

## 专题介绍

### Review

# 苧麻组织培养和遗传转化研究进展

马雄风 喻春明 唐守伟 王延周 朱爱国 朱四元 熊和平\*

中国农业科学院麻类研究所, 长沙, 410205

\* 通讯作者, [ramiexhp@public.cs.hn.cn](mailto:ramiexhp@public.cs.hn.cn)

**摘要** 苧麻是优良的精纺纤维, 也是重要植物蛋白饲料资源和新型生物质产业的基础材料, 本文从组织培养和遗传转化两个方面, 结合本实验室工作综述了苧麻组织培养和遗传转化研究的最新进展。在苧麻组织培养的外植体中以下胚轴和子叶最适宜, 而在激素使用以 6-BA 诱导器官分化的效率最高, 并以此为基础建立了苧麻再生体系。在苧麻遗传转化方面, 目前以农杆菌介导法应用最多。本文还指出了苧麻转基因研究中存在的问题, 并对生物技术培育苧麻新品种和促进苧麻生产的可能性进行了讨论。

**关键词** 苧麻, 组织培养, 遗传转化

## Advances in Studies of Tissue Culture and Transformation of Ramie

Ma Xiongfeng Yu Chunming Tang Shouwei Wang Yanzhou Zhu Aiguo Zhu Siyuan Xiong Heping\*

Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, 410205

\* Corresponding author, [ramiexhp@public.cs.hn.cn](mailto:ramiexhp@public.cs.hn.cn)

**Abstract** Ramie is fine worsted, and an important resource of botanic protein feed and a new basic material for biomass material industry. This article summarizes advances of ramie tissue culture and genetic transformation. The studies on tissue culture indicated that, hypocotyl and cotyledon is the most suitable. The explant and culture medium with 6-BA has the highest regeneration efficiency. Accordingly, the in vitro regeneration system of ramie has been established. The reported studies on ramie genetic transformation showed that, *Agrobacterium*-mediated technique was used more. In conclusion, problems and prospects on ramie tissue culture and genetic transformation are pointed out. Furthermore, the possibility of breeding new ramie varieties and promoting the ramie product via biotechnology was also discussed.

**Keywords** Ramie, Tissue culture, Transformation

苧麻(*Boehmeria nivea* L. Gand)为荨麻科苧麻属的多年生宿根性草本植物, 在我国有着悠久的栽培和加工历史, 很早就在欧美和东南亚国家得到广泛利用。苧麻纤维及其织物、织品是我国重要工业原料和传统的出口创汇产品, 近二十年为国家创汇 60 亿美元。

通过苧麻遗传育种培育新的品种是提高产量和品质的重要手段之一, 育种工作者先后采用系选、杂交、倍性育种和辐射育种等育种手段, 培育出中苧一号、园叶青、川苧 9 号、华苧 5 号等高产、优质、多抗新品种, 在不同时期为麻业生产均做出贡献。通过上述传统育种方法, 苧麻产量有了很大的提高, 但常规育种在进一步提高产量、品质和抗性等方面的局限性已逐步显现, 尤其是纤维品质一直没有很大改善。

基因工程育种可望打破纤维品质与产量的遗传负相关, 使品质与产量同步提高。无论是利用转基因手段创造具有新性状的优良苧麻材料, 还是对苧麻基因功能的深入研究, 都需要植物转基因遗传转化技术辅助。所以, 稳定高效的遗传转化体系的建立已经成为了制约苧麻分子遗传育种的瓶颈之一。本文拟从苧麻的组织培养和遗传转化两个方面并结合本实验室的工作对苧麻组织培养和遗传转化研究进展作一综述。

### 1 苧麻组织培养研究进展

农杆菌浸染是自然界发生的完美的基因转化过程, 它的一段 DNA 能以单拷贝插入到受体植物细胞基因组, 遗传稳定性好, 并且多数符合孟德尔遗传规

律,因此转基因植株能较好地为育种提供中间选育材料。农杆菌介导法需要经过组织培养过程,所以需要建立一个有效的离体再生体系,苎麻的组织培养研究起始于1979年,但研究重点在快速繁殖(颜昌敬等,1982)、花药培养、茎尖脱毒和原生质体培养(陈德富等,1996;熊兴耀等,1996)等方面。直到近年才有报道称建立了可满足遗传转化需求的离体植株再生体系。

