

人工老化对老芒麦醇溶蛋白遗传完整性的影响

黄帆 李俊 刘磊 李志勇 李鸿雁 师文贵 解永凤

(中国农业科学院草原研究所, 010010, 内蒙古呼和浩特)

摘要 以4份老芒麦种质为试验材料, 对其人工加速老化后种子活力及其醇溶蛋白的遗传完整性进行了分析。结果表明, 随着老化时间的延长, 老芒麦种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数逐渐降低, 其中供试材料的发芽势、活力指数均随发芽率的下降与对照呈极显著差异。与未老化的种子相比, 人工老化后种子醇溶蛋白的遗传完整性发生了明显变化。在发芽率降低为55%及以下, 育成品种川草1号、农牧由最初的2、3种谱带类型减少为仅表现1种谱带类型, 而2份野生材料较对照分别丢失了2~3种谱带类型。老芒麦醇溶蛋白谱带的遗传多样性指数分析结果也显示, 当发芽率低于55%时, 4份材料的等位基因数均与对照间呈显著差异。因此, 建议60%~70%作为老芒麦繁殖更新的参考发芽率标准, 最低临界值为55%。

关键词 老芒麦; 遗传完整性; 种子活力; 醇溶蛋白; 人工老化

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



遗传完整性指种质原始的遗传组成状态, 即在繁殖、保存过程中要使其群体的遗传结构得到完全的保持, 它的有效维持是种质安全保存的核心^[1]。老芒麦(*Elymus sibiricus* L.)是禾本科(Gramineae)披碱草属(*Elymus*)的模式植物, 为多年生疏丛型优良牧草, 也是重要粮食作物小麦的野生近缘种。其野生种质广泛分布于我国的西北、东北、华北等地区^[2], 全面搜集具有一定难度, 对搜集种质的安全保存研究具有重要意义。截至2017年底, 国家种质牧草中期库共保存披碱草属种质1522份, 其中老芒麦种质506份, 贮藏量较大。然而即使在4℃的库存条件下, 随着保存年限的增加, 种子依旧会发生不同程度的老化, 特别是种子贮藏蛋白的变化, 是种质遗传完整性丧失的直接表现。因此, 本研究以老芒麦的2份育成品种及2份野生种质为试验材料, 利用酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(A-PAGE), 对人工老化后种子活力及醇溶蛋白的遗传完整性变化进行研究, 以期对披碱草属牧草资源的安全保存及其种子的繁殖更新标准提供参考依据。

作者简介: 黄帆, 助理研究员, 主要从事牧草种质资源与育种研究
李志勇为通信作者, 研究员, 主要从事牧草种质资源与利用研究

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(1610332018020); 农作物种质资源保护项目(2018NWB045); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-IGR-2015-04)

收稿日期: 2018-11-01; **修回日期:** 2019-06-20

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取2个育成品种及2个野生种质的老芒麦作为供试材料, 其种子来自中国农业科学院草原研究所国家种质牧草中期库。2013年将4个材料种植于中国农业科学院草原研究所沙尔沁农牧交错试验示范基地, 并于2015年收获种子(表1)。

表1 供试材料
Table 1 Testing materials

编号 Number	种质名称 Germplasm name	种质类型 Germplasm type	选育单位/原产地 Breeding unit/Origin
G1	农牧	育成品种	内蒙古农业大学
G2	川草1号	育成品种	四川省草原科学研究所
G3	05189	野生材料	新疆乌鲁木齐
G4	05191	野生材料	西藏拉萨

1.2 人工老化处理

在人工老化处理前, 将所有供试种子在湿度75%、温度25℃的条件下进行7d种子含水量平衡处理。平衡处理结束后, 将种子用铝箔袋密封分装, 在25℃条件下继续平衡2d后再做老化处理。采用高温高湿法(温度45℃, 湿度80%)进行人工老化。通过7~14d的老化处理分别得到4份老芒麦材料和3个发芽率梯度(80%~85%、45%~55%、<30%)组合的12份老化种子, 以其对应的4份未经处理的发芽率>90%的种子作为对照。人工老化

处理顺序采用倒序法，即先处理老化时间最长的种子，最后处理老化时间最短的种子。

1.3 种子活力检测

老化后种子的活力检测参照牧草种子检验规程 (GB 2930.4-2001) [3]，测定种子 100 粒，3 次重复，取平均值。温度设为 25℃，第 5 天统计发芽势，第 10 天统计发芽率，同时计算发芽指数、活力指数。各项指标计算方法如下：

