

# 青蒿组织培养中克服玻璃化现象研究

张丽珍<sup>1</sup>, 杨冬业<sup>2</sup>, 靳振江<sup>3</sup>, 刘贤贤<sup>1</sup>

(1. 桂林师范高等专科学校 化学与工程技术系 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541001; 3. 桂林理工大学, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 玻璃化现象是青蒿组织培养过程中的首要障碍。用青蒿顶芽为外植体, 以 MS 为基本培养基, 采用不同浓度的 6-BA、琼脂、蔗糖和活性炭正交实验对解决青蒿组织培养过程中的玻璃化问题进行了研究。结果表明: 在 MS 培养基添加 4.0% 的蔗糖、0.75% 琼脂和 0.08% 的活性炭, 附加 0.10 mg/L 的细胞分裂素 6-BA, 可得到健壮的青蒿组培苗。

**关键词:** 青蒿; 组织培养; 玻璃化

**中图分类号:** S 636.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0120-03

黄花蒿即中药青蒿 (*Artemisia annua* L.) 为菊科 1a 生药用植物。从青蒿中提取的青蒿素 (Artemisinin) 是低毒高效的抗疟疾药, 青蒿素的生物合成成为人们研究的热点<sup>[1-2]</sup>。随着青蒿素应用研究的开展, 人工种植青蒿在近几年中逐渐形成规模。在种植过程中, 青蒿素含量差别很大<sup>[3,4]</sup>, 采用组培技术选育青蒿素含量高的株系是解决青蒿素含量参差不齐的有效手段之一。

然而, 在对青蒿进行组培繁育的过程中玻璃化现象非常严重, 频率高达 60%~80%。目前有关青蒿玻璃化苗的研究未见报道。针对这个问题, 现采用正交实验,

用青蒿顶芽为外植体, 对再生频率高的青蒿玻璃苗的发生及克服途径进行了初步研究, 建立了良好的再生体系, 为选育优良的品系和大规模工厂化生产作好准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用青蒿苗采集于桂林师范高等专科学校药用植物园。

### 1.2 试验方法

采集青蒿顶芽, 冲洗干净后在无菌操作台上用 75% 的酒精消毒 30 s, 再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 接种于 MS 基本培养基上培养。10 d 后取其幼叶接种在 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L (单位下同略) 的培养基中进行愈伤组织诱导及丛生芽分化培养<sup>[5]</sup>。

30 d 后选取健康无菌的丛生芽 (株高约 1~2 cm) 接种在 MS 基本培养基中, 以 6-BA、蔗糖、琼脂浓度和活性

**第一作者简介:** 张丽珍 (1979-), 女, 广西贵港人, 硕士, 讲师, 现主要从事生物学教学与植物细胞工程研究工作。

E-mail: xiaozhang446@163.com。

**基金项目:** 广西壮族自治区精品课程资助项目。

**收稿日期:** 2010-10-11

## Research on Greening and Plant Composition-diversity in Urban Square of Mudanjiang City

XU Li-ying

(Department of Biology, Mudanjiang Teachers College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

**Abstract:** The greening situation, green coverage rate and the plant composition-diversity of 7 square were investigated and analyzed in Mudanjiang City. The results showed that the landscape of pearl plaza was best, in green coverage rate the highest was under Dongguang overpass was about 81.5%, the lowest was culture square was about 21.9%. *Picea koraiensis* was the highest plant for application frequency and composition-diversity in the greening square. *Picea koraiensi*, *Ligustrum obtusifolium* and *Sabina chinensis* cv. Dandong were the key landscape tree species in the greening square.

**Key words:** square; green coverage rate; plant composition-diversity

碳(activated carbon, AC)为单因子对比试验, 每个处理分  
化芽数为 30 株/每瓶 5 株, 3 次重复。培养条件: 温度(25±  
1)℃, 光照 14 h/d, 光照强度 30~40 mmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

1.3 数据处理方法

培养 20 d 后, 观察并统计组培苗出现玻璃化的情  
况。用 SPSS 10.0 软件进行单因素的差异显著性分析,  
并按下列公式计算增殖系数及玻璃化率: 增殖系数=增  
殖芽数/接种苗数; 玻璃苗百分率(%)=玻璃苗数/总苗  
数×100%。

2 结果与分析

2.1 6-BA 浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

在添加 4.0%的蔗糖、0.75%的琼脂和 0.08%的活  
性碳的 MS 基本培养基中, 附加不同浓度的 6-BA, 接种  
继代培养后的青蒿组培苗(图 1、2), 接种 20 d 后观察统  
计的结果见表 1。随着 6-BA 浓度的增加, 增殖系数随之  
增大, 玻璃化率也随之增高, 当 6-BA 为 1.0 时增殖系数  
达到 4.83, 玻璃化率为 24.14%, 当 6-BA 为 2.0 时增殖  
系数为 5.06, 玻璃化率高达 63.74%, 说明青蒿对低浓度  
的 6-BA 敏感, 对高浓度的 6-BA 不敏感, 高浓度的 6-BA  
引起高频率的玻璃化(图 3、4)。综合考虑, 该试验确定  
6-BA 为 1.0。

