

冷宇鑫, 闵义, 付阳云, 等. 贵州荞麦重要种质的遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(3): 148-157.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.03.015

贵州荞麦重要种质的遗传多样性分析及分子身份证构建

冷宇鑫, 闵义, 付阳云, 周奎, 何颖, 文晓鹏

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025

摘要 为精准鉴定贵州荞麦种质资源, 采用SSR分子标记对60份荞麦种质进行遗传多样性分析, 构建DNA分子身份证数据库。结果显示, 从100对SSR引物中筛选出16对稳定性好、多态性丰富的引物, 在60份供试种质中共扩增出174个多态性条带; Shannon's 信息指数、Nei's 多样性指数、多态信息指数均值分别为0.337、0.206、0.693, 引物的多态性较好, 能有效揭示60份荞麦种质的遗传多样性; 在Dice遗传相似系数为0.374时, 所有供试材料可聚为A、B、C三组; 当Dice遗传相似系数为0.484时, 将苦荞组(A组)更细分为A1、A2两个小组。采用毛细管电泳及8%的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳对SSR标记扩增产物进行双验证, 2种方法的聚类结果一致。结果表明, 本研究开发的高效性SSR分子标记能够有效地鉴定贵州荞麦重要种质的遗传多样性且用于构建分子身份证。

关键词 荞麦; SSR标记; 毛细管电泳; 遗传多样性; DNA分子身份证

中图分类号 S517.102.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)03-0148-10

荞麦属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum* Mill)双子叶植物, 营养丰富, 有“百谷之王”之称^[1]。贵州是中国荞麦的起源地和主产区之一, 有苦荞(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.)、甜荞(*F. esculentum* Moench)和金荞麦(*F. cymosum*)3个种, 主要以苦荞种植为主^[2-3]。荞麦为贵州省优势特色作物品种, 是贵州发展山地特色高效农业的支柱产业之一^[4]。长期以来, 贵州毕节市、六盘水市等荞麦主产区存在自繁留种、品种混杂和栽培管理粗放等问题, 严重影响了荞麦产量和品质^[5]。因此, 基于分子标记技术开展荞麦种质资源遗传多样性分析和DNA指纹鉴定, 对加快荞麦遗传育种和新种质知识产权保护进程, 进而促进荞麦产业发展具有重要意义。

SSR(simple sequence repeat, 简单重复序列)分子标记操作简单、多态性丰富、重复性好, 在近似品种的鉴别方面优势显著, 是构建指纹图谱的重要标记^[6-7]。现有的使用SSR分子标记技术对荞麦种质资源遗传多样性分析和指纹图谱构建的研究大多集中在苦荞, 并且没有对贵州省荞麦资源亲缘关系及DNA分子身份证构建等的系统研究^[8-9]。DNA分子身份证是在指纹图谱基础上, 将种质特征数字化, 使每个种质都拥有自己的独特代码, 检索品种时更加方

便和直观^[10-11]。近年来, 使用SSR标记方法开展种质亲缘关系分析和DNA分子身份证构建已非常普遍^[12-13]。

目前, 国内外未见利用SSR分子标记结合毛细管电泳技术用于荞麦的研究报道, 本研究拟采用SSR标记对贵州省60份荞麦种质开展遗传多样性分析, 并构建其DNA分子身份证, 旨在揭示贵州省荞麦种质资源间的亲缘关系, 为贵州省荞麦种质的遗传育种、种质保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦荞、甜荞和金荞3个种共60份试验材料, 保存单位为贵州师范大学(54份)和六盘水职业技术学院(6份)(表1)。51份种质由贵州师范大学荞麦产业技术研究中心提供种子, 在营养盘播种20d后进行采样, 其余9份分别取自贵州省六盘水市水城区玉舍镇和贵州师范大学安顺市西秀区双堡镇荞麦种植基地。采样时随机选取10株, 采集新鲜幼嫩叶片, 混合后包入锡箔纸, 迅速放入液氮, 带回实验室保存于-80℃冰箱备用。

收稿日期: 2023-09-18

基金项目: 贵州省科技厅中央引导地方发展资金项目(黔科合中引地[2023]009); 贵州省农业农村厅种业发展项目(黔农计财[2022]9号)

