

小麦地方品种繁殖更新过程中的遗传多样性变化分析

张舒娜, 高爱农, 杨欣明, 刘伟华, 李秀全, 张锦鹏, 李立会

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 采用分别保存于长期库及中期库的 3 个小麦地方品种的 6 份材料, 进行了 9 项农艺性状及 35 个与农艺性状相关的微卫星标记检测, 每份材料选取 30 个单株进行遗传多样性与遗传结构分析。结果表明: (1) 更新前 3 个小麦地方品种均为遗传异质性群体, 在 SSR 位点上的异质度分别为 57.14%、48.57% 和 5.71%。(2) 在农艺性状表现上, 只有温泉小麦 3 在株高和穗粒数上更新后比更新前显著增加, 其他材料无显著差异。(3) 在 SSR 位点多态性表现上, 3 个品种在更新后均发生了遗传多样性变化, 8 个与粒重、产量、生育期性状相关位点存在等位位点丢失现象, 其中 2 个与粒重、生育期相关位点频率变化显著。(4) 综合农艺性状调查与 SSR 分子标记检测结果发现, 3 个品种更新前后在多样性指数上无显著差异, 遗传分化系数 G_{st} 分别为 0.0269、0.0324 和 0.0380, 即更新前后遗传差异分别为 2.69%、3.24% 和 3.80%。上述结果建议, 经繁殖更新的小麦种质资源能够比较完好地保持其遗传多样性和遗传结构。对于遗传异质性小麦地方品种在繁殖更新后存在遗传多样性丢失的危险, 为了保证更新前后的遗传完整性, 建议在繁殖更新过程中每个品种至少应保持 300 个单株的群体。

关键词: 小麦地方品种; 繁殖更新; 农艺性状; SSR; 遗传多样性; 遗传完整性

Genetic Diversity Change of Wheat Landraces in Regeneration

ZHANG Shu-na, GAO Ai-nong, YANG Xin-ming, LIU Wei-hua,
LI Xiu-quan, ZHANG Jin-peng, LI Li-hui

(National Key Facilities for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute
of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The purpose of this study was to reveal the change of population structure and genetic diversity of wheat germplasm in the process of regeneration and to provide a scientific basis for the collection and conservation of wheat germplasm resources, so as to conserve and utilize the resources more efficiently. Nine agronomic traits were investigated and 35 pairs of microsatellite markers associated with agronomic traits were used to analyze 6 accessions from three wheat varieties, each of the varieties was stored both in the long-term genebank and the mid-term genebank respectively. Population structure and genetic diversity within wheat accessions composed of 30 individual and between two types of conservation were analyzed by agronomic traits and SSR marker. It showed that (1) All of three wheat varieties was heterogeneity accession, genetic heterogeneity among individuals was different at the SSR locus with 57.14%, 48.57% and 5.71% respectively. (2) The regeneration wheat accessions (mid-term genebank) displayed similar performance in morphological, only plant height and number of spikelets significantly increased in wenquanxiaomai3. (3) Allele gene frequencies was significantly different and allele absence was observed at eight microsatellite sites which was associated with grain weight, grain yield and heading date, genetic di-

收稿日期: 2011-05-28 修回日期: 2011-11-24

基金项目: 国家科技基础性工作专项(2006FY110700); 作物种质资源保护项目(NB-2130135-1-03); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2011CB100401)

作者简介: 张舒娜, 硕士研究生。E-mail: zhangshunazsn@163.com

通讯作者: 高爱农, 博士。E-mail: gaoainong@caas.net.cn

versity reduced after regeneration. (4) The analysis of agronomic traits and molecular markers all showed that there was no significant different between the long-term genebank and the mid-term genebank in diversity. The G_{st} value of three varieties was 0.0269, 0.0324 and 0.0380 respectively, only 2.69%, 3.24% and 3.80% differences existed between accessions from the two types of conservation. It suggested that the danger of the loss of genetic integrity exists after regeneration, 300 individual should be maintained at least to ensure the genetic integrity in regeneration.

Key words: Wheat landraces; Regeneration; Agronomic traits; SSR; Genetic diversity; Genetic integrity

低温种质库是目前种质资源异位保存的主要途径^[1]。我国的种质保存体系中,国家长期库主要负责全国作物种质资源的长期保存,贮存的资源作为国家战略资源,一般不对外供种;而中期库负责作物种质资源收集、整理、编目、特性鉴定、繁殖和分发,需要大量的种质材料,繁殖更新就十分必要。因此,对经过较长时间低温保存种质在繁殖更新过程中遗传多样性与遗传结构变化的研究,对种质资源的保存与利用具有重要的理论及现实意义。

全世界已保存的种质资源约 610 多万份,其中 90% 以上以种子的形式保存在低温种质库中,包括约 74.85 万份小麦资源^[2]。面对诸多资源对其进行深入研究就变得十分必要。目前已经在形态学、染色体、蛋白质、DNA 水平^[3-9]上对种质保存进行了多方面的研究。Borner 等^[3]利用 SSR 分子标记技术检测了保存于长期库中的 8 份更新多次的小麦种质,检测到 1 份繁殖更新群体发生了遗传漂变。利用 SSR 标记对种质库中经长期储藏的豌豆^[4]、黑麦^[7]种质的遗传多样性研究发现,不同保存年份的保存材料在等位基因组成上存在差异,频率上存在显著变化。Parzies 等^[5]通过形态和蛋白标记对不同保存年代的大麦种质的研究表明,随着保存年代的增加,其遗传多样性显著降低。张晗等^[6]通过对 20 份小麦种质发芽率和根尖细胞染色体畸变的测定,发现同一品种贮藏于中期库的低发芽率种质,其染色体畸变率明显高于贮藏于长期库的高发芽率种质,这些研究都为提高种质资源保存和利用效率提供了基础数据。

