

苦荞 SSR 引物开发及其在遗传多样性分析中的应用

韩瑞霞^{1,2}, 张宗文^{2,3}, 吴斌², 李艳琴¹

(¹山西大学生物技术研究所, 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:苦荞在中国已经成为广受欢迎的健康食品。本研究通过选择性扩增微卫星序列、体外重组扩增产物和构建 SSR 富集文库, 开发出了一种简便的重组微卫星引物设计方法。通过这种方法, 设计合成 500 对 SSR 引物, 在苦荞上的有效性约 50%, 多态率达 10.8%, PIC 平均值为 0.3600。利用其中的 28 对 SSR 引物, 在苦荞核心种质中检测出等位基因 85 个, 每位点的等位基因数为 2~5 个, 平均 3.0 个。不同地理来源的苦荞种质资源的 Shannon-Weaver 多样性指数为 0.3633~0.6671, 来自云南、四川和西藏的苦荞材料不但遗传多样性丰富, 而且亲缘关系较近, 进一步证实苦荞起源于中国西南部。本研究证明重组微卫星引物设计方法开发的引物对苦荞非常有效, 将有助于促进苦荞种质资源遗传多样性、有用基因发掘和分子标记辅助育种研究。

关键词:苦荞; SSR 标记; 遗传多样性

Development of SSR Markers and Application in Analysis of Genetic Diversity in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)

HAN Rui-xia^{1,2}, ZHANG Zong-wen^{2,3}, WU Bin², LI Yan-qin¹

(¹Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006; ²Institute of Crop

Science of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³Bioversity International, Office for East Asia, Beijing 100081)

Abstract: Tartary buckwheat has become a popular health food in China. In the current study, through selectively amplifying microsatellite-containing sequences, recombining the amplicons by redigestion and ligation, and constructing SSR loci library, an effective method of recombinant microsatellite amplification was developed. With this method, we designed 500 pairs of primers and tested tartary buckwheat. The effectiveness of these SSR primers in tartary buckwheat was about 50%, the polymorphic rate was 10.8%, and the average value of PIC was 0.3600. We analyzed the genetic diversity of core collection of tartary buckwheat with 28 SSR markers. A total of 85 alleles were identified, ranging from 2 to 5 with an average of per locus. Shannon's information indices of geographical variation ranged from 0.3633 to 0.6671. The accessions from Yunnan, Sichuan and Tibet were not only abundant in genetic diversity but also had the closely phylogenetic relationship. This result further confirmed that tartary buckwheat originated from Southwestern China. This study demonstrates that the recombinant microsatellite amplification method for development of SSR primers in tartary buckwheat would be very effective, and will contribute to the researches on genetic diversity analysis, identification of useful traits, and marker-assistant breeding in tartary buckwheat.

Key words: Tartary buckwheat; SSR markers; Genetic diversity

苦荞 (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.), 又名鞑靼荞麦, 属于蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill) 双子叶植物, 在世界上很多国家都有种

植^[1]。在我国苦荞属于小宗作物, 主要分布在西南地区, 是当地的粮食作物之一, 尤其是四川省凉山彝族, 非常喜欢苦荞食品。苦荞含有其他粮食作物所

收稿日期: 2012-03-23 修回日期: 2012-04-09

基金项目: 国际生物多样性中心与中国农业科学院作物科学研究所合作项目 (APO2009/004)

作者简介: 韩瑞霞, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传研究。E-mail: hrx510954764@163.com

通讯作者: 吴斌, 博士, 主要从事荞麦和燕麦种质资源研究。E-mail: wubinah@yahoo.com.cn

李艳琴, 教授, 主要从事植物分子生物学及植物功能成分研究。E-mail: yanqin@sxu.edu.cn

缺乏的特种微量元素及药用成分,具有防治糖尿病和冠心病、降血脂、降血糖、安神、消炎等多种功能作用^[2-4]。我国苦荞栽培历史悠久,拥有十分丰富的种质,至今已经收集保存苦荞资源 1000 多份。

