

基于SSR标记与农艺性状对三七集团选择群体的评价

李满桥^{1,2,3}, 王 前^{1,2,3}, 李葵秀^{1,2,3}, 俎 峰⁴, 陈中坚⁵, 王 勇⁵, 魏富刚⁶, 杨生超^{1,2}, 刘冠泽^{1,2}

(¹云南农业大学西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 昆明 650201; ²云南农业大学云南省药用植物生物学重点实验室,

昆明 650201; ³云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; ⁴云南省农业科学院经济作物研究所, 昆明 650225;

⁵文山学院三七研究院, 云南文山 663099; ⁶文山苗乡三七科技有限公司, 云南文山 663000)

摘要:三七为人参属多年生草本植物, 生长和繁育周期长, 群体间的遗传多样性低, 但群体内单株间表型变异大, 人参皂苷含量差异尤为明显。本研究根据三七中5种人参皂苷(三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd)含量构建了11份集团群体(SL1~SL11), 对当代和第一代集团群体人参皂苷含量进行了比较分析。同时, 基于三七基因组, 使用MISA软件进行全基因组水平SSR标记开发, 鉴定到255239个SSR标记, 筛选出17对多态性SSR标记。使用SSR标记对第一代群体进行遗传多样性评价。结果表明, 11份第一代集团群体观察杂合度 H_o 较高(0.4583~0.6042), 遗传分化程度低($F_{st}=0.0447$), 且具有较高基因流($Nm=11.6189$); 第一代群体间总皂苷含量无显著性差异而三七皂苷R1变异系数高于总皂苷和其他单体皂苷, 且群体SL8三七皂苷R1含量显著高于其他群体。综上, 本研究以皂苷含量为目标性状构建了高皂苷含量的集团群体, 并利用SSR标记评价了群体遗传多样性, 构建的三七皂苷R1高含量群体可作为后续育种材料。

关键词:三七; 集团群体; SSR标记; 人参皂苷

Evaluation of Mass Selected Populations of *Panax notoginseng* Based on SSR Markers and Agronomic Traits

LI Manqiao^{1,2,3}, WANG Qian^{1,2,3}, LI Kuixiu^{1,2,3}, ZU Feng⁴, CHEN Zhongjian⁵,

WANG Yong⁵, WEI Fugang⁶, YANG Shengchao^{1,2}, LIU Guanze^{1,2}

(¹National Local Joint Engineering Research Center on Germplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in

Southwest China, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; ²Yunnan Provincial Key Laboratory of Medicinal Plant

Biology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; ³College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural

University, Kunming 650201; ⁴Institute of Cash Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650225;

⁵Notoginseng Research Institute, Wenshan University, Wenshan 663099, Yunnan; ⁶Miaoxiang Panax

Notoginseng Science and Technology Corporation Ltd., Wenshan 663000, Yunnan)

Abstract: *Panax notoginseng* is a perennial herb with long growth period and reproduction cycle. The inter-population diversity was low while the intra-population diversity among individual plants remained higher. Among them, the ginsenosides content of individual plants were significantly different among groups, providing a theoretical basis for deploying the group selection approach. In this study, 11 group populations (SL1-SL11) were constructed according to the content of five saponins (notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1, ginsenoside Re, ginsenoside Rd) in *P. notoginseng*. The contemporary and first generation group population were compared and analyzed base on the saponins content. In addition, the genetic diversity of

收稿日期: 2024-01-31 网络出版日期: 2024-08-14

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240131008>

第一作者研究方向为三七种质资源评价与鉴定, E-mail: 13988543978@163.com

通信作者: 刘冠泽, 研究方向为药用植物遗传育种, E-mail: guanzeliu@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(32260095); 云南省重大科技专项(202102AA100052-02, 202102AA310048-01); 云南省科技人才与平台建设(202305AR340004)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32260095); Major Science and Technology Projects of Yunnan Province (202102AA100052-02, 202102AA310048-01); Yunnan Province Science and Technology Talent and Platform Development (202305AR340004)

populations was evaluated by using 17 pairs of polymorphic SSR markers that were identified from a total of 255239 SSR polymorphisms. Resulted from the genetic diversity of the first generation population of SL1-SL11 that were evaluated by SSR markers, the high heterozygosity (0.4583-0.6042), low genetic differentiation ($F_{st}=0.0447$), and high gene flow ($Nm=11.6189$) were observed. Although there were no significant difference in total saponin among the populations, the coefficient of variation for notoginsenoside R1 was higher than that for total content of five saponins and other monomeric saponins. The notoginsenoside R1 content in the SL8 population was significantly higher than that of other populations. Collectively, this study produced group populations using saponin content as the target trait, and evaluated their genetic diversity using SSR markers. The newly-generated population with higher notoginsenoside R1 content can serve as breeding material in breeding of *Panax notoginseng*.

Key words: *Panax notoginseng*; mass selected populations; simple sequence repeat markers; ginsenosides

三七 (*Panax notoginseng* (BurK.) F. H. Chen) 为五加科人参属多年生草本植物, 因具有定痛消肿、止血散淤、提高免疫力和保护心脑血管等多种功效被广泛使用^[1]。三七中三萜皂苷类为主要活性物质, 栽培群体个体间单体皂苷组分含量相差3.6~10.2倍, 总皂苷含量则相差2.0倍以上^[2]。三七自然群体中皂苷含量变化及高品质育种一直是三七遗传改良的重点工作。早期研究表明, 自然群体个体间性状变异如根的形状、果色、茎色、复叶数、小叶形状等, 在居群间和居群内变异明显^[3], 地下茎(剪口)变异系数达0.433~0.617^[4], 但居群及群体间的遗传多样性较低, 居群间有着较强的基因流动, 遗传变异主要发生在居群内个体间。三七群体间遗传多样性低, 加大了品种选育难度, 加之三七生长年限长、繁殖系数低, 生长过程对环境要求苛刻, 难以通过单株选择获得纯系材料^[5-6]。

