

基于 SSR 分子标记的裸花紫珠种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建

张红瑞¹, 李 鑫^{1,2}, 陈振夏², 胡文斌², 李 伟³, 黄 梅^{2*}, 于福来^{2*}, 杨林立⁴

1. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450046

2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 农业农村部中药材生物学与栽培重点实验室/海南省热带药用植物工程研究中心, 海南 海口 571101

3. 海南九芝堂药业有限公司, 海南 海口 570311

4. 河南省中医院, 河南 郑州 450053

摘要: 目的 研究裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* 种质资源遗传多样性, 为其种质资源鉴定及优异种质筛选提供依据。方法 采用 SSR 分子标记技术, 探究 103 份裸花紫珠种质遗传多样性, 基于遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 以 SSR 扩增条带为基础建立供试材料扩增条带 DNA 指纹图谱。结果 14 对引物共扩增出 92 个等位基因 (number of alleles, N_a), 有效等位基因 (effective number of alleles, N_e) 占比 39.37%。平均多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 为 0.468 2, 6 对引物具有高度多态性 ($PIC > 0.5$), 6 对具有中度多态性 ($0.25 < PIC < 0.5$)。平均 Nei 多样性指数 (Nei's gene diversity index, H) 和 Shannon 指数 (Shannon's information index, I) 分别为 1.039 0、0.505 1, 表现出较高的遗传多样性水平。聚类分析将材料分为 2 大类: 类群 I 包括 2 份种质; 类群 II 包含 101 份种质, 并分为 2 个亚类。主坐标分析将材料分为 3 个类群, 与聚类结果基本一致。构建的指纹图谱通过引物组合能较好地将种质进行区分。结论 103 份裸花紫珠种质具有丰富的遗传多样性, 并成功利用 14 对 SSR 引物构建裸花紫珠种质 DNA 指纹图谱, 可为裸花紫珠种质鉴定、亲缘关系以及分子辅助育种提供科学依据。

关键词: 裸花紫珠; SSR 分子标记; 遗传多样性; 遗传距离; 聚类分析; 主坐标分析; DNA 指纹图谱

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3971-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.023

Genetic diversity analysis and DNA fingerprints construction of *Callicarpa nudiflora* germplasm resources based on SSR markers

ZHANG Hong-rui¹, LI Xin^{1,2}, CHEN Zhen-xia², HU Wen-bin², LI Wei³, HUANG Mei², YU Fu-lai², YANG Lin-li⁴

1. College of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China

2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Biology and Cultivation of Herb Medicine (Haikou), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Hainan Provincial Engineering Research Center for Tropical medicinal plants, Haikou 571101, China

3. Hainan Jiuzhitang Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou 570311, China

4. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity and genetic relationship of Luohuazizhu (*Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.) germplasm resources, provide the basis for identification of germplasm resources and screening of excellent germplasm resources. **Methods** Genetic diversity of 103 germplasm resources was explored by SSR molecular marker technique, UPGMA cluster analysis was carried out based on genetic distance, and DNA fingerprints of amplified bands of tested materials were established

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2021001); 海南省自然科学基金项目 (322QN393)

作者简介: 张红瑞, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药资源与栽培。E-mail: zhanghongrui2003@126.com

*通信作者: 于福来, 博士, 研究员, 主要从事中药 (南药) 资源定向培育研究。E-mail: fulai.yu@163.com

黄 梅, 硕士, 助理研究员, 主要从事南药种质资源评价及规范化栽培。E-mail: huangmei122@126.com

based on SSR amplified bands. **Results** A total of 92 alleles (N_a) were amplified by 14 pairs of primers, effective number of alleles (N_e) accounted for 39.37%. The average polymorphism information content (PIC) was 0.468 2, six pairs of primers were highly polymorphic ($PIC > 0.5$) and six pairs were moderately polymorphic ($0.25 < PIC < 0.5$). The average Nei's gene diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 1.0390 and 0.5051, showing a high level of genetic diversity. Cluster analysis divided the materials into two categories: Group I included two germplasm; Group II contains 101 germplasm resources and is divided into two subclasses. Principal coordinate analysis divided the materials into three groups, which were basically consistent with the clustering results. The constructed fingerprint can distinguish germplasm by primer combination. **Conclusion** A total of 103 germplasms have rich genetic diversity. The DNA fingerprint of *C. nudiflora* germplasms was successfully constructed by 14 pairs of SSR primers. The results can provide scientific basis for germplasm identification, genetic relationship and molecular assisted breeding of *C. nudiflora* germplasms.

Key words: *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.; SSR molecular marker; genetic diversity; genetic distance; cluster analysis; principal coordinate analysis; DNA fingerprinting

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn 为马鞭草科紫珠属植物, 干燥叶入药, 主产于海南、广东、广西等省份, 是海南省道地药材和黎药大品种, 为《中国药典》2020 年版唯一新增收载药材, 具有消炎、解肿毒、化湿浊、止血等功效^[1]。课题组前期对海南岛裸花紫珠种质资源进行调查, 发现生产上尚无优势品种, 人工栽培种苗大部分来源于自留种, 长期以来会导致种质混杂, 药材产量与质量参差不齐^[2], 因此对现有种质资源进行鉴定、厘清种质种源亲缘关系, 对于后续指导裸花紫珠药材新品种选育显得尤为重要。

DNA 分子标记是研究种质资源遗传多样性及分子辅助育种的重要手段, 主要包括随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 等^[3]。早期的 RAPD、AFLP 等传统标记技术由于多态性信息含量低、分型不稳定、重复性差不适合做种质资源鉴定, 而 SSR 分子标记因其多态性高、重复性好的特点被广泛应用于遗传多样性分析和亲缘关系鉴定等^[4]。近年来, SSR 分子标记逐步应用于裸花紫珠研究当中, 于福来等^[5]对裸花紫珠进行基因组调研及 SSR 特征分析, 发现其单、双、三核苷酸重复序列占比较高。彭云露^[6]利用 MISA 软件对 6 份裸花紫珠进行 SSR 位点搜索, 筛选出 22 对引物进行多态性分析, 发现在分子水平上的变异较小, 因使用的样本数量较少, 难以全面反映出裸花紫珠基因型差异。

鉴于此, 本研究扩大样本数量, 基于基因组和转录组信息, 利用 SSR 分子标记对来自我国 3 省 23 县 (市) 共计 103 份裸花紫珠种质进行遗传多

样性分析, 建立了裸花紫珠 DNA 指纹图谱, 为裸花紫珠种质鉴定、优异种质筛选以及分子辅助育种等提供理论依据, 并为后续充分发掘利用裸花紫珠种质资源、选配育种亲本等工作奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 药材 实验样品为来自 3 省 23 县 (市) 的 103 份裸花紫珠野生种或半野生种, 集中种植于农业部儋州热带药用植物种质资源圃, 由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所于福来副研究员鉴定为马鞭草科紫珠属植物裸花紫珠 *C. nudiflora* Hook. et Arn, 其中 93 份来自于海南, 5 份来自于广东, 5 份来自于广西, 具体信息见表 1, 103 份种质中不同编号代表来自不同乡镇、村落的裸花紫珠种质。

