

[11] 潘明凤. 川芎的化学成分研究与多指标成分的含量测定 [D]. 成都: 西南交通大学, 2014.

[12] Zhang L, Du J R, Wang J, *et al.* Z-ligustilide extracted from *Radix Angelica Sinensis* decreased platelet aggregation induced by ADP *ex vivo* and Arterio-venous shunt thrombosis *in vivo* in rats [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2009, 129(7): 855-859.

[13] 杜旌畅. 川芎挥发油保护血管内皮细胞有效成分筛选及藁本内酯的作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.

[14] 汪 雪, 赵林霞, 张志军, 等. 藁本内酯抑制小胶质细胞中 NF- κ B 介导的趋化因子表达 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(7): 496-502.

[15] 田京伟, 傅风华, 蒋王林, 等. 川芎苯酞对大鼠局部脑缺血的保护作用及机理探讨 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 466-468.

[16] 宋向岗, 周 威, 陈 超, 等. 基于分子对接方法的川芎治疗脑缺血的物质基础及分子机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2195-2198.

[17] 李 斌. 川芎油软胶囊治疗偏头痛急性发作期 (血瘀证) 即刻止痛作用效果的临床研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[18] 关晓燕. 榄香烯对人胶质瘤 U251 细胞株体外放射增敏机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.

[19] Nam S Y, Chung C K, Seo J H, *et al.* The therapeutic efficacy of α -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 273-282.

[20] 夏忠弟, 余俊龙. α -蒎烯对白色念珠菌生物合成的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(1): 44; 46.

[21] 严 颖, 赵 慧, 邹立思, 等. 基于 LC-Triple TOF MS/MS 技术分析杜仲不同药用部位化学成分差异 [J]. 质谱学报, 2018, 39(1): 101-111.

[22] 顾俊菲, 宿树兰, 彭珂毓, 等. 丹参地上部分资源价值发现与开发利用策略 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1659-1664.

大籽猕猴桃种质资源探究

玛 青, 舒舰辉, 方津津, 吴尚林, 杨哲诚, 张浩聪, 陆 胤*
(浙江树人大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310015)

摘要: **目的** 探究濒危药用植物大籽猕猴桃的种质资源。**方法** 以浙江及周边地区的大籽猕猴桃及其近缘种为主要研究对象, 进行生药学研究, 分析生境尤其是土壤理化性状, 进行 EST-SSR 多态性分析。**结果** 通过研究, 了解大籽猕猴桃的生长环境特点, 构建了大籽猕猴桃及其常见混淆品的鉴别要点, 并在大量引物中筛选出 3 个具有多态性的 EST-SSR 分子标记 AM-es03、AM-es06 和 AM-es093。**结论** 本研究基于群体思想, 对大籽猕猴桃植物资源进行了遗传多样性系统分析和种质评价, 以期为后续大籽猕猴桃的遗传结构、遗传变异、药材道地性分析奠定基础。

关键词: 大籽猕猴桃; 种质资源; 分子标记

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)02-0535-05

doi: 10. 3969/j.issn.1001-1528. 2021. 02. 049

分子标记在种质资源多样性研究中有着广泛的应用。DNA 水平的多态性主要表现核苷酸序列的差异, 对于任何类型的核苷酸序列的差异都可用分子标记技术对其进行检测。其中简单重复序列 (SSR) 又称微卫星序列^[1], 是由 1~6 个核苷酸的串联重复单元组成的一类 DNA 序列。2005 年以来, 第 2 代高通量测序技术的发展为规模化遗传变异检测和标记位点开发带来了新机遇。SSR 可从表达序列标签库 (EST) 或转录组测序数据中挖掘, 称之为 EST-

