

荞麦属植物三叶期幼叶过氧化物酶同工酶研究

张以忠^{1,2}, 陈庆富^{1*}

(1. 贵州师范大学生物技术与工程学院植物遗传育种研究所, 贵阳 550001; 2. 毕节学院环境与生命科学系, 贵州毕节 551700)

摘要: 用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对荞麦属(*Fagopyrum* Mill)8个种(含大粒组7个种和小粒组1个种)28份栽培及野生荞麦植株三叶期幼叶的过氧化物酶同工酶进行了研究。结果发现:过氧化物酶同工酶酶带共23条,不同物种的酶带数4~9条,其中甜荞有6条带,而苦荞为9条。酶带及聚类分析表明:大粒组荞麦种的谱带与细野荞(*F. gracilipes*)等小粒组荞麦种间差异极大,甜荞(*F. esculentum*)和苦荞(*F. tataricum*)酶带分别与大野荞(*F. megaspartanium*)和毛野荞(*F. pilus*)相似,并分别与大野荞和毛野荞聚类最近,支持Chen(1999)提出的大野荞和毛野荞可能分别是甜荞和苦荞的祖先种的假说。

关键词: 甜荞; 苦荞; 野荞; 过氧化物酶同工酶; 系统关系

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2008)02-0213-05

Peroxidase Isozyme of Young Leaves of Genus *Fagopyrum* Plants at Three-leaf Stage

ZHANG Yi-Zhong^{1,2}, CHEN Qing-Fu^{1*}

(1. Institute of Plant Genetics and Breeding, School of Biological Technology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Department of Environment and Life Science, Bijie College, Bijie, Guizhou 551700, China)

Abstract: The peroxidase isozyme of twenty-eight accessions of cultivated and wild buckwheat belonging to eight species of genus *Fagopyrum* including seven species of the big-achene group and one species of the small-achene group were studied by means of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that there are a total of twenty-three bands of peroxidase isozyme, and the variation of band number from four to nine among different buckwheat species. *F. esculentum* and *F. tataricum* have a total of six bands and nine bands, respectively. The results about the zymograph and the clustering showed that there are much great difference of zymographs between the big-achene group and the small-achene group and that *F. megaspartanium* and *F. pilus* are close to *F. esculentum* and *F. tataricum*, respectively, supporting Chen's hypothesis that *F. megaspartanium* and *F. pilus* may be the ancestor species of *F. esculentum* and *F. tataricum*, respectively.

Key words: Common buckwheat; Tartary buckwheat; Wild buckwheat; Peroxidase isozyme; Phylogeny

荞麦营养丰富、全面,又具有较高的药用、保健价值,在国际市场上销售很好,对荞麦的研究和开发越来越受到人们的重视。

荞麦属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*)^[1~5]。到目前为止,荞麦属约有16个种。其中大粒组含7个种,即*F. esculentum* Moench、*F. tataricum* (L.) Gaertn.、*F. zuogongense* Q. F. Chen、*F. megaspartanium* Q. F. Chen、*F. pilus* Q. F. Chen、*F. cymosum* Meissn 和*F. giganteum* Krot.^[6]。小粒组包括9个种,即*F. gracilipes* (Hemsl.) Dammer ex Diels、*F.*

leptopodium (Diels) Hedberg、*F. statice* Gross、*F. capillatum* Ohnishi、*F. callianthum* Ohnishi、*F. gilesii* (Hemsl.) Hedberg、*F. pleioramosum* Ohnishi、*F. lineare* (Sam.) Haraldsom 和*F. urophyllum* Gross。荞麦属这两个组间遗传差异很大^[7~9]。

酶是基因表达的产物,同工酶谱的差异能够很好地衡量种间的亲缘关系,也可揭示种间、种内在进化过程中的变异程度。对荞麦同工酶的研究不仅有助于荞麦的分类鉴定,而且对荞麦遗传、育种、生化等方面的研究具有一定的指导意义。

收稿日期:2007-08-10,修回日期:2007-09-19。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270852, 30471116);教育部新世纪人才支持计划项目(NECT2004-0931);国家“十一·五”科技支撑计划项目(2006BAD02B06)。

