

以种子贮藏蛋白多样性辅助筛选苜蓿育种亲本的研究

王照兰, 师文贵, 杜建材, 徐 柱, 田青松

(中国农业科学院 草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要:对田间表现较好的 42 份苜蓿种质材料(品种)进行了种子贮藏蛋白水平的遗传多样性分析,并以此为辅助依据筛选到特异苜蓿育种材料 2 份,可在苜蓿综合品种培育研究中作为优选亲本利用,为我国苜蓿种质资源的收集、保存、亲缘关系分析以及苜蓿品种鉴定等提供了重要依据。

关键词:苜蓿;种子贮藏蛋白;多样性;辅助筛选;育种亲本

中图分类号:SS4

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)S2-0005-05

Assistance selecting breeding parents of alfalfa using seed storage protein diversity mark

WANG Zhao-lan, SHI Wen-gui, DU Jian-cai, XU Zhu, TIAN Qing-song

(Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China)

Abstract: This paper described the seed storage protein diversity of 42 selected alfalfa materials. Special two of them, which can be used in synthetic breeding of alfalfa, were got by analysis of seed storage protein diversity. The result provides a better insight into alfalfa germplasm resources collection, protection and realistic reflection of the genetic relationships among varieties.

Key words: alfalfa; seed storage protein; diversity; assistance selection; breeding parents

苜蓿作为“牧草之王”,是全世界公认的最重要的豆科牧草。由于分布范围广,种类多,生态环境复杂,在其植物种间、种群间及品种间产生了很大的生态变异。世界发达国家已经在大量苜蓿种质资源收集和评价研究的基础上,培育出系列苜蓿品种营销世界各地,获得了经济效益。中国随着农业种植结构和产业结构的调整、国家西部开发退耕还草、生态治理工程的启动,以及草产业的发展,市场对优良苜蓿品种的需求十分迫切。我国苜蓿育种经过半个多世纪的努力,已经培育并审定登记了一批品种,在我国苜蓿生产中发挥了重要作用。但是,随着苜蓿在我国大面积的生产应用,国内苜蓿品种普遍暴露出产量低、再生能力差、品种之间差异小、品种特性不够突出等缺点;进口苜蓿品种以其产量高、再生力强等特点很快占领了国内市场。而生产应用表明,进口苜蓿

品种不仅种子价格昂贵,大部分品种抗逆性也不如国内品种。卢欣石^[1]、李拥军^[2]等对我国审定登记苜蓿品种遗传多样性的研究表明,中国苜蓿品种间缺少各自独立的遗传特性,具狭窄的遗传背景,这是阻碍中国品种表现特有的专一性优良特性的主要原因。改良我国审定登记苜蓿品种存在的问题,急需拓宽我国苜蓿育种材料所包含的基因源,而要实现这一目标,除从世界各国广泛收集和引进国外苜蓿种质外,国内野生状态下苜蓿种质资源的发掘和利用亦十分重要。新疆是中国苜蓿种类最多的省区,有 8 个种、2 个变种和 6 个变型,占我国苜蓿种质资源总量的 76.7%^[3,4]。卢欣石^[1]、毕玉芬^[5]等通过等位酶研究一致认为,新疆地区以相对较小的地域面积却蕴育着相对丰富的遗传变异。中国农业科学院草原所依靠国家牧草基因库的工作及国家重大项目的支

收稿日期:2004-09-18

作者简介:王照兰(1964-),女,副研究员,博士。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G2000018601)

