

苦荞种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析

侯雅君^{1,2}, 张宗文^{2,3}, 吴斌², 李艳琴¹

(¹山西大学生物技术研究所/教育部化学生物学与分子工程重点实验室, 太原 030006; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

³国际生物多样性中心东亚办事处, 北京 100081)

摘要: 【目的】从分子水平研究苦荞种质资源的遗传多样性, 为综合评价苦荞种质资源提供依据。【方法】用筛选出的 20 对 AFLP 引物, 对 14 个不同地理来源的 165 份苦荞种质进行遗传多样性分析。【结果】共扩增出 938 条清晰的条带, 其中 314 (33.48%) 条呈多态性, 平均每对引物组合的条带数和多态性带数分别为 46.9 个和 15.7 个。不同地理来源苦荞种质的 Shannon-Weaver 多样性指数为 0.1093~0.2661, 四川资源群最高, 青海、云南和甘肃/宁夏等资源群次之, 湖南资源群最低。利用 Popgen Ver. 1.32 软件, 依不同地理来源苦荞资源群间 Nei's 遗传一致度可聚类成 5 个组, 聚类结果与苦荞地理分布相关。基于 Structure 2.2 软件分析, 165 份苦荞资源分为 5 大组群, 并与 Popgen Ver. 1.32 聚类结果呼应得较好, 其中云南和四川资源的群体结构最复杂, 最为多样化, 分别被聚到了 5 个组群中。【结论】苦荞类群的亲缘关系以及遗传多样性与其地理分布有一定相关性。

关键词: 苦荞; AFLP; 种质资源; 遗传多样性

Genetic Diversity in Tartary Buckwheat Revealed by AFLP Analysis

HOU Ya-jun^{1,2}, ZHANG Zong-wen^{2,3}, WU Bin², LI Yan-qin¹

(¹Institute of Biotechnology of Shanxi University/Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Taiyuan 030006; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³Bioversity International, Office for East Asia, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】The genetic diversity of tartary buckwheat accessions was analyzed at molecular level, and the helpful information for breeding and germplasm evaluation was obtained. 【Method】The genetic diversity of 165 accessions of tartary buckwheat from 14 different geographical regions was analyzed using 20 informative primer pairs of AFLP markers. 【Result】Totally 938 loci were detected among which 314 (33.48%) were polymorphic. The number of amplified fragments and polymorphic fragments per primer combination were 46.9 and 15.7, respectively. Shannon's information index of different geographical groups was 0.1093-0.2661. The group from Sichuan possessed the highest level of genetic diversity, followed by those from Qinghai, Yunnan and Gansu/Ningxia. The group from Hunan was the lowest in genetic diversity. Five cluster groups were identified based on the dendrogram of pairwise Nei's genetic identity. The clustering results revealed that the genetic diversity of accessions of tartary buckwheat closely related to their origins. Five types of population structure within 165 tartary buckwheat accessions were inferred by structure analysis, which also correlated to their geographic origins. The population structure of accessions from Yunnan and Sichuan provinces were the most complicated and multiplex. 【Conclusion】The result showed that the genetic relationship and diversity of tartary buckwheat populations correlated to their geographic distribution to a certain extent.

Key words: tartary buckwheat; AFLP; genetic resources; genetic diversity

收稿日期: 2009-05-13; 接受日期: 2009-08-18

基金项目: 农业部农作物种质资源保护专项 (BN07-2130135-(25-30)-10)

作者简介: 侯雅君 (1984-), 女, 山西高平人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: 211yajun@163.com。通信作者张宗文 (1958-), 男, 内蒙古赤峰人, 研究员, 博士, 研究方向为遗传多样性与起源进化。E-mail: zongwenz@163.com。李艳琴 (1960-), 女, 山西太原人, 副教授, 研究方向为植物、微生物分子遗传学。E-mail: yanqin@sxu.edu.cn