随着生物技术的快速发展,分子标记已经成为评估荞麦种质资源的遗传多样性的重要工具。王莉花等^[5]利用 RAPD 对 26 份云南野生荞麦资源进行了遗传多样性分析及亲缘关系比较,表明了云南荞麦资源种间比种内的多样性更丰富;Kump 等^[6]通过 RAPD 技术研究了青藏高原及周边地区的 40 份栽培和野生苦荞材料的遗传多样性,认为群体间遗传多态性大于群体内。Tsuji 等^[7]利用 AFLP 研究了野生和栽培苦荞居群之间的起源进化关系,而后利用 RAPD 揭示了西藏苦荞在天然群居中的起源进化地位^[8];赵丽娟等^[9]采用 ISSR 对 66 份苦荞种质资源进行了遗传多样性分析,揭示了我国不同地区苦荞资源的多样性和丰富度;侯雅君等^[10]利用 AFLP 标记对 14 个不同地理来源的苦荞种质资源进行研究,揭示了苦荞种质资源的地理分布特点和群体间的遗传关系。

表 1 供试材料及来源

Table 1 Name and origin of accessions tested

| 来源 Origin | 序号及名称 Code and name |
|-----------|--|
| 辽宁 | 1. 辽荞 75 号(苦) |
| 内蒙古 | 2. 陕西白,3. 苦荞,4. 苦荞,5. 苦荞 |
| 宁夏 | 6. 苦荞,7. 苦并荞 |
| 青海 | 8. 苦荞麦,9. 苦荞,46. 麻苦荞,47. 苦荞,48. 苦荞 K,49. 苦荞,108. 黑苦荞,109. 荞麦,110. 黑苦荞,111. 荞麦 |
| 西藏 | 10. 苦荞,11. 黑粒苦荞,12. 苦荞,13. 苦荞,14. 苦荞,15. 苦荞,75. 苦荞,76. 苦荞,77. 苦荞,78. 苦荞,79. 苦荞,80. 苦荞 |
| 山西 | 16. 荞麦,17. 苦荞,18. 苦荞,19. 苦荞,20. 蔓荞子,21. 苦荞,92. 岭东苦荞,93. 灵丘苦荞,94. 灵丘苦荞,95. 灵丘苦荞,96. 灵丘苦荞,97. 柳林苦荞,98. 中阳苦荞,99. 五台苦荞,100. 汾西苦荞,101. 汾西苦荞 |
| 陕西 | 22. 白苦荞,23. 苦荞,24. 苦荞,25. 黑苦荞 26. 苦荞,27. 苦荞,28. 苦荞,29. 苦荞,30. 小米苦荞,31. 苦荞,32. 苦荞,33. 苦荞,34. 苦荞,35. 苦荞,102. 苦荞 |
| 甘肃 | 36. 苦荞麦,37. 苦荞,38. 黑绿荞,39. 苦荞,40. 苦荞,41. 小荞麦,42. 荞麦(麻),43. 荞麦,44. 小荞,45. 麻苦荞,103. 苦荞,104. 金荞,105. 麻苦荞,106. 苦荞,107. 甘荞 1 号 |
| 四川 | 50. 额洛乌起,51. 额拉,52. 额乌,53. 大额楚,130. 黑苦荞,131. 前山苦荞,132. 初额,133. 额洛木尔惹,150. 苦荞,151. 若苦荞,152. 苦荞,153. 额去瓦子,154. 额刺,155. 老鸱苦荞,156. 苦荞,157. 苦荞,158. 苦荞,159. 苦荞,160. 刺荞,161. 苦荞,162. 苦荞 |
| 安徽 | 54. 82-8-1,55. 82-4-6,112. 苦荞,113. 苦荞麦,114. 苦荞麦 |
| 江西 | 56. 彭泽苦荞,57. 九江苦荞 |
| 贵州 | 58. 长尖咀苦荞,59. 黑苦荞,60. 苦荞,61. 苦荞,62. 毕节黑苦荞,134. 苦荞,135. 水城苦荞,136. 90-3,137. 混选一号,138. 90-5,139. 威黑 II-3,140. 麻子荞 |
| 云南 | 63. 刺荞,64. 贡山苦荞,65. 中甸苦荞,66. 营盘苦荞,67. 马街苦荞,68. 长咀苦荞,69. 米苦荞,70. 田子荞,71. 大苦荞,72. 扁子荞,73. 细苦荞,74. 白云苦荞,141. 格那务起,142. 内蒙荞,143. 粗额,163. 剑川秋荞,164. 寻甸尖嘴苦,165. 姚安西拉,166. 嵩明苦荞 |
| 湖北 | 115. 苦荞,116. 苦荞,117. 苦荞,118. 苦荞,119. 苦荞,120. 苦米儿荞,121. 苦荞,122. 苦荞,123. 苦荞,124. 苦荞,125. 苦荞 |
| 湖南 | 126. 凤凰苦荞,127. 新邵苦荞,128. 塘弯苦荞,129. 洗马苦荞 |
| 广西 | 144. 苦荞,145. 苦荞,146. 苦荞,147. 苦荞,148. 苦荞,149. 苦荞 |
| 尼泊尔 | 81. 87-23(F6080), 82. 87-25(F6224), 83. 87-26(F6245), 84. 87-28(F6286), 85. 87-29(F6378), 86. 88-23(IV-708), 87. 88-27(IV-63), 88. 88-28(IV-51), 89. 88-29(IV-136), 90. 88-35(V-121), 91. 87-16(F3035) |

