植物遗传资源学报 2010,11(4):428-432
Journal of Plant Genetic Resources

库存和圃存对雀麦属种质遗传完整性的影响

游国卿[1],石凤翎[1],卢新雄[2],李志勇[3],师文贵[3]

([1]内蒙古农业大学生态环境学院,呼和浩特 010019;[2]中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室,北京 100081;[3]中国农业科学院草原研究所,呼和浩特 010010)

摘要:利用20条ISSR引物,对7份雀麦属种质进行遗传完整性检测,每一份种质包括库存和圃存两个供试亚群体。提取方法为混合取样。本试验7份种质的供试亚群体之间遗传相似性系数除无芒雀麦3为0.78之外,其余均大于0.80。采用聚类分析除无芒雀麦3和杂色雀麦出现分支外,其余种质亚群体分支都按照同一种质群分别聚类。本试验表明雀麦属种质资源在圃存条件下,经多年保存易发生遗传分化,从而影响其遗传完整性。

关键词:雀麦属种质;遗传完整性;保存

Genetic Integrity Analysis of *Bromus* Accessions by ISSR

YOU Guo-qing[1], SHI Feng-ling[1], LU Xin-xiong[2], LI Zhi-yong[3], SHI Wen-gui[3]

(*[1]College of Ecology and Envirnment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019; [2]Key Laboratory of Crop Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agriculture/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; [3]Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010019*)

Abstract: The genetic integrity of 7 accessions of *Bromus* stored in genebank of Inner Mongolia investigated by 20 ISSR primers. Each accession was represented by two sub-populations regenerated in different conservation. The genetic similarity between the two sub-populations of the same accession was above 0.80, except for 0.78 in Wumangquemai 3. Cluster analysis based on the similarity coefficient showed that Wumangquemai 3 and Zasequemai diverged from each other, falling into two branches, and each one cluster was created by two sub-populations of the same accessions. The results showed that the *Bromus* stored outside had much more genetic divergence.

Key words: *Bromus*; Genetic integrity; Conservation

目前牧草种质资源主要保存方式是种质圃保存和种质库保存,这两种传统的保存方式便于长期保存,在完整地保存某物种所有的多样性等方面有着不可替代的重要性。种质圃具有保存相对稳定、效率高、花费少等优点,但是不可避免受到环境的影响。同时,繁种群体大小、授粉方式和种子收获方式等因素会影响遗传完整性的变化。库存不容易受到外界环境的影响,保存稳定,但是相对圃存花费大,耗费能源多,不利于节约[1-2],而且库存保存一定年限后不可避免要进行繁种更新,因此库存和圃存要相互补充,缺一不可。

对于保存相同年限的种质,采用何种保存方式对其遗传完整性影响最小这一问题越来越受到人们的关注。因此对比研究库存和圃存对遗传完整性的影响有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

7份雀麦属材料(表1),每一份都有两个供试亚群体。一个亚群体来自中国农科院草原所种质

收稿日期:2009-04-28　**修回日期**:2009-12-14

基金项目:农作物基因资源安全保存评价关键技术研究(2006BAD13B10-08);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(中国农业科学院草原研究所)(2006-1-06);内蒙古科技厅草业专项(20071923)

作者简介:游国卿,硕士研究生。E-mail:youyu1014@126.com

通讯作者:石凤翎,教授。E-mail:sfl0000@126.com

万方数据

库,另一个亚群体来自中国农科院草原所种质圃。来源于种质圃的叶片,每 5 株按比例混合为一份供试材料。对于种质库的种子将其置于 25℃ 黑暗条件下发芽,培育 15d 后得到黄化苗,每 15 株为一个混合样本。

供试种子入库时间为 2004 年,同年将该种子播入种质圃中。

表 1　试验材料

Table 1　The materials used in this study

圃存编号 Number of nursery	库存编号 Number of genebank	种质名称 Name	学名 Latin name
1	2	无芒雀麦 1	*B. inermis* Leyss.
3	4	疏花雀麦 1	*B. remotiflorum* (Stend.) Ohwi
5	6	无芒雀麦 2	*B. inermis* Leyss.
7	8	杂色雀麦	*B. variegates*
9	10	草甸雀麦	*B. bieberstenni*
11	12	无芒雀麦 3	*B. inermis* Leyss.
13	14	疏花雀麦 2	*B. remotiflorum* (Stend.) Ohwi