冷宇鑫, E-mail: 1960034828@qq.com

通信作者: 文晓鹏, E-mail: xpwensc@hotmail.com

表1 供试荞麦种质信息

Table 1 The information of the tested buckwheat germplasm

编号 Number	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin	编号 Number	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin
QM01	黔黑荞 Qianheiqiao	威宁县 Weining County	QM24	毕选苦荞3号 Bixuankuqiao No.3	威宁县 Weining County
QM02	黔苦荞2号 Qiankuqiao No. 2	威宁县 Weining County	QM25	毕选苦荞4号 Bixuankuqiao No.4	威宁县 Weining County
QM03	黔苦荞3号 Qiankuqiao No. 3	威宁县 Weining County	QM26	六农1号 Liunong No.1	安顺市 Anshun City
QM04	黔苦荞4号 Qiankuqiao No. 4	威宁县 Weining County	QM27	威宁地方苦荞 Weining Difangkuqiao	威宁县 Weining County
QM05	黔苦荞5号 Qiankuqiao No. 5	威宁县 Weining County	QM28	凉K19-10 Liang K19-10	六盘水市 Liupanshui City
QM06	黔苦荞6号 Qiankuqiao No. 6	威宁县 Weining County	QM29	盘县四格荞 Panxiansigeqiao	安顺市 Anshun City
QM07	黔苦荞7号 Qiankuqiao No. 7	威宁县 Weining County	QM30	AL-031	威宁县 Weining County
QM08	褐米202203-212 Hemi 202203-212	威宁县 Weining County	QM31	六苦荞3号 Liukuqiao No.3	六盘水市 Liupanshui City
QM09	黄米202203-221 Huangmi 202203-221	威宁县 Weining County	QM32	六苦荞4号 Liukuqiao No.4	六盘水市 Liupanshui City
QM10	黑米202203-88 Heimi 202203-88	赫章县 Hezhang County	QM33	六苦荞5号 Liukuqiao No.5	六盘水市 Liupanshui City
QM11	黑米41-2 Heimi41-2	赫章县 Hezhang County	QM34	六苦荞6号 Liukuqiao No.6	六盘水市 Liupanshui City
QM12	黑米2号 Heimi No. 2	赫章县 Hezhang County	QM35	云南昭通苦荞 Yunnanzhaotongkuqiao	六盘水市 Liupanshui City
QM13	贵米苦荞18号 Guimikuqiao 18	赫章县 Hezhang County	QM36	丰甜1号 Fengtian No.1	安顺市 Anshun City
QM14	贵米苦荞55号 Guimikuqiao 55	赫章县 Hezhang County	QM37	贵甜荞1号 Guitianqiao No.1	安顺市 Anshun City
QM15	贵黑米15号 Guiheimi 15	赫章县 Hezhang County	QM38	贵甜2号 Guitian No.2	安顺市 Anshun City
QM16	小米荞 Xiaomiqiao	安顺市 Anshun City	QM39	贵甜21-1系 Guitian 21-1	安顺市 Anshun City
QM17	晋荞2号 Jinqiao No.2	安顺市 Anshun City	QM40	贵甜20220315 Guitian 20220315	安顺市 Anshun City
QM18	品苦1号 Pinku No.1	安顺市 Anshun City	QM41	贵甜4号 Guitian No.4	安顺市 Anshun City
QM19	贵苦荞1号 Guiquqiao No.1	安顺市 Anshun City	QM42	贵红花甜荞2号 Guihonghua Tianqiao No.2	安顺市 Anshun City
QM20	贵苦20203-218 Guiku 20203-218	安顺市 Anshun City	QM43	贵红花甜荞3号 Guihonghua Tianqiao No.3	安顺市 Anshun City
QM21	贵苦20203-219 Guiku 20203-219	安顺市 Anshun City	QM44	庆红甜1号 Qinghongtian No.1	安顺市 Anshun City
QM22	毕选苦荞1号 Bixuankuqiao No.1	威宁县 Weining County	QM45	贵金苦1号 Guijinku No.1	赫章县 Hezhang County
QM23	毕选苦荞2号 Bixuankuqiao No.2	威宁县 Weining County	QM46	贵金苦4号 Guijinku No.4	赫章县 Hezhang County

续表 1 Continued Table 1

编号 Number	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin	编号 Number	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin
QM47	贵金苦5号 Guijinku No.5	赫章县 Hezhang County	QM54	贵金荞3号 Guijinqiao No. 3	赫章县 Hezhang County
QM48	贵金苦6号 Guijinku No.6	赫章县 Hezhang County	QM55	九江苦荞 Jiujiangkuqiao	安顺市 Anshun City
QM49	长黑4T Changhei 4T	赫章县 Hezhang County	QM56	六农1号-1 Liuong No.1-1	六盘水市 Liupanshui City
QM50	大苦1号 Daku No.1	赫章县 Hezhang County	QM57	六苦荞5号-1 Liukuqiao No.5-1	六盘水市 Liupanshui City
QM51	红心金荞麦 Hongxin Jinqiao	赫章县 Hezhang County	QM58	六苦荞6号-1 Liukuqiao No.6-1	六盘水市 Liupanshui City
QM52	贵金荞1号 Guijinqiao No. 1	赫章县 Hezhang County	QM59	地方苦荞 Difangkuqiao	六盘水市 Liupanshui City
QM53	贵金荞2号 Guijinqiao No. 2	赫章县 Hezhang County	QM60	六苦荞3号 Liukuqiao No.3	六盘水市 Liupanshui City

1.2 植物DNA的提取

采用DNA提取试剂盒DP320(天根,北京)提取所有供试样品DNA,提取完成后采用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性,采用全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)检测其浓度与纯度,质量合格后将稀释至约35 ng/ μ L,置于-20℃保存。

1.3 SSR引物对来源

根据SSR引物具有通用性强的特点,查阅普通荞麦、苦荞SSR标记研究的相关文献^[14-17],共搜集挑选出100对引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 SSR-PCR

随机挑选5个DNA模板对100对引物进行PCR扩增,通过2%琼脂糖凝胶电泳初步筛选出多态性引物,再采用Qsep 100™全自动核酸蛋白分析仪(杭州厚泽生物科技有限公司)进行毛细管电泳检测。用于引物筛选的DNA材料包括采用黔黑荞(QM01)、贵米苦荞55号(QM14)、凉K19-10(QM28)、贵红花甜荞2号(QM42)和九江苦荞(QM55)。

PCR扩增反应采用10 μ L体系:模板基因组DNA 1 μ L,正、反向引物各1 μ L,2 \times Taq PCR Master Mix 5 μ L, ddH₂O 补充至10 μ L。2 \times Taq PCR Master Mix来源于北京天根生物科技有限公司(TIANGEN)。SSR-PCR扩增反应程序:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,最适退火温度60℃反应30 s,72℃反应30 s,共35个循环;72℃延伸7 min;4℃保存。

将筛选出的16对多态性丰富的SSR引物(表2)进行毛细管电泳,毛细管电泳所使用的卡匣为S1高分辨率卡匣,分子大小标准参照物为1K Size marker(深圳鼎泽扬生物科技有限公司生产)。使用8%变性聚丙烯酰胺凝胶分离PCR产物,电压为170 V,120 min后开始银染,随后拍照留存。

1.5 数据统计与分析

毛细管电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果均按获得的DNA分子质量进行统计,根据片段位置区分,同一位置有条带记为1,无条带记为0。将统计结果构建成数据矩阵,用Popgen32软件计算等位基因数、有效等位基因数、观察杂合度和Shannon's指数;用Power Marker v3.25软件计算多态信息含量(PIC);NTSYS pc 2.10e分析软件计算相似系数,并按UPMGA方法构建亲缘关系树状图;通过条形码和二维码生成器(<http://qr-batch.com/>)构建供试种质分子身份证。

