

向日葵离体再生体系的建立

王园园, 李彩凤, 张翼飞, 陈业婷, 赵丽影, 越鹏, 滕祥勇, 王南博

东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030

摘要: 为了建立高效的向日葵离体再生体系, 从基因差异、外植体取材、生长素和细胞分裂素浓度、附加物的添加等方面出发, 对向日葵愈伤诱导、分化、生根等过程进行了系统优化。结果表明: 杂交材料相对于自交材料更容易实现再生; 最佳外植体是生长 4 d 的子叶; 最佳愈伤诱导培养基是 MS 培养基 (MS) +2.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤 (6-BA)+0.5 mg/L 萘乙酸 (NAA)+1.0 mg/L 激动素 (KT), 诱导率最高可达 100%; 最佳分化培养基是 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.3 mg/L KT+0.3 mg/L 硝酸银 (AgNO₃)+0.2 g/L 活性炭 (AC), 芽分化率可达 71%; 最佳生根培养基是 1/2 MS+0.6 mg/L 吲哚丁酸 (IBA), 生根率最高为 77%。方差分析表明, 材料基因型、外植体生长时间、激素、AgNO₃、AC 对向日葵再生呈现显著性影响。

关键词: 向日葵, 离体再生, 愈伤组织诱导, 芽分化, 生根

Establishing the regeneration system of sunflower

Yuanyuan Wang, Caifeng Li, Yifei Zhang, Yeting Chen, Liying Zhao, Peng Yue, Xiangyong Teng, and Nanbo Wang

College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: In order to establish a high efficient regeneration system of sunflower, we optimized the process of callus induction, differentiation and rooting by screening the optimum genotype, explant materials, hormone and cytokine concentration and additives. The results indicated that hybrid sunflowers were easier to regenerate than selfing ones; The best explant was four days cotyledon. The optimum induction medium was Murashige and Skoog (MS) +2.0 mg/L 6-benzyladenine (6-BA)+0.5 mg/L naphthaleneacetic acid (NAA)+1.0 mg/L kinetin (KT). The maximum rate of callus induction was 100%. The optimum differentiation medium was MS +0.2 mg/L 6-BA +0.5 mg/L NAA +0.3 mg/L KT +0.3 mg/L silver nitrate (AgNO₃)+0.2 g/L active carbon (AC), and the buds differentiation rate was up to 71%. The best rooting culture medium was 1/2 MS +0.6 mg/L indolebutyric acid (IBA). The highest rooting rate was 77%. The analysis of variance showed that genotype, explants growth time, different kinds and concentration of hormone, AC concentration had a significant effect on sunflower regeneration.

Keywords: sunflower, *in vitro* regeneration, callus induction, bud differentiation, rooting

向日葵 *Helianthus annuus* L. 是世界上重要的油料作物之一^[1]。利用现代生物技术手段培育向日葵新品种, 是向日葵研究的重要工作, 而离体再生是生物技术的重要手段。从 20 世纪 80 年代, 人们对向日葵离体再生培养进行了大量研究, 已经利用茎尖^[2]、子叶^[3]、真叶^[4]、下胚轴^[5]、花药^[6]、原生体^[7]等不同程度地得到了胚状体或植株, 但是诱导出芽的频率不高, 而且形成的芽不易长成植株。向日葵属于难再生作物^[8], 外植体类型、基因型^[9]、无菌苗日龄^[10]、内外源激素^[11]、NO₃⁻浓度^[4]、酚类及其氧化物^[12]等都是制约其再生的重要因素。基因型的差异使得向日葵组织培养植株再生研究仅在有限的基因型上获得成功^[12]; 马雪霞等^[14]的实验证明, 苗龄 2~4 d 的子叶外植体再生能力很低而且易形成单株; Paterson 等^[10]和徐培洲等^[3]的研究结果指出, 诱导培养基中若含有 2,4-D, 则获得的愈伤没有再生能力。

迄今为止有关向日葵离体培养的研究文献中, 未见能够较全面、较系统对向日葵离体再生过程进行优化研究的报道。本研究将在前人研究基础上从基因型、外植体的选择, 培养基激素配比、褐化控制等方面对影响向日葵离体再生的因素进行进一步探究, 对其再生条件进行优化, 提高向日葵离体再生频率, 建立高效的向日葵离体再生体系。

1 材料与方法

1.1 材料

10 份向日葵试验材料由东北农业大学提供, 其中 1~5 号为杂交品系, 6~10 号为自交品系。

1.1.1 无菌苗的制备

将供试的 10 份向日葵种子, 不去种壳, 用 70% 的酒精溶液浸泡 1 min, 再用 10% 的过氧化氢溶液消毒 30 min 或 0.1% 的升汞溶液消毒 5 min, 最后用无菌水冲洗 5 遍。胚端朝上接种于无激素 MS 培养基上, 其中蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L 进行无菌苗的制备。

1.1.2 外植体的选择

从健壮的不菌苗上选取生长 2~10 d 的子叶、下

胚轴、叶片作为外植体, 将下胚轴切成约 1 cm 长的小段, 叶片、子叶切成 0.5 cm 宽的小片, 根据培养目的, 选择不同的外植体, 接种于不同的培养基上。培养室温度为 26 °C~28 °C, 先完全黑暗培养 3 d 后转入光照培养, 光照时间每天 15 h, 光强 2 000 lx 左右。

