

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.09.001

吴怡超, 李晓瑜, 何星星, 等. 苦荞种质资源芦丁含量与 SSR 标记关联分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(9): 2-11.

## 苦荞种质资源芦丁含量与 SSR 标记关联分析

吴怡超, 李晓瑜, 何星星, 岳林清, 崔静斌,  
丁梦琦, 张建, 易泽林, 方小梅

西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715

**摘要:** 芦丁是一种黄酮类化合物, 具有强化血管、抗氧化等生物活性. 苦荞籽粒富含芦丁, 是重要的药食兼用作物. 了解和研究苦荞芦丁含量的遗传规律, 开发与苦荞籽粒芦丁含量相关的分子标记对选育高芦丁苦荞种质具有重要意义. 本研究以 263 个苦荞种质资源为材料, 检测并统计分析芦丁含量, 263 个种质籽粒芦丁含量的变幅为 0.46%~1.43%, 变异系数为 21.64%, 利用实验室已有的 77 对 SSR 标记检测结果, 聚类分析将 263 份苦荞资源分为 3 个类群, 群体结构分析将 263 份种质划分为 3 个亚群. 亲缘关系分析结果说明材料间亲缘关系较远, 对关联分析影响较小. GLM 和 MLM 模型的  $p$  值 QQ plot 图显示两个模型都适用于 263 份苦荞资源的芦丁关联分析, 结果表明: TatG0085, TatG0131, TatG0155, TatG0156, TatG0164, TatG0187, TatG0188, S6763, SWU\_Ft029, SWU\_Ft177, SWU\_Ft394, SWU\_Ft420 这 12 对 SSR 标记与苦荞芦丁含量显著关联, 其中 TatG0164 和 SWU\_Ft394 在两个模型中均与芦丁含量呈显著性关联, 与前人研究相比, 8 个标记可能存在一因多效的功能. 该研究结果可以为分子标记辅助选择高芦丁苦荞种质资源及苦荞芦丁含量重要功能基因挖掘提供重要科学依据.

**关键词:** 苦荞; 关联分析; 芦丁含量; SSR 标记

中图分类号: S517 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)09-0002-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Association Analysis of Rutin Content with SSR Markers in Tartary Buckwheat Germplasm Resources

WU Yichao, LI Xiaoyu, HE Xingxing,  
YUE Linqing, CUI Jingbin, DING Mengqi,  
ZHANG Jian, YI Zelin, FANG Xiaomei

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

收稿日期: 2023-05-31

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTB2022NCQ-msx1034); 重庆市农委荞麦技术产业体系项目(202201).

作者简介: 吴怡超, 硕士研究生, 主要从事苦荞分子育种研究.

通信作者: 方小梅, 博士, 副教授.

**Abstract:** Rutin a flavonoid compound known for its ability to strengthen blood vessels, antioxidant and other biological activities. Tartary buckwheat is an important medicinal and food crop, which is rich in rutin in its grains. Therefore, it is of great practical significance to understand and study the genetic mechanism of rutin content in Tartary buckwheat and develop markers related to rutin content in Tartary buckwheat grains for breeding high-rutin Tartary buckwheat germplasm. In this study, 263 Tartary buckwheat germplasm resources were used as materials to determine and analyze rutin content. The variation range of rutin content was 0.46% to 1.43% and variation coefficient was 21.64%. Based on the genotypes of 263 germplasm resources detected by 77 SSR markers in our previous study, 263 Tartary buckwheat germplasm resources were divided into 3 groups by cluster analysis. Similarly, 263 germplasm resources were divided into three subgroups by population structure analysis. The relationship analysis showed that the genetic relationship among the 263 germplasm resources was very distant, which had little influence on the association analysis. The QQ plots of GLM and MLM showed that the two models were suitable for the association analysis of rutin of 263 Tartary buckwheat resources. The results show that twelve pairs of SSR markers, TatG0085, TatG0131, TatG0155, TatG0156, TatG0164, TatG0187, TatG0188, S6763, SWU\_Ft029, SWU\_Ft177, SWU\_Ft394, SWU\_Ft420, had significant correlations with rutin content in Tartary buckwheat. Among them, TatG0164 and SWU\_Ft394 showed significant correlation with rutin content in both models. Compared with previous studies, 8 markers may have pleiotropic function. This study provides important scientific basis for molecular marker-assisted selection of high-rutin Tartary buckwheat germplasm resources and mining important functional genes controlling rutin content in Tartary buckwheat.

**Key words:** Tartary buckwheat; association analysis; rutin content; SSR marker

苦荞(*Fagopyrum tataricum* L. Gaertn), 属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*), 是我国传统的药食两用杂粮作物<sup>[1]</sup>, 其籽粒中营养物质极为丰富, 除蛋白质、淀粉、脂肪和多种维生素外, 还富含其他粮食作物没有的黄酮类化合物芦丁. 芦丁对人体有巨大的益处, 包括预防肝损伤、氧化应激、血管疾病和某些形式的癌症<sup>[2]</sup>. 因此, 苦荞被人们誉为“五谷之王”, 是一种集营养、保健、治疗于一体的健康食品<sup>[3-4]</sup>. 苦荞芦丁含量属多基因控制的数量性状, 遗传基础比较复杂, 表现型和基因型的对应关系也不明确, 对其遗传基础的研究比较困难<sup>[5]</sup>. 因此, 了解和研究苦荞芦丁含量的遗传规律, 开发和鉴定与苦荞芦丁显著关联的分子标记对选育高芦丁含量的苦荞种质具有重要的现实意义.

