

• 研究报告 •

基于ITS和*ndhF-rpl32*序列的 荞麦种间亲缘关系分析

胡亚妮^{1,2} 张宗文^{2,3*} 吴 斌² 高 佳² 李艳琴^{1*}

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中国办事处, 北京 100081)

摘要: 荞麦起源于我国, 演化形成了丰富的物种和遗传多样性。为了有效研究和利用荞麦及其野生种资源, 以从四川、甘肃、贵州等地采集的荞麦属(*Fagopyrum*) 10个种(含变种、亚种和复合体种)共71份材料为对象, 通过ITS和叶绿体*ndhF-rpl32*序列分析, 利用MEGA5.0构建系统进化树, 探讨了荞麦种内及种间亲缘关系。结果表明, 在ITS序列矩阵中, 序列长度为725 bp, 信息位点为150个, 占序列总长度的20.7%; 在*ndhF-rpl32*序列矩阵中, 序列长度为940 bp, 信息位点为158个, 占序列总长度的16.8%。由ITS序列和*ndhF-rpl32*序列构建的两个进化树都可以将71份材料分为大粒荞麦种组和小粒荞麦种组; 其中, 大粒荞麦种组包括栽培苦荞和米苦荞(*F. tataricum*)、金荞复合体(*F. cymosum* complex)、栽培甜荞(*F. esculentum*)和野生甜荞(*F. esculentum* ssp. *ancestralis*); 小粒荞麦种组包括齿翅野荞(*F. gracilipes* var. *odontopterum*)、疏穗小野荞(*F. leptopodum* var. *grossii*)、小野荞(*F. leptopodum*)、密毛野荞(*F. densovillosum*)、细柄野荞(*F. gracilipes*)和硬枝万年荞(*F. urophyllum*)。而*ndhF-rpl32*序列构建的系统发育树还能区分栽培甜荞和野生甜荞, 具有更好的聚类效果。另外, 与栽培甜荞相比, 金荞复合体与栽培苦荞的亲缘关系更近。该研究为荞麦属种的分类和条形码研究提供了一定的科学依据。

关键词: *Fagopyrum*; 亲缘关系; ITS; *ndhF-rpl32*

Genetic relationships of buckwheat species based on the sequence analysis of ITS and *ndhF-rpl32*

Yani Hu^{1,2}, Zongwen Zhang^{2,3*}, Bin Wu², Jia Gao², Yanqin Li^{1*}

1 Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006

2 Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081

3 China Office of Biodiversity International, Beijing 100081

Abstract: Buckwheat was originated in China and evolved into abundant species and genetic diversity. In order to effectively use germplasm resources of buckwheat and its wild relatives, the genetic relationships of buckwheat species were analyzed on 71 *Fagopyrum* samples including 10 species (subspecies, varieties and complex), which were collected mainly from Sichuan, Guizhou and Gansu provinces. Through the analysis of ITS and *ndhF-rpl32* sequences and the construction of phylogenetic trees, the inter- and intra-specific relationships of these species were discussed. Results showed that the sequence length of ITS was 725 bp in the matrix, while the parsimony informative sites was 150, accounting for 20.7% of the total length. In the matrix of *ndhF-rpl32* sequence, the length was 940 bp, while the parsimony informative sites was 158, accounting for 16.8% of total length. On one hand, the phylogenetic trees based on both ITS and *ndhF-rpl32* sequencing data clearly separated the big-achene-group buckwheat (*F. tataricum*, *F. cymosum* complex, *F. esculentum* and *F. esculentum* ssp. *ancestralis*) from the small-achene-group buckwheat (*F. gracilipes* var. *odontopterum*, *F. leptopodum* var. *grossii*, *F. leptopodum*, *F. densovillosum*, *F. gracilipes*, and *F. urophyllum*). On the other

收稿日期: 2015-09-21; 接受日期: 2016-03-02

基金项目: 特色小宗作物种质资源发掘与创新利用(2013BAD01B05-2)和作物种质资源保护与利用专项(2014NWB030-06)

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: zhangzongwen@caas.cn; yanqin@sxu.edu.cn

hand, the phylogenetic tree based on *ndhF-rpl32* sequences can be used to distinguish *F. esculentum* ssp. *ancestralis* and *F. esculentum*, which indicated that the *ndhF-rpl32* sequence was more effective in analyzing the phylogenetic relationships of buckwheat species. These results provide a scientific basis for studies of taxonomy and establishing barcodes of *Fagopyrum* species.

