

SSR 标记分析种子老化及繁殖世代 对大豆种质遗传完整性的影响

王 栋¹, 卢新雄¹, 张志娥¹, 陈晓玲¹, 辛 霞¹, 辛萍萍¹, 耿立格²

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄 050031)

摘要:选取大豆品种中黄 18 为试验材料, 利用 60 对 SSR 核心引物对经过不同老化时间处理的群体及其繁殖后代群体进行遗传完整性分析。经过老化处理的群体及其繁殖子代群体与未经老化处理的对照群体相比, 等位基因频率、有效等位基因数没有显著差异, 结果表明经过老化处理种子及其繁殖子代群体的等位基因频率变化不大。未经老化处理、发芽率为 98% 的对照群体 (G_0-1) 与其繁殖一代、繁殖二代群体相比, 等位变异数、遗传多样性指数、香农指数和稀有等位基因数没有显著差异, 且遗传一致度相对较高; 而经过老化处理、发芽率低于 85% 的群体 (G_0-3 和 G_0-4) 及其后代繁殖群体与对照群体相比, 等位变异数、遗传多样性指数、香农指数和稀有等位基因数显著或极显著降低, 且遗传一致度相对较低。因此, 种子老化较繁殖世代对大豆种质群体的遗传结构影响更大。

关键词:大豆; 种子老化; 繁殖世代; SSR; 遗传完整性; 种质保存

Effect of Seed Aging and Regeneration on Genetic Integrity in Soybean by SSR Markers

WANG Dong¹, LU Xin-xiong¹, ZHANG Zhi-e¹, CHEN Xiao-ling¹, XIN Xia¹, XIN Ping-ping¹, GENG Li-ge²

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²Cereal and Oil Crops Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031)

Abstract: In this study soybean cultivar Zhonghuang 18 was used as materials, and the genetic integrity of population with different germination percentage and their descendant population was investigated by 60 core SSR primers. The results showed that there was no significant difference in the allelic frequencies and the effective number of alleles of the aged population and their descendant population compared with the control population. It indicated that the allelic frequencies of the aged population and their descendant population changed slightly. There was no significant difference in the number of alleles, the index of genetic diversity, Shannon's information index and the number of rare alleles between the control population with the germination percentage of 98% and its first and second descendant population, and the value of genetic identity was relatively high. The number of alleles, the index of genetic diversity, Shannon's information index and the number of rare alleles of the aged population (G_0-3 and G_0-4) with the germination percentage below 85% and their first and second descendant population were significantly reduced compared with the control, and the value of genetic identity was relatively high. Therefore, seed aging maybe had a greater impact on the genetic composition of the soybean population than regeneration times.

Key words: Soybean; Seed aging; Regeneration; SSR; Genetic integrity; Germplasm conservation

作物种质资源是作物育种、生物技术和作物科学发展的物质基础, 是人类赖以生存与发展的宝贵

财富。世界各国都非常重视对种质资源的收集保存, 目前已收集到 610 万份植物种质资源, 其中约

收稿日期: 2009-03-10

修回日期: 2009-09-10

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD13B10); 农作物种质资源保护利用专项 (2130135)

作者简介: 王栋, 在读硕士, 主要从事种质资源遗传完整性研究。E-mail: beijing_wangdong@126.com

通讯作者: 卢新雄, 研究员。E-mail: xxlu@caas.net.cn

90%以种子的形式保存在 1300 多座低温种质库中^[1]。我国国家长期库贮存的种质数量已达到 35.2 万份,长期保存的种质数量处于世界前列。

然而,无论保存技术如何改进,随着贮藏时间的延长,种质库中种子的生活力会不可避免地发生下降,同时由于生活力监测及对外供种的消耗使得贮藏样品的数量不断减少。为此,当保存种质发芽率下降或贮存种质数量减少至某一更新临界值时,就需进行繁殖更新,并以更新的种子形成新一轮种质保存样品^[2]。许多研究报道表明,在种质繁殖更新过程中,其遗传完整性易受到种子老化、繁殖群体大小、授粉及收获方式、繁育体系和繁殖世代数等因素影响而发生改变^[3-8]。早期的种质遗传完整性检测方法有形态标记、细胞标记和同工酶标记等,这些方法存在这样或那样的缺陷。随着 DNA 分子标记技术的兴起,RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等技术已应用于遗传完整性检测,Russell 等^[9]、Powell 等^[10]和 Taramino 等^[11]证明 SSR 比其他分子标记具有更高的多态性,而且是共显性标记。因此,SSR 标记技术是研究种质遗传完整性变化较为理想的方法。

中国是大豆的起源地,我国国家作物种质长期库中保存了大豆种质资源 2.5 万余份,包括育成品种、地方品种和国外引进品种。另外保存的野生大豆种质资源 6 千余份。这些资源是我国大豆遗传研

