

网络出版时间:2025-12-15

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.s.20251212.1409.016

基于 SSR 分子标记的青稞品种鉴定及遗传多样性分析

滕彩玲^{1,2}, 杨晓洪^{1,2}, 荆若男³, 张凯浙³, 法永英^{1,2}, 赵春芳⁴,

Abdelfattah Mohammed Abdelfattah Nagy⁵, 韩瑞玺³, 刘艳芳^{1,2}

(1. 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 云南昆明 650205; 2. 农业农村部植物新品种测试(昆明)分中心, 云南昆明 650205;

3. 农业农村部科技发展中心, 北京 100176; 4. 昭通学院农学与生命科学学院, 云南昭通 657000;

5. 埃及农业研究中心大田作物研究所, 开罗 11435)

摘要:为了筛选一套适合中国青稞品种鉴定标准的 SSR 核心引物, 并建立青稞品种分子鉴定体系和 DNA 指纹数据库, 基于国内外已报道的青稞 SSR 标记, 对 155 个青稞品种进行 PCR 扩增和标记筛选验证, 并分析其遗传多样性和鉴别效率。结果表明, 从 200 对 SSR 引物中, 筛选出峰型简单易读取、多态性好、扩增稳定性高、染色体上分布均匀的核心引物 21 对, 用云青 4 号、迪青 4 号、昆仑 8 号等 31 个参照品种验证了 21 对核心引物的稳定性和可靠性。利用 21 对核心引物构建了 155 个青稞品种的指纹数据库, 并检测到 137 个等位变异, 每对引物等位变异的范围为 2~10 个, 平均值为 6.52 个; PIC 值范围为 0.39~0.85, 平均值为 0.68, 高多态性位点占比 95.24%; 21 对核心引物可区分 155 个品种中的 153 个品种, 引物鉴别效率为 99.991%。通过聚类分析、群体结构分析和主成分分析, 将 154 个青稞品种分为 3 个类群, 品种间遗传多样性丰富, 45.81% 的品种遗传背景简单。由此可见, 基于 SSR 分子标记建立的青稞品种鉴定体系鉴定效果好, 应用性强, 可用于青稞品种真实性鉴定、辅助 DUS 测试近似品种筛选、新品种权保护等领域; 155 个青稞品种的 DNA 指纹数据库和遗传多样性分析结果可为未来青稞育种提供一定参考。

关键词: 青稞; SSR 标记; 品种鉴定; 遗传多样性

中图分类号: S512.3; S338

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)06-0754-14

SSR Marker Based Analysis for Identification and Genetic Diversity of Hulless Barley Varieties

TENG Cailing^{1,2}, YANG Xiaohong^{1,2}, JIN Ruonan³, ZHANG Kaixi³, FA Yongying^{1,2},

ZHAO Chunfang⁴, Abdelfattah Mohammed Abdelfattah Nagy⁵, HAN Ruixi³, LIU Yanfang^{1,2}

(1. Quality Standards and Testing Technology Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China; 2. Kunming DUS Test Station, Ministry of Agricultural and Rural Affairs, Kunming, Yunnan 650205, China;

3. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China;

4. College of Agronomy and Life Science, Zhaotong University, Zhaotong, Yunnan 657000, China; 5. Field Crops Research Institute, Agriculture Research Center, Cairo 11435, Egypt)

Abstract: To establish a molecular identification system and DNA fingerprint database for hulless barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.) varieties in China, this study aimed to screen a set of SSR core primers suitable for national variety identification standards, thereby providing technical support for variety authentication, management, and new variety protection. Based on previously reported SSR markers of hulless barley, PCR amplification, marker screening, and validation were per-

收稿日期: 2025-09-18

修回日期: 2025-10-29

基金项目: 科技部生物育成品种 DUS 测试工具装备研发项目(2023ZD0406106); 云南省重大科技专项(202502AE090022); 云南省重点研发计划项目(202503AP140031); 云南省农业科学院预研项目; 中国科学技术部国际杰青计划项目(国科外[2025]28号)

第一作者 E-mail: tengcailing@yaas.org.cn(滕彩玲)

通讯作者 E-mail: wudifeixue007@163.com(韩瑞玺); liuyf528@163.com(刘艳芳)

formed across diverse varieties, followed by analyses of genetic diversity and discrimination efficiency. Using 155 hulless barley accessions, 200 SSR primer pairs were subjected to polymorphism screening. Twenty-one core primers were selected based on criteria including clear and easily interpretable peak patterns, high polymorphism(mean PIC=0.68), amplification stability, and even chromosomal distribution. Reference varieties(e.g., Yunqing 4, Diqing 4, and Kunlun 8) were employed to validate the stability and reliability of these primers. The constructed DNA fingerprint database for 155 accessions detected 137 alleles, ranging from 2 to 10 per locus(mean=6.52). The polymorphism information content(PIC) values varied between 0.39 and 0.85(mean=0.68), with 95.24% of loci classified as highly polymorphic(PIC>0.5). These 21 primers achieved a discrimination efficiency of 99.991%, distinguishing 153 out of 155 accessions. Cluster analysis, population structure analysis, and principal component analysis classified the 154 accessions into three distinct groups, revealing rich genetic diversity and simple genetic backgrounds in 45.81% of the accessions. The SSR-based identification system developed in this study demonstrated high accuracy and practical applicability, enabling authenticity verification, auxiliary screening of approximate varieties in DUS testing, and intellectual property protection. Furthermore, the DNA fingerprint database and genetic diversity analysis provide valuable molecular-level insights for future hulless barley breeding programs.

Keywords: Hulless barley; SSR markers; Variety identification; Genetic diversity

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.)隶属禾本科大麦属,为栽培大麦的变种,其显著特征是内外稃与颖果分离,籽粒呈裸露状态,因而也被称作裸大麦^[1-2]。中国是世界青稞分布范围最广、种植面积最大的地区,其青稞种植主要集中于西藏、青海、四川、云南以及甘肃的藏区^[3]。青稞在青藏高原的栽培历史源远流长,大约已有3 500年^[4]。它具有耐寒、抗旱能力强、抗逆性突出、适应范围广泛、生育期较短等特性,不仅是青藏高原的特色作物,更是藏族人民的主要食粮^[5]。近年来,随着育种技术的不断发展以及青稞种质资源的逐步丰富,中国在青稞新品种培育方面取得了显著进展,培育速度持续加快。然而,这一过程也暴露出诸多问题。例如,青稞育种工作中存在低水平重复研究的现象;品种同质化与碎片化问题严重,导致品种的遗传背景相对狭窄,这不仅增加了品种保护的难度,也对青稞产业的健康可持续发展产生了一定阻碍。在这样的背景下,当前主要依赖表型性状开展品种鉴定的方式已难以满足实际需求。鉴于此,筛选一套优质的青稞SSR核心引物,进而构建青稞品种分子标记鉴定体系以及指纹数据库,就显得尤为迫切。这一举措对于满足青稞品种保护、维权、管理等多方面的需求具有重大意义,既能切实保障育种家的合法权益,提高其育种积极性,又有助于规范青稞种业市场秩序,推动青稞产业朝着健康有序的方向发展。

SSR(simple sequence repeat)分子标记以其

共显性遗传、多等位基因、基因组覆盖范围广、丰度高、再现性良好等诸多优势^[6-7],在水稻^[8]、玉米^[9]、棉花^[10]、大豆^[11]等众多作物的品种鉴定工作中得到了广泛应用。曾乐等^[12]应用28个SSR标记对44个国内外大麦品种进行特异性鉴定和遗传多样性分析,发现15个SSR标记组合可完成不同来源品种的纯度和真实性鉴别。Dido等^[13]运用49个SSR标记评估了从埃塞俄比亚不同大麦种植区收集的384个大麦基因型的遗传多样性和种群结构。Shirvani等^[14]利用SSR和EST-SSR标记对伊朗西部的114个野生大麦品种进行遗传多样性分析。吴昆仑等^[15]运用SSR引物,对来自青藏高原区域内西藏、青海、四川和云南的55个青稞材料展开遗传多样性分析发现,不同生态区的青稞材料在遗传特性上存在明显差异,其中云南材料的遗传多样性最丰富。原红军等^[16]借助95对SSR引物,对收集自世界各地的1 220个青稞种质资源进行了亲缘关系与遗传多样性评估,将这些种质可划分为A1和A2两个亚群,分别包含192和1 028个材料,A1亚群主要为国外青稞种质,A2亚群的材料则大多来自青藏高原地区,且A1亚群较A2亚群呈现出较高的等位变异丰度和遗传多样性。王国平等^[17]利用27个SSR标记将39个青稞品种分为3个亚群,它们的亲本材料之间遗传差异较小,亲缘关系较为紧密。张元元等^[3]采用92个SSR标记,对来自甘肃和西藏不同地区的102个青稞材料的遗传多

样性和群体遗传结构进行分析,并将其分为2个亚群,且大部分供试青稞材料之间亲缘关系相近。Qu等^[18]通过深入分析SSR分子指纹图谱,明确了西藏传统、现代和种质资源库基因库的遗传多样性状况,以及品种内和品种间遗传多样性的分布情况,为品种的合理有效利用提供了重要参考依据。Hu等^[19]则运用18个SSR标记,对63个不同地区的青稞品种开展遗传多样性分析。

国际植物新品种保护联盟明确指出,分子标记技术在鉴别品种、品系(包括杂交亲本、自交系)方面具有显著优势,是一种强有力的工具。同时,该联盟推荐SSR标记作为植物品种鉴定以及数据库构建的首选标记之一^[20-22]。中国在2016年发布的《植物品种鉴定DNA分子标记法总则》中,也将SSR标记列为当前各植物品种DNA指纹鉴定推荐使用的主要标记之一^[23]。然而,在以往的青稞品种研究中,SSR标记染色体分布不够均匀,多态性较低,分子标记数较少,不能满足大规模品种鉴定的需要。此外,SSR数据主要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳获取,在基因分型和数据共享方面存在一定局限性,不利于研究成果的广泛应用与交流。因此,有必要建立一个高通量、高鉴别效率的SSR分子标记鉴定体系。

