

乌拉尔甘草组培再生体系的研究

葛淑俊¹, 李广敏¹, 马峙英¹, 王文全², 武晓阳¹, 袁静娅¹, 孟义江^{1*}

(1. 河北省作物种质资源重点实验室 河北农业大学, 河北 保定 071001; 2. 北京中医药大学, 北京 100102)

摘要:甘草是兼具生态和经济双重价值的重要植物资源, 人工培育以野生变家种为主, 尚未开展系统的育种工作。本研究以内蒙古杭锦旗的野生乌拉尔甘草为材料, 研究了外植体、基本培养基、NAA、TDZ 和蔗糖对丛生芽诱导的影响以及微繁体系的建立。结果表明, 适合甘草丛生芽诱导的外植体为生长 4~7 d 的无菌苗子叶节, 培养基为 MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20~30 g/L; 将带 1 叶的茎段在改良 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0~2.0 mg/L 的培养基中培养, 其增殖倍数可稳定达到 25 倍; 在 1/2MS+核黄素 2.0 mg/L 中生根, 炼苗 3 d 移栽到蛭石中, 成活率达 96% 以上。1 个带腋芽茎段培养 3 个月可获得 13 906 棵生根试管苗, 成活 13 350 株, 繁殖效率高达 85%。

关键词:乌拉尔甘草; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S567.7⁺1; Q945.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2007)06-0107-06

甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)为豆科甘草属多年生草本植物, 是荒漠半荒漠地区重要的防风固沙植物, 同时又是接近濒危的大宗道地药材, 此外, 还广泛用于食品、饮料、卷烟业和化妆品工业, 具备生态和经济的双重价值^[1,2]。随着世界范围内对甘草需求量的迅速增加, 20 世纪 60 年代末—80 年代初, 我国野生甘草遭到了无计划的毁灭性采挖, 造成野生资源日趋枯竭, 甘草质量和数量迅速下降, 甚至面临灭绝的危险^[1]。人工种植甘草种子完全来自野生, 其基因型的高度不一致使得栽培质量有很大差别, 国内外目前还没有开展系统的育种工作, 由于甘草在自然栽培条件下 4~5 年才有种子形成^[4], 利用天然地下根茎无性繁殖, 繁殖系数较低, 限制了育种工作的开展。目前, 国内外对甘草的组培再生体系研究较少, 于林清等^[5]利用带 2 叶茎段进行繁殖, 6 个月后由 1 株材料繁殖移栽成活株数为 98 株; 苟克俭和任茜^[6]研究表明由 1 棵植株经过 3 个月繁殖数量最高可以达到 216 株, 繁殖系数均不高。本研究以甘草无菌苗的各个部位为外植体, 通过调整培养基成分诱导丛生芽的形成, 建立适宜的植株再生体系, 为甘草种质资源保存和生产利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

乌拉尔甘草种子来自内蒙古杭锦旗西北沟甘草基地, 2002 年采收。

1.2 研究方法

1.2.1 无菌苗的培养 将甘草种子用 98% 浓硫酸处理 60~70 min, 打破硬实, 自来水充分冲洗干净后用 0.1% 升汞消毒 8~10 min, 无菌水冲洗 3 或 4 次, 浸泡过夜, 次日接种到不含植物激素的 MS 固体培养基上, pH 值为 5.80, 在 25℃ 黑暗下培养。

1.2.2 丛生芽的诱导 采用正交设计法 $L_{16}(4^5)$, 5 个因素 4 种水平(表 1, 2), 重复 3 次。接种时将子叶基部划出伤口, 下胚轴剪成 3~5 mm 切段, 子叶节直接接种, 每个处理 10 瓶, 每瓶 5 或 6 个外植体, 记录不定芽形成时间、长度以及诱导率。

1.2.3 芽的增殖及培养基成分对增殖率的影响 将长度超过 1 cm 的丛生芽剪成带 1 叶的茎段, 接种到增殖培养基中, 每处理 10 瓶, 每瓶接种 4 或 5 个外植体, 2 个世代后调查每个外植体形成的次生芽数、芽高超过 1 cm 的次生芽数、每个外植体的节段数、生长的整齐度和增殖倍数(由 1 瓶试管苗培养 1 个月后能接种的瓶数, 连续 2 代

