

栽培荞麦种子醇溶蛋白遗传多样性分析

杨玉霞¹, 蒋召雪², 胡平¹, 安金玲¹, 周先建¹, 夏燕莉¹
(¹四川省中医药科学院, 成都 610041; ²西昌学院, 四川西昌 615013)

摘要:利用 A-PAGE(Acid-polyacrylamide gel electrophoresis)对来源于7个国家的76份栽培荞麦(苦荞54份, 甜荞22份)醇溶蛋白遗传多样性进行评价。结果表明, 荞麦醇溶蛋白位点存在丰富的等位变异, 共分离出18条迁移率不同的谱带, 每份材料具有6~12条不等, 平均9.5条, 多态性带占88.89%。材料间平均遗传相似系数(GS)为0.777, 变幅为0.389~1.000。在GS为0.63的水平上, 供试材料可聚为苦荞和甜荞2大类, 绝大部分来自于相同或相似生态地理环境的材料聚成一类, 表明荞麦醇溶蛋白所揭示的遗传关系与地理来源有较高的相关性。

关键词:苦荞; 甜荞; 醇溶蛋白; 遗传多样性; 聚类分析; A-PAGE

中图分类号: S517

文献标志码: A

论文编号: 2011-0700

Analysis on Genetic Diversity of Seeds Prolamine in Cultivated Buckwheat

Yang Yuxia¹, Jiang Zhaoxue², Hu Ping¹, An Jinling¹, Zhou Xianjian¹, Xia Yanli¹

(¹Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041;

²Xichang College, Xichang Sichuan 615013)

Abstract: The genetic diversity of prolamine among 76 cultivated buckwheat accessions (54 accessions of tartary buckwheat, 22 accessions of common buckwheat) from 7 countries were analyzed by A-PAGE. A total of 18 prolamine bands were separated by electrophoresis. The abundant variations of prolamine were observed, and 18 prolamine bands were detected, ranging from 6 to 12 bands per accession with the average of 9.5, among which 88.89% bands were polymorphic. The genetic similarity (GS) varied from 0.389 to 1.000, with the average of 0.777. The cluster analysis showed that all the accessions could be clustered into two groups at GS 0.63 level: tartary buckwheat and common buckwheat. Moreover, the accessions from the same origin frequently could be divided into one group, which indicated that there was a significantly positive correlation between genetic differentiation and geographical habits among the cultivated buckwheat.

Key words: tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*); common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*); prolamine; genetic diversity; cluster analysis; A-PAGE

0 引言

荞麦为蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*)植物, 集营养、保健、医疗于一身, 主要有苦荞和甜荞2个栽培种。多年来, 国内外学者曾利用形态学^[1-3]、同工酶^[4-6]及分子标记^[7-17]等对荞麦遗传多样性进行了研究, 结果发现荞麦资源遗传多样性较为丰富。

目前, 对荞麦种子蛋白的研究主要集中在其结构、组成、制备和功能性质等方面, 对荞麦籽粒蛋白进行遗

传多样性的研究报道甚少。蛋白质作为基因的直接稳定产物, 能反映生物DNA组成上的差异, 已广泛用于种质鉴定^[18]、种子纯度检验^[19]、植物起源与演化研究^[20]和遗传多样性分析^[21]。研究荞麦蛋白质的多样性, 有助于对荞麦进行分类鉴定、品质分析和生化分析, 对荞麦的分子遗传改良育种研究具有重大的指导意义。分析不同荞麦品种籽粒蛋白质组分谱带差异变化, 研究其多态性, 能为开拓荞麦潜在食用营养价值以及种质

基金项目: 四川省教育厅青年基金“苦荞麦遗传多样性研究”(2006B019)。

第一作者简介: 杨玉霞, 女, 1980年出生, 四川乐山人, 博士, 主要从事中药材遗传育种、资源评价与利用等。通信地址: 610041 四川省成都市人民南路四段51号 四川省中医药科学院, Tel: 028-85255011, E-mail: yangyuxia-7@163.com。

