

西藏豌豆资源蛋白质含量及遗传多样性分析

侯维海, 王建林, 旦巴, 胡单

(西藏农牧学院/高原作物分子育种实验室, 林芝 860000)

摘要:为探究西藏高原豌豆资源遗传多样性,分析种子蛋白质含量与生态地理环境间的关系。本研究搜集整理了54份来自西藏不同生态地理环境条件下的豌豆材料。利用SDS-PAGE对54份豌豆种子水溶性和盐溶性蛋白进行遗传多样性分析,测定种子蛋白质含量,分析地理生态因子(经度、纬度、海拔)与总蛋白含量间的关系。结果表明,54份豌豆材料种子总蛋白含量为17.58%~28.67%,其中水溶性蛋白占86.12%~91.40%,盐溶性蛋白占4.76%~8.29%。相关分析表明,西藏豌豆种子总蛋白含量与经度呈显著正相关,与纬度呈正相关,而与海拔高度呈负相关。54份豌豆种子水溶性和盐溶性蛋白SDS-PAGE分别检测出蛋白谱带1588条和699条,其中水溶性蛋白分出迁移率不同的谱带类型43种,基因多样性指数为0~0.50,相对分子量在24.71~149.54 Ku之间,且其谱带多集中于24.87~50.41 Ku低相对分子量区和56.34~88.08 Ku高相对分子量区;盐溶性蛋白分离出迁移率不同的谱带类型24条,基因多样性指数0~0.50,相对分子量在24.85~91.24 Ku之间。基于蛋白的谱带的聚类分析将54份豌豆资源可划分为7个类群,遗传相似系数变异范围为0.60~0.91;根据海拔高度将54份豌豆资源划分为4个地理类群,各类群蛋白谱带的基因多样性指数分别为0.23、0.18、0.35和0.31,Shannon's信息指数分别为0.33、0.41、0.52和0.46。西藏豌豆资源遗传变异较丰富,表现出随着海拔高度增加,遗传变异呈增大趋势。同时种子贮藏蛋白含量与经度呈显著正相关,而与纬度和海拔高度相关性不大。

关键词:豌豆;蛋白质含量;SDS-PAGE;西藏

Analysis of Protein Content and Genetic Diversity in Pea Germplasm in Tibet

HOU Wei-hai, WANG Jian-lin, Dan Ba, HU Dan

(Xizang Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000)

Abstract: To explore the genetic diversity of pea resources in Tibet plateau, and to analyze the relationship between the content of seed protein and the ecological and geographical environment. Fifty-four landraces of pea from different ecological and geographical environment conditions of Tibet were collected, water soluble and salt soluble protein content of above genotypes were examined. While, the relationships between the protein contents (total seed protein content, water soluble and salt soluble protein content) of above genotypes and geographical factors (longitude, latitude and elevation) were analyzed. The results showed that the total protein content of 54 pea seed samples ranged from 17.58% to 28.67%, among which water soluble proteins accounted for 86.12% to 91.40%, and salt soluble proteins accounted for 4.76% to 8.29%. The total protein content of Tibet field pea seed samples significantly correlated with longitude, and correlated with latitude, but negatively correlated with altitude. 1588 water soluble and 699 salt soluble protein bands were detected by SDS-PAGE electrophoresis; among them, 43 band types of water soluble protein and 24 band types of salt soluble protein based on migration rate were identified with diversity index ranged from 0 to 0.50. The relative molecular weight of water soluble proteins ranged from 24.71 Ku to 149.54 Ku, showing concentrated areas of low molecular weight (24.85-50.41 Ku) and high molecular weight

收稿日期:2017-07-03 修回日期:2017-07-16 网络出版日期:2018-02-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180209.0908.033.html>

基金项目:国家自然科学基金(31560362);西藏自治区重点项目(XZXTCX-2016);西藏自治区高校青年教师创新项目(QC2015-35)

第一作者研究方向为作物遗传育种研究。E-mail:418267205@qq.com

通信作者:王建林,研究方向为作物栽培与育种研究。E-mail:xzwangjl@126.com

(56.34-88.08 Ku). The relative molecular weight of salt soluble proteins ranged from 24.85 Ku to 91.24 Ku. Based on the cluster analysis of protein bands, 54 pea resources were divided into 7 groups, and the variation range of genetic similarity coefficient was 0.60-0.91. The 54 pea landraces were divided into 4 geographical groups according to the altitude information, with genetic diversity indices of 0.23, 0.18, 0.35 and 0.31, and Shannon information index of 0.33, 0.41, 0.52 and 0.46. The genetic variation of pea resources in Tibet was abundant, which showed that the genetic variation was increasing with the increase of altitude. At the same time, the content of seed storage protein was positively correlated with the longitude, but not with latitude and altitude.

Key words: pea; protein content; SDS-PAGE; Tibet

豌豆(*Pisum sativum* L.)属豆科豌豆属一年或越年生草本植物,具有耐旱、耐寒、耐瘠等特点,其地理分布广泛^[1-2],在全世界 90 多个国家种植,是世界第三大豆类作物,也是重要的休闲养地作物和食品原料之一^[3]。豌豆在我国有悠久的种植历史,作为蔬菜、粮食和饲料等原料广泛栽植于全国各地^[4]。据联合国粮农组织(FAO)统计,2013 年我国豌豆干子粒产量 138 万 t,居世界第 2 位,仅次于加拿大^[5],此外,我国是世界上鲜食豌豆生产第一大国。豌豆在西藏有悠久的种植历史,是西藏传统的四大作物之一,其播种面积仅次于青稞、小麦和油菜,是西藏重要的粮饲兼用作物。豌豆具有喜凉、耐寒、耐瘠等特点,在西藏高原分布广泛,其垂直分布上限达到 4500 m,常与青稞、油菜、小麦混播或轮作^[6]。近年来,由于西藏豌豆育种工作严重滞后,导致豌豆产量和品质下降,其播种面积逐年下降,许多豌豆农家种、野生近缘种等种质资源未得到有效搜集、保存和利用,豌豆基础研究几乎为零。因此亟需对西藏豌豆种质资源进行抢救性搜集、评价和遗传分析,挖掘优异豌豆种质资源,扩大豌豆种质基因库,以促进西藏豌豆产业发展。

