

荞麦属种间 13S 球蛋白基因序列比较研究

梁成刚,陈晴晴,石桃雄,陈其皎,孟子烨,陈庆富

(贵州师范大学/荞麦产业技术研究中心,贵阳 550001)

摘要:荞麦 13S 球蛋白是荞麦种子中的一类主要贮藏蛋白。本研究选用荞麦属植物甜荞栽培种及其野生类型、苦荞栽培种及其野生类型、毛野荞、左贡野荞、细柄野荞和硬枝万年荞 6 个种共 44 份材料,进行 PCR 特异性扩增、测序得到荞麦 13S 球蛋白基因的保守片段序列。对序列进行差异分析,结果发现 44 份供试材料 13S 球蛋白基因片段的 285 个排列位点中不变位点为 24 个,多态性位点 S 为 261 个(含简约信息位点数 198 个和单型可变位点 63 个),序列总突变位点 Eta 为 503 个。野生甜荞种内 13S 球蛋白基因序列差异明显高于栽培甜荞,但野生苦荞种内 13S 球蛋白基因序列差异仅稍高于栽培苦荞。推测其一方面可能与繁殖方式有关,另一方面可能与荞麦驯化过程中通常只有少数野生型群体被驯化有关。系统聚类分析发现栽培甜荞与野甜荞亲缘关系近,与左贡野荞亲缘关系次之;栽培苦荞与野苦荞亲缘关系近,与毛野荞亲缘关系次之;细柄野荞和硬枝万年荞的 13S 蛋白基因片段序列差异较小,说明其亲缘关系较近。上述结果为荞麦属种间遗传多样性与进化关系研究提供了理论依据。

关键词:荞麦;13S 球蛋白基因;序列分析;系统关系

Sequence Analysis of 13S Globulin Gene of Genus *Fagopyrum* Species

LIANG Cheng-gang, CHEN Qing-qing, SHI Tao-xiong, CHEN Qi-jiao, MENG Zi-ye, CHEN Qing-fu

(Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University, Guiyang 550001)

Abstract: 13S globulin is one of the major storage proteins in buckwheat seeds. This study investigated the 13S globulin gene sequence by PCR specific amplification and sequencing using 6 species of genus *Fagopyrum*, a total of 44 collections including cultivated and wild species of *F. esculentum* and *F. tataricum*, *F. pilus*, *F. zuogongense*, *F. gracilipes*, *F. urophyllum*. Variance analysis of ultra-conserved segments of 13S globulin gene sequence indicated that a total of 285 arrangement sites were identified including 24 invariable (monomorphic) sites and 261 polymorphic (segregating) sites (198 parsimony informative sites and 63 singleton variable sites), and a total of 503 mutations on Eta site were isolated in the whole sequence. The intraspecific genetic diversity of 13S globulin gene sequence for the wild species of common buckwheat was obviously higher than that of the cultivated species of common buckwheat, and for the wild species of tartary buckwheat was slightly higher than that of the cultivated species of tartary buckwheat. These results implied that the distinct genetic diversity of 13S globulin gene sequence between *F. esculentum* and *F. tataricum* might be due to the fact that only a few wild type groups were domesticated during evolution as well as the different reproductive patterns. Cluster analysis indicated that the cultivated species of *F. esculentum* was closely clustered with its wild species, and further grouped with *F. zuogongense*, while the cultivated species of *F. tataricum* was closely clustered with its wild species, and further grouped with *F. pilus*. The highly ultra-conserved gene sequence of 13S globulin of *F. gracilipes* and *F. urophyllum* was identified, implying a close relationship between *F. gracilipes* and *F. urophyllum*. These results provide theoretical basis for the study of genetic diversity and evolutionary relationship of genus *Fagopyrum*.