究和作物育种的宝贵财富,保存好这些资源意义重大。前人对大豆种质遗传完整性变化影响因素研究,大多集中在更新年限方面^[12],而在种子老化和繁殖世代方面探讨较少。本研究以大豆品种中黄 18 为材料,利用 SSR 分子标记技术,分析评价了种子老化及繁殖世代对大豆种质资源遗传完整性的影响,为制定科学的大豆种质保存和更新策略提供了重要的理论与现实依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种中黄 18 的原始材料种子由中国农业科学院作物科学研究所提供,2001 年大田收获,种子含水量为 8%~9%。2002 年 2 月将种子置于铝箔袋内密封包装后,在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 下进行不同时间的人工老化处理(112d、154d、196d),得到 3 个不同生活力水平的原始材料种子(G_0-2 、 G_0-3 、 G_0-4),未经人工老化处理的原始材料种子(G_0-1)为对照(CK)。2003 年将原始材料种子(G_0)进行田间种植,分别获得 4 个子一代繁殖群体种子(G_1),2006 年将子一代种子(G_1)再进行田间种植,获得 4 个子二代繁殖群体种子(G_2),详见表 1。所有收获的种子晾干后在 4°C 条件下贮藏,以备试验用。本研究以处理群体为基本单位。

表 1 供试大豆种质群体

Table 1 Soybean germplasm population used in the study

世代 Generation	群体 Population	老化时间(d) Aging duration	发芽率(%) Germination percentage	繁殖背景 Background of regeneration
原始材料 G_0	G_0-1	0	98.00	
	G_0-2	112	95.00	
	G_0-3	154	81.00	
	G_0-4	196	79.00	
繁殖一代 G_1	G_1-1	0	88.00	由 G_0-1 繁殖
	G_1-2	0	85.33	由 G_0-2 繁殖
	G_1-3	0	88.00	由 G_0-3 繁殖
	G_1-4	0	81.33	由 G_0-4 繁殖
繁殖二代 G_2	G_2-1	0	97.00	由 G_1-1 繁殖
	G_2-2	0	94.00	由 G_1-2 繁殖
	G_2-3	0	96.00	由 G_1-3 繁殖
	G_2-4	0	95.30	由 G_1-4 繁殖

1.2 田间试验设计

繁殖一代(G_1)与繁殖二代(G_2)的田间繁殖均采用随机区组设计方案,每个处理设置 4 个重

复,每个重复播种的种子量为 200 粒,每个处理需用 800 粒种子,并按照当地的大田管理技术流程进行繁殖更新,采取混合方法收获种子。繁殖更

新地点为河北省石家庄市河北农科院粮油作物研究所试验地。

1.3 种子发芽率测定

参照《国际种子检验规程》中的发芽条件进行发芽试验^[13]。发芽床采用滤纸,温度为 25℃,重复 2 次。逐日调查发芽数,第 3 天统计发芽势(Gp),第 4 天统计发芽率(G)。

1.4 基因组 DNA 提取

从每个处理群体材料中随机取出 200 粒种子于蛭石中并在培养箱内进行变温培养。每天光照 14h,温度为 30℃;黑暗 10h,温度为 20℃,相对湿度为 80%。幼苗长至 3 叶期时,每个处理随机取 60 株,单株提取 DNA。提取方法采用 SDS 法,用 1×TE 稀释成相同的浓度(20ng/μl),4℃保存备用。

1.5 SSR 引物选取

选取谢华等^[14]选出的 60 对 SSR 核心引物,相关信息来自 <http://soybase.org/resources/ssr.php>,见表 2。60 个 SSR 位点均被定位在大豆遗传图谱上,完全覆盖大豆 20 个连锁群,每个连锁群上分布 2~4 个位点,平均为 3 个。

表 2 60 对 SSR 核心引物的名称、核心序列、片段大小、连锁群和染色体位置

Table 2 Name, core sequence, fragment size, linkage group and position in LG of 60 core primers

引物 Primer	核心序列 Core sequence	片段大小(bp) Fragment size	连锁群 Linkage group	染色体位置 Position in LG
Satt236	(ATT) ₁₉	210~234	A1	93.23
Satt300	(ATT) ₁₉	231~264	A1	30.93
Satt187	(ATT) ₁₉	229~293	A2	54.92
Satt387	(ATT) ₁₀	214~238	A2	53.25
Satt429	(ATT) ₂₅	221~278	A2	162.03
Satt197	(ATT) ₂₀	135~190	B1	46.39
Satt453	(ATT) ₁₃	235~278	B1	123.96
Satt168	(ATT) ₁₆	200~235	B2	55.2
Satt556	(ATT) ₁₄	155~222	B2	73.21
Satt577	(ATT) ₁₂	108~122	B2	6.05
Satt180	(ATT) ₁₆	215~266	C1	127.77
Satt194	(ATT) ₂₃	214~246	C1	26.35
Satt565	(ATT) ₁₉	159~193	C1	0
Satt281	(ATT) ₁₉	184~237	C2	40.3
Satt286	(ATT) ₁₇	195~221	C2	101.75
Satt307	(ATT) ₁₂	162~185	C2	121.27
Satt184	(ATT) ₁₃	138~186	D1a	17.52
Satt267	(ATT) ₁₆	222~246	D1a	57.34
Satt157	(ATT) ₃₁	178~310	D1b	37.07

