

向日葵(*Helianthus annuus* L.)不同外植体组织培养及其再生的研究

刘海学^{1,3}, 王 罡^{1,2}, 季 静², 宋英今²

(¹ 吉林大学植物科学学院, 长春 130062; ² 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; ³ 天津农学院, 天津 300384)

摘要:【目的】建立向日葵不同外植体离体培养再生体系, 为向日葵遗传转化、突变体筛选奠定基础。【方法】以不同基因型向日葵为材料, 研究了向日葵不同外植体在不同的培养基中诱导不定芽再生的频率。【结果】向日葵不同基因型外植体在含适宜吲哚-3-乙酸 (IAA)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 等激素的培养基中均较易形成愈伤组织, 但愈伤组织诱导不定芽的能力则较弱; 不同基因型向日葵外植体的不定芽诱导率依次为子叶节 > 下胚轴 > 子叶 > 真叶; 诱导子叶节不定芽再生的适宜 6-BA 浓度为 1.2 ~ 1.8 mg·L⁻¹, 下胚轴为 1.8 mg·L⁻¹, 子叶为 0.6 mg·L⁻¹, 真叶却未见到诱导出不定芽; MS + 0.03 mg·L⁻¹ IAA + 1.2 ~ 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA 培养基可用于向日葵子叶、子叶节和下胚轴再生体系; 不同基因型向日葵诱导不定芽的能力差别较大, 其中, 基因型 PR29 再生能力较强。【结论】本研究成功地建立了向日葵不同外植体离体培养再生途径, 并获得了再生植株。

关键词: 向日葵; 外植体; 组织培养; 植株再生

The Research of Tissue Culture and Regenerated of the Different Explants of Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

LIU Hai-xue^{1,3}, WANG Gang^{1,2}, JI Jing², SONG Ying-jin²

(¹ College of Plant Science Jilin University, Changchun 130062; ² Agriculture and Biology Engineering College, Tianjin University, Tianjin 300072; ³ Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: 【Objective】The article researched tissue culture within sunflower explant. The method we established will be useful for mutant selection and genetic engineering. 【Method】Scientists investigated the effect of media components on the induction of shoot regeneration for different types of explants in three genotypes of sunflower. 【Results】Forming the callus for different genotypes explants cultured on media containing suitable 3-indoleacetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (6-BA) concentrations was easy, but shoot regeneration from the callus proved difficult. The frequency of shoot regeneration from sunflower's different types of explants for all the genotypes were in turn as follows: cotyledonary nodes > hypocotyls > cotyledons > leaves. Best shoot regeneration rates were obtained in the presence of 1.2-1.8 mg·L⁻¹ 6-BA for cotyledonary nodes, 1.8mg·L⁻¹ BA for hypocotyls and 0.6 mg·L⁻¹ 6-BA for cotyledonary. The shoot didn't regenerate from leaves. The best culture medium for the sunflower's organogenesis is MS + 0.03 mg·L⁻¹ IAA + 1.2-1.5 mg·L⁻¹ 6-BA. The ability of inducing shoot regeneration for different genotype sunflower was very different and the regenerated frequency of PR29 was the highest. 【Conclusion】These results indicate that the authors have successfully established the plant regeneration system of sunflower. They have successfully obtained the regenerated plant.

Key words: Sunflower; Explant; Tissue culture; Plant regeneration

收稿日期: 2005-08-11; 接受日期: 2006-01-27

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20030120); “国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设”专项课题 (J99-B-001)

作者简介: 刘海学 (1965-), 男, 内蒙古通辽人, 高级实验师, 博士研究生, 研究方向为植物转基因。Tel: 022-87401878; E-mail: liuhaixue715@126.com; 通讯作者王罡 (1964-), 男, 吉林省吉林市人, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子生物学。Tel: 022-87401878; E-mail: wanggangtjdx@126.com

