

# 普通荞麦愈伤组织诱导及其分化的正交设计试验研究

王爱国 张以忠 任翠娟 陈庆富

(贵州师范大学生物技术与工程学院植物遗传育种研究所 贵阳 550001)

**摘要:**用正交设计法研究不同激素处理及不同外植体对普通荞麦愈伤组织诱导及分化过程中的影响。结果表明,在本实验设计中,2,4-D是诱导普通荞麦愈伤组织的主要因素;诱导愈伤组织的最佳培养基为MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L 6-BA;愈伤组织分化的主要因素是6-BA;愈伤组织分化的最佳培养基为MS+2.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT。

**关键词** 愈伤组织 普通荞麦 正交设计 组织培养

## Studies on Callus Induction and Differentiation in *Fagopyrum Esculentum* Moench by Orthogonal Design

Wang Aiguo, Zhang Yizhong, Ren Cuijuan, Chen Qingfu

(Institute of Plant Genetics and Breeding, College of Biological Technology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550001)

**Abstract:** Effects of various plant growth substances and different explants on callus induction and callus differentiation in *Fagopyrum esculentum* Moench were studied by orthogonal design statistic analysis. The results indicated that the main factor which influenced callus induction is 2,4-D, the optimal medium for callus induction is MS + 2.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L 6-BA; The results also showed that the main factor which influenced callus differentiation is 6-BA and the optimal medium for callus differentiation is MS + 2.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT.

**Key words** Callus *Fagopyrum esculentum* Moench Orthogonal design Tissue culture

普通荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)属于被子植物门种子植物亚门双子叶植物纲蓼目蓼科荞麦属<sup>[1,2]</sup>,它在世界上分布较广,几乎遍及所有种植有粒作物的国家<sup>[5,11]</sup>。在我国主要分布于边远落后山区,其遗传改良程度很低,因此开发荞麦产业有很大的发展潜力,对促进我国落后地区的经济发展有重要意义。

荞麦种子中蛋白质含量较高,氨基酸组成十分平衡,非常适合人类的营养结构,对儿童的生长和智力的开发也很有帮助。荞麦含有丰富的黄酮类化合物芦丁(Rutin,也称芸香苷、维生素P、紫槲皮苷),是惟一富含芦丁的粮食作物。芦丁具有降低毛细血管通透性、维持血管正常的渗透压,有助于保持、恢复毛细血管的正常弹性功能,对多种炎症具有良好疗效;芦丁能治疗闭塞性脑血管症,临床用于脑血栓所致的偏瘫、失语以及动脉硬化等症<sup>[4,6]</sup>。

目前国内提取芦丁的原料主要为槐花,资源稀少,不能充分满足市场需求。对荞麦进行组织培养,通过组织培养生产芦丁是解决问题的途径之一。关于荞麦组织培养研究,日本、韩国、俄罗斯开展得较好。Yamane(1974)<sup>[19]</sup>以下胚轴为外植体培养取得成功;Srejavic and Neskovic(1981)<sup>[18]</sup>以子叶为外植体培养取得成功;Neskovic et al(1987)<sup>[17]</sup>未成熟胚为外植体培养取得成功;Lachmann and Adachi(1991)<sup>[16]</sup>分别将源于下胚轴的原生质体为外植体进行植株再生培养取得成功;Adachi(1989)<sup>[15]</sup>以花药为外植体进行植株再生培养取得成功。我国

收稿日期:2005-09-28。

基金项目:国家自然科学基金(30270852,30471116)。

作者简介:王爱国(1970~),男,硕士研究生;主要从事资源植物组织培养及药用成分含量分析工作。

通讯作者:陈庆富,E-mail: cqf1966@163.com。

金红等(2002)<sup>[10]</sup>、郝建平(2001)<sup>[7,9]</sup>、侯建华等(1995)<sup>[13]</sup>、王茅雁等(2000)<sup>[14]</sup>、吴清等(2001)<sup>[8]</sup>也在荞麦组织培养上取得成功。上述研究大多数是利用种子胚轴等胚性组织,很少使用茎叶等器官进行荞麦组织培养。在有些研究中如荞麦三体繁殖,由于单种子鉴定染色体数目十分困难,需要利用组织培养形成愈伤组织系,通过愈伤组织系的染色体观察鉴别三体,也可以将已鉴定的三体植株进行组织培养和植株再生、扩大繁殖。因此需要探索荞麦茎叶组织培养技术,以适应相关研究的需要。