种子贮藏蛋白(SSP, seed storage proteins)是指不具备代谢和结构功能的种子蛋白,已被作为遗传标记广泛应用于 4 个方面:材料间遗传多样性分析、鉴定基因组关系、遗传资源保存和育种相关的植物驯化、植物改良育种方面^[7]。基于 SDS-PAGE 种子蛋白质电泳已经成为一种解决植物分类、进化问题、品种和变种的鉴定、种质特征分析和补充评价相关信息的有效工具^[8-10]。前人通过对小麦、大麦、辣椒、玉米、水稻、大豆、蚕豆、云豆等作物研究表明,不同生态类群、品种和材料间种子贮藏蛋白是高度多态的,这种多态性主要由遗传因素决定^[11-15]。例如,基于大豆贮藏蛋白的谱带,能快速鉴定蛋白亚基的变异、突变体和品种^[15-19]。T. Hirata 等^[20]利用同工酶和种子蛋白分析了日本、中国和韩国不同生

境条件下的大豆资源遗传多样性,其多样性指数分别为 0.248、0.249 和 0.209。V. Velusamy 等^[8]利用 SDS-PAGE 对韩国 8 个生态地理区的 722 份大豆种子蛋白遗传多样性分析发现,供试材料间蛋白亚基多样性在 0~0.2642 之间,平均值为 0.1565。利用 SDS-PAGE 对小麦族植物麦谷蛋白、醇溶蛋白等多态性研究,发现无论是高分子量,还是低分子量贮藏蛋白位点均存在丰富的遗传多态性,在一定程度上能反映供试材料间的亲缘关系^[21-23]。例如马晓岗等^[23]对青海省 77 份小麦种质材料醇溶蛋白的遗传多样性分析,发现供试材料醇溶蛋白谱带多态性较高,具有丰富的遗传多样性;聚类分析将供试材料分成 6 大类,聚类结果在一定程度上反映了供试材料间的亲缘关系。石建斌等^[24]利用 SDS-PAGE 技术对 101 份蚕豆种质资源清蛋白电泳分析表明,供试材料间清蛋白亚基变异丰富,有较强的多态性,根据遗传相似系数生成的聚类图能够反映供试材料间的亲缘关系。宋晓敏等^[25]利用 SDS-PAGE 对我国蚕豆主产区 20 种蚕豆材料种子水溶性和盐溶性蛋白电泳分析,发现不同材料间水溶性和盐溶性蛋白有不同迁移率的条带,表明不同蚕豆盐溶性蛋白基因在表达水平上存在一定的遗传变异,蚕豆种质资源具有比较丰富的遗传多样性和形态多样性。王燕平等^[26]选用山西 57 份不同生态型大豆种质资源为材料,利用 SDS-PAGE 梯度电泳技术分离 11S 球蛋白和 7S 伴球蛋白各主要亚基,不同生态型大豆种质资源间同一亚基相对含量存在较大变异,大豆蛋白亚基相对含量随品种和产地变化存在明显的变异;同时发现 4 份自然变异的特异大豆种质。

利用电泳分析种子蛋白谱带已经成功应用于相关作物及其近亲之间的分类和进化关系,在分子水平上分析其遗传同源性^[7]。但迄今为止,有关 DNA 分子标记技术如 SSR、ISSR、PAPD、SNP 对西藏豌豆种质资源遗传多样性分析的论文尚未见报道,不利

于对西藏高原豌豆种质遗传背景的进一步了解。西藏属于低纬度高海拔农业区,具有全球最典型的立体生境,其地质独特,地形地貌复杂,土壤种类繁多,生态环境千差万别,产生了丰富的豌豆种质资源。本研究以西藏豌豆农家种、野生近缘种为材料,利用 SDS-PAGE 技术对豌豆种子蛋白多态性进行分析,从蛋白质水平上探讨西藏豌豆种质资源的遗传多样性和亲缘关系,并结合种子粗蛋白、水溶性和盐溶性蛋白含量的表现,筛选出蛋白含量高、遗传差异大、亲缘关系远的豌豆亲本材料,为西藏豌豆资源开发和优良亲本选配提供理论依据。

表 1 54 份豌豆种质材料基本信息

Table 1 Basic information of 54 pea landraces

材料号 Material number	采集地点 Collection site	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	海拔 (m) Altitude	材料号 Material number	采集地点 Collection site	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	海拔 (m) Altitude
1	波密县扎木镇通木村	95°89'	29°79'	2874	28	莎迦县麻加乡拉多村	87°85'	28°72'	4325
2	比如县白戈乡彭安村	94°26'	31°22'	3861	29	南木林县奴玛乡嘎村	89°64'	29°39'	3895
3	墨竹工卡县工卡镇三村	91°82'	29°79'	3879	30	仁布县茶巴村五末村	89°92'	29°19'	3972
4	甘肃省康乐县苏集村 双寨姚子畦	103°34'	35°20'	2000	31	琼结县下水乡康布齐村	91°72'	29°12'	3674
5	尼木县尼木乡塔荣村	90°15'	29°44'	3841	32	琼结县下水乡康布齐村	91°72'	29°12'	3674
6	加查县洛林乡郭西卡村	92°56'	29°00'	3446	33	贡嘎县江塘镇岗玛村	90°62'	29°27'	3619
7	江孜县车仁乡加堆村	89°77'	28°84'	4189	34	曲松县下江乡下江村	92°22'	29°04'	4010
8	林芝县车久乡白果村	94°77'	29°97'	2638	35	扎郎县吉汝乡强念村	91°30'	29°06'	3959
9	边坝县尼木乡瓦如村	94°37'	31°23'	3724	36	昂仁县卡嘎乡布玛村	87°43'	29°21'	4313
10	仁布县茶巴乡第二村	89°95'	29°17'	3972	37	定日县协格尔镇楚西村	87°21'	28°59'	4266
11	琼结县加玛乡昌嘎村	91°65'	29°	3822	38	江孜县乃沙乡第二村	89°38'	29°06'	3935
12	察隅县古玉乡博学村	97°20'	29°31'	3591	39	扎郎县吉汝乡若村	91°31'	29°15'	3720
13	南木林县南木林镇	89°09'	29°66'	3991	40	洛扎县扎日乡扎日村	90°69'	28°37'	4204
14	察隅县古玉乡古庆村	97°21'	29°16'	3428	41	拉孜县查务乡查务村	87°58'	29°10'	4063
15	琼结县加玛乡昌嘎村	91°65'	29°	3822	42	隆子县日当镇村巴村	92°3'	28°49'	4104
16	达孜县帮堆乡克日村	91°	30°	3729	43	江孜县庄孜乡盘久村	89°48'	29°	3975
17	昌都县俄洛镇朗达村	96°97'	31°22'	3326	44	贡嘎县朗杰学乡第四村	91°10'	29°16'	3671
18	理塘县加娃乡江达村	100°42'	29°75'	3625	45	贡嘎县昌果乡普夏村	91°17'	29°42'	3693
19	仁布县茶巴乡贡仁布村	89°90'	29°20'	3956	46	朗县金东乡列村	93°34'	28°98'	3112
20	波密县岗乡易贡单卡队	95°69'	29°93'	2703	47	察隅县古玉乡菠萝村	97°39'	29°99'	2895
21	康马县康马乡查纳村	89°67'	28°62'	4264	48	桑日县绒乡巴朗村	92°	29°23'	3582
22	乃东县昌珠镇白菜村	91°75'	29°16'	3633	49	洛扎县生格乡古局村	91°03'	28°16'	3570
23	日喀则市东嘎乡加角村	88°89'	29°37'	3854	50	丁青县丁青镇明通村	95°64'	31°39'	3808
24	甘肃省康乐县苏集镇 双寨沈家山	103°34'	35°20'	2000	51	洛隆县康沙乡再村	96°13'	30°77'	3866
25	亚东县下司马镇春丕村	88°91'	26°47'	2918	52	隆子县列麦乡顿巴村	92°73'	28°35'	3480
26	朗县金东乡列村	93°34'	28°98'	3112	53	桑日县绒乡通巴村	92°14'	29°28'	3583
27	比如县比如乡用朗村	93°66'	31°49'	3920	54	洛扎县洛扎镇吉堆村	90°77'	28°38'	4037

