

西南地区硬枝野荞麦(*Fagopyrum urophyllum*)居群的遗传多样性研究^{*}

罗定泽¹ 侯 鑫² 赵佐成³

(1. 四川师范大学化学与生命科学学院, 成都 610066; 2. 内蒙古大学生物系, 呼和浩特 010021;
3. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘 要: 采用等位酶电泳技术研究了云南省中北部昆明、富民、宾川 3 县(市)及四川省西南布拖县的硬枝野荞麦(*Fagopyrum urophyllum*) 6 个天然居群的遗传多样性和分化。硬枝野荞麦居群内维持有较高的遗传多样性, 多态位点比率为 50.0%, 预期杂合度和观察杂合度分别为 0.251 和 0.471。并对硬枝野荞麦(*F. urophyllum*)与栽培荞麦之间遗传变异作了比较。
关键词: 等位酶; 等位基因频率; 遗传多样性; 硬枝野荞麦(*Fagopyrum urophyllum*)
中图分类号: Q 152; Q 948.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-470X (2001)02-0107-06

Genetic Diversity of *Fagopyrum urophyllum* Populations in Southwest China

LUO Ding-Ze¹ HOU Xin² ZHAO Zuo-Cheng³

(1. Institute of Chemistry and Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China;
2. Department of Biology, Nei Mongol University, Huhehot 010021, China;
3. Chengdu Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: Based on allozyme electrophoresis, the genetic diversity and differentiation among 6 wild populations of *Fagopyrum urophyllum* from the counties Kunming, Fumin and Binchuan in the north-central part of Yunnan Province, the county Butuo in the southwest part of Sichuan Province, China, were studied in this paper. The results showed that the genetic diversity within wild population was high. The percentage of loci polymorphism (P) was 50.0%, the means of expected and observed heterozygosities were 0.251 and 0.471, respectively. The genetic variation between cultivated buckwheat and wild population was compared.
Key words: Allozyme; Allele frequency; Genetic diversity; *Fagopyrum urophyllum*

收稿日期: 2000-04-15, 修回日期: 2000-11-14。
^{*} 作者简介: 罗定泽(1943-), 男, 教授, 硕士, 从事植物发育遗传研究。

硬枝野荞麦(*Fagopyrum uropyllum*)是荞麦属(*Fagopyrum*)中唯一的多年生半灌木类型,在我国云南省中部高原及其毗邻的四川省凉山彝族自治州西南分布较为广泛。该地区地质历史悠久,植物起源古老,种类丰富,是古北大陆起源植物的定居场所^[1]。硬枝野荞麦生长于海拔1 600~ 2 800 m 的高原山地,是山坡及林缘灌丛的重要组成种类。该地区亦是我国和世界苦荞麦生产和种质资源分布的核心地区^[2]。土壤主要为弱酸性红壤。气候冷凉,年均温度和 10℃,年积温偏低。年降雨量较低,年均降水量多在1 000 mm 以下。分析研究该地区苦荞麦及其近缘野生荞麦居群的遗传多样性,对于荞麦栽培资源的保护,探讨荞麦种系发生和进化特征均具有重要价值。已有报道^[2,3]采用等位酶分析荞麦栽培居群的遗传变异和分化,但涉及其近缘野生种居群的遗传多样性研究,国内外均未见有过报道。

本研究选择了我国云南和四川省的 4 个市、县境内共 6 个硬枝野荞麦居群,采用等位酶电泳法分析其遗传多样性和居群的遗传分化,旨在为苦荞麦种质资源的保存与恢复提供依据,并为进一步探讨栽培荞麦与其近缘种间遗传关系提供基本资料。

1 材料和方法

1.1 采样地点

在四川省凉山彝族自治州南部的布拖县,云南省中部的昆明市、富民县,西北部的宾川县境内,对 6 个硬枝野荞麦天然居群进行调查和采样(见表 1)。其中,布拖县 2 个居群,分别位于交际河区的联合乡场头和三岔河附近。昆明市 1 个居群,位于西山山门附近。富民县 2 个居群,位于拖胆水库附近和北邑村。宾川县 1 个居群,位于鸡足山。6 个居群分布的海拔高度介于 1 600~ 2 800 m。

表 1 硬枝野荞麦天然居群编号和采样地点
Table 1 Numbers and sampling of wild population of *Fagopyrum uropyllum*

居群编号 Pop. No	居群 Population name	地点 Locality	海拔(m) Elevation	居群编号 Pop. No	居群 Population name	地点 Locality	海拔(m) Elevation
1	BU TUO 127	布拖	2 800	4	FUM N 139	富民	2 200
2	BU TUO 131	布拖	1 600	5	FUM N 144	富民	1 800
3	KUNM NG 146	昆明	1 800	6	B NCHUAN 167	宾川	2 200

