

亚麻种质创新的研究现状

杨学¹,关凤芝¹,李柱刚²,吴广文¹,路颖¹,陈浩¹,王珣²

(1. 黑龙江省农业科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;2. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所/黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:分别对细胞工程、基因工程在亚麻种质创新方面的研究进展及取得的成果进行了综述,并对存在的问题及今后的发展方向进行了探讨,以期为相关研究提供参考。

关键词:亚麻;生物技术;种质创新

中图分类号:S563.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)03-0008-04

种质创新的主要目的是增加种质资源的遗传多样性,种质创新早在1万年前开始有选择地驯化植物时,就已无意识地开始了。近百年来,由于遗传学和农艺学的飞速发展,种质创新工作成为创造新类型、新材料的育种工作。20世纪80年代初,我国首次提出“种质创新”这一概念,并逐渐引起全世界人们的重视。

种质创新,一是指对种质做较大程度的改造。如通过远缘杂交进行基因导入,利用基因突变形成具有特殊基因源的材料,综合不同类型的多个优良性状而进行聚合杂交;二是除包含上述含义外,应包括种质拓展。将具有较多的优良性状如高产和优质结合起来。种质改进指改进种质的某一性状,从而将创造的新作物、新品种、新类型、新材料,提供给育种家和遗传学家使用,这是作物遗传育种发展的基础和保证。

亚麻种质创新工作是从20世纪60年代开始的,大多采用系统育种、杂交育种和⁶⁰Co-γ射线照射种子产生突变创造新类型的方法。

1 突变体的诱变

1.1 辐射诱变育种

辐射诱变育种是目前国内外常用的一种人工诱变的育种方法,我国的辐射育种从1956年开始,它是利用X射线、γ射线、β射线和热中子等照射亚麻的种子、植株或花粉,诱发基因突变,扩大变异幅度,辐射能使亚麻在熟期、株高、出麻率

及产量等方面的基因突变率提高5~6倍,改变品种某一不良性状,育成具有突出优良性状的新品种等方面,具有明显的效果。采取辐射与杂交相结合的方法育种效果较好,辐射可以使染色体断裂,打破基因的连锁,再通过基因重组产生新的变异类型。杂交可以综合双亲的优点,使某些有益的经济性状通过基因重组、累加而加强。用这2种育种方法交替进行,能克服单一育种方法的缺点,选育出具有综合性状好的新品种^[1]。

辐射育种材料的选择是辐射育种的基础,要根据育种目标的要求,有针对性地选择综合性状较好、优点多的品种或品系,通过人工诱变,改变其1~2个不良性状,通过培育选择后,可以获得所需要的材料。特别是从国外引入材料及杂交后代材料,其遗传结构和遗传基础并不十分稳定,通过⁶⁰Co-γ射线照射,进行人工诱变及“单点突变”,能获得所需要的材料。

⁶⁰Co-γ射线对亚麻花药愈伤组织诱导率及绿苗分化率也有促进作用。由于基因型的不同,花药愈伤组织的诱导率存在一定的差异。对于花药愈伤组织诱导率低的基因型可用低剂量⁶⁰Co-γ射线辐射花药的方法来提高其愈伤组织的诱导率。⁶⁰Co-γ射线辐射花药的适宜剂量为30 Gy,加大剂量虽然可以提高突变率,但绿苗分化率急剧下降,从而也相对降低了选择机率。应用花药培养与辐射诱变相结合,在培养过程中添加选择剂可定向筛选突变体,进一步提高了诱变的方向性和准确性。

亚麻用⁶⁰Co-γ射线照射种子的适宜剂量是200~500 Gy。低于100 Gy,亚麻几乎不发生变异。超过800 Gy亚麻死亡率过高(80%以上),影响辐射效果。辐射能使亚麻在熟期、株高、出麻率