1.2 试验设计

1.2.1 基因型选择试验设计

10 份向日葵种子分别培养无菌苗, 选择其生长 4 d 的子叶作为外植体接种到 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 诱导培养基上, 继代 2 次后转入分化培养基 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA。每个品种处理重复 5 次, 每瓶接种 20 个外植体, 统计其愈伤诱导率和芽的分化率。

1.2.2 外植体取材试验设计

选择芽分化率最高的杂交一代材料 4 号作为试验材料, 培养无菌苗, 分别选择生长 2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 的子叶、下胚轴、叶片, 接种到 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 愈伤诱导培养基和 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 分化培养基上, 每个处理重复 5 瓶, 每瓶接种 20 个外植体, 统计愈伤诱导情况和芽的再生率。

1.2.3 愈伤诱导的实验设计

以 4 号材料和生长时间为 4 d 的子叶作为外植体, 研究细胞分裂素 6-BA、NAA 以及细胞生长素 2,4-D、KT 4 种外源激素的不同激素配比对向日葵愈伤组织诱导的影响。愈伤诱导试验参考宋英今等^[15]的试验方法, 用软件设计 L₉(3⁴) 正交试验, 4 种激素的浓度分别选取 3 个水平 (表 1), 共计 9 个处理, 每个处理重复 5 次, 每瓶接种 20 个外植体统计愈伤诱导率。

表 1 向日葵愈伤诱导培养的正交试验设计因素和水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental design for sunflower callus induction

Factors		1	2	3
A	6-BA (mg/L)	0	1.0	2.0
B	NAA (mg/L)	0	0.5	1.0
C	2,4-D (mg/L)	0	1.0	2.0
D	KT (mg/L)	0	0.5	1.0

1.2.4 向日葵再生芽分化试验设计

选择最佳愈伤组织, 转入分化培养基上进行分化培养试验, 每隔 7 d 继代 1 次。分化培养基试验选用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验, 研究不同浓度的附加物 $AgNO_3$ 、活性炭 (Activated carbon, AC) 以及细胞分裂素 NAA、生长素 KT 和 6-BA 对向日葵再生芽率和褐化率的影响。 $AgNO_3$ 、AC、NAA、KT、6-BA 分别选取 4 个水平 (表 2), 共计 16 个组合, 每个处理重复 5 瓶, 每瓶接种 20 个愈伤组织, 统计芽的诱导率和褐化率。

表 2 向日葵分化的正交实验设计因素和水平
Table 2 Factors and levels of orthogonal experimental design for sunflower differentiation

Factors	1	2	3	4
A AC (g/L)	0	0.1	0.3	0.5
B $AgNO_3$ (mg/L)	0	0.2	0.5	1.0
C 6-BA (mg/L)	0	0.2	0.5	1.0
D NAA (mg/L)	0	0.2	0.5	1.0
E KT (mg/L)	0	0.1	0.3	0.5

1.2.5 生根培养试验设计

切取分化培养基中生长健壮的单株小苗, 接种于生根培养基上, 培养 20 d 后, 统计生根数和根的生长情况生根培养基试验以 MS、1/2 MS、1/4 MS 为基本培养, 添加不同浓度的激素 IBA (0、0.3、0.6、0.9 mg/L), 共计 12 个处理, 每个处理重复 5 瓶, 每瓶接种 3 株小苗, 统计生根率。

1.2.6 试验数据计算

愈伤诱导率=(产生愈伤组织的数量/接种的外植体数量) $\times 100\%$ 。

褐化率=(褐化的愈伤组织的数量数/接种愈伤组织的数量) $\times 100\%$ 。

芽诱导率=(分化出芽的愈伤组织的数量/接种的愈伤组织的数量) $\times 100\%$ 。

生根率=(接种的小苗数/带有根的苗数) $\times 100\%$ 。

1.2.7 数据统计

统计结果采用 Excel、SPSS13.1 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同基因型材料愈伤诱导率和芽分化率

由表 3 可以看出, 不同基因型材料的愈伤的诱导率不同, 但都在 80% 以上, 其中 2 号、4 号、10 号都达到 100%。芽的分化率差别比较大, 除 10 号自交品种略高于 3 号杂交品种外, 1、2、4、5 号杂交材料再生品种均高于其他自交材料, 自交材料 6 号和 9 号没有芽的出现。再生率最高的为 4 号杂交一代品种, 再生率为 37%, 本研究以其为主要试验材料进行后续试验, 通过对试验结果的方差分析可知, 基因型对愈伤诱导率和再生芽诱导率都呈现显著性关系, 可见选择合适的基因型是向日葵再生的重要条件, 具体见表 4。

表 3 不同基因材料的愈伤诱导率和芽再生率
Table 3 The callus induction rate and shoot regeneration rate of different genetic materials

Cultivars No.	Callus induction rates (%)	Buds regeneration rates (%)
1	98	27
2	100	31
3	89	20
4	100	37
5	93	24
6	87	0
7	93	19
8	91	17
9	85	0
10	100	23

