

荞麦及其野生种遗传多样性分析

史建强^{1,2}, 李艳琴¹, 张宗文^{2,3}, 吴斌², 王安虎⁴

(¹山西大学生物技术研究所, 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; ⁴西昌学院, 四川西昌 615013)

摘要:荞麦起源于我国西南地区, 该地区分布有大量荞麦地方品种和野生近缘种。本研究利用 SSR 分子标记, 对从我国西南地区收集的 81 份荞麦及其野生资源进行遗传多样性分析。结果显示, 利用 19 对 SSR 引物共检测出 84 个等位基因, 每对 SSR 引物平均扩增出 4.421 个等位基因, 19 对 SSR 引物的平均 Shannon's 信息指数为 0.985, 平均 PIC 为 0.478。81 份荞麦及其野生资源的相似系数范围为 0.500 ~ 1.000, 分析发现大粒组荞麦种(甜荞及其近缘种、苦荞及小米荞、金荞)与小粒组硬枝万年荞亲缘关系比较近。通过聚类分析在遗传相似系数为 0.732 时, 可将 81 份荞麦种质分为 4 个类群, 第 I 类由小粒组齿翅野荞、细柄野荞、小野荞麦、疏穗小野荞麦和硬枝万年荞组成; 第 II 类由甜荞和甜荞近缘种组成; 第 III 类都是由金荞组成; 第 IV 类是由苦荞和小米荞组成。在遗传系数为 0.920 时, 小粒组荞麦种可以明显区分出疏穗小野荞麦、硬枝万年荞、齿翅野荞及其细柄野荞。研究表明, 19 对 SSR 引物多态性较高, 能较好反应荞麦及其野生种质的遗传多样性, 本研究的结果为荞麦属种之间的亲缘关系分析和荞麦起源进化研究提供科学依据。

关键词:野生荞麦; SSR 标记; 遗传多样性

Genetic Diversity of Buckwheat and Its Wild Species

SHI Jian-qiang^{1,2}, LI Yan-qin¹, ZHANG Zong-wen^{2,3}, WU Bin², WANG An-hu⁴

(¹Institute of Biotechnology of Shanxi University, Taiyuan 030006; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³The Office for East Asia, Bioversity International,

Beijing 100081; ⁴Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: Buckwheat was originated in southwest of China, where exists a large number of buckwheat landraces and wild relatives. This study analyzed the genetic diversity of 81 samples of buckwheat and its wild species with SSR molecule makers. The results indicated that 84 alleles were detected among 81 samples of 11 species by 19 pairs of SSR primers, averaged 4.421 alleles by each pair of SSR primers. The average Shannon's information index of 19 pairs of SSR primers was 0.985, while the average PIC was 0.478. The similarity coefficient of 81 buckwheat samples were 0.500 to 1.000. The analysis found that the large-seed group grain (*F. esculentum*, *F. esculentum* ssp. *ancestralis*, *F. tataricum*, *F. kashmirianum*, *F. cymosum*) were more closely related to *F. urophyllum*. At the position 0.732 of the similarity coefficient, all samples can be divided into four categories by the clustering analysis. The first category is composed of *F. gracilipes*, *F. gracilipes* var. *odontopterum*, *F. leptopodum*, *F. leptopodum* var. *grossii* and *F. urophyllum*; the second category is made up of *F. esculentum*, and *F. esculentum* ssp. *ancestralis*, the third category is composed of *F. cymosum* only, and the fourth category included *F. tataricum* and *F. kashmirianum*. However, the pellets, can be obviously distinguished into buckwheat *Eleptopodum* var. *grossii*, *Europhyllum*, *Egracilipes* and *Egra-*

收稿日期: 2014-09-09 修回日期: 2014-10-13 网络出版日期: 2015-04-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150410.1629.024.html>

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程; 国家科技支撑计划项目(2013BAD01B05-2)

第一作者主要开展荞麦种质资源遗传多样性研究。E-mail: 735602589@qq.com

通信作者: 张宗文, 主要开展荞麦种质资源遗传多样性研究, E-mail: zhangzongwen@caas.cn

cilipes var. *odontopterum*. At the position 0.920 of genetic coefficient, *F. leptopodium* var. *grossii*, *F. urophyllum*, *F. gracilipes* var. *odontopterum* and *F. gracilipes* were clearly distinguished in the small-seed group. This research shows that SSR primers had high level of polymorphism and is able to detect the genetic diversity of buckwheat and its wild species. The results provided a scientific basis for analyzing the genetic relationships and studying the origin and evolution of buckwheat.