收稿日期:2010-12-20

第一作者简介:杨学(1969-),男,黑龙江省庆安县人,学士,副研究员,从事亚麻植保和抗病育种研究。E-mail:yxflax@126.com。

通讯作者:李柱刚(1972-),男,黑龙江省庆安县人,博士,研究员,从事作物遗传育种研究。E-mail:yxflax@126.com。

及产量等方面的基因突变率提高 5~6 倍,在改变品种某一不良性状,育成具有突出优良性状的新品种方面具有明显的效果。例如黑龙江省农业科学院经济作物研究所,以火炬×瑞士 10 号的杂交后代优良株系 6104-295 为材料,用⁶⁰Co- γ 射线 200 Gy 处理种子, M₃ 代选育出优良突变系 γ 67-1-681, 又以其为母本与常规优系 6409-640 再次杂交选育成功了黑亚 4 号, 该品种抗盐碱、丰产性突出, 原茎产量达 8 241.0 kg·hm⁻², 推广面积达 2 万 hm²。利用此法选育出高纤、优质的黑亚 6 号、黑亚 7 号、内纤亚 1 号等在株高、原茎、种子、长麻率、抗逆性等方面有突出特点的亚麻新品种。

1.2 化学诱变育种

我国化学诱变育种起步于 20 世纪 50 年代后期, 经过 40 a 的发展取得了令世人瞩目的成就, 诱变育成的品种数量和种植面积居世界首位。化学诱变因操作方法简便、专一性强、突变频率高和育种时间短等特点而被亚麻育种家们广泛的运用^[2]。

甲烷磺酸二酯(EMS)对亚麻具有较好的诱变效果, 诱导突变率取决于 EMS 的浓度和品种的基因型。高浓度(0.4%~0.5%)时, 突变率高, 但是有益突变较少; 低浓度(0.1%)或中等浓度(0.2%~0.3%)时出现有益突变较多。其处理方法是先将亚麻种子浸泡在溶液中 24 h, 然后用清水冲洗, 洗净后直接播种或干燥 2 d 再播种。此方法对获得高纤维含量及高千粒重的突变比较有效。

此外亚硝基烷基脒、次乙亚胺、抗菌素、秋水仙碱、氮离子注射等对亚麻也具有诱变作用。其中亚硝基烷基脒、次乙亚胺、氮离子注射等可诱导产生多种突变, 秋水仙碱可以诱导产生多倍体, 抗菌素可诱导产生不育性状。

抗生素可诱导亚麻雄性不育, 但不同种类抗生素的诱导频率有明显差异, 链霉素、青霉素、利福平、红霉素、四环素都有一定效果, 其中利福平的诱变频率最高, 红霉素的诱变频率最低。诱导频率同时受品种基因型的影响。诱导产生的不育株的性状与原品种基本一致。不育株的花冠大小和颜色与可育株相似, 花瓣能够正常展开, 花药瘦小, 淡黄色, 在显微镜下观察呈半透明状, 部分不育株可以稳定遗传。

2 单倍体育种

自 20 世纪 60 年代起, 利用曼陀罗花药人工培养出大量的单倍体植株以来, 全球育种家已在水稻、小麦、亚麻、油菜等几十种重要作物上获得了单倍体植株, 为其杂交育种做出了巨大的贡献。我国自 20 世纪 70 年代开始进行单倍体育种研究, 获得的单倍体种的数量居全球第一位^[3]。

亚麻单倍体育种是将杂种 F₁~F₂ 花药进行培养, 诱导其雄配子发育为单倍体, 单倍体加倍产生纯合二倍体, 然后选择培育亚麻新品种。它减少了杂种后代的分离, 可缩短育种年限, 同时还可排除大量杂合体对后代选择的干扰, 提高选择效率。

