

新思路、新技术、新方法

Novel Thinking & Technology

鸡冠花离体快繁及多倍体诱导

王军玲 汪卫星 郭启高 王忠猛 向素琼 李晓林 梁国鲁*

西南大学园艺园林学院, 重庆, 400716

* 通讯作者, lianggl@swu.edu.cn

摘要 以鸡冠花顶芽为外植体, 研究其离体快繁程序并在无菌体繁殖条件下探索了秋水仙素溶液不同浓度和时间处理对鸡冠花的诱变效应。快繁研究结果显示: 最适初代培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L; 以芽和茎段为培养对象诱导产生不定芽的最适培养基分别是 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.02 mg/L; 最佳生根培养基是 1/2 MS+IBA 0.4 mg/L。采用浸泡法将鸡冠花营养芽在 0.05%、0.1%、0.15%和 0.2%不同秋水仙溶液浓度下分别处理 12 h、24 h、36 h 和 48 h, 并对诱导处理后获得的再生植株进行鉴定, 得出以 0.15%秋水仙素溶液浸泡 36 h 为诱导多倍体的最佳处理组合, 诱导率达 23.3%。

关键词 鸡冠花, 离体培养, 多倍体, 秋水仙素诱导

in vitro Rapid Propagation and Polyploid Induction of *Celosia cristata*

Wang Junling Wang Weixing Guo Qigao Wang Zhongmeng Xiang Suqiong Li Xiaolin Liang Guolu*

College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing, 400716

* Corresponding author, lianggl@swu.edu.cn

Abstract The apical buds of *Celosia cristata* were used as the explants for the rapid propagation to compare the mutagenic effects treated with colchicines at different concentrations and time duration in tissue culture. The results of the rapid propagation showed that MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L would be the optimum medium for generation; MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L and MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.02 mg/L might be the favorable proliferate medium for adventitious buds obtained from buds and stems; the best rooting medium would be 1/2 MS+IBA 0.4 mg/L. the apical bud of *Celosia cristata* was immersed in 0.05%, 0.1%, 0.15% and 0.2% colchicine solutions for 12 h, 24 h, 36 h, 48 h respectively and the chromosome numbers of the root tip cells in the regenerated plantlets were examined, which showed that the treatment with 0.15% colchicine solution for 36 h would be the best combination that the polyploid rate could reached 23.3%.

Keywords *Celosia cristata*, *in vitro* culture, Polyploid, Induced by colchicine

鸡冠花 (*Celosia cristata*) 属于苋科 (*Amaranthaceae*) 青葙属 (*Celosia*), 一年生草本植物, 原产东亚及南亚亚热带和热带地区, 是重要的花坛花卉, 花序、种子可入药, 茎和叶可食 (刘燕, 2007)。鸡冠花为异花授粉植物, 品种间极易混杂, 造成种性退化, 留种栽培需重视隔离工作等特点 (王秀峰和李宪利, 2003)。目前, 学者们多针对鸡冠花的药、食价值进行研究 (陈静等, 2001; 2003; 李万里等, 2003; 1999; Ashraf and Kapoor, 2004; Baranwal and Verma, 1997; 彭子模等, 2003), 被推测为是一种很有开发利用前景的天然食药兼备的“功能性色素”资源 (李进等, 2004)。

组织培养是品种保存和种性纯化, 扩大栽培的有效途径, 而多倍体育种则是植物品种改良的重要手段。多倍体育种利用染色体加倍的剂量效应, 可增大植物的营养器官, 同时也能增强抗逆性, 而且倍性变化往往能导致次生代谢产物含量的变化, 是获得有效成分含量高的新品种一种快捷方法。目前, 相关鸡冠花快繁的研究报道很少 (韩会新和孙燕香, 2006; 周俊辉等, 2006), 因此本实验拟在对鸡冠花进行离体快繁系统研究的基础上, 采用组织培养结合化学诱导的方式获得鸡冠花多倍体新类型, 为获得观赏价值高、抗性强、药效成分增加等明显特点的鸡冠花新品种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及种子处理

西南大学果树实验室提供的鸡冠花(*Celosia cristata*)种子。将种子置于超净工作台,采用常规方法灭菌后,接种于 MS 培养基,25 d 左右,长成具 3~4 片真叶的无菌苗。

