

文章编号 :1000-4025(2003)05-0765-06

应用 RAPD 标记研究不同生态区谷子品种的遗传差异*

杨天育^{1,2}, 窦全文¹, 沈裕琥¹, 黄相国¹, 何继红², 吴国忠²

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001 2 甘肃省农业科学院粮食作物研究所, 兰州 730070)

摘要 应用 RAPD 标记对 19 份国内不同生态区的谷子品种的遗传变异进行了研究。结果表明, 分子水平上, 不同生态区的谷子品种间存在一定的遗传差异, 但遗传差异程度并不高。11 个随机引物共扩增出 54 条多态性带, 不同引物扩增的带数差异较大, 每个引物可扩增 2~8 条多态性带, 平均每个引物扩增出 4.91 条多态性带。引物 S1050 扩增的多态性带最多(8 条)。聚类结果表明, 基于 RAPD 标记分析的遗传聚类群与生态类型有很大的一致性。

关键词 RAPD 标记 谷子 遗传差异

中图分类号 Q946.33.S515 文献标识码 A

Genetic variation among varieties of foxtail millet from different regions in China based on RAPD markers

YANG Tian-yu^{1,2}, DOU Quan-wen¹, SHEN Yu-hu¹, HUANG Xiang-guo¹, HE Ji-hong², WU Guo-zhong²

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xi'ning, 810001, China; 2 Crop Institute, Gansu Provincial Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, 730070, China)

Abstract Genetic variation of 19 varieties of foxtail millet collected from different regions in China was studied. The results show that 19 varieties have a certain degree of genetic variation in molecular level, but the degree of variation is not significant. 11 primers yielded 54 polymorphic bands from 19 varieties. Every primer yielded 2~8 polymorphic bands and the average of polymorphic bands is 4.91 yielded by each primer. The primer S1050 yielded 8 bands. The cluster analysis of RAPD indicates that the cluster type of genetic variation of varieties is consistent with ecological type.

Key words RAPD markers; foxtail millet; genetic variation

谷子遗传差异的研究传统方法多是对形态标记的鉴定与分析^[1~4], 染色体核型和带型分析为细胞学水平上认识谷子的遗传差异起了积极作用^[5,6], 20 世纪 60 年代后应用蛋白质标记研究谷子的遗传差异得到了广泛应用^[7~13], 而分子标记技术(RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等)的快速发展为在 DNA 水平上估计谷子的遗传差异提供了更大的可能性^[14~16]。

RAPD 是以随机的寡核苷酸作引物, 通过 PCR 扩增, 产生不连续的 DNA 产物, 用以检测 DNA 序列的多态性^[17,18]。由于 RAPD 具有自动化程度高, 简便快速, 费用较低, 无放射性污染等优点, 在品种鉴定、群体内和种内遗传差异的研究中应用较多^[19~22]。本文应用 RAPD 标记技术对国内不同生态区的 19 个谷子品种的遗传差异进行了研究, 以期

* 收稿日期 2002-02-29 修改稿收到日期 2003-02-24
基金项目 甘肃省自然科学基金项目(ZS011-A 25-038-N) 国家科技攻关项目(96-014-01-03)
作者简介 杨天育(1968-), 男(汉族), 甘肃渭源人, 副研究员, 硕士。

