

# 正交优化西红花组培快繁优化

彭海君, 胡润淮

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:**以西红花带芽的球茎切块为外植体, 采用正交实验, 通过极差分析、方差分析和多重比较, 优选愈伤组织诱导条件、丛生芽增殖条件和球茎诱导条件。结果表明: 适宜愈伤组织诱导培养基为 1/2MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.4 mg/L; 丛生芽增殖培养基为 1/2MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 2.0 mg/L; 球茎诱导培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+10%香蕉汁。

**关键词:**西红花; 正交实验; 诱导率; 组培; 快繁

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0111-04

西红花(*Crocus sativus* L.)属鸢尾科番红花属球根类多年生草本植物, 别名藏红花、番红花, 素有“红色金子”、“植物黄金”等美称<sup>[1]</sup>, 原产于伊朗、西班牙、希腊等地中海沿岸地区, 我国于20世纪60年代引种栽培, 现上海、浙江、江苏、山东等地有较大规模栽植<sup>[2]</sup>。西红花以花朵的红色柱头入药, 有解郁安神、活血化瘀之功效, 对

经期不调、气血瘀滞、肿痛、肝肿硬、中风、瘫痪、久咳、虚弱、炎症等有显著疗效, 且无毒副作用, 在民间广泛使用<sup>[3-4]</sup>。现代药理研究表明, 西红花可辅助治疗和预防肝炎、肝硬化、肾病、冠心病、心绞痛、心脑血管疾病、肿瘤、调节内分泌、抗缺氧、提高免疫力等<sup>[3]</sup>。西红花除了在传统和现代医药上具有很高的药用价值外, 作为一种珍贵调味剂、香料和染料在欧洲应用已经有几百年的悠久历史<sup>[4]</sup>。

西红花染色体为三倍体, 花粉败育高, 开花后罕见结实, 只能靠球茎繁殖。西红花球茎繁殖率很低, 一般比率只有1:(1.2~1.5), 因此繁殖速度较慢。组培快繁因其快速的繁殖能力而在许多濒危珍稀植物繁殖方面得到广泛应用。目前, 解决西红花球茎资源短缺的思

**第一作者简介:**彭海君(1988-), 男, 浙江临安人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源利用。E-mail: penghaijun8881@163.com

**责任作者:**胡润淮(1957-), 男, 教授, 研究方向为药用植物化学分析检测。E-mail: hurh57@163.com

**基金项目:**2012年浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)资助项目(2012R412053)。

**收稿日期:**2013-11-22

## Establishment of *in vitro* Regeneration System of *Nepeta multifida* (L.) Briq.

LIU Wen-wen<sup>1</sup>, LIANG Yu-ling<sup>1,2</sup>, GUAN Yan-ying<sup>3</sup>, XIANYU Liang-yan<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002; 2. Biological Engineering Technology Research Center in Hebei Province, Baoding, Hebei 071002; 3. Department of Biology and Chemistry, Baoding University, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Taking aseptic root, stem and leaf of *Nepeta multifida* (L.) Briq. as explants, *in vitro* regeneration of adventitious buds, *in vitro* rapid propagation system was established. The influence of adventitious bud regeneration between different explants and additional ratio of exogenous hormones were studied. The results showed that the best explant for adventitious buds regeneration *in vitro* was the segment of stem with axils of *Nepeta multifida* (L.) Briq. The optimum medium to induce adventitious buds regeneration was MS+0.2 mg/L NAA+1.0 mg/L TDZ, and each explant could produce average 18 adventitious buds. The cycle to cultivate adventitious buds was 4 weeks. The propagation coefficient in theory was  $1 \times 18^{12}$ . Move the adventitious bud into root medium to induce rooting when the bud grew to 3~4 cm. The best medium for the plantlet rooting was MS+0.2 mg/L NAA and the transplanting survival rate was 53.85%.