1.1.2 试剂 2×Taq PCR Master Mix (美国基因泰克公司), DL 2000 DNA Marker (美国基因泰克公司), 琼脂糖 (美国基因泰克公司), 10 μL/200 μL 移液吸头 (爱思进生物技术有限公司), 96 孔 PCR 板 (爱思进生物技术有限公司), 磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化有限公司), 普通引物/荧光标记引物 (天一辉远有限公司), GeneScan 500 LIZ Size Standard (美国应用生物系统公司), POP-7 Polymer (美国应用生物系统公司), Hi-Di Formamide (美国应用生物系统公司)。

1.2 仪器

Mikro 120 型台式离心机 (MIKRO 公司), Veriti 96 型 PCR 仪 (美国应用生物系统公司), DYY-6C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司), Gel Doc TM XR+型紫外分析仪 (美国伯乐公司), King Fisher™ Flex 型核酸提取仪 (赛默飞有限公司), 3730XL 型基因分析仪 (美国应用生物系统公司)。

表 1 供试材料来源
Table 1 Source of germplasms

来源	样本数	样本编号	资源类型
广西北海	1	81	野生种
广西南宁	1	82	半野生种
广西钦州	3	78、83~84	野生种
广东湛江	1	77	野生种
广东茂名	4	79~80、85~86	野生种
海南澄迈	1	9	半野生种
海南保亭	1	74	半野生种
海南琼海	1	99	野生种
海南文昌	1	67	野生种
海南陵水	1	75	半野生种
海南陵水	2	73、87	野生种
海南三亚	3	91、102~103	野生种
海南儋州	4	88~89、96~97	野生种
海南屯昌	1	49	半野生种
海南屯昌	4	38、53、55、62	野生种
海南万宁	1	94	半野生种
海南万宁	4	66、71、92、95	野生种
海南昌江	5	90、93、98、100~101	野生种
海南琼中	6	22、46、51、58、61、72	野生种
海南定安	6	23、31、41~42、44、47	野生种
海南乐东	6	33、40、54、60、63、65	野生种
海南海口	7	26、39、43、48、52、57、59	野生种
海南五指山	2	35、45	半野生种
海南五指山	6	10~12、14~15、17	野生种
海南临高	8	13、25、27~28、32、34、36~37	野生种
海南东方	11	20~21、24、29~30、50、56、64、68~69、76	野生种
海南白沙	1	70	半野生种
海南白沙	11	1~8、16、18~19	野生种

2 方法

2.1 总 DNA 提取与检测

采集供试材料的幼嫩叶片，液氮冷冻保存，使用磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化）提取 103 份裸花紫珠嫩叶样品的总 DNA，使用 Nano DROP 8000 超微量分光光度计检测核酸浓度和纯度， A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0，表明 DNA 提取纯度较高，最终调整 DNA 浓度为 50~200 ng/L 用于进一步研究。

2.2 SSR 引物的合成、筛选与 PCR 扩增

依据课题组前期测序结果，由天一辉远生物科技有限公司合成 384 对 SSR 引物。选择编号分别为 1、2、8、12、50、54、61、77、81、86 的 10 份遗传背景差异较大的裸花紫珠种质的混合 DNA 样本，对合成的 SSR 引物进行初步筛选，并对初筛引物进行复筛和验证，最终筛选出 14 对条带清晰、多态性高及稳定性好的核心引物（表 2）。

SSR 的 PCR 扩增反应体系（10 μ L）为：2×

Taq PCR Master Mix 5.0 μ L，基因组 DNA（~20 ng）1 μ L，上游引物（浓度 10 pmol/ μ L）0.5 μ L，下游引物（浓度 10 pmol/ μ L）0.5 μ L，ddH₂O 3.0 μ L。PCR 反应在 Veriti 96 PCR 仪（Applied Biosystem）上进行。反应程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，62~52 $^{\circ}$ C 梯度退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，10 个循环，每个循环下降 1 $^{\circ}$ C；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，52 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，25 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 20 min，4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 扩增产物检测

荧光 PCR 扩增完成后，取 3 μ L 荧光 PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，检测 PCR 条带是否单一、片段大小是否与预期一致。条带单一且大小相符的，对照 DNA Marker 的浓度进行定量，将所有产物稀释至相同的浓度范围。取 10 μ L 甲酰胺和 0.5 μ L 内标混匀，加入 1 μ L PCR 稀释产物，上 ABI 3730xl 仪器进行毛细管电泳检测。

表 2 14 对 SSR 引物序列信息

Table 2 Sequences of 14 pairs of SSR primers

引物名称	重复单元	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp	荧光基团
CnH078	(TCC) ₅	F: AGGCACCTAGCTAGACACCA R: ACGCTCAGGTAGTTGGTGTG	177~184	FAM
CnH080	(GAT) ₇	F: ACATCCGGTGCATCCTTTCT R: TTCCTTCAAGCACCTGTCCC	292~301	FAM
CnH107	(ATCA) ₅	F: ACGCCTTCCATTATGCACGA R: GCGCGAGTTTGTAGTGGTGA	137~148	HEX
CnH138	(CTTTT) ₅	F: GGCTGTGGTCCAAGAAAGGT R: AGAAGTTACAGAGCCAAACCA	202~208	FAM
CnH147	(TGA) ₅	F: CCGAGGCAAAGTTCCAACCA R: CCACTGATAAACCAACGAGCC	157~162	FAM
CnH155	(TCT) ₁₃	F: CACAGAAACAACACGGCCAG R: GCGTTTCGACTGCATTCGAT	259~277	HEX
CnH156	(AAG) ₁₂	F: GGCCCTGATGCTTCTTCTGT R: CCTTATAACGCACGCATGGC	277~301	TAMRA
CnH182	(TCT) ₁₅	F: ATCTCTGTCTCACAAGCGCC R: CACCGGAACCCTGCATGTAA	251~286	FAM
CnH205	(AAT) ₁₃	F: GGTATGTCTCATGTGCGCGA R: TTGCGTTCACGATGCTTTGG	250~269	HEX
CnH220	(TTC) ₁₄	F: CCCAAGAAGAGCTGTCCACA R: CCTCAGCATGCAGAACTGG	186~204	HEX
CnH275	(GTA) ₈	F: GAGGCTGGTTTGGAGTGGAA R: TGTGTCCAAAGGCATCGTGA	238~253	FAM
CnH304	(ATA) ₁₁	F: ACCAAGCTGCAATTCCCAAG R: ACCAAATCTTAGGTCCACATCCT	276~298	HEX
CnH305	(CCA) ₈	F: CAGCGCAGGATTGTTGATCA R: GGGTAAACAGTGGGTGGAGG	264~270	FAM
CnH357	(AACC) ₅	F: CCCACCAAGTGAAAGGCTTCT R: CGATGTGGGCTGTGATCGTA	210~222	HEX

