

高帆, 宋 韡. 基于 AFLP 标记的苦荞种质资源遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 122–126.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.032

# 基于 AFLP 标记的苦荞种质资源遗传多样性研究

高帆<sup>1</sup>, 宋 韡<sup>2</sup>

(1. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006; 2. 山西体育职业学院, 山西太原 030006)

**摘要:**用 AFLP 分子标记手段对我国苦荞种质资源遗传多样性进行研究, 为综合评价我国苦荞种质资源提供依据。以 50 份苦荞核心种质为试验材料, 优化筛选出 19 对 AFLP 标记分析引物, 经 AFLP-PCR 扩增、PAGE 检测, 统计分析 AFLP 图谱, 运行 Popgene Ver. 1.31 和 NTSYSpc Ver. 2.2 软件对苦荞种质资源遗传多样性和遗传关系进行分析, 共检测到 211 个 AFLP 特异性标记, 平均每对引物组合产生 11.11 个多态性位点 (PIC), 遗传相似系数 (GS) 分布区间均较大, 变幅为 0.515~0.954, 辛普森指数和香农指数计算结果表明来自四川的苦荞种质资源多样性最为丰富; Popgene Ver. 1.31 运行结果表明, 当 GS 为 0.790 时, 50 份苦荞材料被分为 5 个组群, 聚类结果与苦荞种质的地理分布有一定的相关性。说明 AFLP 是一种有效的分子标记方式, 适合于苦荞种质遗传多样性分析; 我国苦荞种质资源多样性丰富, 须要在保护、利用现有种质资源的基础上继续加强区域间引种、育种, 为我国荞麦产业的发展提供帮助。

**关键词:**苦荞; AFLP; 遗传多样性

**中图分类号:** S517.024 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0122-05

苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 属蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill), 尼泊尔、我国西藏东部和云南西北部是苦荞的分布中心和起源地<sup>[1]</sup>。我国是苦荞的主产区, 栽培面积超过 30 万  $\text{hm}^2$ , 产量水平达 900  $\text{kg}/\text{hm}^2$ , 总产量达 3 亿  $\text{kg}$ <sup>[2]</sup>。苦荞粮药兼用, 不仅营养价值高, 而且具有降糖脂、降胆固醇、抗氧化和消炎等功效, 被誉为 21 世纪重要的绿色食品资源<sup>[3]</sup>。我国苦荞种质资源丰富, 利用 AFLP 分子标记对我国苦荞种质资源遗传多样性进行分析对我国苦荞种质资源的保护、品种的改良、分子育种及优良基因的挖掘具有重要的意义。尽管国内外学者已采用形态学标记<sup>[4]</sup>、细胞学标记<sup>[5]</sup>、种子蛋白标记<sup>[6]</sup>和同工酶标记<sup>[7]</sup>等手段对荞麦的遗传多样性进行分析, 但分子标记技术仍然是目前最主要的遗传多样性分析手段, 国内外已采用 RAPD<sup>[8]</sup>、SSR<sup>[9]</sup>、ISSR<sup>[10]</sup>和 SRAP<sup>[11]</sup>等分子标记方式对苦荞遗传多样性进行了研究。AFLP 是一种可靠性高、适用性强、多态性水平高的分子标记方式, 非常适合于对研究背景模糊、材料来源广泛的作物进行标记分析。Tsuji 等利用 AFLP 标记技术对野生苦荞和栽培苦荞进行了系统研究<sup>[12]</sup>; Yasui 等利用 AFLP 标记, 构建了野生

