

# 普通荞麦生物技术研究进展

吴婕, 韩丹, 陈建欣

(吉林工商学院, 吉林 长春 130507)

**摘要:** 阐述国内外普通荞麦生物技术研究现状, 包括普通荞麦的起源及其祖先种, 普通荞麦的遗传多样性, 普通荞麦遗传图谱构建, 遗传转化的研究, 普通荞麦的基因克隆研究, 以及荞麦的生物技术育种。

**关键词:** 普通荞麦; 生物技术; 遗传图谱; 起源; 遗传多样性

## Advances in Biotechnology Research Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)

WU Jie, HAN Dan, CHEN Jian-xin

(Jilin Business and Technology Collgeg, Changchun 130507, Jilin, China)

**Abstract:** This paper describes the current research buckwheat biotechnology, including the origin of its ancestral species buckwheat, buckwheat genetic diversity, buckwheat genetic mapping, genetic transformation of research, cloning buckwheat research, as well as buckwheat biotechnology and breeding.

**Key words:** buckwheat; biotechnology; genetic mapping; genetic diversity; origin

荞麦属于蓼科荞麦属, 约有 15 个自然物种, 其中有两种为栽培种, 是普通荞麦(又叫甜荞)和苦荞, 其余都是野生种。我国北方地区主要种植甜荞, 西南地区主要种植苦荞。随着对荞麦的研究深入, 发现荞麦具有很高的营养价值和药用价值, 国内外开始加强对荞麦的研究和开发。国内外学者均认为中国是荞麦的起源中心, 物种资源丰富, 而且我国是荞麦生产大国, 种植面积和产量居世界第二位。但是我国对于荞麦的生物技术研究及应用起步较晚, 而且基础薄弱, 所以研究进展缓慢, 目前大部分的研究工作集中在对荞麦的遗传多样性及亲缘关系等的研究。本文主要是从分子水平和细胞水平对普通荞麦生物技术的应用和研究进展加以总结, 希望给普通荞麦的研究工作者提供参考, 培育出高产量及高质量的新品种, 发展荞麦产业, 带动我国经济发展。

### 1 普通荞麦的起源及其祖先种

关于荞麦的起源地, 国内外学者都认为中国是荞麦的起源地, 但是, 至于荞麦起源于中国哪个地区, 普通荞麦(甜荞)和苦荞是不是起源于同一个地方, 目前

还没有结论<sup>[1]</sup>。目前关于普通荞麦的起源地有几种说法, 早在 1960 年, Nakao 提出栽培荞麦应起源于紧靠喜马拉雅山脉的中国西南地区, 由于那里荞麦属野生种类分布的数目较多, 范围较广, 有的还形成了群落<sup>[2]</sup>。1992 年 Li 和 Yang 在中国云南发现了野生普通荞麦<sup>[3]</sup>。2001 年 Ohnishi 根据普通荞麦在南唐江峡谷及金沙江峡谷的栽培史的研究结果, 认为西藏东部可能是普通荞麦起源的一个地方<sup>[4]</sup>。但是同年陈庆富从普通荞麦形态学、生殖生物学、分类学、同工酶、细胞学、种间可杂交性等方面进行研究分析, 认为: 普通荞麦起源于中国西南地区如云南和四川等地<sup>[5]</sup>。

关于栽培荞麦的祖先种问题一直以来始终存在很多争议, 一般认为金荞(*F.cymosum* complex)是栽培荞麦的祖先种。迄今为止, 证据最充分的假说是: 1999 年 Chen 通过形态学、同工酶、染色体核型、与普通荞麦可杂交性等方面的研究得出的结论, 毛野荞可能是栽培苦荞的祖先种, 大野荞可能是栽培甜荞的祖先种<sup>[6]</sup>。在 2008 年张以忠等<sup>[7]</sup>用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对 33 份荞麦的谷草转氨酶同工酶进行了研究, 结果发现: 谷草转氨酶同工酶带共 14 条, 甜荞和苦荞酶带分别与 *F.megaspartanium* (大野荞) 和 *F.pilus* (毛野荞) 相似, 并分别与 *F.megaspartanium* 和 *F.pilus* 聚类最近, 暗示 *F.megaspartanium* 可能是甜荞的祖先种, *F.*

基金项目: 吉林省教育厅十二五项目(2014443)