2 结果与分析

2.1 SSR引物对筛选

提取的60份荞麦种质的基因组DNA质量浓度为38~122 ng/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.7~2.0,均满足后续PCR试验的要求。利用100对引物对随机选取的5个荞麦品种进行扩增,筛选出扩增产物条带清晰稳定的40对引物(图1),对这40对引物进行多态性检测,共筛选出多态性较高的16对(表2)。以引物SSR98为例,它在5个品种中扩增产物毛细管电泳图见图2,可见该引物具有较高的扩增多态性。

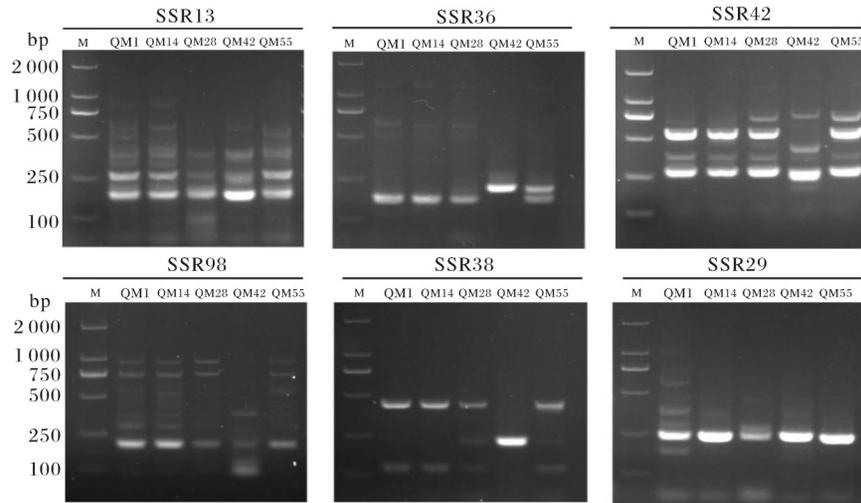


图1 部分SSR引物的2%琼脂糖电泳图

Fig.1 The profiles amplified by several primers using 2% agarose gel electrophoresis

表2 16对SSR引物信息

Table 2 The information of 16 pairs of SSR primers

引物名称 Primer name	正向序列 Forward DNA sequence	反向序列 Reverse DNA sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Product size	来源 Source
SSR13	GGGTCTGAGAACGAGATGCG	GACCCCCACCCAGACCAAC	64	172	[14]
SSR27	GCCACTCGACAATCACAAACAG	TCTCCACAATGCCTGCTACA	60	246	[15]
SSR29	CTCACCTTCCTTCCACCGTC	CGTCCTCTCTCCCCCTCAAA	60	216	[15]
SSR33	ACAAGAGCACACACATTTCGA	ATTTGGCAGCAACCCCTGAT	60	237	[15]
SSR34	GCTTCAGGAGCCTTTGTCTAAC	ACTGCTTAAACTAGAGGGGCA	60	263	[15]
SSR36	TGCTTGATTTCGAGACCGTCA	CAGGCGGCAATATGACAAGC	60	246	[15]
SSR38	CAGGCGGCAATATGACAAGC	CAAACAGCACCTTACCGBAA	60	224	[15]
SSR42	TCATCCCTGGTCAGAGAGCT	TCTAGATTTTCAATCGGACCTACA	60	208	[15]
SSR55	GATCACGGTCACCATCACGA	CAAGAGCGGAGCATCCCAGAG	60	261	[16]
SSR59	CTTGCCAGAGCCAAGGTAT	AGCAAAACCTATGCTTTTACTGC	60	168	[16]
SSR72	ATTCAATTCACAAAACGCC	CGGTGAGCCATTTCTCTCTC	60	220	[17]
SSR77	TGAGAGCCAATCGAGGTGTG	GAAGGTTGCCGATTGTGAAT	60	266	[17]
SSR82	CAACTCAAGGTCAGGACCCA	TGGACGGTAGTTTGTATGCG	60	214	[17]
SSR85	GGCGTGTCTGATTCCAAAT	AAAATGTTTGTACAGCGCCC	60	150	[17]
SSR87	TGAATTTGGTCACACATCTGAA	CCAAACATATGGCAGAACCC	60	276	[17]
SSR98	AAAGGTTGAGTGCCACGAAT	GAAAGTGTGGGTGGATGCT	60	214	[17]

2.2 荞麦的遗传多样性分析

通过Popgene32对毛细管电泳结果统计的0、1数据进行统计分析,结果(表3)显示,16对SSR引物在60份荞麦种质中共检测出174个多态性片段,最少的3个(SSR72、SSR98),最多的24个(SSR29),平均为10.875个,基因片段大小集中在102~508 bp。单个引物的等位基因数为1.944~2.000,均值1.993;有效等位基因数为1.162(SSR82)~1.647(SSR13),均值1.317;Nei's基因多样性指数变幅为0.126(SSR36)~0.361(SSR13),平均值0.206;Shannon信息指数变幅为0.231(SSR36)~0.532(SSR13),平均值0.337;多态信

息含量在0.309~0.925,均值为0.693。以上结果表明,筛选出的引物多态性高,贵州省荞麦资源遗传多样性丰富。

2.3 荞麦种质的聚类分析

根据UPGMA法对60份荞麦种质进行聚类分析,进而获得不同荞麦品种间的遗传关系树状图(图3)。在Dice系数0.374处荞麦种质可分为3组:其中A组包含47份苦荞品种;B组包含4份金荞麦的品种;C组包含9份甜荞品种。Dice相似系数0.484将苦荞组更细分为A1、A2 2个小组,A1组主要包括:贵州省威宁县农业科学研究所毛春等选育的黔苦荞

