

繁殖群体量及隔离对蚕豆种质遗传完整性的影响

刘敏^{1,2}, 辛霞¹, 张志娥¹, 陈晓玲¹, 张金梅¹, 卢新雄¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要: 为研究繁殖群体量和隔离方式对常异花授粉作物蚕豆种质繁殖更新的影响, 以9份蚕豆地方种质为对象, 以国家库保存的原种为对照群体, 采用 AFLP 分子标记方法, 对比了 50 株和 20 株群体量及开放无隔离群体和网棚隔离群体更新后代的遗传完整性差异。结果表明: 与对照群体相比, 50 株和 20 株群体的多态性位点数、多态位点百分率、每位点有效等位基因数、香农指数、遗传多样性指数均出现不同程度下降, 但下降幅度 20 株大于 50 株群体; 遗传相似性和 UPGMA 聚类分析表明 50 株群体与对照群体的遗传相似性高于 20 株群体; 网棚隔离可降低群体间串粉与花粉污染, 但其遗传完整性却较开放无隔离群体低。

关键词: 蚕豆; 繁殖更新; AFLP; 遗传完整性; 种质保存

Effect of Sample Sizes and Isolation Methods on Genetic Integrity of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Germplasm

LIU Min^{1,2}, XIN Xia¹, ZHANG Zhi-e¹, CHEN Xiao-ling¹, ZHANG Jin-mei¹, LU Xin-xiong¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: The genetic integrity of nine faba bean landraces and their regeneration groups were studied to investigate the effects of sample sizes and isolation methods on the regeneration of faba bean (*Vicia faba* L.) using AFLP markers. Seeds stored in the national genebank were used as control. The results showed that: compared with those of the control group, the number of polymorphic loci, percentage of polymorphic loci, effective number of alleles per locus, Shannon index, and genetic diversity index decreased in 50 and 20 plants groups, but the decline was greater in 20 plants group. Genetic similarity analysis and UPGMA cluster results showed that the genetic similarity between control and 50 plants group was higher than that between control and 20 plants group. Cages isolation can reduce pollen contamination, but their genetic integrity was lower than that of the open pollination groups.

Key words: *Vicia faba* L.; Regeneration; AFLP; Genetic integrity; Germplasm conservation

确保种质及时更新并维持其遗传完整性是种质库管理者面临的最核心课题^[1-3]。但有报道指出, 个别种质库在繁殖更新过程中, 多达 50% 的原始种质样品已丧失生活力或更新后发生了遗传漂变^[4]。而导致种质遗传完整性发生变化的主要影响因素包括种子老化、繁殖群体量、繁殖世代和授粉方式等^[5-11]。Gale 等^[12]认为, 对于

异花授粉作物, 种质繁殖群体量的大小就如一个“瓶颈”, 若在一次繁殖世代中群体量太小, 那么在其它繁殖世代中增大群体量也是徒劳的。虽然从理论上讲, 一个无限大的异花授粉作物群体, 在没有突变、选择和外源花粉的前提下, 通过完全随机交配, 其原有的群体遗传结构可以代代相传。但在种质繁殖更新实践中, 无限大的繁殖群体量

收稿日期: 2011-05-10 修回日期: 2011-12-12

基金项目: 中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610032012006);

农作物种质资源保护利用专项(2130135)

作者简介: 刘敏, 硕士研究生, 主要从事种质资源遗传完整性研究。E-mail: liumin615@126.com

通讯作者: 卢新雄, 研究员。E-mail: xxlu@caas.net.cn

是无法采用的,因此适宜繁殖群体量的确定是非常重要的。

AFLP 分子标记技术具有多态性丰富、结果可靠稳定、重复性好、所需 DNA 量少,且可以在基因组序列未知的情况下进行研究等优点^[13],近年来已有学者利用该技术进行种质遗传完整性的研究。如 Treuren 等^[14]利用该技术检测到了多年生黑麦草资源在繁殖更新中存在外来花粉的污染。王栋等^[15]在大豆种质遗传完整性研究中,发现 AFLP 标记检测多态性位点多于 SSR 标记,表明 AFLP 标记更适用于种质遗传完整性变化的分析研究。蚕豆是典型的常异花授粉作物,自然条件下其异交率一般为 20%~40%^[16],目前利用 AFLP 分子标记技术研究蚕豆种质遗传完整性的变化,国内外鲜有报道。且在国家种质库长期保存 4400 余份蚕豆资源中,大部分资源的贮存年限已超过 20 年,需要考虑繁殖更新问题。本研究以蚕豆地方品种为材料,利用 AFLP 标记分析繁殖群体量及隔离方式对蚕豆种质遗传完整性的影响,以期蚕豆种质资源繁殖更新标准的制定提供科学的理论与实践指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