本实验以荞麦茎段、叶片、叶柄为外植体,配以含有不同激素组合的培养基,由此探讨荞麦叶、叶柄及茎段生产愈伤组织的技术体系,为荞麦育种以及荞麦药用成分的组织培养工业化开发提供指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试材料为普通荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)遵义甜荞品种(ES 2003110101)。种子发芽后移栽进贵州师范大学生物技术与工程学院植物遗传育种研究所生长室花盆土壤内,于10~30℃条件下生长。

### 1.2 实验方法

(1)外植体取材与愈伤组织诱导:于荞麦初花期剪取荞麦完全展开的幼叶、幼茎及叶柄,流水清洗后沥干。在超净工作台上进行如下操作:用75%酒精浸泡30s,0.1%升汞(含少量吐温80)溶液中浸泡15min,无菌水冲洗5次;将幼茎及叶柄切成0.5cm长的切段,幼叶切成0.5cm<sup>2</sup>的方块作外植体,分别接种于附加不同激素组合的愈伤组织诱导培养基上进行愈伤组织诱导。

(2)继代培养与器官分化:愈伤组织继代培养后再接入愈伤组织分化培养基上进行器官分化培养。

### 1.3 培养基及培养条件

MS为基本培养基,附加3%蔗糖、500mg/L水解乳蛋白、0.85%琼脂,pH 5.8。材料均培养在温度(25±2)℃的光照培养箱内,愈伤组织诱导阶段不需要光照,分化阶段光照强度3000lx。

### 1.4 考察记录的参数

采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表,根据设计安排组织了9次实验。因子水平安排见表1。

表2、表5中培养基均按正交法设计。每组接种20瓶,每瓶接种5块外植体。每天观察愈伤组织诱导情况。接种后18d,统计愈伤组织诱导率。

愈伤组织的诱导率为产生愈伤组织的外植体块数占接种总块数的百分率。器官发生率为分化出器官的愈伤组织块数占接种愈伤组织总块数的百分率。计算器官发生频率时,将褐化、白化考虑在内(污染不计入)。同时观察记录愈伤组织颜色,用数码相机拍照保存。

### 1.5 统计分析方法

运用正交设计助手II v 3.1(共享版)软件进行培养基配方设计。统计分析方法为方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导及其分化

本研究将叶片的基部叶段、叶柄、植株中上部生长旺盛的茎段分别接种于表2所列的9种培养基上,于黑暗条件下培养10d左右,发现外植体均有不同程度的伸长。愈伤组织从伤口处长出来,颜色很浅,较疏松,用枪形镊子很容易夹取、接种。继代培养于光照强度3000lx的条件下进行,18d左右发现叶柄及茎段外植体两端不同程度膨大并呈不对称哑铃形,愈伤组织生长表现出一定的极性(见图1、2),其形态学下部的生长量大于形态学上部的生长量;叶片愈伤组织的极性生长表现得不很突出,但也能观察到其形态学下部(近叶柄一端)的生长量大于形态学上部(近叶尖一端)的生长量(见图3)。3种外植体形成的愈伤组织从形态、质地上均可分为4种类型。类型1为黄绿色,质地紧密,用解剖刀才能剥离(图8);类型2为浅绿色,质地较为疏松(图9);类型3为粉红色(图4),质地紧密;类型4,愈伤组织表面为白色,质地紧密(图7)。试验中观察到愈伤组织多为黄绿色致密愈伤组织,随着培养时间的延长,黄绿色愈伤组织表面有时也会有浅黄色或白色疏松愈伤组织生成。

