

青蒿组织培养再生体系的建立

李 飞, 马 焕 新, 李 忠 爱, 王 子 成

(河南大学 生命科学院, 河南 开封 475004)

摘 要:为了建立和优化青蒿的组织培养再生体系,获得快速繁殖技术,以青蒿叶片和叶柄为外植体,研究了不同激素配比对其离体培养和大量快速繁殖的影响。结果表明:以青蒿叶片为外植体,其愈伤组织诱导培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D,诱导率为 78.0%;分化培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3%蔗糖+0.7%琼脂粉,分化率达 95.3%。分化苗在 1/2 MS+1.0 mg/L NAA 培养基上快速生根,且根系发达,粗壮,生根率达 98.9%。以青蒿叶柄为外植体,叶柄可在培养基 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 上一次成苗,在 1/2 MS+1.0 mg/L NAA 培养基上生根良好。该体系有效的缩短了培养周期,具有重要的研究价值。

关键词:青蒿;叶片;叶柄;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0093-04

青蒿(*Artemisia annua* L.)属菊科艾属植物黄花蒿,是一年生草本植物。中药青蒿是其地上部分,所含的青蒿素是治疗疟疾的特效药,青蒿素类药物不仅对各种疟疾有效,还具有抗寄生虫病、治疗弓形虫感染、抗心律失常、抗组织纤维化、抗肿瘤等作用。青蒿分布广泛,生长在不同地区的青蒿所含的青蒿素含量有显著差异,如生长在海拔较高、坡度较大的丘陵、山地区域内的青蒿,其青蒿素含量高于生长在海拔较低、坡度较小的平原区域内的青蒿^[1]。近年来,已有报道运用基因工程技术即将青蒿素生物合成相关途径酶基因导入大肠杆菌、酿酒酵母等模式植物细胞中,在这些细胞中模仿青蒿素生物合成途径,由于青蒿素合成复杂又不十分清楚,而青蒿素合成途径中产生的中间产物积累对受体菌生长代谢有一定的影响,现阶段实现代谢途径平衡运行,进而有效地高产制备目的产物是青蒿素合成生物学的终极目标之一^[2]。因此,药用青蒿素多从植株青蒿内提取。另外利用转基因技术,超表达青蒿素合成途径基因改良野生青蒿,获得高产青蒿素植株是目前可行的策略^[3]。此外,生产上,青蒿也常被用来作为菊花这一重要观赏园艺植物的砧木,通过基因工程手段调控青蒿的抗逆性,

也对菊花生产具有一定的意义。该试验旨在通过培养基的选择,建立和优化青蒿的遗传再生体系,以期为青蒿基因工程提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试青蒿取自开封市园林菊花研究所,取无病虫害青蒿嫩的叶片和叶柄作为外植体来源。

1.2 试验方法

1.2.1 青蒿无菌外植体获得 将青蒿在自来水下冲洗 20 min,在洁净工作台上用 70%的酒精消毒 10 s、0.1%的升汞消毒 8 min,然后用无菌蒸馏水洗 4~5 次,最后用灭过菌的滤纸吸干。接种于愈伤诱导培养基中。
1.2.2 青蒿叶片与叶柄愈伤诱导 在 MS 基本培养基的基础上,添加不同浓度的 6-BA、2,4-D,共设计 12 种愈伤诱导培养基配方,见表 1(其中 MS 培养基为对照培养基)。再加上 0.7%琼脂粉和 3%的蔗糖,pH 调到 5.8,121℃灭菌 20 min。将消毒好的叶片切成 0.5 cm² 大小,叶柄切成 0.5 cm 左右的长度,接种到灭过菌的青蒿愈伤诱导培养基上,每瓶接入 5 个外植体,每个培养基配方做 6 瓶平行,重复 3 次,在(25±2)℃组织培养室培养。

表 1 青蒿愈伤诱导培养基配方

Table 1 *Artemisia annua* callus induction medium formulation

mg/L					
编号 No.	激素 Hormone		编号 No.	激素 Hormone	
	6-BA	2,4-D		6-BA	2,4-D
A	1.0	0.1	G	2.0	2.0
B	1.0	0.5	H	3.0	0.5
C	1.0	1.0	I	3.0	1.0
D	2.0	0.5	J	3.0	2.0
E	2.0	1.0	K	3.0	3.0
F	2.0	1.5	L	0.0	0

第一作者简介:李飞(1989-),女,硕士研究生,研究方向为表观遗传学。E-mail:577761424@qq.com.

