

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.20267

黎瑞源, 石桃雄, 陈其蛟, 潘凡, 陈庆富. 中国 35 个苦荞审定品种 EST-SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 267-275

Li RY, Shi TX, Chen QJ, Pan F, Chen QF. Construction of EST-SSR fingerprinting and analysis of genetic diversity of thirty-five registered tartary buckwheat cultivars (*Fagopyrum tataricum*) in China[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(2): 267-275

中国 35 个苦荞审定品种 EST-SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析

黎瑞源¹, 石桃雄^{2*}, 陈其蛟², 潘凡², 陈庆富²

(1. 贵州师范大学贵州省信息与计算科学重点实验室, 贵阳 550001;

2. 贵州师范大学荞麦产业技术研究中心, 贵阳 550001)

摘要: 核心引物对种质资源遗传多样性分析、品种鉴定、指纹图谱构建等研究具有重要价值。本研究以 35 个苦荞 (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) 审定品种为材料, 从 91 对苦荞 EST-SSR 引物中筛选出 50 对多态性引物。综合考虑引物多态性信息量 (PIC) 大小、鉴别力 (DP), 筛选出等位变异位点数在 2 ~ 4, PIC 值在 0.60 ~ 0.78 之间的 6 对引物 (SSR9007、SSR6873、SSR7642、SSR2234、SSR6789、SSR68216) 构建了供试品种的分子指纹图谱。遗传多样性聚类分析结果表明, 供试品种的相似系数为 0.50 ~ 0.99。当遗传相似系数为 0.60 时, 可将供试品种分为 4 大类群, 其中 54.3% 的供试品种被聚为一类, 表明苦荞审定品种遗传组成差异较小, 遗传基础狭窄。聚类结果表明各类群间没有明显的地域分布趋势, 但能较好的反映供试品种间的亲缘关系。

关键词: 苦荞; EST-SSR; 核心引物; 遗传多样性

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)02-0267-09

Construction of EST-SSR fingerprinting and analysis of genetic diversity of thirty-five registered tartary buckwheat cultivars (*Fagopyrum tataricum*) in China

Li Rui-Yuan¹, Shi Tao-Xiong^{2*}, Chen Qi-Jiao², Pan Fan², Chen Qing-Fu²

(1. Key Laboratory of Information and Computing Science of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: Core primers are important in genetic diversity analysis, cultivar identification, and fingerprinting construction. In this study, 91 pairs of EST-SSR primers were screened using 35 registered tartary buckwheat cultivars, with 50 primers showing polymorphism. Based on the polymorphism information content (PIC) and discrimination power (DP) results, a core set of six SSR primers (SSR9007, SSR6873, SSR7642, SSR2234, SSR6789, and SSR68216) were further selected to construct fingerprinting of the 35 cultivars, with alleles amplified by each pair of primers ranging from 2 to 4 and PIC values ranging from 0.60 to 0.78. The UPGMA

收稿日期: 2016-06-12, 退修日期: 2016-07-21。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460280); 国家现代农业产业体系荞麦育种岗位科学家专项资金 (CARS-08-A4); 贵州省科技厅科学技术基金 (黔科合 JZ 字 [2014]2011 号); 贵州师范大学博士基金项目 (11904-05032130025, 11904-0514027)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31460280), Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-08-A4), Foundation of Guizhou Natural Science (Qiankehe JZ zi [2014]2011), and Scientific Research Foundation for Doctor of Guizhou Normal University (11904-05032130025, 11904-0514027)。

作者简介: 黎瑞源 (1980-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为生物信息和荞麦植物种质资源保护与开发利用 (E-mail: ruiyuan.li@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: shitaoxiong@126.com)。

cluster analysis showed that the genetic similarity of the 35 cultivars varied from 0.50 to 0.99. The cultivars were divided into four groups based on a genetic similarity of 0.60, with 54.3% remaining clustered together, indicating a close genetic relationship and narrow genetic basis. The genetic relationship was in accordance with their breeding history, but was not affected by their geographic differences.

Key words: Tartary buckwheat; EST-SSR; Core primer; Genetic diversity

苦荞 (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn), 又名鞑靼荞麦 (tartary buckwheat), 属双子叶蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属, 是荞麦属中仅次于甜荞 (*F. esculentum* Moench) 的第二大栽培种, 也是我国旱作农区重要的粮食和经济作物^[1]。我国云南、贵州、四川一带是苦荞的主产区和起源地。现贮存于国家种质资源库的苦荞资源达 1086 份, 其中, 云南、贵州、四川 3 省的材料占 48.5%^[2]。截至 2015 年, 经审定的苦荞品种共有 47 份, 其中, 国审品种 24 份, 省审品种 23 份, 云南、贵州、四川 3 省选育的品种占总数的 48.9%。

苦荞种质资源农艺性状变异丰富, 为种质创新提供了保证^[3,4]。但长期以来苦荞种植水平低、管理粗放、品种混杂、退化严重、同名异种和同种异名的现象普遍。随着苦荞审定品种和收集的地方品种数目逐渐增多, 品种间的遗传背景也趋于相近, 导致形态学、系谱资料和地理分析等传统分类方法难以对苦荞资源进行有效的区分。因此, 如何快速、有效地鉴别苦荞品种和选配优良亲本培育新品种, 已成为当前苦荞育种及生产中急需解决的问题。

微卫星 DNA (microsatellite DNA), 即简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 以其重复性好、多态性丰富、易于操作等优点, 已成为当前作物亲缘关系及遗传多样性分析、指纹图谱构建等研究常用的分子标记之一。如史建强等^[5]利用 19 对 SSR 引物对我国西南地区 81 份荞麦及其野生资源的亲缘关系进行了分析, 结果显示苦荞和小米荞 (*F. kashmirianum* Munshi) 的遗传差异最小, 其次是金荞麦 (*F. cymosum* (Trev.) Meisn), 与甜荞的遗传差异最大。高帆等^[6]从 250 对 SSR 引物中筛选出 19 对用于分析 50 份不同地理来源的苦荞种质的遗传多样性, 研究发现四川苦荞种质资源遗传多样性最丰富。筛选同属作物甜荞的 SSR 引物, 对苦荞资源遗传多样性的分析结果表明, 苦

