

黑老虎新品系的 SSR 指纹图谱构建

邹建文, 饶红欣, 陈 灵, 罗先权, 何润华, 陈 铭, 何 艳

湖南省植物园, 湖南长沙 410116

摘要: 由于黑老虎种质的特异性评价以其果实及经济性状为主, 未结实时仅依据形态性状较难区分, 因此, 构建黑老虎 DNA 指纹图谱有助于黑老虎种质的快速精准鉴定。选择 15 对引物对 20 个黑老虎品系进行 SSR 分析, 依据 Nei's (1972) 遗传距离, 采用非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 通过位点间的组合构建 SSR 指纹图谱。结果表明: 15 对引物在 20 个黑老虎品系中共扩增出 15 个位点 75 个等位基因, 每个位点的等位基因数为 2~15, 其 Shannon 信息指数 (I) 为 0.199~2.456, 多态信息含量 (PI) 为 0.095~0.894。20 个品系间遗传相似系数为 0.328~0.891, 基于 UPGMA 聚类可分为 2 个类群。所有 15 个位点均不能单独完全区分 20 个黑老虎品系, 以 KCZ023 位点的区分能力最强; KCZ023 与 KCZ135、KCZ023 与 KCZ100 以及 KCZ023 与 KCZ147 的 2 位点组合以及 28 个 3 位点组合能够将 20 个品系完全区分。20 个黑老虎品系的遗传多样性较丰富, 应用 3 个 2 位点组合和 28 个 3 位点组合能够完全区分各品系, 该研究结果可为黑老虎种质鉴定以及杂交亲本选配提供科学依据。

关键词: 黑老虎; DNA 指纹图谱; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S567.19 文献标识码: A

SSR Fingerprinting for 20 *Kadsura coccinea* Clones

ZOU Jianwen, RAO Hongxin, CHEN Ling, LUO Xianquan, HE Runhua, CHEN Ming, HE Yan

Hunan Botanical Garden, Changsha, Hunan 410116, China

Abstract: It is normally difficult to distinguish germplasms of *Kadsura coccinea* with morphological traits before they bear fruits because the evaluations on the specificity are mainly based on fruit and economic traits. Establishing DNA fingerprinting profile is useful for rapid and accurate identification of *K. coccinea* germplasms. SSR analysis for 20 clones of *K. coccinea* was conducted using 15 pairs of primers, the clones were clustered based on Nei's (1972) genetic distance by UPGMA clustering method, and SSR fingerprinting profile was established through combinations of some markers. 15 pairs of primers produced 75 alleles at 15 loci from 20 clones of *K. coccinea*, with two to 15 alleles per locus, the Shannon diversity index varied from 0.199 to 2.456, polymorphic information index from 0.095 to 0.894, and genetic similarity coefficient from 0.328 to 0.891. The 20 clones could be divided into two groups by the UPGMA clustering method. All the 15 loci could not distinguish 20 clones separately, among which KCZ023 showed the strongest ability to distinguish. Two-loci combinations of KCZ023 with KCZ135, KCZ100 or KCZ147 as well as 28 three-loci combinations could distinguish all the 20 clones separately. The 20 clones of *K. coccinea* show abundant genetic diversity, and can be fully distinguished by any of three two-loci combinations or 28 three-loci combinations. The findings would provide evidences for germplasm identification and hybrid parent selection.

Keywords: *Kadsura coccinea*; DNA fingerprinting; genetic diversity; genetic relationship

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.04.007

黑老虎 (*Kadsura coccinea*) 俗称冷饭团, 为 五味子科 (Schisandraceae) 南五味子属一种常绿

收稿日期 2022-10-21; 修回日期 2022-11-08

基金项目 湖南创新型省份建设专项 (No. 2020NK2052); 国家林业和草原局生物安全与遗传资源管理专项经费项目 (No. KJZXSA202309); 湖南省林业科技创新项目 (No. XLK201815)。

作者简介 邹建文 (1968—), 男, 本科, 副研究员, 研究方向: 森林培育与植物资源开发利用。E-mail: zou5671695@126.com。

木质藤本植物。黑老虎是一种食药兼用的新型珍稀水果,具有较高的药用价值和营养保健功效,而且其果形奇特、果期长,亦具有独特的观赏价值,在中药材、水果和食品以及园林绿化美化等方面颇具发展潜力^[1]。近年来,随着其果实和相关产品在国内市场不断走俏,黑老虎在湖南、广西、贵州和云南等省(区)得到大力发展,一些市(县)形成了产业化发展格局,有力推动了国家乡村振兴战略的实施。尤其在湖南通道县,黑老虎的种植规模迅速扩大,并且获评国家地理标志农产品^[2]。在黑老虎的规模发展过程中,科研人员开展了黑老虎新种质的挖掘和选育研究,并通过嫁接推广应用。目前已涌现出一批在果形、果色、口感、早实性等方面具特异性的品种(系)。