2.4 数据处理及分析方法

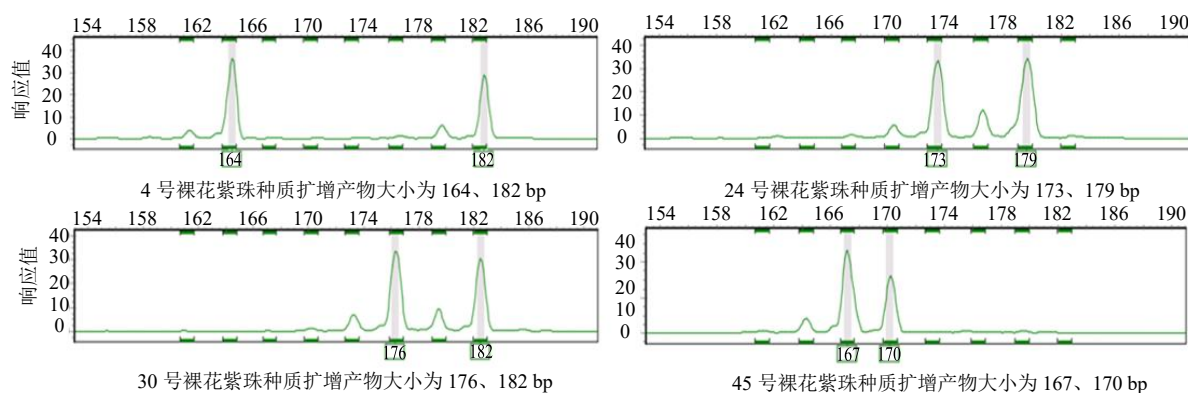
将电泳结果导入 GeneMarker 分析软件中, 进行基因型数据的读取, 并按位点名称分别导出 Excel 基因型原始数据和 PDF 分型峰图文件。利用 GenALEx 6.502 将 SSR 分子标记的结果转化为 txt 文本格式。Popgene 32^[7]计算各 SSR 位点的等位基因数 (number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、Shannon's 信息指数 (shannon's information index, I) 以及基因多样性指数 (nei's gene diversity index, H)。PowerMarker 3.25^[8]计算 PIC 值。NTSYS-version 2.10e^[9]计算遗传距离, 并绘制遗传距离三维图。MEGA 6.06^[10]绘制环形遗传聚类图谱。GenALEx 6.502^[11]绘制主坐标分析图。

3 结果

3.1 SSR 引物遗传多样性分析

对所筛选出的 14 对引物进行 PCR 扩增, 通过 DNA 分析仪对扩增产物进行分析, 准确获得裸花

紫珠不同种质在各位点等位基因的片段大小及相应的电泳图, 部分检测结果如图 1 所示。14 对核心 SSR 引物参数见表 3, 103 份样品中共扩增 92 个 N_a , 平均每对引物扩增 6.571 4 个, 变化范围 3~13 个; N_e 变化范围在 1.081 8~4.947 2, N_e 变异占比 39.37%; I 范围在 0.211 3~1.808 5, 其中 4 对引物达到 1.5 以上; H_e 变化范围在 0.076~0.801 8, 平均为 0.507 5 ($H_e > 0.5$), 提示供试材料遗传多样性较高^[12]; H_o 变化范围在 0.009 7~0.87, 平均为 0.357 0, 仅 1 个引物的 H_e 小于 H_o 外, 其余引物 H_e 均大于 H_o , 这说明供试种质内杂合子过剩现象少^[13]; 平均多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 值变化范围在 0.074 7~0.768 4, 平均为 0.468 2, 具有中度多态性 ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$), 其中 6 对引物具有高度多态性 ($\text{PIC} > 0.5$), 6 对引物为中度多态性 ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$)。本研究中, 高 PIC 值的引物占 42.9%, 表明这些 SSR 位点可从分子水平解释基因型差异, 具有丰富的遗传差异性, 可作为有效标记来构建裸花紫珠种质 DNA 指纹图谱。



部分裸花紫珠种质用 CnH220 引物扩增产物的毛细管电泳检测图示例, CnH220 引物在所有样品中共扩增多态性位点 7 个, 分别是 164、167、170、173、176、179、182 bp

Examples of capillary electrophoresis detection of CnH220 primer amplification products for some *C. nudiflora*, CnH220 primers amplified 7 polymorphic loci in all samples, which were 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182 bp, respectively

图 1 裸花紫珠 CnH220 引物扩增产物的毛细管电泳检测图

Fig. 1 Image of capillary electrophoresis detection results of amplified products of *C. nudiflora* with CnH220 primer

表 3 14 对核心 SSR 引物遗传多样性分析

Table 3 Genetic diversity analysis of 14 pairs of core SSR primers

引物名称	N_a	N_e	H_o	H_e	I	PIC	H
CnH078	5	2.352 6	0.436 9	0.577 7	0.999 5	0.484 6	0.574 9
CnH080	5	2.987 2	0.485 4	0.668 5	1.172 7	0.598 4	0.665 2
CnH107	10	4.657 7	0.870 0	0.789 2	1.808 5	0.761 4	0.785 4
CnH138	4	1.433 7	0.242 7	0.304 0	0.591 3	0.280 0	0.302 5
CnH147	3	1.179 5	0.009 7	0.152 9	0.303 4	0.142 0	0.152 2
CnH155	8	1.609 9	0.330 1	0.380 7	0.888 8	0.366 1	0.378 8
CnH156	8	4.296 5	0.529 4	0.771 0	1.622 7	0.732 0	0.767 3
CnH182	10	3.845 5	0.470 6	0.743 6	1.592 2	0.700 2	0.740 0
CnH205	6	1.377 5	0.130 0	0.275 4	0.587 2	0.257 0	0.274 1
CnH220	7	4.947 2	0.607 8	0.801 8	1.700 8	0.768 4	0.797 9
CnH275	5	1.081 8	0.058 3	0.076 0	0.211 3	0.074 7	0.075 6
CnH304	13	2.724 0	0.313 1	0.636 1	1.457 3	0.601 8	0.632 9
CnH305	3	1.963 5	0.252 4	0.493 1	0.721 9	0.379 5	0.490 7
CnH357	5	1.764 5	0.262 1	0.435 4	0.888 4	0.408 7	0.433 3
合计	92	36.221 1	—	—	—	—	—
平均值	6.571 4	2.587 2	0.357 0	0.507 5	1.039 0	0.468 2	0.505 1
标准差	2.821 2	1.299 9	—	—	0.510 4	—	0.233 0

3.2 裸花紫珠种质资源遗传距离分析

基于 NTSYS-pc 2.10 软件计算 103 份裸花紫珠种质间遗传距离及构建遗传距离矩阵, 绘制三维曲面图 (图 2), 103 份供试材料间遗传距离范围在 0~2.791 7, 大多数种质遗传距离在 0.5~1.0, 平均遗传距离为 0.634 2, 遗传距离较大, 表明各供试材料间具有丰富的遗传多样性。其中编号为 93 (海南昌江