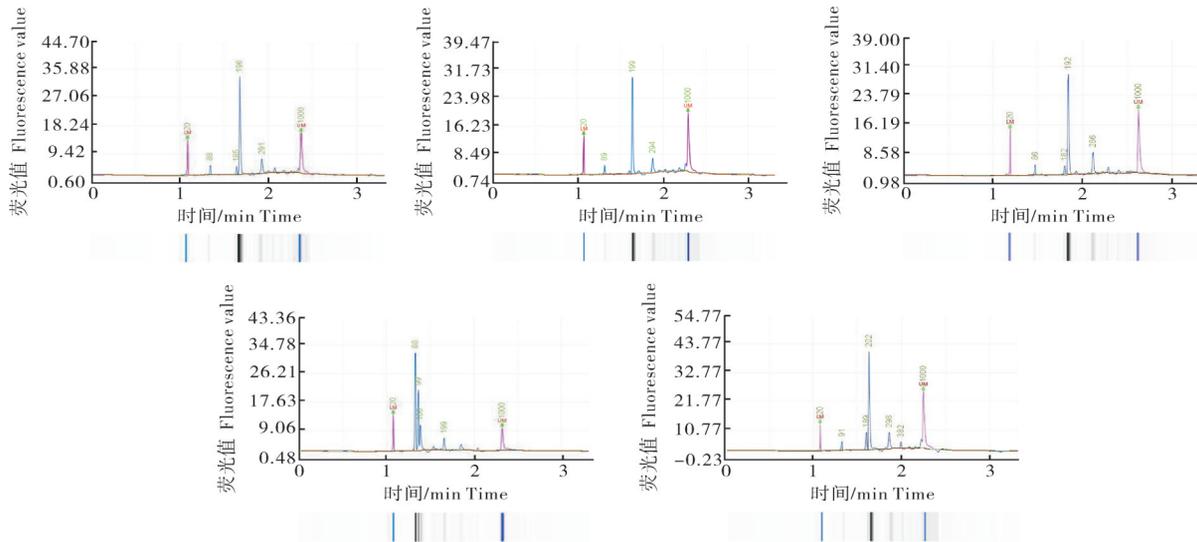


图2 SSR98引物在5个荞麦样本中的毛细管电泳图

Fig.2 Capillary electrophoresis of SSR98 primer in five samples

表3 SSR引物扩增结果统计

Table 3 Statistics of SSR primers amplification results

引物 Primer	扩增位点数 Amplification bit count	观测等位基因数 Observing number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	基因多样性指数 Gene diversity index	Shannon's 指数 Shannon's index	多态信息含量 Polymorphism information content
SSR-13	12	2.000	1.647	0.361	0.532	0.878
SSR-27	13	2.000	1.245	0.171	0.292	0.796
SSR-29	24	2.000	1.206	0.154	0.273	0.925
SSR-33	7	2.000	1.369	0.224	0.354	0.689
SSR-34	7	2.000	1.317	0.192	0.312	0.606
SSR-36	23	2.000	1.168	0.126	0.231	0.901
SSR-38	11	2.000	1.360	0.236	0.382	0.765
SSR-42	8	2.000	1.204	0.150	0.266	0.558
SSR-55	14	2.000	1.236	0.165	0.282	0.744
SSR-59	6	2.000	1.591	0.324	0.481	0.701
SSR-72	3	2.000	1.363	0.244	0.396	0.309
SSR-77	17	1.944	1.258	0.171	0.284	0.835
SSR-82	16	2.000	1.162	0.133	0.252	0.910
SSR-85	6	2.000	1.215	0.160	0.279	0.461
SSR-87	4	2.000	1.450	0.273	0.425	0.518
SSR-98	3	2.000	1.280	0.206	0.348	0.484
平均 Mean	10.875	1.993	1.317	0.206	0.337	0.693

系列、贵州师范大学陈庆富等通过小米荞(属薄壳苦荞)与晋荞2号等有性杂交产生的新品系(含贵米苦荞和黑米苦荞系列);A2组包括:六盘水职业技术学院张清明等选育的六苦荞系列,通过苦荞和金荞杂交育成的贵金苦荞系列。这表明贵州地区的不同苦荞种质具有遗传近缘性和差异性。

2.4 毛细管电泳鉴定荞麦种质可靠性

本研究分别采用毛细管和聚丙烯银染显影技术,基于相同的材料和引物对2种方法的检测结果进

行比较,以SSR-13为例展示2种检测方法的结果(图4和图5)。毛细管电泳由于较高的灵敏度,共扩增出174条多态性条带,而聚丙烯酰胺凝胶电泳仅扩增出72条多态性条带,60份荞麦种质的Dice系数变幅为0.333~0.974,平均0.699。在Dice系数约为0.654处,苦荞、金荞麦和甜荞分别聚为A、B和C3组(图6);在Dice系数约为0.702处分为A1和A22个小组,43个苦荞种质聚在A1组,A2组仅包含大苦1号和3个贵金苦荞品种。