由于黑老虎的种质特异性,以果实及其经济性状为主,加之生长环境导致的营养器官形态变异也较大,在结实前依据形态性状较难鉴别。由于DNA标记不受环境和发育时期的影响,构建DNA指纹图谱是一种快速且准确的途径^[3]。SSR标记具有多态性高、共显性遗传、测试操作简单、结果重复性好等优点,被国际植物新品种权保护联盟(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)确定为构建植物品种(系)DNA指纹数据库的首选标记^[4],已在宝巾花^[5]、梨属^[6]、仁用杏^[7]、核桃^[8]、薄壳山核桃^[9]、苦参^[10]以及杨树^[11-12]等观赏、食用、药用以及材用植物品种(系)DNA指纹图谱上得到广泛应用。本研究应用SSR标记技术分析湖南省选育的20个黑老虎品系的遗传多样性,探明其亲缘关系,构建SSR指纹图谱,旨在为黑老虎品种(系)鉴定以及新品种(系)选育与创制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

20个黑老虎品系来自湖南省通道县独坡镇虾团村、芷江县大树坳乡竹坡村和芷江县三道坑镇芷溪村(表1)。其中,通道县独坡镇虾团村自2004年以来开始发展黑老虎,建立了平宽黑老虎专业合作社,湖南省植物园与当地种植大户合作收集、保存了大量黑老虎种质资源,部分品系即来自该种质资源圃;其他品系是利用芷江县大树坳乡竹坡村和三道坑镇芷溪村天然次生林内的黑老虎优株经嫁接而获得。部分品系特征见图1。对每个

品系采集其嫩叶,用硅胶(质量比为1:10)干燥带回实验室。

表1 20个黑老虎品系基本信息
Tab. 1 Information of 20 *K. coccinea* clones

| 编号 No. | 品系 Clone | 来源 Source | 特征描述 Specific description |
|-----------|-------------|--------------|------------------------------|
| 1 | TD07 | 通道县独坡镇虾团村 | 虎绿 |
| 2 | TD08 | 通道县独坡镇虾团村 | 高产 |
| 3 | TD19 | 通道县独坡镇虾团村 | 方形果、高产 |
| 4 | TD21 | 通道县独坡镇虾团村 | 黄果、叶厚、高产 |
| 5 | TD22 | 通道县独坡镇虾团村 | 叶厚、叶大、高产 |
| 6 | TD23 | 通道县独坡镇虾团村 | 高产 |
| 7 | TD40 | 通道县独坡镇虾团村 | 果大、粉红色、高产 |
| 8 | TD41 | 通道县独坡镇虾团村 | 果实青色(青果) |
| 9 | TD42 | 通道县独坡镇平宽村 | 长形果 |
| 10 | TD43 | 通道县独坡镇平宽村 | 肉多、果甜 |
| 11 | TD44 | 通道县独坡镇平宽村 | 早熟 |
| 12 | TD45 | 通道县独坡镇平宽村 | 果紫黑色 |
| 13 | TD46 | 通道县独坡镇平宽村 | 果粉色、果甜 |
| 14 | TD47 | 通道县独坡镇平宽村 | 早熟 |
| 15 | TD50 | 通道县平宽基地 | 长形果 |
| 16 | TD51 | 通道县平宽基地 | 果大、高产 |
| 17 | TD52 | 通道县平宽基地 | 虎绿 |
| 18 | TD54 | 通道县平宽基地 | 果大 |
| 19 | ZJ34 | 芷江县大树坳乡竹坡村 | 高产 |
| 20 | ZJ40 | 芷江县三道坑镇芷溪村 | 黄果、高产 |

1.2 方法

DNA提取和SSR分析。采用改良的CTAB法^[13]提取DNA,从前期开发的28对SSR引种中选择15对(表2),应用M13-tailed引物法进行SSR分析^[1]。采用10 μL的PCR扩增反应体系:DNA模板50 ng, dNTPs 150 μmol/L, MgCl₂ 2.0 μmol/L, M13荧光标记引物0.5 μmol/L, M13荧光标记的正向引物0.5 μmol/L, 反向引物0.5 μmol/L, 1×PCR缓冲液以及Taq DNA聚合酶0.04 U/μL。PCR缓冲液和Taq DNA聚合酶由天根生化科技(北京)有限公司生产。在PCR扩增仪Master cycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf)上进行扩增反应,其程序为:4 min 94 °C预变性;30 s 94 °C变性,30 s 60 °C退火,30 s 72 °C延伸,循环30次;10 min 72 °C延伸。选用GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, USA)为内标,采用3730XL自动测序仪(Applied Biosystems, USA)检测PCR产物的多态性。应用

