

麻类作物组织培养及遗传转化研究进展

秦先超, 祁建民, 方平平

(福建农林大学/作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室 福州 350002)

摘要: 概述了国内外红麻等麻类作物快速繁殖、花药培养、原生质体培养、体细胞胚发生、器官发生等几个方面的组织培养以及遗传转化的研究进展, 并对存在的问题进行了讨论, 提出了进一步研究的一些见解, 以为促进麻类组织培养及遗传转化研究提供科学依据。

关键词: 麻类作物; 组织培养; 遗传转化

Progress of Tissue Culture and Transformation of Bast Fiber Crops

QIN Xian-chao, QI Jian-min, FANG Ping-ping

(Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics Breeding and Multiple Utilization
of Crops / Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: This article provided an overview of domestic and foreign progress of several aspects of tissue culture including micropropagation, anther culture, protoplast culture, embryogenesis, organogenesis, and transformation of kenaf bast fiber crops. Problems and prospects on tissue culture and transformation were also discussed in this paper, raised some opinions of further research, in order to provide the scientific basis for promoting the hemp crops tissue culture and genetic transformation study.

Key words: Bast Fiber Crops; Tissue Culture; Genetic Transformation

麻类作物是我国具有民族特色的天然纤维作物, 是继粮、棉、油、茶之后第五大作物群, 我国麻类作物种植业在国际上有很强的竞争优势, 其中红麻、黄麻、苕麻和亚麻的育种水平、单产水平和种植面积均居世界前列。1949 年以来我国先后育成麻类新品种 100 余个, 大大提高了我国麻类作物的生产水平。近年来全球对麻类天然纤维的需求以 8% ~ 15% 的速度增长, 成为发达国家的主导消费品, 我国麻类产品年出口创汇突破 20 亿美元。

植物组织培养经过百余年的发展, 已经成为生物科学中一项不可或缺的技术, 它对作物育种与遗传转化有重要的意义。我国麻类作物组织培养在麻类科研工作人员多年的努力下, 在快速繁殖、花药培养、原生质体培养、体细胞胚发生和器官发生等研究

方面取得了较好的进展, 在遗传转化的研究上也取得了一定的成效。本文就我国麻类作物组织培养及遗传转化研究做了系统地综述和展望, 以为促进麻类作物细胞工程育种研究的进一步发展提供科学依据。

1 麻类作物组织培养研究进展

1.1 顶芽与腋芽快速繁殖

以植物顶芽和腋芽为外植体进行快繁, 是一种高效、快速的繁殖无毒苗的办法, 且获得再生植株无需通过愈伤组织培养阶段, 不但缩短了扩繁周期, 也减少了组培中产生的变异。Zapata 等^[1]以红麻品种 EV71、Tainung 1、Tainung 2 含部分子叶的顶芽为外植体, 以 MS 及 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度

收稿日期: 2011-08-22 修回日期: 2011-10-12

基金项目: 国家麻类产业技术体系建设(ARS-49-E06); 福建省南方麻类种质资源创新平台(2010N2002)

作者简介: 秦先超, 硕士。主要从事红麻组织培养及遗传转化研究。E-mail: qinchao1987.ok@163.com

通讯作者: 祁建民, 教授, 博导。主要从事麻类遗传育种与种质资源研究。E-mail: qjm863@163.com

的 NAA(0、0.1、1mg/L) 与 6-BA(0、0.1、1mg/L) 进行不定芽的诱导。其研究结果显示,不同基因型之间不定芽的平均诱导率没有明显差异,而培养基 MS+0.1mg/L 6-BA 不定芽的诱导率最高;MS 与 1/2MS 两种培养基对不定芽的诱导率没有差异,生长素对红麻不定芽诱导率没有明显作用,高浓度的 6-BA 与 NAA 对诱导再生芽以及生根不利,却能形成大量的愈伤组织。Srivatanakul 等^[2]利用 Ev71、Tainung 1、Tainung 2、7N、SF459 几个红麻品种顶芽为外植体,接种于添加不同浓度 2,4-D(0~2.3 μ mol/L) 以及 TDZ(0~20 μ mol/L) 的 MS 培养基中能够诱导出丛生芽,供试品种之间的出芽率差异不明显。Ayadi 等^[3]以红麻品种广东 743-2 腋芽为外植体,在 MS+BAP(0~2mg/L)+NAA(0~1mg/L)+IBA(0~1mg/L) 的培养基上进行芽诱导,在不添加任何激素的 MS 培养基上芽诱导率最高,在 MS+0.5mg/L BAP+1mg/L NAA 的培养基上芽诱导率最低;而单独添加 BAP、NAA 或 IBA 不能提高红麻芽的再生。此外,在 MS 培养基中添加外源激素会使不定芽矮化,且易形成愈伤。苎麻快繁中颜昌敬等^[4]以苎麻的 1~3 个茎段为外植体,在 MS+1.0~2.0mg/L 6-BA 或者 MS+1.0~2.0mg/L 6-BA+0.2~0.5mg/L GA₃ 培养基上得到大量的再生苗;而陈建荣等^[5]认为苎麻腋芽培养的最适培养基为 MS+0.05mg/L NAA。在剑麻快繁中,吕玲玲等^[6]以剑麻 H.11648 的茎尖为外植体,研究了在 SH、MS、MMS 3 种基质中,SH 对剑麻 H.11648 不定芽诱导的效果最好;最佳分化培养基为 SH+3.0mg/L 6-BA,增殖培养基为 SH+0.1~0.5mg/L 6-BA,生根培养基为 SH+1% 蔗糖。洪向平等^[7]以剑麻茎尖为外植体,研究出剑麻快繁的诱导培养基为 MS+5mg/L 6-BA,增殖培养基为 MS+3~5mg/L 6-BA+0.5mg/L IAA,生根培养基为 MS+1mg/L 6-BA+1mg/L NAA。亚麻扩繁中,姬妍茹等^[8]以野生亚麻无菌苗的茎尖、子叶、下胚轴为外植体,对诱导分化获得的再生苗茎段进行不定芽再次诱导,研究结果表明,诱导培养基 B₅+0.5mg/L IAA+2.0mg/L 6-BA+200mg/L CH+2.0/L 活性炭不定芽诱导率高于 MS+0.05mg/L NAA+0.5mg/L 6-BA,但后者获得的再生苗质量比前者高,且基因型对不定芽分化有一定的影响;此外,不定芽低温保存一定时间有利于提高不定芽的分化率。