1 材料与方法

1.1 材料

参试材料为西藏豌豆农家种和野生近缘种 51 份,甘肃康乐县 2 份,四川甘孜理塘县 1 份(表 1),于 2015 年从西藏各县市、甘肃康乐、四川甘孜搜集获得并就地记录海拔高度、经度、纬度。2016 年 3 月 20 日按小区播种在西藏农牧学院农场(26°52'~30°40'N,92°09'~98°47'E,海拔 2900 m),采用常规田间管理。豌豆成熟期,按材料单独采集豆荚 5 个,分类保存,自然晾干用于后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 豌豆粗蛋白含量的测定 参照 GB 50095—2010 方法(N × 6.25)进行豌豆粗蛋白含量的测定。

1.2.2 豌豆水溶性、盐溶性蛋白的分离和含量测定 参考宋晓敏等^[25]的水溶性、盐溶性蛋白的分离提取方法并作适当改动。取 2~3 粒豌豆种子置于预冷的研钵中,捣碎去皮并快速充分研磨至粉状,称取 0.15 g 豌豆粉移入 2 mL 离心管,按照 1:10 比例各加入 1.5 mL 蒸馏水涡旋震荡混匀,置于 4 °C 冰箱提取 30 min,期间每 5 min 摇匀 1 次,6500 r/min 离心 20 min,取上清液移入新离心管,为水溶性蛋白,4 °C 保存备用。取 0.15 g 豌豆粉加入 1.5 mL 1 mol/L 的 NaCl 溶解,放 4 °C 冰箱提取 30 min,6500 r/min 离心 20 min,取上清液置 4 °C 冰箱透析 24 h 得干粉,离心,用 40 μL 1 mol/L 的 NaCl 溶解干粉,为盐溶性蛋白,放 4 °C 保存备用。

1.2.3 豌豆蛋白的 SDS-PAGE 电泳 分别取 40 μL 水溶性蛋白和盐溶性蛋白,用 NanoDrop 2000 测量蛋白含量并配置成 2.5 mg/μL 的蛋白溶液,各加入 12 μL 上样缓冲液(250 mmol/L, pH 值 6.8 的 Tris-HCl、10% SDS、0.5% 溴酚蓝、50% 甘油、5% β-巯基乙醇),于 100 °C 烘箱煮沸 5 min,离心 20 s,冷却后进行点样。电泳采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 10%,以 Tris-甘氨酸作为电极缓冲液,每份样品上样量为 20 μL,凝胶厚度 1.0 mm。在 16 mA 恒流条件下电泳,待指示剂迁移至凝胶底部后结束电泳。

采用考马斯亮蓝 R-250 溶液染色 90 min,蒸馏水漂洗 2 次,脱色液(25 mL 无水乙醇 + 50 mL 冰醋酸 + 475 mL ddH₂O)脱色,期间换 2~3 次脱色液至亚基条带清晰,蒸馏水漂洗后拍照。

1.2.4 数据统计分析 利用 SPSS 20 对豌豆蛋白质和经度、纬度、海拔高度进行相关性分析。采用 Quantity one 软件自动读取豌豆水溶性和盐溶性蛋白电泳谱带,并进行人工辅助修正;按照同一位置,蛋白电泳条带有赋值为 1,无赋值为 0,生成 0、1 矩阵。通过 NTSYS-pc 2.1 软件对生成的 0、1 矩阵进行非加权类平均法进行聚类,计算遗传距离和遗传相似系数。利用 popgen32 软件计算供试材料不同群体间和不同群体内某一位点的等位变异数、等位变异频率、有效等位基因数、Shannon's 信

息指数、基因多样性指数。通过 Microsoft Excel 计算出出现频率。

2 结果与分析

2.1 豌豆种质地理生态因素与蛋白含量相关性分析

供试豌豆来自于 103°34'~87°21'E、35°20'~28°16'N、海拔 4325~2000 m 高原地区,覆盖范围广,涉及的地形地貌复杂多样。地理生态因素对豌豆蛋白含量相关性分析表明,经度与豌豆粗蛋白含量存在显著正相关,纬度与粗蛋白呈正相关,而与海拔高度呈负相关(表 2)。此结果说明在西藏高原地区,藏东到藏中到后藏区其豌豆粗蛋白有一定的增加;随着纬度的增加,豌豆粗蛋白含量有增加趋势;随着海拔高度增加,豌豆总蛋白有轻微下降的趋势。

表 2 地理生态因素与豌豆蛋白含量相关性分析

Table 2 Correlation analysis of geographical factors and protein contents of pea landraces

项目 Item	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude
粗蛋白 Crude protein	0.278 *	0.196	-0.088

* :0.05 水平上显著差异

* :Correlation is significant at the 0.05 level(2-tailed)

2.2 豌豆子粒中水溶性、盐溶性蛋白质的含量分析

不同生态区的 54 份豌豆材料种子总蛋白质含量有明显差异(表 3)。供试材料子粒总蛋白含量变幅为 17.58%~28.67%,其中蛋白质含量最高的材料来自西藏察隅地区,蛋白质含量最低的材料来自西藏东南部山南市中部的琼结县。通过单因素方差分析发现,54 份豌豆种质资源间的蛋白质含量存在显著性差异。

