

甘草组培快繁技术优化的研究

曹君迈 陈彦云 任贤 刘建利

摘要 以野生乌拉尔甘草根茎芽为外植体,对乌拉尔甘草根茎芽的组培快繁程序的优化问题进行了研究,试验结果表明:乌拉尔甘草无需生根培养,便可移栽。无菌苗繁育周期为 60d,炼苗成活率达 90% 以上。

关键词 甘草;快繁程序;技术优化

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 是豆科多年生草本植物,以根和根状茎入药,有十方九草之称,具有清热解毒、润肺止咳、消炎、免疫、抗多种肿瘤如:子宫内膜癌^[1]、前列腺癌和肝癌^[2,3] 以及抗 HIV^[4] 作用等,因此,具有很高的药用价值。另外,还具有防风固沙等生态价值。

甘草广泛分布于北纬 40 度左右的干旱温带半荒漠地区,中亚及地中海沿岸为其分布中心,共 21 种,我国约有 10~16 种,主要分布在西北等地区^[5]。乌拉尔甘草、胀果甘草、光果甘草均被我国《药典》收录,而以乌拉尔甘草质量最优,主产于宁夏等地区^[6],其药用成分主要是甘草酸、甘草黄酮等。宁夏是我国甘草资源重点分布区和主产区之一,近年来,由于滥采滥挖给该区产地的生态环境造成了严重破坏。为了保护生态环境,国家大力提倡人工种植甘草,但由于其种子种皮坚硬,发芽率低,并且多种在沙漠化程度较高的土壤中,造成出苗率低,严重地限制了甘草生产的发展。虽然对甘草组织培养快速繁殖技术已有报道,但分化率低仅在 3%~6%^[7-9]。为此,我们利用组织培养手段,直接从野生甘草营养器官上进行选材,以根茎芽为外植体,解决了快繁过程中愈伤组织分化低的问题^[10],并对甘草快繁程序进行了优化研究,与传统组培繁育程序相比,省去了生根培养阶段,无菌苗繁育周期为

60d。直接移栽炼苗后,成活率达 90% 以上。与文献报道的相比,繁殖系数提高 32 倍、移栽成活率提高 40%^[7],从而为快繁和良种繁育提供了快捷有效的方法,为生产实际应用提供了技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自宁夏银川西夏区文昌北路郊外荒地自然生长的乌拉尔甘草 (*G. uralensis* Fisch.)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选取和愈伤组织诱导

将甘草的根用自来水冲洗干净,取其带芽点的根茎作为接种材料,用洗洁精漂洗一遍,再用自来水冲洗半小时,然后将其带入接种室,用镊子夹入盛有 75% 酒精的三角瓶中,杀菌 15s 后立刻倒出酒精,用灭菌水冲洗三遍,再加入 0.1% 的升汞消毒 5min,用无菌水再冲洗 3~5 遍,放在头孢他定的抗生素溶液中浸泡 20min,取出放到消过毒的滤纸上吸干水分,将消毒后的材料切成 0.5cm 大小的外植体,接种到带有头孢他定抗生素的 MS + BA 2mg/L + 2,4 D 0.5mg/L 愈伤组织诱导培养基上。

1.2.2 芽的诱导、增殖、壮苗及炼苗

将诱导出的愈伤组织转接于 4 种分化培养基上,即:①MS + BA 4mg/L + KT 1mg/L;②MS + BA 2mg/L + NAA 1mg/L;③MS + BA 0.7mg/L + NAA 0.05mg/L;④MS + BA 3mg/L + KT 1mg/L。分化出的丛生苗 1cm 高时切下,转接于 4 种增殖培养基上,即:①MS + BA 2mg/L + NAA 1mg/L;②MS + BA 0.7mg/L + NAA 0.05mg/L;③MS + BA 3mg/L + KT 1mg/L;④MS + BA 1.8mg/L + KT 0.2mg/L。苗长至 2cm 高时转入 MS 壮苗培养基培养 7d,就可进行移栽炼苗。愈伤组织诱导、分化、增殖、壮苗培养基均加蔗糖 30g/L, pH = 6.0, 琼脂 6.5g/L。

1.2.3 培养条件

培养温度为 22℃,光照 2000Lux。

曹君迈,副教授,西北第二民族学院,750021,宁夏银川

陈彦云,宁夏大学,750021,宁夏银川

任贤,刘建利,通讯地址同第 1 作者

收稿日期:2006-08-14

2 结果与分析

2.1 不同外源激素对甘草愈伤组织分化效果的影响

将甘草根茎芽接种在 MS + BA 2mg/L + 2.4D 0.5mg/L 愈伤组织诱导培养基上,培养 23d 时形成愈伤组织,并将其转接在 4 种分化培养基上,每瓶接 1cm² 大小的 3 块愈伤组织,于 30d 时对其分化效果进行统计,结果见表 1。

