



张冬梅,牟林林,齐春杰,等.籽粒苋种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J].黑龙江农业科学,2022(3):19-23.

籽粒苋种质资源遗传多样性的 SSR 分析

张冬梅¹,牟林林¹,齐春杰²,尤佳¹,韩微波¹,邸桂俐¹,王建丽¹

(1. 黑龙江省农业科学院 草业研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;2. 尚志市苇河林区中学,黑龙江 尚志 150623)

摘要:为了解籽粒苋种质资源遗传多样性,本试验利用 30 对 SSR 引物对 18 份籽粒苋种质进行初步分析。结果表明:筛选出的 21 对 SSR 引物可扩增出清晰条带。试验共扩增出 90 个等位基因位点,其中 81 个为多态性位点,多态位点百分率(PPB)为 90.00%。有效等位基因数(Ne)的变化范围在 1.189 2~1.994 2 之间;期望杂合度(He)的变幅介于 0.159 1~0.498 5 之间;Shannon's 信息指数(I)变幅为 0.295 8~0.691 7;PIC 值介于 0.146 3~0.374 2 之间,所选取的 SSR 标记具有中度多态水平。分子标记结果表明,筛选出来的引物可以很好地反映 18 种籽粒苋品系的遗传多样性,可以进一步进行籽粒苋种质资源的开发利用和品种选育。

关键词:籽粒苋;种质资源;SSR 分子标记;遗传多样性

籽粒苋(*Amaranthus hypochondriacus*),属于苋科苋属一年生 C₄ 草本植物,在我国种植历史十分悠久^[1]。籽粒苋具有高产、优质、可再生、营养丰富等特点,在畜禽青饲料、食品和药品等方面均有广泛应用^[2-4]。此外,籽粒苋耐受能力强,能在酸性、盐碱、干旱、贫瘠土壤中良好生长,现已成为可推广的抗逆优质资源^[5-6]。种质资源品质的好坏直接影响到育种工作的成败,因此为了有效利用和挖掘籽粒苋种质资源,研究其遗传多样性十分必要。近年来,分子标记技术的迅猛发展,SSR 分子标记分析方法,具有操作简单便捷、共显性和重复性好等优点,不仅能够更加深入地体现种质资源信息,还能够提高育种效率,因而被广泛用于研究作物的品种鉴定与纯度分析,及系统发育关系、遗传多样性与亲缘关系评价等领域^[7-8]。目前国内对籽粒苋种质资源的研究主要集中在品质性状的鉴定与评价、表型多样性分析、农艺性状多样性等方面^[9-11],对于籽粒苋种质资源的遗传多样性研究鲜有报道。基于此,本研究利用 30 对 SSR 引物对 18 份籽粒苋种质资源进行遗传多样性分析,为籽粒苋种质资源的开发利用、亲本选择、品种改良提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 样品

供试的 18 份籽粒苋种质材料,均来自黑龙江省农业科学院草业研究所,品系序号分别为: LX005、LX006、LX007、LX008、LX009、LX010、LX011、LX012、LX013、LX014、LX015、LX016、LX017、LX018、LX019、LX020、LX021 和 LX022。

1.2 方法

1.2.1 籽粒苋 DNA 提取 首先将 18 份籽粒苋种质材料在室内进行发芽,长至 3 片叶时取新鲜嫩叶清洗干净后,称取约 0.1 g,于液氮中充分研磨。选用康为世纪 CW0531DNA 试剂盒,提取籽粒苋 DNA,然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量,依据紫外光照射下的条带亮度、有无拖尾等现象评判 DNA 质量的好坏。最后将满足要求的 DNA 溶液于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 PCR 扩增与检测 参考已发布的 SSR 引物序列,从中选取 30 对 SSR 引物^[12],具体引物信息如表 1 所示。利用 30 对 SSR 引物对 18 份籽粒苋种质材料进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测。反应体系为 20 μL,其中包括 cDNA 模板 2 μL、正向和反向引物各 1 μL、Taq Plus PCR Master Mix 10 μL,最后加入 6 μL ddH₂O 补齐。PCR 扩增反应仪器选用 T100TM (BIO-RAD, USA) PCR 仪。扩增步骤:首先 94 ℃ 预变性 5 min;然后 94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共计 35 个循环;最后在 72 ℃ 条件下