黄酮类物质对人体极为有益<sup>[6]</sup>, 而芦丁是苦荞所含的主要黄酮类物质. 吕丹<sup>[7]</sup>利用 59 对 SSR 引物对 230 份苦荞种质资源的 15 个性状进行了关联分析, 发现引物 TatG-110 显著关联籽粒黄酮含量、籽粒产量、籽粒周长和百粒质量; 引物 TatG-172 显著关联籽粒黄酮含量、初花期、主茎分枝数. DING 等<sup>[8]</sup>研究发现 *FtERF-EAR3* 可以通过结合 *FtF3H* 启动子中的 GCC-box 来抑制 *FtF3H* 的表达和类黄酮的生物合成, 而茉莉酸盐(jasmonates, JAs)可以诱导 *FtERF-EAR3* 基因表达, 这个结果揭示了 JAs 响应转录抑制因子参与类黄酮生物合成的精确调控机制, 将有助于进一步提高苦荞类黄酮生物合成效率. 此外, TAK 等<sup>[9]</sup>建立了 50 个苦荞基因型的芦丁谱, 比对了芦丁含量高和含量低的两种基因型的 *PAL* 基因序列, 检测到 19 个氨基酸变异, 推测蛋白质结构在两种不同基因型中显示出构象变化, 并可能对芦丁的生物合成有影响. LI 等<sup>[10]</sup>对芦丁浓度和生物量生长曲线进行研究, 发现 *FtMYB16* 与 *Ftimportin- $\alpha$ 1* 相互作用, 直接介导芦丁的生物合成, 当 *FtMYB16* 过表达时会抑制芦丁积累和根系生长. XU 等<sup>[11]</sup>利用转录组-代谢组相关网络中的 *GGT* 基因进行探索, 鉴定了苦荞中连接鼠李糖糖苷元的 *FtUGT79A15* 蛋白, 证实了 *FtUGT79A15* 在体外和植物体内均具有催化槲皮素 3-O-葡萄糖苷生成芦丁的鼠李糖转移酶活性, 并确定 *FtUGT79A15* 参与苦荞类黄酮二糖苷的生物合成途径. 彭艳<sup>[12]</sup>以川荞 2 号种子为供试材料建立了突变体库, 进行 *F3'H* 基

因的 TILLING 分析, 结果表明: *F3'H* 基因的突变可以促进槲皮素的合成, 为芦丁的合成提供底物, 且类黄酮葡萄糖苷转移酶可能影响芦丁合成。

关联分析是鉴定群体内目标性状与遗传标记关系的方法, 是遗传解析复杂数量性状的有效工具, SSR 标记属于关联分析常用的分子技术之一。SONG 等<sup>[13]</sup>利用 110 对 SSR 引物对 97 个苦荞资源进行基因分型, 对芦丁含量、株高、主茎节数等性状进行关联分析, 发现 SXAU2034 引物在至少两种环境中与芦丁含量显著关联的同时, 与根长也显著关联<sup>[13]</sup>。石桃雄等<sup>[14]</sup>使用 62 对 SSR 引物对 193 份材料进行关联分析, 检测到与黄酮含量显著关联的 SSR 标记分别为 S2310, S2304, TatG0124, S2312, S6853, 其中标记 TatG0124 和 S6853 的表型贡献率较高。综上所述, 尽管国内外研究者对芦丁等黄酮类物质在苦荞内的生物合成相关基因或显著关联的分子标记已有一定研究, 但苦荞中芦丁含量的合成机制仍不清楚, 当前亟需深入挖掘苦荞芦丁含量关联的标记, 加深对苦荞芦丁分子调控机制的理解。

本研究收集 263 个苦荞种质资源, 对其芦丁含量进行测定和分析, 结合实验室前期 318 份苦荞种质资源的 77 对 SSR 基因型数据<sup>[17]</sup>, 对苦荞芦丁进行了群体结构分析, 亲缘关系分析, SSR 关联分析, 以筛选与芦丁紧密关联的标记, 为高芦丁苦荞分子育种奠定基础。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 供试材料

供试材料共 263 份, 其中中国重庆 57 份, 四川 57 份(西昌 12 份), 北京 17 份, 贵州 29 份, 山西 7 份, 陕西 28 份, 西藏 28 份, 云南 24 份, 江西 14 份; 国外材料来自韩国与日本, 各 1 份。

### 1.2 田间种植

供试材料于 2022 年春季种植于西南大学合川农场试验基地(106° 7' 51" E, 30° 0' 4" N)。田区完全随机设计, 每个资源种植 3 行, 行长 2.0 m, 行距 0.5 m, 种植密度每公顷 90 万株。苦荞生长发育期间不施肥, 其他田间管理同一般大田管理。待 75% 籽粒成熟后, 各种质资源随机选取无病害、长势相对一致的 3 株植株, 分别进行人工脱粒, 烘干, 备用。

### 1.3 苦荞籽粒芦丁含量的测定

(1) 籽粒总黄酮提取: 每份苦荞种质材料选取 20 g 左右的饱满籽粒, 自然风干, 然后置于烘箱内, 以 60 °C 烘干至恒重, 用高速粉碎机充分研磨, 称取 0.020 g 粉末, 置于 2 mL 的离心管中。加入 2 mL 75% 的甲醇, 60 °C 恒温水浴 2 h 后, 在离心机内以 8 000 r/min 室温离心 10 min, 过滤。取 10 μL 溶液, 加 0.1 mmol/L 氯化铝 80 μL, 再加 1.0 mol/L 醋酸钾 120 μL, 用甲醇定容至 250 μL, 作待测样品。用酶标仪在波长 420 nm 处测吸光度。

(2) 芦丁标准曲线绘制: 分别吸取浓度为 80 μg/mL 的芦丁标准对照品溶液 0 mL, 0.8 mL, 1.6 mL, 2.4 mL, 3.2 mL, 4.0 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 氯化铝 8 mL, 再加 1 mol/L 醋酸钾 12 mL, 用 75% 甲醇溶液定容至 25 mL, 摇匀。以第一管为空白对照, 用酶标仪在波长 420 nm 处测定吸光度。以浓度值 *C* 为横坐标, 吸光值 *A* 为纵坐标, 绘制芦丁标准曲线, 建立一元线性回归方程, 确定相关系数。