54 份豌豆子粒中水溶性蛋白和盐溶性蛋白质含量有一定的差异(表 3),其中,水溶性蛋白占子粒总蛋白的 86.12%~91.40%、盐溶性蛋白占子粒总蛋白的 4.76%~8.29%,水溶性蛋白约为盐溶性蛋白的 10 倍。此结果与大豆蛋白质相比,豌豆的主要蛋白质为水溶性蛋白质;同盐溶性蛋白相比,水溶性蛋白具有在食品中应用广泛、食用方便等特性。因此,豌豆蛋白有更广泛的应用前景。

表3 54份豌豆种质材料总蛋白、水溶性蛋白和盐溶性蛋白含量

Table 3 The total protein, water soluble and salt soluble protein content of 54 pea landraces

材料号 No.	总蛋白 Total protein	水溶性蛋白 Water soluble protein	盐溶性蛋白 Salt soluble protein	材料号 No.	总蛋白 Total protein	水溶性蛋白 Water soluble protein	盐溶性蛋白 Salt soluble protein
1	20.63a	88.91	6.96	28	21.67b	85.63	6.72
2	19.51a	90.47	5.04	29	20.94a	88.37	5.98
3	22.59b	88.66	7.36	30	23.10b	90.12	7.35
4	24.42b	91.28	8.21	31	20.88a	87.63	7.16
5	22.47b	89.46	7.56	32	19.32a	87.36	4.82
6	22.00b	89.60	6.46	33	20.71a	89.13	5.96
7	25.37c	92.67	6.27	34	23.04b	90.16	7.45
8	21.20a	87.40	7.91	35	20.44a	88.74	6.96
9	21.93b	89.87	7.73	36	22.40b	89.45	7.03
10	21.86b	87.84	6.36	37	19.01a	87.32	6.14
11	17.58a	90.31	5.56	38	23.95b	90.67	7.49
12	28.67c	91.20	8.01	39	20.73a	89.96	7.08
13	23.21b	87.37	6.11	40	22.30b	87.63	6.54
14	21.92b	90.61	7.37	41	18.45a	86.13	5.18
15	19.19a	87.49	5.65	42	19.25a	90.00	4.76
16	20.37a	88.66	6.24	43	19.54a	86.79	5.85
17	21.05a	89.53	7.39	44	22.20b	90.63	6.63
18	22.86b	90.01	6.76	45	19.42a	86.12	5.52
19	24.58c	91.21	6.37	46	23.51b	87.15	7.68
20	21.25a	88.24	5.92	47	22.38b	89.62	8.52
21	25.71c	91.22	8.11	48	20.92a	86.16	7.15
22	23.66b	90.60	8.29	49	21.31a	90.43	7.74
23	22.73b	91.40	5.52	50	23.48b	88.69	6.83
24	23.60b	87.80	8.24	51	25.66c	90.24	6.48
25	21.95b	89.12	7.83	52	20.84a	86.42	7.16
26	21.98b	91.14	5.06	53	20.99a	87.65	6.52
27	20.56a	87.60	6.47	54	20.19a	87.23	6.68

采用 Duncan's multiple range test 方法分析,各样品的蛋白质含量与蛋白质含量最低的 11 号样品相比,同一列不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05, n = 3$)

Using Duncan's multiple range test method, different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05, n = 3$)

2.3 豌豆水溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析

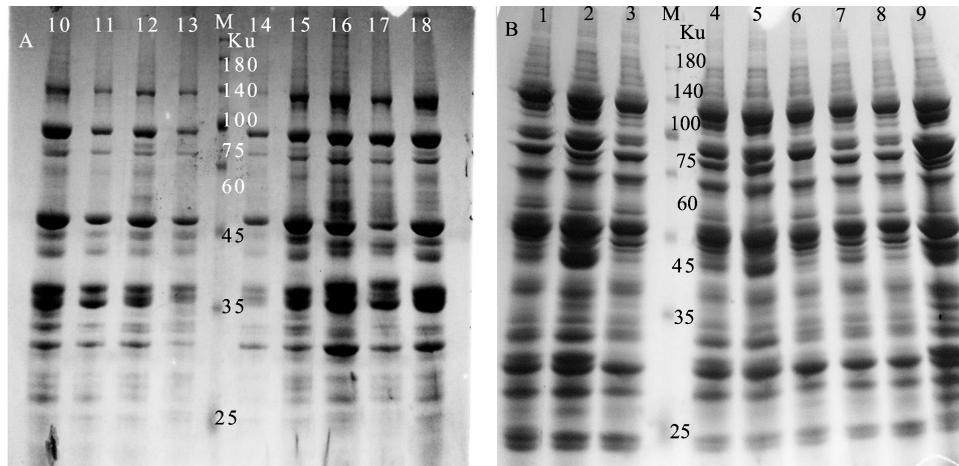
54 份豌豆材料子粒水溶性蛋白经 SDS-PAGE 电泳,表现出迁移率有差异的谱带,谱带数因样品而异(图 1-A)。供试材料共分离出 1588 条水溶性蛋白谱带,其中迁移率不同的谱带 43 条,其变异范围为 6~43 条,平均每份材料水溶性蛋白谱带条数为 20.4 条,其中 31 号豌豆材料分离出的水溶性蛋白谱带数最多,为 36 条,而 18 号和 40 号材料谱带数最少,为 22 条。

在 43 条不同迁移率的谱带中,各谱带在 54 份供试材料中出现次数在 6~54 次,相应的出现频率为 11.11%~100%(表 4),基因多样性指数范围在

0~0.50 之间(表 5),其中 3、4、5、7、21 和 38 号谱带在所有供试材料中均有出现,其出现频率为 100%,基因多样性指数为 0,是共有带;6 号谱带在 54 份豌豆材料中出现频率最低,为 11.11%,仅在 6 份豌豆材料中出现,其他豌豆材料缺失,基因多样性指数也较低。8、12、15、27、34 和 40 号谱带在 54 份材料中的出现次数在 40 次左右,但谱带基因多样性指数最大,为 0.50,表明这些带变异频率高,多态性强。豌豆水溶性蛋白各亚基相对分子量范围在 24.71~149.54 Ku 之间,其中两个区域电泳谱带较为集中,分别为 24.87~50.41 Ku 低相对分子量的蛋白亚基和 56.34~88.08 Ku 高相对分子量的蛋白亚基。在