持,广泛收集了国内外及我国新疆苜蓿种质资源.并用传统育种方法结合分子标记辅助鉴定进行了苜蓿种质资源评价、优良育种材料筛选及育种研究.目前,分子标记辅助鉴定育种材料的技术已发展到分子水平,如 RAPD、AFLP、ISSR 和 SSR 技术等.但各种技术在实际育种应用中都有其优点和局限性.种子贮藏蛋白(seed storage proteins, 简称 SSP)电泳是近年来应用较广泛的一种生化标记.除极少数例外,双子叶植物的贮藏蛋白主要为球蛋白,而单子叶植物胚乳中主要为谷蛋白和醇溶蛋白.有关苜蓿种子贮藏蛋白,国外科学家已对其成分、提取方法及电泳方法进行了探讨^[6].我国这方面的研究报道较少.有关我国野生种群或逸生类型苜蓿的种子贮藏蛋白研究,仅见于林清等^[7]在黄花苜蓿上的报道.与同功酶相比,种子贮藏蛋白取样方便,不受生长季节和环境条件的影响,多态性也相对较高,电泳结果稳定,不受环境、贮藏年限的影响.因而避免了同功酶活性受时空影响的局限性,这些优越性使种子贮藏蛋白电泳技术在遗传多样性检测的研究中得到了广泛的应用^[8].应用种子贮藏蛋白多样性辅助筛选苜蓿育种亲本的研究尚鲜见报道.

1 材料与方法

1.1 材料

以来自国外及我国新疆的 152 份苜蓿种质资源中田间评价表现较好的 42 份苜蓿种质材料(品种)为研究材料.实验在中国农业科学院草原研究所资源育种室进行.

1.2 方法

1.2.1 苜蓿种子贮藏蛋白的提取 取单粒种子放入 1.5 mL 离心管中,用玻璃棒碾碎,加 50 μ L 样品提取液混匀后,静置 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液置 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用.

1.2.2 电泳 采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法.电极缓冲液为 Tris-甘氨酸, pH 8.3.浓缩胶 3.4%,分离胶 12%.1%的考马斯亮蓝染色 4 h 以上,甲醇-乙酸脱色,直到带谱清楚为止.脱色后输入 GDS-8000 凝胶成像分析仪成像并进行统计.每份供试材料(品种)分析 18 粒单粒种子,42 份苜蓿材料共分析 756 个样品.

1.2.3 数据统计分析方法 蛋白单体相对分子质量的计算:根据已知相对分子质量的标准蛋白(marker)在相同电泳条件下的迁移率,作出分子质量和迁移率的标准曲线,然后测定待测蛋白单体迁移率以确

定其相对分子质量.

遗传参数计算方法:对电泳带谱进行统计时,把某一位点出现带者记为 1,未出现带者记为 0,根据 1 出现的次数计算各条带出现的频率.根据各单体出现的频率,按 Nei 方法计算相关遗传参数.

遗传距离的计算和聚类分析:根据各单体出现的频率,计算各材料(品种)间的欧氏遗传距离,在此基础上进行聚类分析.遗传距离和聚类分析均利用 SPSS 统计软件进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 材料(品种)种子贮藏蛋白单体组成及相对分子质量

本研究提取供试苜蓿材料(品种)种子贮藏蛋白,在变性条件下进行电泳,可检测到 30~40 个单体.对其中表现稳定、分辨率高的 33 个单体进行了出现频率的统计和相对分子质量的计算.单体分子在 21 800~93 300 之间.不同材料(品种)之间或同一材料(品种)内不同单粒种子的蛋白单体均有一定的多态性,不同材料(品种)间的差别是通过各材料内 18 个单粒种子贮藏蛋白单体出现的频率来体现.

2.2 不同材料(品种)各单体出现频率

对每份材料(品种)18 粒种子贮藏蛋白电泳结果进行统计,在 33 个被统计的单体中,单体 1、2、5、13、14、15、31、32、33 在所有材料(品种)中出现频率为 1,表明编码这些蛋白单体的基因位点是单态的(monomorphic),其余 24 个单体在材料(品种)之内和之间出现频率不同,表明编码这些单体的基因位点是多态的(polymorphic).有的单体在一些材料(品种)中呈单态,而在其他材料(品种)中表现为多态,如单体 6,在 105 号材料中表现为单态,在 101 号材料中表现为多态.

2.3 材料(品种)间种子贮藏蛋白的遗传参数分析

根据各供试材料种子贮藏蛋白单体出现频率,计算各材料的遗传参数(表 1).从表 1 可以看出来自北疆奇台的 22 号紫花苜蓿材料多态位点比例最高(66%),来自北疆福海的 25 号紫花苜蓿材料多态位点比例最低(34%).从基因多样性来看,北疆奇台 22 号材料基因多样性最高(0.388 1),北疆伊犁巩乃斯的 65 号材料,基因多样性最低(0.221 5),说明 65 号材料内基因一致性最高(0.778 5).