为合理利用谷子种质资源, 培育优质、丰产、抗逆的谷子新品种提供分子水平上的理论依据。

1 材料与方法

表 1 RAPD 标记分析的谷子材料及来源

Table 1 Name and resource of foxtail millet using RAPD analysis

编号 No	品种名称 Name of variety	来源 Resource	编号 No	品种名称 Name of variety	来源 Resource
1	宽京早 3-1-2 Kuanjingzao3-1-2	华北平原 Huabei Plain	11	吉 181 Ji181	东北平原 Northeast Plain
2	红苗滑皮 Hongmiao huapi	华北平原 Huabei Plain	12	91- 117 铁 91- 117Tie	东北平原 Northeast plain
3	郑 737(9) Zheng737(9)	华北平原 Huabei Plain	13	55057 龙杂 55057Longza	东北平原 Northeast Plain
4	孟县黄谷 Yuxianhuanggu	黄土高原 Losses Plateau	14	9037 铁 9037Tie	东北平原 Northeast Plain
5	同川谷 Tongchuangu	黄土高原 Losses Plateau	15	予 1 × 日 60 日 Yu1 × Ri60ri	华北平原 Huabei Plain
6	等身齐 Dengshenqi	黄土高原 Losses Plateau	16	呼早内谷 2 Huzao neigu2	内蒙高原 Inner Mongolia Plateau
7	山东红 Shandonghong	黄土高原 Losses Plateau	17	坝谷 245 Bagu245	内蒙高原 Inner Mongolia Plateau
8	陇谷 3 号 Longgu 3	黄土高原 Losses Plateau	18	83-458 83-458	内蒙高原 Inner Mongolia Plateau
9	通渭黄蜡头 Tongweihuangleitou	黄土高原 Losses Plateau	19	冀张 1 号 Jizhang 1	内蒙高原 Inner Mongolia Plateau
10	01 龙 01 Long	东北平原 Northeast Plain			

1.2 DNA 的提取

用吴晓雷的改良 SDS 法^[23]分离谷子基因组 DNA。

1.3 PCR 反应

PCR 反应体系: 所用引物为上海生工生物工程技术有限服务公司的 RAPD 随机引物, 其序列见表 2。采用 25 μ L PCR 反应体系, 反应液组成包括 2.5 mmol/L dNTP, 2.0 μ L, 2.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 × buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3) 2.5 μ L, 0.8 μ L Taq 酶 (Promega 公司), 0.6 μ mol/L 引物, 50 ng 模板 DNA。

PCR 反应程序: 96 50 s, 35 退火 45 s, 72 延伸 1 min 20 s, 预变性 4 个循环; 94 变性 45 s, 36 退火 40 s, 72 延伸 1 min 10 s, 共 40 个循环。最后在 72 延伸 10 min, 4 下保存待测。反应在

1.1 材料

选取了国家科技攻关项目“粟类优异种质的评价与利用”研究材料中代表东北平原、华北平原、内蒙高原、黄土高原区的 19 份谷子品种 (表 1)。

PE9600 扩增仪 (PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 9600) 上进行。

1.4 电泳检测

扩增产物中加入一滴 6 × Loading buffer, 在 1% D 的琼脂糖凝胶上电泳, 加样量为 20 μ L Lane, 电极缓冲液为 1 × TBE (0.09 mol/L Tris-borate, 2 mmol/L EDTA), 电泳电压开始为 100 V, 待样品出加样孔后调至 80 V, 电泳时间 1 h 左右。用 3% 的溴化乙锭 (EB) 染色, 紫外灯下检测照相。

1.5 RAPD 数据的统计分析方法

参照分子量标记的电泳图谱, 按同一迁移率电泳条带的有无记录, 有记为 1, 无记为 0, 记录的电泳图谱形成 RAPD 标记原始数据矩阵。在遗传距离 (P-distance) 的基础上用非加权配对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 得到树形图。统计数据在

MEGA 2.0 软件下完成。

表 2 引物及其扩增结果

Table 2 Primer and amplified results

引物 Primer	引物序列 Primer sequences	多态性带数 Polymorphic bands	总扩增带数 Total bands	可鉴别的品种数 Number of identified varieties
S1485	CCCGA TCA GA	6	8	7
S352	GTCCCGTGGT	3	4	6
S1427	GTGGCCGA TG	3	4	3
S1029	TCGCTGGTGT	3	4	3
S1425	GTTA GTGCGG	2	2	3
S1426	CCA GAACGGA	6	7	5
S1449	TVGCTTCTCC	5	5	7
S1471	AA GACCGGA	6	7	9
S1042	TCGCACA GTC	6	7	6
S1050	GTTACCGCGA	8	9	7
S1048	GTGCTCCCTC	6	6	9

