

中国苦荞 SSR 分子标记体系构建及其在遗传多样性分析中的应用

高帆^{1,2}, 张宗文^{2,3}, 吴斌²

(¹山西大学生命科学学院, 太原 030006; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³国际生物多样性中心东亚办事处, 北京 100081)

摘要:【目的】从分子水平优化并构建用于中国苦荞种质资源遗传多样性分析的 SSR 分子标记体系, 为综合评价中国苦荞种质资源提供依据。【方法】以 50 份苦荞种质为试验材料, 用正交设计法 [$L_{16}(4^5)$] 筛选适用于苦荞 SSR 标记分析的 PCR 反应体系, 浓度梯度检测最佳胶分离效果, 并从 250 对不同科属作物 SSR 引物中筛选出 19 对引物进行苦荞遗传多样性分析。【结果】优化的苦荞 SSR 反应体系为 DNA 模板 30 ng, Taq 酶 $2.0 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP、引物和 Mg^{2+} 终浓度分别为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 总体积为 25 μL , 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。SSR 引物筛选率为 7.6%, 蓼科同属甜荞的 SSR 引物适用于苦荞 SSR 扩增。19 对引物共检测到 157 个等位变异, 每对 SSR 引物检测到的等位变异 2—11 个, 平均等位变异 (NA) 7.42 个, 平均多态性信息量 (PIC) 0.888, 平均鉴定力 (DP) 5.684, 2 对为 SSR 骨干引物。利用 Popgen Ver. 1.31 软件, 当遗传相似度 (GS) 为 0.578 时, 50 份苦荞材料被分为 5 个组群, 聚类结果与苦荞地理分布相关性不大。四川苦荞资源组群各遗传多样性参数均最高, 该区域苦荞种质资源多样性最丰富。利用骨干引物可鉴定部分近缘苦荞品种。【结论】构建的 SSR 分子标记体系适用于中国苦荞种质资源遗传多样性分析, 甜荞 SSR 引物可用于苦荞 SSR 标记分析, TBP5 和 Fes2695 为苦荞 SSR 骨干引物, 50 份苦荞材料遗传多样性丰富, 可划分为 5 个组群。

关键词: 苦荞; SSR; 遗传多样性

Construction and Application of SSR Molecular Markers System for Genetic Diversity Analysis of Chinese Tartary Buckwheat Germplasm Resources

GAO Fan^{1,2}, ZHANG Zong-wen^{2,3}, WU Bin²

(¹College of Life Science of Shanxi University, Taiyuan 030006; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³Bioversity International, Office for East Asia, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】 The SSR molecular markers system was optimized and constructed for genetic diversity analyses of Chinese tartary buckwheat germplasm resources, which is helpful for evaluating Chinese tartary buckwheat collections. 【Method】 The SSR-PCR system was optimized by [$L_{16}(4^5)$] orthogonal design, the optimized gel concentration of PAGE was confirmed, and the genetic diversity of 50 tartary buckwheat accessions was analyzed by 19 SSR primer pairs screened from 250 ones of different crops. 【Result】 The optimized SSR-PCR system was as follows: 30 ng DNA template, $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primer, $2.0 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ TaqDNA polymerase, $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, $1\times$ Taq buffer and ddH₂O then added up to terminal volume of 25 μL with 6% PAGE for testing. The primers screening efficiency was 7.6%, and the primers from common buckwheat were applicable. A total of 157 alleles were detected by 19 primers, with 2-11 alleles for each primer pair, and the average was 7.42. Moreover, the averaged PIC and DP values were 0.8881 and 5.684, respectively. Using Popgen Ver. 1.31, 50 accessions were clustered into 5 groups at GS 0.578.

收稿日期: 2011-09-29; 接受日期: 2011-11-24

基金项目: 农业部农作物种质资源保护专项——小宗作物种质资源保护研究 (NB2010-2130135-25-06)

联系方式: 高帆, Tel: 15110355586; E-mail: gaofan@sxu.edu.cn. 通信作者张宗文, Tel: 13601016906; E-mail: zongwenz@163.com

The clustering results revealed that the genetic diversity of accessions of tartary buckwheat was not correlated to their geographic origins. The genetic diversity of tartary buckwheat from Sichuan was very rich as genetic parameters were the highest. The core primers could be used to identify the similar accessions. 【Conclusion】 The SSR molecular markers system was effective for assessment of genetic diversity of Chinese tartary buckwheat germplasm resources. SSR primers of common buckwheat could be used in tartary buckwheat. TBP5 and Fes2695 were SSR core primers. It showed a high genetic diversity in 50 Chinese tartary buckwheat accessions which could be classified into 5 groups.

Key words: tartary buckwheat; SSR; genetic diversity

0 引言

【研究意义】苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 属于蓼科 (polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill), 起源于中国, 云南、四川和贵州一带是苦荞的分布中心和起源地^[1]。中国是苦荞的主产区, 常年种植面积超过 3×10^5 公顷, 年产量 30—50 万吨^[2]。苦荞粮药兼用, 不仅营养价值高, 而且富含生物类黄酮等活性成分, 具有降糖脂、降胆固醇、抗氧化、清除自由基和消炎等功效, 早已引起医学界的广泛关注^[3], 是 21 世纪重要的绿色食品来源^[4]。中国地域辽阔, 复杂的地貌和气候, 使苦荞种质资源十分丰富, 构建适用于中国苦荞种质资源遗传多样性分析的 SSR 分子标记体系, 对于种质资源的评价、品种的鉴定、分子辅助育种、优良基因的定位及克隆具有重要的意义。【前人研究进展】尽管过去国内外学者采用形态学标记^[5]、细胞学标记^[6]、种子蛋白标记^[7]和同工酶标记^[8]等方法对荞麦多样性进行了遗传分析, 但分子标记技术已成为近几年来最主要的种质资源遗传多样性分析手段。利用分子标记评价苦荞遗传多样性的工作已经逐步开展, 国内外广泛使用的分子标记多为 RAPD^[9]和 AFLP^[10], ISSR^[11]和 SRAP^[12]标记也偶有报道。尽管近几年来国内外有关于荞麦 SSR 引物的开发^[13]、筛选^[14]及地方种质遗传多样性分析的报道^[15], 但多集中在甜荞及部分地方苦荞品种, 系统、全面、大量地利用 SSR 标记分析中国苦荞核心种质遗传多样性的报道却很少。SSR 分子标记具有揭示遗传变异多、共显性、结果稳定、操作简单等优点, 已成为遗传多样性研究的重要手段。Iwata 等^[16]应用 5 个 SSR 标记对 19 个日本甜荞品种的遗传多样性进行了分析, 显示等位基因丰富性与开花时间的不同有密切关系; Konishi 等^[17]采用文库富集法开发了 180 对甜荞 SSR 引物, 检测结果显示 PIC 值比其它作物都高, 将有助于甜荞分子育种; Li 等^[18]设计了半特异性简并引物锚定 PCR 法开发了 4 对 SSR 引物, 扩增结果表明, 开发的 SSR 引物适用于苦荞遗传多样性研究。对于荞麦遗传作图方面的报