作者简介:张以忠(1977-),男,硕士,讲师,从事生物学教学和荞麦科研工作。

* 通讯作者:(E-mail:cqfl1966@163.com)。

目前,国内外有关荞麦过氧化物酶同工酶的研究报道极少,而且所研究的材料较为局限。主要有高洪君等^[10]对甜荞几个收集系以及赵钢等^[11]对3个荞麦种(甜荞、苦荞、金荞)的过氧化物酶同工酶做过初步分析。本研究比较和分析了荞麦属所有大粒组种类和部分小粒组种类的过氧化物酶同工酶,以期为荞麦属种间系统关系、栽培荞麦起源与演化、

荞麦遗传育种及开发利用等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的8个种28份荞麦材料来源于贵州师范大学植物遗传育种研究所,其编号、种名、倍性、原产地、代号等见表1。所有研究都在该研究所完成。

表1 供试荞麦材料
Table 1 Buckwheat materials used in this study

种名 Species name	编号 Accession	倍性 Ploidy	果实 Achene	类型 Type	原产 Native to	代号 Symbol
甜荞 <i>Fagopyrum esculentum</i>	ES2004102902	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州黔西 Qianxi, Guizhou	ES2
	ES200410201	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	ES3
	ES2004091702	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州水城 Shuicheng, Guizhou	ES4
	ES2004091703	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州遵义 Zunyi, Guizhou	ES5
	ES2004091701	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州道真 Daozhen, Guizhou	ES6
	ES2004010401	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州兴仁 Xingren, Guizhou	ES8
	ES2004030101	2x	大 Big	栽培 Cultivated	四川凉山 Liangshan, Sichuan	ES9
	ES2004102901	2x	大 Big	栽培 Cultivated	湖南武冈 Wugang, Hunan	ES10
	ES2004062001	2x	大 Big	栽培 Cultivated	德国 Germany	ES11
	ES2004082201	2x	大 Big	栽培 Cultivated	捷克 Czechic	ES12
	TA2003120102	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	TA2
	TA2001112202	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	TA4
苦荞 <i>F. tataricum</i>	TA2004041507	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	TA5
	TA2004041503	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	TA6
	TA2004081103	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	TA7
	TA2001112203	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州威宁 Weining, Guizhou	TA8
	TA2004100102	2x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州水城 Shuicheng, Guizhou	TA9
	TA1998100101	4x	大 Big	栽培 Cultivated	贵州沿河 Yanhe, Guizhou	TA11
	TA2004081101	2x	大 Big	栽培 Cultivated	四川九江 Jiujiang, Sichuan	TA12
	TA2004102902	2x	大 Big	栽培 Cultivated	湖南武冈 Wugang, Hunan	TA14
	TA2003100801	2x	大 Big	栽培 Cultivated	山西大同 Datong, Shanxi	TA15
野甜荞 <i>F. esculentum</i> var. <i>homotropicum</i>	HO2004101901	2x	大 Big	野生 Wild	云南 Yunnan	HO1
金荞 <i>F. cymosum</i>	CY2002062501	4x	大 Big	野生 Wild	云南 Yunnan	CY1
佐贡野荞 <i>F. zuogongense</i>	ZU2003070101	4x	大 Big	野生 Wild	西藏 Tibet	ZU1
毛野荞 <i>F. pilus</i>	PI2004120101	2x	大 Big	野生 Wild	西藏 Tibet	PI1
大野荞 <i>F. megaspartanium</i>	ME2003101201	2x	大 Big	野生 Wild	贵州 Guizhou	ME4
巨荞麦 <i>F. giganteum</i>	GI2003080101	2x	大 Big	野生 Wild	人工合成 Man-made	GI2
细野荞 <i>F. gracilipes</i>	GR2004100701	4x	小 Small	野生 Wild	云南 Yunnan	GR1

