

基于 *PAL* 基因序列的地方苦荞品种遗传多样性分析

李敏^{1,2}, 张宗文^{2,3}, 李艳琴¹, 吴斌², 高佳²

(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)

摘要:苦荞在中国具有广泛的栽培种植地区, 长时间演化形成了丰富的遗传多样性。为了研究和利用苦荞资源, 以国内北方苦荞产区(内蒙古、青海、陕西、山西、甘肃)、西南苦荞产区(西藏、四川、贵州、云南)、国内其他地方品种(江西、安徽、湖北、湖南、广西)及国外品种(尼泊尔)共计 67 份苦荞材料为研究对象, PCR 扩增其 *PAL* 基因并测序。在此基础上分析苦荞的遗传多样性, 并采用 NJ 法(neighbor-joining)对 67 份苦荞材料构建系统进化树。结果表明, 供试的 67 份苦荞材料的 *PAL* 基因序列长度为 2011 bp, 其中, 变异位点为 160 个, 占序列总长度的 7.9%, 简约信息位点为 33 个, 占序列总长度的 1.64%, 突变的类型主要是碱基的转换与颠换, 高变异位点均集中在外显子 2 的 N 端。不同来源的苦荞材料间的遗传距离分布于 0.002 ~ 0.016 之间, 来源于中国四川组的苦荞材料种内平均遗传距离最大(0.016), 中国内蒙古组的最小(0.002)。中国四川地区的材料与其他地区来源的材料间的遗传距离位于 0.010 ~ 0.016 之间, 而其他地区间的遗传距离为 0.004 ~ 0.013。67 份苦荞材料的平均 π 值和 θ 值分别为 0.0034 和 0.0143。其中, 中国四川材料的 π 值为 0.0148。基于 *PAL* 基因序列构建的 NJ 进化树中, 67 份苦荞材料分为 7 个类群, 分类与地理来源无关。仅中国西藏来源的 5 份材料聚集为一类, 说明 *PAL* 基因序列较为稳定, 多数材料间变化差异较小。中国四川地区的苦荞材料具有丰富的遗传多样性, 中国西藏地区的某一材料中有较多的 SNP 位点, 推测中国西藏的部分材料可能存在突变的热点区, 预示着 *PAL* 基因新的突变位点区域。

关键词:苦荞; *PAL* 序列; 遗传多样性

Genetic Diversity of Tartary Buckwheat Based on the Sequence Analysis of *PAL*

LI Min^{1,2}, ZHANG Zong-wen^{2,3}, LI Yan-qin¹, WU Bin², GAO Jia²

(¹Institute of Biotechnology of Shanxi University, Taiyuan 030006;

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

³The Office for East Asia, Biodiversity International, Beijing 100081)

Abstract: Tartary buckwheat is widely cultivated in different areas of China and gradually evolved into genetic diversity. In order to study and utilize the tartary buckwheat, the *PAL* gene differences of the tartary buckwheat were analyzed on 67 samples, which were collected from different provinces of China (including the north region and the southwest region) and the Nepal region. We amplified the *PAL* gene by PCR and then acquired the sequence results. Based on the sequences, genetic diversity was analyzed and cluster of analysis of 67 samples was also carried out by NJ method. The results showed that after aligning and splicing, the length the *PAL* sequence was 2011 bp in the matrix, the variable sites was 160, while the parsimony informative sites was 33, accounting for 7.9% and 1.64% of the total length, respectively. Variable type were mainly base transition and base transversions. Variable site mainly concentrated in the region of 600-1200, which was the site of the N-terminal of the exon-2. The intra-specific mean

收稿日期: 2016-12-29 修回日期: 2017-02-10 网络出版日期: 2017-04-21

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170421.0931.010.html>

基金项目: 科技部科技支撑计划项目(2013BAD01B05-2); 农业部国家作物种质资源保护专项(2015NWB030-06)

第一作者主要从事荞麦种质资源遗传多样性研究。E-mail: limin910326@163.com

通信作者: 张宗文, 主要从事荞麦种质遗传多样性研究。E-mail: zhangzongwen@caas.cn

李艳琴, 主要从事植物功能成分研究。E-mail: yanqin@sxu.edu.cn

distance of the Sichuan group was 0.016, while the tartary buckwheat from Inner Mongolia group showed that the intra-specific mean distance was 0.002. And it revealed that there was a significant difference among the tartary buckwheat resources in genetics diversity from different geographic origins. We checked the 67 *PAL* sequences using software. And it showed that the average value of the Nucleotide polymorphism (π) and the average heterozygosity (θ) were 0.0034 and 0.0143, respectively. The Nucleotide polymorphism (π) value in samples from Sichuan was the highest (0.0148). From the phylogenetic tree, it indicated that the 67 samples from the different province could be clustered into seven categories. And the 5 sample in Tibet were clustered into another category. These results showed that the *PAL* sequences of the majority tartary buckwheat samples was stable and the differences between the most samples was not significant. The samples in Sichuan province had abundant genetic diversity. But only in samples from Tibet it revealed many SNPs site, and this should be the new mutation spots in the *PAL* coding regions.

