



向日葵组织培养研究进展

景 岚, 沙日娜

(内蒙古农业大学 农学院, 呼和浩特 010019)

摘 要: 向日葵(*Helianthus annuus*)是世界主要的油料作物之一。近几年来有关向日葵的研究很多, 其中向日葵组织培养研究越来越受到重视。本文从向日葵外植体培养、植株再生影响因素、组培过程中存在的问题及解决方法等方面进行了综述。

关键词: 向日葵; 组织培养

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

Progress of the Study on Tissue Culture of Sunflower

JING Lan, SHA Ri-na

(College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the major oil crops in the world. In recent years, more research works have been done on sunflower, among which the study on tissue culture of sunflower has been paid more and more attention and some progress has been achieved. This paper reviewed the researches in the tissue culture of sunflower in the following aspects: explants' culture of the sunflower, influential factors on shoots' regeneration as well as the existing problems and the way to solve these problems.

Key words: sunflower; tissue culture

向日葵(*Helianthus annuus* L.)是世界四大油料作物之一, 种植面积广, 富含亚油酸(50%~60%), 是我国北方地区的主要油料作物, 其作为油料或蛋白质资源日益受到人们的重视。

组织培养不仅可生产大量的优良无性系, 也可打破种属间的界限, 克服远缘杂交及不亲和性障碍, 在向日葵新品种的培育和种性的改良中有着巨大的潜力。在近近年来基因工程技术的发展和应用中, 向日葵再生体系的建立也是转化能否成功的关键。

向日葵属于难培养植物, 有许多因素制约着向日葵的植株再生。从进行向日葵组织培养技术研究^[1]到现在已有 20 多年的历史, 向日葵植株再生方法已经得到长足发展, 各种技术也已有报道。近几年来向日葵育种工作者通过生物技术手段, 在向日

葵组织培养方面取得了可喜的成果。

1 向日葵组织培养中不同外植体研究

向日葵再生植株最早是用子叶作为外植体培养成功的^[1]。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、未成熟胚等多种器官上获得成功。

1.1 器官培养

在过去的 20 a 里, 向日葵的器官培养从子叶^[1-3]开始到下胚轴^[4]、真叶^[5]、茎尖^[6-11]等都不同程度地得到了再生植株, 这几种外植体中子叶、下胚轴、茎尖较易诱导出再生植株。总体上诱导出芽的频率不高, 一般在 2.5%~12%, 而且受各种因素影响芽不易长成植株^[1,2]。马雪霞等^[4]在对几个向日

葵品系研究时发现,对于子叶、下胚轴、真叶而言,真叶形成的愈伤组织较小,且不易分化成芽,子叶柄切取的部位如果生长点切除得不干净,生长点部位易形成单株;下胚轴离生长点部位越近再生能力越强。如果离生长点太远愈伤组织上易形成畸形芽,不易成苗。贺宾等^[12]实验表明油葵茎尖周缘分生区再生率略高于其它组织。而最近几年进行的向日葵遗传转化中以茎尖作为转化受体的居多,选用具有直接分化能力的茎尖为受体,可缩短组织培养过程,防止体细胞变异,尽管转基因植株的获得率低于0.1%,但皆获得转基因后代植株^[6-11]。

1.2 胚胎培养

幼胚培养技术在作物杂交育种中对克服远缘杂交的胚败育、缩短杂交育种世代周期、加快育种速度是一种重要的技术手段。而最近几年有关向日葵未成熟胚培养成功的报道越来越多,向日葵胚胎培养技术已越来越成熟。李映红^[13]、Finer^[14]、Freyssinet等^[15]都报道了在向日葵幼胚培养中体细胞胚胎的发生。Charriere^[16]也报道了未成熟的合子中诱导出愈伤组织再由愈伤组织发生体细胞胚胎的间接途径,但再生器官的发生率不是很高。宋英凯等^[17]从1990年开始对向日葵未成熟胚不定芽发生进行了研究,结果表明,自交系、杂一代和保持系的再生频率高于普通品种,而且向日葵子叶阶段未成熟胚再生不定芽的能力较强,10 d以上幼胚成苗率较高。刘海学等^[18]以8种基因型向日葵为材料,对未成熟胚的萌动、愈伤组织的诱导、分化及再生苗的培养和移栽等方面进行了研究,结果表明,幼胚的大小直接影响分化率,过小不能成苗和分化,过大要进入休眠期,授粉后10~12 d的胚分化成苗率在MS+0.03 mg·L⁻¹ IAA+1.2 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基上最高,可达到70%以上;向日葵未成熟胚的分化苗需要在保湿和保温条件下培养,移栽前一定要进行适应锻炼,移栽后按时浇水,定期施肥或浇肥料水,每天保证光照时间达到16 h,光照强度为4 000 lx。Ozyigit^[19]的研究中采用了成熟胚,6种基因型愈伤化率达80%~92%,其中1种基因型的芽再生率达44%,而且在添加IBA和无激素的培养基上都有生根。目前向日葵的遗传转化过程中采用成熟胚或未成熟胚作为转化受体获得成功的例子也不少^[20-22]。