2.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

三种外植体中, 下胚轴首先形成愈伤, 暗培养 2 d 后两端开始膨大, 5 d 后形成明显的愈伤, 其次是子叶, 6 d 左右形成明显愈伤, 最慢形成愈伤组织的是叶片, 8 d 才发现较为明显的愈伤; 但是下胚轴形成的愈伤组织大多都白色松散, 为非胚性愈伤, 不具有分化能力 (图 2)。子叶形成的愈伤为黄绿色致密的愈伤 (图 2), 具有较强的分化能力。叶片形成愈伤较慢, 而且容易干枯; 随着取材时间的延后,

外植体的愈伤诱导率都呈现先增加后降低的趋势,取材时间为 3 d 的下胚轴有最高的愈伤诱导率,子叶的最佳取材时间为 4 d,最高愈伤诱导率达 97%,显著高于叶片和下胚轴的最高诱导率,具体见表 5。将取材时间和外植体类型对愈伤诱导率的影响结果进行方差分析表明,取材时间对愈伤诱导影响呈差异显著,外植体类型不显著,具体见表 6。综合比较,最佳的外植体是生长 4 d 的子叶,并将其作为后续试验的外植体,进行后面的研究。

2.3 外源激素对向日葵愈伤诱导的影响

由表 7 可知,除 1 号不添加激素的对照外,其余处理组合诱导率均达到 70% 以上,其中 4、6、8、9 号组合的诱导率均达到 100%。不同试验处理中,愈伤组织的生长和颜色有所不同。绿色致密的愈伤为胚性愈伤,具有分化能力(图 2)。疏松、水性愈伤不具备分化能力,属于非胚性愈伤。1、6、8 号处理组合形成的愈伤为致密愈伤,具有分化能力(图 2)。4、5、8、9 号处理愈伤生长速度较快,1 号

表 4 基因型对向日葵愈伤诱导率和出芽率影响的方差

Table 4 Variance analysis of the effect of genetic materials on callus induction rate and shoot regeneration rate

Factors	Results	Sum of squares	DF	Mean square	F	Significance
Genotypes	Induction rate	608.050	9	67.561	32.957	0.000
	Shoot rate	2 719.050	9	302.117	154.932	0.000
Error	Induction rate	20.500	10	2.050		
	Shoot rate	19.500	10	1.950		
Total	Induction rate	173 051.000	20			
	Shoot rate	10 461.000	20			

表 5 不同取材时间的外植体愈伤诱导率结果

Table 5 The result of the effect of explants based time on callus induction rate

Sampling time (d)	Cotyledon callus induction rate (%)	Leaf callus induction rate (%)	Hypocotyls callus induction rate (%)
1	66	69	71
2	77	78	77
3	83	89	93
4	97	81	84
5	71	70	81
6	65	64	74
7	60	56	68
8	54	47	61
9	49	40	55
10	66	69	71

表 6 外植体取材时间和部位对愈伤诱导率影响的方差分析

Table 6 Variance analysis of the effect of explants based time and area on callus induction rate

Factors	Sum of squares	Df	Mean square	F	Significance
Explant type	228.741	2	114.370	5.969	0.120
Drawn time	3 937.185	8	492.148	25.683	0.000
Error	306.593	16	19.162		
Total	130 821.000	27			

不含激素的处理愈伤生长速度最慢。综合分析, 8号处理组合诱导的愈伤为胚性愈伤, 且生长状况良好, 为最佳组合, 即 MS+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L KT。通过对表 7 结果的方差分析可知, 4 种激素都对愈伤诱导呈现显著性影响, 按照影响关系的递减的顺序进行排序, NAA>6-BA>KT>2,4-D, 具体见表 8。

2.4 向日葵芽的分化

从表 9 可以看出, 所有处理都能一定程度地诱导出芽, 其中 3、5、2 号处理芽的分化率较高, 分别为 71%、47%和 46%。1 号处理不含任何附加物, 芽诱导率最低仅为 9%, 同时褐化率较高为 57%。所有的处理都有不同程度的褐化, 其中 4 号处理的褐化程度最轻为 5%。由表 10 和表 11 方差分析可知, AgNO₃、AC、6-BA、NAA 和 KT 的浓度对向日葵

芽的诱导和褐化率影响程度均达到显著水平, 其中对分化率的影响程度依次为: NAA>6-BA>KT>AgNO₃>AC, 对褐化率的影响程度均达到显著水平, 依次为: AC>6-BA>NAA>KT>AgNO₃。

2.4.1 硝酸银对芽分化和褐化的影响

由图 1 可以看出, 随着 AgNO₃ 浓度的增加, 芽的诱导率先增加后降低, 褐化率先降低后升高。经 LSD 多重比较分析, 不同浓度的 AgNO₃ 对向日葵芽的分化在 1、2 水平间呈现显著性差异, 在 3、4 水平间呈现极显著性差异; 在芽分化过程中, AgNO₃ 对褐化的影响在 2、3 和 3、4 水平之间均呈现极显著差异。由图 1 可以清晰看出当 AgNO₃ 浓度在第 3 水平 (0.3 mg/L) 时, 芽的诱导率最高, 褐化率最低, 因此在向日葵芽的诱导过程中, 最佳的 AgNO₃ 浓度为 0.3 mg/L。