0 引言

【本研究的重要意义】向日葵是世界上重要的油料作物和生物能源材料, 在中国人民的饮食结构中是食用油的主要来源之一。利用现代生物技术手段获得高产、高品质的向日葵新品种, 是育种家的目标。因此, 向日葵不同外植体离体培养的研究将为向日葵品种改良、优良种质的无性繁殖、向日葵的遗传转化和突变体筛选等提供了材料和技术基础, 具有特别重要的实用意义。【前人研究进展】20 世纪 80 年代, 人们对向日葵组织培养进行了研究, 但是至今向日葵离体培养植株再生仍十分困难。向日葵的再生途径主要通过器官发生^[1-4]和胚胎发生而产生^[5-7], 外植体的类型主要有下胚轴、子叶、子叶节和茎尖等。向日葵再生频率要受到培养条件、基因型以及它们的相互作用的影响。Prado 和 Beryille 报道^[8], 向日葵胚轴部分的体细胞胚只能在液体培养基中诱导发生, 因为这样才会加强组织和培养基之间的相互作用; 向日葵中胚胎发生的数量随着蔗糖浓度的增加而增加, 器官发生则表现相反的趋势^[2]。另外, 为了获得较高的体细胞胚形成率, 保持外植体完全处于黑暗之中是非常必要的^[9]。

【本研究切入点】有关向日葵组织培养的研究文献中, 能够较全面、较系统地利用不同外植体对向日葵离体培养方面的研究未见报道。本研究以向日葵不同基因型的子叶节、子叶、下胚轴和真叶作为外植体, 从器官发生的途径进行了不定芽诱导再生实验。【拟解决的关键问题】由于向日葵是公认的难转化作物, 其转化频率不高, 并且重复性差, 其主要原因是从转化的细胞或组织分化再生植株困难。因此, 本研究主要是探讨向日葵离体培养再生难的问题, 以促进向日葵植株再生技术日臻完善, 不断提高植株再生频率。

1 材料与方法

1.1 供试品种

龙食葵、PR29、HA89、RHA265、B7、2603。其中, 龙食葵为食用基因型, 其余为油用基因型。所有材料均由天津大学农业与生物工程学院植物基因工程研究中心提供。

1.2 外植体的选择和接种

向日葵种子先用 75% 的酒精振荡冲洗 5~8 min, 再用 0.1% HgCl_2 溶液浸泡 10 min, 无菌水冲洗 4 次, 然后接种于 MS 培养基上。当培养的无菌苗长出 1~2 片真叶时, 分别取其子叶节、子叶、下胚轴、真叶作

为外植体 (图 1-A 和图 1-B), 根据不同的培养目的, 接种于不同的培养基上。其中, 子叶节接种方式采用插入半埋的方法; 下胚轴的接种方式先将胚轴劈开, 然后平放在培养基上 (切面向下); 而子叶和真叶应埋于培养基里面, 但要微露。

1.3 培养条件

培养室温度为 25~28℃, 光照 1 600 lx, 日光灯每天光照 12 h, 固体培养基含 7.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, 灭菌前调 pH 5.8~6.0。向日葵外植体接种于 50 ml 或 100 ml 三角瓶中, 2 周继代 1 次。

1.4 试验数据的统计与分析方法

试验重复 3 次, 每个处理接种外植体数为 30~40 个, 愈伤率 (形成愈伤外植体个数/接种外植体个数 $\times 100\%$) 2 周后统计, 不定芽诱导率 (产生不定芽外植体个数/接种外植体个数 $\times 100\%$) 8 周后统计, 试验数据应用 SPSS10.0 统计软件进行相应的统计分析, 平均数之间差异显著性比较采用 Duncan 法 (新复极差法), 柱形图和折线图均在 Excel 电子表格下制作。