荞资源遗传多样性较为丰富^[7-10]。韩瑞霞等^[11]开发了 500 对苦荞 SSR 引物, 扩增多态性位点比率为 10.8%。筛选其中的 28 对引物对 166 份苦荞资源进行遗传多样性分析, 结果表明云南、四川和西藏地区的苦荞资源遗传多样性更为丰富, 且亲缘关系较近, 研究还发现苦荞的遗传相似性与地理分布有很大关联。然而, 目前苦荞的遗传多样性分析主要针对地方种质, 所采用的 SSR 引物对也并非来源于苦荞基因组序列, 扩增的多态性位点比率较低。因此, 本研究利用基于苦荞基因组序列开发的 SSR 分子标记对我国已审定的苦荞品种, 系统、全面地开展遗传多样性分析及指纹图谱的构建。

本研究以我国 1990 – 2015 年期间审定的 35 个苦荞品种为材料, 从黎瑞源等^[13]开发的 91 对有效扩增的 EST-SSR 引物中进行筛选, 获得了 6 对可用于苦荞 SSR 指纹图谱构建和遗传多样性分析的核心引物, 可为苦荞品种鉴定、种质资源管理、品种选育等生产实践应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

35 个苦荞品种由贵州师范大学荞麦产业技术研究中心提供 (表 1), 分别从全国 9 个省市的 15 个育种单位选育, 均在 1990 – 2015 年期间通过省级以上审定。

1.2 DNA 提取

于苦荞苗期, 每个供试品种随机选取 10 个单株, 将其幼嫩叶片混合后利用小样 CTAB 法分别提取 35 个苦荞品种的基因组 DNA, 以 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 检测。DNA 浓度稀释至 50 ng/μL, 置 -20℃ 冰箱保存。

1.3 SSR 分子标记分析

本研究参考的 91 对 EST-SSR 引物^[13], 经验证可有效用于苦荞基因组序列的扩增。PCR 扩增体系为 10 μL, 其中 DNA 模板 (50 ng/μL) 2.0 μL,

表 1 供试苦荞品种

Table 1 Tartary buckwheat cultivars used in the study

编号 Code	品种 Cultivars	编号 Code	品种 Cultivars
1	‘川荞 1 号’ ‘Chuangqiao 1’	19	‘黔黑荞 1 号’ Qianheiqiao 1’
2	‘川荞 2 号’ ‘Chuangqiao 2’	20	‘黔苦 2 号’ ‘Qianku 2’
3	‘川荞 3 号’ ‘Chuangqiao 3’	21	‘黔苦 3 号’ ‘Qianku 3’
4	‘川荞 4 号’ ‘Chuangqiao 4’	22	‘黔苦 4 号’ ‘Qianku 4’
5	‘川荞 5 号’ ‘Chuangqiao 5’	23	‘黔苦 5 号’ ‘Qianku 5’
6	‘迪苦 1 号’ ‘Diku 1’	24	‘黔苦 6 号’ ‘Qianku 6’
7	‘凤凰苦荞’ ‘Fenghuangkuqiao’	25	‘塘湾苦荞’ ‘Tangwankuqiao’
8	‘甘荞 1 号’ ‘Ganqiao 1’	26	‘西农 9909’ ‘Xinong 9909’
9	‘黑丰 1 号’ ‘Heifeng 1’	27	‘西农 9920’ ‘Xinong 9920’
10	‘晋荞 2 号’ ‘Jinqiao 2’	28	‘西荞 1 号’ ‘Xiqiao 1’
11	‘晋荞 4 号’ ‘Jinqiao 4’	29	‘西荞 2 号’ ‘Xiqiao 2’
12	‘晋荞 5 号’ ‘Jinqiao 5’	30	‘西荞 3 号’ ‘Xiqiao 3’
13	‘晋荞 6 号’ ‘Jinqiao 6’	31	‘榆 6-21’ ‘Yu 6-21’
14	‘九江苦荞’ ‘Jiujiangkuqiao’	32	‘云荞 1 号’ ‘Yunqiao 1’
15	‘六苦 2 号’ ‘Liuku 2’	33	‘云荞 2 号’ ‘Yunqiao 2’
16	‘六苦 3 号’ ‘Liuku 3’	34	‘昭荞 1 号’ ‘Shaoqiao 1’
17	‘米荞 1 号’ ‘Miqiao 1’	35	‘昭荞 2 号’ ‘Shaoqiao 2’
18	‘宁荞 2 号’ ‘Ningqiao 2’		

上下游引物(100 ng/μL)各 0.5 μL, 2 × PCR Mix 5 μL(天根)和 ddH₂O 2.0 μL。反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 以最佳温度退火 45 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 然后于 4℃保存。

PCR 产物先用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测, 然后经 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离。凝胶经染色、显影后读带, 估算 PCR 扩增片段的大小。

1.4 数据分析

基于扩增产物的电泳图谱, 在同一位置上将可

重复的、清晰的条带记为 1, 无带计为 0, 建立原始数据矩阵。每对引物的多态性信息量 $PIC = 1 - \sum p_i^2$, 其中 p_i 为基因座位上第 i 个等位基因出现的频率。利用 NTSYSpc 2.1 软件进行相似系数的计算, 并基于 SAHN 程序的 UPGMA 方法进行聚类分析。