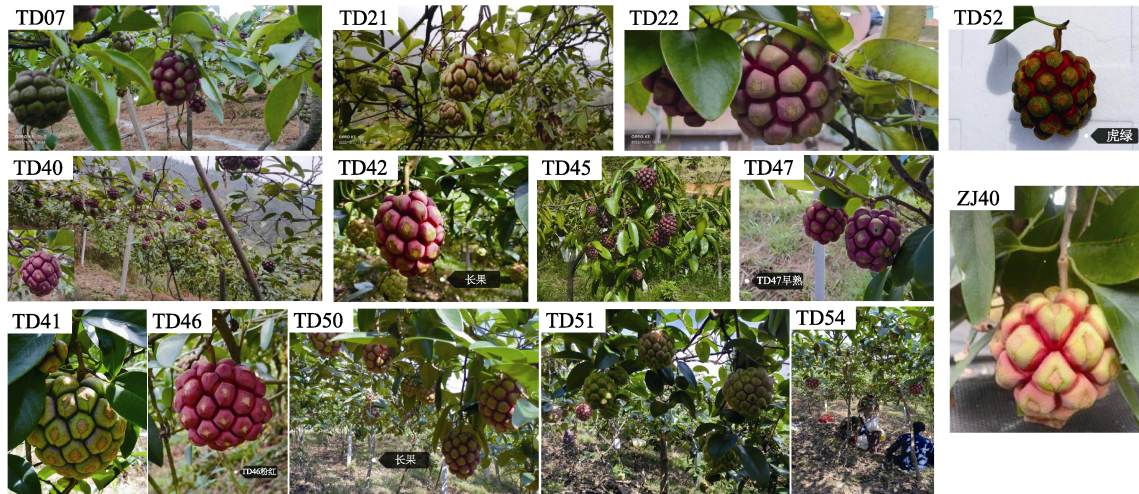


图 1 部分黑老虎品系特征

Fig. 1 Part clones of *K. coccinea* showing their characteristics

表 2 15 对 SSR 引物信息

Tab. 2 Information of 15 SSR primer pairs

| 位点 Loci | 引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3') | 重复序列 Repeat motif | 片段大小 Allele size/bp |
|------------|--|----------------------|------------------------|
| KCZ023 | F: ACATGAGAAAAGAGGGTTTGGGA; R: CACGTGTATTCAAATTCTCGGCA | (GA)7 | 103~129 |
| KCZ029 | F: TATGAGCTGGAAAACACCCGAG; R: TCAACTGGATTGCGAAATGGT | (AAG)7 | 105~120 |
| KCZ031 | F: GGAACGAACCTCTTCTGTGGA; R: TCGATTGTTGTATTGGAAGAGTCC | (ATT)7 | 218~227 |
| KCZ035 | F: ATCAATCGAACTGGGCAATCCA; R: TTGTAAACACACCAATCGGCAC | (TAA)7 | 191~203 |
| KCZ036 | F: AAAGGGAATAAGTGGGAGGCAG; R: AAAGGAGCAGTGGTTTCCATCT | (TCT)7 | 214~229 |
| KCZ038 | F: AGGTGCTATGCATGTCTCTAGC; R: GGGCCCTTATCGGATCTCAGA | (ATC)7 | 206~218 |
| KCZ057 | F: ACAAGGGTACGACGATAATGAAGA; R: TGTTAAAGATGAAAAGCATTGGCA | (ACAT)7 | 102~114 |
| KCZ058 | F: TGGAGAGATTGTTTCGATCGA; R: AGGTAGTAGGTTAAGGGTAACATCA | (TAAA)7 | 226~234 |
| KCZ059 | F: ACCCAATTCCTATGGGTTTCAT; R: CCAGAAAAGTATAGCCCCCTT | (AAAT)7 | 179~203 |
| KCZ061 | F: GTGGGCTTCGAAAGAGATAGGA; R: GCCAACTCCCAGTTCTTTCTCT | (ATAGA)7 | 237~247 |
| KCZ100 | F: TCAGGAGCCACCAGAGACTTAT; R: GTCGCCATTAACACTGCACT | (TC)9 | 226~244 |
| KCZ103 | F: GACCCAGGAGTCCAGAAATACC; R: AAAGCCCTCAAAACCCCAAAAC | (AG)9 | 272~290 |
| KCZ113 | F: CCCTCACTTGGATGAATGCCTA; R: AACGTCTGTATCATGGCTCCT | (AC)9 | 96~104 |
| KCZ135 | F: AGAGCTATCCTCAATCCTCAGT; R: CGGTTGACTGCTATAGAGGCAT | (ATC)9 | 220~235 |
| KCZ147 | F: GAGCAATCTTATCCGCAAACCC; R: ACGAAGACCAGAATATCCGACG | (GAA)9 | 117~129 |

GeneMarker V2.2.0 软件^[14]判读基因型。

1.3 数据处理

应用 Excel 软件统计每个位点的基因型数量、特异等位基因数 (A_p) 以及鉴定品系数。应用 GenAlEx 6 软件^[15]计算每位点的等位基因数 (A)、有效等位基因数 (A_e)、Shannon 信息指数 (I)、观测杂合度 (H_o)；基于等位基因频率，采用公式 $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ 计算多态信息含量 (PIC)， $PI_i = 2(\sum P_{ij}^2)^2 - \sum P_{ij}^4$ 计算基因型相同的概率 (PI)，其中 P_{ij} 为位点 i 等位基因 j 的频率^[16]；按照各位点及其等位基因的有无构建 (0, 1) 矩阵，应用

NYSYS-pc 2.1 软件^[17]计算品系间的 Nei's (1972) 遗传距离，基于遗传距离进行 UPGMA (非加权组平均法) 聚类分析，绘制亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

15 对 SSR 引物在 20 个黑老虎品系中共检测到 108 个基因型，76 个等位基因，其中 18 个为特异等位基因，仅在 1 个品系中出现。每个位点的等位基因数 (A) 为 2~15，有效等位基因数 (A_e) 为 1.105~9.412，均以 KCZ023 位点最高，15 个