作者简介: 吴婕(1965—), 女(汉), 副研究员, 研究生, 研究方向: 食品科学。

*pilus* 可能是苦荞的祖先种。2009年任翠娟等<sup>[8]</sup>对荞麦属 (*Fagopyrum*) 11个种共50份栽培及野生荞麦资源进行 RAPD(随机扩增多态性 DNA 标记)分析研究,结果表明大野荞是甜荞在 RAPD 水平上较近缘,毛野荞与苦荞在 RAPD 水平上较近缘,进一步支持大野荞和毛野荞分别与甜荞和苦荞祖先种的假说。随着分子生物学技术的快速发展,2013年盛茂银采用双色荧光原位杂交技术<sup>[9]</sup>,对栽培荞麦甜荞和苦荞有丝分裂中期染色体上的 45S 和 5S rDNA 基因物理位置进行了定位分析,结果显示二者起源上关系较远。总之,迄今为止栽培甜荞和栽培苦荞具体起源于中国哪里,甜荞和苦荞是否具有相同祖先种以及其祖先种到底是什么种类等学者们关注的焦点问题还有待深入的研究。

## 2 普通荞麦的遗传多样性

随着科学技术的发展,国内外研究人员利用染色体核型分析、等位酶技术、生化标记和分子标记等技术对普通荞麦的遗传多样性及其亲缘关系等开展了大量研究,并取得了很大研究进展。

在细胞学上,2000年张宏志等<sup>[10]</sup>从细胞学的角度对小红花、日本甜荞、山西甜荞和威宁苦荞进行了染色体核型分析。2001年陈庆富用去壁低渗法对甜荞、苦荞、左贡野荞、大野荞及毛野荞的茎尖有丝分裂染色体的核型进行了比较分析,结果表明:这5种荞麦在核型上类似,都有2对随体染色体,而且都为对称核型,但它们彼此有一定的差异<sup>[11]</sup>。2005年王健胜等<sup>[12]</sup>通过对中国10个甜荞品种和7个苦荞品种进行染色体核型分析,发现17个品种染色体结构的种间差异比较明显,种内差异较小。2007年王甜<sup>[13]</sup>利用染色体核型分析和荧光原位杂交技术对普通荞麦(甜荞)和其25个三体系列的染色体进行了研究。随着对等位酶和同工酶的研究的深入,很多研究人员利用这些技术研究荞麦资源的遗传多样性。1999年 Ohnishi 等<sup>[14]</sup>对19个来自中国四川和云南的野生荞麦天然居群进行了等位酶技术分析,发现每个居群的亲缘关系与它的地理分布显著相关。

从2008年到2011年张以忠用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对荞麦属甜荞、苦荞、野生荞麦、三叶期幼叶、过氧化物酶同工酶、谷草转氨酶同工酶、淀粉酶同工酶、盛花期幼叶酯酶同工酶进行了酶带及聚类分析研究,子叶期幼叶的过氧化物酶同工酶。

近几年,张以忠等<sup>[15-16]</sup>利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对毕节地区栽培荞麦24个收集系的酯酶同工酶和23个收集系的过氧化物酶同工酶进行了研究,发现

供试荞麦在种间和种内均存在一定的差异,但种内差异均小于种间差异<sup>[15-26]</sup>。

随着分子生物学技术的飞速发展,分子标记技术为荞麦的遗传研究注入了新的活力。2003年樊冬丽<sup>[27]</sup>利用 RAPD 分子标记技术对来自山西各地的58份甜荞品种进行遗传多样性研究,结果发现,甜荞成对品种的遗传相似系数变化在0.633到1.000之间,供试甜荞的遗传分化程度较小。2004年王莉花等<sup>[28]</sup>利用筛选出的19个随机引物对云南荞麦资源的26份材料进行 RAPD 分析,表明云南荞麦资源种间比种内具有更丰富的多样性。2005年 Iwata 等<sup>[29]</sup>应用卫星标记对19个日本甜荞品种进行遗传多样性分析,揭示甜荞品种内和品种间的遗传多样性。2006年赵丽娟等<sup>[30]</sup>利用 ISSR(简单序列重复区间扩增多态性)和 AFLP(扩增片段长度多态性)两种标记对91份甜荞和79份苦荞进行分析,表明 ISSR 和 AFLP 两种标记适合荞麦的遗传多样性分析,并且建立了的 ISSR 技术体系。2009年任翠娟等<sup>[8]</sup>对荞麦属50份栽培及野生荞麦资源进行 RAPD 研究,初步建立了荞麦属不同物种的 RAPD 指纹图谱。2011年邓琳琼等<sup>[31]</sup>对甜荞和苦荞品种遗传多样性进行 RAPD 分析。2013年田晓庆等<sup>[32]</sup>利用筛选出的17对 SSR(简单重复序列)引物对来自我国12个省的荞麦栽培品种的遗传多样性进行了研究。