2 结果与分析

2.1 不同基因型向日葵外植体对形成愈伤的影响

将向日葵子叶、子叶节、下胚轴、真叶接种于培养基 MS + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ α -萘乙酸 (NAA) + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, 大多数外植体都在接种 7 d 后就开始膨大, 切口处开始形成愈伤组织, 呈黄绿色, 14 d 后产生明显可见的愈伤组织 (图 1-C)。通过对不同基因型的 4 种外植体培养发现子叶、子叶节、下胚轴、真叶都较易形成愈伤组织, 不同外植体平均愈伤率都达到 90% 以上 (图 2)。从图 2 还可以看出, 真叶诱导愈伤的能力不如其它 3 种外植体; 从基因型来看, B7 最容易诱导愈伤, 各种外植体愈伤率均已达到 100%。另外, 将以上 4 种外植体分别接种于 MS + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) + 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 MS + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D + 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素 (KT), 实验结果发现, 加 2, 4-D 的培养基均能诱导出愈伤组织, 但愈伤组织基本表现为蓬松的白色, 有时呈透明状, 手感松软, 无分化能力。

2.2 不同 6-BA 浓度对向日葵外植体诱导不定芽的影响

试验以龙食葵和 PR29 为材料, 采用附加不同浓度 6-BA 的 MS 培养基, 研究了向日葵成熟种子发芽后的子叶、子叶节、下胚轴、真叶 4 种外植体诱导不定芽发生的效果 (图 3, 图 4)。结果表明, 两种基因



A. 子叶(左)和真叶(右); B. 下胚轴(左)和子叶节(右); C. 不同外植体形成的愈伤; D. 下胚轴的愈伤及不定芽; E. 子叶(左)及真叶(右)的不定芽; F. 子叶节的不定芽

A. Cotyledons(left) and euphyllas(right); B. Hypocotyls(left) and cotyledonary nodes(right); C. Callus formed from the different kinds of explant; D. Callus and adventitious bud of hypocotyls; E. Adventitious bud of cotyledons(left) and euphyllas(right); F. Adventitious bud of cotyledonary nodes

图1 向日葵不定芽诱导和再生

Fig. 1 Adventitious bud induction and regeneration of sunflower

型不同外植体诱导不定芽发生的适宜6-BA浓度不同,子叶节为 $1.2\sim 1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下胚轴为 $1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,子叶为 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,在本试验设计的浓度范围内,真叶未见诱导出不定芽。由此可见,向日葵不同外植体诱导不定芽对6-BA的反应不同。方差分析表明:不同外植体及不同6-BA浓度对向日葵不定芽的诱导都存在极显著的差异(P 分别为0.000;0.004),基因型间不定芽的诱导差异并不显著($P=0.921$)。4种外植体对向日葵不定芽诱导差异显著性测验结果如图3所示($\alpha=0.05$),从不同6-BA浓度对向日葵不同外植体不定芽诱导的差异显著性看,适合向日葵不同外植体不定芽诱导的6-BA浓度为 $1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 不同培养基对向日葵子叶节不定芽诱导率影响

利用MS为基本培养基,以龙食葵和PR29的子叶节为材料,研究了IAA和6-BA共同作用对不定芽诱导发生的效果(表1)。结果表明,当IAA浓度为 $0.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA的浓度为 $1.2\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,2种基因型子叶节不定芽诱导率都在70%~80%之间,但是当IAA浓度为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,2种基因型向日葵的不定芽诱导率都有不同程度的降低。方差分析结果表明,不同培养基之间不定芽诱导存在显著差异($P=0.012$)。为了寻找较为适宜的培养基,进行了不同培养基对向日葵子叶节不定芽诱导率差异显著性测验,结果见表1。由表1看出 $\text{MS} + 0.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA} + 1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$