2 结果与分析

2.1 RAPD 多态性分析

用 22 个 RAPD 随机引物对 19 个谷子品种进行了扩增,选择其中电泳谱带清晰并有多态性的 11 个引物进行分析。从表 2 图 1 可以看出,11 个引物共扩增出 63 条带,其中 54 条为多态性带,占总扩增带的 85.71%。不同引物扩增的多态性带数相差较大,每个引物可以扩增 2~8 条多态性带不等,平均

每个引物扩增出 4.91 条多态性带,引物 S1050 扩增出的多态性带数最多(8 条)。从表 2 也可以看出,每个引物可鉴别的谷子品种数是有限的,应用单个引物很难将 19 个谷子品种完全分开。上述结果说明分子水平上来自不同生态区的谷子品种存在一定的遗传差异,但这种遗传差异的程度并不高,这与黎裕对来自不同地理区域谷子 RAPD 标记的研究结果是一致的^[24]。

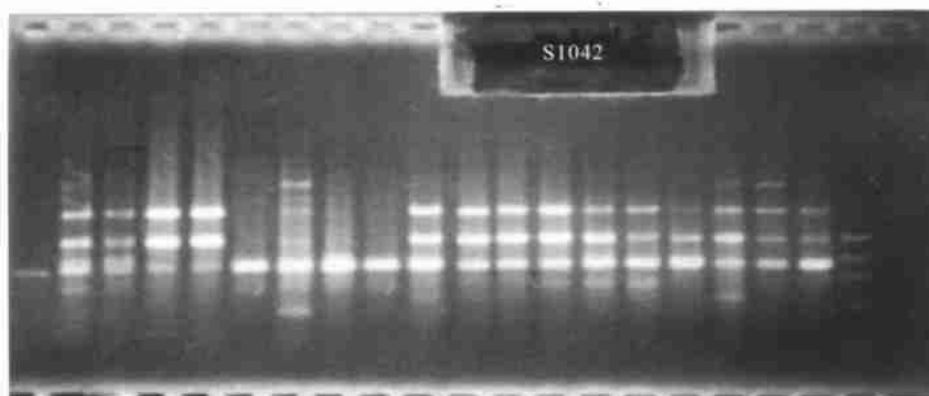


图 1 19 个谷子品种 RAPD 引物 S1042 扩增结果

从左至右谷子品种依次为:宽京早 3-1-2、红苗滑皮、郑 737(9)、孟县黄谷、同川谷、等身齐、山东红、陇谷 3 号、通渭黄蜡头、01 龙、吉 181、91-117 铁、55057 龙杂、9037 铁、予 1×日 60 日、呼早内谷 2、坝谷 245、83-458、冀张 1 号、Marker。

Fig 1 Amplified results of 19 foxtail millet varieties on primer S1042

Varieties from the left to the right are: Kuanjingzao3-1-2, Hongmiaohuapi, Zheng737(9), Yuxianhuanggu, Tongchuangu, Dengshenqi, Shandonghong, Longgu3, Tongweihuanguatou, 01Long, Ji181, 91-117Tie, 55057Longza, 9037Tie, Yu1×Ri60Ri, Huzaoneigu2, Bagu245, 83-458, Jizhang 1, Marker

2.2 遗传距离和聚类分析

表 3 列出了 19 个谷子品种间的遗传距离。19 个谷子品种间 RAPD 标记的遗传距离在 0.05~0.33 之间,来自东北平原的品种 01 龙和来自华北平原的品种红苗滑皮间的遗传距离最大,为 0.33,表明这两个品种间的遗传差异较大;同为东北平原品种的 91-117 铁和吉 181 的遗传距离最小,为 0.05,表明这两个品种间的遗传差异较小。

图 2 是 RAPD 标记的遗传聚类图,当取值 0.05 时,除 91-117 铁和吉 181 聚成一类外,其余品种都

分别自成一类,这说明尽管谷子 RAPD 标记的遗传变异不太高,但 RAPD 标记用于谷子基因型的鉴别是很有效的。RAPD 是利用寡聚核苷酸对基因组 DNA 进行多态性检测,检测区域几乎覆盖了整个基因组,因而可以检测不同品种间的微小差异^[25],同时 RAPD 技术也具备了良好基因型鉴定方法的要素,如简单易行、快速、低成本、需样品量少、不用放射性同位素,虽然 RAPD 的稳定性较差,但只要严格控制反应条件,建立起 RAPD 分析的标准模式,可以得到准确可靠的鉴定结果^[26]。