集团混合选择作为三七品种选育中的主要选择手段, 通过地上部分性状与地下部分性状以及皂苷含量的相关性分析, 选出优质的群体材料^[7]。研究发现叶面积对三七单株产量影响较大, 高产三七品种选育应提高叶面积, 选择宽叶性状。三七中紫根、复叶柄平展、长形根、宽叶等4种性状中皂苷含量高。因此, 4种性状类型可作为优质三七品种选育的目标。此外, 三七中双茎植株总皂苷含量低于单茎植株, 绿茎植株在田间相较于紫茎植株表现出植株高大、产量高、块根大的优良农艺性状, 紫茎植株存苗率高于绿茎植株^[8]。通过三七茎秆颜色, 选育出紫茎品种滇七1号和绿茎品种苗乡1号, 两个品种产量和皂苷含量均高于自然群体, 此后育种家基于三七表型性状通过集团选择选育出多个三七新品种^[9]。

分子标记在三七种质资源筛选、居群遗传多样

性评价和品种选育的应用已有报道^[10-11]。基于转录组数据开发简单序列重复 (SSR, simple sequence repeat) 标记, 从 2361 个表达序列标签 (EST, expressed sequence tag) 中共鉴定出 2772 个与三萜皂苷合成酶乙酰辅酶 A: 2-甲基丙二酰辅酶 A 转移酶 (AACT, Acetyl-CoA: 2-Methylbutyryl-CoA transferase)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR, HMG-CoA reductase)、鲨烯环氧化酶 (SE, squalene epoxidase)、鲨烯合酶 (SS, squalene synthase)、达玛烯二醇合酶 (DS, dammarenediol synthase) 基因序列关联的 SSR 标记^[12]。张金渝等^[13]用 17 对 EST-SSR 引物对 4 个不同地区 17 份三七品系的遗传多样性进行分析, 共扩增出 136 个多态位点, 平均多态信息含量 (PIC, polymorphic formation content) 值为 0.78, Nei's 基因多样性 0.139, 香农信息指数 (I , Shannon's information index) 为 0.208, 品系间遗传分化系数 (F_{st} , the F-Statistic) 为 0.382。遗传相似度和聚类分析结果表明, 17 份三七品系和屏边三七被划分为 4 个大类群, 其中 17 份三七品系被分为 3 个类群。此后, 张金渝等^[5]利用 17 对 EST-SSR 引物对 6 个三七居群遗传多样性和遗传结构进行比较分析, 结果表明三七居群间遗传分化水平低, 彼此间具有较高基因流, 遗传差异主要存在于居群内。随着三七参考基因组信息的公布, 为三七分子标记开发与重要性状的遗传解析奠定了基础^[14-15]。基于三七基因组序列信息, 揭应碧等^[10]共鉴定到 314060 个 SSR 标记, 密度为每 Mb 131 个 SSR 标记, 平均距离为 7.62 kb。以滇七 1 号、苗乡 1 号和 8 个自然群体为材料, 筛选出多态性标记引物 41 对。利用筛选出的多态性引物与性状进行关联分析, 获得与主根干重、鲜重、主根直径、皂苷含量相关联的 8 个 SSR 标记^[16]。此外, Su 等^[17]

基于转录组信息获得与 14 个农艺性状具有显著关联的 15 个 SSR 标记, 其中 P19-FAM 标记与剪口和主根中的三七皂苷 R1 (NG-R1, notoginsenoside R1) 含量显著关联, 该位点关联基因为 *PnDof1*。在三七细胞系中过表达该基因, 三七皂苷 R1 和人参皂苷 Rg1 (G-Rg1, ginsenoside Rg1)、人参皂苷 Rb1 (G-Rb1, ginsenoside Rb1)、人参皂苷 Re (G-Re, ginsenoside Re)、人参皂苷 Rd (G-Rd, ginsenoside Rd) 含量显著提高, 推测该基因可能调控三七中皂苷合成。

通过集团混合选择构建集团群体已育成多个三七品种, 但目前尚未以皂苷含量为目标性状构建集团群体用于三七品种选育。本研究根据三七自然群体中不同单株皂苷含量差异构建了 11 个集团群体, 基于已有三七参考基因组信息开发 SSR 标记, 结合农艺性状对集团群体第一代群体进行评价, 为后续高皂苷含量材料的选择提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料来自于云南省文山州丘北县 (海拔 1631 m, 北纬 23.83°, 东经 104.10°)。2018 年 11 月, 采集成熟 3 年生三七植株 240 株, 分别测定不同单株主根中 5 种单体皂苷 (三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd) 含量。根据主根中总皂苷含量和 5 种单体皂苷含量高低, 构建 11 份集团群体 (SL1~SL11)。于 2021 年 11 月, 对 11 份 3 年生三七集团群体进行综合评价并采集植株叶片用于 DNA 的提取。

1.2 皂苷含量测定和 11 份集团群体构建

收集 240 株 3 年生三七进行 5 种皂苷含量测定, 精密称取人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、三七皂苷 R1 和人参皂苷 Rd 对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含人参皂苷 Rg1 0.4 mg、人参皂苷 Rb1 0.4 mg、三七皂苷 R1 0.1 mg、人参皂苷 Re 0.1 mg 和人参皂苷 Rd 0.2 mg 的混合标准品溶液。取 3 年生三七主根粉末 0.6 g, 加入甲醇 50 mL, 称定重量放置过夜, 置 80 °C 水浴上保持微沸 2 h, 冷却后称定重量并用甲醇补足重量, 摇匀用 0.22 μm 微孔滤膜滤取滤液。使用高效液相色谱仪 (Agilent 1260 Infinity, 美国) 进行检测, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×250 mm, 5 μm) (安捷伦科技有限公司, 美国), 流速为 0.7 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 按表 1 中参数进行梯度洗脱, 检测波长为 203 nm^[18]。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution procedure

