

番红花组织培养及快速繁殖研究

汪 洋¹, 韩 婷¹, 朱 昱¹, 吴锦忠², 郭 蕾¹, 李 琳¹, 秦路平^{1*}

(1. 第二军医大学药学院 生药教研室, 上海 200433; 2. 福建中医学院中西医结合研究院, 福建 福州 350108)

摘 要:目的 为番红花的快速繁殖提供依据。方法 添加不同种类及不同浓度的激素, 对番红花进行愈伤组织诱导、丛生芽诱导及球茎培养。结果 愈伤组织诱导的适宜培养基为 MS + 2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA; 丛生芽诱导的适宜培养基为 MS + 0.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA; 在光照条件下, 丛生芽可分化出小球茎。结论 利用组织培养技术能够实现番红花快速繁殖。

关键词: 番红花; 愈伤组织; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0807-03

番红花 *Crocus sativus* L. 系鸢尾科(Iridaceae) 番红花属(*Crocus* L.) 多年生草本植物, 入药部位为番红花的干燥柱头。番红花原产南欧各国及伊朗等地, 后经印度传入西藏再传入中国, 引种栽培成功, 故又名藏红花或西红花^[1]。因花丝中含有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神、健胃等药用成分, 使其具有较高的药用价值和经济价值^[2]。然而, 在自然状态下, 番红花不能进行有性生殖, 只能以球茎进行无性繁殖, 且栽培条件下其球茎退化现象严重^[3], 影响中药材西红花的质量和产量。由于番红花只是柱头入药, 产量极低, 远远不能满足人们的需要; 采收耗时费力; 同时种源少, 适宜栽培地区有限、条件苛刻等因素致使其价格昂贵, 在我国被列为珍惜名贵的中药材。近年来组织培养技术在药用植物上得到了广泛的应用, 这为繁殖能力较差的名贵中药药用资源的保存和生产提供了新的途径。因此, 开展番红花组织培养及快速繁殖技术研究, 对改良番红花的种质, 提高西红花药材质量和产量都有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 本实验所用材料由上海华宇药业有限公司番红花 GAP 生产基地提供, 经第二军医大学生药学院秦路平教授鉴定为番红花 *Crocus sativus* L.。实验所需试剂均为分析纯。

1.2 仪器: SA-1600-2JZ 多功能超净操作台(上海稼丰园艺用品有限公司); YXQ-LS-75SLL 立式压力蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 电子天平 FA2004(上海恒平科技有限公司)。

1.3 培养基与培养条件: 采用 MS、B₅、White 基本培养基, 添加 0.6% 琼脂, 3% 蔗糖及不同浓度的植物生长调

节剂, 调节 pH 值至 5.8, 121 °C 高压灭菌 30 min, 备用。所有培养均在以下条件下进行: 温度(20 ± 1) °C, 光照时间 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx。

1.4 方法: 将番红花球茎于自来水中冲洗干净, 除去皮膜, 置于超净工作台上消毒接种。先于 70% 酒精中漂洗 30 s, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 8 min, 最后用无菌水冲洗 4~5 次, 彻底洗去残余的 HgCl₂。将消毒后的球茎切成 1 cm³ 大小, 接种于预先配制好的培养基上, 用于诱导愈伤组织。诱导率 = 愈伤组织数/外植体总数 × 100%。

2 结果

2.1 不同培养基对番红花愈伤组织诱导率的影响: 由表 1 可见, 在 MS、B₅、White 3 种不同培养基添加不同浓度配比的激素均能诱导出愈伤组织, 且诱导率差异显著($P < 0.05$)。在 MS 培养基中其诱导率最高, B₅ 培养基愈伤诱导率次之, White 培养基愈伤诱导率最低。比较愈伤组织诱导时间, 在 MS 培养基上的外植体愈伤组织诱导周期最短, 在接种后的第 10~15 天就出现了透明的愈伤组织; B₅ 培养基上的外植体则是在接种后的第 14~18 天出现了透明的愈伤组织; 而接种在 White 培养基上外植体出现愈伤组织的周期更长, 在接种后的第 21 天以后才缓慢诱导出愈伤组织。因此进行大规模组织培养繁殖番红花球茎时, 须选择 MS 培养基诱导愈伤组织, 再由愈伤组织分化生芽。

2.2 不同植物生长调节剂对番红花愈伤组织诱导和生长的影响: 考察了不同浓度激素配比的 MS 培

* 收稿日期: 2008-09-28

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目课题(05DZ19729)

作者简介: 汪 洋(1981—), 女, 黑龙江人, 在读博士。 Tel: (021) 81871310 E-mail: wangyangsyx@163.com

* 通讯作者 秦路平 Tel: (021) 81871300 E-mail: qinsmmu@126.com

培养基对愈伤组织诱导和组织生长的影响(表 2),外植体个数为 40($n=40$)。愈伤组织性状特征包括质地(疏松和致密)和颜色(白色、淡黄色和黄色)。其中 MS+2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 培养基的愈伤组织诱导率最高(60.7%),而且愈伤组织结构致密、表面光滑、长势良好,继代后愈伤组织保持旺盛生长(图 1)。