**Key words:** *Nepeta multifida* (L.) Briq.; *in vitro* regeneration; 6-BA; TDZ

路主要是依靠组织培养育苗后进行大田移栽,其中,西红花组织培养中具有较高诱导率的培养基筛选是育苗的关键环节之一。所以该研究旨在通过正交实验对西红花组织培养基进行优化选择,找出最佳诱导培养基,以实现西红花的快速繁殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

西红花球茎来自于浙江农林大学中药学科实验室,母球茎生长健壮、无病虫害、整齐一致。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选取与消毒 取带芽的球茎,将球茎剥去外表皮,在流水下冲洗 1 h,再用洗洁精水清洗,并冲洗干净。在无菌条件下将球茎在 70%乙醇中浸泡 30 s,然后在 0.1%的升汞中浸泡 15 min,用无菌水冲洗 4 次。用消毒过的剪刀将球茎剪成 0.5 cm<sup>3</sup> 左右带芽点的球茎切块,得无菌外植体。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将消毒处理好的球茎切块在无菌条件下接种于愈伤组织诱导培养基内(表 1)。每瓶接种 3 个球茎切块,每个处理接种 20 瓶,3 次重复。30 d 后,统计西红花球茎切块的愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率(%)=诱导出的愈伤组织数目/接种的外植体数目×100%。

表 1 愈伤组织诱导正交实验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)因素与水平

Table 1 The factor and level of orthogonal test L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) for callus inducing

水平 Level	因素 Factor		
	A	B	C
	培养基 Medium	NAA 浓度 Concentration of NAA/mg · L <sup>-1</sup>	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>
1	MS 培养基	1.0	0.2
2	1/2MS 培养基	2.0	0.4
3	B5 培养基	3.0	0.6

1.2.3 丛生芽增殖 在愈伤组织形成后,将愈伤组织转接入 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L 培养基中诱导丛生芽。丛生芽诱导出来后,将单个芽接种到丛生芽增殖培养基中(表 2),每瓶接种 3 个单芽,每个处理接种 20 瓶,3 次重复。30 d 后,统计西红花丛生芽增殖倍数。

1.2.4 球茎诱导 丛生芽继代增殖后,选取健壮的芽苗,接种于球茎诱导培养基中(表 3)。每瓶接种 3 个芽苗,每个处理接种 20 瓶,3 次重复。30 d 后,统计西红花球茎诱导率。球茎诱导率(%)=诱导出的球茎数目/接种的芽苗数目×100%。

### 1.3 培养条件

培养室温度(25±2)℃,每天光照时间 12 h,光照强度 1 500~2 000 lx。

表 2 丛生芽增殖正交实验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)因素与水平

Table 2 The factor and level of orthogonal test L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) for cespitose buds multiplication

水平 Level	因素 Factor		
	A	B	C
	培养基 Medium	NAA 浓度 Concentration of NAA/mg · L <sup>-1</sup>	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>
1	MS 培养基	0.2	1.0
2	1/2MS 培养基	0.4	1.5
3	B5 培养基	0.6	2.0

表 3 球茎诱导正交实验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)因素与水平

Table 3 The factor and level of orthogonal test L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) for corm inducing

水平 Level	因素 Factor		
	A	B	C
	培养基 Medium	NAA 浓度 Concentration of NAA/mg · L <sup>-1</sup>	营养添加物质 Nutrient substances
1	MS 培养基	0.5	10%香蕉汁
2	1/2MS 培养基	1.0	10%马铃薯汁
3	B5 培养基	1.5	10%椰汁

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导条件的优化

从表 4 可以看出,影响愈伤组织诱导率的因素按重要性依次为培养基>6-BA 浓度>NAA 浓度。1/2MS+NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上能获得最高的愈伤组织诱导率,达 59.6%。同时,随着 NAA 和 6-BA 浓度的增加,愈伤组织诱导率都略有下降,说明较高浓度的细胞分裂素和生长素都会抑制愈伤组织的诱导。培养基中的含盐量也会对愈伤组织的诱导产生影响,甚至比激素的影响更大。通过对各因素进行方差分析,可以看出各因素对愈伤组织诱导都有显著影响。但 NAA

表 4 西红花球茎切块愈伤组织诱导试验结果

Table 4 The test result of corm callus inducing of *Crocus sativus* L.