发芽势 (%) = $n/N \times 100\%$ 。式中， n 为前 5d 发芽的种子数； N 为供试种子数。

发芽率 (%) = $n/N \times 100\%$ 。式中， n 为发芽种子粒数； N 为供试种子数。

发芽指数 (GI) = $\sum G_n/D_n$ 。式中， G_n 为 n 天的发芽种子数； D_n 为发芽天数。

活力指数 (VI) = $GI \times S$ 。式中， GI 为发芽指数； S 为幼苗重 (g)。

1.4 醇溶蛋白谱带分析

对老化后种子进行横切，带胚端发芽，若发芽则选取另外半粒种子提取醇溶蛋白。4 份对照及 12 份老化处理的种子，每份选取 70 粒种子进行单粒醇溶蛋白的提取。采用 A-PAGE 进行醇溶蛋白谱带分析，蛋白提取及分析方法参照国际种子检查协会发布的标准程序 [4]。

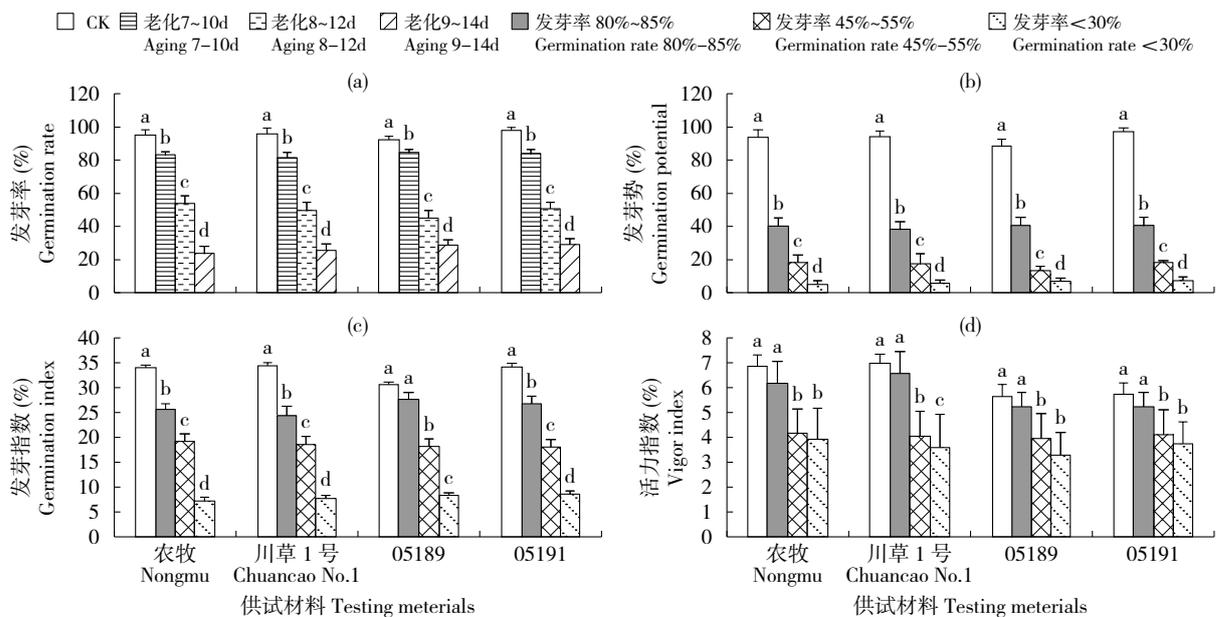
1.5 数据处理

应用 SAS 8.0 软件进行种子活力的差异分析，采用 POP-GENE 1.32 软件进行醇溶蛋白电泳谱带遗传多样性指数的统计分析。

2 结果与分析

2.1 人工老化对老芒麦种子活力的影响

由图 1 所示，随着老化时间的增加，老芒麦种子的发芽率呈显著下降趋势，其发芽势、发芽指数、活力指数均随发芽率的下降而明显下降。4 个老芒麦材料的种子发芽率不同所需老化时间不同，育成种较野生种所需老化时间稍长，表明育成种的种子较野生种的种子具有更强的抗老化能力。供试材料的发芽势均随发芽率的下降而显著下降。除野生材料 05189 的发芽指数在对照与发芽率为 80%~85% 之间无显著差异以外，其他 3 个材料的发芽指数均随人工老化处理呈显著的下降趋势。活力指数方面，所有供试材料发芽率降低为 55% 以下群体与对照差异显著，发芽率 80%~85% 群体与对照无显著差异；发芽率低于 30% 后，除川草 1 号外，其他材料与发芽率 45%~55% 群体的活力指数均无显著差异，说明发芽率 45%~50% 为活力指数下降的关键节点。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)
Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 1 人工老化对老芒麦种子活力的影响
Fig.1 Effects of artificial aging on seed vigor of *Elymus sibiricus* L.

2.2 人工老化对老芒麦种子醇溶蛋白谱带类型的影响

对 4 个材料醇溶蛋白谱带类型进行编号, 依次命名为 I、II、III、IV、V、VI 等 (图 2), 统计每个供试材料老化至 80%~85%、45%~55%、<30% 3 个发芽率梯度, 根据谱带类型出现数量计算其出现频率。结果 (图 2) 显示, 育成品种农牧仅包含 2 种谱带类型, 而育成品种川草 1 号包含 3 种谱带类型。2 个野生材料分别包含 6、7 种谱带类型。醇溶蛋白的每种谱带类型代表 1 种生物型, 仅含 1 种谱带类型的种质属于遗传上同质种质, 而含有 2 种及以上谱带类型的种质属于遗传上异质种质^[5]。因此, 本研究供试材料均属于遗传上异质种质。表 2 结果显示, 随老化时间的增加、发芽率的降低, 供试材料醇溶蛋白谱带的带型数量均呈梯度下降, 特异性条带出现的频率也随之降低。当发芽率降低至

