

甘草组织培养的研究进展

杨 瑞, 王礼强, 刘 颖*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘 要: 甘草为我国常用的大宗药材之一, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛和调和诸药等作用, 素有“国老”、“十方九草”之誉, 国内外用量很大。由于过度采挖, 甘草野生资源遭到了严重破坏, 而大部分栽培甘草存在品质退化和甘草酸量低等问题。为了很好地解决甘草资源可持续发展这一问题, 很多研究者开展了甘草组织培养的研究。对甘草组织培养中外植体来源及预处理、愈伤组织诱导、再生植株诱导、快速繁殖研究、毛状根诱导以及组织培养物中活性成分6个方面结合实际工作进行了归纳与综述, 以期部分解决甘草的资源替代问题以及以组织培养为基础的基因与代谢工程研究提供理论及技术指导。

关键词: 甘草; 组织培养; 愈伤组织; 毛状根; 快速繁殖; 甘草酸; 甘草总黄酮

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)12-1796-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.028

Research progress on tissue culture of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

YANG Rui, WANG Li-qiang, LIU Ying

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; tissue culture; callus; hairy roots; intermediate propagation; glycyrrhizin; glycyrrhiza flavonoids

甘草是豆科 (Leguminosae) 甘草属 *Glycyrrhiza* Linn. 植物, 分布于我国甘肃、河北、黑龙江、辽宁、内蒙、宁夏、青海、陕西、山东、新疆省区, 还分布于阿富汗、哈萨克斯坦、吉尔吉斯斯坦、俄罗斯、塔吉克斯坦等国家^[1]。《中国药典》2010年版规定甘草有3个来源, 即乌拉尔甘草 *G. uralensis* Fisch.、光果甘草 *G. glabra* Linn. 及胀果甘草 *G. inflata* Batalin.^[2] 甘草是最常用的大宗药材之一, 以根及根茎入药, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛和调和诸药等作用^[3], 素有“国老”、“十方九草”之誉。除药用价值外, 甘草还可以作为食品矫味剂及烟草添加剂等原料。

商品甘草过去主要来源于野生资源, 由于过度采挖, 甘草野生资源遭到了严重破坏, 国务院已明令禁止采挖野生甘草 (国发 [2000] 13号), 目前栽培甘草已经是主流商品。但是, 栽培甘草质量差异较大, 大部分栽培甘草存在品质退化和甘草酸量低

等问题, 达不到《中国药典》和《日本药典》规定的甘草酸量不低于2.0%和2.5%的合格标准^[4-5], 既影响甘草临床疗效, 也制约栽培甘草的出口。

人们试图通过多种手段来解决上述甘草资源可持续发展这一“瓶颈”问题。由于甘草在栽培条件下4~5年才能收获种子, 而利用地下根茎进行营养繁殖的繁殖系数较低, 这些都限制了甘草系统育种工作的开展。而药用植物组织培养技术作为中药生物工程的核心内容之一, 在药用植物的资源保护和可持续发展方面具有重要的作用。早在20世纪八九十年代, 芮和恺等^[6]和于林清等^[7]就开始了甘草组织培养的大量研究, 试图诱导再生植株。经过多年的发展, 甘草的组织培养在离体再生、快速繁殖、次生代谢产物积累、毛状根诱导等多方面取得了一定的成果。本文对甘草的组织培养进行综述, 以期部分解决甘草资源的替代问题以及以组织培养为基础的基因与代谢工程提供有效的途径和理论指导。

收稿日期: 2013-12-06

基金项目: 北京高等学校“青年英才计划”——基于根特异性表达的甘草功能基因 CNVs 与甘草酸合成代谢的相关性研究 (YETP0819); 北京中医药大学自主课题——甘草功能基因 HMGR、SQS、 β -AS 的根特异性表达研究 (522/010060511)

作者简介: 杨 瑞 (1993—), 女, 本科在读。Tel: (010)84738646 E-mail: yruixingzou@sina.com

*通信作者 刘 颖 (1979—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事分子生物学研究。Tel: (010)84738646 E-mail: liuyliwd@vip.sina.com