## 3 甜荞遗传图谱构建

国内外应用 DNA 分子标记技术对荞麦进行研究的相关报道,主要集中在荞麦属植物资源的起源、传播、演化、多样性和系统关系等领域。随着更多分子技术在荞麦研究的应用,关于荞麦遗传图谱构建的方面的研究也有一些报道。Yasuo 等以花柱同型、自交亲和的 *F. homotropicum*(远缘杂种)和花柱异型、自交不亲和的 *F. esculentum*(甜荞)之间进行杂交产生的 F<sub>2</sub> 代分离群体为研究对象,利用 AFLP 标记引物分别构建了普通荞麦和它的野生近缘种的 AFLP 遗传连锁图谱,还在 AFLP 遗传图谱上整合了花柱同长、落粒性和瘦果棱型3个形态学标记。任翠娟利用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术,对50份栽培及野生荞麦资源进行了研究,初步建立了荞麦属种类的 RAPD 指纹图谱,为荞麦属种类鉴别和遗传图谱建立提供依据。任翠娟等<sup>[8]</sup>对荞麦属(*Fagopyrum*)11个种共50份栽培及野生荞麦资源进行 RAPD 研究,初步建立了荞麦属不同物种的 RAPD 指纹图谱。潘守举对普通荞麦、*F. esculentum* var. *homotropicum* 及其杂交所建立的238株 F<sub>2</sub> 代分离群体进行了 RAPD 与 STS(序列标志位点)

标记分析,构建遗传标记连锁图谱。邓琳琼等对甜荞和苦荞品种遗传多样性进行 RAPD 分析,初步建立了 19 个荞麦品种的 RAPD 指纹图谱。

#### 4 遗传转化的研究

随着生物技术的发展,研究人员开始利用细胞工程和基因工程方法培育荞麦新品种。目前,植物转基因技术主要包括农杆菌转化体系、基因枪、原生质体转化、硅碳纤维介导的转化等转化方法。但是在荞麦上应用的方法仅限于根瘤农杆菌介导的转化方法和基因枪法,而且比较成熟的转化方法是根瘤农杆菌介导的转化方法,基因枪法不是很成熟。

Jovanka 等利用农杆菌介导法遗传转化甜荞,并获得再生的转基因植株。Kojima 等利用穿刺法向甜荞苗顶端分生组织灌入农杆菌,经过筛选培育后,检测到 36%~70% T1 代植株被转化。金红等在 2000 年用发根农杆菌 A4 对荞麦的下胚轴和子叶进行离体转化,得到 Ri T-DNA 表达的发状根。在 2002 年用发根农杆菌 A4 对荞麦的下胚轴和子叶进行离体转化,均得到 Ri T-DNA 表达的发状根。陆小平等以荞麦幼苗的茎尖分生组织为受体材料,利用转座子 Tn5 将野生型农杆菌 T-DNA 中致瘤基因 *tms1* 敲除,在其毒性盒 *Vir* 的辅助下,将  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因导入荞麦幼苗中,转化效率达 90%。陈利红等通过农杆菌介导法将拟南芥液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白基因 *AtNHX1* 转入荞麦中,获得再生植株,转化频率为 4.17%。Kim 等通过使用农杆菌感染荞麦茎段外植体的荞麦转化方法,发现被转染的 20 株荞麦中,有 17 株转染成功。

还有一些研究是关于金荞和苦荞的遗传转化方法的研究,但是总的来说,与其它农作物品种的遗传操作研究相比,甜荞的遗传操作研究显得较为滞后,目前国际国内从事荞麦基因工程的相关研究还不多。而且关于荞麦遗传转化的研究大部分还处于起步阶段,主要原因是荞麦的组织培养比较困难,植株再生率低。在已报道的关于荞麦的遗传转化研究中,农杆菌感染法是荞麦遗传转化应用是比较成功的方法,但是转化频率不高。可见优化现有的农杆菌介导的荞麦转化体系,是提高荞麦转化效率的必由之路。