1.5 核心引物指纹图谱的构建

记录每份实验材料经不同 SSR 引物扩增条带的数目和相应的片段大小, 按每对引物扩增条带从大到小的顺序记录, 再按照引物的固定顺序对扩增条带进行编号, 表示品种的 SSR 指纹图谱代码。

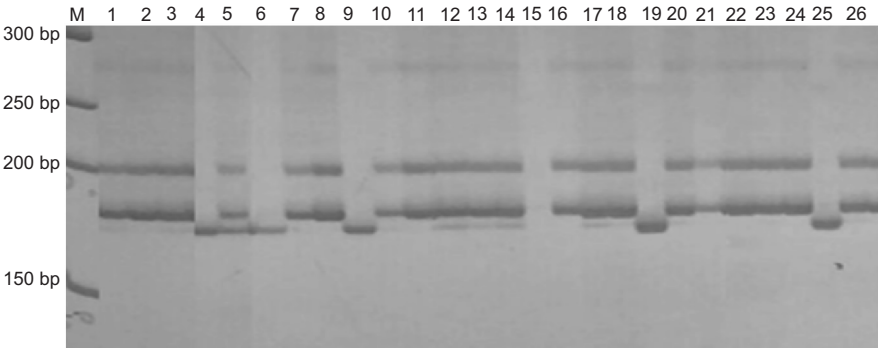
2 结果与分析

2.1 EST-SSR 标记多态性分析

采用 91 对 EST-SSR 引物对 35 个苦荞品种的扩增结果显示, 其中 50 对引物具有多态性(图 1), 共扩增出 167 个多态性位点, 平均每对引物产生 3.3 个等位变异, 变幅为 2 ~ 7。多态信息含量(PIC)在 0.06 ~ 0.78 之间, 平均为 0.44。扩增产物片段约为 98 ~ 410 bp(表 2)。

2.2 核心引物的筛选及品种指纹图谱构建

通过 50 对 SSR 引物扩增谱带的统计分析, 综合考虑 PIC 值大小和引物组合鉴别力(引物组合所能区分的最大品种数), 确定 6 对引物 SSR9007、SSR6873、SSR7642、SSR2234、SSR6789 和 SSR68216 为核心引物。这些引物具有较高的多态性, 它们共扩增出 21 个等位变异位点, 平均每对引物 3.3 个。等位变异位点长度约为 103 ~ 410 bp, PIC 值约在 0.60 ~ 0.78 之间, 平均为 0.71(表 2)。



M: 分子量标准; 1 ~ 26: 对应实验材料的编号同表 1。
M: DNA ladder; 1 ~ 26: codes of cultivars corresponding to those in Table 1.

图 1 引物 SSR2234 对部分苦荞品种的扩增结果

Fig. 1 DNA fragments amplified by SSR2234 in the tartary buckwheat cultivars

表 2 苦荞 50 对多态性引物信息
Table 2 Information on 50 polymorphic primer pairs of tartary buckwheat

