



## ‘温莎甜荞’再生体系建立的研究

闫超敏

(山西省中条山国有林管理局, 山西侯马 043000)

**摘要:**为了荞麦的进一步研究和转基因体系的建立以及农杆菌介导转化的研究奠定基础,为基因工程改良荞麦芦丁生物合成提供了理论依据及技术保证。以‘温莎甜荞’为研究材料,建立组织培养再生体系,以子叶和下胚轴为外植体,基本培养基为MS,添加不同浓度的生长素和细胞分裂素,设计不同激素配比组合,在相同的培养条件下,研究‘温莎甜荞’子叶和下胚轴愈伤组织诱导和生长特征,筛选出诱导‘温莎甜荞’愈伤组织的最适培养基,为基因工程提供参考和理论依据。研究表明:‘温莎甜荞’子叶产生愈伤组织的最佳培养基为MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 0.4 mg/L。诱导芽的最佳培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L。下胚轴诱导愈伤组织的最佳培养基为MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.1 mg/L。诱导芽的最佳培养基为MS+6-BA 3 mg/L+IBA 0.5 mg/L。生根的最佳培养基为1/2 MS。

**关键词:**荞麦;再生体系;外植体

**中图分类号:**Q94

**文献标志码:**A

**论文编号:**2012-0118

### Research on the Regeneration System Establishment of ‘Windsor Sweet Buckwheat’

Yan Chaomin

(Shanxi Zhongtiaoshan Forest Bureau, Houma 043000, Shanxi, China)

**Abstract:** The research as the transgene system establishment, the agricultural bacillus leads transformed the research to lay the foundation which has further provided the theory basis and the technical guarantee for the genetic engineering improvement of the buckwheat biosynthesis. Selecting the buckwheat which is ‘windsor sweet buckwheat’ for establishing regeneration system and antibiotic screening system, We know explants are cotyledon and hypocotyls. The basic culture medium is called MS. We can add into the different auxin and cytokinin under the different condition auxin and cytokinin under the different condition, we studied ‘Jiujiang bitter buckwheat’ of the seed leaf and under the hypocotyls injuries the organization the induction as well as does not decide the bud differentiation and the growth situation. We can establish the best regeneration system through researching the different explants, as the transgene system establishment has further provided the theory basis. The research indicates that the ‘windsor sweet buckwheat’ seed leaf produces injuries the organization the best culture medium is MS + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 0.4 mg/L. The induction bud’s best culture medium is MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L. The next hypocotyls induction injuries the organization the best culture medium is MS + 2,4-D 3 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L, the induction bud’s best culture medium is MS + 6-BA 0.05 mg/L + IBA 0.1 mg/L. The rooting induction the best culture medium is 1/2 MS.

**Key words:** Buckwheat; Regeneration System; Explants

### 0 引言

荞麦(*Fagopyrum esculentum*)是蓼科荞麦属的双子叶植物<sup>[1]</sup>,主要栽培种有甜荞(也叫普通荞麦)和苦荞(也叫鞑靼荞麦)两种。中国是荞麦的生产大国,出口量占第一位<sup>[2]</sup>,总产量居世界第二<sup>[3]</sup>。荞麦是一种药

膳兼用的食物,不仅营养丰富,而且具有一定的药用价值和生物学价值。中国西北地区是荞麦的主产区,不仅种子中含有丰富的蛋白质、脂肪和维生素;而且被称为“三降食品”,其药理和化学成分黄酮物质芦丁可以预防和治疗高血压、风湿性关节炎、糖尿病等,尤其对

**作者简介:** 闫超敏,女,1985年出生,山西沁水人,硕士,研究方向为植物生理与分子生物学。通信地址:043000 山西省侯马市新田路南一巷侯马经销站58号,E-mail:475558664@qq.com。

**收稿日期:**2012-02-23,修回日期:2012-05-18。



高血压等心血管疾病有良好治疗效果<sup>[4-6]</sup>。对黄酮提取工艺研究主要表现在苦荞植株中类黄酮含量较高,是一种优良黄酮类化合物,具有高蛋白低脂肪的特点,并含治疗糖尿病和高血脂的有效活性成分<sup>[7-8]</sup>。

