

藏红花瓣状体的诱导与花柱-柱头状物的定向分化

王莉 李毅* 董相军 徐文华 张宝琛

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

关键词 瓣状体, 花柱-柱头状物, 藏红花, 花瓣

中图分类号 Q947 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0638-04

藏红花 (*Crocus sativus* L.) 又名番红花、西红花; 藏药中称为苟日苟木。它是鸢尾科草本植物, 原产于欧洲、地中海地区。我国长期以来把它作为珍贵的中藏药。其药用部位是柱头, 有效成分主要是藏红花素、藏红花酸、藏红花醛和藏红花苦素。丁葆祖等于 1979 年首次从藏红花的球茎获得完整的植株^[1]。Sano 等人 1987 年在离体条件下, 诱导花柱-柱头状物再生获得成功^[2], 此后国内外不断有相关报道^[3-7]。但试验大多集中在由外植体直接或由愈伤组织间接诱导柱头状物, 且花柱-柱头状物的频率低和数量少。我们试图先由藏红花花瓣诱导瓣状体, 再定向分化花柱-柱头状物, 来提高花柱-柱头状物的诱导频率和数量。从而为以后的大规模生产奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

在藏红花的花期, 选用长约 7~8cm 的顶芽。在无菌条件下用 75% 的乙醇擦洗球茎和顶芽 3 次。用无菌的解剖针剥离芽鞘露出花苞, 再分离花瓣接种到 3 种不同激素处理的培养基上。

1.2 培养基

(1) 1/2MS + NAA 4 mg/L + KT 4 mg/L;

(2) 1/2MS + NAA 4 mg/L + KT 8 mg/L;

(3) 1/2MS + NAA 8 mg/L + KT 4 mg/L。

以上 3 种培养基均附加水解酪蛋白 300mg/L、肌醇

200mg/L、3% 的蔗糖。pH 调整到 5.8, 琼脂粉 5g/L。121 °C 灭菌 20 min。

1.3 培养方式

先将花瓣接种在 3 个不同浓度激素处理的培养基上, 放置在 20 ± 1 °C, 完全黑暗条件下培养。待白色瓣状体大量形成后, 再将成丛的白色瓣状体作为外植体分离下来, 转接到处理 1 培养基上。定向分化的培养条件与瓣状体的诱导条件相同。

2 结果与分析

2.1 3 种不同激素浓度对花瓣外植体上瓣状体和花柱-柱头状物诱导的影响

花瓣外植体被接种到不同激素组合的培养基上培养 5~6 周后, 花瓣先是发生卷曲, 之后其基部都出现黄绿色的膨大 (图版 FA)。随后膨大的基部形成小鳞片样突起。突起长大形成白色瓣状体后, 增殖快, 在短期内就生长成簇 (图版 FB)。

各种处理中瓣状体的诱导频率如表 1 所示。其中以处理 2 中的诱导频率较高 (30.0%)。处理 3 上形成瓣状体较迟一些, 其频率较低 (14.3%)。另外, 在处理 1 中我们还发现花瓣外植体的基部能直接形成花柱-柱头状物, 形成的频率为 10%。而处理 2、3 中的花瓣在这一阶段也有花柱-柱头状物形成, 但频率很低, 如表 1 中所列。总体来讲, 这一培养阶段中花瓣直接诱导出花柱-柱头状物的频率都太低, 不适用于大规模培养。

表 1 不同激素组合中瓣状体和花柱-柱头状物诱导频率的差异

Table 1 Induction rates of petal-like structure and style-stigma-like structure in different treatments

Treatment	No. of explants	No. of explants inducing petal-like structures	Induction rate of petal-like structures / %	No. of explants inducing SLS *	Induction rate of SLS* / %
1	20	3	15.0	2	10.0
2	29	9	30.0	1	3.4
3	14	2	14.3	1	7.1

* SLS: style-stigma-like structures

收稿日期: 2002-02-02, 修回日期: 2002-05-13。

基金项目: 2001 年中国科学院“西部之光”人才培养计划研究项目资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-971-6101454; Fax: 86-971-6143282; E-mail: liyi@mail.nwipb.ac.cn

2.2 不同来源的瓣状体再分化花柱-柱头状物的差异

将各种培养基中的瓣状体丛从原外植体上分离下来,转到处理 1 培养基进行培养。3 周后瓣状体中开始有白色或黄色的花柱-柱头状物形成(图版 FC)。在培养中,花柱-柱头状物的颜色逐渐加深,与天然柱头相似,并且伸长。在继代过程中,无论是产生花柱-柱头状物的瓣状体的数目还是形成的花柱-柱头状物的数量都有增加。瓣状体再分化的花柱-柱头状物的最高数量可以达到 30 枚(图版 FD)。

来源不同的瓣状体再分化花柱-柱头状物的频率有着较大的差异(表 2)。表现在来源于处理 1 的瓣状体再诱导花柱-柱头状物的频率较低(18.8%) ;而来源于处理 2 的瓣状体再分化花柱-柱头状物的频率较高(32.5%) ;来源于处理 3 的瓣状体定向分化花柱-柱头状物的频率竟高达 60.0%。