收稿日期: 2011-03-18, 修回日期: 2011-05-20。

鉴定和优化提供基础资料。因此,本研究拟采用 A-PAGE 技术,对来自 7 个不同国家的栽培荞麦进行醇溶蛋白遗传多样性分析,探讨甜荞和苦荞醇溶蛋白谱带差异,以期为荞麦品种鉴定、遗传育种及群体遗传结构提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为来自 7 个国家的 76 份栽培荞麦(苦荞

54 份;甜荞 22 份),见表 1。其中,56 份由美国种质资源库(Germplasm Resources Information Network, GRIN)Dr. Croston 惠赠,‘川荞 1 号’、‘川荞 2 号’、‘西荞 1 号’、‘九江苦荞’、TBX 005 和 TBX 006 由西昌学院科技处王安虎老师提供,TBX 009、CBX 001 由西藏农科所刘仁建提供,其余为自己收集。

1.2 方法

根据 ISTA 1986 年颁布的 A-PAGE (pH3.1)电泳程

表 1 供试材料编号及来源

种	来源地	材料编号/名称	材料数
苦荞	不丹	PI 481645, PI 481646, PI 481647, PI 481648, PI 481649, PI 481650, PI 481651, PI 481652, PI 481653, PI 481654, PI 481655, PI 481656, PI 481658, PI 481660, PI 481661, PI 481644, PI 481662, PI 481663, PI 481664, PI 481665, PI 481666, PI 481667, PI 481668, PI 481669, PI 481671, PI 481672, PI 481673, PI 481674, PI 481675	29
	中国	川荞 1 号, 川荞 2 号, 西荞 1 号, 九江苦荞, TBX 001, TBX 002, TBX 003, TBX 004, TBX 005, TBX 006, TBX 007, TBX 008, TBX 009, TBX 010, TBX 011, TBX 012, TBX 013	17
	墨西哥	PI 451723	1
	尼泊尔	PI 427235, PI 427237, PI 427238, PI 427239	4
	美国	PI 199769, PI 476852, PI 503879	3
	甜荞	不丹	PI 481628, PI 481629, PI 481630, PI 481632, PI 481635, PI 481637, PI 481638, PI 481639, PI 481642, PI 481643
	中国	CBX 001, CBX 002, CBX 003	3
	尼泊尔	PI 427236	1
	俄罗斯	PI 280831, PI 280832, PI 633689	3
	美国	PI 600909, G 24776	2
	津巴布韦	PI 482595, PI 482596, PI 482597	3

注:PI 编号的材料为 GRIN 提供, TBX、CBX 编号的材料为中国的材料,下同。

序(稍加改进)分析荞麦醇溶蛋白。每份材料取单粒种子称重,用样品钳夹碎,放入 0.5 mL 离心管中,按 1 mg 加 2 μL 的比例加入样品提取液(含 2-氯乙醇 25%, 甲基绿 0.05%, 巯基乙醇 1%),室温浸提过夜,加样前 10000 r/min 离心 10 min,取上清液加样。采用连续分离系统,电泳仪为 Bio-Rad 公司的 PROTEAN II Xiell 型电泳槽。电泳条件为恒压 300 V,额定电流 18 mA,电泳时间为前沿指示剂甲基绿迁移至板底为止。电泳结束后,每块胶用染色液(含 1%考马斯亮兰 5 mL, 10%三氯乙醇 200 mL)染色过夜,7%冰乙酸脱色并保存结果,拍照,统计。

每份材料取 2~3 粒种子进行重复试验,另随机抽取 4 份材料,每份材料取 10 粒种子分别处理,重复试验以检验其电泳条带是否一致。由于来自不丹的 PI 253529 和中国的 CBX 001 的醇溶蛋白条带多,且较清晰,故以这 2 份材料作对照。

1.3 统计分析

按条带有无对每份材料进行统计,条带存在时赋

值为 1, 否则为 0。遗传相似系数(genetic similarity, GS)按 Nei^[22]的方法: $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_i 为材料 i 出现的条带数, N_j 为材料 j 出现的条带数。 N_{ij} 为材料 i 和 j 共有的条带数。利用 GS 按不加权重对群算术平均法(UPGMA)进行聚类分析。统计分析采用 NTSYS-pc2.1 软件。