道, 国内几乎空白, 国外的相关报道也多集中在甜荞和野生荞麦, Yasui 等^[19]利用 20 对 AFLP 引物组分别构建了甜荞及其野生近缘种 *F. homotropicum* 遗传图谱, 两图谱都含有 8 个连锁群 (遗传距离分别为 508.3 cM 和 548.9 cM, 分别含 224 和 214 个 AFLP 标记); Konishi 等^[20]同时利用 AFLP 和 SSR 2 种标记构建了甜荞的遗传连锁图谱, 父母本均含有 12 个连锁群, 其中, 母本含 131 个标记 (54 个 SSR 和 77 个 AFLP), 遗传距离为 911.3 cM; 父本含 71 个标记 (37 个 SSR 和 34 个 AFLP), 遗传距离为 909.0 cM。【本研究切入点】上述研究虽利用不同的标记方式对部分苦荞种质进行了遗传多样性分析, 但系统构建中国苦荞 SSR 分子标记体系并应用于种质遗传多样性分析的报道却没有; 尽管有一些关于苦荞 SSR 引物开发和 SSR-PCR 反应体系优化方面的报道, 但对于苦荞 SSR 通用引物的适用范围以及利用 SSR 指纹图谱鉴定品种亲缘关系却未见报道。【拟解决的关键问题】本研究在前人研究的基础上, 拟利用正交设计法 [$L_{16}(4^5)$] 优化苦荞 SSR-PCR 反应体系, 筛选出适用于中国苦荞种质遗传多样性分析的 SSR 引物对, 利用 SSR 分子标记技术对中国 50 份苦荞种质进行遗传多样性分析, 揭示种质材料之间的遗传关系, 为中国苦荞种质资源的收集、保护、利用以及苦荞遗传连锁图谱的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

国内苦荞种质材料 50 份, 分别来自 12 个省区 (表 1)。供试材料由中国农业科学院作物科学研究所农作物种质保存中心提供。

1.2 DNA 的提取

取 0.5 g 嫩叶, 参照 CTAB 法^[21]提取总 DNA。利用紫外分光光度计及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。

1.3 SSR-PCR 体系优化及验证

以中国农业科学院小宗作物课题组自主开发的苦荞 SSR 引物 TBP α (F 5'-CGGCTAATAAGTCGTTTC-3',

R : 5'-GGATCATAGGTCGTGAAT-3') 对供试材料青海黑苦荞 (34 号) 进行扩增。采用 5 因素 4 水平共 16 组进行正交试验 $[L_{16}(4^5)]^{[22]}$ 。在 Biorad (MyCycler) 型 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 反应程序为 95 5 min ; 94 45 s , 57 35 s , 72 1 min , 共 35 个循环 ; 72 7 min。扩增产物分别用 2%、4%、6% 变性聚丙烯酰胺电泳 (PAGE) 分离, 快速银染检测不同浓度梯度下的胶分离效果, 并对 50 份苦荞材料进行 SSR-PCR 反应体系验证。

1.4 SSR 引物筛选

分别对来自于小麦^[23]、大麦^[24]、燕麦^[25]、小豆^[26]、甜荞^[17]及苦荞^[18]的共 250 对 SSR 引物(由北京赛百盛基因技术公司合成)进行苦荞 SSR 多态性引物筛

选。

1.5 SSR 分析

按照优化的 SSR-PCR 反应体系, 19 对 SSR 引物对 50 份苦荞材料进行 PCR 扩增, 温度梯度确定各引物对的最佳退火温度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色。

1.6 数据统计分析

在电泳图谱上, 清晰条带记为“1”, 同一位置上无条带记为“0”。计算各引物的鉴别力 (discrimination power, DP)。用 Popgene Ver.1.31 软件^[27]计算平均等位变异数目 (observed number of alleles, NA)、有效等位变异数 (effective number of alleles, NE)、多态性位点比例 (percentage of polymorphic bands, PP)、

表 1 试验材料名称及来源

Table 1 Name and origin of the accessions

编号 Code	品种名称 Accessions name	来源省份 Origin	编号 Code	品种名称 Accessions name	来源省份 Origin
1	黑丰 1 号 Heifeng No.1	山西 Shanxi	26	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi
2	六荞 2 号 Liuqiao No.2	贵州 Guizhou	27	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi
3	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi	28	刺荞 Ciqiao	四川 Sichuan
4	苦荞 Kuqiao	安徽 Anhui	29	苦荞 Kuqiao	贵州 Guizhou
5	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi	30	苦荞 Kuqiao	宁夏 Ningxia
6	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi	31	荞麦 Qiaomai	山西 Shanxi
7	82-8-1	安徽 Anhui	32	荞麦 Qiaomai	甘肃 Gansu
8	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi	33	辽荞 75(苦)Liaoqiao75(ku)	辽宁 Liaoning
9	苦荞 Kuqiao	四川 Sichuan	34	黑苦荞 Heikuqiao	青海 Qinghai
10	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi	35	湖南 2-2 Hunan 2-2	湖南 Hunan
11	苦荞 Kuqiao	山西 Shanxi	36	塘弯苦荞 Tangwankuqiao	湖南 Hunan
12	威宁 3 号 Weining No.3	贵州 Guizhou	37	六荞 1 号 A LiuqiaoNo.1A	贵州 Guizhou
13	苦荞 Kuqiao	湖北 Hubei	38	湖南 1-2 Hunan 1-2	湖南 Hunan
14	额洛木尔惹 Eluomuerre	四川 Sichuan	39	苦荞 Kuqiao	青海 Qinghai
15	湖南 3-1 Hunan 3-1	湖南 Hunan	40	湖南 6-2 Hunan 6-2	湖南 Hunan
16	海源苦荞 Haiyuankuqiao	宁夏 Ningxia	41	晋荞麦 2 号 JinqiaomaiNo.2	山西 Shanxi
17	凤凰苦荞 Fenghuangkuqiao	湖南 Hunan	42	苦荞 Kuqiao	青海 Qinghai
18	湖南 5-2 Hunan 5-2	湖南 Hunan	43	苦荞麦 Kuqiaomai	安徽 Anhui
19	苦荞 Kuqiao	陕西 Shaanxi	44	苦荞麦 Kuqiaomai	甘肃 Gansu
20	苦荞 Kuqiao	湖北 Hubei	45	苦荞 Kuqiao	湖北 Hubei
21	西农 9909 Xinong 9909	陕西 Shaanxi	46	镇巴苦荞 Zhenbakuqiao	陕西 Shaanxi
22	彭泽苦荞 Pengzekuqiao	江西 Jiangxi	47	老鸦苦荞 Laoyakuqiao	四川 Sichuan
23	洗马苦荞 Ximakuqiao	湖南 Hunan	48	麻苦荞 Makuqiao	甘肃 Gansu
24	苦荞 Kuqiao	湖北 Hubei	49	新邵苦荞 Xinshaokuqiao	湖南 Hunan
25	麻苦荞 Makuqiao	甘肃 Gansu	50	湖南 3-2 Hunan 3-2	湖南 Hunan