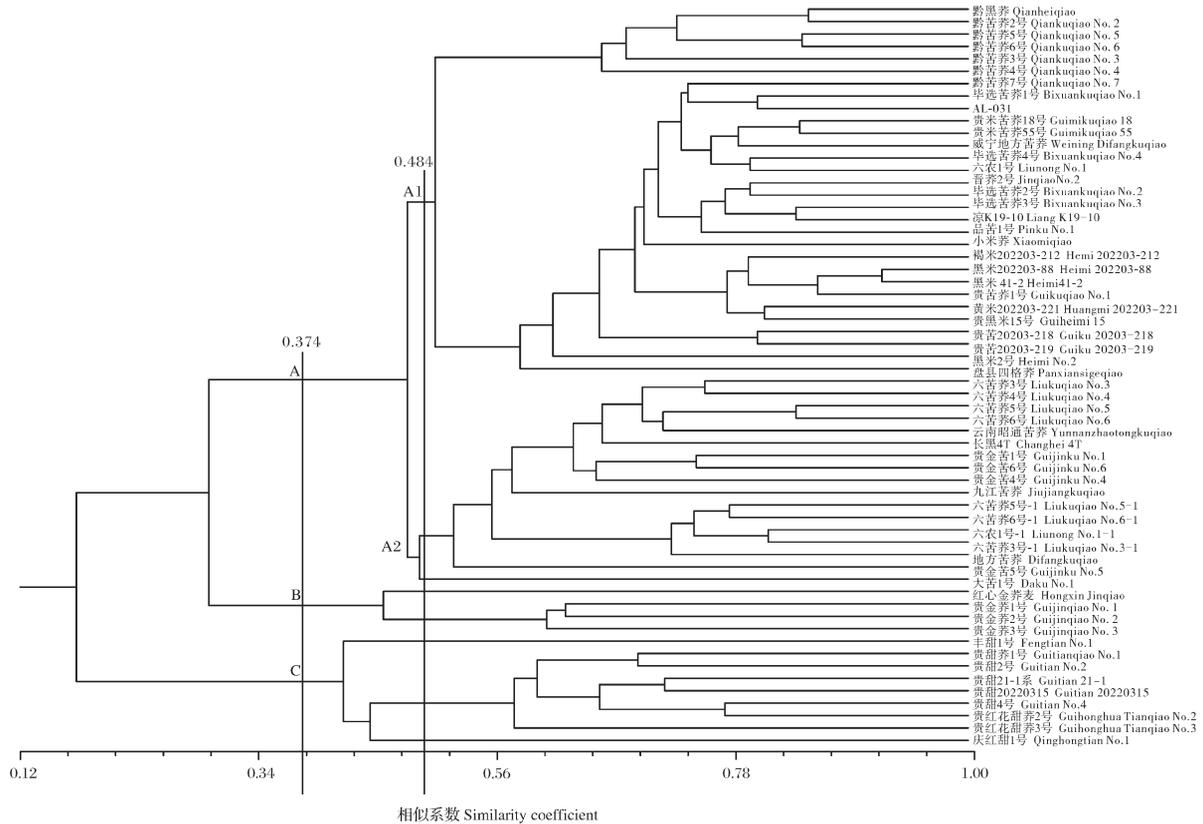


图 3 基于毛细管电泳的荞麦种质 SSR 标记 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrograms of 60 buckwheat germplasms as revealed by SSR markers

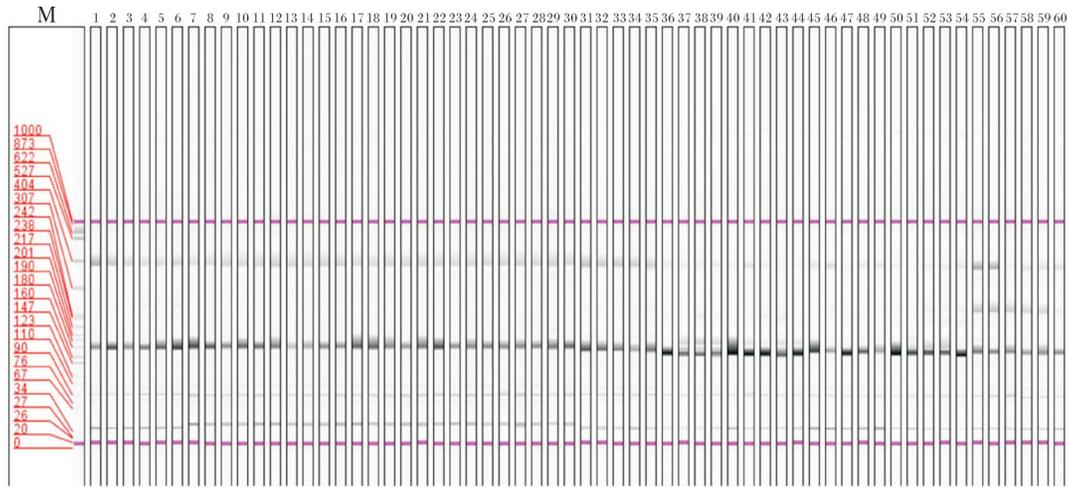


图 4 引物 SSR-13 扩增荞麦种质的毛细管电泳图

Fig.4 The capillary electrophoretic profiles of buckwheat germplasms as revealed by primer pair SSR-13

2.5 种质 DNA 分子身份证构建

在 16 对多态性引物中, SSR29、SSR36、SSR77、SSR82、SSR55、SSR13 和 SSR38 的多态性指数较高, 鉴别能力较强, 其中 SSR29 引物鉴别能力最强(表 4), 可单独鉴别 39 个种质, 鉴别率为 65%。经过筛选, 所有供试种质通过 SSR29、SSR36、SSR77 3 对 SSR 引物组合即可被完全区分开, 可以用来构

建荞麦种质的 DNA 分子身份证。将选用的 3 对 SSR 引物按照 SSR29、SSR36、SSR77 固定顺序, 以每个种质在对应的引物扩增的“0”和“1”矩阵进行串联排列, 用以表示 DNA 分子身份证字符串, 最后将种质的编号、保存单位及身份证号等信息导入二维码生成器中以得到二维码 DNA 分子身份证, 图 7 为贵米苦荞 55 号和九江苦荞的分子身份证。

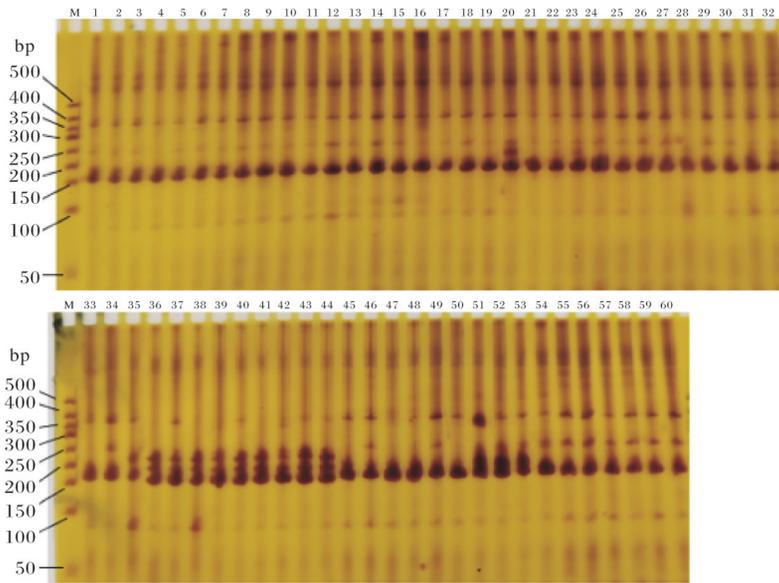


图5 引物SSR-13扩增的60份荞麦聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.5 The polyacrylamide gel electrophoretic profiles of buckwheat germplasms