2 结果与分析

2.1 供试材料醇溶蛋白的多态性

各重复间的电泳图谱,除个别极弱谱带(未统计)外均表现一致。图 1 为部分材料的醇溶蛋白电泳图谱。试验结果表明,76 份供试材料醇溶蛋白电泳图谱表现出较大遗传变异,表现在各材料间电泳图谱带型上具有数量、位置和染色深浅不同的带纹。76 份材料共出现了 18 条谱带(多态性带占 88.89%)、32 种醇溶蛋白带型,可见栽培荞麦醇溶蛋白位点存在着较为丰富的遗传变异。每份材料可分离出谱带数目的变幅为 6~12 条,平均 9.5 条。根据迁移率的不同可将电泳谱带分为 2 区域,集中在图谱上端的谱带为慢速电泳区

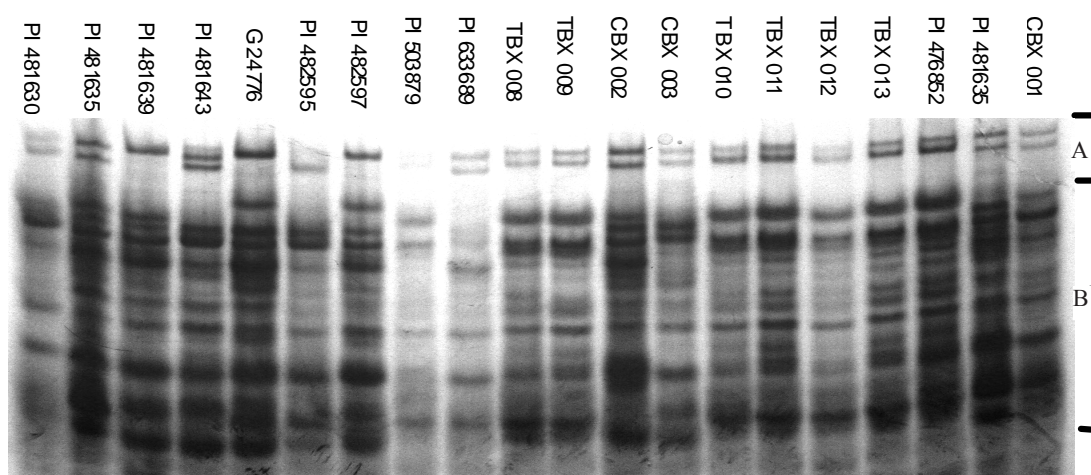


图1 部分材料的醇溶蛋白图谱

(A区),共3条谱带;集中在图谱下端的为快速电泳区(B区),共15条谱带。

2.2 供试材料醇溶蛋白遗传相似性分析

76份供试材料醇溶蛋白遗传相似系数GS值变异范围在0.389~1.000之间,平均为0.777,进一步说明供试材料醇溶蛋白具有丰富的遗传多样性。其中,苦荞和甜荞变异范围分别为0.667~1.000、0.389~0.944,其平均值分别为0.886、0.681。苦荞和甜荞种间遗传相似系数为0.664,表明栽培荞麦种间遗传差异较大,且甜荞种内遗传差异比苦荞的大。苦荞和甜荞各国内和国家间平均遗传相似系数列于表2(墨西哥苦荞、尼泊尔甜荞仅1份,未列出)。从表2中可以看出,苦荞不同

国家内遗传相似系数变幅为0.815~0.935,平均值0.883。来自美国的苦荞遗传多样性水平相对较高,GS平均值0.815,而来自尼泊尔的则相对较低,平均GS值0.935。不同国家间的平均GS值为0.878,变异范围为0.852~0.928。不丹与尼泊尔苦荞间GS值最高(0.928),表明这两国间苦荞材料亲缘关系最近。不丹和美国间GS值为0.852,表明不丹和美国间苦荞材料的亲缘关系最远。此外,比较不同国家内和国家间间的GS值还可以发现,不同国家间的平均GS值低于国家内的平均GS值,说明苦荞国家间遗传多样性大于国家内遗传多样性。