时间 (Minutes)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
Time	Mobile phase A	Mobile phase B
0~12	19	81
12~60	19~36	81~64

根据总皂苷和单体皂苷含量组合构建集团群体, SL1~SL4 由总皂苷含量高于 10% 的单株构成, SL9~SL11 由总皂苷含量低的单株构成, 11 个集团群体构成见表 2。将各群体当代单株种子混收构成第一代集团群体材料。

表 2 当代集团群体构建信息

Table 2 Information on contemporary group population construction

群体编号	性状	皂苷含量范围 (%)	含量平均值 (%)
Population	Traits	Range of saponin content	Mean
SL1	5 种皂苷	12.83~14.13	13.30
SL2	5 种皂苷	11.73~12.59	12.13
SL3	5 种皂苷	10.87~11.64	11.20
SL4	5 种皂苷	10.16~10.77	10.46
SL5	人参皂苷 Rg1	4.43~5.62	4.82
SL6	人参皂苷 Rb1	4.13~5.10	4.46
SL7	人参皂苷 Re	1.49~2.31	1.73
SL8	三七皂苷 R1	1.36~2.41	1.97
SL9	5 种皂苷	3.78~6.11	4.80
SL10	5 种皂苷	3.21~5.81	4.48
SL11	5 种皂苷	2.74~4.94	3.66

1.3 集团群体材料性状调查

三七植株性状测定参照《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 三七》^[19], 共测定 11 个植物学性状, 包括: 总花梗高、茎秆高、中叶长、中叶宽、主根长 (钢卷尺和直尺进行测量), 复叶柄基茎径、茎中部直径、茎基部直径、主根直径 (游标卡尺测量), 主根鲜重 (电子天平称重), 三七叶面积 (参考陈中坚等的计算方法^[20])。

1.4 三七全基因组 SSR 标记开发

利用两个版本三七参考基因组 PnV1^[14] 和 PnV2^[15] 进行全基因组水平 SSR 分子标记的开发。使用 MISA (Microsatellite identification tool, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 对 PnV2 版本进行 SSR 标记开发, 选择重复单元为 1、2、3、4、5、6 个碱基的基序, 最小重复数分别为 12、6、5、5、5、5。若两个相邻 SSR 之间的碱基数 ≤ 100 则定义为复合型 SSR。根据 SSR 标记两端保守序列, 利用 primer3 (

primer3. sourceforge.net/)设计标记引物,长度为16~24 bp,PCR产物在80~350 bp之间,其余参数选择软件默认参数。

对筛选获得的标记引物在PnV1和PnV2基因组中进行电子聚合酶链式反应(e-PCR)分析^[21],使用Xshell软件进行三七PnV1和PnV2参考基因组e-PCR分析数据创建,建库参数为-w7-f0,利用re-PCR命令在两个版本的基因组中进行e-PCR分析,结合编写perl脚本获得两个版本基因组中仅能扩增1个位点的标记引物,后用筛选出的标记引物在PnV2基因组CDS序列中再进行e-PCR,获得在PnV2版本CDS中可扩增1个位点,两个基因组之间产物长度相差20 bp以上的引物并验证。

1.5 基因组DNA提取及SSR标记验证

用CTAB法提取三七叶片DNA,取0.5 g中叶,

充分研磨后加入CTAB抽提液500 μ L,65 $^{\circ}$ C水浴加热30~60 min。随后加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)混合液,混匀后12000 r/min离心10 min,取200 μ L上清液。加入等体积无水乙醇,静置20 min后10000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入500 μ L 75%乙醇10000 r/min离心5 min,弃去上清液并晾干残留乙醇。用ddH₂O溶解DNA,并通过1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量^[22]。PCR反应体系为20 μ L,模板DNA 1 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各0.3 μ L(表3),2 \times Taq Master Mix(诺唯赞,南京)10 μ L,用ddH₂O补足至20 μ L。PCR扩增程序:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性15 s,57 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共30个循环;最后72 $^{\circ}$ C末端延伸5 min。使用8%聚丙烯酰胺非变性凝胶对PCR扩增产物进行检测,通过银染法获得扩增条带^[23]。