80%~85%, 育成品种农牧原出现频率较低的 1 类带型消失, 在发芽率降低至 55% 及以下, 2 份育成品种仅表现 1 种谱带类型, 野生材料 05189 较对照减少了 2 种谱带类型, 而 05191 较对照减少了 3 种谱带类型 (表 2)。

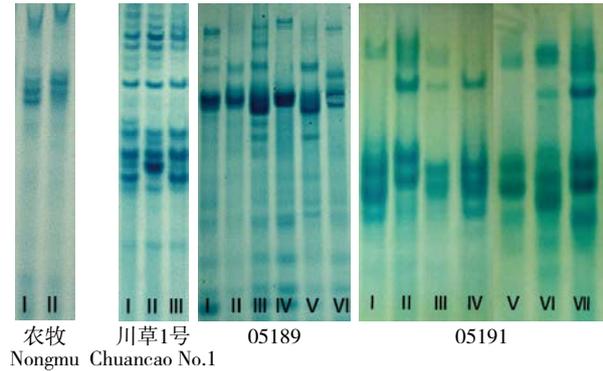


图 2 人工老化对老芒麦醇溶蛋白谱带类型的影响
Fig.2 Effects of artificial aging on the gliadin spectrum types of *Elymus sibiricus* L.

表 2 人工老化对老芒麦醇溶蛋白谱带类型及频率的影响
Table 2 Effects of artificial aging on the gliadin spectrum types and frequency of *Elymus sibiricus* L.

编号 Number	发芽率 (%) Germination rate	带型数 Number of gliadin spectrum type	各带型频率 Frequency of gliadin spectrum type (%)						
			I	II	III	IV	V	VI	VII
G1-CK	95.3	3	85.15	10.21	4.64	-	-	-	-
G1-1	83.2	2	71.37	28.63	-	-	-	-	-
G1-2	53.9	1	100.00	-	-	-	-	-	-
G1-3	23.7	1	100.00	-	-	-	-	-	-
G2-CK	95.9	2	83.95	16.05	-	-	-	-	-
G2-1	81.6	2	73.28	26.72	-	-	-	-	-
G2-2	49.6	1	100.00	-	-	-	-	-	-
G2-3	25.7	1	100.00	-	-	-	-	-	-
G3-CK	92.3	6	75.44	3.33	12.33	3.46	3.33	2.11	-
G3-1	84.7	5	87.22	4.89	2.25	2.67	2.97	0.00	-
G3-2	44.1	4	82.53	4.44	6.36	6.67	0.00	0.00	-
G3-3	28.6	4	88.95	2.55	1.36	7.14	0.00	0.00	-
G4-CK	98.1	7	78.46	5.26	2.26	2.22	4.95	3.33	3.52
G4-1	84.0	6	79.21	7.89	3.22	3.67	3.08	2.93	0.00
G4-2	50.8	4	83.58	5.44	4.31	6.67	0.00	0.00	0.00
G4-3	29.3	4	89.95	6.57	2.38	1.10	0.00	0.00	0.00

