

苦荞遗传多样性分析与核心种质筛选

徐笑宇¹, 方正武^{1,2}, 杨 璞¹, 高金锋¹, 王鹏科¹, 冯佰利¹

(1. 旱区作物逆境生物学国家重点试验室/西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100;

2. 长江大学农学院, 湖北 荆州 434025)

摘 要: 利用 SSR 分子标记技术, 对来自西藏、陕西、四川、贵州等 4 省区的 210 份苦荞品种进行遗传多样性研究。结果表明, 所选用的 50 对 SSR 引物中, 有 16 对引物多态性良好, 共扩增出 178 个条带, 其中多态性条带达 118 个, 占总数的 66.3%; 210 份苦荞种质的遗传变幅为 0.62~0.98, 平均值为 0.80, 在遗传相似系数为 0.88 处可划分为 5 大类。聚类结果显示, 来自同一地区的苦荞品种显示出聚为一类的趋势, 表明苦荞的遗传信息受地理分布的影响较大; 第 V 类所聚的 41 份分别来自西藏(27 份)、陕西(8 份)和贵州(6 份)的品种表现出较为丰富的遗传多样性, 与其他种质相比, 这 41 份材料不仅遗传差异较大, 而且遗传来源广泛, 可作为苦荞核心种质筛选的基础。

关键词: 苦荞; 遗传多样性; 核心种质; SSR

中图分类号: S517.02 **文献标志码:** A

Genetic diversity analysis of tartary buckwheat and selection of core collections

XU Xiao-yu¹, FANG Zheng-wu^{1,2}, YANG Pu¹, GAO Jin-feng¹, WANG Peng-ke¹, FENG Bai-li¹

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas/Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: SSR marker was utilized in this study to analyze the genetic diversity of 210 tartary buckwheat accessions from Tibet, Shaanxi, Sichuan and Guizhou provinces. Results had indicated that among the overall 50 SSR primers, there were 16 primers demonstrating good polymorphisms. 178 bands were obtained and 66.3% of them (118) were polymorphic bands. The genetic similarity levels of 210 accessions ranged from 0.62 to 0.98, exhibiting an average value of 0.80. At the similarity level of 0.88, these tartary buckwheat varieties could be clustered into five groups. According to the ultimate dendrogram, these tartary buckwheat accessions which came from the same planting region had presented a similar clustering tendency, reflecting that the genetic information of tartary buckwheat might be affected remarkably by its geographic distribution. Moreover, 41 accessions clustered in a V group which came from Tibet (27), Shaanxi (8), and Guizhou (6) provinces showed abundant genetic diversity. Compared with other accessions, these 41 germplasms possessed not only large genetic differences, but also a wide range of genetic origins. Thereby it is reasonable to choose them as the foundation for selections of core collections in tartary buckwheat.

Keywords: tartary buckwheat; genetic diversity; core collections; SSR

荞麦(*Fagopyrum esculentum*)分甜荞(*F. esculentum*)和苦荞(*F. tataricum*),是我国旱作农区重要的粮食作物和经济作物^[1]。荞麦营养丰富,富含蛋白质、黄酮,具明显的医疗和保健功效^[2]。近年来,随着人们对健康生活品质的追求,苦荞因具有能够有

效清除人体内的氧自由基^[3]、降低血管脆性、降血脂^[4]、降血糖^[5]以及抗肝脏毒^[6]、抗炎^[7]、抗菌^[8]和抗癌等^[9-10]功能而倍受关注。

核心种质(core collection),是由 Frankel^[11-12]和 Brown^[13-14]提出并发展的概念,以最少量的遗传资

收稿日期: 2014-07-05
基金项目: 国家自然科学基金项目(31071472); 陕西省科技攻关(2012K01-09)及陕西省小杂粮产业技术体系资助
作者简介: 徐笑宇(1990—),男,云南昆明人,硕士研究生,主要从事作物高效栽培研究。E-mail: richardxu516@gmail.com。
通信作者: 冯佰利(1966—),男,陕西耀县人,教授,博士生导师,主要从事作物高产生态生理技术及小杂粮栽培、育种研究。E-mail: 7012766@163.com。

源来最大限度地保存整个资源群体的遗传多样性, 同时还可反映整个群体的地理分布, 具有异质性、多样性、代表性、实用性和动态性等特征^[15]。目前, 已有多数针对主要作物如水稻^[16]、大豆^[17]和小麦^[18]等核心种质研究的报道, 但对苦荞的类似研究却依然较少。我国作为世界荞麦的主产区, 不仅具有丰富的苦荞资源储备, 也是世界荞麦的起源中心和遗传多样性中心^[19-20], 然而, 由于我国各地域间的苦荞不论在基因型还是表现型上都差异显著, 导致各类优良苦荞品种的分布较不集中, 使得育种工作相对受限。针对此, 利用现代分子标记技术分析不同苦荞品种间的亲缘关系和遗传差异, 探索其遗传多样性的丰富程度, 筛选出能代表大量群体遗传多样性的核心种质, 对于优质苦荞基因资源的挖掘、品种鉴评和有利基因的定位及克隆等分子辅助育种具有重要意义^[21]。在众多分子标记手段中, SSR (simple sequence repeat, 简单重复系列) 分子标记因具有多态性好、灵敏度高、共显性、稳定可靠等优点, 成为遗传多样性分析和核心种质研究^[22]的最佳选择^[23]。

Iwata^[24]、Konishi^[25] 等对日本甜荞首次进行了 SSR 标记, 其开发的一部分引物多态性良好, 适用于大多数荞麦群体的遗传多样性调查; Ma 等^[26] 开发了 136 对引物, 其中 10 对标记效应显著, 41 对在鉴别栽培荞麦和野生荞麦的亲缘关系上贡献突出; Li 等^[27] 采用引物锚定 PCR 法开发了 4 对苦荞 SSR 引

物, 扩增效应良好, 与传统的引物设计方式相比, 更加具有针对性。在国内, 高帆等^[21] 构建了适合我国苦荞的 SSR 标记体系, 韩瑞霞等^[28] 开发了 28 对多态性较好的引物; 莫日更朝格图^[29]、田晓庆等^[30] 采用 SSR 标记对不同地区的荞麦品种进行聚类分析, 一定程度上探索了遗传多样性与地理分布的联系。杨学文等^[31] 针对内蒙古赤峰地区的苦荞品种进行 SSR 标记研究, 发现一些地方的荞麦材料可能存在同名异物或同物异名的情况, 指出对苦荞资源进行分子水平的遗传多样性评价很有必要。此外, 亦有部分学者还采用了 RAPD^[32]、AFLP^[33]、ISSR^[34]、SRAP^[35] 等其它分子标记技术进行过相应的研究。本研究从国内外文献中选择出 50 对已被证实多态性良好的荞麦 SSR 引物对主要来自我国西北和西南地区的 210 份苦荞种质进行遗传多样性研究, 确定了其亲缘关系, 亦分析了各品种间的遗传差异, 旨在为苦荞核心种质资源的基础筛选、保护及种间杂交和基因改良等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦荞种质材料 210 份, 主要来源于陕西、西藏、四川和贵州 (见表 1)。所选材料由 50 穴育苗盘育苗, 每个品种取 10 粒种子发芽, 幼苗出土后于 3 叶期随机选择 5 个单株的叶片进行试验。