0 引言

【研究意义】苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 属于双子叶蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill), 又名鞑靼荞麦, 是荞麦属的一个栽培种。苦荞起源于中国, 在中国已有两千多年的栽培历史。苦荞在中国的常年种植面积超过 30 万公顷, 年产量为 30~50 万吨^[1]。苦荞为一年生草本植物, 生育期短 (60~90 d)、耐瘠、适应性强。苦荞是一种粮药兼用的经济作物, 不仅营养全面, 而且富含生物类黄酮、多肽、糖醇和 D-手性肌醇等高活性药用成分, 具有降糖、降脂、降胆固醇、抗氧化、抗衰老和清除自由基的功能, 其所含的生物活性成分已引起医学界的广泛关注, 并已成为新世纪全球重要的保健食品资源。中国地域辽阔, 复杂的地理与气候环境等因素, 使苦荞种质资源十分丰富, 研究苦荞种质资源的遗传多样性, 掌握其分布特点及规律, 对于苦荞种质资源的正确评价、现有资源的充分发掘利用、育种亲本合理选配、优良基因定位与克隆等研究具有十分重要的意义。【前人研究进展】近年来, 国内外学者先后采用形态标记^[2-3]、细胞学标记^[4]、同工酶标记^[5-6]、种子蛋白标记^[7-8]等对荞麦资源遗传多样性进行评价。随着分子生物学的飞速发展, 分子标记技术为荞麦的遗传研究注入了新的活力。王莉花等^[9]利用 RAPD 对中国 26 份云南野生荞麦资源的遗传多样性进行了研究, 表明荞麦种间多样性比种内更丰富; Kump 等^[10]对苦荞 33 个栽培居群和 7 个野生居群进行了 RAPD 分析, 认为分子标记能够有效揭示品种间遗传差异; Tsuji 等^[11]利用 AFLP 揭示了野生和栽培苦荞居群之间的系统发育关系, 又采用 RAPD 技术^[12-13]研究了苦荞栽培品系和天然居群的系统发育关系; 赵丽娟等^[14]利用 ISSR 分子标记对来自 9 省的 66 份苦荞种质的遗传多样性进行分析, 揭示了中国不同产区苦荞种质资源的多样性特点和丰富度; Iwata 等^[15]应用 5 个微卫星标记对 19 个日本甜荞品种的遗传多样性进行了分析, 揭示了品种内和品种间的遗传多样性。【本研究切入点】上述研究或者采用的样本数较少, 或者样品来源地范围不够大, 虽然肯定了分子标记在苦荞遗传多样性研究中的可靠性, 但是缺少对广泛地理来源、大量代表性苦荞资源样本的系统分析。本研究在总结前人经验的基础上, 选取了保存在国家种质库的 165 份苦荞种质资源作为研究对象, 所选材料地理覆盖面广, 分别来自 15 个省区, 涵盖了所有苦荞产区, 还包括部分国外资源, 类型齐全,

较好的代表了苦荞资源的自然分布和整个种质资源的遗传多样性。【拟解决的关键问题】拟利用 AFLP 分子标记技术对 165 份不同地理来源的苦荞种质资源进行遗传多样性分析, 旨在揭示苦荞种质资源遗传多样性地理分布特点和种质资源群体间的遗传关系, 为苦荞种质资源的收集、保护、研究和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦荞种质 165 份, 其中国内资源 154 份, 分别来自 15 个省区, 另有 11 份材料来自尼泊尔。材料来源及序号见表 1。供试材料由中国农业科学院农作物种质保存中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 苦荞幼苗, 每份材料随机选取 20 个单株, 每株剪取 1 片新鲜子叶混合, 参照 Manubens 等^[16]的 CTAB 法, 提取叶片总 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, -20℃ 保存备用。

1.2.2 AFLP 分析 AFLP 试验方法参照 Vos 等^[17]的方法。预扩增 PCR 条件为: 94℃ 5 min, 继之 94℃ 30 s→56℃ 30 s→72℃ 1 min, 循环 30 次; 将预扩增产物稀释 20 倍后, 采用 E+2/M+3 和 E+3/M+2 引物组合 (表 2) 进行选择扩增, PCR 扩增条件为: 94℃ 4 min, 继之 94℃ 35 s→65℃ 35 s (每循环降低 0.7℃)→72℃ 1 min, 循环 12 次, 接着 94℃ 35 s→56℃ 35 s→72℃ 1 min, 循环 30 次。PCR 扩增在 biorad (MyCycler) 型 PCR 扩增仪上完成, 内切酶和连接酶均购自 New England Biolabs 公司, 接头及引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。AFLP 选择性扩增产物变性后在 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶上电泳分离, 硝酸银染色显影。

1.2.3 数据处理与分析 同一迁移率上, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 构建 [1, 0] 数据矩阵, 根据不同分析软件的格式要求作相应转换。应用 Popgen Ver.1.32 软件计算不同引物的多态性条带百分率 (PPB)、多态性信息指数 (PIC), 不同资源群的 Shannon-Weaver 多样性指数、Nei's 遗传距离和遗传一致度, 根据群体间遗传一致度, 采用 UPGMA 方法, 运行 NTSYSpc2.2 软件的 SHAN 程序, 对依地理来源区分的 14 个苦荞资源群进行聚类分析。利用 Structure2.2^[18-19]软件对苦荞种质资源进行群体遗传结构分析, 所设置的 Structure 参数 “Burnin Period” 和 “after Burnin” 为 10 000 次, K 值为 1~10, 每个 K