1 外植体材料来源、预处理及表面灭菌

目前大量文献报道显示在对甘草进行离体培养时,最常用的外植体材料为甘草种子无菌培养后所获得的无菌苗。甘草的种子由于种皮较厚,不易自然萌发,所以培养前通常需进行预处理,以提高其发芽率。种子的预处理方式一般有2种:一种是浓硫酸浸种^[8-10],一种是温汤浸种^[11]。浓硫酸浸种时,多采用98%硫酸浸泡处理60~70 min,自来水充分洗净。温汤浸种时通常采用40℃温水浸泡处理30 min以上。王彦芹等^[11]采用浓硫酸浸种和温汤浸种时差异显著,前者的甘草发芽率可达到85.77%,而后者种子不吸胀,发芽率为零。这一实验结果与本课题组的实验结果有较大的差异。本课题组在对甘草种子进行浸泡处理时,发现浓硫酸浸种与温水浸种的发芽率都较高,没有显著性差异。但浓硫酸浸种时种皮易破损,从而导致种胚的破坏,会造成一定比例的种子损失;而温水浸种时不会造成种皮的破坏,效果反而略好于浓硫酸。同时本课题组对浓硫酸及温水的浸泡时间进行了梯度考察,发现浓硫酸浸泡时间不宜过长,以30~40 min效果最好,这也与前述报道中1 h以上的浸泡时间有明显的差别,而与刘晓丹等^[12]的实验结果较为接近。温水的浸泡时间也以30 min为宜。

在对甘草种子进行表面灭菌时,多采用75%乙醇结合0.1%~1.0%升汞共同灭菌的方法,首先用75%乙醇浸泡处理30~60 s,无菌水冲洗3次,然后用0.1%~1.0%升汞浸泡处理8 min左右,无菌水冲洗5次,基本上可达到无菌的要求。将种子接种到MS基本培养基上,在25℃,黑暗条件下培养1周左右,即可得到甘草无菌苗。

2 愈伤组织诱导

大量文献报道显示,在诱导甘草愈伤组织时,多以无菌苗的子叶、下胚轴或胚根作为外植体材料,以MS培养基作为基本培养基,添加NAA、2,4-D、6-BA等植物生长调节剂,在25℃、黑暗条件下诱导愈伤组织的发生。但不同的研究者对以上具体条件的报道又有所差异。

范小峰等^[13]认为不同的外植体中,以甘草下胚轴愈伤组织诱导率最高,可达到94%;不同的植物激素中2,4-D有助于诱导产生非胚性愈伤组织,而一定浓度的6-BA与NAA配合,可诱导产生胚性愈伤组织。

王彦芹等^[11]在其研究中发现,以甘草无菌苗的

下胚轴为外植体,在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L以及MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L培养基上,3~4周之后就可以产生疯长型愈伤组织,且不易褐变,在培养一段时间之后也不会出现生长停滞现象。

雷呈等^[14]在对胀果甘草进行愈伤组织诱导时发现,适宜的外植体材料为下胚轴,非胚性愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L,而胚性愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L。

刘颖等^[15]以甘草无菌苗的胚根为外植体,考察不同浓度激素组合对愈伤组织诱导和继代培养的影响时发现:以诱导率为指标,NAA对甘草细胞脱分化的影响最为显著;以相对生长速率为指标,6-BA、2,4-D、NAA对甘草细胞生长分裂的影响均较为显著。诱导甘草愈伤组织的最佳激素组合为2,4-D 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.3 mg/L。

此外,柳福智等^[16]对甘草愈伤组织诱导中氮源的影响进行了考察,结果发现以下胚轴作为外植体材料,在MS+6-BA 0.6 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.4 mg/L+NAA 0.6 mg/L诱导培养基上,不同浓度的氮源对下胚轴愈伤组织的诱导和生长有显著的影响,较低和较高浓度的氮源均不利于愈伤组织的生长,较为适宜的最佳氮源浓度为60 mmol/L。