SSR 标记具有多态性好、灵敏度高、共显性、稳定可靠等优点,成为遗传多样性研究的最佳选择。Iwata 等^[11]利用 5 对 SSR 标记分析日本甜荞,揭示出较高的多态性水平。Konishi 等^[12]开发了 54 对 SSR 引物对甜荞居群的遗传变异进行检测。Ma 等^[13]开发得到 20 对 SSR 引物评估不同地理来源的甜荞遗传多样性。莫日更朝格图等^[14]利用来自文献里的 SSR 引物分析了 82 份中国地方苦荞种质资源遗传多样性。但与其他作物相比,苦荞可利用的 SSR 引物很少,远不能满足资源鉴定和基因发掘方面的需要。本研究通过一种新的 SSR 引物方法,开发有效的荞麦 SSR 引物,并应用于苦荞核心种质遗传多样性分析,本研究的结果对苦荞种质资源研究、优异基因发掘和分子标记辅助育种有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

苦荞核心种质资源 166 份(表 1),其中 155 份来自我国 16 个省市,另有 11 份来自尼泊尔。供试材料全部由中国农业科学院国家种质库提供。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取苦荞幼苗时期的叶片。使用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Biotake, China) 提取苦荞 DNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,紫外分光光度计测定其浓度。-20℃ 保存。

1.2.2 SSR 引物开发 DNA 模板制备 以苦荞为试验材料,用 5 U *MspI*, *EcoRI* (NEB) 对苦荞基因组 DNA (1μg) 酶切,37℃ 过夜,连接通用接头。

EcoRI 接头序列: 5'-CTAATACGACTCACTAT-AGCCGGCAGACTGCGTACCAATT-3',

反向序列为: 5'-GGTACGCAGTCTGCCGGCTAT-AGTGAGTCGTATTAGA-3',

MspI 接头序列: 5'-CTAATACGACTCACTAT-AGCCGGCGACGACCGACGAG-3',

反向序列: 5'-CGCTCGTCGGTCGTCGCCGGC-TATAGTGAGTCGTATTA-3',

连接后,进行抑制 PCR,引物量为 10pmol,序列为 5'-CTAATACGACTCACTATAGCCG-3',酶切连接产物 2μl 作为模板。

选扩微卫星、重组 选扩含不同 SSR 位点的片段,酶切连接。选扩的引物是锚定 SSR 引物 PCT6 和一个抑制引物,锚定 SSR 引物序列为 5'-KK-VRVVRTCTCTCTCT-3' (其中 K 代表 G 和 T; R 代表 A 和 G; V 代表 A, C 和 G)。取 5μl 稀释的产物作为模板,进行 Touchdown PCR。PCR 程序为: 92℃ 60s,退火温度从 65℃ 降低到 57℃ 60s,延伸 72℃ 90s,共 37 个循环。扩增后用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化扩增产物, *NaeI* (5 U) 37℃ 酶切 3h。酶切后再纯化,去接头,以 PCT6 (40 pmol) 为引物,再进行 Touchdown PCR。