培养基编号 Number of medium	培养基 Medium	NAA 浓度 Concentration of NAA	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA	空列 Empty columns	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%
1	1	1	1	1	51.4
2	1	2	2	2	55.5
3	1	3	3	3	41.4
4	2	1	2	3	47.8
5	2	2	3	1	56.4
6	2	3	1	2	59.6
7	3	1	3	2	33.2
8	3	2	1	3	29.1
9	3	3	2	1	37.3
k <sub>1</sub>	49.433	44.133	46.700	48.367	
k <sub>2</sub>	54.600	47.000	46.867	49.433	
k <sub>3</sub>	33.200	46.100	43.667	39.433	
R	21.400	2.867	3.200	10.000	

注:k<sub>i</sub>为每列因素 i 水平所对应的试验指标的平均值;R 为每列因素的极差。下同。

浓度和 6-BA 浓度的极差小于误差列,故这 2 个因素对愈伤组织诱导率的影响可以忽略不计。多重比较结果见表 5。MS 培养基和 1/2MS 培养基对愈伤组织的诱导与 B5 培养基有显著差异,MS 和 1/2MS 培养基间差异不显著。筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基为 1/2MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.4 mg/L。

表 5 愈伤组织诱导多重比较

Table 5 Multiple comparison of corm callus inducing

培养基 Medium	k1	k2	k3
均值 Mean value	49.4a	54.6a	33.2b

2.2 丛生芽增殖倍数统计

从表 6 可以看出,对丛生芽增殖倍数的影响按重要性依次为培养基>6-BA 浓度>NAA 浓度。在 1/2MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 培养基中,丛生芽增殖倍数能达到 7.20 倍。同时,随着 NAA 浓度的增加,丛生芽增殖倍数也相应地增加。而 6-BA 在较低浓度和较高浓度下都能获得较高的丛生芽增殖倍数,可能是由于丛生芽的增殖对细胞分裂素的浓度比较敏感。对试验数据进行方差分析,可以知道培养基类型和 6-BA 浓度都对丛生芽增殖影响显著,而 NAA 浓度对丛生芽增殖影响不显著。大概是由于丛生芽增殖过程中生长素对其影响较小,或者生长素各水平相距太近,彼此间对丛生芽增殖影响不显著。从表 7 可以看出,MS 培养基和 1/2MS 培养基间对丛生芽增殖影响的差异不显著,但均与 B5 培养基有极显著差异。6-BA 各浓度间仅有 2.0 mg/L 和 1.5 mg/L 2 个浓度间对丛生芽增殖倍数有显著差异。丛生芽增殖最优的培养基条件为 1/2MS+0.6 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA。

表 6 西红花丛生芽增殖试验结果

Table 6 The test result of cespitose buds muhplition of *Crocus sativus* L.

培养基编号 Number of medium	培养基 Mudium	NAA 浓度 Concentration of NAA	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA	空列 Empty coulumnns	丛生芽增殖倍数 Proliferation multiples of cespitose buds/倍
1	1	1	1	1	5.65
2	1	2	2	2	4.55
3	1	3	3	3	7.10
4	2	1	2	3	5.25
5	2	2	3	1	7.20
6	2	3	1	2	6.55
7	3	1	3	2	4.10
8	3	2	1	3	3.65
9	3	3	2	1	3.20
k1	5.767	5.000	5.283	5.350	
k2	6.333	5.133	4.333	5.067	
k3	3.650	5.617	6.133	5.333	
R	2.683	0.617	1.800	0.283	