位点的 A 和 A_e 的平均值分别为 5.067 和 2.866。特异等位基因数 (A_p) 以 KCZ023 和 KCZ100 最多, 均有 4 个。Shannon 信息指数 (I) 为 0.199~2.456, 观测杂合度 (H_o) 为 0.100~0.900, 多态

信息含量 (PIC) 为 0.095~0.894, 亦均以 KCZ023 位点最高, 15 个位点的 I 、 H_o 和 PIC 的平均值分别为 1.106、0.473 和 0.562。基因型相同的概率 (PI) 为 0.020~0.824, 以 KCZ023 位点为最低 (表 3)。

表 3 20 个黑老虎品系的遗传多样性

Tab. 3 Genetic diversity of 20 *K. coccinea* clones

| 位点 Loci | 基因 型数 N_g | 等位基因 数 A | 有效等位 基因数 A_e | 特异等位 基因数 A_p | Shannon 信 息指数 I | 观测杂 合度 H_o | 多态信息 含量 PIC | 基因型相同 的概率 PI | 区分品 系数 N_i |
|------------|----------------|---------------|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|
| KCZ023 | 17 | 15 | 9.412 | 4 | 2.456 | 0.900 | 0.894 | 0.020 | 15 |
| KCZ029 | 3 | 3 | 2.174 | 0 | 0.898 | 0.800 | 0.540 | 0.285 | 0 |
| KCZ031 | 3 | 3 | 1.629 | 1 | 0.644 | 0.500 | 0.386 | 0.434 | 1 |
| KCZ035 | 11 | 5 | 3.493 | 0 | 1.420 | 0.450 | 0.714 | 0.120 | 7 |
| KCZ036 | 6 | 4 | 1.778 | 1 | 0.825 | 0.250 | 0.437 | 0.356 | 3 |
| KCZ038 | 7 | 4 | 2.446 | 1 | 1.028 | 0.500 | 0.591 | 0.243 | 4 |
| KCZ057 | 6 | 4 | 2.041 | 0 | 0.926 | 0.550 | 0.510 | 0.298 | 3 |
| KCZ058 | 2 | 2 | 1.105 | 0 | 0.199 | 0.100 | 0.095 | 0.824 | 0 |
| KCZ059 | 9 | 6 | 3.320 | 1 | 1.432 | 0.550 | 0.699 | 0.128 | 3 |
| KCZ061 | 2 | 2 | 1.923 | 0 | 0.673 | 0.000 | 0.480 | 0.386 | 0 |
| KCZ100 | 9 | 7 | 2.996 | 4 | 1.344 | 0.550 | 0.666 | 0.164 | 5 |
| KCZ103 | 7 | 5 | 2.010 | 2 | 0.985 | 0.250 | 0.502 | 0.286 | 4 |
| KCZ113 | 10 | 5 | 3.463 | 0 | 1.377 | 0.650 | 0.711 | 0.132 | 5 |
| KCZ135 | 8 | 6 | 3.053 | 3 | 1.319 | 0.500 | 0.673 | 0.162 | 4 |
| KCZ147 | 8 | 5 | 2.145 | 1 | 1.057 | 0.550 | 0.534 | 0.255 | 3 |

2.2 亲缘关系分析

20 个黑老虎品系间 Nei's (1972) 遗传相似系数为 0.328~0.891, 以 TD07 与 TD43 间遗传相似系数最大, TD45 与 TD46 间遗传相似系数最小, 其平均值为 0.614 (表 4)。聚类分析发现, 以遗传相似系数 0.57 为阈值可将 20 个品系分为 2 个类群: TD21、TD22、TD42、TD43、TD47、TD50、TD51 和 TD54 等 8 个品系聚为一类 (I); 其他 12 个品系聚为一类 (II)。以遗传相似系数 0.62 为阈值可将第 II 类群分为 3 个组: TD07、TD41、TD45、TD46、TD52、ZJ34、ZJ40 等 7 个品系为一组; TD08 和 TD19 为一组; TD23、TD40、TD44 为一组 (图 2)。

2.3 DNA 指纹图谱构建

由表 5 可知, 15 个 SSR 位点均不能单独将 20 个黑老虎品系完全区分开。其中, KCZ023 位点的区分能力最强, 能单独鉴别 15 个品系, 占 75%; 其次为 KCZ035 位点, 能单独区分 7 个品系, 占 35%; 再次为 KCZ100 和 KCZ113, 均能单独鉴定出 5 个品系, 占 25%; KCZ029、KCZ058