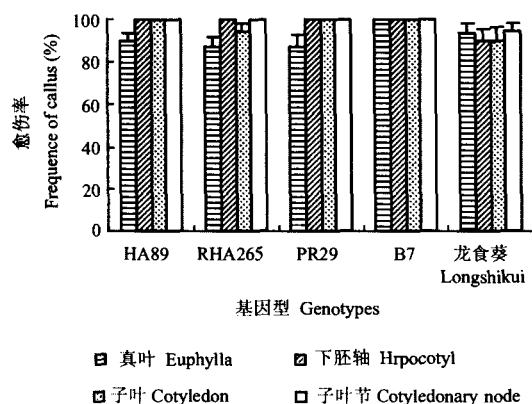


图 2 不同基因型向日葵外植体形成愈伤能力的比较

Fig. 2 Effect of different types of genotypes on callus formation

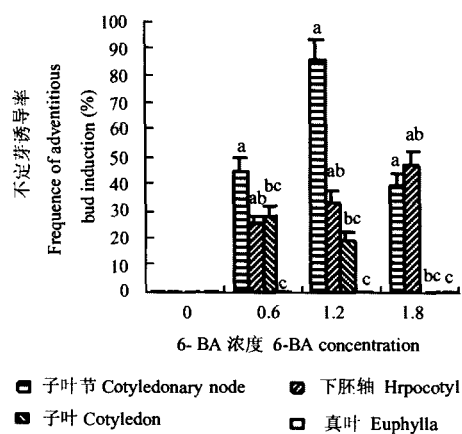


图 3 6-BA 浓度对龙食葵不同外植体不定芽的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of 6-BA on shoot regeneration of different explants of Longshikui

表 1 10 种培养基对向日葵不定芽诱导率影响的差异显著性

Table 1 Significance test for frequency of adventitious bud induction with 10 kinds of media

培养基 Types of media	不定芽平均诱导率 Average of frequency of adventitious bud induction (%)	显著性 Significance	
		0.05	0.01
MS+0.03mg·L ⁻¹ IAA+1.2mg·L ⁻¹ 6-BA	77.50	a	A
MS+0.03mg·L ⁻¹ IAA+1.5mg·L ⁻¹ 6-BA	75.70	a	AB
MS+0.05mg·L ⁻¹ IAA+1.5mg·L ⁻¹ 6-BA	50.25	ab	ABC
MS+0.03mg·L ⁻¹ IAA+0.9mg·L ⁻¹ 6-BA	48.35	abc	ABC
MS+0.03mg·L ⁻¹ IAA+0.6mg·L ⁻¹ 6-BA	36.05	bc	ABC
MS+0.05mg·L ⁻¹ IAA+0.3mg·L ⁻¹ 6-BA	35.70	bc	ABC
MS+0.05mg·L ⁻¹ IAA+1.2mg·L ⁻¹ 6-BA	34.35	bc	ABC
MS+0.05mg·L ⁻¹ IAA+0.6mg·L ⁻¹ 6-BA	32.45	bc	BC
MS+0.05mg·L ⁻¹ IAA+0.9mg·L ⁻¹ 6-BA	27.50	bc	C
MS+0.03mg·L ⁻¹ IAA+0.3mg·L ⁻¹ 6-BA	18.60	c	C

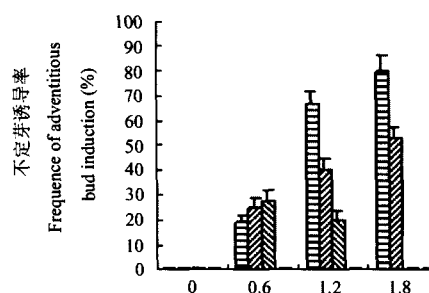


图 4 6-BA 浓度对 PR29 不同外植体诱导不定芽的影响

Fig.4 Effect of the concentration of 6-BA on shoot regeneration of different explants of PR29