我国对亚麻花药培养始于 20 世纪 70 年代, 黑龙江省甜菜研究所从 1976 年开始进行亚麻单倍体育种研究, 已获得较大进展, 成功地把亚麻花粉粒离体培养, 诱导出愈伤组织, 并分化出幼苗。此后, 黑龙江省农业科学院经济作物研究所于 1980 年获得花粉植株 22 株, 并进行了花粉移栽、加倍获得成功。黑龙江省亚麻原料工业研究所(现改名为黑龙江省科学院亚麻综合利用研究所), 从 1975 年进行亚麻单倍体育种研究工作, 1979 已获得了亚麻花粉植株, 初步完成了花粉植株移栽、加倍及其后代 H₂ 的鉴定工作。正确掌握花粉发育最适时期培养, 是花药培养成败的关键。20 世纪 80 年代末获得了亚麻茎尖、子叶和下胚轴再生植株, 并相继开展了亚麻单倍体育种, 用单倍体技术育成了亚麻新品系, 2008 年用单倍体技术育成双亚 13 亚麻新品种^[4-7]。

3 亚麻外源 DNA 导入

外源 DNA 直接导入技术是我国自主创新发明的分子育种技术。1974 年, 中国科学院上海生物化学研究所周光宇先生提出并设计了授粉后外源 DNA 导入技术, 即将供体总 DNA 的片段于授粉后一定时期导入受体, 外源 DNA 沿着花粉管渗入, 经过珠心通道进入胚囊, 转化合子或早期胚胎细胞, 该方法可用于任何开花植物。周光宇在对吉林省李贞生培育的玉米稻进行调查分析后, 从分子学的角度提出了 DNA 片段杂交的假说, 随后与江苏省农业科学院黄骏麟等在棉花上和中国农业科学院陈善葆等在水稻上设计模拟了远缘杂交进行 DNA 导入植物的花粉管通道路线, 确

定了具体的外源 DNA 导入技术,开始了大田农作物育种应用工作。黑龙江省农业科学院经济作物研究所于 1993 年首次在亚麻上利用了开花植物授粉后形成的花粉管道直接导入外源 DNA 以实现某些目的基因转移的生物工程技术,并进行亚麻植株总 DNA 的提取研究,得到了符合分子育种所要求的 DNA 纯度、浓度及片段长度,同时对外源 DNA 导入后代进行了过氧化物酶同工酶分析和导入后代各世代的花色、熟期、种皮颜色、抗倒伏性观察及株高、工艺长、分枝数、蒴果数、单株茎重、单株纤维重、麻率等性状的变异系数及遗传力分析。利用此项技术,黑龙江省农业科学院经济作物研究所采用柱头基部切割滴注法以法国品种范妮(FANY)为供体,黑亚 10 号为受体育成了黑亚 14,产量性状超过其受体亲本和当前的主栽品种。该项技术作为亚麻品种改良、新品种培育的一种有效手段,在亚麻育种工作中将具有更广阔的应用前景^[8-9]。

4 亚麻分子标记辅助选择育种

到目前为止,分子标记在亚麻中的应用较少。Chen Y 等人利用分子标记鉴定了花培时小孢子形成的植株。用 2 个显性 ISSR 标记和 3 个显性 RAPD 标记,证明来源于 ACMcDuf/AC Emerson F₁ 杂交种的不同花药形成的植株中共有 103 个植株是由小孢子发育形成的。根据 PCP/RFLP 共显性标记的 L6 或 L9 等位基因诊断片段的出现,鉴定出 AC Emerson/McGregor F₁ 杂交的不同愈伤组织形成的植株中共有 311 株是由小孢子发育形成的。Khadhir 等对 R16(1)/F1/R1 进行 RFLP 分析,表明在被感染的亚麻中有紫菀黄化病原生质体的存在,这是亚麻紫菀黄化病原生质体的首次报道。高风云等人采用 RAPD 技术对亚麻显性雄性核不育基因进行了分子标记的初步研究,并得到了 2 个与其相关的标记。