构建 SSR 文库 将 PCR 产物直接连接到质粒载体 pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 后转化到 *Escherichia coli* TOP 10 中,将克隆产物在含 *Amp* 的 100μl LB 培养基中 37℃ 培养 4h,PCR 筛选,ABI 3730xl 测序。

SSR 位点筛选 设计反向引物,利用染色体步移得到全部 SSR 位点^[15]。阳性克隆测序后通过 primer3^[16] 设计 SSR 基序的引物,结合抑制引物,以连接接头的 DNA 为模板,扩增反向的 SSR 侧翼序列。接头端的巢式引物序列为:

NP1: 5'-ACTATAGCCGGCAGACTGCGT-3' (for *EcoRI* adaptor-ligated DNA),

NP2: 5'-ACTATAGCCGGCGACGACCGA-3' (for

MspI adaptor-ligated DNA),

通过基因组步移法得到一些 SSR 位点。

PCR 扩增,设计合成引物 按照 SSR 位点测序结果设计特异序列 SSR 引物,PCR 扩增,将扩增产物变性,6% 变性 PAGE 分离,银染^[17],可以看到 SSR 扩增的目的条带。再扩增,测序,并合成引物,引物序列由 Invitrogen 生物公司合成。

1.2.3 SSR 引物有效性检测 利用开发的引物对苦荞核心种质进行 PCR 扩增,反应体系 (20μl) 中含 10 × buffer 2μl, dNTP (2.5mmol/L) 0.4μl, 引物 (10mmol/L) 0.6μl, *Taq* DNA 聚合酶 (2.5U/μl) 0.4μl, DNA 模板 50ng, ddH₂O 15μl。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7min, 4℃ 保存。所需的各种试剂购自天根生化有限公司。PCR 扩增在 biorad (MyCycler) 型 PCR 仪进行。扩增产物在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染^[17] 显影,照相保存。

1.2.4 数据处理与聚类分析 在 PAGE 胶中相同迁移位置上,有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 999,构建 [1, 0] 二元数据矩阵。应用 Popgen Ver. 1.32 软件计算 Shannon-Weaver 多样性指数 *I* 和遗传一致度等遗传多样性参数。按照类平均法 (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages),采用 NTSYS-pc 2.2^[18] 进行聚类分析。SSR 位点的多态性信息量根据 Anderson 等^[19] 提出的公式 $PIC = 1 - \sum P_i^2$ 计算,其中 P_i 表示某一位点的第 *i* 个等位变异的基因频率。

2 结果与分析

2.1 苦荞 SSR 引物开发

2.1.1 SSR 引物开发效率 本研究通过对苦荞基因组 DNA 进行 SSR 片段选择性扩增,结合锚定的 SSR 基序和接头引物,将来自不同基因组位点的扩增产物酶切、连接和片段扩增,然后以含有 SSR 基序的重组体为引物,进行 PCR 扩增,连接到 T 载体,测序后构建 SSR 文库。利用这种重组微卫星引物设计方法,共设计合成 500 对 SSR 引物,然后在苦荞核心种质上对这些引物进行了检测,其中 249 对引物能够扩增到清晰单一的条带,约占 50%; 其中有 54 对引物可以扩增得到清晰且具多态性的条带,有效率达 10.8%。