1.2 芽诱导培养

切取无菌苗顶芽接入以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA (mg/L,下同),NAA (mg/L,下同)的分化培养基(表 1),30 d 后观察结果。

1.3 继代增殖培养与试管苗生根

取生长相对一致的营养芽(顶芽和腋芽)及具 2~3 节的茎段,接入不同浓度增殖培养基(表 2,表 3),25 d 后观察结果。将生长健壮的试管苗,转接于生根培养基(表 4),15 d 后统计生根率,筛选出最佳生根培养基。

1.4 多倍体诱导与鉴定

采用浸泡法即将生长健壮的芽(留少许叶片),用不同浓度的秋水仙素溶液,分别处理 12 h, 24 h, 36 h 和 48 h,处理后接到增殖培养基培养。对诱导后获得

的材料进行外部形态初步判断,找出变异体,然后对其生根,采用去壁低渗火焰干燥法制片(李懋学和张赞平,1996),进行体细胞染色体数目的鉴定。

2 结果与分析

2.1 鸡冠花的快繁

2.1.1 激素对比对芽初代诱导培养的影响

如表 1 所示,6-BA 和 NAA 对鸡冠花的芽诱导起着重要的作用,在无激素的情况下,不能萌发出芽,而当加入激素后随浓度提高,出芽数增加。结果显示处理 10 诱芽最多,但芽小,生长表现不良,处理 7 芽增殖系数为 2.17 虽小于处理 10,但芽生长表现相对好,所以综合考虑以 6-BA 1.0+NAA 0.2 为最佳的初代培养基。

2.1.2 激素对比对继代增殖的影响

不同激素对比对营养芽培养的影响。通过观察统计芽的增殖生长,表明激素是诱导芽增殖的关键物质,适宜的激素组合可以使芽的增殖系数达到最高(表 2)。观察中发现单独使用 6-BA 芽增殖差,且多数不形成丛生芽,而是形成并生状态的芽,在随后的继代转接后发现它易向花芽转变。在处理组合中 6-BA 1.0+NAA 0.1 增殖系数 2.43,长势好,为最佳的

表 1 不同激素对比对芽初代培养的影响

Table 1 Effects of different hormone combinations on primary culture of *Celosia cristata*.

处理编号 Treatment number	处理 Treatment (mg/L)	接种芽(个) Inoculated number	新芽数(个) Bud number	增殖系数 Coefficient of multiplication
1	0.0+0.0	30	30	0.0
2	0.5+0.05	30	34	1.13
3	0.5+0.1	30	36	1.2
4	0.5+0.2	30	39	1.3
5	1.0+0.05	30	45	1.5
6	1.0+0.1	30	57	1.9
7	1.0+0.2	30	65	2.17
8	2.0+0.05	30	54	1.8
9	2.0+0.1	30	63	2.1
10	2.0+0.2	30	68	2.27

注:芽增殖系数=新芽数/接种数

Note: Coefficient of multiplication=Bud numbers/Inoculated numbers

表 2 不同激素对比对芽继代增殖培养的影响

Table 1 Effects different hormones combinations on subculture multiplication of *Celosia cristata*.

处理 Treatment	接种芽数(个) Inoculated number	新芽数(个) Bud number	增殖系数 Coefficient of multiplication
0.5+0.0	30	33	1.10
1.0+0.0	30	38	1.27
2.0+0.0	30	40	1.33
0.5+0.05	30	42	1.40
0.5+0.1	30	45	1.50
0.5+0.2	30	50	1.67
1.0+0.05	30	65	2.17
1.0+0.1	30	73	2.43
1.0+0.2	30	69	2.30
2.0+0.05	30	68	2.27
2.0+0.1	30	70	2.33
2.0+0.2	30	65	2.17

注:芽增殖系数=增殖后芽总数/接种芽数

Note: Coefficient of multiplication= total bud numbers/ Inoculated numbers

芽增殖培养基。

不同激素配比对茎段培养的影响。取具 2~3 节的茎段接入增殖培养基 (表 3)。观察发现提高 NAA 浓度,基部愈伤组织出现增多的现象;激素配合使用

对增殖效果更为明显,有随浓度的提高,形成的不定芽数上涨的趋势。结合增殖系数和生长状况,以 6-BA 1.0+NAA 0.02 为最佳增殖培养基。

2.1.3 生长素 IBA 对试管苗生根的影响

表 3 不同激素比对茎段增殖培养的影响

Table 1 Effects different hormones combinations on subculture of *Celosia cristata*