县) 的种质和编号为 2 (海南五指山市) 的种质遗传距离最大 (2.791 7), 表明 2 个种质间遗传背景差异大, 亲缘关系远。另外, 来自广东的种质平均遗传距离为 0.644 3, 来自广西的种质平均遗传距离为 0.661 3, 来自海南的种质平均遗传距离为 0.616 5, 3 个省份供试材料间平均遗传距离差异较小, 表明遗传距离分析准确性强, 可信度高。

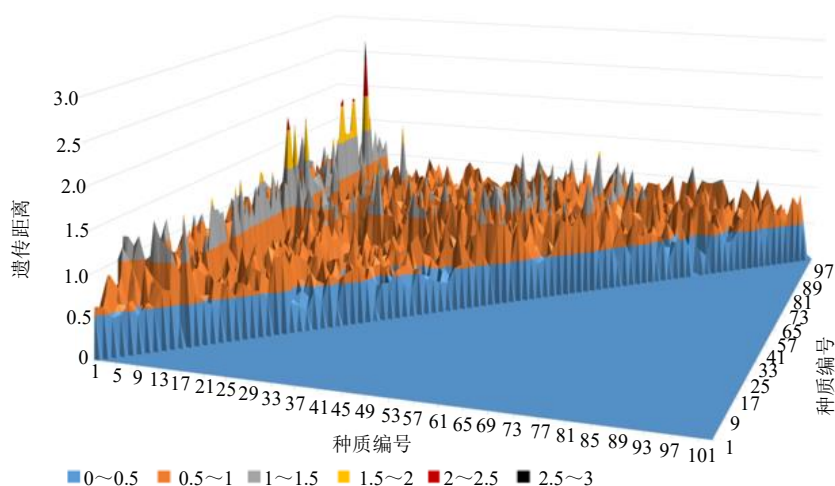


图 2 裸花紫珠种质资源的遗传距离三维图

Fig. 2 Three-dimensional surface plot of genetic distance of *C. nudiflora* germplasm resources

3.3 裸花紫珠种质资源的聚类分析

根据种质间遗传距离, 利用 UPGMA 法对供试材料进行分类并得到聚类图 (图 3)。结果表明, 101 份裸花紫珠种质被有效区分, 编号 4 和编号 8 的种质 (均来自海南白沙) 未被区分开, 聚类在可信度 0.3515 处将 103 份种质分为 2 大类 (类群 I、类群 II)。类群 I 包括 2 份裸花紫珠种质, 分别是编号 11 和编号 12 (均来自海南五指山); 类群 II 被分为 2 个亚类群 (II-1 和 II-2): 亚类群 II-1 包括编号 2 (海南白沙) 与编号 64 (海南东方) 的种质, 亚类群 II-2 包括其他 99 份种质, 在可信度 0.093 7 处

再次将亚类群 II-2 分为 3 个小类群, 小类群 II-2-1 包括编号为 68 和编号 69 的种质 (均来自海南东方), 小类群 II-2-2 包括编号为 54 (海南乐东)、66 (海南万宁)、57 (海南海口)、82 (广西南宁) 的种质, 小类群 II-2-3 含括其他 93 份种质, 包括来自广西北海和广西钦州的 4 份、广东省 5 份以及海南省 18 市 (县) 的 84 份种质。从聚类分析中可以看出, 有些位于同一地区的种质并未完全聚在一起, 而一些不同地区的则被聚为一类, 这可能是由于不同地区种质进化来源相同, 也有可能是不同种质在长期自然选择过程中存在基因交流的现象。

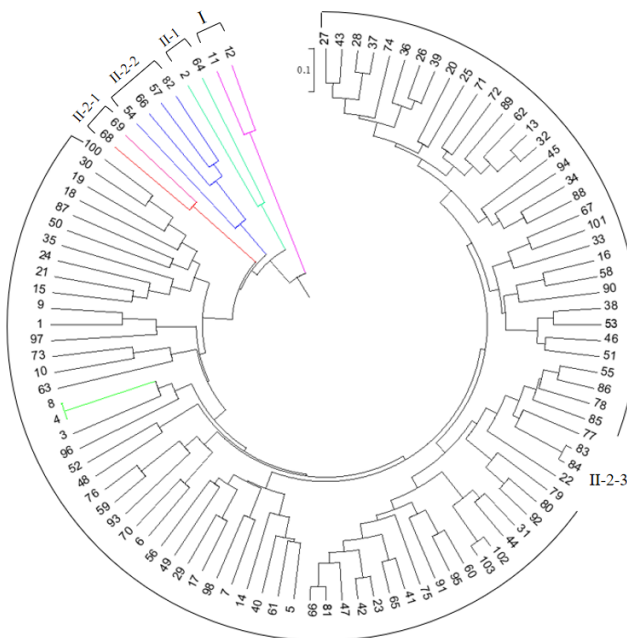


图 3 103 份裸花紫珠种质资源的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 103 *C. nudiflora* germplasm resources

3.4 裸花紫珠种质资源的主成分分析

为了更好地验证裸花紫珠种质间的遗传关系, 利用 GenAlEx 6.502 对供试材料进行主成分分析, 以第 1 主成分和第 2 主成分为二维坐标图的横坐标和纵坐标, 构建二维主成分分析图 (图 4), 其中主成分 1 解释率为 12.33%, 主成分 2 解释率为 8.96%。主成分分析将 103 份种质划分为 3 个类群, 每一类群均分布在不同象限内。

第 1 类包括 24 份种质, 主要分布在第 2 象限, 其中包含聚类分析中类群 I 的 2 份种质、亚类群 II-1 的 2 份种质、小类群 II-2-1 的 2 份种质、小类群 II-2-2 的 4 份种质以及小类群 II-2-3 中的 16 份种质。第 2 类主要分布在第 3 象限, 共聚集 18

份种质, 包含小类群 II-2-2 中的 1 份种质以及 II-2-3 中的 17 份种质。第 3 类材料最为丰富, 共 61 份种质, 在 4 个象限中均有分布, 但在第 1、4 象限分布较为集中, 包括聚类分析小类群 II-2-2 中的 3 份种质以及 II-2-3 中的 58 份种质, 其中来自广东、广西的 10 份种质被聚集在一起。主成分分析从不同角度直观反映出供试材料间的亲缘关系, 且种质在主坐标二维图中分布均匀, 表明其遗传多样性较为丰富^[15-16], 聚集在一起的裸花紫珠材料代表种质间遗传背景相似, 亲缘关系较近。本研究将 PCoA 主成分分析与 UPGMA 聚类分析相结合, 发现类群内对具体种质的分布高度一致, 两者分析结果可以相互佐证。