9 份蚕豆 (*Vicia faba* L.) 地方品种(表 1),于 2008 年在福州的福建农科院试验地繁殖。大田开放授粉群体,每份种质繁殖群体量设 50 株和 20 株两个处理。繁殖群体量是指实验设计的成苗植株数,实际收获株数见表 1。在所有群体外围种植 2 行油菜,引诱昆虫传粉。网棚隔离,选取其中的鸭子嘴、祥云豆、小粒蚕豆 3 份种质,种植于一全封闭网棚内,棚内无昆虫传粉,亦无人工授粉,繁殖群体量为 20 株。种子采取单株单荚法收获,烘干后置于 4℃ 下贮藏备用。以保存在国家种质长期库的同一份种质(不经繁殖)为对照(CK)。

1.2 DNA 提取与检测

每个群体选取 70 粒种子盆栽,尽量选择来自不同株的种子,若因收获株数限制,则保证所取种子来自不同荚。将种子播种于蛭石中并在培养箱内进行变温培养。每天光照 16h,温度为 25℃;黑暗 8h,温度为 20℃,相对湿度为 80%。幼苗长至三叶期,分别从不同处理群体中随机取 60 株,使用植物基因组 DNA 提取系统(天根生化科技有限公司)单株提取 DNA,使用 UV-4802 型紫外可见分光光度计测定

表 1 供试蚕豆种质群体

Table 1 Faba bean germplasm populations used in the study

序号 No.	统一编号 Accession No.	品种名称 Variety	来源 Origin	处理群体 Population size	收获株数 Plants harvested
1	H0001182	沁后本	福建	50	47
				20	19
2	H0003911	绿小粒种	浙江	50	40
				20	15
3	H0001463	胡豆	四川	50	39
				20	16
4	H0002550	青皮蚕豆	江苏	50	41
				20	13
5	H0001605	鸭子嘴	湖北	50	50
				20	15
				20-DP	12
6	H0000174	祥云豆	云南	50	36
				20	20
				20-DP	8
7	H0002544	小粒蚕豆	广西	50	44
				20	10
				20-DP	6
8	H0000148	西亭白皮	江苏	50	25
				20	10
9	H0000147	土豆仔	福建	50	44
				20	9

50: 繁殖群体量为 50 株的开放无隔离群体; 20: 繁殖群体量为 20 株的开放无隔离群体; 20-DP: 繁殖群体量为 20 株的网棚隔离群体

50: 50 plants group in open-pollination; 20: 20 plants group in open-pollination; 20-DP: 20 plants group in cages

DNA 浓度,并用 1% Agarose 胶检测 DNA 的质量。用 0.1 × TE 将 DNA 稀释成相同浓度(100ng/μl), 4℃ 下保存备用。

1.3 AFLP 分析

AFLP 实验程序参照 Zong 等^[17]的方法。经过引物筛选,最终从 64 对 *EcoRI/MseI* 引物组合中选取了 8 对引物组合用于 AFLP 分析。选用的 8 对引物组合见表 2。

1.4 统计分析

统计扩增条带,在同一迁移率上有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 9,并参照 10bp ladder marker 估计片段大小。使用 GenAlEx 6.41^[18]计算出 30 个蚕豆种质群体每个位点的等位基因频率;用 POPGENE ver. 1.32 完成供试群体的多态位点数、多态位点百

分数(P)、每位点有效等位基因数(A_e)、遗传多样性指数(H)和香农指数(I)等遗传多样性参数的计算;利用 SPSS (18.0) 对各处理群体与对照群体的所有位点等位基因频率及所有位点相应遗传多样性参数进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。用 MEGA 根据群体间 Nei's 遗传相似系数进行非加权类平均法(UPGMA)聚类分析,使用“WinBoot”通过重抽样对支序图节点的可靠性进行评估(bootstrap analysis)。