Key words: tartary buckwheat; *PAL* sequence; genetic diversity

苦荞 (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.), 属于蓼科荞麦属, 也称鞑靼荞麦, 是药食兼用的一年生作物^[1]。苦荞有较高的营养价值和药用价值, 不仅含有人体所需的多种营养成分, 如: 蛋白质、淀粉、脂肪、粗纤维、维生素和矿物元素, 而且含有较多的芦丁、苦味素等功能性成分, 具有防治糖尿病^[2]、抗氧化^[3-4]、降血脂^[5-6]、降血糖、安神、消炎等多种功能作用。因此, 苦荞被称为 21 世纪具有前途的绿色食品。苦荞起源于中国, 苦荞遗传资源丰富, 其生产地主要集中在我国西南地区的云南、四川、贵州等省市的高海拔地区、高原和高寒地区, 黄土高原的山西、陕西、内蒙古、甘肃等省区也有种植和分布。

苯丙氨酸解氨酶 (*PAL*) 是苦荞的黄酮类化合物合成途径中的第 1 个酶, 也是第 1 个关键酶^[7]。该酶催化苯丙氨酸脱氨基转化为肉桂酸, 位于整个次生代谢途径的中心地位, 并控制整个代谢途径的起始。苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*) 是编码苯丙氨酸解氨酶的结构基因。目前, 已经成功获得苦荞 *PAL* 基因的 cDNA 序列, 并通过 DNA 与 cDNA 的序列比对明确其基因结构

组成^[8], 但有关 *PAL* 基因遗传多样性的研究未见报道。

生物中的 DNA 序列模式能够为物种的进化与发展提供非常有用的信息, 通过了解自然选择影响下的单个基因的分子变异情况可以为物种的遗传进化和由分子变异导致的性状改变提供有效的解释^[9]。因此, 本试验以 67 份苦荞为材料, 通过 PCR 产物直接测序的方法获得 *PAL* 基因编码区序列, 分析苦荞 *PAL* 基因序列的差异和变异程度, 进而探讨苦荞种质的遗传多样性, 以及基于 *PAL* 基因的苦荞种质的进化关系, 为挖掘相关分子标记, 开展分子辅助选择研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为苦荞地方品种, 共 67 份, 包括来自国内四川、云南、贵州、西藏、青海等省自治区的 66 份材料以及国外尼泊尔的 1 份材料, 材料的代号、统一编号、名称、来源如表 1 所示。

表 1 供试的苦荞材料名称、来源

Table 1 The code and origins of the tested *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.

代号 Code	统一编号 Accessions number	品种名称 Name	来源 Origin	代号 Code	统一编号 Accessions number	品种名称 Name	来源 Origin
1	QM000967	苦荞	中国内蒙古 IM	11	QM000988	苦荞	中国西藏 XZ
2	QM000969	苦荞	中国内蒙古 IM	12	QM002367	苦荞	中国西藏 XZ
3	QM000972	苦荞麦	中国青海 QH	13	QM002393	苦荞	中国西藏 XZ
4	QM001215	苦荞	中国青海 QH	14	QM002394	苦荞	中国西藏 XZ
5	QM001218	苦荞	中国青海 QH	15	QM000997	荞麦	中国山西 SX
6	QM001219	苦荞	中国青海 QH	16	QM001007	苦荞	中国山西 SX
7	QM000976	黑粒苦荞	中国西藏 XZ	17	QM001024	苦荞	中国山西 SX
8	QM000979	苦荞	中国西藏 XZ	18	QM001038	苦荞	中国山西 SX
9	QM000981	苦荞	中国西藏 XZ	19	QM002447	岭东苦荞	中国山西 SX
10	QM000985	苦荞	中国西藏 XZ	20	QM002464	灵丘苦荞	中国山西 SX

表 1(续)