表1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验表头设计

水平	植物生长物质(mg/L)		C(外植体)
	A(2,4-D)	B(6-BA)	
1	0.5	0	1(叶片)
2	1.0	1.5	2(叶柄)
3	2.0	2.5	3(茎段)

试验过程中配制了 MS<sub>0</sub> 培养基(未加激素)作对照,并计算诱导率:叶片为 35%,叶柄为 56%,茎段 51%,均低于正交表中所设计的培养基的愈伤组织诱导率。

普通荞麦愈伤组织诱导率、平均诱导率及其方差分析结果分别见表 2~4。

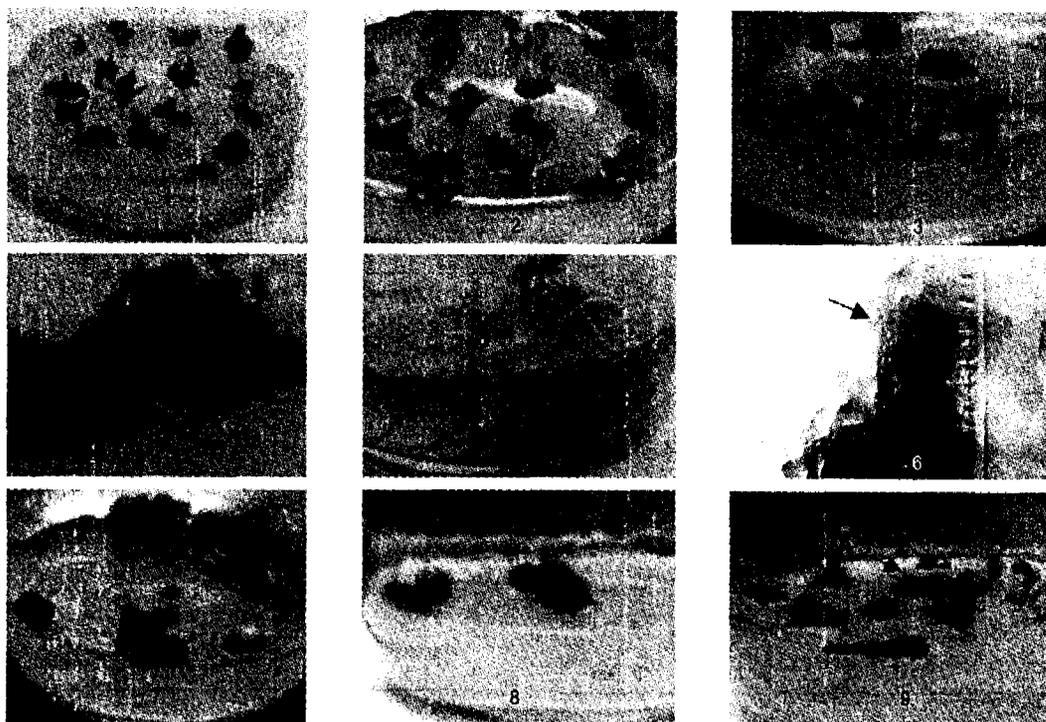


图 1~9 普通荞麦茎段、叶柄和叶段所产生愈伤组织的形态

图 1. 叶柄愈伤组织;图 2. 茎段愈伤组织;图 3. 叶愈伤组织;图 4. 叶柄红色愈伤组织;图 5. 叶柄红色愈伤组织发状根;图 6. 茎段绿色愈伤组织形成胚状前体(箭头所示);图 7. 叶柄愈伤组织表面为白色;图 8. 叶柄绿色愈伤组织;图 9. 叶段绿色愈伤组织生产绿色芽点(箭头所示)。

从表 2 和表 3 可以看出:A 因素的极差最大,D 因素的极差最小。即 2,4-D 的诱导能力最大,而外植体类型的影响最小。方差分析表明(见表 4),不同浓度的 2,4-D 对愈伤组织的诱导率有极显著性差异,不同浓度水平的 6-BA 对愈伤组织的诱导作用差异显著。因此,2.0 mg/L 2,4-D 和 1.5 mg/L 6-BA 配比的 8 号培养基为诱导愈伤组织的较合适培养基。

