

# 花色素苷含量高的鸡冠花愈伤组织系的筛选

王惠珍<sup>1</sup>, 孟祥春<sup>2</sup>, 王小菁<sup>2</sup>

(1. 佛山科学技术学院生命科学院, 广东佛山 528231; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广州, 510631)

**摘要:**以凤尾鸡冠花(*Celosia cristata* var. *pyramidalis*)无菌苗下胚轴为外植体, 于添加  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D 和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 的  $\text{B}_5$  培养基上诱导出产花色素苷的愈伤组织。在愈伤组织的继代过程中, 筛选出二种不同颜色的花色素苷含量高的愈伤组织系 JSA10(洋红)和 JSA25(橙红)。比较研究 JSA10 和 JSA25 愈伤组织生长及花色素苷的产量, 其生长曲线均呈“S”形。花色素苷的积累主要在愈伤组织的缓慢生长期。JSA10 的生长及花色素苷的积累能力均强于 JSA25。

**关键词:** 凤尾鸡冠花; 愈伤组织; 花色素苷; 生长; 筛选

**中图分类号:** S603.6; S681.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2004)01-0058-03

花色素苷属于黄酮类物质, 广泛存在于植物体各器官特别是花中<sup>[1]</sup>, 可赋予植物体鲜艳夺目的色彩。花色素苷作为天然色素, 可用作食品、化妆品的着色剂, 有些还具有药用价值, 与人工色素相比, 具有无毒、无副作用等优点<sup>[2,3]</sup>。花色素苷的生产受到植物资源、生长季节、提取工艺等方面的限制。因此, 用植物细胞培养技术生产包括花色素苷在内的次生物质是当前生物工程中最活跃的研究领域之一<sup>[4]</sup>。

凤尾鸡冠花(*Celosia cristata* var. *pyramidalis*)为苋科植物, 叶、茎及穗部呈鲜艳红色, 花色素苷含量高。鸡冠花红色素可作为天然色素并具有药用价值<sup>[3]</sup>。以鸡冠花为材料进行细胞培养产花色素苷的研究, 目前尚未见报道。本试验以凤尾鸡冠花无菌苗下胚轴作外植体, 诱导产生愈伤组织, 从中筛选并建立花色素苷含量高且稳定的愈伤组织系 JSA10(洋红)和 JSA25(橙红), 及白色的愈伤组织系 JSB25, 并探讨了 JSA10 和 JSA25 愈伤组织的生长与花色素苷的积累规律, 为建立高产花色素苷的植物组织培养系统提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 鸡冠花无菌苗的获得

凤尾鸡冠花(*Celosia cristata* var. *pyramidalis*)种子, 由深圳莲花山公园谢佐桂赠送。种子经 70% 的乙醇表面消毒 1 min(分钟), 再用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 12 min(分钟), 无菌水冲洗 3 次, 接种到 MS 培养基上, 于  $25^\circ\text{C}$  温度,  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  光强, 每天光照 14 h(小时)培养。

### 1.2 愈伤组织的诱导及继代培养

以  $\text{B}_5$  作为基本培养基, 添加不同的激素配比组成诱导及继代培养基。培养基中蔗糖  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 琼脂  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH

5.8~6.0,  $0.1 \text{ MPa}$ (兆帕)灭菌 15 min~20 min(分钟)。以 20 d(天)龄的无菌苗下胚轴作外植体接种于诱导培养基上诱导出愈伤组织, 取红色疏松的新鲜愈伤组织 1 g(克), 接种于继代培养基中, 每 15 d(天)继代一次。培养温度和光照条件同种子萌发培养阶段。每瓶培养基量为 25 ml(毫升)。

### 1.3 愈伤组织生长的测定

以愈伤组织的鲜重、干重及两者增长量来衡量愈伤组织的生长。取出每一培养单位(瓶)的愈伤组织于电子天平上称重, 为其鲜重。将愈伤组织于  $80^\circ\text{C}$  干燥至恒重后称重, 为愈伤组织干重。

