

文章编号: 1000-5471(2007)01-0068-05

西红花球茎组织培养的研究^①

张 洁, 林春来, 王力超, 梁国鲁

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 以球茎切块为外植体, MS 为基本培养基, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 为激素, 在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 黑暗环境下培养, 可以获得 98% 的愈伤组织诱导率. 愈伤转入 $\text{MS} + 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 培养基中, 可诱导丛生芽的产生, 将丛生芽切成单个不定芽后转移到 $\text{MS} + 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基中, 光照条件下可诱导新生小球茎的产生.

关键词: 西红花; 组织培养; 愈伤组织; 丛生芽; 小球茎

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

西红花(*Crocus sativus* L.), 又名番红花、藏红花, 系鸢尾科番红花属球根类多年生草本植物. 在国外, 西红花最初仅是作为染料栽培, 19 世纪以来, 由于其独特的香味, 更被许多国家作为香料, 广泛应用于食品工业、美容化妆品中. 西红花的药用部位为干燥柱头, 有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神等功效. 柱头中的有效成分, 如西红花甙、西红花苦甙、西红花酸和西红花醛具有明显的抗癌作用, 能破坏 DNA 合成酶系, 抑制癌细胞 DNA 和 RNA 的生成^[1], 以及抑制细胞蛋白激酶的活性和原癌基因的表达^[2], 近年来成为新型抗癌药物的研究热点. 由于西红花染色体是三倍体, 花粉败育高, 开花后不能结实, 要靠球茎繁殖, 而在栽培过程中球茎逐渐退化, 球茎一般 8 g 以上才能开花, 球茎越大, 开花越多, 球茎越小, 开花越小甚至不开花, 但小球茎通过种植技术逐年种植可使之变成能开花的大球茎. 据张治国等(1986)统计, 1 g 以下小球茎经 3 年逐年种植才能达到 6 g 重种球茎标准; 1 g 重的小球茎要两年; 3~5 g 重的要 1 年达此标准, 因此, 子代小球茎百分率的提高会致使开花率降低, 从而失去药用价值, 不能满足市场的需求. 如何生产出大的种球茎、降低子代小球茎百分率是生产中提高西红花产量的关键所在. 本实验以西红花球茎为外植体, 从激素浓度的配比使用上探讨诱导愈伤组织、丛生芽及小球茎的发生, 探求一条人工繁殖西红花球茎的途径, 以期提高西红花的繁殖系数, 解决球茎退化, 种源紧缺等问题.

1 材料与方法

1.1 材 料

西红花(*Crocus sativus* L.)球茎来自重庆市药物研究所.

取材时间为 4 月底, 西红花球茎正处于夏眠时期.

1.2 培养条件

以 MS 为基本培养基, pH 5.8, 市售白砂糖 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 卡拉胶 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

① 收稿日期: 2006-10-20

作者简介: 张 洁(1982-), 女, 重庆荣昌人, 硕士研究生, 主要从事细胞学和多倍体育种方面的研究.

通讯作者: 梁国鲁, 研究员, 博士生导师.

愈伤组织及丛生芽在黑暗条件下诱导培养, 新生小球茎在光照条件下诱导, 1 500~2 000 lx, 每天光照 12 h, 温度均为(20±2) °C.

1.3 试验方法

将取回的西红花(0.2~1.0 g)种球置于低温 4 °C 处理 40 d 后, 用 0.5~1.0 mg·L⁻¹ GA 浸泡 10 min, 剥取外层褐色皮膜后, 流水冲洗 40 min, 转入 75% 酒精消毒 1 min 后, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min, 无菌水冲洗 6 次, 彻底洗去残余的 HgCl₂ 后放入无菌环境下待接种.

1.3.1 接种及初代培养

将西红花小球茎切成 8 mm 左右大小, 接种到不同激素浓度配比的 MS 培养基中, 在 20 °C 黑暗条件下诱导球茎愈伤组织.

1.3.2 分化培养

将上述已长出愈伤的切块转入附加不同 6-BA 和 NAA 浓度分化培养基中黑暗条件诱导丛生芽的分化和增殖.

1.3.3 诱导新球茎

经过黑暗条件下继代培养后, 再于 1 500~2 000 lx, 光照时间 10~12 h/d 的条件下, 分割丛生芽, 诱导小球茎的再生.

2 结果分析

2.1 不同培养基对西红花愈伤组织诱导的影响

球茎切块接种在附加不同浓度 6-BA 和 2,4-D 或 NAA 的 MS 培养基上, 由于切口组织损伤, 培养过程中, 切口周围先是逐渐变白变干, 15 d 左右, 切口处表面张裂, 长出少许松散型黄色颗粒状愈伤组织, 继续继代生长一个月后, 部分愈伤组织形成致密的、光滑突起的表面, 略带白色, 有分化的趋势(图 1).