关于荞麦组织培养的研究报道较少,国外学者研究大多只报道采用柱层析分析甜荞中黄酮类化合物组成的研究而未报道有关荞麦类化合物的提取工艺,对荞麦的壳、全籽粒、糊粉层、叶、花中生物类黄酮资源的化学组成、抗氧化性和稳定性进行大量分析研究<sup>[9]</sup>,表明这些生理功能和药用价值与荞麦中富含生物类黄酮有十分密切关系。荞麦黄酮具有很强的抗氧化性和清除自由基功能,并有多种药用价值与保健功能,还是生产芦丁的重要原料,它是荞麦中最主要的黄酮。荞麦的蛋白质和脂肪含量明显高与其他谷类作物,在食品开发方面有特殊的营养价值。

荞麦芦丁及相关黄酮类代谢物质的提取工艺及化合物的分离已有成功的报道,荞麦生理生化和分子生物学上已有一定的研究,并且具有很高的营养价值、药用价值和生物学价值。在20世纪90年代,已经对普通荞麦的5个品种(‘牡丹荞’、‘北海道’、‘野道地町’、‘黎麻道’、‘榆3-3’)进行了花药培养试验研究。其中有4个品种获得再生绿苗,说明利用荞麦的花药建立再生体系已有一定研究<sup>[10]</sup>。Yanmne等<sup>[11]</sup>分别用成熟种子和未成熟胚作外植体进行愈伤组织诱导并得到再生植株,但其诱导率很低。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%,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。

荞麦的育种始于19世纪,从事育种的国家有中国、俄罗斯、加拿大、日本等,主要技术是杂交、多倍体和诱变育种<sup>[12]</sup>。多倍体育种是近代作物育种的新方法,荞麦多倍体诱导的研究,郑丕尧和崔继林应用水仙素将甜荞多倍体诱导成功,但未能在生产上应用。1987年,唐宇等<sup>[13]</sup>对‘九江苦荞’进行了多倍体诱导的

研究,获得了同源四倍体苦荞新品系,对于荞麦育种,多倍体育种是一种可行的新方法。但是,多倍体育种存在着育性下降的缺点,对于收获籽粒的作物来讲,应用前景不大。荞麦的种间杂交一般用人工杂交方式,杂交不成功最大的问题是受精卵夭折,必须采用离体培养,杂交种子生活力低,获得种间杂种需要通过幼胚培养方法,目前甜荞与苦荞,金荞与苦荞、甜荞与佐贡野荞等组合在种间杂交上均取得成功<sup>[14]</sup>,但是其他组合种间杂交还未成功。利用组织培养技术可获得种间杂种的纯合体,基于愈伤组织可进行药理学分子机制的研究等多个方面。

目前荞麦品种极度退化,严重影响其产量和品质的进一步提高,针对这个问题,建立荞麦高效再生体系势在必行。基于荞麦广阔的应用前景和对荞麦的开发利用限度,组织培养的研究尚在探索阶段。目前国内对外对苦荞的研发力度大于甜荞。为此,通过对前人研究成果的总结和对新技术新方法新理论的应用和实践,笔者对‘温莎甜荞’再生体系的建立进行了研究,为遗传转化提供了参考,并将会在未来发挥出它的巨大潜力和更大应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 外植体材料和实验试剂

挑选由山西省农科院研究所提供的‘温莎甜荞’种子,用75%酒精处理1 min,漂洗4~5次,再用0.1%升汞处理8 min后,漂洗4~5次,接种于MS培养基中,在温度25℃,光照强度2000~2500 lx,光周期10~14 h/d条件下培养4~5天,获得无菌苗。选取无菌苗的子叶和下胚轴分别作为外植体试验材料。选用激素为6-BA和2,4-D。

### 1.2 试验用培养基

基本培养基为MS培养基。诱导子叶愈伤组织发生的培养基配方见表1。诱导下胚轴愈伤组织发生的培养基配方见表2。子叶诱导愈伤组织芽分化的培养基配方见表3。下胚轴诱导愈伤组织芽分化的培养基配方见表4。

表1 诱导子叶愈伤组织发生的培养基

组号		1	2	3	4	5	6	7	8
配比/(mg/L)	2,4-D	2	2	3	3	4	4	5	5
	6-BA	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5

表2 诱导下胚轴愈伤组织发生的培养基

组号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
配比/(mg/L)	2,4-D	2	2	2	3	3	3	4	4	4
	6-BA	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5



表3 子叶诱导愈伤组织芽分化的培养基配方

组号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
配比/(mg/L)	6-BA	2	2	2	3	3	3	4	4	4
	IBA	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5

表4 下胚轴诱导愈伤组织芽分化的培养基

组号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
配比/(mg/L)	6-BA	1	1	1	2	2	2	3	3	3
	IBA	0.5	1	1.5	0.5	1	1.5	0.5	1	1.5

