

通用稳定向日葵耐盐细胞系的建立

高金秋¹, 宋洋¹, 孙立娟¹, 孙丽娜¹, 张义²

(1. 白城师范学院 生命科学学院, 吉林 白城 137000; 2. 白城市农业科学院 向日葵研究所, 吉林 白城 137000)

摘要:以 10 个向日葵品种为试材, 利用细胞悬浮技术, 研究了培养耐盐细胞系的最佳条件。结果表明: 切取向日葵 7 日龄无菌苗子叶与胚轴接种于 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + NaCl 50 mmol · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹, pH 5.5~7.0 的 MS 培养基中, 培养温度为 28 °C, 14 d 后取其 1 g 愈伤组织接种于添加 NaCl 175 mmol · L⁻¹ 的 30 mL 液体培养基中, 振荡培养, 7 d 继代 1 次, 即可获得稳定耐盐细胞系。该方案不仅适合油葵也适用食葵。

关键词:向日葵; 细胞悬浮培养; 耐盐性

中图分类号:S 565.503.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0111-04

盐碱地是指土壤表层积聚过多盐碱成分(含盐量一般大于 0.1%), 对植物生长有抑制作用的土地^[1]。当前, 全球盐碱地面积已达 9.5 亿 hm², 而且每年还以较高的速度增长^[2]。面对如此严峻的生态问题, 如何改良利用盐碱地已成为全球问题。近年来, 发展盐土农业已成为世界范围内盐碱地治理和改良的主流, 其方法主要有 2 种: 一是用基因工程方法对传统作物进行改造, 但进展不大; 二是对已有耐盐植物进行筛选^[1]。

向日葵(*Helianthus annuus* L.) 是公认耐盐碱植物^[3-5], 别名太阳花、朝阳花, 属菊科向日葵属草本植物。向日葵耐盐性较强, 在土壤全盐量为 0.4% 时能正常生长发育, 当土壤全盐量为 0.4%~0.7% 时, 合理栽培也能取得可观产量^[6]。向日葵还有吸盐性能, 据化验其茎秆氯化钠含量高达 0.5% 左右^[6], 因此, 常被用作盐碱地先锋作物。

该研究利用细胞悬浮培养技术, 通过正交实验设计建立了稳定耐盐向日葵细胞系, 以期为进一步通过体细胞变异筛选耐盐突变体奠定基础, 同时也为其它耐盐植物选育提供技术参考, 为世界盐土农业发展贡献力量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试向日葵为白城市农业科学院向日葵研究所提供, 编号分别为“1401”“1402”“1411”“1414”“1416”“1622”“1627”“1628”“1630”和“1636”的 10 个品种。

第一作者简介:高金秋(1976-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: wawa760824@126.com

基金项目:吉林省教育厅科学技术研究资助项目(2010-220); 白城师范学院重点资助项目(2014)。

收稿日期:2016-04-18

1.2 试验方法

1.2.1 向日葵耐盐品种筛选 挑选上述 10 个向日葵品种各 300 粒, 每个品种每 100 粒放入含等量营养土的 500 mL 烧杯中, 共 30 组。每个品种分别浇入等量的 25、50、75 mmol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液。将其在 5 000 lx、16 h 光照/8 h 黑暗、(25±2) °C 下培养。培养期内各烧杯每 2 d 分别添入等量的相应 NaCl 溶液保持土壤湿度。14 d 后取出向日葵幼苗, 统计其生长情况。