表 1 210 份苦荞种质资源的名称及来源
Table 1 Accession and origin of 210 tartary buckwheat resources

编号 Code	品种名 Accessions name	来源 Origin	编号 Code	品种名 Accessions name	来源 Origin
K1	靖边 - 1051 Jingbian - 1051	陕西 Shaanxi	K106	ZGM38	西藏 Tibet
K2	靖边 - 1052 Jingbian - 1052	陕西 Shaanxi	K107	ZGM39	西藏 Tibet
K3	靖边 - 1053 Jingbian - 1053	陕西 Shaanxi	K108	ZGM40	西藏 Tibet
K4	定边 - 1056 Dingbian - 1056	陕西 Shaanxi	K109	ZGM41	西藏 Tibet
K5	定边 - 1057 Dingbian - 1057	陕西 Shaanxi	K110	ZGM42	西藏 Tibet
K6	定边 - 1058 Dingbian - 1058	陕西 Shaanxi	K111	ZGM43	西藏 Tibet
K7	定边 - 1059 Dingbian - 1059	陕西 Shaanxi	K112	ZGM44	西藏 Tibet
K8	子洲 - 1061 Zizhou - 1061	陕西 Shaanxi	K113	ZGM45	西藏 Tibet
K9	清涧 - 1062 Qingjian - 1062	陕西 Shaanxi	K114	ZGM46	西藏 Tibet
K10	志丹 - 1063 Zhidan - 1063	陕西 Shaanxi	K115	ZGM47	西藏 Tibet
K11	志丹 - 1064 Zhidan - 1064	陕西 Shaanxi	K116	ZGM48	西藏 Tibet
K12	志丹 - 1065 Zhidan - 1065	陕西 Shaanxi	K117	ZGM49	西藏 Tibet
K13	延安 - 1066 Yanan - 1066	陕西 Shaanxi	K118	ZGM50	西藏 Tibet
K14	黄龙 - 1068 Huanglong - 1068	陕西 Shaanxi	K119	ZGM51	西藏 Tibet
K15	宜君 - 1069 Yijun - 1069	陕西 Shaanxi	K120	ZGM52	西藏 Tibet
K16	华县 - 1070 Huaxian - 1070	陕西 Shaanxi	K121	ZGM53	西藏 Tibet
K17	华县 - 1071 Huaxian - 1071	陕西 Shaanxi	K122	ZGM54	西藏 Tibet

续表 1

编号 Code	品种名 Accessions name	来源 Origin	编号 Code	品种名 Accessions name	来源 Origin
K18	旬邑 - 1074 Xunyi - 1074	陕西 Shaanxi	K123	ZGM55	西藏 Tibet
K19	长安 - 1076 Changan - 1076	陕西 Shaanxi	K124	ZGM56	西藏 Tibet
K20	宝鸡 - 1079 Baoji - 1079	陕西 Shaanxi	K125	ZGM57	西藏 Tibet
K21	太白 - 1080 Taibai - 1080	陕西 Shaanxi	K126	ZGM58	西藏 Tibet
K22	留坝 - 1081 Liuba - 1081	陕西 Shaanxi	K127	ZGM59	西藏 Tibet
K23	佛坪 - 1082 Foping - 1082	陕西 Shaanxi	K128	ZGM60	西藏 Tibet
K24	略阳 - 1083 Lueyang - 1083	陕西 Shaanxi	K129	ZGM61	西藏 Tibet
K25	勉县 - 1084 Mianxian - 1084	陕西 Shaanxi	K130	ZGM62	西藏 Tibet
K26	汉中 - 1085 Hanzhong - 1085	陕西 Shaanxi	K131	ZGM63	西藏 Tibet
K27	西乡 - 1086 Xixiang - 1086	陕西 Shaanxi	K132	ZGM64	西藏 Tibet
K28	西乡 - 1087 Xixiang - 1087	陕西 Shaanxi	K133	ZGM65	西藏 Tibet
K29	西乡 - 1088 Xixiang - 1088	陕西 Shaanxi	K134	ZGM66	西藏 Tibet
K30	西乡 - 1089 Xixiang - 1089	陕西 Shaanxi	K135	ZGM67	西藏 Tibet
K31	宁强 - 1090 Ningqiang - 1090	陕西 Shaanxi	K136	ZGM68	西藏 Tibet
K32	宁强 - 1091 Ningqiang - 1091	陕西 Shaanxi	K137	江达苦荞 Jiangdaku	西藏 Tibet
K33	宁强 - 1092 Ningqiang - 1092	陕西 Shaanxi	K138	白朗苦荞 Bailangku	西藏 Tibet
K34	宁强 - 1093 Ningqiang - 1093	陕西 Shaanxi	K139	日喀则苦荞 - 1 Rikeze - 1	西藏 Tibet
K35	宁强 - 1094 Ningqiang - 1094	陕西 Shaanxi	K140	日喀则苦荞 - 2 Rikeze - 2	西藏 Tibet
K36	宁陕 - 1095 Ningqiang - 1095	陕西 Shaanxi	K141	日喀则苦荞 - 3 Rikeze - 3	西藏 Tibet
K37	宁陕 - 1096 Ningqiang - 1096	陕西 Shaanxi	K142	日喀则苦荞 - 4 Rikeze - 4	西藏 Tibet
K38	宁陕 - 1097 Ningqiang - 1097	陕西 Shaanxi	K143	日喀则苦荞 - 5 Rikeze - 5	西藏 Tibet
K39	宁陕 - 1098 Ningqiang - 1098	陕西 Shaanxi	K144	日喀则苦荞 - 8 Rikeze - 8	西藏 Tibet
K40	宁陕 - 1099 Ningqiang - 1099	陕西 Shaanxi	K145	日喀则苦荞 - 16 Rikeze - 16	西藏 Tibet
K41	宁陕 - 1100 Ningqiang - 1100	陕西 Shaanxi	K146	崇信苦荞 Chongxinku	甘肃 Gansu
K42	宁陕 - 1101 Ningqiang - 1101	陕西 Shaanxi	K147	寿阳苦荞 Shouyangku	山西 Shanxi
K43	宁陕 - 1102 Ningqiang - 1102	陕西 Shaanxi	K148	榆 6 - 21 Yu6 - 21	陕西 Shaanxi
K44	宁陕 - 1103 Ningqiang - 1103	陕西 Shaanxi	K149	永善苦荞 Yongshanku	云南 Yunnan
K45	宁陕 - 1104 Ningqiang - 1104	陕西 Shaanxi	K150	朝阳刺荞(线荞) Chaoyangci	辽宁 Liaoning
K46	宁陕 - 1105 Ningqiang - 1105	陕西 Shaanxi	K151	炎山刺荞 Yanshanci	云南 Yunnan
K47	宁陕 - 1106 Ningqiang - 1106	陕西 Shaanxi	K152	宣威苦荞 Xuanweiku	云南 Yunnan
K48	石泉 - 1107 Shiquan - 1107	陕西 Shaanxi	K153	中甸苦荞 Zhongdianku	云南 Yunnan
K49	石泉 - 1108 Shiquan - 1108	陕西 Shaanxi	K154	永胜苦荞 Yongshengku	云南 Yunnan
K50	石泉 - 1109 Shiquan - 1109	陕西 Shaanxi	K155	丽江苦荞 Lijiangku	云南 Yunnan
K51	汉阴 - 1110 Hanyin - 1110	陕西 Shaanxi	K156	喜德 1 号 Xide No.1	四川 Sichuan
K52	汉阴 - 1111 Hanyin - 1111	陕西 Shaanxi	K157	喜德 2 号 Xide No.2	四川 Sichuan
K53	汉阴 - 1112 Hanyin - 1112	陕西 Shaanxi	K158	喜德 3 号 Xide No.3	四川 Sichuan
K54	白河 - 1113 Baihe - 1113	陕西 Shaanxi	K159	喜德 4 号 Xide No.4	四川 Sichuan
K55	安康 - 1114 Ankang - 1114	陕西 Shaanxi	K162	喜德 5 号 Xide No.5	四川 Sichuan
K56	安康 - 1115 Ankang - 1115	陕西 Shaanxi	K161	喜德 6 号 Xide No.6	四川 Sichuan
K57	安康 - 1116 Ankang - 1116	陕西 Shaanxi	K162	昭觉 1 号 Zhaojue No.1	四川 Sichuan
K58	紫阳 - 1117 Ziyang - 1117	陕西 Shaanxi	K163	宣汉荞麦 Xuanhan	四川 Sichuan
K59	平利 - 1119 Pingli - 1119	陕西 Shaanxi	K164	川 - 8802 Chuan - 8802	四川 Sichuan
K60	平利 - 1120 Pingli - 1120	陕西 Shaanxi	K165	川 - 8806 Chuan - 8806	四川 Sichuan
K61	平利 - 1121 Pingli - 1121	陕西 Shaanxi	K166	苦刺荞 Kuciqiao	四川 Sichuan
K62	平利 - 1122 Pingli - 1122	陕西 Shaanxi	K167	川固 - 1 Chuangu - 1	四川 Sichuan
K63	岚皋 - 1123 Langao - 1123	陕西 Shaanxi	K168	额 - 02 E - 02	四川 Sichuan
K64	岚皋 - 1124 Langao - 1124	陕西 Shaanxi	K169	傣额 Dai - e	四川 Sichuan
K65	岚皋 - 1125 Langao - 1125	陕西 Shaanxi	K170	额角瓦齿 Ejiaowachi	四川 Sichuan
K66	岚皋 - 1126 Langao - 1126	陕西 Shaanxi	K171	老鸦苦荞 Laoyaku	四川 Sichuan