对 42 份供试苜蓿材料按新疆南疆、北疆及国外 3 个不同来源统计遗传参数,结果见表 2.从总基因多样性来看,42 份供试材料中的南疆苜蓿材料总基

表 1 供试 42 份苜蓿材料(品种)的遗传参数(SSP 标记)

Tab. 1 Genetic parameters of the 42 alfalfa germplasms based on SSP markers

代号	材料	全部位点数	多态位点比例 /%	基因多样性
5	紫花苜蓿	33	55	0.328 2
15	杂花苜蓿	33	43	0.275 3
20	紫花苜蓿	33	45	0.285 7
22	紫花苜蓿	33	66	0.388 1
25	紫花苜蓿	33	34	0.228 8
26	紫花苜蓿	33	48	0.254 6
27	紫花苜蓿	33	48	0.263 7
38	紫花苜蓿	33	52	0.309 9
39	紫花苜蓿	33	55	0.272 3
47	杂花苜蓿	33	42	0.242 4
61	紫花苜蓿	33	52	0.279 3
62	紫花苜蓿	33	48	0.284 7
63	杂花苜蓿	33	39	0.237 3
65	紫花苜蓿	33	36	0.221 5
78	紫花苜蓿	33	45	0.263 8
79	紫花苜蓿	33	55	0.346 4
82	紫花苜蓿	33	55	0.322 4
84	紫花苜蓿	33	48	0.283 4
86	紫花苜蓿	33	55	0.304 7
87	紫花苜蓿	33	52	0.309 3
88	紫花苜蓿	33	48	0.307 7
91	紫花苜蓿	33	48	0.287 5
98	紫花苜蓿	33	55	0.350 0
99	紫花苜蓿	33	42	0.264 5
101	紫花苜蓿	33	45	0.321 3
105	杂花苜蓿	33	45	0.276 4
107	杂花苜蓿	33	52	0.280 6
108	杂花苜蓿	33	42	0.252 2
111	紫花苜蓿	33	48	0.327 5
112	紫花苜蓿	33	45	0.334 4
114	紫花苜蓿	33	48	0.318 7
117	紫花苜蓿	33	52	0.364 9
118	紫花苜蓿	33	52	0.279 3
130	紫花苜蓿	33	42	0.274 6
133	紫花苜蓿	33	42	0.263 5
134	紫花苜蓿	33	55	0.342 7
135	紫花苜蓿	33	39	0.266 9
136	紫花苜蓿	33	45	0.268 6
139	紫花苜蓿	33	42	0.291 5
144	Norseman	33	52	0.319 9
145	Vernal	33	52	0.333 3
146	Ranger	33	39	0.309 4
平均值		33	48	0.293 7

表2 新疆南、北疆及国外不同来源供试苜蓿材料的遗传参数比较(SSP标记)

Tab. 2 Comparison of genetic parameters of the 42 alfalfas of different sources

材料来源	平均位点数	平均多态位点 比例 /%	材料(品种)内基因 多样性平均值 (Hs)	总基因一致性 (Jt)	总基因多样性 (Ht)	基因分化 系数 (Gst)
北疆材料	33	48.0	0.282 7	0.700 9	0.299 1	0.054 8
南疆材料	33	48.4	0.307 1	0.680 9	0.319 1	0.037 6
国外材料	33	46.0	0.295 0	0.693 2	0.306 8	0.038 5
总材料	33	47.7	0.293 7	0.691 6	0.308 4	0.047 7