收稿日期:2021-12-16

基金项目:黑龙江省科研院所科研业务费项目(CZKYF 2020C007);黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX08)。

第一作者:张冬梅(1979—),女,硕士,助理研究员,从事牧草栽培、育种技术研究。E-mail:zhd_mei@163.com。

通信作者:王建丽(1977—),女,博士,副研究员,从事牧草分子设计与遗传育种研究。E-mail:wangjianlip@126.com。

延伸 10 min。PCR 扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,之后用 Gelred 染色 120 min。于凝胶成像仪中观察电泳结果,并及时进行拍照读带,从而选择出扩增条带清晰、多态性高、重复性好的引物进行遗传多样性分析。

表 1 30 对 SSR 引物信息

引物	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
TAM001	ACCTCTCTCAGAAAGCCGTG	AAGCGAACCAGAAAGTGCAG
TAM002	ATGTGGTTAAGGCCTGAGGG	CCAACACCATCATAGAGTCCAC
TAM003	GGGAGGTTTAAGGGAGTG	ACCCTTCTCTTCAACCCACC
TAM004	AAATAGTGGAGGGCTCGGAC	CTCGTAACGGGTGCAACTTC
TAM005	AATGGGTTAGGGCGGGTATC	CAGCTTAACACTGCGGCTAC
TAM006	TGCATGCCAAGTCCGAATTC	GCTCAGCTTGTGTGCGACTC
TAM007	ATCTGACCGTGGCTGATACC	ACGATGAGTATGGGCCCTTC
TAM008	TCTAGCAGTCACCGGTTAGC	CAGGTTTACGCTGGCAGAAG
TAM009	CACGTACACTGTAGCTTGCG	TTGATGGTGTCTCCTACGTC
TAM010	TTGTTTGGCACTGTATCGCC	GGGATAGGTAGTTGGAGGCG
TAM011	AACGGCGCTATAAGTTGCAG	GTGCAAGCAGAGGGAACAG
TAM012	GGCTCGCCATTTACTCATG	ACCTAGATCTGCGTTCGGTC
TAM013	CCGAGGGAACACGTCTTTTG	CCGAGCAAATAAGGGAAGG
TAM014	AAATGCGAGCAGTTCAGTCG	CACATGTGCAGAGGTTTGGG
TAM015	TAAAGCCGCATGATTCGTG	CGTTTGGGAATACGAGCACC
TAM016	AACCGTGGGAATGCTTTGG	CACGTTCTGTTACTTCCAGC
TAM017	GTGATTCCGCGTTCATCTG	CAGAGTCCAAACACCGATGC
TAM018	TTTATGCGCCAAACTCCGAC	AGAGGGAAGATGCCATGTCC
TAM019	GACGCTTGGCTCTTGTTCTC	GGGTGCTCAGCTTGTTTCTC
TAM020	GCAACGTGACCCAGAACATC	TCCGTCTTCTAACCATGGCC
TAM021	TGGGTATAGTTCGCCACACC	ACACCCTTTCTCTCCCTTTC
TAM022	TCGCACTGATTCAACGGTTG	AGCCCATCTCCCATAGCAG
TAM023	GCGCACACCATCTTGTAAGT	GGCGTCTCTAGCATAGTC
TAM024	TGCGTCTTTGTGATTGTCCG	ACGCGACAAGATATCTCCC
TAM025	CCGATTAAAGAATGGCGGCC	ATGTCCGTATCCTGTGTCCG
TAM026	CAAGGCCAACACCACTATG	AGTATGAGGGTACGTGCTGC
TAM027	ACTCACCCACACCATCTTCC	AATTGTTAGCACGAGTCGCC
TAM028	CCCATGTGCATCAATCGACC	CACCTCCTTCAACAATGGCC
TAM029	CTCCATCTCTCTTGTCGCG	TTGCGAGGCCTTAAAGCAG
TAM030	TACCGTCACATCCGTCGTAC	AGTTGCGCAAAGAGTTCGTC

