

# 荞麦属植物多年生种间杂种的鉴定

杨丽娟, 饶庆琳, 李洪有, 王 艳, 冉 盼, 崔娅松, 陈庆富

(贵州师范大学荞麦产业技术研究中心, 贵阳 550001)

**摘要:** 探讨 SSR 分子标记用于荞麦种间  $F_1$  杂种的真假性鉴定的可行性, 为今后荞麦杂交育种研究及高产优质新品种选育提供一定的指导。利用 235 对 SSR 引物对小米荞、大苦 1 号、红心金荞、大野荞、巨荞 5 个亲本进行 PCR 扩增, 以获得多态性较高的引物, 在此基础上对大苦 1 号  $\times$  红心金荞、巨荞  $\times$  红心金荞、小米荞  $\times$  红心金荞、巨荞  $\times$  小米荞、巨荞  $\times$  小米荞 B、巨荞  $\times$  大野荞 6 个杂交组合杂种进行 SSR 分子标记分析, 同时对真杂种形态表现进行观察记录并计算其杂种优势。结果获得 2 对多态性较高引物 (SSR2159/58 和 SSR6790/89), 鉴定出 3 个真杂种: 大苦 1 号  $\times$  红心金荞、小米荞  $\times$  红心金荞、巨荞  $\times$  红心金荞。本研究结果说明 SSR 分子标记可以用于荞麦种间杂种鉴定, 真杂种大苦 1 号  $\times$  红心金荞表现出超亲优势且正常可育, 可用于新品种选育。

**关键词:** 荞麦; 种间杂种; SSR 鉴定; 形态表现

## Identification of Perennial Interspecific Hybrids on Genus *Fagopyrum*

YANG Li-juan, RAO Qing-lin, LI Hong-you, WANG Yan, RAN Pan, CUI Ya-song, CHEN Qing-fu

(Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University, Guiyang 550001)

**Abstract:** This study attempted to search SSR markers for validating the authenticity of  $F_1$  hybrids between buckwheat species, in order to provide some clues for the future research of crossing breeding and the development of new varieties with high yield and good quality. By employment of 235 pairs of SSR primers, we performed PCR amplification using 5 parental accessions, including *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. (Xiaomiqiao), *F. tataricum* (L.) Gaertn. (Daku No.1), *F. cymosum* (Trevir.) Meisn., *F. megaspartanum* Q. F. Chen, *F. giganteum* Krotov to find the polymorphic markers. On this basis, primers with higher polymorphism were obtained, and SSR molecular marker analysis of 6 hybrids, including *F. tataricum* (Daku No.1)  $\times$  *F. cymosum*, *F. giganteum*  $\times$  *F. cymosum*, *F. tataricum* (Xiaomiqiao)  $\times$  *F. cymosum*, *F. giganteum*  $\times$  *F. tataricum*, *F. giganteum*  $\times$  *F. tataricum*, *F. giganteum*  $\times$  *F. megaspartanum*. At the same time, the morphological characteristics of hybrids were observed and recorded, and their heterosis was calculated. The results showed that there are 2 pairs of polymorphic primers (SSR2159/58 and SSR6790/89) identified, and 3 true hybrids were identified, including *F. tataricum* (Daku No.1)  $\times$  *F. cymosum*, *F. tataricum* (Xiaomiqiao)  $\times$  *F. cymosum*, *F. giganteum*  $\times$  *F. cymosum* (Trevir.) Meisn.. Thus, SSR markers can be used for identifying interspecific hybrids of buckwheat, hybrid *F. tataricum* (Daku No.1)  $\times$  *F. cymosum* showed superparental superiority and normal fertility, and could be used for developing varieties.

**Key words:** buckwheat (*Fagopyrum* spp.); hybrid  $F_1$ ; SSR identification; morphdogy

收稿日期: 2018-08-02 修回日期: 2018-09-27 网络出版日期: 2018-12-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181214.1033.001.html>

第一作者研究方向为荞麦属植物遗传育种, E-mail: juanpan0320@163.com

通信作者: 陈庆富, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: cqf1966@163.com

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31471562, 31860408); 国家燕麦荞麦现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-07-A5); 贵州省高层次创新型人才培养对象十百千计划 (2014GZ97588); 贵州省荞麦工程技术研究中心 (黔科合农 G 字 [2015] 4003 号); 贵州省农业科技支撑计划 (黔科合支撑 [2017] 2505, 黔科合支撑 [2018] 2320)

**Foundation project:** Natural Science Fund of China (31471562, 31860408), China Agricultural Research System on Oat and Buckwheat (CARS-07-A5), Guizhou Province High Level Innovative Talents Training Target (2014GZ97588), Guizhou Province Buckwheat Engineering Technology Research Center (Guizhou Province, G [2015] 4003), Guizhou Agricultural S & T Support Project (QiankeheZhicheng [2017] 2505, QiankeheZhicheng [2018] 2320)

荞麦起源于我国西南地区,属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum* Mill.)双子叶植物。荞麦不仅含有丰富的营养物质,如淀粉、蛋白质、氨基酸、维生素、各类矿质元素等,还富含黄酮类化合物,具有极高的营养保健价值<sup>[1-3]</sup>,引起人们越来越多的关注和喜爱,加速了人们对荞麦的育种研究。然而,由于长期的人工定向选择,使得荞麦的遗传基础狭窄,遗传多样性较差,导致荞麦品种的抗逆性下降,这是荞麦育种中面临的一个主要问题。可喜的是,中国作为荞麦的起源地之一,拥有丰富的多年生野生荞麦资源。野生荞麦具有极强的抗逆境能力,含有众多优良性状基因,是荞麦育种改良中的重要的基因库。因此,对荞麦属植物进行种间杂交是丰富遗传基础、导入野生种的优异基因、培育荞麦新品种的重要途径之一。在种间杂交中,对 F<sub>1</sub> 杂种进行鉴定和选择,剔除 F<sub>1</sub> 假杂种,不仅可以减轻育种后期工作量,提高育种效率,还能加快资源的有效利用。然而,传统 F<sub>1</sub> 杂种鉴定主要是通过形态学观察判定真伪,这种基于表型的 F<sub>1</sub> 杂种鉴定较为粗放,准确性较低。因此,近年来人们开展了利用分子标记鉴定 F<sub>1</sub> 杂种的研究。在众多分子标记中,SSR