表3 多态引物序列信息

Table 3 Polymorphic primer sequence information

引物 Primer	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
SSR1	AGTATGTCTCCAACAAGCTCAGG	ATCTTTGAACGAGGTAGCTTCAG
SSR2	GATCGCCGGTTATGTATTTGTAT	TCCTAGTAGTCGTTGCACGTAGA
SSR3	TCCCGAGTATCAACGTATTTGAG	ACGTCAGAATGTTTCAATTTTCG
SSR4	CAAAACTTAATCTGATCACGTCCG	TCAGGCAACATCTGAGTTGAATA
SSR5	GCTCTAGTTTGGAATTGCTTTGA	GAGCATTGACCCTATCTTAGCCT
SSR6	TAGCTATTTCGTATTTGGTGCCTC	ATTAGAAAAGGAACGCATGGAGT
SSR7	CTAAAATCCTCCATTACCAACCC	GCAAATGCAAAGTTACAAAAGGT
SSR8	CGGTGGCTATCTGCTTGTG	CGCGCGTTTCAGGTTTAT
SSR9	GGTGGTGAAAAGCCAGAGA	TGCAGACAGCATAGGAGGC
SSR10	TGAGGTTCGACCCAGGAGA	TTTTCGCCAATGACCAGC
SSR11	GTGGCGTGATGTGTCAA	AAAGGGACCCAACTCCG
SSR12	GGCAATGTTTCAGCCTTGG	ATACTGCCCGTCGGCTTT
SSR13	CACCTTCGGCCTAGCCTC	GAGCGTTATGCGGGTGAC
SSR14	GAATGGTCGAATCACGCC	GCACATGGGGCATCTAGC
SSR15	TCCCAGTTCTCGACAGCC	TGGATTGCTGAATATGCTGG
SSR16	AGTATCATGGCCTCGGCA	CCCATCAGCACCAATTCC
SSR17	AGCCAACATTGCCACCAT	GATTTGCGCCTGCCTAGA
SSR18	TTCTTTATCGGCCCTCC	GGAAGGCTTCAGGCCACT
SSR19	GGAGCTTGTTGCTGCAGAT	TCATCCGCTCGGTATGCT
SSR20	ATGGCGCAAGCTGTATCC	AGCCACCATGCCACAGAG
SSR21	AAGGCCACGGAAGGGTAA	CATTGAACCCACGCATCA
SSR22	AAGGCTCCGAAAGAGAGGTG	TTCGGCCATCTCACGAAT
SSR23	TGCCTGAAAAAGTCCGGT	GGACCTCAAGGTGGCAA
SSR24	AGTGCAGGTTTTTCGCCA	CTCGAAAGCCTCCACAA

1.6 数据获取及分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,将有扩增条带的记为1,无扩增条带的记为0,建立各标记扩增谱带

0,1矩阵数据。使用Popgen32软件分析标记引物扩增位点等位基因数(N_a , the number of alleles)、有效等位基因数(N_e , the effective number of alleles)、观

察杂合度 (H_o , observed heterozygosity)、期望杂合度 (H_e , expected heterozygosity)、香农信息指数 (I , Shannon's information index)、多态信息含量 (PIC , polymorphic formation content)、遗传分化系数 (F_{st} , the F-Statistic)、基因流 (Nm , gene flow) 等参数^[24]。使用 Excel 和 SPSS19.0 分析三七的农艺性状, 各组间性状的显著性分析采用单因素方差分析 (以 $P \leq 0.05$ 为显著性差异阈值)^[25]。

2 结果与分析

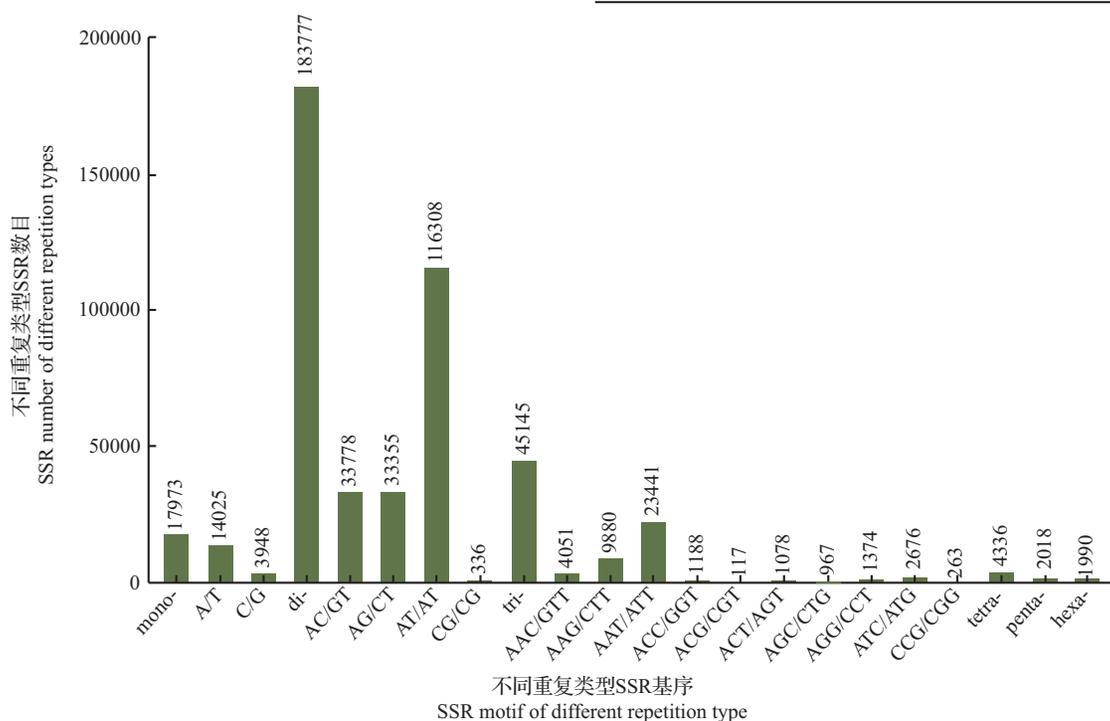
2.1 三七全基因组 SSR 标记开发与验证

从 PnV2 基因组 90336 条基因组骨架 (Scaffold) 中共检测到 255239 个 SSR 位点, 分布于 30605 条基因组骨架, 其中, 有 20533 条 Scaffolds 包含 1 个以上 SSR 位点 (表 4)。根据 SSR 核苷酸重复类型, SSR 重复单元从 1 到 6 数目分别为 17973、183777、45145、4336、2018、1990 (图 1)。在 PnV2 基因组中检测到 255239 个位点, 设计 182501 对标记引物, 预扩增 20846786 个 SSR 位点, 平均每个标记可扩增 114.2 个位点。其中, e-PCR 预扩增共有 97396 个标记仅能扩增出 1 个位点, 占比 53.37% (表 4)。