1.2 样品的采集和处理

1998 年秋季在野外采集硬枝野荞麦成熟果实带回成都室内保存过冬。1999 年 4 月将所采集硬枝野荞麦的成熟果实带到北京。在室温 21℃下,将种子置培养皿中用蒸馏水浸泡 6 h,再转入塑料盆栽钵细砂土中播种待萌发。17 d 之后,子叶转绿色,每个居群随机取 17~ 26 个单株,6 个居群共取 121 个单株。每个单株取 0.05 g 新鲜子叶材料,加入 100 μL 复杂磷酸提取缓冲液^[4],分别冰镇研磨。以 6 mm × 2 mm 的新华 1 号滤纸沁子吸取提取液,然后将滤纸沁子置放玻璃培养皿内,保存于- 70℃低温冷冻箱备用。

1.3 淀粉凝胶电泳

采用水平式淀粉凝胶电泳分析了 7 个酶系统。它们分别是还原型辅酶 I 心肌黄酶(DA)、异柠檬酸脱氢酶(DH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(PGD)、磷酸葡萄糖异构酶(PGI)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)、莽草酸脱氢酶(SKD)。所用的水解淀粉酶系美国 Sigma 公司产品(S-4501),采用不连续缓冲液系统^[5],淀粉胶浓度为 12%。酶带

染色主要采用胶染方法^[4]。

1.4 酶谱记录 and 遗传学解释

在电泳酶谱记录纸上画出带谱的相对位置和浓度,并用黑白胶卷对凝胶切片上酶谱一一拍照记录,再以彩色反转片有选择的拍照,作为酶谱的永久保存。采用基因构成法分析解释谱带和命名,并确定基因位点和等位基因。

1.5 数据分析

电泳数据采用 Biosys-1 软件在计算机上运算,输入全部个体的基因型,计算出等位基因频率,进而计算出平均等位基因数目 A、多态位点比率 P (采用最常见的等位基因频率不超过 95% 标准)、观察杂合度 H_o 、预期杂合度 H_e ^[6],以及 Wright (1978) 的固定指数 (F_{IS} , F_{IT})。

1.6 聚类分析

利用等位酶分析所得到的 6 个居群间遗传一致度 (I) 的数据进行聚类分析。采用 Statistics 软件和 BM -P II 计算机完成。聚类皆采用不加权对组平均法 (Unweighted pair-group average)。

2 结果

2.1 等位基因频率

经过 7 种酶系统的检测,获得 11 个等位酶位点,各位点上等位基因频率见表 2。其结果显示,有多态位点 8 个: 其中 4 个多态位点上 (*DLA* -1、*DLA* -2、*PGD* -1 和 *SKD* -1) 均有 3 个等位基因; 1 个多态位点上 (*IDH* -1) 有 4 个等位基因; 另有单态位点 3 个 (*MDH* -2、*MDH* -3 和 *PGI* -1)。

表 2 硬枝野荞麦居群的等位基因频率
Table 2 Allele frequencies in the populations of *Fagopyrum urrophyllum*

位 点	居 群 Population						位 点	居 群 Population					
Locus	1	2	3	4	5	6	Locus	1	2	3	4	5	6
<i>DLA</i> -1							<i>MDH</i> -3						
A	0.500	0.500	0.500	1.000	0.500	0.500	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	<i>PGD</i> -1						
C	0.500	0.500	0.500	0.000	0.500	0.000	A	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.324
<i>DLA</i> -2							B	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.324
A	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.353
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	<i>PGI</i> -1						
C	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.441	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>IDH</i> -1							<i>PGM</i> -1						
A	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	A	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000
B	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000	B	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	<i>PGM</i> -2						
D	0.500	0.500	0.477	0.500	0.500	0.500	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.647
<i>MDH</i> -1							B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.353
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	<i>SKD</i> -1						
B	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.500	A	0.692	0.500	0.500	0.444	0.000	0.676
<i>MDH</i> -2							B	0.308	0.500	0.500	0.556	1.000	0.059
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.265

比较表 2 所列 6 个居群间的位点多态性差异, 可发现 8 个多态位点上有 6 个等位基因是居群 6(宾川居群) 的特有等位基因, 而为其它 5 个居群所没有。仅 1 个等位基因属居群 3(昆明居群) 的特有基因。上述居群所特有等位基因的频率有的很低, 如居群 3 的 *IDH* -1-A 的频率 0.023, 居群 6 的 *DIA* -2-B 的频率 0.059。但有的特有基因的频率较高, 如居群 6 在 5 个位点上都存在较高频率的特有基因: *DIA* -1-B、*IDH* -1-C、*PGD* -1-C、*PGM* -2-B 和 *SKD* -1-C 的频率在 0.265~ 0.500 范围, 表现出较高水平变异性。