引物 Primer	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')	SSR 基序 SSR motif	PS (bp)	PIC	<i>N</i> _a	PR (bp)
SSR7582	ATCCGAAACCGCCTCCTTAC	GGGGTTTTGGTGCAGGTACT	(TCA)5	234	0.46	6	130–410
SSR9023	TCGGGGCCACAAGTCAATAC	TCTGGATAAGGGTTGGGGGT	(CT)8	136	0.61	6	145–300
SSR7676	CGAGCACGTCGTTGAACTTG	AGGAGCTGCAGGTGAGGATA	(AGA)7	191	0.41	2	150–170
SSR7622	GGA CTGGCCAGCTGATTCT	GTGAGGGCTGGTGTGTGAAGA	(GTT)5	218	0.38	2	250–252
SSR7678	GCCAACATGCAAATGACCCA	CGGTGGATACGGGTAGGTTG	(TGG)5	249	0.57	3	250–355
SSR7642	GTTACGGAGGAGCGGAAGAG	GGCTATGAGCATTATTTTGGTGG	(GTG)5	138	0.78	3	150–250
SSR8993	TCTGTGTGGTGAATTGGGC	CGCTTCCTCCCACATCTAGC	(AG)6	154	0.25	3	160–190
SSR9065	ATCTGATCTTCCTCCGACGC	CCTGGATCTCGAACCCCATC	(AG)6	119	0.34	4	119–137
SSR9095	AGCTGCAGCCATGTCCATAA	CATCATGAGACTCGGGACGG	(TGC)5	175	0.49	3	175–252
SSR8951	TGACAACCCAGTAGAAATCAAAGT	TCATCCAAGTCTGACCACA	(T)10	149	0.5	2	152–165
SSR9007	AGTTCACGTGAGATCCTAGTGT	CAACAGGGGAGAATGACGCT	(AT)6	103	0.7	2	103–148
SSR8983	TAGAAGATTTGTGGCCGCCT	GGGAAATCACAATCATAGTAAAGCA	(A)11	150	0.56	2	199–240
SSR9045	ACGGTTTGCCTTTGGATTGC	CACCGACAACAACCGTTTCC	(AG)6	274	0.16	3	240–274
SSR7606	AGTTCGGCGGGAAGATGAAT	AGTAGTCCCGGAGCTCATAT	(GCA)5	232	0.16	3	245–322
SSR7662	AATGGCGGCAATCTCGCTA	TGAGGATTTACGGGGCTTGG	(TCT)5	191	0.66	2	160–190
SSR2218	TATCCGGCTAACCCCTACCA	ACACCTTCACCTTGAATCTCG	(TA)6	175	0.36	4	155–180
SSR2298	CCCAGTTAAGGCCGGAATGA	TAAGGCTGGTGGTGGGGATA	(TGT)5	175	0.26	4	170–272
SSR2314	TGGTCGTAGAACCAACTCGC	GTTCAATACCTGCACCGCCT	(GGA)5	195	0.41	2	202–205
SSR2158	GCTAGTGAGGCAGCTGAGAA	TCTGCACGGACTAGTGAAGC	(A)11	209	0.26	3	155–210
SSR2214	GTGAGTCGGAAACCGTAGCA	ACCCATATCGCAGGAAAGCAA	(AT)6	102	0.5	3	98–105
SSR2252	CACGCCCTCCACTTTTCTT	TGCAAGCGATAGTAGCGATCC	(GT)6	117	0.34	2	120–140
SSR2288	CCCCAACAAACAGAGCCAAAA	CAGGGGAGGGTTGTTGTTGT	(CT)7	138	0.43	3	160–250
SSR6827	AAACCACGAGCTTCTCTCC	AGAATTTGCGGGAAGGGTGA	(CT)6	138	0.47	3	152–158
SSR6865	GCAATGAGATCAGCCGGTTC	TCGCCTTTCTTTCTCCTTGG	(TGC)5	134	0.37	2	160–245
SSR2234	CTTGCCAGAGCCAAAGGTAT	AGCAAAACCTATGCTTTTACTGC	(AT)7	168	0.73	4	168–265
SSR6871	GAGAGATGAGCACAGCGTCA	TCGATGGCGAAACCCAAGTT	(ATC)5	177	0.25	2	300–330
SSR6821	ACCTGCAAAGCAACCTAGTGA	GCCCCAATCGAAGTTTACC	(GA)6	200	0.7	3	198–400
SSR6873	TTGATGGACACTAGGCAAGGT	GTGAGGAGCAATTGGCGTTT	(AGA)5	170	0.76	4	160–400
SSR2216	TTTTCCACCTCAGAGGGCAG	TTGCACATTGTCGTTTCCA	(TA)6	180	0.39	7	170–215
SSR2310	GGGAATCCTCCACCGTTGAT	TCCTGAAGCCGAGTCTCCTA	(TTC)5	129	0.53	3	130–245
SSR2312	ATGAGTGCACCACATCCACC	ATTGCAGCATTAGGAGGCGG	(CCA)5	131	0.53	6	130–250
SSR6853	GGCCTCCTTGAACAGCTAGA	GCAGTGACCGAAGTGCAGAT	(A)10	109	0.65	6	109–124
SSR6805	AAGACAGTGGTGGTAGTGGC	TAGAGGAAAGTAGTGCGGCG	(CT)6	136	0.49	3	145–160
SSR6891	TGAGGGGCCAATGCATGAGA	GGAGGCTTCTTAGTCTTTTCCC	(ATG)5	142	0.33	3	140–148
SSR6875	GAATCCACCATCACCAGGCA	GTTTTGATGCCAACTGCGA	(CAT)5	141	0.3	3	141–190
SSR6789	GGTTGTGGTTTCTGACGTTG	CCGTAAACCCAGTTCGTAGT	(T)10	186	0.6	4	160–210
SSR6843	TGAGTAATTGAAAATGGAGATCGAC	TACTCCCAACCAGCAATCCG	(GA)6	194	0.46	4	195–225
SSR6859	ATGCTTGGGACATTTGACACATT	CGAGTCTAAAGCCAAGTGGGA	(AT)7	193	0.5	3	180–193
SSR7654	GATCACGGTCACCATCACGA	CAAGAGCGAGCATCCAGAG	(CAC)5	261	0.61	4	155–198
SSR7668	AGTGATTCTCCAGGTCCCCA	CCTCAATTACAGAGCAGCCC	(TCT)5	109	0.26	3	109–210
SSR6819	CAGTTTGAAGGGCAGCAGGA	TCTCCACCAGCAACAACGTA	(AT)6	190	0.5	6	175–210
SSR6811	AGCAGCAAGAAGAACCCAGA	CGTTATCCTTCTTTCTTAACTGT	(TC)7	163	0.21	2	160–165
SSR5196	ATTCTTCAGCCCTCTTCTCCTC	GGCTATCCTGATGGTTATGCAG	(CT)6	244	0.21	2	250–260
SSR5166	GACTCAACAAAGCTGGCTGC	CAAGGAAACCAACGGCAAGG	(AAG)5	134	0.26	4	140–165
SSR5176	GCTTTGGAGAAGGGACTTTTGC	GATCGAAGGACCAAGCCCTTA	(AAG)5	200	0.16	2	200–270
SSR9013	TGTAGCTGCAGTTGAAGACG	CTTCCCGGTTTTCTGGTGA	(A)14	192	0.46	3	198–380
SSR8963	CGAAGCTCAGACAGGGAAGG	ACCGGGTTTTACGTAGACGG	(T)11	122	0.06	5	110–145
SSR8969	TGTTGGGAGTTCTTCCTTCCA	CTGTACACCCCCAACTTCA	(T)10	198	0.58	2	210–450
SSR8947	ATCCCATGGCAGACGACAAG	TGTGCAATGCCGATTTACAG	(A)12	159	0.34	3	110–160
SSR2304	TGAGCGCAATGCATCTGTA	AGGAGAGAGCGCGAAAAACA	(TCT)5	166	0.65	4	180–240

注：PS，扩增产物大小；PIC，多态信息含量；*N*_a，有效等位变异数；PR，扩增产物大小范围。
Notes: PS, product size; PIC, polymorphism information content; *N*_a, effective number of alleles; PR, product size range.