续表 1

编号 Code	品种名 Accessions name	来源 Origin	编号 Code	品种名 Accessions name	来源 Origin
K67	岚皋 - 1127 Langao - 1127	陕西 Shaanxi	K172	川 - 91 Chuan - 91	四川 Sichuan
K68	岚皋 - 1128 Langao - 1128	陕西 Shaanxi	K173	额拉 E - la	四川 Sichuan
K69	岚皋 - 1129 Langao - 1129	陕西 Shaanxi	K174	额保 E - bao	四川 Sichuan
K70	岚皋 - 1130 Langao - 1130	陕西 Shaanxi	K175	滇定 1 号 Dianding No.1	四川 Sichuan
K71	岚皋 - 1131 Langao - 1131	陕西 Shaanxi	K176	金阳 - 1 Jingyang - 1	四川 Sichuan
K72	岚皋 - 1132 Langao - 1132	陕西 Shaanxi	K177	金阳 - 2 Jingyang - 2	四川 Sichuan
K73	镇坪 - 1133 Zhenping - 1133	陕西 Shaanxi	K178	会理苦荞 Huiliku	四川 Sichuan
K74	洛南 - 1134 Luonan - 1134	陕西 Shaanxi	K179	西荞 1 号 Xiqiao No.1	四川 Sichuan
K75	商县 - 1135 Shangxian - 1135	陕西 Shaanxi	K180	炉霍苦荞 Luhoku	四川 Sichuan
K76	丹凤 - 1136 Danfeng - 1136	陕西 Shaanxi	K181	盐源额拉 Yanyuanela	四川 Sichuan
K77	丹凤 - 1137 Danfeng - 1137	陕西 Shaanxi	K182	甘孜苦荞 Ganziku	四川 Sichuan
K78	柞水 - 1138 Zhazhui - 1138	陕西 Shaanxi	K183	威宁 - 3 Weining - 3	贵州 Guizhou
K79	商南 - 1139 Shangnan - 1139	陕西 Shaanxi	K184	威宁 - 5 Weining - 5	贵州 Guizhou
K80	镇安 - 1141 Zhenan - 1141	陕西 Shaanxi	K185	威宁 - 9 Weining - 9	贵州 Guizhou
K81	ZGM1	西藏 Tibet	K186	威宁 - 14 Weining - 14	贵州 Guizhou
K82	ZGM2	西藏 Tibet	K187	威宁 - 20 Weining - 20	贵州 Guizhou
K83	ZGM5	西藏 Tibet	K188	威宁 - 21 Weining - 21	贵州 Guizhou
K84	ZGM12	西藏 Tibet	K189	威宁 - 26 Weining - 26	贵州 Guizhou
K85	ZGM16	西藏 Tibet	K190	威宁 - 28 Weining - 28	贵州 Guizhou
K86	ZGM17	西藏 Tibet	K191	威宁 - 33 Weining - 33	贵州 Guizhou
K87	ZGM18	西藏 Tibet	K192	黔威 1 号 Qianwei No.1	贵州 Guizhou
K88	ZGM19	西藏 Tibet	K193	威宁 - 36 Weining - 36	贵州 Guizhou
K89	ZGM20	西藏 Tibet	K194	威宁 - 37 Weining - 37	贵州 Guizhou
K90	ZGM21	西藏 Tibet	K195	威宁 - 40 Weining - 40	贵州 Guizhou
K91	ZGM22	西藏 Tibet	K196	威宁 - 41 Weining - 41	贵州 Guizhou
K92	ZGM23	西藏 Tibet	K197	威宁 - 44 Weining - 44	贵州 Guizhou
K93	ZGM24	西藏 Tibet	K198	威宁 - 45 Weining - 45	贵州 Guizhou
K94	ZGM25	西藏 Tibet	K199	威宁 - 47 Weining - 47	贵州 Guizhou
K95	ZGM26	西藏 Tibet	K200	威宁 - 48 Weining - 48	贵州 Guizhou
K96	ZGM27	西藏 Tibet	K201	威宁 - 49 Weining - 49	贵州 Guizhou
K97	ZGM29	西藏 Tibet	K202	威宁 - 51 Weining - 51	贵州 Guizhou
K98	ZGM30	西藏 Tibet	K203	威宁 - 55 Weining - 55	贵州 Guizhou
K99	ZGM31	西藏 Tibet	K204	威宁 - 56 Weining - 56	贵州 Guizhou
K100	ZGM32	西藏 Tibet	K205	威宁 - 57 Weining - 57	贵州 Guizhou
K101	ZGM33	西藏 Tibet	K206	威宁 - 58 Weining - 58	贵州 Guizhou
K102	ZGM34	西藏 Tibet	K207	威宁 - 100 Weining - 100	贵州 Guizhou
K103	ZGM35	西藏 Tibet	K208	威宁 - 59 Weining - 59	贵州 Guizhou
K104	ZGM36	西藏 Tibet	K209	威宁 - 8 Weining - 8	贵州 Guizhou
K105	ZGM37	西藏 Tibet	K210	威宁 - 62 Weining - 62	贵州 Guizhou