本研究根据2016年发布实施的《植物品种鉴定DNA分子标记法总则》规范^[23],拟筛选出一套具备扩增稳定、峰型易于读取、区分率高、多态性丰富以及在染色体上均匀分布等特性的SSR核心引物组合。以此为基础,构建青稞品种分子鉴定体系和DNA指纹图谱库,旨在为青稞品种的真实性快速鉴定提供技术支持,同时在辅助青稞品种特异性、一致性和稳定性测试(简称DUS测试)筛选近似品种方面发挥积极作用,进而为规范青稞种业市场秩序提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收集青稞品种共155个,由农业农村部植物新品种测试(昆明)分中心、农业农村部植物新品种测试(西宁)分中心、云南省农业科学院粮食作物研究所、国际玉米小麦改良中心等单位提供,包含43个地方品种和112个育成品种(表1)。

1.2 SSR引物

从相关文献材料收集包含染色体位置信息的200对青稞SSR引物^[15-19,24-31]。对于初步筛选后

的引物,依据扩增片段长度选取TAMRA、HEX、FAM、ROX中的一种荧光染料在上游5'端进行标记。普通引物和荧光引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.3 基因组DNA提取

使用改良的CTAB法^[32]提取基因组DNA。每个品种取30株幼苗的幼嫩叶片等量混匀,液氮冷冻研磨后提取。使用Nano Drop 2000分光光度计测定OD₂₆₀/OD₂₈₀值与浓度,并将DNA母液稀释至20~25 ng·μL⁻¹, -20℃保存备用。

1.4 PCR扩增

采用20 μL的PCR反应体系,其包含10 μL 2×Taq Plus Master Mix、SSR上下游引物(浓度10 μmol·L⁻¹)各0.5 μL、7 μL双蒸水和2 μL DNA模板。

PCR扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,相应退火温度退火30 s,72℃延伸45 s,共35个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。

1.5 扩增产物检测

普通毛细管电泳检测:普通PCR产物稀释后,取20 μL加入96孔板,利用Qsep400™全自动核酸蛋白分析系统进行电泳检测。

荧光毛细管电泳:按照分组吸取1 μL的PCR扩增产物,混匀稀释125~150倍,再取1 μL混合产物稀释液加入深孔板,每孔加入8.9 μL的去离子甲酰胺和0.1 μL LIZ500,混匀后95℃变性5 min,冷却后利用ABI3730基因分析仪进行片段分析。

1.6 数据统计与数据分析

根据等位基因扩增片段大小记录数据,杂合位点记录为X/Y,纯合位点的基因型数据记录为X/X,例如166/168和168/168,166与168是该位点上的2种等位变异。

用Power Marker V3.25^[33]计算品种间遗传距离、多态性信息含量、主要等位基因频率和基因型数量。用GenAlEx 6.5^[34]计算观测杂合度、期望杂合度、等位基因数、有效等位基因数等遗传多样性参数。用R语言统计品种间的差异位点数并作图。用MEGA 11^[35]和iTOL v6^[36]构建系统发育树。用Structure 2.3.4^[37]软件分析供试品种的群体结构。MCMC值设置为50 000。Burnin Period值设置为5 000。最佳群体组群数K的取值范围为1~10,每个K值重复运行20次,依据似然值最大原则选取合适的K值为群体数

表 1 155 份青稞品种信息

Table 1 Information of the 155 hulless barley varieties

编号 No.	品种名称 Variety name	地区 Region	编号 No.	品种名称 Variety name	地区 Region	编号 No.	品种名称 Variety name	地区 Region	编号 No.	品种名称 Variety name	地区 Region
1	紫光芒裸大麦 ^A Ziguangmangluodamai	云南 Yunnan	40	昆仑 15 号 ^B Kunlun 15	青海 Qinghai	79	S-70 ^B	云南 Yunnan	118	K51 ^B	云南 Yunnan
2	中甸紫青稞 ^A Zhongdianziqingke	云南 Yunnan	41	昆仑 14 号 ^B Kunlun 14	青海 Qinghai	80	S-7 ^B	云南 Yunnan	119	K50 ^B	云南 Yunnan
3	镇康软壳青稞 ^A Zhenkangruanqeqingke	云南 Yunnan	42	昆仑 13 号 ^B Kunlun 13	青海 Qinghai	81	S-69 ^B	云南 Yunnan	120	K49 ^B	云南 Yunnan
4	长芒青稞 ^A Changmangqingke	云南 Yunnan	43	昆仑 12 号 ^B Kunlun 12	青海 Qinghai	82	S-68 ^B	云南 Yunnan	121	K45 ^B	云南 Yunnan
5	长芒米大麦 ^A Changmangmidamai	云南 Yunnan	44	昆仑 10 号 ^B Kunlun 10	青海 Qinghai	83	S-67 ^B	云南 Yunnan	122	K44 ^B	云南 Yunnan
6	长芒裸大麦 ^A Changmangluodamai	云南 Yunnan	45	宽颖大麦 ^A Kuanyingdamai	云南 Yunnan	84	S-66 ^B	云南 Yunnan	123	K43 ^B	云南 Yunnan
7	长芒六棱露仁 ^A Changmangliuluren	云南 Yunnan	46	康青 4 号 ^B Kangqing 4	四川 Sichuan	85	S-65 ^B	云南 Yunnan	124	K42 ^B	云南 Yunnan
8	长黑青稞 ^A Changheiqingke	云南 Yunnan	47	康青 3 号 ^B Kangqing 3	四川 Sichuan	86	S-64 ^B	云南 Yunnan	125	K41-2 ^B	云南 Yunnan
9	早熟白青稞 ^A Zaoshubaiqingke	云南 Yunnan	48	黄长钩裸大麦 ^A Huangchanggouluodamai	云南 Yunnan	87	S-63 ^B	云南 Yunnan	126	K41 ^B	云南 Yunnan
10	杂交青稞 ^A Zajiaoqingke	云南 Yunnan	49	松花麦 ^A Songhuamai	云南 Yunnan	88	S-6-2 ^B	云南 Yunnan	127	K39 ^B	云南 Yunnan
11	云青 606 ^B Yunqing 606	云南 Yunnan	50	黑青稞 ^A Heiqingke	云南 Yunnan	89	S-62 ^B	云南 Yunnan	128	K38 ^B	云南 Yunnan
12	云青 4 号 ^B Yunqing 4	云南 Yunnan	51	黑白青稞 ^A Heibaipingke	云南 Yunnan	90	S-61 ^B	云南 Yunnan	129	K37 ^B	云南 Yunnan
13	云青 3 号 ^B Yunqing 3	云南 Yunnan	52	钩芒裸大麦 ^A Goumangluodamai	云南 Yunnan	91	S-6 ^B	云南 Yunnan	130	K36 ^B	云南 Yunnan
14	云青 2 号 ^B Yunqing 2	云南 Yunnan	53	钩芒米大麦 ^A Goumangmidamai	云南 Yunnan	92	S-4 ^B	云南 Yunnan	131	K35 ^B	云南 Yunnan
15	玉环洋大麦 ^A Yuhuanyangdamai	云南 Yunnan	54	甘德拉青稞 ^A Gandelaiqingke	云南 Yunnan	93	S-32 ^B	云南 Yunnan	132	K31 ^B	云南 Yunnan
16	有芒白青稞 ^A Youmangbaiqingluo	云南 Yunnan	55	曲曲麦 ^A Ququmai	云南 Yunnan	94	S-30 ^B	云南 Yunnan	133	K26-2 ^B	云南 Yunnan
17	洋大麦 ^A Yangdamai	云南 Yunnan	56	富恒米大麦 ^A Fuhengmidamai	云南 Yunnan	95	S-3 ^B	云南 Yunnan	134	K26 ^B	云南 Yunnan
18	羊毛青稞 ^A Yangmaoqingke	云南 Yunnan	57	二棱大麦 ^A Erlengdamai	云南 Yunnan	96	S-29 ^B	云南 Yunnan	135	97-47 ^B	云南 Yunnan
19	鲜裸大麦 ^A Xianluodamai	云南 Yunnan	58	短白青稞 ^A Duanbaiqingke	云南 Yunnan	97	S-28 ^B	云南 Yunnan	136	97-14-2 ^B	云南 Yunnan
20	温泉青稞 ^A Wenquanqingke	云南 Yunnan	59	冬青 15 号 ^B Dongqing 15	西藏 Xizang	98	S-26 ^B	云南 Yunnan	137	97-14 ^B	云南 Yunnan
21	上江青稞 ^A Shangjiangqingke	云南 Yunnan	60	东旺白青稞 ^A Dongwangbaiqingke	云南 Yunnan	99	S-25 ^B	云南 Yunnan	138	94-64 ^B	云南 Yunnan
22	青稞麦 ^A Qingkemai	云南 Yunnan	61	迪青 6 号 ^B Diqing 6	云南 Yunnan	100	S-23 ^B	云南 Yunnan	139	94-59-2 ^B	云南 Yunnan
23	青稞 1 ^A Qingke 1	云南 Yunnan	62	迪青 5 号 ^B Diqing 5	云南 Yunnan	101	S-20 ^B	云南 Yunnan	140	90126-2 ^B	云南 Yunnan
24	青稞 2 ^A Qingke 2	云南 Yunnan	63	迪青 4 号 ^B Diqing 4	云南 Yunnan	102	S-2 ^B	云南 Yunnan	141	80 天青稞 ^A 80 tianqingke	云南 Yunnan
25	糯青稞 ^A Nuoqingke	云南 Yunnan	64	迪青 3 号 ^B Diqing 3	云南 Yunnan	103	S-18 ^B	云南 Yunnan	142	19QK-5 ^B	云南 Yunnan
26	尼西黑青稞 ^A Nixiheiqingke	云南 Yunnan	65	藏 83062 ^B Zang 83062	西藏 Xizang	104	S-16 ^B	云南 Yunnan	143	19QK-4 ^B	云南 Yunnan
27	米麦 114 ^B Mimai 114	云南 Yunnan	66	北青 88 繁 45 ^B Beiqing 88 fan 45	青海 Qinghai	105	S-15-1 ^B	云南 Yunnan	144	04-185 ^B	云南 Yunnan
28	米大麦 ^A Midamai	云南 Yunnan	67	北青 7 号 ^B Beiqing 7	青海 Qinghai	106	S-14 ^B	云南 Yunnan	145	04-181 ^B	云南 Yunnan
29	潞水米大麦 ^A Mangshuimidamai	云南 Yunnan	68	北青 8 号 ^B Beiqing 8	青海 Qinghai	107	S-12 ^B	云南 Yunnan	146	04-171 ^B	云南 Yunnan
30	裸大麦 ^A Luodamai	云南 Yunnan	69	北青 6 号 ^B Beiqing 6	青海 Qinghai	108	S-11 ^B	云南 Yunnan	147	04-150 ^B	云南 Yunnan
31	禄劝裸黑大麦 ^A Luquanluoheidamai	云南 Yunnan	70	北青 1 号 ^B Beiqing 1	青海 Qinghai	109	S-1 ^B	云南 Yunnan	148	04-147 ^B	云南 Yunnan
32	昆仑 8 号 ^B Kunlun 8	青海 Qinghai	71	白青稞 ^A Baiqingke	云南 Yunnan	110	K60-2 ^B	云南 Yunnan	149	04-149 ^B	云南 Yunnan
33	昆仑 3 号 ^B Kunlun 3	青海 Qinghai	72	紫青稞 ^A Ziqingke	云南 Yunnan	111	K59 ^B	云南 Yunnan	150	98092 ^B	云南 Yunnan
34	昆仑 1 号 ^B Kunlun 1	青海 Qinghai	73	八十天紫青稞 ^A Bashitianziqingke	云南 Yunnan	112	K58 ^B	云南 Yunnan	151	90126 ^B	云南 Yunnan
35	昆仑 19 号 ^B Kunlun 19	青海 Qinghai	74	阿青 5 号 ^B Aqing 5	四川 Sichuan	113	K57 ^B	云南 Yunnan	152	97-9-2 ^B	云南 Yunnan
36	昆仑 18 号 ^B Kunlun 18	青海 Qinghai	75	S-8 ^B	云南 Yunnan	114	K56 ^B	云南 Yunnan	153	97-9-1 ^B	云南 Yunnan
37	昆仑 17 号 ^B Kunlun 17	青海 Qinghai	76	S-73 ^B	云南 Yunnan	115	K54 ^B	云南 Yunnan	154	97-7-2 ^B	云南 Yunnan
38	昆仑 16 号 ^B Kunlun 16	青海 Qinghai	77	S-72 ^B	云南 Yunnan	116	K53 ^B	云南 Yunnan	155	97-7-1 ^B	云南 Yunnan
39	昆仑 164 ^B Kunlun 164	青海 Qinghai	78	S-71 ^B	云南 Yunnan	117	K52 ^B	云南 Yunnan			