注: 编号 G1-G4 同表 1, 1 代表发芽率 80%~85%, 2 代表发芽率 45%~55%, 3 代表发芽率 <30%, 下同。“-”代表未出现此类型条带。“0.00”代表没有条带

Note: G1-G4 are the same as table 1, 1 stands of germination rate of 80%~85%, 2 stands of germination rate of 45%~55%, 3 stands of germination rate of <30%, the same below. "-" represents absence of this type of gliadin spectrum. "0.00" represents no spectrum

2.3 人工老化对老芒麦种子醇溶蛋白遗传多样性指数的影响

随发芽率的降低, 4 个老芒麦材料的等位基因数、有效等位基因数、多样性指数及香农指数均呈下降趋势。其中, 当种子发芽率 <55% 后, 所有供

试材料的等位基因数与对照间均差异显著, 2 个育成品种的多样性指数与对照呈显著差异, 而 2 个野生材料的多样性指数各发芽率梯度间无显著差异。在有效等位基因数及香农指数方面, 4 份材料均无显著差异 (表 3)。

表 3 老芒麦醇溶蛋白谱带的遗传分析
Table 3 Genetic analysis of gliadin spectrum types of *Elymus sibiricus* L.

编号 Number	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	多样性指数 H_e	香农指数 I
G1-CK	1.4344 ± 0.0095	1.4110 ± 0.0019	0.2147 ± 0.0057	0.2966 ± 0.0020
G1-1	1.3753 ± 0.0389	1.4035 ± 0.0051	0.2104 ± 0.0059	0.2881 ± 0.0066
G1-2	1.3616 ± 0.0401 [*]	1.4022 ± 0.0072	0.2013 ± 0.0064 [*]	0.2846 ± 0.0058
G1-3	1.3603 ± 0.0352 [*]	1.3917 ± 0.0130	0.2001 ± 0.0056 [*]	0.2817 ± 0.0080
G2-CK	1.4385 ± 0.0056	1.4099 ± 0.0047	0.2107 ± 0.0054	0.2971 ± 0.0034
G2-1	1.4299 ± 0.0030	1.4080 ± 0.0061	0.2090 ± 0.0069	0.2909 ± 0.0041
G2-2	1.4164 ± 0.0064 [*]	1.4056 ± 0.0052	0.1945 ± 0.0067 [*]	0.2874 ± 0.0064
G2-3	1.4095 ± 0.0083 [*]	1.3954 ± 0.0118	0.1921 ± 0.0054 [*]	0.2847 ± 0.0081
G3-CK	1.4416 ± 0.0026	1.3438 ± 0.0041	0.1987 ± 0.0044	0.2824 ± 0.0049
G3-1	1.4365 ± 0.0047	1.3423 ± 0.0021	0.1971 ± 0.0049	0.2774 ± 0.0026
G3-2	1.4178 ± 0.0051 [*]	1.3393 ± 0.0017	0.1939 ± 0.0054	0.2745 ± 0.0034
G3-3	1.4117 ± 0.0088 [*]	1.3372 ± 0.0039	0.1930 ± 0.0050	0.2693 ± 0.0043
G4-CK	1.6596 ± 0.0079	1.4415 ± 0.0036	0.2397 ± 0.0071	0.3703 ± 0.0052
G4-1	1.6537 ± 0.0078	1.4364 ± 0.0025	0.2366 ± 0.0058	0.3655 ± 0.0062
G4-2	1.6371 ± 0.0089 [*]	1.4300 ± 0.0102	0.2338 ± 0.0061	0.3639 ± 0.0073
G4-3	1.6296 ± 0.0062 [*]	1.4298 ± 0.0109	0.2302 ± 0.0081	0.3610 ± 0.0080

