

· 中药农业 ·

黄花蒿新品种“研青一号”研究[△]丁丹丹¹, 马婷玉¹, 陈士林¹, 冷梁¹, 黄盛群², 谢刚², 向丽^{1*}

1. 中国中医科学院 中药研究所/北京市中药鉴定与安全性检测评估重点实验室, 北京 100700;

2. 广西仙草堂制药有限责任公司, 广西 柳州 545400

[摘要] 目的: 通过培育青蒿素高含量的新品种, 降低青蒿素提取成本, 保障我国青蒿素原料供应优势地位。方法: 通过混合选育获得青蒿素含量高的新品种“研青一号”, 进行特异性、一致性、稳定性评价; 对来自15个产地样品进行基因组重测序, 筛选“研青一号”特征性插入缺失突变位点, 并采用药用植物全球产地生态适宜性信息系统(GMPGIS)预测其全球适宜种植范围。结果: “研青一号”植株呈圆塔型, 矮小、紧凑、叶片较大, 生育期240~250 d, 种子千粒质量(34.98 ± 1.74) g, 单株干叶片产量(211.90 ± 48.07) g; 青蒿素含量较高, 平均为(2.11 ± 0.38)%, 最高达2.70%。2对AaIn101和AaIn110特异性引物, 可用于区分“研青一号”和其他产地黄花蒿种质。中国为“研青一号”适宜种植的主要区域, 主要集中在我国东南部, 以广西最大, 达211 656.27 km²; 结论: “研青一号”植株形态特征特异性明显, 青蒿素含量较高; 具有特异性、一致性及稳定性, 适宜在我国东南部推广。

[关键词] “研青一号”; 黄花蒿; 青蒿素; 规范化栽培

[中图分类号] R282.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-1072-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190219004

Study on New Variety of *Artemisia annua* L. "Yanqing No. 1"DING Dan-dan¹, MA Ting-yu¹, CHEN Shi-lin¹, LENG Liang¹, HUANG Sheng-qun², XIE Gang², XIANG Li^{1*}

1. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Guangxi Xiancaotang Pharmaceutical Co., Ltd., Liuzhou 545400, China

[Abstract] **Objective:** To breed high artemisinin content varieties to reduce the extraction cost and guarantee China's dominant position in supply of artemisinin. **Methods:** A high artemisinin content variety, "Yanqing No. 1", was obtained through mixed breeding methods and its specificity, consistency, and stability was evaluated. After genomic resequencing, the special insertion deletion mutations of "Yanqing No. 1" were screened compared with other 14 samples. Global geographic information system for medicinal plant(GMPGIS) was also used to predict its global suitable planting areas. **Results:** The "Yanqing No. 1"(YQ 1) variety is a round tower type, short, compact, large in leaves, and has a growth period of 240-250 days. The thousand seeds weight is (34.98 ± 1.74) g, and the dry leaf yield per plant is (211.90 ± 48.07) g. The average content of artemisinin is (2.11 ± 0.38)%, and the highest is 2.70%. Two pairs specific primers of AaIn101 and AaIn110 were screened to distinguish YQ1 and other 14 samples. The global suitable planting area of "Yanqing No. 1" is mainly in China. The suitable planting areas in China is mainly concentrated in the southeast, with the largest in Guangxi, reaching 211 656.27 km². **Conclusion:** The "Yanqing No. 1" plant has specific morphological characteristics and high artemisinin content with specificity, consistency and stability and is suitable for planting in the southeast of China.

[Keywords] "Yanqing No. 1"; *Artemisia annua*; artemisinin; standardized cultivation

青蒿素是治疗间日疟、恶性疟和抗氯喹疟疾的首选药物^[1], 近几年全球青蒿素年用量在180 t左

右^[2], 虽然早有研究可通过人工合成的方法合成青蒿素^[3-4], 但由于成本和效率等问题难以大规模生

[△] **[基金项目]** 国家自然科学基金特别项目(81641002, U1812403-1); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101002-003-001, 2019ZX09201005-006-001); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZZ10-024, ZZ13-YQ-102)

* **[通信作者]** 向丽, 副研究员, 研究方向: 中药资源; E-mail: lixiang@icmm.ac.cn

产^[5],目前主要依靠从黄花蒿植物中提取的方法。除了我国少部分地区外,全球大部分区域的黄花蒿中青蒿素含量都在0.2%以下,不具有提取价值^[6-7]。相关研究^[8-10]发现,黄花蒿在我国海南、湖南、广西等地适宜生长;重庆、四川等地和低海拔地区黄花蒿抗疟效果较好;海南省降水充沛、光热量足,与黄花蒿高温喜湿的生物学特性一致^[8],野生资源青蒿素含量较高。目前,黄花蒿主要依靠人工栽培,但是不同产地、不同品种黄花蒿中青蒿素含量存在显著差异,生产栽培技术不够规范导致栽培的黄花蒿质量良莠不齐。青蒿酸、双氢青蒿酸、青蒿乙素均是青蒿素生物合成的前体物质^[11-12]。课题组经过多年混合选育,获得青蒿素含量高达2.11%的新品种“研青一号”(YQ1),并对青蒿素及其前体物质进行了含量测定,基于重测序筛选其Indel分子标记,采用药用植物全球产地生态适宜性信息系统(GMPGIS)预测了其适宜种植范围,并总结了规范化栽培技术体系,为降低原料成本、获得高品质青蒿素原料提供保障。