2 结果与分析

2.1 引物扩增多态性

利用 8 对 AFLP 引物组合对 30 个供试蚕豆种质群体进行检测,共得到 192 条清晰可辨的条带,每个引物组合的条带数为 19~29,平均为 24(表 2)。引物组合 AGC/CTA 扩增小粒蚕豆 50 株群体的电

泳图谱见图 1。

表 2 8 对 *EcoR* I/*Mse* I 引物组合的多态百分率

Table 2 Level of polymorphism revealed by the eight *EcoR* I/*Mse* I primer pairs

引物组合 Primer pairs	总条带数 No. of bands	多态条带数 No. of polymorphic bands	多态条带百分率(%) Percentage of polymorphic bands
AGG/CAA	23	13	56.52
AGG/CTA	22	18	81.82
AGG/CTC	19	16	84.21
ACG/CTA	25	22	88.00
AGC/CTA	29	22	75.82
AGC/CTT	28	21	75.00
ACT/CTC	24	20	83.33
AAG/CAG	22	11	50.00

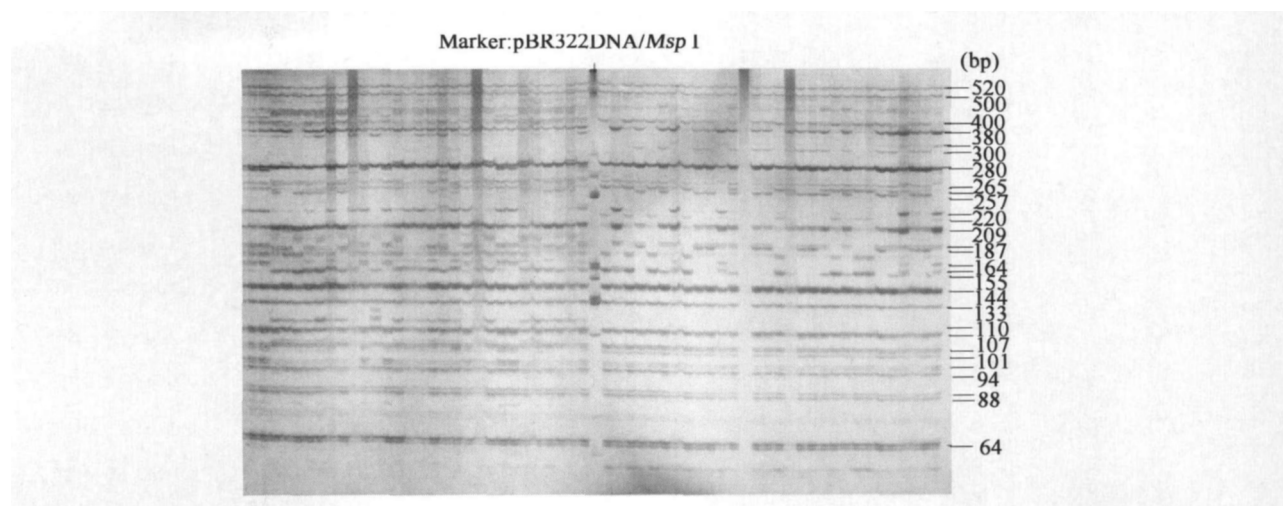


图 1 引物组合 AGC/CTA 扩增小粒蚕豆 50 株群体的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of AFLP with primer combinations AGC/CTA in population Xiaolicandou

2.2 繁殖群体量的比较

2.2.1 供试种质材料的等位基因频率方差分析

单因素方差分析结果显示供试蚕豆种质的 50 株、20 株群体的等位基因频率与对照群体相比差异不显著,它们本身之间差异也不显著。表明一次繁殖更新过程对蚕豆种质群体的等位基因频率影响不大。

2.2.2 供试种质材料的群体遗传结构分析 从表 3 可以看出,与对照群体相比 50 株、20 株群体的多态位点数、多态位点百分率均出现了下降。20 株群体下降幅度高于 50 株群体。更新群体的每位点有

效等位基因数、香农指数和遗传多样性指数也基本上出现了降低,20 株群体的下降幅度大于 50 株群体。结果表明繁殖更新后代群体在多态位点数目较对照低;相比于 50 株群体,20 株群体下降程度更大。单因素方差分析显示,对照群体、50 株群体、20 株群体之间的每位点有效等位基因数、香农指数以及遗传多样性指数均无显著差异。将 9 个品种看成 9 次重复,计算 50 株、20 株群体与对照群体间的平均差异,结果显示 20 株群体与对照群体的香农指数和遗传多样性指数有显著差异($P: 0.042, 0.049$),其余均无显著差异($P: 0.059 \sim 0.877$)。