1.2 DNA 提取

本研究采用优化过的 CTAB 法^[36]提取样品 DNA。取幼叶约 0.5 g,剪碎后置于 1.5 mL 离心管内,加入液氮后迅速研磨成粉,随后加入 600 μL 预热过的缓冲液(2% CTAB,1.4 mol·L⁻¹ NaCl,100 mmol·L⁻¹ pH = 8.0 Tris - HCL,50 mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂,1% PVP,1% β - 巯基乙醇),65℃ 下水浴 40 min;向离心管内加入等体积的氯仿 - 异戊醇(V:V

= 24:1)溶液,混匀,室温下 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,然后将上清液转移至另一管中,再次加入相同体积的氯仿 - 异戊醇,重复离心;随之将上清液小心移出,加入两倍体积冰冻过的无水乙醇,轻轻摇动直至出现白色絮状沉淀,4℃ 沉淀 30 min 后,挑出 DNA,用 70%的冰乙醇洗涤 3 次,置于室温下风干,最后加入 100 μL 的 TE 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris - HCL,1 mmol·L⁻¹ EDTA)溶解。提取后的 DNA 用

1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其质量和浓度,−20℃保存。

1.3 SSR 引物的筛选及 PCR 扩增

从文献中选择 50 对多态性良好的 SSR 引物,分别来自高帆^[21]、Ma^[26]、田晓庆^[30]、Iwata^[24]等,所选

引物在原文献中报道的多态性条带数均大于 8 条,引物由 Invitrogen 公司合成;选择 50 份表型差异较大的荞麦品种做进一步筛选,将筛选得到的条带清晰稳定、多态性较高的 16 对引物(表 2)用于总体苦荞种质的遗传多样性研究。

表 2 16 对 SSR 引物序列的名称、序列及扩增结果
Table 2 Sequence information of 16 SSR primers and the resulting PCR amplifications

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temp/℃	扩增条带数 Amplified bands	多态性带数 Polymorphic bands	多态性比例 PIC /%
Fes1497 ^[21]	F: GTTGGCTGACGAAGACCGAC R: AAAGAGAGCGAGAGGCACTG	61	14	10	71.4
Fes2695 ^[21]	F: ACCGAGATAGAGACCGAGAT R: CAAACTAACATACCCAAAGA	55	13	8	61.5
BM85 ^[30]	F: AGGAGACGGGAGAGAAGCAG R: GGATGTTTGGGTGATTTCAG	56	8	5	62.5
BM87 ^[30]	F: CTCCAAGTCAGCCCAAGAAA R: GGTCCAAGGGAGAAGCGTAG	56	7	7	100.0
BM84 ^[30]	F: CCATATTCTACTTTCCGACC R: GAAGCACAAAGGAAATGAGGG	56	13	10	76.9
BM047 ^[30]	F: AGAAAGAATCGACGTGAGTG R: CCCGTTCCAACCCCTTCGTTTC	58	14	12	85.7
BM062 ^[30]	F: CTTTTCCTTTCAACCATGTACGC R: GATAGGCAATTAGAGCGTGAGTT	56	21	11	52.4
BM88 ^[30]	F: AAGCATTCATTCAATTCATTC R: GAGTTTGTGTGTTTGGAGG	55	13	11	84.6
BM812 ^[30]	F: CAACCACTCAAAGCCTCATC R: CTTTCATATCCCTAACACAC	58	11	8	72.7
BM82 ^[30]	F: ACGACGAAGACAAATGAGGA R: ATATGGACGGCCTGGATTAT	56	18	8	44.4
GB – FE – 035 ^[26]	F: TGCAATGACTTGGAGGAGA R: ACCACCATTCAACAAGCG	58	12	10	83.3
GB – FE – 054 ^[26]	F: TGTGGACTTCCTAGACCTG R: CATGAAAAGGGGATGCAA	58	4	3	75.0
Fem1322 ^[24]	F: AAGCATTCATTCAATTCATTC R: GAGTTTGTGTGTTTGGAGG	57	9	5	55.6
Fem1840 ^[24]	F: ACGACGAAGACAAATGAGGA R: ATATGGACGGCCTGGATTAT	60	7	4	57.1
TBP8 ^[21]	F: GGAGTCCATGAGGATGTTGCTG R: GGAGTCCATGAGGATGTTGCTG	55	10	4	40.0
TBP5 ^[21]	F: GGGGATTGATCGAGAAAG R: CCGAAGAGTAACTAGGAC	55	4	2	50.0
总带型统计 Overall banding	共 16 对 SSR 引物 16 pairs of SSR primers in totall	—	178	118	66.3

采用 10μL 的 PCR 反应体系,其中模板 DNA(30 ng)1 μL,上、下游引物各(1 μmol · L^{−1}) 0.2 μL, dNTP (2.5 mmol · L^{−1}) 0.8 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U · μL^{−1})0.05 μL, 10 × PCR buffer 1 μL, MgCl₂ 0.6 μL, 剩余体系用 ddH₂O 补足。所采用的 10 × PCR buffer、MgCl₂、Taq 酶均购自 Thermo 公司。总反应程序为: ① 95℃预变性 5 min; ② 94℃变性 45 s; ③ 52℃ ~ 61℃(依据各引物的退火温度而定)退火 30 s; ④

72℃延伸 1 min; ⑤ 2 ~ 4 步骤循环 35 次; ⑥ 72℃总延伸 7 min; ⑦ 4℃下保存。PCR 在 biorad(MyCycler)型 PCR 仪上进行。PCR 扩增产物在 6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,1 600 V 下电泳 1.5 h 后即可银染显色,照相保存。