1.2 花药与杂种胚培养

花药培养是有选择性地改变花粉核的分裂方式,从而产生愈伤组织或胚状体。在这个过程中各种

培养条件、遗传因素都单独或者联合作用影响花粉植株的诱导频率^[9]。我国红麻花药培养研究起步最早,中国农科院麻类研究所于 1978~1984 年,以 71-33、722 等红麻品种为材料进行花药培养,花粉愈伤组织最佳诱导培养基为 MS+2,4-D(2mg/L)+KT(1mg/L)+NAA(1mg/L),不同材料、年份、季节之间花药愈伤组织诱导率差异很大;在愈伤组织增殖、分化培养时,附加 300~5000mg 水解乳蛋白或 0.1% 酵母浸出液、提高蔗糖浓度到 8% 有利于红麻花药培养;瘤状体分化培养基为 1/2 MS+4~6mg/L GA₃+500mg/L LH(水解乳蛋白)。在红麻杂种幼胚培养中,以金钱吊芙蓉为父本,以红麻 722 和青皮 3 号为母本进行木槿属种间杂交,获得幼胚进行离体培养,其最佳成胚培养基为 MS+KT 0.5mg/L+IAA 1.0mg/L+2,4-D 0.4mg/L;以红麻品种 KB₁₁ 为母本,玫瑰麻 85-122 为父本杂交获得的胚珠,先后于培养基 MS(蔗糖浓度为 10%)+KT 1.0mg/L+IAA 0.2mg/L+GA₃ 0.4mg/L+LH 500mg/L、MS+6-BA 2.0mg/L+IBA 0.1mg/L+GA₃ 0.4mg/L+LH 500mg/L、MS+NAA 0.2mg/L+IAA 0.1mg/L 萌发出腋芽,最后将腋芽切下进行生根培养形成完整植株^[10]。此外,陈祥云等^[11]报道称,红麻花药培养受基因型的影响且品种间的差异较大。苎麻花药培养处于初步阶段,虽有刘国民^[12]报道通过花药培养得到苎麻植株,却没有证明这些植株是否是单倍体。汪波等^[13]报道了苎麻花药和未授粉子房离体培养的研究,但是仅得到花粉愈伤组织,没有从愈伤组织进一步分化出芽。在亚麻花药培养中,孙洪涛等^[14]试验表明使愈伤组织脱分化最有效的激素是 2,4-D,其次是 IAA 和 NAA;宋淑敏等^[15]认为,亚麻花药培养中双层培养的效果优于固体培养。

1.3 原生质体培养与悬浮细胞培养

原生质体是细胞融合、细胞器移植以及基因转化的理想受体,也可以通过组织培养形成完整植株。在红麻原生质体培养研究中,牛英等^[16]以红麻 722 无菌苗下胚轴为外植体,经 0.4mol/L 甘露醇处理,于 pH5.5 的 5.0mg/L 纤维素酶和 5.0mg/L 果胶酶中游离后,得到质量较好的原生质体。原生质体分裂最适培养基为 KM₈P+0.5mg/L 2,4-D+0.5mg/L 6-BA+0.45mol/L 甘露醇+2% 蔗糖;微滴培养优于液体浅层培养和琼脂糖平板培养。王丽爽等^[17]以红麻愈伤组织为外植体,经 0.55mol/L 甘露醇处理、2% 纤维素酶+0.1% 果胶酶酶解 6h 可获得较完整的原生质体,酶解最适 pH 值为 5.8。此外,王丽爽等^[18]还利