如何有效地保护种质资源历来是人们关注的问题,前人对种质的低温种质库保存及其繁殖更新过程中遗传多样性的变异情况,进行了大量的研究,然而对于种质低温保存及其繁殖更新过程中各种功能性变异的研究还少有报道。随着对小麦产量性状、品质性状、抗逆性的 QTL 定位的完成,使得我们可以通过对与性状相关的 SSR 位点的检测来研究这些位点在繁殖更新过程中的变异情况。本试验对 3

个小麦品种长期库保存群体及其繁殖更新群体(中期库)的遗传多样性分析,旨在了解繁殖更新过程中遗传多样性的变化,为种质资源的收集和保存提供科学依据,从而更有效地保护与利用种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

国家种质库长期库保存的 3 个小麦地方品种和与其对应的保存于中期库中的繁殖更新 1 代材料,共 6 份,由国家种质资源库提供。其中光头麦(ZM011952),长期库与中期库入库年代分别为 1991 年、2005 年,收集自云南永德县。温泉小麦 2(ZM020197),长期库与中期库入库年代分别为 1993 年、2005 年,收集自云南宁蒗永宁乡温泉村。温泉小麦 3(ZM020198),长期库与中期库入库年代分别为 1993 年、2005 年,收集自云南宁蒗县。

1.2 材料取样

1.2.1 农艺性状调查 2008-2010 年连续 2 年将所有试验材料分别在 3 个试验点(北京中国农业科学院试验基地,云南昆明市,河北沽源县)进行田间种植和性状调查。随机区组排列,3 行小区,2m × 0.2m × 20 粒/行播种,重复 3 次,田间管理同一般大田生产。依据居群多样性取样策略^[10-12],每份材料随机选取 30 个单株调查抽穗期、开花期、成熟期、株高、穗长、小穗数、穗粒数、千粒重和有效分蘖 9 项农艺性状,调查方法参照《小麦种质资源描述规范和数据标准》^[13]。

1.2.2 DNA 提取 DNA 提取采用 SDS 方法^[14],选取对应上述农艺性状调查的 30 个单株,采集新鲜叶片,分单株提取 DNA,用时样品稀释浓度为 30ng/μl。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 引物 参考基因目录中与农艺性状相关的 SSR 引物 35 对,根据 GrainGenes(<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report>.) 上公布的小麦 SSR 引物序列,由上海生工生物工程公司合成,见表 1。

表 1 SSR 标记及相关农艺性状

Table 1 SSR markers and their related agronomic traits

定位 Location	标记 Primer	相关性状 Trait	参考文献 Reference
2A	<i>Xgum339</i>	产量	[16]
2A	<i>Xgum445</i>	小穗数, 千粒重	[17]
3AS	<i>Xbarc12</i>	抽穗期	[18]
4A	<i>Xgum494</i>	粒重	[16]
4A	<i>Xgum162</i>	粒重	[16]
5A	<i>Xbarc319</i>	Q 基因(多效基因如颖壳形状和韧性, 穗轴脆弱性, 穗长, 株高和抽穗期)	[19]
5A	<i>Xgum179</i>	Q 基因(多效基因如颖壳形状和韧性, 穗轴脆弱性, 穗长, 株高和抽穗期)	[19]
5A	<i>Xbarc1</i>	抗赤霉病	[20]
5A	<i>Xcfa2250</i>	粒长	[21]
5A	<i>Xcfa2163</i>	穗粒数	[22]
6AS	<i>Xcfe273</i> (EST)	穗粒数, 抽穗期	[23]
6AS	<i>gpm7592</i> (EST)	穗粒数, 抽穗期	[23]
7A	<i>Xgum130</i>	分蘖	[24]
2B	<i>Xgum148</i>	抽穗期	[25]
2B	<i>Xgum630</i>	抗条锈病	[26]
2B	<i>Xgum47</i>	抗叶锈病	[27]
2B	<i>Xgum257</i>	粒重	[16]
3B	<i>Xwmc231</i>	成熟期	[16]
3B	<i>Xbarc164</i>	开花期	[28]
3B	<i>Xksun29</i>	子粒硬度	[29]
4B	<i>Xgum113</i>	休眠	[30]
5B	<i>Xbarc74</i>	产量	[31]
5B	<i>Xgum604</i>	产量, 抽穗期	[24], [31]
7B	<i>Xgum333</i>	开花期	[25]
7BL	<i>gpm7596</i> (EST)	穗粒数, 抽穗期	[23]
1D	<i>Xgdm126</i>	产量	[16]
2D	<i>Xgum261</i>	产量	[29], [32]
3D	<i>Xgum191</i>	抗倒伏	[16]
3D	<i>Xgum341</i>	粒重	[16]
3D	<i>Xwmc552</i>	粒重	[16]
5D	<i>Xbarc320</i>	抽穗期	[33]
5D	<i>Xwmc215</i>	抽穗期	[33]
6D	<i>Xgum325</i>	粒重	[16]
6D	<i>Xgum55</i>	粒重	[16]
7D	<i>Xwmc702</i>	穗长	[22]

1.3.2 PCR 反应 总反应体积为 10 μ l, 10 \times Taq Buffer 1 μ l, dNTP Mix 0.2 μ l, Taq 酶 0.5 U, SSR Primers 2 μ l, DNA 2ng, 其余 ddH₂O 补足。扩增反应在 GeneAmp 的 PCR System5700 扩增仪上进行。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 保持退火温度(依引物而定) 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 38 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 下保存待用。