(Simple Sequence Repeats)分子标记具有分布广泛、均匀,变异丰富、多态性高,共显性等优点。近年来已被广泛应用于多种物种的真杂种鉴定<sup>[4-14]</sup>、杂种纯度鉴定<sup>[15-23]</sup>、杂种亲本分子身份证的建立<sup>[24-25]</sup>及种质鉴定<sup>[26-31]</sup>等方面。目前,在荞麦研究方面,SSR 标记已经运用于荞麦种质资源遗传多样性分析<sup>[32-33]</sup>和连锁图谱的构建<sup>[34]</sup>上,但其在种间杂种鉴定中的运用尚未见报道。本研究首次通过 SSR 分子标记结合形态学观察,对 6 份荞麦种间杂种的真伪进行鉴定,探讨 SSR 标记是否可以用于荞麦种间杂种鉴定,为提高荞麦杂交育种的选择效率,加速荞麦育种进程奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用材料(表 1)由贵州师范大学荞麦产业技术研究中心提供,其中所有杂种均是通过有性杂交产生<sup>[35-37]</sup>,大多数种间杂种为多年生。所有材料种植于贵州师范大学荞麦产业技术研究中心实验大棚中,待幼苗长至 3 叶期时取幼嫩叶片,置于 -80 ℃ 保存备用。

表 1 亲本及杂交组合  
Table 1 Parental lines and candidate hybrids used in this study

序号 Number	亲本及杂交组合 Parents and hybrid combinations	学名 Academic name	倍性 Ploidy
1	大苦 1 号(♀) × 红心金荞(♂)	<i>F.tataricum</i> × <i>F.cymosum</i>	四倍体
2	巨荞(♀) × 红心金荞(♂)	<i>F.giganteum</i> × <i>F.cymosum</i>	四倍体
3	小米荞(♀) × 红心金荞(♂)	<i>F.tataricum</i> G. × <i>F.cymosum</i>	二倍体
4	巨荞(♀) × 小米荞(♂)	<i>F.giganteum</i> × <i>F.tataricum</i>	—
5	巨荞(♀) × 小米荞 B(♂)	<i>F.giganteum</i> × <i>F.tataricum</i>	—
6	巨荞(♀) × 大野荞(♂)	<i>F.giganteum</i> × <i>F.megaspartanium</i>	三倍体
7	小米荞	<i>F.tataricum</i> (L.) Gaertn.	二倍体
8	大苦 1 号	<i>F.tataricum</i> (L.) Gaertn.	同源四倍体
9	红心金荞	<i>F.cymosum</i> (Trevir.) Meisn.	四倍体
10	大野荞	<i>F.megaspartanium</i> Q. F. Chen	二倍体
11	巨荞	<i>F.giganteum</i> Krotov	四倍体

— : 倍性未知  
— : stands for unknown o ploidy

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取及质量检测** 采用 CTAB 法提取亲本及 F<sub>1</sub> 植株叶片的 DNA。将研钵用锡箔纸包裹放于烘箱于 180 ℃ 烘烤 24 h;称取 0.1 g 荞麦幼叶置于已冷却研钵中,加入 200 μL 2% 的 CTAB 缓冲液研磨至匀浆,再加入 800 μL CTAB 提取缓冲液,充分研磨后转入 2 mL 离心管;55~60 ℃ 水浴 1 h,每隔 10 min 震荡 1 次;加入 1 mL 氯仿:异戊醇(24:1,

V/V),用力震荡混匀;室温下 12000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清转入到新的离心管中;加等体积 4 ℃ 预冷的冰乙醇,在 4 ℃ 下放置 20 min;用枪头挑出析出的 DNA 白色絮状物,转入 1.5 mL 离心管中,加入 200 μL 75% 乙醇洗涤去除杂质,倒掉乙醇,DNA 于离心管中吹干;视析出的 DNA 量酌情加入 100~300 μL 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸溶液,溶解 DNA。取 2 μL DNA 溶液用紫外分

光光度计 (NANODROP 2000) 检测 DNA 浓度, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 质量合格的 DNA 贮存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.2.2 多态性 SSR 引物筛选** 以 5 份亲本材料 DNA 为模板, 利用 235 对 SSR 引物进行 PCR 扩增。试验采用  $10\text{ }\mu\text{L}$  反应体系:  $2.0\text{ }\mu\text{L}$  DNA 模板、 $1.0\text{ }\mu\text{L}$  引物、 $5\text{ }\mu\text{L}$  PCR Mix、 $2.0\text{ }\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。扩增条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $4\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ,  $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $1\text{ min}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ , 共 34 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。将 PCR 扩增产物放于沸水中变性  $5\text{ min}$ , 然后放于冰水中冷却  $2\text{ min}$ , 加入等体积的上样缓冲液静置待用。取  $3.3\text{ }\mu\text{L}$  在 6% 的聚丙烯酰胺胶上电泳分离。

**1.2.3 杂种鉴定** 以亲本和 F<sub>1</sub> 杂种的 DNA 为模板, 利用筛选出的多态性 SSR 标记进行 PCR 扩增, PCR 产物进行 PAGE 胶电泳分离, 读取 PCR 产物

带型, 其中同时具有父母本扩增带型的样品为真杂种。

**1.2.4 形态学观察及杂种优势分析** 对杂种 F<sub>1</sub> 及双亲的植株形态性状如株型、主花序、育性及种子性状等进行观察, 并对主要农艺性状如株高、主茎分枝数、主茎节数、主茎粗、主花序、育性及种子性状进行测定, 并计算杂种优势, 如中亲值、中亲优势、超亲优势等。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记筛选

利用 235 对 SSR 引物对 5 份荞麦亲本材料 DNA 进行 PCR 扩增, 结果发现 7 对 SSR 引物在亲本间具有多态性, 多态率为 2.98%。选择其中两对在亲本间多态性最高的引物 (表 2) 用于后续种间杂种的分子标记鉴定。