续表

引物 Primer	核心序列 Core sequence	片段大小(bp) Fragment size	连锁群 Linkage group	染色体位置 Position in LG
Satt005	(ATT) ₁₉	141~191	D1b	75.29
Satt216	(ATT) ₁₉	140~218	D1b	19.4
Satt002	(ATT) ₂₅	102~151	D2	47.73
Satt226	(ATT) ₁₈	306~340	D2	85.15
Satt386	(ATT) ₁₅	162~199	D2	125
Sat_112	(AT) ₈	337~357	E	8.67
Satt230	(ATT) ₁₅	219~227	E	71.31
Satt268	(ATT) ₁₇	208~252	E	44.27
Satt146	(ATT) ₁₇	290~310	F	1.92
Satt334	(ATT) ₁₆	202~210	F	78.06
Satt586	(ATT) ₁₉	174~219	F	3.63
Sct_188	(CT) ₁₃	269~294	F	85.33
Satt012	(ATT) ₁₉	143	G	66.55
Satt130	(ATT) ₁₄	231~243	G	23.1
Satt309	(ATT) ₁₃	125~146	G	4.53
Satt352	(ATT) ₁₈	183~195	G	50.53
Satt279	(ATT) ₂₈	172~198	H	68.5
Satt434	(ATT) ₃₂	309~352	H	105.74
Satt442	(ATT) ₃₅	231~265	H	46.95
Satt239	(ATT) ₂₂	183~195	I	36.94
Satt571	(ATT) ₁₄	126~153	I	18.5
Sct_189	(CT) ₁₇	156~191	I	113.77
Satt431	(ATT) ₂₁	233~250	J	78.57
Satt596	(ATT) ₁₇	233~291	J	39.64
Satt242	(ATT) ₂₆	177~200	K	14.35
Satt414	(ATT) ₂₃	250~306	K	37.04
Satt588	(ATT) ₁₈	122~173	K	117.02
Sat_099	(AT) ₂₅	260	L	78.23
Satt373	(AT) ₂₂	211~290	L	107.24
Satt462	(ATT) ₂₀	216~288	L	41
Satt308	(ATT) ₂₁	147~173	M	130.76
Satt346	(ATT) ₁₇	185~217	M	112.79
Satt590	(ATT) ₂₆	262~340	M	7.84
Satt022	(ATT) ₁₇	140~340	N	102.96
Satt339	(ATT) ₂₆	210~240	N	75.91
Satt390	(ATT) ₁₇	192~220	N	9.14
Satt530	(ATT) ₁₂	212~246	N	32.85
Satt173	(ATT) ₁₈	230	O	58.4
Satt243	(ATT) ₁₇	200~236	O	119.5
Satt345	(ATT) ₂₇	187~217	O	59.43
Satt487	(ATT) ₂₂	199~209	O	9.53

1.6 PCR 扩增与聚丙烯酰胺电泳检测

PCR 反应总体系为 20μl,包括 10×PCR buffer (含 Mg²⁺)2μl,2.5mmol/L dNTP1.8μl,2.5U/μl Taq

酶 0.4 μl , 5 $\mu\text{mol/L}$ Primer-pairs (1 + 1) μl , 20ng/ μl DNA 5 μl , ddH₂O 9 μl 。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 4min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 47 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 温度降至 15 $^{\circ}\text{C}$ 时取出, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下备用。扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 功率 70W, 时间 45min, 银染法检测^[15]。PCR 反应中的 Taq 酶、dNTP 和 PCR buffer 均购自北京天根生化科技有限公司。

1.7 数据分析

统计扩增条带, 每个引物视为 1 个位点, 每条带视为 1 个等位变异。在统一迁移率上有带记为 1, 无带记为 0, 缺失记为 9, 并参照 DNA marker I 估计

片段大小。使用 Powermarker V3.25、POPGENE version 1.31、NTSYS pc2.1 等软件对不同时间老化处理和繁殖世代的大豆种质群体进行遗传结构分析, 所得的实验数据用 SAS V8 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 群体遗传结构分析

利用 60 对 SSR 核心引物对大豆中黄 18 12 个种质群体进行分子标记检测, 共检测到 60 个位点、138 个等位基因, 每个位点的等位基因数在 1~4 之间, 平均为 2.3 个。引物 Satt307 扩增原始材料 (G_0) 4 个群体的 SSR 电泳图谱分别见图 1、图 2。

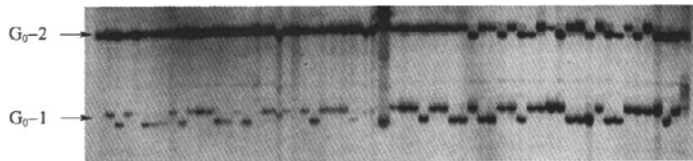


图 1 引物 Satt307 扩增群体 G_0 -1 和 G_0 -2 的 SSR 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of SSR with primer Satt307 in population G_0 -1 and G_0 -2