香农指数 (Shannon's information index, SI)、遗传相似度 (genetic similarity coefficient, GS)。根据遗传相似度,采用 UPGMA 法,利用 NTSYSpc Version 2.2^[28] 软件进行苦荞品种聚类分析。

2 结果

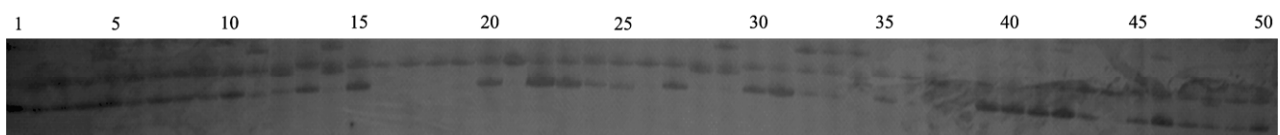
2.1 苦荞 SSR-PCR 正交试验及验证

在确定引物最佳退火温度后,按照 $L_{16}(4^5)$ 的 PCR 正交试验^[29] (模板:20—50 ng; dNTP:100—250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 引物:0.1—0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Taq 酶:0.5—2.0 U; Mg^{2+} :1.0—2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 16 个组合分别进行 PCR 扩增,电泳、染色、显影后照相观察。结果表明,所有的 16 个组合均扩增出微卫星条带,其中,第 9—16 号组合条带弥散,有非特异性扩增并伴有拖尾。第 4—8 号组合总体扩增效果较好,其中,第 6 号组合(25 μL PCR 反应体系为 DNA 模板 30 ng, Taq 酶 2.0 U $\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP、引物和 Mg^{2+} 终浓度分别为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 不仅条带清晰,且无非特异扩增,扩增效果最佳。浓度梯度试验表明,6% PAGE 胶分离效果最佳,便于统计分析。应用优化的反应体系对 50 份苦荞种质材料进行 SSR 扩增,部分检测结果如图 1 所示。优化后的 SSR-PCR 反应系统不仅扩增性强,而且特异性高,同时具有良好的稳定性和可重复性。表明该反应体系能有效地对中国不同区域苦荞种质材料基因组进行 SSR 扩增,实用性好,可靠性强。

2.2 适用于苦荞种质资源遗传多样性分析的 SSR 引物筛选

2.2.1 各种引物扩增情况 用 250 对 SSR 引物对 10 份表型性状差异较大的苦荞材料进行扩增和多态性筛选(表 2)。远缘作物大麦、小麦、燕麦、小豆的 58 对 SSR 引物基本没有扩增条带,说明 SSR 引物在不同科的远缘作物间难以转移使用。甜荞的 138 对引物中,71 对扩增出微卫星条带,其中 9 对多态性较好。另从中国农业科学院小宗作物课题组开发设计的 50 对苦荞 SSR 引物中筛选出多态性丰富的引物 9 对,从 Li 等^[18]开发的 4 对引物中筛选出多态性引物 1 对。SSR 引物有效扩增率大小为苦荞(94.4%) > 甜荞(51.4%) > 其它远缘作物(5.2%),多态性比率大小为苦荞(18.5%) > 甜荞(6.5%) > 其它远缘作物(0)。总的引物有效扩增率为 50%,多态性比率为 7.6%。

2.2.2 多态性引物分析 利用筛选得到的 19 对 SSR 引物(表 3)分析 50 份苦荞种质资源,共检测到 156 个等位变异,每对 SSR 引物等位变异数为 2—11 个,平均 7.42 个。其中,引物 TBP2 的等位变异数最多(11 个),引物 TBP6 最少(2 个)。不同 SSR 引物所揭示参试材料的多态信息量 (PIC) 介于 0.591—0.999,平均为 0.888。19 对 SSR 引物的鉴别力 (DP) 为 2—10,平均为 5.684。甜荞和苦荞 2 种类型的 SSR 引物检测到的平均等位变异数目 (NA) 分别为 8.67 和 6.30; 所揭示参试材料的平均 PIC 分别为 0.891 和 0.885。从



1—50 为表 1 供试材料编号 1-50 means No. of tartary buckwheat accessions used in table 1

图 1 SSR 引物 TBP7 对 50 份苦荞材料扩增图谱

Fig. 1 Electrophoretic pattern of 50 accessions of tartary buckwheat with SSR primer TBP7

表 2 各种作物 SSR 引物扩增情况

Table 2 Amplification for SSR primer pairs of different crops

引物种类 Type of primers	引物数目 No. of primers	有扩增产物 Product		无扩增产物 No product	有效扩增率 Effective amplification (%)	多态性比率 Polymorphism (%)
		单态 Monomorphic	多态 Polymorphic			
大麦、小麦、燕麦、小豆 SSR Barely, Common wheat, Oat, Adzuki bean SSR	58	3	0	55	5.2	0
甜荞 SSR Common buckwheat SSR	138	62	9	67	51.4	6.5
苦荞 SSR Tartary buckwheat SSR	54	41	10	3	94.4	18.5

