

·中药研究 Study of Chinese Pharmacy·

番红花(*Crocus sativus* L.)组织培养的初步研究*The Preliminary Study on the Tissue Culture of the *Crocus sativus* L.

王磊 Wang Lei, 李学文 Li Xuewen, 娄玉霞 Lou Yuxia, 刘魁锋 Liu Kuifeng, 王永锋 Wang Yongfeng

河南中医学院, 河南 郑州 450008

Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450008

摘要:目的:初步探讨番红花组织培养的一些影响因素。方法:采用组织培养技术,以番红花幼嫩的叶片为外植体对其愈伤组织及不定胚的诱导进行了研究;结果:MS+BA 0.1 mg/L+2,4-D 2 mg/L为诱导愈伤组织形成的最佳培养基,而诱导不定胚的最佳培养基为MS+BA 1.5 mg/L+2,4-D 2 mg/L。结论:基本明确了番红花愈伤组织及不定胚诱导的最佳激素组合。

Abstract: Objective: To discuss the factors which affected the induction of callus and adventitious embryoid of *Crocus sativus* L. . Methods: The induction of callus and adventitious embryoid were studied in the tissue culture of *Crocus sativus* L. , when the leaves were placed on five media supplied with different concentration of different hormone. Results: It was found that the MS medium containing BA 0.1 mg/L, 2,4-D 2 mg/L was the best to induce callus, while the medium containing BA 1.5 mg/L, 2,4-D 2 mg/L was the best to induce adventitious embryoid. Conclusion: The best concentration of hormone was found to induce the callus and the adventitious embryoid of *Crocus sativus* L. .

关键词:番红花;组织培养;激素;愈伤组织;不定胚

Key words: *Crocus sativus* L. ; Tissue culture; Hormone; Callus; Adventitious embryoid

中图分类号 CLC number: R282.2 **文献标识码** Document code: A **文章编号** Article ID: 1672-6839(2006)03-0030-02

番红花(*Crocus sativus* L.)又名藏红花、西红花,为鸢尾科番红花属多年生草本植物。原产欧洲南部,其雌蕊柱头是名贵中药,具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神之功效,是传统的妇科、伤科良药。临床上还主要用于胃病、调经、麻疹、发热、黄疸、肝脾肿大等的治疗。尤其是近年来在治疗心脑血管疾病方面取得了较好的疗效,同时也可作为芳香剂、调味品、化妆品等^[1],此外其植株又具有较高的观赏价值^[2],因此它与人们的日常生活关系密切。但自然状态下,番红花主要以球茎进行繁殖,且栽培条件下其球茎退化现象严重,导致种质资源严重缺乏。我国自引种以来,栽培番红花产量一直较低,远远不能满足人们的需求^[3]。近几十年来,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。为了探索扩大种源的途径,采用组织培养技术进行了番红花愈伤组织及小球茎诱导进行研究,以期为其种质资源的保存与利用奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料番红花取自河南中医学院番红花试验田。

1.2 实验方法

先将番红花的球茎,于室温 25℃ 下催芽,待芽刚伸出

(1 cm)时,割取顶芽或侧芽(略带球茎部分),并流水冲洗 30 min以上,用 70% 乙醇消毒 15 s,再用 0.1% 的升汞浸泡 8 min,无菌水冲洗 4~5 次,接种于 MS 基本培养基上生长。待苗长至约 3 cm 左右时,于超净工作台上剥取芽鳞,留嫩叶,并将叶子切成 0.3~0.5 cm 左右的小段,作为外植体接种于附加不同激素浓度的 MS 培养基上。实验设 5 组,每瓶接种 8 个外植体,每组 5 个瓶,每组共 40 个外植体。培养基设置为 2,4-D 2 mg/L, BA 浓度分别为 0.0 mg/L、0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L。琼脂浓度为 0.6%,蔗糖浓度为 3%,激素在培养基高温灭菌前加入,pH 值 5.8,培养物在室温(25±2)℃,光周期 16 h·d⁻¹,光照度 2500lx 下培养。实验过程中每天观察外植体的变化,30 d 后,按下列公式统计愈伤组织诱导率:

$$\text{愈伤组织诱导率} = \frac{\text{诱导出愈伤组织的外植体数}}{\text{接种的外植体数}}$$

$$\text{不定胚的诱导率} = \frac{\text{愈伤组织诱导出不定胚的数目}}{\text{接种愈伤组织块数}}$$

2 结果与分析

2.1 番红花愈伤组织及不定胚的形成

观察发现,将番红花叶片接种于不同激素浓度的培养基上 14 d 后(BA 0.0 mg/L 除外),叶片切口处膨大增厚,并在切口的表皮上有许多小突起,叶片卷曲。16 d 后开始形成愈伤组织,刚形成的愈伤组织呈淡黄色,质地较疏松,随着培养时间的延长,颜色逐渐变成棕色或黄褐色。继续培养 50 d 左右发现从长势较好的愈伤组织上产生了白色球形不定胚,

* 基金项目:河南中医学院科研苗圃工程资助项目(编号:2004MP017)

60 d后不定胚呈鱼雷状。

2.2 不同激素浓度对番红花愈伤组织形成的影响

以番红花叶片作为外植体接种于不同激素浓度的培养基上,30 d后统计愈伤组织的诱导率,发现不同激素浓度对番红花愈伤组织诱导率的影响明显不同,当BA浓度为0.0 mg/L时,愈伤组织的诱导率为0%,随着其浓度的增加,愈伤组织诱导率呈先升后降的趋势,当其浓度为0.1 mg/L时,诱导率最高为75%,之后随浓度的升高诱导率逐渐降低。这说明BA浓度的高低在番红花叶片形成愈伤组织的过程中起着关键作用。但过高或过低的浓度均不利于愈伤组织的形成。详见表1。