表 7 丛生芽增殖多重比较

Table 7 Multiple comparison of cespitose buds muhplition

均值 Mean value	培养基 Medium	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA
k1	5.767aA	5.283ab
k2	6.333aA	4.333b
k3	3.650bB	6.133a

2.3 球茎诱导率统计

由表 8 可知,在 1/2MS+NAA 1.5 mg/L+10%香蕉汁培养基上能获得最高的球茎诱导率,达到 65.10%。通过试验数据进行极差分析可知,对球茎诱导率的影响按重要性依次为培养基>营养添加物质>NAA 浓度。低浓度的生长素能获得更高的球茎诱导率,同时培养基类型也对诱导率有极大影响,而营养添加物质也能起到辅助球茎诱导的作用。对各因素进行方差分析,可知仅有培养基类型对球茎诱导有显著影响。由表 9 可知,1/2MS 和 B5 培养基间对球茎诱导有显著差异。故丛生芽增殖最优的培养基条件为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+10%香蕉汁。

表 8 西红花球茎诱导试验结果

Table 8 The test result of corm inducing of saffron

培养基编号 Number of medium	培养基 Mudium	NAA 浓度 Concentration of NAA	营养添加物 Nutrient substances	空列 Empty coulumnns	球茎诱导率 Bulb induction rate/%
1	1	1	1	1	54.69
2	1	2	2	2	51.99
3	1	3	3	3	48.63
4	2	1	2	3	60.27
5	2	2	3	1	58.45
6	2	3	1	2	65.10
7	3	1	3	2	45.10
8	3	2	1	3	41.60
9	3	3	2	1	40.40
k1	51.770	53.353	53.797	51.180	
k2	61.273	50.680	50.887	54.063	
k3	42.367	51.377	50.727	50.167	
R	18.906	2.673	3.070	3.893	

表 9 球茎诱导多重比较

Table 9 Multiple comparison of corm inducing

培养基 Medium	k1	k2	k3
均值 Mean value	51.770ab	61.273a	42.367b

3 讨论

该试验结果表明,通过调节生长素和细胞分裂素的比值,能调控组织分化的方向,如愈伤组织诱导时,需较低浓度的细胞分裂素和适宜浓度的生长素;而丛生芽增殖时,则需较低浓度的生长素和适宜浓度的细胞分裂素。球茎诱导时,低浓度的生长素和额外的营养添加物能得到较高的诱导率。陈书安等<sup>[3]</sup>报道指出,用带芽球茎切块为外植体,在 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.25 mg/L 培养基上能在较短时间内获得比较高的愈伤组织诱导率,且愈伤组织形态良好;而王寿芹等<sup>[5]</sup>利用新生

球茎为外植体,在 MS+6-BA 5 mg/L+NAA 5 mg/L 培养基上也能诱导出愈伤组织,并在相同的培养基上分化出了幼苗;刘咏梅等<sup>[7]</sup>利用球茎切块为外植体,在 MS+TDZ 4.54  $\mu$ M 培养基上诱导出愈伤组织,并且每个球茎外植体分化出了(39 $\pm$ 5.1)个丛生芽,还出现了半透明、球形的类胚状结构;陈文浩等<sup>[1]</sup>在西红花球茎诱导中,用 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基生能获得不错的效果。同时,在培养基中加入活性炭后,即 MS+NAA 5 mg/L+6-BA 5 mg/L+AC 0.5 g/L 培养基上能获得较重的球茎。说明在西红花组培过程中,培养基中的激素种类、浓度和组合对外植体的分化方向有重要影响。