1.3 原生质体培养

原生质体培养为解决常规杂交育种中远缘杂交不亲和性等难题提供了可行性的理论依据,也可用

于无性系变异及突变体的筛选等研究,因而越来越受到重视。

最早是1981年Binding等^[23]在一个77种双子叶植物的原生质体再生能力试验中,极简略提到向日葵茎尖培养物的原生质体能再生植株,但无详细报道。后来,研究者们在此基础上利用下胚轴原生质体^[24]及叶肉原生质体^[25]进行培养形成愈伤组织,但仅有1个愈伤组织发生根分化^[25]。1991年Burrus^[26]用液体培养方法利用下胚轴原生质体成功地诱导出了再生植株。Fischer等^[27]也用子叶和下胚轴原生质体培养获得了再生苗。Samaj^[28]认为在向日葵原生质体培养系统中,下胚轴的原生质体分离及培养更有价值。但在原生质体培养方式上,固体培养似乎比液体培养更有效。因为在固体培养基上培养时,琼脂与外植体接触,并对质膜产生压力,再生效率高一些^[29]。蒋君达等^[30]指出红光与苗龄对向日葵原生质体的产量和分裂生长有一定的互作效应;另外在MS培养基上添加5 mmol·L⁻¹谷氨酰胺或以7.5 mmol·L⁻¹谷氨酰胺代替原培养基中的无机氮,能促使原生质体高频率分裂,再生愈伤组织。李耿光^[31]用向日葵籽苗下胚轴原生质体,培养在含有0.5 mg·L⁻¹ 6-BA、0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D、0.1 mg·L⁻¹ NAA和0.55 mg·L⁻¹葡萄糖的改良Kao培养基中,分裂频率达到95%以上,原生质体诱导的少数愈伤组织发生了根的分化。

2 影响向日葵组织培养植株再生因素

向日葵组织培养中受基因型、外植体生理状况、外源激素等条件的影响,其再生能力不同。

2.1 基因型限制

在向日葵组织培养中一些研究者认为植株再生能力存在显著的基因型差异。刘宝等^[32]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。兰海燕^[33]、徐培洲等^[3]、Leurence^[34]和刘海学等^[18]在子叶、幼胚外植体培养中也得到相同结果。因此选择合适的基因型材料依然是目前进行高效组织培养成功的关键。Nestares^[35]声称尽管向日葵再生能力很大程度上受基因型影响,培养条件也起重要作用,在用20个向日葵自交系的子叶培养中,结果发现基因型和培养基的相互作用很明显,再生率也大不相同。然而,Pugliesi等^[36]认为基因型和植株再生能力间无关系,再生能力依赖于生长调节剂(生长素和细胞激动素)之间数量上的互作。

2.2 外植体生理状况对再生能力的影响

许多较难再生的作物类型,其外植体的生理状况与芽再生能力之间有很大关系,在向日葵组培中子苗日龄是影响外植体再生能力的最重要的因素之一^[37]。Pugliesi 等^[36]经实验发现,4 个基因型子叶再生能力在发芽后 2 d 都开始下降,其中 1 个品种的再生能力 4 d 后完全丧失。徐培洲等^[3]的实验表明 3~5 d 龄子叶诱导芽分化率最高,随着苗龄的增加和减少,分化率均明显降低。认为子叶含有养分和维持种子发芽过程的激素浓度,在最初发育阶段,其器官形成潜力与它们的新陈代谢有关。过于幼嫩的子叶,新陈代谢水平处于上升阶段,一些器官发生所必需的蛋白质、维生素还未形成;老龄子叶新陈代谢水平下降,伴随着营养物的消耗,而对需要高能量的器官形成过程没有足够的储备。马雪霞等^[4]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,下胚轴外植体未分化出芽,而取自苗龄 5~7 d 的外植体均分化出丛生的不定芽,但随着苗龄的增加,子叶、下胚轴丧失再生能力。张义等^[38]试验表明:幼胚培养中较适宜的接种时间为油用型授粉后 7~8 d,食用型授粉后 8~9 d,各种基因型随着胚龄的增大成苗率亦随之提高,但到授粉后 14 d 幼胚直接分化成苗率有下降的趋势。宋英凯^[17]认为,10 d 以上幼胚经过愈伤化成苗率较高。刘海学等^[18]的实验结果表明,授粉后 10~12 d 的胚分化频率最高,可达 70% 以上。

