱导形成的愈伤组织及时转入生根培养基,生根很快,而未及时转入生根培养基的其后期分化效果不理想。对花枝诱导基本上看不到愈伤组织,观察到的是直接形成的幼苗植株,认为其诱导是直接的器官发生,不经历或很少经历脱分化阶段就直接发育成为幼苗,可以通过炼苗直接形成完整植株,是进行快繁的理想材料。

3.2 分化差异

如上所述,叶形成的愈伤组织属于胚状体的愈伤组织,分化时是在愈伤组织上形成不同器官原基,然后在原基的基础上形成根茎叶,分化时先形成芽,最后再形成根。茎段膨大的愈伤组织分化时表现为两种类型,一是及时转入生根培养基的茎段愈伤组织直接形成根,然后在根的基础上形成叶;二是茎段膨大的愈伤组织未及时转入生根培养基而是直接转入分化培养基,芽点形成慢,后期植株形成也较慢。从器官重新发生角度而言,茎段愈伤组织是直接由外植体细胞形成器官原基,继而发育成为

器官,茎段内愈伤组织一般是直接分化为根,再在根上形成不定芽,或者在不同部位形成芽和根,再通过维管束连接形成植株,在这个过程中由于茎段末端的愈伤组织不够大,形成的芽点原基与根原基不够充分,随着培养基成分的耗尽及培养过程中代谢物的累积,未能继续生长的反而转向衰亡状态,在一些组织块上出现褐变组织。

3.3 褐变的影响

褐变是植物多酚氧化酶的作用结果。叶诱导分化培养其褐变较少,但茎段诱导分化培养褐变现象较严重。这个现象与植物体内含有大量多酚类化合物有关^[9],一般植物材料在切口处的创伤会激活植物组织中的酚类化合物分泌,这些酚类物质一般都具有清除自由基、抗氧化的功能,同时也激活了植物组织中的多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)。PPO存在于天然植物的叶绿体、线粒体中^[20],其天然状态是没有活性的,但将组织匀浆或损伤后,酶活性被激活,催化多酚氧化为醌,醌聚合并与细胞内蛋白质的氨基酸反应,形成黑色素沉淀,促进细胞死亡。PPO是黑色素生物合成过程中的主要限速酶。但它的表达具有时空差异和组织特异性,一般在幼龄组织中表达,在成熟组织中不表达。POD是一类从植物、动物、微生物中提取出来的氧化还原酶,以血红素为辅基,参与生物体内的生理代谢^[21]。在生命活动过程中,POD主要催化分解生物体内的氧化物或过氧化物,氧化分解其他毒素^[22],通过酶的作用可以部分消除代谢产生的有害物质。在组培初期,外植体的PPO含量较低,再加之培养基激素的作用,能够部分抑制多酚氧化酶的活性,而且有害的代谢产物积累少。由于PPO和POD的共同作用不至于让外植体全部褐变死亡,同时由于生长激素的作用启动了细胞分裂,使外植体恢复正常,随着培养的进行,细胞分裂增加,愈伤组织逐渐形成。

但是在培养过程中,细胞代谢产物逐渐累积,其中包括有害物质,这些物质会进一步提高植物组织中PPO和POD活性^[23],甚至会改变植物体内POD和PPO的含量分布,这些改变与培养条件及营养成分的改变有关。PPO与POD分别对细胞培养物褐化有促进和抑制作用,所以当PPO占上风时,就容易促进愈伤组织的褐变。另外,叶诱导的胚性愈伤组织和茎段诱导的非胚性愈伤组织,其多酚氧化酶的活性是不同的。有资料表明^[24],POD活性在非胚性愈伤组织中是胚性愈伤组织中的1/3,而PPO活性则相反。对于黄花蒿叶片与茎段诱导而言,我们认为可能叶片诱导的愈伤组织的PPO活性较低。外植体褐变是由于PPO和酚类物质引起的,其变化规律取决于PPO活性和总酚含量的变化规律,其中酚类物质含量起决定性作用。另外,高温、强光照的培养条件会提高PPO的活性,促进酚类物质的氧化,加速褐化。所以,在植物组培中,防治褐变是至关重要的一个环节。

3.4 激素的影响

本试验所采用的几组培养基的差异,不外乎是激素的差异。IAA是天然生长素,2,4-D是人工合成的生长素,而KT和6-BA都属于细胞分裂素。生长素的主要作用是促进细胞核分裂、细胞伸长及扦插不定根的形成,细胞分裂素主要促进细胞的分裂及芽的分化。不同激素组合具有协同作用,从而表现出增效作用,二者要合理调配才能很好地诱导愈伤组织形成。在进行烟草组织培养时发现,细胞分裂素和生长素的相互作用控制愈伤组织根、芽的形成。生长素/细胞分裂素的比值较高,诱导愈伤组织形成根,较低则诱导形成芽,而适中的比值可以维持愈伤组织不分