荞 (*F. homotropicum*) 和甜荞的 8 个连锁群的遗传图谱<sup>[13]</sup>; Konishi 等利用 AFLP 标记揭示了野生甜荞和栽培甜荞间的起源关系<sup>[14]</sup>; 侯雅君等对百余份苦荞材料进行了遗传多样性分析<sup>[15]</sup>。以上研究虽利用不同的标记方式对苦荞进行了遗传多样性分析, 但利用 AFLP 标记分析我国极具代表性的苦荞核心种质 (精准鉴定品种) 的研究几乎没有。尽管到目前为止国内外已有一些关于苦荞 AFLP 标记方面的报道, 但大多数分析范围或是过于狭窄或是过于宽泛, 分析材料多数不具有典型的地域代表性。本研究在前人研究的基础上, 从国家种质库中精心挑选出 50 份极具代表性的苦荞精准鉴定材料为研究对象, 从 40 对引物组合中筛选出 19 对信息量丰富、多态性好的 AFLP 引物, 对我国苦荞种质资源进行遗传多样性分析, 旨在揭示我国苦荞种质资源间的遗传关系, 为苦荞种质资源的收集、保护、利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

我国苦荞精准鉴定材料 50 份, 分别来自 12 个省 (区), 具体情况见表 1, 供试材料由中国农业科学院农作物种质保存中心提供。

### 1.2 DNA 提取与酶切

取 0.5 g 嫩叶, 用 CTAB 法<sup>[16]</sup>提取总 DNA, 稀释 100 倍后

收稿日期: 2015-04-21

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2011BAD09B01)。

作者简介: 高帆 (1985—), 男, 山西长治人, 博士, 实验师, 主要从事荞麦种质资源遗传多样性研究。E-mail: gaofan@sxu.edu.cn。

[2] 宋志剑, 刘仁建, 雄奴塔巴, 等. 拉萨地区春青稞产量构成因素相关性和通径分析[J]. 西藏农业科技, 2008, 30(4): 11–14.

[3] 陈超, 邹滢. 常用功能与应用实例精讲[M]. 北京: 电子工业出版社, 2009: 208–215.

[4] 杜家菊, 陈志伟. 使用 SPSS 线性回归实现通径分析的方法[J]. 生物学通报, 2010, 45(2): 4–6.

[5] 杨金华, 于亚雄, 刘丽, 等. CIMMYT 不同稃型大麦产量构成因素及其对产量的影响[J]. 西南农业学报, 2008, 21(4): 920–924.

[6] 王建武, 姜龙. 啤酒大麦产量构成因素分析与应用[J]. 大麦科学, 2000(3): 18–19, 36.

[7] Paunovic A S, Madic M, Nezevic D K, et al. The inter dependence of productive and technological traits in Two-Rowed spring barley[J]. Acta Agriculturae Serbica, 2006, 22(6): 37–43.

[8] Milomirka M A, Paunovic, Djurovic D, et al. Correlations and path coefficient analysis for yield and yield components in winter barley[J]. Acta Agriculturae Serbica, 2005, 20(5): 3–9.

表 1 苦荞品种名称及来源

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
1	黑丰 1 号	山西	26	苦荞	陕西
2	六荞 2 号	贵州	27	苦荞	陕西
3	苦荞	陕西	28	刺荞	四川
4	苦荞麦	安徽	29	苦荞	贵州
5	苦荞	陕西	30	苦荞	宁夏
6	苦荞	陕西	31	荞麦	山西
7	82-8-1	安徽	32	荞麦	甘肃
8	苦荞	陕西	33	辽荞 75(苦)	辽宁
9	苦荞	四川	34	黑苦荞	青海
10	苦荞	陕西	35	湖南 2-2	湖南
11	苦荞	山西	36	塘弯苦荞	湖南
12	威宁 3 号	贵州	37	六荞 1 号	贵州
13	苦荞	湖北	38	湖南 1-2	湖南
14	额洛木尔惹	四川	39	苦荞	青海
15	湖南 3-1	湖南	40	湖南 6-2	湖南
16	海源苦荞	宁夏	41	晋荞麦 2 号	山西
17	凤凰苦荞	湖南	42	苦荞	青海
18	湖南 5-2	湖南	43	苦荞麦	安徽
19	苦荞	陕西	44	苦荞麦	甘肃
20	苦荞	湖北	45	苦荞	湖北
21	西农 9909	陕西	46	镇巴苦荞Ⅱ	陕西
22	彭泽苦荞	江西	47	老鸦苦荞	四川
23	洗马苦荞	湖南	48	麻苦荞	甘肃
24	苦荞	湖北	49	新邵苦荞	湖南
25	麻苦荞	甘肃	50	湖南 3-2	湖南