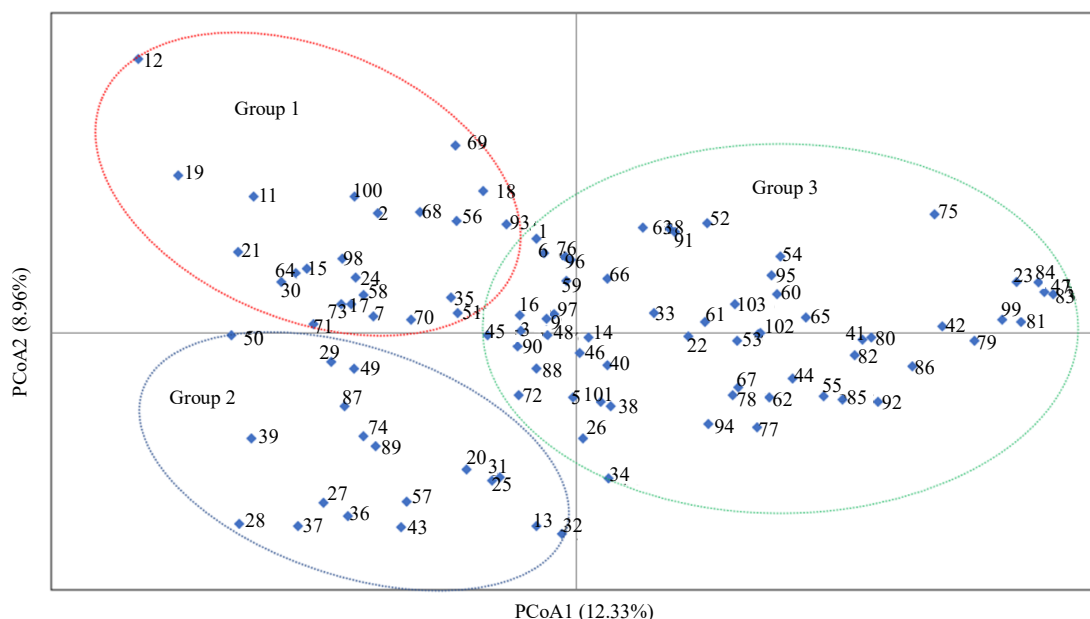


图 4 103 份裸花紫珠种质 SSR 标记主成分分析的二维点散图

Fig. 4 Two-dimensional scatter diagram of principal coordinate analysis of SSR markers in 103 *C. nudiflora*

3.5 构建裸花紫珠 DNA 指纹图谱

DNA 指纹图谱表现形式采用闵学阳等^[17]的方法, 根据扩增结果将有条带、无条带分别记为“1”和“0”, 根据 Botstein^[18]提出的理论, 指纹分析无法仅用 1 对引物将某个种质与其他种质区分开, 因此需要利用引物组合的方式进行区分。对 14 对引物进行多样性分析后, 选取具高度多态性的引物区分所有种质, 如不能全部鉴别, 增加一个引物进行区分, 直到将所有种质区分开。从表 3 可以看出, CnH080、CnH107、CnH156、CnH182、CnH220、CnH304 引物多态性信息含量高 (PIC > 0.5), 引用上述 6 对引物组合共区分出 99 个种

质, 还有 4 份种质未被区分。因此, 综合 PIC 值和等位基因数等因素, 增加 CnH078 引物进行鉴别, 共区分出 101 个种质, 将 14 对引物全部转换成指纹图谱 (表 4), 仍有 2 个种质 (编号 4 和编号 8) 无法完全区分开, 这与聚类分析结果一致, 这表明该 2 份材料可能为同一种质, 也可能与供试种质较多, 引物鉴别力下降有关^[19]。本研究首次利用 14 对引物构建出 101 份裸花紫珠种质资源 DNA 指纹图谱代码, 使每份种质都有各自唯一的一套 DNA 指纹, 可在分子水平上辅助解决裸花紫珠同名异种或者同种异名等种质混乱现象^[20], 也使裸花紫珠种质鉴定更加准确高效。

表 4 103 份裸花紫珠 DNA 指纹图谱
Table 4 DNA Fingerprint of 103 *C. nudifloa*

编号	引物 DNA 代码													
	CnH080	CnH107	CnH156	CnH182	CnH220	CnH304	CnH078	CnH357	CnH305	CnH155	CnH138	CnH205	CnH147	CnH275
1	11000	0000001000	00101000	0011000000	1000010	00010000000000	00011	00001	100	01000010	0110	011000	010	00010
2	11000	0000001000	01100000	0010000010	0000001	01010000000000	00010	01100	010	01000000	0101	001000	110	01010
3	11000	1000001000	00000000	0000010010	0000010	01000000000000	00101	00101	100	01000000	0100	001000	010	00010
4	01100	1000010000	01000000	0010100000	1000001	01100000000000	00101	00101	100	01000000	0110	001100	010	00010
5	01100	0000010010	00001100	0000001010	1000010	01000000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
6	01000	0000010000	00101000	0000110000	0001001	01010000000000	00101	01001	110	01000000	0010	001000	010	00010
7	11000	0000010000	01010000	0000010010	0010001	01010000000000	00101	00100	010	01000000	1010	001000	010	10010
8	01100	1000010000	01000000	0010100000	1000001	01100000000000	00101	00101	100	01000000	0110	001100	010	00010
9	11000	0000010010	00011000	0010000000	1000010	00010000000000	00001	00101	100	01010000	0010	001000	010	00010
10	10100	0000100010	00000100	0000001000	0010100	00000000000100	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
11	00100	0000100010	00001100	0110000000	1000010	01000100000000	00101	01000	010	01000000	1010	001010	010	00011
12	00100	0000000010	00001000	0100000000	0000010	00000100000000	00100	01000	010	01000000	0100	000010	010	00001
13	10000	0000010000	00100000	0000010000	0001010	01000000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
14	01100	0000010010	00000100	0010000000	0000101	00000000000100	00001	00100	110	01000000	0110	001000	010	00010
15	01000	0000010000	01000100	0100000000	0000110	01000100000000	00001	01000	010	01000100	0010	001000	010	00010
16	01100	0100010000	00011000	0010000000	0000110	01000000000000	00101	00100	010	01000000	1010	001000	010	00010
17	00100	0000010010	00101000	0000010010	0000000	01100000000000	00101	00100	010	01010000	0010	001000	010	00010
18	01100	0010010000	01010000	0100010000	0011000	00110000000000	00110	01010	110	01000010	0010	001000	010	00010
19	01100	0000010010	00001000	0000010000	1000000	01010000000000	00101	01000	010	00100010	0110	001000	010	00010
20	10000	0000010010	00011000	0000010000	0010010	01000000000000	00011	00100	100	01000001	0010	001000	010	00010
21	01100	0010010000	01010000	0101000000	0000010	01010000000000	00011	00110	010	01000100	0110	001000	010	00010
22	01100	0100010000	00010010	0010010000	0001010	01000001000000	00101	00101	100	01000000	0010	001000	010	00010
23	01000	0100001000	00100000	0010000000	0000100	01010000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
24	01001	0000100100	01010000	0100000000	0001010	01000000000000	00001	00010	110	00001100	0010	001000	010	00010
25	10000	0000010010	00010100	0000010000	0000110	10100000000000	00001	00100	100	01000000	1010	011000	010	00010
26	10000	0010010000	00100000	0000010000	0000011	00100000000000	00101	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
27	10000	0010010000	00100100	0010010000	0000010	01000000000000	00001	00100	010	01000000	0010	011000	010	00010
28	10000	0000001010	00000100	0000010000	0000010	01000000000000	00001	00100	010	01000000	0010	001000	010	00010
29	10100	0000010010	00101000	0110000000	0010001	01100000000000	00001	00100	010	01000000	0010	001000	010	00010
30	01100	0000010010	00011000	0100010000	0000101	00100000000000	00001	00100	010	01000010	0110	001000	010	00010
31	00100	0010010000	00100100	0000010000	0000010	01000000000000	00001	00100	100	11000000	0010	001000	010	00010
32	10000	0100010000	00100000	0000010000	0000110	01000000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
33	10100	0010010000	00001010	0110000000	0001010	00000010000000	00110	00100	100	01000010	0010	001000	010	00010
34	11000	0000100100	00100100	0010010000	0000010	01000000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
35	01100	0010010000	00000100	0100010000	0001000	01000010000000	00001	00001	110	01000100	0110	010100	010	00010
36	10000	0010010000	00000100	0000010000	0000010	01100000000000	00001	00100	110	01000000	1010	001000	010	00010
37	10000	0000010010	00000100	0000010000	0000110	01000000000000	00001	00100	010	01000000	0010	001000	010	00010
38	00100	0010010000	00010000	0100000000	0000100	01000000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
39	10100	0010010000	00100000	0000010000	0000010	00100000000000	00001	00100	010	01000000	0010	001000	010	00010