1.2　方法

1.2.1　DNA 的提取　取幼嫩的材料在液氮中研磨,采用俞金荣[3]改良 CTAB 法提取,略有改进。用 Unico UV-4802 型分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,DNA 的工作浓度为 20ng/μl。

1.2.2　引物筛选　从小麦族中选取 24 条 ISSR 引物,从中筛出 20 条条带清晰、多态性高、重复性好的引物用于扩增所有样品。

1.3　PCR 分析

PCR 总反应体积 20μl。优化的 20μl 扩增体系为:模板 DNA 40ng,引物 10μmol/L,*Taq*DNA 聚合酶 0.5U/μl,dNTP 0.3mmol/L。扩增程序为经 94℃ 预变性 5min;45 个循环为 94℃ 变性 45s,50 ~ 56℃ 退火 60s,72℃ 延伸 90s;最后 1 个循环完成后,在 72℃ 下延伸 7min。

1.4　电泳和银染

扩增产物加 5μl 上样缓冲液(loading buffer)于 95℃ 变性 5 min 后冰浴冷却待用。采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶,预电泳 30min 后上样 3μl。电泳缓冲液上槽为 1/3 × TBE,下槽为 1/2 × TBE,恒功率 80W。电泳 1.5h 左右,硝酸银染色。胶晾干后观察记录,数码相机照相。

1.5　数据处理

每个样品的电泳条带按有或无记录,电泳条带存在时赋值 1,否则赋值 0。根据条带计算遗传相似系数(*GS*),按 Jaccard 系数的方法计算 GS:$GS = X_{12}/(X_1 + X_2 + X_{12})$,其中 X_1 和 X_2 分别为成对比较的两个取材部位特有扩增条带数,X_{12} 为共有带数。聚类分析按照 UPGMA 方法进行,所有数据处理均由 NT-SYS-PC2.02 和 Excel 完成。

2　结果与分析

2.1　库存种子材料发芽情况

将库存 4 年的种子材料,置于 25℃、光照条件下,发芽 15d(表 2)。由此可见在低温库中,贮藏 4 年仍获得 90% 以上的高发芽率。

表 2　试验材料发芽情况

Table 2　The germination status of the materials

种质名称 Name	发芽率(%) Germination rate	发芽势(%) Germination energy	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index
无芒雀麦 1	96	92	15.75	3.83
无芒雀麦 2	95	91	15.75	3.80
无芒雀麦 3	96	91	15.70	3.85
疏花雀麦 1	92	89	14.98	3.94
疏花雀麦 2	90	89	14.80	3.94
杂色雀麦	93	90	15.60	3.66
草甸雀麦	90	91	15.00	3.76

2.2　ISSR 标记和遗传相似性分析

20 条引物在 14 份材料中共检测到 150 个等位基因,每个 ISSR 上等位基因的个数为 4 ~ 9 个,平均为 7.5 个(图 1)。在检测到的 150 个等位基因中分别检测到另一种保存方式所没有的等位基因。其中来自圃存特有等位基因的数目 4 ~ 14 个,平均为 8.3 个;来自库存特有等位基因的数目为 4 ~ 26 个,平均为 9.7 个(表 3)。由此结果可以说明,同样的种质资源采用库存和圃存两种不同的保存方式,经过一定年限的保存,圃存会导致一些遗传片段的丢失,而库存过程中遗传片段丢失的基因片段很少,因此造成库存和圃存在分子标记上的差异。

根据 ISSR 多态性数据,计算每一份材料的遗传相似性系数(表 3),其变化范围在 0.78 ~ 0.93 之间,平均为 0.87。其中无芒雀麦 3 种质资源库存和圃存两个亚群体的遗传相似性系数为 0.78 在各供试材料中最低,这说明无芒雀麦 3 的遗传物质稳定性较差,更容易受到外界环境的不良影响,从而导致遗传物质的丢失。而疏花雀麦 1 和无芒雀麦 2 的遗传相似性系数均为 0.93,远远高于平均值。由此说明疏花雀麦 1 和无芒雀麦 2 的遗传物质稳定,不易丢失。