和 KCZ061 位点均不能单独区分任何品系。

从表 5 可以看出, 位点两两组合中, KCZ023 与 KCZ059、KCZ023 与 KCZ135 以及 KCZ023 与 KCZ147 等 3 个组合中的任意一个均能将 20 个品系完全区分, 其他组合均不能将 20 个品系完全区分。3 位点组合中, 共有 28 个组合能将 20 个黑老虎品系完全区分, 包括: (1) KCZ023 与 KCZ035 或 KCZ023 与 KCZ100, 加上 KCZ036、KCZ057、KCZ061、KCZ103 和 KCZ113 的任意一个位点, 计 10 个组合; (2) KCZ035 与 KCZ057, 或 KCZ035 与 KCZ059, 或 KCZ035 与 KCZ100, 加上 KCZ103 或 KCZ135, 计 6 个组合; (3) KCZ035 与 KCZ113 加上 KCZ059 或 KCZ100, 以及 KCZ035 与 KCZ147 加上 KCZ057 或 KCZ059, 计 4 个组合; (4) KCZ035 与 KCZ103 加上 KCZ113 或 KCZ135, 以及 KCZ035 与 KCZ113 加上 KCZ135 或 KCZ147, 计 4 个组合; (5) KCZ035、KCZ036 和 KCZ059, KCZ035、KCZ135 和 KCZ147, KCZ057、KCZ100 和 KCZ113 以及 KCZ100、KCZ113 和 KCZ135 等 4 个组合。

表 4 20 个黑老虎品系的遗传相似系数
Tab. 4 Genetic similarity coefficient between 20 *K. coccinea* clones

| 品系 Clone | TD07 | TD08 | TD19 | TD21 | TD22 | TD23 | TD40 | TD41 | TD42 | TD43 | TD44 | TD45 | TD46 | TD47 | TD50 | TD51 | TD52 | TD54 | ZJ34 | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| TD08 | 0.548 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TD19 | 0.628 | 0.751 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TD21 | 0.452 | 0.462 | 0.639 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TD22 | 0.402 | 0.462 | 0.611 | 0.722 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TD23 | 0.503 | 0.433 | 0.611 | 0.417 | 0.583 | | | | | | | | | | | | | | | |
| TD40 | 0.432 | 0.653 | 0.477 | 0.427 | 0.578 | 0.754 | | | | | | | | | | | | | | |
| TD41 | 0.596 | 0.710 | 0.586 | 0.537 | 0.561 | 0.610 | 0.706 | | | | | | | | | | | | | |
| TD42 | 0.704 | 0.620 | 0.622 | 0.622 | 0.674 | 0.519 | 0.516 | 0.706 | | | | | | | | | | | | |
| TD43 | 0.328 | 0.593 | 0.519 | 0.519 | 0.752 | 0.519 | 0.539 | 0.547 | 0.798 | | | | | | | | | | | |
| TD44 | 0.601 | 0.570 | 0.491 | 0.375 | 0.433 | 0.664 | 0.601 | 0.609 | 0.539 | 0.593 | | | | | | | | | | |
| TD45 | 0.705 | 0.575 | 0.528 | 0.628 | 0.553 | 0.603 | 0.727 | 0.684 | 0.680 | 0.516 | 0.705 | | | | | | | | | |
| TD46 | 0.586 | 0.593 | 0.544 | 0.570 | 0.570 | 0.648 | 0.750 | 0.569 | 0.677 | 0.605 | 0.647 | 0.891 | | | | | | | | |
| TD47 | 0.659 | 0.627 | 0.452 | 0.729 | 0.603 | 0.427 | 0.568 | 0.662 | 0.750 | 0.657 | 0.548 | 0.636 | 0.539 | | | | | | | |
| TD50 | 0.397 | 0.649 | 0.485 | 0.670 | 0.693 | 0.416 | 0.732 | 0.670 | 0.712 | 0.712 | 0.480 | 0.669 | 0.669 | 0.732 | | | | | | |
| TD51 | 0.492 | 0.593 | 0.648 | 0.726 | 0.778 | 0.441 | 0.657 | 0.638 | 0.847 | 0.774 | 0.485 | 0.704 | 0.774 | 0.704 | 0.798 | | | | | |
| TD52 | 0.727 | 0.653 | 0.678 | 0.603 | 0.553 | 0.678 | 0.682 | 0.839 | 0.774 | 0.563 | 0.731 | 0.841 | 0.727 | 0.727 | 0.711 | 0.704 | | | | |
| TD54 | 0.500 | 0.444 | 0.477 | 0.653 | 0.653 | 0.452 | 0.455 | 0.596 | 0.774 | 0.750 | 0.392 | 0.659 | 0.563 | 0.705 | 0.732 | 0.657 | 0.659 | | | |
| ZJ34 | 0.727 | 0.585 | 0.670 | 0.590 | 0.456 | 0.563 | 0.485 | 0.636 | 0.675 | 0.425 | 0.585 | 0.776 | 0.725 | 0.582 | 0.580 | 0.600 | 0.776 | 0.582 | | |
| ZJ40 | 0.546 | 0.627 | 0.754 | 0.578 | 0.553 | 0.528 | 0.523 | 0.684 | 0.680 | 0.539 | 0.470 | 0.614 | 0.586 | 0.523 | 0.627 | 0.704 | 0.773 | 0.636 | 0.849 | |