收稿日期:2015-06-25 修回日期:2015-08-05 网络出版日期:2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160406.1125.018.html>

基金项目:国家燕麦荞麦现代农业产业技术体系专项资金(CARS-08-A4);国家自然科学基金项目(31471562,31171609);贵州省高层次创新型人才培养对象十百千计划(2014GZ97588);贵州省科技合作计划项目(黔科和LH[2015]7770号)

第一作者主要从事作物分子生理研究。E-mail: jessselcg@163.com

通信作者:陈庆富,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: cqf1966@163.com

Key words: *Fagopyrum*; 13S globulin gene; sequence analysis; phylogeny

荞麦 (*Buckwheat*) 属蓼科 (*Polygonaceae*) 荞麦属 (*Fagopyrum*), 是我国粮食作物中的小宗作物。与大宗作物水稻、小麦和玉米相比, 荞麦蛋白质含量较高, 且主要以清蛋白和球蛋白为主, 二者含量占总蛋白质的 50% 以上^[1]。荞麦种子贮藏蛋白中球蛋白主要为 25 ~ 28kD 和 32 ~ 43kD 亚基蛋白, 少部分为 57 ~ 58kD 亚基蛋白^[2]。另外, Z. H. Wang 等^[3]从苦荞中还纯化出一种与 IgE 结合活性较强的 22kD 的球蛋白, 称为 TB22。荞麦 13S 球蛋白是荞麦种子中的一类主要贮藏蛋白。M. K. Rout 等^[4]研究指出荞麦 13S 球蛋白中 26kD 亚基蛋白的营养组成均衡, 适宜人体吸收和利用。

植物种子蛋白是由多基因家族编码, 其编码序列和位点的差别往往会造成种子蛋白高级结构及其功能的差异。通过对编码基因序列的研究, 可以推断这些编码基因的进化关系, 为使用编码种子蛋白的基因序列研究系统演化提供了理论依据^[5]。同样, 荞麦种子储存蛋白也是由多基因家族编码。S. Bharali 等^[6]研究发现编码荞麦贮藏蛋白的 *FA02* 和 *FA18* 基因在种子发育过程中具有较高表达水平, *FA02* 基因的预测氨基酸序列与 BW24KD 氨基酸 N-末端结构域序列一致。荞麦 13S 球蛋白中 26kD 亚基的氨基酸序列与咖啡树 11S 球蛋白的相似度为 93%, 与南瓜 11S 球蛋白 β 亚基的相似度为 75%, 说明荞麦与咖啡树亲缘关系较近^[4]。W. Higuchi 等^[7]通过基因序列比较分析发现, 豆科的球蛋白基因与水稻谷蛋白基因序列同源性很高, 推测它们可能是由原始的单一区域进化而来。T. Jelena 等^[8]分离出荞麦种子中类豆球蛋白 13S 多肽的 cDNA 全长片段, 通过与双子叶植物、单子叶植物和裸子植物进行氨基酸序列比对发现, 荞麦 13S 多肽属于低等被子植物进化分枝中富含甲硫氨酸的豆球蛋白亚科。种子蛋白基因序列差异为研究不同物种间种子蛋白的多样性与物种的亲缘关系提供了更为精确的依据^[9]。因此, 本试验通过在 NCBI 数据库中查找荞麦 13S 球蛋白基因编码区保守区段, 设计特异性引物, 经 PCR 仪扩增、测序, 分析不同荞麦此基因序列的差异性, 以期对荞麦 13S 球蛋白的结构功能研究与荞麦属不同种的进化关系研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中国西南地区被认为是荞麦种类的分布中心和

多样性中心^[9]。本研究所用的 44 份材料由贵州师范学院荞麦产业技术研究中心提供 (表 1)。

1.2 种子蛋白基因序列的 PCR 扩增及测序

采用 CTAB 法提取荞麦嫩叶基因组 DNA, 具体操作步骤参考陈晴晴等^[10]方法。参照已发表的普通荞麦 13S 球蛋白基因的编码序列, 根据 blastn 结果, 利用 Primer5.0 在其保守区分别设计一对特异性引物 (SPF/SPR), 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。PCR 反应体系总体积为 60 μ L, 包含 $2 \times Taq$ PCR MasterMix 30.0 μ L, 5 μ mol/L 引物各 6.0 μ L, 40 ng/ μ L DNA 模板和 ddH₂O 9.0 μ L。扩增反应体系为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, T_m 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后由生工生物工程 (上海) 有限公司测序。