不同国家内和国家间甜荞醇溶蛋白遗传相似系数

表2 不同国家内和国家间栽培荞麦醇溶蛋白遗传相似系数平均值

	苦荞				甜荞					
	不丹	中国	尼泊尔	美国	不丹	中国	俄罗斯	美国	津巴布韦	
不丹	0.913				不丹	0.756				
中国	0.873	0.868			中国	0.600	0.741			
尼泊尔	0.928	0.883	0.935		俄罗斯	0.711	0.599	0.593		
美国	0.852	0.857	0.875	0.815	美国	0.728	0.667	0.741	0.778	
					津巴布韦	0.681	0.574	0.593	0.685	0.778

和苦荞类似。甜荞各国内遗传相似系数变幅为0.593~0.778,平均值0.729。俄罗斯的甜荞遗传差异最大,中国的次之,美国 and 津巴布韦的遗传差异最小。各国间的平均GS值为0.658,变异范围为0.574~0.741。美国与俄罗斯甜荞间的GS值最高为0.741,表明这两国间甜荞材料亲缘关系最近。津巴布韦和中国甜荞的遗传差异最大,GS值为0.574,表明这国间的亲缘关系最远。甜荞国与国间的平均GS值低于国内的平均GS值,说明甜荞国与国间遗传多样性大于国内遗传多样

性。

2.3 聚类分析

采用UPGMA法对供试材料进行聚类分析(图2)。可以看出,在GS为0.63水平上所有材料明显分为苦荞和甜荞2大类。第I类由PI 481645、PI 481675、TBX 013等54份苦荞和PI 280831等5份甜荞组成。这1大类进一步分为3个亚类: I a包括了所有的苦荞及来自俄罗斯的PI 280831、美国的G 24776等2份甜荞; I b由中国的CBX 003和尼泊尔的PI

427236等2份甜荞组成;来自中国的甜荞CBX 001和CBX 002组成亚类 I c。第 II 类由 PI 481635、PI 481637等16份甜荞组成,可分为2个亚类:来自津巴布韦的3份甜荞聚为 II b,其余的13份聚为 II a。从图2可知,绝大多数来源相同的材料能聚在一起,表明聚

类结果与地理来源有密切的关系。同时,材料间遗传相似程度大小在不同的来源地有所不同,例如不丹的材料在聚类图上排列较为集中,而中国、美国、尼泊尔等国材料则比较分散,这与根据来源地分析遗传相似性的结果相一致。