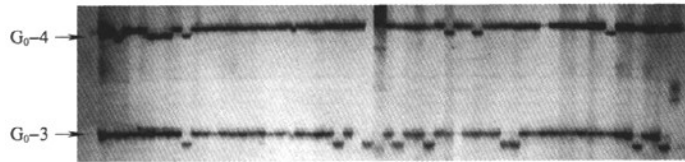


图 2 引物 Satt307 扩增群体 G_0 -3 和 G_0 -4 的 SSR 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretic patterns of SSR with primer Satt307 in population G_0 -3 and G_0 -4

利用 Powermarker V3.25 计算各个群体的等位基因频率, 用 SAS V8 对其进行 t 测验, 结果见表 3。从表 3 中可以看出各处理群体与对照群体 t 测验的概率值 P 均大于 0.9990, 表明处理群体与对照群体相比等位基因频率几乎没有差异。由此可见, 种子老化和繁殖世代对大豆中黄 18 种质群体的等位基因频率分布影响不大。

使用 POPGENE version 1.31 对各个群体进行进一步分析, 计算各群体的等位基因数、多态位点数、多态位点百分数、每位点等位基因数、有效等位基因数、遗传多样性指数和香农指数等遗传多样性参数, 结果见表 4。从表 4 中可以看出, 各群体的每位点有效等位基因数与对照群体相比差异不显著, 这与等位基因频率差异分析相一致。经过不同时间老化处理 (112d、154d、196d) 的群体 G_0 -2、

表 3 供试大豆种质群体等位基因频率 t 测验

Table 3 The t -test for allele frequency of the tested soybean germplasm population

比较群体 The compared population	t 值 t value	概率值 $P > t$
G_0 -1 vs G_0 -2	0.001	0.9993
G_0 -1 vs G_0 -3	0	0.9998
G_0 -1 vs G_0 -4	0	0.9998
G_0 -1 vs G_1 -1	0.001	0.9994
G_0 -1 vs G_1 -2	0	0.9999
G_0 -1 vs G_1 -3	0	0.9998
G_0 -1 vs G_1 -4	0	1.0000
G_0 -1 vs G_2 -1	0	1.0000
G_0 -1 vs G_2 -2	0	0.9996
G_0 -1 vs G_2 -3	-0.001	0.9998
G_0 -1 vs G_2 -4	0	0.9999

G_0-3 、 G_0-4 及繁殖的子代群体 G_1-2 、 G_1-3 、 G_1-4 和 G_2-2 、 G_2-3 、 G_2-4 ，其各项遗传多样性参数均低于对照群体 G_0-1 ，而且随老化时间的延长，生活力水平愈低，其各项遗传多样性参数也愈低。每位点等位基因数、有效等位基因数、遗传多样性指数和香农指数的显著性检验结果显示，发芽率低于 85% 的群体 G_0-3 、 G_0-4 的每位点等位基因数、遗传多样性指数和香农指数 3 项遗传多样性参数与对照群体 G_0-1 相比差异极显著。同样 G_0-3 和 G_0-4 的后代群体，即群体 G_1-3 、 G_2-3 以及群体 G_1-4 、 G_2-4 的每位点等位基因数、遗传多样性指数和香农指数 3 个遗传多样性参数与对照群体相比差异显著

著或极显著，但这几项参数分别比群体 G_0-3 和 G_0-4 要略高。结果表明，随着老化时间的延长，生活力水平的下降，存活群体内的遗传多样性低于对照群体遗传多样性。由对照群体 G_0-1 繁殖的子代群体 G_1-1 及其再次繁殖的群体 G_2-1 ，其各项遗传多样性参数与对照群体 G_0-1 相比几乎没有差异。表明未经过老化处理的高生活力水平大豆种质材料经过两次繁殖更新后，其群体的遗传结构得到了较好的保持。以上结果表明，种子老化较繁殖世代对大豆种质材料的群体遗传结构影响更大。