6 对引物中，SSR9007 和 SSR6873 引物组合，可将‘川荞 4 号’、‘晋荞 5 号’、‘昭荞 1 号’、‘昭荞 2 号’等 8 个品种区分开，占品种总数的 22.9%。将它们结合引物 SSR9007、SSR6873 和 SSR7642 联合分析，又可区分‘晋荞 2 号’、‘黔苦 3 号’、‘川荞 2 号’、‘西荞 1 号’等 16 个品种，占品种总数的 45.7%。引物 SSR9007、SSR6873、SSR7642 和 SSR2234 可区分‘川荞 1 号’、‘凤凰苦荞’、‘黔苦 4 号’等 21 个品种，占品种总数的

60.0%。引物 SSR9007、SSR6873、SSR7642、SSR2234、SSR6821 可将‘黑丰 1 号’、‘西荞 2 号’、‘米荞 1 号’、‘黔苦 6 号’等 30 个品种区分开，占品种总数的 85.7%。而 SSR9007、SSR6873、SSR7642、SSR2234、SSR6821 和 SSR6789 等 6 对引物，可将 35 个品种全部区分开。本研究按照 SSR9007/SSR6873/SSR7642/SSR2234/SSR6821/SSR6789 的引物组合，构建了 35 个苦荞品种的 EST-SSR 指纹图谱(表 3)。

表 3 35 个苦荞审定品种 EST-SSR 核心引物的指纹图谱
Table 3 Fingerprinting for 35 registered tartary buckwheat cultivars constructed by core SSR primers

编号 Code	品种 Cultivar	引物及扩增条带大小 Primer and amplified fragments size (bp)					
		SSR9007 148/103	SSR6873 400/360/170/160	SSR7642 250/170/150	SSR2234 265/200/170/168	SSR6821 400/260/198/195	SSR6789 210/190/180/160
1	‘川荞 1 号’	01	0010	110	0110	1011	0101
2	‘川荞 2 号’	11	1110	001	1100	0010	0000
3	‘川荞 3 号’	00	1111	111	1101	0011	1111
4	‘川荞 4 号’	11	0010	100	0110	1011	0101
5	‘川荞 5 号’	10	0010	111	1110	1011	0111
6	‘迪苦 1 号’	01	1110	101	1100	0010	1111
7	‘凤凰苦荞’	01	0010	110	0001	1011	0101
8	‘甘荞 1 号’	11	1111	111	1111	1011	1111
9	‘黑丰 1 号’	00	0010	100	0001	0010	0101
10	‘晋荞 2 号’	01	1110	110	0001	0011	1011
11	‘晋荞 4 号’	00	0000	001	1110	0000	0000
12	‘晋荞 5 号’	10	0000	100	0001	0010	0101
13	‘晋荞 6 号’	11	1110	110	0110	1011	0101
14	‘九江苦荞’	10	1111	101	1110	1011	0101
15	‘六苦 2 号’	10	0010	111	1111	1011	1111
16	‘六苦 3 号’	10	1101	111	1111	1011	1111
17	‘米荞 1 号’	00	0000	000	0000	0000	0000
18	‘宁荞 2 号’	00	0000	001	1110	0010	0101
19	‘黔黑荞 1 号’	01	1110	101	1100	0010	1111
20	‘黔苦 2 号’	10	1110	111	1111	1011	1111
21	‘黔苦 3 号’	00	0010	101	1110	1011	0101
22	‘黔苦 4 号’	10	0010	100	0001	1011	1111
23	‘黔苦 5 号’	11	1101	101	1110	0010	0101
24	‘黔苦 6 号’	00	0000	000	0000	0010	0000
25	‘塘湾苦荞’	10	1101	101	1110	1011	0101
26	‘西农 9909’	00	0000	101	1110	0010	0101
27	‘西农 9920’	00	0000	101	1110	1010	0101
28	‘西荞 1 号’	10	1110	001	1110	1010	0101
29	‘西荞 2 号’	00	0010	100	0001	1010	0101
30	‘西荞 3 号’	00	0000	001	1110	0010	0000
31	‘榆 6-21’	00	0010	101	1110	0011	0101
32	‘云荞 1 号’	10	0010	101	1110	0010	0101
33	‘云荞 2 号’	10	0010	101	1110	1010	0101
34	‘昭荞 1 号’	00	0001	101	1110	1011	0101
35	‘昭荞 2 号’	00	1110	101	1110	0010	0101

注：‘1’，表示检测到目的条带；‘0’，表示未检测到条带。
Notes: ‘1’，band with the product size detected; ‘0’，band not detected.

2.3 苦荞审定品种的遗传多样性和聚类分析

根据 6 对 SSR 核心引物的扩增谱带，构建了 35 个苦荞品种遗传聚类图(图 2)。当遗传相似系数为 0.500 时，所有供试品种被聚为一类；相似系数为 0.552 时，88.6%的供试品种可聚为一类。当相似系数为 0.600 时，可将供试品种分为 4 大类群，即 1 个大类群 I 和 3 个小类群 II、III、IV。

聚类分析结果表明，I 类群共包含 19 个品种，占品种总数的 54.3%。当遗传相似系数为 0.650 时，I 类群可被分为 2 个亚类，即 I-1 和 I-2。I-1 亚类包含 15 个品种，当遗传相似系数为 0.690 时，又可进一步划分为 I-1-A、I-1-B 两组。‘川荞 1 号’、‘川荞 4 号’、‘晋荞 6 号’聚为 A 组，其中‘川荞 1 号’和‘川荞 4 号’均为引进品种‘老鸦苦荞’的后代。B 组共包含 12 个品种，其中西北地区 4 个，西南地区 6 个、贵州 2 个，‘西荞 1 号’和‘宁荞 2 号’均由地方种‘额洛乌且’经辐射诱变系统选育而成。‘川荞 2 号’、‘迪苦 1 号’、‘黔黑荞 1 号’、‘昭荞 2 号’聚为 I-2 亚类，均属西南地区品种。