表 3 苦荞的 SSR 引物扩增结果

Table 3 Amplification results of SSR primers in tartary buckwheat

引物名称 Primer name	SSR 引物序列 Sequences of SSR primers (5'-3')	等位变异数 No. of alleles	退火温度 Annealing temperature ()	片段大小 Size of brands (bp)	PIC 值 Value of PIC	鉴别力 DP
TBP1*	F: TGCCGTTTCGTGTCGTAATTCAGC R: TTGTCACCGTCATTGTGAGTCCA	9	56	150—200	0.845	7
TBP2*	F: GTTGGCTGATGACAAGAT R: GTTGGCTGATGACAAGAT	11	55	150—290	0.872	9
TBP3*	F: GGGTGGTCTATTACCGATTTA R: TTGAGGGTTAGGTGATCTTGCTT	7	55	125—160	0.984	6
TBP4*	F: TCGCCGAGATGCTTGAT R: TGACCCTGCTTCACCTTA	4	55	130—145	0.884	2
TBP5*	F: GGGGATTGATCGAGAAAG R: CCGAAGAGTAACTAGGAC	10	55	200—250	0.998	10
TBP6*	F: CGGCTAATAAGTCGTTTC R: GGATCATAGGTCGTGAAT	2	57	140—250	0.932	2
TBP7*	F: GACCCTTGACCGTGTTCCT R: AAGGTAAGGTAAGCACGGTCAA	3	55	250—350	0.894	2
TBP8*	F: GGAGTCCATGAGGATGTTGCTG R: GGAGTCCATGAGGATGTTGCTG	8	55	100—250	0.858	5
TBP9*	F: AAGGTATGGCTGGTAGACAAAGA R: GTCCTATCGCTACTAGAGGAAGA	4	56	190—350	0.994	4
TH3A_CA7 ^[18]	F: KKVMVMV(GT) ₆ R: AGTGC CCGTC CCGTGTAC	5	57	160—200	0.591	1
Fes1585 ^[17]	F: GCCTCCTACTAGCCCTCCA R: AGCTGACCCTTGTGTCTCCC	10	58	100—200	0.922	9
Fes1623 ^[17]	F: CGACCGAGATTTGGTTTGAA R: CGTGGTGAATTAGGGTTGTG	8	50	100—200	0.766	3
Fes2644 ^[17]	F: GGAGTAAGACCTCCACAAAGGT R: GCAAGTGATAACCCCTCTCTCT	8	58	195—300	0.640	2
Fes1497 ^[17]	F: GTTGGCTGACGAAGACCGAC R: AAAGAGAGCGAGAGGCACTG	10	61	100—140	0.820	9
Fes3340 ^[17]	F: CATAACCACAACAGAACGATG R: TTGGTTTTGCATTAGAGAGCAC	8	55	110—150	0.935	6
Fes1308 ^[17]	F: ACTCTTGAATGTATGCACCAG R: TAGCGTGAGAGAGAGAGAGAGA	6	48	200—300	0.978	5
Fes2695 ^[17]	F: ACCGAGATAGAGACCGAGAT R: CAAACTAACATAACCAAAAGA	10	55	300—400	0.999	10
Fes1326 ^[17]	F: GACCCTTCGTTAGTAGACCA R: GGAGGAAGAGAAGAGAAAGT	10	55	180—290	0.961	8
Fes2459 ^[17]	F: CGGGATGAGCAACTCTGACT R: TTATACGCTCCACGCTTCCT	8	56	150—225	0.994	8
平均 Mean		7.42			0.888	5.684

*表示引物为中国农业科学院作物科学研究所小宗作物课题组自主开发

The asterisks means that the primer pairs were developed by Minor Crops Research Group of Institute of Crop Science of CAAS

检测结果看, 引物 TBP5 和 Fes2695 无论从等位变异数(仅次于 TBP2, 均为 10 个)、PIC(0.998 和 0.999) 还是从 DP(均为 10) 来看, 均较高, 它们将是苦荞分子标记研究的骨干引物。

2.3 苦荞种质资源遗传多样性分析

SSR 标记结果(表 4) 表明, 50 份苦荞品种的遗传相似度(GS) 在 0.308—0.836, 分布区间较大, 说

明这些苦荞品种遗传多样性丰富, 同时也表明该 SSR 分子标记体系适合于中国苦荞种质遗传多样性分析。

采用 UPGMA 法进行聚类, 当 GS=0.578 时, 苦荞材料被分为五组(图 2)。64% 的材料被分到第 1 组里, 其中, 包括来自各个省份的共 32 份材料, 来自贵州(2) 和陕西(10) 的 2 份材料遗传相似度最高, 为 0.836; 第 2 组包括来自湖南(17、18、38)、陕

表 4 SSR 标记的 50 份苦荞种质遗传相似度

Table 4 Genetic similarity among 50 tartary buckwheat accessions based on SSR markers

序号 No.	最大值 Max	最小值 Min	平均值 Mean	序号 No.	最大值 Max	最小值 Min	平均值 Mean
1	0.780(9)	0.436(20)	0.639	26	0.776(25)	0.483(45)	0.599
2	0.836(10)*	0.440(20)	0.656	27	0.717(46)	0.423(20)	0.587
3	0.807(8,31)	0.500(20)	0.657	28	0.667(29)	0.408(44)	0.564
4	0.813(9)	0.467(20)	0.636	29	0.755(8,10)	0.417(20)	0.597
5	0.820(8)	0.464(20)	0.670	30	0.645(5)	0.400(48)	0.562
6	0.776(2)	0.468(20)	0.651	31	0.807(3)	0.417(44)	0.613
7	0.780(8)	0.481(20)	0.658	32	0.710(33)	0.419(48)	0.594
8	0.828(10)	0.453(20)	0.694	33	0.737(6)	0.475(14)	0.632
9	0.813(4)	0.423(20)	0.661	34	0.667(2)	0.400(49)	0.573
10	0.836(2)*	0.491(20)	0.694	35	0.774(8,23)	0.462(44)	0.639
11	0.706(10)	0.390(44)	0.563	36	0.679(9)	0.444(45)	0.565
12	0.783(10)	0.469(20)	0.634	37	0.813(5)	0.500(20)	0.639
13	0.788(8)	0.452(38)	0.629	38	0.625(26)	0.448(15)	0.547
14	0.667(2)	0.383(18)	0.531	39	0.808(16)	0.512(44)	0.622
15	0.710(10)	0.414(14)	0.590	40	0.684(12)	0.438(14)	0.588
16	0.808(39)	0.480(18)	0.633	41	0.806(8)	0.456(20)	0.633
17	0.730(8,10)	0.483(20)	0.619	42	0.679(2,8)	0.414(19)	0.574
18	0.711(26)	0.383(14)	0.558	43	0.720(46)	0.440(14)	0.592
19	0.689(7)	0.400(44)	0.564	44	0.619(6,26)	0.390(11)	0.520
20	0.609(18)	0.308(48)**	0.486	45	0.697(1)	0.421(18)	0.549
21	0.689(26)	0.439(47)	0.550	46	0.792(9)	0.449(20)	0.657
22	0.793(23)	0.481(14)	0.626	47	0.642(5)	0.431(28,30)	0.553
23	0.828(8)	0.500(44)	0.673	48	0.651(9)	0.308(20)**	0.555
24	0.698(26)	0.455(25)	0.586	49	0.717(9)	0.400(34)	0.573
25	0.776(26)	0.426(45)	0.606	50	0.680(9)	0.391(20)	0.554

*最大遗传相似系数；**最小遗传相似系数；括号内数字为表 1 苦荞材料编号

The max GS with one asterisk; The min GS with two asterisks; Numerals in bracket is No. of accessions in table 1

西(21、26)、湖北(24)和甘肃(25)的7份材料,其中,来自湖南(38)的一份材料可单独聚为一类,其余6份材料可聚为一类;第 大组包括来自山西(11)、陕西(19)和湖南(49)的3份材料,其中陕西(19)和湖南(49、50)的3份材料可聚为一类;第 大组包括来自湖北(45)、湖南(36)和四川(14)的3份材料。第 大组包括来自甘肃(44、48)和四川(47)的4份材料。剩余1份材料来自湖北(20),由于与以上5组材料亲缘关系较远,未能与之聚为一类。Nei's 遗传聚类结果显示,中国苦荞种质资源的遗