表 4 供试大豆种质群体的遗传结构

Table 4 Genetic composition of the tested soybean germplasm population

群体 Population	等位基因 数 NA	多态位点 数 K	多态位点百 分数 $P(\%)$	每位点等位 基因数 A	每位点有效等 位基因数 A_e	遗传多样性指数 H	香农指数 I
G_0-1	132	49	81.67	2.2000 ± 0.7768	1.1614 ± 0.2425	0.1068 ± 0.0127	0.2061 ± 0.0197
G_0-2	131	49	81.67	2.1833 ± 0.7700	1.1517 ± 0.2532	0.1054 ± 0.0126	0.2012 ± 0.0196
G_0-3	112	48	80.00	1.8667 ± 0.5357**	1.1362 ± 0.2527	0.0889 ± 0.0122**	0.1689 ± 0.0192**
G_0-4	111	46	76.67	1.8500 ± 0.5469**	1.1347 ± 0.2534	0.0837 ± 0.0121**	0.1652 ± 0.0185**
G_1-1	132	49	81.67	2.2000 ± 0.7768	1.1588 ± 0.2532	0.1061 ± 0.0127	0.2060 ± 0.0196
G_1-2	123	49	81.67	2.0500 ± 0.6746*	1.1476 ± 0.2685	0.1035 ± 0.0126	0.1978 ± 0.0194
G_1-3	123	47	78.33	2.0500 ± 0.6993*	1.1507 ± 0.2571	0.0967 ± 0.0132	0.1828 ± 0.0203*
G_1-4	112	46	76.67	1.8667 ± 0.5665**	1.1438 ± 0.2635	0.0932 ± 0.0132*	0.1807 ± 0.0187*
G_2-1	132	49	81.67	2.2000 ± 0.7768	1.1521 ± 0.2649	0.1060 ± 0.0127	0.2027 ± 0.0196
G_2-2	123	48	80.00	1.9167 ± 0.6187**	1.1449 ± 0.2600	0.1025 ± 0.0126	0.1856 ± 0.0194
G_2-3	115	47	78.33	2.0500 ± 0.6993*	1.1479 ± 0.2507	0.0944 ± 0.0139	0.1814 ± 0.0199*
G_2-4	112	46	76.67	1.8667 ± 0.5357**	1.1377 ± 0.2571	0.0924 ± 0.0124*	0.1653 ± 0.0193*

NA : No. of Alleles; K : No. of polymorphic loci; P : percentage of polymorphic loci; A : No. of alleles per loci; A_e : Effective No. of alleles per loci; H : Index of genetic diversity; I : Shannon's information index

*、** : 5%、1% 水平上显著差异* and ** : Significant at 5% level and 1% level

2.2 遗传一致度分析

使用 POPGENE version 1.31 计算出各个群体间的遗传一致度，结果见表 5。从表 5 可以看出，各群体与对照群体 G_0-1 相比，遗传一致度最大的群体是 G_1-1 为 0.9999，其次是群体 G_2-1 为 0.9998，遗传一致度最小的是群体 G_0-4 、 G_0-3 ，分别为 0.9962、0.9970。根据各群体间的遗传一致度，利用 NTSYS pc2.1 以非加权类平均法 (UPGMA) 进行聚类分析，建立树状聚类图，结果见图 3。从图 3 可以看出，虽然群体 G_0-4 与对照群体 G_0-1 的遗传一致度最低，但是其绝对值仍然很高，最低也在 0.9965 处与对照群体 G_0-1 聚在一起，表明所有群体与对照群体在遗传一致度方面还是具有较高的一致性，这与等位基因频率以及每位点有效等位基因数的分析相一

致。群体 G_1-1 与对照群体 G_0-1 的遗传一致度最大，遗传距离也最近，其次是群体 G_2-1 。这是因为群体 G_1-1 是由未经老化处理的对照群体 G_0-1 繁殖更新而来，群体 G_2-1 又是群体 G_1-1 繁殖更新而来，表明未经老化处理的高生活力水平大豆种质材料经过两次繁殖后其遗传一致度得到了较好的保持。经过老化处理的群体 G_0-3 、 G_0-4 与对照群体 G_0-1 的遗传一致度相对较低，表明种子老化对大豆种质材料遗传一致度的影响较大。群体 G_1-3 和群体 G_2-3 、群体 G_1-2 和群体 G_2-2 、群体 G_1-4 和群体 G_2-4 之间具有较高的遗传一致度，因为后者是由前者繁殖更新而来。这 6 个群体与对照群体 G_0-1 的遗传一致度比群体 G_0-3 、 G_0-4 与对照群体 G_0-1 的要高，说明种子老化对大豆种质材料遗传一致度的

影响较繁殖世代更大。

表 5 供试大豆种质群体间遗传一致度

Table 5 Genetic identity among the tested soybean germplasm population

群体 Population	群体 Population												
	G ₀ -1	G ₀ -2	G ₀ -3	G ₀ -4	G ₁ -1	G ₁ -2	G ₁ -3	G ₁ -4	G ₂ -1	G ₂ -2	G ₂ -3	G ₂ -4	
G ₀ -1	1.0000												
G ₀ -2	0.9996	1.0000											
G ₀ -3	0.9970	0.9982	1.0000										
G ₀ -4	0.9962	0.9966	0.9983	1.0000									
G ₁ -1	0.9999	0.9996	0.9982	0.9966	1.0000								
G ₁ -2	0.9984	0.9966	0.9963	0.9950	0.9966	1.0000							
G ₁ -3	0.9986	0.9986	0.9970	0.9952	0.9985	0.9972	1.0000						
G ₁ -4	0.9977	0.9978	0.9971	0.9958	0.9978	0.9986	0.9977	1.0000					
G ₂ -1	0.9998	0.9996	0.9982	0.9966	0.9999	0.9965	0.9985	0.9977	1.0000				
G ₂ -2	0.9983	0.9961	0.9959	0.9944	0.9960	0.9998	0.9969	0.9984	0.9960	1.0000			
G ₂ -3	0.9985	0.9985	0.9971	0.9950	0.9985	0.9971	0.9998	0.9975	0.9984	0.9970	1.0000		
G ₂ -4	0.9980	0.9981	0.9974	0.9957	0.9980	0.9981	0.9978	0.9997	0.9980	0.9979	0.9977	1.0000	