处理 Treatment 6-BA+NAA (mg/L)	接种数(个) Inoculated number	不定芽数(个) Number of adventitious bud	增殖系数 Coefficient of multiplication	不定芽生长情况 Growing situation of adventitious bud
0.2+0.0	30	48	1.6	长势正常 Growing normal
0.6+0.0	30	60	2.0	长势好 Growing normal
1.0+0.0	30	70	2.33	长势弱,芽稍小 Growing weak, small
0.2+0.02	30	60	2.0	长势弱 Growing weak
0.2+0.05	30	64	2.13	长势正常 Growing normal
0.2+0.1	30	75	2.5	长势正常 Growing normal
0.6+0.02	30	90	3.0	长势正常 Growing normal
0.6+0.05	30	100	3.33	长势稍弱 Growing weak
0.6+0.1	30	110	3.67	长势较差 Growing weak, bad
1.0+0.02	30	140	4.67	长势好,壮 Growing normal, strong
1.0+0.05	30	120	4.00	长势稍弱,芽小 Weak, small
1.0+0.1	30	102	3.4	芽小多畸形 Small, bad, weak

注: 增殖系数 = 不定芽数 / 接种茎段数

Note: Coefficient of multiplication = Number of adventitious bud / Inoculated number

表 4 IBA 对根诱导的影响

Table 4 Effects of IBA to induce the root formation of *Celosia cristata*

处理(mg/L) Treatment (mg/L)	接种数 Inoculated number	生根数 Rooting number	生根率(%) Rooting rate (%)	生根情况 Rooting state
1/2 MS	20	14	70	3~4 条根, 较细长 3~4 roots, slender
1/2 MS+IBA 0.2	20	18	90	5~6 条根, 细 5~6 roots, slender
1/2 MS+IBA 0.4	20	19	95	8~10 条根, 中等粗长 8~9 roots, medium
1/2 MS+IBA 0.6	20	17	85	5~7 条根, 粗短 5~7 roots, thick and short
1/2 MS+IBA 1.0	20	16	80	4~5 条根, 细 4~5 roots, slender

在附加不同浓度 IBA 的生根培养基上, 生根情况如表 4, IBA 对生根具有重要作用。5 种所试培养基以 1/2 MS+IBA 0.4 mg/L 效果最好, 生根率达 95%, 根多且粗壮。

2.2 多倍体的诱导

2.2.1 秋水仙素对材料的诱导影响

实验发现, 秋水仙素对芽的影响很大, 处理后接

在增殖培养基上, 在后来生长中, 可以明显观察到叶片发生肿大, 且 20 天左右时应及时进行二次转接, 这样才能诱发处理芽的萌发, 形成丛生芽, 否则, 材料下部将长出很多愈伤组织, 随后变黄变黑, 最终死亡。

由表 5 可见, 随着秋水仙素浓度的提高和处理时间的延长, 茎尖的生长受抑制程度大。当浓度为 0.2%, 处理 48 h 时, 仅 40% 的茎尖能够存活。相同浓度下, 处理时间与其受伤害程度也呈正相关即随时

表 5 秋水仙素不同处理浓度和时间处理组合对鸡冠花的诱导影响

Table 5 The induction effect on *Celosia cristata* treated by colchicines with different concentration and time

处理浓度(%) Treatment concentration (%)	处理时间(d) Treatment time (d)	处理数 Treatment number	死亡数 Death number	死亡率(%) Death reatio (%)	获得多倍体情况(株) Obtained polyploids		诱导率(%) Inducing ratio (%)
					嵌合体 Chimerism	4× Tetraploid	
CK	0	0	0	0	0	0	0
0.05	12	30	0	0	0	0	0
	24	30	1	3.3	0	0	0
	36	30	4	13.3	1	0	3.3
	48	30	6	20	2	1	10
0.1	12	30	2	6.7	0	1	3.3
	24	30	2	6.7	2	1	10
	36	30	6	20	2	2	13.3
	48	30	11	36.7	2	0	6.7
0.15	12	30	3	10	3	0	10
	24	30	5	17	5	2	23.3
	36	30	8	27	3	4	23.3
	48	30	13	43.3	3	2	16.7
0.2	12	30	8	27	1	1	6.7
	24	30	9	30	3	1	13.3
	36	30	12	40		1	3.3
	48	30	18	60	0	0	0

