

西红花组织培养研究进展

王 桢,张永春,杨柳燕,蔡友铭,李青竹

(上海市农业科学院林木果树研究所/上海市设施园艺技术重点实验室,上海 201403)

摘要:为了研究人工繁育西红花种球的途径,笔者综述了国内外30多年以来的西红花组织培养研究进展,发现利用不同的外植体都有诱导形成小球茎或完整植株的报道,但是其诱导周期长、诱导率较低,未见进行大规模产业化生产的报道。因此,今后应该着重于研究如何缩短诱导周期,提高诱导率、增殖率,加快大球茎培育进程,并进行花器官和子房的组织培养研究,提高柱头状物诱导率,加强细胞大规模培养技术研究,推动次生代谢产物生产的规模开发。笔者就西红花组织培养的研究成果进行了归纳与综述,并对西红花组培进展进行了展望,以期为中国西红花种球规模化和产业化生产提供参考。

关键词:西红花;组织培养;研究进展

中图分类号:S6

文献标志码:A

论文编号:casb18010046

Tissue Culture of *Crocus Sativus* L.: Research Progress

Wang Zhen, Zhang Yongchun, Yang Liuyan, Cai Youming, Li Qingzhu

(Forest & Fruit Tree Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences/

Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403)

Abstract: The paper aims to study the ways of artificial breeding of saffron, we review the research progress on tissue culture of saffron in China and abroad for more than 30 years. It is found that the formation of small bulbs or intact plant could be induced by using different explants, but the induction period is long and the induction rate is low, so no large-scale industrial production is reported. Therefore, in the future, we should focus on how to shorten the induction period, increase the rate of induction and proliferation, and accelerate the process of the large bulb cultivation. In addition, the research should be carried on the tissue culture of flower organs and ovary, and the improvement of induction rate of stigma-like structure, and the large-scale culture of cell culture should also be strengthened to promote the scale development of the production of secondary metabolites. The paper summarizes the research progress on achievements of tissue culture of saffron, and discusses its future prospects in order to provide reference for large scale propagation and industrial production of saffron in China.

Keywords: saffron (*Crocus Sativus* L.); tissue culture; research progress

0 引言

西红花(*Crocus sativus* L.)为鸢尾科番红花属多年生球根草本,又名藏红花、番红花,原产于伊朗、西班牙和希腊等地中海沿岸国家,其他国家如土耳其、意大利、摩洛哥、日本等也有少量的栽培,其中伊朗的栽培

面积最大,年产约占全世界总量的80%。中国于20世纪60年代先后从日本、德国引进西红花种球资源进行栽培研究,现在很多地区如上海、浙江、江苏等地已经形成了较大面积的栽培规模^[1]。

西红花红色的干燥柱头和花柱可入药,其中含有

基金项目:上海市农委成果转化项目“西红花优质种球脱毒繁育技术成果转化与应用”(沪农科转字(2016)第2-4号);上海市花卉产业技术体系建设/市农委产业体系建设专项(沪农科产字(2017)第8号);上海植物种苗组培专业技术服务平台/市科委(研发平台专项)(15DZ2291000)。

第一作者简介:王桢,女,1986年出生,湖北人,助理研究员,博士,主要从事花卉育种与分子生物学研究。通信地址:201403 上海市奉贤区金齐路1000号 上海市农业科学院林果所,E-mail:413838512@qq.com。

通讯作者:蔡友铭,男,1965年出生,江苏人,研究员,博士,主要从事花卉育种与生产。通信地址:201403 上海市奉贤区金齐路1000号 上海市农业科学院林果所,Tel:021-52231163,E-mail:zhangyc@saas.sh.cn,642925790@qq.com。

收稿日期:2018-01-08,修回日期:2018-10-12。

的西红花甙(crocin)、西红花醛(safranal)和西红花酸(crocetin)等有效成分,具有活血化痰,凉血解毒,解郁安神之功效^[2],同时还有抗高血压、抗氧化、镇痛消炎、抗遗传毒性和细胞毒性的作用等^[3],是中国目前紧缺的名贵药材之一。同时,西红花还广泛应用于食品香料、天然染料等行业,集多种用途于一身,其经济价值居世界药用植物之首,被誉为“红色金子”^[4]。据统计,中国西红花年产量仅有20 t左右,只能满足需求的20%左右,因此,每年需要进口大量的西红花花丝及种球。