1.4 数据统计分析

在电泳图谱上,根据 Marker(DL2000)的位置,读取位于 100 bp ~ 300 bp 片段范围之间的带型,清晰

的条带记为“1”,同一位置上无条带或条带模糊的记为“0”,构建[1,0]二元数列矩阵。利用 NTYSp2.1 软件中 Similarity 模块里的 Qualitative data 的 Dice 法计算遗传相似系数,再采用该软件聚类分析模块的 SAHN 的 UPGMA 法进行聚类分析,绘制树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物扩增的多态性分析

利用筛选得到的 16 对 SSR 引物分析 210 份苦荞资源,共扩增出 178 个条带,检测到 118 个等位变

异,占总条带数的 66.3%(见表 2)。每对 SSR 引物等位变异 2~13 个,平均 7.38 个。其中,引物 BM047 的等位变异数最多(12 个),引物 TBP5 最少(2 个),引物 BM87 的位点多态性达到了 100%,其扩增的总条带数为 7 个。图 1 是引物 BM047 在部分苦荞材料中的扩增结果,由图可知,其主带区集中在 DNA 片段大小为 100 bp~250 bp 的区域内;图 2 则是引物 Fes1497 在另一苦荞群体中的扩增结果,两图对比可知,不同的引物扩增效应不同,而且带型差异显著。

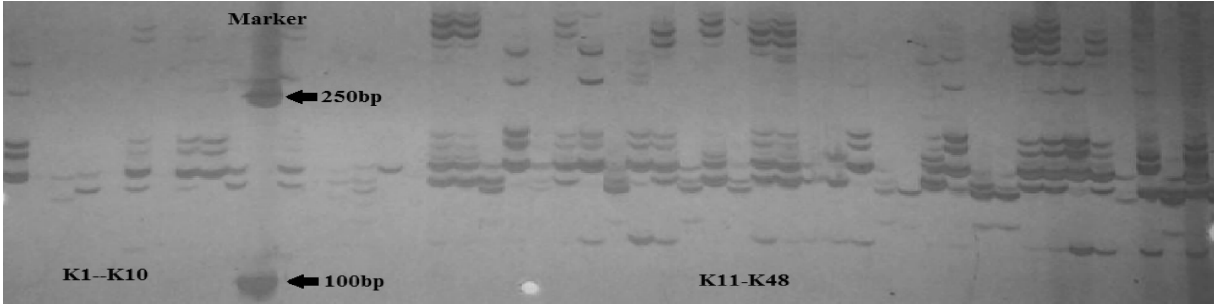


图 1 BM047 在部分苦荞种质中的扩增结果(Marker 为 DL2000)

Fig.1 DNA fragments amplified by BM047 in partial tartary buckwheat accessions (Marker: DL2000)

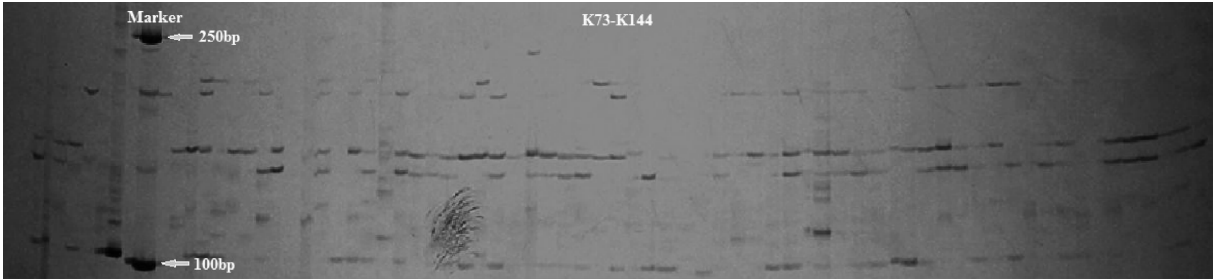


图 2 Fes1497 在部分苦荞种质中的扩增结果(Marker 为 DL2000)

Fig.2 DNA fragments amplified by Fes1497 in partial tartary buckwheat accessions (Marker: DL2000)

2.2 荞麦种质资源的遗传多样性分析

由于品种较多,文中不列出总体聚类图,而是根据其结果,选择在遗传相似系数为 0.88 时将 210 份苦荞种质划分成五个大组(图 3、4、5、6、7)加以分析。其中,第 I、II、III、IV 组为完全能够聚在一起的品种,第 V 组则是遗传多样性表现丰富仅能在遗传相似系数为 0.62 处聚为一类的族群。

图 3 显示了第 I 组的聚类结果, I 组中共有 10 份均来自陕西的种质能够聚为一类,相互之间遗传差异较小。图 4 显示的第 II 组中,共有 110 份苦荞能够聚为一类,其中陕西的品种最多,达 54 份;四川 26 份、贵州 22 份、山西 1 份和云南 7 份。第 II 组又能分出两个亚类,每个亚类中来自同一地区的苦荞种质表现出聚在一起的趋势,如第一个亚类中的 12 个品种(K3、K56 和 K55 等)都来自陕西,第二个亚类中

除了少数来自陕西的品种外,共有西南地区四川、贵州和云南三个省的 49 份种质能够聚为一类。剩余的品种则以来自陕西的为主,而其中来自陕南的品种亦又能表现出聚在一起的趋势,这说明,遗传相似性与地理分布有很大关系。本组聚类中,来自陕西、四川地区的部分种质(如 K161 和 K170 等)表现出近乎完全相同的分子标记带型,其在遗传相似系数 0.98 时几乎无遗传差异。

根据图 5,构成第 III 组聚类结果的 45 份材料中绝大部分都来自西藏,个别来自四川(K176)和陕西(K9 和 K35),同样,第 IV 组聚类图中只有 K75 一份是来自陕西的品种,其余四份都来自西藏,这表明,西藏的大部分苦荞种质在一定程度上保留了其独立的遗传特性,但其与其他地区的苦荞种质资源依然存在较高的亲缘关系。