万方数据

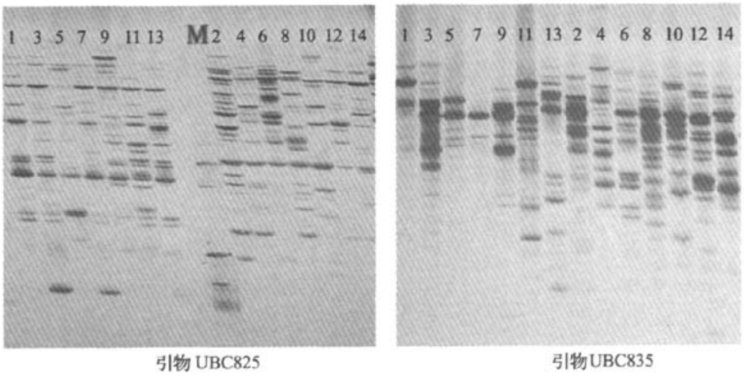

图1 引物UBC825和UBC835的电泳图谱

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of primers UBC825 and UBC835

1～14:库(圃)存编号

表3 14份供试材料ISSR数据分析结果

Table 3 Analysis of data

种质名称 Name	共有等位基因 No. of total alleles	圃存 Nursery		库存 Genebank		遗传相似系数 Genetic similarity
		特有等位基因数 No. of unique alleles	百分比(%) Percentage	特有等位基因数 No. of unique alleles	百分比(%) Percentage	
无芒雀麦1	118	9	6.6	10	7.2	0.86
疏花雀麦1	112	4	3.0	5	3.8	0.93
无芒雀麦2	125	4	2.9	6	5.1	0.93
杂色雀麦	128	7	5.0	4	2.8	0.92
草甸雀麦	117	14	10	9	6.4	0.82
无芒雀麦3	105	9	6.4	26	19.6	0.78
疏花雀麦2	117	11	8.0	8	5.9	0.86
合计	117.4	8.3	6.0	9.7	7.3	0.87

2.3 聚类分析

根据ISSR数据矩阵,按照UPGMA进行聚类分析得到14份材料的树状聚类图(图2)。从聚类图可以看出,除无芒雀麦3和杂色雀麦遗传上出现分化外,其他群体分支都按照同一种质群分别聚类。无芒雀麦3的种质材料亚群体和无芒雀麦2种质群遗传距离近于其与无芒雀麦3叶片材料。这说明无芒雀麦3的种质内遗传相似性低于与无芒雀麦3种间的遗传相似性,从而导致了遗传聚类上的分支。同样,圃存杂色雀麦和疏花雀麦1遗传距离要比其与疏花雀麦2的距离近,这说明种质间遗传相似性系数明显高于种质内遗传相似性。其余种质的群体之间未出现明显的遗传分化,种质内的遗传相似性高于种质间遗传相似性。

2.4 取样方法验证

鉴于单株取样和混合取样两种方法的优点不同,在重复试验过程中针对一些处理采取单株取样的方法,希望可以弥补混合取样带来的不足。试验结果表明,单株取样与混合取样对试验结果几乎没有影响(图3)。所以单株取样和混合取样策略均可运用于牧草种质资源遗传完整性检测。

3 讨论

3.1 保持种质遗传完整性的重要性

在种子保存过程中,种子的活力会随保存时间的延长而逐步降低[5],不同种子会因为基因型的不同,在圃存过程中影响其遗传完整性,同时贮藏还可诱发可遗传的点突变,因此繁殖更新可以降低贮藏种子基因突变和田间选择对种质资源遗传完整性的