#### 5 荞麦的基因克隆研究

李玉英从荞麦根部、茎及叶片分别提取了 RNA,反转录成 cDNA,利用 RT-PCR(逆转录 PCR)和巢式 PCR 法扩增克隆,得到了甜荞麦蛋白酶抑制剂基因的部分核苷酸序列。张政等采用盐析、凝胶过滤和离子

交换层析等方法从甜荞中纯化出荞麦胰蛋白酶抑制剂,经活性鉴定该抑制剂属丝氨酸类蛋白酶抑制剂家族李玉英等采用 RT-PCR 和 RACE(cDNA 末端快速扩增技术)技术,以荞麦 cDNA 为模板,克隆得到了荞麦胰蛋白酶抑制剂基因及其表达谱分析。张艳等利用 PCR 技术以‘西农 9920’苦荞品种和‘西农 9976’甜荞品种为材料扩增,得到了查尔酮合成酶基因片段,对苦荞和甜荞的查尔酮合成酶基因的氨基酸序列进行分析。王晓娟等克隆了甜荞麦 16KD 过敏原蛋白的基因,并且成功构建了原核表达载体。李翠以荞麦总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 方法及 RACE 技术从荞麦中克隆出了  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 FtNHX,全长 2052bp, GeneBank 登录号为 GU984045。

刘晓宇等对甜荞麦过敏原的分子生物学开展研究。利用 RT-PCR 克隆甜荞麦 16 kDa 过敏原蛋白的全长基因,成功克隆了甜荞麦 16 kDa 过敏原蛋白的基因,且构建了其原核表达载体。该基因含有长度为 450 bp 的开放阅读框,编码 149 个氨基酸,在 GeneBank 登录号为 EU883600。郑亚迪对荞麦属植物的核基因 ITS 序列和 2 个叶绿体基因: *matK* 和 *psbA-trnH* 序列进行分析,重建荞麦属系统发育关系,探讨该属植物属内种间的系统发育关系。陈晴晴等通过对属于 8 个荞麦种和 1 个变种的 58 个收集系中的 BW10KD 过敏蛋白基因保守片段进行差异分析与系统进化关系研究,结果表明栽培甜荞与野甜荞亲缘关系近,其次与左贡野荞较近缘。石桃雄等利用 Misa 软件进行 SSR 位点扫描,对 19 个普通荞麦品系进行遗传多样性分析,结果在 2226 个独立基因中发现了 2666 个 SSR 位点。

#### 6 荞麦的生物技术育种

侯建华以甜荞麦的成熟胚,幼胚,下胚轴为外植体,建立其愈伤组织诱导体系;金红等利用荞麦无菌苗下胚轴切段在含不同激素配比的 MS 培养基上进行愈伤组织诱导,建立了荞麦离体诱导高频率再生植株的试验体系。陈发菊等利用荞麦无菌苗的幼茎和幼叶作外植体分别接种在 MS 补加不同激素组合的培养基上培养获得再生植株。王茅雁等利用甜荞麦子叶作为外植体,成功诱导愈伤组织。柴瑞娟等分别用荞麦自然苗和无菌苗的幼茎和幼叶作材料进行荞麦的组织培养条件探索,同时,还探讨了培养基中琼脂浓度对荞麦愈伤组织诱导的影响。王爱国以荞麦属 10 个种为材料,研究了其组织培养技术的体系、不同材料的愈伤组织诱导率、叶片及其愈伤组织的总黄酮含量以及二者之间的相关性,建立荞麦离体繁殖技术体系。