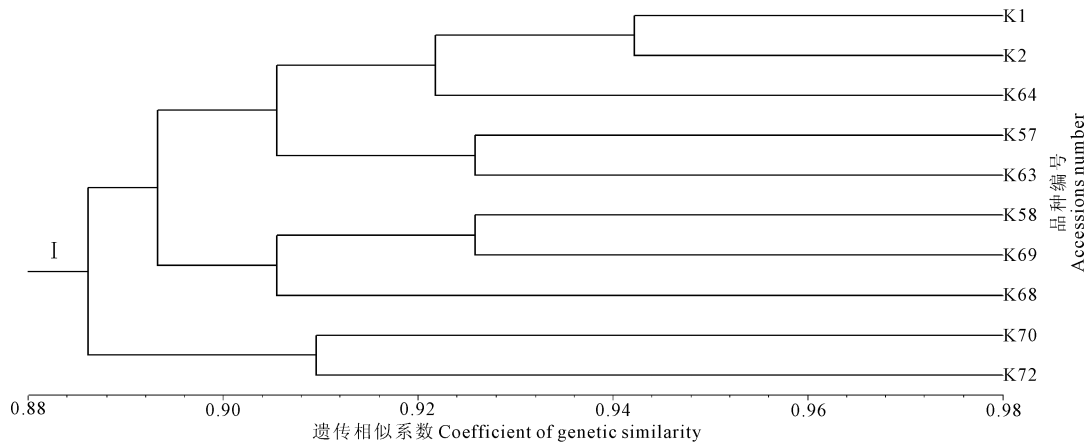


图 3 第 I 组苦荞的聚类情况
Fig.3 Dendrogram of tartary buckwheat I

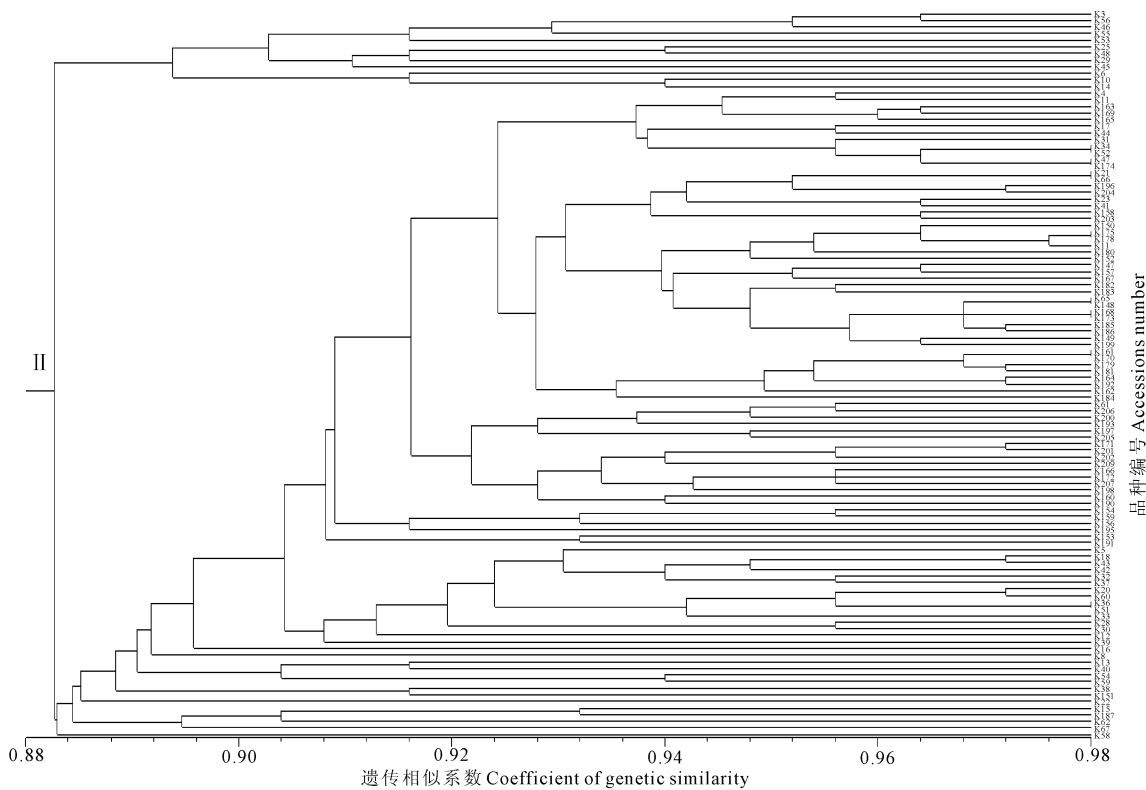


图 4 第 II 组苦荞的聚类情况
Fig.4 Dendrogram of tartary buckwheat II

图 7 反映的聚类情况比较特殊,第 V 组所聚的 41 个品种中,27 份来自西藏,8 份来自陕西,剩下 6 份来自贵州。这些品种只能在遗传相似系数为 0.62 处聚为一类,而在遗传相似系数为 0.88 时大多数品种则可单独聚为一类;与前四组相比,第 V 组所聚的苦荞种质的遗传多样性十分丰富,从其分出的三个亚类来看,K7、K24 和 K50 这三份来自陕西的品种构成了第一个亚类,贵州地区的 6 个品种和部分西藏

品种构成了第二个亚类,而第三个亚类则完全由 17 份来自西藏的苦荞组成。这表明,西藏、陕西和贵州三省的部分苦荞资源在遗传多样性上要比其他地区的丰富,而且能够被分为两个极端:一个极端是遗传基础较为单一,与其他地区品种的遗传相似度较低,却依然表现出一定亲缘关系的族群;另一极端则是遗传变异丰富,与其他地区的种质遗传差异明显的族群。