参考闫龙等的试验方法<sup>[17]</sup>,37℃条件下用 *Mse* I 和 *Eco* R I 对总 DNA 酶切 8h,检测酶切效果。

1.3 加接头与预扩增

将酶切产物分别加上 *Eco* R I 和 *Mse* I 接头。在  $T_4$  连接酶的作用下,16℃过夜连接后获得连接产物,稀释 5 倍后用预扩增引物 M(5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3')和 E(5'-GACTGCGTACCAATTTC-3')进行预扩增反应。预扩增反应体系为:连接产物 4.0 μL,M 引物 1.0 μL,E 引物 1.0 μL,10×PCR buffer 2.0 μL,dNTP 0.4 μL,*Taq* 酶 0.2 μL,ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20μL。预扩增反应程序为:94℃ 1 min;94℃ 30 s,56℃ 35 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 7 min。检测预扩增效果后,稀释 20 倍备用。

1.4 引物筛选与选择性扩增

选用遗传差异较大的 7 份苦荞材料对 40 对 AFLP 引物组合进行筛选,筛选出扩增条带数量多、多态性好、清晰度高、分布均匀的 19 对引物组合:E-AA/M-CAG、E-AA/M-CTG、E-AC/M-CCC、E-AG/M-GCA、E-GA/M-CGT、E-GC/M-ACG、E-GC/M-CCT、E-GG/M-GAT、E-GG/M-GCA、E-TG/M-ACG、E-CTG/M-AC、E-CTG/M-CG、E-CTG/M-TT、E-GCT/M-CG、E-GCT/M-CT、E-GTC/M-CC、E-ACA/M-GT、E-ACT/M-CAG、E-ACT/M-CTG。获取有效的 AFLP 引物组合后,进行选择性扩增反应。选择性扩增反应体系为:预扩增产物 2.5 μL,AFLP 引物组各 0.8 μL,10×PCR buffer 1.5 μL,dNTP 0.3 μL,*Taq* 酶 0.15 μL,ddH<sub>2</sub>O 补齐至 15 μL。选择性扩增反应程序为:94℃ 1 min,94℃ 30 s,65℃ 35 s(每个循环降

低 0.7℃),72℃ 1 min,12 个循环;94℃ 30 s,56℃ 35 s,72℃ 1 min,25 个循环;72℃ 7 min。反应结束后加入 5 μL Loading buffer,94℃ 变性 3 min 后立即置于冰上冷却备用。

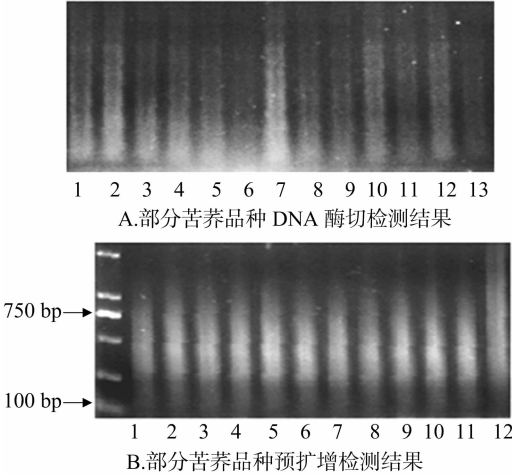
1.5 PAGE 检测与数据统计分析

参考赵丽娟的方法<sup>[18]</sup>进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测,固定、银染、显影后用拍照计数。在电泳图谱上,清晰条带记为“1”,同一位置上无条带记为“0”。用 Popgene Ver. 1.31 软件<sup>[19]</sup>计算多态性信息指数(PIC)、多态性信息位点百分数(PPB)、辛普森指数(Simpson index)、香农指数(Shannon-Weaver index)、遗传相似系数(GS)。根据 GS,采用 UPGMA 法,利用 NTSYSpC Ver. 2.2 软件<sup>[20]</sup>进行苦荞品种聚类分析。