表 3 供试蚕豆种质群体的遗传结构

Table 3 Genetic structure of the tested faba bean germplasm population

品种 Variety	群体 Population	多态位点数 <i>K</i>	多态位点百分数 <i>P</i>	每位点有效等位基因数 <i>Ae</i>	香农指数 <i>I</i>	遗传多样性指数 <i>H</i>
沁后本	CK	49	25.52	1.1774 ± 0.0243	0.1455 ± 0.0187	0.0995 ± 0.0131
	50	45	23.44	1.1643 ± 0.0235	0.1350 ± 0.0183	0.0924 ± 0.0127
	20	44	22.92	1.1500 ± 0.0224	0.1254 ± 0.0176	0.0853 ± 0.0122
绿小粒种	CK	58	30.21	1.2062 ± 0.0257	0.1678 ± 0.0197	0.1150 ± 0.0138
	50	55	28.65	1.2082 ± 0.0263	0.1660 ± 0.0199	0.1145 ± 0.0140
	20	53	27.60	1.1967 ± 0.0253	0.1599 ± 0.0195	0.1098 ± 0.0136
胡豆	CK	58	30.21	1.1887 ± 0.0242	0.1597 ± 0.0189	0.1078 ± 0.0132
	50	58	30.21	1.1739 ± 0.0223	0.1553 ± 0.0182	0.1032 ± 0.0125
	20	57	29.69	1.1915 ± 0.0239	0.1624 ± 0.0192	0.1102 ± 0.0133
青皮蚕豆	CK	48	25.00	1.1722 ± 0.0236	0.1435 ± 0.0185	0.0978 ± 0.0129
	50	41	21.35	1.1329 ± 0.0209	0.1139 ± 0.0168	0.0769 ± 0.0116
	20	41	21.35	1.1293 ± 0.0200	0.1145 ± 0.0165	0.0765 ± 0.0113
鸭子嘴	CK	64	33.33	1.1900 ± 0.0235	0.1672 ± 0.0187	0.1113 ± 0.0129
	50	58	30.21	1.1835 ± 0.0240	0.1555 ± 0.0187	0.1046 ± 0.0130
	20	56	29.17	1.1638 ± 0.0219	0.1462 ± 0.0179	0.0971 ± 0.0123
	20-DP	54	28.13	1.1509 ± 0.0210	0.1368 ± 0.0173	0.0903 ± 0.0118
祥云豆	CK	60	31.25	1.2118 ± 0.0259	0.1732 ± 0.0199	0.1185 ± 0.0139
	50	55	28.65	1.1859 ± 0.0239	0.1577 ± 0.0189	0.1068 ± 0.0131
	20	49	25.52	1.1764 ± 0.0237	0.1474 ± 0.0187	0.1005 ± 0.0130
	20-DP	49	25.52	1.1660 ± 0.0232	0.1399 ± 0.0182	0.0948 ± 0.0126
小粒蚕豆	CK	59	30.73	1.2061 ± 0.0253	0.1705 ± 0.0197	0.1164 ± 0.0137
	50	50	26.04	1.1641 ± 0.0227	0.1391 ± 0.0182	0.0943 ± 0.0126
	20	48	25.00	1.1745 ± 0.0235	0.1448 ± 0.0188	0.0993 ± 0.0130
	20-DP	48	25.00	1.1677 ± 0.0230	0.1410 ± 0.0184	0.0961 ± 0.0127
西亭白皮	CK	58	30.21	1.2131 ± 0.0256	0.1750 ± 0.0200	0.1200 ± 0.0139
	50	54	29.17	1.1951 ± 0.0244	0.1648 ± 0.0192	0.1118 ± 0.0133
	20	50	28.13	1.2064 ± 0.0260	0.1661 ± 0.0198	0.1144 ± 0.0139
土豆仔	CK	51	26.56	1.1878 ± 0.0248	0.1527 ± 0.0192	0.1049 ± 0.0134
	50	50	26.04	1.1845 ± 0.0248	0.1489 ± 0.0191	0.1025 ± 0.0134
	20	49	25.52	1.1900 ± 0.0257	0.1488 ± 0.0194	0.1035 ± 0.0137

