

· 研究报告 ·



糜子EST-SSR分子标记的开发及种质资源遗传多样性分析

何杰丽^{1†}, 石甜甜^{2†}, 陈凌³, 王海岗³, 高志军⁴, 杨美红¹, 王瑞云^{2,3*}, 乔治军^{3*}

¹山西农业大学文理学院, 太谷 030801; ²山西农业大学农学院, 太谷 030801; ³山西省农业科学院农作物品种资源研究所/农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室/杂粮种质资源发掘与遗传改良山西省重点实验室, 太原 030031

⁴鄂尔多斯市农牧业科学研究院, 鄂尔多斯 017200

摘要 基于前期高通量测序结果设计EST-SSR引物, 用于评估国内外不同生态区144份糜子(*Panicum miliaceum*)种质资源的遗传差异。结果表明, 200对引物中80对呈多态性, 开发效率为40%; 引物分辨率(Rp)为0.67–4.67 (平均值为2.00), 扩增产物大小为50–500 bp。144份材料在80个位点共检测到206个等位变异, 每个位点为2–3个; 多样性指数(I)为0.659 3 (RYW108)–1.087 2 (RYW124), 平均为0.859 9; 多态性信息含量(PIC)为0.222 9 (RYW98)–0.717 2 (RYW124), 平均为0.457 3。基于UPGMA将144份资源划分为3个群组, 其中2个群组主要为北方春糜子区材料, 另一个群组主要为黄土高原春夏糜子区材料。基于Structure (K=4)将材料划分为4个类群, 即2个代表北方资源基因库以及代表黄土高原和国外资源基因库各1个。基于主成分分析将材料聚为7个类群, 划分结果与材料的地理来源一致。

关键词 糜子, 遗传多样性, 主成分分析, SSR标记

何杰丽, 石甜甜, 陈凌, 王海岗, 高志军, 杨美红, 王瑞云, 乔治军 (2019). 糜子EST-SSR分子标记的开发及种质资源遗传多样性分析. 植物学报 54, 723–732.

糜子又称黍稷、糜黍, 起源于中国, 有10 000多年的驯化栽培史(Lu et al., 2009), 是我国北方旱作可持续农业的主栽作物, 目前全国年种植面积约 $5.33 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 主要分布在华北、西北和东北的干旱半干旱地区(国家谷子糜子产业技术体系, 2018)。作为C₄植物, 糜子抗旱、耐贫瘠, 蒸腾速率低, 即使在年均降雨量小于500 mm、沙质和微酸性土壤等恶劣生境(如印度、撒哈拉以南和西非)中也能正常生长(Changmei and Dorothy, 2014)。全球糜子种质有20 000余份, 中国有9 885份。厘清糜子种质遗传背景是合理高效利用资源的前提。Wang等(2016)和Habiyaemye等(2017)从栽培历史、种植面积、饮食文化、营养保健功能、生物和非生物胁迫耐性以及遗传多样性等方面综述了中国和美国糜子的栽培概况与遗传特性。王瑞云(2017)在其专著《糜子遗传多样性

及进化研究进展》中概括了SSR标记的开发及连锁图谱构建、遗传多样性分析、驯化和传播等。Wang等(2018)阐明了糯性糜子的分子调控机制。

SSR标记多态性高、重现性好, 是分析作物遗传多样性的有效分子工具(郭琪等, 2015; 朱宇佳等, 2018)。Hu等(2009)利用种间SSR标记评价了中国糜子的遗传差异。Rajput和Santra (2016)用983个来自柳枝稷(*Panicum virgatum*)等物种的SSR在糜子中进行扩增, 发现只有46个标记可产生清晰的多态性条带, 表明种间标记通用性低。自从Cho等(2010)构建糜子特异性SSR标记以来, 越来越多的微卫星标记相继被发掘并用于阐明资源的遗传背景。由于糜子的基因组复杂(减数分裂过程不一致、等位和非等位基因组合、基因型和表型间相关性小), 用有限的分子标记难以覆盖全基因组(Saha et al., 2016), 导致其基因组研

收稿日期: 2019-02-24; 接受日期: 2019-06-18

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-06-13.5-A16)、国家自然科学基金(No.31271791)、山西省回国留学人员科研资助项目(No.2016-066)和山西省重点研发计划(No.201803D221008-5)

† 共同第一作者。

* 通讯作者。E-mail: wry925@126.com; nkypzs@126.com

究进程缓慢。因此,王银月等(2014)和刘笑瑜(2017)基于RNA-Seq分别开发了116和85个SSR标记,开发效率分别为9.59%和56.29%。Liu等(2016)、连帅等(2016)、王瑞云等(2017a, 2017b)和薛延桃等(2018)利用上述SSR分别评估了88、192、132、96和146份国内外糜子资源,但因开发的标记数目较少,不足以评估全球2万余份糜子材料。本研究基于转录组测序构建了80个EST-SSR分子标记,并用其评价144份国内外糜子资源的遗传差异,旨在为环境友好型种质筛选鉴定和优异基因挖掘克隆提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验材料为144份糜子(*Panicum miliaceum* L.)资源,来源于国家种质资源库(国内95份,国外31份)和本实验室收集的农家种18份(附表1),分布于国内和国外的6个糜子生态栽培区(表1)。

表1 国内各生态区和国外糜子资源的分布
Table 1 Distribution of common millet accessions in different ecotopes of China and abroad

Ecotope/abroad	Origin	Number of accession	Total
Northwest spring and summer-sowing ecotope (NWSS)	Xinjiang	4	4
Northern spring-sowing ecotope (NSP)	Qinghai	13	48
	Gansu	11	
	Inner Mongolia	14	
Loess Plateau spring and summer-sowing ecotope (LPSS)	Shanxi	10	37
	Shanxi	18	
	Shaanxi	8	
	Ningxia	11	
Northeast spring-sowing ecotope (NES)	Heilongjiang	5	9
	Jilin	3	
	Liaoning	1	
Northern summer-sowing ecotope (NSU)	Hebei	9	13
	Shandong	2	
	Anhui	1	
	Henan	1	
Southern autumn and winter-sowing ecotope (SAW)	Hainan	2	2
Abroad	Former Soviet Union	2	31
	Poland	2	
	India	27	
Total			144