表 1 6-BA 浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

6-BA 浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	接种苗数 /株	增殖芽数 /株	增殖 系数	玻璃化苗数 /株	玻璃化率 /%
0	30	30.00	1.00±0.00e	0.00	0.00±0.00e
0.5	30	108.33	3.61±0.54b	22.33	0.21±0.64d
1.0	30	145.00	4.83±0.00a	35.00	0.24±1.03c
1.5	30	148.33	4.94±0.10a	67.33	0.45±1.30b
2.0	30	151.67	5.06±0.10a	96.67	0.64±2.06a

注: 同列数据后不同字母表示差异显著(P<5%), 下同。

2.2 蔗糖浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

在添加 1.0 mg/L 的 6-BA、0.75%的琼脂和 0.08%  
的活性碳的 MS 基本培养基中, 附加不同浓度的蔗糖, 接  
种继代培养后的青蒿组培苗, 接种 20 d 后观察统计的结  
果见表 2。在蔗糖浓度较低时, 随着蔗糖浓度的增加, 增  
殖系数随之增大, 玻璃化率变小, 在蔗糖浓度较高时, 随  
着蔗糖浓度的增加, 增殖系数反而变小, 玻璃化率变小,  
当蔗糖浓度为 3.0%时增殖系数达到 4.78, 玻璃化率为  
30.47%, 当蔗糖浓度为 4.0%时增殖系数为 4.50, 玻璃  
化率为 19.26%, 说明青蒿在蔗糖浓度适中的条件下, 增  
殖系数变化不大, 但玻璃化率随着蔗糖浓度的升高而急  
剧下降。综合考虑, 该试验确定蔗糖浓度为 4%。

2.3 琼脂浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

在添加 4.0%的蔗糖、1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.08%

的活性碳的 MS 基本培养基中, 附加不同浓度的琼脂, 接  
种继代培养后的青蒿组培苗, 接种 20 d 后观察统计的结  
果见表 3。随着琼脂浓度的增加, 增殖系数变小, 玻璃化  
率也随之变小, 当琼脂为 0.75%时增殖系数达到 3.83,  
玻璃化率为 16.81%, 当琼脂为 0.80%时增殖系数为  
1.94, 玻璃化率为 14.86%, 说明青蒿在琼脂浓度适中的  
条件下, 玻璃化率变化不大, 但增殖系数随着琼脂浓度  
的升高而急剧下降。在培养过程中发现, 当琼脂为  
0.80%时, 组培苗有变黄坏死现象。综合考虑, 该试验确  
定琼脂浓度为 0.75%。

表 2 蔗糖浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

蔗糖浓度 /%	接种苗数 /株	增殖芽数 /株	增殖系数	玻璃化苗数 /株	玻璃化率 /%
1	30	95.00	3.17±0.17d	55.00	57.89±1.58a
2	30	137.67	4.59±0.08ab	58.33	42.37±1.66a
3	30	143.33	4.78±0.10a	43.67	30.47±0.48b
4	30	135.00	4.50±0.17b	26.00	19.26±0.38c
5	30	113.33	3.78±0.10c	18.33	16.18±0.76c

表 3 琼脂浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

琼脂浓度 /%	接种苗数 /株	增殖芽数 /株	增殖系数	玻璃化苗数 /株	玻璃化率 /%
0.60	30	148.33	4.94±0.10a	99.33	66.97±2.83a
0.65	30	139.33	4.64±0.04b	66.67	47.85±1.64b
0.70	30	128.33	4.28±0.25c	47.33	36.88±2.57c
0.75	30	115.00	3.83±0.00d	19.33	16.81±0.54d
0.80	30	70.00	1.94±0.19e	8.67	14.86±1.65d

2.4 活性碳浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

在添加 4%的蔗糖、0.75%的琼脂和 1.0 mg/L 的  
6-BA 的 MS 基本培养基中, 附加不同浓度的活性碳, 接  
种继代培养后的青蒿组培苗, 接种 20 d 后观察统计的结  
果见表 4。添加活性碳组培苗更健壮(图 5、6)。从表 4  
可看出, 随着碳粉浓度的增加, 增殖系数随之减小, 玻璃  
化率也随之变小, 当碳粉浓度为 0.08%时, 增殖系数达  
到 3.72, 玻璃化率为 8.96%, 增殖系数与上一浓度  
(0.05%)相比变化不大, 但玻璃化率却显著降低。当碳  
粉浓度大于 0.08%时, 增殖系数显著减小, 而玻璃化率  
变化不大。综合考虑, 该试验确定碳粉浓度为 0.08%。