(3) 籽粒芦丁含量测定: 通过标准曲线, 获得每个苦荞种质籽粒黄酮提取物中的芦丁浓度, 然后按照公式(1)进行芦丁的百分含量计算。

$$X\% = (C \times N \times V / M \times 106) \times 100\% \quad (1)$$

式中: *X* 为芦丁含量; *C* 为样品吸光度; *V* 为体积(mL); *N* 为稀释倍数; *M* 为称样量(g)。

### 1.4 SSR 标记分型

本试验所用 SSR 引物分为 3 批, 共 77 对。第一批 44 对 SSR 引物由 FANG 等<sup>[15]</sup>根据苦荞全基因组序列开发; 第二批 12 对 SSR 引物以“S”开头命名, 由李月<sup>[16]</sup>根据苦荞种子转录组 Unigene 序列开发; 第三批 21 对 SSR 引物是石桃雄等<sup>[14]</sup>根据合成类黄酮化合物的关键基因、落粒相关的关键基因及合成种子关键蛋白基因等序列所设计的。基因分型数据来源于本课题前期 318 份(含本试验使用的 263 份)苦荞种质资源

基因分型<sup>[17]</sup>, 用“0—1”读带法标记条带, 在相同水平线上的条带, 有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 形成二元矩阵。

### 1.5 数据分析

考种数据用 Excel 表格汇总后, 进行苦荞种质资源芦丁含量的遗传多样性分析, 计算各个苦荞资源品种的芦丁含量的平均值、标准差、变异系数等; 使用 Powermarker 处理得到二元矩阵, 并用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-Joining tree 聚类图, 用 Fig Tree v 1.4.4 软件对聚类图作进一步的美化。用 Structure 2.3.4 软件对 263 份苦荞种质材料进行群体结构分析, 并得到最佳  $K$  值。把  $K$  值设定为 2~10, 并对每个  $K$  值假设重复进行 15 次运算, 将不作数迭代 (Length of burn in period) 和 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) 均设为 100 000 次, 将结果所在的文件压缩为 zip 格式, 上传至网络在线软件 Structure Harvester 处理, 得到最佳  $K$  值与  $Q$  值 (每份种质被分配到对应亚群中的概率), 完成群体结构分析; 利用 TASSEL\_5 软件对 263 份苦荞种质资源进行亲缘关系分析, 得到亲缘关系矩阵, 并用 R 语言绘制亲缘关系热图; 用 TASSEL\_5 软件对 263 份苦荞种质资源的芦丁含量和 SSR 标记进行关联分析, 分别使用一般线性模型 (general linear model, GLM) 和混合线性模型 (MLM), 设置阈值  $p < (-\log_{10}(p) = 3)$  统计显著性位点, 使用 R 语言绘制 Manhattan 图和 QQ plot 图。关联分析结果得到  $p$  值、表型变异贡献率 ( $R^2$ ) 和关联位点等数据。若  $p < 0.05$ , 则说明该标记与该性状存在显著关联; 若  $p < 0.01$ , 则说明该标记与该性状存在极显著关联。

## 2 结果分析

### 2.1 苦荞种质资源芦丁含量的变异分析

对 263 个苦荞种质资源的芦丁含量进行遗传多样性分析。其中各品种的芦丁含量变异范围较大, 变异系数为 21.63%, 芦丁含量范围为 0.46%~1.43%。芦丁含量较低的品种有藏苦 12 变异 1 (0.46%), 额拉 6 (0.51%)。芦丁含量较高的品种有晋苦荞 6 号 2 (1.40%), 黔苦荞 1 号 (1.40%), 藏苦 12 变异 3 (1.43%)。263 个苦荞资源品种的平均芦丁含量为 1.04%。来自四川西昌的 12 个苦荞品种的芦丁含量整体表现优异, 芦丁均值含量为 1.17%, 优于 263 个品种的均值。偏度系数小于 0, 说明数据分布形态与正态分布相比为负偏, 长尾巴在左, 表明左侧边数据有较多的极端值; 峰度系数小于 0, 表明该性状数据分布与正态分布相比较为平坦, 为平顶峰 (表 1)。频率分布图表明 263 份苦荞资源芦丁含量呈偏态分布 (图 1)。

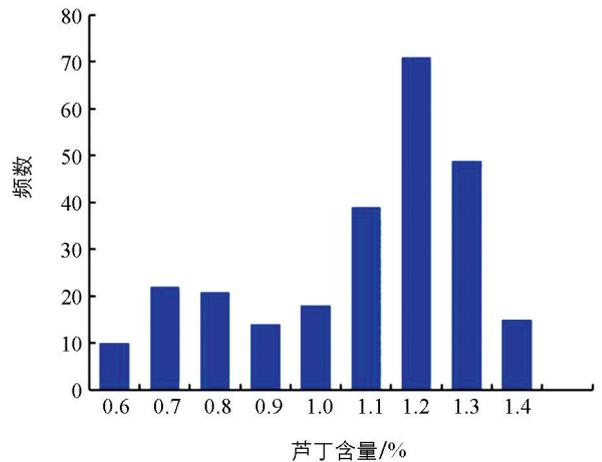


图 1 263 份苦荞资源芦丁含量频率分布图

表 1 苦荞种质资源芦丁含量的变异情况

性状	最大值	最小值	平均值	标准差	极差	变异系数 CV/%	偏度系数	峰度系数
芦丁含量/%	1.43	0.46	1.04	0.22	0.97	21.64	-0.77	-0.48

### 2.2 基于 SSR 标记的聚类分析

利用 77 对 SSR 标记对 263 份供试苦荞资源材料进行聚类分析, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 苦荞种质资源可分为 3 个类群。第 I 类群包括 27 份材料 (北京 2 份, 贵州 5 份, 江西 1 份, 陕西 2 份, 四川 4 份, 西藏 1 份, 云南 2 份, 重庆 10 份), 第 II 类群包括 106 份 (北京 4 份, 贵州 14 份, 江西 6 份, 山西 6 份, 陕西 10 份, 四川 28 份, 西藏 8 份, 云南 9 份, 重庆 20 份, 韩国 1 份), 第 III 类群包括 130 份 (北京 11 份, 贵州 10 份, 江西 7 份, 山西 1 份, 陕西 16 份, 四川 25 份, 西藏 19 份, 云南 13 份, 重庆 27 份, 日本 1 份), 其

中 49.4% 的材料被聚集到第 III 类群中.