表 1 参试材料及来源

Table 1 Name and origin of the accessions

来源 Origin	序号及名称 Code and name
内蒙古 Inner Mongolia	1. 陕西白 Shaanxibai, 2. 苦荞 Kuqiao, 3. 苦荞 Kuqiao, 4. 苦荞 Kuqiao
宁夏 Ningxia	5. 苦荞 Kuqiao, 6. 苦并荞 Kubingqiao
青海 Qinghai	7. 苦荞麦 Kuqiaomai, 8. 苦荞 Kuqiao, 46. 麻苦荞 Makuqiao, 47. 苦荞 Kuqiao, 48. 苦荞 Kuqiao, 49. 苦荞 Kuqiao, 108. 黑苦荞 Heikuqiao, 109. 荞麦 Qiaomai, 110. 黑苦荞 Heikuqiao, 111. 荞麦 Qiaomai
西藏 Tibet	9. 苦荞 Kuqiao, 10. 黑粒苦荞 Heilikuqiao, 11. 苦荞 Kuqiao, 12. 苦荞 Kuqiao, 13. 苦荞 Kuqiao, 14. 苦荞 Kuqiao, 15. 苦荞 Kuqiao, 76. 苦荞 Kuqiao, 77. 苦荞 Kuqiao, 78. 苦荞 Kuqiao, 79. 苦荞 Kuqiao, 80. 苦荞 Kuqiao
山西 Shanxi	16. 荞麦 Qiaomai, 17. 苦荞 Kuqiao, 18. 苦荞 Kuqiao, 19. 苦荞 Kuqiao, 20. 蔓荞子 Manqiaozi, 21. 苦荞 Kuqiao, 92. 岭东苦荞 Lingdongkuqiao, 93. 灵丘苦荞 Lingqiuikuqiao, 94. 灵丘苦荞 Lingqiuikuqiao, 95. 灵丘苦荞 Lingqiuikuqiao, 96. 灵丘苦荞 Lingqiuikuqiao, 97. 柳林苦荞 Liulinkuqiao, 98. 中阳苦荞 Zhongyangkuqiao, 99. 五台苦荞 Wutaikuqiao, 100. 汾西苦荞 Fenxikuqiao, 101. 汾西苦荞 Fenxikuqiao
陕西 Shaanxi	22. 白苦荞 Baikuoqiao, 23. 苦荞 Kuqiao, 24. 苦荞 Kuqiao, 25. 黑苦荞 Heikuqiao, 26. 苦荞 Kuqiao, 27. 苦荞 Kuqiao, 28. 苦荞 Kuqiao, 29. 苦荞 Kuqiao, 30. 米米苦荞 Mimikuqiao, 31. 苦荞 Kuqiao, 32. 苦荞 Kuqiao, 33. 苦荞 Kuqiao, 34. 苦荞 Kuqiao, 35. 苦荞 Kuqiao, 102. 苦荞 Kuqiao
甘肃 Gansu	36. 苦荞麦 Kuqiaomai, 37. 苦荞 Kuqiao, 38. 黑绿荞 Heilvqiao, 39. 苦荞 Kuqiao, 40. 苦荞 Kuqiao, 41. 小荞麦 Xiaoqiaomai, 42. 荞麦(麻) Qiaomai(Ma), 43. 荞麦 Qiaomai, 44. 小荞 Xiaoqiao, 45. 麻苦荞 Makuqiao, 103. 苦荞 Kuqiao, 104. 金荞 Jinqiao, 105. 麻苦荞 Makuqiao, 106. 苦荞 Kuqiao, 107. 甘荞 1 号 Ganqiao No. 1
四川 Sichuan	50. 额洛乌起 Eluowuqi, 51. 额拉 Ela, 52. 额乌 Ewu, 53. 大额楚 Daechu, 130. 黑苦荞 Heikuqiao, 131. 前山苦荞 Qianshankuqiao, 132. 初额 Chue, 133. 额洛木尔惹 Eluomuerre, 150. 苦荞 Kuqiao, 151. 若苦荞 Ruokuqiao, 152. 苦荞 Kuqiao, 153. 额去瓦子 Equwazi, 154. 额刺 Eci, 155. 老鸦苦荞 Laoyakuqiao, 156. 苦荞 Kuqiao, 157. 苦荞 Kuqiao, 158. 苦荞 Kuqiao, 159. 苦荞 Kuqiao, 160. 刺荞 Ciqiao, 161. 苦荞 Kuqiao, 162. 苦荞 Kuqiao
安徽 Anhui	54. 82-8-1, 55. 82-4-6, 112. 苦荞 Kuqiao, 113. 苦荞麦 Kuqiaomai, 114. 苦荞麦 Kuqiaomai
江西 Jiangxi	56. 彭泽苦荞 Pengzekuqiao, 57. 九江苦荞 Jiujiankuqiao
贵州 Guizhou	58. 长尖咀苦荞 Changjianjukuqiao, 59. 黑苦荞 Heikuqiao, 60. 苦荞 Kuqiao, 61. 苦荞 Kuqiao, 62. 毕节黑苦荞 Bijieheikuqiao, 134. 苦荞 Kuqiao, 135. 水城苦荞 Shuichengkuqiao, 136. 90-3, 137. 混选一号 Hunxuan No. 1, 138. 90-5, 139. 威黑 II-3Weihei II-3, 140. 麻子荞 Maziqiao
云南 Yunnan	63. 刺荞 Ciqiao, 64. 贡山苦荞 Gongshankuqiao, 65. 中甸苦荞 Zhongdiankuqiao, 66. 营盘苦荞 Yingpankuqiao, 67. 马街苦荞 Majiekuqiao, 68. 长咀苦荞 Changjukuqiao, 69. 米苦荞 Mikuoqiao, 70. 田籽荞 Tianziquqiao, 71. 大苦荞 Dakuqiao, 72. 扁籽荞 Bianziquqiao, 73. 细苦荞 Xikuqiao, 74. 白云苦荞 Baiyunkuqiao, 75. 嵩明苦荞 Songmingkuqiao, 141. 格那务起 Genawuqi, 142. 内蒙荞 Neimengqiao, 143. 粗额 Cue, 163. 剑川秋荞 Jianchuanqiuqiao, 164. 寻甸尖嘴苦 Xundianjianzuiku, 165. 姚安西拉 Yaoanxila
湖北 Hubei	115. 苦荞 Kuqiao, 116. 苦荞 Kuqiao, 117. 苦荞 Kuqiao, 118. 苦荞 Kuqiao, 119. 苦荞 Kuqiao, 120. 苦米儿荞 Kumierqiao, 121. 苦荞 Kuqiao, 122. 苦荞 Kuqiao, 123. 苦荞 Kuqiao, 124. 苦荞 Kuqiao, 125. 苦荞 Kuqiao
湖南 Hunan	126. 凤皇苦荞 Fenghuangkuqiao, 127. 新邵苦荞 Xinshaokuqiao, 128. 塘弯苦荞 Tangwankuqiao, 129. 洗马苦荞 Ximakuqiao
广西 Guangxi	144. 苦荞 Kuqiao, 145. 苦荞 Kuqiao, 146. 苦荞 Kuqiao, 147. 苦荞 Kuqiao, 148. 苦荞 Kuqiao, 149. 苦荞 Kuqiao
尼泊尔 Nepal	81. 87-23 (F6080), 82. 87-25 (F6224), 83. 87-26 (F6245), 84. 87-28 (F6286), 85. 87-29 (F6378), 86. 88-23 (IV-708), 87. 88-27 (IV-63), 88. 88-28 (IV-51), 89. 88-29 (IV-136), 90. 88-35 (V-121), 91. 87-16 (F3035)