SSR^[2]。与基因组 SSR 相比, EST-SSR 开发相对较易, 但其多态性相对较低。筛选高多态性的 EST-SSR 分子标记对于遗传研究与种质资源评价均具有重要的价值。目前, 基于转录组信息进行 SSR 标记引物开发在忍冬 *Lonicera japonica*、丹参 *Salvia miltiorrhiza*、红豆杉 *Taxus cuspidata*、三七 *Panax notoginseng*、紫苏 *Perilla frutescens* 和杜仲 *Eucommia ulmoides* 等药用植物上得到有效应用^[3]。

大籽猕猴桃 *Actinidia macrosperma* 为抗癌中药猫人参的

收稿日期: 2019-06-03

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31600257); 浙江省科技厅公益研究项目 (2016C32022); 浙江省自然科学基金青年基金项目 (LQ19C020005); 杭州市科技项目 (20130932H25)

作者简介: 玛 青 (1990—), 女, 博士, 研究方向为植物系统进化。Tel: 15858208118, E-mail: 1017938412@qq.com

* 通信作者: 陆 胤 (1980—) 女, 教授, 研究方向为植物资源学。Tel: (0571) 88297100, E-mail: luyin_zjsru@aliyun.com

网络出版日期: 2019-09-17

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20190917.1356.002.html>

基源植物^[4]，较对萼猕猴桃有更高的药用价值，主产于浙江临安、富阳等地^[5]，江西、安徽、江苏等地区亦产，是浙江地区的习用中药，其根具有清热解毒、消肿疔等功效，临床用于治疗骨髓炎、肺癌深部脓肿、消化系统肿瘤、肝硬化黄疸腹水等，是华东地区常用大宗药材^[3]。近年来由于人为因素，并且药用部位为根部，加之大籽猕猴桃自身生长繁殖速度较慢，使得大籽猕猴桃已濒临灭绝，市售的猫人参商品良莠不齐，更有不良商家将同属的近缘种作为猫人参混入其中，如对萼猕猴桃 *A. valvata*、黑蕊猕猴桃 *A. melanandra*、中华猕猴桃 *A. chinensis*、小叶猕猴桃 *A. lanceolata*、毛花猕猴桃 *A. eriantha* 等，甚至其他不同科植物被混充作猫人参流入市场^[5]。为解决该问题，很多学者对其基源植物进行多方面的鉴定研究，主要集中在形态、显微、化学成分鉴别等方面^[6]。利用 EST-SSR 分子标记构建大籽猕猴桃核心种质尚属空白。相比于随机扩增的多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP) 以及内部简单序列重复 (ISSR) 这一类显性分子标记而言，EST-SSR 作为共显性分子标记，能够与植物物种某些表达不同的功能基因相联系，因此可以更加明确物种种间和种内的遗传差异。开发新的 EST-SSR 引物，对于构建高密度遗传图谱和品种指纹图谱具有重要意义，对于大籽猕猴桃的分子鉴定工作将有现实的指导及实践意义。

1 材料与方法

1.1 生药学 通过对标本实例与野外样本的观察、总结，并在一定程度上结合专业检索书籍的内容，形成大籽猕猴桃及其常见混淆品野生植株的鉴别要点和相应检索表。并先后对浙江、安徽、江西等省的药材市场进行猫人参药源的调查和收集，发现目前市售商品多取材于药材的茎干（多年生）；通过对药材横切和药材粉末的观察、总结，形成大籽猕猴桃及其常见混淆品的性状鉴别要点和相应检索表。

1.2 生境调查 通过实地调查采集及对国内几个专业植物标本馆的查阅，结合已经公开的文献数据，明确大籽猕猴桃的资源分布。

1.2.1 地理及气候条件 根据地理环境的表观数据及地理国情监测云平台信息，确定不同生境大籽猕猴桃的地理及气候条件。

1.2.2 土壤理化性质分析 分别取样品采集地 30~50 cm 深度的土壤，对水分含有量、pH、有机质含量、氮含量、磷含量、钾含量等参数进行测定^[7]。

1.3 EST-SSR 分子标记筛选

1.3.1 基因组 DNA 提取 采用 PlantZol 试剂盒法提取 DNA 基因组^[8]。即采取大籽猕猴桃幼嫩叶片，将叶片初步夹碎后，至于 2 mL 离心管中，加入小磁珠和少量聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)，用磨样仪研磨 2 次。每管加 1 mL 洗涤液，震荡仪混匀，4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min 进行 DNA 清洗，弃上清，取沉淀。而后每管加植物基因组 DNA 快速提取试剂 1 mL 和 β-巯基乙醇混合液 2 μL，震荡仪混匀；65 ℃ 水

