

荞麦组织培养及高频植株再生体系的建立

陈利红¹ 徐子勤*

(西北大学陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069)

摘要 通过对荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)不同外植体、不同激素配比的比较研究,建立了荞麦离体培养高效植株再生体系。荞麦子叶切段在含 2.0 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上愈伤组织诱导率为 89.6%,而下胚轴切段在含 2.0 mg/L 2,4-D 和 1.0-2.0 mg/L 6-BA MS 培养基上愈伤组织诱导率高达 100%。在 2.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L IAA 和 1 mg/L KT 的 MS 培养基上通过愈伤组织间接分化或外植体直接分化形成不定芽。来自子叶和下胚轴的愈伤组织的分化率分别为 42.5%和 73.6%,下胚轴的分化率明显高于子叶。将生长状态良好的不定芽转至含 1.0 mg/L IBA 和 0.5mg/L NAA 的 1/2 MS 培养基上生根,生根率达到 100%。再生植株移栽到盆土中,成活率达 91.6%,并且生长状态和特征均表现正常。

关键词: 荞麦 愈伤组织 组织培养 器官发生 植株再生

荞麦是蓼科(*Polygonaceae*)、荞麦属(*Fagopyrum* Mill)的双子叶植物,主要栽培种有甜荞(*F. esculentum* Moench,也叫普通荞麦)和苦荞(*F. tataricum* (L.) Gaerth,也叫鞑靼荞麦)两种。荞麦起源于中国和亚洲北部,我国是荞麦的生产大国,总产量占居世界第二,出口量占第一位。荞麦在我国的分布较广,但种植区相对集中,华北、西北、东北地区以种植甜荞为主,西南地区的四川、云南、贵州等省以种植苦荞为主^[1]。

甜荞麦,也称荞麦,是一种营养丰富的杂粮,同时具有药用和食用价值^[2]。近年来随着人民生活水平的提高和膳食结构的改变,糖尿病、高血压、冠心病等发病率日趋增加,因而素有“三降食品”之称的荞麦越来越受人们青睐。药理和化学成分研究表明荞麦中的类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,尤其对高血压等心血管疾病具有良好的治疗效果^[3]。据文献报道荞麦子叶中的总黄酮含量高达 6.16%^[4],其中的黄酮可增加胰岛素与受体的结合能力和敏感性,还具有抗脂质过氧化等作用^[5]。目前国内外对荞麦的研究主要涉及过敏蛋白^[6-7]、种子贮藏蛋白及其基因调控序列^[8-9]、类金属硫蛋白基因^[10]、蛋白酶抑制剂^[11-12]、抑菌肽^[13]、黄酮醇-3-葡萄糖苷酶^[14]、酯酶^[15]、肌醇半乳糖苷合酶^[16]等,但对荞麦的组织培养至今报道很少,且分化频率很低^[17-20]。本文以甜荞麦的子叶和下胚

轴为实验材料,对其愈伤组织的诱导和离体再生体系的建立进行了初步研究,为进一步的遗传操作奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 供试品种

所用荞麦品种为平荞 2 号,由甘肃省平凉市农科所提供。

1.2 实验材料

选取籽粒饱满的成熟种子,剥去种皮,在 75%乙醇溶液中浸 45s,用 0.1% HgCl₂ 溶液表面消毒 12 min,再用无菌蒸馏水洗涤 4-5 次,每次 5 min 左右。将灭菌后的种子接种到附加 3%蔗糖、0.75%琼脂粉无激素的 MS 固体培养基上,每日光照 16 h,光照强度 2000 lx,培养温度 25±2℃。

1.3 愈伤组织诱导

分别取生长 5-15d 的荞麦无菌苗,将其子叶和下胚轴切成 5-10 mm 的小段,接种在含有不同激素组合的 MS 培养基上诱导愈伤组织。MS 培养基并附加有 3%蔗糖、600 mg/L 水解酪蛋白、300 mg/L 酵母提取物、0.75%琼脂,pH 5.8-6.2,培养温度 25±2℃,光照强度 2500 lx。2 周后统计外植体的愈伤组织诱

本文 2005 年 4 月 10 日收到。2006 年 7 月 10 日接受。

* 通讯作者, E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn

导频率,并选择诱导频率最高的培养基作为愈伤组织的继代培养基。每2周继代培养一次。并分别试验了0.5% AgNO₃、0.1%–0.5%活性炭和0.28 mmol/L Vc对愈伤组织生长的影响。