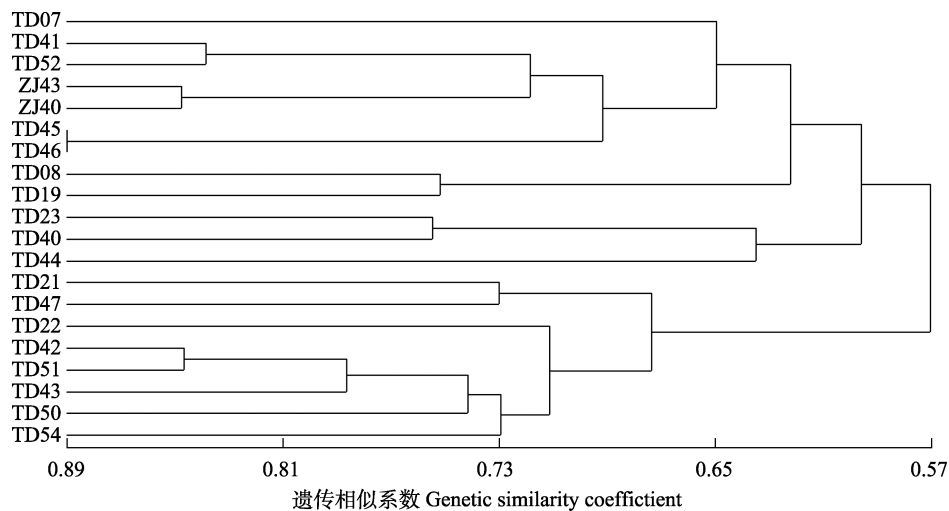


图 2 20 个黑老虎品系的 UPGMA 聚类分析

Fig. 2 Clustering for 20 *K. coccinea* clones based on UPGMA analysis

3 讨论

本研究应用 15 对 SSR 引物研究了 20 个黑老虎品系的遗传多样性,检测到 76 个等位基因、18 个特异等位基因和 108 个基因型,尤其是 KCZ023 位点具有 15 个等位基因,高于该位点在城步、桂东和会同 3 个天然群体所检测到的等位基因数 (13)^[1],而且该位点对于黑老虎品系的区分能力最强,可单独区分 15 个品系,可作为黑老虎品

系鉴定的核心位点。20 个品系的多态信息含量 (PIC) 为 0.095~0.894,绝大多数高于城步、桂东和会同 3 个天然群体^[1],说明 20 个黑老虎品系具有较高的遗传多样性。其原因可能是:尽管 20 个品系绝大部分来自湖南通道县独坡镇虾团村,由于通道县位于湖南、贵州和广西三省(区)交界处,亦是人工种植黑老虎最早的地区之一^[2],当地种植大户从各地广泛收集黑老虎种质资源进

表 5 20 个黑老虎品系的指纹图谱
Tab. 5 Fingerprint map of 20 *K. coccinea* clones

| 品系 Clone | KCZ023 | KCZ029 | KCZ031 | KCZ035 | KCZ036 | KCZ038 | KCZ057 | KCZ058 | KCZ059 | KCZ061 | KCZ100 | KCZ103 | KCZ113 | KCZ135 | KCZ147 |
|-------------|----------------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------|----------------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| TD07 | 119/125 | 105/111 | 218/227 | 200 | 223 | 218 | 102/114 | 234 | 187 | 237 | 226/236 | 278 | 102 | 232 | 117/126 |
| TD08 | 101/115 | 105/111 | 218/227 | 200 | 214 | 209/218 | 102/114 | 234 | 183/191 | 237 | 228 | 272/290 | 98/100 | 220/235 | 126/129 |
| TD19 | 109 | 105/111 | 218/227 | 191/203 | 214 | 209/218 | 102 | 234 | 191/195 | 237 | 228/230 | 278 | 98/104 | 229/232 | 126 |
| TD21 | 111/123 | 105/111 | 218 | 203 | 214/229 | 215/218 | 114 | 226/234 | 191 | 247 | 226/230 | 278 | 98/100 | 229/232 | 120/126 |
| TD22 | 109 | 105/111 | 218/227 | 191/203 | 229 | 215 | 102/114 | 234 | 191 | 247 | 228/230 | 274/278 | 96/102 | 226/235 | 117/126 |
| TD23 | 107/117 | 111/120 | 218/227 | 191/197 | 229 | 209/215 | 106/114 | 234 | 195 | 237 | 230/244 | 274/276 | 102 | 229/232 | 126 |
| TD40 | 113/115 | 111/120 | 218 | 197/200 | 229 | 209 | 106/114 | 234 | 191 | 237 | 228/230 | 276 | 102 | 235 | 126/129 |
| TD41 | 109/121 | 111/120 | 218 | 200 | 229 | 218 | 114 | 234 | 183/191 | 237 | 228 | 276/278 | 98/102 | 223 | 126 |
| TD42 | 107/115 | 105/111 | 218/227 | 194/200 | 229 | 218 | 102/114 | 234 | 187 | 247 | 228 | 278 | 98/102 | 232/235 | 126 |
| TD43 | 107 | 105/111 | 218/227 | 191/194 | 229 | 209/218 | 102/114 | 234 | 179/191 | 247 | 228 | 274 | 98 | 235 | 117/126 |
| TD44 | 105/117 | 111/120 | 218/227 | 200 | 229 | 209/218 | 102/110 | 226/234 | 179/203 | 237 | 226 | 274 | 98/102 | 232/235 | 123/126 |
| TD45 | 103/123 | 105/111 | 218 | 200/203 | 229 | 209/218 | 114 | 234 | 179/187 | 237 | 226 | 278 | 102 | 235 | 126/129 |
| TD46 | 107/115 | 105/111 | 218/227 | 194/197 | 229 | 209 | 114 | 234 | 187/191 | 237 | 226 | 278 | 100/102 | 235 | 123/126 |
| TD47 | 107/115 | 105/111 | 218 | 200 | 223/229 | 218 | 114 | 234 | 191 | 247 | 226/228 | 274/278 | 98/102 | 232 | 129 |
| TD50 | 111/113 | 111 | 218 | 200 | 229 | 209 | 114 | 234 | 191 | 247 | 228 | 278 | 96/98 | 235 | 126/129 |
| TD51 | 109/115 | 105/111 | 218 | 194 | 226/229 | 209/218 | 102/114 | 234 | 191 | 247 | 226/228 | 278 | 98/102 | 235 | 126 |
| TD52 | 103/107 | 111 | 218 | 200 | 229 | 218 | 110/114 | 234 | 191/195 | 237 | 226/228 | 278 | 102/104 | 232/235 | 126 |
| TD54 | 107/125 | 111 | 218 | 191 | 229 | 218 | 114 | 234 | 179/187 | 247 | 228/238 | 278 | 96/98 | 229/235 | 117/129 |
| ZJ34 | 103/129 | 105/111 | 218/224 | 194/200 | 214/229 | 209/218 | 114 | 234 | 179/187 | 237 | 226/240 | 278 | 96 | 232 | 126 |
| ZJ40 | 103/127 | 111 | 218 | 194 | 214/229 | 206/218 | 102/114 | 234 | 179/191 | 237 | 228 | 278 | 96 | 229/232 | 126 |