浴 60 min，每 15 min 轻轻颠倒 10 次。将水浴后的样品移入圆底离心管，每管加氯仿异戊醇（24：1）750 μL，混匀后，于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min，取上清并加异丙醇 630 μL 混匀，置于-20 ℃ 静置 30 min 以上，离心（4 ℃，12 000 r/min，10 min）取 DNA 沉淀。而后每管加入 75% 乙醇 1 mL，清洗数次；挥干乙醇后，加 30 μL 双蒸水于 4 ℃ 溶解 DNA 4 h 以上，最后保存于-20 ℃ 冰箱中。为评价 DNA 质量，将提取到的基因组 DNA 采用紫外分光光度计检测，选择 OD_{260}/OD_{280} 比值介于 1.8~2.0 之间的优良 DNA。

1.3.2 EST-SSR 引物设计与合成 通过 RNA-Seq 得到大籽猕猴桃 EST 序列并开发 EST-SSR 引物^[9]。引物设计时选用 SSR 重复次数较高的 EST，从而增大引物在不同材料间的多态性扩增率，提高 EST-SSR 标记在资源分析中的效率^[10]。引物设计的具体条件为 PCR 产物长度控制在 125~300 bp；引物长度 18~24 bp；避免出现引物二聚体。GC 含量 40%~70%，最适合为 50%； T_m 值控制在 58 ℃ 左右。

1.3.3 多态性引物筛选 用抽提的大籽猕猴桃叶片 DNA 为模板，用以下设计的引物进行扩增^[11]。

1.3.3.1 PCR 反应体系 在 20 μL 反应体系含 2.0 mmol/L Mg^{2+} ，0.25 mmol/L dNTP，0.3 μmol/L 引物，60 ng DNA，*Taq* DNA polymerase 1U。

1.3.3.2 PCR 扩增 利用 Eppendorf Mastercycler PCR 仪扩增。反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min，然后 94 ℃（30 s）~60 ℃（30 s）~72 ℃（45 s）循环 35 次；之后 72 ℃ 延伸 15 min。

1.3.3.3 电泳检测 取 5 μL PCR 产物用 8% 丙烯酰胺凝胶电泳检测，硝酸银染色显影，并扫描图像记录结果。

1.3.3.4 STR 片段长度分析 将上述电泳检测中条带长度在合理范围内的 PCR 产物进行 STR 片段长度分析，得到不同产地大籽猕猴桃的 SSR 位点的具体长度，收集多态性信息。

1.3.3.5 EST-SSR 多态性分析 信息含量 PIC 通过公式^[12] $PIC=1-\sum_{i=1}^k P_i^2$ ， P_i 为第 i 个等位基因的频率， k 为等位基因的数量。PIC≥0.10 为多态性 SSR，PIC≥0.70 为高多态性 SSR。

2 结果与分析

2.1 样本收集 用踏查和线路调查相结合的方式，完成资源调查和群体取样（主要集中在华东地区），见图 1。共采集到大籽猕猴桃野生群体 8 个及对萼猕猴桃群体 1 个、黑蕊猕猴桃群体 1 个、小叶猕猴桃群体 1 个，见表 1。

2.2 生药学研究

2.2.1 野生植株的鉴别要点 通过对标本实例与野外样本的叶片、叶脉、叶柄、茎干髓部等特征的观察、归纳及总结，形成大籽猕猴桃及其常见混淆品野生植株的鉴别要点。大籽猕猴桃，茎枝髓实心或基本实心，叶背面脉腋有髯毛、中脉或叶柄具短小软刺，种子长 4~5 mm；对萼猕猴桃，