1.4 数据分析

1.4.1 农艺性状数据统计分析 农艺性状数据统计以单株为单位, 保存群体间差异显著性分析通过 SAS 软件 ANOVA 程序完成。利用多样性指数 (Shannon-Weiner index H')^[15] 衡量群体遗传多样性大小。具体方法如下: 根据总体平均值和标准差, 将数据划分为 10 级, 从第 1 级 [\bar{X} ; $<(\bar{X} - 2\sigma)$] 到第 10 级 [\bar{X} ; $>(\bar{X} + 2\sigma)$], 每 0.5 σ 为一级, 计算每一级的相对频率 P_i (即某一性状第 i 级别内材料份数占总份数的百分比); 然后计算各个性状在每个群体中的遗传多样性指数, 计算公式为: $H' = -\sum P_i \times \ln P_i$ 。其中, P_i 指某性状第 i 级别内材料份数占总份数的百分比, \ln 为自然对数。

1.4.2 SSR 数据统计分析 统计 SSR 引物扩增谱带, 根据扩增产物的电泳结果, 凝胶上在相同迁移率位置有 DNA 条带记为 1, 无 DNA 带记为 0, 根据软件的需要将条带数转换为基因型数据。由 PowerMarker version 3.25 (Http://www.powermarker.net) 进行遗传参数的统计: 等位基因数 (Number of alleles)、基因多样性 (Gene diversity)、多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC)。通过 SAS 软件对不同保存群体间等位变异频率进行卡方检验。采用 PopGene Version 1.32 (Http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh/) 软件计算遗传一致度 (Genetic identity) 及反映遗传分化程度的参数遗传分化系数 G_{st} (Coefficient of gene differentiation), $G_{st} = (H_T - H_s) / H_T$, 式中 H_T : 总群体杂合度 (Total gene diversity); H_s : 亚群体杂合度。

1.4.3 繁殖有效群体数量的估算 运用 GRSimulator 软件 (http://www.isbreeding.net/kejian1.html) 对小麦繁殖更新群体量进行计算机模拟估算。

2 结果与分析

2.1 农艺性状遗传多样性变化分析

为了研究长期库与中期库(繁殖更新) 2 个群体间的遗传多样性变化情况, 对抽穗期、开花期、成熟期、有效分蘖、株高、穗长、小穗数、穗粒数和千粒重

9 项农艺性状进行了调查和差异显著性分析(表 2) 结果表明 温泉小麦 2 与光头麦在 2 种保存方式下 9 项农艺性状均没有显著差异 ($P > 0.05$); 温泉小麦 3 中期库保存群体株高与穗粒数较长期库保存

群体都显著增加 ($P < 0.05$) ,株高由长期库保存群体的 88.72cm 增加到中期库保存群体的 95.09cm ,穗粒数由长期库保存群体的 51.60 增加到中期库保存群体的 54.77。

表 2 供试材料的农艺性状

Table 2 Agronomic traits in accessions examined

种质名称 Cermplasm name	来源 Source	有效分蘖数 No. of effective tillers	株高 (cm) Plant height	穗长 (cm) Spike length	小穗数 Spikelet number per spike	穗粒数 Kerner number per spike	千粒重(g) 1000-kerner weight	理论单株产量 (g) Theoretical grain weight per plant	抽穗期 (d) Heading date	开花期 (d) Flowering date	成熟期 (d) Maturity date
光头麦 Guangtoumai	长期库	11.01 ± 1.82a	124.20 ± 4.46a	9.73 ± 0.37a	24.24 ± 0.77a	74.20 ± 6.93a	24.19 ± 2.77b	19.76 ± 3.84a	215a	222a	265a
	中期库	11.88 ± 1.73a	126.29 ± 4.01a	9.83 ± 0.47a	24.27 ± 0.78a	73.49 ± 6.07a	24.55 ± 1.34b	20.43 ± 3.04a	215a	222a	265a
温泉小麦 2 Wenquanxiaomai 2	长期库	9.77 ± 1.39a	86.88 ± 4.34a	9.59 ± 0.63a	22.88 ± 1.19a	53.47 ± 5.64a	36.59 ± 3.62a	19.13 ± 3.55a	207a	214a	261a
	中期库	10.37 ± 2.03a	84.86 ± 6.32a	9.46 ± 0.53a	22.63 ± 0.76a	53.54 ± 6.46a	35.86 ± 3.77a	19.51 ± 4.08a	207a	214a	261a
温泉小麦 3 Wenquanxiaomai 3	长期库	10.02 ± 2.51a	88.72 ± 9.12b	10.10 ± 0.71a	21.98 ± 1.76a	51.60 ± 9.06b	34.92 ± 5.99a	18.80 ± 5.85a	210a	218a	261a
	中期库	10.15 ± 2.08a	95.09 ± 7.35a	10.09 ± 0.95a	21.46 ± 1.69a	54.77 ± 8.12a	35.66 ± 6.58a	19.61 ± 5.59a	210a	218a	261a

显著水平为 0.05; 相同字母表示不显著 Significance at 0.05 the same letter stands for no significance

3 份材料的分蘖、株高、穗长、小穗数、穗粒数、千粒重 6 项农艺性状遗传多样性指数都较高(表 3) 在 1.656~2.101 之间。光头麦、温泉小麦 2、温泉小麦 3 中期库保存群体平均遗传多样性指数分别为 1.830、1.879、1.840,均低于长期库保存群体的 1.971、

1.901、1.901,说明中期库保存群体的遗传多样性较长期库保存群体遗传多样性有所降低,但差异显著性分析表明 2 种保存方式群体间遗传多样性差异并未达显著水平 ($P > 0.05$) 表明中期库中的小麦种质繁殖更新群体的遗传多样性得到了比较完整的保持。