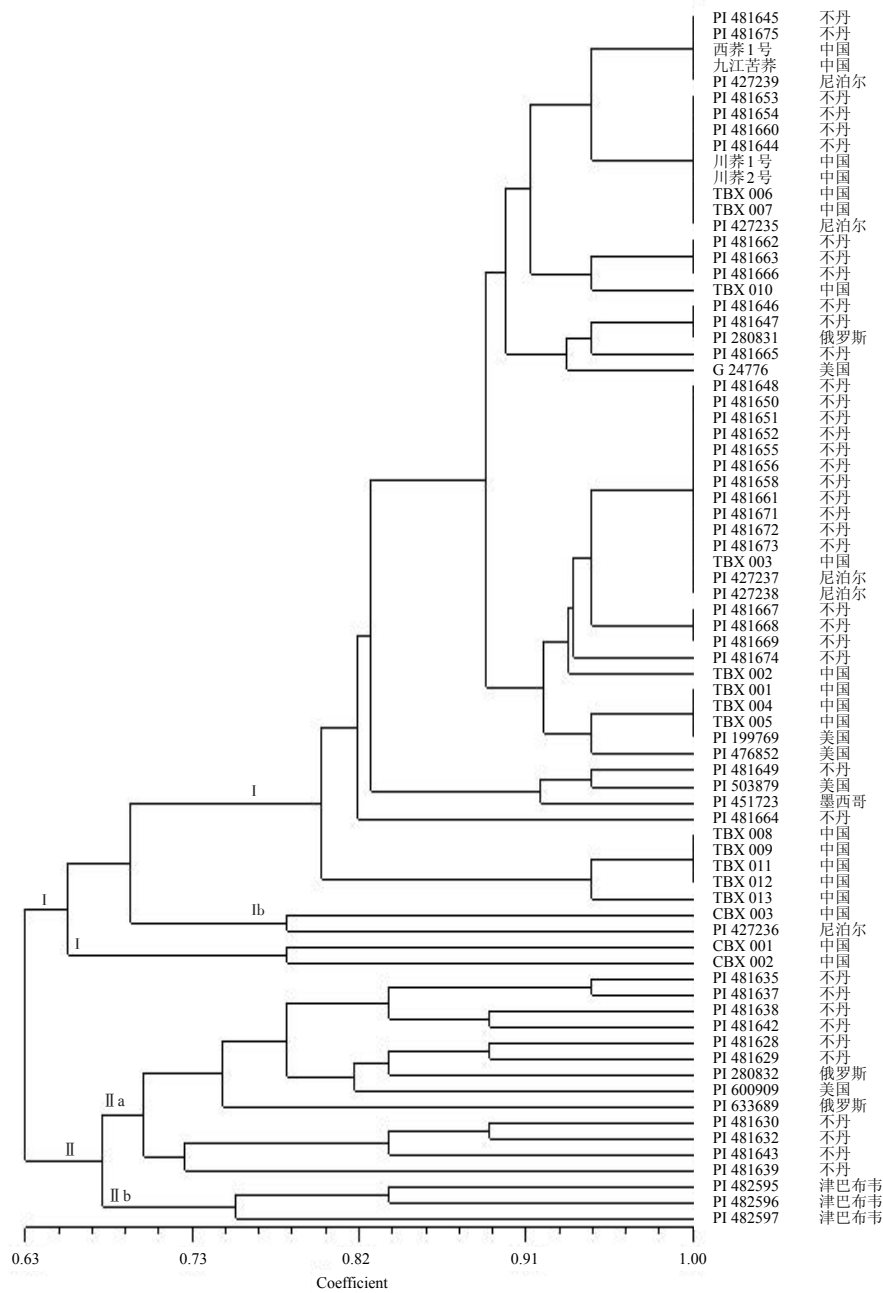


图2 76份栽培荞麦基于醇溶蛋白的聚类图

3 结论与讨论

本研究利用A-PAGE对76份来自不同国家的栽培荞麦进行分析。结果表明,供试材料醇溶蛋白电泳图谱差异较大,遗传多样性较为丰富,进一步证实可将醇溶蛋白带型作为荞麦资源遗传多样性评价的工具之

一。但部分材料尚未能完全区分开,因此还需结合其他手段,如分子标记等作进一步分析。

前人对苦荞和甜荞遗传差异的研究结果不尽相同。王转花等^[4]研究发现,苦荞EST同工酶种内差异明显,甜荞种内差异较小。Wang等^[23]研究表明,甜荞

的等位同工酶变异率大于苦荞,而赵佐成等^[8,14-15]发现栽培苦荞麦的遗传多样性较低。本研究表明,栽培荞麦种间差异较大,且甜荞种内的遗传变异比苦荞的大,这与Zeller等^[24]的研究结果相近。甜荞属异花授粉作物,而苦荞属严格自花授粉作物,这可能是导致蛋白质谱带表现迥异的主要原因。大量资料表明,世界各国的栽培荞麦由中国传入,且荞麦从起源地(中国)传播有2条路线,一条是从中国南方→中国北方→朝鲜半岛→日本;另一条是从中国西藏→不丹→尼泊尔→克什米尔→波兰^[7]。本研究中来自中国和不丹、尼泊尔的材料绝大部分聚集在一起,这为荞麦的传播路线提供了又一佐证。

本研究发现,相同或相似地理来源的部分材料首先聚在一起,醇溶蛋白与地理环境有较高的相关性,这与Sharma等^[12]的结果相似。另一方面,来源不同的材料间遗传差异较大,中国、不丹等国的材料遗传变异更为丰富,这可能是与其具有悠久的荞麦栽培历史、形成了荞麦多样性中心有关。