K: 多态位点数; *P*: 多态位点百分率; *Ae*: 每位点有效等位基因数; *I*: 香农指数; *H*: 遗传多样性指数

K: No. of polymorphic loci; *P*: percentage of polymorphic loci; *Ae*: effective No. of alleles per locus; *I*: Shannon's information index; *H*: index of genetic diversity

2.2.3 遗传相似性分析 从表 4 可以看出 50 株群体与对照群体的遗传相似性高于 20 株群体。与对照群体遗传相似性最高的是鸭子嘴 50 株群体,为

0.9914,最低的是胡豆 20 株开放无隔离群体,为 0.9714。这表明,相比于 20 株群体,50 株群体维持原有群体的遗传完整性相对较好。

表 4 供试蚕豆种质更新群体与原始群体之间的遗传相似系数

Table 4 Genetic similarity coefficient between the regenerated and the original population

更新群体 Regenerated populations	原始群体 Original Populations								
	沁后本	绿小粒种	胡豆	青皮蚕豆	鸭子嘴	祥云豆	小粒蚕豆	西亭白皮	土豆仔
50	0.9834	0.9894	0.9730	0.9809	0.9914	0.9850	0.9752	0.9781	0.9830
20	0.9819	0.9858	0.9714	0.9800	0.9818	0.9810	0.9759	0.9762	0.9757
20-DP	-	-	-	-	0.9817	0.9801	0.9774	-	-

2.2.4 遗传距离树状图 从 UPGMA 聚类分析图 (图 2) 中可以看出, 30 个群体以品种为单位聚成 9 簇。所有种质的更新后代群体又形成一簇, 说明繁殖更新对群体的遗传结构产生了影响。50 株群体与对照群体的遗传距离小于 20 株群体, 这说明相比于 20 株群体, 50 株群体更利于保持群体的遗传完整性。这与遗传结构分析的结论相一致。

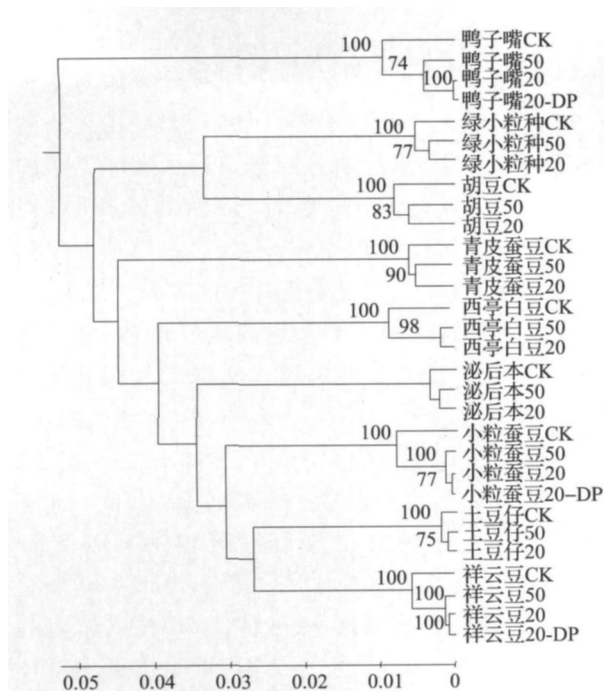


图 2 供试蚕豆群体 UPGMA 聚类分析

Fig. 2 UPGMA dendrogram of the tested *Vicia Faba* germplasm population.

线上数值为自展值

Integers above the line are bootstrap values > 50% from a maximum parsimony analysis

2.3 分子方差分析

利用 AMOVA (Analysis of molecular variance) 对分子方差的来源进行分析。将分子方差的变异来源分为 3 个层次: 种质间、种质内群体间和群体内个体间。根据表 5 可以看出多数变异来自于种质间 (53%), 只有少数差异来自于群体间 (5%)。

表 5 供试蚕豆群体品种间、群体间和个体间的分子方差变异分析

Table 5 AMOVA for *Vicia Faba* among variety, population and individual

变异来源 Source	自由度 df	平方和 SS	变异组成 Variance components	变异百分比 (%) Proportion of variation
品种间 AV	9	13797.856	8.597	53
群体间 AP	23	1041.183	0.739	5
群体内个体间 AI/WP	1605	10456.681	6.831	42

AV: Among Varieties; AP: Among Populations; AI/WP: Among Individuals / Within Populations