表 7 不同激素组合处理下愈伤组织的诱导率和生长状况

Table 7 Effect of different hormone combination on callus induction and growth

Treatment No.	A	B	C	D	Induction rate (%)	Color	Growth response
1	1	1	1	1	16	Yellow	Density +
2	1	2	2	2	73	Pale yellow	Loose ++
3	1	3	3	3	79	Pale yellow	Water state++
4	2	1	2	3	100	Green	Loose +++
5	2	2	3	1	87	Pale yellow	Water state+++
6	2	3	1	2	100	Green	Density++
7	3	1	3	2	81	Pale yellow	Water state++
8	3	2	1	3	100	Green	Density ++++
9	3	3	2	1	100	Pale yellow	Loose +++

Note: + + + +, + + +, + +, + mean the state of alfalfa callus was very good, good, general and bad, respectively.

表 8 激素对向日葵愈伤诱导影响的方差分析

Table 8 Variance analysis of the effect of hormones on callus induction

Factors	Sum of squares	Df	Mean square	F	Significance
NAA	5 557.000	2	2778.500	666.840	0.000
6-BA	2 264.333	2	1132.167	271.720	0.000
2,4-D	862.333	2	431.167	103.480	0.000
KT	2 057.333	2	1028.667	246.880	0.000
Error	37.500	9	4.167		
Total	129 363.000	18			

表 9 向日葵芽的分化结果与分析

Table 9 Results and analysis of sunflower buds differentiation

Treatment No.	Factors					Differentiation rate (%)	Browning rate (%)
	A	B	C	D	E		
1	1	1	1	1	1	9	57
2	1	2	2	2	2	46	32
3	1	3	3	3	3	47	17
4	1	4	4	4	4	12	5
5	2	1	2	3	4	71	31
6	2	2	1	4	3	39	28
7	2	3	4	1	2	17	37
8	2	4	3	2	1	31	11
9	3	1	3	4	2	41	34
10	3	2	4	3	1	37	22
11	3	3	1	2	4	40	13
12	3	4	2	1	3	33	9
13	4	1	4	2	3	34	47
14	4	2	3	1	4	29	22
15	4	3	2	4	1	39	19
16	4	4	1	3	2	40	11

表 10 各因素对向日葵芽分化的方差分析

Table 10 Variance analysis of the effect of each factor on sunflower buds differentiation rates

Factors	Sum of squares	Df	Mean square	F	Significance
A (AgNO ₃)	363.375	3	79.750	19.188	0.000
B (AC)	351.375	3	346.250	18.554	0.000
C (6-BA)	1 294.375	3	1 144.500	68.350	0.000
D (NAA)	2 039.375	3	1 548.750	107.690	0.000
E (KT)	471.375	3	544.083	24.891	0.000
Error	101.000	16	7.875		
Total	45 376.000	32			

表 11 各因素对向日葵褐化的方差分析

Table 11 Variance analysis of the effect of each factor on sunflower buds browning rates

Factors	Sum of squares	Df	Mean square	F	Significance
A (AgNO ₃)	308.125	3	102.708	31.603	0.000
B (AC)	4 109.625	3	1 369.875	421.500	0.000
C (6-BA)	337.125	3	112.375	34.577	0.000
D (NAA)	571.375	3	190.458	58.603	0.000
E (KT)	602.625	3	200.875	61.808	0.000
Error	52.000	16	3.250		
Total	24 126.000	32			

2.4.2 活性炭对芽分化和褐化的影响

通过 LSD 多重比较分析, AC 对向日葵芽的分化在 1、2 水平之间呈现显著性差异, 在 3、4 水平之间呈现极显著差异, 对褐化的影响在各水平之间均呈现显著差异, 其中在 1、2 和 3、4 之间均呈极显著水平。从图 1 可以看出, 低浓度的 AC 对芽的分化并没有明显的影响, 但随着浓度的增加, AC 对芽的分化起抑制作用, 在 200 mg/L 时芽分化率最高; AC 的添加能有效地抑制褐化的产生, 随着浓度的增加, 褐化率显著降低, 但是分化率也呈现下降趋势, 所以本研究认为 200 mg/L 的 AC 为最适浓度。

2.4.3 激素对芽分化和褐化的影响

6-BA 对向日葵芽的诱导影响是随着浓度的增加, 先促进后抑制, 对褐化的影响是先降低后增加。通过 LSD 分析, 6-BA 对芽诱导的影响在各个水平间均呈现显著水平, 其中 1、2 和 3、4 水平之间呈极显著水平, 对褐化的影响在 1、2 和 3、4 水平之间呈现极显著差异。由图 1 可以清晰地看出, 当 6-BA 为 2 水平 (0.2 mg/L) 时, 芽的分化率最高, 但是褐化率不是最低的, 通过显著性分析, 2 和 3 水平之间分化率和褐化率都没有显著性差别, 为求得更高的分化