1.3 测序结果分析与进化树的构建

在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行在线比对, 分析基因序列的同源性, 然后使用 blastn 进行同源性分析。将序列对齐分值大于 150, 序列同一性大于 65% 的基因序列定义为高度同源^[11]。使用 ClustalW 进行多序列比对分析; 使用 DNAsp5 和 MEGA5.05 进行核酸序列差异分析。

根据荞麦种间 13S 球蛋白基因序列的变异特点, 选择荞麦类群内差异小、类群间差异大的位点, 对差异位点按 0-1 方法进行赋值。将变异位点某类群恒定碱基定义为 1, 其他为 0。如某位点某种群恒定为 A 的赋值为 1, 该位点其他种群均无 A 时赋值为 0, 部分为 A 时根据该位点为 A 的材料占该种群材料总数的比例赋值 0.1 ~ 0.9。通过对差异位点数据按分类群整理分析, 使用 SPSS16.0 软件衡量各材料之间的距离 (欧式平方距离), 采用类平均法进行系统聚类。

2 结果与分析

2.1 13S 球蛋白基因序列的 PCR 扩增

对 44 个供试材料进行 13S 球蛋白基因序列 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测发现在约 400bp 处产生特异性条带。图 1 为部分材料 13S 球蛋白基因的电泳图谱, 扩增条带与目标片段大小符合, 初步判定所扩增序列是 13S 球蛋白基因序列。