参考文献

- [1] 李淑久,张惠珍,袁庆军,等.四种荞麦营养器官的形态学与解剖学比较研究[J].贵州农业科学,1992(5):10-14.
- [2] Ohsako T, Ohnishi O. New *Fagopyrum* species revealed by morphological and molecular analyses[J].Genes and Genetic systems, 1998,73(2):85-94.
- [3] 周忠泽,赵佐成,汪旭莹,等.中国荞麦属花粉形态及花被片和果实微形态特征的研究[J].植物分类学报,2003,41(1):63-78.
- [4] 王转花,马文丽.荞麦同工酶多态分析[J].山西农业科学,1998,26(2):24-26.
- [5] Ohnishi O. Geographical distribution of allozymes in natural populations of wild tartary buckwheat[J].Fagopyrum,2000,17:29-34.
- [6] Yamane K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among natural populations of perennial buckwheat, *Fagopyrum cymosum* Meisn., revealed by allozyme variation[J].Genetic Resources and Crop Evolution,2001,48(1):69-77.
- [7] Murai M, Ohnishi O. Population genetics of cultivated common buckwheat,*Fagopyrum esculentum* Moench. X. Diffusion routes revealed by RAPD markers[J].Genes and Genetic Systems,1996, 71(4):211-218.
- [8] 赵佐成,周明德,王中仁,等.中国苦荞麦及其近缘种的遗传多样性研究[J].遗传学报,2002,29(8):723-734.
- [9] Tsuji K, Ohnishi O. Origin of cultivated Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert.) revealed by RAPD analyses[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000,47(4):431-438.
- [10] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among wild and cultivated Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert.) populations revealed by AFLP analyses[J].Genes and Genetic Systems, 2001, 76(1):47-52.
- [11] Kump B, Javornik B. Genetic diversity and relationships among cultivated and wild accessions of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as revealed by RAPD markers[J].Genetic resources and crop evolution, 2002, 49(6):565-572.
- [12] Sharma T R, Jana S. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) variation in *Fagopyrum tataricum* Gaertn.accessions from China and the Himalayan region[J]. Euphytica,2002,127:327-333.
- [13] Iwata H, Imon K, Tsumura Y, et al. Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits[J]. Genome, 2005, 48(3):367-377.
- [14] 谭萍,王玉株,李红宁,等.十种栽培苦荞麦的随机扩增多态性DNA (RAPD)研究[J].种子,2006,25(7):46-49.
- [15] 赵丽娟,张宗文,黎裕,等.苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报,2006,7(2):159-164.
- [16] Anusuya R, Nikhil C. Genetic variation and species relationships in Himalayan buckwheat's as revealed by SDS-PAGE of endosperm proteins extracted from single seeds and RAPD based DNA fingerprints[J].Genetic resources and crop evolution, 2007,54: 767-777.
- [17] 任翠娟,陈庆富.荞麦属(*Fagopyrum* Mill)植物资源的 RAPD 研究[J].种子,2009,28(11):37-44,48.
- [18] 张学勇,杨欣明.醇溶蛋白电泳在小麦种质资源遗传分析中的应用[J].中国农业科学,1995,28(4):25-32.
- [19] 张彦萍,刘海河,贾兵国,等.利用种子醇溶蛋白指纹图谱鉴定葱蒜类蔬菜品种纯度的研究[J].种子,2004,23(5):12-13.
- [20] 吴若箐,赖文胜,方炜,等.福青黑松醇溶蛋白的群体遗传分析[J].热带亚热带植物学报,2005,13(1):53-58.
- [21] Jiang H, Gao Q R, Li L J, et al. Genetic diversity of recurrent selection populations with Ms2 gene assessed by gliadins in common wheat(*Triticum aestivum* L.) [J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(5):615-625.
- [22] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided population[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973,70(12): 3321-3323.
- [23] Wang Z H, Zhang Z, Lin R. et al. Seed protein diversity of buckwheat in China. Current advances in buckwheat research[M]. Japan: Shinshu University Press,1995:411-417.
- [24] Zeller F J, Weishaeupl H, Hsam S L K. Identification and genetics of buckwheat (*Fagopyrum*) seed storage protein[C]. In: Seung S.H., Y. S. Choi, N. S. Kim, Proceedings of the VIII International Symposium on Buckwheat, Chunchon, Korea. Advances in Buckwheat Research, 2004:195-201.