陈佳用荞麦无菌苗的子叶和胚轴为外植体诱导得到的愈伤组织来研究荞麦的分化再生,探索荞麦再生体系建立的技术路线。王鹏姬以荞麦无菌苗胚轴作为外植体诱导愈伤组织,研究了光照、蔗糖、L-苯丙氨酸和植物激素等因素对荞麦愈伤组织生长,对不同基因型荞麦的愈伤组织生长进行比较,探索荞麦愈伤组织生长的最佳培养条件。很多研究表明荞麦在愈伤组织分化方面能力较差,还需进一步提高其分化效率。在转基因操作中与农杆菌共培养、抗性筛选培养等方面还需进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] Wei Yi-Min. Buckwheat Production in China[J]. Current Advances in Buckwheat Research, 1995,7(10):8-10
- [2] 柴岩. 我国荞麦育种现状与新世纪展望[J]. 荞麦动态, 2001(1):1-4
- [3] Li Q, Yang M. Preliminary investigation on buckwheat origin in Yunnan, China. Proceedings of the 5th International Symposium on Buckwheat. Taiyuan, China. Beijing: Chinese Agricultural Publishing house, 1992,1(28):44-48
- [4] Suji K, Ohnishi. Phylogenetic relationships among wild and cultivated Tarrary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert.) population revealed by AFLP analyses[J]. Genes and Genetic Systems, 2001,76(b):47-52
- [5] 陈庆富. 五个中国荞麦种的核型分析[J]. 广西植物, 2011, 21(2): 107-110
- [6] Chen Qing-Fu. A study of resource of *Fagopyrum* (Polygonaceae) native to China[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1999 (130): 53-64
- [7] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属种质资源的谷草转氨酶同工酶研究[J]. 种子, 2008,27(5):39-43
- [8] 任翠娟, 陈庆富. 荞麦属(*Fagopyrum* Mill)植物资源的 RAPD 研究[J]. 种子, 2009,28(11):37-45
- [9] 盛茂银. 栽培荞麦 45S 和 5S rDNA 的染色体物理定位研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013,14(2):317-321
- [10] 张宏志, 管正学, 刘湘元, 等. 甜荞和苦荞染色体核型分析[J]. 内蒙古农业大学学报, 2000,21(1):69-74
- [11] 陈庆富. 五个中国荞麦种的核型分析[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 107-110
- [12] 王健胜, 柴岩, 赵喜特, 等. 中国荞麦栽培品种的核型比较分析[J]. 西北植物学报, 2005,25(6):1114-1117
- [13] 王甜. 普通荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)三体系的鉴定[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2007
- [14] Ohnishi O, Asano N. Genetic diversity of *Fagopyrum homotropicum*, a wild species related to common buckwheat[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1999,46(2):389-398
- [15] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属植物三叶期幼叶过氧化物酶同工酶研究[J]. 武汉植物学报, 2008,26(2):213-217
- [16] 张以忠, 陈庆富. 几种荞麦的过氧化物酶同工酶研究[J]. 种子, 2008, 27(1):17-19
- [17] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属种质资源发芽种子过氧化物酶同工酶研究[J]. 广西植物, 2008,26(4):553-557
- [18] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属植物三叶期幼叶酯酶同工酶研究[J]. 武汉植物学研究, 2008,26(4):428-432
- [19] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属种质资源的谷草转氨酶同工酶研究[J]. 种子, 2008,27(5):39-42,46
- [20] 张以忠, 周真燕, 邓琳琼, 等. 荞麦淀粉酶同工酶研究[J]. 种子, 2009,40(6):48-50
- [21] 张以忠, 陈庆富. 多年生野生荞麦植株盛花期幼叶的酯酶同工酶研究[J]. 种子, 2009,43(9):41-43,46
- [22] 张以忠, 李艳娟, 邓琳琼, 等. 荞麦过氧化物酶同工酶研究[J]. 种子, 2011,65(2):52-54,59
- [23] 张以忠, 张云, 邓琳琼, 等. 荞麦酯酶同工酶研究[J]. 种子, 2011,66(6):38-41
- [24] 张以忠, 陈庆富. 荞麦属种质资源发芽种子酯酶同工酶研究[J]. 广西植物, 2011,45(2):233-238
- [25] 张以忠, 邓琳琼, 游萍, 等. 荞麦子叶期幼叶过氧化物酶同工酶研究[J]. 贵州科学, 2011,56(3):35-39
- [26] 张以忠. 荞麦属种质资源的同工酶研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2005
- [27] 樊冬丽. 山西省荞麦品种资源的遗传多样性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2003
- [28] 王莉花, 殷富有, 刘继梅, 等. 利用 RAPD 分析云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系[J]. 分子植物育种, 2004,2(6):807-815
- [29] Iwata H, Imon K, Tsumura Y, et al. Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits[J]. Genome, 2005,48(3):367-377
- [30] 赵丽娟. 荞麦种质资源遗传多样性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006
- [31] 邓琳琼, 张奎, 黄凯丰, 等. 甜荞和苦荞品种遗传多样性的 RAPD 分析, 安徽农业科学, 2011,54(15):8895
- [32] 田晓庆, 徐宏亚, 汪灿, 等. 用 SSR 标记分析荞麦栽培种资源的遗传多样性. 作物杂志, 2013,33(5):28

收稿日期: 2015-10-08