2 结果与分析

2.1 酶切与预扩增检测

琼脂糖凝胶电泳检测苦荞基因组 DNA 酶切和预扩增结果见图 1。由图 1-A 和图 1-B 结果可知,DNA 酶切片段均匀,预扩增片段丰富,基本位于 100~750 bp 之间,适宜进行选择性扩增<sup>[21]</sup>。



图中编号为表 1 中苦荞品种编号

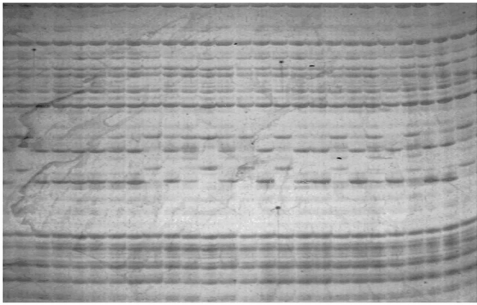
图1 部分苦荞品种酶切和预扩增检测结果

2.2 选择性扩增检测

本研究从 40 对 AFLP 引物组合中筛选出适宜的选择性扩增引物 19 对,筛选率为 47.5%。19 对引物在 50 份苦荞材料上共扩增出清晰条带 890 条(图 2),平均每对引物可扩增出条带 46.84 条,长度分布在 45~570 bp 之间。如表 2 所示,共扩增出多态性条带 211 条,平均每对引物的多态性条带有 11.11 条,平均多态性位点百分率(PPB)为 24.05%,PIC 最大值为 0.1918(引物组合为 E-CTG/M-CG),最小值为 0.024 1(引物组合为 E-AA/M-CAG),PIC 平均值为 0.123 2。

2.3 苦荞种质遗传多样性分析

鉴于有些地区有代表性的苦荞核心种质材料太少,将少于 4 份材料的省份划分至与其毗邻或种植环境相似的省份,计算各社群苦荞种质资源的遗传多样性参数。由表 3 可知,AFLP 标记的苦荞品种,辛普森指数为 0.892~0.989,平均 0.940;香农指数为 0.095~0.194,平均 0.153。四川是我国



1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27  
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26

图中的编号即为表 1 中苦荞品种编号

图2 AFLP引物E-GG/M-GAT 对部分苦荞材料的扩增图谱

表 2 苦荞的 AFLP 引物扩增结果

引物组合	多态性带数(条)	条带数(条)	多态性位点百分率(%)	PIC 值
E-AA/M-CAG	5	24	20.83	0.024 1
E-AA/M-CTG	9	75	12.00	0.126 4
E-AC/M-CCC	4	40	10.00	0.054 6
E-AG/M-GCA	11	52	21.15	0.178 3
E-GA/M-CGT	9	39	23.08	0.130 9
E-GC/M-ACG	13	32	40.63	0.177 1
E-GC/M-CCT	10	45	22.22	0.174 9
E-GG/M-GAT	9	66	13.64	0.131 1
E-GG/M-GCA	4	26	15.38	0.012 5
E-TG/M-ACG	10	41	24.39	0.185 9
E-CTG/M-AC	10	50	20.00	0.100 7
E-CTG/M-CG	17	50	34.00	0.191 8
E-CTG/M-TT	12	57	21.05	0.047 7
E-GCT/M-CG	10	60	16.67	0.128 9
E-GCT/M-CT	15	45	33.33	0.180 3
E-GTC/M-CC	24	67	35.82	0.098 4
E-ACA/M-GT	10	39	25.64	0.147 4
E-ACT/M-CAG	21	49	42.86	0.110 6
E-ACT/M-CTG	8	33	24.24	0.140 0
平均值	11.11	46.84	24.05	0.123 2