2.2.2 SSR 引物的多态性 经进一步筛选,采用其中 28 对较突出的多态性引物,对 166 份苦荞核心

种质资源进行 PCR 扩增,共检测出 85 个等位变异,每个位点有 2 ~ 5 个等位变异,其中 BM28、BM202

和 BM486 检测到最多的等位变异数均为 5 个。图 1 是引物 BM486 在部分材料中的扩增结果。

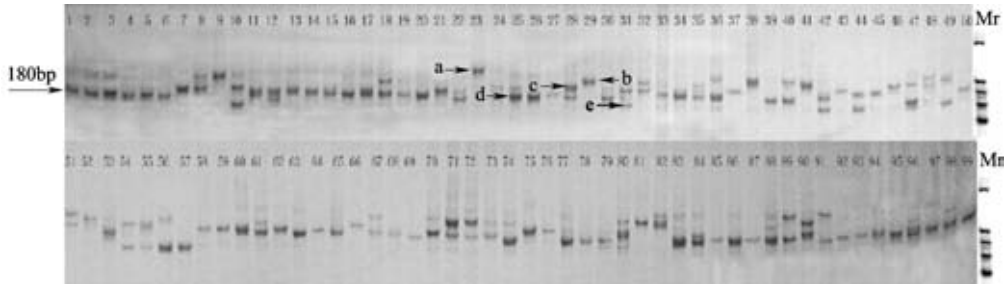


图 1 引物 BM486 在部分苦荞材料中的扩增结果

Fig. 1 DNA fragments amplified by BM486 in tartary buckwheat

a、b、c、d 和 e 分别代表 5 个等位基因;Mr 为 50Ubp DNA Marker, 条带大小分别是 300bp、200bp、180bp、160bp 和 140bp
a、b、c、d and e represent the five alleles p;Mr means 50bp DNA Marker, the sizes of bands are 300bp、200bp、180bp、160bp and 140bp

在 28 对 SSR 引物中,其期望杂合度和表观杂合度变化范围分别为 0.0586 ~ 0.7463 和 0.0241 ~ 0.9699,平均值分别为 0.3099 和 0.4169。绝大多数的表观杂合度小于期望杂合度,只有 6 对引物的表观杂合度略大于期望杂合度。多态信息指数(PIC)变化幅度为 0.1383 (BM3) ~ 0.7015 (BM28),平均值为 0.3600(表 2)。

表 2 SSR 引物的多态性检测结果

Table 2 The polymorphism analysis of 28 SSR primer pairs in tartary buckwheat

| 引物名称 Primer | 等位基因数 No. of alleles | 表观杂合度 <i>H_o</i> | 期望杂合度 <i>H_e</i> | 多态信息含量 <i>PIC</i> |
|----------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| BM3 | 4 | 0.1084 | 0.1257 | 0.1383 |
| BM4 | 2 | 0.0783 | 0.0755 | 0.2109 |
| BM11 | 4 | 0.3517 | 0.6799 | 0.6105 |
| BM28 | 5 | 0.3484 | 0.7463 | 0.7015 |
| BM192 | 2 | 0.0904 | 0.5000 | 0.3743 |
| BM202 | 5 | 0.3916 | 0.4577 | 0.4172 |
| BM225 | 3 | 0.3012 | 0.2718 | 0.2388 |
| BM254 | 2 | 0.3758 | 0.5014 | 0.3749 |
| BM256 | 2 | 0.0241 | 0.0586 | 0.1567 |
| BM257 | 3 | 0.7470 | 0.4802 | 0.3777 |
| BM270 | 3 | 0.2500 | 0.3820 | 0.3170 |
| BM272 | 2 | 0.3735 | 0.3047 | 0.2576 |
| BM274 | 3 | 0.4699 | 0.3873 | 0.3329 |
| BM281 | 3 | 0.3253 | 0.4916 | 0.4215 |
| BM287 | 2 | 0.3091 | 0.4625 | 0.3548 |
| BM312 | 3 | 0.9699 | 0.5041 | 0.3794 |

续表

| 引物名称 Primer | 等位基因数 No. of alleles | 表观杂合度 <i>H_o</i> | 期望杂合度 <i>H_e</i> | 多态信息含量 <i>PIC</i> |
|----------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| BM318 | 4 | 0.4277 | 0.6770 | 0.6162 |
| BM347 | 3 | 0.0241 | 0.2890 | 0.2662 |
| BM362 | 2 | 0.2485 | 0.4625 | 0.3548 |
| BM387 | 2 | 0.1386 | 0.1599 | 0.1467 |
| BM398 | 3 | 0.2349 | 0.4438 | 0.4010 |
| BM403 | 3 | 0.4096 | 0.5534 | 0.4524 |
| BM424 | 3 | 0.2545 | 0.4264 | 0.3639 |
| BM451 | 4 | 0.2289 | 0.2721 | 0.2536 |
| BM461 | 3 | 0.4578 | 0.5194 | 0.4161 |
| BM474 | 3 | 0.2651 | 0.4908 | 0.3724 |
| BM481 | 2 | 0.1506 | 0.2438 | 0.2136 |
| BM486 | 5 | 0.3203 | 0.7051 | 0.6585 |
| 平均 Mean | 3.0357 | 0.3099 | 0.4169 | 0.3600 |