A: 地方品种; B: 育成品种。
A: Landrace; B: Cultivars.

目。对 DNA 指纹数据进行数字化编码,将每个标记的等位变异片段按分子量从小到大的顺序用数字 1~9 表示,获得每个品种对应的指纹字符串,将对应的字符串导入在线条码生成器(<https://barcode.tec-it.com/zh/Code128>)中,生成条形码 DNA 身份证^[38]。

2 结果与分析

2.1 鉴定体系构建

2.1.1 核心引物筛选

选取 16 份植物学性状差异明显的青稞品种(表 2),利用 200 对 SSR 引物对从这些品种上提取到的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经毛细管电泳检测,对引物的扩增稳定性及多态性进行分析,初步筛选出 42 对条带清晰、稳定性好、多态性高的 SSR 引物。根据初选引物的扩增片段长度选取 6-FAM、ROX、TAMRA、HEX 中的一种荧光染料对其上游引物的 5'端进行标记,利用合成的荧光引物对 155 个品种进行扩增,扩增产物稀释后在 ABI 3730 基因分析仪上进行片段分析。

综合考虑峰型易读程度、扩增稳定性、等位变异丰富程度、染色体分布、多态性等因素,最终筛选出 21 对多态性高、峰型易读的 SSR 核心引物,它们在青稞的 7 条染色体上均有分布(图 1)。

2.1.2 等位变异位点校准

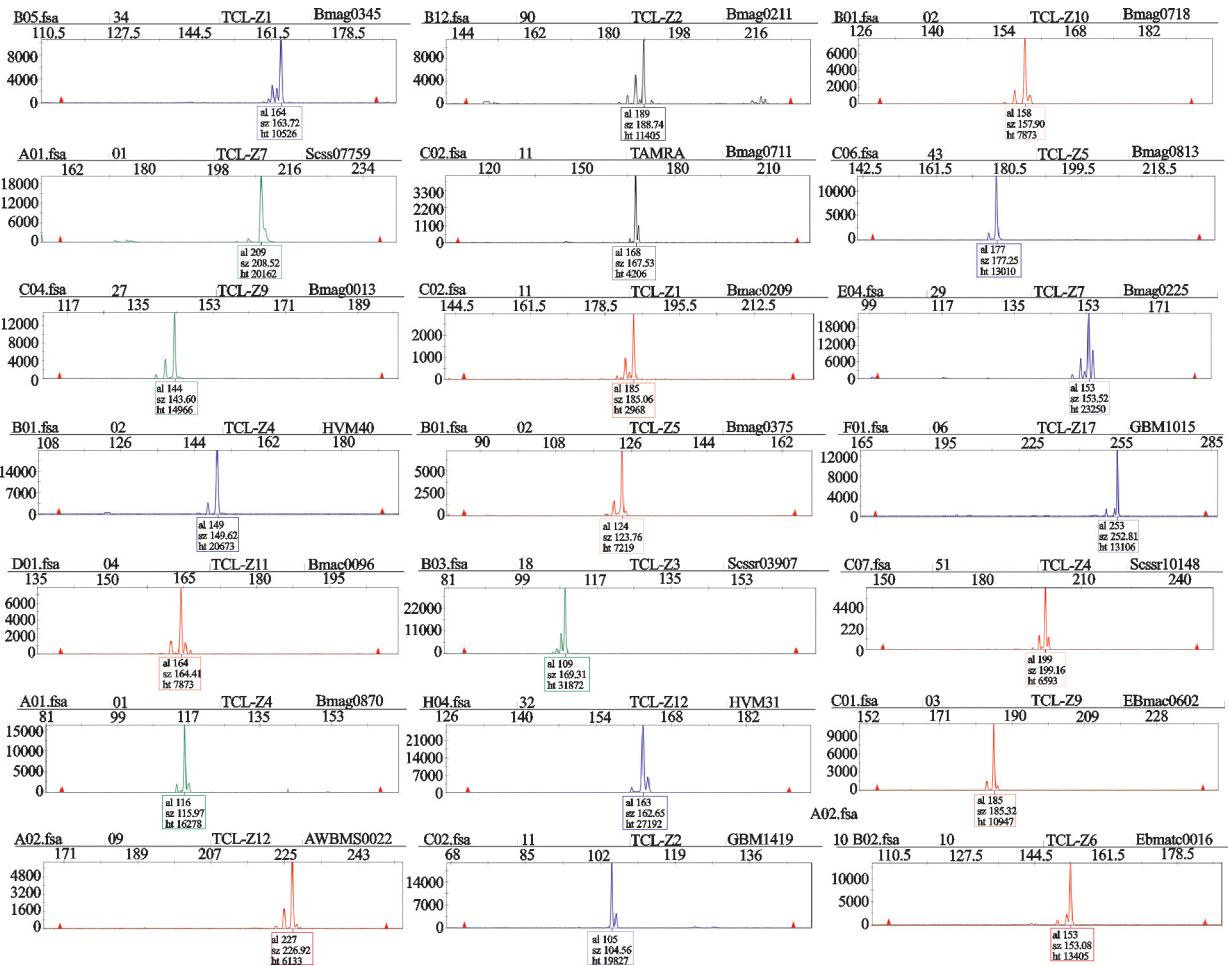
选择冬青 15 号、藏 83062、云青 2 号等 31 个品种(表 3)作为参照品种,分别在农业农村部植物新品种测试(杭州)分中心、农业农村部植物新品种测试(济南)分中心、农业农村部植物新品种测试(成都)分中心对这些品种、21 对 SSR 标记的指纹信息进行了毛细管荧光电泳检测平台验证。结果表明,PCR 扩增产物均具有清晰、稳定的主峰,且易识别;扩增片段大小可重现。

2.1.3 DNA 指纹数据库构建

采集 155 个青稞品种在 21 个 SSR 核心位点的指纹数据,构建青稞品种 DNA 指纹数据库。此外,为了提高检测效率和降低检测成本,根据荧光标记类型和扩增片段大小区间,将 21 对荧光引物进一步分为 10 组(表 4)。各组引物均可混合进行多重荧光毛细管电泳。

表 2 16 个代表性品种
Table 2 Information of 16 representative varieties

品种名称 Variety name	粒色 Grain color	棱型 Row type	穗蜡质 Spike waxiness	抽穗习性 Heading characteristics	小穗密度 Spikelet density	品种类型 Variety type
冬青 15 号 Dongqing 15	黄色 Yellow	六棱 Six-row	中 Middle	全抽 Whole heading	中 Middle	育成品种 Cultivar
昆仑 3 号 Kunlun 3	黄色 Yellow	四棱 Four-row	强 Strong	不抽 No heading	密 Dense	育成品种 Cultivar
北青 7 号 Beiqing 7	蓝色 Blue	四棱 Four-row	强 Strong	不抽 No heading	密 Dense	育成品种 Cultivar
康青 3 号 Kangqing 3	黄色 Yellow	四棱 Four-row	强 Strong	半抽 Half heading	密 Dense	育成品种 Cultivar
黑青稞 Heiqingke	紫色 Purple	四棱 Four-row	中 Middle	全抽 Whole heading	中 Middle	地方品种 Landrace
短白青稞 Duanbaiqingke	灰褐色 Taupe	四棱 Four-row	强 Strong	全抽 Whole heading	密 Dense	地方品种 Landrace
云青 3 号 Yunqing 3	紫色 Purple	六棱 Six-row	强 Strong	半抽 Half heading	中 Middle	育成品种 Cultivar
迪青 3 号 Diqing 3	紫色 Purple	四棱 Four-row	强 Strong	全抽 Whole heading	疏 Sparse	育成品种 Cultivar
藏 83062 Zang 83062	黄色 Yellow	六棱 Six-row	强 Strong	半抽 Half heading	密 Dense	育成品种 Cultivar
昆仑 12 号 Kunlun 12	黄色 Yellow	四棱 Four-row	强 Strong	半抽 Half heading	中 Middle	育成品种 Cultivar
富恒米大麦 Fuhengmidamai	蓝色 Blue	四棱 Four-row	强 Strong	半抽 Half heading	密 Dense	地方品种 Landrace
东旺白青稞 Dongwangbaiqingke	灰褐色 Taupe	六棱 Six-row	中 Middle	不抽 No heading	中 Middle	地方品种 Landrace
钩芒裸大麦 Goumangluodamai	黄色 Yellow	二棱 Two-row	中 Middle	全抽 Whole heading	中 Middle	地方品种 Landrace
尼西黑青稞 Nixiheiingke	黑色 Black	六棱 Six-row	中 Middle	不抽 No heading	密 Dense	地方品种 Landrace
迪青 4 号 Diqing 4	蓝色 Blue	四棱 Four-row	中 Middle	全抽 Whole heading	疏 Sparse	育成品种 Cultivar
云青 4 号 Yunqing 4	黄色 Yellow	二棱 Two-row	中 Middle	全抽 Whole heading	密 Dense	育成品种 Cultivar