西红花引种到中国进行大规模栽培以来,未见有结实的报道,故不能进行有性繁殖,生产上多采用分球繁殖的方式,不仅繁殖系数低,还导致严重的种球病害和种球退化等问题,成为限制西红花产业壮大的主要限制因素^[5-6]。植物组织培养技术能够在较短时间内获得大量的无菌苗,繁殖系数高,因此已经成为很多观赏植物和药用植物的产业化生产手段。关于西红花组培已经有较多报道,研究表明通过球茎直接诱导丛生芽^[7-9],或者通过诱导愈伤再分化出芽^[10-13]等都能实现再生,但是在提高球茎诱导率、缩短诱导时间等方面还需要进一步提高。因此,笔者综述了利用组织培养等手段探索人工繁育西红花种球的途径,以期能够大大提高西红花种球繁殖系数,解决种源严重短缺和球茎病害、退化等问题。

1 西红花再生体系研究进展

1.1 外植体的选择、预处理及表面消毒

1.1.1 外植体的选择 植物组织或细胞的离体培养受生长素和细胞分裂素的调节,其生理状态和培养条件极

大地影响着器官的发生,其中决定培养成功的首要条件还是外植体的选择。以快繁为目的的体系建立多以西红花球茎、叶片、芽等作为外植体,而以获得次生代谢产物为目的的多以花柱、花被等花器官作为外植体。

西红花通过外植体直接诱导成芽或通过外植体诱导愈伤组织分化成芽,大多采用球茎作为外植体,一般将球茎切成0.5~1 cm见方的小块^[14-15],但也有通过叶片、芽和花器官诱导愈伤组织的报道^[16-19]。如杨永华等^[11]用西红花老叶、幼叶、芽及球茎为外植体,诱导愈伤组织,发现幼叶和芽具有高达99%的诱导率,而球茎作为外植体的诱导率只有80%,同时还发现初冬长出的幼叶比初春的老叶具有更高的愈伤诱导率。陈书安等^[12]对西红花的组织培养、悬浮培养等进行了大量的研究,发现通过球茎诱导出的愈伤组织呈颗粒状,黄色,生长快,而且只有部分褐化,能保持良好的生长趋势,因此,认为球茎是西红花愈伤组织诱导的理想外植体。球茎外植体切块大小也能影响其愈伤组织诱导和丛生芽产生。王寿芹等^[20]研究结果表明:以球茎作为外植体,产生丛生芽的能力从大到小依次为:5~6 mm见方、8~10 mm见方、13~15 mm见方、2~3 mm见方、整个球茎;带芽眼球茎的外植体形成丛生芽的能力大于没有芽眼的;靠近球茎顶部的外植体形成丛生芽的能力大于球茎下部的的外植体。最近,还有利用顶芽中间部位的1 mm厚度的横切或纵切细胞层作为外植体诱导愈伤组织,并成功获得小球茎的报道^[21]。总之,根据已有的文献报道,以球茎作为外植体,通过组织培养成功获得小植株或小球茎的研究最多(见表1)。

表1 西红花组织培养研究成果(部分)

| 外植体 | 基础培养基 ^a | 生长调节物 | 发育阶段 ^b | 形态学响应 | 参考文献 |
|--------|--------------------|------------|-------------------|--------|-------------------|
| 小球茎切块 | MS | KT | I | 芽 | 丁葆祖(1979) |
| 小球茎切块 | MS | 2,4-D | II | 小植株 | |
| 球茎 | MS | NAA、IAA | I, II, III | 愈伤、小植株 | 丁葆祖(1981) |
| 球茎切块 | MS | 2,4-D、6-BA | I | 愈伤 | 何凯(2002) |
| 愈伤 | MS | 6-BA、NAA | II | 丛生芽 | |
| 丛生芽 | MS | 6-BA、NAA | III | 球茎 | |
| 出芽球茎切块 | MS | 2,4-D、6-BA | I | 愈伤 | 陈书安(2003) |
| 胚性愈伤组织 | MS | 6-BA、NAA | I | 芽 | 陈文浩(2007) |
| 芽 | 1/2MS | 6-BA、NAA | III | 球茎 | |
| 球茎 | MS | 2,4-D、6-BA | I | 愈伤 | 张洁(2007) |
| 愈伤 | MS | NAA、6-BA | II | 丛生芽 | |
| 丛生芽 | MS | NAA、6-BA | III | 球茎 | |
| 球茎 | MS | IAA | I | 愈伤 | Ilahi et al(1987) |
| 丛生芽 | MS | 2,4-D、BAP | III | 小植株 | |