2.2 苦荞种质 SSR 标记遗传多样性

2.2.1 不同来源组群苦荞种质遗传多样性 按照不同的地理来源将 166 份苦荞资源分为 14 个组群,其中材料来源较少的与其毗邻的省份分为同组。通过对不同来源供试材料的香农信息指数与杂合度的分析,可以揭示出不同来源组群间的遗传多样性。从表 3 中可以看出,不同来源组群多样性指数变化范围从 0.3633 ~ 0.6671,其中最高值是来自四川的品种,其次是产自云南(0.6200)、西藏(0.6193)和尼泊尔(0.5692),来自内蒙古/辽宁的品种香农指数最低。不同来源地的苦荞其表观杂合度和期望杂

合度分别是 0.2243 ~ 0.3988 和 0.2590 ~ 0.4210。

表 3 基于 SSR 的不同来源组群苦荞种质遗传多样性指数
Table 3 Shannon-Weaver indices of groups of tartary buckwheat germplasm from different origins based on SSR

| 来源地 Origin | 香农信息指数 Shannon-Weaver index | 表观杂合度 <i>H_o</i> | 期望杂合度 <i>H_e</i> |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 四川 | 0.6671 | 0.2889 | 0.3306 |
| 云南 | 0.6200 | 0.3796 | 0.4210 |
| 西藏 | 0.6193 | 0.2722 | 0.3401 |
| 尼泊尔 | 0.5692 | 0.3614 | 0.3815 |
| 贵州 | 0.5673 | 0.3988 | 0.3615 |
| 甘肃/宁夏 | 0.5666 | 0.2458 | 0.3468 |
| 青海 | 0.5433 | 0.2243 | 0.2728 |
| 陕西 | 0.5419 | 0.3546 | 0.3088 |
| 广西 | 0.5234 | 0.3956 | 0.4057 |
| 湖北 | 0.5116 | 0.3200 | 0.3957 |
| 湖南 | 0.4541 | 0.2689 | 0.3711 |
| 山西 | 0.4510 | 0.2827 | 0.3490 |
| 江西/安徽 | 0.4498 | 0.2946 | 0.3482 |
| 辽宁/内蒙古 | 0.3633 | 0.2625 | 0.2590 |

表 4 苦荞种质不同来源组群间遗传一致度

Table 4 Nei's genetic identity among groups of tartary buckwheat germplasm from different origins

| 来源地 Origins | 辽宁/内蒙古 Liaoning/ Inner Mongolia | 山西 Shanxi | 陕西 Shaanxi | 甘肃/宁夏 Gansu/ Ningxia | 江西/安徽 Jiangxi/ Anhui | 青海 Qinghai | 湖北 Hubei | 湖南 Hunan | 广西 Guangxi | 四川 Sichuan | 云南 Yunnan | 贵州 Guizhou | 西藏 Tibet |
|----------------|---------------------------------------|--------------|---------------|----------------------------|----------------------------|---------------|-------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-------------|
| 山西 | 0.9507 | | | | | | | | | | | | |
| 陕西 | 0.9124 | 0.9376 | | | | | | | | | | | |
| 甘肃/宁夏 | 0.8969 | 0.9223 | 0.9788 | | | | | | | | | | |
| 江西/安徽 | 0.8846 | 0.8582 | 0.8945 | 0.9004 | | | | | | | | | |
| 青海 | 0.8785 | 0.8865 | 0.9432 | 0.9691 | 0.8892 | | | | | | | | |
| 湖北 | 0.8987 | 0.8750 | 0.9134 | 0.9107 | 0.8754 | 0.8818 | | | | | | | |
| 湖南 | 0.8428 | 0.8481 | 0.8403 | 0.8583 | 0.8351 | 0.7877 | 0.8859 | | | | | | |
| 广西 | 0.8856 | 0.8957 | 0.9056 | 0.8911 | 0.8707 | 0.8335 | 0.9204 | 0.9243 | | | | | |
| 四川 | 0.8722 | 0.8611 | 0.8819 | 0.8996 | 0.8705 | 0.8663 | 0.8889 | 0.8726 | 0.8849 | | | | |
| 云南 | 0.8334 | 0.8067 | 0.8482 | 0.8736 | 0.8383 | 0.8497 | 0.8376 | 0.8227 | 0.8064 | 0.9690 | | | |
| 贵州 | 0.8418 | 0.8137 | 0.8349 | 0.8681 | 0.8536 | 0.8366 | 0.8776 | 0.8774 | 0.8425 | 0.9525 | 0.9563 | | |
| 西藏 | 0.8291 | 0.8543 | 0.8705 | 0.8665 | 0.7988 | 0.8461 | 0.8049 | 0.7843 | 0.7842 | 0.8874 | 0.8710 | 0.8594 | |
| 尼泊尔 | 0.8791 | 0.8967 | 0.8971 | 0.8844 | 0.8097 | 0.8613 | 0.8469 | 0.8232 | 0.8153 | 0.8862 | 0.8768 | 0.8714 | 0.9474 |