43 条蛋白谱带中,相对分子量在 88.08、68.25、62.38、44.76 和 29.89 Ku 处的谱带恒定且明显。这

些数据表明,西藏豌豆种质在水溶性蛋白水平上存在着丰富的遗传差异。



M: 蛋白质 Marker, 含有 8 条蛋白谱带, 其相对分子量分别为 25 Ku、35 Ku、45 Ku、60 Ku、75 Ku、100 Ku、140 Ku、180 Ku;

A: 为 10 ~ 18 号青稞材料水溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图, 每个泳道顶部数字表示对应的青稞材料号;

B: 为 1 ~ 9 号青稞材料盐溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图, 每个泳道顶部数字表示对应的青稞材料号

M: Protein Marker, contains 8 protein bands, and their relative molecular weights are 25 Ku, 35 Ku, 45 Ku, 60 Ku, 75 Ku, 100 Ku, 140 Ku, 180 Ku,

A: SDS-PAGE electrophoresis of water soluble protein form No. 10-18 hulless barley material, at the top of each lane number corresponds to the digital representation of barley materials,

B: SDS-PAGE electrophoresis of salt soluble protein form No. 1-9 hulless barley material, at the top of each lane number corresponds to the digital representation of barley materials

图 1 54 份豌豆材料种子粒蛋白水溶性和盐溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis bands of water and salt soluble proteins of grain of 54 field pea landraces from Tibet

表 4 54 份豌豆材料种子 SDS-PAGE 电泳谱带统计

Table 4 Statistics of seed protein bands in 54 pea landraces by SDS-PAGE electrophoresis

材料号 No.	水溶性蛋白 谱带 WPB	盐溶性蛋白 谱带 SPB	材料号 No.	水溶性蛋白 谱带 WPB	盐溶性蛋白 谱带 SPB	材料号 No.	水溶性蛋白 谱带 WPB	盐溶性蛋白 谱带 SPB
1	30	12	19	27	14	37	34	16
2	30	11	20	24	13	38	26	17
3	28	14	21	30	10	39	32	9
4	30	15	22	34	12	40	22	15
5	26	15	23	27	11	41	30	12
6	28	9	24	29	12	42	29	15
7	28	14	25	31	17	43	27	16
8	27	16	26	32	10	44	32	6
9	28	10	27	26	12	45	29	8
10	29	15	28	26	14	46	27	14
11	30	12	29	33	14	47	30	14
12	33	15	30	30	18	48	30	14
13	32	12	31	36	13	49	30	12
14	32	7	32	34	11	50	28	10
15	26	17	33	34	9	51	34	13
16	27	16	34	34	13	52	30	17
17	32	14	35	30	9	53	25	13
18	22	16	36	31	12	54	27	14

WPB: 水溶性蛋白谱带; SPB: 盐溶性蛋白谱带

WPB: Water soluble protein bands, SPB: Salt soluble protein bands

表 5 54 份豌豆材料种子水溶性蛋白谱带多样性分析

Table 5 Diversity analysis of water soluble protein bands in the seeds of 54 field pea landraces

蛋白谱带编号 Protein band No.	相对分子质量(Ku) Relative molecular mass	出现次数 Occurrence times	出现频率(%) Occurrence frequency	基因多样性指数 <i>H</i>	蛋白谱带编号 Protein band No.	相对分子质量(Ku) Relative molecular mass	出现次数 Occurrence times	出现频率(%) Occurrence frequency	基因多样性指数 <i>H</i>
1	149.54	44	81.48	0.48	23	44.93	17	31.48	0.30
2	138.95	51	94.44	0.34	24	44.76	43	79.63	0.48
3	125.37	54	100.00	0.00	25	43.49	50	92.59	0.39
4	116.28	54	100.00	0.00	26	42.31	47	87.04	0.43
5	107.76	54	100.00	0.00	27	41.27	41	75.93	0.50
6	96.66	6	11.11	0.11	28	40.34	12	22.22	0.20
7	88.08	54	100.00	0.00	29	38.02	44	81.48	0.49
8	82.56	39	72.22	0.50	30	37.35	37	68.52	0.49
9	82.07	35	64.81	0.48	31	35.67	18	33.33	0.31
10	78.28	33	61.11	0.47	32	34.08	23	42.59	0.36
11	75.36	22	40.74	0.36	33	33.61	45	83.33	0.47
12	69.96	40	74.07	0.50	34	33.15	40	74.07	0.50
13	68.25	31	57.41	0.47	35	32.55	33	61.11	0.47
14	65.68	31	57.41	0.45	36	31.97	15	27.78	0.26
15	62.38	42	77.78	0.50	37	31.12	44	81.48	0.48
16	60.08	30	55.56	0.44	38	29.89	54	100.00	0.00
17	59.55	44	81.48	0.48	39	28.45	52	96.30	0.26
18	57.19	23	42.59	0.37	40	27.19	39	72.22	0.50
19	56.34	8	14.81	0.13	41	25.84	14	25.93	0.24
20	50.41	35	64.81	0.48	42	25.47	52	96.30	0.26
21	49.31	54	100.00	0.00	43	24.71	53	98.15	0.19
22	46.12	31	57.41	0.46					

2.4 豌豆盐溶性蛋白的凝胶电泳分析

54 份豌豆材料子粒盐溶性蛋白经 SDS-PAGE 电泳,共分离出 699 条蛋白谱带,其中迁移率不同的谱带 24 条,其变异范围为 6~17 条,平均每份材料谱带条数为 20.4 条,其中 30 号豌豆材料分离出的盐溶性蛋白谱带条数最多,为 18 条,而 44 号材料谱带条数最少,为 6 条(表 4)。24 条不同迁移率的谱带在 54 份供试材料中出现的频率为 18.52%~100%,基因多样性指数为 0~0.50。6 号谱带在所有供试材料中均有出现,其出现频率

为 100%,为共有带;17 号谱带出现频率最低,为 18.52%,仅在 10 份豌豆材料中出现。7、13 和 22 号谱带基因多样性指数最大,为 0.5,表明这种谱带变异最丰富(表 6)。

豌豆盐溶性蛋白各亚基相对分子质量范围在 24.85~91.24 Ku,其中,相对分子量在 69.32、44.22、36.06 和 34.28 Ku 处的谱带明显。与豌豆水溶性蛋白亚基相对分子质量相比,一些相对分子量大的蛋白谱带显著减少。这些数据表明西藏豌豆种质在水溶性蛋白水平上存在着丰富的遗传差异。