续表 1

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|-----------------|------------|------------------|-----------------------|
| 球茎切块 | 多种 | NAA、KT | I | 无 | Homes et al (1987) |
| 球茎切块 | B5,MS | 2,4-D、KT | II | 小球茎 | |
| 叶片基部 | N ₆ | 2,4-D | I | 愈伤 | Huang (1987) |
| 愈伤 | MS | 2,4-D、BAP | I, II | 芽 | |
| 芽 | 1/2MS | NAA、BAP | I | 茎 | |
| 柱头状结构 | | | I | 合成西红花素、西红花苷、西红花醛 | Himeno & Sano (1987) |
| 花组织切块 | LS/N ₆ | NAA、BAP | | 柱头状结构 | Himeno et al (1988) |
| 球茎不同部位、芽、柱头、花梗、叶片 | MS | 多种 | I | 愈伤、茎和根 | Milyaeva et al (1988) |
| 完整小球上分离的顶芽或侧芽 | | ZT、2,4-D、乙烯 | I, II, III | 叶片和球茎 | Plessner et al (1990) |
| 花瓣、胚珠 | MS | NAA、BAP、KT | I, II | 柱头状结构 | Otsuka et al (1992) |
| 茎尖分生组织 | LS | BAP、NAA | I | 体胚 | Ahuja et al (1994) |
| 体胚 | 1/2MS | GA ₃ | II | 成熟胚 | |
| 成熟胚 | 1/2MS | BAP、NAA | III | 植株、小球茎 | |
| 顶芽、侧芽、愈伤 | MS | IAA/NAA、ZT | II | 球茎 | Milyaeva et al (1995) |
| 茎尖分生组织 | LS | KT、2,4-D | I | 胚性愈伤 | Karamian et al (2010) |
| 原生质体 | MS | KT、2,4-D | II | 微型愈伤,胚性愈伤 | |
| 胚性愈伤 | 1/2MS | ABA | II | 成熟胚性愈伤组织 | |
| 成熟胚性愈伤组织 | 1/2MS | GA ₃ | III | 萌发的愈伤 | |
| 萌发的愈伤 | 1/2MS | BAP、NAA | III | 植株 | |
| 球茎切块 | MS | 2,4-D、BAP | I | 愈伤 | Zeybek et al (2012) |
| 愈伤 | MS | BA | II | 丛生芽 | |
| 丛生芽 | MS | IBA | III | 小球茎 | |
| 侧芽 | MS | 2,4-D、BAP | I | 长叶的茎 | |
| 长叶的茎 | MS | 2,4-D、BAP | II | 不定芽 | |
| 不定芽 | MS | BAP | III | 小球茎、根 | |
| 顶芽、侧芽 | MS | TDZ、PIC | I | 体胚 | Devi et al (2014) |
| 体胚 | MS | TDZ、PIC | II | 体胚 | |
| 体胚 | MS | BAP、NAA | III | 丛生芽、小球茎 | |
| 顶芽 1mm 细胞层 | MS | 2,4-D、BAP、NAA | I | 愈伤 | Azadi et al (2017) |
| 愈伤 | MS | BAP | II | 丛生芽 | |
| 丛生芽 | MS | BAP/NAA | III | 球茎 | |

注: *MS=Murashige & Skoog (1962); B5=Gambourg (1968); LS=Linsmaier & Skoog (1965); N₆=Nitsch & Nitsch (1969); ^b发育阶段: I—诱导阶段; II—再生和(或)增殖阶段; III—硬化、生根和球茎形成阶段。

1.1.2 预处理及表面消毒 选择球茎作为外植体时,部分文献中报道会进行低温处理和赤霉素浸泡的预处理方法,来打破休眠,认为处于休眠期的球茎对外源激素的敏感性低,不利于愈伤组织的快速诱导。张洁等^[11]把处于夏休眠期的小球茎置于4℃低温处理40天,消毒前再用0.5~1.0 mg/L GA 浸泡10 min;陈书安等^[12]将5—6月处于夏休眠的球茎在人工气候箱中通过10 h光照/14 h黑暗条件诱导出芽;王寿芹等^[20]在进行球茎消毒前采用4℃低温处理48 h打破休眠。