续表 4

编号	引物 DNA 代码													
	CnH080	CnH107	CnH156	CnH182	CnH220	CnH304	CnH078	CnH357	CnH305	CnH155	CnH138	CnH205	CnH147	CnH275
40	01100	0000010010	00100000	0000001010	0010001	0100000000000	00001	00100	100	01010000	0010	001000	010	00110
41	01000	0000010010	00100000	0000010000	0001100	0100000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
42	11000	0010001000	00100000	0010000000	0000100	0101000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
43	10000	0010010000	00000100	0000010000	0000100	0100000000000	00001	00100	010	01000000	0010	010000	010	00010
44	00100	0010010000	00100000	0000010000	0000100	0100000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
45	01010	0010010000	00100100	0010010000	0110000	0100000000000	00101	01100	010	01000000	0010	001000	010	00010
46	10100	0010010000	00110000	0010001000	0001100	0100000000000	00101	01100	110	01000000	0010	001000	010	00010
47	01000	0100010000	00100000	0010000000	0001100	0100000000000	00100	00100	100	01000000	0010	000000	010	00010
48	10000	0010010000	00100000	0010000000	0000010	0010000000000	00100	00100	010	01000000	0010	010000	010	00010
49	10000	0100010000	00110000	0010000000	0001001	0100000100000	00001	01100	010	01010000	0010	001000	010	00010
50	10100	0100010000	00001000	0100010000	0000110	0000100000000	00001	00100	011	00010100	0110	001000	010	00010
51	00100	0010010000	00110000	0100010000	0000110	0000000000110	00101	01100	110	01000000	0010	001000	010	00010
52	01000	0010010000	00000100	0010000000	0001000	0010000000000	00100	00100	010	11000000	1010	001000	010	00010
53	10000	0010010000	00010000	0100000000	0000100	0010000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
54	11000	0010001000	01100000	1000100000	0011000	0100000000000	00100	01100	100	00010100	0010	110000	001	00010
55	01000	0100010000	00010000	0010000000	0000100	0100000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
56	01000	0100010000	00100000	0000001010	1000001	0110000000000	00101	01100	010	01000000	0110	001000	010	00010
57	10000	0010001000	00000100	0000010000	0001100	0100000000000	00001	00100	010	11000000	0010	010000	001	00010
58	11000	0000000000	00011000	0000000000	0000110	0000000000000	00101	01100	010	01000000	0010	001000	010	00010
59	01000	0000100010	00100100	0100010000	0001010	0010000000000	00101	00100	110	01000000	0110	001000	010	00010
60	11000	0000010100	00100100	0100000000	0001000	0100000000000	00100	00101	100	01000010	0010	001000	010	00010
61	01100	0000010010	00000110	0010000010	0010000	0100000000000	00101	01100	100	01000000	0010	001000	010	00010
62	01000	0100010000	00100000	0000010000	0001100	0100001000000	01001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
63	00101	0000000000	00110000	0010001000	0011000	0100000000000	00100	00010	110	01000000	0010	000000	010	00010
64	10100	0000001001	01100000	0000010010	1000001	0000100000100	00001	01010	110	01010000	0110	001000	001	00010
65	01000	0000010010	01100000	0100010000	0000100	0100000000000	00110	00100	100	01010000	0010	001000	010	00010
66	10100	0010001000	00010100	0010000000	0010100	0100000000000	00100	00100	010	01000100	0110	000100	001	00010
67	10100	0100010000	00000100	0010000000	0000011	0000000010100	00101	00100	100	01000000	0010	001001	010	00010
68	11000	0000100010	00101000	0000010000	1010000	0000000001001	00101	00010	100	00011000	0100	001000	010	00010
69	01100	0000100010	00100100	0000010000	1000000	0001000000000	00100	00110	110	00000100	0100	011000	010	00010
70	10001	0000100010	00101000	0000011000	0001010	0101000000000	00101	00001	110	01000000	0010	001000	010	00010
71	01000	0100010000	00100000	0000010000	0000010	0100000000000	01001	01000	010	01000000	1010	001000	010	00010
72	11000	0100010000	00100010	0000011000	0010010	0000000000000	01001	00100	110	01000000	0010	011000	010	00010
73	10000	0000010010	00010100	0010001000	0010000	0000000000100	00101	00010	010	01000000	0010	001000	010	00010
74	10000	0100010000	00000100	0000001000	0000010	0100000000000	00101	00100	010	01000000	1010	001000	010	00010
75	01000	0100010000	00100000	0010000000	0001100	0000000000100	00100	00100	100	01000100	1000	001000	010	00010
76	01000	0000000010	00110000	0100001000	0001010	0010000000000	00101	00100	110	01010000	0010	001000	010	00010
77	10000	0100010000	00000100	0000010000	0001100	0000000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
78	00100	0100010000	00000100	0010000000	0001000	0000000000000	00001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
79	01000	0010001000	00000100	0010000000	0011000	0100000000000	10100	00100	100	01000000	0010	001000	001	00010