1.2 基因组DNA提取和SSR标记构建

144份糜子资源种植于山西农业大学农作站,种植方法同王瑞云等(2017b)所述方法。采用改良的CTAB法(Murray and Thompson, 1980)提取三叶期叶片的基因组DNA,检测质量并稀释至浓度30–80 ng·μL⁻¹。

从高通量测序获得的42 240个Unigene中筛选出2 301个EST,利用Primer 5设计200对EST-SSR引物,检测地理来源差异较大的6份糜子材料(表2)的多态性,发现80对引物(附表2,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)的扩增产物条带清晰、具多态性,可用于分析144份糜子资源的遗传多样性。

表2 糜子SSR引物筛选
Table 2 Screening of SSR primers for common millet

Number	Unicode	Accession name	Origin
1	00000177	Hongmizi	Ningan, Heilongjiang
2	00000750	Baimizi	Shawan, Xinjiang
3	00006653	Jinshu	Hainan
4	00007238	Dahongmizi	Bameng, Inner Mongolia
5	00007478	Baigedami	Huangzhong, Qinghai
6	No unicode	Hongshuzi	Anyang, Henan

1.3 PCR扩增及数据处理

在BIO-GENER基因扩增仪(GT9612)上进行PCR扩增。反应体系(20 μL)包括10 μL 2×MasterMix (中科瑞泰2×Taq PCR MasterMix),上、下游引物(终浓度为0.4 μmol·L⁻¹)各0.8 μL, 7.4 μL ddH₂O和1 μL DNA模板。反应程序: 94℃预热4分钟; 94℃变性40秒, 退火40秒, 72℃模板延伸1分钟, 36个循环; 72℃延伸8分钟。通过银染检测PCR扩增产物。

读取电泳条带并记录为基因型数据(0, 1),在Excel中转换成不同软件相应格式。用PopGen1.32 (Yeh and Boyle, 1997)和PowerMarker 3.25 (Liu and Muse, 2005)软件计算遗传多样性衡量参数。用MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011)和Structure 2.2 (Falush et al., 2003)构建聚类图。用NTSYSpc2.11 (Rohlf, 2002)进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。利用Genepop on the web在线软件(<http://genepop.curtin.edu.au.html>)对群体各标记位点的无效等位基因频率和哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)进行检验。

2 结果与讨论

2.1 SSR标记构建

用前期转录组测序获得的序列设计200对SSR引物检测6份糜子材料(表2)的多态性,发现23对无扩增条带;177对(88.5%)有扩增条带,其中80对呈多态性,开发效率为40%。

R_p值可衡量引物对不同基因型的辨别能力, $\overline{R_p}$ (分辨率均值)可确定引物有效等位基因的平均分辨能力。80对SSR引物的GGC碱基序列重复最多(附表2),等位基因大小为50–500 bp, RYW158等位基因条带最多(附表3); R_p值为0.67–4.67 (平均值为2.00), RYW107的R_p值最高, $\overline{R_p}$ 值为0.33–0.83 (平均值为0.55), RYW153的 $\overline{R_p}$ 值最高。

基于R_p值的80个EST-SSR的分布频次(图1)显示,标记分布于5个区段,其中介于1–2的最多(36个,占45.00%),其次为介于0–1的(17个,占21.25%),介于4–5的最少(2个,占2.50%)。

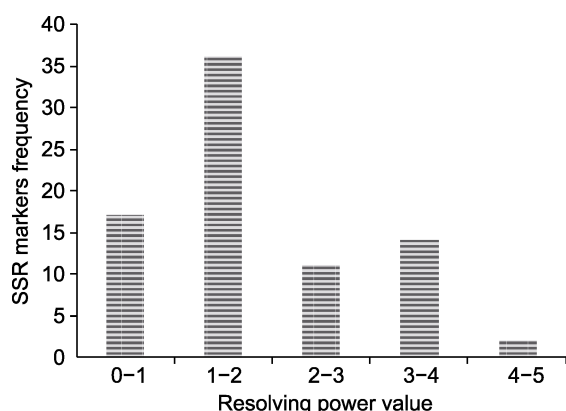


图1 80个EST-SSR的R_p值分布频次

Figure 1 Distribution of resolving power values of 80 EST-SSR markers

2.2 无效等位基因与哈迪-温伯格平衡检验

基于80个EST-SSR对7个类群材料进行无效等位基因频率和哈迪-温伯格平衡的卡方检测(附表4)。结果表明,所有标记在各群体间均存在不同程度的偏离哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),无效等位基因频率为0–0.707 1,各位点(80个位点×7个群体)均存在无效等位基因(合计313个)。北方春糜子区、黄土高原春夏糜子区和国外类群材料偏离平衡的位点数和无效等位基因数均较高。推测无效等位基

因的存在可能是纯合子过剩导致。

2.3 遗传多样性和遗传相似性分析

用上述80个EST-SSR评估糜子资源的遗传多样性(附表5),结果表明,80个位点在144份试材中共检出等位变异206个,每个位点检出2–3个(平均2.575个);*I*值介于0.659 3 (RYW108)–1.087 2 (RYW124)之间,平均为0.859 9±0.150 9; *PIC*值介于0.222 9 (RYW98)–0.717 2 (RYW124)之间,平均为0.457 3 ± 0.095 2。

分析不同生态区糜子资源,从其遗传多样性参数(表3)可以看出,就*I*和*PIC*值而言,北方春糜子区材料最高,黄土高原春夏糜子区材料次之,南方秋冬糜子区材料最低;就国内和国外资源而言,国内资源大于国外资源。