Key words: wild buckwheat; SSR markers; genetic diversity

荞麦属于蓼科 (*Polygonaceae*) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill), 一年生草本双子叶植物。荞麦具有较高的营养价值和药用价值, 荞麦含有丰富的黄酮类、维生素、微量元素、蛋白质和膳食纤维等^[1-3], 现代医学表明荞麦中的黄酮类化合物作为一种功能成分, 可用于防治肝炎和关节炎、抗肿瘤、平喘、抗氧化活性以及降血脂和血糖^[4-6]。此外, 荞麦中槲皮素还具有防治动脉粥样硬化和降低胆固醇等生理功效^[7-8]。我国是世界荞麦的起源中心^[9-14], 其种质资源十分丰富。根据已有报道, 到目前为止在我国发现的荞麦属有 23 个种, 包含大粒组 7 个种和小粒组 16 个种^[15]。对于荞麦属种间系统关系的研究, 仅大粒组种间研究较系统, 而小粒组种间关系研究报道很少。开展荞麦及其野生种资源遗传多样性研究, 探索荞麦属种的遗传关系以及起源进化, 有助于挖掘荞麦野生种种质资源优良基因, 对荞麦品种改良具有重要意义。

随着生物技术的快速发展, SSR (simple sequence repeat) 标记因具有多态性好、重复性好、共显性等优点在荞麦遗传多样性研究方面得到了广泛的应用。早期国内外学者多以等位酶电泳技术、RAPD、AFLP 等技术来研究荞麦的遗传多样性, 多数是以大粒组中的甜荞、苦荞为研究对象, 涉及到野生荞麦种质资源的较少。Z. H. Wang 等^[16]通过酯酶同工酶谱的差异性揭示了荞麦种子蛋白的多样性, 并提出甜荞的等位同工酶变异率大于苦荞。赵佐成等^[17-18]采用等位酶电泳技术对苦荞栽培居群的研究, 结果表明苦荞居群的遗传多样性水平较高, 并且居群之间有明显的遗传分化, 之后又采用该技术对四川和云南的栽培苦荞和野生荞麦进行遗传多样性研究, 结果表明野生荞麦的遗传多样性比栽培苦荞的要高。B. Kump 等^[19]用 RAPD 技术研究了苦荞及其野生荞麦种间和种内的遗传多样性, 认为种间的遗传多样性水平高于种内。王莉花等^[20]利用 RAPD 技术分析了云南野生荞麦资源, 结果表明了云南野生荞麦资源种间比种内具有更丰富的多样性。侯雅

君等^[21]利用 AFLP 标记对 14 个不同地理来源的苦荞种质资源进行研究, 认为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。H. Iwata 等^[22]利用 5 对 SSR 引物分析了日本 19 个甜荞品种, 揭示出甜荞品种内具有较高的遗传多样性。K. H. Ma 等^[23]开发了 10 对 SSR 引物并对不同地理来源的 41 个甜荞品种进行遗传多样性检测, 表明了 SSR 标记的多态性及其可靠性。杜晓磊等^[24]通过 SSR 分子标记首次构建了包含 15 个连锁群, 89 个标记组成的苦荞遗传连锁图。田晓庆等^[25]用 SSR 标记来分析荞麦栽培种质资源的遗传多样性, 表明了甜荞和苦荞的亲缘关系比较远。任翠娟等^[26]以 10 对随机引物通过 RAPD 研究 50 份栽培荞麦及野生荞麦资源, 包括硬枝万年麦、*F. pleioramosum*、*F. calianthum*、细野荞 4 个种类。总的来讲, 上述研究主要针对大粒组物种, 很少涉及小粒组野生荞麦。本研究采用 SSR 分子标记对已收集到的 81 份荞麦及其野生种质资源的遗传多样性进行分析, 目的在于揭示不同野生荞麦种之间以及野生种与栽培种之间的遗传关系, 为荞麦起源进化研究和野生荞麦种质资源的有效利用研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选取的 81 份材料均由中国农业科学院作物科学与研究所与西昌学院的研究人员共同在四川采集。试验材料包括甜荞、苦荞及其野生种共 11 个种或亚种, 可分为大粒组即甜荞 (*F. esculentum*)、苦荞 (*F. tataricum*)、金荞麦 (*F. cymosum*)、小米荞 (*F. kashmirianum*)、甜荞近缘种 (*F. esculentum* ssp. *ancestralis*) 和小粒组即齿翅野荞 (*F. gracilipes* var. *odontopterum*)、细柄野荞 (*F. gracilipes*)、小野荞 (*F. leptopodium*)、疏穗小野荞 (*F. leptopodium* var. *grossii*)、密毛野荞 (*F. densovillosum*)、硬枝万年荞 (*F. urophyllum*) (表 1)。