在对西红花外植体进行表面消毒时,多采用75%乙醇结合0.1%~1.0%升汞灭菌的方法,首先用75%乙醇浸泡30~60 s,无菌水冲洗3遍,再用0.1%~1.0%升汞浸泡5~10 min左右,无菌水冲洗5遍,基本可达到无菌要求^[7,11,19,22]。也有极少数的文献是利用次氯酸钠进行球茎外植体的消毒,陈书安等^[12,23]采用的方法是将整个球茎在70%乙醇中浸泡30 s,无菌水冲洗2遍,再用2%活性氯的次氯酸钠溶液消毒15 min,无菌水冲洗5遍;Sharifi等^[24]则是把球茎在70%乙醇中浸泡2 min,再用

1%次氯酸钠消毒 15 min。由于球茎长期在土壤中生长繁殖,携带的真菌、细菌等较多,同时球茎内部还存在大量的内生菌,所以在实验中,如果采用球茎作为外植体,要得到最低的污染率和较高的诱导率,升汞是最理想的消毒试剂。

1.2 组织培养体系的建立

目前对西红花组织培养研究主要集中于三方面:一是以带芽点的球茎切块作为外植体,直接诱导丛生芽,并在此基础上继续诱导形成小球茎或植株的快繁体系;二是以各种不同的外植体为材料,先诱导形成愈伤组织或体胚,再诱导形成丛生芽和小球茎的再生体系;三是以花器官为外植体,通过诱导愈伤组织,得到含有西红花素和西红花醛等有效成分的红色花柱-柱头状组织,以得到次级代谢产物为主要目的。

1.2.1 快繁体系的建立

以快繁为目的的体系构建多以球茎作为外植体。西红花快繁体系的构建都是以带芽点的球茎切块作为外植体,直接诱导出芽、长根,形成完整植株或诱导小球茎产生。

最早进行西红花组织培养研究的是 1979 年丁葆祖等利用西红花球茎切块在添加了 0.5 mg/L KT 或 1.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,诱导休眠芽点的萌发并最终形成了新的小球茎,同时还诱导形成了愈伤组织,经过一年多的继代培养,愈伤组织成功实现了芽的分化,开创了西红花组织培养研究的历史^[14,25]。1980 年,陈薇等^[26]将带有 2~3 片叶原基的组织块作为外植体,接种于含有 2 mg/L KT+0.5 mg/L IAA+1 mg/L NAA+4 mg/L 6-BA 的 MS 或 B5 培养基上,能使西红花球茎的生长点形成带根的小植株,在短日照条件下培养,也能开花,但是花瓣畸形,而花柱形态正常呈棕黄色,同时,在长日照条件下诱导 2~4 天,即能使已分化的花原基转变为叶原基,导致叶片生长,基部逐渐膨大产生小球茎。这是中国首次尝试建立西红花组织快繁体系并在试管内开花。之后,通过球茎诱导直接成芽的组培快繁也有较多报道。何凯等^[7]以带芽眼的小球茎切块作为外植体,弱光条件下在 MS+1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+7% CM 培养基上培养 1~2 月,再转至 MS+5 mg/L NAA+5 mg/L 6-BA 培养基上,黑暗条件下继代培养 1~2 次,丛生芽诱导率可达到 74%,将诱导出的丛生芽分割成单个的不定芽并转接至 MS+0.5 mg/L NAA+3 mg/L 6-BA 培养基上,能在光照条件下诱导分化出小球茎,继而长出完整植株。此外,丛生芽可置于黑暗条件下继续继代增殖,需要时再转入分化培养基即可持续获得新生小球茎。李军等^[27]以诱导出的丛生芽为材料,着重研究了不同固相支持物和有机添加剂

对西红花球茎的诱导作用,结果表明添加一定浓度的 NAA、香蕉泥、土豆泥和以卡拉胶为固相支持物对球茎的诱导效果最好,球茎诱导率达到 100%,平均直径达 8.52 mm。

1990 年, Plessner 等^[28]通过把整个小球茎接入含有 1 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中,并通过对顶芽制造微型伤口和乙烯处理的方式,在腋芽处得到了 15±3 个基部叶膨大的小球茎,而不做任何处理的小球茎上只产生 1±0 个。

1.2.2 器官发生途径再生体系的建立

植株再生主要通过 2 种方式进行:器官发生途径和体细胞胚发生途径。在过去 30 多年间,国内外很多研究者们对西红花的再生体系进行了大量的研究,他们的研究表明,器官发生途径和体细胞胚再生途径的植株再生都可以实现。其实在研究过程中,这 2 种途径并没有进行严格的鉴定,一般是愈伤组织诱导成功后再鉴定其是否是胚性愈伤组织。