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 将荞麦播种到生长室花盆内, 取第三真叶完全展开时的幼叶。先用自来水冲洗, 再用双蒸水冲洗, 用干净滤纸吸干表面水分。称取该荞麦幼叶材料 0.5 g, 加 0.8 mL 双蒸水、0.96 g 聚乙烯基吡咯烷酮和 0.5 g 石英砂, 冰浴研磨至匀浆。4℃下 4000 r/min 离心 20 min, 上清液为实验样品。

1.2.2 制胶及电泳 采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶技术, 分离胶浓度为 8.5% (pH 8.9), 浓缩胶浓度为 5.16% (pH 6.3), 胶板为 20 cm × 12.5 cm × 0.23 cm, 每槽加样约 50 μL, 上槽加 1 滴 2% 溴酚蓝, 4℃冰箱中进行电泳, 起始电压 100 V, 2 h 后调到 200 V, 待溴酚蓝指示线移至距胶底 0.2 cm 时, 终止电泳。

1.2.3 染色及记录 过氧化物酶同工酶的染色与固定, 参考胡能书等^[12]的方法, 并稍加改动。具体方法为: 在 75 mL 双蒸水中分别加入 0.1 g 联苯胺、5 mL 无水乙醇、10 mL 1.5 mol/L 乙酸钠和 10 mL 1.5 mol/L 乙酸, 让其充分溶解并过滤待用。电泳完毕, 凝胶经双蒸水冲洗 3 次后, 在染液中加入 7 滴 H₂O₂, 迅速摇匀后倒在凝胶上, 片刻就显示出酶带, 待酶带完全出现后, 倒出染色液, 用自来水冲洗, 拍照后放入 7% 的乙酸中保存。

1.3 数据分析方法

本研究采用系统聚类法, 首先将各样本看成一类, 有酶带数计为 1, 无酶带计为 0, 使用 SPSS 11.1 分析软件, 利用欧氏距离计算样品间距离, 用最短距离法计算类群间距离, 按系统聚类分析方法对收集系进行聚类分析。

2 结果与分析

8 个种 28 份荞麦材料植株三叶期幼叶的过氧化物酶同工酶电泳结果见图 1。从图 1 中共发现过氧化物酶同工酶谱带 23 条。不同物种酶带数 4 到 9 条。根据谱带的分布, 可分为 4 个区(见图 1:3B): a 区(POD:1~5), b 区(POD:6~12), c 区(POD:13~18), d 区(POD:19~23)。

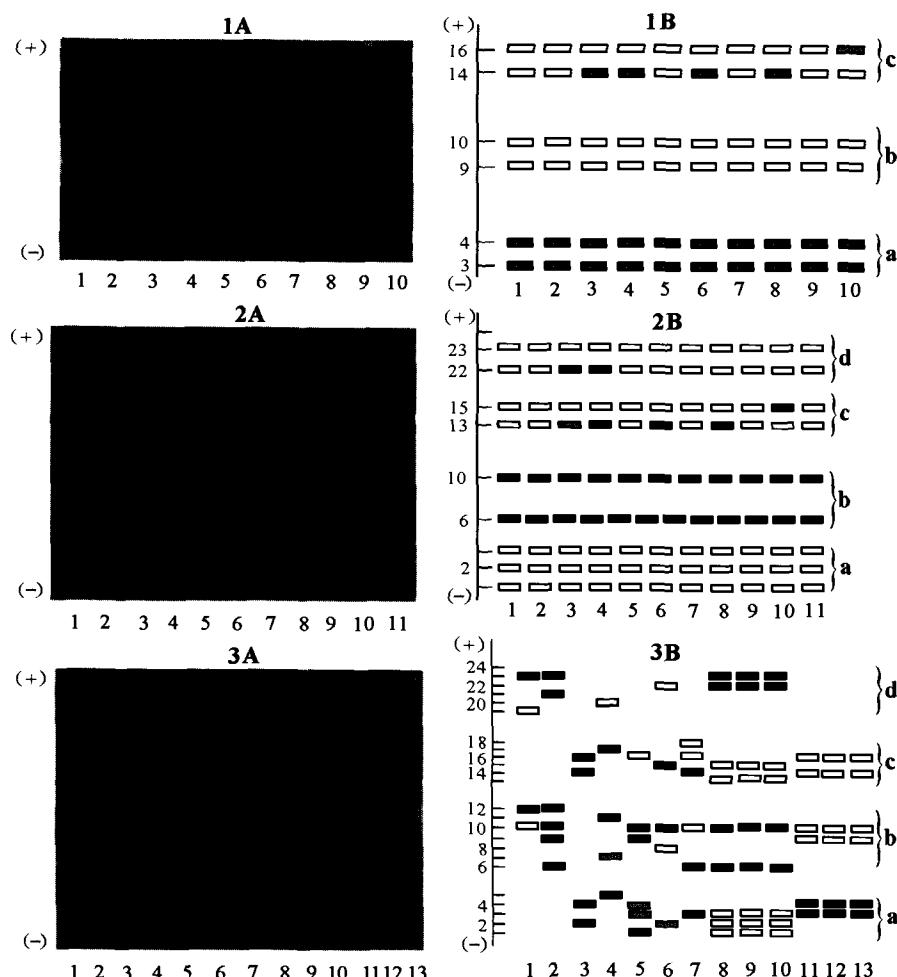
甜荞(见图 1:1A、1B), 共 6 条带(POD:3、4、9、10、14、16), 不同收集系间无变异。苦荞(见图 1:2A、2B), 共 9 条带(POD:1、2、3、6、10、13、15、22、23), 不同收集系间也无变异。佐贡野荞(ZU1)(见图 1:3A、3B), 共 6 条带(POD:3、6、10、14、16、18), 其中 3 条带(POD:3、6、14)较深为主带, 其余带很