代号 Code	统一编号 Accessions number	品种名称 Name	来源 Origin	代号 Code	统一编号 Accessions number	品种名称 Name	来源 Origin
21	QM002470	灵丘苦荞	中国山西 SX	45	QM002666	水城苦荞	中国贵州 GZ
22	QM001078	米米苦荞	中国陕西 SHX	46	QM002680	威黑 II-3	中国贵州 GZ
23	QM001094	苦荞	中国陕西 SHX	47	QM002686	麻子荞	中国贵州 GZ
24	QM001142	苦荞麦	中国甘肃 GS	48	QM001390	刺荞	中国云南 YN
25	QM001154	黑绿荞	中国甘肃 GS	49	QM001394	贡山苦荞	中国云南 YN
26	QM001161	苦荞	中国甘肃 GS	50	QM001400	中甸苦荞	中国云南 YN
27	QM001170	小荞麦	中国甘肃 GS	51	QM001404	营盘苦荞	中国云南 YN
28	QM001187	小荞	中国甘肃 GS	52	QM001426	长咀苦荞	中国云南 YN
29	QM001194	麻苦荞	中国甘肃 GS	53	QM001463	大苦荞	中国云南 YN
30	QM002515	金荞	中国甘肃 GS	54	QM001479	细苦荞	中国云南 YN
31	QM002527	麻苦荞	中国甘肃 GS	55	QM001487	白云苦荞	中国云南 YN
32	QM002538	甘荞 1 号	中国甘肃 GS	56	QM002690	格那务起	中国云南 YN
33	QM001234	额洛乌起	中国四川 SC	57	QM002400	87-23(F6080)	尼泊尔 Nepal
34	QM001320	额乌	中国四川 SC	58	QM002571	苦荞麦	中国安徽 AH
35	QM002624	黑苦荞	中国四川 SC	59	QM002574	苦荞	中国湖北 HB
36	QM002629	初额	中国四川 SC	60	QM002594	苦荞	中国湖北 HB
37	QM002631	额洛木尔惹	中国四川 SC	61	QM002600	苦荞	中国湖北 HB
38	QM002849	苦荞	中国四川 SC	62	QM002601	苦荞	中国湖北 HB
39	QM001348	彭泽苦荞	中国江西 JX	63	QM002606	苦荞	中国湖北 HB
40	QM001349	九江苦荞	中国江西 JX	64	QM002609	新邵苦荞	中国湖南 HN
41	QM001361	长尖咀苦荞	中国贵州 GZ	65	QM002610	塘弯苦荞	中国湖南 HN
42	QM001363	黑苦荞	中国贵州 GZ	66	QM002611	洗马苦荞	中国湖南 HN
43	QM001377	苦荞	中国贵州 GZ	67	QM002707	苦荞	中国广西 GX
44	QM002661	苦荞	中国贵州 GZ				

IM: Inner Mongolia, QH: Qinghai, XZ: Xizang, SX: Shanxi, SHX: Shannxi, GS: Gansu, SC: Sichuan, GZ: Guizhou, JX: Jiangxi, YN: Yunnan, AH: Anhui, HB: Hubei, HN: Hunan, GX: Guangxi, the same as below

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取与检测 取供试材料种子萌发至 3~4 片叶龄时的幼嫩叶片,采用 QIAGEN 公司提供的 DNeasy Plant Mini Kit(50)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/mL。

1.2.2 PCR 扩增、测序 *PAL* 序列扩增所用引物基于 NCBI 上公布的苦荞 *PAL* 的基因序列(登录号为 GQ285125),由 oligo 7.0 设计,能够获得 *PAL* 基因扩增产物的 3 对引物序列如表 2。所用引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成后,纯水溶解、稀释,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 2 所用引物名称及其序列

Table 2 The name and the sequence of the primer used

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物长度(bp) Primer length	PCR 片段大小(bp) Amplified length
Forward Primer1	TAAGCCAGCAGTGATTGGTTAT	24	2393
Reverse Primer1	GTACAGTGGGTATGATCTGCATTC	24	
Forward Primer2	ATGGGGTCTCAAACGGA	18	2549
Reverse Primer2	CTCCAGTGAGGGCAGTGAA	19	
Forward Primer3	TAAGGAAGCGGTGCTCTT	19	2166
Reverse Primer3	CTCCAGTGAGGGCAGTGAA	19	

PCR 反应体系为 20 μL , 包括 10 \times buffer 2 μL , 2.5 mM dNTP 0.4 μL , 10 μM 引物各 0.6 μL , 2.5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 15 μL 。PCR 扩增程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 以下程序循环 35 次: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。循环结束后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 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, 由北京天一辉远生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 序列编辑及系统发育分析 用 DNAMAN 进行序列编辑拼接, 空位作缺失处理。采用 MEGA 6.0 软件包进行序列校对并对序列长度、多态性位点数、简约信息位点等序列特征进行分析。利用 ClustalX 1.83 软件中的 Do Complete Alignment 功能对 67 份苦荞材料的 *PAL* 基因序列进行多序列比对, 进行单核苷酸变异分析。用 DnaSP 5.0 软件计算核苷酸多样性 π 值、平均杂合度 θ 值^[10], 研究苦荞 *PAL* 基因序列的多样性。采用 1000 次自展重复检测支持率, 构建遗传距离矩阵。基于 Jukes-Cantor 距离法构建邻接 (neighbor-joining) 系统进化树^[11]。