表 1 供试材料名称和来源

Table 1 The botanic names and sources of the tested materials

学名 Species	编号 Collecting number	原产地 Origin	代号 Code	学名 Species	编号 Collecting number	原产地 Origin	代号 Code
齿翅野荞	XDCC201210021	四川喜德县	a1	细柄野荞	XDXB201211028	四川喜德县	g1
<i>F. gracilipes</i> var. <i>odontopterum</i>	XDCC201211027	四川喜德县	a2	<i>F. gracilipes</i>	ZJXB2012102602	四川昭觉县	g2
	YXCC201211030	四川喜德县	a3		ZJXB2012102605	四川昭觉县	g3
	ZJCC2012102601	四川喜德县	a4		ZJXB2012102703	四川昭觉县	g4
	ZJCC2012102603	四川昭觉县	a5		ZJXB2012102802	四川昭觉县	g5
	ZJCC2012102604	四川昭觉县	a6		MGXB2012102901	四川美姑县	g6
	ZJCC2012102701	四川昭觉县	a7		HLXB2012110303	四川会理县	g7
	ZJCC2012102702	四川昭觉县	a8		HLXB2012110306	四川会理县	g8
	ZJCC2012102704	四川昭觉县	a9		HDXB2012110401	四川会理县	g9
	BTCC2012102705	四川布拖县	a10		HDXB2012110404	四川会理县	g10
	BTCC2012102706	四川昭觉县	a11		HDXB2012110501	四川会东县	g11
	ZJCC2012102801	四川昭觉县	a12		HDCC2012110504	四川会理县	g12
	ZJCC2012102803	四川昭觉县	a13		HDXB2012110504	四川会东县	g13
	MGCC2012102902	四川美姑县	a14		HLXB2012110301	四川会理县	g14
	LBCC2012103002	四川雷波县	a15		MNXB201210006	四川冕宁县	g15
	HLCC2012110304	四川会理县	a16		XDXB201210014	四川喜德县	g16
	HLCC2012110305	四川会理县	a17		XDXB201211046	四川喜德县	g17
	HDCC2012110402	四川会东县	a18		YXXB201211031	四川越西县	g18
	HDCC2012110502	四川会东县	a19		YYCC201210012	四川盐源县	g19
	HDCC2012110503	四川会东县	a20	金荞麦	XDJQ201210004	四川冕宁县	h1
	YXCC201211040	四川越西县	a21	<i>F. cymosum</i>	MNJQ201210007	四川冕宁县	h2
	YXCC201211044	四川越西县	a22		XDKQ201210017	四川喜德县	h3
苦荞	XDKQ201210003	四川喜德县	b1		XDJQ201210022	四川喜德县	h4
<i>F. tataricum</i>	XDKQ201210005	四川喜德县	b2		YXJQ201211029	四川喜德县	h5
	XDKQ201210013	四川喜德县	b3		YXJQ201211039	四川喜德县	h6
	XDKQ201210019	四川喜德县	b4		XDJQ201211045	四川喜德县	h7
	XDKQ201210020	四川喜德县	b5		DCJQ2012110302	四川德昌县	h8
	YXKQ201211032	四川喜德县	b6		PGJQ2012110601	四川普格县	h9
	YXKQ201211033	四川喜德县	b7		DCJQ2012110202	四川德昌县	h10
疏穗小野荞	YXSS201211036	四川越西县	c1		HDJQ2012110403	四川会东县	h11
<i>F. leptopodum</i> var. <i>grossii</i>	GLSS201211037	四川甘洛县	c2		XDJQ201210002	四川喜德县	h12
	GLSS201211038	四川甘洛县	c3		XDKQ201210018	四川喜德县	h13
	GLSS201211050	四川甘洛县	c4		YXJQ201211043	四川越西县	h14
	GLSS201211052	四川甘洛县	c5	硬枝万年荞	YYYZ201210011	四川喜德县	i1
	YXSS201211051	四川越西县	c6	<i>F. urophyllum</i>	MGJZ2012102903	四川美姑县	i2
甜荞近缘种	XCYTQ201210008	四川冕宁县	d1		LBYZ2012103004	四川雷波县	i3
<i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	LBTJ2012103001	四川雷波县	d2		MGYZ2012102903	四川雷波县	i4
小野荞	XDXY201210021	四川喜德县	e1	小米荞	YXXMQ201211034	四川喜德县	j1
<i>F. leptopodum</i>	MNXY201210024	四川喜德县	e2	<i>F. kashmirianum</i>	YXXM201211042	四川喜德县	j2
密毛野荞	MGMM2012102804	四川美姑县	f1	甜荞	平荞 2 号	甘肃	k1
<i>F. densovillosum</i>	LBMM2012103003	四川雷波县	f2	<i>F. esculentum</i>			

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 以荞麦叶为试验材料,采用 CTAB 改良法^[27]提取荞麦基因组 DNA,用核酸蛋白定量分析仪结合 1% 琼脂糖凝胶电泳的方法检测所提 DNA 的纯度和浓度。DNA 模板工作浓度稀释为 30 ng/ μ L,置于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 SSR 引物筛选 用本实验室开发的 700 对 SSR 引物在 12 份不同荞麦材料间进行初步筛选,得到 101 对差异性引物,选取其中扩增效果好、条带清新、差异明显的 19 对引物在 81 份荞麦进行 PCR 扩增反应。

1.2.3 反应体系及扩增反应 SSR-PCR 反应体系为 20 μ L,包括 10 \times buffer 2 μ L, 2.5 mM dNTP 0.4 μ L, 10 μ M 引物 0.6 μ L, 2.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.4 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 15 μ L。PCR 反应程序为: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 30 个循环; 72 °C, 7 min; 4 °C 保存。PCR 扩增在 Biorad (*MyCycler*) 型 PCR 仪进行。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离检测。

1.2.4 数据统计与分析 根据电泳胶图,对扩增出的条带进行统计。有带记为 1,无带记为 0。采用 Popgene1.32 软件分析不同品种间某一位点的有效等位基因 (N_e)、Shannon 信息指数 (I),标记位点的多态性信息含量 (PIC , *polymorphism information content*),按公式 $PIC = 1 - \sum f_i^2$ 计算^[28];采用 NTSYS-pc 2.20 软件计算遗传相似系数,并用非加权组平均法 (*UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic*) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的多态性分析