传关系与区域分布间没有明显的相关性。

2.4 不同地理来源苦荞资源群的遗传多样性比较

将少于4份材料的省份划分至与其毗邻、种植环境相似的省份,计算各来源组群苦荞种质材料的遗传多样性参数。结果(表5)显示,四川、湖北、湖南是中国苦荞遗传多样性较丰富的地区,其中,四川无论是 NA (6.782)、 PIC (0.811),还是 SI (0.224),均最大,是中国苦荞种质资源最为丰富的区域。虽然陕西的供试材料最多(与湖北同为10份),但遗传多样性并非最高,这从分子水平上证明资源量与遗传多

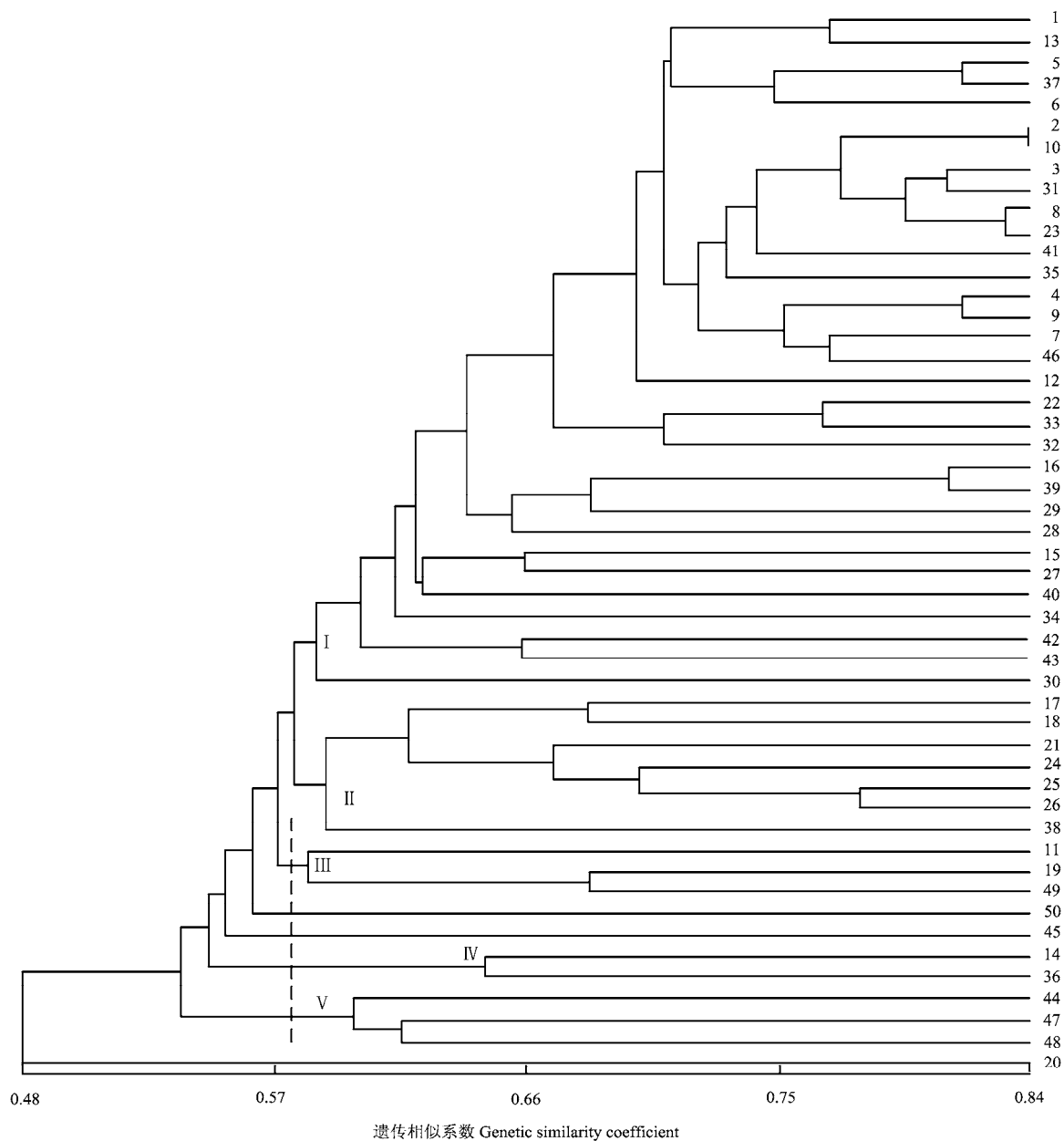


图 2 SSR 标记的 50 份苦荞材料 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram among 50 tartary buckwheat accessions with SSR markers

样性并非正相关的观点。与平均等位变异数 (NA) 相比, 湖南的有效等位变异数 (NE) 较小, 说明该区域极端频率的等位变异相对较多。安徽/江西、宁夏/青海 2 个组群的 PP 和 SI 均较低, 说明这些地区的苦荞资源多态性不明显, 需加强地区间引种, 不断丰富其遗传多样性。

2.5 基于 SSR 分子标记技术的苦荞品种检测

利用筛选出的骨干 SSR 引物对农艺性状十分相似的苦荞材料进行检测, 从分子标记水平上对其进行鉴

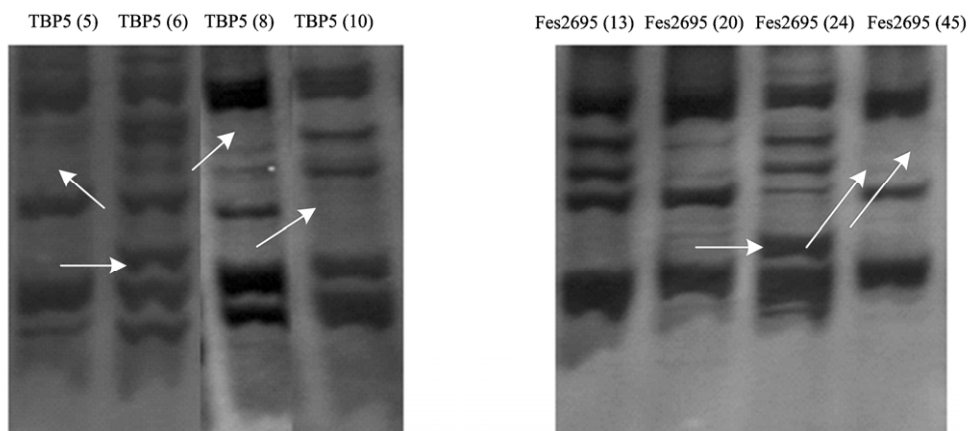
定。将表观遗传性状接近的山西和湖北的 8 份苦荞材料进行 SSR-PCR 反应, 6%PAGE 电泳分离 2 h, 银染后照相分析 (图 3)。

由图 3 可知, 苦荞 SSR 骨干引物扩增出的 DNA 指纹图谱清晰, 易于分析, 扩增出的条带数为 3—8 条。对于山西的 4 个苦荞品种 (5、6、8、10), 利用 TBP5 分别扩增出 6、8、6、5 条条带, 明显的差异性条带有 4 条, 利用这些差异条带完全可以将 4 份苦荞品种区分开来; 对于湖北的 4 个苦荞品种 (13、20、