接种一个月后观察, 结果如表 1 所示, 几种不同浓度激素配比都能产生愈伤组织, 说明高浓度的 2,4-D 对诱导愈伤组织有利, 除此之外, 少量的 6-BA 加以协同作用, 促进细胞分裂. NAA 也能诱导愈伤组织, 但效果不如 2,4-D. 在诱导愈伤组织的过程中, 笔者曾采用光照条件诱导愈伤, 但结果发现, 光照条件下常常会出现球茎切块褐化的现象, 有的甚至严重致死. 黑暗条件下培养个别也会出现褐化现象, 但程度较前者轻, 本实验采取缩短继代时间的方式减轻褐化现象, 即一旦发现轻微的褐化, 立即转入新的培养基中培养, 反复多次继代, 结果发现, 褐化程度降低.

表 1 不同激素比对愈伤组织诱导的影响(30 天统计)

Table 1 The Effect of Different Concentration on Crocus Sativus L. Callus inducing(Statistics of 30 Days)

培养基/mg·L ⁻¹	外植体数	愈伤组织生长情况	愈伤组织诱导率/%
MS+6-BA 0+2,4-D 1	20	颗粒状, 黄色, 生长缓慢, 易褐化	80
MS+6-BA 0.1+2,4-D 2	20	颗粒状, 黄褐色, 生长缓慢, 易褐化	95
MS+6-BA 0.2+2,4-D 2	20	颗粒状, 黄色, 生长较快, 少量褐化	95
MS+6-BA 0.5+2,4-D 2	20	颗粒状, 黄色, 生长较快, 不易褐化	98
MS+6-BA 0.5+NAA 0.2	20	小颗粒状, 黄褐色, 生长缓慢, 容易褐化	25

2.2 不同培养基对丛生芽诱导的影响

将已产生愈伤组织的球茎切块转入下列不同激素浓度配比的培养基中诱导丛生芽的增殖, 此时, 球茎切块除在诱导愈伤的培养基中长出致密愈伤组织外, 逐渐在光滑突起的表面分化出白色披针形的叶片, 随后发育出不定芽(图 2), 将产生的不定芽部分切下, 转移到新鲜培养基上进一步继代培养, 又会产生

更多的不定芽. 此时球茎切块芽眼中的芽也会逐渐萌发形成顶芽和侧芽.



图 1 球茎切块生成愈伤组织

Fig. 1 Induction of Callus



图 2 愈伤组织分化的白色丛生芽

Fig. 2 Differentiation of White Tufty Buds

表 2 表明, 丛生芽的诱导和增殖需要较高浓度的细胞分裂素和生长激素, 虽然较高细胞分裂素和较低生长激素配比, 丛生芽的诱导率也较好, 但相对高浓度生长激素来说, 显然效果不如前者. 2, 4-D 与 BA 可能起协同作用, 但由实验结果看出, 其几乎不能与高浓度的 NAA 和 BA 共同作用, 反而会抑制丛生芽的生长.

表 2 不同激素比对丛生芽诱导的影响(40 天统计)

Table 2 Effect of Different Concentration on Induction of Tufty Buds(Statistics of 40 Days)

培养基/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	外植体数/个	外植体平均出芽数	出芽率/%
MS+6-BA0.5+NAA0.2	20	5	25
MS+6-BA 2.0+NAA 0.5	20	10	50
MS+6-BA 4.0+NAA 0.2	20	12	60
MS+6-BA 5.0+NAA 5.0	20	18	90
MS+6-BA 5.0+NAA 5.0 +2, 4-D 1.0	20	0	0

在对球茎愈伤组织的诱导到继代 1~2 次诱导出丛生芽的过程中均是黑暗培养, 对于丛生芽的进一步增殖和分化, 如表 3 所示, 在黑暗条件下丛生芽的增殖率几乎 100%, 而光照条件下, 丛生芽的增殖率大大降低, 由此可见, 光照对于丛生芽的诱导同样起到负面的作用.

表 3 光照对丛生芽增殖的影响

Table 3 Effect of Illumination on Multiplication of Tufty Buds

培养条件	丛生芽数/个	增殖数/个	增殖率/%
光 照	20	4	20
黑 暗	20	17	85

2.3 不同激素浓度对小球茎发生的影响

将已产生不定芽的球茎切块转入分化培养基中, 继代 1~2 次后, 观察到丛生芽逐渐增殖, 生成许多白色丛生芽, 将丛生芽分割成单个不定芽, 转入下列分化培养基中, 于光照条件下培养, 不定芽迅速生长, 芽的叶鞘内逐渐生成绿色的幼叶, 基部开始膨大, 30 d 左右发育为小球茎(图 3-5).



图 3 不定芽分化出绿色幼叶

Fig. 3 Differentiation of Tender Leaves

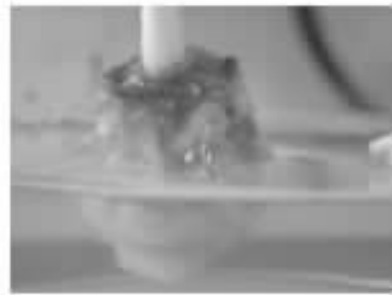


图 4 芽的基部开始膨大

Fig. 4 Bud's Base Starts to Expand



图 5 新生小球茎

Fig. 5 Newborn Small Corm



图 6 球茎的褐化

Fig. 6 Corm Browning

在植物组织培养中不同激素及其组合对植物器官形成有明显影响, 从表 4 可以看出, 培养基于含有 BA 和 NAA 的培养基中小球茎的诱导率可高达 50%, 但在 BA 与 2,4-D, GA 的配比培养基中, 虽能诱导小球茎产生, 但诱导率显然没有与 NAA 协同作用效果好.