注: “*” 表示在 0.05 水平差异显著

Note: “*” means significantly different at 0.05 level

3 讨论

确保种质遗传完整性, 即群体遗传结构的稳定, 是种质资源安全保存的核心。牧草种质资源丰富, 且多为异花授粉, 遗传上异质种质材料居多。而异质种质因更易受到发芽率低、遗传漂变、高异交度等因素的影响, 使其遗传完整性较难保存^[6]。种子的自然老化过程需经历较长年限, 在人为控制的高温高湿条件下加速老化, 并短期内对种子活力变化进行研究, 已被广泛认为是一种研究种子劣变规律的有效途径, 也是国际种子检验协会活力测定委员会推荐的 8 种活力测定方法之一。

种子活力是检测种子质量的重要指标, 与种子田间出苗率密切相关, 同时它又是植物生命过程的重要特性之一, 与种子成熟、萌发、贮藏及老化等生理过程有密切联系。发芽率是反映种子活力变化最为可靠和直接的指标, 与种子活力呈正相关。种子老化最直接的表现就是发芽率的降低。有研究表明, 在种子老化过程中, 发芽率的下降过程普遍呈现先慢后快的规律^[7], 本研究中发现种子发芽率由初始的 90% 以上下降为 80%~85% 需要的老化时间较长, 需经历 7~10d; 而发芽率由 45%~55% 下降为 <30%, 经历的老化时间很短, 仅 1~2d。

麦类植物种子的醇溶蛋白组成由遗传因素决定, 具有复杂的多态性, 其谱带分析能够简便、快速地鉴定种质资源材料。为此, 醇溶蛋白分析不

仅应用于种质资源鉴定^[8-9]、种质资源遗传多样性研究^[10-12], 也较多地应用于种质资源的遗传完整性研究^[13]。早在 20 世纪 90 年代初保加利亚学者 Stoyanova^[5] 对萨多沃 1 号小麦 (*Triticum aestivum* L.) 群体的遗传完整性进行过一系列研究, 发现此品种群体经老化处理后, 在发芽率较低时, A 型和 C 型谱带纯系群会从原有的 A、B、C、D 4 种类型蛋白谱带纯系群中消失, 当发芽率下降到 30% 以下, 仅剩大部分 B 型谱带和极个别 D 型谱带的纯系群, 表明老化使得小麦种质的遗传完整性发生变化, 导致了群体内的异质性下降, 这与国内众多学者^[14-15] 的研究结果一致。王欣欣等^[16] 采用 30 粒种子混合提取醇溶蛋白的方法, 通过对醇溶蛋白谱带进行分区, 同样对 4 份老芒麦种质醇溶蛋白的遗传完整性进行了研究, 发现种子发芽率降低到 30% 左右时, 部分区域的蛋白谱带消失。本研究结果显示, 伴随发芽率的降低, 供试老芒麦种质醇溶蛋白谱带的带型数量均呈下降趋势, 特异性条带出现的频率也随之降低。与王欣欣等^[16] 的结果不同的是, 本试验结果发现在发芽率下降为 45%~55%, 蛋白谱带数量的下降趋势最为明显, 这可能是由于单粒与混合提取蛋白进行谱带分析存在差异性导致的。同时, 老芒麦醇溶蛋白谱带遗传多样性指数的分析结果也表明, 随发芽率的降低, 供试材料的等位基因数、有效等位基因数、多样性指数及香农指数均呈下降趋势, 多项遗传完整性研究^[17-18] 的结果同样呈现

了这一规律,说明老化后的种质资源群体内遗传变异性下降,某些等位基因可能减少或丢失,特别是育成品种中某些稀有、特殊的等位基因由于老化而从群体内消失,是种质资源保存的巨大损失。

因此,繁殖更新时的发芽率标准对种质资源的有效、安全保存是重要的参照指标。联合国粮农组织国际植物遗传资源研究所推荐发芽率85%作为更新繁殖的生活力指标,其最低临界值为65%^[19]。

4 结论

从老化对老芒麦种子活力、醇溶蛋白谱带类型及其遗传多样性指数的影响进行了系统分析,发现发芽率在45%~55%,老芒麦的遗传完整性与对照呈显著差异,据此建议发芽率为60%~70%作为繁殖更新的参考生活力标准,最低临界值为55%。