1.4 芽的分化与增殖

将生长状态良好的愈伤组织转至含不同激素配比的MS分化培养基中。培养基其他附加成分及培养条件与愈伤组织诱导一样。30d后统计分化率。同时比较了愈伤组织继代时间对分化频率的影响。

1.5 根的诱导

当苗长到2–3 cm高时,将生长健壮的幼苗从愈伤组织上切下,转至含不同浓度NAA、IBA、IAA的MS和1/2 MS的培养基上诱导生根,2周后统计生根率,同时试验了活性炭对根诱导的影响。

1.6 计算方法

愈伤组织的诱导率=(愈伤组织块数/接种外植体数)×100% ;

芽分化率=(分化不定芽的愈伤组织块数/接种愈伤组织块数)×100% ;

生根率=(生根的不定芽数/接种的不定芽数)×100% ;

生根指数= $\sum_{i=1}^n \frac{ni \times mi \times li}{n}$ 其中

n :表示不定芽的总数目。

ni :表示第*i*个不定芽。

mi :表示第*i*个不定芽生根的数目。

li :表示第*i*个不定芽产生根的平均长度。

2 结果

2.1 无菌苗生长时间对愈伤组织诱导的影响

取生长5–15d无菌苗的子叶和下胚轴,分别接种到含有2.0 mg/L 2,4-D和1.0–2.0 mg/L 6-BA的MS培养基上,15d后观察愈伤组织的诱导情况,并统计相应的数据。实验显示:子叶和下胚轴的发育年龄对荞麦愈伤组织诱导有明显的影 响,发育年龄适中的外植体(10–12d),愈伤组织的诱导率较高。较幼嫩的子叶和下胚轴也能产生愈伤组织,但诱导率较低。而发育年龄较大的外植体,由于细胞分化程度较高且褐化严重,不利于后期愈伤组织的分化(图1)。

2.2 愈伤组织的诱导与继代培养

荞麦种子在MS无激素培养基上萌发9d时,发芽率达到85%以上。将子叶和下胚轴切段接种于表1所列的11种培养基上。5d后外植体两端开始膨大并呈哑铃型(图版I,图A)。在只有2.0 mg/L 2,4-

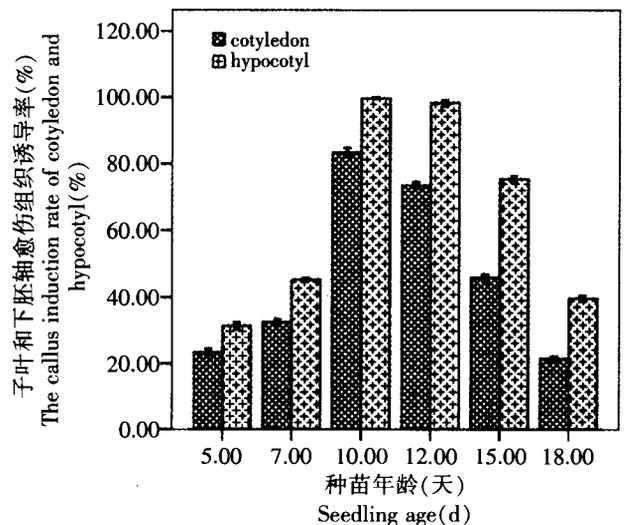


图1 种苗年龄对子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响

Fig.1 Effects of seeding age on callus induction rate of cotyledon and hypocotyl

Error bars: \pm 2.00 SE

D存在的条件下,子叶和下胚轴的愈伤组织诱导率分别只有58.3%和76.3%。当2,4-D浓度增加到4.0 mg/L时,两种外植体的愈伤组织诱导率反而降低,并且发现愈伤组织出现严重的褐化现象,这可能是其分泌大量酚类物质所致。而2,4-D(2.0 mg/L)浓度不变,另加入0.5 mg/L 6-BA时,两种外植体的愈伤组织诱导率都有显著提高。随着6-BA浓度的增加,下胚轴的诱导率达到了100%,而子叶在1.0 mg/L 6-BA培养基上诱导率最高(表1)。同时发现尽管在3、4、5号三种培养基上下胚轴愈伤组织的诱导率都达到了100%,但愈伤组织的质地和形态却有所不同。在3号培养基上产生棕黄色或微带红色的疏松愈伤组织(图版I,图B; I型),而在4、5号培养基上产生了绿色或棕绿色质地紧密且较硬的愈伤组织(图版I,图C; II型),经过继代培养,II型愈伤组织变得更坚硬且较大,转到分化培养基上后基本上没有分化能力,但长出了很多根。而3号培养基上的愈伤组织转到分化培养基上时,能直接分化出芽,因此我们选择3号培养基作为愈伤组织的继代培养基。在实验过程中还发现随着继代时间的延长,愈伤组织的分化能力逐渐降低且褐化程度加重。在连续继代培养过程中为了缓解愈伤组织的褐化而加入的0.5% AgNO₃、0.1%–0.5%活性炭和0.28 mmol/L Vc并没有取得显著效果。