各生态区糜子资源在遗传距离和遗传一致度(表4)方面,南方秋冬糜子区与西北春夏糜子区的遗传距离最大(0.140 0),南方秋冬糜子区与东北春糜子区次之(0.108 3),北方春糜子区与黄土高原春夏糜子区最小(0.011 7);南方秋冬糜子区与西北春夏糜子区遗传一致度最低(0.869 4),南方秋冬糜子区与东北春糜子区次之(0.897 4),北方春糜子区与黄土高原春夏糜子区最高(0.988 4)。由此可见,遗传距离越大,遗传一致度越低,地理距离越远。

2.4 基于UPGMA的聚类分析

基于UPGMA对糜子资源进行聚类(图2),并分析遗传多样性(表5)。结果表明,144份材料可划分为3个群组(A、B和C)。A群组33份,主要为北方春糜子区材料,遗传多样性参数最高;B群组15份,主要为黄土高原春夏糜子区材料;C群组96份,主要为北方春糜子区材料。C群组又可划分为2个亚群组(C1和C2),C1亚群组70份,主要为北方春糜子区材料;C2亚群组26份,主要为国外资源,遗传多样性参数最低。C1亚群组可划分为2个亚亚群组(C11和C12),C11亚亚群组37份,主要为北方春糜子区材料;C12亚亚群组33份,主要为国外资源。A群组中,材料98与99(均来自南方秋冬糜子区,海南)划分在同一分支;C11亚亚群组中,材料31–37(均来自北方春糜子区,内蒙古)划分在一起;C12亚亚群组中,材料114、117、122、130、131和141(均来自国外)划分在一个分支中。不同地区资源群体间遗传关系远近基本

与其地理分布一致。

2.5 基于Structure的遗传结构聚类

我们对 144 份试材基因库数目进行建模(Evan et al., 2005) (图3), 并分析其遗传结构(图4; 表6), 结果发现 K 值(遗传群体数)在 2 和 4 处存在峰值(Delta K)。 $K=2$ 时, 划分为红色类群(68 份)和绿色类群(76 份), 红色类群主要来自国外资源基因库, 遗传多样性参数最低; 绿色类群主要为北方资源基因库。 $K=4$ 时, 划分为 4 个类群, 红色(47 份)和绿色(31 份)类群均主要为北方资源基因库, 红色类群遗传多样性参数最高; 蓝色类群(19 份)主要为黄土高原基因库; 黄色类群(47 份)代表国外资源基因库, 遗传多样性指数

最低。

$K=2$ 的红色类群材料半数以上未发生分化, 即为 $K=4$ 的黄色类群, 代表国外类群基因库, 遗传多样性指数均最低。 $K=2$ 的绿色类群分化为 $K=4$ 的红色、绿色和蓝色 3 个类群。 $K=4$ 时, 黄土高原春夏糜子区材料(主要为山西资源)在各类群中均有分布; 材料 30–37 (来自内蒙古)和材料 54–57 (来自陕西)集中分布于红色类群; 蓝色类群遗传分化最为丰富, 在 7 个地区均有分布; 黄色类群集中分布在海外, 遗传多样性最低, 国内外资源间存在明显的遗传分化。

2.6 主成分分析

利用三维 PCA 分析 144 份供试材料(图5), 结果表明,

表3 不同生态区糜子的遗传多样性参数

Table 3 Parameters of genetic diversity in different ecotope of common millet

Ecotope/ abroad	Accessions	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC
NWSS	4	2.3375±0.5017	2.1517±0.4194	0.7644±0.2178	0.8042±0.2688	0.5944±0.1193	0.3551
NSP	48	2.5750±0.4975	2.3106±0.3211	0.8604±0.1576	0.8228±0.1308	0.5655±0.0604	0.4536
LPSS	37	2.5750±0.4975	2.2803±0.3110	0.8506±0.1534	0.8384±0.1166	0.5615±0.0595	0.4203
NES	9	2.5125±0.5030	2.2435±0.3929	0.8289±0.1823	0.7937±0.1732	0.5737±0.0909	0.4212
NSU	13	2.5625±0.4992	2.2815±0.3527	0.8496±0.1632	0.7946±0.1608	0.5712±0.0667	0.4304
SAW	2	2.2375±0.5092	2.0608±0.4387	0.7347±0.2316	0.7812±0.3265	0.6813±0.2006	0.2156
Domestic	113	2.5750 ±0.4975	2.3122±0.3086	0.8628±0.1554	0.8200±0.1188	0.5625±0.0584	0.4651
Abroad	31	2.5750±0.4975	2.2464±0.2909	0.8387±0.1449	0.8540±0.1193	0.5571±0.0561	0.3896

NWSS、NSP、LPSS、NES、NSU 和 SAW 同表 1。 N_a : 观测等位基因数; N_e : 有效等位基因数; I : 多样性指数; H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; PIC : 多态性信息含量

NWSS, NSP, LPSS, NES, NSU and SAW are the same as Table 1. N_a : Observed number of alleles; N_e : Effective number of alleles; I : Shannon's diversity index; H_o : Observed heterozygosity; H_e : Expected heterozygosity; PIC : Polymorphism information content

表4 各糜子群体间的Nei氏遗传距离与遗传一致度

Table 4 Parameters of Nei's genetic distance and Nei's genetic agreement in common millet populations

Population	NWSS	NSP	LPSS	NES	NSU	SAW	Abroad
NWSS		0.9560	0.9614	0.9487	0.9380	0.8694	0.9477
NSP	0.0449		0.9884	0.9678	0.9794	0.9110	0.9864
LPSS	0.0394	0.0117		0.9716	0.9830	0.9116	0.9865
NES	0.0527	0.0327	0.0288		0.9675	0.8974	0.9587
NSU	0.0640	0.0208	0.0171	0.0331		0.9023	0.9762
SAW	0.1400	0.0932	0.0926	0.1083	0.1029		0.9102
Abroad	0.0537	0.0137	0.0136	0.0422	0.0240	0.0941	

NWSS、NSP、LPSS、NES、NSU 和 SAW 同表 1。表格对角线以下为 Nei 氏遗传距离; 表格对角线以上为 Nei 氏遗传一致度。

NWSS, NSP, LPSS, NES, NSU and SAW are the same as Table 1. Nei's genetic distances are below the diagonal; Nei's genetic agreements are above the diagonal.