表 4 三七基因组 SSR 标记分布特征

Table 4 Distribution characteristics of SSR in the genome of *P. notoginseng*

SSR 鉴定	统计
SSR locus identification	Statistics
PnV2 基因组检测的序列数目	90336
Number of PnV2 genome sequences examined	
PnV2 基因组检测到序列的总长度 (bp)	1790761764
Total size of detected PnV2 genome sequences	
PnV2 基因组识别到 SSR 的数量	255239
Total number of SSRs identified in the PnV2 genome	
PnV2 基因组包含 SSR 的序列数目	30605
Number of sequences containing SSRs in the PnV2 genome	
PnV2 基因组包含 1 个以上 SSR 的序列数量	20533
Number of sequences containing more than 1 SSR in the PnV2 genome	
可通过 Primer3 设计引物的 SSR 位点	182501
SSR locus that can be design with primers using primer3	
PnV1 基因组扩增 1 个位点的标记	60979
Markers at 1 locus were amplified in the PnV1 genome	
PnV2 基因组扩增 1 个位点的标记	97396
Markers at 1 locus were amplified in the PnV2 genome	
PnV2 基因组 CDS 中能扩增的标记	1738
Markers capable of amplification in the PnV2 genomic CDS	



mono-表示单核苷酸重复, di-表示双核苷酸重复, tri-表示三核苷酸重复, tetra-表示四核苷酸重复, penta-表示五核苷酸重复, hexa-表示六核苷酸重复

mono- for single nucleotide repeats, di- for dinucleotide repeats, tri- for trinucleotide repeats, tetra- for tetranucleotide repeats, penta- for pentanucleotide repeats, hexa- for hexanucleotide repeats

图 1 不同重复类型 SSR 基序数量

Fig. 1 SSR number of different repetition types

在 PnV1 基因组中, 97396 个标记可预扩增 73918 个位点, 其中有 60979 个标记可扩增出单个位点, 在 PnV2 CDS 序列中进行 e-PCR 分析, 有 1738 个标记在 PnV2 基因组 CDS 序列中可预扩增 2136 个位点。其中, 有 414 个标记在 PnV1 和 PnV2 基因组中的 e-PCR 产物具有扩增长度差异, 有 102 个标记

的 e-PCR 产物差异大于 20 bp。使用 102 个标记在 11 个集团群体中进行聚丙烯酰胺非变性凝胶验证, 有 60 个标记可扩增出条带, 扩增效率为 58.82%, 其中 17 个标记 (SSR8~SSR24) 在 11 份集团群体间具有多态性 (图 2)。

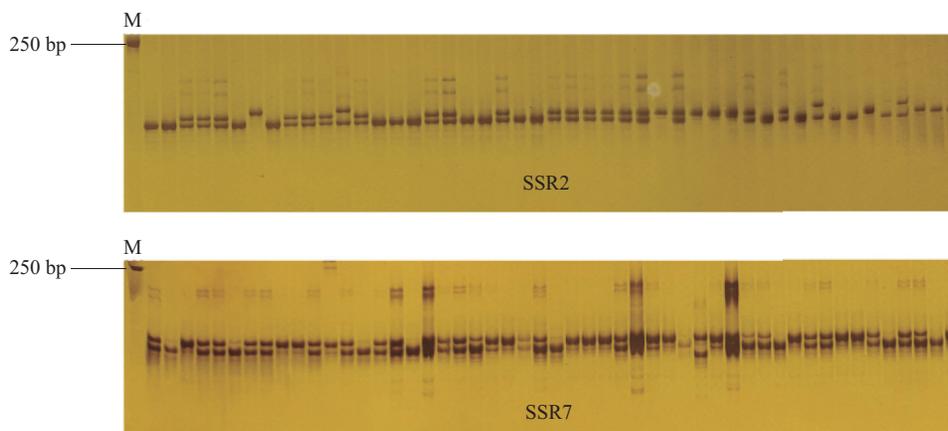


图 2 部分材料 SSR2 和 SSR7 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Fig. 2 Part of the material polyacrylamide gel electrophoresis detection with primer SSR2 and SSR7

2.2 11 份集团群体遗传多样性分析

利用前期研究的 7 对 (SSR1~SSR7) 多态性标记引物, 以及本次筛选获得的 17 对 (SSR8~SSR24) 标记引物 (表 3), 对 11 份集团群体进行遗传多样性分析。结果表明, 24 个标记在 11 份集团群体中可扩增出 52 个位点, 平均每个标记扩增位点 2.29 个; 其中

SSR2、SSR5、SSR7、SSR13、SSR15、SSR21、SSR22 可扩增出 3 个位点。24 个标记多态信息含量值为 0.0468~0.7514, 平均多态信息含量值为 0.4125, 9 个标记为高度多态性, 10 个标记为中度多态性, 5 个标记为低多态性。平均遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.0447, 平均基因流 (N_m) 为 11.6189 (表 5)。