Key words: buckwheat; genetic relationships; ITS; *ndhF-rpl32*

荞麦是蓼科荞麦属(*Fagopyrum*)植物,一般认为有23个种,其中仅甜荞和苦荞为栽培种,其余均为野生种,广泛分布于亚洲及欧洲(陈庆富,2012)。荞麦又是医食同源作物,既是营养丰富的粮食作物,也是疗效良好的药用植物。荞麦营养丰富,蛋白质含量达10%以上,赖氨酸6%左右,并且含有丰富的维生素P即黄酮类化合物,具有降低血脂、胆固醇和血压,软化血管,保护视力和预防脑出血的作用,已经成为应用广泛的保健和功能产品(张玲等,2011;徐琥珀,2014)。

目前,荞麦种间的亲缘关系研究主要涉及形态学、同工酶分析、种子蛋白免疫分析、种间杂交和DNA多态性等5个方面。从形态学上看,甜荞(*F. esculentum*)、苦荞(*F. tataricum*)与金荞复合体(*F. cymosum* complex)是近缘种,且甜荞在形态上与金荞复合体的相似性很高(Steward, 1930; Hedberg, 1946; Hirose et al, 1995)。酯酶同工酶和谷草转氨酶的研究结果表明,荞麦同一物种不同品系之间差异较小,但是不同物种间表现出明显的差异(Chen, 1999a, 2004)。种子蛋白免疫化学分析的结果显示,金荞复合体和苦荞的亲缘关系更近(Shevchuk et al, 1981)。栽培种和野生种的所有杂交组合杂交成功率极低,而且所得的少量杂交种子空瘪,缺乏生活力,表明这2个组合亲缘关系远(Chen, 1999b)。利用AFLP(Sharma et al, 2002b; 侯君雅等, 2009)、RAPD(Tsuji & Ohnishi, 2001; Sharma & Jana, 2002a; 王莉花等, 2004)和SSR(史建强等, 2015)等分子标记对荞麦属不同种间以及品种间的遗传差异研究表明,野生荞麦的种间比种内具有更丰富的多样性。

利用ITS序列和叶绿体基因组序列探讨物种亲缘关系的研究也越来越多。虞泓等(2005)根据ITS的证据探讨了亚洲系百合9个品种的亲缘关系,韩建萍等(2010)利用叶绿体*psbA-trnH*序列区分了肉苁蓉属(*Cistanche*)与草苁蓉属(*Boschniakia*)植物的差异。在荞麦属植物中,王安虎等(2008a)以9个野生种

(变或亚种)以及1个栽培种为研究材料,通过ITS和F. tataricum ssp. *potanini*进化而来。杨玉霞(2008)基于ITS序列和叶绿体基因组中的*matK*、*rbcL*及

尽管对荞麦属种间的亲缘关系研究较多,但由于研究材料不同或者是标记的数量有限等原因,结果并不相同。目前,DNA序列已成为物种系统与进化研究的重要分子标记之一。ITS序列和叶绿体序列碱基变异适中,可以提供丰富的变异位点和信息位点,适用于不同种的分析。因此,本实验结合ITS序列和叶绿体*ndhF-rpl32*序列对现有荞麦材料进行分析,进一步探索荞麦属种间关系,以期为种质创新、野生资源优异基因利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为荞麦种质材料共71份,涵盖荞麦属的10个种(含变种、亚种和复合体种),包括栽培种和野生种。栽培甜荞来自国家种质库,其余材料由中国农业科学院作物科学研究所与西昌学院的研究人员在四川等地采集,参照《荞麦属植物科学》(陈庆富,2012),经详细的物种特征比对,确定了每份材料的物种名称。材料编号、名称及来源见表1。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取

取供试材料种子萌发至3-4片叶龄时的幼嫩叶片,采用改良的CTAB法(Doyle, 1986)提取基因组DNA,用1%琼脂糖凝胶电泳技术及超微量分光光度计检测DNA的纯度和浓度,稀释至其工作浓度30 ng/ μ L。