表 3 AFLP 标记下不同地理来源苦荞种质的遗传参数值

组群	组群大小	辛普森指数	香农指数
山西/辽宁	5	0.980	0.176
贵州	4	0.982	0.163
陕西	10	0.898	0.157
安徽/江西	4	0.877	0.098
四川	4	0.989	0.194
湖北	4	0.979	0.165
湖南	10	0.892	0.166
宁夏/青海	5	0.886	0.095
甘肃	4	0.981	0.165
平均值		0.940	0.153

苦荞遗传多样性最为丰富的地区,无论辛普森指数(0.989),还是香农指数(0.194)均为最大。虽然湖南和陕西的供试材料最多(均为 10 份),但遗传多样性并不丰富,这从分子水平上证明资源量与遗传多样性并非正相关的观点。安徽/江西、宁夏/青海 2 个组群的辛普森指数和香农指数均较低,说明该地区的苦荞种质资源多样性不够丰富,需要在保护其遗传稳

定性的基础上,加强区域间引种。部分省份的核心种质抽样材料太少(如江西和辽宁各仅有 1 份),这也可能对遗传多样性参数值的计算造成一定的误差<sup>[22]</sup>,不能完全反映该区域内的种质资源多样性情况。

2.4 苦荞种质遗传关系分析

用 NTSYSpc Ver. 2.2 软件计算 50 份苦荞种质的遗传相似系数(GS)。AFLP 标记结果(表 4)表明,50 份苦荞种质的 GS 值在 0.515~0.954 之间,分布区间较大,说明苦荞种质多态性较为丰富,同时也表明 AFLP 标记适宜于我国苦荞种质遗传多样性分析。

采用 UPGMA 法进行聚类,当 GS 为 0.790 时,大部分苦荞材料可被分成五大组群。第Ⅰ组群可分为 2 个小组,第 1 小组包括来自山西(1)、陕西(5、6)、湖南(17、18、40)、甘肃(32)和青海(39)的 8 份材料,其中山西和陕西的材料聚为一类,湖南、青海和甘肃的材料聚为一类;第 2 小组包括来自安徽(7)、陕西(21、10、19)和湖北(13、20、24)的 7 份材料,其中安徽(7)、陕西(21、10、19)和湖北(13)的材料聚为一类,而另 2 份湖北材料(20、24)聚为另一类。第Ⅱ组群可分为 2 个小组,第 1 小组又可分为 2 个亚组,第 1 亚组包括来自陕西(3、27、26)、安徽(4)、甘肃(25)、湖南(35、36、38)和山西(41)的 9 份材料,第 2 亚组包括来自安徽(43)、甘肃(44)、湖北(45)、陕西(46)和湖南(49、50)共 6 份材料;第 2 小组包括山西(11)和辽宁(33)的 2 份材料。第Ⅲ组群包括来自山西(31)、青海(42)、四川(47)和湖南(23)的 4 份材料。第Ⅳ组群包括来自贵州(2、12、29、37)、四川(9、28)和宁夏(16)的 7 份材料,其中来自贵州(29)和四川(28)的 2 份材料遗传相似度最近,为 0.954。第Ⅴ组群包括来自江西(22)、宁夏(30)和湖南(15)的 3 份材料。剩余的来自四川(14)、青海(34)、陕西(8)和甘肃(48)的 4 份材料与以上 5 个组群的遗传距离较远,单独聚为一类特殊的类型(图 3)。

由聚类图(图 3)可知,来自四川和贵州的刺荞和苦荞 GS 值最高(0.954),原因可能是四川的刺荞属于当地地方品种有翅苦荞的一类,而来自贵州的苦荞也是当地的一个地方品种,两者同属于苦荞的栽培品种,两地也同属我国栽培荞麦的主产区—西南地区,地理位置接近及品种交流频繁等因素导致两者遗传相似性较高。来自四川的额洛木尔惹和来自甘肃的麻苦荞 GS 值最低(0.515),原因可能是甘肃的麻苦荞为当地的一个栽培品种,四川的额洛木尔惹来自于川西南部的凉山彝族自治州,该地区地貌复杂,具有独特的生态气候,是我国苦荞麦主要的生产和次生起源地之一,荞麦种质资源丰富<sup>[23]</sup>,而该品种也很可能是当地野生荞麦的一个近缘种,丰富的荞麦遗传资源背景造成四川的额洛木尔惹与甘肃的麻苦荞遗传差异度较大。