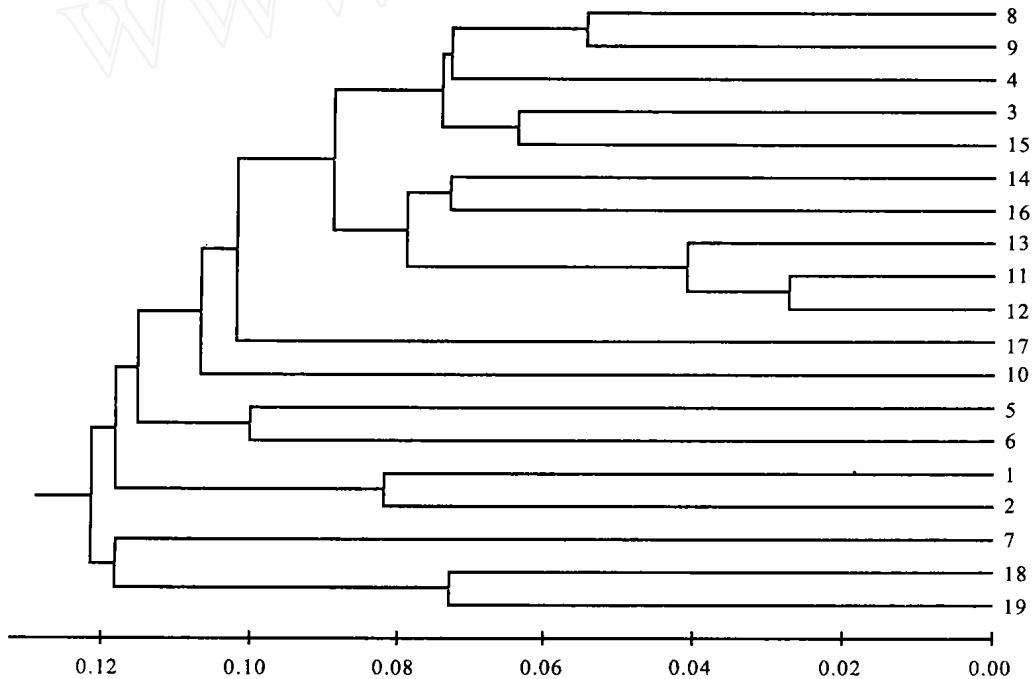


图 2 19 个谷子品种 RAPD 标记的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 19 foxtail millet varieties on RAPD markers

从图 2 可以看出,当取值 0.12 时,19 个品种可以分成两大聚类群,第一类包括 3 个品种(83-458 和冀张 1 号属内蒙高原的品种,山东红为黄土高原的品种),内蒙高原的材料占 66%。第二类包括 16 个品种,又可以分为 6 个亚类:第一亚类 2 个品种(等身齐和同川谷)均为黄土高原的品种;第二亚类 2 个品种(宽京早 3-1-2 和红苗滑皮)均为华北平原的品种;第三亚类 5 个品种,可分成更小的类,其中郑 737(9)和予 1×日 60 日为华北平原的品种,孟县黄谷、通渭黄蜡头和陇谷 3 号为黄土高原的品种;第四亚类 5 个品种,也可分成更小的类,91-117 铁、55057 龙杂、吉 181 和 9037 铁为东北平原的品种,