2.2 遗传多样性度量

从表 3 可见, 11 个位点的平均遗传变异水平以宾川居群(N_o. 6) (*A* = 1.8, *P* = 58.3%, *H_o* = 0.525, *H_e* = 0.304) 最高, 以富民拖旦水库居群(N_o. 4) (*A* = 1.4, *P* = 41.7%, *H_o* = 0.333, *H_e* = 0.208) 最低。而在另外 4 个居群(N_o. 1、N_o. 2、N_o. 3、N_o. 5)

之间, 上述遗传多样性指标 (*A*、*P*、*H_o*、*H_e*) 数值表现相对一致。见表 3, 各居群的观察杂合度值均较高, *H_o* 在 0.333 ~ 0.525 范围。居群观察杂合度(*H_o*) 与预期杂合度(*H_e*) 数值相

表 3 硬枝野荞麦居群 11 个酶位点的平均遗传变异
Table 3 Means of variability at 11 Loci in the populations of *Fagopyrum urophyllum*

居群编号 Pop. No.	居群 Population	平均基因数 A	多态位点比率 P (%)	观察杂合度 H _o	预期杂合度 H _e
1	BU TUO 127	1.5	50.0	0.468	0.244
2	BU TUO 131	1.5	50.0	0.500	0.250
3	KUNM NG146	1.6	50.0	0.500	0.252
4	FUM N 139	1.4	41.7	0.333	0.208
5	FUM N 144	1.5	50.0	0.500	0.250
6	B NCHUAN 167	1.8	58.3	0.525	0.304
平均 Mean		1.55	50.0	0.471	0.251

差(*H_o* > *H_e*) 均较大, 表明居群中杂合体的适合度普遍高于纯合体。

2.3 固定指数

用 Wright 的 *F* 统计量来反映硬枝野荞麦居群的遗传结构(见表 4)。固定指数(*F_{IS}*、*F_{IT}*)可表示在居群水平上或种水平上基因型频率偏离 Hardy-weinberg 遗传平衡的程度。表 4 所列 8 个多态位点的 *F_{IS}* 和 *F_{IT}* 平均值分别为 - 0.875 和 - 0.573, 反映出无论在居群水平还是在种水平上, 实际基因型和基因频率均偏离 Hardy-Weinberg 平衡。 *F* < 0, 显示纯合体不足, 杂合体过量。这一结果与表 3 中 *H_o* > *H_e* 的结果一致, 均表明居群自交率低或居群纯合体适合度低。

表 4 硬枝野荞麦居群的 *F* 统计量
Table 4 *F*-statistics at all loci in the populations of *Fagopyrum urophyllum*

位点 Locus	<i>F_{IS}</i> *	<i>F_{IT}</i> **	位点 Locus	<i>F_{IS}</i> *	<i>F_{IT}</i> **	位点 Locus	<i>F_{IS}</i> *	<i>F_{IT}</i> **
<i>DIA</i> -1	- 1.000	- 0.538	<i>MDH</i> -1	- 1.000	- 0.200	<i>PGM</i> -2	- 0.545	- 0.063
<i>DIA</i> -2	- 0.966	- 0.962	<i>PGD</i> -1	- 0.895	- 0.806	<i>SKD</i> -1	- 0.341	0.013
<i>IDH</i> -1	- 0.986	- 0.745	<i>PGM</i> -1	- 1.000	- 0.714	平均 Mean	- 0.875	- 0.573

注: * 表示在亚居群中基因型的实际频率和理论预期频率的离差; ** 表示在总居群中基因型的实际频率和理论预期频率的离差。

Note: *F_{IS}* Deviate of observed frequency and expected frequency in genotype of subpopulation; *F_{IT}* Deviate of observed frequency and expected frequency in genotype of total population

3 讨论

硬枝野荞麦居群的平均多态位点比率 *P* = 50.0% (41.7% ~ 58.3%), 平均预期杂合

度 $H_e = 0.251 (0.208 \sim 0.304)$, 平均等位基因数目 $A = 1.55 (1.4 \sim 1.8)$ 。对照 Hamrick 对 165 属 449 种植物的统计结果^[7], 植物居群水平的上述 3 项遗传多样性指标值分别为: $P = 35\%$, $H_e = 0.113$, $A = 1.52$ 。可见, 硬枝野荞麦居群除平均等位基因数目 (A) 略高一些外, 其它 2 项多样性指标值均明显高于其它植物。本工作检测了 11 个基因位点, 获得 8 个多态位点, 等位基因数量较多 (见表 2)。其中 5 个多态位点上等位基因数量均超过 3 个。多态位点上等位基因频率分布较均匀。所以硬枝野荞麦居群具有较高的遗传多样性。