用此种方法 将获得的亚麻和红麻原生质体经 40% PEG 6000 及 0.3mol/L CaCl_2 溶液(含 9% 甘露醇, pH 9.5)融合后获得了稳定的杂合细胞。苕麻原生质体培养中 熊兴耀等^[19]用 6% 纤维素酶分离得到原生质体,以低熔点琼脂糖(LMT)软包埋方式在 MT+0.5mg/L KT+0.5mg/L GA_3 +0.02mg/L NAA+50mg/L LH+K8p+6mg/L 蔗糖基本培养基上培养出完整植株。陈喜文等^[20-23]用苕麻浏阳大叶绿的子叶诱导出愈伤组织建立悬浮细胞系,酶解后得到的原生质体通过海藻酸钠包埋培养,在附加 0.5mg/L 2,4-D+0.5mg/L KT 的 KM_8P 培养基上进行分化以及生根培养得到了完整植株。在剑麻细胞培养研究中 李斌等^[24]以 MS、LS、 N_6 、 B_5 为基本培养基,另附加 0.4mg/L NAA+2.5mg/L 6-BA+4mg/L 2,4-D 对剑麻愈伤组织进行悬浮培养,并进行蛋白酶活力与 pH 值测定。结果表明,剑麻细胞悬浮培养以及蛋白酶诱导的最佳基本培养基为 MS 与 LS, pH 与细胞生长速率呈一定相关性,细胞生长稳定时其 pH 也相对稳定。亚麻原生质体培养研究中,范志辉等^[25]以亚麻品种 Belinka、Viking、7309 和 948 为材料,对亚麻的苗龄、培养方法、更换培养液以及培养基对亚麻原生质生长的影响进行了研究。结果表明,亚麻原生质体最优培养条件为以萌发 10d 的无菌苗为起始材料, P_2 为最适培养基,培养过程中更换培养液 4~5 次进行琼州岛法培养,4 种亚麻品种中 7309 和 Belinka 获得了完整植株,而 Viking 和 948 分别只得到了叶状体和根。

1.4 体细胞胚发生

在组织培养中,诱导胚状体和诱导芽相比,具有数量多、速度快、结构完整等 3 个显著的优点^[26]。通过体细胞胚发生方式再生植株有 4 种基本方式:(1)先形成根,再在根上形成芽;(2)先形成芽,再在芽上形成根;(3)在愈伤组织上独立地产生芽和根,以后连接成统一的轴状结构;(4)再生植物通过合子胚相似的胚胎发生过程。已有研究表明^[27],植物胚状体发生和发育存在诸多影响因素,外部条件:(1)植物激素的作用中包括生长素类物质、细胞分裂素类物质、生长素与细胞分裂素结合使用以及其他植物激素的作用等;(2)含氮化合物;(3)其他外部因素的作用。内部因素:(1)生理上的隔离;(2)外植体的来源和年龄;(3)培养时间和细胞倍性变化的影响;(4)遗传型的影响;(5)胚状体发育成株的能力;(6)内源激素水平的变化等。然而,目前还没有关于红麻体细胞胚发生方式再生植株的研究,

所以研究出红麻体细胞胚培养的技术是红麻组织培养中亟待解决的问题。在苕麻细胞胚发生方式的研究中 陈德富^[28-29]以苕麻浏阳大叶绿子叶为外植体,愈伤组织诱导培养基为 CXW+0.5mg/L CPA+0.05mg/L BR,愈伤组织继代培养基为 CXW+0.5mg/L CPA+0.5mg/L NAA+1.5mg/L ZT 以及 2.0mg/L Met+3000mg/L YE。通过继代培养的愈伤组织可以发育成为胚状体,继而发育成为畸形苗,但该研究的成胚率较低。目前,关于剑麻体细胞培养的研究较少,尚无系统的报道,所以在今后的工作中需对其进行相关的研究。亚麻体细胞培养研究中 葛春辉等^[30]以双亚 5 号为材料,将其种子接种于 1.0mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上诱导愈伤组织,在培养基 MS+0.5mg/L KT+0.5mg/L NAA 进行继代,在 MS+1.5mg/L KT+1.0mg/L 2,4-D 培养基上得到较多的次生体胚或有单极性的畸形胚状体。王克臣等^[31]对双亚 5、双亚 7、黑亚 14、Opaline 4 个品种通过胚胎发生形成完整植株进行研究,结果表明最佳初始体细胞胚诱导培养基为 MS+2mg/L 2,4-D+0.5mg/L 6-BA;体细胞胚胎诱导培养基为 MS+0.5mg/L NAA+0.5mg/L 6-BA,而 4 个亚麻品种中只有黑亚 14 得到了球型胚和心形胚。

1.5 器官发生

1.5.1 直接再生不定芽 外植体不通过形成愈伤组织而直接分化出芽是组织培养中一项高效的再生植株的方式,目前在红麻组织培养上研究较少。刘恒蔚等^[32]以 917、722、BG155、F76、GM26、伊朗裂叶等红麻品种的子叶和真叶为外植体,于培养基 MS+TDZ(3.5mg/L)+NAA(0.1mg/L)培养后,可以直接分化出不定芽。不同基因型不定芽诱导率差异明显,722、BG155、F76 的诱导率最高,GM26、伊朗裂叶诱导率较差,917 的诱导率最低。此外,子叶不定芽诱导效果明显优于真叶;诱导效果较差的子叶和真叶均产生了大量的愈伤组织。苕麻不定芽直接诱导的研究中, Wang 等^[33]以苕麻的子叶、下胚轴、真叶、叶柄以及茎为外植体,研究了苗龄、基本培养基、植物生长调节因子以及培养调节对不定芽诱导的影响。结果表明,以子叶、下胚轴为外植体时,最佳苗龄为 4d;以真叶、叶柄和茎为外植体时,最佳苗龄为 15d。不定芽诱导最佳培养基为 MSB+2.27 μm TDZ+0.054 μm NAA,生根培养基为 1/2 MS+0.134 μm NAA,最适光暗培养时间为 16:8。