在西红花愈伤组织诱导、丛生芽增殖和球茎诱导过程中,培养基类型都对其指标值有显著影响,并且 1/2MS 培养基都是最适合的培养基类型。研究人员也使用了西红花的各种材料作为外植体来进行组培研究,如球茎切块<sup>[6-7]</sup>、茎尖、新生小球茎<sup>[8]</sup>,以及各种花器官来诱导类柱头状物等。而培养基类型也主要是 MS、1/2MS、B5、N6、White 培养基等。组培过程中主要都是使用 MS 培养基,生根培养中 1/2MS 培养基效果更好。该研究中在愈伤组织诱导、丛生芽增殖和球茎诱导中,都是 1/2MS 培养基效果更好,可能以根茎切块为外植体,根茎自身就含有大量营养物质,对盐分的含量需求较低。

地下根茎类植物的球茎切块作为外植体进行组培快繁,污染率是个不容忽视的问题。西红花的组培快繁中,无论是以球茎切块、茎尖还是新生小球茎作为外植体,都有较高的污染率,并且也较容易产生褐化现象。解决污染率较高的问题可以尝试取不定芽的茎尖来进行组培快繁。褐化是由于外植体中的多酚氧化酶被激

活,将外植体内的酚氧化成了醌类物质,醌类物质在培养基上和外植体内扩散,最终会导致外植体死亡<sup>[9]</sup>。袁丽红等<sup>[10]</sup>尝试在培养基中加入活性炭和 PVP,但对褐化现象的抑制效果不太明显。肖娅萍等<sup>[11]</sup>提出连续转移法来减轻褐化,即将外植体接种于培养基上后,当褐化发生但还未在培养基上扩散开来的时候,将外植体转移到新的培养基中。通过连续转移,能有效地减轻褐化的影响。外植体污染和褐化的问题仍然是组织培养工厂化生产中的主要问题,仍然需要对其机理及解决途径进行更深入的研究。

### 参考文献

- [1] 陈文浩,欧元,赵兵,等. 番红花球茎的快速高频诱导[J]. 过程工程学报,2007,7(1):129-132.
- [2] 李琳琳. 藏红花的研究概述[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学、医学版),2008,29(2):46-52.
- [3] 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]. 中国药理学杂志,2003(4):254-256.
- [4] 杨英,赵焕君. 中药西红花的研究进展[J]. 中医药学刊,2006,24(12):2324-2325.
- [5] 王寿芹,赵永钦,刘莉莎,等. 藏红花愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 西南农业学报,2011,24(1):369-372.
- [6] 关萍,石建明. 番红花球茎组织培养[J]. 贵州农学院学报,1995,14(4):47-49.
- [7] 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.
- [8] 何凯,颜韵,唐琳,等. 藏红花球茎诱导丛生芽及球茎再生[J]. 四川大学学报(自然科学版),2002,39(6):1127-1130.
- [9] 黄宁珍,唐凤鸾,付传明,等. 广西地不容组培快繁研究[J]. 中草药,2007,38(3):445-449.
- [10] 袁丽红,陆玉婷,黄晶,等. 藏红花愈伤组织诱导和褐化抑制[J]. 南京工业大学学报(自然科学版),2009,31(6):22-26.
- [11] 肖娅萍,王拈之,张志勤,等. 红树莓植株再生系统的建立[J]. 中草药,2001,32(8):738-741.

## Optimization Conditions of Tissue Culture of *Crocus sativus* L. Using Orthogonal Experiment

PENG Hai-jun, HU Run-huai

(College of Forestry and Biological Technology, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300)

**Abstract:** Using corm of *Crocus sativus* L. as explant, culture medium for the induction of callus, adventitious bud proliferation and the induction of corm were optimized by orthogonal design, through the method of factor index analysis, variance analysis and multiple comparison. The results showed that 1/2MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.4 mg/L was the best medium for induction of callus, the appropriate medium for adventitious buds proliferation was 1/2MS medium with NAA 0.6 mg/L and 6-BA 2.0 mg/L, 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10% banana juice was suitable for corm induction of saffron.

**Key words:** *Crocus sativus* L.; orthogonal experiment; induction rate; tissue culture; rapid propagation