表 1 不同外源激素对甘草愈伤组织分化效果的影响

处理	接愈伤 (块)	诱导出苗 (棵)	分化率 (%)	形成绿芽数 (个)	增殖 系数	经历 (d)
1	60	0	0	0	0	0
2	60	60	100	1800	30	30
3	60	32	53.3	846	26.4	30
4	60	0	0	0	0	0

由表 1 看出,2 号处理愈伤组织分化率最高达 100%;3 号处理为 53.3%;其余两种均无分化,以上结果与曹君迈^[10]研究结果相同,说明甘草分化绿芽具有可重复操作性。在 2 号培养基中:一块愈伤组织经 30d 培养,分化出绿苗 30 棵以上,均优于 3 号培养基。由此说明,在培养基组成成分中激素 BA 与 KT 组合对绿苗分化无作用、与 NAA 组合对绿苗分化作用明显,其中 BA 在 0.7 ~ 2mg/L、NAA 在 0.05 ~ 1mg/L 范围内效果最好。2 号分化培养基是甘草愈伤组织分化的理想培养基,其增殖系数高达 30 倍。

2.2 不同外源激素对甘草芽增殖效果的影响

将分化出 1cm 高的绿苗转接于 4 种增殖培养基上,每瓶接 6 棵,共接 20 瓶,30d 时对未感染的瓶苗的增殖效果进行统计,结果见表 2。

表 2 不同外源激素对甘草芽增殖效果的影响

处理	接种数 (棵)	形成苗数 (棵)	增殖 系数	平均苗高 (cm)	经历 (d)
1	108	445	4.12	2.5	30
2	114	452	3.96	2	30
3	108	624	5.78	1.5	30
4	108	596	5.52	2	30

从表 2 看出:处理 3 与处理 4 芽苗增殖系数在 5 倍以上,而处理 1 与处理 2 芽苗增殖系数在 4 倍左右,说明:3、4 号处理激素组合优于 1、2 号处理,从而也说明 BA 与 KT 搭配,比与 NAA 搭配有利于芽增殖。激素浓度 BA 在 1.8 ~ 3mg/L、KT 在 0.2 ~

1mg/L 变化范围内,有利于芽增殖。

2.3 壮苗及炼苗

将高 2cm 左右的苗接种在 MS 壮苗培养基上培养 7d 后,送入温室准备炼苗。炼苗前用甲基托布津或多菌灵粉剂加硫酸链霉素,浓度为 0.3%,喷透基质,然后将附着在无菌苗上的琼脂洗净,移栽于温室內铺有草炭 + 珍珠岩 = 1:1 的基质塑料弓棚里进行移栽炼苗。炼苗第一周注意湿度保证在 80% 以上,以后逐渐降低湿度,温度在 20 ~ 30℃,一个月后揭掉弓棚,炼苗成活率达到 90% 以上,两个月小苗长到 4 片叶、苗高 10cm 时进行定植。经过组织培养的苗,在苗床上生长健壮、叶片肥大。

3 讨论

目前报道的文献,均是以甘草种子发芽后,取子叶、胚轴、胚根为外植体诱导愈伤组织,愈伤组织诱导率高,但其诱导绿苗分化率仅为 3% ~ 6%^[7-9]。在本试验中,以芽为外植体形成的愈伤组织再分化绿苗的能力很强,其诱导分化率高达 100%。其原因是,不同的外植体可能表达的组织特异性基因不同,导致分化结果不同。

在快繁中,由于植物种类的不同,生长习性不同,有可能使繁育程序简化。据于林清研究报道:利用无根茎段组培快繁,其中生根培养需要 15 ~ 20d,经 6 个月培养可繁 100 ~ 120 棵幼苗,移栽成活率为 50% 左右^[7];而在本试验中发现,乌拉尔甘草无需生根,直接栽于苗床上就可进行炼苗。利用根茎芽诱导愈伤组织需 23d;一块 1cm² 大小的愈伤组织,在适宜的分化培养基 MS + BA 2mg/L + NAA 1mg/L 上培养 30d 时,可分化出 30 个芽苗;每个 1cm 高的芽苗接种在适宜的增殖培养基上,培养 30d 时繁殖系数可达 4 ~ 5 倍,这样按增殖系数为 4、培养时间为 6 个月计算,一块愈伤组织最终可形成无根苗 3 840 株,比于林清试验中繁殖系数提高 32 倍、移栽成活率提高 40%。可能由于试验品种取材部位及年龄不同,其结果产生较大差异。

4 结论

在试验中发现,乌拉尔甘草无需生根,直接栽于苗床上就可进行炼苗,其繁育程序为:选材→外植体(根茎芽)→诱导愈伤组织→诱导分化、增殖及壮苗→移栽炼苗。从根茎芽诱导愈伤组织到完成无根苗的生产需要 60d,即愈伤组织形成 23d,芽分化 30d,