收稿日期: 2006-09-20

基金项目: 河北省自然科学基金委(c2004000318)和河北省教育厅(2004438)资助。

作者简介: 葛淑俊(1970-), 女, 河北滦县人, 副教授, 博士。E-mail: augheshj@yahoo.com.cn

* 通讯作者。E-mail: meyejang@163.com

表 1 丛生芽诱导的因素水平表

Table 1 Factor and level for fasciculated buds inducement

水平 Level	外植体 Explant	基本培养基 CM	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	蔗糖 Sugar (g/L)
1	子叶节 Cot-node (7 d)	MS	0.01	0.1	20
2	子叶节 Cot-node (4 d)	B5	0.10	0.5	30
3	下胚轴 Hy (7 d)	H	0.50	1.0	50
4	子叶 Cot (7 d)	White	1.00	2.0	80

Cot-node; Cotyledonary node; Hy; Hypocotyls; Cot; Cotyledon; CM; Culture media; TDZ; 噻重氮苯基脲 Thidiazuron, N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea; NAA; 萘乙酸 Naphthalene acetic acid; 下同 The same below.

表 2 甘草丛生芽诱导的正交设计处理 $[L_{16}(4^5)]$ Table 2 Fasciculated buds induced orthogonal design treatment of *G. uralensis* $[L_{16}(4^5)]$

试验号 Experiment No.	基本培养基 CM	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	蔗糖 Sugar (g/L)	外植体 Explant
1	MS	0.01	0.1	20	子叶节 Cot-node (7 d)
2	MS	0.10	0.5	30	子叶节 Cot-node (4 d)
3	MS	0.50	1.0	50	下胚轴 Hy (7 d)
4	MS	1.00	2.0	80	子叶 Cot (7 d)
5	B5	0.01	0.5	50	子叶 Cot (7 d)
6	B5	0.10	0.1	80	下胚轴 Hy (7 d)
7	B5	0.50	2.0	20	子叶节 Cot-node (4 d)
8	B5	1.00	1.0	30	子叶节 Cot-node (7 d)
9	H	0.01	1.0	80	子叶节 Cot-node (4 d)
10	H	0.10	2.0	50	子叶节 Cot-node (7 d)
11	H	0.50	0.1	30	子叶节 Cot-node (7 d)
12	H	1.00	0.5	20	下胚轴 Hy (7 d)
13	White	0.01	2.0	30	下胚轴 Hy (7 d)
14	White	0.10	1.0	20	子叶 Cot (7 d)
15	White	0.50	0.5	80	子叶节 Cot-node (7 d)
16	White	1.00	0.1	50	子叶节 Cot-node (4 d)

稳定达到的数值)。

1.2.4 无机盐浓度和活性炭对试管苗增殖的影响 对 MS 培养基进行 3 种改良,将 NH_4^+ 的浓度增加 1/3, NO_3^- 的浓度减少 1/3;大量元素浓度降低 1/2;加入 0.05% 活性炭。将长度超过 1 cm 的丛生芽剪成带 1 叶的茎段,接种到改良后的增殖培养基中,试验处理和调查项目同 1.2.3。

1.2.5 试管苗生根和移栽 将生长健壮、长度在 1 cm 以上的试管苗剪成带 1 叶的茎段,接种到生根培养基中诱导生根。当根长达 2 cm 时,将试管苗移至室内有自然散射光的地方,打开瓶口炼苗 3~5 d,取出生根小植株,轻轻洗掉根基部培养基,移栽到温室营养钵中,基质为灭菌蛭石。栽后喷施 1/800 多菌灵,在 20℃ 下覆盖塑料薄膜保湿 3 d。记录生长情况,成活苗的标准为有新叶长出。

1.2.6 培养条件 温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 3 000 lx,每天光照 14 h。