表 2 用于选择性扩增的 AFLP 引物序列

Table 2 Sequence of primers selected for selective amplification

<i>Eco</i> R I 引物名称 <i>Eco</i> R I primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	<i>Mse</i> I 引物名称 <i>Mse</i> I primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
E11	GACTGCGTACCAATTC AA	M12	GATGAGTCCTGAGTAA AC
E12	GACTGCGTACCAATTC AC	M16	GATGAGTCCTGAGTAA CC
E13	GACTGCGTACCAATTC AG	M17	GATGAGTCCTGAGTAA CG
E19	GACTGCGTACCAATTC GA	M22	GATGAGTCCTGAGTAA GT
E20	GACTGCGTACCAATTC GC	M37	GATGAGTCCTGAGTAA ACG
E25	GACTGCGTACCAATTC TG	M49	GATGAGTCCTGAGTAA CAG
E36	GACTGCGTACCAATTC ACC	M52	GATGAGTCCTGAGTAA CCC
E37	GACTGCGTACCAATTC ACG	M54	GATGAGTCCTGAGTAA CCT
E38	GACTGCGTACCAATTC ACT	M56	GATGAGTCCTGAGTAA CGC
E61	GACTGCGTACCAATTC CTG	M61	GATGAGTCCTGAGTAA CTG
E70	GACTGCGTACCAATTC GCT	M64	GATGAGTCCTGAGTAA GAC
		M66	GATGAGTCCTGAGTAA GAT
		M67	GATGAGTCCTGAGTAA GCA

值运行 10 次, 计算每个 K 值对应的 “Var[ln P(D)]” 值的均值, 然后做出折线图选择最佳 K 值, 即为群体遗传结构的群体数^[20]。

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物的扩增结果

用筛选出的 20 对谱带清晰并呈现多态性的有效引物组合对 165 份苦荞材料进行 AFLP 扩增, 引物组合及其扩增结果统计见表 3。20 对引物组合共扩增出 938 条带, 其中 314 条有多态性, 比例为 33.48%。不同引物组合扩增效果差别较大, 扩增总条带数为 31~96 条, 平均 46.9 条, 多态性条带数为 6~35 条, 平均 15.7 条, 多态性位点百分率变化范围为 11.46%~83.33%。不同引物组合的多态性信息指数 PIC 值变化范围为 0.6199~0.9623。图 1 是引物组合 E20/M54 对