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Influence of different media on callus tissue induction					
培养基	诱导时间/d	外植体数/个	愈伤组织数/个	诱导率*/%	愈伤组织性状
MS	10~15	40	23	57.5	淡黄色、较致密、生长较快
B ₅	14~18	40	13	32.5	淡黄色或白色、致密、生长快
White	21	40	5	12.5	黄色、疏松、生长缓慢

* 愈伤组织数占外植体总数的百分比

* percentage of callus tissue induced from explants

表 2 不同激素对比对愈伤组织生长的影响($n=40$)

Table 2 Influence of different hormones on callus tissue growth ($n=40$)				
激素配比/(mg·L ⁻¹)	诱导率*/%	性状特征	生长情况	
NAA0.5+6-BA1.0	35.5	淡黄色、较疏松	生长慢	
NAA0.5+6-BA2.0	43.2	白色、较致密	生长慢	
NAA2.0+6-BA0.5	60.7	淡黄色、致密	生长快且良好	
NAA2.0+6-BA1.0	54.1	黄色、致密	生长较快	
2,4-D0.5+6-BA2.0	38.6	淡黄色、较疏松	生长慢	
2,4-D2.0+6-BA0.5	52.4	淡黄色、较疏松	生长较快	

* 愈伤组织数占外植体总数的百分比

* percentage of callus tissue induced from explants

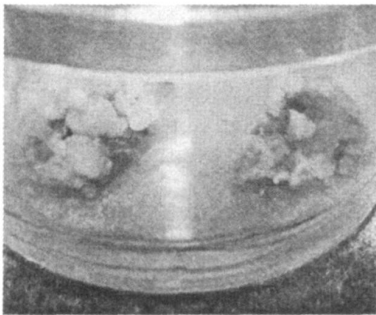


图 1 形成愈伤组织

Fig. 1 Callus tissue formation

2.3 光照条件对愈伤组织诱导的影响:选用 MS+2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 培养基,考察不同的光照条件对球茎愈伤组织诱导的影响(表 3),外植体个数为 40($n=40$)。结果表明 3 种不同的光照形式,愈伤组织诱导率存在显著差异($P<0.05$),且愈伤组织颜色及继代后生长情况差异较大,黑暗

处理的愈伤组织呈乳白色,生长旺盛,继代培养后生长较好。

2.4 丛生芽的诱导:采用不同质量浓度配比的 6-BA 和 NAA 诱导丛生芽。结果表明,经过 30 d 的培养,部分培养基中愈伤组织分化成芽(图 2、3)。其中,以 MS+0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA 培养基长芽的时间较短,且生长速度较快。愈伤组织分化出小芽,幼芽数逐渐增多形成芽丛。同样进行了光照条件对丛生芽的诱导,结果表明黑暗条件下可诱导出大量丛生芽,而光照条件不利于愈伤组织分化成芽。

表 3 光照条件对愈伤组织诱导的影响($n=40$)

Table 3 Influence of light on callus tissue induction ($n=40$)				
光照条件	诱导时间/d	诱导率*/%	性状特征	生长情况
连续 24 h 光照	25	12.1	淡黄色,无光泽	生长缓慢
12 h 光照	21	34.8	乳白色,有光泽	生长慢
连续 24 h 黑暗	13	62.4	乳白色,无光泽	生长快

* 愈伤组织数占外植体总数的百分比

* percentage of callus tissue induced from explants

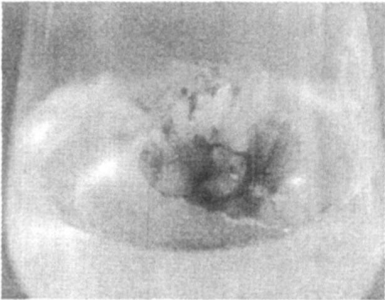


图 2 愈伤组织诱导丛生芽

Fig. 2 Callus tissue induced cluster buds

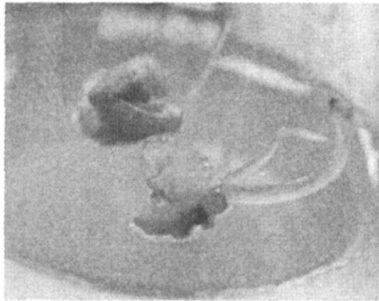


图 3 愈伤组织分化成芽

Fig. 3 Callus tissue differentiated buds

2.5 芽增殖和球茎诱导培养:将从丛生芽切割后转接到不同质量浓度配比的 6-BA 和 NAA 培养基中,其中仍以 MS+0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA 培养基芽增殖效果为好。在光照条件下大约经过 40 d 可诱导出小球茎(图 4),在黑暗条件下则不能诱导出小球茎。