2.3 外源激素对植株再生的影响

在植物组培体系中,培养基中的激素类型及浓度是决定外植体能否再生的重要因素。Януик^[39]研究了 8 种激素对向日葵外植体再生的影响,结果表明,KT、IAA、NAA 在一定浓度范围内对愈伤组织的生长有很好的促进作用,但 2,4-D 和 6-BA 对愈伤组织的分化起抑制作用。另外研究发现含有 2,4-D 的培养基上的愈伤组织没有再生能力。徐培洲等^[3]的实验也证实:2,4-D 诱导的愈伤组织量虽然很大,但基本为非胚性愈伤组织,已无进一步分化的能力。王爱勤等^[40]在油葵组培过程中证实,在仅有 6-BA 的 MS 分化培养基中,子叶和下胚轴均能萌动并产生粉状或水浸状愈伤组织,但均不能分化成芽;徐培洲等^[3]的实验同时还证实,IAA 对诱导愈伤或不定芽都起着良好的作用,而其中 IAA 和 6-BA 组合的诱导芽再生能力最强,MS 添加 IAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 6-BA $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上诱导的愈伤组织质量较好。Pugliesi 等^[36]认为 2 种激素(KT、IAA)对产生再生芽都是必

要的,激动素与吲哚乙酸配比最高,而且以激素浓度最高的处理(4:1)形成再生芽的百分率最高。而马雪霞等^[4]研究认为 6-BA 和 IAA 浓度之比为 5:1 时,诱导出芽率最高。宋英凯等^[17]研究发现 MS 基本培养基中添加 NAA 与 6-BA 更适用于向日葵幼胚直接萌发,且在幼胚培养中高含量蔗糖及适宜的 6-BA 有利于不定芽的发生。刘海学等^[18]在向日葵未成熟胚组织培养试验中发现,6-BA 和 IAA 之比为 40:1 时,诱导分化率最高,为 80%。

关于植物激素在植物生长发育过程中的调节作用已研究得很多,且不断有新的激素应用于组培试验和研究。PAA(苯乙酸)是一种在低等和高等植物中普遍存在的生长素,它的非吲哚组分被证明具有生长素的活跃功能。Dhaka^[41]首次在向日葵组织培养中使用了 PAA,结果发现 PAA 的作用显著, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PAA+ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的组合在几个品种中都不同程度地诱导出再生芽,还发现 PAA 在诱导生根方面的作用也很明显。

不同植物及其不同生长发育阶段对激素的需求是不同的,在组培研究中,摸清不同基因型植物材料的最适激素种类及其浓度仍然是组织培养成功的重要保障。

3 向日葵组织培养过程中存在的问题及解决对策

尽管向日葵组织培养技术已取得很大进展,但还存在一些问题,如:早熟、早开花、玻璃化现象和褐化现象严重、生根率低等^[42,43],这些都影响其培养效果。

Paterson^[37]早期试图通过改变培养基成分及环境条件的方式来克服存在的困难,但收获甚微。然而 Witrzens 等^[44]发现无论是玻璃化或提早开花现象可以通过替换培养基中的无机氮代之氨基酸混合物或加入根皮糖酚、柚皮苷及水合七叶苷等有机物而得以有效防止。另外高浓度水平的乙烯是导致玻璃化现象的重要因素,组织培养中可通过在培养基中加入 AgNO_3 来控制乙烯合成,Chraibi^[45]声称培养基中加入钴化合物也可降低乙烯合成而刺激向日葵植株再生,但 Mayor 等^[46]认为该化合物对上述现象没有影响,而 AgNO_3 的加入能有效地控制早熟及玻璃化现象。还有降低培养基糖分含量以及尽早去掉激素的措施对控制玻璃化及褐化现象也很有效,通过嫁接途径解决早花性的再生苗不生根的难题等^[3]。但由于具有早花性的再生苗生长量有限,

很难获得种子。

防止玻璃化现象也可以通过增加或减少光照强度或时间,增加昼夜温差,减少培养基的含水量等方法。可以用容积大的三角瓶来代替容积小的培养皿来降低含水量。此外,将外植体放置在黑暗条件培养一段时间,然后进行预处理,或多次连续转移减轻褐化现象亦有一定效果。