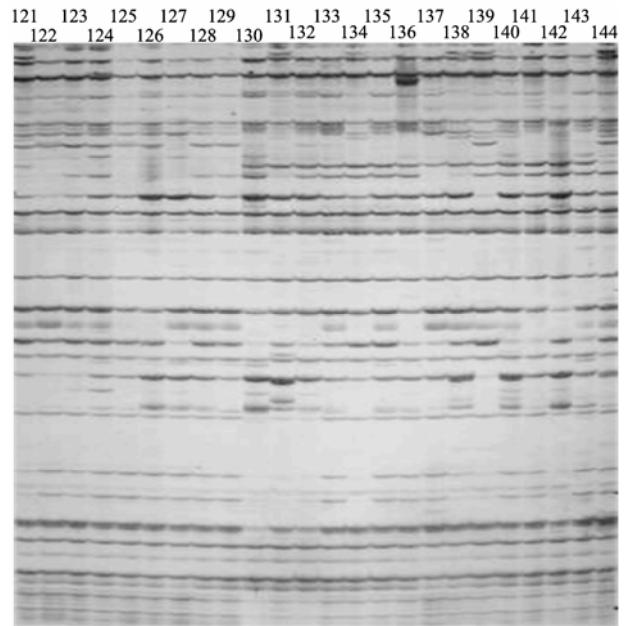


图 1 引物 E20/M54 对 121~144 号苦荞材料的 AFLP 扩增图谱

Fig. 1 AFLP fingerprinting of the primer combination E20/M54 for No.121-144 tartary buckwheat accessions

表 3 苦荞种质的 AFLP 标记多态性

Table 3 Polymorphism detected by AFLP marker in tartary buckwheat

引物组合 Primer combination	多态性带 No. of polymorphic bands	条带数 No. of bands	多态性位点百分率 Percentage of polymorphic bands (%)	多态性信 息指数 PIC
E20/M54	25	40	62.50	0.6199
E25/M37	16	53	30.18	0.8062
E19/M67	27	53	50.94	0.6798
E11/M49	8	42	19.05	0.7566
E20/M37	26	38	68.42	0.8725
E12/M52	13	43	30.23	0.8383
E19/M64	12	39	30.77	0.7529
E20/M61	35	42	83.33	0.7343
E12/M56	17	31	54.84	0.6898
E11/M61	11	96	11.46	0.7802
E25/M66	7	45	15.56	0.7180
E25/M61	6	43	13.95	0.7808
E13/M67	9	61	14.75	0.9623
E36/M12	20	59	33.90	0.9192
E70/M17	27	41	65.85	0.7910
E61/M16	13	49	26.53	0.9290
E70/M16	19	43	44.19	0.6682
E61/M12	11	38	28.95	0.7830
E38/M16	6	46	13.04	0.7007
E37/M22	6	36	16.67	0.6588
平均 Mean	15.7	46.9	33.48	0.7720

部分苦荞材料的 AFLP 扩增图谱。

2.2 不同地理来源苦荞资源群的遗传多样性分析

2.2.1 不同地理来源苦荞资源群的多样性指数分析
为了分析苦荞资源遗传多样性与其地理来源的相互关系以及不同来源地苦荞资源亲缘关系的远近, 将 165 份苦荞按照省份来源分组, 并将材料数较少的省份合并至与其相毗邻、种植环境相似的省份, 即宁夏的 2 份材料和甘肃材料合并为甘肃/宁夏组群, 江西的 2 份材料和安徽材料合并为安徽/江西组群, 则 165 份苦荞材料被划分为 14 个资源群。运用 Popgene Ver.1.32 软件计算得到苦荞 14 个资源群的 Shannon-Weaver 多样性指数 (表 4)。14 个资源群总体 Shannon-Weaver 多样性指数为 0.2772, 各资源群多样性指数由高到低依次为: 四川>青海>云南>甘肃/宁夏>山西>西藏>贵州>陕西>尼泊尔>湖北>安徽/江西>内蒙古>广西>湖南, 指数变化范围为 0.1093~0.2661, 变化幅度不大。总体上看, 位于西南云贵川青藏高寒山区和西北黄土高原宁甘陕晋山岭地区苦荞种质的 Shannon-Weaver 多样性指数普遍高于其他省区, 其中四川和青海资源群的 Shannon-Weaver 指数最高, 遗传多样性最为丰富。

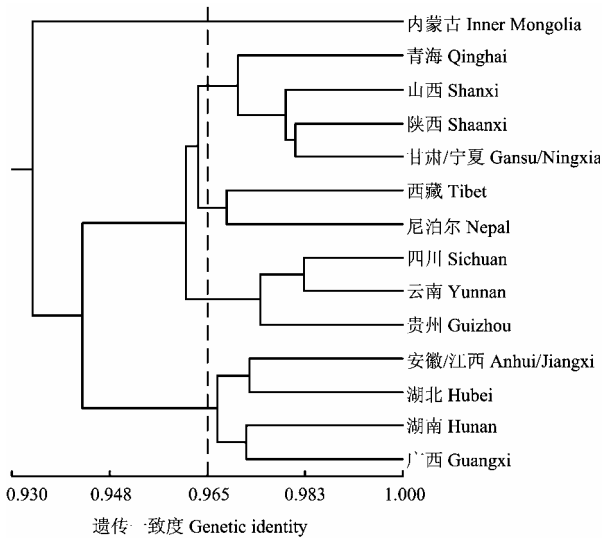


图 2 苦荞种质 14 个来源群遗传一致度聚类分析图
Fig. 2 Dendrogram of 14 groups of germplasm resources of tartary buckwheat with different origins based on genetic identity