1.2.2 细胞悬浮起始材料获得 在超净工作台中, 将去壳后的“1628”向日葵种子用 70% 酒精消毒 60 s, 无菌水冲洗 1 次, 再用 3% 的 NaClO 消毒 20 min, 无菌水冲洗 5 次, 接种于 MS 培养基, 置于 28 °C、16 h · d⁻¹ 散射光下培养。采用 4 因素 4 水平正交实验设计(表 1) 16 种培养组合(表 3), 基础培养基为 MS 添加 NaCl 50 mmol · L⁻¹。7 d 后切取其子叶约 0.5 cm × 0.5 cm 和长约 0.5 cm 胚轴接种于上述 16 种组合培养基, 每种组合 6 皿(3 皿子叶、3 皿胚轴), 每皿接种 15 个外植体, 5 000 lx、16 h · d⁻¹ 条件下培养。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 激素配比 Hormone combination /(mg · L ⁻¹)	B 蔗糖浓度 Sucrose concentration /(mg · L ⁻¹)	C pH	D 培养温度 Cultivation temperature/°C
1	6-BA 0.5+2,4-D 0.5	10	5.5	20
2	6-BA 0.5+NAA 0.5	20	6.0	23
3	6-BA 2.0+NAA 0.5+KT 1.0	30	6.5	26
4	6-BA 0.5+2,4-D 0.5+KT 1.0	40	7.0	28

1.2.3 稳定耐盐细胞系建立 按上述最佳方案将“1414”“1627”“1628”“1630”“1636”诱导愈伤组织, 以 1 g 愈伤组织接种 30 mL 培养基(6-BA 0.5 mg · L⁻¹ +

2,4-D 0.001 mg · L⁻¹ + NaCl 50 mmol · L⁻¹ + 蔗糖 2% 的 30 mL MS 液体培养基^[7]), 将其进行悬浮振荡培养, 每处理 9 次重复。每 7 d 将细胞悬液在 4 800 r · min⁻¹ 下离心 20 min, 收集细胞后转至新鲜培养液, 且每次 NaCl 浓度提高 25 mmol · L⁻¹。离心前每瓶取 1 mL 用于计数。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 耐盐向日葵品种确定

15 d 后测量已萌发向日葵幼苗长, 由表 2 可知, 除了 NaCl 为 50 mmol · L⁻¹ 时, 向日葵萌发数前 5 名由 '1401' 取代 '1636' 外, 在其它 2 种浓度下, 皆是 '1622' '1628' '1627' '1636' '1630' 萌发数最多; 在 3 种浓度下其平均长度最小的 5 个品种, 除了 '1414' '1416' 偶尔会取代 '1622' '1627' 外, 也基本为 '1622' '1628' '1627' '1636' '1630'。为了进一步明确耐盐品种, 对表 2 NaCl 浓度为 75 mmol · L⁻¹ 时所得数据进行分类数为 3 的聚类分析, 筛出耐盐品种为 '1622' '1628' '1627' '1636' '1630', 不耐盐品种为 '1414' '1416', 剩余 3 个品种介于二者之间。因 '1622' 频繁染菌无法进行无菌培养, 后续试验采用 '1627' '1628' '1630' '1636' 作为试验材料, 抽取不耐盐的 '1414' 作对照。

表 2 不同盐浓度培养条件下向日葵萌发情况

Table 2 The sunflower's germination in different salt conditions

品种 Variety	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol · L ⁻¹)					
	25		50		75	
	萌发数 Number	平均长度 Length/cm	萌发数 Number	平均长度 Length/cm	萌发数 Number	平均长度 Length/cm
'1401'	84	3.3	65	3.1	57	2.3
'1402'	51	2.4	35	2.0	58	3.0
'1411'	40	2.9	37	2.8	67	2.7
'1414'	28	1.0	15	5.0	29	1.6
'1416'	48	0.7	13	1.0	33	2.5
'1622'	93	3.1	85	1.5	83	1.0
'1627'	95	2.0	77	1.8	89	1.5
'1628'	94	1.0	98	1.0	94	1.0
'1630'	90	1.5	95	1.5	78	1.0
'1636'	89	1.5	62	0.8	92	1.3