大量文献报道显示,西红花的器官发生途径主要是通过外植体诱导产生愈伤组织,再诱导产生丛生芽、植株和小球茎。

丁葆祖等^[14,25]以带芽点的西红花球茎切块为外植体,在 MS+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L NAA 培养基上获得了较高的愈伤组织诱导率,诱导分化出的芽经过吲哚丁酸 IBA 处理后置于生长和生根培养基上可形成小球茎。

杨继祥等^[29]将嫩叶接种至 MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0~5.0 mg/L 6-BA 或 MS+2.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA 的培养基上,蔗糖浓度为 6% 并添加 300~500 mg/L 水解酪蛋白,室温光照条件下能诱导出愈伤组织,继续培养能形成不定胚继而分化形成小球茎。

刘咏梅等^[30]以萌芽后的球茎为外植体接种至 MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.2~0.5 mg/L 6-BA 培养基上,诱导率可达 100%,30 天后将愈伤组织转至 MS+5.0 mg/L NAA+5.0 mg/L 6-BA 培养基后,发现愈伤组织会继续长大,并形成致密的小团块状愈伤组织,之后团块状愈伤组织会长成小球茎,且上面有顶芽。同时以西红花完整的小球茎作为外植体,在 MS+0.2~0.3 mg/L NAA+2~3 mg/L 6-BA 的培养基上培养,与球茎切块外植体相比,出芽快而多;将无菌芽去尖接种到含较高浓度细胞分裂素(4 mg/L 6-BA)并附加少量生长素(0.2 mg/L NAA)的培养基上,对丛生芽诱导有利,将芽转接至 MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 培养基上,能长出小球茎,将带芽的小球茎接种至 1/2MS+1 mg/L 6-BA 培养基上,可得到 96% 的生根率。

张洁等^[11]以球茎为外植体,置于MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA培养基中,黑暗条件下培养,愈伤组织诱导率可达98%,将愈伤组织转入MS+5.0 mg/L NAA+5 mg/L 6-BA培养基中,可诱导产生丛生芽,将从生芽切成单个不定芽转移到MS+0.5 mg/L NAA+4 mg/L 6-BA培养基中,光照条件下可诱导产生新生小球茎。

国外研究者对西红花组织培养也进行了大量的研究,如Ilahi等^[10]利用球茎作为外植体,置于含有1 mg/L IAA+20 g/L椰子汁的MS培养基上,诱导产生愈伤组织,再在含有0.5~1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BAP的MS培养基上发育形成芽和小植株。2012年,Zeybek等^[15]利用球茎上的侧芽和球茎切块分别通过直接和间接器官发生途径,成功诱导得到小球茎。

1.2.3 体胚发生途径再生体系的建立 西红花的体胚发生途径主要是通过外植体诱导产生愈伤组织,再诱导产生不定胚、丛生芽、植株和小球茎。

陈书安等^[12]以芽周围2 cm左右的出芽后球茎切块为外植体,在MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L 6-BA培养基上,在(21±0.3)℃的黑暗环境下培养后获得了60%的愈伤组织诱导率,并认定为胚性愈伤组织。之后进一步优化了西红花胚性愈伤组织的发生及出芽条件,胚性愈伤组织在B5+3.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+400 mg/L CH固体培养基上,在22℃黑暗条件下培养,25天繁殖系数达到9 g/g;在1/2 B5+3.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+400 mg/L的固体培养基上,每天10 h光照,22℃条件下培养,45天后胚性愈伤组织出芽率达到44.7%^[31]。

陈文浩等^[8]在陈书安得到胚性愈伤的研究基础上,通过在MS+2.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA培养基中暗培养诱导丛生芽,再通过优化的1/2MS+5 mg/L NAA+5 mg/L 6-BA+0.5 g/L AC培养基诱导小球茎,5周球茎诱导率高达85.7%,球茎均重达0.53 g。

Ahuja等^[22]以茎尖分生组织作为外植体在4.5 mg/L BAP+3.7 mg/L NAA的LS培养基上诱导出胚性愈伤组织,之后在含有20 mg/L GA₃的1/2MS培养基上诱导发芽,继而在含有1.1 mg/L BAP+0.9 mg/L NAA+2% AC的1/2MS培养基上分化形成带小球茎的完整植株。Devi等^[19]利用无菌的顶芽和侧芽作为外植体,在含有0.5 mg/L TDZ+0.5 mg/L PIC的MS培养基上诱导产生体胚,并进行了体胚的增殖继代,最终在含有6 mg/L BAP+0.2 mg/L NAA的MS培养基上诱导体胚出芽和长小球茎。同时,该研究发现只有芽的基部膨大部分能够诱导产生体胚,可能是由于该部位具有分