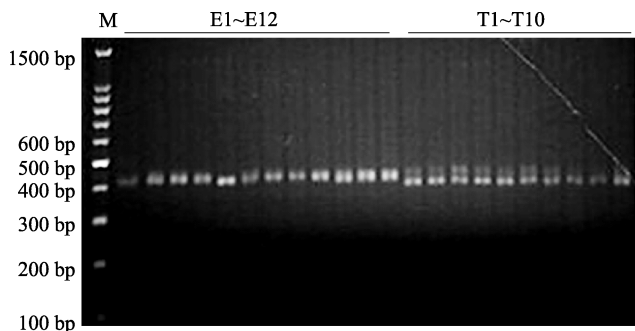
表 1 供试荞麦材料

Table 1 Buckwheat accessions used in this study

材料	种名	收集地	代号	材料	种名	收集地	代号
Accession	Species	Origin	Code	Accession	Species	Origin	Code
榆林甜荞	<i>F. esculentum</i>	陕西榆林	E1	高坂苦荞	<i>F. tataricum</i>	贵州贵阳	T10
甜自 21	<i>F. esculentum</i>	贵州贵阳	E2	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	西藏八宿	WT1
宁荞 1 号	<i>F. esculentum</i>	宁夏固原	E3	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	/	WT2
自花甜荞	<i>F. esculentum</i>	贵州贵阳	E4	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	/	WT3
赤甜 1 号	<i>F. esculentum</i>	内蒙古赤峰	E5	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	/	WT4
定甜 2 号	<i>F. esculentum</i>	甘肃定西	E6	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	/	WT5
平荞 2 号	<i>F. esculentum</i>	贵州贵阳	E7	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	西藏工布江达	WT6
信农 1 号	<i>F. esculentum</i>	宁夏	E8	野苦荞	<i>F. tataricum</i> ssp. <i>potanini</i>	西藏山南地区	WT7
威甜 1 号	<i>F. esculentum</i>	贵州威宁	E9	野甜荞	<i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	西藏芒康	WE1
大甜 1 号	<i>F. esculentum</i>	贵州贵阳	E10	野甜荞	<i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	云南德钦	WE2
综甜 1 号	<i>F. esculentum</i>	贵州贵阳	E11	野甜荞	<i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	四川泸定	WE3
信甜 2 号	<i>F. esculentum</i>	宁夏	E12	野甜荞	<i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	云南	WE4
丰甜 1 号	<i>F. esculentum</i>	贵州贵阳	E13	野甜荞	<i>F. esculentum</i> ssp. <i>ancestralis</i>	/	WE5
小米荞	<i>F. tataricum</i>	云南	T1	左贡野荞	<i>F. zuogongense</i>	西藏芒康	Z1
黑苦荞	<i>F. tataricum</i>	贵州威宁	T2	左贡野荞	<i>F. zuogongense</i>	西藏芒康	Z2
苦荞	<i>F. tataricum</i>	山西大同	T3	左贡野荞	<i>F. zuogongense</i>	云南香格里拉	Z3
黔苦 3 号	<i>F. tataricum</i>	贵州威宁	T4	左贡野荞	<i>F. zuogongense</i>	四川巴塘	Z4
黔苦 5 号	<i>F. tataricum</i>	贵州威宁	T5	细柄野荞	<i>F. gracilipes</i>	贵州贵阳	G
西荞 2 号	<i>F. tataricum</i>	四川西昌	T6	硬枝万年荞	<i>F. urophyllum</i>	云南昆明	U
晋荞 2 号	<i>F. tataricum</i>	山西	T7	毛野荞	<i>F. pilus</i>	西藏波密	P1
辽荞 75 号	<i>F. tataricum</i>	辽宁	T8	毛野荞	<i>F. pilus</i>	西藏林芝	P2
凤凰苦荞	<i>F. tataricum</i>	江西	T9	毛野荞	<i>F. pilus</i>	西藏工布江达	P3

“/”表示收集地不详

“/” represents that the origin is unknown



M:分子量标记;E1~12:甜荞系;T1~T10:苦荞系
M: DNA marker, E1-E12: Collections of common buckwheat,
T1-T10: Collections of tartary buckwheat

图 1 特异引物在部分材料中扩增结果
Fig. 1 Amplification products in partial samples
of buckwheat using specified primers

2.2 植物 13S 球蛋白基因的 DNA 序列同源性分析

Blastn 分析表明,44 个材料中扩增得到约 400 bp

的 13S 球蛋白核苷酸序列与已报道的普通荞麦 legumin-like 13S 贮藏蛋白基因序列片段(AY536050. 1 和 D87982. 1)的相似度达到 100%;与普通荞麦 13S 种子贮藏球蛋白(O23880. 1)和普通荞麦 legumin-like 13S 贮藏蛋白(AAS48513. 1)基因序列的相似度达到 95%;与苦荞过敏蛋白(ABI32184. 1)、13S 种子贮藏球蛋白 1(O23878. 1)、13S 种子贮藏球蛋白 3(Q9XFM4. 1)和普通荞麦豆球蛋白(AAO65485. 1)基因序列的相似性为 87%~89%。因此,推测经 PCR 扩增所得到的片段即为荞麦 13S 球蛋白基因序列。此外,荞麦 13S 球蛋白扩增片段核苷酸序列与燕麦属、无花果属、胡麻属、苋属、藜属、蓖麻属、巴西果、油棕、葡萄、猕猴桃球蛋白基因序列的相似度为 50%~70%,与拟南芥 12S 球蛋白基因序列的相似度为 41%~56%。