1.2.3 数据分析 利用 POPGEN 1.32 软件计算有效等位基因数(effective number of alleles, Ne)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)、Shannon's 指数(I)及多态性信息含量(polymorphism information content,PIC)。

2 结果与分析

2.1 籽粒苋 SSR 标记的多态性分析

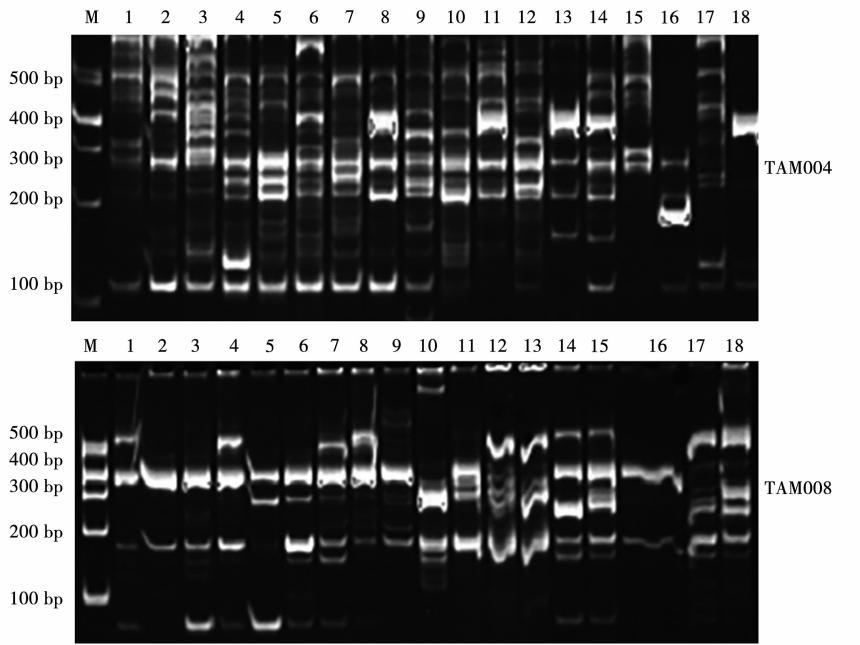
利用 30 对 SSR 引物对 18 个籽粒苋品系进行检测,最终筛选出条带清晰,扩增性好的 SSR 引物 21 对。由表 2 可知,21 对引物共扩增出了 90 个条带,引物平均扩增条带为 4.29 条。其中,多态性条带有 81 条,平均扩增 3.86 条。多态位点百分率(PPB)达到 90.00%。每个引物所扩增出的条带数为 2~5 条,其中有 12 对引物扩增条带为 5 条,分别为 TAM002、TAM004、TAM005、TAM007、TAM008、TAM009、TAM011、TAM012、TAM013、TAM019、TAM021、TAM026,而 TAM030 引物扩增条带数最少,仅为 2 条。扩增总数及多态性条带最多的引物有 9 对,分别为 TAM002、TAM004、TAM005、TAM008、TAM009、TAM012、TAM013、TAM021 和 TAM026,其中 TAM004 和 TAM008 扩增结果如图 1 所示。

表 2 SSR 引物扩增结果

引物编号	总带数/个	多态性条带数/个	多态性条带百分率/%
TAM002	5	5	100.00
TAM004	5	5	100.00
TAM005	5	5	100.00
TAM006	3	1	33.33
TAM007	5	4	80.00
TAM008	5	5	100.00
TAM009	5	5	100.00
TAM011	5	2	40.00
TAM012	5	5	100.00
TAM013	5	5	100.00
TAM016	4	4	100.00
TAM017	4	4	100.00
TAM018	3	3	100.00
TAM019	5	4	80.00
TAM020	4	2	50.00
TAM021	5	5	100.00
TAM023	3	3	100.00
TAM025	4	4	100.00
TAM026	5	5	100.00
TAM028	3	3	100.00
TAM030	2	2	100.00
总数	90	81	90.00