浅。毛野荞(PI1)(见图 1:3A、3B), 共 5 条带(POD:2、8、10、15、22), 其中 3 条带(POD:2、10、15)较深为主带, 其余各带均很浅。巨荞麦(GI2)(见图 1:3A、3B), 共 6 条带(POD:6、9、10、12、21、23), 其中 4 条带(POD:10、12、21、23)很深为主带, 其余带较浅。大野荞(ME4)(见图 1:3A、3B), 共 6 条带(POD:1、3、4、9、10)较深为主带, 而 POD 16 带很浅。细野荞(GR1)(见图 1:3A、3B), 共 5 条带(POD:5、7、11、17、20), 其中 4 条带(POD:5、7、11、17)较深为主带, 1 条带(POD 20)很浅。野甜荞(HO1)(见图 1:3A、3B), 共 4 条带(POD:2、4、14、16), 其中 1 条带(POD:4)很深为主带, 其余各带较浅。金荞(CY1)(见图 1:3A、3B), 共 4 条带(POD:10、12、19、23), 其中 2 条带(POD:12、23)为主带, 其余带很浅。

以上 9 种荞麦, 根据酶带在 c 区和 d 区中的分布情况可分为 4 种类型。类型 1:c 区无带, d 区有带 POD 23, 包括 *F. cymosum* (CY1)、*F. giganteum* (GI2)。类型 2:c 区有带 POD 16, d 区无带, 包括甜荞、*F. megaspartanium* (ME4)、*F. esculentum* var. *homotropicum* (HO1)、*F. zuogongense* (ZU1)。类型 3:c 区有带 POD 15, d 区有带 POD 22, 包括苦荞、*F. pilus* (PI1)。类型 4:c 区有独特带 POD 17, d 区有独特带 POD 20, 仅有 *F. gracilipes* (GR1)。

从以上分析可以看出: 甜荞、*F. megaspartanium*、*F. esculentum* var. *homotropicum*、*F. zuogongense* 有一定的亲缘关系。苦荞、*F. pilus* 亲缘关系较近。*F. cymosum* (CY1) 和 *F. giganteum* (GI2) 具有相似谱带, 暗示有一定亲缘关系。*F. gracilipes* 有独特带 POD 17 和 POD 20, 独立成为一种类型, 暗示与其它荞麦亲缘关系很远。