利用 19 对 SSR 引物对 81 份荞麦材料进行分析,共检测出 84 个等位基因(表 2),每对 SSR 引物平均扩增出 4.421 个等位基因,每对 SSR 引物扩增出的等位基因范围为 3~7 个,引物 BM472 扩增出的等位基因最多,有 7 个等位基因,19 对 SSR 引物平均有效等位基因数为 2.204,变异范围为 1.635~3.065,平均 Shannon's 信息指数为 0.985,范围为 0.673~1.379。19 对 SSR 引物的平均 PIC 为 0.478,变幅为 0.353~0.622, $PIC > 0.5$ 的高度多态性信息位点有 5 个,其中引物 BM463 多态性最高为 0.622(图 1),引物 BM559 最低为 0.353。结果显示 19 对引物多态性较高,能较好反应荞麦种质的遗传多样性。

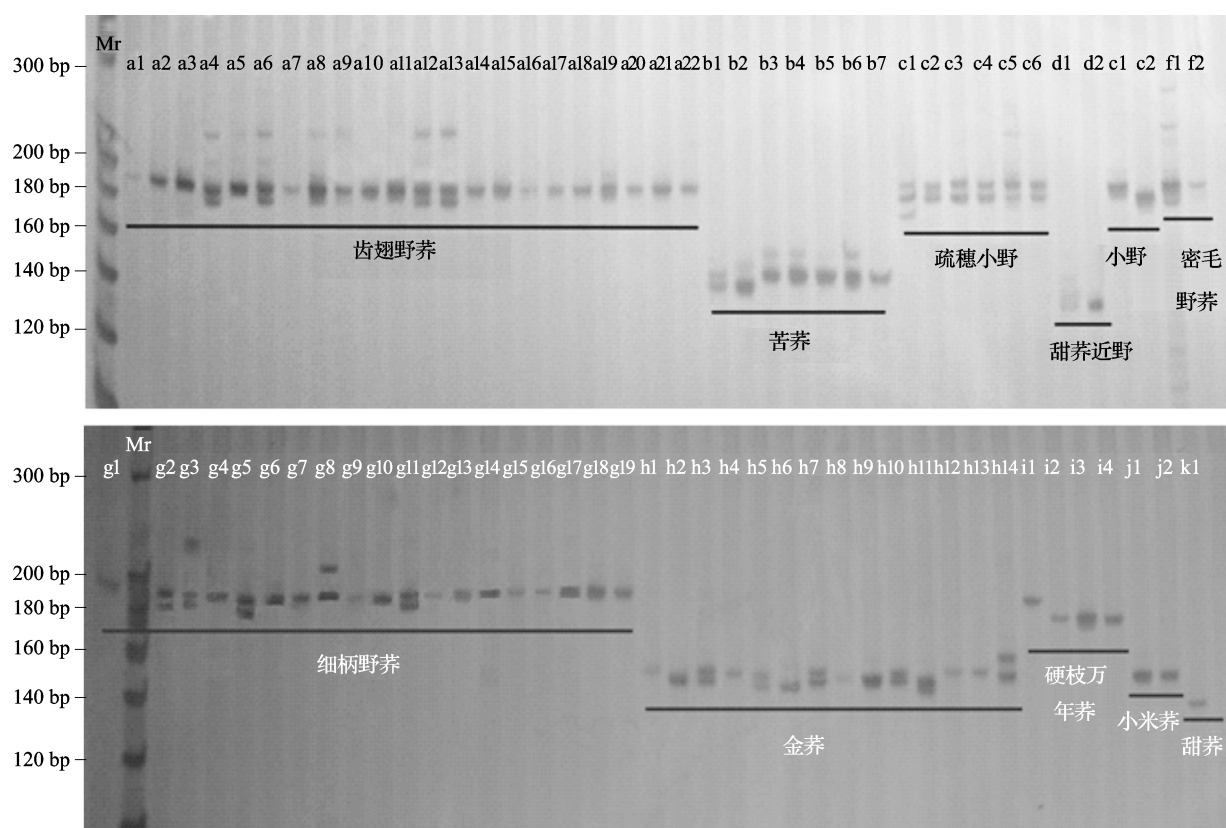
表 2 19 对 SSR 引物扩增结果

Table 2 Amplification result of 19 pairs of SSR primers

SSR 标记 Markers	等位变异 N_a	有效等位变异 N_e	Shannon's 信息指数 I	多态信息含量 PIC
BM024	4	1.920	0.885	0.433
BM076	3	1.814	0.668	0.354
BM191	4	2.009	0.943	0.461
BM331	4	2.007	0.946	0.462
BM350	5	1.917	0.880	0.423
BM374	5	2.142	0.955	0.465
BM377	4	2.088	1.000	0.485
BM383	5	2.828	1.207	0.582
BM398	3	1.733	0.673	0.348
BM463	6	2.923	1.352	0.622
BM469	6	2.076	1.089	0.492
BM472	7	3.012	1.379	0.621
BM516	4	2.034	0.939	0.459
BM517	4	3.065	1.222	0.613
BM520	4	1.932	0.884	0.430
BM529	4	2.038	0.947	0.465
BM535	4	2.082	0.933	0.470
BM559	3	1.635	0.705	0.353
BM678	5	2.616	1.112	0.551