愈伤组织鲜重(干重)增长量( $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ )= 每 2 天鲜重(干重)增长量/2。

### 1.4 花色素苷的测定

花色素苷含量测定依据参考文献<sup>[5,6]</sup>, 略作改动。取新鲜愈伤组织 1 g(克), 用含 1% 盐酸的甲醇 5 ml(毫升),  $4^\circ\text{C}$  浸提 4 h(小时), 离心后测上清液在 530 nm(纳米)和 657 nm(纳米)处的光吸收值(分光光度计, 日本岛津 UV-2100)。以公式  $\Delta A = A_{530} - 0.25A_{657}$  计算花色素苷相对含量( $\Delta A \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ )。

花色素苷相对产量/瓶( $\Delta A, \text{flask}^{-1}$ )= 花色素苷相对含量( $\Delta A \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ ) $\times$  每瓶愈伤组织鲜重( $\text{gFW}$ )。

以上数据测定均为三次重复, 取平均值。

## 2 结果和分析

表 1 不同激素配比下, 鸡冠花愈伤组织诱导率、

愈伤组织生长及花色素苷产量的比较

激素配比	愈伤诱导率 (%)	鲜重 (g)	花色素苷相对含量 ( $\Delta A \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ )	花色素苷相对产量 ( $\Delta A \cdot \text{flask}^{-1}$ )
2,4-D <sub>0.1</sub> +BA <sub>0.5</sub>	93.29 $\pm$ 1.56	2.95 $\pm$ 0.37	0.29 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.14
2,4-D <sub>0.2</sub> +BA <sub>0.5</sub>	86.18 $\pm$ 3.52	1.82 $\pm$ 0.21	0.17 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.06
2,4-D <sub>1.0</sub> +BA <sub>0.5</sub>	70.86 $\pm$ 4.06	0.50 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01

### 2.1 愈伤组织的诱导

外植体接种于诱导培养基上, 诱导培养基为添加不同激素配比的  $\text{B}_5$  培养基。愈伤组织的诱导率、生长及花色素苷的积累见表 1。结果表明添加  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D 和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 最适合愈伤组织诱导, 诱导率可达 93%, 并且诱导的愈伤组织生长好, 且富含花色素苷。



**第一作者简介:** 王惠珍, 女, 1963 年生, 江苏省宜兴市人。1986 年南京农业大学本科毕业。2002 年获华南师范大学硕士学位。职称讲师。现主要从事植物学教学科研工作。主要研究方向植物组织培养。

收稿日期: 2003-10-22

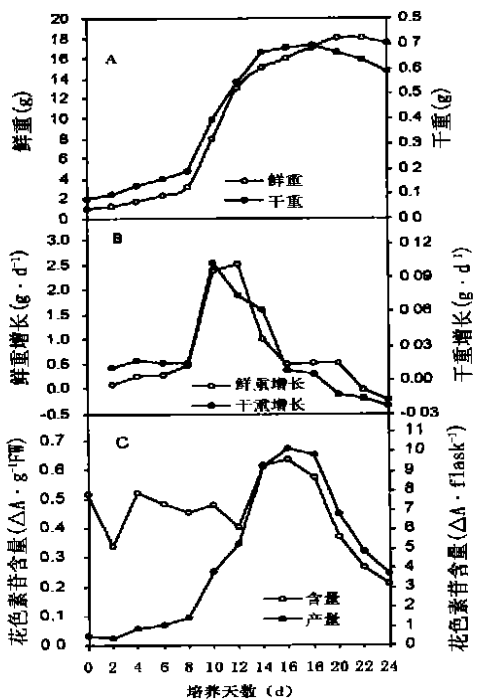


图1 继代培养过程中, JSA10 愈伤组织生长及花色素苷产量的变化

色素苷的产量, 结果如表 2。

表 2 JSA10、JSA25 及 JSB25 愈伤组织生长及花色素苷产量的比较

愈伤组织系	鲜重(g)	干重(g)	花色素苷相对含量(ΔA·g <sup>-1</sup> FW)	花色素苷相对产量(ΔA·flask <sup>-1</sup> )
JSA10	16.00±0.21	0.68±0.04	0.64±0.06	10.16±1.05
JSA25	14.13±0.35	0.64±0.02	0.48±0.06	6.72±0.86
JSB25	10.15±1.25	0.52±0.02	0.02±0.01	0.14±0.02