每组峰图对应 1 对 SSR 引物在 1 个青稞品种中的扩增结果;横坐标(X 轴):片段大小(bp);纵坐标(Y 轴):荧光信号强度。
Each group of electropherograms corresponds to the amplification result of one pair of SSR primers in one hulless barley variety. X-axis: Fragment size(bp). Y-axis: Relative fluorescence intensity(RFU).

图 1 21 对核心引物的部分等位变异
Fig. 1 Partial allelic variations of 21 core primers

表 3 21 对核心引物及其等位变异的参照品种

Table 3 21 core primers and reference varieties for each allelic variation

编号 No.	引物名称 Primer name	染色体位置 Chromosomal position	退火温度 Annealing temperature/ ℃	引物序列 Primer sequence(5'→3')	参照品种(等位变异) Reference variety(allelic variation)
1	Bmag0345	1H	58	F:ATGAGGAATAACTCAACCAAA R:AATATATTTTCGATGTCGAGC	冬青 15 号(132 bp);迪青 4 号(134 bp);藏 83062(144 bp);昆 仑 164(146 bp);云青 4 号(164 bp);北青 1 号(166 bp) Dongqing 15(132 bp);Diqing 4(134 bp);Zang 83062(144 bp);Kunlun 164(146 bp);Yunqing 4(164 bp);Beiqing 1(166 bp)
2	Bmag0211	1H	58	F:ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC R:ACATCATGTCGATCAAAGC	K53(177 bp);云青 606(183 bp);迪青 4 号(185 bp);藏 83062 (187 bp);昆仑 1 号(189 bp);北青 1 号(191 bp);昆仑 8 号 (193 bp);冬青 15 号(195 bp) K53(177 bp);Yunqing 606(183 bp);Diqing 4(185 bp);Zang 83062(187 bp);Kunlun 1(189 bp);Beiqing 1(191 bp);Kun- lun 8(193 bp);Dongqing 15(195 bp)
3	Bmag0718	1H	55	F:ATCGTGACATCTCAAGAACA R:CCTGATACTGCCTAGCATTAG	镇康软壳青稞(150 bp);迪青 4 号(154 bp);昆仑 1 号(156 bp);藏 83062(158 bp);云青 4 号(160 bp);冬青 15 号(162 bp);昆仑 164(166 bp) Zhenkangruankeqingke(150 bp);Diqing 4(154 bp);Kunlun 1 (156 bp);Zang 83062(158 bp);Yunqing 4(160 bp);Dongqing 15(162 bp);Kunlun 164(166 bp)
4	Scssr07759	2H	60	F:GCAACTCCTCATCATCTCAGG R:CAACAGCCAGAAGGTCTACG	藏 83062(178 bp);云青 4 号(184 bp);尼西黑青稞(209 bp); 迪青 4 号(222 bp) Zang 83062(178 bp);Yunqing 4(184 bp);Nixiheiqingke(209 bp);Diqing 4(222 bp)
5	Bmag0711	2H	55	F:GGAGAGTCACATATCAAGGAC R:CCACTCCTTCTCATACCTTTA	S-11(152 bp);米麦 114(162 bp);迪青 4 号(166 bp);藏 83062(168 bp);S-18(178 bp);云青 4 号(180 bp);冬青 15 号 (182 bp);绿劝裸黑大麦(184 bp) S-11(152 bp);Mimai 114(162 bp);Diqing 4(166 bp);Zang 83062(168 bp);S-18(178 bp);Yunqing 4(180 bp);Dongqing 15(182 bp);Luquanluoheidamai(184 bp)

(续表 3 Continued table 3)

编号 No.	引物名称 Primer name	染色体位置 Chromosomal position	退火温度 Annealing temperature/ ℃	引物序列 Primer sequence(5'→3')	参照品种(等位变异) Reference variety(allelic variation)
6	Bmag0813	2H	55	F:ATGGGTCCATAGCAATAGATA R:GGAAGAATCACATCAAATAGG	云青 4 号(177 bp); 甘德拉青稞(185 bp); 冬青 15 号(187 bp); 尼西黑青稞(189 bp); 云青 606(191 bp); 黑白青稞(193 bp); 藏 83062(195 bp); 镇康软壳青稞(197 bp); 昆仑 164(199 bp); S-18(201 bp) Yunqing 4(177 bp); Gandelaqingke(185 bp); Dongqing 15(187 bp); Nixiheiqingke(189 bp); Yunqing 606(191 bp); Heibaiqingke(193 bp); Zang 83062(195 bp); Zhenkangruanqingke(197 bp); Kunlun 164(199 bp); S-18(201 bp)
7	Bmag0013	3H	58	F:AAGGGGAATCAAAATGGGAG R:TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	昆仑 1 号(142 bp); 洋大麦(144 bp); 云青 606(148 bp); S-4(150 bp); 迪青 4 号(156 bp); 云青 4 号(158 bp); S-2(162 bp); S-12(164 bp); 藏 83062(166 bp) Kunlun 1(142 bp); Yangdamai(144 bp); Yunqing 606(148 bp); S-4(150 bp); Diqing 4(156 bp); Yunqing 4(158 bp); S-2(162 bp); S-12(164 bp); Zang 83062(166 bp)
8	Bmac0209	3H	58	F:CTAGCAACTTCCCAACCGAC R:ATGCTGTGTGTGGACCAT	云青 4 号(175 bp); 迪青 4 号(181 bp); 云青 2 号(183 bp); 藏 83062(185 bp); 泔水米大麦(187 bp); 米麦 114(189 bp) Yunqing 4(175 bp); Diqing 4(181 bp); Yunqing 2(183 bp); Zang 83062(185 bp); Mangshuimidamai(187 bp); Mimai 114(189 bp)
9	Bmag0225	3H	55	F:AACACACCAAAAATATTACATCA R:CGAGTAGTTCCTATGTGAC	冬青 15 号(135 bp); K56(137 bp); 禄劝裸黑大麦(139 bp); 藏 83062(141 bp); S-12(143 bp); 云青 3 号(151 bp); 云青 4 号(153 bp); 钩芒裸大麦(161 bp) Dongqing 15(135 bp); K56(137 bp); Luquanluoheidamai(139 bp); Zang 83062(141 bp); S-12(143 bp); Yunqing 3(151 bp); Yunqing 4(153 bp); Goumangluodamai(161 bp)
10	HVM40	4H	55	F:CGATTCCCCTTTTCCAC R:ATTCTCCGCCGTCCACTC	云青 4 号(141 bp); 鲜裸大麦(143 bp); 藏 83062(149 bp); 洋大麦(151 bp); 北青 1 号(153 bp); 镇康软壳青稞(155 bp); 云青 606(159 bp); S-12(161 bp) Yunqing 4(141 bp); Xianluodamai(143 bp); Zang 83062(149 bp); Yangdamai(151 bp); Beiqing 1(153 bp); Zhenkangruanqingke(155 bp); Yunqing 606(159 bp); S-12(161 bp)
11	Bmag0375	4H	55	F:CCCTAGCCTTCCTTGAAG R:TTACTCAGCAATGGCACTAG	藏 83062(124 bp); 冬青 15 号(126 bp); 钩芒裸大麦(128 bp); 北青 88 繁 45(130 bp) Zang 83062(124 bp); Dongqing 15(126 bp); Goumangluodamai(128 bp); Beiqing 88 fan 45(130 bp)
12	GBM1015	4H	55	F:TTGTTGGAACATACAACATGC R:GTTCCGTGTGAATTAGCGGT	云青 2 号(184 bp); 尼西黑青稞(200 bp); 云青 4 号(229 bp); S-12(237 bp); 冬青 15 号(249 bp); 藏 83062(253 bp); S-4(257 bp) Yunqing 2(184 bp); Nixiheiqingke(200 bp); Yunqing 4(229 bp); S-12(237 bp); Dongqing 15(249 bp); Zang 83062(253 bp); S-4(257 bp)
13	Bmac0096	5H	58	F:GCTATGGCGTACTATGTATGGTTG R:TCACGATGAGGTATGATCAAAGA	鲜裸大麦(162 bp); 冬青 15 号(164 bp); K53(166 bp); 藏 83062(176 bp); 尼西黑青稞(178 bp); 昆仑 8 号(180 bp); 云青 4 号(186 bp) Xianluodamai(162 bp); Dongqing 15(164 bp); K53(166 bp); Zang 83062(176 bp); Nixiheiqingke(178 bp); Kunlun 8(180 bp); Yunqing 4(186 bp)
14	Scssr03907	5H	60	F:CTCCCATCACACCATCTGTC R:GACATGGTTCCCTTCTTCTTC	藏 83062(109 bp); 鲜裸大麦(111 bp); 尼西黑青稞(113 bp); 云青 4 号(125 bp); 冬青 15 号(127 bp); 迪青 3 号(129 bp); S-12(131 bp); S-18(139 bp) Zang83062(109 bp); Xianluodamai(111 bp); Nixiheiqingke(113 bp); Yunqing 4(125 bp); Dongqing 15(127 bp); Diqing 3(129 bp); S-12(131 bp); S-18(139 bp)
15	Scssr10148	5H	60	F:AAGCAGCAAAGCAAAGTACC R:TCATCAGCATCTGATCATCC	藏 83062(179 bp); 云青 4 号(189 bp); S-4(195 bp); S-18(199 bp); 禄劝裸黑大麦(207 bp); 迪青 4 号(209 bp); 洋大麦(213 bp) Zang 83062(179 bp); Yunqing 4(189 bp); S-4(195 bp); S-18(199 bp); Luquanluoheidamai(207 bp); Diqing 4(209 bp); Yangdamai(213 bp)
16	Bmag0870	6H	55	F:AACCATAGGATTGTACTAGTTTC R:TCATGACATCTCAAGAACG	迪青 4 号(116 bp); S-70(120 bp); 黑白青稞(122 bp); 藏 83062(124 bp); 米麦 114(126 bp); 甘德拉青稞(128 bp); S-12(130 bp) Diqing 4(116 bp); S-70(120 bp); Heibaiqingke(122 bp); Zang 83062(124 bp); Mimai 114(126 bp); Gandelaqingke(128 bp); S-12(130 bp)
17	HVM31	6H	58	F:CGGTTTCTGGTTGCTTG R:CGAAGGTCTCAGGCTTCATG	藏 83062(163 bp); 尼西黑青稞(165 bp) Zang 83062(163 bp); Nixiheiqingke(165 bp)
18	EBmac0602	6H	58	F:GATTGGAGCTTCGGATCAC R:CCGTCTAGGGAGAGGTTCTC	藏 83062(185 bp); 迪青 4 号(187 bp); 昆仑 8 号(189 bp); 云青 4 号(203 bp); 冬青 15 号(215 bp); S-2(217 bp); K56(219 bp) Zang 83062(185 bp); Diqing 4(187 bp); Kunlun 8(189 bp); Yunqing 4(203 bp); Dongqing 15(215 bp); S-2(217 bp); K56(219 bp)
19	AWBMS0022	7H	55	F:CCACTTCAAAGGCTTCCACA R:CCGGAGAGTTGCTAATCT	K56(185 bp); 尼西黑青稞(187 bp); 鲜裸大麦(217 bp); 冬青 15 号(221 bp); 藏 83062(227 bp) K56(185 bp); Nixiheiqingke(187 bp); Xianluodamai(217 bp); Dongqing 15(221 bp); Zang 83062(227 bp)
20	GBM1419	7H	58	F:CGTCACGCCACTCACCTC R:CTTGAAAGTCGGAACCCATGT	云青 4 号(95 bp); S-11(101 bp); 镇康软壳青稞(105 bp); 藏 83062(125 bp) Yunqing 4(95 bp); S-11(101 bp); Zhenkangruanqingke(105 bp); Zang 83062(125 bp)
21	EBmatc0016	7H	58	F:CCAACCAAGATAAATGTGCTTG R:ATCCTTATGCTCCTCGCTG	镇康软壳青稞(141 bp); 昆仑 8 号(143 bp); 冬青 15 号(147 bp); 迪青 4 号(153 bp) Zhenkangruanqingke(141 bp); Kunlun 8(143 bp); Dongqing 15(147 bp); Diqing 4(153 bp)