比较 6 个硬枝野荞麦居群在 11 个基因位点上的变异水平 (见 2-2), 以云南西北部的宾川居群 (No. 6) 的遗传变异指标 (A 、 P 、 H_o 、 H_e) 值较高。表 2 显示在全部多态位点上, 宾川居群 (No. 6) 具较多数目等位基因, 除 1 个频率较低的稀有基因 ($DIA-2B$ 的频率为 0.059) 以外, 各位点上基因频率分布较均匀, 表明该居群的基因丰富度高。位于云南省中部的富民拖旦水库居群 (No. 4) 表现较低的遗传变异水平。对照表 2 所列的基因频率分布, 可知在所检测位点上, 富民拖旦水库居群 (No. 4) 的等位基因相对较单调, 在所检测多态位点上均缺乏特有基因, 因而该居群平均等位基因数目 (A)、多态位点比率 (P) 等指标值较低。见表 3, 富民拖旦水库居群 (No. 4) 的观察杂合度 (H_o), 预期杂合度 (H_e) 亦表现最低, 显示其等位基因频率分布均匀程度较低。

据一年生荞麦栽培居群的等位酶研究结果^[2,3], 对比 6 个硬枝野荞麦天然居群的遗传多样性度量主要指标平均值 (见表 5), 表明除平均等位基因数目 (A) 略低而外, 其它度量指标值 (P 、 H_o 、 H_e) 均高于一年生栽培荞麦。由于硬枝野荞麦系多年生半灌木型植物, 在我国西南分布较广泛, 对当地土壤气候环境的适应性强。其生命周期长, 世代重叠特征有利于居群内遗传变异的维持和积累。野生居群并可避免栽培居群中人工选择因素干扰, 所以表现相对较高的遗传多样性水平。

硬枝野荞麦居群较之苦荞麦和甜荞麦栽培居群保存有较高的遗传变异水平, 相应野生居群中基因型杂合率偏高, 显示在其居群的遗传组成上有不同特点。栽培荞麦中苦荞麦属自花授粉植物。已报

表 5 硬枝野荞麦与栽培荞麦遗传变异比较
Table 5 Comparison of genetic variation between *Fagopyrum urophyllum* and cultivated buckwheat

指标 Index	硬枝野荞麦 <i>F. urophyllum</i>	甜荞麦 <i>F. esculentum</i>	苦荞麦 <i>F. tataricum</i>
平均预期杂合度 (H_e)	0.251	0.124	0.218
平均观察杂合度 (H_o)	0.471	0.124	0.187
平均多态位点比率 (P)	50.0%	36.4%	46.6%
平均等位基因数目 (A)	1.55	1.60	1.80

道 8 个苦荞麦居群的内繁育系数 (F_{IS}) 均值为 0.098, 显示部分居群中纯合体过量, 处于不平衡状态^[2]。而甜荞麦属虫媒植物。据研究报道, 亚洲各地栽培居群的 8 个多态位点上等位基因频率均很好地符合 Hardy-weinberg 平衡^[3]。本研究结果显示, 8 个多态位点上内繁育系数 (F_{IS}) 都为负值 (见表 4), 这一结果与该地区另一野生荞麦——金荞麦 (*F. dibotrys*) 居群的遗传结构测定结果^[8]相一致; 表明野生荞麦居群受一些生态因子干扰, 其纯合体适合度普遍低于杂合子适合度, 可能由于选择作用或非随机交配, 导致居群的基因频率偏离遗传平衡; 居群生长环境中严酷的土壤气候因子, 通过植物选择性繁育方式, 较强烈地影响到野生荞麦居群的遗传变异。

参考文献:

- [1] 吴征镒, 朱彦丞主编 云南植被 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 赵佐成, 周明德, 罗定泽, 等 凉山州南部三县苦荞麦栽培居群的遗传多样性和聚类分析 遗传学报, 2000, 27 (6): 538—548
- [3] Ohnishi O. Population genetics of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. VII. Allozyme variability in Japan, Korea, and China *Jpn J Genet*, 1988, 63 (6): 507—522
- [4] 王中仁 植物等位酶分析 北京: 科学出版社, 1996
- [5] Soltis D E, Soltis P S. Starch gel electrophoresis of ferns: a complication of grinding buffers, gel and electrode buffer, and staining schedules *Amer Fern J*, 1983, 73 (1): 9—27.
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals *Genetics*, 1978, 89 (3): 583—590
- [7] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, *et al* eds Plant population genetic, breeding, and genetic resources *Sunderland: Sinauer Associates*, 1989. 43—63
- [8] 罗定泽, 侯鑫, 赵佐成 西南地区金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*(D. Don)Hara)居群遗传多样性研究 四川师范大学学报(自然科学版), 2000, 23 (4): 421—424