聚为第 1 大类，安徽/江西、湖北、湖南和广西资源群聚在第 3 大类，而第 2 大类则涵盖了其余省份来源的种质群。第 2 大类在遗传一致度 0.965 处，又可分为 3 个组，即：青海、山西、陕西、甘肃/宁夏资源聚为一组；西藏和尼泊尔资源聚为一组；四川、云南和贵州资源聚为一组。这样 14 个资源群在遗传一致度 0.965 处可分为 5 个组。聚类结果显示资源群间亲缘关系与地理分布有一定相关性。

2.3 遗传结构分组分析

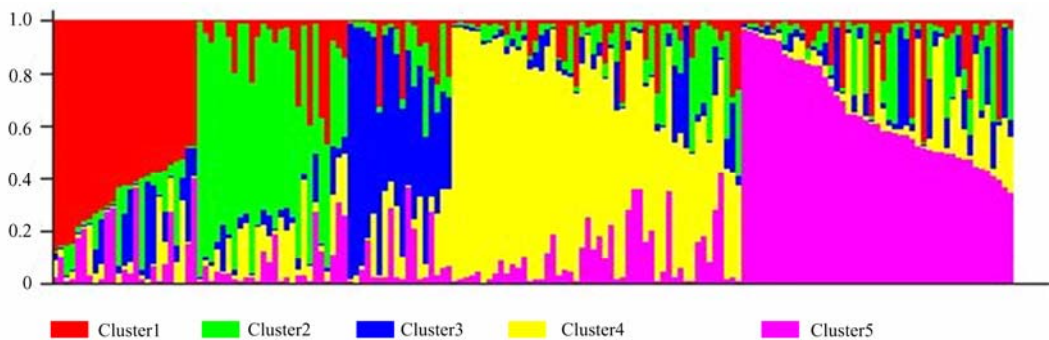
利用 Structure2.2 软件对 165 份苦荞种质资源进行遗传结构分析，根据对数似然方差 $\text{Var}[\text{LnP}(D)]$ 对 K 值所得折线图，165 份参试材料最佳分组应为 5 组(图 3，表 6)。

可以看出，划分的 5 个组群同样与地理来源有一定的相关性。组群 1 主要包括 65% 以上的贵州材料和

表 6 Structure 分析推断出的 5 个组群的资源构成

Table 6 Compositions of the five clusters inferred by Structure analysis

来源 Origin	Cluster1	Cluster2	Cluster3	Cluster4	Cluster5
内蒙 Inner Mongolia	--	--	4	--	--
宁夏 Ningxia	--	--	--	1	1
青海 Qinghai	--	1	1	6	2
西藏 Tibet	2	4	1	5	--
山西 Shanxi	--	--	2	10	4
陕西 Shaanxi	--	--	--	13	2
甘肃 Gansu	--	--	2	13	--
四川 Sichuan	8	2	2	2	7
江西 Jiangxi	--	--	--	--	2
安徽 Anhui	--	--	1	--	4
贵州 Guizhou	8	--	2	--	2
云南 Yunnan	4	9	2	1	3
湖北 Hubei	--	--	1	--	10
湖南 Hunan	1	--	--	--	3
广西 Guangxi	1	--	--	--	5
尼泊尔 Nepal	--	10	--	--	1
总计 Total	24	26	18	51	46



图中不同颜色表示不同的组群，每条彩色竖线代表一份种质，不同颜色所占比例越大，则该种质被划分到相应组群的可能性就越大
Each individual is represented by a single color line, the more proportion of the color, the more possibility of the represented individual by the color divided into the corresponding group

图 3 参试苦荞种质资源群体结构分组

Fig. 3 Estimated population structure for tartary buckwheat genetic resources

部分四川及云南材料；甘肃、山西、陕西和青海的大部分材料（60%以上）集中在组群 4；湖北、安徽、湖南和广西的大部分材料（75%以上）集中在组群 5，充分显示了不同省份资源群间遗传关系的远近与其生态分区相关；尼泊尔资源 90%以上集中在组群 2，组群 2 还分布有 47%的云南材料和 33%的西藏材料，表明尼泊尔资源与国内西藏和云南资源遗传关系接近；内蒙古材料分布在组群 3，但没有与其它材料明显聚在一起，表明其与其他省份资源遗传关系相对较远。其中云南和四川资源的群体结构最复杂，趋向多元化，分别被聚到了 5 个组群中，其次是西藏和青海资源，分别被聚到了 4 个组群中。

Structure 遗传结构分组分析结果与 Popgene Ver.1.32 按不同地理来源资源群间 Nei's 遗传一致度聚类结果基本吻合。2 种分析方法均说明中国苦荞种质资源的遗传多样性与其地理分布有一定的相关性。