2 结果

2.1 甘草丛生芽诱导的情况

不同因素和水平对甘草丛生芽诱导的结果见表 3 和 4。不同外植体产生丛生芽能力不同,7 和 4 d 的子叶节在不同培养基中均能产生新芽,诱导率较高;多重比较的结果表明,以 7 d 子叶节诱导的平均芽数最高(1.474

个),与其他 3 种外植体的平均芽数均达到了极显著差异,在 MS+TDZ 0.01 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20 g/L 处理下,长势均匀一致,生长健壮,超过 1 cm 的新芽数量多;下胚轴和子叶成芽数极少,但就下胚轴而言,一旦成芽,单株芽数较多,平均为 5 个新芽;TDZ 和 NAA 的最适浓度均为 0.1 mg/L;丛生芽的形成需要的渗透压较低,蔗糖用量在 20~30 g/L 比较适宜,过高的渗透压抑制外植体生长,不利于外植体丛生芽的形成。

表 3 甘草丛生芽的基本情况
Table 3 General state of fasciculated buds

试验号 Experiment No.	成芽率 Bud rate (%)	平均芽数 Average bud	>1 cm 芽 Buds>1 cm	芽长势 Buds character
1	100	2.40	79	芽均匀一致,最高 6 cm,平均高度 4.5 cm,4 节段,叶色绿,生长健壮 All buds are green and robust, the highest bud 6 cm, average height 4.5 cm, 4 segments
2	88.6	2.00	51	高矮差别大,芽长最高 5 cm,平均 3.8 cm,6 节段,生长健壮 Buds grow robust but disordered, the highest bud 5 cm, average height 3.8 cm, 6 segments
3	0	0.10	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds
4	0	0	0	
5	0	0.05	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds
6	0	0	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds
7	85.1	1.01	26	新生芽矮化,最高 3 cm,平均 1.5 cm,4 节段,节间短,有玻璃化苗 New buds are dwarf and lightly vitrified, the highest bud 3 cm, average height 1.5 cm, 4 segments
8	90.2	1.48	46	芽均匀一致,最高 4 cm,平均 2.8 cm,4 节段,生长良好 Buds grow regularly and robust, the highest bud 4 cm, average height 2.8 cm, 4 segments
9	75.1	1.00	0	芽矮化,平均高度<1 cm,生长势弱 Buds dwarf and weak, average height less than 1 cm
10	100	1.48	37	芽高均匀,平均高度 2 cm,长势差,生命力弱 Buds grow regularly but weakly with average height 2 cm
11	5.9	0.07	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds
12	1.8	0.04	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds
13	0	0	0	
14	0	0	0	
15	22.1	0.46	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds
16	6.9	0.16	0	芽数量少,生长势弱 Few weak buds

表 4 不同因素水平多重比较结果
Table 4 Multiple comparisons result of different factors and levels

培养基 CM	平均芽数 Average bud	TDZ (mg/L)	平均芽数 Average bud	NAA (mg/L)	平均芽数 Average bud	蔗糖 (g/L)	平均芽数 Average bud	外植体 Explant	平均芽数 Average bud
MS	1.133 A	0.10	0.863 A	0.1	0.672 A	30	0.879 A	子叶节 Cot-node (7 d)	1.474 A
B5	0.634 B	0.01	0.814 B	0.5	0.628 B	20	0.877 A	子叶节 Cot-node (4 d)	0.970 B
H	0.585 C	1.00	0.418 C	2.0	0.624 B	50	0.446 B	下胚轴 Hy	0.003 C
White	0.155 D	0.50	0.412 C	1.0	0.582 C	80	0.304 C	子叶 Cot	0.003 C

注:大写字母不同代表 0.01 水平显著,小写字母不同代表 0.05 水平显著,下同。

Note: Different capital letters in the column represent significant difference at 1% level, different small letters represent significant difference at 5% level. The same below.