计巧灵^[17]针对耐盐性甘草愈伤组织的诱导进行了研究,以促进在盐碱滩人工栽培甘草技术的发展。结果发现子叶块和胚轴段在MS+6-BA 1.5 mg/L+2,4-D 1.2 mg/L+NaCl 100 mg/L培养基上脱分化效果良好,可获得大量淡黄色、稍透明的愈伤组织。

在甘草愈伤组织诱导方面,多数研究^[11-20]表明以下胚轴作为外植体材料诱导愈伤率最高,其次为子叶。通常以MS培养基作为基本培养基,在所有植物激素中6-BA是必不可少的,而2,4-D则有利于非胚性愈伤组织的诱导及继代培养。通常NAA、6-BA和2,4-D 3种激素配合使用,但也有其他的激素使用类型^[21-22]。

本课题组在实验过程中得出的结论与上述内容略有不同,而与尚福强等^[10]的报道在诱导培养基配方与外植体来源方面较为接近。就3种外植体材料而言,最易愈伤的是胚根,其次为下胚轴,而子叶则不易于愈伤;另外,本课题组发现最佳诱导培养

基配方为 MS+6-BA 0.5 mg/L+2, 4-D 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 利用此培养基可在较短时间内获得大量白黄色疏松的愈伤组织。根据这一实验结果, 推测甘草最重要的次生代谢产物甘草酸主要集中于甘草的根部, 因此如果组织培养的目的是诱导愈伤组织、建立悬浮细胞培养体系, 进而收获其中的次生代谢产物, 那么起始外植体材料应该以胚根为宜; 相反, 考虑到各来源外植体材料在诱导分化培养时的难易程度, 如果组织培养的目的是诱导甘草离体培养再生植株的获得, 那么起始的外植体材料应该以下胚轴为宜。

3 再生植株诱导

从前人研究结果可知, 甘草愈伤组织诱导较为容易, 但其分化成芽则比较困难, 分化率仅在 2.5%~6.0%。而且就外植体来源而言, 通常来源于下胚轴的愈伤组织分化成芽的几率要高于来源于子叶及胚根的愈伤组织。对于诱导分化方面的报道近些年来并不多见。

在对甘草组织培养早期的研究中, 芮和恺等^[6]报道了分化培养基为 ZT 2 mg/L、6-BA 2 mg/L、KT 2 mg/L+ZT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 生根培养基则为 1/2 MS+NAA 0.05 mg/L, 当芽转接到生根培养基上, 约 2 周可以从切口处长出短而粗的白色根系, 从而形成完整植株。但仅限于下胚轴来源的愈伤组织, 其他来源的愈伤组织均不能获得再生植株。

雷呈等^[14]在甘草离体培养的过程中, 利用培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 成功诱导获得由大量浅绿色胚性细胞组成的胚性愈伤组织。但将胚状体放入再生培养基中培养后, 胚状体再生能力丧失, 褐化死亡, 因而未能分化得到再生植株。

计巧灵^[17]将甘草愈伤组织转接到 MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+NaCl 200 mg/L 培养基上, 成功分化出大量的不定芽。适当降低培养温度至 18~22 °C, 提供自然光照, 并适量添加 GA₃ 的情况下有利于壮芽的形成; 最适合生根的培养基是 1/2 MS+IAA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+NaCl 200 mg/L, 生根率可达 66.26%。该实验最终成功获得了具有耐盐性的甘草再生植株。

于林清等^[7]和安利佳等^[23]也分别获得了甘草离体再生植株, 其过程大致相同, 均为愈伤组织致密化、出现颗粒状, 随后出现绿色芽点, 进而分化成无根苗, 诱导生根后获得再生植株; 但其使用的分