1.5.2 通过愈伤组织再生不定芽 关于红麻通过愈伤组织诱导不定芽的研究中,中国农科院麻类

所^[10]将红麻子叶接种于球状体诱导培养基 MS + 6-BA (2.0 ~ 3.0mg/L) ,再在 MS + 6-BA (2.0mg/L) + IBA (0.1mg/L) + LH (500mg/L) 培养基上形成瘤状体 ,最后于 MS + 6-BA (0.5 ~ 1.0mg/L) + IBA (0.1 ~ 0.2mg/L) + GA₃ (0.5 ~ 1.0mg/L) 培养基上形成完整绿苗。但是该结果为较早时期的研究 ,后人实验重复性差。目前关于红麻体细胞植株再生的研究尚无新的报道 ,如何使红麻体细胞再生植株技术发展得更加成熟 ,亟待进一步研究。苎麻不定芽诱导的研究中 ,孔华等^[34]以苎麻叶盘为外植体 ,对不定芽诱导培养基进行了研究 ,结果表明最适的愈伤诱导培养基为 MS + 6-BA 2.0mg/L + GA₃ 0.4mg/L + IAA 0.2mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 7.5g/L; 分化培养基为 MS + 6-BA 2.0mg/L + GA₃ 0.4mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 7.5g/L; 生根培养基为 MS + NAA 0.2mg/L + IAA 0.1mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 7.5g/L。伍旭东等^[35]以中苎一号叶片为外植体 ,研究了外植体消毒时间、培养基、生长调节物质对苎麻叶片愈伤诱导、分化不定芽和生根的影响。结果表明: 75% 酒精消毒 10s ,0.1% 升汞加 1 ~ 2 滴 1% HCl 灭菌 8min 灭菌效果最好。叶片最佳愈伤组织诱导培养基为: 1/2 MS + 0.05mg/L TDZ + 0.01mg/L IAA + 0.03mg/L 2,4-D; 分化培养基为: 1/2MS + 0.5mg/L TDZ + 0.02mg/L 2,4-D + 0.03mg/L IAA; 生根培养基为: 1/2 MS + 0.02mg/L TDZ + 0.05mg/L NAA + 0.02mg/L IAA。在通过愈伤组织诱导剑麻不定芽的研究中 ,陈伟等^[36]以剑麻嫩芽为外植体 ,在 N₆ + 2,4-D 2mg/L + NAA 0.5mg/L 培养基上诱导产生愈伤组织 ,在 MS + 2mg/L 6-BA + 0.05mg/L NAA 进行不定芽的诱导和增殖 ,最后通过生根培养得到完整植株。陈鸿等^[37]以剑麻幼叶为外植体 ,研究出愈伤组织最佳诱导培养基为 N₆ + NAA 0.2mg/L + 6-BA 3.0mg/L ,不定芽诱导培养基为 MS + 1.0mg/L TDZ + 0.05mg/L NAA ,生根培养基为 MS。亚麻不定芽诱导的研究中 ,张志扬等^[38]对培养基、外植体材料的基因型、苗龄以及不定芽的生根条件进行研究 ,结果表明愈伤组织和不定芽最佳诱导培养基为 0.2mg/L IAA + 0.5mg/LBA + 0.5mg/LKT; 白花、黑亚 4 号、K6531、K7697、HI026、HI045、I039 和阿丽亚那 12 个亚麻品种中 ,白花的 不定芽诱导率最高; 外植体培养的最适苗龄为 7 ~ 10d; 不定芽的最适生根培养基为 RB₅ + 0.07mg/LNAA + 0.03mg/LIBA。王克臣等^[31]对双亚 5、双亚 7、黑亚 14、Opaline 4 个品种的研究中表明 ,最适愈伤组织诱导培养基为 MS + 4mg/LNAA +

2mg/LKT ,不定芽诱导培养基为 B + 2.5mg/LKT + 1mg/LIAA ,生根培养基为 MS + 0.5mg/L NAA + 0.5mg/L 6-BA。刘志华等^[39]对罗布麻种子愈伤组织再生植株的研究报道 ,愈伤组织最适培养基为 MS + 6-BA2mg/L + NAA0.4mg/L; 幼苗分化培养基为: MS + 6-BA2mg/L + NAA0.2mg/L; 最适生根培养基为: MS + IBA0.5mg/L。

2 麻类作物遗传转化研究进展

植物遗传转化方法有很多种 ,包括农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法、茎尖转化法等 ,目前应用最广泛的转化方法为农杆菌介导法和基因枪法。