北地区,湖北、湖南、广西聚为第 II 大类,西藏、贵州、四川、云南及尼泊尔资源聚为第 III 大类。进一步细分在遗传一致度为 0.886 处,第 I 大类可分为江西/安徽亚类和辽宁/内蒙古、山西、陕西、宁夏/甘肃、青

2.2.2 不同来源组群间苦荞种质的遗传关系 采用 PopGen version 1.32 软件,根据 Nei's 方法分析苦荞群体的遗传一致度(表 4),可以看出,14 个苦荞资源组群的遗传一致度变化范围为 0.7842 ~ 0.9788,变化范围较小。其中宁夏/甘肃与陕西遗传一致度水平较高,为 0.9788,其次为宁夏/甘肃与青海,遗传一致度为 0.9691;西藏与广西最低,为 0.7842,西藏与湖南次之,为 0.7843。来自中国北方(主要是辽宁/内蒙古、山西、陕西及甘肃/宁夏)的大部分苦荞材料的遗传关系比较近,而来自中国北方与南方的材料之间则有很大的区别。很明显,遗传一致度与地理分布有很大关系。

根据 Nei's 遗传一致度采用 NTSYS-pc2.2 软件对供试的 14 个组群进行聚类(图 2)。从图中看出来自陕西的材料与来自甘肃/宁夏的苦荞材料距离非常近,来自四川的材料与来自云南的密切相关。14 个组群在遗传一致度 0.868 处可以分为三大类,第 I 大类包括东北、华北部分地区及青海、甘肃等西

海等亚类;第 III 大类可分为西藏、尼泊尔亚类和贵州、四川、云南亚类。聚类结果表明,供试的苦荞资源群间具有较近的亲缘关系,同时还具有明显的地域性。

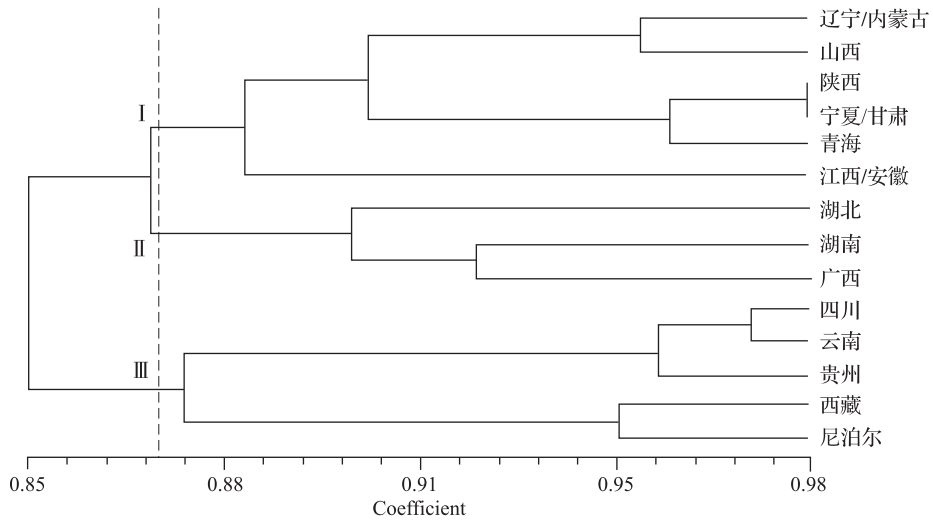


图2 基于遗传一致度的不同来源苦荞种质组群的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of groups of tartary buckwheat germplasm from different geographic origins based on genetic identity