责任作者:王子成(1974-),男,博士,教授,现主要从事菊花花期的表观遗传调控与菊花 DNA 甲基化有关基因的克隆及功能分析和菊花反转录转座子研究以及农药对植物的表观遗传效应相关的教学与科研工作。E-mail:wzc@henu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31372090)。

收稿日期:2015-12-23

7 d后统计染菌率,21 d后统计愈伤数。

1.2.3 青蒿愈伤分化(即青蒿丛生芽诱导培养) 重新设计了17种培养基配方(含MS对照培养基)(表2),促使愈伤分化。将上述步骤中诱导出来的青蒿叶片、叶柄的愈伤组织,切割成3~5 mm²大小的小块,分别转接到分化培养基中,在温度(25±1)℃、光照强度2 000 lx、光照12 h/d的条件下,继续培养。21 d后统计分化率。分化率(%)=分化的愈伤个数/接种的愈伤总数×100。

表2 青蒿愈伤分化培养基配方

Table 2 *Artemisia annua* L. differentiation medium formulation

编号 No.	激素 Hormone		编号 No.	激素 Hormone	
	6-BA	NAA		6-BA	NAA
1	0.1	0.05	10	0.5	0.5
2	0.5	0.05	11	1.0	0.5
3	1.0	0.05	12	2.0	0.5
4	2.0	0.05	13	0.1	1.0
5	0.1	0.10	14	0.5	1.0
6	0.5	0.10	15	1.0	1.0
7	1.0	0.10	16	2.0	1.0
8	2.0	0.10	17	0	0
9	0.1	0.50			

1.2.4 青蒿生根培养和移栽 生根培养基配方为:1/2 MS+1.0 mg/L NAA、MS+1.0 mg/L NAA、MS+0.1 mg/L NAA,分别设为培养基配方1、2、3。将分化的丛生苗接种于这3种培养基上,7 d后开始观察生根情况,21 d后统计生根率。生根率(%)=生根的丛生芽数/接种的的分化苗数总数×100。生根后练苗,先移栽在珍珠岩:草木灰为2:1的穴盘中,当新根生出后,再移栽到室外。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS统计分析软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 青蒿愈伤组织的诱导

2.1.1 不同培养基配方对青蒿叶片愈伤诱导的影响

弱光培养7 d,除对照培养基L外,其它培养基上接种的叶片开始膨大,在叶片边缘的切口处,有乳白色或淡黄色的愈伤生成。接种在L培养基上的叶片,在7 d后叶片边缘开始褐化、变枯,14 d后基本上全部死亡。从表3可以看出,接种21 d后,叶片愈伤诱导率最高为78.0%。随着6-BA浓度的增加,叶片愈伤诱导率呈先上升而后下降的趋势。较高浓度的2,4-D不利于愈伤的诱导。

2.1.2 不同培养基配方对青蒿叶柄愈伤诱导的影响

叶柄通常在弱光下培养,5 d后两端就开始膨大,慢慢形成淡绿色致密的愈伤组织(对照培养基除外),21 d后统计愈伤数。在同样的培养条件下,以青蒿叶柄为材料诱导愈伤,其出愈伤时间早、出愈伤率高,叶柄的愈伤诱导率最高为95.7%(表4),结合表3和表4可以看出,叶柄的愈伤诱导率明显高于叶片的愈伤诱导率。

表3 不同培养基配方对青蒿叶片诱导愈伤组织的影响

Table 3 Effect of different medium formulation on callus induction from *Artemisia annua* L. leaves

编号 No.	接种数 Inoculation number	愈伤数 Callus number	诱导率 Induction rate/%
A	90	20	22.3ef
B	90	28	31.0bcde
C	90	52	58.0b
D	90	70	78.0a
E	90	34	37.7bcd
F	90	36	40.0c
G	90	44	49.0bc
H	90	24	26.7de
I	90	12	13.0ef
J	90	24	26.7de
K	90	12	13.3f
L	90	0	0g

注:不同小写字母表示在0.05水平具有显著差异,同列内的相同字母则表示在该水平上的差异不显著。下同。

Note: Different letters a-g with the same column show significant difference at 0.05 level. Same letters within the column show no significant difference. The same below.