综上所述,适宜甘草丛生芽诱导的条件为:以培养 7 d 的无菌苗子叶节为外植体,以 MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20~30 g/L 为培养基,诱导形成的丛生芽数量相对最多,且生长整齐。

利用 $L_9(3^4)$ 正交设计对外植体、TDZ 和 NAA 诱导丛生芽形成的影响再次进行试验(表 5)。方差分析证实了外植体是影响最大的因素,NAA 和 TDZ 的影响也达到了极显著水平,最优组合是 MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L,平均成芽 2.3 个。

2.2 芽的增殖

将试管苗按带 1 叶的茎段分割后,接种到原诱导培养基中进行增殖,发现试管苗矮化,节间短,幼茎细弱,2 个世代都几乎没有新芽形成,表明该培养基不适合增殖。转接到含有 0.1 mg/L NAA 和不同浓度的 6-BA 中,结果表明,转接后试管苗基部首先膨大,3~4 d 开始启动生长并在基部形成一定量的愈伤组织,一般 10 d 左右在基部和叶腋处分化出新芽(表 6)。表明 6-BA 对甘草试管苗的增殖起决定性的作用,当培养基中含有 0.5 mg/L 6-BA 时,没有新芽形成,1.0 mg/L 的 6-BA 有利于上部腋芽的发育,4.0 mg/L 的 6-BA 有利于基部新芽的萌出,而 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,腋芽和基部新芽同时发生,但是所有的处理均表现为试管苗弱,颜色淡黄,叶片小或未展开,幼茎有轻度的玻璃化现象。

为改变试管苗生长较弱的状态,配制了改变无机成分浓度和添加活性炭的培养基,转接后的结果见表 7。 NH_4^+ 的浓度增加 1/3, NO_3^- 的浓度减少 1/3 时,显著增加了新生芽的数量,试管苗生长整齐,幼茎变粗,但整株试管苗仍呈现浅黄色,转移到以 1/2 MS 为基本培养基的生根培养基中后,叶片完全展开,植株为健康的绿色;把培养基中大量元素减少 50%时,新生芽数和节段数也明显增加,但试管苗表现出明显的营养不良,15 d 后出现新生芽和叶片干枯现象,后期幼茎逐渐死亡;加入活性炭的培养基,试管苗为正常的绿色,健康且生长旺盛,叶片全部展开,但没有新芽形成,增殖主要通过节段数的增加来实现。

综上所述,适合甘草试管苗增殖的培养基为改良 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 或改良 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 5 培养基优化处理的多重比较结果

Table 5 Multiple comparisons results of culture media optimizing

TDZ (mg/L)	平均芽数 Average bud	NAA (mg/L)	平均芽数 Average bud	外植体 Explant	平均芽数 Average bud
0.10	1.562 A	0.10	1.638 A	子叶节 Cot-node (7 d)	2.323 A
0.01	1.447 A	0.20	1.290 B	子叶节 Cot-node (4 d)	1.612 B
0.30	1.178 B	0.05	1.258 B	下胚轴 Hy	0.252 C

表 6 不同浓度 6-BA 对试管苗增殖情况的影响

Table 6 Effect of different concentration of 6-BA on micropropagation of plantlets of *G. uralensis*

6-BA (mg/L)	平均芽数 Average bud	试管苗长势 Character
1.0	3.65 a	基部愈伤化,试管苗整齐健壮,茎粗壮、叶小或不展开,淡黄色 Some calli on the bottom, plantlets grow regularly and robust, light yellow leaves are small or unspread
2.0	2.81 ab	基部愈伤化严重,试管苗整齐健壮,茎粗壮、叶小或不展开,淡黄色 Mass calli on the bottom, plantlets grow regularly and robust, light yellow leaves are small or unspread
4.0	1.65 b	基部愈伤化严重,试管苗不整齐,叶小或不展开,淡黄色 Mass calli on the bottom, plantlets grow irregularly, light yellow leaves are small or unspread
6.0	1.06 c	基部愈伤化严重,试管苗淡黄色 Mass calli on the bottom, plantlets are light yellow
0.5	0.86 d	基部愈伤化,试管苗黄绿色,轻度玻璃化,苗弱小,叶小或不展开 Some calli on the bottom, plantlets are weak, light yellow and vitrified leaves are small or unspread