2.3 愈伤组织分化和苗的形成

将生长较好的没有经过继代培养的愈伤组织块

表 1 不同外植体与激素对荞麦愈伤组织诱导的影响

Table 1 Influences of different explants and growth regulators on callus induction of *F. esculentum*

序号 Number	植物生长调节剂 Plant growth regulator(mg/L)			接种外植体数 No. of inoculated explants		愈伤组织的诱导率(mean±SD) Callus induction rate (%)	
	2,4-D	6-BA	NAA	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
				Cotyledon	Hypocotyl	Cotyledon	Hypocotyl
1	2.0	0	0	79	86	58.3±0.2 a	76.3±0.2 a
2	2.0	0.5	0	88	102	76.2±0.2 c	93.4±0.1 d
3	2.0	1.0	0	96	112	89.6±0.1 c	100±0.0 c
4	2.0	1.5	0	78	108	88.2±0.4 b	100±0.0 c
5	2.0	2.0	0	84	126	80.8±0.3 d	100±0.0 a
6	2.0	1.0	0.2	63	84	85.7±0.4 a	92.3±0.2 b
7	2.0	0	0.2	74	92	46.7±1.2 f	72.3±0.1 b
8	4.0	0	0.2	68	77	39.6±0.5 b	68.7±0.3 f
9	4.0	0.5	0	59	76	53.1±0.1 e	79.2±0.4 d
10	4.0	1.0	0	65	81	56.7±0.2 d	74.8±2.1 e
11	4.0	2.0	0	57	73	42.1±1.1 e	59.6±0.7 e

注 1:表中数据为四次重复平均值±标准误差;

2:数值后的不同字母表示差异显著性($P<0.01$)。表 2、表 3 同。

Note 1: The data in the table represent mean±S.E. of four replicates;

2: Values followed by different letters are significantly different($P<0.01$). The letters have the same meaning in the following table 2 and 3.

接种于分化培养基上(表 2)。据金红^[19]和 E.Gumerova^[20]的实验结果,6-BA 是荞麦分化的必需激素,因此培养基的设计以 6-BA 为基础。当接种在无激素的 1 号 MS 培养基上时,愈伤组织无分化现象且变得更加坚硬,并出现生根现象。在其他分化培养基上,红色的愈伤组织逐渐变成棕黄色或黄绿色,一个月后愈伤组织上出现绿色芽点(图版 I, 图 D、E),而有的培养基(2 号、8 号)比 1 号培养基生根还多,可能是由于 NAA 更有利于根的形成,在后来的生根实验中也证明了这一点。愈伤组织在分化培养基上每 2 周转接一次,否则生根和褐化程度都会加重。

在只含 6-BA 或 KT 的培养基上,6-BA 对芽分化的影响较大,其诱导率相对于 KT 提高了 2 倍之多(见表 2)。但只加 2 mg/L 6-BA 时分化率并不高,再加入 0.1 mg/L IAA 和 1 mg/L KT 时,分化率可以提高 3 倍以上,分化频率最高(7 号培养基),这可能是由于水解酪蛋白能加强激动素诱导分化的作用,特别是当有一定水平的 IAA 存在时诱导效果更为显著^[21]。而当激素含量过高时(10 号培养基),不但分化率降低,而且绿芽还会出现玻璃化现象。在 7 号培养基上出现芽点的愈伤组织中,有 92.3%的愈伤组织上芽点不断增加,2 周后逐渐形成丛生芽(图版