生组织的活性。

Karamian等^[32]通过茎尖分生组织诱导胚性愈伤,并从胚性愈伤中分离出原生质体,通过培养原生质体进一步诱导产生微型愈伤和胚性愈伤组织,并通过诱导胚性愈伤组织的萌发产生新的植株。从胚性愈伤组织中分离原生质体可以为后续的诱导过程提供充足的原材料,但整个诱导周期需要4~5个月,其中具体的步骤和条件还需要进一步探索。

总体而言,西红花愈伤组织诱导过程比较长,不同外植体诱导效率差异较大,多数研究表明以球茎和茎尖分生组织作为外植体的诱导效率最高,愈伤组织状态较好,有利于后期的分化和成球。通常以MS培养基为基本培养基,配合不同浓度的6-BA, NAA和2,4-D激素,都能获得较高的愈伤诱导率。但也有其他的激素使用类型,Sheibani和Sharifi等^[24,33]都利用TDZ成功诱导出胚性愈伤组织,继而分化出丛生芽和小球茎。同时,有文献专门研究了丛生芽诱导小球茎的过程,认为小球茎的诱导需要低激素水平,高浓度激素会延长球茎诱导的时间,但可以提高球茎质量^[8]。

1.2.4 柱头状组织的诱导及悬浮培养 西红花主要入药部位是其柱头,如果能通过离体条件直接诱导获得大量的柱头状组织,并进行产业化生产,能有效解决西红花资源的短缺问题,产生巨大的经济效益。1980年,陈薇等^[29]尝试把未开放的花蕾中的花柱接种于含有3.0 mg/L 2,4-D+0.2~0.5 mg/L KT的MS培养基上,20℃短日照培养,只有个别材料能诱导出愈伤组织,且发生频率不高生长速度缓慢。1987年,Sano和Himeno^[34]以西红花的幼嫩柱头或半个子房为外植体,在含有KT(1.0 mg/L或5.0 mg/L)和NAA(0.1 mg/L或10 mg/L)的LS和N6培养基上,成功诱导出75个柱头状组织,通过TLC检测发现其中黄色的色素物质是西红花甙。1988年,Koyama等^[35]利用柱头的不同部位,成功在含有0.1 mg/L NAA+3.0 mg/L BAP的LS培养基上诱导出柱头和花柱状组织,并在这些组织中检测到西红花甙和其他色素,通过比较认为组织培养所得产物中的成分和含量与原柱头中所含的量相似。同时,值得注意的是,作者还发现只有花柱的基部能诱导形成愈伤组织,上部的柱头和中部的三叉分支部位都不能分化产生柱头和花柱状组织,认为可能是这两个部分缺少分生组织。Himeno等^[36]通过SEM观测发现,柱头状结构是从心皮或托杯的腹侧表皮层的切割边缘处产生的。这也许也能解释为什么陈薇等在用花柱诱导愈伤的过程中诱导率低。

随后,陆续有很多报道以西红花的半个或完整子

房、柱头、花被等作为外植体,成功诱导出花柱-柱头状组织^[37-43]。虽然不同外植体诱导出柱头状组织所需的激素水平及种类不同,但是都需要生长素NAA,同时糖的用量也会影响培养物的生长、分化和次生代谢等,有研究表明蔗糖浓度在6%时花柱-柱头状物诱导率为75%^[44],这也和Otsuka等^[45]研究得出的当蔗糖含量增加到5%~10%时能促进柱头状结构形成的结果一致。

虽然在离体条件下直接或间接诱导花柱-柱头状组织的研究取得了一定进展,但只有花被、花柱、子房等花器官作为外植体才能诱导形成柱头状物,而球茎、叶片、芽、花药等外植体却很难再生出柱头状结构,并且也未见关于柱头状物扩繁增殖的研究报道,使其能应用于次生代谢物提取的产业化水平不高。所以,越来越多的研究通过固液两步培养法和悬浮培养的方法进行次生代谢产物的合成。郭志刚等以叶鞘为外植体,先在固体培养基上诱导愈伤组织,再把愈伤转接入液体培养基中进行西红花甙(crocetin)的合成^[46]。Sarma^[39]等和Dufresh^[47]分别将西红花酸(crocetin)作为前体物质加入到悬浮培养基中,并在悬浮液中检测出了西红花甙(crocetin),可能是由于西红花酸(crocetin)的存在激活了西红花甙类物质的相关合成基因的表达。赵军等将花柱诱导产生的愈伤组织,在黑暗条件下悬浮培养,在悬浮液中检测到西红花苦甙(crocetin)和西红花醛(safranal),而在愈伤组织中只检测到西红花醛(safranal)^[48]。陈书安等通过优化培养基、接种量和种龄等,优化了悬浮培养体系,提高了愈伤组织和柱头状物合成西红花甙(crocetin)的含量^[12,49]。这些研究结果,为实现次生代谢物质的定性合成,通过生物反应器规模化生产西红花甙(crocetin)和西红花醛(safranal)等有效成分,解决西红花资源短缺等问题奠定了基础。