1 材料与方法

1.1 “研青一号”植株形态特征

试验材料包括YQ1以及来自海南栽培种(HQ1)、湖南的栽培种(HUN)以及海南的2个野生种(HN1、HN3)。在采收期(8月中上旬)测量其株高、冠幅、地上茎粗、分枝数、分枝角度、叶片面积及单株干叶质量。叶片面积使用Image J软件对黄花蒿植株一级分枝上叶片进行面积计算,每个品种测量30株。

在种子成熟期,对每个品种随机抽取30粒用于形态观察。首先将种子置于平底玻璃片(5 cm × 10 cm)上,在TOUPCAM显微镜4倍视野下观察,使用Toup View软件量取30粒种子的最长、最宽数据并记录;选用体式显微镜拍照观察并描述其形态与差异,见图1。选择百粒法测定黄花蒿种子千粒质量。每个批次随机抽测100粒种子,使用十万分之一天平称定质量,进行6个重复。按公式(1)(2)对不同

品种黄花蒿种子的发芽率、发芽势进行测定,将100粒黄花蒿种子均匀洒在实验滤纸上,使之保持湿润,每批样品3次重复。发芽条件:温度20℃,相对湿度40%,20%光照8 h。胚根与种子等长或稍长,2片子叶展开者视为正常发芽并统计。连续3 d不发芽视为发芽结束。

$$\text{发芽率} = \frac{\text{发芽种子总数}}{\text{供试种子总数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{发芽势} = \frac{\text{前5 d 发芽种子总数}}{\text{供试种子总数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2 青蒿素类化合物含量测定

在黄花蒿采收期,对5个品种进行青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸和双氢青蒿酸含量测定,每个品种测定30个单株。

采用超高效液相色谱-串联质谱检测法(UPLC-QQQ-MS)进行青蒿素类化合物含量测定。青蒿素(批号:CFS201801,纯度≥99%)、双氢青蒿酸(批号:CFS201801,纯度≥98%)、青蒿酸(批号:CFS201702,纯度≥99%)、青蒿乙素(批号:CFN98807,纯度≥98.0%)均购于武汉天植生物技术有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯(美国Fisher公司);乙酸(分析纯,北京化工厂);甲酸、甲酸铵(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)色谱柱,美国Agilent UPLC-MS系统[1290系列超高效液相色谱仪、6470型三重四极杆质谱仪(安捷伦科技有限公司)];XS105型十万分之一电子分析天平(METTLER TOLEDO公司);舒美KQ-500DE型数控超声波清洗器(功率100 W,昆山市超声仪器有限公司);BS210S型万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

取青蒿素、青蒿乙素、双氢青蒿酸、青蒿酸对照品适量,分别精密称定,加甲醇制成对照品溶液。取植物样品适量,粉碎,精密称取0.1 g,置于50 mL离心管中,加入甲醇10 mL。超声提取30 min,放冷



注: A. HUN; B. HN1; C. HQ1; D. HN3; E. YQ1。

图1 不同来源黄花蒿种子于体视显微镜下的形态

后吸取适量溶液稀释 1000 倍, 滤过, 即得样品溶液。

青蒿素、青蒿乙素流动相: 0.1% 甲酸 10 mmol·L⁻¹-甲酸铵水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~5 min, 5%~100% B; 5~7 min, 100% B), 后运行 2 min。柱温: 30℃, 进样量: 1 μL, 流速: 0.3 mL·min⁻¹。离子源: 电喷雾离子源(ESI), 扫描方式: 正离子模式, MRM 模式进行检测。外标法计算浓度。青蒿素母离子: 283.2, 子离子: 265.1、247.1, 电压: 135 V, 能量: 5; 青蒿乙素母离子: 249.1, 子离子: 189.1, 能量: 9, 子离子: 143.1, 能量: 24, 电压: 130 V。

青蒿酸、双氢青蒿酸流动相: 0.05% 乙酸水溶液(A)-甲醇(B); 等度洗脱(0~3 min, 85% B), 后运行 2 min。柱温: 30℃, 进样量: 1 μL, 流速: 0.3 mL·min⁻¹。离子源: 电喷雾离子源(ESI), 扫描方式: 负离子模式, SIM 模式进行检测。青蒿酸母离子: 233.2, 电压: 140 V; 双氢青蒿酸母离子: 235.2, 电压: 140 V。

以峰面积积分值为纵坐标(Y), 对照品进样浓度(ng·mL⁻¹)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 青蒿素: $Y = 729.95X + 10\ 575$, $r = 0.999\ 9$; 青蒿乙素: $Y = 2\ 327.8X + 421.24$, $r = 1$; 青蒿酸: $Y = 16\ 362X + 23.033$, $r = 0.999\ 6$; 双氢青蒿酸: $Y = 4\ 907.8X - 7\ 124.6$, $r = 0.999\ 8$ 。线性关系良好, 精密性、重复性、稳定性试验合格。