2.3 不同激素浓度对番红花不定胚诱导形成的影响

在上述培养基上,不经转换培养基,发现有些愈伤组织可直接产生白色球形的不定胚,但这种形成不定胚的能力在不同激素浓度的培养基上有所不同,当2,4-D浓度一定时,BA为0.0 mg/L时,不定胚的发生为0%,之后随着BA浓度的增加,不定胚的诱导率也逐渐增加,当BA浓度为0.5 mg/L时,诱导率为50%,而当BA浓度增加到1 mg/L时,不定胚的诱导率却突然下降为41%,进一步增加BA浓度,其诱导率又上升到70%。这说明BA浓度为1.5 mg/L时,最适合不定胚的诱导。详见表1。

表1 不同激素浓度对番红花愈伤组织形成及不定胚形成的影响

| 组别 | n | BA (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | 愈伤组织 诱导率(%) | 不定胚的 诱导率(%) |
|----|----|--------------|-----------------|----------------|----------------|
| 1 | 40 | 0.0 | 2 | 0 | 0 |
| 2 | 40 | 0.1 | 2 | 75 | 30 |
| 3 | 40 | 0.5 | 2 | 45 | 50 |
| 4 | 40 | 1.0 | 2 | 30 | 41 |
| 5 | 40 | 1.5 | 2 | 15 | 70 |

3 讨论

众多的研究表明植物组织培养中不同激素及其浓度的组合对培养物的形成有着明显的影响。本研究发现,番红花离体叶片在受试的五种培养基中,以MS+BA 0.1 mg/L+2,4-D 2 mg/L为诱导愈伤组织形成的最佳培养基,而诱导不定胚形成的最佳培养基为MS+BA 1.5 mg/L+2,4-D 2 mg/L,这进一步证实了前人的观点。刘咏梅等研究发现,由番红花愈伤组织可直接形成小球茎^[4],但本实验研究发现由愈伤组织可形成不定胚,却未见小球茎的形成,可能与实验过程中所采用的激素浓度的不同有关。为了使番红花愈伤组织在培养过程中再分化出芽,实验过程中对BA浓度进行了调整(数据未列出),但始终未发现芽的分化,这可能是与其外植体在培养过程中细胞的分化途径有关,但具体原因有待于进一步研究。

参考文献:

- [1]包胜杰,孙树.番红花的渊源简介[J].中国民族医药杂志,2003,9(1):26.
- [2]刘芸,龙云,朱利泉,等.钾对番红花球茎膨大的生理生态效应[J].应用生态学报,2004,15(4):663-666.
- [3]柯爱萍,薛小红.油菜素内酯(BR)对番红花的增产效果[J].中草药,2000,31(9):708-709.
- [4]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.

编辑:程延安

收稿日期:2005-12-24

作者简介:王磊(1972-),男,河南通许人,工学学士,讲师,从事中制药专业教学和研究工作。

·研究生学位论文摘要·

肺纤维化早期阶段中医证型的实验研究

徐建明 Xu Jianming

河南中医学院 2002 级硕士研究生,河南 郑州 450008

摘要:目的:探讨肺纤维化早期阶段中医证型及证型与部分细胞因子的关系,为临床制定肺纤维化的合理治疗方案及中医“证”的客观化研究提供参考。方法:将大鼠随机分为7组:正常对照组、模型对照组、强的松对照组、瓜蒌薤白汤组、大黄廑虫丸组、肾气丸组和麦门冬汤组。除正常对照组外,其余各组均采用气管内一次性注入平阳霉素复制肺纤维化模型,灌胃用药,于造模后第7、14天分批处死动物,进行HE染色观察肺泡炎和肺纤维化程度,并通过免疫组化方法检测肺组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素10(IL-10)的表达。结果:①模型对照组第7天部分肺泡腔缩小或

萎缩、肺泡隔增宽、以巨噬细胞为主的炎性细胞浸润、间质可见泡沫细胞,而到第14天炎性细胞浸润减少,炎症减轻,成纤维细胞增多,纤维组织增生,说明造模是成功的。②造模第7天各组肺泡炎由轻到重依次为:正常对照组<瓜蒌薤白汤组=麦门冬汤组<强的松对照组=肾气丸组=大黄廑虫丸组<模型对照组,与模型对照组比较只有瓜蒌薤白汤和麦门冬汤组差异具有统计学意义;第14天麦门冬汤组、瓜蒌薤白汤组和强的松对照组肺泡炎低于模型对照组,差异具有统计学意义。③模型对照组大鼠肺组织的TNF- α 表达高于正常对照组,而IL-10表达略低于正常对照组,其差异无统计学意义。强的松、瓜蒌薤白汤和麦门冬汤组的TNF- α 表达均低于模型组,同时强的松和麦门冬汤组IL-10的表达高于其他用药组。结论:①肺纤维化早期阶段痰浊痹阻证、肺阴亏虚证、肾气亏虚证和肺阴亏虚证可能均存在,但以痰浊痹阻证和肺阴亏虚证为主;②TNF- α 参与了肺纤维化早期阶段肺泡炎的形成,与中医的痰浊痹阻证和肺阴亏虚证有一定关系;③抑制TNF- α 和增强IL-10的表达可能是瓜蒌薤白汤和麦门冬汤防治肺纤维化的机制之一。