I, 图 K)。

2.4 培养基种类及激素配比对荞麦再生根的影响

将增殖后生长状态良好长 2-3cm 的不定芽从愈伤组织上切下,接种到不同激素组合的 MS、1/2 MS、和 1/2 MS+1%活性炭生根培养基上进行培养,12d 后统计生根率及生根状况(表 3)。据汪建亚^[22]等报道,活性炭有促进生根的作用,但荞麦再生苗在 1/2 MS+1%活性炭的各种激素组合的生根培养基上培养 21d 后仍然没有生根迹象,这可能是由于活性炭不仅吸附了植物生根时产生的有害物质,也吸附了培养基中的各种激素造成的。同样激素配比的 1/2 MS 比 MS 在荞麦生根时更为有效,而且生长迅速,说明低盐浓度有利于根的形成。

激素种类及浓度对根的形成也有较大的影响。在培养过程中发现激素 IAA 的加入不但没有促进根的产生,在它和别的激素组合时反而降低了根的长度及生根率(6 和 7 号培养基),所以说激素 IAA 不利于荞麦根的产生和生长。同时从表 3 中可以看到在 0.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L IBA 的 1/2 MS 上生根比较容易,3 d 后每个不定芽上就可以产生 7-8 条根,而在其他培养基上此时还没有生根。一周后达到 22-23 条根,平均根长 1.3 cm 左右,因此我们选择该培养基作为生根培养基。

表 2 不同激素对荞麦子叶和下胚轴愈伤组织分化的影响
Table 2 Effects of different phytohormones on differentiation of callus

培养基编号 NO. of media	激素 Phytohormones (mg/L)				接种外植体数 No. of inoculated explants		分化率(mean±SD) Shoot differentiation rate(%)	
	6-BA	KT	IAA	NAA	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
					Cotyledon	Hypocotyl	Cotyledon	Hypocotyl
1	0	0	0	0	41	46	0 a	0 a
2	1	1	0	0.1	39	47	13.2 b	21.8 b
3	0	2	0	0	43	49	3.19 b	8.3 d
4	2	0	0	0	37	46	13.6 f	23.5 c
5	2	0	0.1	0	56	73	39.6 a	68.4 d
6	2	1	0	0	63	78	31.7 e	46.8 f
7	2	1	0.1	0	65	83	42.5 c	73.6 g
8	2	1	0.2	0.1	51	72	37.3 e	59.2 a
9	2	1	0	0	57	69	29.6 d	51.2 c
10	2	2	0	0	48	55	30.3 g	43.7 g

表 3 荞麦不定芽的生根
Table 3 Rooting of *Fagopyrum esculentum* adventitious shoots

植物激素 (mg/L) Phytohormones				平均根长 (cm) Average length	生根率 (%) Rooting rate	生根指数 Rooting index	开始生根时间 (d) Rooting time	根生长情况 Growing characters of root
No	NAA	IBA	IAA					
1	0	0	0	0 a	0 a	0 a	-	无根产生
2	0.5	0	0	1.73 c	100 b	16.87 d	12	一般长、主侧根明显
3	0	0.5	0	1.90 d	75.6 d	10.63 g	12	一般长且细、主侧根明显、有毛状根
4	0	0	0.5	0 a	0 c	0 a	-	无根产生
5	0.5	0.5	0	3.80 e	100 e	35.4 e	9	较长且粗、主侧根明显、有毛状根
6	0.5	0	0.5	1.27 b	100 a	18.93 f	9	根粗而短、主侧根不明显
7	0	0.5	0.5	0.77 f	66.7 f	10.67 g	11	短且细、主侧根不明显、有毛状根
8	1	0	0	0.67 b	71.4 d	4.93 c	7	根细而短、主侧根不明显
9	0	1	0	2.10 g	85.7 g	29.73 e	7	一般长且细、主侧根明显、有毛状根
10	0	0	1	0 a	0 a	0 a	-	无根产生
11	0.5	1	0	2.07 g	100 b	84.76 b	3	一般长且粗、主侧根明显、有毛状根
12	1	0.5	0	0.97 d	76.9 c	16.49 c	4	短且细、主侧根不明显、有毛状根

注 1. “-”表示在此培养基上一直无根产生。 2. 培养基以 1/2 MS 为基础。

Note 1. “-”No root formed on this medium. 2. The medium is based on 1/2 MS.