1.3 基于重测序的 InDel 分子标记筛选

1.3.1 InDel 标记的鉴定及引物设计 使用 Burrows-Wheeler Alignmet (BWA) 将 15 个品系比对到基因组上(每个品系 2~3 个重复, 共 34 个重测序样本), 然后使用 GATK 流程在比对后的重测序样本中注释出每个品系特异的缺失突变(InDel)。选择 YQ1 品系的 3 个重复样本 RS4、RS17 以及 RS30 的特异缺失突变, 取 InDel 位点两翼各 500 bp 碱基长度, 共 1000 bp 片段长度使用 Primer 5.0 进行引物设计。上游设计在 1~500 bp, 下游设计在 500~1000 bp, 筛选 YQ1 特征性的缺失突变位点。

1.3.2 PCR 扩增和电泳 材料来自于 7 份常规栽培及野生黄花蒿种质资源, 包括 YQ1、HQ1、HN1、HN3、HUN、GZ(贵州)、XZ(西藏林芝米林县), 2018 年种植于北京怀柔实验基地。采取幼苗期叶片, 采用基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN Hi-DNAsecure

Plant Kit DP350)。PCR 反应体系为 25 μL, 其中 DNA 模板(15 ng·μL⁻¹) 2 μL, 2×Taq Mix 酶(2.5 U·μL⁻¹) 8.5 μL, 上游引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL, 下游引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL, ddH₂O 12.5 μL。PCR 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电压 120 V, 电泳时间 20 min。显色后照相保存。

1.4 “研青一号”全球产地适宜性分析

运用 GMPGIS 系统对“研青一号”全球适宜生产区域进行预测。根据“研青一号”多点多年试验结果, 将海南省、重庆市、四川省、广西省、湖南省等 132 个试验点经纬度导入 GMPGIS 系统, 生成 shape 文件, 在基础地理信息数据库、气候因子数据库等相关数据库的支持下, 进行“研青一号”的生态因子值分析及全球产地适宜性分析。

2 结果与分析

2.1 选育过程

2013 年通过收集比较全国黄花蒿野生及栽培种质资源 523 份, 发现来自广西融安县的 1 份种质资源青蒿素含量较高, >2.0%, 同时采用高光照射和组织培养方法, 对该品系的植株紧凑、矮化的株系进行保留、扩繁并单独留种。经过 3 年多技术混合选育, 获得平均青蒿素含量达 2.11% 的新品种“研青一号”, 并于 2017、2018 年在四川省宜宾市、重庆市酉阳县、海南省海口市、广西省融安县、湖南省祁阳县、北京市怀柔县、江苏省无锡市进行了多点试验。

2.2 植株形态特征

“研青一号”植株整体表型较为一致, 主要呈圆塔形生长, 平均株高为(124.0±25.5) cm, 较其他种质资源黄花蒿矮, 生育期 240~250 d; 其株型紧凑, 平均冠幅为(93.4±14.0) cm。叶色正绿色, 叶片普遍稍大, 平均叶片面积为(11.2±3.2) cm²。植株腺毛密度高, 气味浓郁, 平均单株叶片干质量为(211.9±48.1) g。种子表面圆润, 有浅棕色沟纹, 基部渐尖, 长宽比为 2.0±0.1, 千粒质量(35.0±1.7) mg。“研青一号”在第 3 和第 4 天开始发芽, 主要集中于第 4 天至第 6 天, 第 7 天和第 8 天后发芽率开始降低, 发芽率为(79.0±10.5)%。因此, “研青一号”植株呈圆塔型, 矮小、紧凑、叶片较大, 生育期长, 能与其他品种进行明显区分(见表 1)。

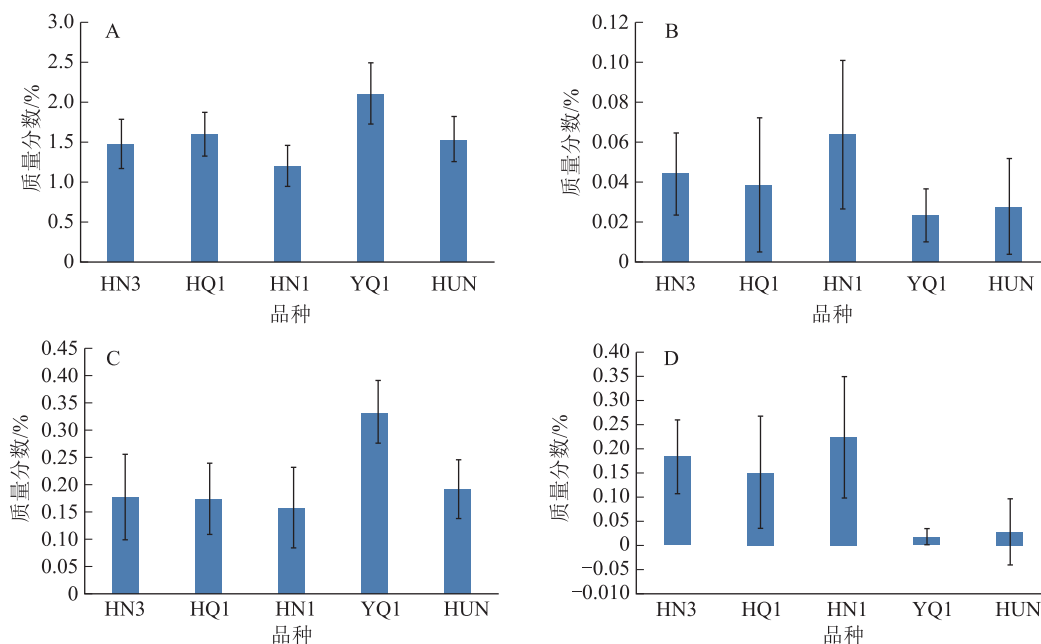
表 1 “研青一号” 植株性状特征及青蒿素含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