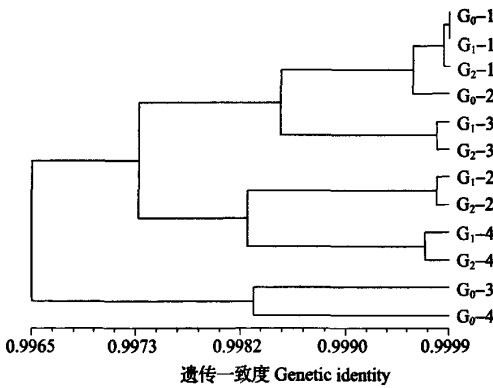


图 3 供试大豆种质群体 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA dendrogram of the tested soybean germplasm population

2.3 稀有等位基因 ($P < 0.05$) 变化分析

稀有等位基因是指群体内其基因频率低于 5% 的等位基因。群体内的遗传多样性差异很大程度上是由于稀有等位基因 ($P < 0.05$) 结合或综合到基因型背景中。大豆种质材料在经过老化处理和繁殖更新后易发生稀有等位基因的丢失或增加,从而导致群体内等位基因数的变化。各个群体内的稀有等位基因数目的变化见表 6。从表 6 可以看出,经过老化处理的群体 G₀-3、G₀-4 的稀有等位基因数要明显低于对照群体 G₀-1,而且与对照群体 G₀-1 共有的稀有等位基因数,随着老化时间的延长和生活力水平的降低而减少,各群体稀有等位基因的变化数

表 6 供试大豆种质群体稀有等位基因数目变化

Table 6 Change of No. of rare alleles of the tested soybean germplasm population

群体 Population	数目 No.	处理与对照 共有的数目 No. of rare alleles between control and treatment	变化数 (丢失数/增加数) Change (lose or increase)
G ₀ -1	55	55	0/0
G ₀ -2	55	53	-2/+2
G ₀ -3	29	27	-28/+2
G ₀ -4	25	25	-30/0
G ₁ -1	53	52	-3/+1
G ₁ -2	40	33	-22/+7
G ₁ -3	31	27	-28/+4
G ₁ -4	30	24	-30/+5
G ₂ -1	53	53	-3/+1
G ₂ -2	36	31	-24/+5
G ₂ -3	35	27	-28/+8
G ₂ -4	43	33	-22/+10

(丢失数/增加数)也有相同的趋势。表明种子老化可以显著地影响大豆种质群体内的稀有等位基因数目,主要是减少其数目。由对照群体 G₀-1 繁殖更新的群体 G₁-1、G₂-1 与其相比,以上 3 个指标变化较小。表明未经过老化处理的高生活力水平大豆种质材料经过两次繁殖更新后,其稀有等位基因得到了较好的保持;而由经过老化处理的低生活力水平群体 G₀-2、G₀-3、G₀-4 繁殖更新的群体 G₁-2、G₁-

3、 G_1-4 以及 G_2-2 、 G_2-3 、 G_2-4 与对照群体 G_0-1 相比稀有等位基因数明显减少;与对照群体 G_0-1 共有的稀有等位基因数的变化趋势一致;而稀有等位基因变化数(丢失数/增加数)却显著增加。表明经过老化处理的低生活力水平群体繁殖更新的后代群体与对照群体相比其稀有等位基因数变化较大。以上分析表明,对稀有等位基因变化的影响,种子老化较繁殖世代作用更大。

3 讨论

3.1 种子老化及繁殖世代对大豆种质群体遗传完整性变化的影响

遗传完整性(genetic integrity)是指群体的遗传结构得到完全的保持,包括基因型频率分布及等位基因频率分布和其原始群体一样,保持不变^[16]。维持种质遗传完整性就是种质在贮藏过程中保持最低程度的遗传改变,在繁殖更新过程中要保持子代与亲代具有最大程度的遗传相似性,这是种质保存工作的核心。Parzies等^[3]运用同工酶标记对贮藏不同年限的大麦地方品种的研究发现,不同繁殖世代的种质材料之间醇溶蛋白谱带频率存在显著差异。Chebotar等^[4]利用SSR分子标记技术对不同繁殖世代的黑麦品种的研究发现等位基因的频率也存在显著差异,并且检测到了某些等位基因的丢失或增加。Roos^[7]对8个不同种子壳色和荚果颜色混合为一个群体的菜豆品种研究发现,经过15次种子老化和更新周期后其中的6个品种丢失。本研究利用SSR分子标记技术,通过对经过不同时间老化处理及繁殖世代的大豆种质群体进行检测,发现各处理群体的等位基因频率、每位点有效等位基因数与对照群体相比差别不大,表明种子老化和繁殖世代对大豆的遗传完整性影响不大。这与大豆自身的遗传结构特点有关,且供试品种中黄18是育成品种,属于同质种质材料,基因型纯合,其材料个体之间基本上具有相同的遗传结构。在繁殖更新过程中,受外来花粉污染的概率也极小。因此,各处理群体与对照群体相比,遗传完整性得到了较好的保持。经过进一步分析发现,经过老化处理的低生活力水平原始材料群体与对照群体相比,等位基因数、多态位点数、多态位点百分数、每位点等位基因数、遗传多样性指数和香农指数均发生下降,而且老化处理时间越长,生活力水平越低,各项遗传多样性参数下降的程度越大。表明经过老化处理的低生活力水平群体内的遗传多样性低于未经过老化的高生活力水平对照群