注：左上为大籽猕猴桃，右上为对萼猕猴桃，左下为黑蕊猕猴桃，右下为小叶猕猴桃。

图 1 大籽猕猴桃及其混淆品的野生植株实物图

表 1 野生大籽猕猴桃及外类群采样策略				
品种	产地	海拔/m	生境	
大籽猕猴桃	浙江 富阳环山	34	杂木林中	
	临安西天目山	326	溪沟边	
	磐安大盘山	820	溪沟边	
	宁波天童	220	杂木林中	
	安徽 歙县三阳	620	溪沟边	
	黄山九龙瀑	460	溪沟边	
	休宁	168	溪沟边	
黑蕊猕猴桃	江西 武陵岩	594	溪沟边	
	江西 武宁	207	溪沟边	
小叶猕猴桃	浙江 临安西天目山	375	溪沟边	
对萼猕猴桃	江西 武宁	38	溪沟边	

表 2 大籽猕猴桃及其常见混淆品性状鉴别要点	
品种	性状特征
大籽猕猴桃	外表皮粗糙有纵皱及开裂,一般不脱落或小片状剥落,残茎的髓部有白色颗粒状,实心或基本实心。外表皮紫褐色或紫红色,切片皮部棕红色,木部浅棕红色,直径一般不超过 2 cm 导管多,孔径较大,其中较大孔径者形成 2 个同心环。常有虫瘦,基干中心蛀空。味淡而后麻。粉碎后呈淡褐色,以碎屑与粉末形式存在
黑蕊猕猴桃	外表皮光滑,紫褐色,密布条纹状斑点,一般呈片状脱落,可见较长的毛须状纤维及白色粉霜。切面皮部深棕色,木部黄白色或中心微红。髓部细小,白色或褐色片状。导管多,孔径较大,分布较均匀。茎干中心有时蛀空。味微苦。粉碎后呈褐色,以纤维状碎屑存在,有少量粉末
小叶猕猴桃	外皮粗糙有纵皱及开裂,一般不脱落,残茎的髓部片层状,褐色、棕色或白色。外表皮红褐色带灰色,切面皮部红棕色或深棕色,散布黄色点(石细胞群),木部黄白色。导管少,孔径小且稀疏,呈同心环状排列。茎干中心正常。味微苦。粉碎后呈淡褐色。以粗碎屑与粉末形式存在
对萼猕猴桃	药材与大籽猕猴桃近似,但外表皮浅黄棕色或棕褐色,切面皮部类白色,木部黄白色,直径一般不超过 2 cm 导管多,孔径较大,1 个同心环。也常有虫瘦,茎干中心蛀空。味淡而后麻。粉碎后呈淡褐色,以碎屑与粉末形式存在

2.3.2 气候条件 浙江地区（富阳、临安、磐安、宁波）大籽猕猴桃生长地年平均气温在 15.66~18.03℃，年均降水量在约 1 565 mm；安徽地区（歙县、黄山、休宁）大籽猕猴桃生长地年平均气温在 7.7~19.2℃，年均降水量在 995 mm；江西地区（武陵岩）大籽猕猴桃生长地年平均气温在 18.0~20.6℃，年均降水量在 1 635 mm；三地气候特点均为雨热同期。

2.3.3 土壤理化性质分析 不同地区的大籽猕猴桃生长地的土壤理化状况差别较大，见表 3，江西地区土壤含水量大于安徽地区含水量；pH 差异不大，浙江与江西大籽猕猴桃

茎枝髓实心或基本实心，叶背面脉腋无髯毛、中脉或叶柄无短小软刺，种子长 1~3 mm；黑蕊猕猴桃，茎枝髓片状，幼时小枝、果实无毛无斑点，叶片无毛或仅背面脉腋有簇聚毛；小叶猕猴桃，茎枝髓片状，幼时小枝、果实有毛及斑点，叶片背密布毛，叶片卵状椭圆形或近披针形，宽 2~4 cm，果实直径 0.5~1 cm。