植株性状		YQ1(圆塔型)		HQ1(尖塔型)		HUN(尖塔型)		HN1(尖塔型)		HN3(尖塔型)	
		平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV	平均值	CV
株高/cm		124.0 ±25.5	0.21	180.9 ±18.6	0.10	175.2 ±22.2	0.13	163.0 ±10.8	0.07	181.7 ±16.7	0.09
冠幅/cm		93.4 ±14.0	0.15	128.2 ±8.7	0.07	131.7 ±13.2	0.10	134.8 ±14.3	0.11	135.4 ±11.8	0.09
地上茎粗/cm		2.9 ±0.4	0.14	3.3 ±0.5	0.15	3.2 ±0.4	0.13	3.6 ±0.7	0.19	3.5 ±0.5	0.14
一级分支	数量	55.3 ±7.0	0.13	62.6 ±5.2	0.08	53.2 ±6.4	0.12	60.2 ±5.4	0.09	60.1 ±4.1	0.07
	分枝角度	36.6 ±6.7	0.18	45.5 ±5.1	0.11	55.9 ±6.5	0.12	50.8 ±5.1	0.10	47.3 ±4.6	0.10
二级分支	数量	656.3 ±217.0	0.33	1 056.5 ±175.3	0.17	918.8 ±176.4	0.19	1 039.8 ±195.7	0.19	1 173.4 ±227.0	0.19
	分枝角度	41.2 ±6.7	0.16	53.7 ±6.3	0.12	55.1 ±6.4	0.12	51.5 ±6.8	0.13	51.9 ±7.0	0.13
叶片	面积/cm ²	11.2 ±3.2	0.29	10.1 ±3.1	0.31	10.9 ±2.0	0.18	10.6 ±2.6	0.25	12.8 ±3.0	0.23
	单株干质量/g	211.9 ±48.1	0.23	184.2 ±34.6	0.19	193.9 ±42.2	0.22	205.0 ±46.5	0.23	238.2 ±40.8	0.17
种子	长/μm	715.3 ±47.1	0.07	885.0 ±143.9	0.16	734.6 ±59.2	0.08	645.3 ±77.2	0.12	692.6 ±50.1	0.07
	宽/μm	362.6 ±26.7	0.07	389.6 ±46.5	0.12	370.0 ±30.9	0.08	326.9 ±37.4	0.11	378.2 ±32.8	0.09
	长/宽	2.0 ±0.1	0.05	2.3 ±0.2	0.09	2.0 ±0.2	0.10	2.0 ±0.3	0.15	1.8 ±0.1	0.06
	千粒质量/mg	35.0 ±1.7	0.05	35.0 ±2.4	0.07	29.6 ±1.1	0.04	22.8 ±3.0	0.13	28.4 ±3.8	0.13
	发芽率/%	79.0 ±10.5	0.13	74.0 ±7.9	0.11	76.3 ±9.1	0.12	64.0 ±21.4	0.33	91.0 ±7.2	0.08
	青蒿素含量/%	2.1 ±0.4	0.19	1.6 ±0.3	0.19	1.5 ±0.3	0.20	1.2 ±0.3	0.25	1.5 ±0.3	0.20
生育期/d		240 ~ 250		210 ~ 220		220 ~ 230		210 ~ 220		210 ~ 220	

2.3 青蒿素类化合物含量测定

由图 2 可知, 与 4 个对照比较, YQ1 青蒿素含量最高, 平均为 $(2.11 \pm 0.38)\%$, 最高达 2.70%; 同时双氢青蒿酸含量也最高, 平均为 $(0.33 \pm 0.07)\%$, 最高达 0.53%; 青蒿乙素和青蒿酸含量

却是 5 个品种中最低的。对照品种内 4 种化合物含量变化趋势基本一致, 青蒿素和双氢青蒿酸含量较高, 青蒿酸和青蒿乙素含量较低, 青蒿素含量比重最大。HN1 青蒿乙素和青蒿酸含量最高, 分别为 $(0.06 \pm 0.03)\%$ 和 $(0.02 \pm 0.01)\%$, 最高为 0.06%。



注: A. 青蒿素; B. 青蒿乙素; C. 双氢青蒿酸; D. 青蒿酸。

图 2 不同黄花蒿中青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸、双氢青蒿酸含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