控释磷酸二铵中磷素对大豆生长效应的影响*

孔东星 张民 孙娅婷 孙强生

摘要 采用包膜控释磷酸二铵及相应的普通磷酸二铵进行大豆盆栽试验,研究在低磷(P_2O_5 1.2g/盆)和高磷(P_2O_5 3.6g/盆)两种磷素水平下,磷素控释对大豆磷素积累、生长情况和产量的影响。研究结果表明:控释肥高量处理 CRDA2 的大豆叶绿素含量、叶片数和茎粗均比同水平普通肥料和对照有明显的优势。控释肥低量处理 CRDA1 相对于同施肥水平普通肥料处理 CDA1 和对照的增产效果不显著;CRDA2 的大豆结荚数、粒数和产量均显著高于普通肥料处理和对照,比对照增产 30.45%,比普通肥料高量处理 CDA2 增产 13.15%。

关键词 控释磷酸二铵;大豆;磷素

磷是作物必需的大量营养元素之一,具有重要的生理作用。作物缺磷,生长缓慢,植株矮小,开花结实少,空瘪粒多,根毛粗大而发育不良。土壤中的磷来源于成土矿物、有机质和施用的含磷肥料^[1]。土壤中的磷移动慢且范围很小,一般不超过 2mm^[2]。在土壤中很容易被化学固定,使其有效性下降。施入的磷肥除被当季作物吸收利用外,大部

分被土壤吸附固定而使得磷肥的当季利用率很低,一般磷素当季利用率仅为 10%~25%^[3,4]。因此,提高磷肥利用率是解决磷肥合理施用的关键。我国有 74% 的耕地土壤缺磷,在相当多的农田土壤中有有效磷供应不足,是农作物获得进一步增产的主要限制因子,即使在一些有效磷含量较高的地块,磷肥施用仍然必不可少,一旦减少磷肥用量就会严重影响作物的产量^[5]。不断往土壤中大量施磷,磷素在土壤中大量积累,这样,一方面表现为土壤缺磷,另一方面却使土壤磷素大量积累,这一现象在北方石灰性土壤上更加突出^[6]。磷肥的低利用率不仅造成了磷肥资源的浪费,并随地表径流由陆地生态系统向水体生态系统迁移,加速了水体的富营养化^[7]。我国磷矿资源比较短缺,提高磷肥的利用率在农业现代化生产中具有非常重要的现实意义。

控释肥(CRF)是指以某种调控机制或措施,预先设定肥料在作物生长季节的释放模式,使其养分释放规律与作物养分吸收同步,从而达到提高肥效目的的一类肥料^[8]。控释肥中氮的研究较多,并已取得了较大的进展^[9],而控释磷肥的研究相对较少。本试验采用高分子聚合物包膜控释磷酸二铵(CRDA)及相应的普通磷酸二铵(CDA)进行大豆盆栽试验。研究在低、高两种磷素水平、不同供磷模式下对大豆生长及产量的不同效应。

孔东星,在读硕士,山东农业大学资源与环境学院,271018,泰安

张民(通讯作者),张娅婷,孙强生,通讯地址同第1作者

*基金项目:国家农业部科技跨越计划项目(2001,跨-8)、农业科技成果转化项目(农计发[2004]32号)资助

收稿日期:2006-07-21

壮苗培养 7d,再经 60d 移栽炼苗培养,其成活率达 90% 以上。

参考文献

- 1 丹羽宪司. 甘草提取剂对小鼠子宫内腺癌的抑制作用. 日本东洋医学杂志,1994,47(6):182
- 2 Kanazawa M, Satomi Y, Mizutani Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. Eur Urol,2003,43(5):580~586
- 3 吴晓慧,王顺祥,周少英. 甘草酸苷对人肝癌细胞增殖及凋亡的影响. 中华实用中西医杂志,2005,2(18):267~269
- 4 Lai C F, Chen J J, Wang Y F, et al. Advance in studies of flavonoids against HIV. J Shantou Univ Med Coll,1994,(2):83~87

- 5 杨平等. 宁夏甘草资源现状和保护利用研究. 宁夏农学院学报,2004,25(1)
- 6 郭巧生. 药用植物栽培学. 第一版. 北京:高等教育出版社,2004,239
- 7 于林清,何茂泰,王照兰. 甘草组织培养快速繁殖技术的研究. 中国草地,1999,1:12~14,18
- 8 霍云谦,葛淑俊,孟义江等. 中国甘草的组织培养的研究进展. 农业生物技术科学,2005,121(9):64~66,78.(5)
- 9 付玉杰,祖元刚, Gunter Schwarz 等. 甘草组织培养进展. ITCM. May2001,18(3):22
- 10 曹君迈,陈彦云,任贤. 甘草愈伤组织再分化的研究. 作物杂志,2006,(3):24~26