2.2 荞麦种间遗传关系

荞麦物种间的相似系数分布在 0.500~1.000 之间,小粒组中齿翅野荞与细柄野荞的相似系数最高达 0.984,小野荞麦与疏穗小野荞麦的相似系数最高达 0.961,密毛野荞与细柄野荞的相似系数最高达 0.967,硬枝万年荞与小野荞麦的相似系数最高达 0.960;在大粒组中苦荞与小米荞的相似系数最高达 0.967,甜荞与甜荞近缘种的相似系数最高达 0.918,金荞与苦荞的相似系数最高达 0.787,与甜荞的相似系数最高达 0.656(表 3、4)。小粒组中各荞麦种属间的遗传差异较小,各荞麦种属间的最高相似系数都高达 0.900 以上,小粒组中荞麦种属两两之间的相似系数最小值是硬枝万年荞与密毛野荞为 0.795。大粒组中苦荞与小米荞的遗传差异较小,相似系数最高达 0.967;甜荞与甜荞近缘种遗传差异较小,相似系数高达 0.918;甜荞与苦荞之间的遗传差异最大,相似系数最高达 0.631;金荞麦与其它荞麦种属之间的遗传差异都很大,仅与苦荞的相似系数最高为 0.787。大粒组与小粒组之间的遗传



图中编号同表 1 The number in the figure is the same as in Table 1

图 1 引物 BM463 扩增 81 份荞麦及其野生种材料的 SSR 电泳图

Fig. 1 The SSR-PCR amplification patterns of 81 samples of buckwheat and its wild species by primer BM463

表 3 小粒组野生荞麦种遗传相似系数范围

Table 3 The range of genetic similarity coefficient of arabica group of wild buckwheat

	齿翅野荞 <i>F. gracilipes</i> var <i>odontopterum</i>	疏穗小野 <i>F. leptopodum</i> var. <i>grossii</i>	小野荞麦 <i>F. leptopodum</i>	密毛野荞 <i>F. densovillosum</i>	细柄野荞 <i>F. gracilipes</i>	硬枝万年荞 <i>F. urophyllum</i>
齿翅野荞	0.918-1.000					
疏穗小野	0.869-0.934	0.959-1.000				
小野荞麦	0.844-0.934	0.877-0.961	0.918-1.000			
密毛野荞	0.828-0.934	0.844-0.934	0.803-0.934	0.885-1.000		
细柄野荞	0.861-0.984	0.844-0.943	0.803-0.943	0.836-0.967	0.885-1.000	
硬枝万年荞	0.828-0.918	0.852-0.910	0.828-0.960	0.795-0.918	0.820-0.934	0.910-1.000

表 4 大粒组荞麦种属遗传相似系数范围

Table 4 The range of genetic similarity coefficient of large group of buckwheat grain

	苦荞 <i>F. tataricum</i>	甜荞近缘种 <i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	金荞 <i>F. cymosum</i>	小米荞 <i>F. kashmirianum</i>	甜荞 <i>F. esculentum</i>
苦荞	0.910-1.000				
甜荞近缘种	0.598-0.689	0.975-1.000			
金荞	0.648-0.787	0.615-0.721	0.852-1.000		
小米荞	0.877-0.967	0.697-0.705	0.697-0.779	1.000-1.000	
甜荞	0.549-0.631	0.910-0.918	0.574-0.656	0.648-0.648	1.000-1.000

差异较大,最高相似系数在 0.623 ~ 0.787 之间,苦荞与硬枝万年荞相似系数最高为 0.697,小米荞与硬枝万年荞的相似系数最高为 0.713,金荞与硬枝万年荞的相似系数最高为 0.680,甜荞近缘种与密毛野荞的相似系数最高为 0.787,甜荞与硬枝万年荞的相似系

数最高为 0.738(表 5)。大粒组和小粒组中的荞麦种属的种内遗传差异性较小,在小粒组中种内相似系数最小的荞麦种属是密毛野荞、细柄野荞,即种内的遗传相似系数最小值都为 0.885,而大粒组中是金荞,种内遗传相似系数最小值为 0.852(表 3、4)。

表 5 大粒组与小粒组荞麦种属间最大相似系数

Table 5 The biggest similarity coefficient between large grain group and arabica group buckwheat species

	苦荞 <i>F. tataricum</i>	甜荞近缘种 <i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	金荞 <i>F. cymosum</i>	小米荞 <i>F. kashmirianum</i>	甜荞 <i>F. esculentum</i>
齿翅野荞	0.672	0.738	0.639	0.705	0.680
细柄野荞	0.656	0.779	0.639	0.705	0.713
小野荞麦	0.656	0.770	0.656	0.689	0.713
密毛野荞	0.656	0.787	0.656	0.689	0.730
疏穗小野荞	0.639	0.754	0.623	0.672	0.697
硬枝万年荞	0.697	0.779	0.680	0.713	0.738