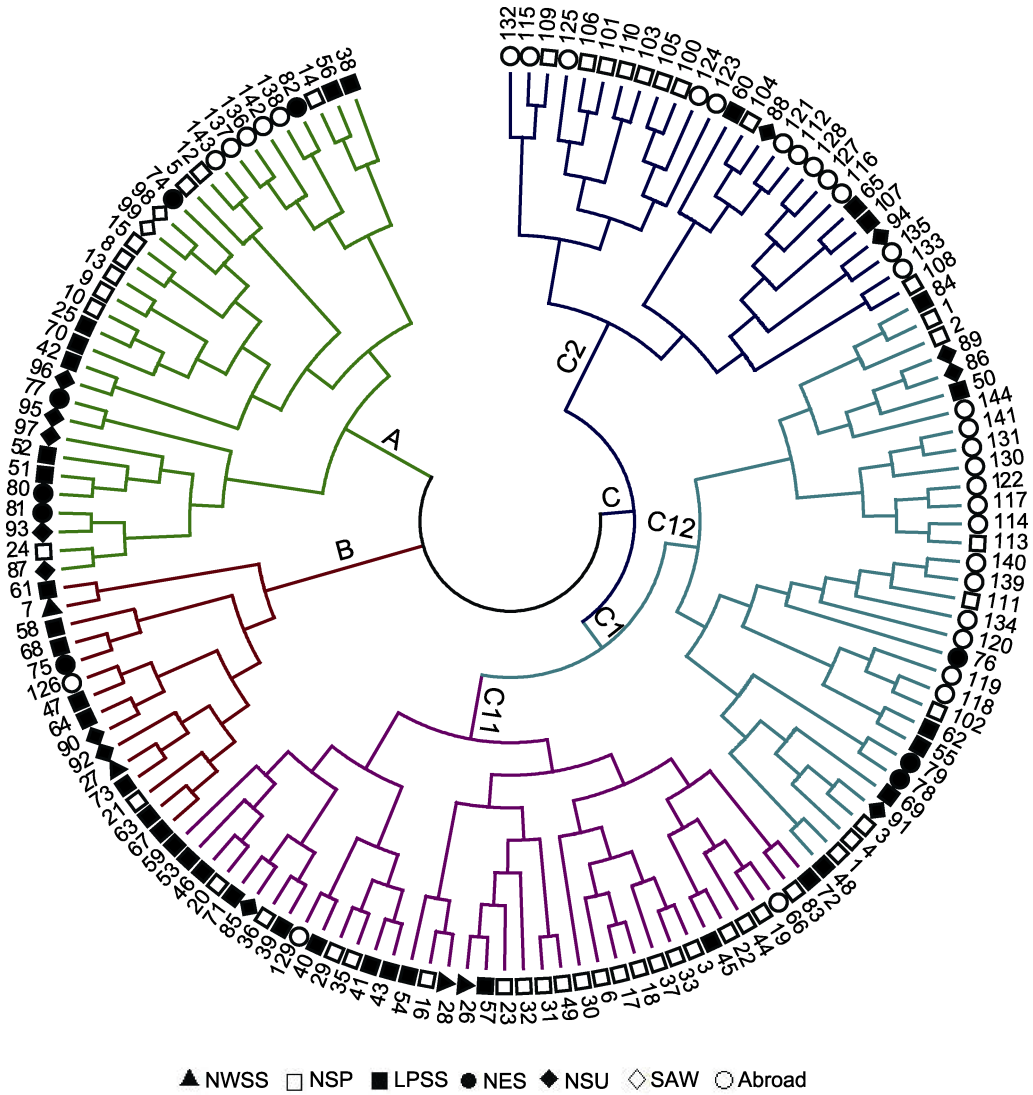


图2 基于UPGMA的糜子资源聚类分析
NWSS、NSP、LPSS、NES、NSU和SAW同表1。

Figure 2 Cluster analysis chart of common millet accessions based on UPGMA
NWSS, NSP, LPSS, NES, NSU and SAW are the same as Table 1.

表5 基于UPGMA聚类分析糜子各类群的遗传多样性

Table 5 Genetic diversity of common millet groups based on UPGMA cluster analysis

Group	Accessions	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>
A	33	2.5750±0.4975	2.3226±0.3374	0.8654±0.1620	0.8055±0.1417	0.5696±0.0636	0.4716
B	15	2.5125±0.5030	2.2471±0.3383	0.8330±0.1627	0.8153±0.1530	0.5651±0.0686	0.3993
C	96	2.5750±0.4975	2.2922±0.2894	0.8571±0.1495	0.8363±0.1111	0.5599±0.0553	0.4380
C1	70	2.5750±0.4975	2.3136±0.3098	0.8635±0.1551	0.8291±0.1199	0.5643±0.0584	0.4531
C2	26	2.5625±0.4992	2.1912±0.2797	0.8163±0.1391	0.8555 ±0.1212	0.5477±0.0558	0.3420
C11	37	2.5750±0.4975	2.3014±0.3143	0.8589±0.1561	0.8332±0.1182	0.5664±0.0603	0.4382
C12	33	2.5750±0.4975	2.3028±0.3224	0.8583±0.1571	0.8255±0.1383	0.5654±0.0610	0.4348

Na、*Ne*、*I*、*Ho*、*He*和*PIC*同表3。*Na*、*Ne*、*I*、*Ho*、*He* and *PIC* are the same as Table 3.