3 结论与讨论

3.1 AFLP 标记技术的有效性和适用性

自 AFLP 标记技术被发明以来,该技术以其特殊的标记特点被广泛应用于作物分子标记分析和遗传多样性研究中。国内外专家均认为,AFLP 是一种有效的分子标记系统<sup>[24-25]</sup>。本研究的苦荞种质资源 AFLP 标记结果表明,AFLP 标记丰富度高(19 对引物组扩增出 890 个条带)、灵敏度强(平均每对

表 4 AFLP 标记的 50 份苦荞品种遗传相似系数

序号	GS			序号	GS		
	最大值	最小值	平均值		最大值	最小值	平均值
1	0.901(5)	0.693(14)	0.814	26	0.894(35)	0.670(8)	0.830
2	0.851(16)	0.626(8)	0.769	27	0.907(35)	0.656(34)	0.837
3	0.889(27)	0.635(14)	0.805	28	0.954(29)*	0.653(34)	0.826
4	0.894(10)	0.670(14)	0.840	29	0.954(28)*	0.626(48)	0.819
5	0.901(1)	0.667(34)	0.828	30	0.856(50)	0.581(34)	0.789
6	0.881(1)	0.576(34)	0.810	31	0.861(46)	0.596(34)	0.809
7	0.883(21)	0.647(34)	0.833	32	0.898(39)	0.663(34)	0.816
8	0.768(48)	0.524(14)	0.707	33	0.880(11)	0.677(8)	0.812
9	0.849(18)	0.640(49)	0.814	34	0.752(8)	0.516(14)	0.660
10	0.908(13)	0.676(48)	0.833	35	0.951(36)	0.693(34)	0.844
11	0.883(43)	0.646(34)	0.799	36	0.951(35)	0.664(14)	0.833
12	0.870(16)	0.619(48)	0.786	37	0.894(28)	0.670(8)	0.822
13	0.908(10)	0.641(34)	0.829	38	0.916(35)	0.676(34)	0.831
14	0.792(12)	0.515(48)**	0.684	39	0.912(40)	0.687(14)	0.840
15	0.846(50)	0.536(34)	0.763	40	0.912(39)	0.691(14,34)	0.834
16	0.870(12)	0.626(48)	0.815	41	0.910(36)	0.699(8)	0.830
17	0.907(18)	0.640(34)	0.822	42	0.893(39)	0.663(8)	0.821
18	0.907(17)	0.667(34)	0.833	43	0.922(44)	0.673(14)	0.834
19	0.874(13)	0.624(34)	0.811	44	0.922(43)	0.649(14)	0.831
20	0.883(4)	0.630(34)	0.815	45	0.915(42)	0.652(14)	0.826
21	0.883(7)	0.627(34)	0.822	46	0.915(43,45)	0.650(34)	0.833
22	0.852(27)	0.627(48)	0.781	47	0.868(40)	0.606(34)	0.800
23	0.866(39)	0.629(34)	0.804	48	0.809(47)	0.515(14)**	0.704
24	0.862(35)	0.604(34)	0.811	49	0.895(50)	0.630(14)	0.808
25	0.907(35)	0.647(48)	0.821	50	0.899(45)	0.639(14)	0.832