2 结果与分析

2.1 *PAL* 序列特征及遗传多样性参数分析

采用设计的 3 对引物, 对 67 份苦荞 *PAL* 基因进行扩增、回收和测序, 经序列比对校正, 两端切平后,

获得总长为 2011 bp 的 *PAL* 基因序列矩阵。苦荞 *PAL* 基因序列包含 2 个外显子及 1 个内含子。其中外显子 1 的长度为 419 bp, 外显子 2 的长度为 1747 bp, 内含子的长度为 451 bp, 总长为 2617 bp。将扩增的 *PAL* 基因序列与 GenBank (登录号为 GQ285125) 上已知的 *Ftpal* 序列进行比对, 本研究获得的 *PAL* 序列覆盖了 *PAL* 基因全长的 76%, 包含了内含子的全部序列和外显子 2 的大部分序列。

采用 MEGA 6.0 及 DnaSP 5.0 软件对 67 份苦荞材料的 *PAL* 基因序列进行分析, 得到相关的遗传多样性参数 (表 3)。在总长 2011 bp 的 *PAL* 序列矩阵中, 变异位点为 160 个, 占序列总长度的 7.9%, 简约信息位点为 33 个, 占序列总长度的 1.64%。 π 值是衡量不同的序列在同一位点存在的核苷酸的平均差异, θ 值则是衡量群体内同源 DNA 序列上每个位点的变异。从表 3 可以看出, 67 份苦荞材料 *PAL* 基因的平均核苷酸多样性 π 值、平均杂合度 θ 值分别为 0.0034 和 0.0143。此外, 将材料按地区划分为不同组, 其中材料来源较少的与其毗邻的省份分为同组, 尼泊尔与中国西藏一组, 中国安徽与江西一组, 中国广西与云南一组。不同地区的苦荞材料 *PAL* 基因的核苷酸多样性 π 值的变化范围介于 0.0019 ~ 0.0148, 平均杂合度 θ 值的变化范围介于 0.0019 ~ 0.0153。从 π 值和 θ 值看, 中国四川地区苦荞材料的遗传多样性最为丰富, 而中国江西/安徽材料的遗传多样性最低。

表 3 苦荞 *PAL* 基因的遗传多样性参数

Table 3 The genetic diversity index of the *PAL* sequence of the tartary buckwheat

来源 Origin	品种数 Sample size	多态性位点 Variable sites	简约信息位点 Parsimony informative sites	核苷酸多样性 π	平均杂合度 θ
中国四川 SC	6	40	6	0.0148	0.0153
中国西藏/尼泊尔 XZ/Nepal	9	38	4	0.0140	0.0141
中国贵州 GZ	7	23	3	0.0106	0.0124
中国云南/中国广西 YN/GX	10	23	6	0.0129	0.0131
中国山西 SX	7	20	4	0.0123	0.0148
中国湖北 HB	5	14	1	0.0064	0.0076
中国湖南 HN	3	13	1	0.0075	0.0075
中国甘肃 GS	9	12	4	0.0050	0.0027
中国陕西 SHX	2	7	1	0.0076	0.0076
中国青海 QH	4	6	1	0.0035	0.0037
中国内蒙古 IM	2	4	1	0.0038	0.0038
中国江西/中国安徽 JX/AH	3	4	1	0.0019	0.0019
总体 Total	67	160	33	0.0034	0.0143

PAL 序列的核苷酸多态性位点分布情况见图1、图2。由图1、图2可以看出, π 值和 θ 值的变化趋势相一致,但在不同区域的变化程度存在一定的差异,即 *PAL* 基因的序列多样性在基因各区域中的分布是不均匀的。但无论是 π 值还是 θ 值,高变异位点均集中在约600~1200 bp之间,这一区域正好是外显子2的N端。

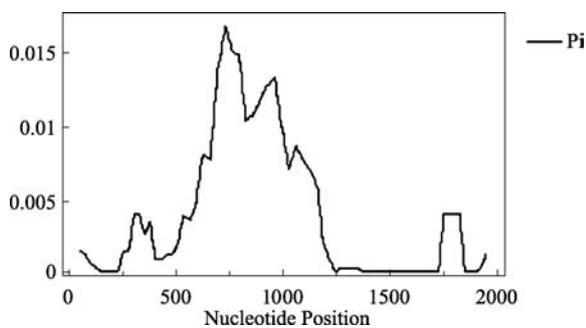


图1 *PAL* 基因序列内核苷酸多样性(π)

Fig.1 The variations of nucleotide diversity (π) in *PAL*

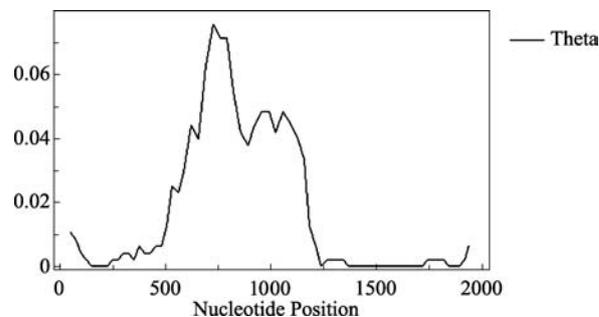


图2 *PAL* 基因序列内平均杂合度(θ)的变化

Fig.2 The variations of heterozygosity (θ) in *PAL*

2.2 基于 *PAL* 序列的不同来源苦荞组内和组间遗传距离分析

采用MEGA 6.0软件,选择Juke-Cantor距离模型,对苦荞*PAL*序列数据进行分析,将来源省份相同的苦荞材料进行分组,得到不同来源苦荞组内的平均遗传距离(表4)和组间的平均遗传距离(表5)。