1.2.2 PCR扩增、测序

利用White等(1990)设计的ITS通用引物序列进

表1 供试的荞麦材料名称和来源

Table 1 The Latin names and sources of the tested *Fagopyrum* materials

编号 Collecting number	原产地 Origin	代号 Code	编号 Collecting number	原产地 Origin	代号 Code
齿翅野荞 <i>Fagopyrum gracilipes</i> var. <i>odontopterum</i>			细柄野荞 <i>F. gracilipes</i>		
YXCC201211030	四川越西 Yuexi, Sichuan	a1	XDXB201211028	四川喜德 Xide, Sichuan	g1
ZJCC2012102601	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	a2	ZJXB2012102602	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	g2
ZJCC2012102603	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	a3	ZJXB2012102605	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	g3
ZJCC2012102604	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	a4	ZJXB2012102703	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	g4
ZJCC2012102704	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	a5	MGXB2012102901	四川美姑 Meigu, Sichuan	g5
BTCC2012102706	四川布拖 Butuo, Sichuan	a6	HLXB2012110303	四川会理 Huili, Sichuan	g6
ZJCC2012102801	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	a7	HLXB2012110306	四川会理 Huili, Sichuan	g7
MGCC2012102902	四川美姑 Meigu, Sichuan	a8	HDXB2012110404	四川会东 Huidong, Sichuan	g8
LBCC2012103002	四川雷波 Leibo, Sichuan	a9	HDXB2012110501	四川会东 Huidong, Sichuan	g9
HLCC2012110304	四川会理 Huili, Sichuan	a10	HDCC2012110504	四川会东 Huidong, Sichuan	g10
HLCC2012110305	四川会理 Huili, Sichuan	a11	HDXB2012110504	四川会东 Huidong, Sichuan	g11
HDCC2012110502	四川会东 Huidong, Sichuan	a12	HLXB2012110301	四川会理 Huili, Sichuan	g12
HDCC2012110503	四川会东 Huidong, Sichuan	a13	MNXB201210006	四川冕宁 Mianning, Sichuan	g13
YXCC201211040	四川越西 Yuexi, Sichuan	a14	XDXB201210014	四川喜德 Xide, Sichuan	g14
YXCC201211044	四川越西 Yuexi, Sichuan	a15	XDXB201211046	四川喜德 Xide, Sichuan	g15
YYCC201210012	四川盐源 Yanyuan, Sichuan	a16	YXXB201211031	四川越西 Yuexi, Sichuan	g16
HDCC2012110402	四川越西 Yuexi, Sichuan	a17	金荞复合体 <i>F. cymosum</i> complex		
栽培苦荞 <i>F. tataricum</i>			XDJQ201210004	四川喜德 Xide, Sichuan	h1
XDKQ201210003	四川喜德 Xide, Sichuan	b1	MNJQ201210007	四川冕宁 Mianning, Sichuan	h2
XDKQ201210005	四川喜德 Xide, Sichuan	b2	XDKQ201210017	四川喜德 Xide, Sichuan	h3
XDKQ201210013	四川喜德 Xide, Sichuan	b3	XDJQ201210022	四川喜德 Xide, Sichuan	h4
XDKQ201210019	四川喜德 Xide, Sichuan	b4	YXJQ201211029	四川越西 Yuexi, Sichuan	h5
XDKQ201210020	四川喜德 Xide, Sichuan	b5	YXJQ201211039	四川越西 Yuexi, Sichuan	h6
YXKQ201211032	四川越西 Yuexi, Sichuan	b6	DCJQ201211045	四川喜德 Xide, Sichuan	h7
YXKQ201211033	四川越西 Yuexi, Sichuan	b7	DCJQ2012110302	四川德昌 Dechang, Sichuan	h8
疏穗小野荞 <i>F. leptopodum</i> var. <i>grossii</i>			PGJQ2012110601	四川普格 Puge, Sichuan	h9
GLSS201211037	四川甘洛 Ganluo, Sichuan	c1	DCJQ2012110202	四川德昌 Dechang, Sichuan	h10
GLSS201211038	四川甘洛 Ganluo, Sichuan	c2	HDJQ2012110403	四川会东 Huidong, Sichuan	h11
GLSS201211050	四川甘洛 Ganluo, Sichuan	c3	XDKQ201210018	四川喜德 Xide, Sichuan	h12
GLSS201211052	四川甘洛 Ganluo, Sichuan	c4	YXJQ201211043	四川越西 Yuexi, Sichuan	h13
YXSS201211051	四川越西 Yuexi, Sichuan	c5	硬枝万年荞 <i>F. urophyllum</i>		
野生甜荞 <i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>			YYYZ201210011	四川盐源 Yanyuan, Sichuan	i1
XCYTQ201210008	四川西昌 Xichang, Sichuan	d1	LBYZ2012103004	四川雷波 Leibo, Sichuan	i2
LBTJ2012103001	四川雷波 Leibo, Sichuan	d2	MGYZ2012102903	四川美姑 Meigu, Sichuan	i3
小野荞 <i>F. leptopodum</i>			栽培甜荞 <i>F. esculentum</i>		
XDXY201210021	四川喜德 Xide, Sichuan	e1	00000664	甘肃武威 Wuwei, Gansu	j1
MNXY201210024	四川冕宁 Mianning, Sichuan	e2	00000906	贵州威宁 Weining, Guizhou	j2
密毛野荞 <i>F. densovillosum</i>			米苦荞 <i>F. tataricum</i>		
MGMM2012102804	四川美姑 Meigu, Sichuan	f1	YXXMQ201211034	四川越西 Yuexi, Sichuan	k1
LBMM2012103003	四川雷波 Leibo, Sichuan	f2	YXXMQ201211042	四川越西 Yuexi, Sichuan	k2

行扩增。序列如下: ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTA-ACAAGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC。 *ndhF-rpl32* 序列扩增所用引物基于GenBank序列号为EU254477的序列, 由Primer 5.0设计。 *ndhF-rpl32* 引物序列如下: FP: TAAGTCCTGCTCCGATTA; RP: TGCCGAATATCCTTTGC。所用引物均由上海生物工程有限公司合成。

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引物各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扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 以下程序循环35次: 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 50 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min。循环结束后, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 4 $^{\circ}$ C保存。PCR扩增在Biorad公司的mycycler型PCR仪上进行。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 由上海生物工程有限公司采用ABI测序仪(3730xl DNA

Analyzer)进行测序。

1.2.3 排序和系统发育分析

测序后序列的编辑拼接用SeqMan完成, 空位作缺失处理。全部序列两端切平后, 获得的序列矩阵通过MEGA5.0进行聚类分析, 采用neighbor-joining (邻接法)比对, 使用Jukes-Cantor距离法, 进行1,000次自展重复检测支持率。