表 5 采用 SSR 引物在 9 个苦荞组群中检测到的遗传多样性参数

Table 5 Estimates of genetic parameters for 9 groups of tartary buckwheat based on SSR primers

组群 Groups	份数 Number	平均等位变异数 NA	有效等位变异数 NE	多态性信息指数 PIC	多态性位点数 NP	多态性位点比例 PP (%)	香农指数 SI
山西/辽宁 Shanxi/Liaoning	5	5.034	3.989	0.651	11.0	81.965	0.176
贵州 Guizhou	4	4.549	2.632	0.624	11.0	76.953	0.163
陕西 Shaanxi	10	5.621	4.376	0.742	12.0	85.723	0.187
安徽/江西 Anhui/Jiangxi	4	2.691	2.135	0.588	11.0	62.499	0.148
四川 Sichuan	4	6.782	5.234	0.811	13.0	98.521	0.224
湖北 Hubei	4	6.315	4.823	0.807	13.0	93.210	0.213
湖南 Hunan	10	6.126	1.516	0.788	13.0	93.093	0.211
宁夏/青海 Ningxia/Qinghai	5	2.104	1.662	0.569	11.0	60.639	0.143
甘肃 Gansu	4	5.478	3.691	0.719	12.0	84.201	0.185
平均 Mean		4.967	3.340	0.699	11.9	81.868	0.183



TBP5 和 Fes2695 为 SSR 骨干引物，括号内数字为部分供试材料编号
 TBP5 and Fes2695 were SSR core primers, No. in bracket means No. of some tartary buckwheat collections used

图 3 山西和湖北苦荞品种 SSR 标记指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprints of tartary buckwheat from Shanxi and Hubei by SSR markers

24、45)，利用 Fes2695 分别扩增出 5、3、6、3 条条带，明显的差异性条带有 3 条，利用这些差异条带基本可以区分 4 份苦荞品种，对于湖北苦荞（20）和（45）尽管没有明显的特征标记，但湖北苦荞（20）主带周围一些细小的非特异性扩增带仍可作为其与湖北苦荞（45）的鉴定依据。

3 讨论

3.1 适用于中国苦荞遗传多样性分析的 SSR 分子标记体系建立

由于影响 SSR-PCR 反应体系的因素较多，各个因

素均可能对扩增敏感性、特异性及产量产生影响。因此，实行多因素联合优化的正交试验设计，利用其均衡分散性和整齐可比性，可有效减少试验操作次数，提高试验效率，节省试剂用量^[29]。另外，SSR 引物退火温度也是影响 PCR 扩增的重要因素之一^[22]，因此，本研究在进行正交试验前首先摸索了各引物的最佳退火温度，在确保有 SSR 产物的前提下进行 PCR 反应体系优化设计。优化后的反应体系敏感度高、特异性强、稳定性好，经验证扩增效果良好，完全适用于中国苦荞种质资源 SSR 分析。与王耀文等^[14]SSR-PCR 优化体系相比，本研究的 Taq 酶用量基本相同，DNA

模板量、dNTP、引物浓度均较小, Mg^{2+} 浓度则略大。考虑到 SSR 扩增的高度特异性, 笔者认为适当降低 DNA 模板用量及引物浓度, 提高聚合酶扩增活性, 可以有效提高微卫星扩增的灵敏度, 减少非特异性扩增, 避免引物二聚体干扰。

SSR 引物的来源有相关文献、近缘种引物、基因组文库和数据库^[30]。随着基础作物的基因组研究日益深入及 SSR 标记的广泛应用, 可适用的 SSR 引物日趋丰富。然而, 对于国内小宗作物苦荞, 分子生物学研究尚未深入, 可供使用的 SSR 引物很少, 可供分析的 SSR 标记不足, 难以满足中国苦荞种质资源遗传多样性分析以及高密度遗传图谱构建等研究的需要。目前, 研究者常采用从 EST 序列中获得 SSR 标记^[31], 但对于研究相对落后的苦荞, 采用简单易行的前 2 种方法获取 SSR 引物是当前苦荞分子标记研究的主要手段。本研究从同属作物甜荞中筛选出 9 对具有多态性的 SSR 引物, 另从中国农业科学院小宗作物课题组自主开发的苦荞 SSR 引物中筛选出多态性引物 9 对, 最后从文献中查到有效的多态性扩增引物 1 对。SSR 引物的有效扩增率大小为苦荞 (94.4%) > 甜荞 (51.4%) > 其它远缘作物 (5.2%), 多态性比率大小为苦荞 (18.5%) > 甜荞 (6.5%) > 其它远缘作物 (0), 每对 SSR 引物检测到的平均等位变异数 (NA) 分别为 6.8 (苦荞引物) 和 9.8 (甜荞引物)。揭示参试资源的多态信息量 (PIC) 分别为 0.885 (苦荞引物) 和 0.891 (甜荞引物)。以上数据说明, 筛选物种的 SSR 引物时, 亲缘关系越近, 有效扩增率越高, 筛选出多态性引物的机率也越大。本研究的 SSR 多态性引物比率 (7.6%) 低于莫日更朝图格等^[15] (52%) 和王耀文等^[14] 的研究数据 (17.6%), 同时也低于谭萍等^[32] 和许瑾等^[33] 的 RAPD 多态性引物筛选率 (分别为 10% 和 46%), 这与本研究的 SSR 引物筛选范围较大及 SSR 引物扩增特异性较强有关。

3.2 苦荞种质资源遗传多样性分析

对国内 50 份苦荞种质材料的 SSR 分析结果表明, 首先, 19 对 SSR 引物组共获得 156 个等位变异位点, 平均每对引物可获得 8.26 个, 表明苦荞的微卫星十分丰富。尽管低于赵丽娟等^[11] 和侯雅君等^[34] 用 ISSR 和 AFLP 所得的 26.6 和 15.7 个位点数, 但仍高于 Senthilkumaran 等^[9] 用 RAPD 标记所得的 6.90 个位点; 其次, GS 变幅 (0.308—0.836) 和 PIC (0.591—0.999) 变幅都很大, 其中本研究的 GS 变幅大于西部苦荞地方品种 (GS 变幅 0.520—0.850)^[15], 说明本研究构建

的 SSR 标记体系对于全国范围内的苦荞种质资源遗传多样性分析都十分奏效, 最后, 通过苦荞与小麦^[35] (平均 $PIC=0.560$)、大豆^[36] (平均 $PIC=0.849$)、谷子^[37] (平均 $PIC=0.732$)、玉米^[38] (平均 $PIC=0.599$) 等作物的平均 PIC 比较发现, 本试验所用 SSR 引物平均 PIC 值 (0.888) 很高, 其中, 引物 TBP5 和 Fes2695 为分子标记体系的骨干引物 (PIC 和 DP 均较高)。这对于充分发掘中国苦荞资源微卫星多态性信息十分有利。