表4 基于 *PAL* 序列计算的苦荞组内的平均遗传距离

Table 4 Genetic distances within the *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. group based on *PAL* sequences

项目 Item	中国 内蒙古 IM	中国 青海 QH	中国西藏/ 尼泊尔 XZ/Nepal	中国 山西 SX	中国 陕西 SHX	中国 甘肃 GS	中国 四川 SC	中国江西/ 中国安徽 JX/AH	中国 贵州 GZ	中国云南/ 中国广西 YN/GX	中国 湖北 HB	中国 湖南 HN
平均遗传距离 Genetic distances	0.002	0.004	0.009	0.008	0.013	0.008	0.016	0.005	0.009	0.011	0.012	0.014

表5 由 *PAL* 序列计算的苦荞组间的平均遗传距离

Table 5 Genetic distances between the *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. groups based on *PAL* sequences

来源 Origin	中国 内蒙古 IM	中国 青海 QH	中国西藏/ 尼泊尔 XZ/Nepal	中国 山西 SX	中国 四川 SC	中国 甘肃 GS	中国 陕西 SHX	中国江西/ 中国安徽 JX/AN	中国 贵州 GZ	中国云南/ 中国广西 YN/GX	中国 湖北 HB
中国青海 QH	0.004										
中国西藏/尼泊尔 XZ/Nepal	0.007	0.008									
中国山西 SX	0.007	0.006	0.009								
中国四川 SC	0.010	0.011	0.012	0.011							
中国甘肃 GS	0.006	0.007	0.009	0.008	0.012						
中国陕西 SHX	0.008	0.009	0.012	0.011	0.014	0.011					
中国江西/中国安徽 JX/AH	0.005	0.004	0.007	0.006	0.010	0.007	0.010				
中国贵州 GZ	0.007	0.008	0.011	0.010	0.014	0.010	0.011	0.009			
中国云南/中国广西 YN/GX	0.008	0.008	0.011	0.010	0.012	0.010	0.012	0.008	0.011		
中国湖北 HB	0.009	0.009	0.011	0.011	0.012	0.011	0.013	0.009	0.013	0.009	
中国湖南 HN	0.009	0.010	0.011	0.011	0.014	0.011	0.013	0.010	0.011	0.009	0.013

就遗传距离而言,无论是来源相同的苦荞品种间还是来源不同的苦荞品种间,基本处于同一水平。由表4中可以看出,在*PAL*基因序列中,苦荞同一组内的遗传差异随其来源的不同而异,来源于中国

四川地区的苦荞材料种内平均遗传距离最大(0.016),中国内蒙古地区的苦荞材料种内平均遗传距离最小(0.002)。说明中国四川省内的苦荞材料的遗传多样性最为丰富。而表5中显示不同来源的苦

荞材料的组间平均遗传距离变化范围是 0.004 ~ 0.014。其中中国四川地区的苦荞材料与其他地区来源的组间遗传距离在 0.010 ~ 0.014 之间,这说明中国四川地区的苦荞材料与其他材料的 *PAL* 序列差异较大,材料具有更加丰富的变异,具有特殊性。

2.3 *PAL* 基因序列的单核苷酸多态性分析

经过 DnaSP、ClustalX 1.83 等软件的分析可知,在 67 份苦荞材料总长为 2011 bp 的序列中,发现 46 个 SNP,无 Indel。突变频率为 1SNP/43.7 bp。在 *PAL* 基因单核苷酸变异中,发生碱基转换为 23 个, A ↔ G 为 11 个, C ↔ T 为 12 个,;碱基颠换是 23 个,分别为 A ↔ T 为 6 个, A ↔ C 为 8 个, G ↔ T 为 5 个, C ↔ G 为 4 个。46 个 SNPs 中,转化与颠换的比率为 1:1。其中在 14 号苦荞材料出现的 SNP 有 10 个。在苦荞的 46 个 SNP 中,有 9 个发生在内含子区域内,占总数的 19.6%,而 37 个发生在外显子的区域内,占总数的 80.4%,编码序列的单核苷酸多态性远大于非编码序列。