化^[2]。本研究结果表明,外加 KT 和 6-BA 的培养基所形成的愈伤组织块较优。可能的原因是外加细胞分裂素的作用下,启动了外植体自身激素的合成,与外加激素形成合适配比的激素组合,从而很好地诱导愈伤组织形成。在诱导愈伤组织芽分化过程中出现了一定的玻璃化现象,玻璃苗产生的最主要的原因是外加激素的比例不合适。在植物组织培养过程中,当细胞分裂素与生长素比例过高时,易导致玻璃苗产生^[3]。因此,合理调配培养基中的激素配比是组织培养成功与否的关键。

3.5 培养条件的影响

首先是 pH 值,培养过程中 pH 值一般为 5.8~6.5,过高或过低都不利于黄花蒿愈伤组织的形成。其次是温度,大多数植物组织培养都在 23~27℃间进行,一般采用(25±2)℃,低于 15℃时植物组织生长停止,高于 35℃时植物生长不利。黄花蒿组织培养温度一般在(25±2)℃下较宜诱导愈伤组织形成^[4],我们在培养过程中也控制在此温度范围内。另外还有光照,黄花蒿愈伤组织培养是在弱光下进行的,而诱导愈伤组织分化则要求在较强光照条件下。由于黄花蒿属严格的短日照植物,因此光照时间不宜过长,一般控制在 10 h 左右。还有水分的影响,水分太多培养基凝固不好,且易引起棉塞长霉,造成污染;水分过低,将使培养基干硬,不利于外植体接触或插进培养基,导致生长受阻。

研究结果表明,诱导愈伤组织形成的培养基以 MS+6-BA(2.0 mg/L)+KT(2.0 mg/L)为最好,诱导愈伤组织分化的培养基以 MS+6-BA(1.0 mg/L)+IAA(1.0 mg/L)为最佳。对黄花蒿的不同外植体进行诱导,发现诱导胚性愈伤组织及分化效果最好的是叶,用于快繁生根的最好材料是带腋芽的茎段,而花序适于直接成苗,但由于采集时间受限,在应用上受到一定的限制。总之,本试验通过组培的手段来摸索适合黄花蒿生长的条件,为青蒿的进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘静明,倪慕云,樊菊芬,等. 青蒿素(Artemisinin)的结构和反应[J]. 化学学报, 1979,37:129-141.
- [2] 青蒿素结构协作组. 一种新型的倍半萜内脂——青蒿素[J]. 科学通报, 1977,3:142.
- [3] 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(2):
- [4] WHO. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (1994/1995): the role of artemisinin and derivatives in the current treatment of malaria. Report of an Inform Consultation convened by WHO In Geneva [Z]. 1993-09-27: 29.
- [5] 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.
- [6] 耿飒,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):1-6.
- [7] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [8] 曾少玲,方良,全吉文,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.
- [9] 黄远新. 何凤发等青蒿花序轴离体培养的初步研究[J]. 四川草原, 2004,4:15-17.
- [10] 薛建平,柳俊,主编. 药用植物生物技术[M]. 中国科学技术大学出版社, 2005:201-205.
- [11] 瞿凯荣,戴若兰,主编. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001:22-24.
- [12] 贺锡纯,曾美怡,李国风,等. 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(1):87-90.
- [13] 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.
- [14] Weathers P J, Cheetham R D, Follasbee E, et al. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* [J]. Biotechnol Lett, 1994,16:1281-1286.
- [15] 秦明波,李国珍,云月,等. 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.
- [16] Ferreira J F S, Janick J. 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.
- [17] 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):639-643.
- [18] 耿飒,姬生栋,袁金云. 青蒿丛生芽诱导影响因素的研究[J]. 中草药, 2004,35(5):566-572.
- [19] 傅德明,蔡正江,毛禄园. 青蒿生物学特性及规范化栽培技术[J]. 中国农技推广, 2005,12:34-35.
- [20] 吴红梅,萧慧,刘刚,等. 多酚氧化酶的研究进展[J]. 茶业通报, 2004,26(2):62-64.
- [21] 贺立红,宾金华. 高等植物中的多酚氧化酶[J]. 植物生理学通讯, 37(4):340-345.
- [22] Rodriguez J N, Ldwe D J, Hernandez-Ruiz J, et al. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: Identification of intermediates in the catalytic cycle [J]. J Am Chem Soc, 2001,123:11838-11847.
- [23] 罗勇军,罗光富,黄应平,等. 过氧化物酶模拟及应用研究进展[J]. 分析测试学报, 2004,23(5):136-142.
- [24] 张月玲,肖尊安,熊红. 红豆杉愈伤组织生长与 PPO、POD 比活性和多酚质量分数变化的研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2002,38(6):800-804.
- [25] 萧浪涛,王三根. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.