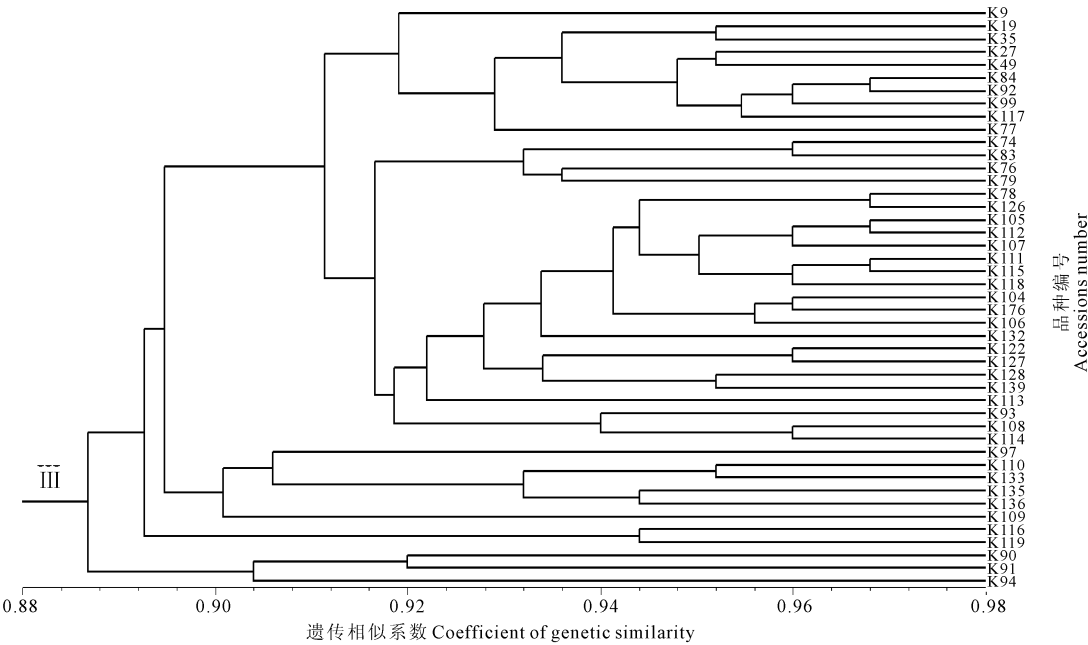


图 5 第Ⅲ组苦荞的聚类情况
Fig.5 Dendrogram of tartary buckwheat III

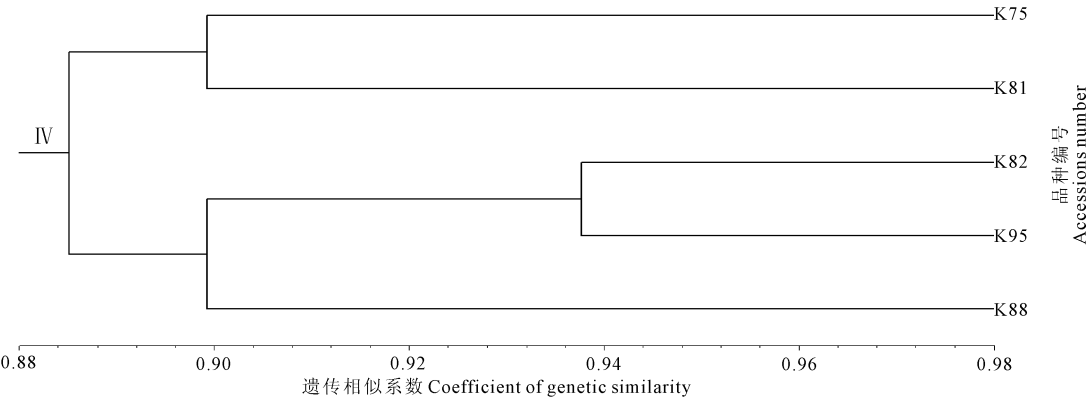


图 6 第Ⅳ组苦荞的聚类情况
Fig.6 Dendrogram of tartary buckwheat IV

3 讨 论

本研究结果显示,210 份苦荞种质的遗传变幅为 0.62 ~ 0.98,品种间遗传差异不均。以遗传相似系数 0.88 为基准时可分为五大组,除第 V 组外,前四组在遗传相似系数 0.88 处均可各自聚为一类。

根据第 II 组反映的聚类情况来看,西南地区的苦荞种质普遍亲缘关系较近,四川、贵州和云南三省的大部分品种在聚类结果上具有较大的一致性,与西藏和陕西地区的部分材料能单独聚为一类的趋势表现出一定差别,这反映出我国西南三省所处的区域由于环境类似、地理毗邻而造成的种质间的基因

交流较为频繁,在一定程度上形成了其相对独立的遗传结构;同时也表明由于自然因素造成的生态差异对苦荞种质的遗传多样性具有很大影响。另外,少部分来自陕西和四川的种质表现出近乎完全相同的分子标记带型,这很有可能是同一地区内的品种存在同物异名的现象,该结果与杨学文等^[31]的结论基本一致。西藏地区的苦荞种质大部分都显示出能够被单独聚为一类的趋势,但又与其他地区的苦荞品种间保持着较高的亲缘关系,这在一定程度上支持 Tsuji 等^[37]认为西藏、云南和四川交界处是栽培苦荞起源中心的学说。

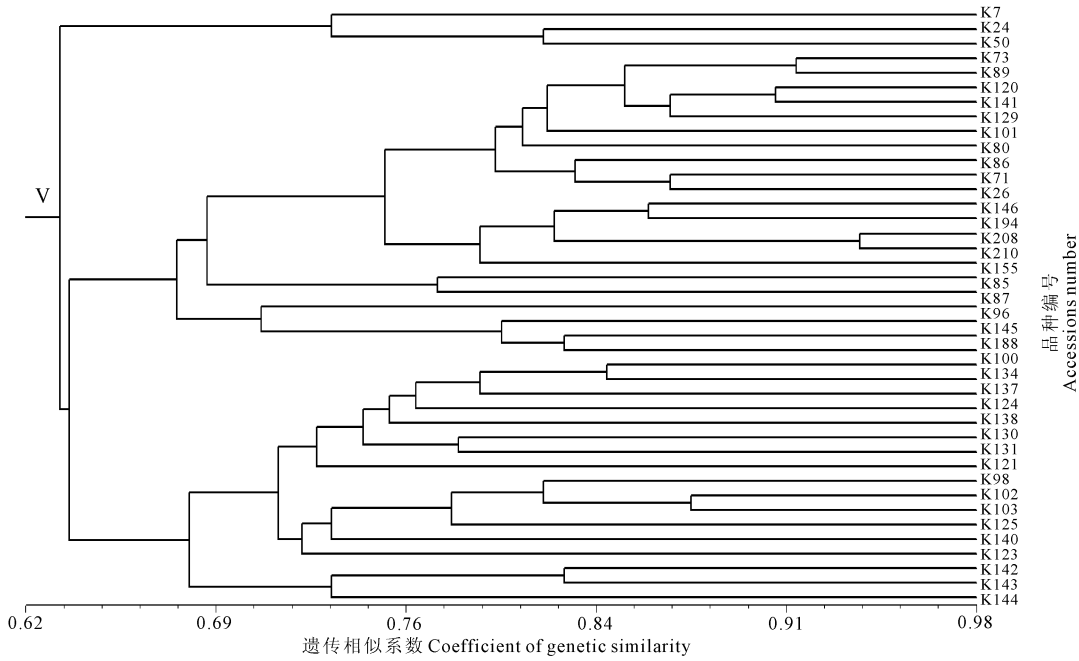


图 7 第 V 组苦荞的聚类情况

Fig.7 Dendrogram of tartary buckwheat V

分析第 V 组的聚类情况,其与前四组相差很大。该组内的 41 份苦荞品种仅能在遗传相似系数为 0.62 处聚在一起,显现出较大的遗传变幅,说明这部分种质不仅遗传多样性丰富,而且在总体的 210 份苦荞资源中属于遗传来源最为广泛的族群。结合其地域分布来看,主要来自西藏、陕西和贵州三省,这三处区域在自然环境上不但差异明显,而且其地理位置相差较远,可尽管如此,该 41 份材料依然能够在不同的生境中表现出一定的遗传相似度,并且各自还呈现出特定的聚类趋势,说明这部分种质基因型在长期自然进化或人为引种和杂交过程中获得了较多的突变,遗传变异覆盖率较高,而且其遗传信息还能够于一定程度上反映部分群体的遗传特征,既可以作为苦荞核心种质鉴定基础来源,又具备发掘优势基因的潜能。然而,由于目前针对荞麦开发的 SSR 引物数量依旧有限,而且多数引物的开发方式特异性不强,在荞麦全基因组信息尚不清晰的情况下,对苦荞核心种质的发掘还不够充分,局限性较强。本研究选择的 50 对在原文献中被报道扩增效应良好的 SSR 引物中,仅有 16 对表现出较高的多态性,说明目前荞麦的 SSR 分子标记仍处于基础阶段,引物的适用性不够普遍、功能性不显著,因此,有关苦荞 SSR 分子标记的研究还有待深入。

参 考 文 献:

[1] Lin R F, Chai Y. Production, research and academic exchanges of

China on buckwheat[C]//Advances in Buckwheat Research-Proceedings of the 10th International Symposium on Buckwheat. Yangling: Northwest A& F University Press, 2007:7-12.