## 2.2 愈伤组织分化

将得到的愈伤组织,转入表 5(e 列为空白列,方差分析时将试验误差放于该列)各分化培养基中。

结果表明,不同激素条件下器官分化频率有明显差别。绿色的愈伤组织继代 2 次后,有的愈伤组织开始出现绿色的芽点(图 9 中箭头所示),有的分化出白色发状根(图 5),有的直接长出胚状前体(图 6 中箭头所示)。粉红色及白色愈伤组织继代 2 次后逐渐变成绿色。继代培养 2 次后,在 2,3,4,5 号培养基上继代的愈伤组织也出现了根的分化。当高浓度的 6-BA(2.5 mg/L)和 KT(1 mg/L)配合使用时(8 号培养基),分化芽的频率最高为 82.5%。

普通荞麦愈伤组织器官分化率、平均器官发生率及其方差分析结果见表 6,7。

从表 6 中极差分析可以看出,对愈伤组织分化的作用从大到小依次为:6-BA、KT、外植体类型。说明不同外植体(愈伤组织来源类型)对愈伤组织分化的影响最小,而 6-BA 对愈伤组织分化的影响最大。

表 7 中方差分析可以看出,6-BA、KT、外植体类型对愈伤组织分化的效应均达到显著性水平。其中,6-BA、KT 的效应均达到极显著性水平。说明不同浓度的 6-BA、KT 对愈伤组织分化的效应差异极显著,不同外植体对愈伤组织分化的效应差异显著。

随着继代培养时间的延长,有的愈伤组织开始出现褐化。可以将褐化的愈伤组织接种于补加 2,4-D(1.0 mg/L)的培养基上,会逐渐转绿,但是这种褐化后又逐渐转绿的愈伤组织分化能力较差,很少分化出根或芽。

表 2 荞麦愈伤组织诱导率

序号	因素			诱导率 (%)
	A	B	C	
1	0.5	0	1	72.6
2	0.5	1.5	2	73.2
3	0.5	2.5	3	78.5
4	1.0	0	2	81.6
5	1.0	1.5	3	93.1
6	1.0	2.5	1	92.8
7	2.0	0	3	96.7
8	2.0	1.5	1	100
9	2.0	2.5	2	98.3

表 3 不同因素下的荞麦愈伤组织平均诱导率

因素	A	B	C
水平 1 的平均值	74.767	83.633	88.467
水平 2 的平均值	89.167	88.767	84.367
水平 3 的平均值	98.333	89.867	89.433
极差	23.566	6.234	5.066

表 4 荞麦愈伤组织平均诱导率的方差分析

变异来源	平方和(SS)	自由度	F 值
A	846.766	2	322.091**
B	66.416	2	25.263*
C	43.416	2	16.514
误差	2.629	2	
Σ	959.227	8	

注: \*表示在 0.05 水平上差异显著; \*\*表示在 0.01 水平上差异极显著。

表 5 荞麦愈伤组织分化的器官发生率

序号	植物生长物质 (mg/L)		外植体类型 (C)	误差 (e)	接种的愈伤组织数 (块)	器官发生类型	器官发生频率 (%)
	A (6-BA)	B (KT)					
1	0	0	1	1	200	胚状前体	23.5
2	0	1	2	2	200	发状根	26.5
3	0	2	3	3	200	发状根	36.5
4	1.5	0	3	2	200	发状根	44.5
5	1.5	1	1	3	200	不定芽	48.5
6	1.5	2	2	1	200	不定芽	45.5
7	2.5	0	2	3	200	不定芽	63.5
8	2.5	1	3	1	200	不定芽	82.5
9	2.5	2	1	2	200	不定芽	78.5