2.1 农杆菌介导法

熊和平^[10]总结了 Yong 等用根癌农杆菌法将 *Npt II* 和 *GUS* 两个目的基因导入红麻品种 EV41 和 EV71 ,获得了转基因植株; 藏巩固等以红麻 7804、KB11 等为材料 ,采用农杆菌介导法将 *BT*、几丁质酶 - 葡聚糖酶双价基因导入红麻。Srivatanakul 等^[40]对增强红麻 T-DNA 区表达的参数进行了研究 ,结果表明最佳农杆菌菌株为 LBA4404 ,T-DNA 区最适表达温度为 28℃ 或 25℃ ,带毒性区 *virG/virE* 以及添加 TDZ 可提高顶芽的存活率 ,农杆菌共培养时 AS 的最适浓度为 200μmol/L。Herath 等^[41]同样对影响红麻 T-DNA 区整合与表达的因子进行了研究 ,结果表明 ,用带愈伤的外植体进行转化可以增强 *GUS* 基因的瞬时表达 ,增加预培养时间可以使 *GUS* 基因的瞬时表达量增加到一个阈值 ,而 *GUS* 基因的瞬时表达与其固定的表达并无直接的联系。在苎麻遗传转化的研究中 ,张福泉等^[42]已相继采用 C58C1 (pBz6111) 根癌农杆菌 ,将异戊烯基转移酶基因 *4·Kmr* 导入苎麻品种湘苎三号的叶细胞; 陈建荣等^[43]采用 RT-PCR 的方法克隆烟草木质素合成关键酶咖啡酰甲基转移酶 (*CCoAOMT*) 基因 ,并构建 *CoAOMT* 基因反义表达载体 ,通过农杆菌介导法对苎麻进行遗传转化 ,得到转基因植株; 易自力等^[44]用含 *publm* 质粒的农杆菌 LBA4404 和 EHA105 菌株 ,已将抗虫基因转导到苎麻基因组中; 马雄凤等^[45]用含 pGV1040 质粒的根癌农杆菌 EHA101 导入一个和蛋白质相关联的基因; 孔华等^[34]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^[46]用含绿色荧光报告基因的农杆菌 EHA105 菌株侵染子叶 ,已将外源基因整合到苎麻基因组中; Wang 等^[47]还对农杆菌的密

度、AS、共培养温度、共培养时间、共培养光照以及 pH 等影响苧麻遗传转化的相关因子进行了研究。结果表明,农杆菌 OD 值为 0.5 ~ 0.8、AS 浓度为 50mg/L、培养温度为 20℃、共培养时间为 3d、pH5.9 是苧麻遗传转化的最适条件;符家平等^[48]通过 PCR 和 Southern 杂交等分子检测,验证了转 *Bt* 基因的苧麻在后代中的稳定遗传,且转化植株的抗虫性明显强于转基因植株;马雄凤等^[49]利用农杆菌将人工合成的 *CryIA* 和 *CpTI* 双价抗虫基因转入中苧 1 号中,且通过 Southern 杂交验证外源基因已整合到植株中。剑麻遗传转化的研究中,丁静等^[50]通过冻融法用携带红掌漆酶基因 *Lac* 的农杆菌转化剑麻,通过 PCR 验证得到 *Lac* 整合到了剑麻植株中。在亚麻的遗传转化研究上,王毓美等^[51]利用根癌农杆菌介导将几丁质酶基因转入亚麻中;王玉福等^[52]将抗除草剂的 *bar* 基因以及 *GUS-INT* 基因转入亚麻植株中;姬妍茹等^[53]研究了几种抗生素及 AgNO_3 的抑菌效果和对纤维亚麻下胚轴不定芽分化率的影响,结果显示亚麻品种双亚 5 号、双亚 7 号和双亚 10 号的最佳抑菌剂为 300mg/L 的头孢曲松钠;李博等^[54]将抗除草剂草甘膦基因 *EPSP* 转入亚麻,通过潮霉素筛选、PCR 验证外源基因整合到亚麻植株中。

2.2 基因枪介导法

熊和平^[10]总结了 Yong 等利用基因枪将 *Npt II* 和 *GUS* 转化到红麻 EV41 与 EV71 叶片中,再将叶片于培养基 MS + TDZ 0.3 ~ 0.5mg/L + NAA 0.1mg/L 上培养,两个红麻品种均获得阳性植株。宫本贺等^[55]利用基因枪法轰击苧麻子叶愈伤组织,将双价抗虫基因 *CryIA* 和 *CpTI* 导入苧麻中。

2.3 花粉管通道法

曹德菊等^[56]将含有外源抗除草剂的 *bar* 基因的质粒 PWYX,通过子房注射法和柱头滴加法转导红麻,田间 PPT 筛选获得红麻阳性转化植株,PPT 的有效筛选浓度为 70mg/L,而子房注射法明显优于柱头滴加法。后期通过 PCR 以及 Southern 杂交,验证外源基因已转入红麻植株中^[57]。祁建民等^[58]将含 *Bt* 基因的质粒 pCAMBI3300-*Bt* 同样通过子房注射法和柱头滴加法,将外源 *Bt* 基因转入红麻品种福红 952,通过 PCR 和 Southern 杂交,已检测到外源基因整合到红麻植株中并获得稳定遗传。吴建梅等^[59]将大米草耐盐基因 *SaNHX* 通过花粉管通道法转入红麻植株,并通过对 T1 红麻转化植株的室内、室外耐盐性观察以及 PCR 检测,初步检测到 *SaNHX* 整合到红麻植株中。熊和平^[10]总结了金关荣用柱头

滴加法将几丁质酶基因和 *Basta* 抗性基因导入浙江萧红麻 1 号中。而其他麻类作物关于花粉管通道法的遗传转化方面的研究较少。

2.4 茎尖转化法

Kojima 等^[60]用含双元载体 pBI-res 的农杆菌 LBA4404 以及 M-21 突变体感染红麻植株的顶端分生组织及腋芽,得到的阳性转化植株比对照红麻植株的茎更粗,植株更高。