将植株性状与青蒿素类化合物含量进行相关性分析,青蒿素含量与双氢青蒿酸含量正相关, $r = 0.6257$ 。青蒿酸和青蒿乙素含量显著正相关, $r = 0.8348$ 。青蒿素、双氢青蒿酸含量与植株的叶面积呈正相关,与株高、冠幅、地上茎粗、分枝数、分枝角度负相关,但相关系数并不显著。植株主要性状与叶片产量相关性分析结果表明,植株产量与株高、冠幅、地上茎粗、分枝数、分枝角度、叶片数皆呈正相关,其中冠幅与产量的相关性最高, $r = 0.6135$ 。结合青蒿素含量及植株产量分析,人工培育新品种时可选择植株紧凑,冠幅适中,二级分支数多,叶面积较大的株系。

2.4 特异性、一致性、稳定性分析

特异性:“研青一号”与4个栽培和野生优良品系比较,特异性明显,植株呈圆塔型,植株紧凑、矮小,一级分支和二级分支夹角小,生育期长;青蒿素和双氢青蒿酸含量最高,平均值分别为 $(2.11 \pm 0.38)\%$ 和 $(0.33 \pm 0.07)\%$ 。

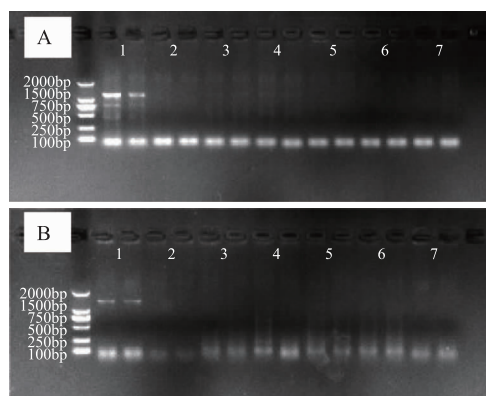
一致性:对“研青一号”主要性状指标变异系数进行分析,其植株形态、叶色、花色、种子颜色全部一致,株高、冠幅、叶面积、一级分支角度、二级分支角度、种子长宽比、种子千粒质量、青蒿素含量、双氢青蒿酸含量等指标的变异系数都符合一致性要求。

稳定性:“研青一号”于2017、2018年在四川省宜宾市、重庆市酉阳县、海南省海口市、广西省融安县、湖南省祁阳县、北京市怀柔县、江苏省无锡市进行了多点试验。除北京市怀柔县基地的样品青蒿素含量有降低外,其余基地植株性状表现较稳定,青蒿素含量均在2.0%以上,稳定性较好。

2.5 基于基因组重测序的 Indel 分子标记筛选

重测序及序列比对结果表明,黄花蒿每个品系的缺失突变数量为76 971~114 174个。“研青一号”3个重复样品RS4、RS17以及RS30的特异缺失突变分别为91 288、96 812、99 827个。随机筛选出Indel标记45条,其中有16条序列的Indel片段>590 bp,对这16条序列进行引物设计,共设计引物32对。以7份黄花蒿材料基因组DNA为模板,用PCR方法检测32对引物有效性。其中AaIn101(AaIn101F: GACTATGTTTAGCGCGGAGC, AaIn101R: TGCCACTACTTTATCATATCAAATC)和AaIn110(AaIn110F1: GTTCTAGACTCGGGCCTTAGC, AaIn110R1: CTGGC-

TGTGCCATGTTTCTG)可以在“研青一号”中出现特异条带,而在其他6份材料中无条带(见图3),可作为“研青一号”的特异分子标记,用于区分“研青一号”和其他产地黄花蒿种质。