续表 4

编号	引物 DNA 代码													
	CnH080	CnH107	CnH156	CnH182	CnH220	CnH304	CnH078	CnH357	CnH305	CnH155	CnH138	CnH205	CnH147	CnH275
80	01000	0100001000	00000100	0010010000	0001000	01100000000000	00101	10100	100	01000000	0010	001000	001	00010
81	01000	1000010000	00100100	0010000000	0000100	01000000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
82	00100	0010001000	00000100	0000010000	0000100	00100000000000	00100	00100	100	01000000	0010	010000	001	00010
83	01000	0100010000	00000100	0010000000	0000100	00100000000000	00100	00100	100	01000000	0010	010000	010	00010
84	01000	0100010000	00000100	0010000000	0001100	00100000000000	00100	00100	100	01000000	0010	010000	010	00010
85	01000	0100010000	00000100	0010010000	0011000	01000000000000	01001	00100	100	01000000	0010	000000	010	00010
86	01000	0100010000	00000100	0010000000	0000100	00100000000000	01001	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
87	10000	0000000010	00010000	0100010000	0010100	01100000000000	00001	00100	110	00100100	0010	001000	010	00010
88	01100	0000000010	00100100	0010010000	0000010	01000000000000	00101	00100	110	11000000	0010	001000	010	00010
89	10001	0000000000	00100010	0000010000	0001010	01000000000000	00001	00110	110	01000000	0010	001000	010	00010
90	10100	0000000100	00001000	0010010000	0000110	01000000000000	10100	00110	110	01000000	0010	001000	010	00010
91	01100	1000010000	01100000	0000001000	0001000	01001000000000	00100	00110	110	01000000	0010	001000	010	00010
92	01000	0100001000	00100100	0010010000	0001100	01000000000000	01001	00100	100	01000000	0010	001000	001	00010
93	01000	0000010010	00011000	0001000001	0001010	00000100100000	00101	00110	110	01010000	0010	011000	010	00011
94	11000	0010000100	00000100	0010000000	0001100	01000000000000	01001	00100	110	01000000	0010	001000	010	00010
95	01000	1000010000	00100100	0100000000	0001000	01000000000000	00100	00100	110	01000000	0010	001000	010	00010
96	01000	1000010000	10001000	0000010000	0000011	01100000000000	00100	00100	110	10000000	1010	001000	010	00010
97	01100	0100001000	10001000	0000011000	1000000	00010000000000	00001	00100	100	01000100	0010	011000	010	00010
98	01100	0000010010	01000001	0000010010	1010000	01000000000000	00101	00110	010	01000000	0110	001000	010	00010
99	01000	0000010010	00100100	0010000000	0000100	01000000000000	00100	00100	100	01000000	0010	001000	010	00010
100	01100	0001000010	01010000	0100010000	1000001	00100000000000	00101	00100	011	00000110	0110	001000	010	01010
101	10100	0000010000	00001100	0110000000	0000010	01000000000000	00101	00100	100	01000100	0010	001000	010	00010
102	01100	0000010000	00100000	0000010100	0010010	01000000000000	00100	00100	100	11000000	0010	001000	010	00010
103	01100	1000010000	00100000	0000010100	0010010	01000000000000	00100	10100	100	11000000	0010	001000	010	00010

4 讨论

4.1 SSR 引物有效性评价

SSR 标记是用来鉴定品种真实性和遗传多样性的有力工具^[21], 遗传多样性水平高可代表物种群体健康、适应性强^[22], 而 SSR 引物有效性高则可以更好地评价物种遗传多样性。本研究利用 14 对 SSR 引物对来自不同省份的 103 个裸花紫珠种质进行遗传多样性分析, 较前人研究^[6]极大的扩增了样本数量, 且来源几乎涵盖所有裸花紫珠的主产区, 样本具有较好的代表性。分析获得的 N_a 平均值 (6.571 4) 和 PIC 平均值 (0.468 2) 较高, 说明引物多态性高、有效性强, 有利于不同遗传背景供试种质的区分, 在种质遗传多样性分析中表现出较大潜力。研究检测到的 N_a 值较高 (92 个), N_e 占比较大 (39.37%), 这可能与供试种质来源广、类型丰富有关, 且采用的方法精确、灵敏, 能够有效

评价裸花紫珠遗传多样性。基于以上分析, 本研究所筛选的引物有效性强, 区分效果好, 使得裸花紫珠种质鉴别更加准确, 为后续裸花紫珠遗传变异检测及杂交育种奠定试验基础。

4.2 裸花紫珠遗传关系

供试材料间的遗传距离可以直观反应种质的遗传多样性, 间接体现出种质间遗传背景相似度。赵雅楠等^[23]利用 10 对多态性引物对 92 份内蒙古绿豆进行遗传距离分析, 发现内蒙古绿豆遗传多样性丰富, 个体差异水平较高。郑涛等^[24]利用 12 对 SSR 引物对 12 份血叶兰进行遗传分析, 发现种质间遗传距离最大为 0.74, 研究有效验证了种质间亲缘关系与遗传距离密切相关。本研究供试材料的遗传距离在 0~2.791 7, 遗传距离变异幅度大, 遗传背景差异明显。少部分来源相同的种质遗传距离较近, 如来自海南三亚的 102 号和 103 号种质遗传距

离为 0.052 7, 来自广西钦州的 83 号和 84 号种质遗传距离仅为 0.032 3, 原因可能是一些地理来源较近的种质经过长时间自然驯化, 导致遗传变异下降。可见 SSR 分子标记能够在一定程度上反应种质地理来源情况。从遗传距离分析, 有些来源不同的种质遗传距离却比较接近, 如来自海南临高的 13 号种质与来自海南儋州的 89 号种质遗传距离仅为 0.160 2, 这可能与种质具有相似的环境背景或常年引种有关, 导致个别种质在进化过程中出现 DNA 分子差异水平下降的情况。因此, 在今后的育种工作中一方面要结合分子标记技术开展各地方种质遗传多样性研究, 发掘亲缘关系相对较远的种质; 另一方面要加大种质资源的收集及保存, 拓宽裸花紫珠育种的遗传背景。

4.3 裸花紫珠类群结构

物种的群体遗传结构与物种的起源进化、自然分布等有很大关系, 对研究物种之间的进化关系有很大帮助^[25]。Feng 等^[26]运用 SSR 技术对 40 份野生黄精进行聚类分析, 认为野生黄精群体间遗传差异小, 主坐标分析有效地验证了聚类分析的结果。Iqbal 等^[27]运用 SSR 技术对 13 个橄榄品种进行聚类分析及主坐标分析, 明确了 13 份材料间亲缘关系的远近, 证明橄榄品种间遗传变异在一定程度上收到地理环境的影响。本研究将 UPGMA 聚类分析及主坐标分析相结合, 发现各类群呈现一定地域相关性, 即相近地区材料间遗传关系较近, 来自同一地区的种质聚集在一起的几率较大, 如图 3 中类群 II-2-3 将来自广东省的所有种质以及广西省的 4 份种质均聚集在了一起, 图 4 的主成分分析将广东的 5 份种质聚为一类。不同地区来源种质也存在相互聚集的情况, 如类群 II-2-2 中聚集了海南岛的 3 份种质和广西的 1 份种质, 主成分将广东的 5 份种质和广西的 5 份种质聚集在一起, 这体现出该种质可能来源于相同(相似)的祖先, 或在发展种植过程中不同地理来源的种质为适应环境而发生基因交流的现象。未被聚集在一起的种质代表种质间亲缘关系较远, 遗传背景差异大, 因此, 在今后对裸花紫珠进行种质改良时, 可以利用亲缘关系远、品质性状优的种质进行杂交选育, 既可获得遗传差异丰富的后代, 又能在一定程度上提高裸花紫珠种质遗传多样性。