### 3 讨论

侯建华, 耿庆汉 (1995)<sup>[13]</sup>以成熟胚、幼胚、下胚轴为外植体进行组织培养, 其愈伤组织诱导率较低, 其最高诱导率为 50%; 金红等 (2002)<sup>[10]</sup>以荞麦无菌苗的下胚轴切段为外植体进行组织培养, 发现了愈伤组织的极性生长, 但没有指出哪一端的生长量大一些; 本研究的愈伤组织诱导率较高, 最高达 100%, 并明确指出了其形态学下部的生长量大于形态学上部的生长量的结果。愈伤组织的极性生长与生长素的极性运输有关, 生长素只能从形态学上部运向形态学下部。

另外, 本研究没有采用种子、成熟胚、幼胚、胚轴等胚性器官, 而是直接取材于大田植株的叶、叶柄及茎段, 对于植物育种具有重要意义。以荞麦的叶柄为外植体属于首创, 效果很好, 愈伤组织诱导率最高达到 98.3%。在试验过程中还发现了表面为白色的愈伤组织, 此前未见报道, 其原因尚不清楚。

胚性愈伤组织的分离和增殖是植物组织培养过程中的关键问题, 也是从事植物组织培养工作人员的头等大事。许智宏也曾在 2004 年全国植物生理学会年会 (贵阳会议) 上作主题发言时提到这个问题。笔者在从事荞麦组织培养过程中观察到胚性愈伤组织表面光滑, 表现出很光亮的嫩绿色, 较软, 不宜过早分离, 要等胚性愈伤组织长成体积较大的圆球体时, 才能进行分离和增殖。

(下转第 13 页)

表 6 荞麦愈伤组织的平均器官发生率

因素	A (6-BA)	B (KT)	外植体类型 C
水平 1 的平均值	28.833	43.833	50.167
水平 2 的平均值	46.167	52.500	45.167
水平 3 的平均值	74.833	53.500	54.500
极差	46.000	9.667	9.333

表 7 荞麦愈伤组织平均器官发生率的方差分析

变异来源	平方和 SS	自由度	F 值
A	3 238.222	2	2 081.120**
B	169.556	2	108.969**
C	130.889	2	84.119*
误差(e)	1.556	2	1.000
总变异	3 540.223	8	

注: \*表示在 0.05 水平上差异显著; \*\*表示在 0.01 水平上差异极显著。

50  $\mu\text{mol/L}$ 的铝对水稻幼苗生长有促进作用<sup>[13]</sup>,低浓度的铝处理提高荞麦种子的萌发率及有利于种子萌发后根的生长<sup>[14]</sup>等。这可能与不同植物对铝的耐性不同相关,大豆、水稻、荞麦等是耐铝的植物,而益母草对铝比较敏感。

本实验的结果可能说明,益母草是一种铝敏感性植物,高铝含量对其种子萌发有明显的抑制作用,因而在益母草生产中要注意对铝毒的预防。

### 参考文献

- 1 Delhaize E, Ryan P R. Update on environmental stress: aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol*, 1995, 107: 315 - 321.
- 2 Grabski S, Schindler M. Aluminum induces rigor with the action network of soybean cells. *Plant Physiol*, 1995, 108: 897 - 901.
- 3 Taylor GJ. Current views of the aluminum stress response the physiology basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem Physiol*. 1991, 10: 57 - 93.
- 4 Von Uexkull H R, Mutert E. Global extent development and economic impact of acid soils. *Plant Soil*, 1995, 171(1): 1 - 15.
- 5 Foy C D, Chaney R L, White M S. The physiology of metal of toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 1978, 29: 511 - 566.
- 6 晁志,周秀佳,马丽玲等. 益母草类药材的性状鉴定[J]. *中药材*, 2000, 23(10): 601 - 603.
- 7 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京, 化学工业出版社, 2000: 237 - 238.
- 8 朱兆仪,郭艳文,周远鹏等. 常用中草药品种整理和质量研究[M]. 北京:北京医科大学出版社, 1995: 528 - 535.
- 9 可燕,车生泉. 不同产地益母草总生物碱含量的比较[J]. *中草药*, 1999, 30(4): 270 - 271.
- 10 张飞联,赵仕湘,吴爱娟等. 物候对益母草生长和总生物碱积累的影响[J]. *中草药*, 2000, 31(5): 371 - 374.
- 11 俞旭平,姚金富,盛束军等. 微肥对益母草生长和总生物碱积累的调控效应[J]. *中国中药杂志*, 2000, 25(1): 20 - 22.
- 12 刘鹏,徐根娣,姜雪梅,等. 铝对大豆种子萌发的影响[J]. *种子*, 2003(1): 30 - 32.
- 13 石贵玉. 铝对水稻幼苗生长和生理的影响[J]. *广西植物*, 2004, 24(1): 77 - 80.
- 14 李朝苏,刘鹏,徐根娣等. 酸铝浸种对荞麦种子萌发的影响[J]. *种子*, 2004, 23(12): 11 - 13.
- 15 孔繁翔,桑伟莲,蒋新等. 铝对植物毒害及植物抗铝作用机理[J]. *生态学报*, 2000, 20(5): 855 - 862.