表 2 两对在亲本间多态性高的 SSR 引物  
Table 2 The information of two polymorphic SSR markers

引物编号 Primer number	引物合成序号 Primer synthesis sequence number	退火温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) T <sub>m</sub>	引物序列 Primer sequence	序列长度 (bp) Sequence length	扩增产物大小 (bp) Amplification product size
SSR2159/58	8401932159	59	CCG TCT AGT GGG TCG AAA GG	20	142
	8401932158		TCC CAT TTT CAA GTG CGC AAA	21	
SSR6790/89	8401766790	60	CCG TAA CCC CAG TTC GTA GT	20	186
	8401766789		GGT TGT GGT TTC CTG ACG TTG	21	

2.2 杂种 F<sub>1</sub> 鉴定分析

利用筛选到的在 5 份亲本间具有最高多态性的 SSR2159/58 和 SSR6790/89 两对 SSR 引物, 分别对 6 个杂交组合及亲本进行 PCR 带谱特征分析, 结果如图 1 所示。引物 SSR2159/58 在杂种 1 和 2 扩增出的条带与亲本扩增出的条带呈现共显性, 表明杂种 1 和 2 为真杂种 (图 1)。引物 SSR6790/89 在杂种 1、2、3 扩增出的条带分别与亲本表现出了共显性, 可确定为真杂种 (图 2)。引物 SSR2159/58 及引物 SSR6790/89 在杂种 5 和 6 扩增出的条带均仅与母本的条带相同, 因此可判定为假杂种。引物 SSR2159/58 在杂种 3 和 4 及引物 SSR6790/89 在杂种 4 扩增出亲本所没有的新条带, 不能判定真假杂种。

2.3 杂种 F<sub>1</sub> 形态性状分析

**2.3.1 杂种 F<sub>1</sub> 形态学观察** 为了进一步确定利用 SSR 标记鉴定到的荞麦种间杂种的真实性, 对 3 份经 SSR 标记鉴定为真杂种的植株进行形态学调查, 包括株型、主花序、育性及种子性状。结果显示, 3

个杂种在某些方面均表现出父母本的综合性状, 均为真杂种。

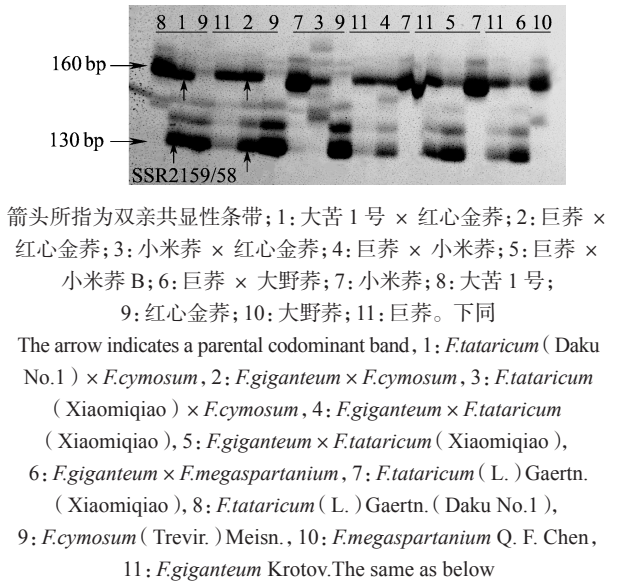


图 1 引物 SSR2159/58 在 6 个种间杂种中的扩增结果  
Fig.1 PCR fragments amplified by primer SSR2159/58 in 6 F<sub>1</sub> interspecific hybrids and their parents



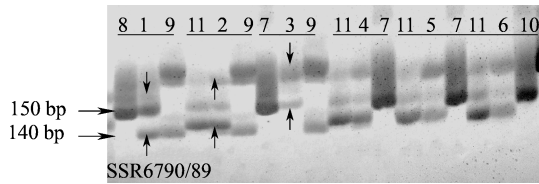


图2 引物 SSR6790/89 在 6 个种间杂种及其亲本中的扩增结果

Fig.2 The PCR amplification results by primer SSR6790/89 in 6  $F_1$  interspecific hybrids and their parents



A、a: 大苦 1 号植株与花序; B、b: 大苦 1 号 × 红心金荞杂种  $F_1$  植株与花序; C、c: 红心金荞植株与花序

A, a: Plants and inflorescences of *F.tataricum* (Daku No.1), B, b: Plants and inflorescences of *F.tataricum* (Daku No.1) × *F.cymosum*  $F_1$ , C, c: Plants and inflorescences of *F.cymosum*

图3 大苦 1 号 × 红心金荞杂种  $F_1$  及其亲本的植株和花序<sup>[36]</sup>

Fig.3 Plants and inflorescences of *F.tataricum* (Daku No.1) × *F.cymosum*  $F_1$  hybrid and parents<sup>[36]</sup>

**2.3.2 杂种  $F_1$  性状优势表现** 对各组合相关性状杂种优势进行分析,结果如表 3。

杂交组合大苦 1 号 × 红心金荞  $F_1$  株高为 95 cm, 中亲优势为 11.80%, 超亲优势为 5.56%; 主茎节数为 16 节, 中亲优势为 18.50%, 超亲优势为 6.67%; 主茎分枝数为 11 个, 中亲优势为 69.00%, 超亲优势为 57.00%; 主茎粗为 21.30 mm, 中亲优势为 160.00%, 超亲优势为 99.60%。在此组合中, 主茎粗、株高、主茎节数、主茎分枝数均表现为超亲型, 其中, 主茎分枝数、主茎粗杂种优势较明显。