间延长, 伤害度加重。结果表明: 0.15% 秋水仙素处理 24 h 和 36 h, 诱导率均达到 23.3%, 但处理 24 h 时获得的嵌合体较多, 后代分离麻烦, 最终选择以 0.15% 秋水仙素浸泡 36 h 为最佳处理组合。

2.2.2 倍性的鉴定

形态鉴定法。多倍体的巨大性为此提供了可靠的理论基础。经秋水仙素处理鸡冠花获得的材料, 与二倍体比较一部分显示叶片加厚, 颜色浓绿, 叶柄加粗, 分化能力弱, 且生长迟缓等特点(图 1-A, B), 因此, 初步判断为多倍体。另外发现, 形态上表现为多倍体特征的植株, 生长中易出现茎尖死亡的现象(图 1-C), 对于这类植株应尽快切取下部愈伤组织和死的顶端部分, 转入新鲜培养基, 促其再发, 否则将往下逐渐坏死(图 1-D)。

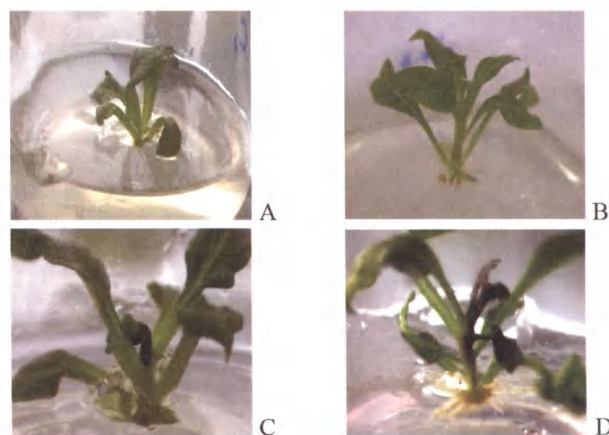


图 1 形态特征对照

注: A: 四倍体植株; B: 二倍体植株; C, D: 茎尖死亡植株

Figure 1 Comparison of morphological characteristic

Note: A: Tetraploid plant; B: Diploid plant; C, D: Death of plantlet shoot-tip

染色体计数法。染色体计数法是最直接最准确的鉴定方法。将未经诱导的离体再生植株的根尖,进行染色体的检测,结果发现其染色体数目均为 $2n=2x=36$ (图 2-A),未发现其它倍性植株。对经形态鉴定为多倍体的植株,在经染色体鉴定后证明,外部形态与细胞学检验结果有很好的一致性,获得了嵌合体和纯合的多倍体植株。所得多倍体的染色体数目为 $2n=4x=72$ (图 2-B)。

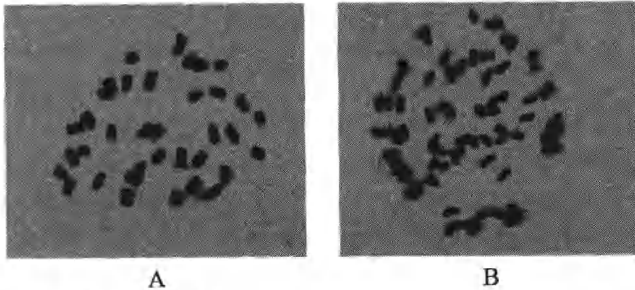


图 2 体细胞染色体数

注: A: 二倍体细胞染色体数 ($2n=2x=36$); B: 四倍体细胞染色体数($2n=4x=72$)

Figure 2 The chromosome number of somatic cell

Note: A: The chromosome number of diploid ($2n=2x=36$); B: The chromosome number of tetraploid ($2n=4x=72$)