(上接第10页)

### 参考文献

- 1 陈庆富. 五个中国荞麦(*Fagopyrum*)种的核型分析[J]. *广西植物*, 2001, 21(2): 107 - 110.
- 2 林汝法主编. 中国荞麦[M]. 北京:中国农业出版社, 1994.
- 3 严力蛟,汤金尧. 荞麦研究综述[J]. *农业科技译丛(浙江)*, 1993(1): 5 - 9.
- 4 杨克理. 我国荞麦种质资源研究现状与展望[J]. *作物品种资源*, 1995(3): 11 - 13.
- 5 吴野敏子,孙军. 世界荞麦研究动向[J]. *世界农业*, 1992(1): 25 - 26.
- 6 张琪,刘慧灵,朱瑞等. 苦荞麦中总黄酮和芦丁的含量测定方法的研究. *食品科学*, 2003, 24(7): 113 - 116.
- 7 郝建平,张江涛. 8种甜荞的种子消毒及愈伤组织诱导和增殖条件[J]. *植物研究*, 2001(21): 66 - 69.
- 8 吴清,向素琼,闫勇等. 金荞麦的离体快繁及同源四倍体的诱导[J]. *西南农业大学学报*, 2001(23): 108 - 110.
- 9 郝建平,陈占宽,裴雁曦等. 非选择性除草Basta对荞麦和莜麦种子萌发的影响[J]. *华北农学报*, 2001, 16(2): 136 - 140.
- 10 金红,贾敬芬,郝建国. 荞麦高频离体再生及发根农杆菌转化体系的建立[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(3): 611 - 616.
- 11 钟兴莲,姚自强,杨永宏等. 荞麦资源调查研究[J]. *作物研究*, 1994, 8(4): 31 - 32.
- 13 侯建华,耿庆汉. 荞麦愈伤组织培养及分化研究[J]. *内蒙古农牧学院学报*, 1995, 16(3): 21 - 25.
- 14 王茅雁,锡建中,张晶等. 荞麦愈伤组织的高频率诱导和植株再生研究[J]. *内蒙古农业大学学报*, 2000, (21): 41 - 44.
- 15 Adachi. T. etal. Plant regeneration from protoplasts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(4): 247 - 250.
- 16 Lachmann and Adachi. Callus regeneration from hypocotyl protoplasts of Tartary buckwheat [J]. *Fagopyrum*, 1991, 10: 62 - 64.
- 17 Neskovic. Somatic emhryogenesis in buckwheat Biotechnology in agriculture and forestry [M]. *Plant Cell Reports*, 1987, 6(6): 423 - 426. 31: 412 - 427.
- 18 Srejavic and Neskovic. Regeneration of plants from cotyepedon fragments of buckwheat [J]. *P. flanznphysiol*, 1981, 104: 37 - 42.
- 19 Yamane. Induced differentiation of buckwheat plants from subcultured calluses in vitro [J]. *Genet.*, 1974, 48: 139 - 146.