表 7 无机成分和活性炭对甘草试管苗生长情况的影响

Table 7 Effect of organic components and AC on plantlets of *G. uralensis*

处理 Treatment	增殖情况 Propagation				试管苗形态 Character	
	平均芽数 Average bud	平均节段数 Average segment	增殖倍数 Proliferation time	苗高 Height (cm)	叶片 Leaf	其他 Other characters
4/3 NH ₄ ⁺ 2/3 NO ₃ ⁻	4.766 7 A	5.471 4 A	25.970 5 A	4.5	未展开, 淡黄 Unspread and light yellow	基部愈伤化, 苗生长整齐, 偶有玻璃化 Plant- lets grow regularly with a little vitrification and calli on the bottom
1/2 MS	2.373 3 B	3.060 0 B	7.278 7 B	6.8	未展开, 淡黄 Unspread and light yellow	基部无愈伤化, 新生叶片和芽干枯, 后期死亡 New leaves and buds dry to die
活性炭 AC	0 C	5.371 0 A	5.371 0 B	8.1	展开, 绿色 Spread and green	基部正常, 苗细弱, 节间长 Plantlets grow weakly with longer internodes

AC: Activated charcoal.

2.3 试管苗的生根和移栽

将生长粗壮的甘草无根苗, 按带 1 叶的茎段接种到含有核黄素(VB₂) 2.0 mg/L 的 1/2 MS 培养基上诱导生根, 一般 4 d 左右有可见根形成, 诱导率和平均根数较高, 达到 86% 和 3.72 条, 根系为淡黄棕色、细长, 分枝数少, 20 d 后根长平均可达到 5 cm 左右。

当根系生长到 2 cm 左右时, 在自然光下打开瓶口炼苗 3 d, 即可移栽到灭菌蛭石中, 甘草试管苗对环境的适应能力极强, 只表现暂时的生长延缓, 一般 4~5 d 即恢复生长, 成活率可达 96%。

3 讨论

甘草的人工培育研究以野生变家种进行人工种植为主, 但生产中存在很多问题, 如种子硬实严重, 成苗率低, 生长的早期植株弱小, 草害和虫害严重, 在自然栽培条件下, 至少 4 年才能采收种子等, 极大地限制了甘草的大面积推广和育种工作的开展^[4,7,8]。关于甘草育种研究尚处于起步阶段^[9~11], 在种质资源的评价、亲本选配、后代优良株系选择及生物技术在育种中应用尚属空白。尤其组织培养技术应用研究方面比较薄弱, 如分化率极低, 分化仅限于下胚轴外植体, 利用短茎进行繁殖倍数不高等^[5,6]。而植物组织培养作为常规育种的有效辅助技术, 尤其是花药培养、细胞突变体筛选、原生质体培养和细胞融合以及离体快繁和脱毒技术的应用等在大田作物、果树和蔬菜以及药用植物育种中发挥了重要的作用^[12~16]。本试验结果是以生长 4~7 d 的无菌苗子叶节为外植体, 以 MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20~30 g/L 为培养基, 能促进丛生芽的形成, 每个外植体可以形成 1 或 2 个芽; 将带 1 叶的茎段在改良 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0~2.0 mg/L 培养基中培养可增殖 25 倍左右, 增殖数量为 25ⁿ (n 为繁殖的世代数); 在 1/2 MS+核黄素 2.0 mg/L 中生根后炼苗 3 d 移栽到蛭石中, 成活率达 96% 以上, 即由 1 株带腋芽茎段在 3 个月内可增殖为 15 625 株, 成活 13 350 株, 繁殖效率高达 85%, 接种 13.5 个带 1 个腋芽的茎段培养 3 个月可满足 667 m² 土地的用苗量, 可为生产上提供基因型高度一致的种苗, 增殖效率大大提高; 同时, 该技术还可以作为辅助育种的平台, 开展多倍体诱导工作以及诱变育种研究。