表 3 供试材料不同保存群体 6 项农艺性状遗传多样性指数

Table 3 Diversity index of six agronomic traits for different conservation populations

品种 Cermplasm name	来源 Source	分蘖 No. of effective tillers	株高 Plant height	穗长(cm) Spike length	小穗数 Spikelet number per spike	穗粒数 Kerner number per spike	千粒重(g) 1000-kerner weight	平均 Mean
光头麦 Guangtoumai	长期库	1.939	2.014	1.966	1.977	1.934	1.998	1.971
	中期库	1.946	1.937	1.943	1.709	1.789	1.656	1.830
温泉小麦 2 Wenquanxiaomai 2	长期库	1.913	1.821	1.987	2.101	1.774	1.810	1.901
	中期库	1.969	2.084	1.672	1.656	1.957	1.933	1.879
温泉小麦 3 Wenquanxiaomai 3	长期库	2.070	1.838	1.789	1.767	2.090	1.850	1.901
	中期库	1.933	1.681	1.890	1.760	1.914	1.864	1.840

2.2 SSR 位点等位变异分析

采用 35 对微卫星引物对 3 个小麦品种繁殖更新前后的 6 个群体 180 个单株进行扩增,35 对引物都能扩增出清晰的谱带,光头麦长期库保存群体和中期库保存群体检测到的等位基因数分别为 37 和

36; 温泉小麦 2 长期库保存群体和中期库保存群体检测到的等位基因数分别为 53 和 50; 温泉小麦 3 长期库保存群体和中期库保存群体检测到的等位基因数分别为 64 和 58(表 4)。每个引物位点检测到的等位基因数在 1~3 个之间,其中单态性引物位点 13

个,占所用引物的 33.14%,多态性位点 22 个,占所用引物的 66.86%。这些多态性位点中的 *Xbarc74-5B*、*Xgwm339-2A*、*Xgwm604-5B*、*Xgwm130-7A*、

Xbarc319-5A、*Xgwm47-2B*、*Xwmc702-7D*、*Xgwm630-2B* 等 9 个 SSR 引物位点在供试材料中多态性较高,每个引物扩增出 3 个等位变异。

表 4 各品种不同保存群体的遗传参数

Table 4 The polymorphism information within populations for wheat accessions

种质名称 Germplasm name	来源 Source	等位基因数 No. of allele	主要等位基因频率 Major allele frequency	基因多样性 Gene diversity	多态信息 PIC 含量
光头麦 Guangtoumai	长期库 中期库	37 36	0.986 0.991	0.020 0.013	0.016 0.011
温泉小麦 2 Wenquanxiaomai 2	长期库 中期库	53 49	0.895 0.893	0.153 0.135	0.126 0.108
温泉小麦 3 Wenquanxiaomai 3	长期库 中期库	64 58	0.830 0.851	0.233 0.190	0.198 0.155

进一步分析比较同一种质繁殖更新前后各 SSR 位点等位变异情况,发现 3 份低温保存的小麦种质在繁殖更新后都产生了不同程度的等位基因丢失,其中 22 对多态性位点等位基因动态变化情况详见表 5。由表 5 可知,温泉小麦 2 繁殖更新后有 2 个位点等位基因丢失,其中开花期相关位点 1 个为 *Xbarc-164-3B*,产量相关位点 2 个为 *Xbarc74-5B*、*Xwmc552-3D*。温泉小麦 3 繁殖更新后有 5 个位点等位基因缺失,其中生育期相关位点 2 个为 *Xbarc-12-3AS*、*gpm7596-7BL*,产量相关位点 2 个为 *Xbarc604*、*Xbarc-130-7A*;穗长相关位点 1 个为 *Xwmc702-7D*。光头麦繁殖更新后只有 1 个与粒重相关位点 *Xgwm162-4A* 产生等位基因缺失。卡方检验表明,温泉小麦 2 繁殖更新后与粒重相关标记位点 *Xwmc552-3D* 差异极显著 ($P < 0.01$),与开花期相关标记位点 *Xbarc-164-3B* 差异显著 ($P < 0.05$),另外 2 个品种的位点检测结果无显著差异。可见,保存种质经繁殖更新后某些位点等位基因组成及频率可能会产生显著变化。

SSR 检测还发现,更新前的 3 份小麦种质内部个体间都存在不同程度的遗传异质性,其中以温泉小麦 3 的多态位点数最多,在所用的 35 对 SSR 引物中,有 20 对在温泉小麦 3 中能检测到等位基因变异,多态位点频率达到了 57.14%,品种内异质度最高;其次为温泉小麦 2,有 17 对引物能检测到等位基因变异,其多态位点频率达到了 48.57%;光头麦多态位点数最少,仅有 2 对引物能检测到等位基因变异,多态位点频率为 11.76%,并且两个多态性位点的等位变异较少,都只有两个等位基因,其品种内异质性最低。繁殖更新后,温泉小麦 3 中期库保存

群体多态性位点数只有 18 个,多态位点频率 51.42%;温泉小麦 2 中期库保存群体多态性位点数只有 14 个,多态位点频率 40%;光头麦中期库保存群体多态性位点数只有 1 个,多态位点频率 2.86%。繁殖更新后多态位点数减少,异质度降低。