注: A. AaIn110; B. AaIn101; 1. YQ1; 2. GZ; 3. XZ; 4. HUN; 5. HQ1; 6. HN1; 7. HN3。

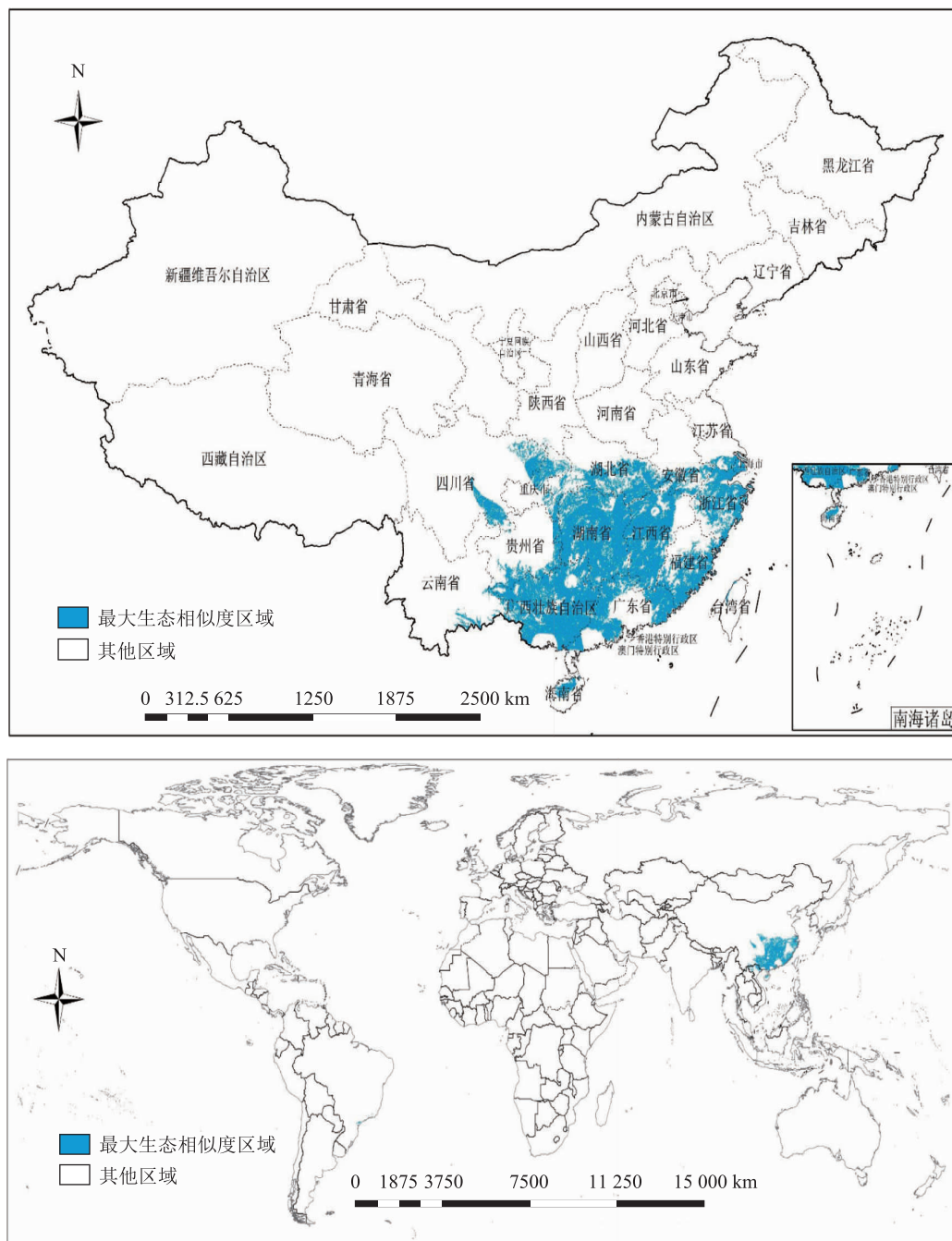
图3 引物 AaIn101 和 AaIn110 对 7 份黄花蒿种质资源的扩增结果

2.6 “研青一号”全球产地适宜性分析

通过对“研青一号”基点的 GMPGIS 分析,得出“研青一号”主要分布区域的生态因子值范围:最冷季均温 $4.5 \sim 18.9^{\circ}\text{C}$,最热季均温 $24.4 \sim 28.6^{\circ}\text{C}$,年均温 $14.9 \sim 24.3^{\circ}\text{C}$,年均相对湿度 $68.61\% \sim 77.35\%$,年均降水量 $987 \sim 1688\text{ mm}$,年均日照 $124.96 \sim 145.47\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$,土壤类型以强淋溶土、高活性强酸土、暗色土、人为土、黑钙土、铁铝土等为最多。

根据以上分析所得到的生态因子值范围,利用加权欧式距离法计算得到“研青一号”的最大生态相似度区域(指相似度 $99.9\% \sim 100\%$ 的区域分布图,见图4)。“研青一号”在亚洲的适宜生长区域面积分布较大,多处于亚热带季风和季风性湿润气候。其中,中国适宜性分布区域面积最大,达 $1\,020\,446.59\text{ km}^2$ 、越南占 $38\,609.57\text{ km}^2$ 、巴西占 $8\,006.91\text{ km}^2$ 、日本占 $3\,247.25\text{ km}^2$ 。

“研青一号”在中国的最大生态相似度区域,主要分布在我国东南部,具体包括广西壮族自治区、湖南、江西、广东、湖北、浙江、福建、四川、贵州、重庆、海南等。其中面积最大的为广西壮族自治区,适宜性分布区域面积达 $211\,656.27\text{ km}^2$ 。根据 GMPGIS 分析结果可得,在我国东南部地区较适宜“研青一号”生长。



注：审图号为 GS(2020)2680 号。

图 4 “研青一号” 99.9% ~ 100% 最大生态相似度区域分布

3 “研青一号” 无公害规范化栽培技术

3.1 种子繁殖

3.1.1 选地与整地 “研青一号” 生活能力较强，喜温，根据多点试验及 GMPGIS 分析结果，选择我国东南部海拔在 800 m 以下林缘、荒地，气候潮湿向阳，排水良好，疏松肥沃的沙壤土，未连作地块