呼早内谷 2 为内蒙高原的品种;第五亚类 1 个品种(01 龙);第六亚类 1 个品种(坝谷 245)。基本上属同一生态类型的品种聚为一类, RAPD 标记分析的遗传聚类群与生态类型有很大的一致性,这与 Ennequin 的研究结果相同^[27],也与同工酶的研究结果一致^[28]。在取值 0.12 时的聚类群中也可看到,不同生态区的谷子品种有聚集在一起的现象,如第一类的 3 个品种 83-458 和冀张 1 号属内蒙高原的品种,而山东红为黄土高原的品种。在对谷子形态学性状进行聚类分析时发现,性状相似的品种或生态类型一致的品种常聚在一起^[29],83-458、冀张 1 号和山东红的生育期相当,都属于高茎粗秆、大穗多粒、单

株生产力高的品种,因此 3 个品种虽不属于同一生态类型,但它们仍聚成一类。

表 3 19 个谷子品种 RAPD 标记的遗传距离

Table 3 Genetic distance of 19 varieties of foxtail millet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	0.16																	
3	0.20	0.25																
4	0.20	0.25	0.14															
5	0.27	0.25	0.22	0.18														
6	0.22	0.24	0.24	0.16	0.20													
7	0.25	0.27	0.24	0.20	0.27	0.22												
8	0.20	0.33	0.14	0.14	0.22	0.24	0.16											
9	0.16	0.29	0.14	0.14	0.25	0.16	0.20	0.11										
10	0.29	0.31	0.24	0.24	0.27	0.25	0.29	0.24	0.20									
11	0.22	0.24	0.20	0.16	0.16	0.22	0.25	0.13	0.20	0.18								
12	0.27	0.29	0.18	0.18	0.22	0.27	0.27	0.14	0.22	0.20	0.05							
13	0.24	0.29	0.18	0.18	0.22	0.24	0.24	0.11	0.18	0.20	0.09	0.07						
14	0.18	0.20	0.16	0.24	0.27	0.22	0.29	0.24	0.20	0.22	0.18	0.16	0.13					
15	0.14	0.20	0.13	0.16	0.24	0.22	0.25	0.16	0.12	0.18	0.15	0.16	0.16	0.15				
16	0.18	0.27	0.20	0.20	0.27	0.29	0.29	0.16	0.16	0.22	0.18	0.16	0.13	0.15	0.18			
17	0.20	0.22	0.25	0.18	0.22	0.27	0.24	0.21	0.22	0.24	0.20	0.22	0.22	0.20	0.26	0.16		
18	0.25	0.27	0.20	0.16	0.27	0.22	0.22	0.24	0.16	0.25	0.25	0.27	0.27	0.25	0.18	0.25	0.20	
19	0.29	0.24	0.24	0.20	0.27	0.22	0.25	0.27	0.20	0.25	0.25	0.27	0.27	0.25	0.22	0.29	0.24	0.15

3 讨论

种质资源是育种的物质基础,种质资源遗传差异的研究历来是育种工作的重要方面。种质资源的遗传差异体现在形态学、细胞学、蛋白质和 DNA 不同水平上,最精确检测遗传差异的方法是直接测定 DNA 序列^[30],分子标记的应用为从分子水平上了解物种间的遗传差异开辟了崭新的研究和应用领域,也使育种的目地性更强。RAPD 作为一项简单快速、灵敏准确、多态性丰富的检测物种遗传差异的方法,在谷子遗传差异研究中得到了较好应用^[15,24],在本实验研究中也显示出了较大潜力,但是注意到 RAPD 标记的研究结果与形态学、蛋白质的分析结合起来将会更全面的揭示谷子种质的遗传差异。综合应用多种检测方法进行遗传分析,以达到全面而准确地评价遗传差异已成为当前普遍采用的方法^[31,32]。

谷子在我国长期广阔复杂的自然条件下驯化和栽培,形成了丰富的种质类型。谷子品种间在长期自然选择和人工选择下积累了一定程度的遗传变异,在不同生态环境下栽培,适应性导致不同地理区域间的谷子品种在形态和农艺性状上存在较大的差