2 结果

2.1 ITS和*ndhF-rpl32*序列变异

经扩增、测序, 部分样品重复扩增测序验证, 测定了71份材料的ITS和*ndhF-rpl32*序列。经序列比对, 两端切平后, 获得ITS的序列矩阵总长为725 bp。其中, ITS序列长度为642 bp, ITS1长度为288 bp, ITS2长度为225 bp, *ndhF-rpl32*序列矩阵总长为940 bp。ITS序列信息位点为150个, 占总序列长度的20.7%。ITS1中信息位点为86个, 占ITS1序列长度的29.9%, ITS2中信息位点为57个, 占ITS2序列长度的25.3%; 而*ndhF-rpl32*信息位点为158个, 占序列长度的16.8%。ITS序列和*ndhF-rpl32*序列中每个种的G+C含量列于表2, 在ITS序列中, 栽培苦荞和米苦荞(*Fagopyrum tataricum*)的G+C碱基含量明显高于其他种, 而在*ndhF-rpl32*序列中, 密毛野荞(*F. densovillosum*)和硬枝万年荞(*F. urophyllum*)的G+C含量较高。

2.2 基于ITS和*ndhF-rpl32*序列的荞麦种内及种间遗传关系分析

采用MEGA5.0软件, 选择Jukes-Cantor距离模型, 对ITS和*ndhF-rpl32*序列数据进行分析, 分别得到了种内平均遗传距离(表3)和种间平均遗传距离(表4)。

由表3看出, 在ITS序列中, 硬枝万年荞的ITS序列种内遗传距离最大, 为0.165, 说明其ITS序列遗传多样性最为丰富。比较ITS序列种内距离与种间距离发现, 栽培苦荞的种内遗传距离为0.003, 而栽培苦荞与米苦荞的种间遗传距离为0.002, 栽培苦荞的种内遗传距离大于与米苦荞的种间遗传距离, 即栽培苦荞的种内变异完全超过了米苦荞, 这与米苦荞是栽培苦荞的一个变异类型相符合。齿翅野荞(*F. gracilipes* var. *odontopterum*)、密毛野荞(*F. densovillosum*)、细柄野荞(*F. gracilipes*)和小野荞(*F. leptopodum*)任意两两之间的遗传距离均小于或等于相对应的种内遗传距离, 这4个种两两之间难以

表2 不同荞麦种(含变种、亚种和复合体种)的ITS序列和*ndhF-rpl32*序列中G+C含量

Table 2 The G+C contents of ITS and *ndhF-rpl32* sequences in *Fagopyrum* species

种名 Species	ITS (%)	<i>ndhF-rpl32</i> (%)
齿翅野荞 <i>F. gracilipes</i> var. <i>odontopterum</i>	65.57	24.17
栽培苦荞 <i>F. tataricum</i>	67.65	22.79
疏穗小野荞 <i>F. leptopodum</i> var. <i>grossii</i>	65.96	22.01
野生甜荞 <i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	66.46	24.47
小野荞 <i>F. leptopodum</i>	66.82	23.43
密毛野荞 <i>F. densovillosum</i>	65.34	24.77
细柄野荞 <i>F. gracilipes</i>	65.81	23.17
金荞复合体 <i>F. cymosum</i> complex	65.80	22.75
硬枝万年荞 <i>F. urophyllum</i>	63.93	24.68
栽培甜荞 <i>F. esculentum</i>	65.47	24.13
米苦荞 <i>F. tataricum</i>	67.95	23.40

表3 基于ITS序列和*ndhF-rpl32*序列计算的荞麦种内遗传距离

Table 3 Distance within *Fagopyrum* species based on ITS and *ndhF-rpl32* sequences

种名 Species	ITS	<i>ndhF-rpl32</i>
齿翅野荞 <i>F. gracilipes</i> var. <i>odontopterum</i>	0.001	0.182
栽培苦荞 <i>F. tataricum</i>	0.003	0.000
疏穗小野荞 <i>F. leptopodum</i> var. <i>grossii</i>	0.002	0.002
野生甜荞 <i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	0.107	0.001
小野荞 <i>F. leptopodum</i>	0.062	0.021
密毛野荞 <i>F. densovillosum</i>	0.003	0.018
细柄野荞 <i>F. gracilipes</i>	0.001	0.099
金荞复合体 <i>F. cymosum</i> complex	0.028	0.026
硬枝万年荞 <i>F. urophyllum</i>	0.165	0.014
栽培甜荞 <i>F. esculentum</i>	0.110	0.000
米苦荞 <i>F. tataricum</i>	0.000	0.001

区分。栽培甜荞与野生甜荞的遗传距离为0.133, 而其种内遗传距离分别为0.110和0.107, 表明栽培甜荞与野生甜荞种内遗传差异较大, 虽然两者的种间遗传距离比种内距离大, 但倍率较小, 本分析方法对两者的区分度不高。金荞复合体与栽培苦荞和栽培甜荞的遗传距离分别为0.059和0.168, 而三者种内遗传距离分别为0.028、0.003和0.110, 说明通过ITS序列可以有效区分金荞复合体、栽培苦荞和栽培甜荞这3个种, 同时也表明, 金荞复合体与栽培苦荞的亲缘关系比与栽培甜荞更近。

由表3看出, 齿翅野荞的*ndhF-rpl32*序列种内遗传距离最大, 为0.182, 序列比对后发现, 其中齿翅野荞材料a6与a8的*ndhF-rpl32*序列相似性较高, 其

表4 由ITS序列(对角线下)和 $ndhF-rpl32$ 序列(对角线上)计算的荞麦种间遗传距离Table 4 Distance between *Fagopyrum* species based on ITS (below diagonal) and $ndhF-rpl32$ (above diagonal) sequences