来源不同的瓣状体上形成的花柱-柱头状物的数量也有差异。从每一瓣状体上花柱-柱头状物的平均数来看。来源于处理 1 的瓣状体上平均数量最低(3.5 枚);来源于处理 3 中的瓣状体上的花柱-柱头状物平均值最高(13.3 枚);来源于处理 2 中的平均数介于以上二者之间为 6.5 枚。

表 2 不同来源的瓣状体形成花柱-柱头状物的频率及平均数量
Table 2 The frequency and the average number of style-stigma-like structures from petal-like structures

Initial treatments	No. of petal-like structures	No. of HLS* induced	% of SLS* of SLS*	Induction rate of SLS	Average number of SLS* / %
1	16	3	18.8	18.8	3.5
2	40	13	32.5	32.5	6.5
3	15	9	60.0	60.0	13.3

* HLS: petal-like structures; * SLS: style-stigma-like structures

2.3 瓣状体的持续增殖和稳定分化

瓣状体在分化花柱-柱头状物的同时自身也能持续增殖。每次统计以前一次的数量为基础,结果如下(表 3)。从所列的结果可以看出,其中以来源于处理 2、3 中的瓣状体增殖效果最好,增长率也稳定。这就为大量培养花柱-柱头状物提供了基础。

表 3 瓣状体的持续增殖

Table 3 The continuous proliferation of petal-like structures

Initial treatments	Initial No. of HLS	The growth rate in first subculture/ %	The growth rate in second subculture/ %
1	8	200.0	125.0
2	22	181.8	272.7
3	6	250.0	293.3

分析表 4 中的结果,发现瓣状体在继代过程中能够稳定的分化出花柱-柱头状物。来源不同的瓣状体都保持了各自的分化频率。来源于处理 3 的瓣状体在继代过程中保持着分化花柱-柱头状物的高频性。

表 4 瓣状体分化花柱-柱头状物的稳定性

Table 4 The differentiation stability of style-stigma-like structure from the petal-like structures

Initial treatments	Induction rate of SLS in first subculture/ %	Induction rate of SLS in second subculture/ %	Induction rate of SLS in third subculture/ %
1	18.8	22.2	26.7
2	32.5	37.5	39.2
3	60.0	68.2	66.7

3 讨论

过去的试验中无论是以花瓣还是其它花器官为外植体诱导花柱-柱头状物时都在频率或数量方面存在一些问题。我们的研究着重解决这两方面的问题。有的研究者观察到花瓣直接诱导出花柱-柱头状物的频率最高为 37.5%^[4]。而我们观察到花柱-柱头状物的最高诱导频率达到 60.0%。明显高于以往试验中的诱导频率。

从数量方面看,有人在研究中观察到花瓣为外植体时,诱导的柱头状物至多 3 枚,且长度不足 1.0cm^[5]。我们的试验中瓣状体产生的柱头状物的最高数量为 30,且长度与天然产物相似。

根据试验中瓣状体诱导花柱-柱头状物的频率和数量,我们认为瓣状体之所以能够较高频率地再分化花柱-柱头状物是因为在诱导瓣状体的培养中也诱导或是启动了花柱-柱头状物原基分化。原基虽然在此阶段大量的形成,但是要在改变条件时才能开始器官的建成。

另外,来源不同的瓣状体分化花柱-柱头状物的频率有较大的差异。虽然处理 3 中瓣状体的诱导频率低,但此瓣状体分化花柱-柱头状物的频率却是最高。因而我们还认为高浓度的 NAA(8 mg/L)可以有效地诱导或是启动花柱-柱头状物原基的形成,却不能有效地使花柱-柱头状物分化和生长,只有在降低其浓度(4 mg/L)的条件下被启动的原基才开始形态的建成,从而有效地分化花柱-柱头状物。瓣状体是原基被启动的形态标志。禾本科植物体细胞胚胎发生中也有类似的情况,胚状体诱导和早期发育较高浓度的 2,4-D 是必须的,而完整胚状体的形成只能在没有或很低浓度的生长素存在下产生^[8]。

综合各方面的分析,我们认为藏红花花柱柱头状物的分化分为两个阶段。一是原基的分化阶段;二是原基发育阶段。两个阶段所要求的条件不同:原基分化要求较高的 NAA 浓度,而进一步的发育则要在较低浓度下进行。

REFERENCES (参考文献)

[1] DINGB Z(丁葆祖), BAI S H(柏淑华), WU Y(吴逸), WANGB K(王保康). Preliminary Report on Tissue Culture of Corm of *Crocus sativus* L. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1979, 21(4): 389
[2] Sano K, Himeno H. *In vitro* proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, 11: 159-166