2.3 更新前后群体间遗传多样性与遗传结构的分析

为比较判断更新前后群体间遗传多样性与遗传结构的变化,分别对 3 个材料各保存群体的 4 个遗传参数进行分析(表 4)结果显示,同一种质中期库保存繁殖更新群体与长期库保存群体各遗传参数的变化趋势大致相同,中期库检测到的等位基因数、多态信息含量均低于长期库保存群体。3 个保存品种中期库基因多样性均低于长期库保存群体,其中温泉小麦 3 长期库保存群体基因多样性为 0.233,更新保存群体为 0.190;温泉小麦 2 长期库保存群体基因多样性为 0.153,更新保存群体为 0.135;光头麦长期库保存群体基因多样性为 0.020,更新保存群体为 0.013,表明保存种质繁殖更新后其遗传多样性有所下降,但差异显著性分析表明,3 个品种两种保存方式下群体间基因多样性差异均不显著 ($P > 0.05$),说明中期库保存的经繁殖更新的群体其遗传多样性得到了比较完整的保持。

遗传分化系数(G_{st})能够反映群体的分化水平, G_{st} 在 0~0.05 间,表明群体之间有轻度的遗传分化; G_{st} 在 0.05~0.15 间,各群体之间有中度遗传分化; G_{st} 在 0.15~0.25 间,表明各群体之间存在较大的遗传分化; G_{st} 大于 0.25 时,表明各群体之间存在很大的遗传分化。光头麦、温泉小麦 2、温泉小麦 3 长期库保存群体与中期库保存繁殖更新群体间 G_{st}

表 5 繁殖更新前后群体间等位基因频率卡方检测

Table 5 Chi-square tests for allele frequencies of wheat accessions having multiplications

引物 Primer	温泉小麦 2 Wenquanxiaomai 2				温泉小麦 3 Wenquanxiaomai 3				光头麦 Guangtoumai		
	等位基因 数 No. of allele	等位基因频率 Frequency of allele		P 值 P value	等位基因 数 No. of allele	等位基因频率 Frequency of allele		P 值 P value	等位基因频率 Frequency of allele		P 值 P value
		中期库	长期库			中期库	长期库		中期库	长期库	
Xbarc164	2	30:0	25:5	0.0195	2	28:2	23:7	0.0706	1		
Xgwm261	1				2	10:20	11:19	0.7866	1		
Xwmc552	2	0:30	6:24	0.0098	2	29:1	25:5	0.0852	1		
Xgwm162	1				1				2	8:21	11:18
Xgwm339	2	13:17	9:21	0.2839	3	17:1:11	16:6:8	0.1314	1		
Xgwm604	2	13:17	10:20	0.4257	3	16:0:14	12:2:16	0.2586	1		
Xbarc74	3	17:13:0	19:10:1	0.4859	3	16:13:1	14:11:5	0.2269	1		
Xgwm130	2	20:10	20:10	1	3	24:6:0	19:10:1	0.2751	1		
gpnw7596	2	28:2	29:1	0.5536	2	30:0	27:3	0.0756	1		
gpnw7592	2	28:2	29:1	0.5536	2	29:1	27:3	0.1304	1		
Xcfc273	1				2	1:29	5:25	0.0852	1		
Xbarc320	2	30:1	27:4	0.0753	2	28:3	22:10	0.0831	1		
Xwmc215	2	26:4	24:6	0.4884	2	28:2	24:6	0.1287	1		
Xbarc12	2	9:21	6:24	0.3711	2	30:0	28:2	0.1503	2	30:0	27:3
Xwmc231	2	15:15	19:11	0.2974	1				1		
Xbarc319	1				3	12:1:17	12:4:14	0.3516	1		
Xgwm47	2	14:16	18:12	0.3006	3	11:1:18	9:1:20	0.8584	1		
Xgwm630	2	22:8	25:5	0.3472	3	1:10:19	4:6:20	0.2435	1		
Xgwm148	2	25:5	25:5	1	2	18:12	16:14	0.6028	1		
Xwmc702	2	28:2	27:3	0.6404	3	12:18:0	8:19:2	0.2453	1		
Xcfa2163	2	1:29	5:25	0.0852	2	21:9	24:6	0.3711	1		
Xgdm126	1				3	10:14:6	9:20:1	0.0962	1		

分别为 0.0324、0.0380、0.0269; 3 个品种的 G_{st} 均在 0~0.05 之间, 说明繁殖更新前后群体间只产生轻度的遗传分化, 只有 2.69%、3.24% 和 3.80% 的差异存在于繁殖更新前后群体间。遗传一致度分析结果表明, 3 个品种长期库保存群体与中期库保存繁殖更新群体间遗传一致度分别为 0.9994、0.9922、0.9930, 即中期库与长期库保存群体间有极高的相似度。表明中期库中保存的小麦种质在繁殖更新过程中遗传多样性与遗传结构总体上得到了较好的保持。

据此, SSR 分子检测结果与农艺性状检测结果相一致, 虽然中期库保存群体遗传多样性较长期库保存群体有所降低, 但差异并不显著, 中期库保存的繁殖更新群体遗传多样性与遗传结构得到了较好的保持。

2.4 繁殖有效群体的估计

通过计算机软件模拟, 估算繁殖有效群体量。

选取 *Xbarc320-5D*、*Xbarc164-3B*、*Xumc552-3D*、*Xbarc74-5B*、*Xbarc12-3AS*、*gpm7596-7BL*、*Xbarc604*、*Xbarc130-7A*、*Xumc702-7D* 9 个位点等位基因频率, 假设频率为 0.01, 模拟群体量分别为 50、100、150、200、250、300、350、400 个单株的群体, 繁殖更新 10 代(每个世代分别模拟了 200 次)。8 个群体等位基因丢失个数的平均值, 等位基因丢失标准差, 等位基因不发生丢失的几率, 有效繁殖群体的大小分别见图 1, 在第 1 到第 5 个繁殖更新世代, 繁殖群体量为 300 株、350 株、400 株的群体等位基因丢失个数的平均值及标记基因频率标准差相差都不大, 300 株可以作为最小的有效繁殖群体。在繁殖更新的第 5 代后, 350 株与 400 株的繁殖群体等位基因丢失标准差及等位基因不发生丢失的几率变化相差都不大, 350 株可以作为最小的有效繁殖群体。要保证繁殖更新中不发生等位基因的丢失, 繁殖群体量应保持在 300~350 个单株。