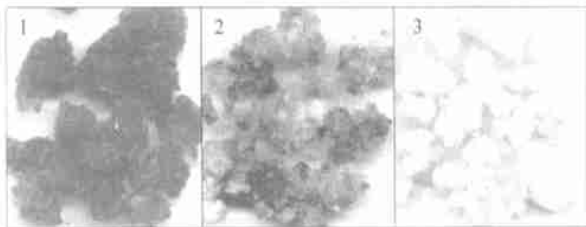
由表 2 中可知, JSA10 和 JSA25 的鲜重、干重和花色素苷产量均显著高于 JSB25, 鲜重比 JSB25 分别提高 57.6% 和 39.2%, 干重的增长有所降低。花色素苷的相对含量及产量均显著高于 JSB25, 是 JSB25 的 30~70 倍。可见, JSA10 和 JSA25 是花色素苷含量高的愈伤组织系。进一步比较发现, JSA10 比 JSA25 的生长和花色素苷积累能力强。

我们进一步观察比较了三种愈伤组织的细胞, JSA10 细胞中色素分布均匀, 色泽鲜艳(图版 II-1), 而 JSA25 细胞的色素分布不够均匀, 色泽深浅不一(图版 II-2), 这与 JSA25 愈伤组织色素分布不够均匀相一致。JSB25 的细胞呈白色, 花色素苷积累极少, 有些细胞有分化现象(图版 II-3)。

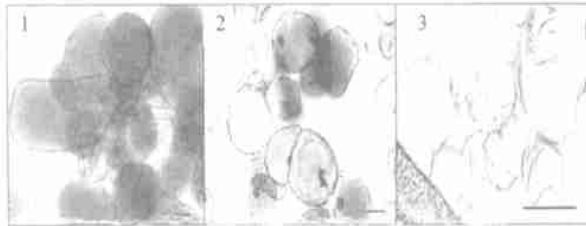
2.3 JSA10 愈伤组织的生长及花色素苷的积累

JSA10 的生长曲线呈“S”形, 愈伤组织接种后前 8 d(天)生长缓慢, 以后开始快速生长, 鲜重在 20 d(天)时达到最高, 干重则在 18 d(天)达到高峰, 分别为接种时增加 18.1 倍和 7.6 倍(见图 1A)。

图版 I



图版 II



图版说明: 从鸡冠花无茎苗下胚轴诱导筛选的三种愈伤组织系

- I: 1. 洋红愈伤组织系-JSA10;  
2. 橙红愈伤组织系-JSA25;  
3. 白色愈伤组织系-JSB25.
- II: 三种不同颜色的愈伤组织细胞:  
1. JSA10 愈伤组织细胞;  
2. JSA25 愈伤组织细胞;  
3. JSB25 愈伤组织细胞.

图 2 继代培养过程中, JSA25 愈伤组织生长及花色素苷产量的变化

2.2 花色素苷含量高的愈伤组织系的筛选

选取红色疏松的愈伤组织进行继代培养, 结果表明, 添加  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D 和  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 的 B<sub>5</sub> 培养基最适合愈伤组织的继代培养, 在继代过程中, 愈伤组织快速生长, 花色素苷含量高。继代培养 4~5 代后, 我们筛选出二种不同颜色的花色素苷含量高的稳定愈伤组织系, 命名为 JSA10(洋红, 图版 I-1)和 JSA25(橙红, 图版 I-2), 以 JSB25(白色, 图版 I-3)作为对照。将 JSA10、JSA25 和 JSB25 的愈伤组织 1 g(克)接种于继代培养基上, 16 d(天)后比较愈伤组织的生长及花