表 5 SSR 引物多态性分析

Table 5 Polymorphism analysis of SSR primers

标记 Locus	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	香农信息指数 I	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	遗传分化系数 F_{st}	基因流 N_m
SSR1	2	1.9555	0.6817	0.6111	0.4906	0.3453	0.0557	4.2380
SSR2	3	2.3082	0.9189	0.5238	0.5690	0.6803	0.0252	9.6529
SSR3	2	1.6101	0.5667	0.4286	0.3804	0.4255	0.0411	5.8398
SSR4	2	1.9969	0.6924	0.7222	0.5012	0.2581	0.0454	5.2570
SSR5	3	1.3987	0.5529	0.3254	0.2862	0.6482	0.0526	4.5022
SSR6	2	1.6602	0.5870	0.3730	0.3993	0.4739	0.0465	5.1209
SSR7	3	2.0259	0.7544	0.5952	0.5084	0.5892	0.0514	4.6172
SSR8	2	1.9938	0.6916	0.8651	0.5004	0.1296	0.0174	14.0928
SSR9	2	1.0080	0.0259	0.0079	0.0079	0.5000	0.0457	5.2250
SSR10	2	1.0322	0.0815	0	0.0314	0.5156	0.0710	3.2716
SSR11	2	1.9989	0.6929	0.9444	0.5017	0.0468	0.0033	76.5634
SSR12	2	1.9898	0.6906	0.5476	0.4994	0.3756	0.0722	3.2113
SSR13	3	1.9834	0.8291	0.5397	0.4978	0.6457	0.0760	3.0391
SSR14	2	1.0241	0.0646	0.0238	0.0236	0.4997	0.1734	1.1917
SSR15	3	2.1450	0.9142	0.3492	0.5359	0.7514	0.0487	4.8872
SSR16	2	1.9756	0.6870	0.6667	0.4958	0.3024	0.0306	7.9234
SSR17	2	1.0080	0.0259	0.0079	0.0079	0.5000	0.0571	4.1250

表 5 (续)

标记 Locus	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	香农信息指数 <i>I</i>	观察杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>	遗传分化系数 <i>Fst</i>	基因流 <i>Nm</i>
SSR18	2	1.9980	0.6926	0.6349	0.5015	0.3315	0.0421	5.6928
SSR19	2	1.0322	0.0815	0.0317	0.0314	0.4995	0.0327	7.3913
SSR20	2	1.9999	0.6931	0.8492	0.5020	0.1451	0.0215	11.3966
SSR21	3	2.5067	0.9858	0.8095	0.6035	0.5732	0.0293	8.2778
SSR22	3	2.6127	1.0253	0.9921	0.6197	0.4950	0.0189	12.9441
SSR23	2	1.9955	0.6920	0.9365	0.5009	0.0619	0.0085	29.2042
SSR24	2	1.9955	0.6920	0.8889	0.5009	0.1075	0.0060	41.1890
均值 Mean	2.2917	1.8023	0.5966	0.5281	0.3957	0.4125	0.0447	11.6189

11 份集团群体遗传多样性分析结果显示,各群体内观察杂合度 (*Ho*) 0.4583~0.6042, 平均为 0.5288; 期望杂合度 (*He*) 0.3787~0.4392, 平均为 0.4007; 香农信息指数 (*I*) 为 0.5123~0.6198, 平均为 0.5708。11 份集团群体期望杂合度 (*He*) 均小于观察杂合度 (*Ho*), 结果表明, 11 份群体间无遗传分化, 但存在较强的基因流 (*Nm*), 群体内遗传多样性较高, 变异主要存在于集团群体内的单株之间(表 6)。

表 6 11 份集团群体遗传多样性分析

Table 6 Genetic diversity analysis of 11 group populations

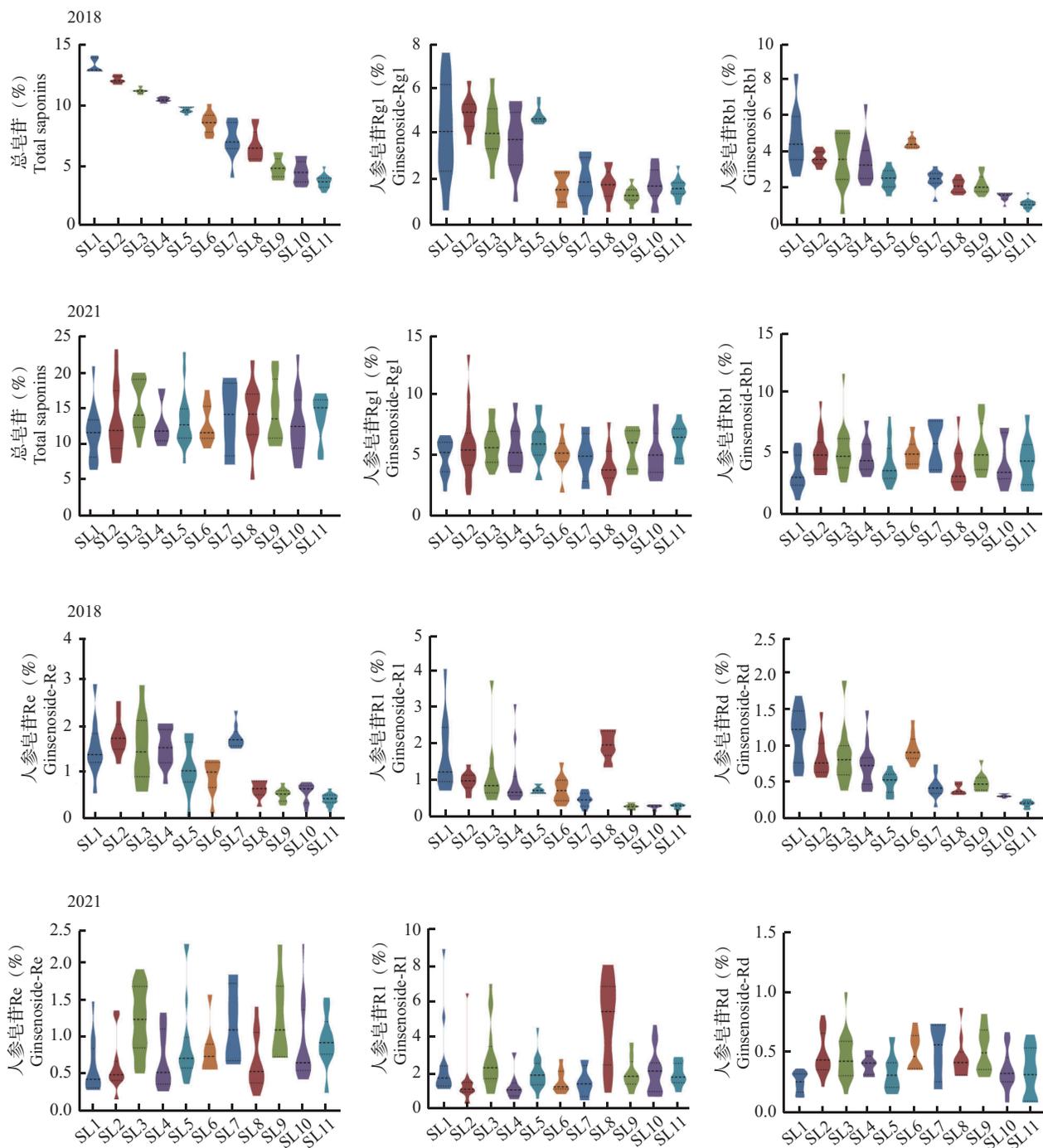
群体 Population	等位 基因数 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	香农信 息指数 <i>I</i>	观察杂 合度 <i>Ho</i>	期望杂 合度 <i>He</i>
SL1	2.0833	1.8132	0.5974	0.5128	0.4112
SL2	2.1667	1.7899	0.5945	0.5347	0.4048
SL3	2.0417	1.7513	0.5609	0.5000	0.3873
SL4	2.1250	1.8329	0.6198	0.6042	0.4392
SL5	2.0833	1.7723	0.5767	0.5078	0.3940
SL6	2.0417	1.7936	0.5842	0.6042	0.4167
SL7	1.9167	1.6632	0.5123	0.4583	0.3899
SL8	2.1667	1.7496	0.5808	0.4958	0.3993
SL9	1.9583	1.7339	0.5463	0.5104	0.3944
SL10	2.0000	1.7292	0.5490	0.5472	0.3787
SL11	2.0000	1.7490	0.5564	0.5417	0.3919
均值 Mean	2.0530	1.7616	0.5708	0.5288	0.4007