1.3 方法

1.3.1 温莎甜芥基因型子叶和下胚轴愈伤组织的诱导  
将温莎甜芥的子叶和下胚轴在75%的乙醇中浸泡1 min,蒸馏水漂洗4~5次,0.1%升汞溶液消毒8 min,蒸馏水漂洗4~5次,超净台中将子叶和下胚轴切为约0.5 cm×0.5 cm的切块,接种于不同激素配比的MS培养基上,(表1、表2),培养温度25℃,湿度70%~80%的条件下暗培养1周并观察记录愈伤情况,愈伤组织开始膨大。2周后形成愈伤组织,并观察记录。

诱导出的愈伤组织分别接种于已经设置好的不同培养基中(表3、表4)温度25℃,光周期10~14 h/d,光照强度2000~2500 lx条件下进行培养,并观察记录分化情况。将诱导出来的芽分别接种在MS、1/2 MS、1/3 MS、1/4 MS 4种不同浓度的MS培养基中,观察记录其生根情况。

1.4 数据分析

实验数据在Excel 2003软件中进行初步的录入和处理,计算平均值和标准差,并进一步生成图表。处理间(不同激素配比)的差异显著性在SPSS 15.0软件中采用单因素方差分析(ANOVA)进行分析,统计显著性 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 温莎甜芥子叶和下胚轴高效再生体系的建立

2.1.1 激素比对温莎甜芥子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响  
子叶诱导过程(激素配比见表1),暗培养1周后,明显观察到愈伤组织在切口处膨大,2周后形成完整的愈伤组织,叶面卷曲,叶面逐渐变为硬块状,切口处的愈伤体积扩大,随着2,4-D浓度升高(2~5 mg/L),愈伤组织膨大明显,颜色多为黄绿色;边缘随2,4-D浓度升高逐渐变为褐色,当浓度为5 mg/L时整个愈伤组织变为褐色(表5)。

下胚轴诱导的过程中(激素配比见表2),暗培养1周,愈伤组织开始在两端切口处膨大,2周后形成完整的愈伤组织,下胚轴呈“1”状,颜色多为白绿色,愈伤组

织随着2,4-D浓度增加(2~4 mg/L)而越膨大,随2,4-D浓度高于4 mg/L时,愈伤组织变为褐色(表5)。

由表5可知:温莎甜芥子叶在MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 0.3 mg/L的培养基中愈伤组织生长致密且为白色,出愈率最高(76%),显著高于其他激素配比处理( $P<0.05$ ),为最适培养基。在诱导愈伤组织过程中,2,4-D浓度过高,愈伤组织易发生水渍状,褐化严重,畸形;2,4-D浓度过低,愈伤组织生长不良,缓慢,不利于分化。温莎甜芥下胚轴在MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.1 mg/L培养基中,愈伤组织为白色较致密,愈伤率为83.3%,显著高于其他激素配比处理( $P<0.05$ ),为诱导愈伤组织最适培养基,愈伤组织生长

表5 2种激素比对温莎甜芥子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响

部位	组号	接种数/个	出愈数/个	出愈率/%	形态特征
子叶	1	25	19	76a	白色,致密
	2	25	16	64b	白绿
	3	25	13	52b	白绿,疏松
	4	26	11	42.3bc	绿色,疏松
	5	25	9	36c	黄绿,疏松
	6	26	10	38.5c	黄色水渍状
	7	26	9	34.6c	黄褐色
	8	25	8	32c	褐色
下胚轴	1	24	10	41.7c	白色,致密
	2	25	14	56b	白色
	3	25	17	68b	黄白疏松
	4	24	20	83.3a	黄白
	5	25	13	52b	白绿,疏松
	6	25	10	40c	黄绿
	7	25	11	44c	黄绿,疏松
	8	24	9	37.5c	绿色,疏松
	9	25	8	32c	黄绿

注:表中同列相同字母表示不存在差异显著性,不同字母之间表示存在显著差异( $P<0.05$ )。下同。



良好。

2.1.2 不定芽的分化 温莎甜荞由子叶和下胚轴诱导出的愈伤组织,分别将其切为0.5 cm×0.5 cm的切块,接种于不同的培养基中(激素配比见表3和表4),诱导不定芽的产生(表6)。在植物离体培养中外源细胞分裂素和生长素对不定芽的诱导和生长发育起着重要作用,通常在培养基中添加细胞分裂素6-BA和生长素IBA等,可获得再生植株。