2.3 荞麦 13S 球蛋白基因的 DNA 序列组成及变异分析

DNA 序列组成分析结果表明,44 个荞麦材料的

13S 球蛋白基因序列相对碱基组成频率为 0.3517, 种间差别不大。其中,T(U) 含量为 25.3%,C 含量为 23.4%,A 含量为 25.1%,G 含量为 26.2%,A + T 含量为 50.4%。密码子第 1 位点 A + T 含量为 52.9%,第 2 位点 A + T 含量为 47.3%,第 3 位点的 A + T 含量为 51.2%。第 3 位点 T 的含量最低,平均为 19.0%,A 含量最高,平均为 32.2%。这表明密码子的碱基使用频率存在偏向性。总碱基转换颠换比率为 0.764,其中嘌呤为 1.753,嘧啶为 1.296。转换的发生以 A→G,G→A 为主(占 58%)。经多重序列比对(去掉共同引物区)分析得到序列长度为 387bp 的片段,除去 102 个插入缺失 gaps 位点,对其中的 285 个位点进行分析,结果显示总突变位点 Eta 为 503

个,单型不变位点为 24 个,多态性位点 S 为 261 个,其中简约信息位点为 198 个,单型可变位点为 63 个;单倍型 h 为 28,基因单倍型多样性比率 Hd 为 0.910;平均核苷酸变异数 K 为 56.909,核苷酸多态性 Pi 为 0.19968。所有供试材料间平均遗传距离为 0.2701,标准偏差为 0.0159。各群体内平均遗传距离分别为 0.0887 (*F. esculentum* ‘cv’)、0.1807 (*F. esculentum* ssp. *ancestralis*)、0.1186 (*F. tataricum* ‘cv’)、0.1314 (*F. tataricum* ssp. *potanini*)、0.4139 (*F. pilus*) 和 0.7877 (*F. zuogongense*)。左贡野荞与毛野荞种间遗传距离最大为 0.6477,细柄野荞与硬枝万年荞种间遗传距离为 0(表 2)。

表 2 基于 13S 球蛋白基因的种间平均遗传距离和种间平均净遗传距离

Table 2 Interspecific genetic distance and interspecific net genetic distance based on buckwheat 13S globulin gene sequence

材料 Material	E	G	P	T	U	WE	WT	Z
E		0.1548	0.0386	0.1550	0.1548	0.0037	0.1455	0.1077
G	0.1992		0.0057	0.0012	0.0000	0.1490	0.0013	0.1453
P	0.2899	0.2127		-0.0023	0.0057	0.0178	-0.0040	0.0469
T	0.2587	0.0605	0.2640		0.0012	0.1465	-0.0031	0.1342
U	0.1992	0.0000	0.2127	0.0605		0.1490	0.0013	0.1453
WE	0.1384	0.2393	0.3151	0.2962	0.2393		0.1415	0.1180
WT	0.2556	0.0670	0.2686	0.1219	0.0670	0.2975		0.1296
Z	0.5459	0.5392	0.6477	0.5874	0.5392	0.6022	0.5892	

E:甜荞;G:细柄野荞;P:毛野荞;T:苦荞;U:硬枝万年荞;WE:野甜荞;WT:野苦荞;Z:左贡野荞。上三角区为种间净遗传距离;下三角区为种间遗传距离

E:*F. esculentum*,G:*F. gracilipes*,P:*F. pilus*,T:*F. tataricum*,U:*F. urophyllum*,WE:Wild type of *F. esculentum*,WT:Wild type of *F. tataricum*,Z:*F. zuogongense*. Values of interspecific net genetic distance are shown in the upper triangle,while values of interspecific genetic distance are shown in the lower triangle

2.4 基于 13S 球蛋白基因序列差异的进化关系研究

依据荞麦属植物 13S 球蛋白基因序列种内变异小、种间变异大的 54 个恒定变异位点,以 0-1 方法进行赋值,采用类间平均法建立系统聚类图(图 2)。当 T=15 时,供试的 44 个材料被聚为 2 个类群,类群 I 包括栽培苦荞、野苦荞、细柄野荞、硬枝万年荞、毛野荞(P1 和 P2)以及左贡野荞(Z3 和 Z4);类群 II 包括甜荞、野甜荞、毛野荞(P3)以及左贡野荞(Z1 和 Z2)。本次聚类中供试材料 Z1、Z2 及 P3 与甜荞聚为一类,而 Z3、Z4 及 P1、P2 与苦荞聚为一类,暗示左贡野荞、毛野荞是有分化的;同为小粒组的细柄野荞、硬枝万年荞首先聚为一类,其次与苦荞类聚为一类。