### 1.1 外植体类型

用于转化的外植体必须易于再生,有很高的再生频率,并且具有良好的稳定性和重复性。研究者相继从子叶(汪波等,2006)、下胚轴、茎段(刘瑛等,2002)、叶片(陈建荣等,2005a;胡继金,1991)、茎尖以及腋芽培养出再生植株。从满足遗传转化需求的离体植株再生体系的研究角度看,下胚轴比子叶愈伤组织分化出芽的时间早,出芽频率也高很多,而离体叶片(赵庆华等,1984)很难诱导出再生植株。此外,基因型能控制外植体的状态,决定是否脱分化和愈伤组织增殖的状态(王晓玲和彭定祥,2005),也成为影响苎麻外植体再生的重要因素之一。本实验室的经过多年研究和摸索,选用一些品种的下胚轴作为遗传转化的外植体。

### 1.2 培养基和激素的作用

基本培养基对苎麻离体培养植株再生有显著的影响,大多数文献报道的愈伤组织的诱导和芽的分化一般都是采用MS培养基。黄记生和莫荣达(1981)研究了MS、White、B5、BT和SH等5种培养基对愈伤组织的诱导及分化的影响,发现MS和SH培养基能诱导下胚轴产生不定芽,但在MS的分化率为33.3%,要明显高于SH培养基上的11.1%。潘昌立等(1995)对MS基本培养基进行了改进,在诱导培养时使用1/2MS和3/4MS培养基,而在分化培养时则使用了3/4MS基本培养基,都取得了较好的培养效果。王晓玲等(2003)则进行了MS、LS、MSB、B5、N6、Nitsch和White等7种培养基对苎麻不同外植体进行愈伤组织的诱导和分化的研究。发现前5种基本培养基均能诱导子叶、下胚轴、叶和茎段产生愈伤组织。本实验室的研究工作中通过对多种培养基的筛选工作,选择MS作为基础培养基。

迄今为止,研究者发现不同的各种激素组合都能诱导苎麻的不同外植体产生愈伤组织,而6-BA是最有利于苎麻不同外植体来源的愈伤组织分化出

苗的细胞分裂素。虽然单独使用2,4-D、NAA、IAA、6-BA或者KT都能诱导苎麻下胚轴产生愈伤组织,细胞分裂素和生长素的比例是激素使用的关键。莫荣达和黄记生(1983)研究发现在MS培养基中添加0.1~10 mg/L 6-BA或者ZT均能诱导下胚轴产生愈伤组织继而从愈伤组织上分化出不定芽,且6-BA的适宜浓度是2.0 mg/L,而ZT的适宜浓度是5.0 mg/L,还发现6-BA与NAA、IAA或者2,4-D配合使用,当浓度比是2:1的时候,下胚轴都不能分化,出不定芽。潘昌立等(1995)利用IBA和6-BA配合使用,能使下胚轴在培养20 d左右开始分化不定芽。郭清泉等(1998)用NAA和6-BA配合使用,在2.0~3.0 mg/L 6-BA+0~0.5 mg/L NAA+1/2MS培养基上,叶片外植体产生愈伤组织和分化出不定芽。我们优化培养体系后,培养基中IAA和6-BA配合使用,能使下胚轴在培养仅20 d左右开始分化不定芽。

## 2 苎麻遗传转化研究进展

国内外相继有关于苎麻转基因研究成功的报道,Dusi等(1993)用含pGV1040质粒的根癌农杆菌EHA101菌株侵染子叶,在B5+0.2 mg/L IAA+2.0 mg/L 6-BA培养基上获得抗性再生植株,经过GUS标记检测和Southern杂交检测,将一个和蛋白质相关联的基因转入了饲用苎麻中。易自力等(2006)用含publm质粒的农杆菌LBA4404和EHA105菌株侵染圆叶青品种的下胚轴,在MS+2.0 mg/L 6-BA+不同浓度的IAA或者NAA培养基上,获得了独立来源的再生植株,经过PCR和Southern杂交检测,验证外源基因已整合转基因苎麻基因组中。孔华等(2006)用含轮状病毒外壳抗原蛋白VP4基因农杆菌EHA105菌株侵染真叶叶片,采用叶盘转化法转化苎麻栽培品种圆叶青,以卡那霉素抗性作为转化植株的筛选标记获得抗性植株,经PCR和Southern blot分析表明,初步获得了轮状病毒外壳蛋白VP4的转基因苎麻植株。汪波等(2007)用含绿色荧光报告基因的农杆菌EHA105菌株侵染子叶,子叶外植体经过共培养、选择培养、伸长培养和生根培养后再生出抗性植株,对抗性植株的GFP荧光检测和Southern blot分析表明,外源基因已整合到苎麻基因组中。