体。这与张晗等^[17]研究的结果一致。通过对稀有等位基因变化的研究揭示了问题的本质。稀有等位基因在群体内占有极小的份额,但是却大大增加了群体内的基因多样性。稀有等位基因易受到种子老化、繁殖群体大小、种子收获方式、繁殖世代等因素影响而发生丢失。稀有等位基因的变化可以较小地改变群体内的基因型频率和等位基因频率,却较大地改变群体的遗传多样性。通过对各群体的遗传结构、各群体与对照群体间的遗传一致度以及稀有等位基因变化的研究表明,种子老化比繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响更大。因此,在进行大豆种质繁殖更新时,确定高的发芽率更新标准是至关重要的。

3.2 大豆种质繁殖更新发芽率标准

种质资源繁殖更新策略研究的目标就是降低遗传漂变、遗传漂移、选择和异型花粉污染及种子混杂等对种质资源遗传完整性的影响,其研究内容主要包括更新发芽率标准、繁殖群体大小和种子收获方式等^[18-20]。大豆是典型的自花授粉作物,天然自交率约为0.5%~1.0%,繁殖群体大小和种子收获方式对其遗传完整性的影响不会太大,其繁殖更新策略应着重考虑更新发芽率标准。适宜的繁殖更新发芽率指标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影响。根据大豆种子30℃老化试验结果,李灵芝等^[21]推荐发芽率80%作为大豆种子繁殖更新的生活力标准,73%为更新发芽率下限。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%之间^[2]。IPGRI推荐标准为发芽率85%,或者降至起始发芽率的85%,最低临界值为发芽率65%^[18,22]。本研究得出未经过老化处理、发芽率为98%的对照群体其繁殖更新的后代群体与之相比,等位基因数、遗传多样性指数、香农指数和稀有等位基因数没有显著性差异,遗传一致度相对较高;而经过老化处理、发芽率低于85%的群体(G_0-3 、 G_0-4 的发芽率分别为81%和79%)及其繁殖更新的后代群体与对照群体相比,等位基因数、遗传多样性指数、香农指数和稀有等位基因数显著降低,且遗传一致度相对较低。这印证了IPGRI推荐发芽率为85%在种质繁殖更新中的重要指导作用。

参考文献

- [1] FAO. Report on the state of the world's plants genetic resources [R]// International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany. FAO, Rome, Italy, 1996

- [2] Frankel O H, Brown A H D, Burdon J J, et al. The conservation of plant biodiversity [M]. Cambridge University Press, Cambridge, 1995
- [3] Parzies H K, Spoor W, Ennos R A, et al. Genetic diversity of barley landrace accessions (*Hordeum vulgare* ssp. *Vulgare*) conserved for different lengths of time in *ex situ* gene banks [J]. *Heredity*, 2000, 84: 476-486
- [4] Chebotar S, Röder 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(8): 1469-1476
- [5] Stoyanova S D. Genetic shifts and variations of gliadins induced by seed aging [J]. *Seed Sci & Technol*, 1991, 19: 363-371
- [6] Del Rio A H, Bamberg J B, Huaman Z, et al. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. I. Effects of seed increase [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 191-198
- [7] Roos E E. Report of the storage committee working population on effects of storage on genetic integrity 1980-1983 [J]. *Seed Sci & Technol*, 1984, 12: 255-260
- [8] Tao K-L J, Perrino P, Spagnoletti Zeuli P L, et al. Rapid and non-destructive method for detecting composition change in wheat germplasm accessions [J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 1039-1042
- [9] Russell J R, Fuller J D, Macaulay M, et al. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 714-722
- [10] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Mol Breed*, 1996, 2: 225-238
- [11] Taramino G, Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize [J]. *Genome*, 1996, 39: 277-287
- [12] 夏冰, 卢新雄, 陈晓铃, 等. 利用 SSR 分子标记检测分析 30 份大豆种质遗传完整性 [J]. *大豆科学*, 2007, 26(3): 305-309
- [13] 国际种子检验协会 (ISTA). 国际种子检验规程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 187-188
- [14] 谢华, 常汝镇, 曹永生, 等. 利用中国秋大豆 (*Glycine max* (L.) Merr) 筛选 SSR 核心位点的研究 [J]. *中国农业科学*, 2003, 36(4): 360-366
- [15] Cairns M J, Murray V. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914-921
- [16] 盖钧镱. 植物种质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
- [17] 张晗, 卢新雄, 张志娥, 等. 种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响 [J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(3): 271-275
- [18] Sackville Hamilton N R, Chorlton K H. Regeneration of accessions in seed collection [M]. IPGRI, Rome, 1997
- [19] Engels J M M, Ramanatha Rao R. Regeneration of seed crops and their wild relatives [R] // Proceedings of a Consultation Meeting, 1995, ICRISAT, Hyderabad, India, IPGRI, Rome, 1998
- [20] Lawrence M J, Marshall D F, Davies P. Genetics of genetic conservation. I. Sample size when collecting germplasm [J]. *Euphytica*, 1995, 84: 89-99
- [21] 李灵芝, 王丽娜, 马华英, 等. 基因库大豆种子繁殖更新阈值研究 [J]. *华北农学报*, 2001, 16(3): 74-79
- [22] FAO/ IPGRI. Genebank Standards [S]. FAO Rome, IPGRI Rome, 1994