万方数据

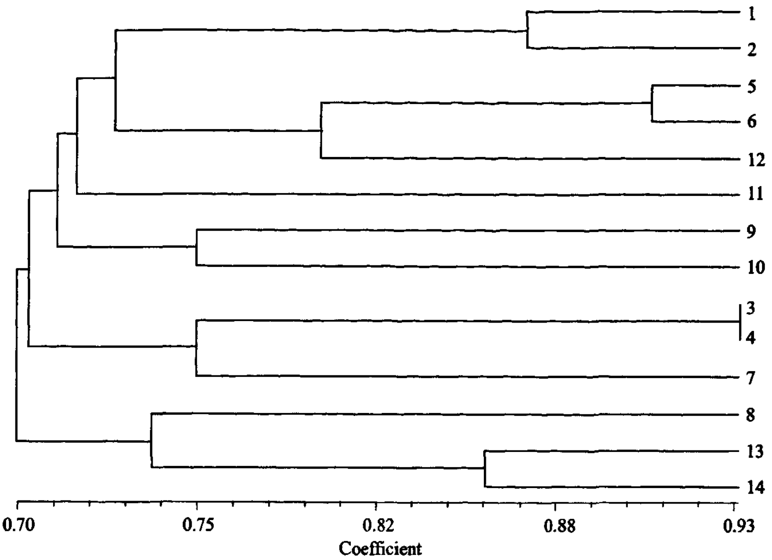

图 2　14 份雀麦属种质群体的聚类分析

Fig. 2　UPGMA dendrogram of 14 *Bromus* based on genetic similarity

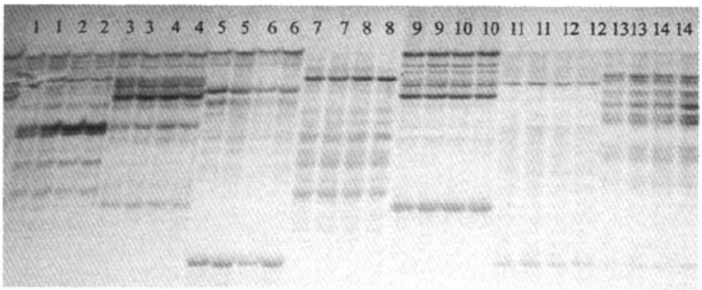

图 3　单株取样和混合取样对照图

Fig. 3　Individual and mixed sampling

影响[6]。目前国内外种质基因库繁殖更新的发芽率标准通常在 65% ~85%[7]。如 IPGRI 推荐标准为发芽率 85%，或活力下降 15%，最低临界值为发芽率 65%[8-9];印度的更新发芽率指标为 75%[10]。具体到牧草种质资源也可参考上述繁殖更新发芽指标。本试验中取自种质库的材料发芽率指标均高于 90%。

对于库存种质的繁殖更新,为了保持其遗传完整性,可以采用套袋自交的方式,防止生物学混杂,繁殖更新过程中需要对繁殖后代进行观察鉴定,以便确定是否有变异和性状出现分离现象。

确保种质在繁种更新过程中维持群体遗传结构稳定,即保持种质群体的基因频率分布及等位基因频率分布和原始群体一样,是种质安全保存的重要目标[4]。本试验通过对 7 个群体的遗传完整性检测,发现大部分种质的两个供试材料之间具有较高的遗传相似性,未见有明显的分化。个别种质从聚类图上出现分支现象,究其原因可能是圃存种质受到的外界环境因素影响比较大,经过多年的保存受到的选择压力较大,导致遗传分化的出现。而库存的种质自入库以来从未或者很少进行过繁种更新,因此两个亚群体之间出现遗传差异是可能的。同时保存相同的年限,无芒雀麦 3 分化比较明显,而疏花雀麦 1 和无芒雀麦 2 仍有较高的遗传相似性,这说明材料自身基因型比较稳定,不易丢失。因此在繁种更新时应因材更新,这样才能保持种质资源的遗传完整性。

3.2　ISSR 分子标记与雀麦属种质的遗传完整性检测

分子标记比形态标记稳定,不受外界环境影响,准确反映个体间在等位基因上的差别。同工酶也是一种常用的生理生化指标,但是对于自然老化严重的种质来说,因同工酶失去活性而无法准确检测遗传完整性变化,也就是说同工酶受限于种质个体酶

万方数据

活而不能达到准确检测遗传完整性的目的。目前看来,DNA分子标记是普遍认同的遗传检测手段,但是各种标记间也有差别;各种标记都能对一份样品检测到各自特有指纹,但在检测多态性的量上有差异,经筛选的ISSR引物和其他分子标记相比多态性带的百分比最大,每检测单位带数和基因数都高于RFLP和RAPD,而低于AFLP。但是由于AFLP是显性标记,而共显性标记的ISSR可以解决交配系统、计算杂合度和父系分析等问题,因而ISSR在遗传检测中更受青睐[17]。本试验得到的数据表明,ISSR分子标记在扩增雀麦属牧草图谱时,同样可以获得丰富的条带以及显著的差异,因此ISSR分子标记可以用于雀麦属种质遗传完整性的检测。