表4 不同培养基配方对青蒿叶柄诱导愈伤组织的影响

Table 4 Effect of different medium formulation on callus induction from *Artemisia annua* L. petioles

编号 No.	接种数 Inoculation number	愈伤数 Callus number	诱导率 Induction rate/%
A	90	40	44.3c
B	90	40	44.7c
C	90	68	75.7b
D	90	86	95.7a
E	90	64	71.0b
F	90	28	31.0de
G	90	50	55.6c
H	90	24	26.6de
I	90	40	44.6c
J	90	26	28.7e
K	90	18	20.0de
L	90	0	0f

2.2 青蒿愈伤组织再分化

2.2.1 不同培养基配方对青蒿叶片愈伤分化的影响

在统计过程中发现除了对照培养基17号外,6、7、9~16号培养基均为分化,且在培养过程中,这些培养基中的愈伤褐化严重;1~5、8号培养有不同程度的分化。从图1可以看出,青蒿叶片愈伤在3、4号培养基上分化率显著高于1、2、5、8号培养基上愈伤的分化率,3号培养基上的分化率高达95.3%,4号的分化率为82.4%。

2.2.2 不同培养基配方对青蒿叶柄愈伤分化的影响

从研究结果可以看出,叶柄愈伤的分化率很低,几乎不分化,分化的多为玻璃化苗,培养一段时间就会慢慢褐化死去,仅有5号培养基上有分化,分化率为6%。在原有的愈伤组织诱导培养基D上,分化率为11%。叶柄分化率低、再生能力差,但可在MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D培养基(愈伤组织诱导培养基)上一次成苗。

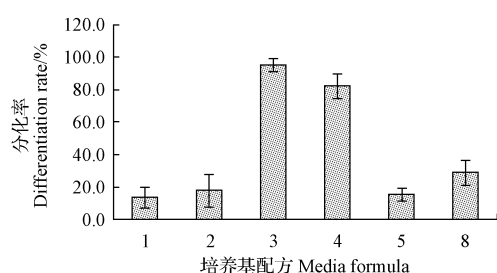


图1 不同培养基配方对青蒿叶片愈伤分化的影响

Fig. 1 Effect of different culture medium on differentiation of *Artemisia annua* L. leaves

2.3 生根培养与移栽

青蒿幼苗在 1/2 MS+1.0 mg/L NAA+3%蔗糖+0.7%琼脂粉的培养基上生根最高,并且生根快,粗壮且密,明显优于 2 号和 3 号培养基(图 2)。21 d 后将生根好的青蒿,闭光练苗 5~7 d,栽种到珍珠岩:草木灰为 2:1 的穴盘中,最初的 7 d 要注意水分和温度,等到青蒿重新生出新根后,移栽到室外,移栽成活率为 90%。

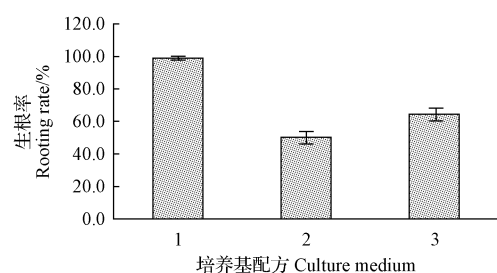


图2 不同培养基配方对青蒿分化苗生根率的影响

Fig. 2 Effect of different culture medium on rooting rate of *Artemisia annua* L.