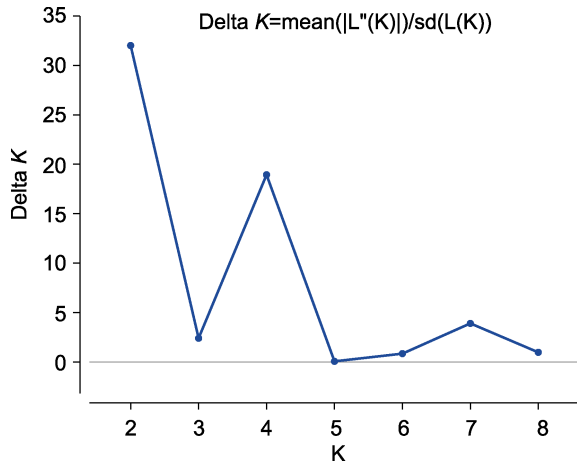


图3 基于Structure对144份糜子资源群体建模

Figure 3 Population modeling of 144 common millet accessions based on Structure

前3个主要组件PC1/Dim-1、PC2/Dim-2和PC3/Dim-3分别解释了基因总变异的22.9%、2.9%和2.2%，累积解释变异28%。PC1将试材划分成7个类群(西北春夏糜子区4份、北方春糜子区48份、黄土高原春夏糜子区37份、东北春糜子区9份、华北夏糜子区13份、南方秋冬糜子区2份及国外群体13份)。

2.7 讨论

糜子是古老的粟类作物，遗传变异丰富，迄今已有大量相关研究。在遗传多样性指数(*I*值)方面，Cho等(2010)首次构建25个糜子SSR，基于这些标记得到*I*值分别为0.391 0、0.409 7、0.529 8和0.542 6 (Hunt et al., 2011; 董俊丽等, 2015; 刘笑瑜等, 2016; 王瑞云等, 2017b)。随后，基于高通量测序发掘了一批SSR并用于评估糜子资源差异，发现*I*值分别为 0.627 5、

0.770 8和0.847 8 (连帅等, 2016; 王瑞云等, 2017b; 薛延桃等, 2018)。本研究开发并利用80个EST-SSR标记分析来自国内外144份糜子资源，发现*I*值(0.8599)高于上述研究结果，可能与本研究所用的检测标记数目多且实验材料来源广泛有关。

Rp值与微卫星标记信息直接关联，能反映标记有效等位基因的分辨力，是遗传差异评估的有效指标(Prevost and Wilkinson, 1999; Azevedo et al., 2012)。以往研究显示，苕麻(*Boehmeria nivea*)、穿心莲(*Andrographis paniculata*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*) Rp值分别为3.22、5.36和6.9 (Prevost and Wilkinson, 1999; Satya et al., 2015; Tiwar et al., 2016)，而糜子Rp值为0.88–3.15 (Rajput et al., 2014; 王瑞云等, 2017b; 薛延桃等, 2018; 王璐琳等, 2018)。本研究结果(Rp平均值为2.00)处于上述范围。由此表明，不同植物的Rp值存在差异，可能与物种自身特性有关。本研究开发的80个EST-SSR分子标记可作为评估糜子遗传多样性和阐明其群体结构的有效工具。

在遗传多样性评估过程中，基于遗传距离和结构划分的类群常出现个别例外。王舒婷等(2019)利用27个SSR分析57份糜子资源，UPGMA聚类显示第2类群主要为黄土高原春夏糜子区材料，但北方春糜子区材料(3号大白黍)也划归其中；黄土高原春夏糜子区材料在3个类群中均有分布。Structure分析显示，第2类群主要为晋中资源，而晋北资源(11号红黍)也划归其中，且晋北资源在3个类群中均有分布，基于PCA分析则将上述个例划分在各自相应类群中。本研究也存在类似现象，基于UPGMA聚类的B群组主要是黄土高原春夏糜子区材料，但1份国外材料(印度126号)也划归其中；国外材料在3个群组中均存在。基于Structure

表6 遗传结构图中K=2和K=4各类群的遗传多样性分析

Table 6 Genetic diversity analysis of different cluster based on genetic structure (K=2 and K=4)

Cluster		Accessions	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>PIC</i>
<i>K</i> =2	Red	68	2.5750±0.4975	2.2446±0.2626	0.8407±0.1403	0.8602±0.1056	0.5528±0.0520	0.3773
	Green	76	2.5750±0.4975	2.3396±0.3329	0.8711±0.1620	0.7975±0.1315	0.5679±0.0619	0.5031
<i>K</i> =4	Red	47	2.5750± 0.4975	2.3496±0.3944	0.8745±0.1768	0.7439±0.1668	0.5785±0.0743	0.5296
	Green	31	2.5750± 0.4975	2.2844±0.3202	0.8516± 0.1549	0.8225±0.1399	0.5635±0.0607	0.4414
	Blue	19	2.5750±0.4975	2.2973±0.3199	0.8575±0.1568	0.8190±0.1311	0.5628±0.0608	0.4450
	Yellow	47	2.5750±0.4975	2.2238±0.2723	0.8312±0.1387	0.3634±0.2702	0.4984±0.1050	0.3543

N_a、*N_e*、*I*、*H_o*、*H_e*和*PIC*同表3。*N_a*、*N_e*、*I*、*H_o*、*H_e*和*PIC* are the same as Table 3.