表 4 活性碳浓度对青蒿试管苗玻璃化现象的影响

碳粉浓度 /%	接种苗数 /株	增殖芽数 /株	增殖 系数	玻璃化苗数 /株	玻璃化率 /%
0	30	149.00	4.97±0.22a	98.33	66.00±2.10a
0.05	30	129.00	4.30±0.12b	48.33	37.47±2.42b
0.08	30	111.67	3.72±0.10c	10.00	8.96±0.54c
0.1	30	77.67	2.59±0.15d	3.33	4.29±0.22c
0.12	30	49.67	1.66±0.20e	1.33	2.68±0.35c



图1 愈伤组织诱导



图2 丛生芽继代培养



图3 玻璃化苗1

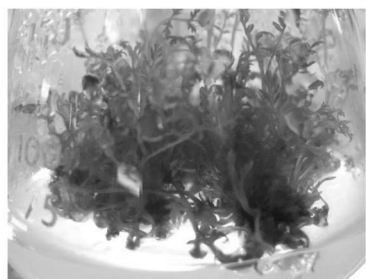


图4 玻璃化苗2



图5 健壮组培苗1



图6 健壮组培苗2

图版

### 3 结论与讨论

在青蒿组织培养过程中, 常常出现玻璃化苗, 频率高达 60%~80%, 单独采取任何一种处理方式都不能克服青蒿组织培苗的玻璃化现象。该研究发现在 MS 基本培养基中添加 4% 的蔗糖、0.75% 的琼脂、1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.08% 的碳粉能有效控制青蒿组织培苗的玻璃化现象, 使增殖系数较高, 玻璃化率相对较低, 组培苗也较健壮, 移栽成活率高。试验通过调控组织培养条件减少青蒿组培苗玻璃化现象的发生, 从而提高组培苗的产量和质量。为青蒿品种选育和工厂化育苗提供保障, 为植物组织培养过程中试管苗出现玻璃化现象的发生机理和防止措施的研究提供依据。

对植物组织培养中玻璃化的原因和防止措施的研究受到广泛关注<sup>[6-9]</sup>。如在培养基中添加  $\text{Ca}^{2+}$ 、聚乙烯醇和  $\text{AgNO}_3$  等物质, 在培养过程中控制光质和温度等措施来防治玻璃化苗。但目前对试管苗玻璃化的原因和机理尚无定论。

### 参考文献

- [1] Nicholas S, Huahong W, Werner R, Rönisch-Margl et al. Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A  $^{13}\text{C}_2$  study [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 179-187.
- [2] Huahong W, Chenfei M, Zhenqiu L, et al. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L [J]. Industrial Crops and Products, 2010, 31: 214-218.
- [3] Rita B, Benedetta L, Stefano P, et al. Distribution of artemisinin and bio-active flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2008, 36: 340-348.
- [4] 杨水平, 杨宪, 黄建国, 等. 青蒿素生产研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(2): 189-194.
- [5] 张丽珍, 徐淑庆, 杨冬业, 等. 青蒿组织培养及其快速繁殖研究 [J]. 生物学通报, 2010, 45(3): 48-50.
- [6] 张红, 王万新. 香石竹组培中的玻璃化现象及防止 [J]. 北方园艺, 2008(8): 196-197.
- [7] 潘仰星, 黄敬浩, 邓昌琳. 花椰菜再生苗去玻璃化试验 [J]. 福建农业科技, 2005, 50: 59-60.
- [8] 戴圆圆, 孙永林, 周晓阳. 甜瓜试管苗继代培养玻璃化现象的研究 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(2): 48-49.
- [9] 王娜, 刘孟军, 秦子禹. 聚乙烯醇在枣和酸枣组织培养中的作用 [J]. 果树学报, 2006, 23(2): 301-303.

## Study to Overcome Vitrification in Tissue Culture of *Artemisia annua* L.

ZHANG Li-zhen<sup>1</sup>, YANG Dong-ye<sup>2</sup>, JIN Zhen-jiang<sup>3</sup>, LIU Xian-xian<sup>1</sup>

(1. Guilin Normal College, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004; 3. Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004)

**Abstract:** Vitrification was a first barrier for tissue culture of *Artemisia annua* L. Orthogonal experiments were designed to configure the concentration of 6-BA, sucrose, agar and activated carbon using terminal buds of *Artemisia annua* L. as explants and MS medium as basic medium culture for solving the problem of vitrification. The results showed that a healthy plant can be got by adding 0.10 mg/L 6-BA, 4.0% sucrose, 0.75% agar and 0.08% activated carbon in MS media.

**Key words:** *Artemisia annua* L.; tissue culture; vitrification