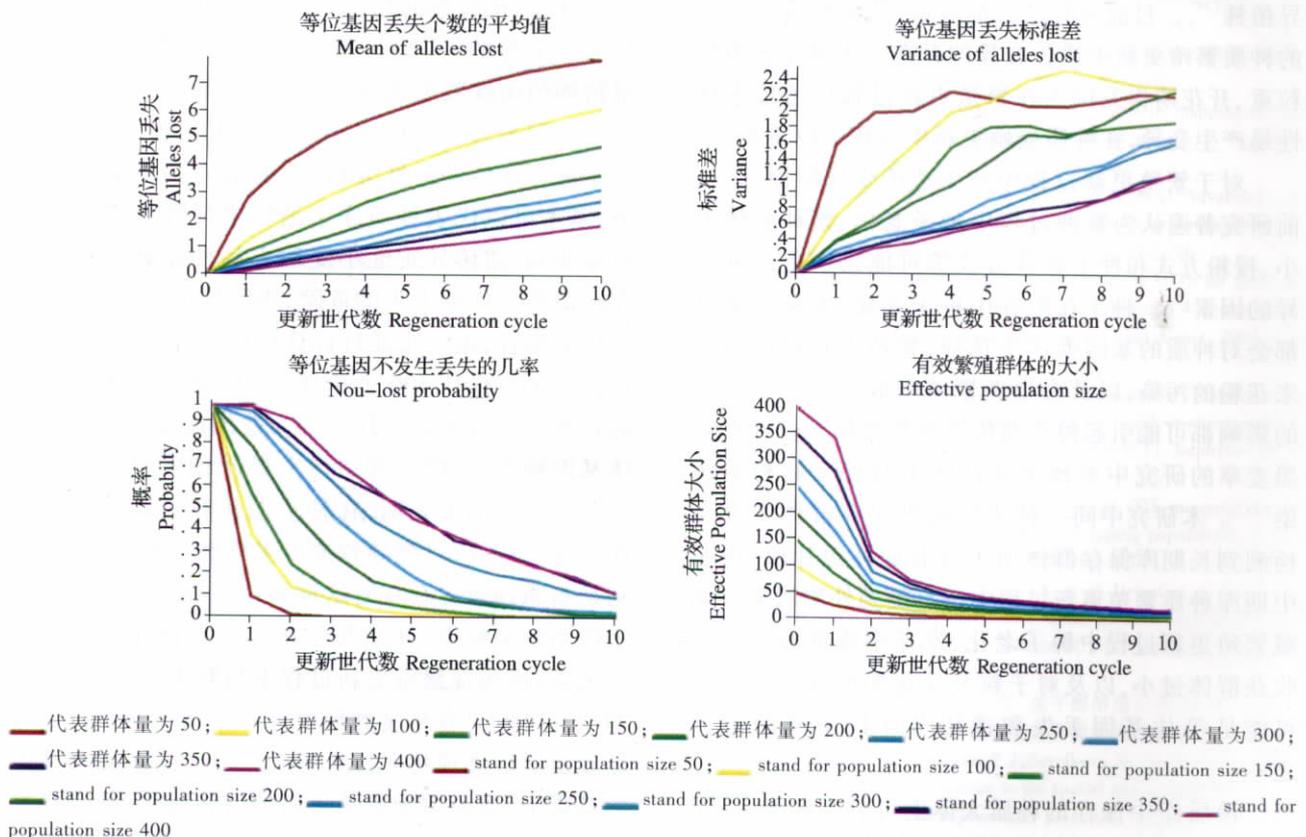


图 1 计算机模拟繁殖更新后等位基因丢失情况

Fig. 1 Computer simulation of alleles lost after regeneration

3 讨论

前人对种质繁殖更新中遗传变异进行了大量的研究^[3-4, 7, 9], 然而对于繁殖更新过程中控制性状的

DNA 水平上变异的研究还少有报道。本研究结合形态标记及与部分农艺性状相关的 SSR 分子标记检测方法, 对小麦种质繁殖更新过程中的遗传多样性和遗传结构进行研究。两种遗传多样性检测的结

果是一致的,表明形态标记与 SSR 分子标记都可以有效的检测种质保存过程中遗传多样性的变化,结合这两种检测方法可以反应不同水平的变异。我国种质库保存的小麦种质在繁殖更新过程中群体遗传多样性与遗传结构基本得到了有效保存,但同时 SSR 分子标记检测到某些位点等位基因丢失,这与前人的研究结果是一致的。在小麦^[3]与黑麦^[7]中也曾检测到随着繁殖更新代数的增加,稀有基因会有不同程度的丢失。Borner 等^[3]曾利用 SSR 技术检测保存于长期库的 8 份更新多次的小麦种质,其中 1 个群体发生了遗传漂变。Chobotar 等^[7]在对多次繁殖更新黑麦种质的研究中检测到等位基因组成及其频率的变化。对种质库中经长期储藏的豌豆 SSR 标记分析表明,其遗传多样性有降低的危险,并且等位基因组成与频率产生显著差异^[4]。醇溶蛋白遗传多样性分析表明,经人工更新的小麦群体醇溶蛋白部分谱带类型丢失,并发现醇溶蛋白谱带变异植株^[34]。目前研究结果都显示,低温种质库保存的种质繁殖更新中遗传变异的存在。本研究表明与粒重、开花期相关位点在繁殖更新过程中遗传多样性易产生变异,在种质繁殖更新中应该予以重视。