率, 本试验认定 0.2 mg/L 6-BA 为最佳芽分化浓度。

不同浓度水平的 NAA 对芽的诱导影响同 6-BA 一样, 也是先增加后降低, 对褐化的影响是先抑制后促进。通过 LSD 分析, NAA 对芽的诱导影响在各个水平间都呈现极显著差异, 对褐化的影响是在 1、2 和 2、3 水平之间呈极显著差异, 在 3、4 水平之间不呈现显著差异。由图 1 明显可看出, 最佳的 NAA 浓度为 0.5 mg/L。

芽的分化率在所设的 4 个 KT 浓度水平之间呈现先增加后下降的趋势, 褐化率一直呈现下降趋势。通过 LSD 分析, KT 浓度在 1、2 和 3、4 之间呈现极显著差异, 在 2、3 之间差异不显著, 而对褐化的影响是在 2、3 和 3、4 之间呈现极显著差异, 在 1、2 之间无显著差异。综合考虑芽的诱导率和褐化率, 当 KT 浓度为第 3 水平 (0.3 mg/L) 时, 最有利于向日葵芽的分化。

2.5 培养基和 IBA 对生根的影响

在分化培养基上诱导的芽会进一步分化形成苗, 并且带有少量根系, 分化苗剪下根系后, 在不同的培养基上培养, 10 d 即可长出新的根系。如表 8 所示, 在试验设计的 12 种生根培养基上, 每个处理的生根率都在 40% 以上; 就三种基本培养基比较,

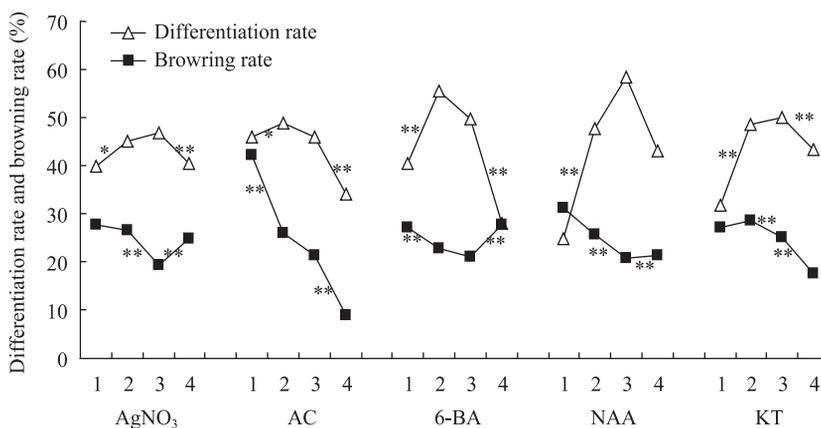


图 1 不同因素对芽分化率和褐化率的影响

Fig. 1 Effect of each factor on buds differentiation rates and brown rates. *Show significantly difference among levels. **Show very significantly difference among levels.

表 12 培养基和 IBA 对生根率的影响

Table 12 Effects of medium and IBA on rooting rates

Treatment No.	Basic medium	IBA (mg/L)	Rooting rates (%)	Root growth
1	MS	0.0	44	Relatively fine +
2	MS	0.3	49	Moderate stout ++
3	MS	0.6	48	Moderate stout ++
4	MS	0.9	53	Moderate stout, regarding +++
5	1/2 MS	0.0	52	Relatively fine ++
6	1/2 MS	0.3	71	Moderate stout ++
7	1/2 MS	0.6	77	Moderate stout, regarding +++
8	1/2 MS	0.9	69	Relatively fine +++
9	1/4 MS	0.0	50	Relatively fine +
10	1/4 MS	0.3	67	Moderate stout, regarding ++
11	1/4 MS	0.6	55	Moderate stout +++
12	1/4 MS	0.9	59	Moderate stout, regarding+++

Note: +++ root is the longest, ++ moderate length, + root shortest.

1/2 MS 培养基生根率较高；添加 IBA 有利于生根，且随着浓度的增加，生根率有所增加，长度也增加，但是多为须根（图 2）。IBA 浓度时在 0.6 mg/L 时主根最为粗壮，长度适中（图 2）。所以最佳的生根培养基为 1/2 MS+0.6 mg/L IBA。通过对生根结果的分差分析可知激素 IBA 对生根率呈现显著影响，基本培养基对结果影响性低于激素，呈现不显著影响。

3 讨论

3.1 基因差异对向日葵再生的影响

现有研究证明，向日葵的品种特性对其再生表现出决定性的作用，选择合适的培养材料是成功与否的关键^[16]。刘宝等^[17]对 51 份向日葵自交系材料进行了离体培养，所有的品种都能获得愈伤组织，但是只有 16 份获得再生芽；徐培洲等^[3]对 8 份向日葵材料进行再生诱导，其中 5 种基因型实现了不定芽再生，并且在很大范围的激素浓度内实现的，但有 3 种基因型未能实现，这也充分说明了基因型的重要性。本研究结果表明，杂交品系比自交品系更容易实现再生，如表 2 所示，此结果和王梦元^[6]、付迎军等^[18]的研究一致。杂交品系相对自交品系材料愈伤组织形态发生的比较容易，原因可能是通过