聚类结果显示, 遗传差异与地理分布没有明显相关性, 这可能与国内苦荞遗传变异幅度较小, 近年来不同地区间频繁传种、换种有关。来自于陕西和贵州的 2 个地方品种苦荞 (10) 和六荞 2 号 (2) 遗传相似度最高 ($GS=0.836$), 说明这 2 份材料亲缘关系很近, 这可能与两地区间品种和基因交流频繁有关。由于贵州更接近中国荞麦次生起源地之一的川中南部地区^[39], 推测两地品种的基因交流方向应为贵州→陕西。来自甘肃的麻苦荞 (48) 和来自湖北的苦荞 (20) 遗传相似度最低 ($GS=0.308$), 原因可能与两品种间地理阻隔较远, 基因交流很少有关。由于两地的品种交流需要历经青海、内蒙、宁夏、陕西及四川五个省份, 因此, 这 2 个品种间遗传差异十分明显, 将是很好的遗传育种材料。

3.3 适用于苦荞品种鉴定的 SSR 指纹图谱

利用 2 对 SSR 骨干引物 (TBP5 和 Fes2695) 扩增出的苦荞 DNA 指纹图谱, 可大大增强苦荞近缘品种的鉴定能力, 有效避免了由于表型鉴定和生化鉴定所引起的误差。虽然许瑾等^[33] 也利用 6 对 RAPD 引物有效扩增了用于苦荞品种鉴定的指纹图谱, 但考虑到其鉴定品种来源 (分别来自 9 个不同的省份) 的地理和气候环境差异较大, 以及品种本身表现遗传差异明显等因素, 利用骨干引物扩增出的苦荞 SSR 指纹图谱将具有更广泛的品种分析范围和更高的品种鉴定水平。鉴于优化后的 SSR-PCR 技术简便易行以及标记下的指纹图谱条带数少、重复性好、稳定性高、易于区分等特点, 我们需要在今后的研究中加大苦荞 SSR 骨干引物的开发和筛选力度, 建立苦荞 SSR 骨干引物库, 这对于苦荞种质资源遗传多样性分析、苦荞遗传连锁图谱构建、苦荞分子标记辅助育种都十分有利, 是以上各项研究的基础和前提。

4 结论

优化了苦荞 SSR-PCR 反应体系, 证实了近缘作物

间 SSR 引物的通用性。筛选出 19 对多态性丰富的苦荞 SSR 引物，其中，2 对骨干引物可用于部分苦荞近缘品种的鉴定，构建了适用于中国苦荞种质资源遗传多样性分析的 SSR 分子标记体系。应用该体系对 50 份苦荞进行了遗传多样性分析，参试材料遗传多样性丰富，可被分为 5 个组群。四川地区的苦荞资源多样性最为丰富，安徽、江西、青海、宁夏的苦荞资源多样性则不够丰富。因此，在加强区域内苦荞资源保护的前提下，还要加强区域间引种，最重要的是加强种质创新，不断丰富中国苦荞种质资源遗传多样性。

References

- [1] 赵佐成, 周明德, 罗定泽, 侯 鑫, 王中仁, 沈国坤, 李发良, 曹吉祥. 四川省凉山州北部栽培苦荞麦的遗传多样性研究. 遗传学报, 2000, 27(12): 1084-1093.
Zhao Z C, Zhou M D, Luo D Z, Hou X, Wang Z R, Shen G K, Li F L, Cao J X. Genetic diversity of *Fagopyrum tataricum* cultivated in north Liangshan prefecture of Yi nationality, Sichuan, China. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(12): 1084-1093. (in Chinese)
- [2] Lin R F, Chai Y. Production, research and academic exchanges of China on buckwheat. *Advances in Buckwheat Research*, 2007: 7-12.
- [3] 魏益民, 张国权. 同源四倍体荞麦籽粒品质性状研究. 中国农业科学, 1995, 28(S): 34-40.
Wei Y M, Zhang G Q. Studies on the quality properties of autotetraploid buckwheat kernel. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(S): 34-40. (in Chinese)
- [4] 徐丽华, 潘 宏, 赵英明. 荞麦——一种新兴的多用途作物. 杂粮作物, 1998, 18(3): 1-4.
Xu L H, Pan H, Zhao Y M. A multi-purpose crop: Buckwheat. *Rain Fed Crops*, 1998, 18(3): 1-4. (in Chinese)
- [5] 高金峰, 张慧成, 高小丽, 卓 喙, 柴 岩, 李瑞国, 冯佰利. 西藏苦荞种质资源主要农艺性状分析. 河北农业大学学报, 2008, 31(2): 1-5.
Gao J F, Zhang H C, Gao X L, Zhuo G, Chai Y, Li R G, Feng B L. Analysis on the agronomic traits of tartary buckwheat in Tibet. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2008, 31(2): 1-5. (in Chinese)
- [6] Ohnishi O, Asano N. Genetic diversity of *Fagopyrum homotropicum*, a wild species related to common buckwheat. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999, 46: 389-398.
- [7] Dvořáček V, Čepková P, Michalová A, Kreft I. Seed storage protein polymorphism of buckwheat varieties (*Fagopyrum esculentum* Moench; *Fagopyrum tataricum* L.). *Advances in Buckwheat Research*, 2004: 412-418.
- [8] Ohmishi O. Population genetic of cultivated common buckwheat of *Fagopyrum esculentum* Moench. Allozyme variability in Nepal and koshmirion populations. *Genetic*, 1985, 60: 293-305.
- [9] Senthikumar R, Bisht I S, Bhat K V. Diversity in buckwheat (*Fagopyrum* spp.) landrace populations from north-western Indian Himalayas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2008, 55: 287-302.
- [10] Konishi T, Yasui Y, Ohnishi O. Original birthplace of cultivated common buckwheat inferred from genetic relationships among cultivated populations and natural populations of wild common buckwheat revealed by AFLP analysis. *Genes and Genetic Systems*, 2005, 80: 113-119.
- [11] 赵丽娟, 张宗文, 黎 裕, 王天宇. 苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 159-164.
Zhao L J, Zhang Z W, Li Y, Wang T Y. Genetic diversity in tartary buckwheat based on ISSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2006, 7(2): 159-164. (in Chinese)
- [12] Li Y Q, Fan X L, Shi T L, Zhang Q B, Zhang Z W. SRAP marker reveals genetic diversity in tartary buckwheat in China. *Frontiers of Agriculture in China*, 2009, 3(4): 383-387.
- [13] Ma K H, Kim N S, Lee G A, Lee S Y, Lee J K, Yi J Y, Park Y J, Kim T S, Gwag J G, Kwon S J. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119: 1247-1254.
- [14] 王耀文, 夏 楠, 韩瑞霞, 李艳琴, 王安虎, 蔡光泽. 苦荞 SSR-PCR 反应体系的优化及引物筛选. 贵州农业科学, 2011, 39(4): 4-8.
Wang Y W, Xia N, Han R X, Li Y Q, Wang A H, Cai G Z. Optimization and primer selection of SSR-PCR reaction system in tartary buckwheat. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2011, 39(4): 4-8. (in Chinese)
- [15] 莫日更朝格图, 王鹏科, 高金峰, 高小丽, 柴 岩. 苦荞地方种质资源的遗传多样性分析. 西北植物学报, 2010, 30(2): 255-261.
Morigengchaogetu, Wang P K, Gao J F, Gao X L, Chai Y. Genetic diversity of tartary buckwheat germplasm. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(2): 255-261. (in Chinese)
- [16] Iwata H, Imon K, Tsumura Y, Ohsawa R. 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. *Genome*, 2005, 48(3): 367-377.
- [17] Konishi T, Iwata H, Yashiro K, Tsumura Y, Ohsawa R, Yasui Y,