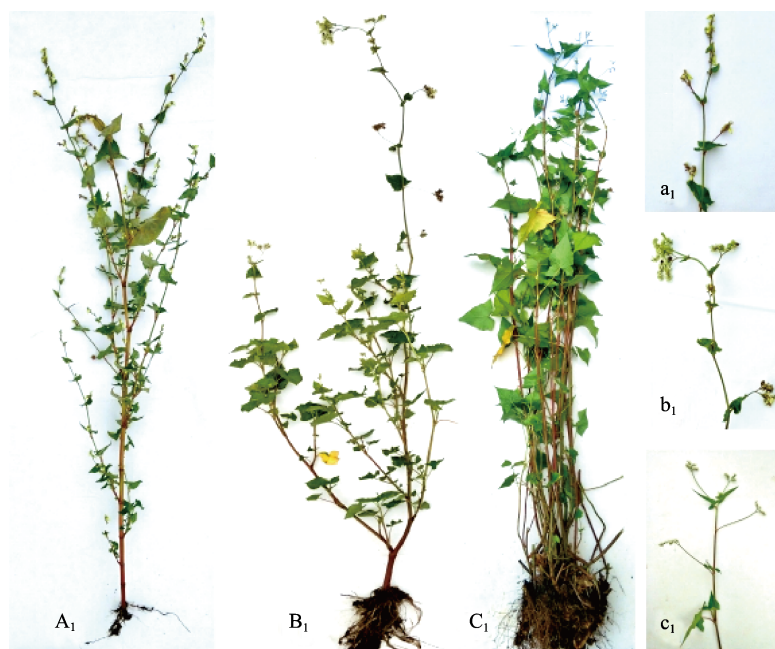
杂交组合小米荞 × 红心金荞  $F_1$  株高为 125 cm, 中亲优势为 62.30%, 超亲优势为 38.90%; 主茎节数为 15 节, 中亲优势为 57.90%, 超亲优势为 25.00%;

杂交组合大苦 1 号 × 红心金荞的亲本及杂种  $F_1$  的植株和花序如图 3 所示。杂种  $F_1$  结实正常, 植株形态特征介于双亲之间。杂交组合小米荞 × 红心金荞  $F_1$  表现为较高的结实率, 但种子均为空瘪的, 植株形态特征介于双亲之间(图 4)。杂交组合巨荞 × 红心金荞的亲本及杂种  $F_1$  的植株和花序如图 5 所示, 其  $F_1$  完全不育, 植株形态特征介于双亲之间。

主茎分枝数为 10 个, 中亲优势为 82%, 超亲优势为 67.00%; 主茎粗为 14.70 mm, 中亲优势为 117.00%, 超亲优势为 37.50%。在此组合中, 株高、主茎节数、主茎分枝数、主茎粗均表现为超亲型, 且杂种优势均较明显。

杂交组合巨荞 × 红心金荞的  $F_1$  株高为 78 cm, 中亲优势为 -21.60%, 超亲优势为 -28.44%; 主茎节数为 7 节, 中亲优势为 -39.00%, 超亲优势为 -41.67%; 主茎分枝数为 5 个, 中亲优势为 -17.00%, 超亲优势为 -16.67%; 主茎粗为 6.13 mm, 中亲优势为 -17.70%, 超亲优势为 -42.71%。在此组合中, 株高、主茎节数、主茎分枝数、主茎粗均不具有杂种优势。





A<sub>1</sub>, a<sub>1</sub>: 小米荞植株与花序; B<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>: 小米荞 × 红心金荞 F<sub>1</sub> 植株与花序; C<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>: 红心金荞植株与花序

A<sub>1</sub>, a<sub>1</sub>: Plants and inflorescences of *F. tataricum* (Xiaomiqiao), B<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>: Plants and inflorescences of *F. tataricum* (Xiaomiqiao) × *F. cymosum* F<sub>1</sub>,  
C<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>: Plants and inflorescences of *F. cymosum*

图 4 小米荞 × 红心金荞杂种 F<sub>1</sub> 及其亲本的植株和花序

Fig.4 Plants and inflorescences of *F. tataricum* (Xiaomiqiao) × *F. cymosum* F<sub>1</sub> hybrid and parents



A<sub>2</sub>, a<sub>2</sub>: 巨荞植株与花序; B<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>: 巨荞 × 红心金荞 F<sub>1</sub> 植株与花序; C<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>: 红心金荞植株与花序

A<sub>2</sub>, a<sub>2</sub>: Plants and inflorescences of *F. giganteum*, B<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>: Plants and inflorescences of *F. giganteum* × *F. cymosum* F<sub>1</sub>,  
C<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>: Plants and inflorescences of *F. cymosum*

图 5 巨荞 × 红心金荞杂种 F<sub>1</sub> 及其亲本的植株和花序

Fig.5 Plant and inflorescence of *F. giganteum* × *F. cymosum* F<sub>1</sub> hybrid and parents

表 3 杂交 F<sub>1</sub> 在几个重要农艺性状上的杂种优势表现  
Table 3 Heterosis of F<sub>1</sub> hybrids in several important agronomic traits

项目 Item	株高 (cm) Plant height	主茎节数 Number of main stem nodes	主茎分枝数 Number of main branches stem	主茎粗 (mm) Main stem diameter
大苦 1 号 <i>F.tataricum</i> (Daku No.1)	80.00 ± 2.16	15.00 ± 1.14	7.00 ± 1.63	5.69 ± 0.02
大苦 1 号 × 红心金荞 F <sub>1</sub> 均值 Average of <i>F.tataricum</i> (Daku No.1) × <i>F.cymosum</i> F <sub>1</sub>	95.00 ± 1.41	16.00 ± 2.16	11.00 ± 1.25	21.30 ± 0.60
红心金荞 <i>F.cymosum</i>	90.00 ± 2.16	12.00 ± 2.45	6.00 ± 0.82	10.70 ± 0.42
中亲值 Average of parents	85.00	13.50	6.50	8.18
中亲优势 (%) Mid-parent heterosis	11.80	18.50	69.00	160.00
超亲优势 (%) Het-erobeltiasis	5.56	6.67	57.00	99.60
小米荞 <i>F.tataricum</i> (Xiaomiqiao)	64.00 ± 2.16	7.00 ± 0.00	5.00 ± 0.82	2.84 ± 0.05
小米荞 × 红心金荞 F <sub>1</sub> 均值 Averager of <i>F.tataricum</i> (Xiaomiqiao) × <i>F.cymosum</i> F <sub>1</sub>	125.00 ± 5.89	15.00 ± 0.82	10.00 ± 1.41	14.70 ± 1.03
红心金荞 <i>F.cymosum</i>	90.00 ± 2.16	12.00 ± 2.45	6.00 ± 0.82	10.70 ± 0.42
中亲值 Average of parents	77.00	9.50	5.50	6.76
中亲优势 (%) Mid-parent heteraosis	62.30	57.90	82.00	117.00
超亲优势 (%) Het-erobeltiosis	38.90	25.00	67.00	37.50
巨荞 <i>F.cymosum</i>	109.00 ± 1.63	11.00 ± 1.41	6.00 ± 0.82	5.10 ± 0.10
巨荞 × 红心金荞 F <sub>1</sub> 均值 Average of <i>F.cymosum</i> × <i>F.cymosum</i> F <sub>1</sub>	78.00 ± 2.16	7.00 ± 1.41	5.00 ± 1.63	6.13 ± 0.03
红心金荞 <i>F.cymosum</i>	90.00 ± 2.16	12.00 ± 2.45	6.00 ± 0.82	10.70 ± 0.42
中亲值 Average of parents	99.50	11.50	6.00	7.90
中亲优势 (%) Mid-parent beterosis	-21.60	-39.00	-17.00	-17.70
超亲优势 (%) Het-erobeltiosis	-28.44	-41.67	-16.67	-42.71