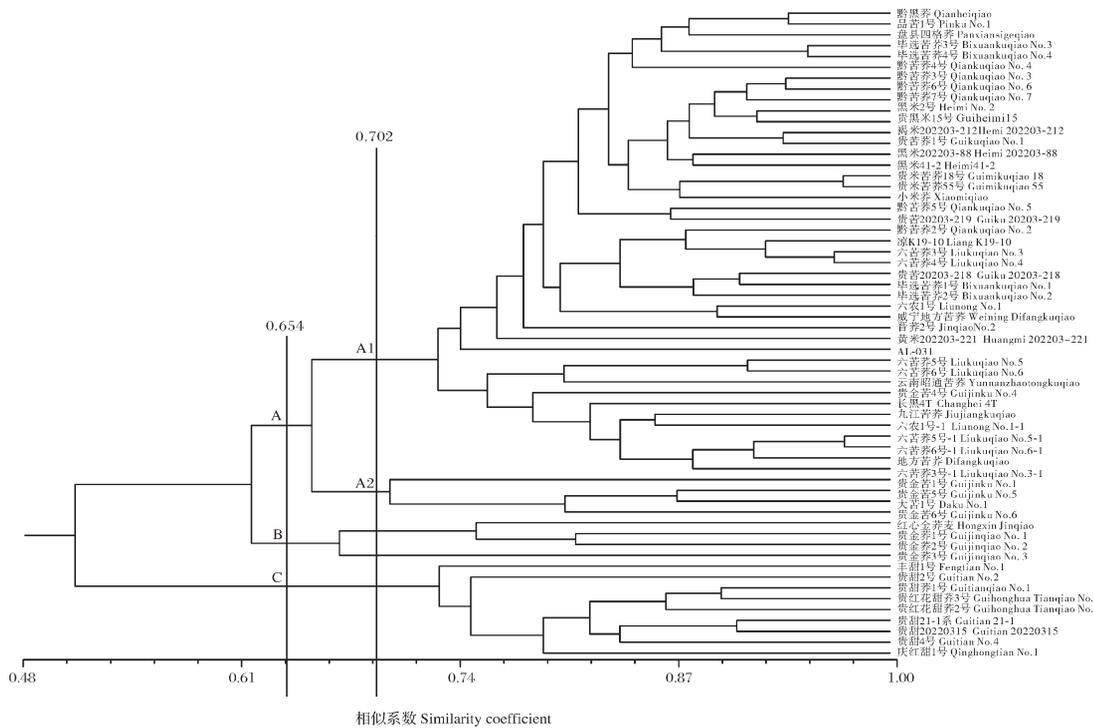


图6 基于聚丙烯酰胺凝胶电泳的荞麦种质SSR标记UPGMA聚类图

Fig.6 UPGMA dendrograms of 60 buckwheat germplasms as revealed by SSR markers

3 讨论

SSR分子标记是国际植物新品种保护联盟(UPOV)认可的DNA指纹数据库构建的首选标记,其扩增产物主要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和毛细管电泳(CE)2种方法进行检测^[18-19]。前期利用SSR分子标记技术对荞麦种质资源的研究主要集中在苦荞,扩增产物均由聚丙烯酰胺凝胶电泳进行

检测^[20]。本研究采用SSR分子标记结合毛细管电泳技术进行荞麦种质资源鉴定。

3.1 荞麦种质DNA分子身份证的构建

种质资源DNA分子身份证与DNA指纹图谱能够区分不同的品种,但二者又有所不同。分子身份证是指纹图谱数字化后的结果,分子身份证利用特定的数字编码成数字串,辅以条形码或者二维码可以实现种质资源快速识别,现已作为一个标准应用

表4 SSR引物鉴别供试种质情况
Table 4 The number of germplasm that can be identified by SSR primers

引物名称 Primer name	区分种质数 Number of germplasm that can be identified	鉴定比率/% Identification ratio
SSR-29	39	65
SSR-36	37	62
SSR-77	26	43
SSR-82	23	38
SSR-55	17	28
SSR-13	15	25
SSR-38	15	25
SSR-27	14	23
SSR-59	12	20
SSR-33	10	17
SSR-42	10	17
SSR-34	9	15
SSR-85	8	13
SSR-81	6	10
SSR-72	5	8
SSR-87	5	8
SSR-89	5	8
SSR-98	5	8
SSR-37	4	7
SSR-57	3	5
SSR-86	3	5



图7 荞麦种质贵米苦荞55号和九江苦荞分子身份证

Fig.7 Molecular IDs of buckwheat cultivars Guimikuqiao 55 and Jiujiangkuqiao

于品种的快速识别和鉴定^[21-22]。

以往对于贵州省荞麦种质资源的研究均为利用SSR分子标记技术构建指纹图谱对荞麦种质资源进行鉴定^[23],没有关于DNA分子身份证构建的研究。本研究以SSR分子标记技术为核心,采用毛细管电泳技术作为分析手段,实现荞麦DNA分子身份证制作的高精度及高通量;结合供试荞麦的保存单位等基础信息,利用3对SSR引物组合构建了60份荞麦种质资源的条形码和二维码共2种DNA分子身份证,克服了指纹图谱人工对比繁琐、低效等问题,不仅可以达到快速鉴定的目的,而且有助于知识产权的保护,这对荞麦种质的识别和鉴定具有十分重要的意义。

3.2 贵州荞麦的遗传多样性和聚类分析

本研究利用16对SSR引物分析荞麦60份种质,使用毛细管电泳法检测出174个多态性位点,每对引物平均10.875个,多态信息含量变幅为0.309~0.925,平均为0.693,表明贵州省荞麦种质资源具有丰富的遗传多样性,这对于今后荞麦品种改良以及挖掘更多的优良基因有重要意义。王晋雄^[24]利用47对SSR引物对甘肃省96份荞麦种质资源进行了遗传多样性分析,PIC平均值为0.590;马名川等^[25]使用13对SSR引物对山西省49份苦荞资源进行了遗传多样性分析,PIC平均值为0.390,均比本研究低,这可能与材料和SSR引物的选择不同以及检测方法有关。