此外,王时豪等^[61]对红麻田间除草剂浓度进行了筛选,研究结果表明,48% 甲草胺乳油和 72% 异丙甲草胺乳油均可做为红麻田良好的除草剂,为红麻更安全地使用,除草剂提供了参考标准。李君等^[62]还对叶绿体转化法、碳化硅纤维介导法、超声波辅助的农杆菌转化法、真空渗入法、藻酸钙微珠介导法等转化方法的优缺点进行了比较研究,为不同作物提供了最适的遗传转化方法。

3 问题与展望

麻类作物组织培养起步相对较晚,滞后于其他农作物,而遗传转化的研究也处于初步阶段,虽然前期的研究取得了一些成绩,但是仍然存在许多问题有待进一步研究。应借鉴其他农作物的组织培养和遗传转化研究技术,有利于促进麻类作物组织培养及遗传转化技术体系的进一步完善。

3.1 花药组织培养高效体系的建立

花药组织培养为人工大量生产单倍体提供了有效的手段,通过这一途径再生的为单倍体植株,经自发加倍或人工诱发加倍,获得纯合可育的二倍体植株,使人们选择满意的基因组合,为进一步的育种和遗传研究提供有用材料。虽然麻类作物在花药培养的研究上有过一些报道,但是成效并不显著。迄今为止,麻类作物还没有建立起一种成熟高效的花药培养技术体系。已有的花药培养报道仅限于早期的一些尝试性研究,近年来这方面的工作没有受到重视,尚无新的研究成果报道。究其原因,是因为麻类作物花药培养有一定的难度,且没有建立一支稳定的从事花药组织培养的专业技术队伍,麻类作物花药培养高效技术体系的建立是一个亟待攻克的技术难关。所以,在日后的研究工作中应加以重视和扶持。

3.2 原生质体培养与种间细胞杂交

原生质体是细胞杂交的良好材料,也是实现种间细胞杂交的有效手段。目前,红麻原生质体培养只能得到愈伤组织,通过原生质体培养形成完整

植株较难,其技术体系尚未建立完善。我国红麻超高杂交育种取得了举世瞩目的成效,但纤维品质改良迄今成效甚微,建立完善成熟红麻原生质体培养技术体系,则可实现苧麻与红麻细胞杂交,将有效促进红麻纤维品质的提高,实现品质育种的突破。苧麻虽然通过原生质体培养获得了完整植株,但是其稳定性差,也尚未建立稳定高效的原生质体再生体系。剑麻原生质培养的研究中也只对其培养参数进行了探讨,并无完整的原生质体再生体系建立的报道。亚麻在原生质体培养的研究上取得了一定的成果,获得了完整的植株,但是这也受供试材料基因型的影响。总的来说,目前尚未建立起一套广泛适用于所有麻类作物的原生质体培养体系,需引起所有从事麻类作物研究工作的同行们的重视。

3.3 体细胞胚培养

通过体细胞胚培养形成的植株同步性较好、变异较小。此外,体细胞胚为遗传转化提供了良好的基础,它比叶盘法的转化效率高,变异相对较小且遗传稳定性较好。但是红麻体细胞胚培养的研究仍处于初步阶段,苧麻的体细胞培养仍存在成胚率低、后代多产生畸形苗多等问题,而在亚麻上的研究报道也较少。目前,几乎所有的麻类作物都没有研究出一套成熟有效的红麻体细胞胚培养技术体系,关于麻类组织培养的研究多半只是通过诱导愈伤组织分化出不定芽或直接通过外植体诱导不定芽的再生,而通过形成体细胞胚形成完整植株的研究甚少。可能是因为作物通过组培形成体细胞胚比较困难,而麻属于纤维作物,通过组培形成体细胞胚更显得困难。通过此途径建立的麻类再生体系是日后进行更深入的研究工作所必须具备的技术,所以也是麻类研究工作者必须解决的问题。

3.4 器官发生

通过体细胞直接产生不定芽是目前红麻组培较常使用的技术,但是该技术仍然不够成熟,红麻通过愈伤组织再生不定芽的研究相对较少,其周期长、愈伤组织分化率不高;而对不定芽分化使用的激素仍然存在许多分歧,且各研究结果实验重复性较差。红麻不定芽再生有待研究出一套体系成熟、重复性好、出芽率高的方法。苧麻组织培养研究需解决愈伤组织分化率低、易褐化、基因型间差异大等技术问题。亚麻组织培养存在随着继代次数增加,分化绿苗效率降低的问题,这是亚麻组织培养研究需进一步完善的关键技术^[63]。

3.5 遗传转化

遗传转化是获得优良新品种最有效的手段,但是麻类作物基因遗传转化育种的研究目前尚处初步,尚未在转基因育种上取得明显的突破,仍存在转化效率低、遗传稳定性差等问题。麻类作物遗传转化已有的研究中,红麻通过花粉管通道法以及茎尖感染法等已经实现了遗传转化,而通过农杆菌介导外源基因转化的研究较少。然而,通过农杆菌介导的遗传转化是作物转基因的主要途径,其效率也远高于花粉管通道法和茎尖感染法。所以,需要对通过农杆菌介导红麻遗传转化进行更深入的研究。苧麻、剑麻、亚麻关于农杆菌介导的遗传转化的研究取得了较好的成绩,其中又以苧麻的研究成果最为突出,其研究的方法以及相关因子值得借鉴。此外,基因枪介导的遗传转化也是实现植物转基因的有效手段,而一些新的遗传转化方法,如叶绿体转化法、碳化硅纤维介导法、超声波辅助的农杆菌转化法、真空渗入法、藻酸钙微珠介导法等,在麻类作物上的应用较少。因此,在以后的研究工作中,可以对这些新方法进行尝试,进而拓宽麻类作物遗传转化途径,建立一套完整、成熟、高效的再生体系,使麻类作物的转基因育种走向成熟。