2.2 细胞悬浮起始材料培养方案确定

2.2.1 最佳培养条件确定 接种 2 d, 可见子叶表面积增大。接种 7 d, 多数子叶、胚轴分化出愈伤组织。接种 15 d, 子叶、胚轴全部长出愈伤组织。由表 3 可知, 对于向日葵子叶、胚轴愈伤组织诱导效果的影响, 4 个参试因子比较结果分别是激素配比(A) > 温度(D) = 蔗糖浓度(B) > pH(C) 与激素配比(A) > pH(C) > 蔗糖浓度(B) > 温度(D), 其中激素配比 A 因素对向日葵子叶、胚轴诱导愈伤组织影响最大, 极差分别为 4.12 与 5.50。为进一

步比较各因素不同水平间处理效应是否有差别, 对其进行方差分析。由表 4 可知, 激素配比为子叶诱导试验关键因素, 达到极显著水平; pH 影响可以忽略, 其平方和小于误差项。将其平方和合并为误差项后, 做进一步方差分析, B、D 因素水平间差异显著(F 值分别为 7.50* 和 8.00*, * $F_{3,6,0.05}=4.76$)。因此得出, 向日葵子叶愈伤组织诱导试验最佳方案为 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + NaCl 50 mmol · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹, 培养温度为 28 °C, pH 5.5~7.0 均可。由表 5 可知, 激素对比对胚轴诱导试验影响显著, 温度影响可以忽略, 其平方和小于误差项, 将其平方和合并为误差项后, 做进一步方差分析, A 因素水平间差异极显著(F 值为 14.61**, ** $F_{3,6,0.01}=$

表 3 子叶、胚轴诱导的愈伤组织
正交实验结果分析

Table 3 The visual analysis of the orthogonal experiment results in callus induction of cotyledons and hypocotyls

编号 No.	A	B	C	D	愈伤组织大小 子叶/胚轴 Callus size/mm Cotyledons/Hypocotyls
1	A1	B1	C1	D1	0.5/4
2	A1	B2	C2	D2	2/6
3	A1	B3	C3	D3	1/4
4	A1	B4	C4	D4	3/5
5	A2	B1	C2	D3	3/9
6	A2	B2	C1	D4	6/10
7	A2	B3	C4	D1	5/5
8	A2	B4	C3	D2	5/8
9	A3	B1	C3	D4	0.5/1
10	A3	B2	C4	D3	0.5/3
11	A3	B3	C1	D2	1/2
12	A3	B4	C2	D1	0.5/4
13	A4	B1	C4	D2	1.5/5
14	A4	B2	C3	D1	1.5/4
15	A4	B3	C2	D4	4/6
16	A4	B4	C1	D3	3/5
\bar{x}_1	1.63/4.75	1.38/4.75	2.63/5.25	1.88/4.25	$T=38/81$
\bar{x}_2	4.75/8.00	2.50/5.75	2.38/6.25	2.38/5.25	
\bar{x}_3	0.63/2.50	2.75/4.25	2.00/4.25	1.88/5.25	
\bar{x}_4	2.50/5.00	2.88/5.50	2.50/4.50	3.38/5.50	
R	4.12/5.50	1.50/1.50	0.63/2.00	1.50/1.25	

表 4 子叶诱导的愈伤组织方差分析

Table 4 The analysis of variance in callus induction of cotyledons

变异来源 Source of variation	SS	DF	MS	F
激素配比 Hormone combination (A)	37.13	3	12.38	59.4** ** $F_{3,3,0.01}=29.46$
蔗糖浓度 Sucrose concentration (B)	5.63	3	1.88	9.0 * $F_{3,3,0.05}=9.28$
pH(C)	0.88	3	0.29	1.4
温度 Temperature (D)	6.00	3	2.00	9.6*
试验误差 Test error	0.63	3	0.21	
总变异 Total variance	50.25			