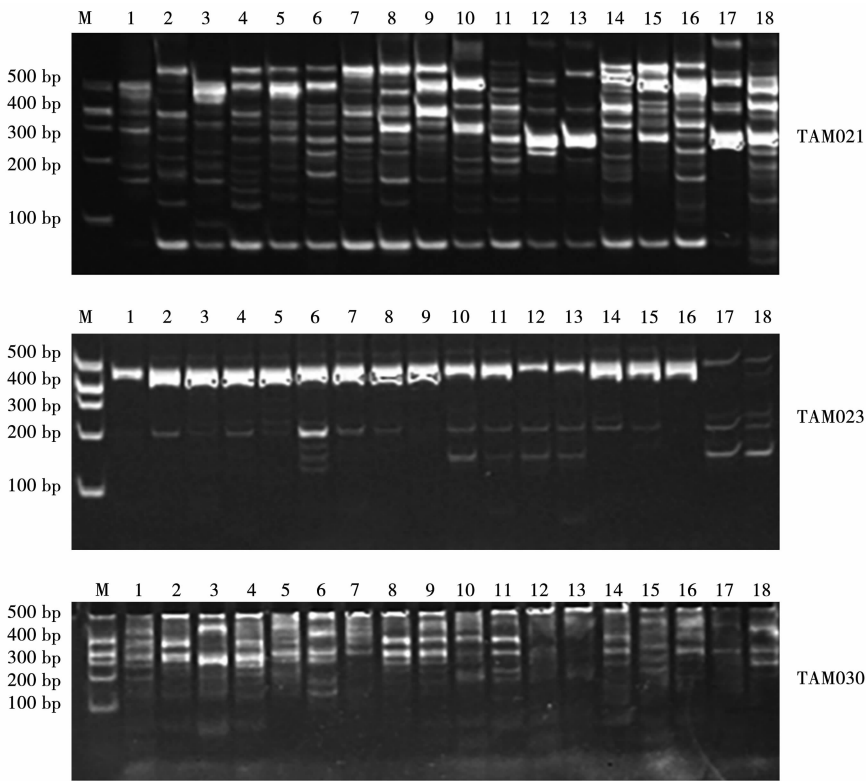
此外,PPB 最高的引物共 16 对,分别为 TAM002、TAM004、TAM005、TAM008、TAM009、TAM012、TAM013、TAM016、TAM017、TAM018、TAM021、TAM023、TAM025、TAM026、TAM028、

TAM030,均为 100%,而引物 TAM006 的 PPB 最低,为 33.33%。其中引物 TAM021、TAM023 和 TAM030 的扩增结果如图 2 所示。



M:Maker 500;泳道 1~18:籽粒苋品系序号 1~18。

图 1 引物 TAM004 和 TAM008 的扩增结果



M:Maker 500;泳道 1~18:籽粒苋品系序号 1~18。

图 2 引物 TAM021、TAM023 和 TAM030 的扩增结果

2.2 遗传多样性分析

由表 3 可知,21 对 SSR 分子标记共检测到 90 个等位基因变异,引物 TAM002、TAM004、TAM005、TAM007、TAM008、TAM009、TAM011、TAM012、TAM013、TAM019、TAM021 和 TAM026 扩增出的多态性位点最多,为 5 个,TAM030 多态性位点仅有 2 个,扩增点位最少。每对引物检测的位点数在 2~5 个,平均多态性位点为 4.29 个。21 对引物有效等位基因数(Ne)的变化范围在 1.189 2~1.994 2 之间,平均为 1.651 6。其中 TAM004 最大,TAM006 和 TAM012 最小。期望杂合度(He)的变幅介于 0.159 1~0.498 5 之间,

平均为 0.375 6;其中 TAM004 最大,TAM006 和 TAM012 最小。Shannon's 指数(I)变幅介于 0.295 8~0.691 7 之间,平均为 0.556 0;其中 TAM004 最大,TAM006 和 TAM012 最小。21 对引物的多态性信息含量(PIC)变化范围为 0.146 3~0.374 2,其平均值为 0.298 5。其中,TAM004 最大,TAM006 和 TAM012 最小;除 TAM006、TAM012、TAM017、TAM023 和 TAM028 的 PIC 值低于 0.25 外,其他引物 PIC 值介于 0.25~0.50 之间,这表明所选取的 SSR 标记具有中度多态水平。