参考文献

- [1] Zapata C, Srivatanakul M, Park S H, et al. Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1999, 56: 185-191
- [2] Srivatanakul M, Park S H, Sanders J R, et al. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 1165-1170
- [3] Ayadi R, Hamrouni L, Hanana M, et al. In vitro propagation and regeneration of an industrial plant kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) [J]. Indust Crop Product, 2011, 33(2): 474-480
- [4] 颜昌敬, 赵庆华. 组织培养应用于苧麻快速繁殖[J]. 上海农业学报, 1988, 4(S): 17-20
- [5] 陈建荣, 郭清泉. 苧麻新品种湘苧3号组织培养快速繁殖法[J]. 湖南农业科学, 1998(6): 18-19
- [6] 吕玲玲, 易克贤, 徐雪荣. H. 11648 麻高效再生体系的建立[J]. 中国麻业, 2006, 28(2): 79-83
- [7] 洪向平, 陈玉生, 黄麒参. 剑麻的组织培养快繁技术[J]. 广西热带农业, 2007(5): 29
- [8] 姬妍茹, 刘伟伟. 野生亚麻无性扩繁及保存技术的研究[J]. 中国麻业科学, 2008, 30(3): 301-304
- [9] 王伟光, 高亦珂. 花药培养的研究进展[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2005, 3(20): 280-284
- [10] 熊和平. 麻类作物学育种[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008
- [11] 陈祥云, 李树川. 黄麻花粉植株诱导的研究[J]. 中国麻作, 1985(3): 1-4
- [12] 刘国民. 苧麻花药和未授粉子房离体培养的研究[J]. 作物研究, 1994, 8(S): 93-94
- [13] 汪波, 彭定祥. 苧麻组织培养及遗传转化研究进展[J]. 中国麻业科学, 2007, 29(1): 9-14
- [14] 孙洪涛, 董丽辉, 付卫东, 等. 外源激素对亚麻花药、花瓣未受