3 讨论

该试验结果表明,在 MS 基本培养基上添加 6-BA 和 2,4-D,且二者的比率在 1:(3~4)时,能成功的诱导青蒿叶片、叶柄愈伤的产生,且能分化成苗,这与伍晓丽等^[4]的研究是相一致的。2,4-D 在愈伤诱导中明显具有优势,但是在后续的愈伤分化中却具有一定的阻止分化的不良影响,这与之前郝建平等^[5]、蒋向辉等^[6]的研究结果相一致。在 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 培养基中愈伤呈疏松型,长时间保持绿色,分化能力强,能形成丛生分化苗,且多次继代后仍能保持旺盛的分化率,这为青蒿的快速繁殖提供了保障。另外除了激素的影响外,光照强度也有一定的影响。在愈伤诱导的过程中如果一直在强光下培养,生成的愈伤容易褐化,如果是降低光照强度或者在弱光下培养,愈伤的褐化速度就会减缓且易于分化出丛生芽。因此,推测前期愈伤在弱光下培养,对防止愈伤褐化和促进丛生芽的分化具有一定的作用。

关于青蒿的生根培养,现在越来越倾向于用单一激

素促进生根,如刘春朝^[7]、施波等^[8]、于飞飞等^[9]、穆胜玉等^[10]和张丽珍等^[11],多数所用激素种类为 NAA,仅张丽珍等^[11]用 IBA 促进根,并且所用浓度也多不一致,NAA 的浓度在 0.05~1.50 mg/L。该研究选用在基本培养基上添加单一激素 NAA 进行生根培养,并设计 0.1、1.0 mg/L 2 个浓度,试验结果表明,在 1/2 MS+1.0 mg/L NAA 培养基上生根最好。该研究表明,植物分化苗生根培养受内外多种因素的影响,之所以会出现不同的结果,可能与外植体的基因型,前期组织培养的条件等有一定的相关性。

利用植物微繁殖技术培养植株再生时,绝大多数情况下是先形成愈伤组织,然后再分化成苗,但是也有例外,有关直接成苗的报道有黑莓叶片^[12]、青蒿叶片^[6]、青蒿花序^[13],不过关于叶柄一次成苗的报道还是比较鲜见的。该研究在 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D+3%蔗糖+0.7%琼脂粉上,成功获得青蒿叶柄一次成苗的再生植株。叶柄可以一次成苗,且分化苗粗壮,生长良好,不足之处是分化数量少,与杜仲叶柄研究相一致^[14]。如果适当的对激素进行合适的控制,建立叶柄一次成苗的遗传再生体系亦是可行的。植物一次成苗的遗传再生体系能大大缩短研究周期,具有重要的实用价值。

参考文献

- [1] 张小波,王利红,郭兰萍,等. 广西地形对青蒿中青蒿素含量的影响[J]. 生态学报,2009,29(2):688-697.
- [2] 孔建强,王伟,程克棣,等. 青蒿素的合成生物学研究进展[J]. 药学报,2013,48(2):193-205.
- [3] 刘万宏,黄玺,张巧卓,等. 青蒿素生物合成与基因工程研究进展[J]. 中草药,2013,44(1):101-107.
- [4] 伍晓丽,刘飞,李隆云,等. 青蒿叶片愈伤组织诱导和植株再生[J]. 时珍国医国药,2007(5):105-106.
- [5] 郝建平,张江涛. 8 种甜养的种子消毒及愈伤组织诱导和增殖条件[J]. 植物研究,2001,21(1):67.
- [6] 蒋向辉,余朝文,谷合勇,等. 多因子正交试验对中药青蒿丛生芽诱导条件的筛选[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2854-2855.
- [7] 刘春朝. 黄花蒿组织培养及培养物中青蒿素含量的研究[D]. 开封:河南大学,2007.
- [8] 施波,孙小琴,任甜甜,等. 青蒿茎段愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2008,26(2):217-219.
- [9] 于飞飞,廖宇靖,贾秀山. 青蒿离体快繁技术研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2008,33(1):116-120.
- [10] 穆胜玉,白志川,宋孝霞. 青蒿组织培养体系建立的研究[J]. 重庆科技学院学报(自然科学版),2006,8(4):21-25.
- [11] 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):48-51.
- [12] SANDHYA C, MAHALAXMI V. *In vitro* high frequency direct plant regeneration from whole leaves of black-berry[J]. Scientia Horticulturae, 2009,120:22-26.
- [13] 贾秀山,廖宇靖,于飞飞,等. 黄花蒿组织培养研究[J]. 生物技术通报,2008,19(2):259-262.
- [14] YEPES L M, MITTAK V, PANG S Z. Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus[J]. Plant Cell Reports,1995(14):694-698.