表 3 基于 21 个分子标记的 18 份籽粒苋种质多态性信息

引物名称	观测等位 基因数	有效等位 基因数	Shannon's 指数	期望杂 合度	多态性信 息含量	引物名称	观测等位 基因数	有效等位 基因数	Shannon's 指数	期望杂 合度	多态性信 息含量
TAM002	5	1.8000	0.6365	0.4444	0.3456	TAM017	4	1.3427	0.4230	0.2552	0.2226
TAM004	5	1.9942	0.6917	0.4985	0.3742	TAM018	3	1.7071	0.6047	0.4142	0.3284
TAM005	5	1.8848	0.6623	0.4694	0.3592	TAM019	5	1.5632	0.5461	0.3603	0.2953
TAM006	3	1.1892	0.2958	0.1591	0.1463	TAM020	4	1.9348	0.6762	0.4832	0.3664
TAM007	5	1.9348	0.6762	0.4832	0.3664	TAM021	5	1.8000	0.6365	0.4444	0.3456
TAM008	5	1.6119	0.5674	0.3796	0.3075	TAM023	3	1.2631	0.3631	0.2083	0.1866
TAM009	5	1.5180	0.5247	0.3412	0.2830	TAM025	4	1.4279	0.4767	0.2997	0.2547
TAM011	5	1.9935	0.6915	0.4984	0.3741	TAM026	5	1.6119	0.5674	0.3796	0.3075
TAM012	5	1.1892	0.2958	0.1591	0.1463	TAM028	3	1.2631	0.3631	0.2083	0.1866
TAM013	5	1.7071	0.6047	0.4142	0.3284	TAM030	2	1.9935	0.6915	0.4984	0.3741
TAM016	4	1.9533	0.6811	0.4880	0.3689	均值	4.29	1.6516	0.5560	0.3756	0.2985

3 讨论

种质资源是作物育种工作能够开展的前提和基础。因此为了能够更加充分地开发和利用籽粒苋的种质资源,对其进行遗传多样性分析尤为重要。本研究利用筛选出的 21 对 SSR 分子标记对不同来源的 18 份籽粒苋品系进行遗传多样性分析,共检测到 90 个等位基因,能够在一定程度上揭示供试材料的遗传多样性。多态性条带百分率(PPB)、期望杂合度(He)和 Shannon's 信息指数(I)可以综合反映出种内不同群体之间或者群体内不同个体之间的遗传多样性的丰富程度^[13-15],本试验中 PPB 平均值为 90.00%,PPB 最高的引物共有 16 对,这说明扩增出的条带具有良好的多态性,可用于分析籽粒苋的遗传多样性;I 的平均值为 0.556 0,表明籽粒苋的遗传多样性较丰富,遗传关系较多样。本试验中 He 的变幅为 0.159 1~

0.498 5,He 的平均值为 0.375 6,同样显示出籽粒苋品系具有较高的遗传多样性。此外,有效等位基因数目(Ne)和多态信息含量(PIC)也能够一定程度上反映出群体遗传多样性水平^[16]。本试验中 21 对引物的有效等位基因数(Ne)的变幅为 1.189 2~1.994 2 之间,不同 SSR 标记的 PIC 值变化较大,变幅区间为 0.146 3~0.374 2,平均为 0.298 5,大多数引物均在 0.25~0.50 之间,这说明本研究所选取的 SSR 标记具有中度多态水平。

4 结论

本研究利用 30 对 SSR 引物对 18 份籽粒苋种质材料进行初步筛选,最终筛选出了 21 对条带清晰、扩增良好且多态性稳定的 SSR 引物。并且通过有效等位基因数目(Ne)和多态信息含量(PIC)等遗传多样性参数对这 18 份材料的遗

传多样性进行评价,结果表明:18 份籽粒苋种质资源的遗传多样性较高,且筛选出的 21 对引物能够很好地反映出 18 个籽粒苋品系的遗传多样性,可以为籽粒苋种质资源的开发利用、品种选育提供参考。

参考文献:

[1] 林汝法,柴岩,廖琴,等.中国小杂粮[M].北京:中国农业科学技术出版社,2002.