## 3 存在的问题及展望

尽管苎麻的组织培养和遗传转化研究已取得初步进展,但无论是外源基因、受体材料,还是转化方法都有进一步深入研究的必要性。

Dusi 等(1993)、易自力(2006)和汪波(2007)等虽已获得了苧麻的转基因植株,但选用的受体是苧麻种子苗的子叶或下胚轴。苧麻的种子苗不同于其他作物,自然变异频率非常高,获得的转基因植株丢失了一些原有的优良性状,再加上种子苗的子叶和下胚轴非常小,操作难度较大,不易进行大规模实验。而且目前报道的苧麻转基因植株多是器官分化途径产生的,多为嵌合体,难以应用于下一步的育种研究。因此,应对受体材料进行更广泛的筛选,如苧麻无菌苗的叶柄、茎段、胚轴等,在保持大量丛生芽再生的能力的同时,又简化操作。应多尝试用胚状体再生体系,体细胞胚具有个体间遗传背景一致、无性系变异小、胚的结构完整、成苗快、数量大等许多优点,有利于转基因植株的生产和推广。陈德富和陈喜文(1998)曾报道苧麻体细胞胚胎发生的研究初报,但这方面的研究目前仍然太少。

除上述的依赖于组织培养再生体系的农杆菌介导法外,应进行更多的尝试,如基因枪法和花序浸入法等。基因枪转化法没有宿主范围限制,靶受体类型广泛,是继农杆菌介导法之后应用最广泛的一项遗传转化技术。目前还没有苧麻基因枪转化方面的报道,仅郭运玲等(2006)探索了茎尖的组织培养及其诱导植株的产生等方面的研究内容。我们已开展了基因枪转化的受体材料、抗性植株筛选方式、渗透处理、真空度、基因枪轰击距离、次数等方面的研究;花序浸入法是一种避开植物组织培养的遗传转化方法,其突出的优点是节省劳动时间,成本相对低廉,经验知识较少,适合普及和使用,在一般实验室或大田即可进行,转化率高,易重复,解决了长期以来经济作物遗传转化率低,难以发挥基因工程在作物品种改良中的重要作用的关键问题;避开了组织培养阶段,排除了组织培养中因体细胞变异导致的目的基因的不正确表达所造成分子遗传学研究中不利的遗传背景;由转化受体直接可得到种子,长成植株,避开了由体细胞或原生质体培养再生植株的难关以及试管苗移栽不宜成活的麻烦。苧麻种子小、结子量大,可借鉴拟南芥花序浸入法。该方法需要搬动植物并把植物倒过来进行花器官侵泡,我们利用苧麻茎的柔韧性,可以直接在大田和温室进行花器官侵泡,省去了棚栽和搬动等工作量。

建立稳定、高效、简捷的转化体系,获得转基因苧麻材料后,就可以利用苧麻无性繁殖的特点,迅速进行大规模扩繁,并开展多方面的苧麻生物工程研究。如可以利用基因工程手段将苧麻中没有的外源

基因(如蜘蛛丝基因、兔角蛋白基因和 PHA 合酶基因等等)转移到苧麻中,不仅可以改善苧麻的纤维品质,而且可以使苧麻纤维获得新的性状,开发苧麻纤维的新用途。此外,我们可以应用基因工程技术在基因水平上操纵苧麻形成层细胞的分裂方向和韧皮部细胞的分化方向,调控苧麻纤维素和木质素(陈建荣等,2005b)代谢,改良纤维品质。还可以将抗虫、抗旱、抗盐等抗逆境的相关基因转入苧麻,使得苧麻能够在更广泛的地区种植,发挥其水土保持作物的优势。基因工程技术还可以改良饲料用苧麻品质并赋予其免疫性可饲疫苗等新性状,满足我国畜牧业的高速发展。总之,苧麻的生物工程研究在我国有广阔的应用前景。