2.4 *PAL* 基因的系统发育树分析

利用 *PAL* 序列数据构建的系统进化树如图 3 所示。从图中可以看出,参试的 67 份材料被分为 7 组。第 I 类群中包含多个省份的 28 份苦荞材料,这说明多数地区的苦荞材料 *PAL* 基因的差异较小,这个类群的亚类中可明显看出同一地区的材料有明显的地域聚类的特点。如编号为 25、28、29、32 的中国甘肃材料等,以及编号为 49、51、56 的中国云南材料等,说明甘肃、云南省内的多数苦荞材料间的差异较小。第 II、III、IV、V、VI 类群均由较少的来源于不同省份的材料聚集在一起形成,且组成较为分散,没有明显的地域聚类特点。在 I、II、IV、VI 类群中均有中国云南地区的品种资源,这说明云南地区的材料既有遗传分化的现象,也存在遗传相似性。第 VII 类群由编号为 8、9、10、13 和 14 的 5 份中国西藏材料组成,表明这 5 份西藏材料与其他材料遗传序列差异较大,因此单独聚为一类群。

3 讨论

遗传多样性是生物在长期进化和发展过程中形成的自然属性,其不仅体现在种群间和种群内,也体现在不同个体间,是种群和个体遗传变异的总和,是生物进化和物种分化的基础^[12-13]。前人研究可知,核苷酸多样性(π)是个体间给定位点序列的平均多样性,表明一个基因的遗传变异程度^[14]。苦荞 *PAL* 基因序列的核苷酸多样性(π)为 0.0034,高于苦荞

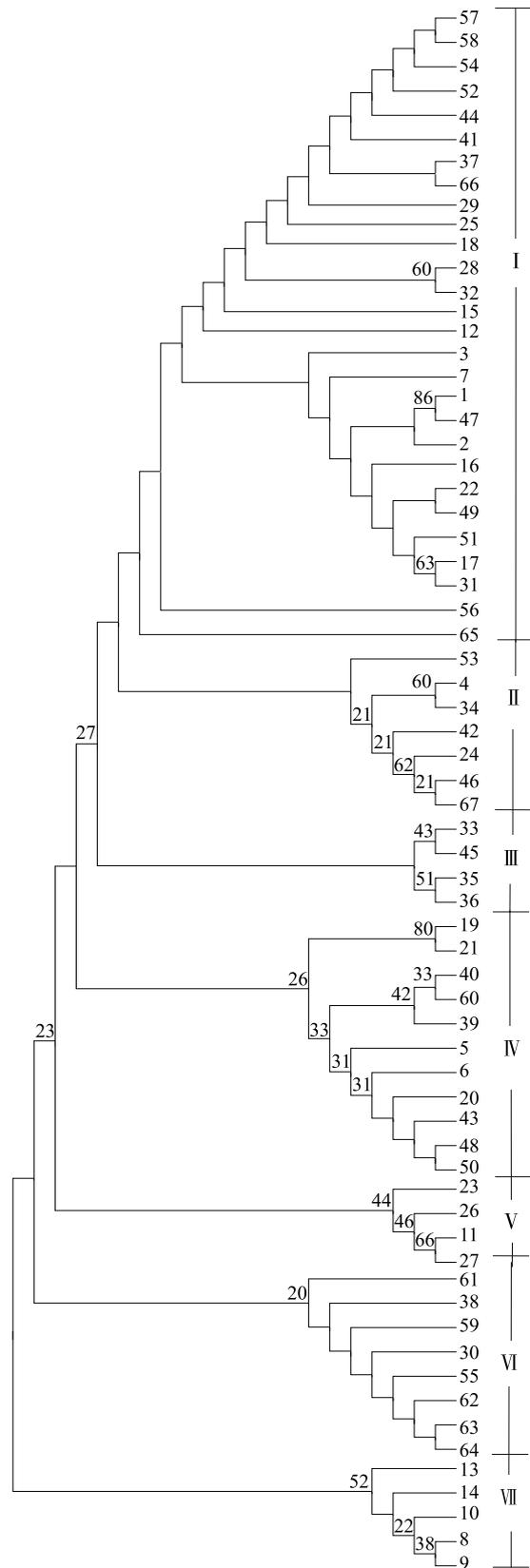


图 3 利用 MEGA 6.0 构建的基于 *PAL* 序列的 67 份苦荞系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 67 tartary buckwheat based on *PAL* sequence by MEGA 6.0

CHI 基因的核苷酸多样性 ($\pi = 0.0017$)^[15]。平均杂合度 (θ) 值为 0.0143, 但低于虎杖转录组基因中的平均杂合度 ($\theta = 0.02519$)^[16]。这表明核苷酸多样性的变异范围, 随作物种类和基因类型的不同而异。

3.1 *PAL* 基因的苦荞遗传多样性

苦荞具有悠久的栽培历史, 作为小宗作物之一, 在中国分布极其广泛, 与中国西南边境毗邻的尼泊尔也有零星种植。因此研究探讨中国苦荞与国外苦荞的遗传多样性水平, 对于研究苦荞的起源、演化及传播也具有重要的意义。