4 小 结

向日葵属于难再生植物,许多因素制约向日葵

离体培养的植株再生过程,对影响再生的因素及机制进行深入探索将对向日葵的组织培养研究具有重要意义。从 20 世纪 80 年代以来,人们在向日葵的组织培养方面做了大量的工作,到目前为止建立一个成熟的再生体系,仍是向日葵组培工作的一个研究重点。因此在今后的研究中,应继续探索建立高效的再生体系,缩短培养时间,排除外植体材料的生理状态及基因型等因素对向日葵组培效果的影响,提高再生频率,以利于向日葵的育种及利用基因工程进行向日葵的品种改良。

参考文献:

- [1] GRECO B, *et al.* Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Sci. Lett.*, 1984, 36: 73—77.
- [2] BAKER M C, MUNOA-FERNANDEZ N, CARTER C D. Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 58: 39—49.
- [3] XU P ZH(徐培洲), WU X J(吴先军), HU B M(胡保民), *et al.* A shoot regeneration system from cotyledon of *Helianthus annuus* L. [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Science* (中国油料作物学报), 2004, 26(4): 16—19 (in Chinese).
- [4] MA X X(马雪霞), LAN H Y(蓝海燕), SONG R(宋 荣). Tissue culture and shoot regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Xinjiang Agricultural Science* (新疆农业科学), 2002, 39(1): 23—24 (in Chinese).
- [5] PUNIA M S, BOHOROVA N E. Callus development and plant regeneration from different explants of six wild species of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Plant Sci.*, 1992, 87: 79—83.
- [6] MOLINIER J, THOMAS C, BRIGNOU M, HAHNE G. Transient expression of ipt gene enhances regeneration and transformation rates of sunflower shoot apices (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Plant Cell Rep.*, 2002, 21: 251—256.
- [7] WEBER S, FRIEDT W, LANDES N, *et al.* Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication [J]. *Plant Cell Rep.*, 2003, 21(5): 475—482.
- [8] KNITTEL N, VERONIQUE G, HAHNE G, *et al.* Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol [J]. *Plant Cell Rep.*, 1994, 14: 81—86.
- [9] MALONE S J, SCELONGE C J, BURRUS M, *et al.* Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants [J]. *Plant Sci.*, 1994, 103: 199—207.
- [10] BURRUS M, MOLINIER J, HIMBER C, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: transformation patterns [J]. *Mol. Breeding*, 1996, 2: 329—338.
- [11] SANKARA K R, ROHINI V K. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a simple protocol [J]. *Annals of Botany*, 1999, 83: 347—354.
- [12] HE B(贺 宾), GAO Y(高 燕), XIANG L J(向理军), *et al.* Tissue culture of development stages around shoot tip and high frequency shoot regeneration of *Helianthus annuus* L. [J]. *Xinjiang Agricultural Science* (新疆农业科学), 2004, 41(2): 86—88 (in Chinese).
- [13] LI Y H(李映红), GUO ZH CH(郭仲琛), WANG F X(王伏雄). Immature embryo culture of sunflower [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 1998, 10(1): 79—86 (in Chinese).
- [14] FINER J J. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose containing medium [J]. *Plant Cell Rep.*, 1987, 6: 372—374.
- [15] FREYSSINET M, FREYSSINET G. Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos [J]. *Plant Sci.*, 1988, 56: 177—181.
- [16] CHARRIERE F, SOTTA B, MIGINIAC E, HAHNE G. Induction of sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a non-meristematic zygotic embryos of *Helianthus annuus*; variation of endogenous hormone levels [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 1999, 37: 751—757.
- [17] SONG Y K(宋英凯), ZHANG T X(张天星), CUI G H(崔国惠), WANG L X(王立新). A study on adventitious bud regeneration in immature embryo culture of sunflower [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 1993, 8(2): 112—115 (in Chinese).
- [18] LIU H X(刘海学), JI J(季 静), WANG P(王 萍), *et al.* Study on tissue culture and regeneration bud of sunflower's young embryos [J]. *Journal of Inner Mongolia University for Nationalities* (内蒙古民族大学学报), 2003, 18(5): 411—414 (in Chinese).
- [19] OZYIGIT I I, GOZUKIRMIZI N, SEMIZ B D. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, 53(4): 556—559.