对 44 个材料 13S 球蛋白基因序列所有差异位点数据按分类群重新整理数据后计算欧氏平方距

离,按类间平均法进行系统聚类分析(图 3)。当 T=15 时,6 种荞麦聚成 2 个类群,类群 I 包括细柄野荞、硬枝万年荞、毛野荞、苦荞栽培种和野生种;类群 II 包括左贡野荞、甜荞栽培种和野生种。栽培甜荞与野甜荞亲缘关系最近;栽培苦荞与野苦荞亲缘关系最近,其次与毛野荞亲缘关系较近;细柄野荞、硬枝万年荞基因序列彼此差异较小,暗示其亲缘关系近,其次与苦荞类亲缘关系较近。

3 讨论

3.1 荞麦 13S 球蛋白基因的序列分析

荞麦 13S 球蛋白是荞麦种子中一类主要的贮藏蛋白^[2]。通过 PCR 扩增、测序和 Blastn 分析发现供试荞麦材料的 13S 球蛋白核苷酸序列与已报道普通荞麦 legumin-like 13S 球蛋白基因序列片段(AY536050.1

聚类分析将硬枝万年荞与齿翅野荞、细柄野荞、小野荞麦和疏穗小野荞麦聚为一类。本研究通过对荞麦 13S 球蛋白基因序列差异分析发现细柄野荞和硬枝万年荞的 13S 球蛋白基因序列差异较小,种间遗传距离为 0,且被聚为一类,说明其亲缘较近。

3.3 基于 13S 球蛋白基因序列的荞麦种内进化关系分析

繁育系统对遗传变异及其分布具有重要影响,以异交为主的植物群间总变异仅为 15% 左右^[21-22]。王转花等^[23]对甜荞和苦荞的 EST 同工酶进行研究,结果发现苦荞的 EST 同工酶在种内存在明显的差异,在甜荞种内差异较小。赵佐成等^[24-25]通过等位酶电泳技术分析四川省、云南省 27 个县、市的苦荞及其近缘种共 8 种 1 变种 50 个居群,结果发现野生苦荞材料间的遗传多样性丰富,且明显高于栽培苦荞。同样,本研究利用 13S 球蛋白基因序列分析发现野生甜荞收集系间平均遗传距离为 0.1807,明显高于栽培甜荞的 0.0887;野生苦荞收集系间平均遗传距离为 0.1314,稍高于栽培苦荞的 0.1186。推测一方面的原因是授粉方式的不同导致收集系和品种的遗传差异产生影响,另一方面则是荞麦从野生型向栽培型驯化过程中通常只有少数野生型群体被驯化成栽培型,进而导致栽培型间遗传差异比野生型间遗传差异小。甜荞是典型的虫媒传粉异花授粉植物。在长期人工驯化与种植过程中,栽培甜荞间存在着广泛的天然杂交,异花授粉特性导致遗传变异被保存在品种群体内并使得栽培甜荞品种间遗传差异变小,加大了甜荞栽培型与野生型间的遗传差异。野生甜荞由于其分布区域各异,区域间并不存在广泛的杂交,可以在进化过程中保存其遗传多样性。由此导致甜荞野生型收集系间的遗传差异大大超过栽培甜荞品种间的遗传差异。苦荞是自花授粉植物,而自花授粉特性使得栽培苦荞品种间的遗传差异得以保持,单株选择进行育种的过程使遗传差异的个体被独立成品种,导致苦荞栽培品种间遗传差异加大,从而使得苦荞栽培型品种间遗传变异与野生型收集系间遗传变异的差异较接近。