3 讨论

近年来,随着分子标记技术的发展,人们已利用分子标记跟踪优良等位基因,以缩小群体的筛选范围,提高育种效率和预见性,进而挖掘杂种优势潜力<sup>[38]</sup>。SSR 分子标记已用于关联分析挖掘一些优异的植物数量性状基因,相关研究在小麦、玉米中较为成熟。张国华等<sup>[39]</sup>用小麦的 47 个功能标记、64 个 SSR 和 27 个 EST-SSR 检测 128 份黄淮麦区的小麦品种(系),共检测到 422 个等位变异位点,关联分析表明其中的 49 个与产量性状有关联,并发现了一批优异等位变异。已有研究发现与玉米产量相关的 SSR 标记引物 120 对<sup>[40-42]</sup>。席先梅等<sup>[42]</sup>还认为利用优异位点及其载体亲本材料进行标记辅助育种,可以实现对杂种优势的预测,也可以通过跟踪目标性状的分子标记,聚合优异位点,进而实现对亲本材料的高效选育和配组。

SSR 分子标记由于具有分布广、变异丰富、多态性高、共显性等优点,已广泛应用于多种作物的杂种鉴定。张建成等<sup>[43]</sup>利用 SSR 分子标记对 11 个杂交组合的梅花 F<sub>1</sub> 杂种进行鉴定,获得

了 41 株真杂种。刘俊睿等<sup>[44]</sup>运用 SSR 分子标记对小豆 43 个杂交组合 123 个 F<sub>1</sub> 进行鉴定,获得 66 个真杂种;魏秀清等<sup>[45]</sup>利用 SSR 标记鉴定特晚熟龙眼品种立冬本和晚熟良种苗翘的正、反交 F<sub>1</sub> 13 个优良株系的杂种真实性,获得 12 个真杂种。李涛等<sup>[46]</sup>利用形态学和 SSR 分子标记鉴定谷子糯与非糯亲本杂交组合 F<sub>1:2</sub> 植株的真实性,获得 11 株真杂种。综上所述,SSR 标记在杂种鉴定中具有一定的可靠性,可用于杂种鉴定。但在荞麦中还从未见报道。本研究利用从 235 对 SSR 引物中筛选到的两对在 5 个荞麦亲本间多态性较高的引物对 6 个种间杂种 F<sub>1</sub> 进行了鉴定。结果显示,其中的 3 份杂种 F<sub>1</sub> 材料(大苦 1 号 × 红心金荞、小米荞 × 红心金荞和巨荞 × 红心金荞)可扩增出双亲的叠加带型,据此初步判定为真杂种。进一步对这 3 份材料进行形态性状观察,结果这 3 个杂种 F<sub>1</sub> 的表型均介于双亲之间。同时,杂种优势分析结果也显示,这 3 份 F<sub>1</sub> 杂种中大苦 1 号 × 红心金荞、小米荞 × 红心金荞 2 个杂种在株高、主茎节数、主茎分枝数和主茎粗 4 个性状上均表现出明显的杂种优势,巨荞 × 红心金荞表现

为负向杂种优势(表3)。由此可见,形态学观察和杂种优势分析结果印证了分子标记的鉴定结果,进一步证明这3份F<sub>1</sub>材料的确为真杂种,同时也说明SSR分子标记可以用于荞麦种间杂种的鉴定,鉴定结果是可靠的。

本研究对235对SSR引物在5份荞麦亲本材料间的多态性进行了筛选。结果表明多态性引物很少,只有7对引物在亲本间具有多态性,仅占2.98%。推测其原因可能为:(1)所涉及的SSR标记多来自荞麦转录组测序数据库,而所涉及的基因组序列在这些亲本间缺乏多态性,因此不能产生扩增产物差异;(2)也可能是由于亲本都是不同物种,基因组序列差异较大,引物序列只能在其中一个亲本中扩增出产物,而另一亲本中不能扩增出对应产物。另外,在本研究中,利用两对SSR多态性标记对亲本及其杂交种进行真假鉴定,杂种F<sub>1</sub>的SSR带型除了双亲互补型的(真杂种)和母本型的(假杂种)以外,还出现了父、母本均不具有的新带型(图1)。以往研究<sup>[28, 47-48]</sup>认为出现新带型可能是由于配子形成过程中,染色体减数分裂时或在染色体复制过程中不等价交换所引起,而对于本研究中出现新带型的原因有待进一步研究确定。

另外,3个杂种中只有大苦1号×红心金荞麦F<sub>1</sub>具有正常育性。暗示其减数分裂过程中染色体配对较正常,所形成的配子不存在染色体不平衡问题,因而育性正常,可进一步开展品种选育工作。另外2个组合的杂种F<sub>1</sub>表现完全不育。推测其减数分裂过程中染色体配对不正常,形成的配子染色体不平衡,从而导致不育。但是关于这些杂种的染色体组成,尚待进一步观察。