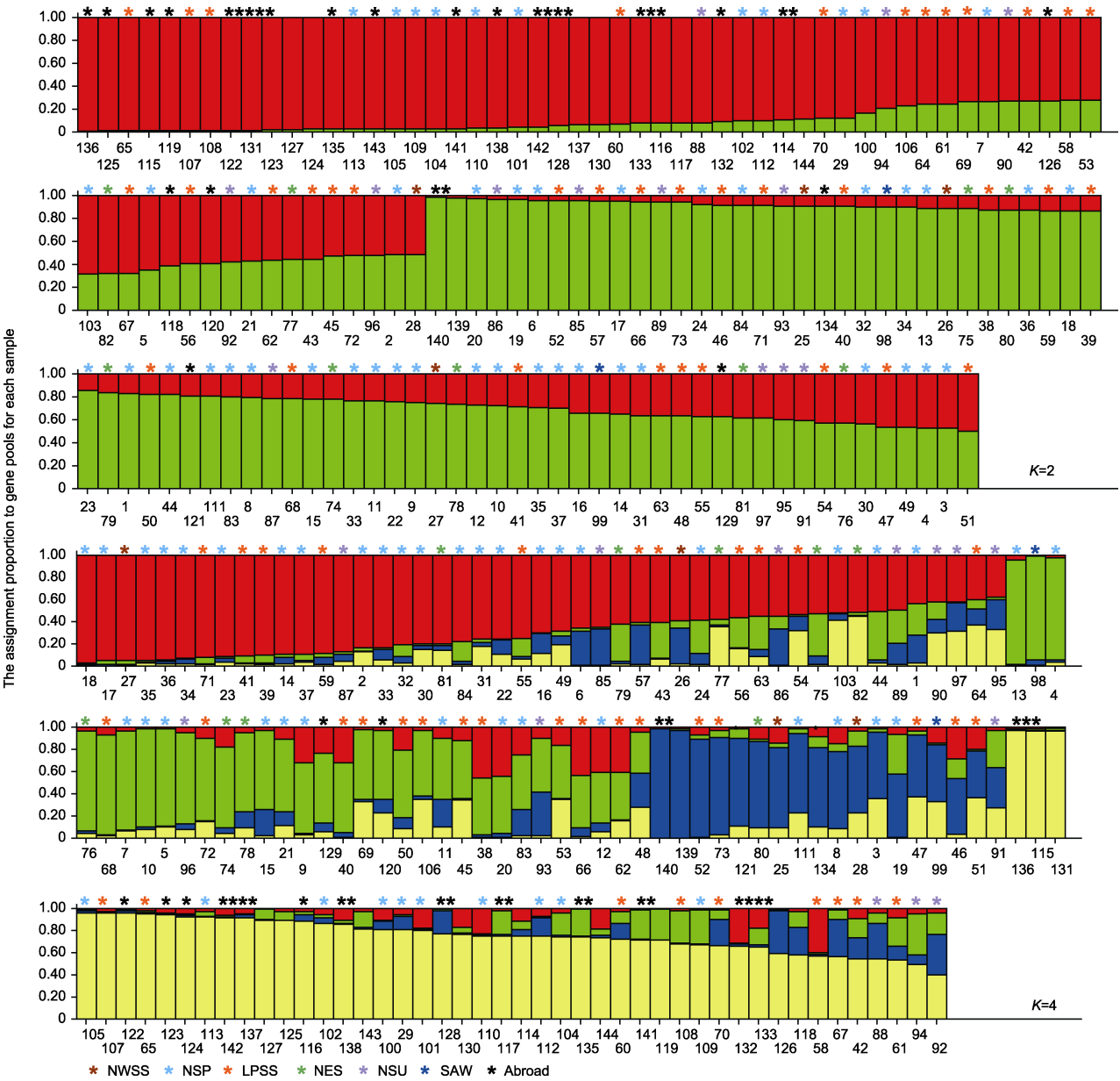


图4 基于Structure的糜子资源遗传结构
颜色代表类群; 条形和横坐标数字分别表示资源及其编号。

Figure 4 Genetic structure of common millet based on Structure
Color represents group; bar and the horizontal coordinate represent origin and its serial number, respectively.

($K=4$)聚类, 黄色类群主要为国外材料, 但3份华北春夏糜子区材料(河北88号、92号和山东94号)也划归其中; 黄土高原春夏糜子区材料(主要为山西品种)在4个类群中均有分布。PCA分析则可解释上述种质资源划

分出现交叉的现象。本研究聚类群组中的特例在主成分分析中都划分到各自相应的类群, 这与以往对大宗作物的研究结果一致(Van Inghelandt et al., 2010; Courtois et al., 2012; Bonman et al., 2015)。