[2] 辛锦兰,李忠良.青贮籽粒苋的应用研究进展[J].饲料与畜牧,2017(9):31-34.

[3] 陈飞平,周家华,常虹,等.籽粒苋苋籽蛋白质的提取工艺研究[J].食品工业,2013,34(1):1-4.

[4] 聂婷婷,李芳,祝振洲,等.籽粒苋的应用研究进展[J].安徽农业科学,2016,44(4):8-10,31.

[5] 谷雨,黄铁平,唐珍琦,等.籽粒苋修复土壤重金属污染研究进展[J].农学报,2020,10(10):41-45.

[6] 吴启航,李伙生,黄雪夏,等.利用植物籽粒苋修复镉污染土壤研究[J].广州大学学报,2016,15(6):17-24.

[7] 杨梦婷,黄洲,干建平,等.SSR 分子标记的研究进展[J].杭州师范大学学报,2019,18(4):429-436.

[8] 卓蕾,向成丽,肖杰,等.SSR 标记在植物种质资源鉴定的应用进展[J].现代园艺,2021,44(15):9-11.

[9] 覃初贤,覃欣广,望飞勇,等.广西籽粒苋资源品质性状的鉴定与评价[J].中国农学通报,2020,36(33):50-57.

[10] 王艳青,卢文洁,李春花,等.云南籽粒苋种质资源的表型多样性分析[J].中国农学通报,2020,36(18):44-54.

[11] 王建丽,刘杰淋,朱瑞芬,等.28 份籽粒苋种质资源的主要农艺性状遗传多样性分析[J].草地学报,2020,28(4):1050-1059.

[12] NGUYEN D C, TRAN D S, HOAI T T, et al. Genetic diversity of leafy amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) resources in Vietnam [J]. Breeding Science, 2019, 69: 640-650.

[13] 闫国跃,杨帆,白燕远,等.69 份苦玄参种质 SSR 遗传多样性及品质性状相关标记分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(4):174-184.

[14] 赵成日.中韩野生软枣猕猴桃种质资源遗传多样性分析[J].果树学报,2018,35(9):1043-1051.

[15] 李群三,陈景斌,顾和平,等.基于 InDel 标记的国内绿豆品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J].植物遗传资源学报,2019,20(1):122-128.

[16] 刘红云,周强,李淑梅,等.豫南地区野生大豆种质资源的 SSR 遗传多样性分析[J].种子,2021,40(3):64-67.

SSR Analysis of Genetic Diversity of *Amaranthus hypochondriacus* Germplasm Resources

ZHANG Dong-mei¹, MU Lin-lin¹, QI Chun-jie², YOU Jia¹, HAN Wei-bo¹, DI Gui-li¹, WANG Jian-li¹

(1. Pratacultural Science Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Shangzhi Weihe Forest District Middle School, Shangzhi 150623, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of *A. hypochondriacus* resources, 30 pairs of SSR primers were used to screen 18 *A. hypochondriacus* varieties. 21 pairs of SSR primers with clear bands were screened out. 90 alleles were amplified, 81 of which were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 90.00%. The number of effective alleles (Ne) ranged from 1.189 2 to 1.994 2. The expected heterozygosity (He) ranged from 0.159 1 to 0.498 5. The change range of the number of Shannon's information index (I) is between 0.295 8 and 0.691 7. PIC values ranged from 0.146 3 to 0.374 2, and the selected SSR markers showed moderate polymorphism. The results of molecular markers showed that the primers could well reflect the genetic diversity of 18 *A. hypochondriacus*, which could provide a reference for the development and breeding of *A. hypochondriacus* resources.

Keywords: *Amaranthus hypochondriacus*; germplasm resources; SSR molecular marker; genetic diversity

著作权使用声明

本刊已许可中国知网、维普网、万方数据等知识服务平台以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。

黑龙江农业科学编辑部