2 展望

西红花组织培养研究在国外开始的比较早,迄今为止,国内外已经有大量的文献报道了以不同外植体为材料成功获得小植株或小球茎的例子,但是未有进行大规模生产的报道。为了今后更好地开展西红花组织培养研究,加快其在实际生产中的产业化进程,可以从以下几个方面开展工作:第一,着重于缩短诱导周期,提高诱导率、增殖率,以及球茎发育的机理研究,加快大球茎培育进程,使西红花瓶内开花成为可能;第二,进行花器官和子房的组织培养技术研究,提高柱头状物诱导率,加强细胞大规模培养技术研究,推动次生代谢产物生产的规模开发;第三,进行西红花在中国引种栽培不结实的机理研究,加快育种进程,使西红花有性繁殖成为可能。通过对以上技术进

行深入研究,为今后西红花的育种、栽培及其规模化生产奠定技术基础,并在技术层面上缩小与其他花卉强国之间的差距。

参考文献

- [1] 黄卫娟,龙春林. 番红花的药用历史与现代研究[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2015,24(3):55-58.
- [2] 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:129.
- [3] Srivastava R, Ahmed H, Dixit R K, et al. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review[J]. Pharmacognosy Review, 2010, 4(8): 200-208.
- [4] 陈云章,李玉芳. 红色金子——西红花[J]. 中国农资, 2003, 21(4): 22-23.
- [5] 饶君凤,王根法,吕伟德. 浙江省西红花“二段法”优质高产栽培技术研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5214-5215.
- [6] 谢礼,吕明芳,董峰丽,等. 藏红花病毒病原的分子鉴定[J]. 中草药, 2013, 44(8): 1033-1036.
- [7] 何凯,颜纺,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.
- [8] 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, 2: 129-132.
- [9] Zeybek E, Önde S, Kaya Z. Improved in vitro, micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron[J]. Central European Journal of Biology, 2012, 7(1): 138-145.
- [10] Ilahi I, Jabeen M, Firdous N. Morphogenesis with Saffron Tissue Culture[J]. Journal of Plant Physiology, 1987, 128(3): 227-232.
- [11] 张洁,林春来,王立超,等. 西红花球茎组织培养的研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版, 2007, 32(1): 68-72.
- [12] 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]. 中国药学杂志, 2003, 38: 254-256.
- [13] George P S, Sujata Visvanath, Ravishankar G A, et al. Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): Somatic embryogenesis and shoot regeneration[J]. Food Biotechnology, 1992, 6(3): 217-223.
- [14] 丁葆祖,柏淑华,吴逸,等. 番红花球茎组织培养初报[J]. 植物生态学报:英文版, 1979(4): 91.
- [15] Zeybek E, Önde S, Kaya Zeki. Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron[J]. Cent. Eur. J. Biol., 2012, 7(1): 138-145.
- [16] Huang S Y. A study on tissue culture of *Crocus sativus* [J]. Plant physiology Communication, 1987, 6: 17-19.
- [17] Visvanath S, Ravishankar G A, Venkataraman L V. Induction of crocin, crocetin, picrocrocetin, and safranal synthesis in callus cultures of saffron: *Crocus sativus* L. [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1990, 12: 336-340.
- [18] 杨永华,陆军,马建平,等. 藏红花愈伤组织诱导及其细胞培养的研究[J]. 生物技术, 1996, 3: 15-17.
- [19] Devi K, Sharma M, Ahuja P S. Direct somatic embryogenesis with high frequency plantlet regeneration and successive cormlet production in saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. South African Journal of Botany, 2014, 93: 207-216.