- 粉子房去分化培养的作用[J]. 中国麻作, 1984(3): 41
- [15] 宋淑敏, 孙洪涛, 傅卫东, 等. 亚麻花药培养研究的进展[J]. 中国麻作, 1996, 18(4): 4-6
- [16] 牛英, 刘恒蔚, 周瑞阳, 等. 红麻下胚轴原生质体的分离与培养[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(2): 149-152
- [17] 王丽爽, 张宗申, 郑来久. 红麻原生质体分离条件的优化[J]. 大连工业大学学报, 2010, 29(4): 243-247
- [18] 王丽爽, 易继财, 张宗申. 亚麻与红麻的原生质体融合[J]. 广东农业科学, 2010(4): 191-193
- [19] 熊兴耀, 甘霖, 郑思乡, 等. 苕麻原生质体再生植株及影响因子的初步研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 147-152
- [20] 陈喜文. 苕麻组织培养和原生质体培养[J]. 作物研究, 1994, 8(S): 85-88
- [21] 陈喜文, 陈德富, 周朴华, 等. 苕麻子叶原生质体的分离和初步培养[J]. 湖南农学院学报, 1995, 21(2): 11-14
- [22] 陈喜文, 陈德富, 周朴华, 等. 苕麻原生质体培养及植株再生[J]. 植物学报, 1996, 38(2): 43-46
- [23] 陈喜文, 陈德富, 周朴华, 等. 苕麻悬浮细胞原生质体培养再生植株[J]. 作物学报, 1996, 22(1): 112-116
- [24] 李斌, 彭志英, 何琼英. 剑麻细胞悬浮培养诱导蛋白酶的研究[J]. 中国食品学报, 2001, 1(2): 5-8
- [25] 范志辉, 卫志明, 徐淑平, 等. 亚麻原生质体培养及植株再生[J]. 实验生物学报, 2000, 33(2): 163-168
- [26] 朱熹. 植物组织培养中的胚状体[J]. 遗传学报, 1978, 5(1): 79-86
- [27] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 II: 影响植物胚状体发生和发育的因素[J]. 植物生理学报, 1982(81): 91-96
- [28] 陈德富, 陈喜文, 周朴华, 等. 麻类愈伤组织多样性及体细胞胚胎发生的研究[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(3): 239-244
- [29] 陈德富, 陈喜文. 苕麻体细胞胚胎发生研究初报[J]. 植物学通报, 1998, 15(3): 65-68
- [30] 葛春辉, 计巧玲, 郭景霞, 等. 亚麻品种‘双亚5号’的胚性愈伤组织诱导和体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 235-239
- [31] 王克臣, 冷超, 李明. 亚麻离体再生体系的建立及优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7195-7199
- [32] 刘恒蔚, 牛英, 周瑞阳. 红麻子叶和真叶不定芽直接诱导的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(3): 245-248
- [33] Wang B, Peng D X, Sun Z X, et al. *In vitro* plant regeneration from seedling-derived explants of ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud][J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2008, 44: 105-111
- [34] 孔华, 郭安平, 章霄云, 等. 苕麻遗传转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2006, 4(2): 233-237
- [35] 伍旭东, 邢虎成, 揭雨成, 等. 苕麻叶片组织培养再生植株的研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 86-89
- [36] 陈伟, 徐立, 李克英, 等. 剑麻的组织培养和快速繁殖[J]. 热带农业科学, 2006, 6(26): 22-24
- [37] 陈鸿, 郑金龙, 徐立, 等. 剑麻叶片愈伤组织诱导及再生体系的建立[J]. 热带农业科学, 2008, 28(6): 11-14
- [38] 张志扬, 陈信波, 张瑜, 等. 亚麻组织培养高频不定芽诱导体系[J]. 植物学通报, 2007, 24(5): 629-635
- [39] 刘志华, 马艳红, 曹枫. 罗布麻种子组培再生体系研究[J]. 种子, 2010, 29(4): 5-8
- [40] Srivatanakul M, Park S H, Maria G S, et al. Transformation parameters enhancing T-DNA expression in kenaf (*Hibiscus cannabinus*) [J]. *J Plant Physiol*, 2001: 255-260
- [41] Herath S P, Suzuki T, Hattori K. Factors in fluencing *Agrobacterium* mediated genetic transformation of kenaf[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2005, 82: 201-206
- [42] 张福泉, 李宗道. 麻类作物遗传转化研究进展[J]. 湖南农业科学, 1999(5): 4-6
- [43] 陈建荣, 张学文, 郭清泉. *CCoAOMT* 基因反义表达载体的构建及转化苕麻的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2005, 28(1): 75-78
- [44] 易自立, 李祥, 蒋建雄, 等. 苕麻再生体系的建立及抗虫基因苕麻的获得[J]. 中国麻业, 2006, 28(2): 61-66
- [45] 马雄风, 喻春明, 唐守伟, 等. 苕麻组织培养和遗传转化研究进展[J]. 分子植物育种, 2008, 6(5): 967-970
- [46] 汪波, 彭定祥, 孙珍夏, 等. 根癌农杆菌介导苕麻转绿色荧光蛋白(GFP)基因植株再生[J]. 作物学报, 2007, 33(10): 1606-1610
- [47] Wang B, Liu L J, Wang X X, et al. Transgenic ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.]: factors affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration[J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 1319-1327
- [48] 符家平, 汪波, 刘立军, 等. 根癌农杆菌介导转 *Bt* 基因苕麻的获得及其抗虫鉴定[J]. 作物学报, 2009, 35(10): 1771-1777
- [49] 马雄风, 喻春明, 唐守伟, 等. 根癌农杆菌介导的转双价抗虫基因(*CryIA + CpTI*)苕麻[J]. 作物学报, 2010, 36(5): 788-793
- [50] 丁静, 徐立, 杜中军, 等. 红掌漆酶基因 *Lac* 的表达载体构建与剑麻转化[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 46-50
- [51] 王毓美, 徐云远, 贾敬芬. 亚麻遗传转化体系的建立及几丁质酶基因导入的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 346-351
- [52] 王玉福, 周思君, 刘燕, 等. 亚麻转基因植株的再生及生根培养的研究[J]. 中国麻作, 2000, 22(3): 25-27
- [53] 姬妍茹, 刘伟伟, 关向军, 等. 农杆菌菌株 *AGL1* 抑菌剂的抑菌效果及其对纤维亚麻下胚轴不定芽分化率的影响[J]. 中国麻业科学, 2008, 30(5): 252-255
- [54] 李博, 黄丽华, 蒋向, 等. 苕白 *EPSP* 基因对亚麻的转化及检测[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(1): 12-16
- [55] 宫本贺, 熊和平, 马雄风. 基因枪介导法转化苕麻获得转基因植株的研究[J]. 作物杂志, 2010(1): 87-90
- [56] 曹德菊, 程备久, 徐明照, 等. 花粉管法将外源除草剂基因导入红麻的有效方法及参数研究[J]. 中国麻作, 2000, 22(1): 1-5
- [57] 曹德菊, 程备久, 林毅. 抗除草剂转基因红麻的分子验证[J]. 中国麻业, 2001, 23(3): 1-4
- [58] 祁建民, 徐建堂, 林荔辉. 转 *Bt* 基因抗虫红麻福红 952 后代的分子杂交验证[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2008, 1(37): 77-79
- [59] 吴建梅, 姚运法, 林荔辉. *SaNHX* 耐盐基因转化红麻 T1 代的耐盐性初步鉴定[J]. 中国麻业科学, 2010, 32(1): 31-32
- [60] Kojima M, Shioiri H, Nogawa M. In Planta transformation of kenaf plants (*Hibiscus cannabinus* var. *aokawa* No. 3) by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Biosci Bioengineering*, 2004, 98(2): 136-139
- [61] 王时豪, 高必达. 红麻田间除草剂筛选试验[J]. 现代农业科技, 2010(20): 183-186
- [62] 李君, 李岩, 刘德虎. 植物遗传转化的替代方法及研究进展[J]. 生物技术通报, 2011, 7: 31-36
- [63] 曹雅琴, 郭清泉, 刘峰. 麻类作物组织培养研究进展[J]. 作物研究, 2005, 21(5): 679-684