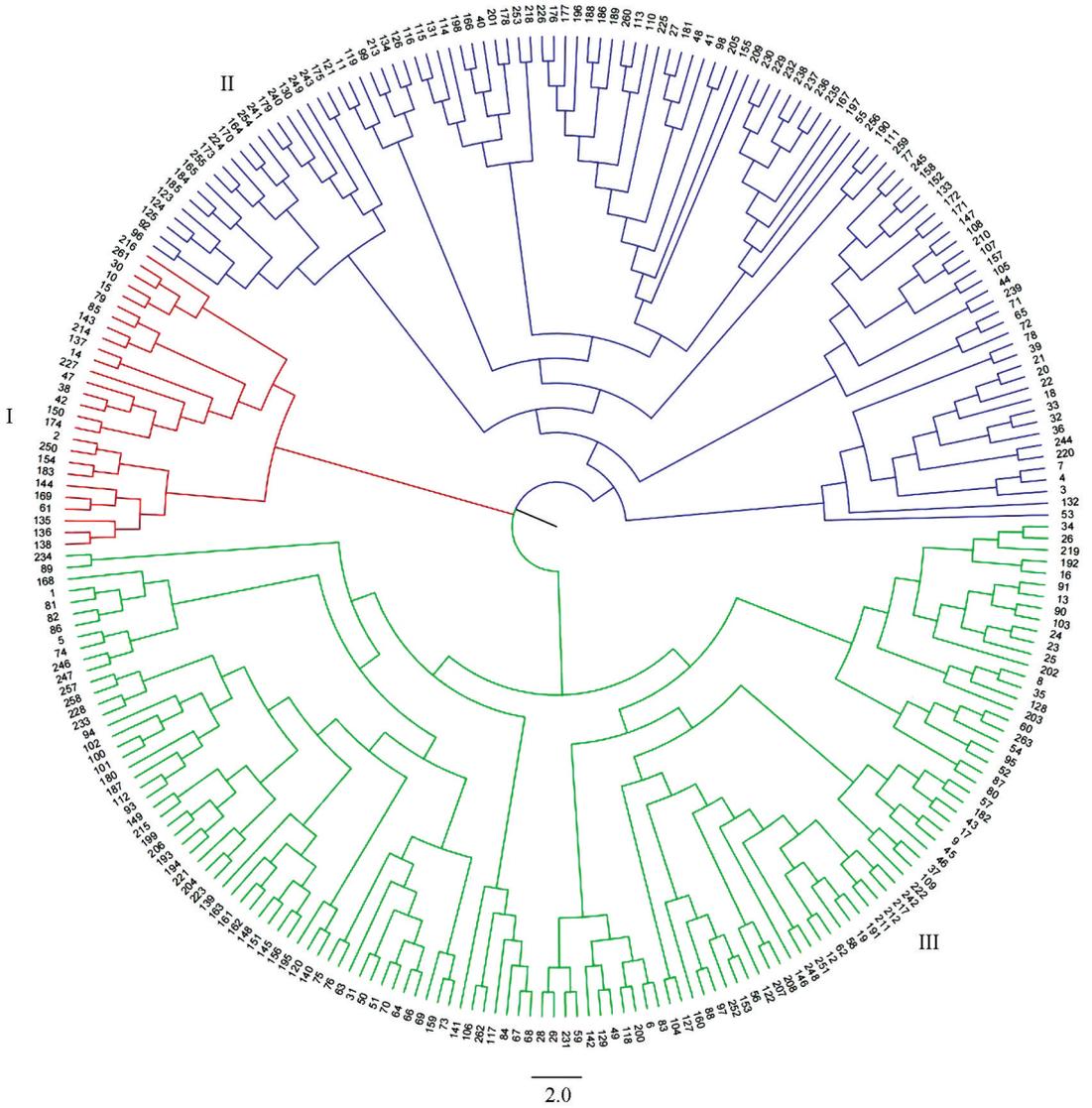


图 2 基于 SSR 标记 263 份苦荞种质资源的聚类结果

### 2.3 苦荞种质的群体结构分析和亲缘关系分析

基于实验室前期对 263 份苦荞种质资源进行的 PCR 扩增及电泳检测, 获得了 77 对多态性引物基因分型数据, 本研究利用 Structure 2.3.4 软件来对 263 份苦荞种质资源材料进行群体结构分析, 设定 K 值为 2~10, 重复次数 15 次, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知, 当 K=3 时,  $\Delta K$  有明显的峰值. 供试材料可分为 3 组, 分别命名为 P1、P2、P3. 其中 P1 种群有包含 110 个个体, 占总材料的 41.8%; P2 种群包含 83 个个体, 占总材料的 31.6%; P3 种群包含 70 个个体, 占总材料的 26.6%. 由群体结果图看(图 4), 3 个种群的基因