	CC	KQ	SS	TJ	XY	MM	XB	JQ	YZ	TQ	MKQ
齿翅野荞(CC) <i>F. gracilipes</i> var. <i>odontopterum</i>		0.191	0.024	0.198	0.001	0.001	0.001	0.191	0.027	0.197	0.191
栽培苦荞(KQ) <i>F. tataricum</i>	0.157		0.185	0.037	0.191	0.190	0.191	0.007	0.188	0.039	0.001
疏穗小野荞(SS) <i>F. leptopodium</i> var. <i>grossii</i>	0.034	0.169		0.191	0.025	0.024	0.025	0.186	0.021	0.194	0.186
野生甜荞(TJ) <i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	0.193	0.145	0.209		0.199	0.198	0.199	0.039	0.194	0.003	0.038
小野荞(XY) <i>F. leptopodium</i>	0.031	0.176	0.038	0.204		0.001	0.000	0.192	0.028	0.198	0.192
密毛野荞(MM) <i>F. densovillosum</i>	0.003	0.160	0.036	0.196	0.033		0.001	0.191	0.027	0.197	0.191
细柄野荞(XB) <i>F. gracilipes</i>	0.001	0.157	0.034	0.193	0.031	0.003		0.191	0.027	0.198	0.192
金荞复合体(JQ) <i>F. cymosum</i> complex	0.144	0.059	0.156	0.144	0.161	0.147	0.144		0.188	0.041	0.008
硬枝万年荞(YZ) <i>F. urophyllum</i>	0.111	0.238	0.117	0.267	0.118	0.114	0.112	0.217		0.197	0.189
栽培甜荞(TQ) <i>F. esculentum</i>	0.211	0.170	0.233	0.133	0.226	0.214	0.211	0.168	0.279		0.040
米苦荞 (MKQ) <i>F. tataricum</i>	0.156	0.002	0.168	0.146	0.175	0.159	0.156	0.060	0.237	0.071	

余14份材料的序列相似性较高,形成序列差异较大的两组材料,可见齿翅野荞的种内遗传距离较大。在 $ndhF-rpl32$ 序列中,栽培苦荞和栽培甜荞的种内遗传距离最小,均为0.000。齿翅野荞、密毛野荞、细柄野荞和小野荞两两之间的遗传距离均小于相对应的种内遗传距离,因此这4个种不能区分。栽培甜荞与野生甜荞的遗传距离为0.003,而其种内遗传距离分别为0.000和0.001。比较种内距离与种间距离可以推论, $ndhF-rpl32$ 序列信息可以区分栽培甜荞与野生甜荞。金荞复合体与栽培苦荞的遗传距离为0.007,与栽培甜荞的遗传距离0.041,说明金荞复合体与栽培苦荞的亲缘关系更近。

2.3 基于ITS和 $ndhF-rpl32$ 序列构建系统进化树

利用ITS序列数据构建的系统进化树如图1A所示。该进化树有效区分了大粒荞麦种和小粒荞麦种,并得到100%的支持率。大粒荞麦种被分为两支,即栽培甜荞和野生甜荞一支,金荞复合体、栽培苦荞和米苦荞一支,同时,在此支中,金荞复合体的所有材料可单独聚为一支。小粒荞麦种中,疏穗小野荞(*Fagopyrum leptopodium* var. *grossii*)可以单独聚为一支,密毛野荞、细柄野荞、齿翅野荞和小野荞聚在一支。

利用 $ndhF-rpl32$ 序列数据构建的系统进化树如图1B所示。该进化树亦有效区分了大粒荞麦种和小粒荞麦种,并得到100%的支持率。大粒种又被分为两支,即金荞复合体、栽培苦荞和米苦荞一支,栽培甜荞和野生甜荞一支。同时,大粒组中的各个(亚)种均可以单独聚为一支。小粒种中,疏穗小野荞和硬枝万年荞均可以单独聚为一支,密毛野荞、细柄野荞、齿翅野荞与小野荞均聚在一支。

3 讨论

3.1 ITS和 $ndhF-rpl32$ 序列在荞麦系统进化研究中的应用

本研究与之前的SSR研究结果(史建强等,2015)相互印证。在本文中,由遗传距离分析得出的结果与系统进化树得到的结果相一致。另外,ITS序列构建的系统进化树和 $ndhF-rpl32$ 的系统进化树结果都能把大粒荞麦种与小粒荞麦种明确区分开,且得到较高的支持率,说明大粒荞麦种与小粒荞麦种有明显的人工选择进化差异。但齿翅野荞、细柄野荞、小野荞与密毛野荞在两个系统发育树中都很难相互区分。其中,齿翅野荞和细柄野荞在形态上较为相似,只是前者的果实比后者多了粉红色或浅红