2.4 开放无隔离群体与网棚隔离群体的比较

单因素方差分析显示, 开放无隔离群体与网棚隔离群体的等位基因频率差异不显著。

与开放无隔离群体相比, 鸭子嘴的网棚隔离群体多态位点数出现了降低, 祥云豆和小粒蚕豆两份网棚隔离群体的每位点有效等位基因数、香农指数以及遗传多样性指数均出现了下降 (表 3)。表明相比于开放无隔离群体, 网棚隔离群体的遗传完整性出现下降。网棚隔离群体和开放无隔离群体与对照群体的遗传相似性差异不大 (鸭子嘴、祥云豆和小粒蚕豆分别为 0.9818: 0.9817、0.9810: 0.9801、0.9759: 0.9774) (表 4)。使用 McDermott^[19] 的公式 $N_m = 0.5 (1 - G_{st}) / G_{st}$ 计算群体间基因流, 开放无隔离群体间 N_m 值为 0.6067, 网棚隔离群体为 0.5927, 开放无隔离群体基因流动性大于网棚隔离群体, 表明网棚隔离阻碍了群体间的基因混杂, 减少了种质间的花粉流动与污染。

3 讨论

3.1 繁殖群体量对蚕豆种质遗传完整性变化的影响

繁殖更新群体量的大小是影响种质遗传完整性的重要因素^[20]。目前, 已经在多花菜豆^[21]、菜

藜^[22]、大豆^[23]、大白菜^[24]、芝麻^[25]、玉米^[26]、甘蓝^[27]和萝卜^[28]等作物中开展了适宜繁殖群体量的研究,适宜繁殖群体量从24到200不等。Crossa等^[29]指出更新时需要保存原始群体每位点等位基因的至少一个拷贝,并且根据等位基因数量及等位基因频率建立了确定最适更新群体量的模型。指出拥有2~4个等位基因的10个位点,如果要保存每位点至少一个拷贝等位基因,更新时需要89~100个个体。Marshall等^[30]的研究证明50~100株植物可以覆盖95%的位点(频率不低于0.05)。Breese^[5]则认为在尽量减少更新次数的前提下,可以用25~50株植物保持群体中的主要等位基因。国际干旱地区农业研究中心(ICARDA)指出,蚕豆地方种等遗传变异较高的品种需要在更新时种植150株,而纯系只需要种植20~30株即可^[31]。本研究采用50株和20株两个开放无隔离群体,与种质库原始种质相比较,统计了群体的遗传结构及遗传相似性,证明随着繁殖群体量的减少,多态性位点数、多态位点百分率都出现了下降,每位点有效等位基因数、香农指数、遗传多样性指数也基本上出现了降低,并且都低于对照种质群体。50株群体与对照群体的遗传相似性高于20株群体,50株群体与原始群体的遗传距离小于20株群体,这些结果表明50株群体较20株群体更利于保持群体的遗传完整性。

3.2 隔离方式对蚕豆种质遗传完整性变化的影响

繁殖更新时的花粉污染是导致种质遗传完整性下降的另一重要因素。防止外来花粉掺入最终取决于作物本身的繁殖生物学和授粉技术。隔离是防止串粉,维持种质遗传完整性的重要措施。Ellstrand等^[32]指出,对于虫媒异花授粉植物来说,可以通过小区间种植相同种或不同种植物来阻断或减少花粉流动。赵群^[33]指出由于蚕豆异交率较高,蚕豆种质资源保存必须采取严格的隔离措施,最好采用网室或套袋方式进行繁殖,或将长条形的小区改为方块型小区,四周种上异种作物(如油菜等)。本研究对比了开放无隔离群体与网棚隔离对群体遗传完整性的影响。结果表明,与开放无隔离群体相比,网棚隔离群体多态位点数出现了降低(鸭子嘴),每位点有效等位基因数、香农指数以及遗传多样性指数均出现了下降;这说明网棚隔离群体的遗传完整性低于开放无隔离群体。由于受试验条件限制,网棚内温湿度较高且易发生病害,植株的收获株数和结实率均受到了影响,最少的收获株数仅为6株,远没有达