注：数字为以碱基数表示的等位基因，加粗为相应位点可鉴别的基因型。

Note: Figures refer to alleles presented with number of bases, and the bolds refer to genotypes which can be identified at the relevant locus.

行种植，湖南省植物园在当地种植大户的基础上也开展了黑老虎种质资源的收集、保存和新品种（系）选育研究，使选育的品种（系）多样性较为丰富。

20 个黑老虎品系间的遗传相似系数为 0.328~0.891，依据遗传相似系数进行 UPGMA 聚类分析，可将 20 个黑老虎品系划分为 2 个类群，其亲缘关系与各品系的果色、果形、风味等性状并无明显的相关性。如，TD45 和 TD46 两个品系的亲缘关系最近，而果实颜色迥异，分别为紫黑色和粉色；同为早熟的 TD44 和 TD47 两个品系的亲缘关系较远，分别属于不同的类群；亲缘关系最远的 2 个品系 TD07 和 TD43 在果色和口感上也差异明显，前者为虎绿、口感一般，而后者通常为紫红色，果肉多且甜。这与本研究使用的 SSR 标记有关，因为这些 SSR 标记是通过简化基因组测序开发而获得的^[1]，多为中性标记。

目前黑老虎种质主要通过嫁接方式无性系化进行推广应用。本研究构建了 20 个黑老虎品系的

SSR 指纹图谱，从 3 个 2 位点组合和 28 个 3 位点组合中选择任意组合均能将 20 个品系完全区分。15 个位点中，满足 $PIC > 0.5$ 和 $PI < 0.2$ 的位点为 KCZ023、KCZ035、KCZ059、KCZ100、KCZ113 和 KCZ135，说明这些位点均具有足够的区分能力^[16]，其组合可优先应用于黑老虎品系的鉴定。尽管严格意义上而言，对于有限数量的品系，DNA 指纹图谱可用于区分品系，但未能应用于直接鉴定^[18]。然而这 20 个品系涵盖了目前生产上应用的种质，应用这些 SSR 指纹图谱，可以区分在形态上相似的品系，如，果色同为虎绿的 TD07 和 TD52，同为长形果的 TD42 和 TD50；亦可以为黑老虎品系嫁接苗的管理提供参考^[19]。

综上所述，本研究揭示了 20 个黑老虎品系的遗传多样性和亲缘关系，构建了 SSR 指纹图谱，能够准确区分这些品系，不仅利于黑老虎品种（系）鉴定，也可应用于黑老虎的杂交亲本选配。黑老虎具有保健食用、药用以及观赏价值，随着新种质的不断挖掘，新品种（系）将不断涌现，