通过 UPGMA 对 81 份荞麦种质的遗传相似系数进行聚类分析,得到聚类树状图(图 2)。在遗传相似系数为 0.732 时,可将 81 份荞麦种质分为 4 个类群,第 I 类由小粒组齿翅野荞 (*F. gracilipes* var. *odontopterum*)、细柄野荞 (*F. gracilipes*)、疏穗小野荞麦 (*F. leptopodium* var. *grossii*)、小野荞麦 (*F. leptopodium*) 和硬枝万年荞 (*F. urophyllum*) 组成;第 II 类由甜荞 (*F. esculentum*) 和甜荞近缘种 (*F. esculentum* ssp. *ancestralis*) 组成;第 III 类都是由金荞 (*F. cymosum*) 组成;第 IV 类是由苦荞 (*F. tataricum*) 和小米荞 (*F. kashmirianum*) 组成。但在遗传系数为 0.920 时,小粒组荞麦明显的可以区分出疏穗小野荞麦、硬枝万年荞、齿翅野荞及其细柄野荞;齿翅野荞与细柄野荞之间亲缘关系很近,两者几乎难以区分。在大粒组中,甜荞、金荞、苦荞、小米荞和甜荞近缘种可以明确区分,甜荞与甜荞近缘种亲缘关系较近,苦荞与小米荞亲缘关系较近,金荞与其他荞麦种属的亲缘关系相对较远。

本研究的野生荞麦材料原产地主要来自四川的 10 个县,齿翅野荞、细柄野荞、金荞材料较多,齿翅野荞和细柄野荞都来自四川的 8 个县,金荞来自四川的 6 个县。通过聚类树状图发现,四川各个县区的齿翅野荞在相似系数为 0.956 时,喜德县 (3 份)、会东县 (3 份)、会理县 (2 份)、越西县 (2 份)、布拖县、美姑县、雷波县 (1 份) 聚在一起,而昭觉县 (7 份) 和喜德县 (2 份) 聚在一起;各个县区的细柄野荞不能明显在聚类树状图上区分出来,但昭

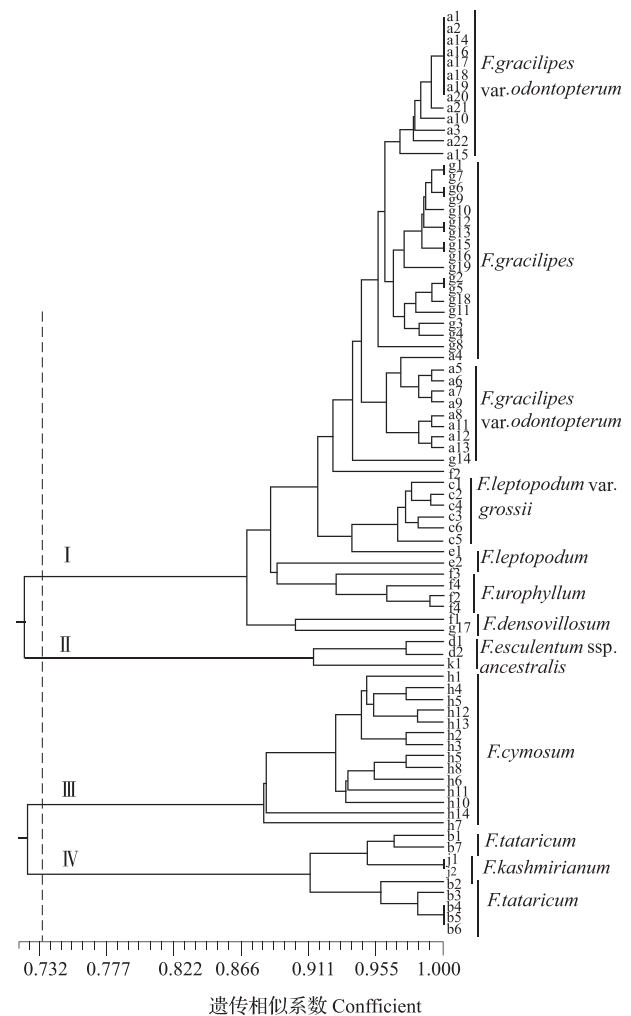


图 2 81 份荞麦种质资源聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 81 Buckwheat samples

觉县(4份)和会理县(4份)的细柄野荞可以在相似系数为0.957区分出来;对于四川6个县区的金荞,越西县(1份)明显的从其他县区材料分离出来,冕宁县(2份)和喜德县(4份)以及普格县(1份)在相似系数为0.954时聚在一起,而喜德县(2份)、德昌县(2份)和会东县(1份)聚在一起。

3 讨论

3.1 SSR 标记与荞麦属种遗传多样性研究

本研究利用19对SSR引物对81份荞麦材料进行遗传多样性分析,从这些引物扩增荞麦种质的SSR电泳图发现,每份荞麦材料的SSR条带数在1~4条之间,并且同一荞麦种属间SSR条带大小基本在同一位置,从不同荞麦种属间SSR条带大小大多数是不同的,形成了可以区分不同荞麦种属的SSR带型。小粒组中各荞麦种属间的带型大致相同,不同引物中可以区分出小粒组中的荞麦。如图1所示疏穗小野荞麦都有两条带,明显可以从小粒组荞麦中区分出来;大粒组中各荞麦种属的带型大小也是基本在同一个水平上,但是相对小粒组来说,带型较复杂,主要体现在金荞上,金荞种内在不同引物中都能表现出多种带型,在胶图上可直观的表现出多态性(如图1),甜荞和甜荞近缘种带型单一,苦荞和小米荞带型大多数是相同的,但是也有一定的差异;有趣的是苦荞和金荞在这19对引物所对应的SSR胶图上所对应的带型大致相同,但是大小不同,一般是金荞的最小带小于苦荞的最小带。可见,SSR分子标记作为一个共显性标记,以杂带少、重复性好、稳定性高的优点对荞麦种属能够很好的区分出来,并且为构建荞麦种指纹图谱奠定了一定的科学依据。