同时,分子标记也被应用到亚麻种质资源的研究中。如加拿大的 Fu Y B 等人用 RAPD 分子标记对加拿大植物基因资源中 2 800 个亚麻品种进行分子特征的分析研究。Treuren 等又用 AFLP 技术对亚麻种质资源进行了分析比较。邓欣等人利用 25 个随机引物对 10 种来自不同国家和地区亚麻品种的遗传多样性进行 RAPD 分析。

早在 1991 年, Hausner G 等就通过使用

CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence, 酶切扩增多态性序列)标记技术成功地对亚麻抗锈病基因 M3 进行了标记。利用抗病基因的保守性获得的分子标记很可能与筛选定位的新基因共分离这一特点,可以在各式基因文库中筛选适宜的克隆。Anderson 等用转座子标记技术克隆亚麻中抗锈病(*Melampsora lini*)基因 M 时,就使用了从 L6 基因衍生的 DNA 序列作探针。若根据已克隆抗病基因的完整序列设计引物,还可能从含新抗病基因的作物中通过 PCR 扩增直接克隆到该抗病基因。若在 PCR 引物中附加酶切点,扩增的含抗病基因的 DNA 序列经酶切后,可以直接克隆到质粒或 M13 噬菌体载体中。随后在 1999 年, Hausner G 等人以 RFLP 标记技术为手段对亚麻抗锈病基因 L2、L6、L11 进行了标记。在国内,薄天岳等人也对亚麻抗锈病基因进行了分子标记,用 520 个 10 碱基随机引物对含有亚麻抗锈病基因 M4 的近等基因系材料 NM4 及其轮回亲本 Bison 进行 RAPD 分析,其中 OPA18 引物在 NM4 材料中稳定地扩增出特异的 DNA 片段,并将 OPA18₄₃₂ 片段回收、克隆和测序,成功地将其转化为 SCAR 标记。对不同抗源材料的扩增分析表明,该标记是 M4 基因的特异标记,目前这一标记已成功地应用于亚麻抗锈病基因 M4 的分子标记辅助选择育种中^[10]。

目前亚麻分子遗传图谱还不完善,只建立了包含 13 个 RFLP 和 80 个 RAPD 标记的连锁群。W Spielmeyer 等人利用 AFLP 标记技术,以双单倍体系(DH)为材料构建亚麻遗传连锁图谱,并用于识别独立连锁组上对抗枯萎病有较大影响的 2 个数量性状基因位点(QTLs)。2003 年薄天岳等人用高抗枯萎病亚麻品种晋亚 7 号与高感枯萎病品种晋亚 1 号配制杂交组合,接种鉴定其正反交 F₁ 代以及 F₂ 代分离群体的枯萎病发生情况,结果表明,晋亚 7 号对枯萎病的抗性属于细胞核遗传,受 2 个显性基因控制。用 48 个 EcoRI/MseI 引物组合对晋亚 7 号和晋亚 1 号 2 个亲本及其 F₂ 代抗病和感病基因池进行 AFLP 分析,共扩增出约 3 300 条可分辨的带,其中 3 条为稳定的差异。用晋亚 7 号和晋亚 1 号杂交产生的 F₂ 代分离群体对 3 个特异条带与目的基因的遗传连锁性进行分析,发现特异条带 AG/CAG 与暂定名为 FuJ7(t)的抗枯萎病基因紧密连锁,二者之间的

遗传距离为 5.2 cM。将 AG/CAG 片段回收、克隆和测序,成功地将其转化为 SCAR 标记,可以更加方便地用于对 *FuJ7(t)* 基因的分子检测和标记辅助选择^[11]。