化培养基配方差异较大, 前者分化培养基为 MS+6-BA 0.8 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 1.5 mg/L, 后者则采用 1/2B (MS+B5 的最佳组合)+6-BA 0.7 mg/L+NAA 0.2 mg/L。二者在基本培养基类型、激素类型及配比方面均存在差异, 但所使用的生根培养基则大致相同, 均为 1/2 MS 培养基中添加一定量的 NAA。

邹翠霞等^[24]对刺果甘草进行组织培养诱导再生较为成功, 其实验结果显示以 MS+6-BA 0.5 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L 作为诱导培养基、以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 作为分化培养基、以 1/2 MS+IAA 1.0 mg/L 作为生根培养基, 可以获得较为健壮的再生植株。对该再生植株炼苗后, 移栽至以炉灰渣为基质的花盆中, 以室温、湿度 95%遮阴条件下培养 10 d 后即可转入正常的日光温室培养, 成活率可达到 69%。虽然刺果甘草不属于《中国药典》2010 年版甘草的基源, 但其诱导再生植株的成功经验也可以为甘草组织培养提供一定的理论依据及技术指导。

本课题组在实验过程中采用 MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 作为分化培养基, 也成功获得了甘草无根苗, 将无根苗转入 1/2 MS+IAA 0.6 mg/L 生根培养基中, 20~30 d 可长出多条白黄色、较为粗壮的根, 待到根系进一步强健以后, 即可进行移栽, 但也出现了甘草诱导分化困难、分化率低以及试管苗移栽不易成活等问题。这些问题都在一定程度上增加了甘草组织培养的难度。

总体而言, 甘草愈伤组织诱导分化较为困难, 分化培养基以 MS 或 B5 作为基本培养基, 添加 6-BA、ZT、KT 等细胞分裂素, 三者单独使用或配合 NAA 使用。生根培养基则多为 1/2 MS 培养基添加一定量的 NAA 或 IAA。

4 快速繁殖研究

目前报道的甘草快速繁殖的方法多采用以茎尖、腋芽作为外植体诱导丛生芽, 以带叶茎段诱导生根, 从而实现快速繁殖的目的, 具有较高的繁殖系数, 相对简便易行。

葛淑俊等^[9]对乌拉尔甘草进行了丛生芽诱导研究, 并建立了相应的微繁体系。其研究表明适合甘草丛生芽诱导的外植体为生长 4~7 d 的甘草无根苗子叶节部位, 适合诱导丛生芽诱导的培养基为 MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20~30 g/L。将带 1 叶的茎段转接在改良 MS+NAA 0.1

mg/L+6-BA 1.0~2.0 mg/L 培养基上,其增殖倍数可达到25倍,在1/2 MS+核黄素2.0 mg/L 培养基中生根,炼苗3 d后转移到蛭石中,成活率可达96%以上。总体来说,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。

黄玉杰等^[25]分别利用甘草茎尖、腋芽作为外植体进行丛生芽的诱导,结果发现较为适宜的诱导培养基为MS+NAA 1.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,较为适宜的生根培养基为1/2 MS+NAA 0.05 mg/L,生根率可达到80%。

梁玉勇等^[26]研究结果表明适宜甘草分蘖培养的外植体材料是生长4~7 d的无菌苗子叶段,适宜的培养基为MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;在生根培养时,真叶段特别是茎尖的效果最好,适宜的培养基为MS+IBA 3.0 mg/L+KT 0.1 mg/L;移栽时以培养30 d以上,蛭石和河沙为基质的效果较好,成活率可达88%以上。

本课题组对甘草快速繁殖的研究,实验结果与葛淑俊等^[9]的研究较为类似。综上所述,甘草的快速繁殖多采用MS培养基作为基本培养基,通常添加NAA和6-BA 2种植物生长调节剂,但不同研究者在具体的实验中采用的激素配比略有不同。以此方法可获得大量的甘草丛生芽,对其进行生根诱导,特别是在添加IBA和KH₂PO₄的培养基中进行生根诱导^[12],可获得大量的再生植株,具有较高的繁殖系数。