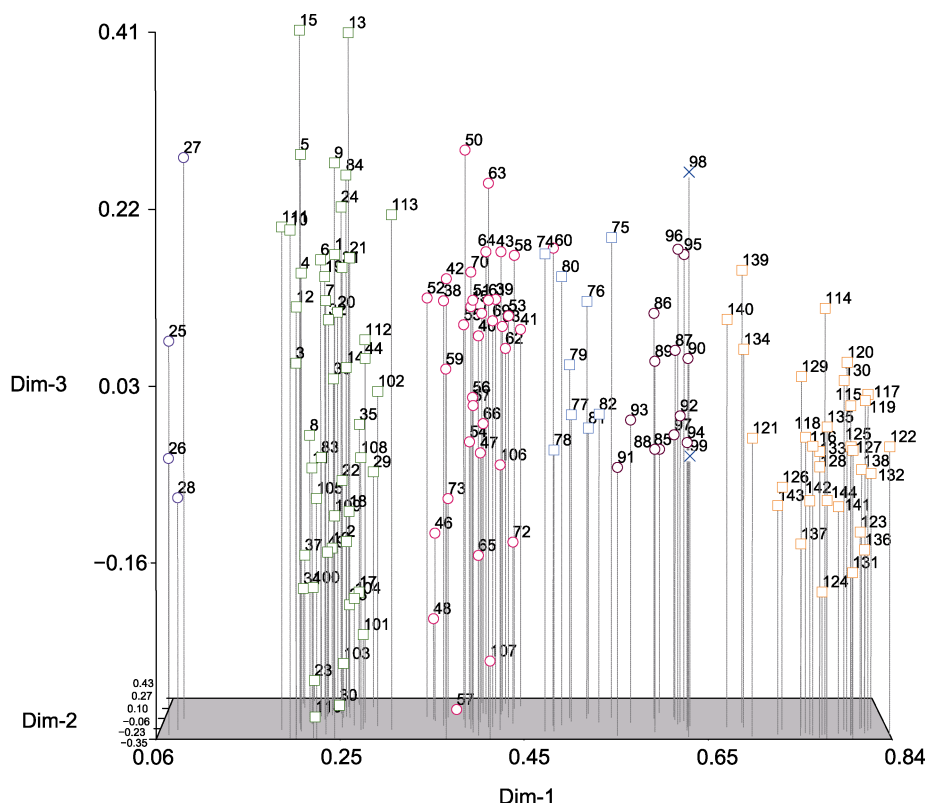


图5 基于糜子资源SSR基因型的主成分分析

Figure 5 Principal component analysis on SSR genotypes of common millet accessions

参考文献

- 董俊丽, 王海岗, 陈凌, 王君杰, 曹晓宁, 王纶, 乔治军 (2015). 糜子骨干种质遗传多样性和遗传结构分析. 中国农业科学 **48**, 3121–3131.
- 国家谷子糜子产业技术体系 (2018). 中国现代农业产业可持续发展战略研究·谷子糜子分册. 北京: 中国农业出版社. pp. 3–22.
- 郭琪, 郭大龙, 郭丽丽, 张琳, 侯小改 (2015). SSR分子标记在牡丹亲缘关系研究中的应用与研究进展. 植物学报 **50**, 652–664.
- 连帅, 陆平, 乔治军, 张琦, 张茜, 刘敏轩, 王瑞云 (2016). 利用SSR分子标记研究国内外黍稷地方品种和野生资源的遗传多样性. 中国农业科学 **49**, 3264–3275.
- 刘笑瑜 (2017). 利用高基元SSR分析中国糜子资源的遗传多样性. 硕士论文. 太谷: 山西农业大学. pp. 22–41.
- 刘笑瑜, 王瑞云, 刘敏轩, 邱岩岩, 季煦, 连帅, 乔治军, 王纶, 王海岗 (2016). 利用SSR标记分析40份糜子资源的遗传多样性. 分子植物育种 **14**, 1624–1630.
- 王璐琳, 王瑞云, 何杰丽, 薛延桃, 陈凌, 王海岗, 乔治军 (2018). 糜子特异性SSR标记的开发. 山西农业科学 **46**, 1–4, 86.

王瑞云 (2017). 糜子遗传多样性及进化研究进展. 北京: 中国农业出版社. pp. 20–92.

王瑞云, 季煦, 陆平, 刘敏轩, 许月, 王纶, 王海岗, 乔治军 (2017a). 利用荧光SSR分析中国糜子遗传多样性. 作物学报 **43**, 530–548.

王瑞云, 刘笑瑜, 王海岗, 陆平, 刘敏轩, 陈凌, 乔治军 (2017b). 用高基元微卫星标记分析中国糜子遗传多样性. 中国农业科学 **50**, 3848–3859.

王舒婷, 何杰丽, 石甜甜, 陈凌, 王海岗, 王瑞云, 乔治军 (2019). 利用微卫星标记分析山西糜子的遗传多样性. 植物遗传资源学报 **20**, 69–78.

王银月, 刘敏轩, 陆平, 乔治军, 杨天育, 李海, 崔喜艳 (2014). 构建黍稷分子遗传图谱SSR引物的筛选. 作物杂志 (4), 32–38.

薛延桃, 陆平, 乔治军, 刘敏轩, 王瑞云 (2018). 基于SSR标记的黍稷种质资源遗传多样性及亲缘关系研究. 中国农业科学 **51**, 2846–2859.

朱宇佳, 焦凯丽, 罗秀俊, 冯尚国, 王慧中 (2018). 基于SSR分子标记的酸浆属植物亲缘关系研究. 植物学报 **53**, 305–312.

Azevedo ALS, Costa PP, Machado JC, Machado MA, Pereira AV, da Silva Léo FJ (2012). Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite mar-