异^[1-3,33],但在遗传背景方面变化可能不大,蛋白质和分子标记的研究都支持这一观点^[13,16,34]。本实验研究也表明,DNA 水平上谷子品种间存在一定的遗传变异,且这种变异的程度并不高。由于谷子品种间的遗传变异有限,远不如种间遗传变异大^[13],因此,要使谷子育种有更大的突破,就必须突破品种的界限,要充分而有效的利用谷子野生近缘种甚至远缘种,通过现代生物技术进行种质材料的创新,以拓宽遗传改良的种质基础。

本实验的聚类分析结果表明,谷子 RAPD 标记的遗传聚类群与生态类型有很大的一致性,这与形态学和蛋白质标记的聚类群与生态类型一致的研究结果相同^[28,29],分子水平的研究结果较好地印证了形态学和蛋白质水平的研究结果。作物遗传育种为了更有效的合理选配杂交育种的亲本,需要对其进行分类,聚类分析提供了非常有价值的信息。由于形态学、蛋白质和分子水平上的研究结果基本都认为不同生态类型的谷子品种遗传差异较大,因此谷子品种间杂交考虑选配亲本时,应尽可能选择生态类型差异较大的育种材料,以使杂交后代有更多的机会出现理想的性状组合,从而提高育种的精度和效率。

参考文献:

- [1] V ISHVANA THA J K. Studies on the genetic variability in the world gemplasm collection of foxtail millet (*Setaria italica* Beauv.) [J]. Mysore Journal of Agricultural Sciences, 1978, 12(3): 519-520