聚类分析中苦荞、甜荞和金荞麦各聚为一类,在相似系数约为0.484处苦荞进一步聚为A1和A2两个小组。所有种质遗传相似系数变幅在0.032~0.918,贵甜4号和黑米2号的遗传相似系数最小,黑米41-2和黑米202203遗传相似性系数最大。根据王贵等^[26]对沙子空心李的研究,遗传相似系数能够反映群体间的亲缘关系,贵甜4号和黑米2号的遗传相似系数最小,二者之间亲缘关系最远,可以为荞麦育种时亲本材料的选择提供参考。此外,本研究发现来自不同地区同名的品种并没有聚在同一类,如分别来自贵州师范大学荞麦产业技术研究中心保存和贵州省六盘水市水城区玉舍镇种植的六农1号、六苦荞3号,这表明荞麦品种可能存在换种现象,其原因有待进一步研究。金荞麦作为重要的药饲兼用植物资源,越来越受到人们的关注,但目前未有针对金荞麦基因组开发的SSR引物。在本研究共收集了4份金荞麦种质,数量较少,在引物筛选时并未将其选入,但筛选出的16对SSR引物同样适用于金荞麦种质的分析鉴定。从聚类图中可看出种质间遗传关系的远近,对于贵州省荞麦资源进一步的保护和利用具有重要意义。

总之,本研究开发的高效性SSR分子标记能够有效地鉴定贵州荞麦重要种质的遗传多样性,并且可用于构建分子身份证。未来可将筛选到的SSR标记应用于更广泛的荞麦种质的多态性鉴定和分析中,以促进荞麦的种质创新和种质保存。

致谢:感谢贵州师范大学荞麦产业技术研究中心陈庆富教授和六盘水职业技术学院张清明老师提供试验材料。

参考文献 References

- [1] 田晓庆,徐宏亚,汪灿,等.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):28-33.TIAN X Q, XU H Y, WANG C, et al.Genetic diversity of common buckwheat based on SSR markers[J].Crops,2013(5):28-33 (in Chinese with English abstract).
- [2] 罗嵩,黄俊明,易勇,等.贵州省荞麦产业发展现状、问题、优势及对策[J].耕作与栽培,2017(6):49-53.LUO S, HUANG J M, YI Y, et al.Development status, problems, advantages and countermeasures of Guizhou buckwheat industry [J]. Tillage and cultivation,2017(6):49-53 (in Chinese with English abstract).
- [3] 郭旭,胡俊鸿,杨婷,等.贵州省威宁县荞麦产业高质量发展路径研究[J].食品工业,2022,43(9):209-212.GUO X, HU J H, YANG T, et al.Study on the high quality development path of buckwheat industry in Weining County, Guizhou Province [J].The food industry,2022,43(9):209-212 (in Chinese with English abstract).
- [4] 范昱,丁梦琦,张凯旋,等.荞麦种质资源概况[J].植物遗传资源学报,2019,20(4):813-828.FAN Y, DING M Q, ZHANG K X, et al.Germplasm resource of the genus *Fagopyrum* mill [J].Journal of plant genetic resources,2019,20(4):813-828 (in Chinese with English abstract).
- [5] 苏怀鲜,黄朝宾.贵州省威宁县荞麦产业发展分析与思考[J].南方农机,2020,51(11):25-26.SU H X, HUANG C B.Analysis and thinking on the development of buckwheat industry in Weining County, Guizhou Province [J].China southern agricultural machinery,2020,51(11):25-26 (in Chinese).
- [6] MA S N, HAN C Y, ZHOU J, et al.Fingerprint identification of white clover cultivars based on SSR molecular markers [J].Molecular biology reports,2020,47(11):8513-8521.
- [7] LIU S R, AN Y L, LI F D, et al.Genome-wide identification of simple sequence repeats and development of polymorphic SSR markers for genetic studies in tea plant (*Camellia sinensis*) [J/OL].Molecular breeding,2018,38(5):59 [2023-09-18].<https://doi.org/10.1007/s11032-018-0824-z>.
- [8] 黎瑞源,石桃雄,陈其皎,等.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 R Y, SHI T X, CHEN Q J, et al. 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 (in Chinese with English abstract).
- [9] 李春花,陈蕤坤,王艳青,等.利用 SSR 标记构建云南苦荞种质资源分子身份证[J].分子植物育种,2019,17(5):1575-1582.LI C H, CHEN R K, WANG Y Q, et al.Establishment of the molecular ID for Yunnan Tartary buckwheat germplasm resources based on SSR marker [J].Molecular plant breeding,2019,17(5):1575-1582 (in Chinese with English abstract).
- [10] 李红琴,刘宝龙,张波,等.青海省审定小麦品种 SSR 遗传多样性分析及分子身份证的建立[J].作物杂志,2020(3):60-65.LI H Q, LIU B L, ZHANG B, et al.Analysis of genetic diversity and establishment of molecular ID of the wheat cultivars registered in Qinghai using SSR [J].Crops,2020(3):60-65 (in Chinese with English abstract).
- [11] 马琳,刘海珍,陆徐忠,等.130份甘蓝型油菜种质分子身份证的构建[J].中国油料作物学报,2013,35(3):231-239.MA L, LIU H Z, LU X Z, et al.Molecular identity of 130 *Brassica napus* varieties [J].Chinese journal of oil crop sciences,2013,35(3):231-239 (in Chinese with English abstract).
- [12] 秦瑞英,许学,张立平,等.小麦 SSR 指纹图谱及品种身份证的构建:基于毛细管电泳分析[J].中国农学通报,2017,33(34):46-55.QIN R Y, XU X, ZHANG L P, et al.Construction of wheat variety SSR fingerprint and ID: based on capillary electrophoresis [J].Chinese agricultural science bulletin,2017,33(34):46-55 (in Chinese with English abstract).
- [13] 武志江,邓海燕,梁桂东,等.利用荧光标记 SSR 构建火龙果种质资源分子身份证[J].中国南方果树,2020,49(4):20-28.WU Z J, DENG H Y, LIANG G D, et al.Construction of molecular identity card of pitaya germplasm resources by fluorescent SSR [J].South China fruits,2020,49(4):20-28 (in Chinese).
- [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,2015.LI Y.Genetic diversity of common buckwheat germplasm resources by SSR markers and their reevaluation on agronomic traits [D].Guiyang: Guizhou Normal University,2015 (in Chinese with English abstract).
- [15] LIU Y, FANG X M, TANG T, et al.Inflorescence transcriptome sequencing and development of new EST-SSR markers in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J/OL].Plants,2022,11(6):742 [2023-09-18].<https://doi.org/10.3390/plants11060742>.
- [16] 任长忠,陈庆富.中国荞麦品种志 [M].北京:中国农业出版社,2022.REN C Z, CHEN Q F.Chinese buckwheat variety catalogue [M].Beijing: China Agriculture Press,2022 (in Chinese).
- [17] 蔡齐宗,王佳蕊,陈庆富,等.苦荞全基因组 SSR 位点鉴定及分子标记开发[J].河南农业大学学报,2022,56(3):392-400.CAI Q Z, WANG J R, CHEN Q F, et al.Identification of SSR loci and molecular marker development in the whole genome of Tartary buckwheat [J].Journal of Henan Agricultural University,2022,56(3):392-400 (in Chinese with English abstract).
- [18] GUO L L, GUO D L, ZHAO W, et al.Newly developed SSR markers reveal genetic diversity and geographical clustering in *Paeonia suffruticosa* based on flower colour [J].The journal of horticultural science and biotechnology,2018,93(4):416-424.
- [19] 颜新林,管中荣,温雯,等.基于 SSR 标记的芥菜品种鉴定技术体系建立及应用[J].植物遗传资源学报,2021,22(3):758-770.YAN X L, GUAN Z R, WEN W, et al.Establishment and application of mustard variety identification system based on SSR markers (*Brassica juncea* L.) [J].Journal of plant genetic resources,2021,22(3):758-770 (in Chinese with English abstract).
- [20] 左茜茜,宋英杰,马心妍,等.苦荞全基因组 SSR 位点挖掘及遗传多样性分析[J].中国农业科技导报,2022,24(4):38-51.ZUO X X, SONG Y J, MA X Y, et al.Mining SSR loci and analysis the genetic diversity of Tartary buckwheat based on the whole ge-