2.3 集团群体皂苷含量比较分析

对 11 份集团群体的第一代群体总皂苷和 5 种单体皂苷含量进行分析, 与当代集团群体总皂苷含量进行比较。11 份集团群体第一代总皂苷含量为 11.60%~15.61%, 人参皂苷 Rg1 含量为 4.03%~6.11%, 人参皂苷 Rb1 含量为 3.48%~5.80%, 人参皂

苷 Re 含量为 0.59%~1.23%, 三七皂苷 R1 含量为 1.54%~4.96%, 人参皂苷 Rd 含量为 0.26%~0.52%。11 份集团群体第一代平均总皂苷含量在 10% 以上。当代群体 SL1 总皂苷含量为 13.30%, SL2 为 12.13%, SL3 为 11.20%, SL4 为 10.46%, 第一代 SL1 群体总皂苷含量为 11.60%, SL2 为 13.87%, SL3 为 15.61%, SL4 为 12.87%。与当代群体总皂苷相比, 第一代 SL2~SL4 总皂苷含量提高, 但未明显高于第一代 SL9~SL11。综上所述, SL1~SL11 集团群体第一代群体间, 总皂苷含量没有显著差异。

第一代单体皂苷含量比较发现, 11 份集团群体间具有差异。当代群体 SL5 人参皂苷 Rg1 含量为 4.82%、SL6 人参皂苷 Rb1 含量为 4.46%、SL7 人参皂苷 Re 含量为 1.73%、SL8 三七皂苷 R1 含量为 1.97%, 第一代群体 SL5 人参皂苷 Rg1 含量为 5.93%、SL6 中人参皂苷 Rb1 含量为 5.08%、SL7 人参皂苷 Re 含量为 1.16%、SL8 三七皂苷 R1 含量为 4.96%。第一代群体与当代群体相比, SL5 群体中人参皂苷 Rg1、SL6 群体中人参皂苷 Rb1、SL8 群体中三七皂苷 R1 含量提高。比较第一代群体单体皂苷含量, 发现 SL5 人参皂苷 Rg1 含量高于 SL6~SL10, 低于 SL11 但差异不明显; SL6 人参皂苷 Rb1 含量低于 SL7 和 SL9, 高于其他群体但差异不明显; SL7 人参皂苷 Re 含量明显高于 SL8。SL8 构建时当代单株总皂苷含量范围在 5.34%~8.87% 之间, 平均值为 6.68%, 明显低于 SL1~SL6, 单株三七皂苷 R1 含量在 1.36%~2.41% 之间, 平均值为 1.97%, 明显高于 SL1 之外的群体。当代群体 SL1 人参皂苷 Rd 含量明显高于其他群体, 但在第一代群体中 SL1 人参皂苷 Rd 含量明显低于 SL2~SL11, 第一代群体 SL2~SL11 之间人参皂苷 Rd 含量无明显差异。第一代群体 SL8 平均总皂苷含量为 14.06%, 与其他群体没有显著差异, 三七皂苷 R1 平均含量达 4.96%, 明显高于其余 10 个群体(图 3)。



2018年群体为当代群体,2021年群体为第一代群体

The 2018 groups was the contemporary generation, and the 2021 groups was the first generation