- [20] CHARRIERE F, HAHNE G. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators[J]. *Plant Sci.*, 1998, 137: 63—71.
- [21] LUCAS O, KALLERHOFF J, ALIBERT G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Molecular Breeding*, 2000, 6: 479—487.
- [22] TAREK H, ANNIE P, GILBERT A, JEAN K. Dehydrating immature embryo split apices and rehydrating with *Agrobacterium tumefaciens*; A new method for genetically transforming recalcitrant sunflower[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20: 335—345.
- [23] BINDING H, *et al.* Comparative studies of the dicotyledoneae class[J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1981, 101: 119—130.
- [24] BOHOROVA N E, COCKING E C, POWER J B. Isolation culture and callus regeneration of protoplasts of wild and cultivated *Helianthus* species[J]. *Plant Cell Rep.*, 1986, 5: 256—258.
- [25] LENE P, CHUPEAU Y. Isolation and culture of sunflower protoplasts (*Helianthus annuus* L.); factors influencing the viability of cell colonies derived from protoplasts[J]. *Plant Sci.*, 1986, 43: 69—75.
- [26] BURRUS M, CHANABEC C, ALIBERT G. Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Plant Cell Rep.*, 1991, 10: 161—166.
- [27] FISCHER C, KLETHI P, HAHNE G. Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L.); shoot regeneration and seed production[J]. *Plant Cell Rep.*, 1992, 11: 632—636.
- [28] SAMAJ J, OKOLOTA, BOLAK M, GLEBA YU. Increase of callus and embryoid production from hypocotyl production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by culture in microdrops[J]. *Bio. Plantarum*, 1993, 36: 183—190.
- [29] ROEST S, GISSEN J W. Regeneration from protoplasts; a supplementary literature review[J]. *Acta Bot. Neerl.*, 1993, 42: 1—23.
- [30] JIANG J D(蒋君达), XUE Q ZH(薛庆中). Influences of seedling age and red light on protoplast isolation and culture of sunflower[J]. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1992, 19(5): 430—435(in Chinese).
- [31] LI G G, CONSTABEL F. High frequency callus formation and limited rhizogenesis with hypocotyl protoplasts of *Helianthus annuus* L.[J]. *Acta Phytobiologica Sinica*(植物生理学报), 1996, 22(3): 218—224.
- [32] LIU B(刘 宝), GU D F(顾德锋), WU X K(邬信康). Tissue culture and plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus*) inbred lines[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*(吉林农业大学学报), 1991, 13(1): 6—10(in Chinese).
- [33] LAN H Y(兰海燕). Effect of factors on regeneration *in vitro* of sunflower[J]. *Xinjiang Agricultural Science*(新疆农业科学), 2000, 4: 163—165(in Chinese).
- [34] LAURENCE D, PHILIPPE L. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 48: 127—130.
- [35] NESTARES G, *et al.* Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower[J]. *Plant Breeding*, 2002, 121: 336—341.
- [36] PUGLIESI C, MEGALE P, CECCONI F, BARONCELLI S. Plant regeneration and genetic variability from tissue cultures of sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Plant Breeding*, 1991, 106: 114—121.
- [37] PATERSON K E, EVERETT N P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus[J]. *Plant Science*, 1985, 42: 125—132.
- [38] ZHANG Y(张 义), NIU Q J(牛庆杰), LIU D(刘 铎), *et al.* Study on culture of immature embryo of sunflower in nutrition soil[J]. *Jilin Agricultural Sciences*(吉林农业科学), 2000, 25(6): 18—22(in Chinese).
- [39] ЯНУИК В И. Физиол о гияиби охмия куль[J]. *Т. Растени*, 1989, 21(4): 351—357.
- [40] WANG A Q(王爱勤), HE L F(何龙飞), LIN W(林 伟), *et al.* Tissue culture and flowering of *Helianthus annuus* in tube[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2002, 38(6): 583(in Chinese).
- [41] DHAKA N, KOTHARI L S. Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Helianthus annuus* L. [J]. *Plant Cell Rep.*, 2002, 21: 29—43.
- [42] HAO Y L(郝彦玲), LUO Y B(罗云波). Advances in study on genetic transformation of sunflower[J]. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 2005, 25(1): 25—28(in Chinese).
- [43] NESTARES G, ZORAOLI R, MROGINSKI L, PICARDI L. Plant regeneration from cotyledons derived from mature sunflower seeds[J]. *Helia*, 1996, 19: 107—112.
- [44] WITRZENS B, SCOWCR W R, DOWNES R W. Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interspecific hybrids (*H. tuberosus* × *H. annuus*)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1988, 13: 61—76.
- [45] CHRAIBI K M B, CATELLE J C, LATCHE A, *et al.* A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Plant Sci.*, 1992, 86: 215—221.
- [46] MAYOR L M, NESTARES G, ZORZOLI R, PICARDI A. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 72: 99—103.