到预计20株的繁殖群体量,导致网棚隔离群体收获株数少,未能获得足够的群体量;这与没有对单份种质设网棚隔离,并未在棚内放昆虫以促进授粉也有关。有研究表明,蜜蜂为授粉媒介的蚕豆群体较单纯的风媒群体结荚速度快、每荚种子数较多,且可使蚕豆增产19%~52%^[34]。本试验中,网棚隔离群体仅依靠风媒传粉,造成授粉不充分,进而导致植株的结实率受到影响。这两点可能是导致网棚隔离群体的遗传完整性较开放无隔离群体低的原因。通过基因流的分析表明,开放无隔离群体的基因流动性大于网棚隔离群体,这表明网棚隔离在一定程度上降低了不同种质群体间串粉,降低了群体间的花粉流动与污染。

3.3 蚕豆繁殖更新策略

种质资源繁殖更新的目标是获得高质量的种子且保持种质的遗传完整性,在此前提下实现费用的最小化。从理论上讲,对于异花或常异花授粉作物,无限大的繁殖群体更有利于维持种质群体的完整性,但受土地、人力和物力等条件限制,采用大繁殖群体是不现实的,因此适宜的繁殖群体和隔离措施的科学更新策略是非常重要的。适宜的繁殖群体可以有效地保持种质遗传完整性,若过大则加大繁殖更新的成本,过小则易丧失稀有等位基因。据Hamilton等^[35]推断,在100个单株的更新群体中,频率为0.05的基因的丢失概率仅为0.00035,因此推荐繁殖群体量为100个单株。Schoen等^[36]研究指出,只有当更新群体等于或大于75个单株时,有害突变的累积作用才可以忽略;反之,经过25~50个连续更新周期后,有害突变数目显著增加。De Pace等^[37]建议蚕豆繁殖更新时群体量介于20~80株之间。本研究结果表明,50株群体比20株群体更利于保持蚕豆种质的遗传完整性,因此推荐繁殖群体量应大于50株。此外,本研究结果虽表明网棚隔离可以降低群体间花粉流动,但因没有昆虫促进授粉,网棚隔离群体的遗传完整性没有得到很好的维持。因此,今后有必要进一步开展有昆虫促进授粉的网棚隔离群体与开放无隔离群体之间的维持种质遗传完整性对比分析,以便获得蚕豆种质资源最佳的繁殖更新策略。

参考文献

- [1] 卢新雄,陈晓玲,陈叔平.低温种质库安全保存理论的研究进展[J].植物遗传资源科学,2000,1(2):54-58
- [2] Clark R L, Shands H L, Bretting P K. Germplasm regeneration developments in population genetics and their implications [J].