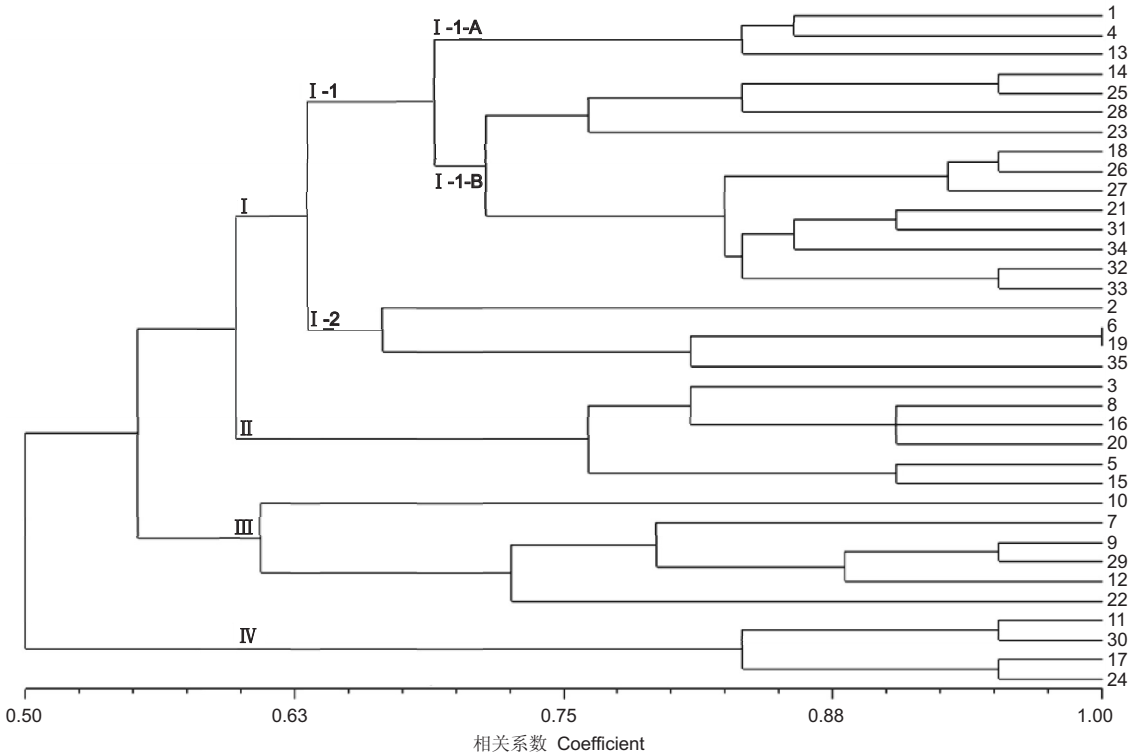
II 类群包含‘川荞 3 号’、‘甘荞 1 号’、‘六苦 3 号’、‘黔苦 2 号’、‘川荞 5 号’、‘六苦 2 号’6 个品种。由‘川荞 3 号’和‘川荞 5 号’经杂交育种而成，地方品种‘额拉’是二者共有的亲本；其中‘六苦 2 号’和‘六苦 3 号’均由地方品种‘细米苦荞’系统选育而成。

III 类群包含‘晋荞 2 号’、‘凤凰苦荞’、‘黑丰 1 号’、‘西荞 2 号’、‘晋荞 5 号’、‘黔苦 4 号’等 6 个品种，其中‘黑丰 1 号’和‘晋荞 5 号’均为‘榆 6-21’的后代，其中‘晋荞 2 号’和‘西荞 2 号’通过地方品种诱变选育获得；‘凤凰苦荞’和‘黔苦 4 号’由地方品种选育而成。

IV 类包含‘晋荞 4 号’、‘西荞 3 号’、‘米荞 1 号’和‘黔苦 6 号’等 4 个品种，其中后 3 份都属于西南地区品种。

3 讨论

利用 SSR 分子标记对苦荞种质进行亲缘关系和遗传多样性的研究已有一些报道^[4,5,7,8]，但它们所用的标记大多来源于从不同科、属作物或同属作



编号对应的品种名见表 1。
Numbers corresponding to species are shown in Table 1.

图 2 35 个苦荞品种 SSR 标记的聚类结果
Fig. 2 Dendrogram of 35 cultivars of tartary buckwheat based on SSR analysis

物甜荞中筛选出的 SSR 引物, 在苦荞种质中扩增得到的多态性位点比率较低, 且引物基于未知序列开发, 所提供的信息量较少, 难以用于后续分子标记辅助育种和比较基因组学等研究。随着荞麦分子生物学的日益深入及 EST 序列的不断增加, 大规模 EST-SSR 标记的开发工作相继展开^[12,13]。EST-SSR 除具备传统基因组 SSR 标记的优势外, 还具有通用性好、与表型性状直接关联等优点, 从而强化了其在遗传多样性分析、指纹图谱与遗传图谱构建中的应用^[14,15]。本研究以 35 个苦荞审定品种为材料, 从 91 对苦荞 EST-SSR 引物中筛选得到 50 对引物, 共扩增出 167 个多态性位点, 引物扩增的等位变异位点数目约 2 ~ 7, 平均值为 3.3, 接近韩瑞霞等^[3]利用重组微卫星引物方法开发的 SSR 引物所获得的平均 3.5 的位点数, 但低于高帆等^[6]获得的平均 7.42 的位点数。实验结果表明本研究筛选的 EST-SSR 标记, 比较适合用于苦荞种质资源指纹图谱的构建。而在扩增变异位点数等指标上与高帆等^[6]的研究存在较大差异, 原因可能与供试苦荞材料来源的广泛程度有关。