#### 参考文献

- [1] 于颖,郭东升.荞麦、燕麦、小米的营养及其几种食品开发.杂粮作物,2005,25(1):58-89  
Yu T Y, Guo D S. Nutrition of buckwheat, oats and millet and several kinds of food development. Rain Fed Crops, 2005, 25(1): 58-89
- [2] 杨玉霞.荞麦种质资源遗传多样性研究.雅安:四川农业大学,2008  
Yang Y X. Studies on genetic diversity of buckwheat germplasms. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2008
- [3] 肖诗明.加工方法对苦荞麦粉营养成分影响的研究.粮食与饲料工业,1999(1):48-49  
Xiao S M. A study on the processing method and its effects on buckwheat flour nutrients. Cereal and Feed Industry, 1999(1): 48-49
- [4] Beckman J S, Solter M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Nature Biotechnology, 1990, 8(10): 930-932
- [5] 谭孟君,肖层林,詹庆才.利用SSR分子标记鉴定杂交稻和种子金优299纯度研究.作物研究,2008,22(2):73-75  
Tan M J, Xiao C L, Zhan Q C. Studies on purity identification of hybrid rice seed of Jingyou 299 using SSR molecular marker technique. Crop Research, 2008, 22(2): 73-75
- [6] Yuan J H, Cheng F Y, Zhou S L. Hybrid origin of *Paonia* × *yananensis* revealed by microsatellite markers, chloroplast gene sequences, and morphological characteristics. International Journal of Plant Sciences, 2010, 171(4): 409-420
- [7] Zhang J J, Shu Q Y, Liu Z A, Ren H X, Wang L S, de Keyser E. Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. Plant Cell Reports, 2012, 31(2): 299-310
- [8] 刘昔辉,方锋学,张荣华,宋焕忠,杨荣仲,高轶静,区惠平,雷敬超,罗霆,段维兴,张革民,李杨瑞.甘蔗与河八王属间杂种的SSR标记鉴定.西南农业学报,2012,25(1):38-43  
Liu X H, Fang F X, Zhang R H, Song H Z, Yang R Z, Gao Y J, Qu H P, Lei J C, Luo T, Duan W X, Zhang G M, Li Y R. Identification of progenies from sugarcane × *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor. by SSR marker. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(1): 38-43
- [9] 马庆华,李京璟,赵天田,梁丽松,王贵禧.基于EST-SSR标记的平欧杂种榛品种鉴定.植物遗传资源学报,2017,18(5):952-959  
Ma Q H, Li J J, Zhao T T, Liang L S, Wang G X. Cultivar identification of Ping'ou hybrid hazelnut based on EST-SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(5): 952-959
- [10] 管洁,焦雪辉,吴锦娣,王青,吕英民.用ISSR分子标记鉴定亚洲百合杂种F<sub>1</sub>代.分子植物育种,2013,11(3):415-420  
Guan J, Jiao X H, Wu J D, Wang Q, Lv Y M. Identification of Asian lily hybrid F<sub>1</sub> by using ISSR. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(3): 415-420
- [11] Guo X, Li Y, Li C F, Luo H M, Wang L Z, Qian J, Luo X, Xiang L, Song J Y, Sun C, Xu H B, Yao H, Chen S L. Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers. Gene, 2013, 527(1): 131-138
- [12] Yu H P, Cheng F Y, Zhong Y, Zhong Y, Cai C F, Wu J, Cui H L. Development of simple sequence repeat (SSR) markers from *Paonia ostii* to study the genetic relationships among tree peonies (Paeoniaceae). Scientia Horticulturae, 2013, 164(164): 58-64
- [13] Wu J, Cai C, Cheng F, Cui H, Zhou H. Characterisation and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences. Molecular Breeding, 2014, 34(4): 1853-1866
- [14] 刘建鑫,杨柳慧,魏冬霞,于晓南.芍药属组内组间杂交及部分后代核型分析与SSR鉴定.北京林业大学学报,2017,39(4):72-78  
Liu J X, Yang L H, Wei D X, Yu X N. Intrasectional and intersectional cross breeding of *Paonia* and karyotype analysis and SSR identification of some hybrids. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(4): 72-78
- [15] 陈静,胡晓辉,石运庆,苗华荣,禹山林.花生品种间杂种F<sub>1</sub>代的SSR标记分析.核农学报,2009,23(4):53-55  
Chen J, Hu X H, Shi Y Q, Miao H R, Yu S L. Identification of peanut hybrids (*Arachis hypogaea* L.) using SSR markers.



- Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2009, 23 ( 4 ): 53-55
- [ 16 ] 盖树鹏. 玉米品种纯度 SSR 鉴定与田间鉴定的相关性. 华北农学报, 2010, 25 ( 8 ): 28-31  
Gai S P. The relativity between SSR method and field test in the hybrids purity identification of maize. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25 ( 8 ): 28-31
- [ 17 ] 郭韬, 刘建毅, 魏强, 李林, 张龙龙, 李广林. 秦优 10 号油菜杂交种纯度的 SSR 标记鉴定. 陕西农业科学, 2010, 16 ( 2 ): 10-12  
Guo T, Liu J Y, Wei Q, Li L, Zhang L L, Li G L. Identification of the purity of rape hybrid Qinyou 10 by SSR. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2010, 16 ( 2 ): 10-12
- [ 18 ] 韩小霞, 栗建文, 胡新军, 袁祖华, 李勇奇, 杨建国. 一种简便的南瓜杂交种纯度 SSR 鉴定方法. 中国农学通报, 2014, 30 ( 7 ): 194-198  
Han X X, Su J W, Hu X J, Yuan Z H, Li Y Q, Yang J G. A simple SSR-based method for Purity Identification of *Cucurbita moschata* hybrids. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30 ( 7 ): 194-198
- [ 19 ] 韩小霞, 胡新军, 袁祖华, 李勇奇, 杨建国, 栗建文. 利用 SSR 标记技术鉴定南瓜杂交种纯度的研究. 分子植物育种, 2014, 12 ( 1 ): 112-117  
Han X X, Hu X J, Yuan Z H, Li Y Q, Yang J G, Su J W. The research of the *Cucurbita moschata* hybrids purity identification by SSR makers. Molecular Plant Breeding, 2014, 12 ( 1 ): 112-117
- [ 20 ] 李超汉, 刘莉, 刘翔, 朱丽华, 宋荣浩, 杨红娟, 顾卫红. 基于 SSR 标记的 5 个西瓜新品种纯度鉴定及特异性分析的研究. 中国农学通报, 2015, 31 ( 33 ): 177-185  
Li C H, Liu L, Liu X, Zhu L H, Song R H, Yang H J, Gu W H. Seed purity detection and distinctiveness analysis of 5 new Watermelon Varieties on SSR markers. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31 ( 33 ): 177-185
- [ 21 ] 王艳娜, 王益奎, 李文嘉, 蒋雅琴, 吴永官, 黎炎, 康德贤. 利用 SSR 分子标记技术鉴定和分析茄子杂种  $F_1$  的纯度. 南方农业学报, 2015, 46 ( 9 ): 1551-1556  
Wang Y N, Wang Y K, Li W J, Jiang Y Q, Wu Y G, Li Y, Kang D X. Identification and analysis on  $F_1$  hybrid purity of eggplant by using SSR molecular marker technology. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46 ( 9 ): 1551-1556
- [ 22 ] 朱盛安, 李璐, 孔祥云, 段广新, 田景翠, 史淑新, 齐冰玉. SSR 标记检验玉米杂交种子纯度核心引物的构建. 种业导刊, 2017 ( 11 ): 20-24  
Zhu S A, Li L, Kong X Y, Duan G X, Tian J C, Shi S X, Qi B Y. Construction of core primers for purity testing of maize hybrid seeds by SSR marker. Journal of Seed Industry Guide, 2017 ( 11 ): 20-24
- [ 23 ] 李倩, 汪端华, 杨建国. 两个茄子品种纯度 SSR 鉴定与田间检测分析. 分子植物育种, 2018, 16 ( 1 ): 334-338  
Li Q, Wang D H, Yang J G. SSR identification and field detection analysis on purity of two eggplant varieties. Molecular Plant Breeding, 2018, 16 ( 1 ): 334-338
- [ 24 ] 万映伶, 张嘉, 刘爱青, 张孔英, 刘燕. 基于 SSR 标记构建中国芍药品种资源分子身份证. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2018, 46 ( 12 ): 2-7  
Wan Y L, Zhang J, Liu A Q, Zhang K Y, Liu Y. Molecular identification of herbaceous peony cultivars based on SSR markers. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2018, 46 ( 12 ): 2-7
- [ 25 ] 陆徐忠, 从夕汉, 刘海珍, 倪金龙, 马琳, 李莉, 倪大虎, 杨剑波. 杂交水稻亲本分子身份证及 SSR 指纹数据库的建立. 核农学报, 2012, 26 ( 6 ): 853-861  
Lu X Z, Cong X H, Liu H Z, Ni J L, Ma L, Li L, Ni D H, Yang J B. Establishment of DNA fingerprinting database for parental lines of hybrid rice. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2012, 26 ( 6 ): 853-861
- [ 26 ] 丁银灯, 胡相伟, 聂石辉, 王仙, 冯国郡, 耿洪伟, 郭丁. 谷子种质资源表型及 SSR 遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19 ( 6 ): 1210-1221  
Ding Y D, Hu X W, Nie S H, Wang X, Feng G J, Gen H W, Guo D. Analysis of phenotypic traits and SSR genetic diversity of foxtail millet germplasms. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 ( 6 ): 1210-1221
- [ 27 ] 戚建锋, 李晓鹏, 王文然, 贾海锋. 利用基于 SSR 标记的 MCID 法鉴定 72 个柿地方品种. 植物遗传资源学报, 2018, 19 ( 5 ): 895-903  
Qi J F, Li X P, Wang W R, Jia H F. Identification of 72 persimmon landraces by using SSR markers-based MCID method. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 ( 5 ): 895-903
- [ 28 ] 金建楚, 李小湘, 黎用朝, 潘孝武, 刘文强, 段永红, 余亚莹, 盛新年, 赵文锦, 魏秀彩. 农户保存与种质库保存的同近名地方稻品种的遗传多样性研究. 植物遗传资源学报, 2018, 19 ( 3 ): 478-487, 497  
Jin J C, Li X X, Li Y C, Pan X W, Liu W Q, Duan Y H, Yu Y Y, Sheng X N, Zhao W B, Wei X C. Genetic similarity analysis of hunan rice landraces with the same or similar name between households and genebank conservations. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 ( 3 ): 478-487, 497
- [ 29 ] 陈文娟, 李万昌, 杨知还, 孙素丽, 王晓鸣, 朱振东, 段灿星. 玉米抗南方锈病种质资源初步鉴定及遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19 ( 2 ): 225-231, 242  
Chen W J, Li W C, Yang Z H, Sun S L, Wang X M, Zhu Z D, Duan C X. Preliminary identification and genetic diversity analysis of maize germplasm resources for resistance to southern corn rust. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 ( 2 ): 225-231, 242
- [ 30 ] 刘国祥, 邹昆晏, 任民, 佟英, 冯全福, 杨爱国, 戴培刚, 张兴伟. 77 份新收集烟草种质资源的鉴定评价与整理编目. 植物遗传资源学报, 2018, 19 ( 2 ): 212-224  
Liu G X, Zou K Y, Ren M, Tong Y, Feng Q F, Yang A G, Dai P G, Zhang X W. Evaluation and cataloguing of 77 newly-collected tobacco germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 ( 2 ): 212-224
- [ 31 ] 徐敏, 石海春, 余学杰, 谭义川, 柯永川, 赵长云, 柯永培. 一个玉米矮秆突变体 K123d 的遗传鉴定. 植物遗传资源学报, 2017, 18 ( 1 ): 155-163  
Xu M, Shi H C, Yu X J, Tan Y C, Ke Y C, Zhao C Y, Ke Y P. Genetic identification of a dwarf mutant K123d in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18 ( 1 ): 155-163
- [ 32 ] Ma K H, Kim N S, Lee G A, Lee S Y, Lee J K, Yi J Y, Park Y J, Kim T S, Gwag J G. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119: 1247-1254