因多样性($H_t = 0.319 1$)略高于北疆材料总基因多样性($H_t = 0.299 1$),但二者均与地理来源较大的国外材料($H_t = 0.306 8$)接近,反映出新疆南、北疆苜蓿种质材料均存在高度的遗传多样性。材料(品种)内平均基因多样性,也表现出相似的规律,充分肯定了在新疆南、北疆苜蓿材料(品种)中蕴藏着与地理来源较远的国外苜蓿种质相近的遗传多样性。从42份供试材料总体分析,总基因多样性为0.308 4,材料(品种)内基因多样性平均值 $H_s = 0.293 7$,表明供试苜蓿材料(品种)内总的遗传多样性较高。从基因分化参数 G_{st} 可知,北疆18份苜蓿材料基因分化系数($G_{st} = 0.054 8$)高于14份南疆材料($G_{st} = 0.037 6$),表明新疆北疆苜蓿材料之间的遗传差异较大。北疆苜蓿材料表现比较特殊,其遗传变异5.48%存在于材料(品种)之间,94.52%存在于材料(品种)内。而南疆材料遗传变异3.76%存在于材料(品种)之间,96.24%存在于材料(品种)内。10份来自国外材料的遗传变异3.85%存在于材料(品种)之间,96.15%存在于材料内。42份材料(品种)总基因分化系数(G_{st})为0.047 7,表明苜蓿的遗传变异主要存在于材料(品种)内(95.23%),材料(品种)间的遗传变异只占其总遗传变异的4.77%。

2.4 材料(品种)间的遗传距离和聚类分析

种子贮藏蛋白多态性反映了苜蓿基因组中编码这些蛋白质的基因的变异情况。因此,根据苜蓿种子贮藏蛋白电泳数据来计算材料(品种)间的遗传距离。可以比较准确地评价各材料(品种)的遗传变异情况,从而揭示它们的亲缘关系。

根据42份苜蓿种子贮藏蛋白电泳带谱统计数据,计算出欧氏遗传距离。来自伊朗的139号紫花苜蓿材料与来自北疆奇台的22号紫花苜蓿材料遗传距离最大(13.648),其次是南疆民丰91号材料与北疆奇台22号紫花苜蓿材料(13.569)。北疆奇台22号紫花苜蓿材料表现出与其他所有材料遗传距离均较大的特点,是一份较特殊的材料。来自俄罗斯的136号材料与北疆巩乃斯63号杂花苜蓿材料遗传距离

最小(2.818),其次是北疆巩乃斯63号杂花苜蓿材料与来自北疆巩乃斯的65号紫花苜蓿材料(2.914)。

42份苜蓿材料(品种)在欧氏遗传距离的基础上进行聚类分析,42份苜蓿材料可分成9组。第1组有11份材料,以北疆材料为主。有趣的是大部分杂花苜蓿聚到了同一组,表现出了与形态特征和农艺性状聚类相似的结果。第2组有15份材料,也是以北疆材料为主,在种子储藏蛋白水平上反映出的种质遗传特性与美国对照品种 Norseman 相近。第3组有8份材料,以南疆材料为主,表明来自南疆民丰、墨玉、库尔勒、疏附的材料亲缘关系较近。阿尔泰杂花苜蓿15号表现出与其他大多数杂花苜蓿不同的种质特性。新源5号和策勒98号2份材料聚为第4组,表明它们的亲缘关系较近。来自伊朗的139号材料,来自奇台的22号材料以及来自南疆民丰的86号、91号材料,分别独自聚类,表明它们之间有较大的遗传差异。来自和布的82号紫花苜蓿材料与来自美国的品种 Ranger 聚为一类,反映出它们较一致的种质遗传特性。

3 讨论

3.1 苜蓿材料(品种)遗传变异水平和遗传结构

苜蓿是典型的异交植物。其遗传多样性的高低和遗传结构受繁育体系的影响很大。本研究所用的苜蓿材料以我国新疆野生(逸生)状态下的苜蓿材料为主,也包括部分国外材料和少数国内外品种,由于材料分布地域广,表现出了较高的遗传多样性。供试42份苜蓿材料(品种)总遗传多样性($H_t = 0.308 4$),平均多态位点比例(47.7%)和品种内的基因多样性($H_s = 0.293 7$)均高于植物的平均值,也高于我国苜蓿地方品种,说明我国新疆苜蓿种质资源的遗传潜力较大,材料内的遗传变异幅度较大,材料的杂合性较高。从遗传结构来看,供试苜蓿种质均为多年生,材料(品种)总的遗传变异主要存在于材料(品种)内(材料内95.23%,材料间4.77%, $G_{st} = 0.047 7$),大多数材料间差异较小。南、北疆苜蓿材料不同的基因