5 毛状根诱导及培养

自Kamada等^[27]在1986年建立了颠茄的毛状根培养体系以来,培养珍贵药用植物的毛状根以收获其次生代谢产物的研究就成为了国内外研究的新热点。毛状根具有生长快、遗传稳定、有效成分高等优点,近些年来取得了较大的成功。目前已在人参、西洋参、丹参、青蒿等100多种药用植物中成功建立了毛状根培养体系,用以收获其次生代谢产物。

我国的张荫麟等^[28]、高京秀^[29]、陈士云等^[30]、黄炼栋等^[31]早在20世纪90年代初就开始对甘草进行毛状根的诱导和培养。采用的菌株多为发根农杆菌ATCC15834,对甘草无菌苗的下胚轴、子叶以及茎段进行诱导,均能成功获得生长良好的甘草毛状根。近些年来,国内外科研工作者也进行了一些甘草毛状根的相关研究,但鲜见报道。Wongwicha等^[32]等用甘草的幼叶和嫩茎诱导了甘草的毛状根,并发现它们可以在1/2 MS培养基中迅速生长。卢虹玉等^[33-34]在成功诱导甘草毛状根的基础上,又继续在

毛状根中对甘草酸代谢途径上的鲨烯合酶基因进行了过表达研究^[35],结果显示过表达鲨烯合酶基因的甘草毛状根中甘草酸的量为空白对照的2.6倍。Zhang等^[36]在甘草毛状根中对甘草黄酮代谢途径上的查耳酮合酶基因进行了过表达研究,结果显示培养3周后,空白对照、转基因毛状根以及用PEG 8000(2%)处理过的转基因毛状根中总黄酮的量分别为0.842%、1.394%、2.838%,从而说明过表达查耳酮合酶基因以及采用PEG 8000同时进行处理可大大提高甘草毛状根中总黄酮的量。Mehrotra等^[37]则研究了光果甘草外植体年龄、类型和生理状态对农杆菌转化能力及生物反应器大规模培养毛状根的影响。

利用发根农杆菌对甘草的子叶、子叶节、叶片、茎段、下胚轴、愈伤组织进行毛状根的诱导,除愈伤组织外,均能获得毛状根,其中以下胚轴和子叶节诱导率高。甘草的毛状根培养大多采用MS基本培养基,其主要的次生代谢产物为黄酮类化合物。

6 甘草组织培养物中有效成分分析

甘草组织培养的另一个重要应用就是利用悬浮细胞、愈伤组织或者毛状根等组织培养物来累积甘草中的重要次生代谢产物,如甘草酸以及甘草总黄酮。为了能够收获到更多的次生代谢产物,国内外研究者开展了诸如高产细胞株的筛选^[38-39]、有效成分的影响因素分析^[40-41]、活性成分的分离纯化及生物反应器的影响^[37-42]等研究。

甘草愈伤组织及毛状根中所含的次生代谢产物主要为黄酮类化合物。王彦芹等^[11]在其研究中发现培养3~4周的胀果甘草愈伤组织中总黄酮的量可以达到1.1%。余茜等^[43]对不同来源的光果甘草愈伤组织中的总黄酮量进行了测定,结果发现来源于节间的愈伤组织中总黄酮的量最高;同时如果在培养基中添加水解乳蛋白500 mg/L,则可极显著地增加来源于各外植体的愈伤组织中总黄酮的量。杨世海等^[44]研究结果发现在愈伤组织的培养过程中添加酵母提取物、水解酪蛋白、真菌诱导子、茉莉酸以及稀土元素等均能显著提高甘草愈伤组织中黄酮类化合物的量。Zhang等^[36]在甘草毛状根中过表达查耳酮合酶基因的实验结果也提示代谢途径中功能基因过表达会对最终的次生代谢产物的量产生重要影响。这些都为组织培养生产甘草黄酮提供了一条可借鉴的途径。杨会琴等^[45]在对不同来源的甘草外植体进行组织培养时,发现其愈伤组织中含有一定量的甘草酸。其中来源于根部的愈伤组织中甘草酸量