2.2.2 药材性状鉴别要点 通过对药材横切和药材粉末的观察和总结，获得大籽猕猴桃及其常见混淆品的药材性状的鉴别要点，见表 2。总的来说，这几种植物在外表皮、髓部、粉碎物及横切面上的导管等方面各有特点。如横切面上导管一般较明显，在许多种类中孔径较大的导管往往排列成同心环状；4 种猕猴桃茎干粉碎物的颜色基本为黄褐色，深浅略有差异；粉碎物形态基本以粉末和碎屑为主，但纤维化程度有较大差异，以黑蕊猕猴桃粉碎物纤维化程度最高。

2.3 生境调查

2.3.1 地理分布及生长环境 大籽猕猴桃多生长在海拔 800 m 以下的丘陵或低海拔山坡、山麓杂木林内及林缘水沟旁、路边旷地上，为常绿、落叶阔叶混交林带。选取样品选自浙江（东经 120°、北纬 30°，海拔 34~820 m）、安徽（东经 117°、北纬 32°，海拔 168~620 m）、江西（东经 115°、北纬 28°，海拔 594 m）等地的大籽猕猴桃野生居群及部分外类群，均处于亚热带季风性气候区，见表 1。大籽猕猴桃生长带地形复杂、山坡平缓、森林茂密，土壤主要为黄色森林土，间或有黄壤分布。表土层枯枝落叶层厚，腐殖质丰富；气候温暖、凉爽、湿润，是蕨类植物种类最丰富，群聚度较高的地段。

桃生长地酸度较低；有机含量差异较大，尤其是安徽大籽猕猴桃生长地的有机含量最为丰富；氮、磷、钾等无机元素在各个大籽猕猴桃生长地的数据差异明显，安徽大籽猕猴桃种植地的全氮含量极高，是其他 3 个地区的 1~5 倍，表明该生长地土壤供氮水平较高，而浙江大籽猕猴桃生长地的供氮水平较低；另外，江西的土壤全磷含量较高，表明其富集磷的能力较强，相较而言浙江生长地的全磷含量较低，富集磷能力较弱；最后，全钾含量浙江地区的土壤含量最高，与其余的几个地区差异较大，其余地区全钾含量维持在相对高的水平。

表 3 大籽猕猴桃生长地土壤理化状况 ($\bar{x}\pm s$)

地区	含水量/%	pH	有机质含量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全氮含量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全磷含量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全钾含量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
浙江	19.92±1.42	5.28±0.02	15.05±0.79	0.59±0.14	0.340	2.58±0.08
安徽	19.35±1.26	5.54±0.05	23.69±1.22	2.45±0.08	0.525	1.98±0.03
江西	21.69±0.39	5.26±0.05	11.32±0.22	1.20±0.12	1.162	2.03±0.08

综合各个地区测得的数据，认为大籽猕猴桃生长地总体情况为土壤偏酸性、有机质含量较高、土壤较潮湿，但土壤沙质，又位于坡地，因此排水良好，对于土壤环境的要求不是特别高，土壤理化指标范围较大，适应性相对较强，表明大籽猕猴桃的移栽、生长情况调控较容易。

2.4 EST-SSR 分子标记筛选

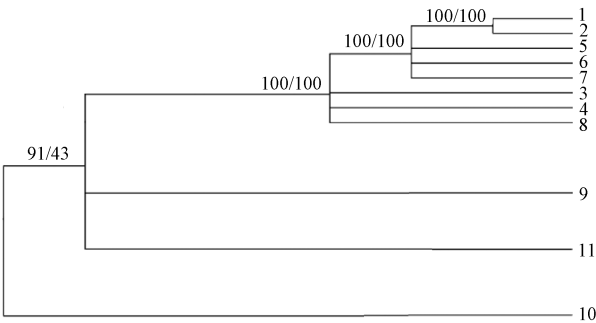
2.4.1 EST-SSR 引物设计与合成 通过 RNA-Seq 共开发了 16 对大籽猕猴桃 EST-SSR 引物。其中，二核苷酸重复聚首 (5 个)，占全部 SSR 的 31.3%；三核苷酸则为 11 个，占 68.8%。可见在大籽猕猴桃 EST-SSR 中，三核苷酸占主导地位。同时，TC/CT 是二核苷酸重复中的优势基元，占二核苷酸重复基元的 60%；三核苷酸中出现频率较高的为 GAA/AGA 和 AAG/GAG，均占三核苷酸重复基元的 18.2%。