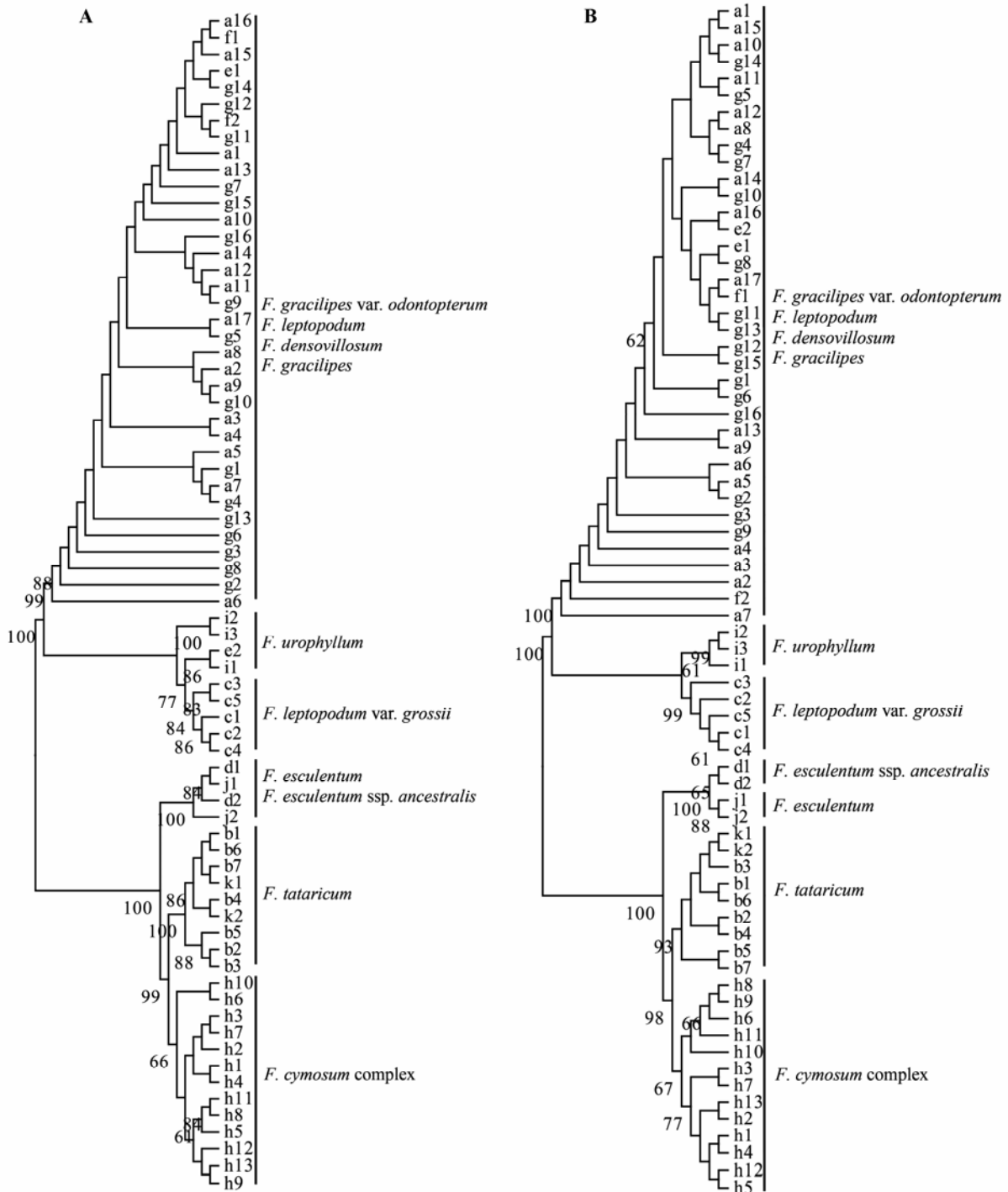


图1 通过邻接法得到的荞麦系统进化树。(A)基于ITS序列; (B)基于*ndhF-rpl32*序列。
 Fig. 1 Neighbor-joining trees of the genus *Fagopyrum* resulted from (A) ITS sequences; (B) *ndhF-rpl32* sequences.

色的翅(王安虎等, 2006, 2008b), 前者是后者的一个亚种。同时, 野外考察发现, 齿翅野荞果实的翅变化较大并有许多中间类型, 甚至有的群体同时具有有翅、无翅及中间类型。齿翅野荞与细柄野荞的亲

缘关系较近, 难以通过这两个序列区分。至于小野荞, 在ITS序列的系统进化树中, 材料e2与硬枝万年荞聚在一起, 有必要对两者的关系通过更多的材料进行进一步的分析。从形态上来讲, 密毛野荞与

细柄野荞相近似,但密毛野荞植株密被白色直立长毛,茎枝较粗壮,基于ITS和*ndhF-rpl32*序列亦不能将两者区分开。

构建的系统进化树表明,*ndhF-rpl32*的序列可以将野生甜荞与栽培甜荞区分开,同时也能把硬枝万年荞与其他种区分开;而ITS序列构建的系统进化树则不能把这几个种区分开。这是因为*ndhF-rpl32*为叶绿体基因组序列,叶绿体基因组是以母系遗传的方式向后代传递,而核基因组则通过双亲遗传向后代传递,两者的碱基替换速率不同,所反映的种间差异也就不同。从这个方面来讲,叶绿体基因组基因对于分类困难的种不失为一个很好的选择。