SSR 指纹图谱也需要不断更新;另一方面,针对其表型性状的独特性开发转录组 SSR 标记,并应用于 SSR 指纹图谱构建,从而使指纹图谱更好地应用于生产实践。

参考文献

- [1] 邹建文, 罗先权, 饶红欣, 李小飞, 颜立红, 何润华, 陈灵. 常绿木质藤本植物黑老虎基因组 SSR 特征分析及引物开发[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(4): 130-138.
ZOU J W, LUO X Q, RAO H X, LI X F, YAN L H, HE R H, CHEN L. Characters of genomic SSRs and development of 28 SSR markers for *Kadsura coccinea*, an evergreen woody vine[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(4): 130-138. (in Chinese)
- [2] 陆松全, 邹建文, 陆忠家, 王国晖, 罗先权, 饶红欣. 黑老虎种植园丰产栽培技术[J]. 湖南林业科技, 2020, 47(3): 128-131.
LU S Q, ZOU J W, LU Z J, WANG G H, LUO X Q, RAO H X. Technical essentials of high-yield cultivation for *Kadusura coccinea* orchard[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2020, 47(3): 128-131. (in Chinese)
- [3] 安泽伟, 曾霞, 胡彦师, 方家林, 程汉, 位明明, 黄华孙. SSR 分子标记在橡胶树栽培品种鉴定中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(2): 550-560.
AN Z W, ZENG X, HU Y S, FANG J L, CHENG H, WEI M M, HUANG H S. Identification of rubber tree clones based on simple sequences repeats molecular markers[J]. Journal Plant Genetic Resources, 2021, 22(2): 550-560. (in Chinese)
- [4] UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction//BMT Guidelines (proj.9)[C]. Geneva: UPOV, 2007.
- [5] 孙利娜, 周群, 黄妹平, 周长品, 徐世松, 杨舒婷, 杜铃, 甘四明, 唐庆. 基于 SSR 标记构建宝巾花品种的分子指纹[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2019, 43(6): 60-66.
SUN L N, ZHOU Q, HUANG M P, ZHOU C P, XU S S, YANG S T, DU L, GAN S M, TANG Q. Using the SSR fluorescent labling to establish SSR fingerprint for 131 cultivars in *Bougainvillea* (Nyctaginaceae)[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2019, 43(6): 60-66. (in Chinese)
- [6] ZURN J D, NYBERG A, MONTANARI S, POSTMAN J, NEALE D, BASSIL N. A new SSR fingerprinting set and its comparison to existing SSR-and SNP-based genotyping platforms to manage *Pyrus* germplasm resources[J]. Tree Genetics & Genomes, 2020, 16: 72.
- [7] 包文泉, 乌云塔娜, 赵罕, 杜红岩. 基于 SSR 标记的仁用杏主栽品种鉴别和指纹图谱构建[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(6): 163-169.
BAO W Q, WUYUN T N, ZHAO H, DU H Y. Identification and fingerprinting construction of accessions of kernel-using apricot by SSR markers[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2017, 45(6): 163-169. (in Chinese)
- [8] 周于波, 朱鹏, 龚伟, 王景燕, 闫思宇, 吴开志. 四川核桃良种 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(7): 1254-1261.
ZHOU Y B, ZHU P, GONG W, WANG J Y, YAN S Y, WU K Z. SSR fingerprinting construction and genetic diversity analysis of elite *Juglans regia* cultivars in Sichuan[J]. Acta Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(7): 1254-1261. (in Chinese)
- [9] 何旭东, 郑纪伟, 田雪瑶, 教忠意, 窦全琴. 薄壳山核桃品种亲缘关系分析与指纹图谱构建[J]. 林业科学研究, 2021, 34(4): 95-102.
HE X D, ZHENG J W, TIAN X Y, JIAO Z Y, DOU Q Q. Genetic relationship analysis and fingerprint construction of *Carya illinoensis* varieties[J]. Forest Research, 2021, 34(4): 95-102. (in Chinese)
- [10] 段永红, 雷海英, 张旭, 吴玉香, 孙毅. 药用植物苦参 EST-SSR 标记的开发及 DNA 指纹图谱的构建[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(9): 21-31.
DUAN Y H, LEI H Y, ZHANG X, WU Y X, SUN Y. Development of EST-SSR markers and construction of DNA fingerprinting in *Sophora flavescens*[J]. Journal of China Agricultural University, 2018, 23(9): 21-31. (in Chinese)
- [11] 贾会霞, 姬慧娟, 胡建军, 卢孟柱. 杨树新品种的 SSR 指纹图谱构建和倍性检测[J]. 林业科学, 2015, 51(2): 69-70.
JIA H X, JI H J, HU J J, LU M Z. Fingerprints of SSR markers and ploidy detection for new *Populus* varieties[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(2): 69-70. (in Chinese)
- [12] 刘超凡, 张国君, 徐刚标. 杨树种质 SSR 指纹数据库构建[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(2): 97-104.
LIU C F, ZHANG G J, XU G B. Construction of SSR fingerprint database of *Populus* germplasm[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(2): 97-104. (in Chinese)
- [13] ZENG J, ZOU Y P, BAI J Y, ZHENG H S. Preparation of total DNA from 'recalcitrant plant taxa'[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(6): 694-697.
- [14] HUCLE D, LI X, SNYDER-LEIBY T, LIU C S J. GeneMarker[®] genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis[J]. Journal of Biomolecular

- Techniques, 2011, 22: S35-S36.
- [15] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 288-295.
- [16] LIU S R, LIU H W, WU A L, HOU Y, AN Y L, WEI C L. Construction of fingerprinting for tea plant (*Camellia sinensis*) accessions using new genomic SSR markers[J]. Molecular Breeding, 2017, 37(8): 93.
- [17] ROHLF F. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1[M]. New York: Applied Biostatistics, Spiegel-Roy, 2000.
- [18] KUNIHISA M, UEDA H, FUKINO N, MATSUMOTO S. DNA markers for identification of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivars based on probability theory[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2009, 78(2): 211-217.
- [19] CHEN Y N, DAI X G, HOU J, GUAN H W, WANG Y X, LI Y, YIN T M. DNA fingerprinting of oil camellia cultivars with SSR markers[J]. Tree Genetics & Genomes, 2016, 12: 7.