[2] Wang QR, Takao O, Wang L. Research and development of new products from bitter-buckwheat[J]. Current Advances in Buckwheat Research, 1995:873-879.

[3] 谭 萍,方玉梅,王毅红,等.苦荞种子黄酮类化合物清除 DPPH 自由基的作用[J].食品研究与开发,2008,29(12):20-22.

[4] 韩淑英,吕 华,朱丽莎,等.荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J].中国药理学通报,2001,17(6):694-696.

[5] 刘淑梅,韩淑英,张宝忠,等.荞麦种子总黄酮对糖尿病高脂血症大鼠血脂、血糖及脂质过氧化的影响[J].中成药,2003,25(8):662-663.

[6] 罗光宏,陈天仁,祖廷勋,等.苦荞生物类黄酮及其测定方法研究进展[J].食品科学,2005,26(9):542-545.

[7] 王元福,陈晓玉,韩淑英,等.甜荞麦叶总黄酮镇痛抗炎作用的实验研究[J].上海中医药杂志,2004,38(11):54-55.

[8] 周小理,成少宁,周一鸣,等.苦荞芽中黄酮类化合物的抑菌作用研究[J].食品工业,2010,2:12-14.

[9] 闫斐艳,崔晓东,李玉英,等.苦荞麦黄酮对人食管癌细胞 EC9706 增殖的影响[J].中草药,2010,41(7):1142-1145.

[10] 郭晓娜,姚惠源.苦荞麦蛋白质对乳腺癌细胞的作用机制[J].食品与生物技术学报,2011,30(1):55-59.

[11] Frankel O H. Genetic perspectives of germplasm conservation[C]//Arber W, Limensee K, Peacock W J, et al, eds. Genetic Manipulation: Impact on Man and Society. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984:161-170.

[12] Frankel O H, Brown A H D. Plant genetic resources today: A critical appraisal[C]//Holden J H W, Williams J T. Crop Genetic Resources: Conservation & Evaluation. London: George Allen & Urwin

Ltd, 1984:249-257.

[13] Brown A H D. Core collections: A practical approach to genetic resources management[J]. Genome, 1989,31:818-824.

[14] Brown A H D. The case for core collections[C]//Brown A H D, Frankel O H, Marshall D R, et al. The Use of Plant Genetic Resources. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1989: 136-156.

[15] 李自超,张洪亮,孙传清,等.植物遗传资源核心种质研究现状与展望[J].中国农业大学学报,1999,4(5):51-62.

[16] 王建成,胡晋,张彩芳,等.建立在基因型值和分子标记信息上的水稻核心种质评价参数[J].中国水稻科学,2007,21(1):51-58.

[17] 邱丽娟,李英慧,关荣霞,等.大豆核心种质和微核心种质的构建、验证与研究进展[J].作物学报,2009,35(4):571-579.

[18] 郝晨阳,董玉琛,王兰芬,等.我国普通小麦核心种质的构建及遗传多样性分析[J].科学通报,2008,53(8):908-915.

[19] 林汝法.中国荞麦[M].北京:中国农业出版社,1994.

[20] 李安仁.中国植物志[M].北京:科学出版社,1998.

[21] 高帆,张宗文,吴斌.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[J].中国农业科学,2012,45(6):1042-1053.

[22] 刘勇,孙中海,刘德春,等.利用分子标记技术选择柚类核心种质资源[J].果树学报,2006,23(3):339-345.

[23] 周延清.DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M].北京:化学工业出版社,2005:131-143.

[24] 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.

[25] Konishi T, Iwata H, Yashiro K, et al. Development and characterization of microsatellite markers for common buckwheat[J]. Breeding Science, 2006,56:277-285.

[26] Kyung Ho Ma, Nam Soo Kim, Gi An Lee, et al. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*[J]. Theor Appl Genet, 2009,119(7):1247-1254.

[27] Li YQ, Shi TL, Zhang ZW. Development of microsatellite markers from tartary buckwheat[J]. Biotechnology letters, 2007,29(5):823-827.

[28] 韩瑞霞,张宗文,吴斌.苦荞 SSR 引物开发及其在遗传多样性分析中的应用[J].植物遗传资源学报,2012,13(5):759-764.

[29] 莫日更朝格图,王鹏科,高金锋,等.苦荞地方种质资源的遗传多样性分析[J].西北植物学报,2010,30(2):255-261.

[30] 田晓庆,徐宏亚,汪灿,等.用 SSR 标记分析荞麦栽培种质资源的遗传多样性[J].作物杂志,2013,5:28-32.

[31] 杨学文,丁素荣,胡陶,等.104 份苦荞种质的遗传多样性分析[J].作物杂志,2013,6:13-17.

[32] 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.

[33] 侯雅君,张宗文,吴斌,等.苦荞种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析[J].中国农业科学,2009,42(12):4166-4174.

[34] 赵丽娟,张宗文,黎裕,等.苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报,2006,7(2):159-164.

[35] 张文英,方正武,王凯华.苦荞地方品种 SRAP 标记遗传多样性分析[J].广东农业科学,2012,39(11):148-150.

[36] Do Ylej J, Do Ylej L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues[J]. Phytochemical Bulletin, 1987,19:11-15.

[37] Koji Tsuji, Ohmi Ohnishi. Phylogenetic position of east Tibetan natural populations in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert) revealed by RAPD analyses[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2001,48(1):63-67.

(上接第 257 页)

[33] Collins S L, Uno G E. Seed predation, seed dispersal, and disturbance in grasslands: a comment[J]. The American Naturalist, 1985, 125(6):866-872.

[34] 朱绍宏,徐长林,方强恩,等.白牦牛放牧强度对高寒草原植物群落物种多样性的影响[J].甘肃农业大学学报,2006,41(4):71-75.

[35] 汪诗平,李永宏,王艳芬,等.不同放牧率对内蒙古冷蒿草原植物多样性的影响[J].植物学报,2001,43(1):89-96.

[36] 罗天相,刘莎.中度放牧干扰对草地生物多样性影响的思考[J].安徽农业科学,2007,35(21):6567-6568,6612.

[37] 戎郁萍,韩建国,王培,等.放牧强度对草地土壤理化性质的影响[J].中国草地,2001,23(4):41-47.

[38] 刘忠宽,汪诗平,陈佐忠,等.不同放牧强度草原休牧后土壤养分和植物群落变化特征[J].生态学报,2006,26(6):2048-2056.

[39] 李希来.青藏高原黑土滩形成的自然因素与生物学机制[J].草业科学,2002,19(1):20-22.

[40] 张继权,刘兴朋,佟志军.草原火灾风险评价与分区—以吉林省西部草原为例[J].地理研究,2007,26(4):755-762.

[41] 刘桂香,苏和,李石磊.内蒙古草原火灾概述[J].中国草地,1999,4:76-78.

[42] Noy – Meir I. Interactive effects of fire and grazing on structure and diversity of Mediterranean grasslands[J]. Journal of Vegetation Science, 1995,6(5):701-710.