和 MS+0.03 mg·L⁻¹ IAA +1.5 mg·L⁻¹ 6-BA 培养基最好, 其不定芽诱导率显著高于其它培养基。

2.4 不同基因型不同外植体对向日葵子叶节不定芽诱导率的影响

试验以龙食葵、PR29 和 2603 成熟种子的子叶、子叶节、下胚轴和真叶为材料, 在 MS+0.03 mg·L⁻¹ IAA+1.2 mg·L⁻¹ 6-BA 培养基上诱导分化 (图 1-D, E 和 F)。结果表明, 3 种基因型不定芽诱导率依次为 PR29>龙食葵>2603, 而不同外植体不定芽诱导率依次为子叶节>下胚轴>子叶>真叶 (表 2 和表 3)。方差分析结果表明: 向日葵不同外植体不定芽诱导率存在极显著的差异 ($P=0.002$), 不同基因型之间不定芽诱导率存在显著差异 ($P=0.011$)。为了得到向日葵不同外植体及不同基因型不定芽诱导率的差异显著性, 本研究对 3 个基因型的 4 种外植体和不同外植体的 3 个基因型不定芽平均诱导率进行了差异显著性测验, 其结果见表 2 和表 3。

3 讨论

表 2 不同外植体对不定芽诱导率的差异显著性测验

Table 2 Significance test for frequency of adventitious bud induction with different explants

外植体 Explants	不定芽平均诱导率 Average of frequency of adventitious bud induction (%)	显著性 Significance	
		0.05	0.01
子叶节 Cotyledonary nodes	75.30	a	A
下胚轴 Hypocotyls	52.90	b	AB
子叶 Cotyledons	32.77	bc	BC
真叶 Euphyllas	20.83	c	C

表 3 3 个基因型对不定芽诱导率的差异显著性测验

Table 3 Significance test for frequency of adventitious bud induction with three types of genotype

基因型 genotypes	不定芽平均诱导率 Average of frequency of adventitious bud induction (%)	显著性 Significance	
		0.05	0.01
PR29	58.00	a	A
龙食葵 Longshikui	53.98	a	AB
2603	28.88	b	B

3.1 不同基因型向日葵对植株再生的影响

Paterson 和 Everett^[10]对 100 个向日葵自交系的茎尖组织在加有细胞分裂素的培养基上进行了培养,其中 54%的基因型有不同程度的再生现象。在这些基因型中有 7 个自交系再生频率较高,而其中的只有 SS415B 被确认其下胚轴再生体系可进一步利用。刘宝等人^[11]对 51 份向日葵自交系材料进行了离体培养,其中 16 份自交系获得了再生芽,在他们的研究过程中发现,离体培养植株的再生能力与基因型间存在着显著的相关性。然而, Pugliesi C 等^[1]人认为,基因型和再生能力之间没有关系,只依赖于生长素和细胞分裂素之间数量上的互作。本实验对 PR29、龙食葵和 2603 等 3 个基因型不同外植体在同一培养基中的不定芽诱导率研究表明,不同基因型之间存在显著差异,PR29 和龙食葵不定芽诱导率显著高于 2603。另外,本研究表明,培养基 $MS+0.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}+1.2\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$ 可用于向日葵子叶、子叶节和下胚轴再生体系。

3.2 植物激素类型和配比对向日葵植株再生的影响

植物细胞分裂素对不定芽再生的影响已被众多研究者报道。在他人研究向日葵的外植体中,各种形态反应的出现主要是由于培养基中加入了不同的外源激素所致^[1,12],而细胞分裂素正是器官发生的主要调节者^[13]。在本实验中,诱导培养基中加入 IAA 和 6-BA 能诱导出不定芽,若加入 2, 4-D, 所获得的愈伤则没有再生能力,这一结果与 Paterson 等人^[12]和徐培洲等人^[14]的研究结果相一致。Pugliesi 等人^[1]的研究认为 KT 和 IAA 对产生再生芽是必需的,当其比值 KT/IAA 达到 4 : 1 时,再生芽百分率最高,他们甚至认为所选用的 5