3 讨论

在植物的离体快繁中,激素是重要的调控因子。韩会新和孙燕香(2006)采用鸡冠花 4~5 d 苗龄子叶、子叶节产生愈伤组织分化芽进行快繁,而本实验是采用鸡冠花部位不同即茎段和营养芽分别进行增殖实验,比较得出鸡冠花不同部位对激素种类及浓度比例要求有所差异。另外,周俊辉等(2006)研究发现鸡冠花组织培养中出现的严重玻璃化现象,在本实验中未发现。

秋水仙素是诱导染色体加倍的一种常用药剂,应用上可以采用多种方法如混培法(何林等,2006)、先预培养后处理法等(李政等,2007),本实验仅采用浸泡法来研究诱导鸡冠花的最适浓度和时间。不同方法间的比较研究,正在继续实验。另外通过人工加倍产成多倍体只是多倍体育种的第一步,为多倍体育种创造了原始材料,在此基础上我们还必须对这些材料进行人工定向选育,才能得到理想的类型。

关于变异植株茎尖死亡现象,有可能是由于秋水仙的诱导毒害作用的原因,而茎尖又是对相当敏感的部位,稍有不妥,首先表现死亡。对此,还需进一步的探讨。

在进行多倍体诱导研究中,嵌合体的出现是普遍存在的问题。本次实验中秋水仙液浓度 0.15%左右比较适合诱导四倍体,但嵌合体出现的机率也很高,最高达到 16.7%。因嵌合体中二倍和高倍性细胞同时存在,且较容易回复成二倍体,所以要加强嵌合体利用及分离。例如通过对其进行不断的切割分离及作为进一步诱导材料等,加以防止回复。

参考文献

- Ashraf G., and Kapoor H.C., 2004, Modifications in the purification protocol of *celosia cristata* antiviral proteins lead to protein that can be N-terminally sequenced, *Protein and Peptide*, 11(6): 555-561
- Baranwal V.K., and Verma H.N., 1997, Characteristics of a virus inhibitor from the leaf extract of *Celosia cristata*, *Plant Pathology*, 46: 523-529
- Chen J., Jiang X.M., Li T., and Chen W.Y., 2001, Research of haemostatic effect mechanism of *celosia cristata*, *Beihua Daxue Xuebao (Journal of Beihua University (Natural Science Press))*, 2(1): 39-40 (陈静,姜秀梅,李坦,陈万宇,2001,鸡冠花止血作用机制研究,北华大学学报,2(1): 39-40)
- Chen J., Wu F.L., Zhang M.Z., and Fan C.X., 2003, Effects of *Celosia cristata* on the immunological function in mice, *Zhongguo Gonggong Weisheng (China Public Health)*, 19(10): 1225 (陈静,吴凤兰,张明珠,范存欣,2003,鸡冠花对小鼠免疫功能的影响,中国公共卫生,19(10): 1225)
- Han H.X., and Sun Y.X., 2006, The control of different hormones on clonal propagation *in vitro* of *Celosia cristata*, *Hebei Linye Keji (Journal of Hebei Forestry Science and Technology)*, 4: 13-14 (韩会新,孙燕香,2006,不同激素组合对鸡冠花离体快速繁殖的调控,河北林业科技,4: 13-14)
- He L., Zhang J., Guo Q.G., and Liang G.L., 2006, Polyploidy induction and rapid proliferation in tiber of *Lilium oriental*, *Xinan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition))*, 28(6): 945-949 (何林,张洁,郭启高,梁国鲁,2006,东方百合 Tiber 多倍体诱导及其快繁研究,西南农业大学学报(自然科学版),28(6): 945-949)
- Li J., Peng Y., Peng Z.M., Song X.H., and Shi D.H., 2004, Study on the safety of edible pigments of *Celosia cristata*, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 14(3): 43-45 (李进,彭宇,彭子模,宋旭红,时德红,2004,鸡冠花食用色素安全性的研究,生物技术,14(3): 43-45)
- Li M.X., and Zhang Z.P., 1996, *Crop chromosome and its research technology*, China Agriculture Press, Beijing, China, pp.23-37 (李懋学,张赞平,1996,作物染色体及其研究技术,中国农业出版社,中国,北京,pp.23-37)
- Li W.L., Tian Y.H., and Shen G.X., 2003, Effect of flavonoid of