表 4 21 对核心引物分组

Table 4 Grouping of the 21 core primers labeled by fluorescence

组别 Group	FAM 标记引物 FAM labeled marker	ROX 标记引物 ROX labeled marker	HEX 标记引物 HEX labeled marker	TAMRA 标记引物 TAMRA labeled marker
1	GBM1419(95~125 bp)	EBmatc0016(140~153 bp)	HVM31(163~165 bp)	Bmag0211(177~195 bp)
2	HVM40(141~161 bp)	Bmag0870(116~130 bp)	Scssr10148(178~213 bp)	
3	GBM1015(184~257 bp)	Bmag0718(151~166 bp)	Scssr03907(109~139 bp)	
4	Bmag0813(177~201 bp)	Bmag0375(124~130 bp)	Bmag0013(142~166 bp)	
5	Bmag0345(132~166 bp)	AWBMS0022(185~227 bp)		
6	Bmag0225(135~161 bp)	EBmac0602(185~219 bp)		
7			Scssr07759(178~222 bp)	
8		Bmac0096(162~185 bp)		
9		Bmac0209(175~189 bp)		
10				Bmag0711(152~184 bp)

括号中的数值为片段大小区间。
The values in the parentheses are the size in tervals of fragments.

2.2 鉴定体系评价

2.2.1 多态性评价

利用 21 对核心引物在 155 个青稞品种中共检测到 137 个等位变异,单对引物的等位变异范围为 2~10 个,每对引物平均 6.52 个等位变异;多态性信息含量(PIC)值变化范围为 0.39~0.85,平均值为 0.68,20 个标记的 PIC 值大于 0.5,为高度多态性位点,占有引物的 95.24%;155 个青稞品种的香农信息指数范围为 0.68~2.11,平均值

为 1.50,引物表现出较高的香农信息指数。PIC 值和香农信息指数值最高的为引物 Bmag0813(表 5)。以上结果表明,核心引物的多态性较高,可以有效检测到青稞品种间的遗传多样性,适用于品种鉴定。155 个青稞品种的观测杂合度变化范围为 0.07~0.23,平均值为 0.15;期望杂合度变化范围为 0.48~0.86,平均值为 0.72。期望杂合度远高于观测杂合度,这与其以自交为主的繁殖方式相等。

表 5 21 对核心引物的重要遗传参数

Table 5 Genetic parameters of 21 core primers

引物 Primer	主要等位 基因频率 Major allele frequency	基因型数量 Number of genotypes	多态性信息含量 Polymorphism information content	等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	香农信息指数 Shannon's information index
Bmag0345	0.34	10	0.71	6	4.02	0.07	0.75	1.50
Bmag0211	0.45	14	0.63	8	3.08	0.16	0.68	1.37
Bmag0718	0.34	17	0.73	7	4.31	0.17	0.77	1.63
Scssr07759	0.43	7	0.58	4	2.90	0.14	0.66	1.12
Bmag0813	0.20	27	0.85	10	7.36	0.19	0.86	2.11
Bmag0711	0.40	20	0.70	8	3.88	0.15	0.74	1.60
Bmag0013	0.29	26	0.82	9	6.02	0.21	0.83	1.96
Bmac0209	0.49	16	0.66	6	3.31	0.14	0.70	1.45
Bmag0225	0.43	20	0.69	9	3.64	0.18	0.73	1.58
HVM40	0.31	26	0.79	8	5.45	0.23	0.82	1.85
Bmag0375	0.56	9	0.52	4	2.43	0.13	0.59	1.03
GBM1015	0.24	19	0.79	7	5.45	0.13	0.82	1.77
Bmac0096	0.55	16	0.61	7	2.83	0.14	0.65	1.37
Scssr03907	0.38	18	0.73	8	4.19	0.11	0.76	1.64
Scssr10148	0.30	15	0.76	7	4.73	0.16	0.79	1.69
Bmag0870	0.25	17	0.81	7	5.77	0.16	0.83	1.84
HVM31	0.58	3	0.39	2	1.93	0.07	0.48	0.68
EBmac0602	0.47	14	0.55	7	2.61	0.12	0.62	1.17
AWBMS0022	0.37	14	0.71	5	3.95	0.16	0.75	1.48
GBM1419	0.38	10	0.62	4	3.16	0.16	0.68	1.25
EBmatc0016	0.34	9	0.68	4	3.71	0.14	0.73	1.35
合计 Total	\	327	\	137	84.73	\	\	
均值 Mean	0.39	15.57	0.68	6.52	4.03	0.15	0.72	1.50

2.2.2 引物鉴别效率评价

使用155个青稞品种的等位变异数据评价核心引物的鉴别效率,结果表明,155个品种中随机抽取2个品种可形成11 935个组合,0个差异位点的品种组合数为1对,区分率为99.991%;差异位点数 ≤ 1 的品种组合数为3对,区分率为99.974%;差异位点数 ≤ 2 的品种组合有5对,区分率为99.958%。对155个品种的差异位点进行统计发现,差异位点数从小到大对应的组合数基本符合正态分布(图2),值得注意的是,0、1差异位点涉及品种为97-9-2、97-9-1和97-7-2,这3个品种均来源于云南地区,为相同对父母本培育而成的品种,说明通过21对SSR引物可以有效鉴别155个青稞品种。

2.3 群体结构和遗传分化分析

2.3.1 遗传距离和系统发育树分析

基于品种间Nei's遗传距离,使用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,结果表明,155个青稞品种间遗传距离范围为0.047 6~1,平均值为0.72;154个青稞品种可划分为3个类群(图3),类群I共计74个青稞品种,包含63个云南育成品种、9个云南地方品种、1个青海育成品种和1个西藏育成品种;类群II共计38个青稞品种,包含23个云南地方品种、14个云南育成品种和1个青海育成品种;类群III共计42个青稞品种,15个青海育成品种、12个云南育成品种、11个云南地方品种、3个四川育成品种和1个西藏育成品种;品种S-2单独构成1个外群分支。

2.3.2 群体结构分析和主成分分析

使用Structure 2.3.4软件进一步分析群体分布特征,结果表明,在 K 取值范围内(1~10), $\ln P(K)$ 的值随着 K 值的增加而增加,没有最大值,无法确定最佳亚群数(图4A)。根据Evanno等^[39]的方法确定最佳分类值,当 ΔK 值随着 K 值变化,出现明显峰值时可将其确定为最佳分类数(图4B)。当 $K=3$ 时,可将155个青稞品种分为3个亚群(图4C),与基于Nei's遗传距离的UPGMA聚类分析结果具有一致性。群体结构分析中的 Q 值用于量化品种的遗传结构成分,反映其归属于不同预设亚群的概率。由群体结构图(图4C)可以看出,亚群I中, Q 值 ≥ 0.8 的品种共计32个,占该类群的46%;亚群II中, Q 值 ≥ 0.8 的品种共计20个,占该类群的43%;亚群III中, Q 值 ≥ 0.8 的品种共计19个,占该类群的48%。 Q 值 ≥ 0.8 的品种共71个,占45.81%,说明这些品种遗传结构相对单一;其余81个品种 Q 值 < 0.8 ,占54.19%,说明其遗传组分混合程度较高。