图 1B 为 JSA10 愈伤组织鲜重和干重增长量的变化。愈伤组织在第 8 d(天)进入快速增长期, 鲜重增长在第 10 d~12 d(天)达到高峰, 每天增重达 2.5 g(克)左右, 然后迅速下

降,在第16 d~20 d(天),增长量一直维持在每天0.5 g(克)左右低水平上,到22 d(天)开始出现负增长。干重增长在第10 d(天)达到最高,每天增重0.1 g(克),继后迅速下降,到20 d(天)就出现负增长。

图1C显示了JSA10生长过程中花色素苷的积累进程。由图可知,接种后2 d(天)内愈伤组织中花色素苷含量有所下降,之后的2 d(天)内恢复到起始水平,此后8 d(天)内变化不大,12 d(天)花色素苷含量开始急剧升高,在16 d(天)达到最高水平,之后花色素苷含量开始快速下降。由于前期愈伤组织生长缓慢,花色素苷产量在前8 d(天)内增长很慢,第8 d(天)到14 d(天)开始快速增长,16 d(天)最高,18 d(天)起产量迅速下降。以上结果表明,花色素苷的积累前期与愈伤组织生长变化相吻合,在愈伤组织生长达到高峰时,花色素苷的含量及产量也最高。后期受愈伤组织生长和花色素苷含量都下降的影响,花色素苷产量也迅速下降。

#### 2.4 JSA25愈伤组织生长及花色素苷的积累

JSA25的生长曲线也呈“S”形,但其对数生长期不明显,在生长前期呈匀速增长,到第18 d(天)愈伤组织的鲜重和干重达到最大,分别为接种时的15.2倍和9.1倍(见图2A)。

图2B为JSA25生长过程中鲜重和干重增长的变化。鲜重和干重在第6 d(天)即进入快速增长期,在第8 d(天)达到最高。鲜重每天增重2.13 g(克),此后生长量下降,在第12 d~18 d(天),每天增长量维持在0.4 g(克)的低水平上,到20 d(天)开始出现负增长。干重增长与鲜重增长变化基本一致。与JSA10相比,JSA25的生长较弱,进入对数生长期提前2 d(天),增长高峰维持的天数较少,较快进入缓慢生长期,提前2 d(天)出现了负增长。

图2C为JSA25生长过程中花色素苷积累的变化。JSA25的花色素苷积累的延滞期较长,在接种后前4 d(天)花色素苷含量显著下降,至接种后8 d(天)才恢复到起始水平,然后一直波动在这一水平,至16 d(天)达到最高,18 d(天)后花色素苷含量开始下降。JSA25中花色素苷的产量从第6 d(天)起就快速增长,16 d(天)时达到最高,18 d(天)起开始下降,说明JSA25花色素苷产量的高峰期较短。

### 3 讨论

以凤尾鸡冠花无菌苗下胚轴为外植体诱导产生愈伤组织,诱导率高,诱导的愈伤组织疏松,含色素,适宜用来建立高产花色素苷的细胞培养体系。我们在筛选诱导愈伤组织时,发现培养基中的激素配比对鸡冠花愈伤组织诱导及花色素苷积累的调节较为关键。

鸡冠花愈伤组织的生长曲线符合“S”形的规律。即首先有一个延滞期;再进入对数生长期,在这一时期,细胞分裂生长旺盛,愈伤组织增长量大;接着进入缓慢增长期,此时细胞分裂生长速率开始减慢,但由于细胞基数大,愈伤组织的生长量仍在增加,细胞进入衰老期后,生长停止。花色素苷主要在细胞的缓慢生长期积累,之后随着细胞的衰老快速下降。