3.2 荞麦属种遗传关系及栽培种起源进化

通过UPGMA对81份荞麦种质进行聚类分析,发现大粒组和小粒组之间明显区分开来,说明大粒组和小粒组之间有明显的遗传差异,这与任翠娟等^[26]通过RAPD标记对50份栽培荞麦及野生荞麦资源进行研究得到结果是一致的。

在小粒组中,齿翅野荞和细柄野荞相似系数很高,在胶图上也很难把它们区分开来,这也可能是因为齿翅野荞是细柄野荞的一个变种,并且在形态学上,它们之间基本一样,只有齿翅野荞的果实比细柄野荞多了粉红色或浅红色的翅^[29-30],虽然在相似系数为0.920时细柄野荞和齿翅野荞聚在一类,但在相似系数为0.966时,部分齿翅野荞和细柄野荞分离出来。在相似系数为0.905,细柄野荞g17与密毛野荞

f1单独聚集在一起,而密毛野荞f2与细柄野荞和齿翅野荞聚集在一起,对这几种材料需要进一步形态学观察和分子水平上的研究。据报道疏穗小野荞麦是小野荞麦的一个变种^[18],它们之间亲缘关系比较近,但在本研究中,两份小野荞麦没有聚在一起,1份在相似系数为0.945被聚集在疏穗小野荞麦上,而另1份在相似系数为0.895与硬枝万年荞聚在一起,有必要收集小野荞麦和硬枝万年荞进一步来研究它们之间的亲缘关系。在小粒组中齿翅野荞和细柄野荞都是四倍体,而在大粒组中金荞麦有二倍体和四倍体,曾报道通过杂交,也不能得到相应的种子^[31],说明他们之间的亲缘关系很远,在本研究也证明了这一点。在大粒组中,甜荞和甜荞近缘种的亲缘关系很近(相似系数0.910~0.918,苦荞与小米荞的相似系数最大可达0.967(表4),因为小米荞是苦荞的一种变异类型,所以它们之间的亲缘关系很近。

从四川各县区荞麦资源地理分布及聚类树状图看,小粒组野生荞麦种内差异性不是很明显,而大粒组野生荞麦种内差异性相对明显。在小粒组荞麦种属中,同一县区的齿翅野荞、细柄野荞首先大致的聚在一起,部分荞麦与其他县区的同种荞麦也聚在一起,这说明齿翅野荞及其细柄野荞的遗传关系受四川各县区地理环境的影响;大粒组野生荞麦种属中,在相似系数为0.867时,所有的金荞都聚在一起,而在相似系数为0.954时,冕宁县、普格县以及和喜德县部分材料聚在一起,而德昌县、会东县和喜德县部分材料聚在一起,而越西县的金荞从其他县区材料分离出来,表明大粒组金荞的遗传关系也受四川各县区地理环境的影响。

金荞与甜荞、苦荞的亲缘关系是国内外学者争论的焦点,A. N. Steward^[32]认为金荞与甜荞的亲缘关系比苦荞的近,而Y. Kishima等^[33]、T. Ohsako等^[34-35]以及T. R. Sharma等^[10]的研究结果与前者相反。Q. F. Chen等^[36]认为金荞麦(*F. cymosum complex*)是由二倍体的大野荞、二倍体的毛野荞和异源四倍体的金荞(*F. cymosum*)组成,并得出大野荞、毛野荞分别是甜荞和苦荞的祖先种。之后王莉花等^[20]利用RAPD分析云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系认为金荞(*F. cymosum*)和甜荞的亲缘关系比苦荞的近。本研究发现,金荞与苦荞的遗传相似系数高于金荞与甜荞,从聚类图(图2)上也可以看出在相似系数为0.720左右苦荞和金荞聚在一起,表明金荞与苦荞的亲缘关系比甜荞的近。王安虎等^[30]对四川野生荞麦资源的特征特性与地理分布进行研究,表明硬枝万年荞的地理分布广泛;罗定

泽等^[37]研究发现西南地区硬枝万年荞具有高度多态性,本研究发现大粒组荞麦种与小粒组硬枝万年荞相似系数都很高(表5),即大粒组荞麦(甜荞及近缘种、苦荞、金荞)与硬枝万年荞的亲缘关系较近,同时发现硬枝万年荞具有高度的多态性,由此可推测硬枝万年荞可能是大粒组荞麦种的基因组来源。