表 5 胚轴诱导的愈伤组织方差分析

Table 5 The analysis of variance in callus induction of hypocotyls

变异来源 Source of variation	SS	DF	MS	F
激素配比 Hormone combination (A)	61.19	3	20.40	13.05*
蔗糖浓度 Sucrose concentration (B)	5.69	3	1.90	1.21
pH(C)	9.69	3	3.23	2.07
温度 Temperature (D)	3.69	3	1.23	0.79
试验误差 Test error	4.69	3	1.56	
总变异 Total variance	89.65			

9.78), B、C 因素水平间差异仍不显著。因此, 向日葵胚轴愈伤组织诱导试验最佳方案为 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NaCl $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $10 \sim 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养温度为 $20 \sim 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 为 $5.5 \sim 7.0$ 。

2.2.2 最佳外植体确定 将子叶、胚轴诱导愈伤组织数据进行成组数据平均数比较的 t 检验, 表明子叶与胚轴愈伤组织诱导能力差异不显著 ($|t_{30}| = -1.68 | < t_{30, 0.05} = 2.042$), 故后续试验子叶与胚轴同用。

2.3 稳定耐盐细胞系确定

以‘1414’为对照, 对耐盐品种向日葵细胞继代

12 次, NaCl 浓度提高到 $325 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每次继代前对细胞进行计数。由图 1 可知, 当 NaCl 浓度在 $50 \sim 125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, NaCl 浓度与向日葵细胞数量呈负相关; NaCl 为 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现 1 个小高峰; 当 NaCl 为 $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 向日葵细胞数量最少。而‘1414’对照品种在 NaCl 为 $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时全部死亡。尽管继代到 $325 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时还有细胞存活, 受条件限制, 耐盐向日葵细胞个数波动上升的原因尚不明确。但考虑到其后的再生及对照的存活状况, 最终确定稳定耐盐向日葵细胞的 NaCl 浓度为 $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

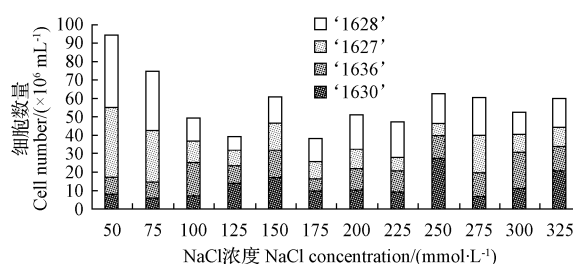
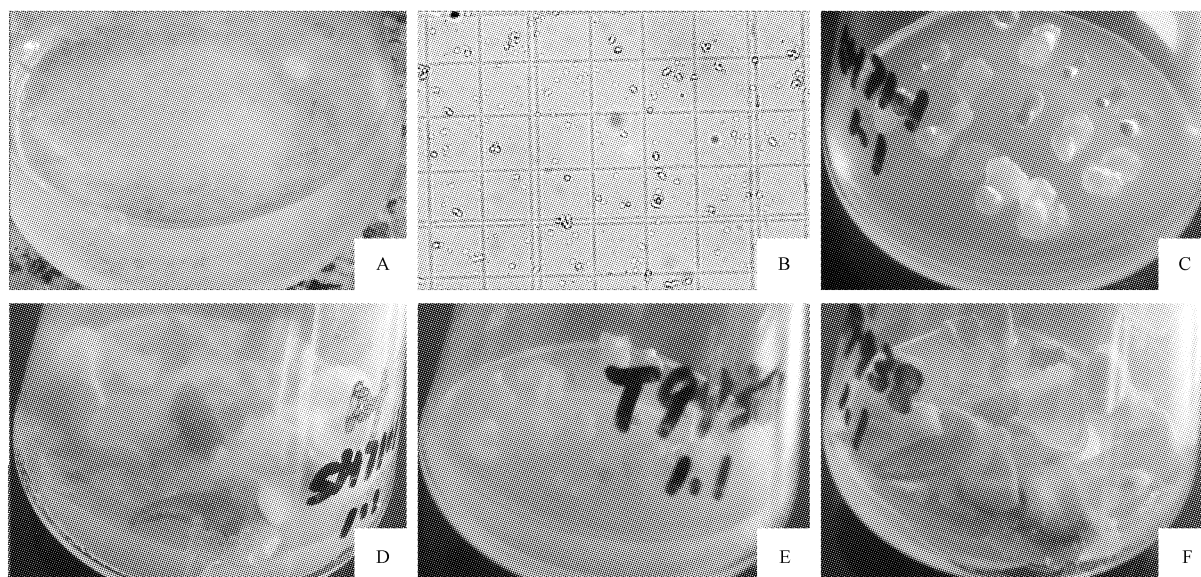