对于繁殖更新过程中产生遗传变异的原因,目前研究普遍认为繁殖过程中种子老化、繁殖群体大小、授粉方式和种子收获方式等可能是产生此种变异的因素^[5]。种子在贮存中种子老化、发芽率降低都会对种质的基因型产生选择,繁殖更新过程中外来花粉的污染,以及在更新繁殖中取样方式和环境的影响都可能引起种质遗传漂变和漂移。曾经在对黑麦草的研究中发现更新群体中有外来花粉的污染^[35]。本研究中同一种质中期库保存群体中没有检测到长期库保存群体所不具有的外源片段,说明中期库种质繁殖更新过程中没有受到外源污染。储藏繁殖更新过程中种子老化、发芽率降低及繁殖和收获群体过小,以及对子粒及开花期的外在选择都可能是等位基因丢失和遗传多样性下降的原因之一。

种质库中保存的种质大体上可分为两类:一类是遗传上同质的材料包括自花授粉作物的现代品种和自交系;另一类是遗传上异质的材料,包括野生种、原始地方品种和异花授粉的栽培种^[36]。小麦作为自花授粉作物,基因型高度纯合。然而很多研究表明,小麦地方品种内存在一定的遗传异质性^[37]。本研究中的 3 份小麦种质均存在一定程度的异质性,分别在低温种质库中保存 12 年或 14 年后进行

繁殖更新,繁殖更新后,都产生等位位点丢失现象,并且异质度都下降,但是异质性较低的种质材料相对于异质性较高的材料变异范围更小。3 份种质中异质性最高的种质温泉小麦 3 在繁殖更新后其农艺性状与 SSR 位点变异也是最广泛的。这表明保存种质品种内的遗传异质性可能对繁殖更新效果产生影响,异质性越高在繁殖更新后变异越广泛,遗传多样性的变化更大。这就要求遗传上异质的种质材料在繁殖过程中为了保持群体的遗传完整性,要保持更大的群体数量级各基因型间的平衡。

种质资源的繁殖更新是种质资源保存的重要环节。为保持繁殖更新过程中作物群体原有的遗传结构,必要的措施包括:(1)繁殖更新种质宜在原产地或与原产地条件相近的地方种植,由于基因型与环境之间的相互作用,繁殖地与原生境环境的差异也同样会使种质的基因型组成产生差异。由于表型标记易受环境的影响,本研究中繁殖更新群体农艺性状上株高、穗粒数的增加可能是由更新过程中的环境因素引起的。(2)保持一定的繁殖群体数,每份材料种植的株数不能太少,以免因基因漂移而使某些基因型丧失。本研究中随机选取其中 30 个单株样本进行遗传多样性分析,根据前人^[10-12]的研究结果,基本可以代表种质库中遗传多样性水平。本试验检测到,遗传异质性小麦地方品种在繁殖更新后存在遗传多样性丢失的危险,为了保证更新前、后的遗传完整性,进一步通过计算机模拟计算,繁殖更新群体至少应保持 300 个单株。(3)避免繁殖过程中的自然选择与人为选择。因为遗传选择可以改变群体基因频率,可能导致遗传上异质种质中异质性的丧失。研究结果表明,在种子老化和更新过程中存在的遗传选择,可能导致遗传多样性显著降低,特别是当瓶颈效应存在时这种效应更加显著。本试验中检测到与粒重、开花期等相关位点存在等位基因的丢失,推测在繁殖更新过程中与粒重、开花期相关的位点可能更容易受到环境等外在选择作用,从而导致这些位点遗传多样性降低。(4)在保证发芽力的基础上,尽量增加繁殖更新的群体数量,减少繁殖更新的世代数,降低由于种子老化、发芽率降低产生的遗传变异。研究表明,芝麻种质的有效保存期为 13~15 年,安全保存期为 10~12 年,更新繁殖的最佳期限为 12~13 年^[38],本研究中的 3 份种质分别在保存 11 年与 13 年后进行更新,其遗传结构得到比较完好的保持。此外,还应该避免繁殖更新过程不严格,机械混杂等原因产生的基因型的流失,从而