## 参考文献

- Chen D.F., and Chen X.W., 1998, Preliminary study on somatic embryogenesis of ramie, *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese Bulletin of Botany), 15(3): 65-68 (陈德富, 陈喜文, 1998, 苧麻体细胞胚胎发生研究初报, *植物学通报*, 15(3): 65-68)
- Chen D.F., Zhou P.H., Li Z.D., and Chen X.W., 1996, Plant regeneration from protoplasts of suspension cells of ramie, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 22(1): 112-116 (陈德富, 周朴华, 李宗道, 陈喜文, 1996, 苧麻悬浮细胞原生质体培养再生植株, *作物学报*, 22(1): 112-116)
- Chen J.R., Guo Q.Q., Zhang X.W., and Chen J., 2005a, Study on *Agrobacterium*-mediated transformation system of ramie leaves, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 21(6): 63-66 (陈建荣, 郭清泉, 张学文, 陈婕, 2005a, 农杆菌介导苧麻叶片遗传转化体系的研究, *中国农学通报*, 21(6): 63-66)
- Chen J.R., Zhang X.W., Guo Q.Q., Tang X.S., and Yang Y.C., 2005b, Construction of *CCoA OMT* antisense expression vector and transformation of ramie, *Hunan Shifan Daxue Ziran Kexue Xuebao* (*Journal of Natural Science of Hunan Normal University*), 28(1): 75-78 (陈建荣, 张学文, 郭清泉, 唐香山, 杨友才, 2005b, *CCoA OMT* 基因反义表达载体的构建及转化苧麻的研究, *湖南师范大学自然科学学报*, 28(1): 75-78)
- Dusi D.M.A., Dubald M., de Almeida E.R.P., Caldas L.S., and Gander E.S., 1993, Transgenic plants of ramie (*Boehmeria nivea* Gaud.) obtained by *Agrobacterium* mediated transformation, *Plant Cell Rep.*, 12(11): 625-628
- Guo Q.Q., Chen J.R., Yang R.F., and Hu R.S., 1998, Study on induction of callus and plantlet regeneration of ramie leaf, *Zhongguo Mazuo* (*China Fiber Crops*), 20(2): 1-4 (郭清泉, 陈建荣, 杨瑞芳, 胡日生, 1998, 苧麻(*Boehmeria nivea* L.)叶片愈伤组织诱导与植株再生的研究, *中国麻作*, 20(2): 1-4)