运用欧氏距离, 对上述 9 种荞麦进行系统聚类, 结果见图 2。聚类图显示 9 种荞麦的关系。T = 16 时, 9 种荞麦明显聚成 4 类, 其中甜荞、*F. megaspartanium*、*F. esculentum* var. *homotropicum* 和 *F. zuogongense* 提前聚为一类, 暗示有一定的亲缘关系。*F. cymosum* 和 *F. giganteum*、苦荞和 *F. pilus* 分别提前聚类, 暗示各自有一定的亲缘关系。当 T = 19 时, 9 种荞麦明显分成 2 种类群。类群 1 包括大粒组的甜荞、*F. megaspartanium*、*F. esculentum* var. *homotropicum*、*F. zuogongense*、苦荞、*F. pilus*、*F. giganteum*、*F. cymosum*, 类群 2 为小粒组的 *F. gracilipes*, 暗示荞麦两个组间的亲缘关系很远。

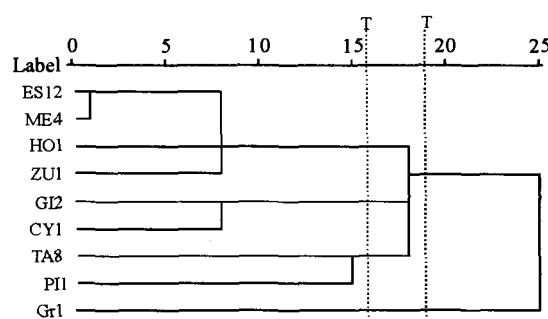


■表示很深带; ■■表示深带; □表示浅带。1A,1B:甜荞过氧化物酶同工酶图(1A)及模式图(1B)。样品1~10分别是ES2、ES3、ES4、ES5、ES6、ES8、ES9、ES10、ES11、ES12;2A,2B:苦荞过氧化物酶同工酶图(2A)及模式图(2B)。样品1~11分别是TA2、TA4、TA5、TA6、TA7、TA8、TA9、TA11、TA12、TA14、TA15;3A,3B:荞麦过氧化物酶同工酶图(3A)及模式图(3B)。样品1~13分别是CY1、G12、HO1、GR1、ME4、PI1、ZU1、TA8、TA2、TA7、ES9、ES12、ES2。

Dark, light, and empty rectangles are stand for very dark, dark, and light bands, respectively. 1A, 1B: Peroxidase isozyme zymographs (1A) and ideograms (1B) of *F. esculentum*. Sample 1~10 are ES2, ES3, ES4, ES5, ES6, ES8, ES9, ES10, ES11, and ES12, respectively; 2A, 2B: Peroxidase isozyme zymographs (2A) and ideograms (2B) of *F. tataricum*. Sample 1~11 are TA2, TA4, TA5, TA6, TA7, TA8, TA9, TA11, TA12, TA14, and TA15, respectively; 3A, 3B: Peroxidase isozyme zymographs (3A) and ideograms (3B) of buckwheat. Sample 1~13 are CY1, G12, HO1, GR1, ME4, PI1, ZU1, TA8, TA2, TA7, ES9, ES12, and ES2, respectively.

图1 荞麦属植物三叶期幼叶过氧化物酶同工酶图(A)及模式图(B)

Fig. 1 Peroxidase Isozyme zymographs (A) and ideograms (B) of buckwheat young leaves at three leaf stage



图中各代号代表的种名见表1

The symbols of accessions in the figure see Table 1

图2 荞麦过氧化物酶同工酶聚类图
Fig. 2 Clustering of peroxidase isozyme zymographs of buckwheat

3 讨论

目前,国内外有关荞麦过氧化物酶同工酶的研究报道极少。高洪君等^[10]利用荞麦的茎叶为材料,研究了6个甜荞收集系的过氧化物酶同工酶,共发现9条酶带,美国甜荞与中国甜荞酶带差异很大,他认为美国甜荞与中国甜荞的地理起源和亲缘关系较远。赵钢等^[11]对甜荞、苦荞和金荞进行了子叶期过氧化物酶同工酶研究,共发现7条带,其中甜荞有4条带,而苦荞和金荞均有6条带,他认为甜荞和苦荞可能由金荞(*F. cymosum* complex)进化而来。本研究首次对荞麦属所有大粒组种类和部分小粒组种类