参考文献

- [1]盖钧镒.植物种质群体遗传结构改变的测度.植物遗传资源学报,2005,6(1):1-8,14.
- [2]郭本兆.中国植物志.北京:科学出版社,1987.
- [3]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.中华人民共和国国家标准:GB 2930.4-2001,牧草种子检验规程.北京:中国标准出版社,2001.
- [4]Draper S R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986. Seed Science and Technology, 1987, 15(1):431-434.
- [5]Stoyanova S D. Genetic shifts and variations of gliadins induced by seed aging. Seed Science and Technology, 1991, 19(2):363-371.
- [6]马延飞,卢新雄,陈晓玲,等.基于SSR标记的30份玉米种质遗传完整性分析.植物遗传资源学报,2007,8(4):387-391.
- [7]陈志德,王州飞,刘永惠,等.花生种子人工老化对萌发期种子活力的影响.江苏农业学报,2011,27(6):1411-1413.
- [8]刘皋芑,高翔,杨明明,等.小麦-簇毛麦易位系中贮藏蛋白的鉴定及分析.西北农业学报,2016,25(9):1304-1310.
- [9]杨延兵,王海莲,秦岭,等.利用SDS-PAGE鉴定不同地区谷子籽粒醇溶蛋白差异.华北农学报,2010,25(6):87-91.
- [10]吴珊.长穗偃麦草醇溶蛋白的遗传多样性分析.河南农业科学,2016,45(3):34-38.
- [11]郭超,刘红,陈新宏,等.部分美国小麦种质资源醇溶蛋白遗传多样性分析及其亚基对品质性状的影响.植物遗传资源学报,2014,15(6):1173-1181.
- [12]姜小苓,张自阳,李小军,等.301份小麦种质醇溶蛋白遗传多样性及其与品质性状的相关性分析.中国粮油学报,2017,32(11):14-20.
- [13]张自阳,马景周,王智煜,等.人工老化对小麦种子活力及醇溶蛋白组成的影响.种子,2017,36(8):42-47.
- [14]王芳,卢新雄,马晓岗,等.基于醇溶蛋白的20份大麦种质资源遗传完整性分析.麦类作物学报,2007,27(4):607-612.
- [15]张自阳,姜小苓,王娟娟,等.人工老化处理对小麦种子活力和醇溶蛋白、麦谷蛋白组成的影响.河南农业科学,2014,43(2):24-27.
- [16]王欣欣,卢萍,李鸿雁,等.种子老化影响老芒麦种子醇溶蛋白遗传完整性的研究.种子,2016,35(5):13-17.
- [17]宿宇,王建光,卢新雄. AFLP分析人工老化对扁蓊豆遗传完整性的影响.草地学报,2012,20(1):125-129.
- [18]王栋,张志娥,陈晓玲,等. AFLP标记分析生活力影响大豆中黄18种质遗传完整性.作物学报,2010,36(4):555-564.
- [19]FAO/IPGRI. Genebank Standards. FAO/IPGRI, Rome, 1994:1-13.

Effects of Artificial Aging on Genetic Integrity of *Elymus sibiricus* L.

Huang Fan, Li Jun, Liu Lei, Li Zhiyong, Li Hongyan,
Shi Wengui, Xie Yongfeng

(Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010010, Inner Mongolia, China)

Abstract The effects of artificial aging on seed vigor and genetic integrity of gliadin in four *Elymus sibiricus* L. accessions were studied. The results showed that the germination rate, germination potential, germinating index and vigor index of the *Elymus sibiricus* L. seeds decreased gradually with the aging time prolonging, the germination potential and vigor index of 4 materials were highly significantly different from CK with the decrease of germination rate among them. The genetic integrity of gliadin also changed obviously compared to CK. Two and three types of gliadin spectrum of varieties *Elymus sibiricus* L. cv. Chuancao No.1 and *Elymus sibiricus* L. cv. Nongmu were reduced to only 1 type while the types of gliadin spectrum of 2 wild accessions decreased most obviously than CK when the germination rate reduced to about 55%. The genetic diversity index analysis on gliadin spectrum of *Elymus sibiricus* L. also showed the allele number of 4 materials was significantly different from that of the control when the germination rate was less than 55%. Therefore, it is recommended that 60%~70% as the reference standard of germination rate for renewing *Elymus sibiricus* L. by reproduction and the lowest critical value is 55%.

Key words *Elymus sibiricus* L.; Genetic integrity; Seed vigor; Gliadin; Artificial aging