DOI:10.11937/bfyy.201608027

紫叶挪威槭再生体系建立

王子岚^{1,2}, 佟欣³, 杜克久^{1,2}

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2. 河北省林木种子资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000;
3. 承德市滦平县国有林场管理处 于营子林场, 河北 滦平 067000)

摘要:以紫叶挪威槭2年生枝条水培后展开1~2片小叶的萌发芽为试验材料,采用无菌条件下组织培养的方法,研究了紫叶挪威槭外植体材料不同的消毒方法和时间,不同的不定芽和不定根分化培养基对再生体系建立的影响,以期低污染、高效的建立紫叶挪威槭的再生体系。结果表明:萌发芽经2%洗涤灵溶液洗涤,无菌水冲洗,去除残留,70%乙醇处理30 s,无菌水冲洗5~6次,1%次氯酸钠消毒液处理20 min,无菌水冲洗5~6次,接种到不定芽分化培养基MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.3 g/L CH(水解酪蛋白)+2.0 g/L PVP+30 g/L 蔗糖(pH 5.5)诱导并产生不定芽。不定芽继代至不定根分化培养基MS+0.4 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+25 g/L 蔗糖(pH 5.5)诱导形成不定根,建立了紫叶挪威槭的植株再生体系。

关键词:紫叶挪威槭;萌发芽;组织培养;再生体系

中图分类号:S 792.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0096-04

紫叶挪威槭(*Acer platanoides* L. 'Crimson King')
属槭树科槭树属落叶乔木,又名红国王、国王枫、红帝娜

第一作者简介:王子岚(1989-),女,硕士研究生,现主要从事环境毒理与生物修复等研究工作。E-mail:zilanwang@126.com

责任作者:杜克久(1965-),男,河北抚宁人,博士,教授,现主要从事植物基因工程生物安全评价及环境修复等研究工作。E-mail:dukejiu@126.com

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2012AA101403);环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金资助项目(KF2009-03);河北省强势学科资助项目。

收稿日期:2015-12-23

威槭、大叶红枫、紫叶挪威槭,原产欧洲。其叶片随季节的变化而呈现不同的颜色,常作为观赏植物被栽植在公路或街道两旁^[1-8]。其生命力旺盛,适应性较强,是园林绿化的优良树种,市场需求量极大,并且价格昂贵。但其繁殖比较困难,扦插和移栽成活率低,播种繁殖后代需要的时间比较长,并且容易产生性状分离^[9]。因此建立和完善紫叶挪威槭的植株再生体系,实现紫叶挪威槭的快速繁殖,具有重要的理论意义和实际应用价值。

王静等^[9]利用紫叶挪威槭的休眠芽为外植体,在WPM培养基上培养,获得无菌体系。利用休眠芽为外

The Establishment of Regeneration System of Tissue Culture of *Artemisia annua* L.

LI Fei, MA Huanxin, LI Zhong'ai, WANG Zicheng

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004)

Abstract: In order to investigate the callus induction and the regeneration of the plant of *Artemisia annua* L., to obtain rapid reproduction technology, the leaves and petioles of *Artemisia annua* L. were taken as explants, and the MS culture was chosen as the basic culture medium to be used in different combinations with hormone. The results showed that using leaves of *Artemisia annua* L. as explants, the callus induced medium was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, the induction rate was 78.0%; the differentiation medium was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3% sucrose+0.7% agar powder, the differentiation rate was 95.3%. The differentiated seedling rooted well in the culture medium 1/2MS+1.0 mg/L NAA, the rooting rate was 98.9%. Petioles of *Artemisia annua* L. could be a seedling by one step in medium MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D. The system could effectively shorten the training period, and was worthy of study.

Keywords: *Artemisia annua* L.; leaf; petiole; tissue cultivation; plant regeneration