表6中的结果表明:适当浓度的细胞分裂素和生长素的配比,可提高芽的分化率,温莎甜荞子叶诱导愈伤组织在MS+6-BA 3 mg/L+IBA 0.1 mg/L的培养基中分化率最高,分化率为41.66%,显著高于其他激素配比处理( $P<0.05$ )。该培养基为诱导子叶外植体愈伤组织芽分化的最适培养基。下胚轴外植体所诱导的愈伤组织均在MS+6-BA 3 mg/L+IBA 0.5 mg/L的培养基组合上,分化率为33.33%,显著高于其他激素配比处理( $P<0.05$ ),为最适培养基,不定芽的分化与激素浓度有关,生长素浓度高不利于芽的分化,细胞分裂素浓度高

表6 激素配比对‘温莎甜荞’子叶和下胚轴愈伤组织诱导芽分化的影响

部位	组号	接种数/个	出愈数/个	出愈率/%
子叶	1	26	6	23.07b
	2	26	3	11.53c
	3	24	3	12.5c
	4	24	10	41.66a
	5	25	7	28b
	6	24	3	12.5c
	7	24	5	20.83b
	8	26	5	19.23bc
	9	26	4	15.38c
下胚轴	1	26	3	11.53c
	2	24	4	16.66c
	3	25	6	24b
	4	26	8	30.76ab
	5	24	7	29.16b
	6	26	7	26.9b
	7	24	8	33.33a
	8	26	3	12.5c
	9	25	4	16c

促进芽的分化。

## 2.2 影响荞麦再生苗生根的因素

选用不同MS培养基为基本培养基,观察根的分

化见表7。由表7可知,再生苗在1/2 MS培养基上,根的分化率最高至88.9%,显著高于其他激素配比处理( $P<0.05$ )。MS培养基成分的降低对根的诱导也有影响,随着成分降低,生根数显著降低,生根率也显著降低。结果表明:1/2 MS培养基相比其他MS培养基有利于生根。

表7 MS培养基对再生苗生根的影响

MS	再生苗/个	生根数/个	生根率/%
MS	18	42	33.3c
1/2 MS	18	116.8	88.9a
1/3 MS	18	32.5	72.2ab
1/4 MS	17	27.5	64.7b

## 3 讨论

### 3.1 影响愈伤组织诱导的因素

愈伤组织再生系统的建立是细胞培养、原生质培养、细胞融合及遗传转化等研究获得成功的工作基础。

应用细胞全能性原理,可通过外植体诱导愈伤组织形成,随后出现根、芽分化,也可以通过外植体直接分化根、芽<sup>[15]</sup>。本研究通过诱导荞麦愈伤组织发生,芽分化后获得再生植株,为进一步遗传转化奠定基础。培养基、外植体、光照、外源激素对愈伤组织的诱导都有影响<sup>[8]</sup>。例如:在子叶和下胚轴诱导愈伤组织发生过程中,2,4-D浓度过高(4 mg/L),愈伤组织水渍状,生长不良;浓度过低(低于2 mg/L),则不能诱导愈伤组织;而生长素在适当浓度下(0.1~0.4 mg/L),愈伤组织诱导分化良好,出愈率高。荞麦喜低温,愈伤组织诱导过程中,温度不可过高(室温26℃)。光暗培养有利于愈伤组织各种蛋白、核酸物质的积累<sup>[16]</sup>,因此外植体先暗培养1周,再转到光下培养,有利于外植体诱导愈伤组织的分化和营养物质的积累。诱导过程中,加入不同浓度配比的2,4-D和IBA,在激素配比适当的条件下,愈伤组织诱导可获得较佳效果。

### 3.2 影响不定芽诱导的因素

外植体诱导出愈伤组织后,经过继代培养形成分生组织,然后再分化成不同的器官原基,器官发生有2种方式:(1)外植体→器官发生(根、芽或胚状体)→再生植株。(2)外植体→愈伤组织→类分生组织→根、芽→再生植株<sup>[17]</sup>。

本研究荞麦愈伤组织芽分化的诱导中,从高浓度的生长素2,4-D培养基上转接至含有低浓度的6-BA和IBA培养基上,适当配比细胞分裂素和生长素的浓度,有利于愈伤组织诱导分化形成芽。如果持续高浓度培