杂交产生的基因型其内在对某些抑制再生的物质的抑制程度轻，对外界刺激比较敏感，具体原因有待于进一步研究。

3.2 外植体类型对向日葵再生的影响

向日葵再生植株最早是用子叶作为外植体培养成功的。从第一例再生植株获得到现在，向日葵组织培养已在子叶、真叶、茎尖、下胚轴、花药、原生质体和未成熟胚等多种器官上获得成功。本研究通过对子叶、下胚轴、叶片的研究，由表 5 结果表明：愈伤诱导能力依次为：子叶>下胚轴>叶片，子叶为最佳愈伤诱导外植体，这是因为子叶、下胚轴的细胞活动性较强，最易形成愈伤。但由于下胚轴在切割时维管束断裂，细胞受损较大，容易受到污染和褐化，所以诱导能力低于子叶。而叶片离生长点相对较远，且新生的叶片营养消耗较快，容易干枯，因此不是最佳外植体。本试验关于叶片不易形成愈伤的结果，与马雪霞等^[14]的研究结果一致。

3.3 外植体日龄对向日葵再生的影响

Pugliesi 等^[19]的研究证明，子叶再生能力取决于它们的日龄，他们认为子叶再生潜力与其新陈代谢旺盛程度有关，这是因为老龄子叶新陈代谢水平下降，能量储备低，而幼嫩子叶含有较多的养分和较

高的激素梯度, 且有许多具有分生能力的细胞使其易受外界激素处理的影响, 从而使其改变正常发育途径, 促使芽的发生。同时, 生长时间过短的外植体瘦弱, 在剪切过程中受到的伤害过大, 容易污染、干枯, 所以本研究选择生长时率最高为 71% (表 5)。

3.4 外源激素对向日葵再生的影响

外源激素在组织培养试验中的重要作用已经被众多研究所证实。根据前人的研究^[20-22], 本研究选择生长素 NAA, 细胞分裂素 6-BA、KT 作为向日葵离体再生过程中的外源激素来源。Януик^[23]研究了 8 种激素对向日葵外植体再生的影响。结果表明, KT、NAA、6-BA 在一定浓度范围内对愈伤组织的生长有促进作用, 但 2, 4-D 对愈伤组织的分化起抑制作用。徐培洲等^[3]的试验也证实了 2, 4-D 能提高愈伤诱导能力, 但是分化的愈伤为非胚性愈伤, 没有分化能力。刘海学等^[7]的试验表明诱导培养基中加入 IAA 和 6-BA 能诱导不定芽, 若加入 2, 4-D, 所获得的愈伤则没有再生能力。本研究的结果也证实添加 2, 4-D 的培养处理中形成的愈伤大多为水性松散、没有分化能力的非胚性愈伤, 如图 2 所示。

研究表明, 只有一定浓度的生长素和细胞分裂素配合使用, 才能最大程度地提高诱导率。马雪霞等^[14]、贺宾等^[2]的研究都证明了这一点。Pugliesi 等^[19]的研究也认为细胞分裂素 KT 和生长素 IAA 对产生再生芽是必需的, 当其比值 (KT/IAA) 达到 4:1 时, 再生芽率最高。本试验结果表明最佳的愈伤诱导激素组合为 2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L KT, 最高愈伤诱导率都在 85% 以上, 最高可达到 100%。最佳的分化激素为 0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L KT, 芽分化率最高可达到 71%, 高于前人的研究^[24-25]最佳生根激素是 0.6 mg/L 的 IBA, 生根率最高达到 77% (表 12)。

3.5 硝酸银对向日葵再生的影响

培养基的其他附加物也会影响向日葵的再生率。本研究在分化培养基中添加不同浓度的 AgNO₃,

结果表明培养基中添加适量的 AgNO₃ 可显著提高向日葵的植株再生频率。原因是植物细胞在离体培养过程中会产生乙烯, 尤其是在密闭的容器中, 乙烯的过度积累会直接影响外植体的生长和芽的分化, 而 AgNO₃ 是乙烯合成的抑制剂。蔡连华等^[26]的研究表明, AgNO₃ 是影响彩色甜椒花药培养胚状体诱导率的最主要因素, 浓度为 1.0 mg/L 时胚状体诱导率最高。另外 AgNO₃ 可以减轻组织培养中材料的褐化, 促进胚状体的发生。本研究的结果表明, 添加 0.3 mg/L 的 AgNO₃ 能最大程度地提高向日葵离体再生水平。这与刘海学等^[27]在 AgNO₃ 对不定芽分化影响试验中的结果一致。

3.6 活性炭对向日葵再生的影响

现有研究证明导致褐化产生的酚类物质可能是抑制愈伤诱导发育的原因之一。本研究在分化培养基中添加不同浓度的活性炭 (AC), 试图降低褐化, 结果表明在附加 AC 的培养基中, 尽管愈伤的褐变可以得到部分抑制, 但由于 AC 的吸附作用不具有选择性, AC 在吸附酚类物质的同时, 也吸附了有利于愈伤组织生长的物质, 随着 AC 浓度的增加, 愈伤组织生长开始变慢, 诱导率降低所以 AC 只有在较低浓度才能利于植株再生。