- [2] SA TO M. , KO KUBU. T. Morphological differences of Italian millet (*Setaria italica* Beauv.) among seed collecting areas [J]. *Memoirs of Faculty of Agriculture, Kagoshima University*. 1988, 24 :101- 109.
- [3] SELVARANA M , GOMATH NAYAGAM P. Genetic variability in foxtail millet [*Setaria italica*(L.)Beauv.] [J]. *Crop Research Harar*, 2000, 20(3) 553- 554.
- [4] 古世禄 谷子研究新进展[M], 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 235- 241.
- [5] 中国农业科学院品种资源研究所. 高粱、谷子、黍稷优异资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 14- 25.
- [6] ZHOU X(周 祥), SUN P Y(孙培业), QIU Y L(仇玉玲), HOU B Y(侯变英), SUN T(孙 涛). A study on the basic karyotype of *Setaria italica* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*. 1989, 24(6) 30- 34.
- [7] JUSUFM , PERNES J. Genetic variability of foxtail millet (*Setaria italica* P. Beauv.). Electrophoretic studies of five isoenzyme systems [J]. *Theor Appl Genet*, 1985, 71 :385- 391.
- [8] KAWASEM , Sakamoto S. Variation and geographical distribution of esterase isozymes in foxtail millet [J]. *Japanese Journal of Genetics*, 1979, 54(6) 443.
- [9] LIUR T(刘润堂), GAOP P(高平平), WEN Q F(温琪汾). A study on esterase isoenzymes of foxtail millet germplasm and their related species [J]. *Acta Agriculturae Borealis Sinica*, 1989, 4(3) 36- 41.
- [10] GAOM J(高明君), CHENG J J(陈家驹). Isozymic studies on the region of cultivated foxtail millet [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1988, 14(2) :131- 136.
- [11] P V ICENT MOTO RO, TUMKUR K, VIRUPAKSHA D, RAJAGOPOL RAO. Proteins of Italian millet : amino acid composition, solubility fractionation and electrophoresis of protein fraction [J]. *J. Sci. Food Agric*. 1982, 33 :535- 542.
- [12] KUMAR K K, PARVATHY K PARAMESWARAN. Characterization of storage protein from selection varieties of foxtail millet (*Setaria italica*(L) Beauv). *J. Sci. Food Agric*. 1998, 77 :535- 542.
- [13] LIY(黎 裕), WANG Y R(王雅儒). Protein variation of foxtail millet and its related species [J]. *Crop Genetic Resource(作物品种资源)*, 1998, 2 :10- 12(in Chinese).
- [14] WANG ZH M(王志民), LIU CH J(刘春吉), WANG R Q(王润奇), GALEM D. Fingerprinting varieties of foxtail millet using probe Gfm 31 [J]. *Acta Genetica Sinica(遗传学报)*, 1996, 23(3) 228- 233(in Chinese).
- [15] SCHONTZ D, RETHER B. Genetic variability in foxtail millet, *Setaria italica*(L.) P. Beauv. : Identification and classification of lines with RAPD markers [J]. *Plant Breeding*, 1999, 118(2) :190- 192.
- [16] 中国农业科学院品种资源研究所. 高粱、谷子、黍稷优异种质[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 106- 110.
- [17] WELSH J, MCCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids. Rec*. 1990, 18 :7213- 7218.
- [18] WELSH J G K, KUBEL I K A R K. DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Rec*. 1990, 18 :6531- 6535.
- [19] ZHAO J(赵 锦), LIU M J(刘孟军), LIU Z R(吕增仁), WANG J R(王玖瑞). The application RAPD technique in studying genetic diversity of plant [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei(河北农业大学学报)*, 2000, 23(1) 25- 28, 36(in Chinese).
- [20] HU Y K(胡英考), XIN ZH Y(辛志勇), CHEN X(陈 孝). Biochemical and molecular markers of a yellow rust resistance wheat Th. Intermediate addition line [J]. *Acta Bot Boreal Occident Sinica(西北植物学报)* 2002, 22(1) :136- 140(in Chinese).
- [21] WANG T(王艇), SU Y J(苏应娟), HUANG CH(黄 超), ZHU JM(朱建明). Phylogenetic relationships of taxaceae based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Bot Boreal Occident Sinica(西北植物学报)* 2002, 20(1) 243- 249(in Chinese).
- [22] KUMPB, JAVORN I K B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers [J]. *Plant Sci*, 1996, 114(2) :149- 158.
- [23] WU XL(吴晓雷), HE C Y(贺超英), CHEN S Y(陈受宜), ZHUANG B CH(庄炳昌), WANG K CH(王克昌), WANG X CH(王学臣). Phylogenetic analysis of interspecies in genus glycine through SSR markers [J]. *Acta Genetica Sinica(遗传学报)*, 2001, 28(4) 359- 366 (in Chinese).
- [24] LIY, JIA J Z, WANG Y R, WU SH ZH. Intraspecific and interspecific variation in *Setaria* revealed by RAPD analysis [J]. *Genetic Resource & Crop Evaluation*. 1998, 45(3) 279- 285.
- [25] WELSH J, C PETERSON, M MOCLELL. Polymorphisms generated by arbitrary PCR in the mouse - Application to strain identification and genetic mapping [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19 :303- 306.
- [26] MAO J N(毛加宁), DUAN SH H(段世华), LI SH Q(李绍清), ZHU Y G(朱英国). Genetic analysis and identification of three groups three line hybrid rice and their parents by RAPD markers [J]. *Hereditas(遗传)*, 2002, 24(3) :283- 287(in Chinese).
- [27] DENNEQU N M L, TOUPANCE B, SARRA. A assessment of relationships between *Setaria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(7) :1061- 1066.
- [28] WEN K(温 奎), ZHANG SH Z(张士遵). Multivariate analysis of peroxidase isozyme data of foxtail millet [J]. *Acta Agriculturae Borealis Sinica(华北农学报)* 1990, 5(3) :14- 19(in Chinese).
- [29] 杨天育. 谷子优异种质资源遗传变异与创新利用研究[D]. 2002: 19- 20.
- [30] LEE M. DNA markers and plant breeding programs [J]. *Adv. Agron.* 1995, 55 :265- 334.
- [31] BUSO G S C, RANGEL P H, FERREIRA M E. Analysis of genetic variability of south American wild rice population (*Oryza glumifera*) with isozyme and RAPD markers [J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(1) :107- 117.
- [32] HOEY B K. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters and allozyme and RAPD markers [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 1996, 92(1) 92- 100.
- [33] LIY, WU S Z, CAO Y S. A phenotypic diversity analysis of foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.) landraces of Chinese origin [J]. *Genet Resour. Crop Evol*. 1996, 43 :377- 384.