最高, 为 70.2 mg/g, 且黑暗条件更有利于甘草酸的合成, 以添加激素组合 2, 4-D 4.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 对来源于根部的愈伤组织进行悬浮培养, 甘草酸的质量分数可达到 81.6 mg/g, 比生药中还要高出 51.08%。梁玉玲等^[46]对胀果甘草愈伤组织中的甘草酸的量进行测定, 发现甘草酸的质量分数随着 2, 4-D 质量浓度的上升而升高, 且在悬浮培养条件下, 离体根培养物中甘草酸的质量分数明显高于其他培养物, 比生药中增加 43.3%。而 Lu 等^[35]的研究结果显示在甘草毛状根中过表达鲨烯合酶基因会提高毛状根中甘草酸的量。这也为组织培养生产甘草酸提供了一条途径。

综上所述, 甘草组织培养物中的主要次生代谢产物为甘草黄酮和甘草酸。在组织培养物如愈伤组织、毛状根中过表达黄酮代谢途径或三萜代谢途径上的关键功能基因则有利于相应的次生代谢产物的积累。本课题组在对甘草酸代谢途径上的功能基因进行相关研究时也发现, 过表达 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因 (3-hydroxy-3methylglutary CoA reductase, HMGR) 以及鲨烯合酶基因 (squalene synthase, SQS) 均会对甘草酸代谢途径下游的代谢产物产生明显的影响。

7 结语与展望

本文对甘草的组织培养进行了归纳和总结。此前, 虽然也有关于甘草组织培养的综合报道^[47-49], 但本文是在结合相关实验工作的基础上对甘草组织培养过程中外植体来源及预处理、愈伤组织诱导、再生植株诱导、快速繁殖、毛状根诱导以及组织培养物中活性成分 6 个方面进行了总结与分析, 融合了本课题组在相应实验过程中的诸多经验及体会。

我国是世界上使用和出口药用植物资源最多的国家, 很多名贵的中药材如野山参、冬虫夏草等, 野生资源都已十分罕见。对于甘草来说, 作为最常用的大宗药材之一, 野生资源不断地被采挖, 严重破坏了生态平衡及其可持续发展。同时甘草的人工培育研究以野生变家种为主, 但在实际生产过程中也存在种子硬实、成苗率低、草害虫害严重等问题, 极大的限制了育种工作的开展。因此, 对其进行组织培养具有特殊的意义。

随着甘草组织培养的发展, 其有望通过悬浮细胞培养或者毛状根培养来直接生产甘草酸及甘草总黄酮等活性化合物; 培养再生植株, 与大田栽培相结合, 快速大量繁殖甘草种苗; 作为一个载体, 进

行甘草的转基因组织和器官培养以及遗传育种研究^[50]; 作为一种手段, 深入研究甘草的次生代谢机制。本课题组也对甘草酸次生代谢途径中的关键功能基因进行了基因克隆、原核表达、真核表达、功能鉴定、过表达、拷贝数测定等诸多研究, 以期揭示关键功能基因对次生代谢产物甘草酸含量的影响^[51-53], 但这些工作都离不开植物组织培养这个基本手段。