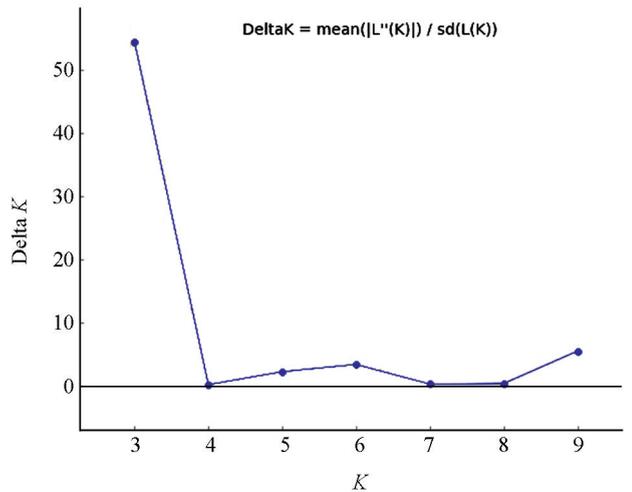


图 3 263 份苦荞资源群体结构分析的 Delta K 值分布

并不纯粹,可能是由长期积累的、偶然性的基因交流导致携带了其他种群的基因。

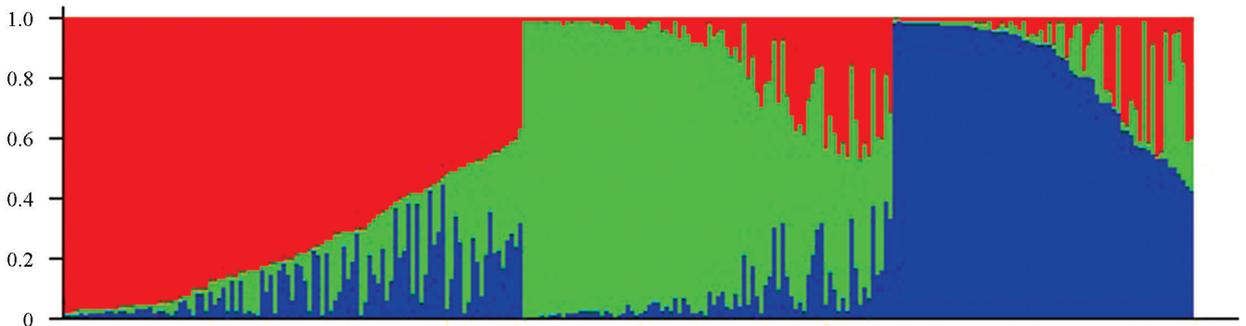


图 4 263 份苦荞种质资源群体结构图

对 263 份苦荞资源材料进行亲缘关系分析,结果如图 5 所示,从该图可以发现,该群体亲缘关系系数大多处于 0 附近,说明各材料亲缘关系较远,对后期基因组关联分析的结果影响较小。

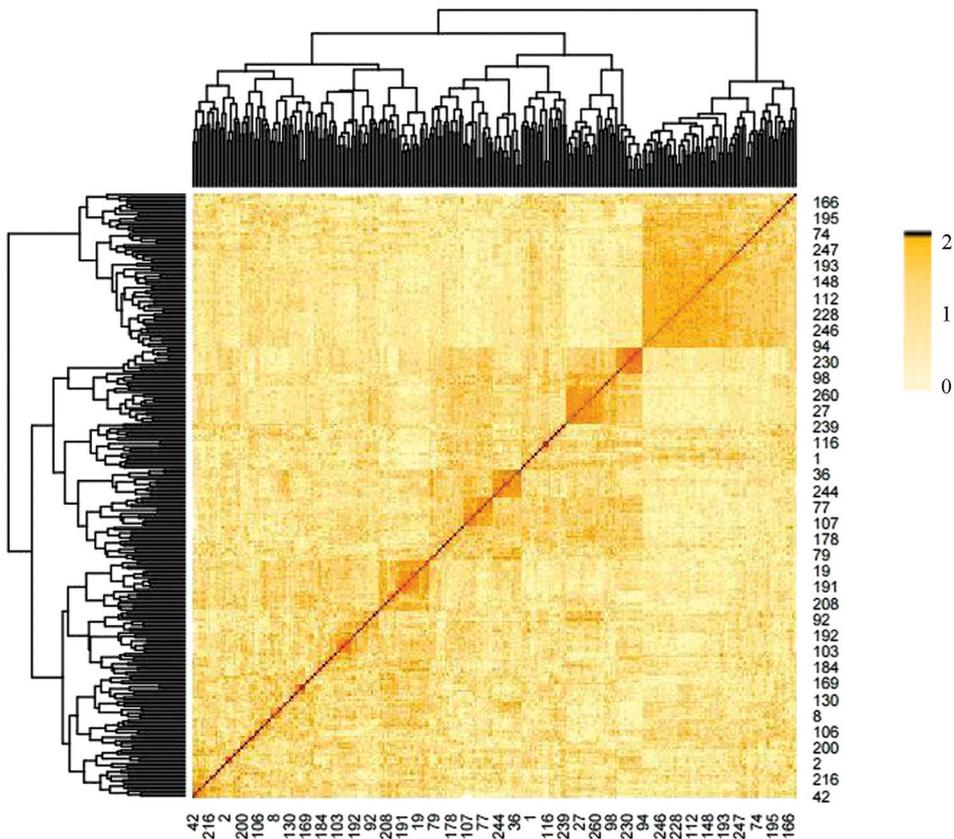


图 5 263 份苦荞种质资源亲缘关系图

#### 2.4 苦荞种质资源的芦丁含量和 SSR 标记关联分析

为了确定模型是适合分析苦荞芦丁含量相关位点,本研究利用苦荞芦丁含量与 SSR 基因分型关联分析,分别计算了 GLM 和 MLM 两种情况下的  $p$  值,进行 QQ plot 图可视化,结果如图 6 所示.两个模型假阳性率都较低,因此 GLM 和 MLM 模型都适合进行芦丁含量的 SSR 关联分析。

将苦荞芦丁含量与 SSR 标记进行关联分析,用所得到的数据,以  $p$  值的负对数为纵坐标,以标记基因的所在位置为横坐标,绘制 Manhattan 图,结果如图 7 所示.由图 7 可知,苦荞芦丁含量与部分标记出现了一定强度的关联。