个材料中,不论它们的遗传组成如何,在补加 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KT}$ 和 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ 的 MS 培养基中均能再生。马雪霞等^[15]的试验结果表明,6-BA 和 IAA 浓度之比为 5 : 1 时,向日葵不定芽诱导率最高,这一结论和笔者的研究结果不一致。笔者的研究表明,当 6-BA 和 IAA 浓度之比为 50 : 1~40 : 1 时,不定芽诱导率最高。究其原因可能是不同基因型外植体不同发育阶段的内源激素水平不一样,所以细胞分裂素与生长素浓度之比不是一个固定的模式,植物体内的内源激素水平会影响其比值。另外,培养基中单独添加不同浓度的 6-BA,无论诱导愈伤还是不定芽,都表现出了较好的效果。

4 结论

向日葵属于难以再生的作物,许多因素影响着向日葵离体培养植株再生过程。本研究从外植体类型、基因型、外源激素等探讨了向日葵离体培养再生过程中的影响因素。向日葵不同基因型外植体在含适宜 IAA、6-BA 等激素的培养基中均较易形成愈伤组织,但愈伤组织分化芽的能力则较困难。从实验结果看, $MS+0.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}+1.2\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$ 培养基可用于向日葵子叶、子叶节和下胚轴再生体系。可是,基因型和外植体不同,诱导不定芽分化率也不相同。所以,选择再生频率高的基因型、适宜培养基和外植体对向日葵离体培养是非常重要的。总之,要在前人研究结果的基础上,对影响向日葵离体培养再生的因素及机制还需要进行深入探索,这将对向日葵离体培养的研究具有特别重要的意义。

References

- [1] Pugliesi C, Ceconi F, Mandolfo A, Baroncelli. Plant regeneration and genetic variability from tissue culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed*, 1991, 106: 114-121.
- [2] Geneviève J, Bronner R, Hahne G. Somatic embryogenesis and organogenesis induced in the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultured *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Reports*, 1995, 15: 200-204.
- [3] Sarrafi A, Roustani J P, Fallot J, Alibert G. Genetic analysis of organogenesis from the cotyledons of zygotic embryos in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 225-229.
- [4] Carola M, Trabace T, Sunseri F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant cell Reports*, 1997, 16: 295-298.
- [5] Zezul T G, Gorbatenko E, Raldugina G N. Regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants via somatic embryogenesis *in vitro*. *Russian Journal of Genetics*, 1995, 3: 197-202.
- [6] Fambrini M, Cionini G, Pugliesi C. Acquisition of high embryogenic potential in regenerated plants of *Helianthus annuus* x *H. tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 51: 103-110.
- [7] Laparra H, Bronner R, Hahne G. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser. *Protoplasma*, 1997, 196: 1-11.
- [8] Prado E, Berville A. Induction of somatic embryo development by liquid culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science*, 1990, 67: 73-82.
- [9] Carola M, Trabace T, Sunseri F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 295-298.
- [10] Paterson K E, Everett N P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Science*, 1985, 42: 125-132.
- [11] 刘宝, 顾德锋, 邬信康. 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.
Liu B, Gu D F, Wu X K. Tissue culture and plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines. *Journal of Jilin Agriculture University*, 1991, 13(1): 6-10. (in Chinese)
- [12] Charriere F, Sotta B, Miginiac E, Hahne G. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37: 751-757.
- [13] Espinasse A, Lay C, Volin J. Effects of growth regulator concentrations and explant size on shoot organogenesis from callus derived from zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1989, 17: 171-181.
- [14] 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.
Xu P Z, Wu X J, Hu B M. A shoot regeneration system from cotyledon of *Helianthus annuus* L. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2004, 26(4): 16-19. (in Chinese)
- [15] 马雪霞, 蓝海燕, 宋荣. 向日葵(*Helianthus annuus* L.)的组织培养及芽分化的研究. 新疆农业科学, 2002, 39(1): 23-24.
Ma X X, Lan H Y, Song R. Study on tissue culture and regeneration bud of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Xinjiang Agriculture Science*, 2002, 39(1): 23-24. (in Chinese)

(责任编辑 王莉)