目前甘草组织培养过程中仍存在许多问题: 愈伤组织分化培养较为困难, 分化率很低; 愈伤组织在继代培养过程中较易褐化; 愈伤组织及毛状根中主要次生代谢产物为黄酮类化合物, 而不是评价甘草品质的甘草酸; 毛状根培养主要是实验室探索阶段, 难于进行大规模生物反应器培养; 基因工程方面虽取得了一定的进展但遗传转化体系尚不稳定, 转化率低等。但随着甘草组织培养的深入研究, 期待这些问题能得到解决, 为将来其他研究的开展奠定基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 42 卷, 第 2 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 曾路, 李胜华, 楼之岑. 国产甘草的生药形态组织学研究 [J]. 药学学报, 1988, 23(3): 200-208.
- [4] Yamamoto Y, Majima T, Saiki I. Pharmaceutical evaluation of *Glycyrrhiza uralensis* roots cultivated in eastern Nei-Meng-Gu of China [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(8): 1144-1149.
- [5] 赵则海, 杨逢建, 曹建国, 等. 野生与栽培乌拉尔甘草不同部位甘草酸含量分析 [J]. 植物研究, 2005, 25(4): 444-448.
- [6] 芮和恺, 忻晓君, 顾慧芬, 等. 甘草的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1986, 22(4): 54-56.
- [7] 于林清, 何茂泰, 王照兰, 等. 甘草组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 中国草地, 1999(1): 12-14.
- [8] 汪连海, 藺海明, 张汉平, 等. 甘草快速繁殖技术的研究 [J]. 广东农业科学, 2012(17): 26-28.
- [9] 葛淑俊, 李广敏, 马峙英, 等. 乌拉尔甘草组培再生体系的研究 [J]. 草业学报, 2007, 16(6): 107-112.
- [10] 尚福强, 田玲, 郑颖, 等. 乌拉尔甘草不同外植体愈伤组织诱导的初步研究 [J]. 林业实用技术, 2011(4): 38-39.
- [11] 王彦芹, 焦培培, 张莉, 等. 利用组织培养技术提取甘草黄酮 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(6):

- 1111-1117.
- [12] 刘晓丹, 王琪, 赵东昱. 乌拉尔甘草组培快繁技术研究 [J]. 现代农业科技, 2011(15): 109-110.
- [13] 范小峰, 杨颖丽, 郭晓强, 等. 乌拉尔甘草不同外植体愈伤组织的诱导及影响因子研究 [J]. 中药材, 2009, 32(2): 173-176.
- [14] 雷呈, 李斐. 胀果甘草胚性愈伤组织的诱导研究 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(8): 909-911.
- [15] 刘颖, 魏景芳, 李冬杰. 甘草愈伤组织培养中激素优化组合的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 931-933.
- [16] 柳福智, 蔺海明, 李占强, 等. 外植体及氮源对甘草愈伤组织诱导的影响 [J]. 草业科学, 2012, 29(7): 1072-1076.
- [17] 计巧灵. 甘草耐盐性愈伤组织的诱导及植株再生研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 265-267.
- [18] 焦艳红, 宋艳茹, 高述民. 药用甘草组织培养生产黄酮的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 13-18.
- [19] 赵晶, 柳福智, 蔺海明. 不同外植体对甘草愈伤组织诱导的影响 [J]. 广东农业科学, 2011(19): 36-38.
- [20] 胡海英, 吴晓玲, 梁新华. 胀果甘草愈伤组织诱导培养 [J]. 药物生物技术, 2004, 11(3): 170-172.
- [21] 文甜甜, 高文远, 张黎明, 等. 甘草悬浮细胞总黄酮含量的测定方法 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 648-649.
- [22] Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama Y, et al. Production of glycyrrhizin in callus cultures of licorice [J]. *Z Naturforsch*, 2008, 63: 413-417.
- [23] 安利佳, 李凤霞, 张俊敏, 等. 豆科植物组织培养的研究 [J]. 植物学报, 1992, 34(10): 743-745.
- [24] 邹翠霞, 王京刚, 佟少明, 等. 刺果甘草的组织培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(6): 1129-1130.
- [25] 黄玉杰, 王丹, 王旭, 等. 甘草的试管苗快速繁殖 [J]. 北京农学院学报, 2013, 28(2): 5-7.
- [26] 梁玉勇, 李雪娇, 尹双双, 等. 甘草组培苗的培养基优化及其有效成分分析 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40(11): 29-33.
- [27] Kamada H, Okamura N, Satake M, et al. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna* [J]. *Plant Cell Rep*, 1986, 5: 239-242.
- [28] 张荫麟, 周新华, 杨岚, 等. 甘草的发状根培养 [J]. 中草药, 1990, 21(12): 23-26.
- [29] 高京秀. 甘草发根中甘草甜素的生产 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1990, 12(6): 44-46.
- [30] 陈士云, 候高生, 桂耀林. 发根土壤杆菌体外转化甘草子叶及下胚轴 [J]. 武汉植物学研究, 1991, 9(4): 301-303.
- [31] 黄炼栋, 胡之璧. 青蒿等六种药用植物发状根的研究 [J]. 上海中医药杂志, 1995(8): 41-42.
- [32] Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama Y, et al. Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures [J]. *Z Naturforsch*, 2011, 66: 423-428.
- [33] 卢虹玉, 刘敬梅, 张海超, 等. 甘草毛状根诱导培养及其黄酮含量检测的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(11): 814-818.
- [34] 卢虹玉, 刘义, 张海超, 等. 甘草毛状根中甘草总黄酮和甘草酸的检测和分析 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(1): 43-46.
- [35] Lu H Y, Liu J M, Zhang H C, et al. Ri-mediated transformation of *Glycyrrhiza uralensis* with a squalene synthase gene (GuSQS1) for production of glycyrrhizin [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2008, 26: 1-11.
- [36] Zhang H C, Liu J M, Lu H Y, et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 1205-1213.
- [37] Mehrotra S, Kukreja A K, Khanuja S P S, et al. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor [J]. *Electron J Biotechnol*, 2008, 11: 717-728.
- [38] 黄慧英, 马文芳, 陈晓燕, 等. NAA 和 2, 4-D 对甘草愈伤组织细胞染色体倍性及次生代谢物的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2104-2109.
- [39] Arias-Castro C, Scragg A H, Stafford A, et al. Growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* cell suspension cultures [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 34: 77-82.
- [40] Shabani L, Ehsanpour A A, Asghari G, et al. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2009, 56: 621-626.
- [41] Zhang H C, Liu J M, Chen H M, et al. Up-regulation of licochalcone A biosynthesis and secretion by Tween 80 in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 47: 50-56.
- [42] Wang G R, Qi N M, Wang Z M. Application of a stir-tank bioreactor for perfusion culture and continuous harvest of *Glycyrrhiza inflata* suspension cells [J]. *Afr J Biotech*, 2010, 9(3): 347-351.
- [43] 余茜, 马淼, 赵红艳. 光果甘草不同愈伤组织中总黄酮含量的比较 [J]. 种子, 2011, 30(7): 4-7.
- [44] 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 等. 不同附加物对甘草愈伤组织培养中黄酮类化合物形成的影响 [J]. 中国药理学