参考文献

- [1] Maksimovic V R, Varkonji-Gasic E I, Radovic S R, et al. The biosynthesis of 13S buckwheat seed storage protein[J]. J Plant Physiol, 1995, 147(6): 759-761
- [2] Radovic S R, Maksimovic V R, Varkonji-Gasic E I. Characterization of buckwheat seed storage proteins[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(4): 972-974
- [3] Wang Z H, Zhang Z, Wieslander G, et al. Purification and some properties of the protein with 22 kD in tartary buckwheat[J]. Fagopyrum, 2000, 17: 441-444
- [4] Rout M K, Chungoo N K, Rao K S. Amino acid sequence of the basic subunit of 13S globulin of buckwheat[J]. Phytochemistry, 1997, 45(5): 865-867
- [5] Fujino K, Funatsuki H, Inada M, et al. Expression, cloning, and immunological analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seed storage proteins[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(4): 1825-1829
- [6] Bharali S, Chungoo N K. Amino acid sequence of the 26 kDa subunit of legumin-type seed storage protein of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): molecular characterization and phylogenetic analysis[J]. Phytochemistry, 2003, 63(1): 1-5
- [7] Higuchi W, Fukazawa C. A rice glutelin and a soybean glycinin have evolved from a common ancestral gene[J]. Gene, 1987, 55(2): 245-253
- [8] Jelena T, Samardzic A, Mira D, et al. Cloning and analysis of cDNA and gene coding for 13S storage polypeptide from buckwheat [C]//Faberova I, Dvoracek V, Cepkova P, et al. Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, Advances in Buckwheat Research. Prague: Czech Republic; 2004: 76-84
- [9] 岳鹏, 陈庆富. 植物种子蛋白的分子生物学研究进展[J]. 种子, 2011, 30(1): 58-62
- [10] 陈晴晴, 石桃雄, 陈庆富. 荞麦不同种间 BW10KD 过敏蛋白基因序列比较[J]. 广东农业科学, 2013, 40(9): 133-139
- [11] 高小丽, 李芳, 岳鹏, 等. 欧李叶片全长 cDNA 文库的构建和部分克隆的序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(1): 156-162
- [12] Li J H, Chen Q F, Zeller F J. Variation in seed protein subunits among species of the genus *Fagopyrum* Mill[J]. Plant Syst Evol, 2008, 274(3-4): 193-202
- [13] 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, 31(2): 233-238
- [14] 赵钢, 唐宇. 荞麦过氧化物同工酶研究[J]. 荞麦动态, 1990(2): 10-15
- [15] Tang Z Z, Huang L, Gou J B, et al. Genetic relationships among buckwheat (*Fagopyrum*) species from southwest China based on chloroplast and nuclear SSR markers[J]. J Genet, 2014, 93(3): 849-853
- [16] 郑殿升, 杨庆文. 中国作物野生近缘植物资源[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 1-11
- [17] 罗定泽, 侯鑫, 赵佐成. 西南地区硬枝万年荞 (*F. agopyrum urophyllum*) 居群的遗传多样性研究[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(2): 107-112
- [18] Zhou M L, Wang, C L, Wang D Z, et al. Phylogenetic relationship of four new species related to southwestern Sichuan *Fagopyrum* based on morphological and molecular characterization[J]. Biochem Syst Ecol, 2014, 57: 403-409
- [19] 郑亚迪. 西南地区荞麦属植物分子系统发育研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012
- [20] 史建强, 李艳琴, 张宗文, 等. 荞麦及其野生种遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 443-450
- [21] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [M]//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland: Sinauer Associates, 1989: 43-63
- [22] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护[J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96
- [23] 王转花, 马文丽. 荞麦同工酶多态分析[J]. 山西农业科学, 1998, 26(2): 24-26
- [24] 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栽培居群的遗传多样性研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(6): 538-548
- [25] 赵佐成, 周明德, 王中仁, 等. 中国苦荞麦及其近缘种的遗传多样性研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(80): 723-734