2.5 吲哚丁酸 (IBA) 和萘乙酸 (NAA) 对诱导荞麦再生苗生根的影响

从不定芽形成的再生苗在附加不同浓度 IBA 和 NAA 的 MS 或 1/2 MS 培养基上 3-10 d 后就会产生不定根。12 d 后统计生根情况及 IBA、NAA 对荞麦生根情况的影响, 结果见图 2。荞麦生根比较困难, 不定芽在无 IBA 和 NAA 的 MS 或 1/2 MS 培养基上培养时, 一个月后仍然无根形成。低浓度的 NAA 和 IBA 对荞麦再生苗生根具有明显的促进作用, 但较

高浓度的 NAA 对根的形成有不利的影响。同时在荞麦不定芽生根过程中发现, 加入适量时 NAA 形成的根粗、短且多, 加入 IBA 时形成的根细、长且主根上还形成许多毛状根, 但 IBA 和 NAA 以一定的比例混合使用时效果较好, 其中 1/2 MS+1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L NAA 培养基最适合生根, 不但根粗、长且多 (图版 I, 图 L, N), 而且生根频率也达到了 100%。

2.6 练苗与移栽

将在生根培养基上生长 20 d 左右, 根系发达和

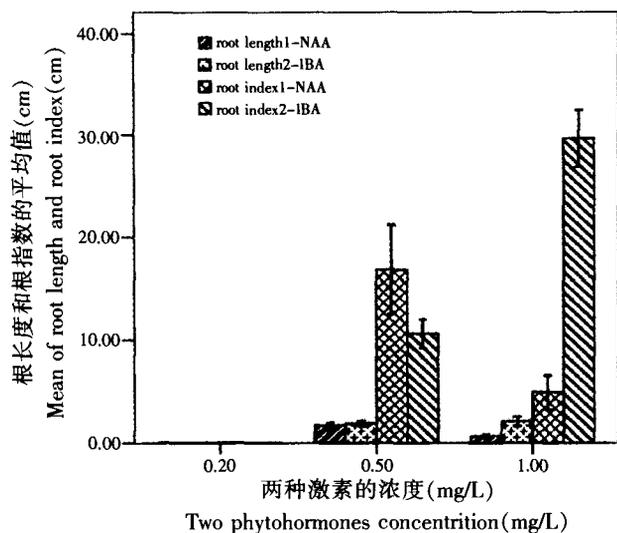


图2 NAA, IBA 的浓度对荞麦不定芽根分化的影响

Fig.2 Effects of NAA, IBA concentration on root formation of adventitious buds of buckwheat

Error bars: \pm 2.00 SE

生长健壮的小苗, 敞开瓶盖练苗, 然后移栽于盆土中, 再生植株成活率为 91.6%, 且生长良好, 未见形态异常(图版 I, 图 M)。

3 讨论

在植物组织培养过程中, 不同的愈伤组织类型往往具有不同的分化能力和发育潜力, 这可能与细胞所处的分化状态有关。不同类型的愈伤组织中细胞的形态结构特征和生理生化特征可能不一样, 因而会表现出不同的形态发生能力。本实验中, 荞麦的下胚轴不论是愈伤组织诱导率还是愈伤组织分化率都比子叶的高, 原因可能就在于此。在影响愈伤组织形态分化的诸因素中, 除了愈伤组织自身的基因型和外植体类型外, 培养基的组成和培养条件也是重要的、可塑性最大的影响因素。通过改变培养基的组成(特别是生长调节物质)和培养条件, 往往可以使一种类型的愈伤组织转变为另一种类型的愈伤组织, 如荞麦的 II 型愈伤组织可以转变为 I 型愈伤组织。对处于不同分化状态的愈伤组织来说, 这种转变过程在时间上长短不一。同时不同荞麦外植体在诱导不定芽时, 既有器官发生途径(图版 I, 图 F、G、H)也有体胚发生途径, 而且和一般的体胚发生途径还有很大的不同(图版 I, 图 I、J), 但大多数外植体主要经历的是器官发生途径。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(如随着继代时间的延长, 愈伤组织褐化程度加重; 不定芽增