注：\* 表示最大遗传相似系数；\*\* 表示最小遗传相似系数。表中的序号为表 1 中的苦荞品种编号。

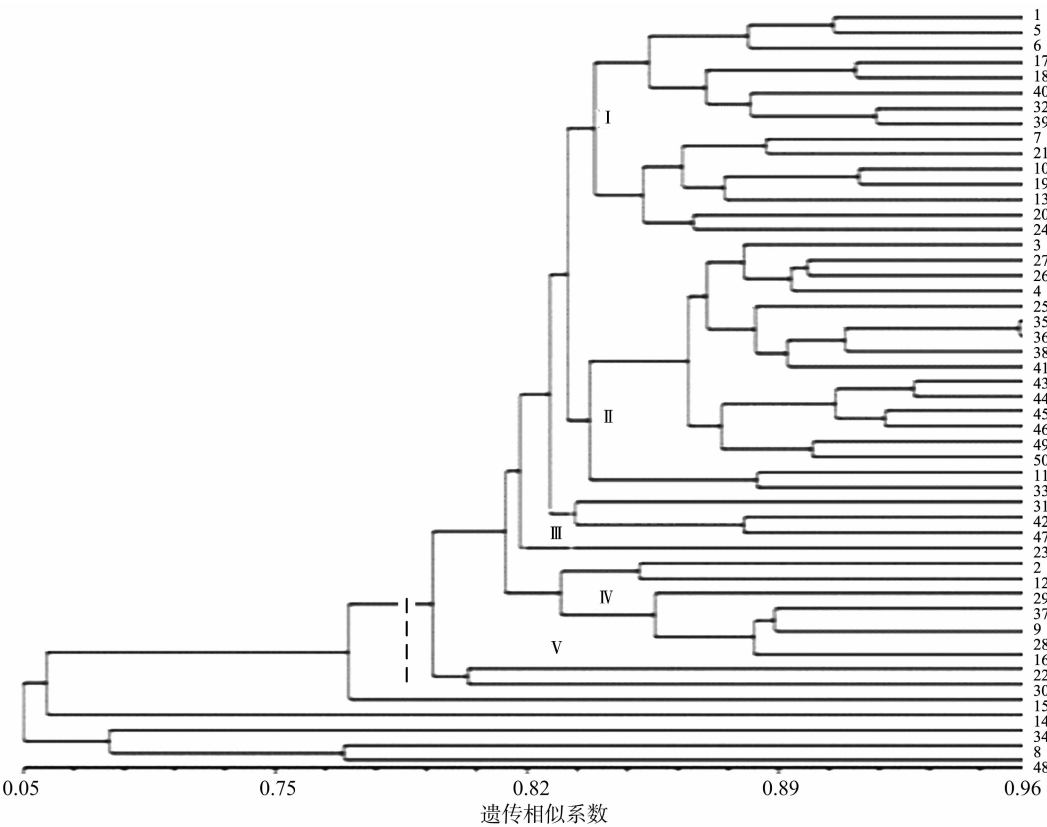


图3 AFLP标记的50份苦荞品种UPGMA聚类

引物扩增条带 46.84 个)。AFLP 标记位点多态性丰富(平均多态性比率为 25.7%),有效性强(平均每对引物可扩增 11.11 个多态性条带,高于 RAPD 标记苦荞所得的 6.90 个多态性条带<sup>[8]</sup>)。有效的 AFLP 引物组合筛选率较高(引物筛选率 47.5%,高于 SSR<sup>[9]</sup> 和 ISSR<sup>[10]</sup> 的引物筛选率)。以上结果表明,AFLP 是一种十分适合于苦荞种质资源多样性分析的标记方式。进一步扩大引物遴选范围,筛选出更多的 AFLP 扩增引物,建立苦荞 AFLP 引物扩增库是下一步的工作重点。

### 3.2 苦荞种质资源的遗传多样性

从不同来源苦荞种质的遗传关系发现,我国苦荞种质资源遗传多样性十分丰富<sup>[26]</sup>;从不同组群苦荞品种的遗传参数值发现,四川地区的种质资源遗传多样性最为丰富,是我国苦荞种质资源的重点保护地区;从 UPGMA 聚类图发现,处于相近地理范围内的苦荞品种可聚在一起,这体现了我国苦荞种质资源遗传关系的地缘性特征。因此,需要在加强区域内苦荞种质资源保护的基础上,不断加强区域间的引种、育种,尤其是针对某些特殊珍贵品种(如四川的额洛木尔惹)的保护与开发,这将不断丰富我国苦荞种质资源的遗传多样性。本研究结果为我国苦荞种质资源的保护和利用、品种的开发以及荞麦产业的发展提供必要的参考依据。