- Guo Y.L., Guo A.P., Liu E.P., Kong H., and He L.K., 2006, Shoot tip culture and plantlet regeneration in ramie, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 27(1): 73-76 (郭运玲, 郭安平, 刘恩平, 孔华, 贺立卡, 2006, 苧麻茎尖的组织培养及其诱导植株的再生, *热带作物学报*, 27(1): 73-76)
- Hu J.J., 1991, Cytological observation of bud formation on the leaf surface of test tube seedlings of ramie, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 17(3): 192-196 (胡继金, 1991, 苧麻试管苗未离体叶面生芽的细胞学观察, *作物学报*, 17(3): 192-196)
- Huang J.S., and Mo R.D., 1981, In vitro organogenesis of ramie *Boehmeria nivea* (L.) Gaud, *Fenzi Xibao Shengwu Xuebao* (*Journal of Molecular Cell Biology*), 14(2): 111-114 (黄记生, 莫荣达, 1981, 苧麻(*Boehmeria nivea* (L.) Gaud)下胚轴组织培养的器官形成, *分子细胞生物学报*, 14(2): 111-114)
- Kong H., Guo A.P., Zhang X.Y., Yao Q.R., Guo Y.L., and He L.K., 2006, Establishment of a genetic transformation system in *Boehmeria nivea*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 4(2), 233-237 (孔华, 郭安平, 章霄云, 姚庆荣, 郭运玲, 贺立卡, 2006, 苧麻遗传转化再生体系的建立, *分子植物育种*, 4(2): 233-237)
- Liu Y., Huang X.Y., Lai X.P., Peng X.Y., and Lai Z.J., 2002, Study on influence of main factor on somatic embryogenesis of ramie, *Jiangxi Nongye Xuebao* (*Acta Agriculturae Jiangxi*), 14(1): 11-15 (刘瑛, 黄小英, 赖小萍, 彭学渊, 赖占钧, 2002, 苧麻组织培养再生植株主要影响因素的研究, *江西农业学报*, 14(1): 11-15)
- Mo R.D., and Huang J.S., 1983, The effects of hormone on the differentiation of stem and leaf explants of ramie, *Zhiwu Shenglixue Tongxun* (*Plant Physiology Communications*), 3: 39-41 (莫荣达, 黄记生, 1983, 植物激素对苧麻茎、叶外植体器官分化的影响, *植物生理学通讯*, 3: 39-41)
- Pan C.L., Li S.C., and Li Y.J., 1995, Studies on somatic cells plant regeneration of ramie and its affecting factors, *Zhongguo Mazuo* (*China Fiber Crops*), 17(1): 1-6 (潘昌立, 李树川, 李育君, 1995, 苧麻体细胞植株再生及其影响因素的研究, *中国麻作*, 17(1): 1-6)
- Wang B., Peng D.X., Sun Z.X., Zhang N., and Gao S.M., 2006, Effect of three antibiotics on seed germination and plant regeneration from cotyledons of ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud], *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 4(6): 495-500 (汪波, 彭定祥, 孙珍夏, 张娜, 高世梅, 2006, 三种常用抗生素对苧麻种子发芽及子叶再生的影响, *分子植物育种*, 4(6): 495-500)
- Wang B., Peng D.X., Sun Z.X., Zhang N., and Xing X.L., 2007, Regeneration of transgenic ramie plants expressing green fluorescent protein mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 33(10): 1606-1610 (汪波, 彭定祥, 孙珍夏, 张娜, 邢秀龙, 2007, 根癌农杆菌介导苧麻转绿色荧光蛋白(GFP)基因植株再生, *作物学报*, 33(10): 1606-1610)
- Wang X.L., and Peng D.X., 2005, Effects of genotype on callus induction and differentiation in ramie, *Changjiang Daxue Xuebao* (*Journal of Jiangnan Petroleum Institute* (Natural Science Edition), 2(8): 62-66 (王晓玲, 彭定祥, 2005, 不同基因型对苧麻愈伤组织诱导及分化的影响, *长江大学学报(自然科学版)*, 2(8): 62-66)
- Wang X.L., Peng D.X., and Chen X.H., 2003, Study of effects on induction and differentiation of different basal media for different explants of ramie, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao* (*Journal of Huazhong Agricultural*), 22(5): 431-435 (王晓玲, 彭定祥, 陈小慧, 2003, 基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化的影响, *华中农业大学学报*, 22(5): 431-435)
- Xiong X.Y., Gan L., Zheng S.X., and Li Z.D., 1996, Study on the regeneration of protoplast and the main factors effecting on protoplast isolation and regeneration in ramie, *Nongye Shengwu Xuebao* (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 4(2): 147-152 (熊兴耀, 甘霖, 郑思乡, 李宗道, 1996, 苧麻原生质体再生植株及影响因子的初步研究, *农业生物学报*, 4(2): 147-152)
- Yan C.J., Zhao Q.H., Hu J.J., Li Z.D., Zhou P.H., Pan C.L., Fan H.Z., and Wang C.T., 1982, Study on tissue culture and its application for the rapid propagation of ramie, *Zhongguo Nongye Kexue* (*Scientia Agricultura Sinica*), 2: 1-8 (颜昌敬, 赵庆华, 胡继金, 李宗道, 周朴华, 潘昌立, 范鸿芝, 王春桃, 1982, 苧麻组织培养及其在快速繁殖上的应用, *中国农业科学*, 2: 1-8)
- Yi Z.L., Li X., Jiang J.X., Wang Z.C., and Liu Q.B., 2006, The establishment of regeneration system and obtaining the insect-resistant transgenic plants of ramie (*Boehmeria nivea* L.), *Zhongguo Maye* (*China Fiber Crops*), 28(2): 61-66 (易自力, 李祥, 蒋建雄, 王志成, 刘清波, 2006, 苧麻再生体系的建立及抗虫转基因苧麻的获得, *中国麻业*, 28(2): 61-66)
- Zhao Q.H., Yan C.J., Pan C.L., Yang M.Q., Wang C.T., and Li Z.D., 1984, Studies on tissue culture of leaves from ramie, *Zhongguo Maye* (*China Fiber Crops*), 4: 9-13 (赵庆华, 颜昌敬, 潘昌立, 杨泌泉, 王春桃, 李宗道, 1984, 苧麻叶片组织培养的研究, *中国麻业*, 4: 9-13)