养,容易出现玻璃化现象、畸形、失绿,因此,激素配比也是影响分化的一个重要因素。MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.1 mg/L 诱导出的愈伤组织大都为绿色或白色致密状,时间越久,体积越大。在 1/2 MS 培养基中,生根率最高,这是因为高浓度无机盐对根的生长有抑制作用;无机盐浓度越低,越有利于生根。有玻璃化现象发生,芽翠绿,呈透明状,脆弱,生长缓慢,部分失绿,增加光照强度,延长光照时间<sup>[18]</sup>,Leshem 等<sup>[19]</sup>曾指出玻璃化是生长因子不平衡的产物,培养基和培养条件不适宜、不平衡是试管苗玻璃化的发生原因。玻璃化问题实质上是适应性问题,即不同种类植物不同个体的适应性差异的问题。

### 3.3 存在的问题

本实验尽管得到了一定数量的再生植株,但培养过程中的一些问题(如褐化、不定芽增值过程中出现脱叶现象,并且还伴随着玻璃化再生苗)还有待于进一步解决,通过对生长调节剂、温度、湿度、光照、消毒方法等培养条件的改变来调整。荞麦获得再生植株的频率较低,国内外对这方面报道相对较少,且分化率较低<sup>[20-21]</sup>。目前,荞麦的研发大都致力于对苦荞,而甜荞较苦荞的研究则偏少,本实验就针对‘温莎甜荞’这一品种获得再生植株而进行研究,为下一步的遗传转化提供理论依据,以更大限度的开发荞麦的营养价值和药用价值以及生物学价值。

### 4 结论

本实验通过对‘温莎甜荞’子叶、下胚轴愈伤组织的诱导,不定芽的诱导,根的诱导、分化,得出的结果为:温莎甜荞子叶产生愈伤组织的最佳培养基为 MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 0.3 mg/L。诱导芽的最佳培养基为 MS+6-BA 3 mg/L+IBA 0.1 mg/L。下胚轴诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.1 mg/L,诱导芽的最佳培养基为 MS+6-BA 3 mg/L+IBA 0.5 mg/L。生根的最佳培养基为 1/2 MS。

### 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] Zang Z, Yang B, Shen Q, et al. Buckwheat Production, Research and Market in China[J]. *Advances in Buckwheat Research*,2001: 690-693.
- [3] 王红育,李颖.荞麦的研究现状及应用前景[J]. *食品科学*,2004(25): 388-391.
- [4] Sun T, C T HO. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. *Food Chemistry*,2005(90):743-749.
- [5] Fabjan N, Rode J, Kosir I J, et al. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin[J]. *J Agric Food Chem*,2003,51(22):6452-6455.
- [6] Pomeranz Y, Robbins G S. Amino acid composition of buckwheat [J]. *J Agric Food Chem*,1972(20):270-274.
- [7] 符献琼.荞麦的营养成分及食效果[J]. *新疆农业科学*,1992(4): 150-152.
- [8] 符献琼,张慧,事量业,等.荞麦叶的营养成分及其营养特性[J]. *新疆农业科学*,1994(3):105-107.
- [9] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛.植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. *植物学通报*,1999,16(3):238-244.
- [10] 宋英凯,孔繁春,王仲青.普通荞麦花药培养植株再升获得成功[J]. *华北农学报*,1991(2):109.
- [11] 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.
- [12] 瞿素萍,王继华,张颢,等.多倍体育种在园艺作物中的应用[J]. *北方园艺*,2003(6):58-60.
- [13] 唐宇,赵钢.苦荞染色体加倍实验[J]. *生物学通报*,1995(2):41.
- [14] 唐宇,赵钢.荞麦的种间杂交育种[J]. *西昌农业高等专科学校学报*, 2001(4):1.
- [15] 韩碧文,李颖章.植物组织培养中器官简称的生理生化基础[J]. *植物学报*,1993(3):3-8.
- [16] 黄大年,谷明光,张雪琴,等.在继代培养中玉米花粉愈伤组织无性系的核酸和蛋白质变化[J]. *遗传学报*,1987(02):114-120.
- [17] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:北京林业出版社,1998.
- [18] 李胜,李唯,杨德龙,等.植物试管苗玻璃化现象研究进展[J]. *甘肃农业大学*,2003,38(1):1-16.
- [19] Leshem B, Sachs T. Vitified *Dianthus-Teratmata* in vitro due to growth factor imbalance[J]. *Ann Bot*,1985(56):613-617.
- [20] 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.
- [21] 金红,郝建国,马洪军,等.荞麦组织培养及植株再生[J]. *西北大学学报*,1999,29(6):611-614.