### 参考文献:

- [1] Jiang J F, Jia X. Sichuan daliangshan area is one of origin region of *Fagopyrum tataricum* [J]. *Fagopyrum: Novosti o ajdi*, 1990, 12 (1): 18–19.
- [2] Lin R F, Production C Y. Research and academic exchanges of China on buckwheat [M]. xi'an: northwest a&f university press, 2007: 7–12.
- [3] 徐丽华, 潘宏, 赵英明. 荞麦——一种新兴的多用途作物 [J]. 国外农学: 杂粮作物, 1998, 18(3): 52–54.
- [4] 高金锋, 张慧成, 高小丽, 等. 西藏苦荞种质资源主要农艺性状分析 [J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(2): 1–5, 20.
- [5] Ohnishi O, Asano N. Genetic diversity of *Fagopyrum homotropicum*, a wild species related to common buckwheat [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999, 46(4): 389–398.
- [6] Dvořáček V, Čepková P, Michalová A, et al. Seed storage protein polymorphism of buckwheat varieties (*Fagopyrum esculentum* Moench; *Fagopyrum tataricum* L.) [M]//Advances in Buckwheat Research, 2004: 412–418.
- [7] Ohnishi O. Population genetic of cultivated common buckwheat of *Fagopyrum esculentum* Moench. IV. Allozyme variability in Nepall and Koshmirion populations [J]. *Genet*, 1985, 60: 293–305.
- [8] Senthikumar R, Bishit I S, Bhat K V. Diversity in buckwheat (*Fagopyrum* spp.) landrace populations from north–western Indian Himalayas [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2008, 55: 287–302.
- [9] 王耀文, 夏楠, 韩瑞霞, 等. 苦荞 SSR–PCR 反应体系的优化及引物筛选 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39(4): 4–8.
- [10] 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.
- [11] Li Y Q, Fan X L, Shi T L, et al. SRAP marker reveals genetic diversity in tartary buckwheat in China [J]. *Frontiers of Agriculture in China*, 2009, 3(4): 383–387.
- [12] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among wild and cultivated Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaert.) populations revealed by AFLP analyses [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2001, 76(1): 47–52.
- [13] Yasui Y, Wang Y J, Ohnishi O, et al. Construction of genetic maps of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and its wild relative, *F. homotropicum* ohinishi based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers [C]//Advances in Buckwheat Research, Proceeding of 8th International Stiposium on Buckwheat. 2001: 225–232.
- [14] Konishi T, Yasui Yasuo, 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 [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2005, 80(2): 113–119.
- [15] 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.
- [16] Manubens A, Lobos S, Jadue Y, et al. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17(3): 255–267.
- [17] 闫龙, 关建平, 宗绪晓. 木豆种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2007, 33(5): 790–798.
- [18] 赵丽娟. 荞麦种质资源遗传多样性分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [19] Yeh F C, Boyle R, Ye T, et al. POPGENE, the user–friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31 [M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997.
- [20] Rohlf F J. NTSYS–pc numerical taxonomy system, exeter publishing [M]. New York: Setauket, 2002.
- [21] 徐微. 裸燕麦种质资源遗传多样性及遗传图谱构建研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [22] 赵茹, 程舟, 陆伟峰, 等. 基于分子标记的野生大豆居群遗传多样性估算与取样策略 [J]. 科学通报, 2006, 51(9): 1042–1048.
- [23] 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.
- [24] Pejic I, Ajmone–Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(8): 1248–1255.
- [25] Smith J, Chin E, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(1/2): 163–173.
- [26] 王艳青, 卢文洁, 李春花, 等. 同异分析法在苦荞新品种(系)综合评价中的应用 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 132–134.