表 6 盐溶性蛋白谱带分析

Table 6 Band analysis of salt soluble proteins

蛋白谱带编号 Protein band No.	相对分子质量(ku) Relative molecular mass	出现次数 Occurrence times	出现频率(%) Occurrence frequency	基因多样性指数 H	蛋白谱带编号 Protein band No.	相对分子质量(ku) Relative molecular mass	出现次数 Occurrence times	出现频率(%) Occurrence frequency	基因多样性指数 H
1	106.67	53	98.15	0.19	13	36.61	39	72.22	0.50
2	94.92	13	24.07	0.23	14	36.37	20	37.04	0.33
3	75.63	35	64.81	0.48	15	34.93	29	53.70	0.44
4	72.52	19	35.19	0.32	16	34.58	21	38.89	0.35
5	69.90	21	38.89	0.34	17	33.79	10	18.52	0.16
6	65.50	54	100.00	0.00	18	32.73	45	83.33	0.48
7	46.00	38	70.37	0.50	19	32.02	20	37.04	0.34
8	45.08	16	29.63	0.28	20	30.86	49	90.74	0.39
9	43.92	42	77.78	0.49	21	30.68	10	18.52	0.18
10	43.44	19	35.19	0.32	22	28.58	38	70.37	0.50
11	42.12	24	44.44	0.38	23	26.39	43	79.63	0.48
12	41.39	13	24.07	0.23	24	25.19	28	51.85	0.42

2.5 聚类分析

通过非加权类平均聚类法(UP-GMA)对 54 份供试材料水溶性和盐溶性蛋白谱带进行聚类结果表明(图 2),所有供试材料遗传相似系数变异范围为 0.60~0.91,表明来源于西藏不同区县的豌豆农家种、地方种间遗传背景差异较大。23 和 24 号材料、53 和 54 号材料间的遗传相似系数最大,为 0.894,表明这 2 组材料遗传差异小,亲缘关系最近。54 份材料在遗传相似系数 GS 值为 0.6 水平上全部聚为一类,在遗传相似系数 0.696 水平上聚为 8 个类群,第 I 类为 1 份材料;第 II 类群为 1 份材料;第 III 类群有 8 份材料,可分为 2 个亚群;第 IV 类群为 3 份材料;第 V 类群有 3 份材料;第 VI 类群有 13 份材料,分为 2 个大亚群;第 VII 类群有 1 份材料;第 VIII 类群为最大的类群,有 25 份材料,在遗传相似系数 0.76 水平上,可分为 7 个亚群。但是聚类分析发现西藏不同海拔梯度的地方种、农家种并没有整齐的聚在一起,而是互相交叉聚类,表明对于供试材料蛋白的遗传距离与地理来源之间无明显关系。

2.6 不同海拔梯度种质群间的遗传多样性差异

根据豌豆材料采集地海拔高度,将 54 份蚕豆种质分为 4 个生态环境类群,即海拔低于 3000 m 的类群、海拔 3000~3500 m 的类群、海拔 3500~4000 m 的类群和海拔 ≥ 4000 m 的类群。各海拔梯度的豌

豆资源遗传多样性见表 7。结果显示,在海拔高度水平上,4 个生态环境类群 54 份材料种子蛋白电泳总谱带条数为 67 条,总多态带为 60 条,多态带百分率为 89.55%,总的基因多样性指数(H)为 0.34,类群内的平均基因多样性指数为 0.27。4 个生态类群各多样性指标均有一定差异,多态性条带数变幅范围为 39~55 条,平均为 50.5 条;多态带百分率变幅为 58.21%~89.55%;Shannon's 信息指数变幅范围为 0.33~0.52,平均值为 0.43;有效等位基因数(N_e)变幅 1.41~1.62,平均值为 1.52;有效等位变异所占比重(N_e/N_a)变幅 0.85~0.89,平均值为 0.87;基因多样性指数(H)变幅为 0.18~0.35,平均值为 0.27。

54 份豌豆材料类群间基因多样性指数(H_t)是 0.3223,类群体内基因多样性指数(H_s)是 0.2929,基因变异的平均系数(G_{st})是 0.0913,群体估计的基因流(N_m)是 4.7971(表 8)。

综合各项指标来看,在 2500~4000 m 的海拔水平上,各项多样性指标都处于最大,表明西藏豌豆种质遗传变异最丰富的地区主要分布在海拔 3500~4000 m 的生态区,其次是 >4000 m 以上的地区。此结果也印证了西藏高原豌豆主产区主要分布在海拔 3500~4000 m 的日喀则、山南地区,在长期的栽培种植过程中,受自然气候影响,其豌豆种质发生了多样的变异。