响

作者: [王栋](#), [卢新雄](#), [张志娥](#), [陈晓玲](#), [辛霞](#), [辛萍萍](#), [耿立格](#), [WANG Dong](#), [LU Xin-xiong](#), [ZHANG Zhi-e](#), [CHEN Xiao-ling](#), [XIN Xia](#), [XIN Ping-ping](#), [GENG Li-ge](#)

作者单位: [王栋, 卢新雄, 张志娥, 陈晓玲, 辛霞, 辛萍萍, WANG Dong, LU Xin-xiong, ZHANG Zhi-e, CHEN Xiao-ling, XIN Xia, XIN Ping-ping \(中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081\)](#), [耿立格, GENG Li-ge \(河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄, 050031\)](#)

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 (2)

被引用次数: 1次

参考文献(22条)

1. [FAO Report on the state of the world's plants genetic resources](#) 1996
2. [FAO/IPGRI Genebank Standards](#) 1994
3. [李灵芝; 王丽娜; 马华英 基因库大豆种子繁殖更新阈值研究\[期刊论文\]-华北农学报](#) 2001 (03)
4. [Lawrence M J; Marshall D F; Davies P Genetics of genetic consorvation. I. Sample size when collecting germplasm](#) 1995
5. [Frankel O H; Brown A H D; Burden J J The conservation of plant biodiversity](#) 1995
6. [Russell J R; Fuller J D; Macaulay M Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs](#) 1997
7. [Tac K-L J; Perrino P; Spagnoletti Zeuli P L Rapid and nondestructive method for detecting composition change in wheat germplasm accessions\[外文期刊\]](#) 1992
8. [Roos E E Report of the storage committee working population on effects of storage on genetic integrity 1980-1983](#) 1984
9. [Del Rio A H; Bamberg J B; Huaman Z Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. I. Effects of seed increase](#) 1997
10. [Stoyanova S D Genetic shifts and variations of gliadins induced by seed aging](#) 1991
11. [Chebotar S; R\(oder M S; Korzun V Molecular studies on genetic integrity of open-pollinating species rye \(Secale cereale L.\) after long-term genebank maintenance\[外文期刊\]](#) 2003 (08)
12. [Parzies H K; Spoor W; Ennos R A Genetic diversity of barley landrace accessions \(Hordeum vulgare ssp. Vulgare\) conserved for different lengths of time in ex situ gene banks](#) 2000
13. [Engels J M M; Ramanatha Rao B Regeneration of seed crops and their wild relatives](#) 1998
14. [Sackville Hamilton N R; Chorhon K H Regeneration of accessions in seed collection](#) 1997
15. [张晗; 卢新雄; 张志娥 种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响\[期刊论文\]-植物遗传资源学报](#) 2005 (03)
16. [盖钧镒 植物种质群体遗传结构改变的测度\[期刊论文\]-植物遗传资源学报](#) 2005 (01)
17. [Cairns M J; Murray V Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels](#) 1994 (05)
18. [谢华; 常汝镇; 曹永生 利用中国秋大豆 \(Glycine max \(L.\) Merr\) 筛选SSR核心位点的研究\[期刊论文\]-中国农业科学](#) 2003 (04)
19. [国际种子检验协会 \(ISTA\) 国际种子检验规程](#) 1996

20. [夏冰;卢新雄;陈晓铃 利用SSR分子标记检测分析30份大豆种质遗传完整性](#)[期刊论文]-[大豆科学](#) 2007(03)
21. [Taramino G;Tingey S Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize](#) 1996
22. [Powell W;Morgante M;Andre C The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR\(microsatellite\)markers for germplasm analysis](#) 1996

引证文献(2条)

1. [张恩来, 徐福荣, 汤翠凤, 阿新祥, 杨雅云, 董超, 张斐斐, 徐安虎, 戴陆园 云南当前种植地方稻种SSR遗传多样性分析](#) [期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2011(6)
2. [乔燕祥, 周建萍, 田齐建, 穆志新 大豆种子老化过程中生理特性变化的研究](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2010(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201002013.aspx