3.7 培养基和 IBA 对向日葵生根的影响

韩晓玲等^[28]研究表明, 低浓度的 IBA 和 1/2 的 MS 培养基能有效促进菊苣再生苗的生根。本研究通过对比不同的基本培养基和不同浓度 IBA 组合的生根培养基生根情况, 结果表明: 1/2 MS+0.6 mg/L IBA 是最佳的生根培养基, 组培苗的生根率最高, 为 77%, 而且根的生长速度较好, 根系粗壮。培养基种类对再生苗生根有一定影响, 高盐浓度 MS 培养基不利于根的形成, 1/2 MS 培养基比较适合再生苗的生根, IBA 在不同培养基中均对根系发育有明显促进作用, 但 IBA 浓度为 0.9 mg/L 时诱导率开始下降, 说明过高浓度的 IBA 会对组培苗生根产生抑制作用。

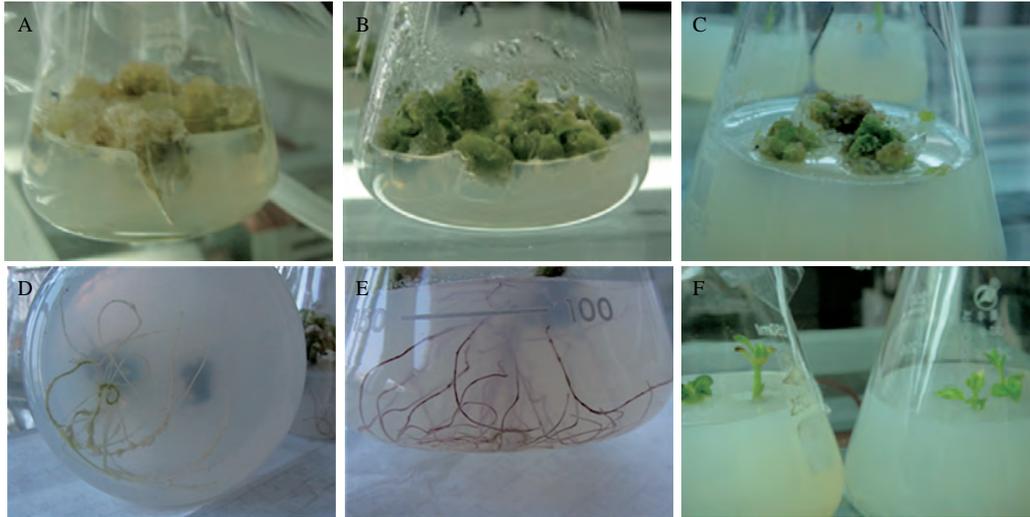


图2 向日葵离体再生过程

Fig. 2 Process of sunflower *vitro* regeneration. (A) The green embryonic calli. (B) The white non-embryogenic calli. (C) The weak root. (D) The strong and healthy root. (E) The differentiated calli. (F) The differentiated seedling.

4 结论

杂交品系比自交品系具有较高的再生率，更容易实现再生；最佳的外植体为生长 4 d 的子叶；最佳愈伤诱导培养基是 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT，诱导率最高可达 100%；最佳分化培养基是 MS+0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.3 mg/L KT+0.3 mg/L AgNO₃+0.2 g/L AC，芽分化率可达 71%；最佳生根培养基是 1/2 MS+0.6 mg/L IBA，生根率可达 77%。

REFERENCES

- [1] Liu J, Mo JS, Liu GS, et al. Advances in study on sunflower molecular biology. *Bull Bot*, 2001, 18(1): 31–39.
刘杰, 莫结胜, 刘公社, 等. 向日葵分子生物学研究进展. *植物学通报*, 2001, 18(1): 31–39.
- [2] He B, Gao Y, Xian LN, et al. The culture of apical shoot of oil sunflower and its high frequent regeneration. *Xinjiang Agri Sci*, 2004, 41(2): 86–88.
贺宾, 高燕, 向理军, 等. 油葵茎尖周缘分生区培养及高频率芽再生. *新疆农业科学*, 2004, 41(2): 86–88.
- [3] Xu PZ, Wu XJ, Hu BM, et al. A shoot regeneration system from cotyledon of *Helianthus annuus* L. *Chin J Oil Crop Sci*, 2004, 26(4): 16–19.
徐培洲, 吴先军, 胡保民, 等. 油葵子叶外植体不定芽再生体系的建立. *中国油料作物学报*, 2004, 26(4): 16–19.
- [4] Hu WR, Huang LP, Meng QY, et al. A regeneration system from cotyledon of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Xinjiang Agri Sci*, 2006, 43(1): 82–85.
胡文冉, 黄乐平, 孟庆玉, 等. 油葵叶片离体再生体系的建立. *新疆农业科学*, 2006, 43(1): 82–85.
- [5] Liu HC. Study on the tissue culture and genetic transformation with hypocotyl of sunflower [D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2007.
刘海臣. 向日葵下胚轴组织培养及其遗传转化的研究 [D]. 长春: 长春理工大学, 2007.
- [6] Wang MY. Callus induction through anther culture in *Helianthus annuus* and drought resistance selection of callus [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008.
王梦元. 油葵花药愈伤组织诱导及其抗旱性筛选 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [7] Liu HX, Ji J, Wang P, et al. Study on tissue culture and regeneration bud of sunflower's young embryos. *J Inner Mongolia Nati Univ: Natl Sci*, 2003, 18(5): 411–414.
刘海学, 季静, 王萍, 等. 向日葵未成熟胚组织培养及再生芽的研究. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2003, 18(5): 411–414.
- [8] Freyssinet M, Freyssinet G. Fertile plant regeneration