对155个青稞品种进行主成分分析,结果表明,第一主成分解释了总遗传变异的19.1%,第二主成分解释了9.9%,前两大主成分累计解释率为29.0%,表明供试青稞品种在遗传结构上存在一定程度的分化。155个青稞品种可分为3类,类群I主要集中在第一主成分的负向区域和第二主成分的正负区间,呈现连续分布的特征,说明该类群内品种遗传背景较为相似且存在一定程度的遗传渐变。类群II明显聚集在第一主成分的正

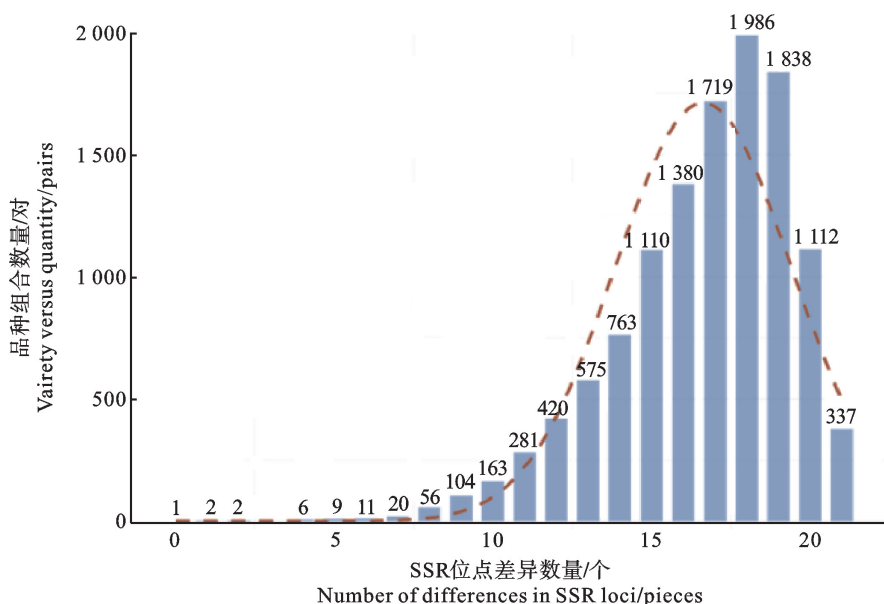


图2 品种间差异位点数统计

Fig. 2 Number of difference alleles between varieties

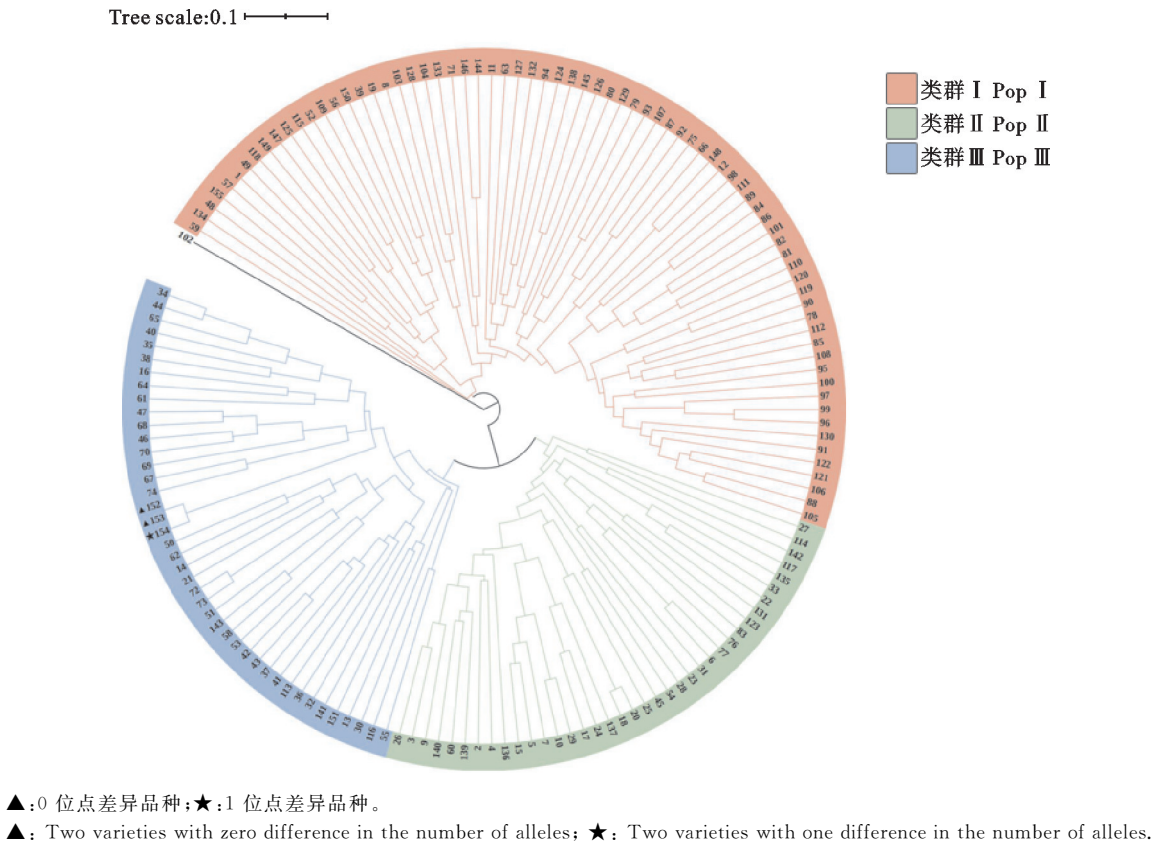


图 3 基于 Nei's 遗传距离的 155 个青稞品种聚类图

Fig. 3 Cluster of 155 hulless barley varieties based on Nei's genetic distance of 21 core primers

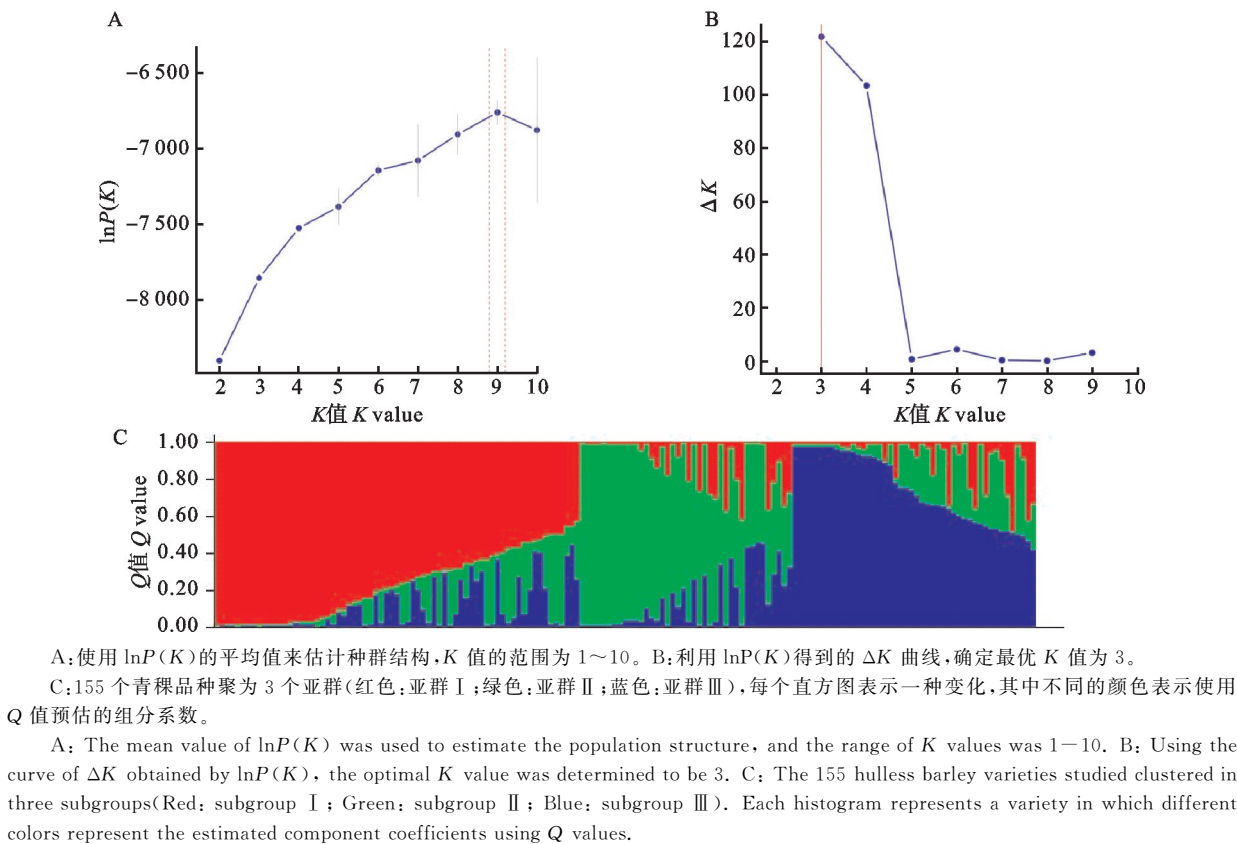


图 4 基于 21 对核心引物的 155 个青稞品种种群结构分析

Fig. 4 Population structure analysis of 155 hulless barley varieties based on 21 core primers