2.4.2 多态性引物筛选 采用 16 对 EST-SSR 引物对 10 份大籽猕猴桃种质 DNA 及同属近缘种进行扩增 (大籽猕猴桃野生群体 8 个及对萼猕猴桃群体 1 个、黑蕊猕猴桃群体 1 个、小叶猕猴桃群体 1 个)。舍弃产生条带不清晰、不稳定、多态性差或者条带较为复杂而无法读带的引物，最终筛选出 6 对 EST-SSR 引物在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶上能够获得清晰的扩增条带，成功率 37.5%，见表 4。其中，三核苷酸重复 SSR 的成功率最高，为 66.67%。6 对引物共扩增出 36 种条带，平均每对引物能扩增出 6 种条带。通过 PIC 计算，AM-es03、AM-es06、AM-es09 为多态性 EST-SSR ($\text{PIC}\geq 0.10$)，多态性扩增率为 50%，对 10 份供试材料的区分率达 100%，占总引物数的 18.75%。3 个多态性引物扩增的多态性条带为 23 条，占 6 对引物总扩增条带的 63.89%；共检测到 37 个等位基因，每对引物可检测到的

等位基因数平均为 12.3 个。

3 讨论

使用 PowerMarker 等软件构建 UPGMA 聚类图^[13]。大籽猕猴桃 EST-SSR 分子标记在猕猴桃属种质遗传多样性分析中的应用。3 个 EST-SSR 分子标记用于大籽猕猴桃野生群体 8 个及对萼猕猴桃群体 1 个、黑蕊猕猴桃群体 1 个、小叶猕猴桃群体 1 个的基因型分析。聚类分析采用 NTSYSpc 2.1 软件，该分析基于 UPGMA 法计算遗传相似性。选取根据 UPGMA 聚类结果，基于邻接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 进行测算，在遗传相似系数为 0.73 的水平上可将 10 份猕猴桃群体材料聚为 2 类，见图 2，其结果与传统的形态分类大体一致^[14]。



注：1 为大籽猕猴桃 (浙江富阳环山)，2 为大籽猕猴桃 (浙江临安西天目山)，3 为大籽猕猴桃 (浙江磐安大盘山)，4 为大籽猕猴桃 (浙江宁波天童)，5 为大籽猕猴桃 (安徽歙县三阳)，6 为大籽猕猴桃 (安徽黄山九龙瀑)，7 为大籽猕猴桃 (安徽休宁)，8 为大籽猕猴桃 (江西武陵岩)，9 为黑蕊猕猴桃 (江西武宁)，10 为小叶猕猴桃 (浙江临安西天目山)，11 为对萼猕猴桃 (江西武宁)