王安虎等(2008a)采用ITS和*trnH-psbA*序列分析主要探讨了栽培苦荞麦的起源,并没有就种间关系进行过多讨论,而杨玉霞(2008)采用ITS序列的研究显示,除个别材料外,荞麦属材料形成大粒和小粒两个分支,苦荞与金荞的亲缘关系比与甜荞更近。本研究结果也将所有荞麦材料分成大粒组和小粒组两个分支,关于甜荞、金荞和苦荞之间的亲缘关系,本研究也与杨玉霞(2008)的结果一致。

关于荞麦叶绿体*ndhF-rpl32*序列的分析未找到相关文献。

3.2 基于ITS和*ndhF-rpl32*序列的荞麦物种亲缘关系

甜荞、苦荞和金荞之间的亲缘关系是国内外学者争论的一个焦点,目前主要有三种观点。以Steward (1930)为代表的观点认为金荞与甜荞的亲缘关系较近,王莉花等(2004)和杨晓艳等(2007)的实验结果均支持这一观点;但是Ohsako和Ohishi (2000)、Sharma和Jana (2002a)通过叶绿体中非编码的序列和RAPD分子标记研究将金荞和苦荞先聚为一类,然后再与甜荞聚为一大类;陈庆富(2004)认为金荞复合体是由二倍体的大野荞(*Fagopyrum megaspartanium*)、二倍体的毛野荞(*Fagopyrum pilus*)和异源四倍体的金荞组成,并得出大野荞、毛野荞分别为甜荞和苦荞的祖先种。在本研究中,ITS和*ndhF-rpl32*序列构建的系统进化树中均显示金荞复合体先与栽培苦荞聚为一支,然后二者再与甜荞聚为一支,因此认为金荞复合体与栽培苦荞的亲缘关系比其与栽培甜荞更近。另外,本实验室曾对这些材料用SSR标记分析,得到了相同的结果(史建强等,2015)。我们将对相关材料做细胞学研究,以便

进一步与陈庆富(1999a, b, 2004)的观点进行比较。

3.3 基于ITS和*ndhF-rpl32*序列的荞麦植物多样性

由结果2.1节可知,简约性信息位点在ITS序列矩阵中占到20.7%(其中,占ITS1的29.9%,占ITS2的25.3%),在*ndhF-rpl32*序列矩阵中,简约性信息位点占到16.8%,低于在ITS矩阵中的比率,可见,10种(亚种、变种和复合体种)的荞麦在ITS序列中表现出来的遗传多样性比在*ndhF-rpl32*序列中更为丰富。推测可能是因为叶绿体基因组属于单亲遗传,不发生重组,仅偶尔发生突变,其基因组序列和结构进化速度较慢。而比较大粒组和小粒组荞麦发现,无论是在ITS序列还是在*ndhF-rpl32*序列中,大粒组种间差异较大,而小粒组种间差异并不是很大。这是因为大粒组多为栽培种,而小粒组多为野生种,这一差异可能与人工选择驯化有关。

综上,71份荞麦种质材料分为大粒种组和小粒种组两个类群。在ITS序列和*ndhF-rpl32*序列中,栽培甜荞、野生甜荞、栽培苦荞、金荞复合体、疏穗小野荞和硬枝万年荞的序列差异与基于形态特征的分类结果相吻合。在亲缘关系方面,栽培苦荞的种内变异完全覆盖米苦荞。金荞复合体与栽培苦荞的亲缘关系更近。

参考文献

- Chen QF (1999a) A study of resources of *Fagopyrum* (Polygonaceae) native to China. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 130, 53–64.
- Chen QF (1999b) Hybridization between *Fagopyrum* (Polygonaceae) species native to China. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 131, 177–185.
- Chen QF (2004) A study of isozyme and interspecific hybridization on big-achene group of buckwheat species (*Fagopyrum*, Polygonaceae). *Crop Sciences*, 44, 1151–1158.
- Chen QF (2012) *Plant Sciences on Genus Fagopyrum*. Science Press, Beijing. (in Chinese) [陈庆富 (2012) 荞麦属植物科学. 科学出版社, 北京.]
- Doyle JJ (1986) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Han JP, Song JY, Liu C, Chen J, Qian J, Zhu YJ, Shi LC, Yao H, Chen SL (2010) Identification of *Cistanche* species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 45, 126–130.
- Hedberg O (1946) Pollen morphology in the genus *Polygonees* L. (s. lat.) and its taxonomical significance. *Svensk Botaisk Tidskrift*, 40, 371–404.
- Hirose T, Ujihara A, Kitayashi H, Minami M (1995) Pollen