图 1 NaCl 浓度与向日葵悬浮细胞数量关系

Fig. 1 The relationship of NaCl concentration and the quantitative of suspended sunflowers' cells



注: A. 悬浮培养 2 年的‘1628’向日葵耐盐细胞系外观; B. 光镜下悬浮培养 2 年的‘1628’向日葵耐盐细胞形态; C. ‘SH7101’胚轴接种 7 d 时生长状态; D. ‘SH7101’子叶接种 14 d 时生长状态; E. ‘T9938’胚轴接种 14 d 时生长状态; F. ‘T9938’子叶接种 14 d 时生长状态。

Note: A. The suspension salt-tolerant cell lines of ‘1628’ after culturing 2 years; B. The ‘1628’ cells in optical microscope after culturing 2 years; C. ‘SH7101’ hypocotyls after inoculation 7 days; D. ‘SH7101’ cotyledons after inoculation 14 days; E. ‘T9938’ hypocotyls after inoculation 14 days; F. ‘T9938’ cotyledons after inoculation 14 days.

图 2 向日葵耐盐细胞系建立过程

Fig. 2 Establishment of the salt-tolerant cell lines of sunflower

3 讨论与结论

3.1 愈伤组织诱导培养基的优化

该试验在前人^[8-16]及自身预试验的基础上, 对诱导

向日葵子叶、胚轴产生愈伤组织的相关因素, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行优化。试验结果表明, 在向日葵愈伤组织诱导过程中细胞分裂素以 6-BA 单独使用效果要好于

与 KT 合用,这与王园园^[8]、杨长友^[9]研究结果 KT 与 6-BA 合用效果好于单用,斯日古等^[10]研究结果单用 KT 效果最好均有所不同,但与刘海臣^[11]研究结果单用 6-BA 效果最好结论一致,可见不同基因型,对愈伤组织诱导效果影响较大。该试验结果还表明,生长素 NAA 要好于 2,4-D,这与王园园^[8]研究结果相一致,且都为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,但与杨长友^[9]研究结果 NAA 为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有所差异。但杨长友^[9]在其试验结果中发现 NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织诱导率最高,因呈玻璃化趋势故而弃去,而该试验没发生这一现象,与 6-BA 含量较低为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有关,进一步证实低浓度的细胞分裂素可降低玻璃化发生^[12]。

此外,该试验还筛选了蔗糖浓度与 pH,从试验结果看,向日葵子叶、胚轴对蔗糖与 pH 耐受范围较高,符合预期,为后续向日葵耐盐品种选育提供了前期技术支持。

3.2 耐盐细胞系建立方案

该研究确立的耐盐细胞系建立方案:切取向日葵 7 日龄无菌苗子叶与胚轴接种于 $6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NaCl } 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 5.5~7.0 的 MS 培养基,培养温度为 28°C ,14 d 后取其 1 g 愈伤组织接种于 $6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4\text{-D } 0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NaCl } 175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 2\%$ 的 30 mL MS 液体培养基中进行悬浮振荡培养,每 7 d 继代 1 次。该方案不仅适合于‘1627’‘1628’‘1630’‘1636’的稳定耐盐细胞系建立(已在课题组继代 2 年多,见图 2A、B),而且还适合筛选出的耐盐品种‘SH7101’与‘T9938’悬浮细胞系建立(其愈伤组织诱导效果见图 2C-F)及市售商业向日葵品种‘JK518’的悬浮细胞系建立。这些向日葵品种中,‘1627’‘1628’‘1630’与‘1636’是油葵,‘SH7101’‘T9938’与‘JK518’是食葵。由此表明,该方案可确定为通用向日葵耐盐细胞系建立方案。