图 2 大籽猕猴桃及其近缘种传统分类群 UPGMA 聚类图

表 4 6 对大籽猕猴桃的 EST-SSR 引物扩增结果

标记	重复单元	序列编号	引物序列 (5'-3')	退火温度/℃	片段大小/ bp	等位基因数	扩增条带数	多态性条带数	多态性条带百分比/%
AM-es03	CGA	1	正向:GATGGCTGACGAACAACGA	55	100~250	17	7	7	100
		2	反向:TCTGTCACGATCACCTCC						
AM-es06	TTC	3	正向:AGCGTTCAGTTCAGTTTC	54	200~300	9	7	7	100
		4	反向:TCAGGTGAGTCCGAGATTC						
AM-es09	TGG	5	正向:CTGGGTGCGCTGTTTCTGG	58	100~300	11	9	9	100
		6	反向:ACCTGGGTTGGTCAGTGG						
AM-es04	GAG	7	正向:TCTCGCTCTCAGTCCTCCAT	60	270~290	9	5	4	80
		8	反向:AAATCAGACCTGAACCAACCG						
AM-es05	TC	9	正向:AGGAAGATGGAGGAGCCATT	60	260~280	6	3	2	66.7
		10	反向:CCACGACTCGACGTCATACA						
AM-es07	CT	11	正向:AGGTGTATTCTGCGCCCTTTC	60	170~190	8	5	4	80
		12	反向:AAAGACGAGACTTCCTCGCA						

净果组中,大籽猕猴桃先聚为一类,来自富阳环山与浙江临安的大籽猕猴桃被聚成一支,与安徽歙县三阳、黄山九龙瀑及休宁的大籽猕猴桃较为接近;浙江磐安大盘山、宁波天童与江西武陵岩的大籽猕猴桃则稍远。上述结果与地理分布的区块基本一致。而后,江西武宁的黑蕊猕猴桃、江西武宁的对萼猕猴桃、最终与 8 份大籽猕猴桃聚为一类。而属于星毛组的来自浙江临安西天目山的小叶猕猴桃被明显分开,提示该份种质与其他种质亲缘关系较远。

综上,本研究所筛选的 EST-SSR 能够将大籽猕猴桃种质按照区域分开,并明显区别于大籽猕猴桃药材资源混淆品的常见同属近缘种^[15],研究结果从分子水平上解释了这些种质资源的遗传多样性水平,展示了大籽猕猴桃 EST-SSR 在大籽猕猴桃的种质鉴定及评价上的良好通用性,以期为后续大籽猕猴桃的遗传结构、遗传变异、药材道地性分析奠定基础。

参考文献:

[1] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(7): 215-222.

[2] Varsney R K, Graner A, Sorrells M. Genie microsatellite markers in plants: features and applications [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(1): 48-55.

[3] 姚利华,滕元文. EST-SSR 标记及其在果树研究中的应用 [J]. *果树学报*, 2008, 25(2): 219-224.

[4] 赵云鹏. 抗肿瘤中草药猫人參的种质鉴别及其与近缘种的活性比较研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

[5] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 218-220.

[6] 陈 豪, 潘坤官, 何丽君. 抗癌中药猫人參研究概况[J]. *海峡药學*, 2011, 23(12): 9-11.

[7] 胡冠九, 陈素兰, 王 光. 中国土壤环境监测方法现状、问题及建议[J]. *中国环境监测*, 2018, 34(2): 10-19.

[8] Murray M G, Thomspson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8 (19): 4321-4325.

[9] Ellis J R, Pashley C H, Burke J M, *et al.* High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener[J]. *Mol Ecol*, 2006, 15(9): 2345-2355.

[10] 邢宝田, 吴 萍, 宋顺华, 等. SDS-PAGE 凝胶电泳法与田间种植法鉴定辣椒种子纯度的相关性研究[J]. *北方园艺*, 2011, 13: 29-31.

[11] 郭奕生, 陆 俊. 微卫星标记在杂交稻种子纯度鉴定上的应用[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(16): 138-141.

[12] 王 卫, 陈义挺, 陈 婷, 等. 均匀设计优化猕猴桃 SRAP 体系[J]. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2013, 42 (1): 23-28.

[13] 斯庆毕力格, 毛 斌. 聚类分析和 TOPSIS 法在森林资源综合评价中的应用 [J]. *西北林学院学报*, 2016, 31(4): 241-245.

[14] 徐小彪, 廖 娇, 黄春辉, 等. 基于 EST-SSR 标记分析猕猴桃种质遗传关系 [J]. *果树学报*, 2012, 29 (2): 212-216.

[15] Huang H, Ferguson A R. Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007: 1-121.