来进行种植较好。

播种前，对苗床进行精细耕作，使土地平整，土壤疏松，然后浇水使土壤润透，制作宽 1.2 m、高 20 cm 的垄面，排水沟宽 30 cm。

3.1.2 播种时间 海南最佳育苗时间为 11—12 月；其余地区在 1—2 月播种较好。

3.1.3 播种方法 播种前将种子与沙土拌匀，每

1 g 种子用 4000 ~ 5000 g 干细泥沙, 然后均匀洒向床面, 播种完成后, 在苗床表面加播一层薄薄的草木灰, 以遮住种子为度, 再在苗床上覆盖一层地膜, 以保持温度, 便于种子萌发。每 1 g 种子可播 15 m², 可种 2664 ~ 3996 m²。

3.1.4 苗床管理 播种 7 d 后, 要勤时揭膜, 观察苗床情况, 通过揭膜通风和及时洒水使之保持合适的温湿度。种苗长到 5 cm 左右时可在地膜去掉, 从苗床两端先撤, 通过炼苗提高种苗的生长适应能力。

炼苗期间视情况而定, 可用 1.5 L 水配 50 g 尿素加 150 g 复合肥配成的尿素水或者经 30% 稀释的农家肥催苗, 施水肥后需用清水补淋 1 次, 苗高 10 ~ 15 cm 主茎变硬时即可进行大田移栽。

3.2 移栽定植

3.2.1 移栽时间 3—4 月。

3.2.2 选地整地 选择气候温暖向阳, 排水良好, 疏松肥沃的沙壤土地, 土地翻耕后, 起厢宽 1.2 m, 起垄宽 0.6 m、高 0.3 m, 沟宽 0.4 ~ 0.5 m。坡地耕后可直接种植, 但注意不能种在起沟起槽的凹地处。每株移栽前在距根部 4.5 ~ 6 cm 间施 100 g 有机肥和 30 ~ 40 粒复合肥 (硫酸钾型 15 + 15 + 15) 混合作底肥。

3.2.3 拔苗移栽 当苗长到 10 ~ 15 cm 时, 选择在晴下午或阴天按 1 m × 0.9 m 间距移栽。若苗床干结, 用清水淋湿后再拔苗, 当天种完。种植深度 3 ~ 5 cm, 种植后及时浇透定根水, 保证成活率。

3.3 田间管理

种苗存活后, 可在 40、70 d 左右生长期中进行第 2 次、第 3 次施加专用复合肥, 每 666 m² 施加 2 kg, 沿植株冠幅边缘垂直线挖穴、放肥、盖土 3 ~ 4 cm, 避免肥料挥发流失及烧苗。移栽后及时检查种苗的存活情况并补苗, 移栽初期及时清理杂草, 后期由于植株生长旺盛, 可不用考虑除草问题。“研青一号”在排水不良的潮湿地带生长较差, 干旱时期要及时浇水, 雨季则注意清沟、防渍排涝。

3.4 病虫害防治

“研青一号”病虫害并不严重, 但在栽培过程中, 由于连作^[13]、气候变化、通风差^[14-15]等原因可能会出现部分病虫害, 主要病虫害为茎腐病、白粉病、黄萎病、蚜虫、小地老虎等。

3.4.1 病害防治 茎腐病在高温多雨时节较易发

生, 根皮部及茎内木质部发黑、脱落, 在发病初期可以喷淋 1% 硫酸亚铁溶液、70% 甲基托布津 500 倍液, 隔 7 ~ 10 d 喷 1 次防治, 防治 2 ~ 3 次。

白粉病主要发病期在 6—7 月, 白粉遍布全株, 由老叶向新叶发展, 可用可湿性粉锈灵兑水 500 ~ 800 倍进行喷雾防治。

黄萎病主要发病期在 6—7 月雨后高温天气时, 染病植株从下部一些叶片开始黄化, 逐渐向上扩展, 最终导致整个植株黄萎病死。发病初期施用 50% 多菌灵可湿性粉剂 450 倍液, 隔 7 ~ 10 d 喷 1 次防治, 防治 2 ~ 3 次。

3.4.2 虫害防治 蚜虫常大量附着在嫩叶、茎尖部位, 可用 20% 速灭丁或蚜虱净等喷雾防治; 小地老虎会将苗床内或刚移栽至大田的幼苗近地面茎部咬断, 造成整株病死, 每 666 m² 可用 90% 敌百虫 30 倍水溶液 150 mL 拌 5 kg 菜叶、鲜草制成毒草进行诱杀。

3.5 采收与储藏

“研青一号”大量采收时, 选择晴天早上将全株从基部割倒, 在晒场或屋檐下晾晒或阴干, 待叶变为褐色且质地呈焦脆状时, 可用棒敲或老式打谷机将叶子打下来, 挑去小枝梗和杂质, 打包装袋, 于避光通风处保存。

4 讨论与展望

青蒿素作为抗疟一线药物, 属于我国战略资源^[16]。“研青一号”经长期选育, 在栽培过程中表型渐为稳定, 株型紧凑, 青蒿素含量平均值较高。采用分子标记可以快速辅助药用植物品种选育^[17-19]。参考黄花蒿全基因组信息^[20], 基于 34 份重测序分析, 筛选获得 2 对特异性 InDel 引物, 可区分“研青一号”与其他产地的黄花蒿种质资源。由于黄花蒿为异花授粉植物, 且野外存在大量黄花蒿资源, 因此在栽培过程中容易发生退化, 虽然现在黄花蒿品种青蒿素含量已经较前期 (0.8%) 提高了 2 ~ 3 倍, 但后期需要进行持续优化, 保持品种的稳定性和优良性, 并通过规范化种植, 保持我国在青蒿素原料方面的优势地位。

参考文献

- [1] 李琛琛, 尹昆, 闫歌. 抗疟药青蒿素及其衍生物相关药理作用研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11 (2): 185-188.