以往对作物品种鉴定指纹图谱的研究表明, 物种基因组越复杂、供试的品种数目越多, 核心引物使用的数量也越多。据农业部 2007 年颁布的行业标准, 水稻 (*Oryza sativa* L.)^[16] ($2n=2x=24$, $n=12$) 和玉米 (*Zea mays* L.)^[17] ($2n=2x=20$, $n=10$) 新品种 SSR 指纹图谱鉴定选用的核心引物数量分别为 12 和 20 对; 小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[18] ($2n=6x=42$, $n=7$)、甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.)^[19] ($2n=4x=38$, $n=19$)、茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)^[20] ($2n=2x=30$, $n=12$) 品种 SSR 指纹图谱研究中提出的核心引物数目分别为 21、20 和 17 对。李月^[14]在普通荞麦 (*F. esculentum* Moench) ($2n=2x=16$, $n=8$) 种质资源的 SSR 指纹图谱构建的研究中选出 7 对核心引物。苦荞基因组约有 530 Mb^[21], 大小与水稻相当, 小于甜荞, 远小于玉米、甘蓝型油菜和茶树等作物。因此, 本研究结合引物多态信息量 (PIC) 及鉴别力, 筛选出 6 对 EST-SSR 引物作为苦荞审定品种鉴定的核心引物, 可以有效用于苦荞品种的鉴别。

核心引物使用的数量还被证实与引物等位位点数及多态性水平有关。引物鉴别力 (discrimination

power, DP) 是指一对引物所能区别的最大分析对象的数目, 引物多态信息量 PIC 越大, 鉴别力越强, 所需引物数量则越少^[22]。马琳等^[23]使用平均等位位点数 4.8、PIC 在 0.52 ~ 0.68 的 6 对核心 SSR 引物即可将 24 份贵州水稻地方品种区分开。段艳凤等^[24]利用平均等位位点数目为 12.2、PIC 在 0.76 ~ 0.89 的 6 对 SSR 核心引物可将 88 个马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 品种全部区分开。李月^[14]利用平均等位位点数 14.0、PIC 在 0.92 ~ 0.96 的 4 对 SSR 核心引物组合将 152 个普通荞麦种质完全区分。王庆彪等^[19]也利用多态性较好的 8 对核心 SSR 引物将 50 个甘蓝型油菜品种全部区分开。也有研究表明, 在保证品种指纹图谱准确性和一致性的基础上, 为缩短各品种指纹图谱字符串长度, 选择核心引物的等位位点数都不应超过 4^[20]。本研究筛选出的 6 对核心引物符合上述情况。虽然苦荞基因组测序结果尚未公布, 无法了解 6 对核心引物在染色体上的分布, 但该核心引物多态性较为丰富, 聚类结果也可全部区分, 表明它们适合用于苦荞品种分子指纹鉴定的研究。

本研究核心引物遗传聚类分析结果表明, 当相似系数为 0.600 时, 可将供试品种分为 4 大类群, 但 54.3% 的供试材料仍聚为同一亚类, 表明苦荞审定品种在遗传组成上差异较小, 遗传基础比较狭窄。分析发现, 4 大类群间没有明显的地域分布特征趋势, 这与高帆等^[6]和田晓庆等^[7]的研究结果一致, 但有悖于徐笑宇等^[8]和韩瑞霞等^[11]的苦荞遗传相似性与地理分布有很大关系的结论, 原因可能与供试品种的数量和来源广泛程度有关, 即供试品种数目越多, 地方品种所占比例越大, 地理来源越广泛, 遗传相似性与地理分布关系越明显。

本研究基于 6 对核心 EST-SSR 引物对 35 个苦荞品种的聚类分析结果与品种的系谱来源有较好的一致性。大部分具有共同亲本的品种聚为一类, 如‘川荞 1 号’和‘川荞 4 号’、‘川荞 3 号’和‘川荞 5 号’、‘六苦 2 号’和‘六苦 3 号’、‘黑丰 1 号’和‘晋荞 5 号’等。但也有聚类分析结果与实际亲缘关系不符之处, 如‘川荞 2 号’和‘川荞 3 号’均由‘九江苦荞’通过杂交选育而成, 却聚在不同的类群中, 原因可能是这 2 个品种的育种目标不同, 造成这 2 个品种的遗传组成中来源于‘九江苦荞’的部分在位点和数量上存在较大的差异, 或者频繁的

传种和扩繁影响了亲本的纯度所导致。

参考文献:

- [1] Lin RF, 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] 林汝法. 荞麦举要[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2013: 46-47.
Lin RF. Tartary Buckwheat[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2013: 46-47.
- [3] 潘凡, 石桃雄, 陈其皎, 孟子焯, 梁成刚, 陈庆富. 苦荞种质主要农艺性状的变异及其对单株粒重的贡献研究[J]. 植物科学学报, 2015, 33(6): 829-839.
Pan F, Shi TX, Chen QJ, Meng ZY, Liang CG, Chen QF. Variation in major agronomic traits and its contribution to grain weight per plant in tartary buckwheat germplasm[J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(6): 829-839.
- [4] 贾瑞玲, 马宁, 魏立平, 刘彦明, 南铭. 50份苦荞种质资源农艺性状的遗传多样性分析[J]. 干旱地区农业研究, 2015, 33(5): 11-16.
Jia RL, Ma N, Wei LP, Liu YM, Nan M. Genetic diversity analysis on the agronomic characteristics of 50 tartary buckwheat germplasms[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2015, 33(5): 11-16.
- [5] 史建强, 李艳琴, 张宗文, 吴斌, 王安虎. 荞麦及野生种遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 443-450.
Shi JQ, Li YQ, Zhang ZW, Wu B, Wang AH. Genetic diversity of buckwheat and its wild species[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(3): 443-450.
- [6] 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.
Gao F, Zhang ZW, Wu B. Construction and application of SSR molecular markers system for genetic diversity analysis of Chinese tartary buckwheat germplasm resources[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(6): 1042-1053.
- [7] 田晓庆, 徐宏亚, 汪灿, 阮仁武, 袁晓辉, 易泽林, 刘光德. 用 SSR 标记分析荞麦栽培种资源的遗传多样性[J]. 作物杂志, 2013(5): 28-32.
Tian XQ, Xu HY, Wang C, Ruan RW, Yuan XH, Yi ZL, Liu GD. Genetic diversity of common buckwheat based on SSR markers[J]. *Crops*, 2013(5): 28-32.
- [8] 徐笑宇, 方正武, 杨璞, 高金锋, 王鹏科, 冯佰利. 苦荞遗传多样性分析与核心种质筛选[J]. 干旱地区农业研究, 2015, 33(1): 268-277.
Xu XY, Fang ZW, Yang P, Gao JF, Wang PK, Feng BL. Genetic diversity analysis of tartary buckwheat and selection of core collections[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2015, 33(1): 268-277.
- [9] 莫日更朝格图, 王鹏科, 高金锋, 高小丽, 柴岩. 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.
Morigengchao GT, Wang PK, Gao JF, Gao XL, Chai Y. Genetic diversity of tartary buckwheat germplasms[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(2): 255-261.
- [10] 杨学文, 丁素荣, 胡陶, 刘迎春, 张晓荣, 生国利. 104份苦荞种质的遗传多样性分析[J]. 作物杂志, 2013(6): 3-17.
Yang XW, Ding SR, Hu T, Liu YC, Zhang XR, Sheng GL. Genetic diversity of 104 tartary buckwheat accessions[J]. *Crops*, 2013(6): 13-17.
- [11] 韩瑞霞, 张宗文, 吴斌, 李艳琴. 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.
Han RX, Zhang ZW, Wu B, Li YQ. Development of SSR markers and application in analysis of genetic diversity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(5): 759-764.
- [12] 石桃雄, 黎瑞源, 郭菊卉, 李月, 李光, 陈庆富. 基于普通荞麦种子表达序列标签微卫星标记的开发[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(3): 1-5.
Shi TX, Li RY, Guo JH, Li Y, Li G, Chen QF. Development of SSR molecular markers based on expression sequence tags from seeds of *Fagopyrum esculentum* [J]. *Guizhou Agricultural Science*, 2014, 42(3): 1-5.
- [13] 黎瑞源, 潘凡, 陈庆富, 石桃雄. 苦荞转录组 EST-SSR 发掘及多态性分析[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(4): 42-52.
Li RY, Pan F, Chen QF, Shi TX. Excavation and polymorphism analysis of EST-SSR from transcriptome of tartary buckwheat[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(4): 42-52.
- [14] 李月. 普通荞麦种质资源农艺性状评价和 SSR 遗传多样性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2014.
Li Y. Genetic diversity of common buckwheat germplasm resources by SSR markers and their evaluation on agronomic traits [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2014.
- [15] 郭菊卉. 普通荞麦重组自交系群体 SSR 标记遗传作图与重要农艺性状的 QTL 定位[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2014.
Guo JH. The genetic mapping of SSR markers on RIL populations of common buckwheat and the QTL location of major agronomic traits [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2014.
- [16] 水稻品种鉴定: DNA 指纹方法. 中华人民共和国农业行业

- 标准: NY/T 1433-2007 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- Identification of rice (*Oryza sativa* L.) varieties using microsatellite markers. Agricultural Sector Standard of The People's Republic of China: NY/T 1433-2007 [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [17] 玉米品种鉴定: DNA 指纹方法. 中华人民共和国农业行业标准: NY/T 1432-2007 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- Maize variety identification molecular techniques. Agricultural Sector Standard of The People's Republic of China: NY/T 1432-2007 [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [18] 王立新, 常利芳, 李宏博, 季伟, 刘丽华, 赵昌平. 小麦区试品系 DUS 测试的分子标记[J]. 作物学报, 2010, 36(7): 1114-1125.
- Wang LX, Chang LF, Li HB, Ji W, Liu LH, Zhao CP. Molecular markers for estimating distinctness, uniformity, and stability of wheat lines in regional trials[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(7): 1114-1125.
- [19] 王庆彪, 张扬勇, 庄木, 杨丽梅, 刘玉梅, 吕红豪, 方智远. 中国 50 个甘蓝代表品种 EST-SSR 指纹图谱的构建[J]. 中国农业科学, 2014, 47(1): 111-121.
- Wang QB, Zhang YY, Zhuang M, Yang LM, Liu YM, Lü HH, Fang ZY. EST-SSR fingerprinting of fifty cabbage representative varieties from China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(1): 111-121.
- [20] 杨阳, 刘振, 赵洋, 梁国强. 湖南省主要茶树品种分子指纹图谱的构建[J]. 茶叶科学, 2010, 30(5): 367-373.
- Yang Y, Liu Z, Zhao Y, Liang GQ. Construction of DNA fingerprints for tea cultivars originated from Hunan province [J]. *Journal of Tea Science*, 2010, 30(5): 367-373.
- [21] Nagano M, Aii J, Campbell C, Kawasaki S, Adachi T. Genome size analysis of the genus *Fagopyrum* [J]. *Fagopyrum*, 2000, 17: 35-44.
- [22] Kloosterman AD, Budowle B, Daselaar P. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. [J]. *Int J Legal Med*, 1993, 105: 257-264.
- [23] 马琳, 余显权, 赵福胜. 贵州地方水稻品种“禾”的 SSR 指纹图谱构建[J]. 西南农业学报, 2010, 23(1): 5-10.
- Ma L, Yu XQ, Zhao FS. Establishment of SSR fingerprint map of local rice varieties “He” in Guizhou [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 23(1): 5-10.
- [24] 段艳凤, 刘杰, 卞春松, 段绍光, 徐建飞, 金黎平. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457.
- Duan YF, Liu J, Bian CS, Duan SG, Xu JF, Jin LP. Construction of fingerprinting and analysis of genetic diversity with SSR markers for eighty-eight approved potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) in China [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(8): 1451-1457.

(责任编辑: 周 媛)