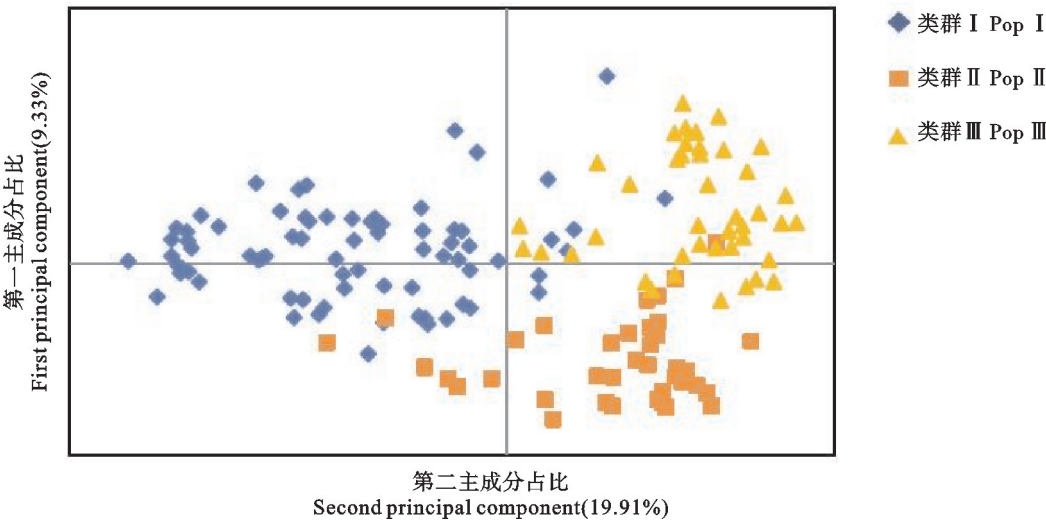


图 5 基于 21 对核心引物的 155 个青稞品种主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis of 155 hulless barley varieties based on 21 core primers

向区域和第二主成分的负向区域,形成独立的聚类簇,体现出该类群内品种具有较高的遗传一致性。类群Ⅲ(黄色三角形)主要分布在第一主成分的正向区域和第二主成分的正向区域,与类群Ⅱ在第一主成分维度上有部分重叠,但在第二主成分维度上可区分,显示出与类群Ⅱ存在一定遗传关联但又具有独特遗传组分。主成分分析结果与群体结构分析结论具有一致性。

2.3.3 群体间的遗传分化

进一步对群体间的遗传分化程度进行分析。结果显示,19%的变异来自于群体间,62%的变异来自类群内品种间,19%的变异来自品种内,类群

内品种间的遗传变异大于类群间的遗传变异(表 6)。这说明类群内品种之间遗传背景较宽,这与群体结构分析表明青稞品种亚群间的基因交流明显、遗传组分混合程度较高的结果具有一致性。群体间遗传分化的程度可以通过遗传分化指数(F_{st})来判定^[40],当 $0 \leq F_{st} < 0.05$ 时,表示遗传分化水平极低;当 $0.05 \leq F_{st} < 0.15$ 时,表明遗传分化处于中等水平;当 $0.15 \leq F_{st} < 0.25$ 时,表示遗传分化较大;当 $F_{st} \geq 0.25$ 时,表示群体间有很大的遗传分化。本研究中 3 个类群(I-II、II-III和I-III)之间的 F_{st} 值分别为 0.110、0.103 和 0.133,均属于中等程度遗传分化。

表 6 基于 21 对核心引物的 155 个青稞品种分子方差分析

Table 6 Analysis of molecular variance(AMOVA) of 155 hulless barley varieties based on 21 core primers

变异来源 Source	自由度 Df	平方和 SS	均方 MS	估计方差 Estimated variance	变异比例 Variance rate/%
群体间 Among populations	2	330.020	165.010	1.556	19%
品种间 Among varieties	152	1 795.655	11.814	5.137	62%
品种内 Within varieties	155	238.500	1.539	1.539	19%
总计 Total	309	2 364.174	—	8.233	100%

2.3.4 品种分子身份证的构建

基于 21 对 SSR 引物的 DNA 指纹检测数据,构建青稞品种分子身份证。先将各引物的等位变异按分子量从小到大排序,进行数字化编码;因品种存在杂合与纯合位点,最终形成 42 位 SSR 分子标记指纹码,确保每个品种获得唯一标识。如迪青 4 号的分子身份证为 223322441133662288771144445566223322554444(图 6)。不同标记的

基因型组合可有效区分品种,等位变异越丰富,品种间差异越显著。将 155 个青稞品种的指纹码导入条码生成器,生成对应条形码分子身份证,实现品种分子差异的直观、快速鉴别。



图 6 迪青 4 号的条形码 DNA 分子身份证
Fig. 6 DNA ID code of Diqing 4

3 讨论

3.1 SSR 标记在品种鉴定中的应用

目前,分子标记在品种鉴定方面有明显的优势,在辅助 DUS 测试近似品种筛选、司法鉴定、品种管理等方面已有大量应用实践^[41]。PIC 值是指在连锁分析中一个基因标记多态性所能提供的信息量的衡量指标。本研究所筛选的 21 对核心引物 PIC 值平均为 0.68,20 对核心引物的 PIC 值均高于 0.5,为高度多态性引物。此 PIC 均值远高于原红军等^[16](0.179)、Xu 等^[42](0.157)和 Guo 等^[43](0.3)的结果,高于巴桑珍玉等^[44]的结果(0.489),略高于张元元等^[3]、王国平等^[17]得到的 PIC 均值(0.6 和 0.612),说明本研究选取的 SSR 标记能较好地反映青稞品种的遗传多样性,用于青稞的品种鉴定具有一定的可靠性。在标记分布方面,本研究中的 21 对 SSR 引物在 7 条青稞染色体上分布均匀,每条染色体均分布有 3 对引物。相较于前人研究中未关注的情况,标记的均匀分布有利于提高品种鉴定的全面性。前人研究中对于 SSR 分子标记的使用多偏向于遗传多样性和种群结构的分析,未对品种鉴别效率进行分析。本研究中,21 对核心引物可区分 155 个品种中的 153 个品种,区分率为 99.991%,满足《植物品种鉴定 DNA 分子标记法总则》中对于核心引物能区分 95%以上品种的要求,说明本研究构建的品种鉴定体系在实际应用中的高效性。在植物新品种侵权的认定中,品种鉴定结论包括分子鉴定结果和田间测试鉴定结论,田间测试鉴定结论常作为最终判定标准^[45]。因此,在利用分子标记技术进行品种鉴定时,0 差异位点的品种,不能仅依据分子标记结果就判定品种相同,而需进一步结合田间测试鉴定进行精准鉴定。

在品种鉴定研究领域,参照品种、多重荧光毛细管电泳分组以及 DNA 指纹数据库的构建,对于提升鉴定的准确性、效率和便捷性具有重要意义。近年来,相关研究不断深入,为品种鉴定提供了更为完善的技术体系^[20-22]。本研究中选择云青 4 号、迪青 4 号、昆仑 8 号等品种作为参照品种并开展多机构验证,一方面可避免因仪器型号或批次不同可能造成的系统误差,确定了不同标记可稳定检测到的标准变异片段大小;另一方面,可对需基于本研究鉴定体系开展青稞品种鉴定工作的研究人员提供参考。此外,本研究还整理了 21 对

核心引物的多重荧光毛细管电泳分组,可有效提高效率、降低成本;基于荧光毛细管电泳获得等位变异片段大小,构建 155 个青稞品种 DNA 指纹数据库,可直观、便捷和高效地用于青稞品种鉴定比对。

3.2 青稞遗传多样性和群体结构

对青稞品种资源遗传多样性、遗传背景和遗传结构的分析研究,可为青稞品种选育、种质创新和品种鉴定提供理论依据,对于促进青稞育种水平的提高具有重要意义^[46]。施永泰等^[47]研究指出,得到较为可靠的信息,多态性位点数应达到或超过 70 个。本研究筛选的 21 对核心引物在 155 个青稞品种中共检测到 137 个等位变异位点,约为 70 个位点的 2 倍,表明本研究得到的遗传多样性结果可靠性较高。从 Shannon's 多样性指数来看,不同位点的平均 Shannon's 多样性指数为 1.50,高于张元元等^[3](0.65)、原红军等^[16](0.34)、吴昆仑等^[15](0.45)、尚毅等^[48](0.85)和李赢等^[49](1.22)的结果,说明本研究选取的 SSR 引物能较好地反映青稞品种的遗传多样性水平。此外,本研究选取的青稞品种为来自云南、青海、四川、西藏的地方品种和育成品种,这可能是本研究中青稞品种遗传多样性丰富的原因。

本研究聚类分析、群体结构分析和主成分分析结果均将 155 个青稞品种划分为 3 个类群,同来源的青稞品种并不完全聚为一类,但具有一定的聚集性,这与王国平等^[17]和 Hu 等^[19]的研究结果高度一致。群体结构分析显示, Q 值 ≥ 0.8 的品种有 71 个,占比 54%,与 Hu 等^[19]利用 18 个 SSR 标记对 63 个青稞品种 Q 值分析中 Q 值 ≥ 0.8 占比 52.38%的结果基本一致。不同亚群间种群结构里遗传组分较为单一的品种占比均超 40%,表明本研究所选青稞品种遗传多样性丰富,且大部分品种遗传背景较简单。依据 Hu 等^[19]研究,聚类分析、群体结构分析和主成分分析结果可作为青稞育种亲本选择参考,优先选用远缘品种和遗传结构简单的品种,能获得遗传差异丰富的后代材料。因此,本研究对青稞品种的遗传多样性分析结果,对于青稞育种亲本材料选择、避免盲目组配、节约育种时间、加快育种进程以及获得有可预见性优势的品种具有重要参考意义。

4 结论

本研究筛选出 21 对核心引物,建立了基于荧

光毛细管电泳平台的青稞品种分子鉴定体系,构建了包括155份青稞品种的DNA指纹图谱库。该体系鉴别效率达99.991%,满足《植物品种鉴定DNA分子标记法总则》品种鉴定要求可用于青稞品种真实性鉴定、辅助筛选DUS测试近似品种和新品种权保护等。遗传多样性分析说明品种间遗传多样性丰富,聚类、群体结构及主成分分析均将155份青稞品种划分为3个类群,类群间呈中等遗传分化($F_{st}=0.103\sim0.133$),62%变异来自类群内品种间,45%品种遗传背景简单,分析结果可为青稞育种亲本选择提供参考。

参考文献:

- [1] RUSSELL J, MASCHER M, DAWSON I K, *et al.* Exome sequencing of geographically diverse barley landraces and wild relatives gives insights into environmental adaptation [J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(9): 1024.
- [2] TAKETA S, AMANO S, TSUJINO Y, *et al.* Barley grain with adhering hulls is controlled by an *ERF* family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(10): 4062.
- [3] 张元元, 冯举伶, 肖婧凤, 等. 青稞遗传多样性及其农艺性状与SSR标记的关联分析[J]. 浙江农业学报, 2024, 36(9): 1977.
- [3] ZHANG Y Y, FENG J L, XIAO J F, *et al.* Genetic diversity of highland barley and correlation analysis between agronomic traits and SSR markers [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2024, 36(9): 1977.
- [4] 陈同睿, 王蕾, 王寒冬, 等. 利用SNP标记鉴定青稞种质资源[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(1): 65.
- [4] CHEN T R, WANG L, WANG H D, *et al.* Identification of the naked barley germplasms using SNP markers [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(1): 65.
- [5] AN L K, WANG Z A, CUI Y M, *et al.* Comparative analysis of hulless barley transcriptomes to regulatory effects of phosphorous deficiency [J]. *Life*, 2024, 14(7): 904.
- [6] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(7): 215.
- [7] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(10): 4127.
- [8] 唐浩, 余汉勇, 张新明, 等. 水稻新品种测试的标准品种DNA指纹图谱多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(1): 100.
- [8] TANG H, YU H Y, ZHANG X M, *et al.* Analysis on the diversity of DNA fingerprinting of the example varieties used for the test of rice new varieties [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(1): 100.
- [9] 王风格, 杨扬, 易红梅, 等. 中国玉米审定品种标准SSR指纹库的构建[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1): 1.
- [9] WANG F G, YANG Y, YI H M, *et al.* Construction of an SSR-based standard fingerprint database for corn variety authorized in China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(1): 1.
- [10] 吴玉珍, 黄龙雨, 周大云, 等. 中国棉花审定品种SSR指纹库的构建与综合评价[J]. 中国农业科学, 2024, 57(8): 1430.
- [10] WU Y Z, HUANG L Y, ZHOU D Y, *et al.* Construction of SSR fingerprint library and comprehensive evaluation for improved cotton varieties in China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2024, 57(8): 1430.
- [11] 齐广勋, 王英男, 袁翠平, 等. 基于SSR标记的不同地理生态型野生大豆遗传多样性分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(3): 334.
- [11] QI G X, WANG Y N, YUAN C P, *et al.* Genetic diversity analysis of wild soybean (*Glycine soja*) populations with different geographical ecotypes based on SSR markers [J]. *Soybean Science*, 2021, 40(3): 334.
- [12] 曾乐, 杨天赐, 姚佳延, 等. 不同大麦品种特异性SSR分子标记的筛选[J]. 麦类作物学报, 2021, 41(1): 20.
- [12] ZENG L, YANG T C, YAO J Y, *et al.* Screening of SSR molecular markers of barley variety distinctness [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2021, 41(1): 20.
- [13] DIDO A A, KRISHNA M S R, ASSEFA E, *et al.* Genetic diversity, population structure and relationship of Ethiopian barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces as revealed by SSR markers [J]. *Journal of Genetics*, 2022, 101(1): 9.
- [14] SHIRVANI H, MEHRABI A A, FARSHADFAR M, *et al.* Comparative analysis of genetic diversity and population structure of wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. spontaneum) in Western Iran using SSR and EST-SSR markers [J]. *Plant Biosystems-an International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 2025, 159(4): 695.
- [15] 吴昆伦. 青稞种质资源的SSR标记遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报, 2011, 31(6): 1030.
- [15] WU K L. Genetic diversity analysis of hulless barley germplasm by SSR markers [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2011, 31(6): 1030.
- [16] 原红军, 曾兴权, 徐其君, 等. 青稞种质资源遗传多样性分析与核心种质群体的构建[J]. 麦类作物学报, 2018, 38(8): 922.
- [16] YUAN H J, ZENG X Q, XU Q J, *et al.* Genetic diversity of germplasm resource and core collection development in hulless barley [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(8): 922.
- [17] 王国平, 胡再青, 徐冬丽, 等. 青稞遗传多样性及其农艺性状与SSR标记的关联分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(1): 1.
- [17] WANG G P, HU Z Q, XU D L, *et al.* Genetic diversity and association analysis of agronomic traits with SSR markers in hulless barley [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2023, 38(1): 1.
- [18] QUZHEN N M, NAMGYAL L, DONDRUP D, *et al.* Abundant genetic diversity harbored by traditional naked barley varieties on Tibetan Plateau: Implications in their effective conservation and utilization [J]. *Biology*, 2024, 13(12): 1018.
- [19] HU Q, YAO Y H, CUI Y M, *et al.* Genetic diversity analysis and DNA fingerprinting of primary Qingke (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f.) cultivars [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2025, 72(2): 1803.
- [20] 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.
- [20] 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.
- [21] 陈琼, 王兰芬, 唐浩, 等. 普通菜豆SSR分子标记鉴定体系的建立及应用[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(6): 1494.
- [21] CHEN Q, WANG L F, TANG H, *et al.* Establishment and application of SSR molecular marker identification system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(6): 1494.

- [22] 苏国钊, 李媛媛, 刘中华, 等. 苦瓜品种 SSR 分子标记鉴定技术体系构建与应用[J]. 中国农业科学, 2024, 57(11): 2227.
- SU G Z, LI Y Y, LIU Z H, *et al.* Construction and application of SSR marker identification system for bitter melon varieties [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2024, 57(11): 2227.
- [23] 中华人民共和国农业农村部. NY/T 2594-2016 植物品种鉴定 DNA 分子标记法 总则[S]. <http://www.transl.cn/translation/show.php?itemid=22941>. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. NY/T 2594-2016 Identification of Varieties by DNA Molecular Markers General Principles [S]. <http://www.transl.cn/translation/show.php?itemid=22941>.
- [24] 崔立操. 栽培和野生大麦群体结构及大麦 MAPK 级联途径相关基因家族的鉴定研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- CUI L C. Comparison of the population genetic structure between cultivated and wild barley and identification of its MAPK cascade-related gene families [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018.
- [25] 张帅. 彩色青稞的功能成分分析及粒色基因的分子标记[D]. 西宁: 青海大学, 2017.
- ZHANG S. Function component is analyzed and color gene molecular of the seed is marked in different grain color of hulless barleys [D]. Xining: Qinghai University, 2017.
- [26] 李珍. 大麦矮秆及产量性状的 QTL 定位分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- LI Z. QTL mapping analysis of barley height and yield traits [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- [27] 袁金娥. 中国近缘野生大麦和栽培青稞的耐盐性鉴定及其与 SSR 标记的关联分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- YUAN J E. Evaluation of salt tolerance and their association analysis with SSR markers in barley wild relatives and cultivated Qingke (hulless barley) of China [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [28] LIU Z W, BIYASHEV R M, SAGHAI MAROOF M A S. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(5): 869.
- [29] FENG Z Y, ZHANG L L, ZHANG Y Z, *et al.* Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2006, 29(2): 330.
- [30] 田海宁, 杨菁, 何桂芳. 青海省栽培青稞 SSR 标记遗传多样性研究(英文) [J]. 安徽农业科学, 2011, 12(1): 70.
- TIAN H N, YANG J, HE G F. Genetic diversity of SSR markers in cultivated *Hordeum vulgare* L. in Qinghai Province [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 12(1): 70.
- [31] JO W S, KIM H Y, KIM K M. Development and characterization of polymorphic EST based SSR markers in barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *3 Biotech*, 2017, 7(4): 265.
- [32] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1): 8.
- [33] LIU K J, MUSE S V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2128.
- [34] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: An update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537.
- [35] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022.
- [36] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(1): 127.
- [37] FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 574.
- [38] 冯艳芳, 马莹雪, 李媛媛, 等. 大麦申请保护品种 DNA 指纹图谱构建[J]. 分子植物育种, 2023, 21(14): 4685.
- FENG Y F, MA Y X, LI A A, *et al.* DNA fingerprint construction of the barley variety for protection [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(14): 4685.
- [39] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611.
- [40] WRIGHT S. The genetical structure of populations [J]. *Annals of Eugenics*, 1949, 15(1): 323.
- [41] 王凤格, 田红丽, 易红梅, 等. 植物品种 DNA 指纹鉴定原理及其鉴定方案[J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4756.
- WANG F G, TIAN H L, YI H M, *et al.* Principle and scheme of DNA fingerprint identification of plant varieties [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(14): 4756.
- [42] XU Q J, ZENG X Q, LIN B, *et al.* A microsatellite diversity analysis and the development of core-set germplasm in a large hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) collection [J]. *BMC Genetics*, 2017, 18(1): 102.
- [43] GUO T L, HORVATH C, CHEN L, *et al.* Understanding the nutrient composition and nutritional functions of highland barley (Qingke): A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 103: 109.
- [44] 巴桑玉珍, 刘新春, 付国勇, 等. 青藏高原青稞耐寒种质资源基于 SSR 标记的遗传多样性及群体结构分析[J]. 麦类作物学报, 2017, 37(1): 40.
- BASANG Y Z, LIU X C, FU G Y, *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of hulless barley with cold tolerance from the Qinghai-Tibetan Plateau revealed by SSR markers [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37(1): 40.
- [45] 李菊丹. 植物新品种侵权诉讼的证明责任分配[J]. 知识产权, 2023(4): 45.
- Li J D. The allocation of burden of proof in litigation for infringement of the breeder's right [J]. *Intellectual Property*, 2023(4): 45.
- [46] CHEN Z W, GUO Z Z, LI L L, *et al.* Genetic diversity and genome-wide association analysis of the hulled/naked trait in a barley collection from Shanghai agricultural gene bank [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(10): 5217.
- [47] 施永泰, 边红武, 韩凝, 等. 中国江、浙地区栽培大麦遗传资源的 RAPD 研究[J]. 作物学报, 2004, 30(3): 258.
- SHI Y T, BIAN H W, HAN N, *et al.* Genetic variation analysis by RAPD of some barley cultivars in China [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(3): 258.
- [48] 尚毅, 华为, 朱靖环, 等. 浙江省裸大麦地方品种遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(7): 922.
- SHANG Y, HUA W, ZHU J H, *et al.* Genetic diversity of hulless barley landraces in Zhejiang [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2014, 34(7): 922.
- [49] 李赢, 刘海翠, 石吕, 等. 江苏裸大麦种质资源遗传多样性和群体结构分析[J]. 作物学报, 2023, 49(10): 2687.
- LI Y, LIU H C, SHI L, *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of naked barley germplasm resources in Jiangsu Province [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(10): 2687.