- [20] 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.
- [21] Azadi P, Bagheri K, Gholami M. et al. Thin Cell Layer, a Suitable Explant for In vitro Regeneration of Saffron (*Crocus sativus* L.)[J]. J. Agr. Sci. Tech.2017,19:1429-1435.
- [22] Ahuja A, Koul S, Ram G. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron, *Crocus sativus* L.[J].Indian Journal of Experimental Biology,1994,32:135-140.
- [23] 陈书安,陈文浩,王晓东,等. 无毒藏红花组培芽的获取及其病毒检测[J]. 高技术通讯,2006,16(11):1170-1175.
- [24] Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, et al. Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron- induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.)[J].In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,2010,46(3):274-280.
- [25] 丁葆祖,柏淑华,吴逸,等. 番红花球茎愈伤组织的诱导及植株的再生[J]. 植物学报,1981,23(5):419-420.
- [26] 陈薇,黄瑞心. 番红花组织培养[J]. 植物生理学报,1980(1):27-28.
- [27] 李军,李白,高广春,等. 西红花组培球茎诱导关键技术[J]. 浙江农业科学,2016,57(2):211-213.
- [28] Plessner O, Ziv M, Negbi M. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.)[J].Plant Cell Tissue and Organ Culture,1990,20:89-94.
- [29] 杨继祥,苗淑侠. 番红花球茎的诱导[J]. 中药材科技,1984,6:1-2.
- [30] 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.
- [31] 陈书安,王晓东,赵兵,等. 藏红花胚性愈伤组织的发生及其调控[J]. 过程工程学报,2007,7(1):134-136.
- [32] Karamian R, Ranjbar M, Tsimidou M Z, et al. Efficient somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Crocus sativus* L.[J].Acta Horticulturae,2010,850:113-116.
- [33] Sheibani M, Nemati S H, Davarinejad G H, et al. Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ) [A].II International Symposium on Saffron Biology and Technology [C].2006:259-267.
- [34] Sano K, Himeno H. In vitro proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.)[J].Plant Cell Tissue and Organ Culture,1987,11:159-166.
- [35] Koyama A, Ohmori Y, Fujioka Y, et al. Formation of stigma-like structures and pigment in cultured tissues of *Crocus sativus* [J]. Planta Medica,1988,54:375-376.
- [36] Himeno H, Matsushima H, Sano K. Scanning electron microscopic study on the in vitro organogenesis of saffron stigma and style-like structures[J].Plant Science,1988,58:93-101.
- [37] Fakhari F, Evans P K. Morphogenic potential of cultured floral explants of *Crocus sativus* L. for in vitro production of saffron[J]. Journal of Experimental Botany,1990,41:47-52.
- [38] Sarma K S, Maesato K, Hara H T, et al. In vitro production of stigma like structures from stigma explants of *Crocus sativus* L.[J]. Journal of Experimental Botany,1990,41:745-748.
- [39] Sarma K S, Sharada K, Maesato K, et al. Chemical and sensory analysis of saffron produced through tissue cultures of *Crocus sativus* [J].Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1991,26:11-16.
- [40] 陆文樑,佟曦然,张冀. 离体培养西番红花花柱-柱头状物再生的研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,1992(4):134-137.
- [41] 贾勇炯,陈放,林宏辉. 番红花离体培养下花柱-柱头状物的诱导及植株再生[J]. 四川大学学报,1996,33(6):747-780.
- [42] 赵婷婷,唐琳,徐莺. 西红花的离体成花[J]. 植物生理学通讯,2005a, 41(1):64-66.
- [43] Mir J I, Ahmed N, Wani S H, et al. In vitro development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.) [J].Physiol Mol Biol Plants,2010,16(4):369-373.
- [44] 赵婷婷,唐琳,肖海波. 西红花柱头状物再生条件的优化[J]. 四川大学学报:自然科学版,2005b,42(6):1238-1241.
- [45] Otsuka M, Saimoto H, Murata Y, et al. Method for producing saffron stigma-like tissue and method for producing useful components from saffron stigma-like tissue: US, US5085995 [P].1992.
- [46] 郭志刚,刘瑞芝. 藏红花的叶鞘培养与藏红花素类物质的合成[J]. 清华大学学报:自然科学版,1999,39(12):4-7.
- [47] Dufresne, C. Glycosylation of encapsulated crocetin by a *Crocus sativus* L. cell culture[J].Enzyme and Microbial Technology,1999, 24:453-455.
- [48] 赵军,徐莺,颜访,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,2001,33(38):131-134.
- [49] 陈书安,王晓东,袁晓凡,等. 藏红花细胞悬浮培养体系的建立及优化[J]. 生物技术通报,2010,7:157-160.