- [3] ZHAO J (赵军), CHEN F (陈放), TANG F (颜钊), TANGL (唐琳), XU Y (徐莹). The Regeneration of stigma-like Structures from the Stamens of *Crocus sativus* L. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2001, **43** (5): 475 ~ 479
- [4] LU WL (陆文梁), DONG Y R (佟曦然), ZHANG Q (张冀), GAO W W (高微微). Study on *in vitro* regeneration of style-stigma-like structure in *Crocus sativus* L. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1992, **34**: 251 ~ 256
- [5] Fakhrai F, Evans P K. Morphogenic potential of cultured floral explants of *Crocus sativus* L. for the *in vitro* production of saffron. *Journal of Experimental Botany*, 1990, **41** (222): 47 ~ 52
- [6] Loskutov A V, Beninger C W, Ball, T M Hosfield *et al.* Optimization of *in vitro* conditions for stigmas-like-structure production from Half-ovary explants of *Crocus sativus* L. *in vitro cell. Dev Biol-Plant*, 1999, **35**: 200 ~ 205
- [7] Sarma K S, Maesato K, Hara T *et al.* *In vitro* production of stigma-like structures from stigma explant of *Crocus sativus* L. *Journal of Experimental Botany*, 1990, **41** (227): 745 ~ 748
- [8] ZHANG S L (张树录) The somatic embryogenesis in the tissue culture of grass. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1985, (6): 15 ~ 20

Induction of Petal-like Structures from Petals of *Crocus sativus* L. and the Differentiation of Style-Stigma-like Structures *in vitro*

WANG Li LI Yi* DONG Xiang-Jun XU Wei-Hua ZHANG Bao-Chen
(Northwest Plateau Institution of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract Firstly the petal of *Crocus sativus* L was cultured on the medium that supplemented with different combinations of hormones. The petal-like structures (PLS) were induced on medium, but the induction rates were different in various medium. The highest induction rate of petal-like structures was obtained on the media that was supplemented with NAA (4 mg/L) and KT (8 mg/L). The petal-like structures were subcultured on another media when the structure was produced on the explants and proliferate groups. The later media was used for inducing style-stigma-like structures (SSLS). The induction rate of style-stigma-like structures in the petal-like structures group is much higher than the rate in the preceding work, and the maximum of style-stigma-like structures produced per explant was 30. The best result of style-stigma-like structures was observed on the petal-like structure groups which came from the third treatment. The differentiation rate of style-stigma-like structures is stable in the subcultures of petal-like structures. The result revealed that the induction frequency of style-stigma-like structures formed on the petal-like structures is higher than that form on the petals of *C. sativus* L.

Key words *Crocus sativus* L, petal, petal-like structure, style-stigma-like structure

Received: 02-02-2002

This work was supported by Grant from the personal training project-the light of western of Chinese Academy of Sciences.

* Corresponding author. Tel :86-971-6101454; Fax: 86-971-6101282; E-mail: liyi@mail.nwpb.ac.cn

《生物工程学报》2002 年订单

邮发代号: 82 - 13

刊号: ISSN1000-3061

CN11 - 1998/Q

刊期: 双月刊

页码: 128

单价: 23.00 元

全年: 138 元

姓名: _____
单位名称: _____
通信地址: _____ 邮编: _____
订阅类别: 个人 单位
订数: 欲订 _____ 年第 _____ 期至第 _____ 期,
共计 _____ 册。
付费方式: 通过 邮汇 银行转帐 付费
(如不返回此单, 请在汇款单上注明上述各项)

户 名: 中国科学院微生物研究所
开户银行: 北京市工商银行海淀镇分理处
帐 号: 0200004509089117425
邮购地址: (100080) 北京市中关村中科院微生物研究所
《生物工程学报》编辑部 E-mail: cjb@sun.im.ac.cn
另: 2000, 2001 年期刊尚有少量余刊, 每册 20/23 元, 全年共 120/138 元, 欢迎订购 (免收邮费)。



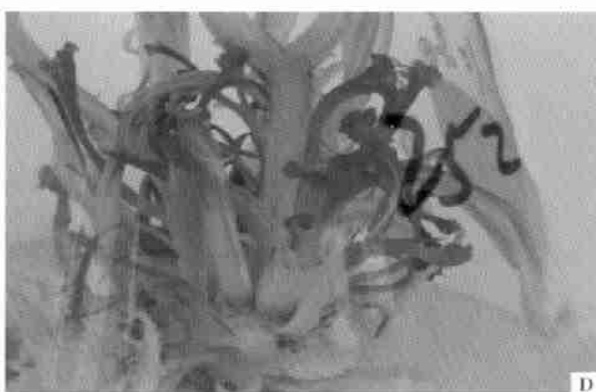
A. 培养 5~6 周后花瓣膨大黄绿色的基部
The petals of *C. sativus* after 5-6 weeks in culture



B. 花瓣上诱导形成的瓣状体
Formation of petal-like structures on the petal explants



C. 瓣状体中形成的黄色花柱-柱头状物
The yellow style stigma-like structure formed on the petal-like structures group



D. 瓣状体中产生的大量花柱-柱头状物
Formation of style-stigma-like structures from the petal-like structures