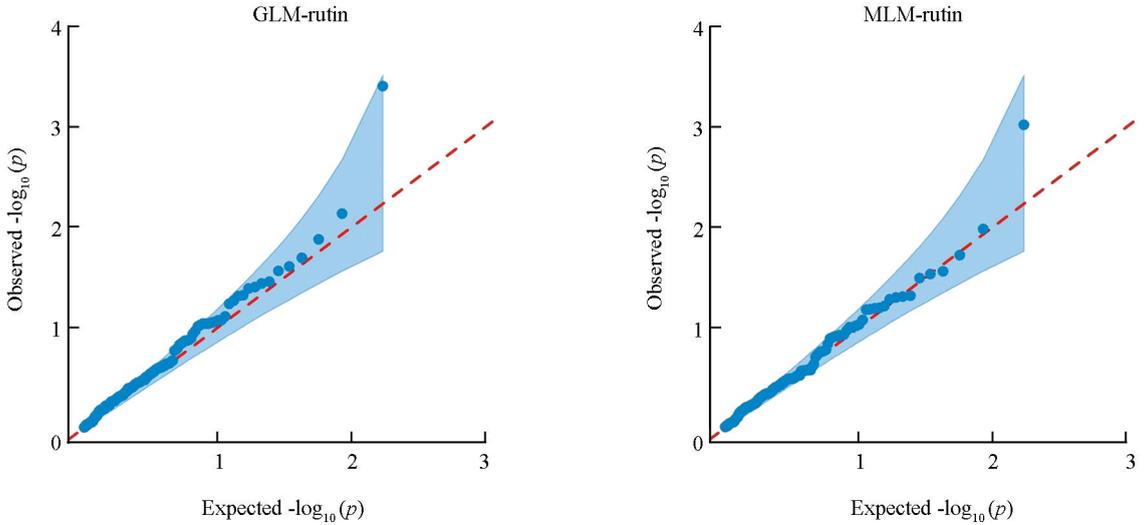


图 6 芦丁含量 QQ plot 图

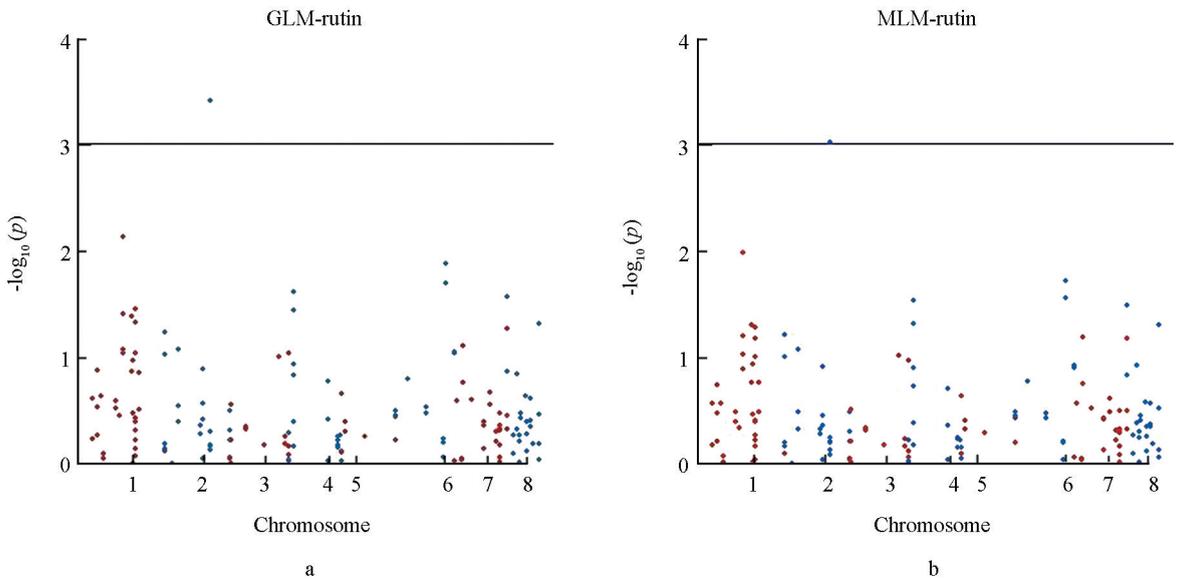


图 7 芦丁含量 Manhattan 图

在 GLM 模型下, 由苦荞芦丁含量的 Manhattan 图(图 7a)可以明显看出, 在 2 号染色体 2.95 Mb 位置上有一个 SSR 与芦丁含量极显著关联。

在 MLM 模型下, 由苦荞芦丁含量的 Manhattan 图(图 7b)可以明显看出, 在 2 号染色体 20 Mb 至 40 Mb 之间有一个 SSR 与芦丁含量极显著关联。

对 263 份苦荞种质资源的遗传关系以及群体结构进行分析, 得到苦荞种质资源对应的 Q 值。使用 77 对已发表的 SSR 标记, 利用 TASSEL\_5 软件包中的 GLM 模型和 MLM 对苦荞种质资源芦丁含量与分子标记进行关联分析。苦荞芦丁含量与 SSR 标记关联结果如表 2 所示。

(1) 在 GLM 模型下得到的结果中, 共检测到 10 个标记与芦丁含量有显著关联( $p < 0.05$ )或极显著相关( $p < 0.01$ )。其中有 8 个标记与芦丁含量存在显著相关( $p < 0.05$ ), 有 2 个标记(TatG0164 和 SWU\_Ft029)与芦丁含量存在极显著相关( $p < 0.01$ )。呈显著关联的各标记对芦丁含量指标的贡献率范围为 1.40%~2.21%, 平均贡献率为 1.66%。呈极显著关联的各标记对芦丁含量指标的贡献率为 2.58%~4.47%, 平均贡献率为 3.53%。

(2) 在 MLM 模型下得到的结果中仅有 4 个标记与芦丁含量有显著关联( $p < 0.05$ )或极显著相关( $p < 0.01$ ). 其中有 3 个标记与芦丁含量存在显著相关( $p < 0.05$ ), 有 1 个标记与芦丁含量存在极显著相关( $p < 0.01$ ). 呈显著关联的各标记对芦丁含量指标的贡献率为 1.83%~2.10%, 平均贡献率为 1.97%. 呈极显著关联的标记对芦丁含量指标的贡献率为 2.88%.