从供试的 67 份材料的遗传多样性看, 本研究结果显示, 依据遗传距离及分析核苷酸多样性, 均发现四川地区的苦荞存在丰富的遗传多样性, 这与赵佐成等^[17]利用等位酶电泳技术得到的结果相一致, 这可能与四川地区作为苦荞起源地^[18-19]具有一定的关联性。湖北、西藏等地的苦荞材料也具有较丰富的遗传多样性, 这与韩瑞霞等^[20]和赵丽娟等^[21]所得到的结果相一致。苦荞 *PAL* 基因形成丰富的遗传多样性, 这些与苦荞所在的栽培环境和自然选择有关。

迄今为止, 生物的单核苷酸多态性是植物基因组中发现的最丰富、遗传变异最高的遗传多态性^[22]。研究表明, 在植物的 *PAL* 基因中均存在较为丰富的单核苷酸多态性。在玉米基因组中每 57 bp 就有一个 SNP^[23]; 而刘佳^[24]在研究美洲南瓜种皮 *PAL* 基因时, 其获得到的 815 bp 的核苷酸序列上有 25 个核苷酸位点发生变化, 变化频率为 1SNP/32.6 bp; 供试的 67 份苦荞材料中, 发现长 2011 bp 的 *PAL* 基因存在 46 个 SNPs, 单核苷酸多态性频率是 1/43.7 bp, 其中编码序列的单核苷酸多态性远大于非编码序列。出现这种现象的原因可能是由于没有克隆分析该基因的 5' 和 3' 非编码区所造成的, 也可能是某一材料中的基因编码区本身就存在较高的突变率。SNPs 的转换/颠换比例 (Ti/Tv) 与物种的遗传多样性成反比^[25]。欧阳蒲月^[16]得到虎杖的 Ti/Tv 为 1.64, 其具有中等遗传多样性水平的结论, 苦荞 *PAL* 基因的 Ti/Tv 为 1.0, 表明苦荞 *PAL* 基因的遗传多样性更加丰富。

3.2 苦荞 *PAL* 基因的系统进化

通过了解自然环境下单个基因的分子变异情况, 可为研究有关植物进化与变异提供方法。如涂礼莉等^[26]通过克隆和测序, 分析了海岛棉 NBS 类型抗病基因类似物的起源、多样性及进化。近几年

的研究主要集中于研究苦荞种质资源农艺性状的遗传多样性及通过 SSR 标记的方法进行遗传多样性的鉴定。例如莫日更朝格图^[27]对来自藏陕云贵川五省区的苦荞种植资源进行了生育期、株高、主茎分枝数等 20 个农艺性状的因子及聚类分析; 赵丽娟等^[21]采用 ISSR 对 66 份苦荞种质资源进行了遗传多样性分析, 揭示了我国不同地区苦荞资源的多样性和丰富度。本试验的研究主要是通过分析苦荞的 *PAL* 基因的遗传信息, 并对苦荞资源的遗传多样性进行分析, 为研究苦荞资源的遗传多样性提供全面多样的认识。遗传距离等结果表明种内的遗传差异随苦荞来源的不同而不同, 表明苦荞地区资源具有丰富的遗传多样性。这与屈洋^[28]利用表型性状与分子标记的方法研究得到的结果一致。

从苦荞 *PAL* 基因的系统进化树中看出, 67 份苦荞材料被分为 7 个类群, 这些聚类结果显示多数的苦荞材料 *PAL* 序列之间差异较小, 分类与地理来源没有关系, 可能原因是苦荞 *PAL* 相关性状不属于选择和改良性状, 地理位置上的隔离对 *PAL* 基因的影响较小。但在第 I 类群相同地区的苦荞资源的 *PAL* 基因具有一定的相似性, 亲缘关系较近。而对于其他类群中少数不同省份来源的材料聚为一类, 如 II 类群中的中国四川、云南及甘肃、广西、青海的材料聚为一类, 虽然地理来源有所差异, 但相似的适生环境、遗传漂变或基因流^[29], 也可能改变了原有遗传物质组成, 进而聚集为同一类群。对于独立分类群的 5 份中国西藏苦荞材料, 比对结果发现其材料中具有较多的碱基转换与碱基颠换的情况。将这 5 份材料与其余来源材料相比, 在内含子区域内, 仅上述材料第 +281 位处发生碱基的颠换 ($G \rightarrow C$), 其中编号 14 的材料发生 7 次碱基颠换、3 次碱基转换; 编号 13 的材料发生 4 次碱基转换和 3 次碱基颠换; 编号为 10 的材料发生 2 次碱基颠换和 2 次碱基转换, 材料 8 和 9 分别发生 2 次碱基颠换。可能是碱基插入与颠换对整个序列产生影响, 导致这 5 份材料 *PAL* 序列发生变化, 与其他材料遗传序列差异较大, 单独聚为一类。这 5 份材料中序列的变化原因可能与自然环境, 所在的气候区有关, 其真实原因还需借助细胞生物学及分子生物学等技术手段对其进行深入研究。