Establishment a Common Stable Salt-tolerance Cell Lines of Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

GAO Jinqi¹, SONG Yang¹, SUN Lijuan¹, SUN Li'na¹, ZHANG Yi²

(1. College of Life Sciences, Baicheng Normal University, Baicheng, Jilin 137000; 2. Sunflower Institute, Baicheng Academy of Agricultural Sciences, Baicheng, Jilin 137000)

Abstract: Taking 10 varieties of *Helianthus annuus* L. as test materials, using the cell suspension technology, the optimum conditions for cultivation of salt-tolerant cell lines were studied. The results showed that cutting out the seven-day sunflower's cotyledons and hypocotyls and inoculating in $6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NaCl } 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + \text{sucrose } 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.5—7.0 MS medium and culturing in temperature at 28°C for two weeks. Then cutting 1 g the callus and put them in the 30 mL liquid medium which contained $\text{NaCl } 175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, shaking and subculturing every seven days, the stable salt-tolerant cell lines were obtained. This scheme was not only applicable for oil sunflower but also for eating sunflower.

Keywords: *Helianthus annuus* L.; cell suspension culture; salt tolerance

参考文献

- [1] 贾敬敦,张富. 依靠科技创新推进我国盐碱地资源可持续利用[J]. 中国农业科技导报,2014,16(5):1-7.
- [2] 杨雪君,毛金枫,张雪,等. 盐碱胁迫对红车轴草种子萌发的影响[J]. 北方园艺,2016(9):69-74.
- [3] 孙瑞芬,闫素丽,安玉麟. 向日葵单染色体显微分离及特异文库的构建[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(1):33-38.
- [4] 安玉麟,侯建华,于海峰,等. 耐盐碱向日葵杂交种鉴定筛选及机理研究[J]. 华北农学报,2012,27(5):127-133.
- [5] 王昱,王萍,梅利那,等. 向日葵品种对 NaCl 耐性两种评价方法的比较[J]. 作物杂志,2014(3):121-124.
- [6] 王静. 盐碱对黑龙江省向日葵生产的影响及高产栽培技术[J]. 哈尔滨师范大学学报(自然科学版),2012,28(6):62-65.
- [7] 高金秋,鲁娜,赵非非. 向日葵耐盐细胞系悬浮培养条件的初步筛选[J]. 农技服务,2014,31(12):67-68.
- [8] 王园园. 向日葵(*Helianthus annuus* L.) 离体再生体系建立的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2011.
- [9] 杨长友. 向日葵离体再生及农杆菌介导的遗传转化研究[D]. 重庆:重庆师范大学,2014.
- [10] 斯日古楞,陈泽彬,张永虎,等. 向日葵子叶不同部位对再生体系建立的影响[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2013,34(2):31-33.
- [11] 刘海臣. 向日葵下胚轴遗传转化影响因素的研究[J]. 河北北方学院学报(自然科学版),2013,29(1):32-36.
- [12] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社,2013:130.
- [13] 鲁娜,高金秋,尹晶. 向日葵耐盐品种扩繁体系建立的研究[J]. 南方农业,2014,8(36):26-28.
- [14] 刘海臣. 向日葵组织培养研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2011,26(2):190-192,195.
- [15] 刘海臣,王秀香,刘海学,等. 向日葵子叶节组织培养及其再生的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(28):15498-15499,15506.
- [16] 孙敏,赵力之,滕刚福,等. 向日葵珍贵种质资源快速繁殖方法-茎尖培养技术[J]. 宁夏农林科技,2015,56(7):43-44.