其中 TatG0164 在两个模型中与芦丁含量均呈极显著关联, SWU\_Ft394 在两个模型中与芦丁含量呈显著性关联.

表 2 GLM 和 MLM 模型的关联分析结果

性状	SSR 标记	GLM		MLM	
		$p$	$R^2/\%$	$p$	$R^2/\%$
芦丁含量	TatG0164	0.000 4	4.47	0.006 6	2.88
	SWU_Ft029	0.007 4	2.58	—	—
	TatG0131	0.013 4	2.21	—	—
	TatG0188	0.024 7	1.82	—	—
	SWU_Ft394	0.027 5	1.76	0.020 3	2.10
	TatG0155	0.035 1	1.60	—	—
	TatG0187	0.036 6	1.58	—	—
	S6763	0.041 3	1.51	—	—
	TatG0156	0.047 8	1.42	—	—
	SWU_Ft420	0.049 0	1.40	—	—
	SWU_Ft177	—	—	0.023 8	1.99
	TatG0085	—	—	0.030 0	1.83

注: “—”表示没有检测值.

## 3 讨论

### 3.1 苦荞种质资源芦丁含量的变异及资源筛选

苦荞是重要的杂粮作物, 其籽粒中含有丰富的芦丁. 芦丁功能多样, 能够降低血糖、血压和血脂; 能够抑制肿瘤细胞, 对癌症有一定预防作用; 有抗氧化作用从而可以延缓衰老<sup>[18-20]</sup>. 本研究中 263 份苦荞种质资源的芦丁含量变异范围为 0.46%~1.43%, 高于汪燕等<sup>[21]</sup>报道的来自于不同地区的 20 份苦荞种质芦丁含量的变异范围(0.95%~1.52%); 变异系数为 21.63%, 高于吕丹<sup>[7]</sup>报道的 230 份苦荞种质资源在 3 个不同环境中籽粒黄酮含量的变异系数(12.06%, 13.27%和 14.33%), 说明本研究中苦荞种质籽粒黄酮含量变异范围仍然是比较丰富的, 不同苦荞种质籽粒中黄酮含量存在较大的基因型差异, 可以通过良种选配和改善栽培措施等方法, 使籽粒黄酮含量获得一定程度的改善和提高, 这为选育籽粒黄酮含量极端苦荞种质提供了理论基础.

本试验对 263 份苦荞种质资源材料的芦丁含量进行了统计分析, 结果表明: 263 个苦荞资源品种的平均芦丁含量为 1.04%, 芦丁含量最高的是藏苦 12 变异 3(1.43%), 晋苦荞 6 号 2(1.40%)和黔苦荞 1 号 1(1.40%)次之, 可作为培育高产黄酮品种的种质资源. 晋苦荞 2 号(1.23%)、晋苦荞 6 号(1.39%)芦丁含量较高, 并且前人研究得出此二品种产量也较高<sup>[22-23]</sup>, 说明这两个品种优质高产, 是培育苦荞新品种的优秀种质资源.

### 3.2 苦荞种质资源芦丁含量与 SSR 标记的关联分析

传统育种方法主要依赖育种家对植株表型的选择, 育种周期长, 效率低. 苦荞芦丁含量为数量性状, 受微效多基因控制, 极易受环境影响, 因此通过连锁分析或者关联分析等遗传手段筛选控制重要数量性状的位点, 有助于为培育高产优质苦荞品种提供优质的基因资源<sup>[24]</sup>. 苦荞属于严格闭花授粉作物, 且花朵非常小, 杂交困难<sup>[25]</sup>, 利用自然群体对苦荞重要性状进行关联分析, 对苦荞重要性状调控位点鉴定及苦荞分子标记辅助育种具有重要作用. 目前, 在苦荞种质资源中利用 SSR 分子标记进行关联分析的相关研究较少<sup>[7]</sup>. 本研究利用 77 对 SSR 分子标记, 采用 GLM 模型和 MLM 模型对 263 份苦荞种质资源进行芦丁含量的关联分析, 检测到 12 个 SSR 标记 (TatG0085, TatG0131, TatG0155, TatG0156, TatG0164, TatG0187, TatG0188, S6763, SWU\_Ft029, SWU\_Ft177, SWU\_Ft394, SWU\_Ft420) 与芦丁含量显著相关. 在前人的研究中, TatG0131、SWU\_Ft420 还同时与籽粒面积显著相关<sup>[17]</sup>, SWU\_Ft177、SWU\_Ft394 与籽粒周长极显著相关<sup>[17]</sup>, TatG0164 与粒宽极显著相关<sup>[17]</sup>, 且该引物对应基因编码天冬氨酸蛋白酶<sup>[26]</sup>; S6763 与籽粒圆度极显著相关<sup>[17]</sup>; TatG0187 与籽粒圆度<sup>[17]</sup>和主茎分枝数<sup>[7]</sup>极显著相关, 且该引物对应基因编码 12s 球蛋白种<sup>[26]</sup>; TatG0155 与植株株高极显著相关<sup>[17]</sup>. 以上 SSR 标记与芦丁含量显著相关的同时, 与其他重要性状也显著相关, 表明其可能有“一因多效”的功能, 参与调控苦荞多个重要性状, 但仍需进一步验证. 本研究结果将为苦荞高芦丁种质资源筛选及分子标记辅助选择育种奠定基础.