- celosia cristata* on mineralization and IGF-1 expression, *Zhongguo Gonggong Weisheng* (China Public Health), 19 (11): 1392-1393 (李万里, 田玉慧, 沈关心, 2003, 鸡冠花黄酮类对成骨细胞矿化和 IGF-1 的作用, 中国公共卫生, 19 (11): 1392-1393)
- Li W.L., Wang P., Wang S.Y., Tian Y.H., and Liu X.L., 1999, Effects of the extract of *Celosia cristata* and calcium on bone metabolism of fluorosis rats, *Xinxiang Yixueyuan Xuebao* (Journal of XinXiang Medical College), 16 (4): 289-291 (李万里, 王萍, 王守英, 田玉慧, 刘晓丽, 1999, 钙与鸡冠花提取物对氟中毒大鼠骨代谢的影响, 新乡医学院学报, 16(4): 289-291)
- Li Z., Huang J.J., and Li L., 2007, Polyploidy induction in *Euphorbia tirucalli* L. with colchicines, *Xinan Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition)), 29(2): 106-110 (李政, 黄静洁, 李凌, 2007, 秋水仙碱诱导绿玉树多倍体研究, 西南农业大学学报(自然科学版), 29(2): 106-110)
- Liu Y., ed., 2007, Landscape flowers, China forestry press, Beijing, China, pp.120 (刘燕, 主编, 2007, 园林花卉学, 中国林业出版社, 中国, 北京, pp.120)
- Peng Z.M., Gao Y., and Peng Y., 2003, The measurement on rough components and harm trace elements of edible pigment of flower of *Celosia cristata* L. of Xinjiang, *Xinjiang Shifan Daxue Xuebao* (Journal of xinjiang normal university (Natural Science Edition)), 22(4): 39-42 (彭子模, 高雁, 彭宇, 2003, 新疆鸡冠花食用色素粗成分与有害微量元素含量的测定, 新疆师范大学学报(自然科学版), 22(4): 39-42)
- Wang X.F., and Li X.L., eds., 2003, Special horticulture (Northern Version), China Agriculture Press, Beijing, China, pp. 458-459 (王秀峰, 李宪利, 主编, 2003, 园艺学各论(北方本), 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.458-459)
- Zhou J.H., Chen Z.Q., Yu Z.L., and Lu J.T., 2006, Preliminary study on vitrification and its control in isolated culture of *Celosia cristata* L., *Jiangxi Nongye Xuebao* (Acta Agriculturae Jiangxi), 18(4): 88-90 (周俊辉, 陈志强, 余卓玲, 卢俊图, 2006, 鸡冠花离体培养中的玻璃化现象及其控制的初步研究, 江西农业学报, 18(4): 88-90)

2007 年农业科学综合类期刊影响因子排名 《分子植物育种》2006 年影响因子 0.918, 排名第 5

序号	刊名	影响因子	序号	刊名	影响因子
1	中国农业科学	1.570	21	农业环境与发展	0.272
2	农业环境科学学报	1.123	22	亚热带农业研究	0.248
3	农业现代化研究	1.122	23	农业科技通讯	0.245
4	中国农业气象	1.042	24	Agricultural Sciences in China	0.242
5	分子植物育种	0.918	25	热带农业科技	0.236
6	农业科技管理	0.879	26	现代化农业	0.240
7	农业系统科学与综合研究	0.815	27	中国农业信息	0.193
8	中国生态农业学报	0.708	28	现代农业科技	0.169
9	中国农业科技导报	0.662	29	农民致富之友	0.163
10	干旱地区农业研究	0.628	30	Agricultural Science & Technology	0.135
11	世界农业	0.614	31	现代农业	0.106
12	农业质量标准	0.580	32	中国农村科技	0.100
13	中国农业资源与区划	0.545	33	世界热带农业信息	0.094
14	古今农业	0.471	34	农村、农业、农民	0.080
15	中国农学通报	0.432	35	中国热带农业	0.079
16	热带农业科学	0.422	36	当代生态农业	0.063
17	山地农业生物学报	0.394	37	中国农垦	0.049
18	农业科学研究	0.357	38	新农业	0.041
19	特产研究	0.298	39	农业知识	0.039
20	特种经济动植物	0.288		农家顾问	0.017