- 志, 2006, 41(2): 96-99.
- [45] 杨会琴, 李敬, 戴翠萍, 等. 甘草愈伤组织培养及其代谢产物甘草酸的研究 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2006, 30(3): 346-348.
- [46] 梁玉玲, 管延英, 阳丽, 等. 胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2000, 20(4): 365-368.
- [47] 裴雁曦, 郝建平. 甘草的组织培养 [J]. 内蒙古农业科技, 1999(3): 16.
- [48] 付玉杰, 祖元刚, Gunter S, 等. 甘草组织培养研究进展 [J]. 中医药信息, 2001, 18(3): 22.
- [49] 霍云谦, 葛淑俊, 孟义江, 等. 中国甘草的组织培养研究进展 [J]. 农业生物技术科学, 2005, 21(9): 64-66.
- [50] 刘洋洋, 刘春生, 曾斌芳, 等. 甘草种质资源研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3593-3598.
- [51] Liu Y, Xu Q X, Xi P Y, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA coding 3-hydroxy-3-methylglutary CoA reductase involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. 药学学报, 2013, 48(5): 773-779.
- [52] 刘颖, 刘东吉, 刘春生, 等. 基于 HMGR、SQS1、 β -AS 基因 CNVs 的甘草道地性机制研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(2): 250-255.
- [53] 刘颖, 徐巧仙, 王学勇, 等. 甘草 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因多态性对其编码酶催化效率的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3784-3788.