3.3 取样策略

供试样品的取样策略也是遗传完整性检测研究必须考虑的主要因素。一般认为,异花和常异花授粉植物的居群内遗传多样性丰富,个体间差异比较大,个别植株不能反映居群的整体遗传水平,大多采取集团取样(bulked seed samples)来代表居群整体水平[11-14]。采用混合取样的分析方法是大规模样本分析和研究中经济、省时、有效的途径。关于牧草遗传多样性研究的混合取样策略已有很多报道。车永和等[15]在冰草属取样策略的研究中,建议在利用生化指纹进行冰草属居群间及种间的遗传多样性研究时,其混合取样量最低应保持在12个个体及以上方能代表居群整体,其数据才能反映居群的整体遗传特性。刘文献等[16]在华山新麦草居群取样策略的SSR分析一文中,建议利用SSR技术进行华山新麦草居群遗传多样性研究,以单个居群随机采集18株华山新麦草为最佳分析单位个体数目。在玉米种质遗传完整性检测中,马延飞[4]论文表示可采用混合取样。但由于混合样品不同单株间的DNA互补,使某些个体的遗传变异被隐含,不能充分地被检测出来。所以在重复试验过程中针对一些处理采取单株取样的方法,希望可以弥补混合取样带来的不足。

参考文献

[1] Wissuwa M Ae N. Genotypic differences in the presence of hairs on roots and gynophores of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and their significance for phosphorus uptake[J]. Journal of Experimental Botany, 2001,52(361):1703-1710

[2] 杨秀红,吴宗璞,张国栋. 不同生育期大豆品种根系性状的比较研究[J]. 大豆科学,2002,21(1):68-70

[3] 俞金蓉. 苜蓿品种间遗传多样性的ISSR分析[D]. 重庆:西南大学, 2007

[4] 马延飞. 玉米种质衰老及遗传完整性研究[D]. 北京:中国农业大学,2007

[5] Chebotar S, Röder M S, Korzun V, et al. Molecular studies on genetic integyity of open-pollinating species rye(*Secale cereale* L.) after long-genebank maintenance[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107:1469-1476

[6] 王吉明,马双武. 西瓜甜瓜种质资源的收集、保存及更新[J]. 中国瓜菜,2007(3):27-29

[7] Frankel O H, Brown A H D, Burdon J J. The conservation of plant bio-diversity [M]. Cambridge University Press, Cambridge, 1995

[8] Sackville Hamilton N R, Chorlton K H. Regeneration of accessions in seed collection[M]. IPGRI Rome, 1997

[9] FAO/ IPGRI. Genebank standards[M]. FAO/IPGRI, Rome, 1994

[10] van Hintum J L, Visser D L. Duplication within and between germplasm collections. II. Duplication in four European barley collections [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1995, 42: 135-145

[11] 孙志民. 冰草属植物的遗传多样性研究[D]. 北京:中国农业科学院研究生院,2000

[12] 解新明,云锦凤,赵冰,等. 蒙古冰草遗传多样性的等位酶分析[J]. 草业科学,2001,18(6):6-11

[13] Zong X X, Kaga A, Tomooka N. The genetic diversity of the *Vigna angularis* complex in Asia[J]. Genome, 2003, 46:647-658

[14] Segovia-Lerma A, Cantrell R G, Conway J M, et al. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasm using bulk DNA templates[J]. Genome, 2003, 46:51-58

[15] 车永和,李立会,何蓓如. 冰草属(*Agropyron* Gaertn.)植物遗传多样性取样策略基于醇溶蛋白的研究[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(3):216-221

[16] 刘文献,李立会,刘伟华,等. 华山新麦草居群取样策略的SSR分析[J]. 麦类作物学报,2006,26(2):16-20

[17] 王心宇,陈佩度,亓增军,等. ISSR标记在小麦指纹图谱分析中的应用研究初探[J]. 农业生物技术学报,2001,9(3):261-263

(上接第427页)

[9] 张黎玉,徐品莲,邱瑞镰. 甘薯近缘野生种的搜集和利用研究[J]. 中国甘薯,1987(1):26-29

[10] 张黎玉,徐品莲,邱瑞镰,等. 甘薯近缘野生种三浅裂野牵牛和白花野牵牛在甘薯育种中的利用[J]. 江苏农业科学,1988(11): 9-12

[11] 谢一芝,尹晴红,戴起伟,等. 甘薯品种抗黑斑病鉴定及其遗传趋势[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(4):311-313