3 讨论

3.1 苦荞 SSR 引物开发

SSR 分子标记近年来被广泛应用于作物的起源、进化以及遗传多样性等研究。本研究自主开发 SSR 引物的方法与传统的技术比较有很多优势。通过对包含 SSR 基序的锚定引物选扩,省去利用链酶亲和素磁珠富集这一步骤,设计 SSR 引物更快速、简洁、廉价,产生的杂带较少,同时效率更高。利用该方法设计开发了 500 对 SSR 引物,经苦荞核心种质检测,其中 54 对引物能够扩增出较好的多态性条带,占 10.8%,比 Ma 等^[13]开发甜荞 SSR 引物得到的多态性引物比率(7.4%)要高,但是比 Konishi 等^[12]开发的甜荞多态性 SSR 引物(26.7%)要低很多。无患子科的荔枝^[20]的引物多态性为 41.5%,而禾本科的小麦^[21]为 58.3%,比率更低。从检测出的等位变异看,每个引物平均检测到 3 个等位变异。与其他作物比较,等位基因数目偏少。引物 BM202 扩增得到 5 个等位基因,而该引物的 PIC 值相对较低,表明开发的 SSR 引物可以用于检测特殊变异,因此认为可以利用该方法进行大量的苦荞 SSR 引物开发,为苦荞研究提供更有用的分子标记。

3.2 苦荞种质的遗传多样性与亲缘关系探讨

从 SSR 标记分析结果看出,不同地理来源的苦荞资源的遗传一致度整体水平较高,而群体遗传变异适中,这可能是人为因素或者环境压力影响使得材料之间亲缘关系渐近。Shannon-Weaver index 变化幅度为 0.3633 ~ 0.6671,显示出不同地理来源组群之间存在明显的遗传多样性差异,其中来自四川、

云南和西藏的材料遗传多样性较高,其次为尼泊尔和贵州,表明我国西南及比邻地区是苦荞种质遗传多样性水平最高的地方。复杂的地理和生态变异可能是导致这种情况的原因之一,民族文化差异也是主要原因,特别是彝族,利用并保存着大量苦荞种质资源,具有良好的社会人文基础。

物种的遗传多样性与其地理分布有一定关系。云南、四川、贵州、西藏和尼泊尔组群材料聚类在一个大组中,而辽宁/内蒙古、山西、陕西和甘肃/宁夏聚为一大类,显然苦荞种质亲缘关系与其地理来源有密切关系,这与侯雅君等^[10]的 AFLP 苦荞种质资源遗传多样性研究结果相一致。作物的遗传多样性与其起源进化密切相关。早期研究大多认为苦荞起源中国西南地区。Tsuiji 等^[22]通过调查研究野生苦荞和栽培苦荞的进化关系,认为栽培苦荞的起源地可能是云南的西北地区。后来, Tsuiji 等^[8]的研究显示西藏西部地区可能是野生苦荞的起源地。本研究结果显示云南、四川和西藏苦荞种质具有较高的遗传多样性,因而支持西南地区是苦荞起源地学说。

参考文献

- [1] 李安仁. 中国植物志(第四十七卷. 第二分册)[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [2] 刘淑梅, 韩淑英, 张宝忠, 等. 荞麦种子总黄酮对糖尿病高血脂症大鼠血脂、血糖及脂质过氧化的影响[J]. 中成药, 2003(8): 662-663
- [3] 李洁, 梁月琴, 郝一彬. 苦荞麦黄酮降血脂作用的实验研究[J]. 山西医科大学学报, 2004(6): 570-570
- [4] 汪得清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪总黄酮对羟自由基所致哺乳动物细胞损伤的防护作用[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 240-242
- [5] 王莉花, 殷富有, 刘继梅, 等. 利用 RAPD 分析云南野生荞麦