## 4 结论

苦荞种质资源芦丁含量与 SSR 标记关联分析的试验结果表明, 本研究中 263 份苦荞种质籽粒芦丁含量变幅为 0.46%~1.43%, 变异系数为 21.64%. SSR 的聚类分析将 263 份苦荞资源分为 3 个类群. 群体结构将 263 份苦荞资源划分为 3 个亚群. 但聚类分析的 3 个类群和群体结构分析的 3 个亚群并不相同. 分析两者差异, 可能是因为两种方法的分析角度不同. 群体结构分析主要是基于模型角度研究的, 而 SSR 聚类分析可以直观表现各苦荞种质资源的亲缘关系远近. 亲缘关系热图可以直观表明各苦荞资源之间的亲缘关系远近. GLM 和 MLM 两种模型下的  $p$  值, QQ plot 图显示两个模型都适合苦荞资源芦丁含量的 SSR 关联分析. 对 263 份苦荞种质籽粒芦丁含量与 77 对 SSR 基因分型进行了基于 GLM 模型和 MLM 模型的关联分析. 其中 TatG0164(4.47%) 解释的表型变异率较大. 由此可以推测 TatG0164 是控制苦荞籽粒芦丁含量的重要位点, 可进一步开发为实用性标记, 这将为分子标记辅助育种选育高芦丁含量苦荞籽粒品种提供依据.

### 参考文献:

- [1] 方小梅, 杨文娟, 王于栋, 等. 苦荞 EMS 突变体库的构建及 SCoT 标记筛选分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(2): 54-65.
- [2] HOU S Y, DU W, HAO Y R, et al. Elucidation of the Regulatory Network of Flavonoid Biosynthesis by Profiling the Metabolome and Transcriptome in Tartary Buckwheat [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(25): 7218-7229.
- [3] 温东, 师玉华, 赵锐, 等. 苦荞 MYB 家族转录因子研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 227-234.
- [4] 母养秀, 杜燕萍, 陈彩锦, 等. 不同苦荞品种营养品质与农艺性状及产量的相关性 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 139-142.
- [5] 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.
- [6] 龚盛昭. 黄酮类化合物保健食品大有开发价值 [J]. 广州食品工业科技, 2002, 18(1): 63-64.
- [7] 吕丹. 苦荞种质资源产量性状和籽粒黄酮含量与 SSR 标记的关联分析 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2020.
- [8] DING M Q, HE Y Q, ZHANG K X, et al. JA-Induced FtBPM3 Accumulation Promotes FtERF-EAR3 Degradation and Rutin Biosynthesis in Tartary Buckwheat [J]. The Plant Journal, 2022, 111(2): 323-334.

- [9] TAK A M, HAMI A, BHAT B, et al. Unravelling Rutin Content of Tartary Buckwheat of North Western Himalayas and Insights into Nucleotide Polymorphisms in PAL Gene to Infer the Associations with Rutin Biosynthesis [J]. 3 Biotech, 2022, 12(8): 156.
- [10] LI J B, ZHANG K X, MENG Y, et al. FtMYB16 Interacts with Ftimportin-A1 to Regulate Rutin Biosynthesis in Tartary Buckwheat [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(8): 1479-1481.
- [11] XU H T, JIANG Z Q, LIN Z M, et al. FtUGT79A15 is Responsible for Rutinosylation in Flavonoid Diglycoside Biosynthesis in Fagopyrum Tataricum [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 181: 33-41.
- [12] 彭艳. 川荞 2 号高芦丁突变体的筛选及 F3'H 基因的 TILLING 分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- [13] SONG Y J, CHENG Z, DONG Y M, et al. Diversity of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum*) Landraces from Liangshan, Southwest China: Evidence from Morphology and SSR Markers [J]. Agronomy, 2022, 12(5): 1022.
- [14] 石桃雄, 黎瑞源, 潘凡, 等. 苦荞黄酮含量与 SSR 标记的关联分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36(8): 884-891.
- [15] FANG X M, HUANG K H, NIE J, et al. Genome-Wide Mining, Characterization, and Development of Microsatellite Markers in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum* Gaertn.) [J]. Euphytica, 2019, 215(11): 1-10.
- [16] 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.
- [17] 李晓瑜, 方小梅, 伍浩天, 等. 苦荞种质资源主要农艺性状 SSR 标记关联分析 [J]. 作物学报, 2022, 48(12): 3091-3107.
- [18] MIDDLETON E, KANDASWAMI C, THEOHARIDES T C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer [J]. Pharmacological Reviews, 2000, 52(4): 673-751.
- [19] PANWAR A, GUPTA N, CHAUHAN R S. Biosynthesis and Accumulation of Flavonoids in *Fagopyrum* Spp. [J] The European Journal of Plant Science and Biotechnology, 2012, 6: 17-26.
- [20] SUZUKI T, MORISHITA T, MUKASA Y, et al. Breeding of 'Manten-Kirari', a Non-Bitter and Trace-Rutinosidase Variety of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum* Gaertn.) [J]. Breeding Science, 2014, 64(4): 344-350.
- [21] 汪燕, 梁成刚, 孙艳红, 等. 不同苦荞品种的产量与品质及其对低氮的响应 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2017, 35(6): 66-73.
- [22] 张清明, 岳永贵, 马裕群, 等. 13 个苦荞品种在六盘水的产量性状表现 [J]. 农技服务, 2019, 36(9): 18-19.
- [23] 赵鑫, 陈少锋, 王慧, 等. 晋北地区不同苦荞品种产量和品质研究 [J]. 作物杂志, 2018(5): 27-32.
- [24] 黄莎, 张正圣, 王文文, 等. 陆地棉 RIL 群体产量与纤维品质性状 QTL 定位 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(1): 55-65.
- [25] ZHANG L J, LI X X, MA B, et al. The Tartary Buckwheat Genome Provides Insights into Rutin Biosynthesis and Abiotic Stress Tolerance [J]. Molecular Plant, 2017, 10(9): 1224-1237.
- [26] SHI T X, LI R Y, CHEN Q J, et al. De Novo Sequencing of Seed Transcriptome and Development of Genic-SSR Markers in Common Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum*) [J]. Molecular Breeding, 2017, 37(12): 147.