- [ 33 ] 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.作物杂志, 2013(5): 28-33  
Tian X Q, Xu H Y, Wang C Ruan R W, Yuan X H, Yi Z L, Liu G D. Genetic diversity of common buckwheat based on SSR markers. Crop Journal, 2013(5): 28-33
- [ 34 ] 杜晓磊,张宗文,吴斌,李艳琴,王安虎.苦荞 SSR 分子遗传图谱的构建及分析.中国农学通报, 2013, 29(21): 61-65  
Du X L, Zhang Z W, Wu B, Li Y Q, Wang A H. Construction and analysis of genetic linkage map in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) using SSR. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(21): 61-65
- [ 35 ] 陈庆富.荞麦生产状况及新类型栽培荞麦育种研究的最新进展.贵州师范大学学报:自然科学版, 2018, 36(3): 1-7  
Chen Q F. The status of buckwheat production and recent progresses of breeding on new type of cultivated buckwheat. Journal of Guizhou Normal University: Natural Sciences, 2018, 36(3): 1-7
- [ 36 ] Chen Q F, Huang X Y, Li H Y, Yang L J, Cui Y S. Recent progress in perennial buckwheat development. Sustainability, 2018, 10: 1-17
- [ 37 ] Chen Q F. Recent progress on interspecific crossbreeding of genus *Fagopyrum* Mill. The 13th International Symposium on Buckwheat. 2016: 285-292
- [ 38 ] Xu Y B, Crouch J H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. Crop Science, 2008, 48(2): 391-407
- [ 39 ] 张国华,高明刚,张桂芝,孙金杰,靳雪梅,王春阳,赵岩,李斯深.黄淮麦区小麦品种(系)产量性状与分子标记的关联分析.作物学报, 2013, 39(7): 1187-1199  
Zhang G H, Gao M G, Zhang G Z, Sun J J, Jin X M, Wang C Y, Zhao Y, Li S S. Association analysis of yield traits with molecular markers in Huang-Huai River valley winter wheat region, China. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(7): 1187-1199
- [ 40 ] 向道权,曹海河,曹永国,杨俊品,黄烈健,王守才,戴景瑞.玉米 SSR 遗传图谱的构建及产量性状基因定位.遗传学报, 2001, 28(8): 778-784  
Xiang D Q, Cao H H, Cao Y G, Yang J P, Huang L J, Wang S C, Dai J R. Construction of a genetic map and location of quantitative trait loci for yield component trait in maize by SSR markers. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(8): 778-784
- [ 41 ] 江培顺,张焕欣,吕香玲,郝转芳,李博,李明顺,王宏伟,慈晓科,张世煌,李新海,史振声,翁建峰.玉米产量相关性状 Meta-QTL 及候选基因分析.作物学报, 2013, 39(6): 969-978  
Jiang P S, Zhang H X, Lv X L, Hao Z F, Li B, Li M S, Wang H W, Ci X K, Zhang S H, Li X H, Shi Z S, Weng J F. Analysis of Meta-QTL and candidate genes related to yield components in maize. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(6): 969-978
- [ 42 ] 席先梅,逯晓萍,李俊伟,薛春雷,董婧,张坤明.玉米杂交种产量相关位点分析及优异等位变异挖掘.玉米科学, 2018, 26(4): 36-42  
Xi X M, Lu X P, Li J W, Xue C L, Dong J, Zhang K M. Analysis of yield related locus in maize hybrids. Journal of Maize Sciences, 2018, 26(4): 36-42
- [ 43 ] 张建成,陈瑞丹,曲春苗,吕晓倩.梅花杂种鉴定中 SSR 分子标记引物的筛选.北京林业大学学报, 2012, 34(S1): 40-44  
Zhang J C, Chen R D, Qu C M, Lv X Q. Screening of SSR molecular marker primers in identification of hybrid of plum blossom. Journal of Beijing Forestry University, 2012, 34(S1): 40-44
- [ 44 ] 刘俊睿,谢梦娇,闫龙,李晗,杨凯,孙新展,张运,牛晓,孙东京,李永强,万平. SSR 分子标记鉴定小豆 F<sub>1</sub> 真假杂种.北京农学院学报, 2015, 29(1): 1-5  
Liu J R, Xie M J, Yan L, Li H, Yang K, Sun X Z, Zhang Y, Niu X, Sun D J, Li Y Q, Wan P. Identification of adzuki bean F<sub>1</sub> hybrids by SSR markers. Journal of Beijing University of Agriculture, 2015, 29(1): 1-5
- [ 45 ] 魏秀清,许玲,章希娟,许家辉.龙眼优良杂交株系的 SSR 鉴定.东南园艺, 2017(5): 6-9  
Wei X Q, Xu L, Zhang X J, Xu J H. SSR Identification of the excellent hybrids of longan. Southeast Horticulture, 2017(5): 6-9
- [ 46 ] 李涛,任芹勇,李强,杨文耀,郭世华.谷子 F<sub>1,2</sub> 代植株真实性的 SSR 分子标记鉴定.分子植物育种, 2018, 16(10): 3213-3218  
Li T, Ren Q Y, Li Q, Yang W Y, Guo S H. Identification of authenticity of millet F<sub>1,2</sub> by SSR molecular marker. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(10): 3213-3218
- [ 47 ] Li H Z, Chen H Y, Zhuang T M, Chen J. Analysis of genetic variation in eggplant and related *Solanum* species using sequence-related amplified polymorphism markers. Scientia Horticulturae, 2010, 125: 19-24
- [ 48 ] 谢文刚,张新全,陈永霞.鸭茅杂交种的 SSR 分子标记鉴定及其遗传变异分析.草业学报, 2010, 19(2): 212-217  
Xie W G, Zhang X Q, Chen Y X. Identification and genetic variation analysis of orchardgrass hybrids (*Dactylis glomerata*) by SSR molecular markers. Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(2): 212-217