三叶期幼叶的过氧化物酶同工酶进行了研究,发现过氧化物酶同工酶带数共23条,其中甜荞有6条带,而苦荞有9条带。它们的谱带数及其分布与上述报道有一定差异,其原因可能是本研究与上述研究的材料不同、方法有差异,而且生育期也不一样等。相比之下,三叶期幼叶过氧化物酶比其它时期更能反映种间差异。无论是甜荞还是苦荞,在本研究中不同收集系间变异很小,这与酯酶、谷草转氨酶等同工酶的研究结果相似^[7-9]。本研究还发现大粒组荞麦谱带与小粒组荞麦(细野荞)谱带差异极大,暗示这两类荞麦之间可能存在很大的差异。Chen(1999a,b,2001)和Chen et al(2004)^[3,7-9]对很多不同类型荞麦进行了形态学、分类学、细胞学、酯酶同工酶、谷草转氨酶、繁殖生物学、种间可杂交性等研究,将金荞复合物(*F. cymosum* complex,都是多年生的野生荞麦)剖分为二倍体大野荞(分布广泛)、二倍体毛野荞(目前发现仅分布于西藏)、异源四倍体金荞(分布于云南、四川、贵州等地)3个不同的生物学物种,并提出甜荞在云贵川及西藏较温暖地区起源于大野荞,苦荞在青藏高原东部较冷凉地区起源于毛野荞的新假说。该假说在国际上首次清楚地阐明了荞麦属两个主要栽培种类(甜荞和苦荞)起源祖先种和起源地问题,也暗示荞麦属分类学研究取得了重大突破。本研究发现大野荞和毛野荞三叶期过氧化物酶的谱带分别与甜荞和苦荞相似,而且在聚类树上分别与甜荞和苦荞聚类最近,支持了Chen(1999)的假说,为栽培荞麦起源研究提供了新的证据。

参考文献:

[1] 吴征镒.西藏植物志(第1卷)[M].北京:科学出版社,1983.

604~605.

- [2] 陈庆富.五个中国荞麦(*Fagopyrum*)种的核型分析[J].广西植物,2001,21(2):107~110.
- [3] Chen Q F. Discussion on the origin of cultivated buckwheat in genus *Fagopyrum* (Polygonaceae) [A]. The 8th Internl. Buckwheat Symposium in Korea. Advances in Buckwheat Research [C]. 2001. 206~213.
- [4] Wang L, Li Y Y, Cai G H, Zhang Z, Wang Z H. Prokaryotic expression and immunological identification of tartary buckwheat allergenic protein (TBA) [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(4):308~312.
- [5] Wang J S, Chai Y, Zhao X T, Ji W Q. Karyotype analysis of Chinese buckwheat cultivars [J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2005, 25(6):1114~1117.
- [6] Lee B S, Ujihara A, Minami M, Hirose T. Breeding of in-terspecific hybrids in genus *Fagopyrum* 4. Production of interspecific hybrid ovules culture among *F. esculentum*, *F. tataricum* and *F. cymosum* [J]. Breeding Science, 1994, 44:183.
- [7] Chen Q F. A study of resources of *Fagopyrum* (Polygonaceae) native to China [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1999a, 130:53~64.
- [8] Chen Q F. Hybridization between *Fagopyrum* (Polygonaceae) species native to China [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1999b, 131:177~185.
- [9] Chen Q F. A study of isozyme and interspecific hybridization on big-achene group of buckwheat specis (*Fagopyrum*, Polygonaceae) [J]. Crop Sciences, 2004, 44:1511~1518.
- [10] 高洪君,侯旭光,李丹.六种荞麦过氧化物酶同工酶研究初报[J].哲里木畜牧学院学报,1994,4(2):53~56.
- [11] 赵钢,唐宇.荞麦过氧化物酶同工酶研究[J].荞麦动态,1990(2):10~15.
- [12] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985. 70~74