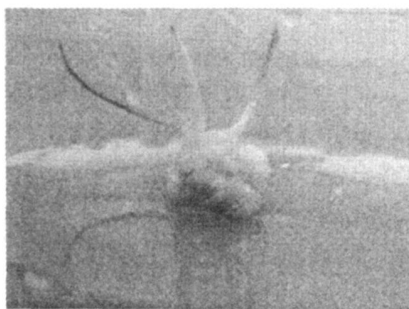


图 4 诱导球茎及球茎生长

Fig. 4 Corms induction and growth

3 讨论与结论

3.1 愈伤组织诱导:一般认为诱导愈伤组织成败关键在于培养的条件。本实验通过考察 3 种不同培养基的影响,确定 MS 为适合番红花愈伤组织诱导的培养基,其结果与陈书安等的报道一致^[4]。植物生长调节剂是诱导愈伤组织极为重要的因素,不同质量浓度激素配比的 MS 培养基中,MS + 2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA 培养基适合诱导愈伤组织,而且诱导率也高于 MS 培养基。光照条件下愈伤组织生长缓慢,且褐化很严重,暗培养诱导速度较快,不易褐化,说明光照不利于番红花愈伤组织诱导,而暗培养有利于愈伤组织脱分化。

3.2 丛生芽的诱导:组织培养中的器官发生包括外植体直接分化成器官的直接发生方式和外植体先脱分化形成愈伤组织再分化成器官的间接发生方式。脱分化过程从细胞分裂的启动开始,经过分裂形成拟分生组织或分生组织中心,随后形成器官原基。器官原基的形成受外界因素和体内生理生化因素的调节。器官分化对生长调节剂的需要是必不可少的,所以对生长调节剂的研究也是人们进行组织培养工作时关注的焦点之一。本试验采用不同质量浓度配比的 6-BA 和 NAA 诱导丛生芽,在适宜的条件下,脱分化后的愈伤组织能够再分化,诱导出丛生芽。

3.3 球茎诱导:在诱导球茎时,所需时间较长,球茎生长很缓慢,诱导技术有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 江苏中医学院 中药大词典(下册) [M]. 上海:上海人民出版社, 1977.
- [2] 王康才,徐德然,唐晓清,等. 中药材种养关键技术丛书 [M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2002.
- [3] Hyouta H, Matsushima H, Sano K. Scanning electron microscopic study on the *in vitro* organogenesis of saffron stigma and style-like structures [J]. *Plant Sci*, 1988, 58: 93-102.
- [4] 陈书安,王晓东,赵兵,等. 藏红花球茎愈伤组织快速诱导的研究 [J]. 中国药杂志, 2003, 38: 254-256.

三七及栽培土壤中烯酰吗啉残留降解动态研究

张文斌^{1,2*},冯光泉^{1,2*},曾鸿超¹,刘云艺¹,武中翠¹,周家明^{1*}

(1. 文山三七研究院,云南 文山 663000; 2. 文山三七科技创新中心有限公司,云南 文山 663000)

摘要:目的 确立了烯酰吗啉在三七及其栽培土壤中的一种分析方法。方法 三七和土壤样品用丙酮提取,正己烷和醋酸乙酯液液萃取,用固相萃取法(弗罗里硅土小柱)净化,然后用液相色谱检测。结果 烯酰吗啉在三七块根内的半衰期为 6.2 d,在三七茎叶内的半衰期为 3.9 d,在土壤中的半衰期为 5.0 d;在三七生长过程中,按常规剂量施用烯酰吗啉农药 6 次,间隔期 25 d 以上,最后一次施药距采挖时间 30 d 以上,三七植株中烯酰吗啉的残留量低于日本肯定列表对三七中烯酰吗啉残留限量标准 (≤ 0.1 mg/kg),栽培土壤中烯酰吗啉的残留量小于 0.02 mg/kg。结论 在三七上规范喷施烯酰吗啉可溶性粉剂,烯酰吗啉在三七植株和土壤中的降解较快,三七质量安全,不会对土壤环境造成污染。

关键词:三七;烯酰吗啉;降解

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0809-04

烯酰吗啉(dimethomorph)商品名安克、Acrobat、WL 127294、CME151 等,化学名称为 4-[3-(4-氯苯基)-

3-(3,4-二甲氧基苯基)丙烯酰基]吗啉,Z 与 E 两种构型的比一般为 4:1。CAS 号为 110488-70-5,分子式为

* 收稿日期:2008-06-29

基金项目:云南省科技攻关项目(2005NG07)

作者简介:张文斌(1974—),男,苗族,云南文山人,助理研究员,理学学士,主要从事中药材栽培环境和质量检测分析研究工作,获省级科技进步奖 1 项,州级科技进步奖 4 项。

* 通讯作者 冯光泉