- kers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of napier grass accessions. *Crop Sci* **52**, 1776–1785.
- Bonman JM, Babiker EM, Cuesta-Marcos A, Esvelt-Klos K, Brown-Guedira G, Chao SM, See D, Chen JL, Akhunov E, Zhang JL, Bockelman HE, Gordon TC** (2015). Genetic diversity among wheat accessions from the USDA national small grains collection. *Crop Sci* **55**, 1243–1253.
- Changmei S, Dorothy J** (2014). Millet—the frugal grain. *Int J Sci Res Rev* **3**(4), 75–90.
- Cho YI, Chung JW, Lee GA, Ma KH, Dixit A, Gwag JG, Park YJ** (2010). Development and characterization of twenty-five new polymorphic microsatellite markers in proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Genes Genomics* **32**, 267–273.
- Courtois B, Frouin J, Greco R, Bruschi G, Droc G, Hamelin C, Ruiz M, Clément G, Evrard JC, Van Coppenole S, Katsantonis D, Oliveira M, Negrão S, Matos C, Cavigliolo S, Lupotto E, Piffanelli P, Ahmadi N** (2012). Genetic diversity and population structure in a European collection of rice. *Crop Sci* **52**, 1663–1675.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J** (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* **14**, 2611–2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK** (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567–1587.
- Habiyaremye C, Matanguihan JB, Guedes JD, Ganjyal GM, Whiteman MR, Kidwell KK, Murphy KM** (2017). Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) and its potential for cultivation in the pacific northwest, U.S: a review. *Front Plant Sci* **7**, 1961.
- Hu XY, Wang JF, Lu P, Zhang HS** (2009). Assessment of genetic diversity in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) using SSR markers. *J Genet Genomics* **36**, 491–500.
- Hunt HV, Campana MG, Lawes MC, Park YJ, Bower MA, Howe CJ, Jones MK** (2011). Genetic diversity and phylogeography of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) across Eurasia. *Mol Ecol* **20**, 4756–4771.
- Liu KJ, Muse SV** (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* **21**, 2128–2129.
- Liu MX, Xu Y, He JH, Zhang S, Wang YY, Lu P** (2016). Genetic diversity and population structure of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) cultivars and landraces in China based on microsatellite markers. *Int J Mol Sci* **17**, 370.
- Lu HY, Zhang JP, Liu KB, Wu NQ, Li YM, Zhou KS, Ye ML, Zhang TY, Zhang HJ, Yang XY, Shen LC, Xu DK, Li Q** (2009). Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10, 000 years ago. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 7367–7372.
- Murray MG, Thompson WF** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4321–4325.
- Prevost A, Wilkinson MJ** (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* **98**, 107–112.
- Rajput SG, Plyler-Harveson T, Santra DK** (2014). Development and characterization of SSR markers in proso millet based on switchgrass genomics. *Am J Plant Sci* **5**, 175–186.
- Rajput SG, Santra DK** (2016). Evaluation of genetic diversity of proso millet germplasm available in the United States using simple-sequence repeat markers. *Crop Sci* **56**, 2401–2409.
- Rohlf FJ** (2002). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.10. New York: Exter Publishing Ltd. Setauket.
- Saha D, Channabyre Gowda MV, Arya L, Verma M, Bansal KC** (2016). Genetic and genomic resources of small millets. *Crit Rev Plant Sci* **35**, 56–79.
- Satya P, Karan M, Jana S, Mitra S, Sharma A, Karmakar PG, Ray DP** (2015). Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. *Meta Gene* **3**, 62–70.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **665**, 2731–2739.
- Tiwari G, Singh R, Singh N, Choudhury DR, Paliwal R, Kumar A, Gupta V** (2016). Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in kalmegh [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees]. *Ind Crops Prod* **86**, 1–11.
- Van Inghelandt D, Melchinger AE, Lebreton C, Stich B** (2010). Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theor Appl Genet* **120**, 1289–1299.
- Wang RY, Hunt HV, Qiao ZJ, Wang L, Han YH** (2016). Diversity and cultivation of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) in China: a review. *Econ Bot* **70**, 332–342.
- Wang RY, Wang HG, Liu XY, Ji X, Chen L, Lu P, Liu MX, Teng B, Qiao ZJ** (2018). Waxy allelic diversity in common millet (*Panicum miliaceum* L.) in China. *Crop J* **6**, 377–385.
- Yeh FC, Boyle TJB** (1997). Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg J Bot* **129**, 157–163.

The Genetic Diversity of Common Millet (*Panicum miliaceum*) Germplasm Resources Based on the EST-SSR Markers

Jieli He^{1†}, Tiantian Shi^{2†}, Ling Chen³, Haigang Wang³, Zhijun Gao⁴, Meihong Yang¹
Ruiyun Wang^{2, 3*}, Zhijun Qiao^{3*}

¹College of Arts and Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; ²College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; ³Shanxi Key Laboratory of Genetic Resources and Genetic Improvement of Minor Crops, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Germplasm Resources, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; ⁴Erdos Institute of Agriculture and Animal Husbandry, Erdos 017200, China

Abstract The EST-SSR molecular markers of common millet (*Panicum miliaceum*) were developed by high-throughput sequencing. Using these markers, we assessed the genetic diversity in a panel of 144 common millet accessions collected from different ecotopic regions in China and abroad. It was shown that 80 pairs of these markers were polymorphic, with the efficiency of approximately 40%. The resolution power (Rp) was 0.67–4.67 (mean 2.00) and the amplified product sizes ranged from 50 to 500 bp. Among the examined 144 accessions, 206 allelic variations were identified in 80 loci, with 2–3 alleles at each locus. The Shannon's diversity index (*I*) ranged from 0.659 3 (RYW108) to 1.087 2 (RYW124) with an average of 0.859 9. The range of polymorphism information content (*PIC*) was 0.222 9 (RYW98)–0.717 2 (RYW124) with an average of 0.457 3. Based on UPGMA, these 144 accessions were classified into 3 groups, two of which belonged to the Northern China spring-sowing ecotopes and one group was mainly from the Loess Plateau spring-summer-sowing ecotopes. Based on Structure (*K*=4), all the accessions were divided into four groups, of which two groups represented the gene pool originated from the Northern China, whereas the other two groups from the Loess Plateau and abroad accessions. Based on principal component analysis (PCA), the accessions were clustered into seven groups, consistent with their geographic origins.

Key words *Panicum miliaceum*, genetic diversity, PCA, EST-SSR markers

He JL, Shi TT, Chen L, Wang HG, Gao ZJ, Yang MH, Wang RY, Qiao ZJ (2019). The genetic diversity of common millet (*Panicum miliaceum*) germplasm resources based on the EST-SSR markers. *Chin Bull Bot* **54**, 723–732.

† These authors contributed equally to this paper

* Authors for correspondence. E-mail: wry925@126.com; nkypzs@126.com

(责任编辑: 白羽红)

附表 1 144 份糜子试材明细

Appendix table 1 The detail of 144 accessions of common millet material in this experiment

附表 2 80 个 SSR 引物特性

Appendix table 2 Characteristics of 80 SSR primers

附表 3 80 个糜子 SSR 标记的 Rp 值

Appendix table 3 Resolving power value of 80 common millet SSR markers

附表 4 无效等位基因与哈迪-温伯格平衡检验

Appendix table 4 Null allelic frequency and Hardy-Weinberg equilibrium *P* value

附表 5 80 对 SSR 引物检测糜子的遗传参数

Appendix table 5 Genetic parameters of common millet tested by the 80 polymorphic SSR markers

<http://www.chinbullbotany.com/fileup/PDF/t19037.xlsx>