- from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. *Plant Sci*, 1988, 56(2): 177-181.
- [9] Baker MC, Muñoz-Fernandez N, Carter CD. Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1999, 58(1): 39-49.
- [10] Paterson KE, Everett NP. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci*, 1985, 42(2): 125-132.
- [11] Charriere F, Sotta B, Miginiac E, et al. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus* variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37: 751-757.
- [12] Li XK, Liu SX (translation). Somatic embryogenesis from immature embryos cotyledons callus in sunflower// ДокладыВАСХИЛ, 1991, 4: 9-13.
李心宽, 刘树萱 (译). 向日葵未成熟胚子叶愈伤组织的体细胞胚胎发生//全苏列宁农业科学院报告, 1991, 4: 9-13.
- [13] Liu GS, Regeneration buds of suspension culture in sunflower. *Chine Bull Bot*, 1989, 31(9): 668-672.
刘公社. 向日葵悬浮培养再生芽. *植物学报*, 1989, 31(9): 668-672.
- [14] Ma XX, Lan HY, Song R. Study on tissue culture and bud differentiation of sunflower (*Helianthus annuus*). *Xinjiang Agric Sci*, 2002, 39(1): 23-24.
马雪霞, 蓝海燕, 宋荣. 向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 的组织培养及芽分化研究. *新疆农业科学*, 2002, 39(1): 23-24.
- [15] Song YJ, Ji J, Liu HX, et al. Callus induction and differentiation in anthurium andraeanum by orthogonal desi. *J Nucl Sci Technol*, 2008, 22(3): 300-303.
宋英今, 季静, 刘海学, 等. 安祖花愈伤组织诱导及其分化的正交试验设计. *核农学报*, 2008, 22(3): 300-303
- [16] Wei ZM, Xu ZH. Tissue culture and plantlet regeneration of sunflower. *Plant Physiol Commun*, 1983(5): 42.
卫志明, 许智宏. 向日葵的组织培养和植株再生. *植物生理学通讯*, 1983(5): 42.
- [17] Liu B, Gu DF, Wu XK, et al. Tissue culture and bud differentiation of self-line in sunflower. *J Jilin Agric Univ*, 1991, 13(1): 6-10.
刘宝, 顾德锋, 邬信康, 等. 向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 自交系的组织培养和芽的分化. *吉林农业大学学报*, 1991, 13(1): 6-10.
- [18] Fu YJ, Ren HY, Bai YF, et al. Study on increasing anther culture induction frequency of soaking maize anther with sucrose. *J Mol Sci*, 2004, 12(1): 111-113.
付迎军, 任海祥, 白艳凤, 等. 糖液预处理对提高玉米花培诱导率的研究. *玉米科学*, 2004, 12(1): 111-113.
- [19] Pugliesi C, Ceconi F, Mandolfo A, et al. Plant regeneration and genetic variability from tissue culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed*, 1991, 106: 114-121.
- [20] Burrus M, Molinier J, Himber G, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: transformation patterns. *Mol Breed*, 1996, 2(4): 329-338.
- [21] Paterson KE, Everett NP. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci*, 1985, 42(2): 125-132.
- [22] Muller A, Iser M, Hess D. Stable transformation of sunflower using a non meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker. *Transgenic Res*, 2001, 10(5): 435-444.
- [23] ЯНУЙКВИ. Физиологияибиохимиякуль. Т. Растени, 1989, 21(4): 351-357.
- [24] Greco B, Tanzarella OA, Carozzo G, et al. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci Lett*, 1984, 36(1): 73-77.
- [25] Liu HC, Guo HY, Yu P, et al. Research of tissue culture and regenerated with hypocotyl of sunflower. *J Changchun Univ Sci Tech*, 2005, 28(4): 126-128.
刘海臣, 果洪宇, 于鹏, 等. 向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 下胚轴组织培养及植株再生的研究. *长春理工大学学报*, 2005, 28(4): 126-128.
- [26] Cai LH, Lei JJ, Chen GJ, et al. Effects of several factors on anther culture of colored bell pepper. *Chin Cucur Vege*, 2005, 4: 16-19.
蔡连华, 雷建军, 陈国菊, 等. 彩色甜椒花药培养若干影响因子的研究. *中国瓜菜*, 2005, 4: 16-19.
- [27] Liu HX, Li XS, Su M, et al. Screening of sunflower mutant with salt-tolerant ability. *J Inner Mongolia Nati Univ: Natl Sci*, 2008, 23(2): 161-163.
刘海学, 李雪松, 苏明, 等. 向日葵耐盐突变体筛选. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2008, 23(2): 161-163.
- [28] Han XL, Wang YH, Li HM, et al. An efficient plant regeneration system via direct adventitious bud formation in Chicory. *J Nucl Sci Technol*, 2006, 20(6): 482-485.
韩晓玲, 王玉华, 李红民, 等. 菊苣高效不定芽直接发生及其植株再生. *核农学报*, 2006, 20(6): 482-485.