参考文献:

- [1] 王照兰, 杜建材, 于林清, 等. 甘草的利用价值、研究现状及存在的问题[J]. 中国草地, 2002, 24(1): 73-76.
- [2] 张继, 姚健, 丁兰, 等. 甘草的利用研究进展[J]. 草原与草坪, 2000, (2): 12-17.
- [3] 谷会岩. 中国甘草资源生态学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 2001.
- [4] 杨发林, 李克昌, 胡崇礼. 甘草种子人工繁育暨配套栽培技术研究初报[J]. 草业科学, 2004, 21(12): 90-94.
- [5] 于林清, 何茂泰, 王照兰. 甘草组织培养快速繁殖技术研究[J]. 中国草地, 1999, (1): 12.
- [6] 苟克俭, 任茜. 六种甘草的试管繁殖研究[J]. 中药材, 1992, 15(2): 8-9.

- [7] 张应昌. 甘草人工栽培技术[J]. 中草药, 1995, 26(6): 314-318.
- [8] 田茂忠, 李凤岭, 孙子亮, 等. 盐碱地甘草栽培技术[J]. 中草药, 1996, 27(3): 175-176.
- [9] 任茜. 甘草雌雄配子体的发生与发育[J]. 中药材, 1993, 16(1): 3-5.
- [10] 张新玲, 李学禹, 魏灵基, 等. 新疆甘草属的种间杂交[J]. 西北植物学报, 1998, 18(1): 132-136.
- [11] 苟克俭, 任茜. 甘草的辐射育种研究初报[J]. 云南植物研究, 1993, 15(2): 214-216.
- [12] 杜学梅, 李登科. 落叶果树生物技术育种研究进展[J]. 果树学报, 2002, 19(5): 286-291.
- [13] 刘鸿艳, 郑成木. 花药培养育种研究进展[J]. 热带农业科学, 2001, (1): 61-64, 74.
- [14] 张红晓, 经剑颖, 张贯臣. 组织培养技术在植物育种中的应用[J]. 洛阳大学学报, 2003, 18(4): 43-45.
- [15] 刘青芳, 步怀宇, 赵宇玮, 等. 紫花苜蓿离体培养植株再生及其 RAPD 分析[J]. 草业学报, 2006, 15(5): 115-121.
- [16] 姜淑慧, 管荣展, 董海滨, 等. 播娘蒿愈伤组织原生质体培养体系的研究[J]. 草业学报, 2006, 15(4): 94-98.

Establishment of micropropagation system of *Glycyrrhiza uralensis*

GE Shu-jun¹, LI Guang-min¹, MA Zhi-ying¹, WANG Wen-quan²,
WU Xiao-yang¹, YUAN Jing-ya¹, MENG Yi-jiang¹

(1. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Beijing University of Chinese
Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: *Glycyrrhiza uralensis* is one of the most important and widely used Chinese traditional medicinal plants. The domestication of wild plants is still the main procedure as no systematic breeding programs have been carried out. This study examined the effects of explants, culture media, NAA, TDZ and sugar on induction of fasciculate buds and on the establishment of a micropropagation system of wild licorice from Hangjinqi, Inner Mongolia. Suitable explants for micropropagation were the cotyledonary nodes from 4 to 7 day old germ-free plants and the initial medium was MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+sugar 20–30 g/L. When the segment with one leaf was inoculated on the improved MS+6-BA 1.0–2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, the newly formed buds grew regularly and the proliferation efficiency was as high as 25 times. After 1–2 cm adventitious roots were produced on 1/2MS+VB₂ 1.0–2.0 mg/L with a rooting percentage of 86%, the plantlets were transplanted to sterile vermiculite directly without any excision and were sprayed with 1/800 Carbendazim CIPAC. The survival rate was about 96%. Thus from only one segment, 13 906 plantlets with roots were formed in 3 months of which 13 350 plants survived. The proliferation efficiency was higher than 85%.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; regeneration *in vitro*; micropropagation