表 4 不同激素浓度对小球茎发生的影响

Table 4 Effect of Different Concentration on Induction of New-regenerated Corm

培养基/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	外植体数/个	小球茎产生数/个	小球茎诱导率/%
MS+6-BA 0.5+NAA 0.2	20	3	15
MS+6-BA 4.0+NAA 0.5	20	10	50
MS+6-BA 2.0+2,4-D 1.0	20	2	10
MS+6-BA 2.0+GA 1.0	20	1	5
MS+KT 2.0+2,4-D 1.0	20	6	30

3 讨 论

有关西红花的组织培养中, 曾经也报道过用 B_6 、White 等作为基本培养基, 而培养于常用的 Ms 培养基中, 附加与本实验不同的激素, 也同样诱导了丛生芽及小球茎的产生, 由此可见, 激素类型、配比及含量是能否培养成功的关键.

西红花球茎在 5~7 月正处于夏眠时期, 对外源激素的敏感性极低, 导致愈伤组织的发生时间长, 诱导率低. 本实验通过采用低温处理及赤霉素浸泡之后, 可诱导球茎 α -淀粉酶、蛋白酶和其它水解酶的合成, 催化球茎内贮藏物质的降解, 以供球茎的生长发育所需, 从而提高对外源激素的敏感性, 打破其休眠, 加速对生长物质的吸收.

在西红花的组织培养中,外植体褐变死亡是常见的问题之一,给诱导脱分化和芽再生造成重大障碍.分化能力不强的愈伤组织,在分化过程中会出现褐化现象(图 6).随着愈伤组织形成进程表现出轻重不同的褐化,初期褐化较轻,随着时间增加,残留的愈伤组织也逐渐褐化,褐化物堆积呈黑褐色,严重的造成愈伤组织的部分死亡.褐化会发生在愈伤组织外围,外周组织褐化可能为内部分化提供一种隔离条件,为外源激素和内源激素之间形成一个缓冲协调区,如果褐化严重会造成危害.因此,在组织培养中应尽量避免出现褐化现象,选择适当大小的外植体,适当减少每瓶的接种数目,缩短继代培养的时间,加入适当浓度抗氧化剂(Vc、AC 和 PVP),可以抑制褐化现象的发生.

此外,西红花组培苗的细胞及其超微结构尚未见研究,培养条件下组培苗的细胞结构、细胞核和染色体变化,可通过切片、荧光染色、分带技术来观察,为西红花的品种选育和转基因工程提供保证.

参考文献:

- [1] 赵 军,徐 莺,颜 钊,等.西红花愈伤组织的诱导与花柱愈伤组织的继代、悬浮培养[J].四川大学学报(自然科学版),2001,38(3):421-424.
- [2] 陈书安,王晓东,欧阳杰,等.藏红花球茎愈伤组织快速诱导的研究[J].中药及天然药物,2003,38(4):254-256.
- [3] Ding B Z, Bai S H, Wu Y, et al. Preliminary Report Oil Tissue Culture of Corm of *Crocus Satisus L*[J]. Acta Botdnica Sin&A, 1979, 21(4): 389.
- [4] 关 萍,石建明.番红花球茎组织培养[J].贵州农学院月报,1995,14(4):47-49.
- [5] 刘咏梅,谈 锋,李坤培.番红花的组织培养和植株再生[J].西南师范大学学报(自然科学版),1995,20(2):183-186.
- [6] 何 凯,陈 放.藏红花球茎的快繁研究及其柱头 cDNA 文库的构建[D].成都:四川大学,2003.
- [7] 杨永华,陆 军,马健平.藏红花愈伤组织诱导及其细胞培养的研究[J].生物技术,1996,6(3):15-17.
- [8] S~rlo K, Himeno H. In vitro proliferatuon of saffron(*Crocus sativus L.*) stigma[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 11: 159-166.
- [9] 黄守印.番红花组织培养研究简报[J].植物生理学通讯,1987,6:17-19.

Study on Tissue culture of Saffron Corms

ZHANG Jie, LIN Chun-lai, WANG Li-chao, LIANG Guo-lu

School of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Corms of saffron crocus (*Crocus sativus*) were used as explants and cultured in the dark on MS medium supplemented with 6-BA 0.5 mg/L and 2,4-D 2 mg/L. The callus induction rate was as high as 98%. Tufty buds were obtained when the calli were transferred to an MS medium containing BA 5.0 mg/L and NAA 5.0 mg/L. The tufty buds were then separated into individual adventitious buds and cultured with illumination on a regeneration medium with 6-BA 4.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L, and cormlets were successfully regenerated.

Key words: *Crocus sativus*; tissue culture; callus; tufty bud; cormlet