4.4 裸花紫珠 DNA 指纹图谱构建

目前, 构建植物分子指纹图谱主要有特征谱带

法、引物组合法和单引物法 3 种方式^[28]。其中, 引物组合法一般用于种质数量多的指纹图谱构建, 该方法不仅可以高效、快速地鉴别种质, 而且极大地提高引物的鉴别能力。目前, SSR 标记在裸花紫珠指纹图谱构建中的应用尚未见报道, 鉴于此, 本次研究运用 SSR 标记技术, 利用 14 对高多态性引物, 采用引物组合法, 首次构建了 103 份裸花紫珠种质 DNA 指纹谱图, 并精准鉴别出 101 份裸花紫珠种质。然而研究中选用的 14 对引物并未将 103 个种质全部区分, 4 号种质与 8 号种质的指纹图谱不具备唯一性(表 4)。究其原因, 一方面可能是由于多态性引物的开发还不够全面, 另一方面可能与所收集的该种质地理来源相近、种质间遗传背景相似有关。

未来随着裸花紫珠种质收集范围的逐渐扩大与种质信息的不断更新, 本研究中的 SSR 引物可能会无法全部鉴别, 因此应进一步优化 SSR 引物或采用更多的多态性引物组合, 为 DNA 指纹图谱应用于裸花紫珠种质鉴别提供方便快捷的记录方式的同时, 扩展更加完善的指纹图谱。

本研究利用 14 对 SSR 标记对裸花紫珠种质资源进行遗传多样性分析, 结果表明, 每个 SSR 标记平均 6.571 4 个 N_a , PIC 平均为 0.468 2, 说明引物多态性较高, 鉴别能力强, 能够精准评价所有种质的遗传多样性。对供试材料进行遗传距离分析发现, 遗传距离在 0~2.791 7, 遗传变异幅度大, 遗传背景差异明显。聚类分析将供试材料分为 2 大类群, 类群 II 又分为 2 个亚类, 与主成分分类结果基本一致, 两者有效验证了种质间亲缘关系的远近。利用 14 对引物组合首次建立 103 份裸花紫珠 DNA 指纹图谱, 能够精准鉴定 101 份种质, 区分全面并具代表性, 对裸花紫珠种质溯源管理及原产地保护具有重要意义。

综上所述, 本研究印证了 SSR 标记技术应用于裸花紫珠遗传多样性分析的可行性, 这些 SSR 标记不仅为裸花紫珠遗传多样性分析和 DNA 指纹图谱构建提供有价值的候选标记, 也为后续裸花紫珠种质分子鉴别、优良种质的分子辅助育种提供分子技术手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典. [S]. 一部. 2020: 385.
- [2] 黄梅, 陈振夏, 于福来, 等. 海南岛裸花紫珠种质资

- 源调查报告 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1717-1721.
- [3] 聂兴华, 郑瑞杰, 赵永廉, 等. 利用荧光 SSR 分子标记评估中国栗属植物遗传多样性 [J]. 中国农业科学, 2021, 54(8): 1739-1750
- [4] 李群, 王栋, 张文兰, 等. 基于 SSR 标记的世界豌豆种质遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(3): 684-691.
- [5] 于福来, 黄梅, 张影波, 等. 裸花紫珠基因组调研及 SSR 特征分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(18): 3974-3978.
- [6] 彭云露. 黎药裸花紫珠资源品质差异及转录组学研究 [D]. 海口: 海南医学院, 2011.
- [7] Yeh F C, Yang R, Boyle T. *Popgene, Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, version 1.31* [M]. Edmonton: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.
- [8] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2128-2129.
- [9] 朱田田, 张明惠, 王富胜, 等. 基于 SSR 荧光标记的不同品种 (系) 当归遗传关系分析及分子身份证构建 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3774-3783.
- [10] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [11] 宋芸, 张鑫瑞, 李政, 等. 基于 SSR 分子标记的柴胡遗传多样性与遗传结构分析 [J]. 药学报, 2022, 57(4): 1193-1202.
- [12] 童治军, 陈学军, 方敦煌, 等. 231 份烤烟种质资源 SSR 标记遗传多样性及其与农艺性状和化学成分的相关分析 [J]. 中国烟草学报, 2017, 23(5): 31-40.
- [13] 姜武, 李亚萍, 陈家栋, 等. 基于 ISSR 和 SRAP 分子标记的黄精种质遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6865-6873.
- [14] 聂立圆, 李爱贤, 秦桢, 等. 基于 SSR 标记的 132 份甘薯种质指纹图谱的构建及遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(5): 904-911.
- [15] 李倩, 若扎·扎尔汗, 李陈建, 等. 36 份新疆野生黄花苜蓿 SSR 水平的差异性研究 [J]. 中国草地学报, 2021, 43(2): 1-7.
- [16] 吕伟, 韩俊梅, 任果香, 等. 山西芝麻种质资源 SSR 遗传多样性及群体结构分析 [J]. 核农学报, 2021, 35(7): 1495-1506.
- [17] 闵学阳, 刘文献, 张正社, 等. 苜蓿 DUS 测试标准品种 SSR 分子标记指纹图谱的构建 [J]. 草业学报, 2017, 26(11): 47-56
- [18] Botstein D. A theory of modular evolution for bacteriophages [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1980, 354(1): 484-491.
- [19] 胡晓辉, 毛瑞喜, 苗华荣, 等. 山东省 46 个花生品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析 [J]. 核农学报, 2016, 30(10): 1925-1933
- [20] 王琰琰, 王俊, 刘国祥, 等. 基于 SSR 标记的雪茄烟种质资源指纹图谱库的构建及遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2021, 47(7): 1259-1274.
- [21] 王杰, 高秋, 杨国锋, 等. 国审苏丹草和高丹草品种 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 草地学报, 2016, 24(1): 156-164
- [22] Amos W, Harwood J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1998, 353(1366): 177-186.
- [23] 赵雅楠, 王颖, 张东杰, 等. 内蒙古地区绿豆品种遗传多样性 SSR 分析及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 食品科学, 2017, 38(16): 8-13.
- [24] 郑涛, 蔡坤秀, 杨俊杰, 等. 基于 SCoT 标记血叶兰资源的亲缘关系分析 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4011-4018.
- [25] Essid A, Aljane F, Neily M H, et al. Assessment of genetic diversity of thirty Tunisian fig (*Ficus carica* L.) accessions using pomological traits and SSR markers [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(1): 335-346.
- [26] Feng T H, Jia Q J, Meng X, et al. Evaluation of genetic diversity and construction of DNA fingerprinting in *Polygonatum* Mill. based on EST-SSR and SRAP molecular markers [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(7): 1-13.
- [27] Iqbal M Z, Jamil S, Shahzad R, et al. DNA Fingerprinting and Cultivar Identification of Olive (*Olea europaea* L.) using SSR markers [J]. *3 Biotech*, 2021, 10(8): 6-23.
- [28] 杨晴, 杨菲, 杨康, 等. 秦皇岛产怪柳 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 363-367.

[责任编辑 时圣明]