[12] 谢一芝,邱瑞镰,戴起伟,等. 甘薯抗黑斑病育种研究进展[J]. 杂粮作物,1997(2):22-24

[13] Kukimura H, Komaki K, Yoshinaga M. Current progress of sweet-potato breeding in Japan[J]. Japan Agri Res Quarterly, 1990, 24(3):169-174

[14] 张黎玉,邱瑞镰,徐品莲,等. 甘薯 F_1 抗黑斑病的表现与亲本抗性水平的关系[J]. 江苏农业科学,1994(6):27-29

[15] 黎裕,贾继增,王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报,1999,15(4):19-22

[16] 唐静. 甘薯黑斑病抗性基因AFLP分子标记[D]. 成都:四川农业大学农学院,2005

[17] 袁照年,陈选阳,张招娟,等. 甘薯抗Ⅰ型薯瘟病的RAPD标记筛选[J]. 江西农业大学报,2005,27(6):861-863

[18] 蒲志刚,唐静,王大一,等. 甘薯抗黑斑病材料AFLP标记分子鉴定初步研究[J]. 西南农业学报,2008,21(1):93-95

万方数据

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

库存和圃存对雀麦属种质遗传完整性的影响

作者： 游国卿， 石凤翎， 卢新雄， 李志勇， 师文贵， YOU Guo-qing， SHI Feng-ling， LU Xin-xiong， LI Zhi-yong， SHI Wen-gui
作者单位： 游国卿,石凤翎,YOU Guo-qing,SHI Feng-ling(内蒙古农业大学生态环境学院,呼和浩特,010019)， 卢新雄,LU Xin-xiong(中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室,北京,100081)， 李志勇,师文贵,LI Zhi-yong,SHI Wen-gui(中国农业科学院草原研究所,呼和浩特,010010)

刊名： 植物遗传资源学报ISTIC PKU
英文刊名： JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年，卷(期)： 2010,11(4)

参考文献(17条)

1. 俞金蓉 苜蓿品种间遗传多样性的ISSR分析 2007

2. 杨秀红;吴宗璞;张国栋 不同生育期大豆品种根系性状的比较研究[期刊论文]-大豆科学 2002(01)

3. Wissuwa M;Ae N Genetypic differences in the presence of hairs on roots and gynophores of peanut(Arachis hypogaea L)and their significance for phosphorus uptake[外文期刊] 2001(361)

4. FAO;IPGRI Genebank standards 1994

5. Sackville Hamilton N R;Chorlton K H Regeneration of accessions in seed collection 1997

6. 王心宇;陈佩度;元增军 ISSR标记在小麦指纹图谱分析中的应用研究初探[期刊论文]-农业生物技术学报 2001(03)

7. 刘文献;李立会;刘伟华 华山新麦草居群取样策略的SSR分析[期刊论文]-麦类作物学报 2006(02)

8. 车永和;李立会;何蓓如 冰草属(Agropyron Gaertn.)植物遗传多样性取样策略基于醇溶蛋白的研究[期刊论文]-植物遗传资源学报 2004(03)

9. Segovia-Lerma A;Cantrell R G;Conway J M AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasm using bulk DNA templates 2003

10. Zong X X;Kaga A;Tomooka N The genetic diversity of the Vigna angularis complex in Asia 2003

11. 解新明;云锦凤;赵冰 蒙古冰草遗传多样性的等位酶分析[期刊论文]-草业科学 2001(06)

12. 孙志民 冰草属植物的遗传多样性研究 2000

13. van Hintum J L;Visser D L Duplication within and between germplasm collections.IL Duplication in four European barley collections[外文期刊] 1995(2)

14. Frankel O H;Brown A H D;Burdon J J The conservation of plant bio-diversity 1995

15. 王吉明;马双武 西瓜甜瓜种质资源的收集、保存及更新[期刊论文]-中国瓜菜 2007(03)

16. Chebotar S;RMer M S;Korzun V Molecular studies on genetic integyity of open-pollinating species rye(Secale cereale L)after long-genebank maintenance[外文期刊] 2003(8)

17. 马延飞 玉米种质衰老及遗传完整性研究 2007

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201004008.aspx