分化系数(Gst 分别为 3.76% 和 5.48%)表明北疆苜蓿材料之间的遗传差异较大。卢欣石^[1]利用等位酶电泳技术对我国审定登记的 23 个苜蓿品种遗传多样性的研究表明,苜蓿的遗传变异主要来自品种内的变异,品种间有较高的一致性(相似性),品种内具较高的杂合性。本研究对苜蓿遗传变异及其遗传结构的分析,获得了与前人一致的结论。

3.2 不同苜蓿材料(品种)的亲缘关系

利用种子贮藏蛋白研究供试苜蓿材料(品种)获得了与形态特征和农艺性状大体一致的结果,如几份杂花种质总是一起聚类;南、北疆地理来源接近的材料,亲缘关系较近,有分别聚类倾向。但也有与形态特征和农艺性状聚类不同的结果,有些形态特征和农艺性状相近的材料,在种子储藏蛋白水平上聚类较远,表现出了形态特征和农艺性状评价难以检测到的变异。

3.3 种子贮藏蛋白多样性检测结果辅助筛选苜蓿综合品种培育适宜亲本的探讨

由于多年生苜蓿全部为异花授粉。紫花苜蓿天然异交率在 25%~75%之间,强制隔离自交结实率仅为 2.2%~15%。综合品种的培育辅之以适当的轮回选择一直是苜蓿杂种优势利用的主要途径,可大幅提高饲草和种子产量以及抗逆性。因此,在田间筛选的基础上,通过遗传多样性深入鉴定,选择农艺性状突出且遗传多样性丰富和遗传差异大的材料作为亲本,进行综合品种培育,理论上更有可能创造好的杂种优势和培育出好的苜蓿品种,具体育种效果有待进一步的研究。当然,苜蓿为异交植物,必需取一定样本大小的单粒种子,单株电泳,然后借助一定的数学方法统计分析,才能反映出各种质材料较为科学的遗传变异和遗传结构。另外,电泳槽的选择也很重要,垂直板的竖长槽,电泳时间可以较长,带谱分

离效果较好,检测到的单体位点较多;垂直板的横长槽,由于电泳迁移距离有限,电泳时间较短,样品的带谱往往不易分开,因此,在电泳结果中,谱带显示的单体位点较少,自然会影响种质遗传多样性的评价结果。本研究表明:来自北疆奇台的 22 号紫花苜蓿材料与其他所有材料的遗传距离均较远,其多态位点比例和基因多样性在所有材料中都最高,是一份特殊的紫花苜蓿材料,由于其田间农艺性状亦比较突出,可以在苜蓿育种研究中作为综合亲本之一优先利用。来自阿尔泰的 15 号杂花苜蓿材料表现出与其他杂花苜蓿材料较远的亲缘关系,而且其田间农艺性状在供试材料中最优,亦可作为优选亲本之一。

参考文献:

- [1] 卢欣石. 中国苜蓿遗传多样性及基因生态类型研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 1997.
- [2] 李拥军. 中国苜蓿地方品种亲缘关系的研究[J]. 草业学报, 1999, 8(1): 31~41.
- [3] 罗中, 催乃然. 新疆豆科牧草植物种质资源[J]. 新疆八一农学院学报, 1984, (1): 38~41.
- [4] 李捷, 张清斌, 杨刚. 中国苜蓿属植物与新疆苜蓿种质资源的优势[J]. 草地学报, 1997, 5(4): 286~291.
- [5] 毕玉芬. 论苜蓿属植物遗传多样性及其保护问题[J]. 国外畜牧学——草原与牧草, 1997, (4): 1~6.
- [6] DAVID A S, NELSEN J. Isolation and characterization of alfalfa 7s and 11s seed storage proteins[J]. Plant Physiol, 1988, (132): 129~133.
- [7] 于林清, 王照兰, 卢欣石, 等. 黄花苜蓿野生种群遗传多样性的初步研究[J]. 中国草地, 2001, 23(1): 23~25.
- [8] 王洪新, 胡志昂. 种子蛋白遗传多样性[A]. 生物多样性研究进展[C]. 1995. 502~507.

【责任编辑 周志红】