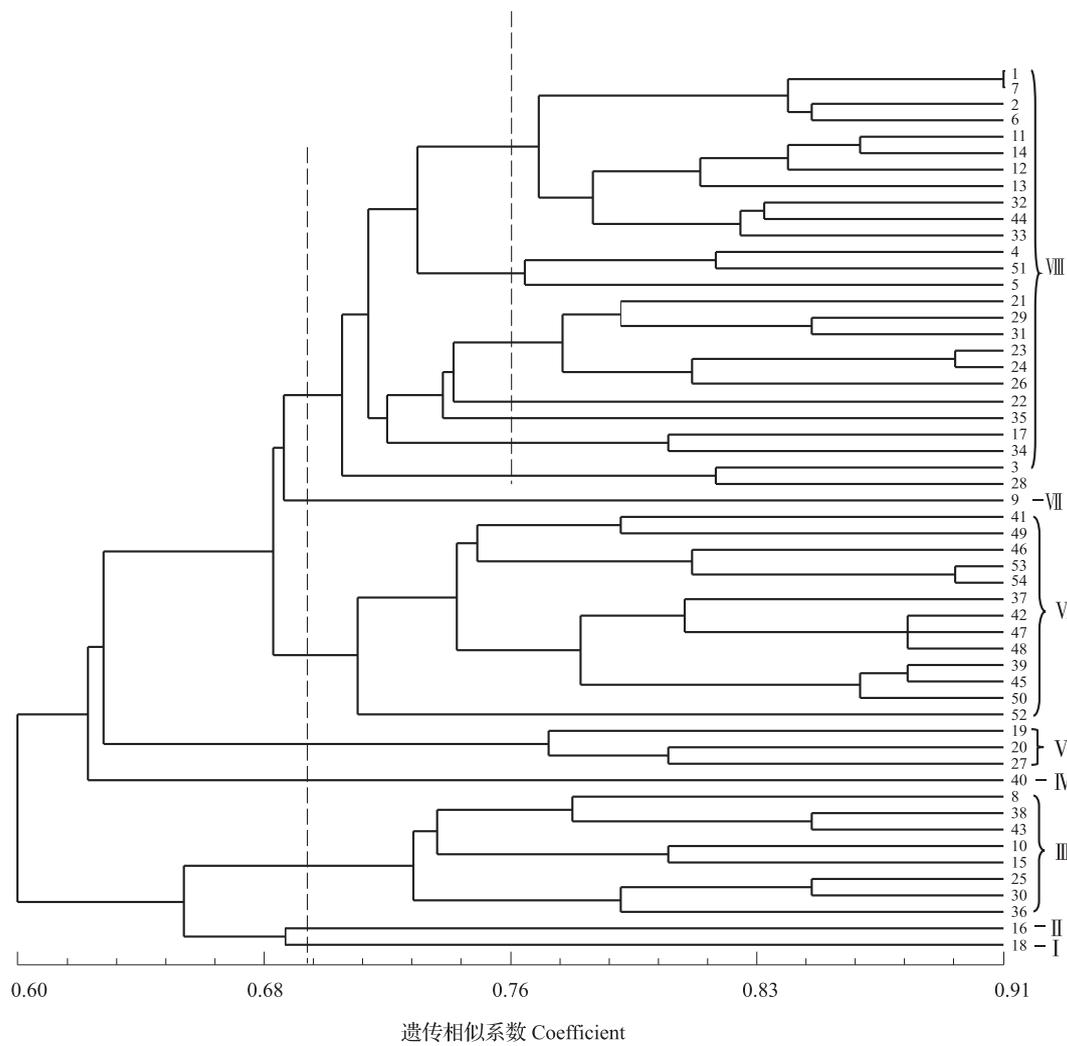


图 2 54 份豌豆种质材料水溶性和盐溶性蛋白亚基带型 N-J 进化树
 Fig. 2 N-J phylogenetic tree clusters of water soluble and salt soluble protein subunit band patterns in 54 pea landraces

表 7 不同海拔梯度的豌豆生态类群遗传多样性分析

Table 7 Genetic diversity analysis of pea ecological groups from different altitudinal gradients

海拔高度 (m) Altitude	资源份数 No. of accession	观测等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	基因多样性 指数 H	有效等位 变异占比 Ratio of N_e/N_a	Shannon's 信息指数 I	多态性带数量 No. of polymorphic loci	多态性带 百分率 (%) Percentage of polymorphic loci
A < 3000	4	1.58	1.41	0.23	0.89	0.33	39.00	58.21
3000 ≤ A < 3500	8	1.72	1.50	0.18	0.87	0.41	48.00	71.64
3500 ≤ A < 4000	33	1.90	1.62	0.35	0.85	0.52	60.00	89.55
A ≥ 4000	9	1.82	1.57	0.31	0.86	0.46	55.00	82.09
平均 Average	1.75	1.52	0.27	0.87	0.43	50.50	75.37	
总体 Total	54	1.90	1.60	0.34	0.84	0.50	60.00	89.55

A: Altitude, N_a : Observed number of alleles, N_e : Effective number of alleles, H : Genetic diversity index, I : Shannon's information index

表 8 54 份豌豆材料基因多样性评价

Table 8 Estimates of genetic diversity of 54 pea landraces

材料 总数 Sample	类群间基因 多样性指数 <i>Ht</i>	类群内基因 多样性指数 <i>Hs</i>	基因变异 平均系数 <i>Gst</i>	群体 基因流 <i>Nm</i>
54	0.3223 ± 0.0287	0.2929 ± 0.0251	0.0913	4.7971

Ht: Total genotypic diversity among the population, *Hs*: Total genotypic diversity within the population, *Gst*: Mean coefficient of gene differentiation, *Nm*: Estimated gene flow in the population, *Nm*: Estimate of gene flow from *Gst* or *Gcs*. E. g., $Nm = 0.5(1 - Gst) / Gst$

3 讨论

研究物种的遗传变异有助于解析基因库和新品种选育,鉴定物种的亲缘关系和相似性,对更全面地比较品种特征具有重要意义^[7]。前人利用蛋白质、DNA 分子标记、细胞遗传学、生物化学和表型特征等方法进行了遗传变异和品种鉴定研究^[27-30]。本研究通过对西藏 54 份豌豆农家种、野生近缘种种质资源储藏蛋白遗传多样性的分析,发现水溶性蛋白和盐溶性蛋白的基因多样性指数均在 0 ~ 0.50 之间。由此可以看出,西藏豌豆种质资源具有丰富的遗传变异,充分利用这些种质资源,将有效拓宽豌豆育种的遗传背景,为豌豆种质资源改良和育种奠定基础。

根据水溶性和盐溶性蛋白谱带差异,在遗传相似系数为 0.696 水平上,将 54 份豌豆种质材料分为 8 个类群,不同类群的材料间并未表现出明显的地域分布,即聚类结果与种质的地理来源没有明显的关联性,这与王丽侠等^[31]和万述伟等^[32]的研究结果一致。这可能与西藏地区特殊的地理环境条件有关,不同区县间环境条件迥异,且大山阻隔了豌豆种质间的基因流,物种在长期适应环境的过程中会出现某些性状趋同的现象,造成不同物种性状间的交叉^[33]。同时在不同海拔高度的生态环境中,豌豆种质资源遗传多样性表现出一定的规律,即海拔 3500 m 以上,豌豆蛋白遗传多样性各指标均显著高于海拔低于 3500 m 的生态环境区,此结果与汪爱华等^[34]利用 RAPD 和 ISSR 分析西藏近缘野生大麦遗传多样性的结论相似,即海拔高度增加,供试材料的遗传变异相应增加。众所周知,随着海拔高度增加,氧浓度逐渐下降、气压下降、辐射强度增加、干旱少雨等,各种诱变因素增加,导致豌豆种质资源变异频率提高。

地理生态因素与豌豆种子蛋白含量相关性分析

发现,豌豆粗蛋白含量与经度存在显著正相关,与纬度呈正相关,而与海拔高度呈负相关(表 2)。此结果说明在西藏高原地区,藏东到藏中到后藏区其豌豆粗蛋白有一定的增加;随着纬度的增加,豌豆粗蛋白含量有增加趋势;随着海拔高度增加,豌豆总蛋白有轻微下降的趋势。