3 讨论

3.1 AFLP 标记与苦荞种质资源遗传多样性分析

本研究所用 20 对 AFLP 引物组合共检测到 314 条多态性谱带，平均每个引物组合扩增出 15.7 条多态性带，高于王莉花等^[9]、Senthilkumaran 等^[21]利用 RAPD 标记得到的每个引物扩增出 8.05 和 6.9 条多态性带水平，由此可见，AFLP 分子标记技术对苦荞种质检测的效率要高于 RAPD，是分析苦荞种质资源遗传多样性比较可靠的工具。对划分为 14 个资源群的 165 份苦荞资源的 AFLP 遗传多样性的系统分析，揭示了不同来源苦荞资源群间的亲缘关系和遗传多样性差异，使笔者对中国苦荞资源的遗传多样性有了全新认识，有助于中国苦荞遗传资源的进一步研究挖掘和育种利用。同时，本研究建立的 AFLP 标记体系，为苦荞资源分子标记研究提供了有用工具。

3.2 苦荞种质资源群间的亲缘关系分析

采用 Popgene Ver.1.32 计算资源群间的遗传距离和遗传一致度，显示 14 个不同地理来源的苦荞种质群间遗传一致度水平较高，资源群间遗传变异较低，这可能是地区间引种等原因导致基因交流频繁、相互渗透引起的。对苦荞资源的聚类及遗传结构分组分析表明，聚类及分组结果与苦荞生态分区具有一定的相关性。总的来讲，西南一带的四川、云南、贵州材料间亲缘关系接近，西北黄土高原一带的山西、陕西、甘肃/宁夏、青海材料间亲缘关系接近，而中东部地区的湖北、安徽、广西、湖南等省份来源的材料间亲缘关

系接近。表明虽然地区间基因交流比较频繁，但苦荞在自身进化传播过程中，在某一生态环境下，经过长期人工选择和改良后，在遗传结构上发生了能够区别于其他生态区资源的变异。这对今后制定苦荞资源遗传多样性原位保护措施、保护范围、保护地点，以及遗传多样性资源的考察收集提供了重要参考，也为苦荞品种改良中亲本选择，以及有效发掘新的优良基因提供了依据。

3.3 苦荞起源和遗传多样性中心

多数学者通过研究普遍认为中国西南的云、贵、川地区是荞麦的地理起源地。叶能干等^[22]认为，从植物学的观点分析，中国西南部，不但是荞麦属植物的分化和散布中心，也可能是荞麦属的起源地。赵佐成等^[23]认为金沙江流域是苦荞及其近缘种的分布中心和起源中心。Tsuji 等^[11]认为西藏、云南和四川交界处是栽培苦荞的起源中心，该中心即云南西北部、西藏东部和四川中部与南部的连接片区。本研究 Structure 遗传结构分析结果表明，云南和四川苦荞资源的群体结构最复杂，最为多样化，分别被聚到了 5 个组群中；Shannon-weaver 多样性指数分析则表明，四川、青海和云南的苦荞种质资源遗传变异丰富，遗传多样性水平较高。根据来源于起源地的种质资源遗传变异丰富，遗传多样性水平较高的理论，本研究结果基本支持中国的西南部是栽培苦荞的起源中心和遗传多样性中心的观点。

中国栽培养麦已有大约 2 000 年的历史^[24]。大量资料表明，世界各国的栽培养麦均由中国传入。有报道^[25]指出：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。本研究 UPGMA 法树状聚类图分析和 Structure 遗传结构分析均显示国外尼泊尔苦荞资源与西藏苦荞资源亲缘关系接近，支持苦荞从中国西藏→不丹→尼泊尔→克什米尔→波兰的传播路线，也证实了西藏一带是苦荞起源中心和遗传多样性中心之一的观点。

4 结论

建立了适合于苦荞种质遗传多样性分析的 AFLP 标记体系，筛选出的 20 对引物组合对 165 份苦荞种质共扩增出 938 条谱带，其中多态性带 314 条，平均每对引物扩增出 15.7 条多态性带；Shannon-Weaver 多样性指数表明西南云贵川青藏高寒山区和西北黄土高原宁甘陕晋山岭地区苦荞遗传多样性普遍高于其它省

区; 根据资源群间遗传一致度, 利用 UPGMA 方法, 在遗传一致度 0.965 处将划分的 14 个资源群聚为 5 组, 聚类结果表现出明显的地域性; 参试资源从遗传结构上被划分为 5 个组群, 其中云南和四川苦荞资源的群体结构最复杂, 最为多样化, 其次是西藏和青海; 认同中国西南部四川、云南、西藏一带是栽培苦荞的起源中心和遗传多样性中心的观点和苦荞从中国西藏→不丹→尼泊尔→克什米尔→波兰的传播路线; 建议对四川、云南、西藏一带的苦荞资源进行重点考察、搜集和保护, 在深入研究和利用的基础上, 加强地区之间引种, 不断丰富其遗传多样性, 拓宽中国苦荞资源遗传背景。