在编号 14 的材料中出现的 SNP 为 10 个, 这些可能是苦荞 *PAL* 基因序列中存在的稀有 SNP, 预示着该基因新的突变方向^[14]。陈吉宝等^[14]报道在小麦的 *TaDREB1* 编码区中存在 2 个突变热点区, *PAL*

编码区出现较高的 SNP 突变频率,可能是 *PAL* 基因的活跃,正在分化形成具有新功能的基因,使得基因编码区内形成突变热点区,从而导致较高的 SNP 突变频率的出现。

综上,67 份苦荞材料的 *PAL* 基因分子水平上存在较高的核苷酸多样性,其中四川材料存在更丰富的遗传多样性。本试验为进一步开展苦荞 *PAL* 基因分子标记开发和苦荞高芦丁含量育种研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 陆大彪. 中国农业百科全书农作物卷(上)[M]. 北京:中国农业出版社,1991:448-449
- [2] 王斯慧,白银花,黄琬凌,等. 苦荞黄酮对 α -淀粉酶的抑制作用研究[J]. 食品工业,2012(3):109-121
- [3] Jiang P, Burczynski F, Campbell C, et al. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation [J]. *Food Res Int*, 2007, 40 (3): 356-364
- [4] 张政,周源,王转花,等. 苦荞麦麸皮中类黄酮的抗氧化活性研究[J]. 药物生物技术,2001,8(4):217-220
- [5] 王敏,魏益民,高锦明. 苦荞麦总黄酮对高血脂大鼠血脂和抗氧化作用的影响[J]. 营养学报,2006,28(6):502-509
- [6] 李洁,梁月琴,郝一彬. 苦荞类黄酮降血脂作用的实验研究[J]. 山西医科大学学报,2004,35(6):570-571
- [7] Teresa C, Paul C. Progress in plant metabolic engineering[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(2):148-154
- [8] Li C L, Bai Y C, Chen H, et al. Cloning, characterization and functional analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL*) from *Fagopyrum tataricum* Gaertn[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(5):1172-1182
- [9] 郝岗平,吴忠义,曹鸣庆,等. 拟南芥抗旱转录因子 *CBF4* 基因区域的核苷酸多样性及其分子进化分析[J]. 遗传学报,2004, 31(12):1415-1425
- [10] Librado P. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (11): 1451-1452
- [11] Sudhir K, Masatoshi N, Joel D, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4):299-306
- [12] 中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994
- [13] 施立明. 遗传多样性及其保存[J]. 生物科学信息,1990,2(4): 159-164
- [14] 陈吉宝,景蕊莲,员海燕,等. 小麦 *TaDREB1* 基因的单核苷酸多态性分析[J]. 中国农业科学,2005,38(12):2387-2394
- [15] 韩瑞霞. 苦荞种质遗传多样性与 *CHI* 基因多样性研究[D]. 太原:山西大学,2012
- [16] 欧阳蒲月. 基于高通量测序技术的虎杖 EST-SSRs 和 EST-SNPs 的开发及特征分析 [J]. *中药材*, 2015, 38 (6): 1164-1167
- [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麦栽培居群的遗传多样性研究[J]. 遗传学报,2000, 27(6):538-548
- [18] 林汝法. 关于荞麦品种资源的研究和利用[J]. 荞麦动态, 1985(1):6-13
- [19] 蒋俊芳. 四川大凉山地区是苦荞起源地之一[J]. 荞麦动态, 1999(1):2-3
- [20] 韩瑞霞,张宗文,吴斌,等. 苦荞 SSR 引物开发及其在遗传多样性分析中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5): 759-764
- [21] 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
- [22] Antoni R. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(2):94-100
- [23] Carine G C, Christerle B T, Manicacci D, et al. Nucleotide diversity of the *ZmPox3* maize peroxidase gene: Relationship between a MITE insertion in exon2 and variation in forage maize digestibility[J]. *BMC Genet*, 2004, 5(1):1-11
- [24] 刘佳. 美洲南瓜苯丙氨酸解氨酶 (*PAL*) 基因克隆、表达分析及品种抗灰霉病研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2013
- [25] Yang Z H, Yoder A D. Estimation of the Transition/Transversion Rate Bias and Species Sampling[J]. *J Mol Evol*, 1999, 48(3): 274-283
- [26] 涂礼莉,张献龙,朱龙付,等. 海岛棉 NBS 类型抗病基因类似物的起源、多样性及进化[J]. 遗传学报, 2003, 30 (11): 1071-1077
- [27] 莫日更朝格图. 苦荞资源遗传多样性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010
- [28] 屈洋. 苦荞产区种质资源遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国农业科学,2016,49(11):2049-2062
- [29] 乔小燕,乔婷婷,周炎花,等. 基于 EST-SSR 的广东与广西茶树资源遗传结构和遗传分化比较研究[J]. 中国农业科学, 2011, 46(11):3297-3311