值过程中, 出现脱叶现象, 而且玻璃化现象也逐代增加)还有待于进一步解决。

参 考 文 献

- [1] 王红育、李 颖, 2004, 荞麦的研究现状及应用前景。食品科学, **25**: 388-391。
- [2] 中草药编写组中药大辞典, 1993, 上海: 上海人民出版社, 1595-1596。
- [3] Sun, T. & C.T. HO, 2005, Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, **90**: 743-749.
- [4] 项昭保、绍 光、石轶松, 2002, 吸光光度法测定荞麦桔中总黄酮。理化检验-化学分册, **38**(9): 436-437。
- [5] 刘淑梅、韩淑英、崔国金, 2003, 甜荞麦叶总黄酮降糖降脂作用及机制。第四军医大学学报, **24** (19): 1815-1817。
- [6] Yoshioka, H., T. Ohmoto, A. Urisu, Y. Mine & T. Adachi, 2004, Expression and epitope analysis of the major allergenic protein Fag e1 from buckwheat. *J. Plant Physiol.*, **161**(7): 761-767.
- [7] 杨文军、景 巍、侯晓军、张 政、王转花, 2003, 苦荞过敏蛋白 TB22 的原核表达及转化。中国生物工程杂志, **23** (11): 76-79。
- [8] Milisavljevic M.D.j, G.S. Timotijevic, S.R. Radovic, J.M. Brkljacic, M.M. Konstantinovic & V.R. Maksimovic, 2004, Vicilin-like storage globulin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **52**(16): 5258-5262.
- [9] Milisavljevic M.D.j, M.M. Konstantinovic, J.M. Brkljacic & V.R. Maksimovic, 2005, Isolation and computer analysis of the 5'-regulatory region of the seed storage protein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Agric. Food Chem.*, **53**(6): 2076-2080.
- [10] Brkljacic, J.M., J.T. Samardzic, G.S. Timotijevic & V. R. Maksimovic 2004, Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein-like gene (MT3) under different stress and physiological conditions. *J. Plant Physiol.*, **161**(6): 741-746.
- [11] Tsybina, T, Y. Dunaevsky, A. Musolyamov, T. EGorov, N. Larionova & M. Belozersky, 2004, New protease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Boil. Chem.*, **385** (5): 429-434.
- [12] 张 政、李玉英、史晓辱、王转花, 2005, 甜荞胰蛋白酶抑制剂 cDNA 片段的克隆及序列特征。西北植物学报, **25** (1): 46-51。
- [13] Fujimura, M., Y. Minami, K. Watanabe & K. Tadera, 2003, Purification, characterization, and sequencing of a novel

- type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(8):1636-42.
- [14] Suzuki, T., Y. Honda, W. Funatsuki & K. Nakatsuka, 2002, Purification and characterization of flavonol-3-glucosidase and its activity during ripening in tartary buckwheat seeds. *Plant Science*, **163**: 417-423.
- [15] Suzuki, T., Y. Honda & Y. Mukasa, 2004, Purification and characterization of lipase in buckwheat seed. *J. Agric. Food. Chem.*, **52**(24): 7407-7411.
- [16] Ueda, T., M.P.Coseo, T.J.Harrell & R.L.Obendorf, 2005, A multifunctional galactinol synthase catalyzes the synthesis of fagopyritol A1 and fagopyritol B1 in buckwheat seed. *Plant Science*, **168**: 681-690.
- [17] Srejavie, V. & M. Neskouic, 1981, Regeneration of plants from cotyledon fragments of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Z. Pflanzenphysiologie*, **104**:37-42.
- [18] 侯建华、耿庆汉, 1995, 荞麦愈伤组织培养及分化研究。内蒙古农牧学院学报, **16**(3):21-25。
- [19] 金红、郝建国、马洪军、贾敬芬, 1999, 荞麦组织培养及植株再生。西北大学学报, **29**(6): 611-614。
- [20] Gumerova, E.A., E.I. GaLeeva, S.A. Chuyenkova & N. I. Rumyantseva, 2003, Somatic embryogenesis and bud formation on cultured *Fagopyrum esculentum* hypocotyls. *Russian Journal of Plant Physiology*, **50**(5):716-721.
- [21] 王关林、方宏筠, 2002, 植物基因工程。北京: 科学出版社, 353-354。
- [22] 汪建亚、河野耕藏, 1998, 猕猴桃的组织培养及繁殖能力的研究。林业科学研究, **11**(6):635-639。

TISSUE CULTURE AND HIGH-FREQUENCY PLANT REGENERATION OF BUCKWHEAT (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH)

CHEN Li Hong¹ XU Zi Qin*

(Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Northwest University, Xi'an 710069)