更有效地保存种质资源材料的多样性和完整性。

致谢: 感谢云南省农业科学院粮食作物研究所于亚雄老师和程加省老师对本研究的帮助。

参考文献

- [1] Dario P. Molecular population genetics and agronomic alleles in seed banks: searching for a needle in a haystack? [J]. J Exp Bot 2009 60: 2541-2552
- [2] FAO. The state of the worlds plants genetic resources for food and agriculture[M]. Rome Food and Agriculture Organization of the United Nation ,1997
- [3] Borner A ,Chebotar S ,Korzun V. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance [J]. Theor Appl Genet ,2000 ,100: 494-497
- [4] Cieslarova J ,Smykal P ,Dockalova Z ,et al. Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance [J]. Genet Resour Crop Ev , 2011 58: 439-451
- [5] Parzies H K ,Spoor W ,Ennos R A. Genetic diversity of barley landrace accessions (*Hordeum vulgare* spp. vulgare) conserved for different lengths of time in *ex situ* gene banks [J]. Heredity 2000 , 84(4) : 476-486
- [6] 张晗 ,卢新雄 ,张志娥 ,等. 种子老化诱导小麦染色体畸变及大麦醇溶蛋白带型频率变化的研究[J]. 植物遗传资源学报 , 2004 5(1) : 56-61
- [7] Chebotar S ,Borner M S ,Korzun V ,et al. Molecular studies on genetic integrity of open-pollinating species rye (*Secale cereale* L.) after long-term genebank maintenance [J]. Theor Appl Genet , 2003 ,107: 1469-1476
- [8] Elizabeth B R ,Margaret E S ,Sharon E M ,et al. Conservation and change: a Comparison of in situ and ex situ conservation of jala maize germplasm [J]. Crop Sci Soci of America ,2006 ,24: 428-436
- [9] Katarzyna J C ,Piotr T B ,Renata L ,et al. Studies on genetic changes in rye samples (*Secale cereale* L.) maintained in a seed bank [J]. Cell Molec Biolo Letters 2006 ,11: 338-347
- [10] Ewens W J. The sampling theory of selectively neutral alleles [J]. Theor Popul Bio ,1972 3: 87-112
- [11] Brown A H D ,Briggs J D. Sampling strategies for genetic variation in ex situ collections of endangered plant species. [M]//: Falk D A ,Holsinger K E (ed.). Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press ,1991 99-119
- [12] Stoyanova S D. Variation of gliadins in wheat cultivars associated with seed survival and multiplication [J]. Seed Sci Technol , 1996 24: 115-126
- [13] 李立会 ,李秀全. 小麦种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社出版 2006
- [14] Sharp P J ,Chao S ,Gale M D. The isolation ,characterization and application in the Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm [J]. Theor Appl Genet , 1989 78: 342-348
- [15] Shannon C E ,Weaver W. The mathematical theory of communication [M]. Urbana: University of Illinois Press ,1949: 3-14
- [16] McCartney C A ,Somers D J ,Humphreys D G ,et al. Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross RL4452 × 'AC Domain' [J]. Genome 2005 48: 870-883
- [17] Yao J ,Wang L X ,Liu L H ,et al. Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat [J]. Genetica ,2009 , 137: 67-75
- [18] Crossa J ,Burgueno J ,Dreisigacker S ,et al. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure [J]. Genetics 2007: 107
- [19] Kosuge K ,Watanabe N ,Kuboyama T ,et al. Cytological and microsatellite mapping of mutant genes for spherical grain and compact spikes in durum wheat [J]. Euphytica 2008 ,159: 289-296
- [20] Buerstmayr H ,Steiner B ,Hartl L ,et al. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat: II. Resistance to fungal penetration and spread [J]. Theor Appl Genet , 2003 ,107: 503-508
- [21] Bresseghello F ,Sorrells M E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars [J]. Genetics 2006 ,172: 1165-1177
- [22] Ma Z ,Zhao D ,Zhang C ,et al. Molecular genetic analysis of five spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F2 populations [J]. Mol Genom 2007 277: 31-42
- [23] 王兰芬 ,Balfourier F ,郝晨阳 ,等. 欧洲与东亚小麦品种遗传多样性的比较分析 [J]. 中国农业学 2007 40(12) : 2667-2678
- [24] Huang X Q ,Cster H ,Ganal M W ,et al. Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet 2003 ,106: 1379-1389
- [25] Kuchel H ,Hollamby G ,Langridge P ,et al. Identification of genetic loci associated with ear-emergence in bread wheat [J]. Theor Appl Genet 2006 ,113: 1103-1112
- [26] Ramburan V P ,Pretorius Z A ,Louw J H ,et al. A genetic analysis of adult plant resistance to stripe rust in the wheat cultivar Kariega [J]. Theor Appl Genet 2004 ,108: 1426-1433
- [27] 张娜 ,杨文香 ,李亚宁 ,等. 小麦抗叶锈病基因 *Lr45* 的 SSR 分子标记. 作物学报 [J] 2007 33(4) : 657-662
- [28] Pankova K ,Milec Z ,Simmonds J ,et al. Genetic mapping of a new flowering time gene on chromosome 3B of wheat [J]. Euphytica , 2008 ,164: 778-787
- [29] Narasimhamoorthy B ,Gill B S ,Fritz A K ,et al. Advanced backcross QTL analysis of a hard winter wheat × synthetic wheat population [J]. Theor Appl Genet 2006 ,112: 787-796
- [30] Mori M ,Uchino N ,Chono M ,et al. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat chromosome 3A and the group 4 chromosomes , and their combined effect [J]. Theor Appl Genet ,2005 ,110: 1315-1323
- [31] Gonzalez-Hernandez J L ,Elias E M ,Kianian S F. Mapping genes for grain protein concentration and grain yield on chromosome 5B of *Triticum turgidum* (L.) var. dicoccoides [J]. Euphytica 2004 , 139: 217-225
- [32] Kumar N ,Kulwal P L ,Balyan H S ,et al. QTL mapping for yield and yield contributing traits in two mapping populations of bread wheat [J]. Mol Breeding 2007 ,19: 163-177
- [33] Zhang K P ,Tian J C ,Zhao L A ,et al. Detection of quantitative trait loci for heading date based on the doubled haploid progeny of two elite Chinese wheat cultivars [J]. Genetica ,2009 ,135: 257-265
- [34] 任守杰 ,张志娥 ,陈晓玲 ,等. 基于醇溶蛋白的 20 份小麦种质遗传完整性分析 [J]. 植物遗传资源学报 2006 7(1) : 44-48
- [35] Van Treuren R ,Goossens P J ,Sevcfkova M. Variation in effective pollination rates in relation to the spatial and temporal distribution of pollen release in rejuvenated perennial ryegrass [J]. Euphytica 2006 ,147(3) : 367-382
- [36] 盖钧镒. 植物种群群体遗传结构改变的测度 [J]. 植物遗传资源学报 2005 6(1) : 1-8
- [37] 张玲丽 ,王辉 ,李立会 ,等. 中国小麦地方品种大青芒遗传多样性研究 [J]. 中国农业科学 2007 40(8) : 1579-1586
- [38] 张秀荣 ,冯祥运. 芝麻种质资源中期库保存现状分析 [J]. 中国油料作物学报 2004 26(1) : 72-74