References

- [1] Lin R F, Chai Y. Production, research and academic exchanges of China on buckwheat. *Advances in Buckwheat Research*, 2007: 7-12.
- [2] 张小燕, 苏敏, 卢宗凡, 武田和羲. 荞麦品种资源聚类分析. 西北农业学报, 2000, 9(2): 121-124.
Zhang X Y, Su M, Lu Z F, TAKEDA. Cluster analysis on germplasm resources of buckwheat. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2000, 9(2): 121-124. (in Chinese)
- [3] 高金锋, 张慧成, 高小丽, 卓嘎, 柴岩, 李瑞国, 冯佰利. 西藏苦荞种质资源主要农艺性状分析. 河北农业大学学报, 2008, 31(2): 1-5.
Gao J F, Zhang H C, Gao X L, Zhuo G, Chai Y, Li R G, Feng B L. Analysis on the agronomic traits of tartary buckwheat in Tibet. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2008, 31(2): 1-5. (in Chinese)
- [4] 张宏志, 管正学, 刘湘元, 刘玉红. 甜荞和苦荞染色体核型分析. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(1): 69-74.
Zhang H Z, Guan Z X, Liu X Y, Liu Y H. Karyotypic analysis of *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2000, 21(1): 69-74. (in Chinese)
- [5] 王转花, 马文丽. 荞麦同工酶多态分析. 山西农业科学, 1998, 26(2): 24-26.
Wang Z H, Ma W L. The analysis of isoenzyme polymorphism in buckwheat. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 1998, 26(2): 24-26. (in Chinese)
- [6] 罗定泽, 侯鑫, 赵佐成. 西南地区硬枝野荞麦(*Fagopyrum urophyllum* (Bur. et Franch.) H. Gross)天然居群的等位酶变异. 四川师范大学学报(自然科学版), 2002, 25(1): 62-65.
Luo D Z, Hou X, Zhao Z C. Allozyme divergence among *Fagopyrum urophyllum* Populations in Southwest of China. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science)*, 2002, (1): 62-65. (in Chinese)
- [7] Dvořáček V, Čepková P, Michalová A, Kreft I. Seed storage protein polymorphism of buckwheat varieties (*Fagopyrum esculentum* Moench; *Fagopyrum tataricum* L.). *Advances in Buckwheat Research*, 2004: 412-418.
- [8] 朱新产, 王宝维, 魏益民. 荞麦种子蛋白组分差异研究. 种子, 2000, 6: 9-10.
Zhu X C, Wang B W, Wei Y M. Studies on the changes of seed protein components in buckwheat grain. *Seed*, 2000, 6: 9-10. (in Chinese)
- [9] 王莉花, 殷富有, 刘继梅, 叶昌荣. 利用 RAPD 分析云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系. 分子植物育种, 2004, 2(6): 807-815.
Wang L H, Yin F Y, Liu J M, Ye C R. Genetic diversity and relationships of the wild buckwheat resources from Yunnan Province revealed by RAPD. *Molecular Plant Breeding*, 2004, 2(6): 807-815. (in Chinese)
- [10] Kump B, Javornik B. Genetic diversity and relationships among cultivated and wild accessions of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2002, 49(6): 565-572.
- [11] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among wild and cultivated Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) populations revealed by AFLP analyses. *Genes and Genetic Systems*, 2001, 76(1): 47-52.
- [12] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among cultivated landraces and natural populations of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) revealed by RAPD analyses. *Advances in Buckwheat Research (Section VI)*, 1998: 41-49.
- [13] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic position of east Tibetan natural populations in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2001, 48(1): 63-67.
- [14] 赵丽娟, 张宗文, 黎裕, 王天宇. 苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 159-164.
Zhao L J, Zhang Z W, Li Y, Wang T Y. Genetic diversity in tartary buckwheat based on ISSR marker. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2006, 7(2): 159-164. (in Chinese)
- [15] Iwata H, Imon K, Tsumura Y, Ohsawa R. 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. *Genome*, 2005, 48(3): 367-377.
- [16] Manubens A, Lobos S, Jadue Y, Toro M, Messina R, Lladser M, Seelenfreund D. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine

- and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17(3): 255-267.
- [17] Vos P, Hoger R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuclear Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [18] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [19] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003, 164(4): 1567-1587.
- [20] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [21] Senthilkumaran R, Bisht I S, Bhat K V, Rana J C. Diversity in buckwheat (*Fagopyrum* spp.) landrace populations from north-western Indian Himalayas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2008, 55(2): 287-302.
- [22] 夏明忠, 王安虎. 野生荞麦资源研究. 北京: 中国农业出版社, 2008: 1-299.
- Xia M Z, Wang A H. *Wild Buckwheat Research*. Beijing: China Agricultural Press, 2008: 1-299. (in Chinese)
- [23] 赵佐成, 周明德, 王中仁, 侯 鑫. 中国苦荞麦及其近缘种的遗传多样性研究. *遗传学报*, 2002, 29(8): 723-734.
- Zhao Z C, Zhou M D, Wang Z R, Hou X. Genetic diversity and differentiation of *Fagopyrum tataricum* and its related species in China. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(8): 723-734. (in Chinese)
- [24] Wei Y M. Buckwheat production in China. *Current Advances in Buckwheat Research*, 1995: 7-10.
- [25] Murai M, Ohnishi O. Diffusion routes of buckwheat cultivation in Asia revealed by RAPD markers. *Current Advances in Buckwheat Research*, 1995: 163-173.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)