参考文献

- [1] Ikeda K, Sakaguchi T, Kusano T, et al. Endogenous factors affecting protein digestibility in buckwheat [J]. *Cereal chemistry*, 1991, 68:424-427
- [2] Huang X Y, Zeller F J, Huang K F, et al. Variation of major minerals and trace elements in seeds of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2014, 61(3):567-577
- [3] 徐宝才, 肖刚, 丁霄霖, 等. 液质联用分析测定苦荞黄酮[J]. *食品科学*, 2003, 24(6):113-117
- [4] Guardia T, Rotelli A E, Juarez A O, et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat [J]. *Farmaco*. 2001, 56(9):683-687
- [5] Lee C C, Shen S R, Lai Y J, et al. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury [J]. *Food Function*, 2013, 4(5):794-802
- [6] 韩淑英, 吕华, 朱丽莎, 等. 荞麦种子总黄酮降血脂血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2001, 17(6):694-696
- [7] JuŸwiak S, Wójcicki J, Mokrzycki K, et al. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits [J]. *Pharmacol Rep*, 2005, 57(57):604-609
- [8] Auger C, Teissedre P L, Gréain P, et al. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(6):2015-2021
- [9] 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
- [10] 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(3):327-333
- [11] Murai M, Ohnishi O. Population genetics of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. X. Diffusion routes revealed by RAPD markers [J]. *Genes & genetic systems*, 1996, 71(4):211-218
- [12] Ohnishi O. Search for the wild ancestor of buckwheat III. The wild ancestor of cultivated common buckwheat, and of tatar buckwheat [J]. *Economic Botany*, 1998, 52(2):123-133
- [13] Tsuji K, Ohnishi O. Origin of cultivated Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD analyses [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2000, 47(4):431-438
- [14] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic position of east Tibetan natural populations in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD analyses [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2001, 48(1):63-67
- [15] 汪德州. 基于 matK 及 rDNA-ITS 对川西荞麦的分子系统关系研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2011
- [16] Wang Z H, Zhang Z, Lin R, et al. Seed protein diversity of buckwheat in China. [C]// the proceedings of the 6th the International Symposium on buckwheat in Shinshu. Current Advances in buckwheat research. Japan: Shinshu University Press, 1995; 411-417
- [17] 赵佐成, 周明德, 罗定泽, 等. 四川省凉山彝族自治州南部三县苦荞栽培居群的遗传多样性研究 [J]. *遗传学报*, 2000, 27(6):538-548
- [18] 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
- [19] 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]. *Genet Resour Crop Ev*, 2002, 49(6):565-572
- [20] 王莉花, 殷富有, 刘继梅, 等. 利用 RAPD 分析云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2(6):807-815
- [21] 侯雅君, 张宗文, 吴斌, 等. 苦荞种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(12):4166-4174
- [22] 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
- [23] Ma K H, Kim N S, Lee G A, et al. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. *Theor. Appl. Genet*, 2009, 119:1247-1254
- [24] 杜晓磊, 张宗文, 吴斌, 等. 苦荞 SSR 分子遗传图谱的构建及分析 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(21):61-65
- [25] 田晓庆, 徐宏亚, 汪灿, 等. 用 SSR 标记分析荞麦栽培种资源的遗传多样性 [J]. *作物杂志*, 2013(5):28-33
- [26] 任翠娟, 陈庆富. 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill) 植物资源的 RAPD 研究 [J]. *种子*, 2009(11):37-44
- [27] Doyle J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem bull*, 1987, 19:11-15
- [28] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95(1-2):163-173
- [29] 王安虎, 夏明忠, 蔡光泽, 等. 四川省凉山州东部野生荞麦资源的特征特性和地理分布研究 [J]. *作物杂志*, 2006(5):008
- [30] 王安虎, 夏明忠, 蔡光泽, 等. 四川野生荞麦资源的特征特性与地理分布多样性研究 [J]. *西南农业学报*, 2008, 21(3):575-580
- [31] Chen Q F, Hsam S, Zeller F J. A Study of Cytology, Isozyme, and Interspecific Hybridization on the Big-Achene Group of Buckwheat Species (*Fagopyrum*, Polygonaceae) [J]. *Crop science*, 2004, 44(5):1511-1518
- [32] Steward A N. The polygonaceae of Eastern Asia [J]. *Contr Gray Herd*, 1930, 88:1-129
- [33] Kishima Y, Ogura K, Mizukami K, et al. Chloroplast DNA analysis in buckwheat species: Phylogenetic relationships, origin of the reproductive systems and extended inverted repeats [J]. *Plant Sci*, 1995, 108:173-179
- [34] Ohsako T, Ohishi O. Intra- and interspecific phylogeny of wild *Fagopyrum* (Polygonaceae) species based on nucleotide sequences of non-coding regions in chloroplast DNA [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(4):573-582
- [35] Ohsako T, Ohishi O. The new *Fagopyrum* (Polygonaceae) species. *F. gracilipedoides* and *F. jinshaense* from Yunnan, China [J]. *Genes Genet Syst*, 2000, 77:399-408
- [36] Chen Q F, Hsam S L K, Zeller F J. Cytogenetic studies on diploid and autotetraploid common buckwheat and their autotriploid and trisomics [J]. *Crop science*, 2007, 47(6):2340-2345
- [37] 罗定泽, 侯鑫, 赵佐成. 西南地区硬枝万年荞麦 (*F. agopyrum urophyllum*) 居群的遗传多样性研究 [J]. *武汉植物学研究*, 2001, 19(2):107-112