- Ohnishi O. Development and characterization of microsatellite markers for common buckwheat. *Breeding Science*, 2006, 56: 277-285.
- [18] Li Y Q, Shi T L, Zhang Z W. Development of microsatellite markers from tartary buckwheat. *Biotechnology Letters*, 2007, 29: 823-827.
- [19] Yasui Y, Wang Y J, Ohnishi O, Campbell C G. Construction of genetic maps of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and its wild relative, *Fhontropicum* ohnishi based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) marks. *The Proceeding of the 8th ISB*, 2001: 225-232.
- [20] Konishi T, Ohnishi O. A linkage map of common buckwheat based on microsatellite and AFLP markers. *Fagopyrum*, 2006, 23: 1-6.
- [21] Manubens A, Lobos S, Jadue Y, Toro M, Messina R, Lladser M, Seelenfreund D. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17(3): 255-267.
- [22] Cheng F Y, Li C G, Liu Y W, Meng Q X, Zhang J L, Song D M, Liu H Z, Meng Z H. Optimization and testing for PCR system of rice by orthogonal design. *Agricultural Science and Technology*, 2010, 11(2): 61-64.
- [23] 韩凤龙, 李正玲, 胡琳, 许为钢. 用于河南小麦品种特异性和一致性鉴定的 SSR 分子标记研究. *中国农业科学*, 2010, 43(18): 3698-3704.
- Han F L, Li Z L, Hu L, Xu W G. Distinctness and uniformity evaluation of wheat (*Triticum aestivum*) varieties in Henan by SSR molecular analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(18): 3698-3704. (in Chinese)
- [24] Ramsay L. A simple sequence repeat-based linkage map of barely. *Genetics*, 2000, 156(4):1997-2005.
- [25] 邵秀玲, 原永兰, 尼秀媚, 范晓虹, 刘瑞军, 张德满, 常兆芝. 燕麦属进境检疫性杂草种子的 SSR 标记检测. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 40(4): 517-520.
- Shao X L, Yuan Y L, Ni X M, Fan X H, Liu R J, Zhang D M, Chang Z Z. Detection of import quarantine weeds of *Aveneae* L. by SSR markers. *Journal of Shandong University: Natural Science*, 2009, 40(4): 517-520. (in Chinese)
- [26] Wang X W, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D A. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in Adzuki bean (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi). *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 352-360.
- [27] Yeh F Y, Boyle R, Ye T, Mao Z. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. Molecular Biology and Biotechnology Centre, Alberta: University of Alberta, 1997.
- [28] Rohlf F. NTSYS-pc Numerical Taxonomy System, Exeter Publishing. NY: Setauket, 2002.
- [29] 李银霞, 李天红. 桃 SSR 反应体系的优化. *中国农业大学学报*, 2005, 10(6): 57-61.
- Li Y X, Li T H. Optimization of SSR reaction system of peach. *Journal of China Agricultural University*, 2005, 10(6): 57-61. (in Chinese)
- [30] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 131-143.
- Zhou Y Q. *The Application of DNA Molecular Markers in Study on Plants*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 131-143. (in Chinese)
- [31] 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 贾继增. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物. *作物学报*, 2005, 31(2): 154-158.
- Chen J F, Ren Z L, Gao L F, Jia J Z. Developing new SSR markers from EST of wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(2): 154-158. (in Chinese)
- [32] 谭萍, 王玉株, 李红宁, 张萍, 赵饮虹. 十种栽培苦荞麦的随机扩增多态性 DNA(RAPD)研究. *种子*, 2006, 25(7): 46-49.
- Tan P, Wang Y Z, Li H N, Zhang P, Zhao Y H. RAPD analysis on ten species of tartary buckwheat. *Seed*, 2006, 25(7): 46-49. (in Chinese)
- [33] 许瑾, 周小梅, 范玲娟, 王转花. 荞麦 RAPD 指纹图谱的建立及在品种鉴定中的应用. *山西大学学报: 自然科学版*, 2006, 29(2):194-197.
- Xu J, Zhou X M, Fan L J, Wang Z H. Generation of RAPD in buckwheat and its application in cultivars identification. *Journal of Shanxi University: Natural Science Edition*, 2006, 29(2):194-197. (in Chinese)
- [34] 侯雅君, 张宗文, 吴斌, 李艳琴. 苦荞种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析. *中国农业科学*, 2009, 42(12): 4166-4174.
- Hou Y J, Zhang Z W, Wu B, Li Y Q. Genetic diversity in tartary buckwheat revealed by AFLP analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(12): 4166-4174. (in Chinese)
- [35] 陈新民, 何中虎, 史建荣, 夏兰芹, Ward R, 周阳, 蒋国梁. 利用 SSR 标记进行优质冬小麦品种(系)的遗传多样性研究. *作物学报*, 2003, 29(1): 13-19.
- Chen X M, He Z H, Shi J R, Xia L Q, Ward R, Zhou Y, Jiang G L. Genetic diversity of high quality winter wheat varieties (Lines) based on SSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(1): 13-19. (in Chinese)
- [36] 海林, 王克晶, 杨凯. 半野生大豆种质资源 SSR 位点遗传多样性分析. *西北植物学报*, 2002, 22(4): 751-757.
- Hai L, Wang K J, Yang K. Genetic diversity of semi-wild soybean

- using SSR markers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(4): 751-757. (in Chinese)
- [37] 郝晓芬, 王节之, 王潞英, 王根全. SSR 标记分析谷子遗传多样性. *山西农业科学*, 2005, 33(4): 29-31.
- Hao X F, Wang J Z, Wang L Y, Wang G Q. Genetic diversity of millet by SSR marker. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2005, 33(4): 29-31. (in Chinese)
- [38] 聂永心, 张 丽, 潘光堂, 荣廷昭. 四川省常用玉米自交系 SSR 遗传多样性分析. *分子植物育种*, 2005, 3(1): 43-51.
- Nie Y X, Zhang L, Pan G T, Rong T Z. Genetic diversity of dominant maize inbred lines revealed by SSR in Sichuan province. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(1): 43-51. (in Chinese)
- [39] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among wild and cultivated tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) populations revealed by AFLP analyses. *Genes and Genetic Systems*, 2001, 76: 47-52.

(责任编辑 李 莉)