- [2] 袁亚男,姜廷良,周兴,等. 青蒿素的发现和发展[J]. 科学通报,2017,62(18):1914-1927.
- [3] ROTH R J, ACTON N. A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin [J]. J Nat Prod, 1989, 52(5): 1183-1185.
- [4] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.
- [5] 钟国跃,周华蓉,凌云,等. 黄花蒿优质种质资源的研究[J]. 中草药,1998,29(4):264-267.
- [6] 马进,向极钎,杨永康,等. 黄花蒿新品种选育现状及其系统选育研究进展[J]. 湖北农业科学,2014,53(19): 4520-4524.
- [7] 陈士林,向丽,李琳,等. 青蒿素原料生产与资源再生全球战略研究[J]. 科学通报,2017,62(18):1982-1996.
- [8] 王欢,李慧,曾凡琳,等. 黄花蒿空间分布及全球潜在气候适宜区[J]. 中药材,2015,38(3):460-466.
- [9] 张小波,郭兰萍,黄璐琦. 我国黄花蒿中青蒿素含量的气候适宜性等级划分[J]. 药学学报,2011,46(4): 472-478.
- [10] 杨婷. 重庆青蒿的品质评价研究[D]. 成都:成都中医药大学,2007.
- [11] 方欣,卢山,于宗霞,等. 青蒿素的生物合成研究[J]. 科技导报,2015,33(20):31-35.
- [12] DHINGRA V, PAKKI S R, NARASU M L. Antimicrobial activity of artemisinin and its precursors [J]. Curr Sci India, 2000, 78(6): 709-713.
- [13] 蒋运生,漆小雪,陈宗游,等. 黄花蒿人工栽培中存在的主要问题及其对策[J]. 时珍国医国药,2007,18(9): 2184-2185.
- [14] 梁惠凌,韦霄,唐辉,等. 黄花蒿主要病虫害调查及防治措施[J]. 中药材,2007,30(11):1349-1352.
- [15] 张永明. 青蒿的栽培管理及病虫害防治[J]. 植物医生,2006,19(6):29-30.
- [16] 岑丽华,徐良,黄莱岗,等. 不同纬区及不同栽培立地条件对黄花蒿青蒿素含量的影响[J]. 安徽农学通报, 2007,13(13):46-47.
- [17] 沈奇,张栋,孙伟,等. 药用植物 DNA 标记辅助育种(II)丰产紫苏新品种 SNP 辅助鉴定及育种研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(9):60-64.
- [18] 董林林,陈中坚,王勇,等. 药用植物 DNA 标记辅助育种(一):三七抗病品种选育研究[J]. 中国中药杂志, 2017,42(1):56-62.
- [19] 陈中坚,马小涵,董林林,等. 药用植物 DNA 标记辅助育种(三)三七新品种——“苗乡抗七1号”的抗病性评价[J]. 中国中药杂志,2017,42(11):2046-2051.
- [20] SHEN Q, ZHANG L D, LIAO Z H, et al. The genome of artemisia annua provides insight into the evolution of asteraceae family and artemisinin biosynthesis [J]. Mol Plant, 2018, 1(13): 1-13.

(收稿日期:2019-02-19 编辑:周鹭)

(上接第1065页)

- [33] XU Y, LI W J. Anti-inflammatory cytokines and depression [J]. Prog Biochem Biophys, 2014, 41(11): 1099-1108.
- [34] MILANESCHI Y, SIMMONS W K, VAN ROSSUM E F C, et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms[J]. Mol Psychiatry, 2019, 24(1): 18-33.
- [35] ROBERTS R E, DELEGER S, STRAWBRIDGE W J, et al. Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27(4): 514-521.
- [36] STUNKARD A J, FAITH M S, ALLISON K C. Depression and obesity[J]. Biol Psychiatry, 2003, 54(3): 330-337.
- [37] LICHTMAN J H, BIGGER J T J, BLUMENTHAL J A, et al. Depression and coronary heart disease: recommendations for screening, referral, and treatment: A science advisory from the american heart association prevention committee of the council on cardiovascular nursing, council on clinical cardiology, council on epidemiology and prevention, and interdisciplinary council on quality of care and outcomes research: endorsed by the american psychiatric association[J]. Circulation, 2008, 118(17): 1768-1775.
- [38] CARNEY R M, FREEDLAND K E, SHELINE Y I, et al. Depression and coronary heart disease: a review for cardiologists[J]. Clin Cardiol, 1997, 20(3): 196-200.
- [39] CARNEY R M, FREEDLAND K E. Depression and coronary heart disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(3): 145-155.

(收稿日期:2019-09-06 编辑:王笑辉)