在我们筛选出的两个花色素苷含量高的愈伤组织系中,JSA10的愈伤组织生长及花色素苷的积累能力均强于JSA25。要高产花色素苷,必须综合考虑愈伤组织生长量和花色素苷产量两个方面。而愈伤组织的生长及花色素苷的积累还受光质、光强、温度、植物激素等其它外界环境因子的影响<sup>[7]</sup>。我们也注意到,JSA10和JSA25继代中颜色的保持需要光的诱导,光质对花色素苷积累有明显的调节,进一步的研究正在进行之中。

#### 参考文献:

- [1] 孟繁静.植物花发育的分子生物学[M].北京:中国农业出版社,2000.225~256.
- [2] 方忠祥,倪元颖.花青素生理功能研究进展[J].广州食品工业科技,2001,17(3):60~62.
- [3] 蔡建芬.我国天然食用色素的开发利用研究[J].泉州师范学院学报(自然科学),2000,18(4):56~59.
- [4] 杜金华,张开利,郭勇.用植物细胞培养技术生产花色素苷[J].山东农业大学学报,1997,28(4):511~522.
- [5] Weiss D, Halevy AH. Stamens and gibberellin in regulation of corolla pigmentation and growth in *Petunia hybrida*[J]. Planta 1989, 179:89~96.
- [6] 孟祥春,张玉进,王小菁.矮牵牛花瓣发育过程中花色素苷,还原糖及蛋白质含量的变化[J].华南师范大学学报(自然科学版),2001,2:89~90.
- [7] 孟祥春,张玉进,王小菁.玉米根中花色素苷积累的某些影响因素研究[J].华南师范大学学报(自然科学版),2002,4:25~28.

## 花卉发展新趋势

何京

易拉罐花卉:将传统的泥土代之以经过特殊配方的无菌培养介质及花卉生长所需的缓释性肥料,并将其按比例装入易拉罐,植入花种后进行真空密封。目前已在北京市上市,十分畅销。罐上印着可爱的花形图案,并标明各种花卉的象征意义和浪漫的赠言。买回家后,拉开上面的盖子和底部的排水孔,加水后7 d(天)左右就可发芽,只要经常浇水即可。

茶用花卉:在大中城市喝“鲜花茶”已渐成时尚,只要适时采摘鲜花进行干燥处理后即可饮用。适用于泡饮的品种有红玫瑰、甘菊、贡菊、杜鹃、金莲花、金银花、辛夷花、紫罗兰、芙蓉花等等,市场前景看好。

食用花卉:食用花卉市场一直看好,我国并有大宗出口业务。主要用其提取食用色素、香料,用于食品糕点、饮料、化工等产品制作。主要品种有玫瑰、万寿菊等。

盆景花卉:将各种花卉、蔬菜、食用菌等按特殊栽培管理方法,培植成形态各异、色彩缤纷的盆景花卉,如观赏番茄、五

彩辣椒、盆桃、盆景灵芝,都很好销。

吸毒花卉:主要用于新修的房屋和办公室,用于吸收室内有害气体及缓解有害射线的辐射,是一种新兴的保健花卉。

多元花卉:目前,多季开花和同株多种花的多元花卉十分受青睐。这种花卉主要利用嫁接等技术,使其一年四季开花,而且同一株花会开出众多不同颜色、品种的花,色彩绚丽、芬芳无比,倍受人们喜爱。

克隆花卉:已在武汉开发成功,采用克隆技术,将众花之长集中在一株花卉上,开创出花卉新品种。市场潜力巨大,但培育技术性较强。

礼盒花卉:在印有花卉彩色照片和说明文字的精美塑料盒里,盛有土壤、花卉种子、球根以及肥料等。由于盒内的空气全部抽空,所以种子不会腐烂。顾客买回后,只要将礼盒启封,浇上清水,并置于阳光下,10 d(天)左右可发芽生长。

管装兰花:是马来西亚研究开发的。兰花装在长仅8 cm(厘米)、可放在口袋里随身携带的管中,兰花的幼苗根部固定在塑料管内的凝固胶质里,胶质内含有兰花生长所需的一切养料。购者可随时打开密封管,洗去胶质,将兰花定植在花盆中。(沈阳市辽中县建设街33号,110200)