2007 年杨学等人以亚麻抗白粉病材料 9801-1 与感病品种 ILONA、VENUS 和 DIANE 为试验材料,配制正反杂交组合,获得了 F₁ 代和 F₂ 代分离群体,通过调查各世代白粉病发生情况,证实了亚麻材料 9801-1 对白粉病的抗性属于显性单基因细胞核遗传。建立了适合亚麻基因组 DNA RAPD 反应最佳体系 (25 μ L), 组成包括: 3.5 U TaqDNA 聚合酶, 10 \times buffer 2.5 μ L, 1 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 250 μ mol \cdot L⁻¹ dNTPs, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ random primer, 100 ng 模板 DNA; 优化后反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。利用 240 个随机引物, 以 9801-1 和 DIANE 杂交得到 F₂ 代分离群体构建的 DNA 混合池为模板进行 RAPD 分析。203 个引物能扩增出条带, 37 个引物无扩增条带, 占总数的 15.4%。203 个引物在混合池中共扩增出 1 201 条带, 平均每个引物扩增出 5.9 条带。203 个引物中, 经过 3 轮的筛选, 结果只有 OPP02 引物能在亲本和抗感混合池间扩增出稳定的多态性, 即在抗病亲本和抗病池间显示出 792 bp 大小的特异扩增带, 命名为 OPP02₇₉₂。进一步扩大群体分析, 表明该标记与抗白粉病基因共分离。回收扩增出的特异片段 OPP02₇₉₂, 将回收片段与

pMD18-T Vector 质粒载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。挑取白色菌斑提取重组质粒 DNA, 经过菌落 PCR 检测和重组质粒 DNA 双酶切电泳证明特异性片段 OPP02₇₉₂ 已成功转化入大肠杆菌。用得到的新鲜菌液测序, 得到该片段的序列, 为今后将其转化为稳定的 SCAR 标记奠定了基础, 以便更加准确地用于对亚麻抗白粉病基因的分子检测和辅助选择^[12]。

参考文献:

- [1] 宋淑敏, 田玉杰, 姬妍茹, 等. γ 射线辐射亚麻花药的研究初报[J]. 中国麻业, 2004, 26(4): 162-163, 176.
- [2] 李卫琼, 李世峰, 李涵. 生物技术在花卉种质创新中的研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2010, 25(1): 118-122.
- [3] 刘燕. 多胚性亚麻种子的单倍体育种技术[J]. 中国麻作, 1999, 21(3): 19-20.
- [4] 宋淑敏, 田玉杰, 苑志辉, 等. 亚麻花粉愈伤组织低温保存研究初报[J]. 中国麻业, 2002, 24(4): 11-13.
- [5] 吴昌斌, 孙洪涛, 宋淑敏, 等. 亚麻子房离体受精研究初报[J]. 中国麻作, 1997, 19(2): 16-17.
- [6] 苑志辉, 孙洪涛, 吴昌斌, 等. 亚麻体细胞无性系的建立及其植株再生[J]. 中国麻作, 1997, 19(1): 17-18, 32.
- [7] 姬妍茹, 田玉杰, 苑志辉, 等. 用组织培养法繁殖野生亚麻的研究[J]. 中国麻业, 2001, 23(4): 8-11.
- [8] 雷勃钧. 外源 DNA 直接导入农作物分子育种[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2008.
- [9] 杨学. 亚麻学[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2009.
- [10] 薄天岳, 叶华智, 王世全, 等. 亚麻抗锈病基因 M4 的特异分子标记[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 922-927.
- [11] 薄天岳, 叶华智, 李晓兵, 等. 亚麻抗枯萎病基因 *FuJ7(t)* 的分子标记[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 287-291.
- [12] 杨学, 赵云, 关凤芝, 等. 亚麻品系 9801-1 对白粉病的抗性遗传分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(6): 656-658.

Advances in Research of Flax Germplasm Innovation

YANG Xue¹, GUAN Feng-zhi¹, LI Zhu-gang², WU Guang-wen¹, LU Ying¹, CHEN Hao¹, WANG Xun²

(1. Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Biotechnology Research Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Heilongjiang Key Laboratory of Molecular Breeding of Crop and Livestock, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The advances and research on cell engineering and genetic engineering of flax germplasm innovation were reviewed. The existing problems and the directions of development in the future were also discussed to provide a reference.

Key words: flax; biotechnology; germplasm innovation