54 份豌豆材料种质基因遗传多样性 (*H*) 为 0.34,暗示着所有供试材料间遗传变异的 34%,而剩余的 64% 的遗传变异发生在群体内。F. C. Yeh 等^[35]认为 *Gst* 范围在 0.151 ~ 0.25 代表大的遗传差异,基于此范围,西藏豌豆 4 个地理生态群体表现出较弱的群体间分化。本研究估算的基因流 *Nm* 为 4.7971, S. Wright^[36]认为 *Nm* 低于 1 暗示着群体因为遗传漂移开始分化,而 J. M. Mcdermott 等^[37]认为 *Nm* 低于 0.5 暗示着群体因基因漂移而产生广泛的遗传多样性。本试验 *Nm* 远高于 1,暗示西藏不同生态类群豌豆处于分化进程中。

参考文献

- [1] 林汝法,柴岩,廖琴,等. 中国小杂粮[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2005:317-319
- [2] 贺晨帮,宗绪晓. 豌豆种质资源形态标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(1):42-48
- [3] Nasir M, Ghafoor A, Habib A, et al. Evaluation of genetic diversity of pea germplasm through phenotypic trait analysis[J]. Pakistan J Bot, 2008, 40(5):2081-2086
- [4] Li L, Redden R J, Zong X, et al. Ecogeographic analysis of pea collection sites from China to determine potential sites with abiotic stresses[J]. Genet Resour Crop Ev, 2013, 60(6):1801-1815
- [5] FAOSTAT. Production of top 5 producers[EB/OL]. (2015-10-25)[2014-10-13]. <http://faostat3.fao.org>
- [6] 王建林. 西藏高原作物栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,2012
- [7] Khoshroo S M, Khavarinejad R, Baghizadeh A, et al. Seed storage protein electrophoretic profiles in some Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars[J]. Afr J Biotechnol, 2013, 10(77):17793-17804
- [8] Velusamy V, Lee K J, Ha B K, et al. Evaluation of genetic diversity in Korean soybean landraces by protein banding patterns using high-throughput screening[J]. J Crop Sci and Biotechnol, 2013, 16(3):189-207
- [9] Hameed A, Shah T M, Atta B M, et al. Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes[J]. Pakistan J Bot, 2009, 41(2):703-710
- [10] Ghafoor A, Ahmad Z, Qureshi A S, et al. Genetic relationship in *Vigna mungo*(L.) Hepper and *V. radiata*(L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE[J]. Euphytica, 2002, 123(3):367-378
- [11] Emre I. Electrophoretic analysis of some *Lathyrus* L. species based on seed storage proteins[J]. Genet Resour Crop Ev, 2009, 56(1):31-38
- [12] Yuzbasioglu E, Acik L, Ozcan S. Seed protein diversity among lentil cultivars[J]. Bio Plantarum, 2008, 52(1):126-128
- [13] Lee K J, Lee G A, Lee J R, et al. Comparison of eating quality and seed storage protein among Korean rice landraces[J]. J Crop Sci

- Biotechnol,2016,19(3):241-247
- [14] Baranger A, Aubert G, Arnau G, et al. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers [J]. *Theor Appl Gen*, 2004, 108(7):1309-1321
- [15] Lee K J, Kim J B, Kim S H, et al. Alteration of seed storage protein composition in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mutant lines induced by γ -irradiation mutagenesis [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(23):12405-12410
- [16] Liu S, Zhou R, Tian S, et al. A Study on subunit groups of soybean protein extracts under SDS-PAGE [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2007, 84(9):793-801
- [17] Manjaya J G, Suseelan K N, Gopalakrishna T, et al. Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. *Food Chem*, 2007, 100(4):1324-1327
- [18] Rashed M A, Sharabash M T M, Hammad A H A, et al. Biochemical genetic markers for discriminating high yielding soybean plants (*Glycine max* L.) after irradiation with gamma rays [J]. *Arab Univ J Agric Sci*, 1997, 5:69-87
- [19] Stejskal J, Griga M. Comparative analysis of some isozymes and proteins in somatic and zygotic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *J Plant Physiol*, 1995, 146(4):497-502
- [20] Hirata T, Abe J, Shimamoto Y. Genetic structure of the Japanese soybean population [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 1999, 46(5):441-453
- [21] 陈晓杰, 吉万全, 王亚娟. 新疆冬春麦区小麦地方品种贮藏蛋白遗传多样性研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(4):522-528
- [22] 张平平, 马鸿翔, 姚金保, 等. 江苏省小麦品种的谷蛋白亚基组成分析 [J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(5):959-965
- [23] 马晓岗, 李凤珍, 王晓辉, 等. 青海省小麦种质材料醇溶蛋白的遗传多样性分析 [J]. *麦类作物学报*, 2012, 32(6):1060-1065
- [24] 石建斌, 侯万伟, 刘玉皎, 等. 蚕豆种质资源清蛋白遗传多样性分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(1):22-28
- [25] 宋晓敏, 李素芬, 刘建福, 等. 220 种蚕豆样品蛋白质含量与其蛋白组分的分子质量 [J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(12):42-46
- [26] 王燕平, 李贵全, 郭数进, 等. 山西不同生态型大豆种质资源蛋白亚基的变异 [J]. *生态学报*, 2011, 31(1):203-0211
- [27] Collard B C, Mackill D J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century [J]. *Philos Trans Royal Soc London*, 2008, 363(1491):557-572
- [28] Malik M F A, Qureshi A S, Ashraf M, et al. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis [J]. *Aust J Crop Sci*, 2009, 3(2):107-112
- [29] Miernyk J A. Seed proteomics [J]. *J Proteomics*, 2014, 74(4):389-400
- [30] Tavaud P M, Sartre P, Nelson R, et al. Genetic diversity in a soybean collection [J]. *Crop Sci*, 2009, 49(3):895-902
- [31] 王丽侠, 程须珍, 王素华, 等. 中国绿豆核心种质资源在不同环境下的表型变异及生态适应性评价 [J]. *作物学报*, 2014, 40(4):739-744
- [32] 万述伟, 宋凤景, 郝俊杰, 等. 271 份豌豆种质资源农艺性状遗传多样性分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(1):10-18
- [33] 曾亮, 李敏权, 杨晓明. 豌豆属种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *草业学报*, 2012, 21(3):125-131
- [34] 汪爱华, 丁毅. 西藏近缘野生大麦 RAPD 和 ISSR 分子标记的遗传多样性 [J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2007, 53(6):723-730
- [35] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. Version 1.32: the user-friendly shareware for population genetic analysis [EB/OL]. In *Molecular Biology and Biotechnology Centre*, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada. (2017-06-21) [1999]. <http://www.ualberta.ca/wfyeh>
- [36] Wright S. Evolution and the genetics of populations. volume 2: The Theory of Gene Frequencies [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1969
- [37] Medermott J M, McDonald B A. Gene flow in plant photosystems [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1993, 31:353-373