- nome sequence[J]. Journal of agricultural science and technology, 2022, 24(4): 38-51 (in Chinese with English abstract).
- [21] 白晓倩, 陈于, 张仕杰, 等. 基于表型性状和 SSR 标记的板栗品种遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(4): 972-984. BAI X Q, CHEN Y, ZHANG S J, et al. Genetic diversity analysis and fingerprinting of chestnut varieties based on phenotypic traits and SSR markers[J]. Journal of plant genetic resources, 2022, 23(4): 972-984 (in Chinese with English abstract).
- [22] 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 等. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证[J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2055-2064. XU L F, GE L, YUAN S X, et al. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of lily germplasms[J]. Acta horticulturae sinica, 2014, 41(10): 2055-2064 (in Chinese with English abstract).
- [23] 潘凡. 苦荞种质遗传资源农艺性状的评价及 SSR 指纹图谱的构建[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2016. PAN F. Evaluation of Main agronomic traits and construction of SSR fingerprints in tartary buckwheat germplasm [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [24] 王晋雄. 甘肃省收集荞麦种质 SSR 遗传多样性分析[D]. 太原: 山西大学, 2015. WANG J X. SSR genetic diversity analysis of buckwheat germplasm collected in Gansu Province[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [25] 马名川, 张丽君, 刘璋, 等. 基于 SSR 标记的山西省不同地区苦荞遗传多样性分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2021, 41(3): 25-31. MA M C, ZHANG L J, LIU Z, et al. Analysis of genetic diversity of Tartary buckwheat from different regions of Shanxi Province based on SSR marker[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (natural science edition), 2021, 41(3): 25-31 (in Chinese with English abstract).
- [26] 王贵, 李蕊蕊, 吴茂宏, 等. 基于 IRAP 标记的沙子空心李遗传多样性评价及指纹图谱构建[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(1): 1-11. WANG G, LI R R, WU M H, et al. Evaluation of genetic diversity and construction of DNA fingerprint of *Prunus salicina* Lindl. 'Shazikongxinli' based on IRAP markers[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2023, 42(1): 1-11 (in Chinese with English abstract).

Genetic diversity and ID construction of important buckwheat germplasm in Guizhou Province based on SSR markers

LENG Yuxin, MIN Yi, FU Yangyun, ZHOU Kui, HE Ying, WEN Xiaopeng

College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering/Ministry of Education Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract SSR markers were used to analyze the genetic diversity and construct a DNA molecular ID database of 60 buckwheat germplasms in order to accurately identify the buckwheat germplasm resources in Guizhou province. The results showed that 16 pairs of stable and polymorphic primers were screened from 100 pairs of SSR primers. A total of 174 polymorphic bands were amplified from 60 germplasm studied. The mean value of Shannon's information index, Nei's diversity index, and polymorphic information index was 0.337, 0.206, and 0.693, respectively. It is indicated that the polymorphism of primers is good, which can effectively identify the genetic diversity of 60 buckwheat germplasms. When the Dice genetic similarity coefficient was 0.374, all materials tested were clustered into three groups including A, B, and C. When the Dice genetic similarity coefficient was 0.484, the Tartary buckwheat group (Group A) was further divided into two subgroups including A1 and A2. The results of clustering SSR amplification products validated by capillary electrophoresis and 8 polyacrylamide gel (PAGE) electrophoresis were consistent. It is indicated that the efficient SSR molecular markers developed can effectively identify the genetic diversity and can be used to construct DNA molecular ID cards of important buckwheat germplasm in Guizhou province.

Keywords buckwheat; SSR marker; capillary electrophoresis; genetic diversity; DNA molecular ID card

(责任编辑: 张志钰)