- tube behavior related to self incompatibility in interspecific crosses of *Fagopyrum*. *Breeding Science*, 45, 65–70.
- Hou YJ, Zhang ZW, Wu B, Li YQ (2009) Genetic diversity in tartary buckwheat revealed by AFLP analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 42, 4166–4174. (in Chinese with English abstract) [侯雅君, 张宗文, 吴斌, 李艳琴 (2009) 苦荞种质资源AFLP标记遗传多样性分析. *中国农业科学*, 42, 4166–4174.]
- Liu J, He T, Chun Z (2009) Analysis and authentication of chloroplast *matK* gene sequences of *Herba dendrobii*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44, 1051–1055. (in Chinese with English abstract) [刘静, 何涛, 淳泽 (2009) 药用石斛的叶绿体 $matK$ 基因序列分析及鉴别. *药学学报*, 44, 1051–1055.]
- Ohsako T, Ohishi O (2000) Intra and interspecific phylogeny of wild *Fagopyrum* (Polygonaceae) species based on nucleotide sequences of noncoding regions in chloroplast DNA. *American Journal of Botany*, 87, 573–582.
- Sharma TR, Jana S (2002a) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation in *Fagopyrum tataricum* Gaertn. accessions from China and the Himalayan region. *Euphytica*, 127, 327–333.
- Sharma TR, Jana S (2002b) Species relationships in *Fagopyrum* revealed by PCR based DNA fingerprinting. *Theoretical & Applied Genetics*, 105, 306–312.
- Shevchuk TE, Gavrilyuk IP, Konarev VG (1981) Immunochemical analysis of the affinities of the genus *Fagopyrum* and the species of some other genera of the family Polygonaceae. *Botanical Journal*, 66, 259–267.
- Shi JQ, Li YQ, Zhang ZW, Wu B, Wang AH (2015) Genetic diversity of buckwheat and its wild species. *Journal of Plant Genetic Resources*, 16, 443–450. (in Chinese with English abstract) [史建强, 李艳琴, 张宗文, 吴斌, 王安虎 (2015) 荞麦及其野生种遗传多样性分析. *植物遗传资源学报*, 16, 443–450.]
- Steward AN (1930) *The Polygonaceae of Eastern Asia*. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University, Boston.
- Tsuji K, Ohnishi O (2001) Phylogenetic position of east Tibetan natural populations in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, 63–67.
- Wang AH, Xia MZ, Cai GZ, Ren YH (2006) Study of the characteristics and geographical distribution of wild buckwheat resources in eastern Liangshan of Sichuan Province. *Crops*, (5), 25–27. (in Chinese) [王安虎, 夏明忠, 蔡光泽, 任迎虹 (2006) 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. *作物杂志*, (5), 25–27.]
- Wang AH, Xia MZ, Cai GZ, Yang P (2008a) The origin of cultivating buckwheat and the genetic analysis of the kindred species. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 21, 282–285. (in Chinese with English abstract) [王安虎, 夏明忠, 蔡光泽, 杨坪 (2008a) 栽培苦荞麦的起源及其近缘种亲缘分析. *西南农业学报*, 21, 282–285.]
- Wang AH, Xia MZ, Cai GZ, Ren YH (2008b) Studies on the characteristics and the geographical distribution diversity of wild buckwheat resources in Sichuan. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 21, 575–580. (in Chinese with English abstract) [王安虎, 夏明忠, 蔡光泽, 任迎虹 (2008b) 四川野生荞麦资源的特征特性与地理分布多样性研究. *西南农业学报*, 21, 575–580.]
- Wang LH, Yin FY, Liu JM, Ye CR (2004) Genetic diversity and relationships of the wild buckwheat resources from Yunnan Province by RAPD. *Molecular Plant Breeding*, 2, 807–815. (in Chinese with English abstract) [王莉花, 殷富有, 刘继梅, 叶昌荣 (2004) 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*, 2, 807–815.]
- White TJ, Bruns T, Lee S (1990) *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. Academic Press, San Diego.
- Xu LP (2014) Research progress of nutrient and chemical constituents in buckwheat. *Sichuan Chemical Industry*, 17(4), 4–8. (in Chinese with English abstract) [徐琥珀 (2014) 荞麦营养与化学成份研究进展. *四川化工*, 17(4), 4–8.]
- Yang YX (2008) *Studies on Genetic Diversity of Buckwheat Germplasm*. PhD dissertation, Sichuan Agricultural University, Chengdu. (in Chinese with English abstract) [杨玉霞 (2008) 荞麦种质资源遗传多样性研究. 博士学位论文, 四川农业大学, 雅安]
- Yang XY, Chen H, Shao JR, Wu Q, Tang Y (2007) Preliminary study on genetic relationship among buckwheat species in north western Sichuan. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27, 1752–1758. (in Chinese with English abstract) [杨小艳, 陈惠, 邵继荣, 吴琦, 唐宇 (2007) 川西北荞麦种间亲缘关系初步研究. *西北植物学报*, 27, 1752–1758.]
- Yu H, Mao J, Qu SP, Xiong L, Li YY, He R (2005) Study on the relationship of nine varieties of Asian *Lilium* based on nrDNA ITS. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 18, 387–391. (in Chinese with English abstract) [虞泓, 毛钧, 瞿素萍, 熊丽, 李永谊, 和锐 (2005) 亚洲系百合九个品种的亲缘关系研究——来自nrDNA ITS证据. *西南农业学报*, 18, 387–391.]
- Zhang L, Gao FH, Gao LJ, Yin XM, Diao Y (2011) Research progress of buckwheat nutrition, function and its products. *South China Agriculture*, 5(6), 74–77. (in Chinese) [张玲, 高飞虎, 高伦江, 尹旭敏, 刁源 (2011) 荞麦营养功能及其利用研究进展. *南方农业*, 5(6), 74–77.]

(责任编辑: 杨庆文 责任编辑: 时意专)