ABSTRACT Different explants and compounding proportions of different hormones were comparatively studied in tissue culture of *Fagopyrum esculentum* Moench and thereafter an efficient plant-regeneration system was established by *in vitro* *F.esculentum* Moench culture. On MS medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L 6-BA, 89.6% cotyledon segments could be induced to produce calli; however, on MS medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0-2.0 mg/L 6-BA, the induction rate of hypocotyl segments could reach as high as 100%. On MS medium containing 2.0 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L IAA and 1 mg/L KT, adventitious buds could be regenerated indirectly from calli or directly from explants, the differentiation rates of cotyledon-derived calli and hypocotyl-derived calli were 42.5% and 73.6% respectively; the calli coming from hypocotyl segments differentiated evidently at a higher rate than the calli originated from cotyledon segments. Well-grown adventitious buds were inoculated on 1/2 MS medium containing 1.0 mg/L IBA and 0.5mg/L NAA, 100% rooting frequency was obtained. Plantlets grew well and appeared normal with no mortality after being transplanted to soil. Moreover, the survival rate of plantlets reached 91.6%.

Key words: Buckwheat. Callus. Tissue culture. Organogenesis. Plant regeneration

* Corresponding author, E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn

图 版 说 明

图 版 I

荞麦的离体再生发育过程

- 图 A 在只有 2.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,一周后形成哑铃型的愈伤组织; $\times 7.5$
- 图 B 在 2.0 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA 培养基上,15d 后产生棕黄色或微带红色的疏松愈伤组织 (I 型); $\times 7.5$
- 图 C 在 2.0 mg/L 2,4-D 和 1.5-2.0 mg/L 6-BA 培养基上,15d 后产生绿色或棕绿色、质地紧密且较硬的愈伤组织(II 型); $\times 7.5$
- 图 D,E 在含 2 mg/L 的 6-BA、0.1 mg/L IAA 和 1 mg/L KT 的 MS 分化培养基上,30d 后形成的绿色不定芽; $\times 7.5$
- 图 F,G,H I 型愈伤组织转到 2 mg/L 6-BA、0.1 mg/L IAA 和 1 mg/L KT 的 MS 培养基上,出现的分化情况; $\times 7.5$
- 图 I,J II 型愈伤组织转到 2 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L IAA 的 MS 培养基上,出现的分化情况; $\times 15$
- 图 K 在 7 号分化培养基上出现芽点的愈伤组织中,绿色芽点不断地增加,2 周后形成的丛生芽; $\times 1$
- 图 L 不定芽在附加 1.0 mg/L IBA,和 0.5 mg/L NAA 的 1/2 MS 生根培养基上,7d 后形成的不定根; $\times 1$
- 图 M 生根的不定芽,敞开瓶盖练苗 2-3 d 后,移栽到盆土中; $\times 1$
- 图 N 不定芽在附加 1.0 mg/L IBA,和 0.5 mg/L NAA 的 1/2 MS 生根培养基上,5d 后形成的不定根; $\times 1$

EXPLANATION OF FIGURES

PLATE I

Plant regeneration of buckwheat *Fagopyrum esculentum*

- Fig.A The dumbbell-like calli induced after 7 d from hypocotyl segments on MS containing 2.0 mg/L 2,4-D; $\times 7.5$
- Fig.B The yellowish or slight red loosen calli (Type I) induced after 15 d from hypocotyl explants on MS supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L 6-BA; $\times 7.5$
- Fig.C The green or heavily green hard calli (Type II) induced after 15 d from hypocotyl explants on MS supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D and 1.5~2.0 mg/L 6-BA; $\times 7.5$
- Fig.D,E Green adventitious shoots regenerated after 30 d on differentiation MS medium supplemented with 2 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L IAA and 1 mg/L KT; $\times 7.5$
- Fig.F,G,H Differentiation of Type I calli after transferring to MS medium containing 2 mg/L 6-BA 0.1mg/L IAA and 1 mg/L KT; $\times 7.5$
- Fig.I,J Differentiation of Type II calli after transferring to MS medium containing 2 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L IAA; $\times 15$
- Fig.K The green shoots continually increased on No.7 differentiation MS medium, and the adventitious shoots formed after 2 weeks; $\times 1$
- Fig.L The roots formed after 7 d from adventitious shoots on 1/2 MS with 1.0 mg/L IBA and 0.5 mg/L NAA; $\times 1$
- Fig.M Rooted shoots were adapted for 2-3 d by opening the lids of containers and then transplanted to soil; $\times 1$
- Fig.N The roots formed after 5 d from adventitious shoots on 1/2 MS with 1.0 mg/L IBA and 0.5 mg/L NAA. $\times 1$

图 版 I