- Crop Sci ,1997 37 (1): 1-6
- [3] FAO. Report on the state of the worlds plants genetic resources [R] // International Technical Conference on Plant Genetic Resources ,Leipzig ,Germany. FAO Rome ,Italy ,1996
- [4] Singh R B ,Williams J T. Maintenance and multiplication of plant genetic resources [M]//Holden J H W ,William J T. Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation ,London: George Allen and Unwin Ltd ,1984: 120-130
- [5] Breese E L. Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background [M] · Rome: International Board for Plant Genetic Resources ,1989
- [6] 任守杰,张志娥,陈晓玲,等. 基于醇溶蛋白的 20 份小麦种质遗传完整性分析[J]. 植物遗传资源学报 2006 7(1): 44-48
- [7] 王栋,卢新雄,张志娥,等. SSR 标记分析种子老化及繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响[J]. 植物遗传资源学报, 2010 ,11(2): 192-199
- [8] 张晗,卢新雄,张志娥,等. 种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响[J]. 植物遗传资源学报, 2005 ,6(3): 271-275
- [9] 李驰,卢新雄,张志娥,等. 利用 SRAP 和 SSR 分子标记检测分析 29 份棉花种质遗传完整性[J]. 植物遗传资源学报, 2007 8(1): 21-25 29
- [10] 夏冰,卢新雄,陈晓玲,等. 利用 SSR 分子标记检测分析 30 份大豆种质遗传完整性[J]. 大豆科学 2007 26(3): 305-309
- [11] 马延飞,卢新雄,陈晓玲,等. 基于 SSR 标记的 30 份玉米种质遗传完整性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2007 ,8(4): 387-391
- [12] Gale J S ,Lawrence M. J. The decay of variability [M] //Holden J H W ,William J T. Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation ,London: George Allen and Unwin Ltd ,1984: 77-99
- [13] 郑先云,郭亚平,马恩波. AFLP 分子标记技术的发展[J]. 生命的化学 2003(1): 65-67
- [14] van Treuren R ,van Hintum T J L. Identification of intra-accession genetic diversity in selfing crops using AFLP markers: implications for collection management [J]. Genet Resour Crop Evol , 2001 48(3): 287-295
- [15] 王栋,张志娥,陈晓玲,等. AFLP 标记分析生活力影响大豆中黄 18 种质遗传完整性[J]. 作物学报 2010 36(4): 555-564
- [16] 龙静宜. 食用豆类作物[M]. 北京: 科学出版社 ,1989
- [17] Zong X ,Liu X ,Guan J ,et al. Molecular variation among Chinese and global winter faba bean germplasm [J]. Theor Appl Genet , 2009 ,118(5): 971-978
- [18] Peakall R ,Smouse P E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Mol Ecol Notes 2006 6(1): 288-295
- [19] medermott J M ,McDonald B A. Gene flow in plant pathosystems [J]. Annu Rev Phytopathol ,1993 31: 353 -373
- [20] Ellstrand N C ,Elam D R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation [J]. Annu Rev Ecol Syst ,1993 24(1): 217-242
- [21] 范传珠,王述民,马缘生,等. 多花菜豆基因库种子繁殖更新后遗传完整性分析[J]. 中国农学通报 ,1999(4): 5-8
- [22] 徐重益,李锡香,王海平,等. 菜薹种质内不同大小群体间遗传多样性的 RAPD 鉴定和比较[J]. 植物遗传资源学报, 2004 5(1): 43-46
- [23] 李灵芝,王丽娜,马华英,等. 基因库大豆种子繁殖更新阈值研究[J]. 华北农学报 2001(3): 74-79
- [24] 马缘生,谭富娟,李灵芝,等. 异花授粉作物大白菜和荞麦基因库种子繁殖技术研究[J]. 中国农业科学 ,2000 ,33(2): 16-22
- [25] 冯祥运,张秀荣,刘越英. 基因库芝麻种子繁殖更新方法研究[J]. 中国油料 ,1997(1): 63-65
- [26] Wen W ,Taba S ,Shah T ,et al. Detection of genetic integrity of conserved maize (*Zeamays L.*) germplasm in genebanks using SNP markers [J]. Genet Resour Crop Evol ,2011 ,58(2): 189-207
- [27] Soengas P ,Cartea E ,Lemam ,et al. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions [J]. Mol Breeding 2009 23(3): 389-395
- [28] Clerc V L ,Briardm ,Granger J ,et al. Genebank biodiversity assessments regarding optimal sample size and seed harvesting techniques for the regeneration of carrot accessions [J]. Biodivers Conserv 2003 ,12(11): 2227-2236
- [29] Crossa J ,Vencovsky R. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species [J]. Theor Appl Genet ,1994 89(7): 936-942
- [30] Marshall D R ,Brown A H D. Optimum sampling strategies in genetic conservation [M] // Frankel O H ,Hawkes J G. Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow ,New York: Cambridge University Press ,1975: 53-80
- [31] Duc G ,Bao S ,Baumm ,et al. Diversity maintenance and use of *Vicia faba L.* genetic resources [J]. Field Crop Res ,2010 ,115(3): 270-278
- [32] Ellstrand N C ,Hoffman C A. Hybridization as an avenue of escape for engineered genes [J]. Bio Sci ,1990 40(6): 438-442
- [33] 赵群. 论甘肃省春蚕豆品种改良 [J]. 中国种业 ,2000(3): 31-32
- [34] Susom J ,Morenom T ,Mondragao-Rodrigues F ,et al. Reproductive biology of *Vicia faba*: role of pollination conditions [J]. Field Crop Res ,1996 46(1-3): 81-91
- [35] Hamilton N R S ,Chorlton K H. Regeneration of accessions in seed collection: a decision guide [M] · Rome: IPGRI ,1997 , 42-44
- [36] Schoen D J ,David J L ,Bataillon T M. Deleterious mutation accumulation and the regeneration of genetic resources [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1998 95: 394-399
- [37] De Pace C ,Monti L M ,Perrino P ,et al. Theoretical aspects and practical implications of cross pollination on seed regeneration of field crop genetic resources [C] // Proceedings of the CEC/EU-CARPIA Seminar ,Rotterdam: AA Balkema ,1981: 211-251