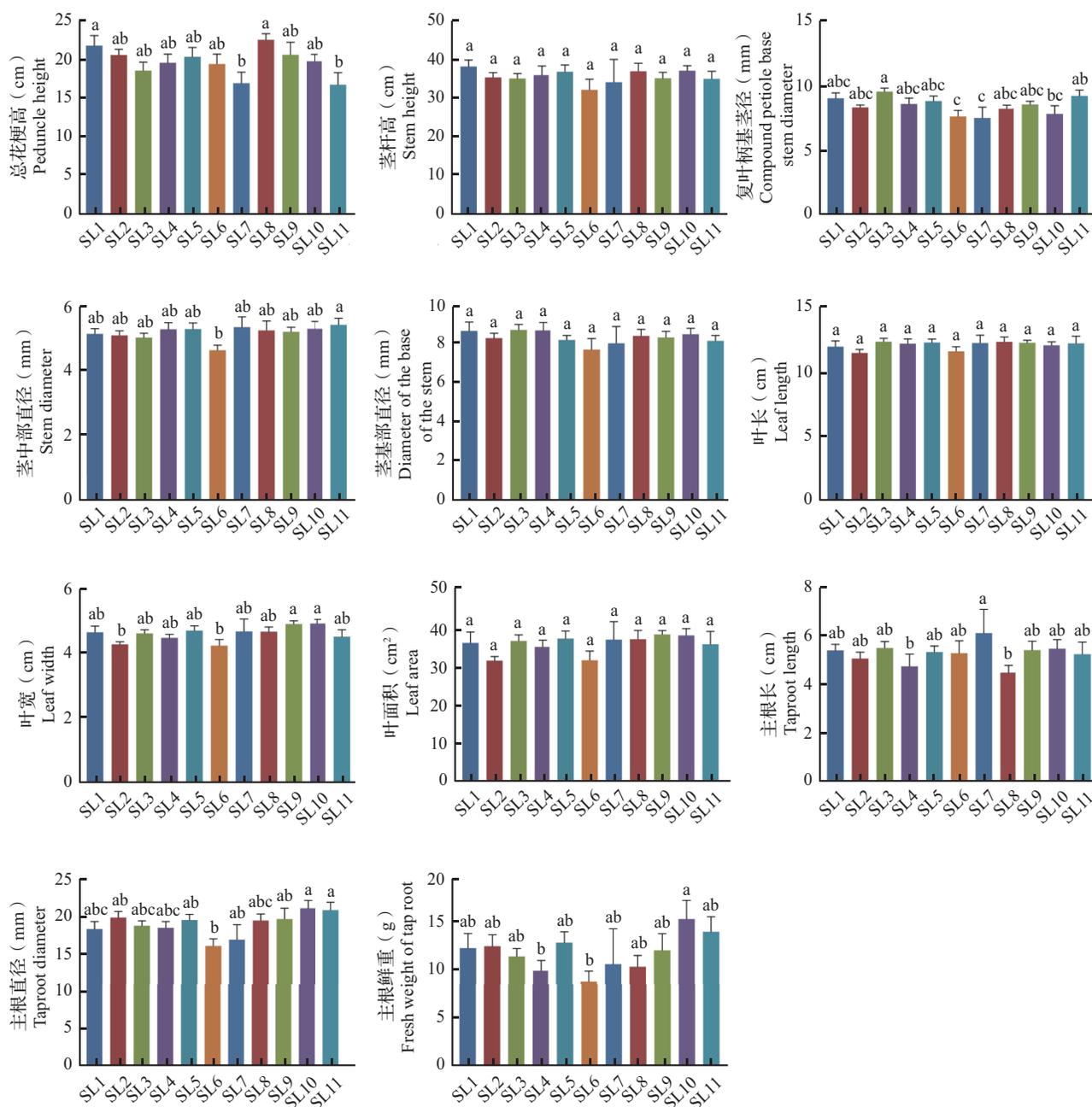
图3 2018年和2021年11份集团群体材料皂苷含量比较

Fig. 3 Compare with total saponins and monomer saponins in 11 group populations in 2018 and 2021

2.4 三七集团群体表型性状比较和性状变异分析

11份集团群体表型性状调查比较发现,茎秆高、茎基部直径、叶长和叶面积等4个性状在群体间无显著差异,总花梗高、复叶柄基茎径、茎中部直径、叶宽、主根长、主根直径、主根鲜重等7个性状群体间差异显著。集团群体差异的性状比较结果表

明,SL7和SL11的总花梗显著矮于SL1和SL8,SL3的复叶柄基茎径显著大于SL6、SL7和SL10,SL11茎中部直径显著大于SL6,SL9和SL10的叶宽显著宽于SL2和SL6,SL7主根长显著长于SL4和SL8,SL10和SL11主根直径显著大于SL6,SL10主根鲜重于SL4和SL6(图4)。



不同小写字母表示群体之间差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

图4 2021年11月份集团群体农艺性状评价

Fig. 4 Comparison with agronomic traits among the 11 group populations in 2021

利用变异系数,对皂苷含量和11个表型性状进行群体内变异和群体间变异分析。结果表明,集团群体内三七皂苷R1变异系数在32.77%~95.18%之间;叶片长度在群体内的变异小,变异系数在4.69%~13.85%之间。叶部性状和茎部性状与根部性状和皂苷含量相比变异较小,根部性状和皂苷含量在群体内变异幅度大。集团群体间,三七皂苷R1

含量的变异与其他性状相比较,变异系数达44.46%。相较于其他性状,三七皂苷R1含量在群体间和群体内都存在着较大变异(图5)。

3 讨论

三七品种选育主要通过目标性状进行混合选择构建集团群体。目前,育种家已利用该方法根

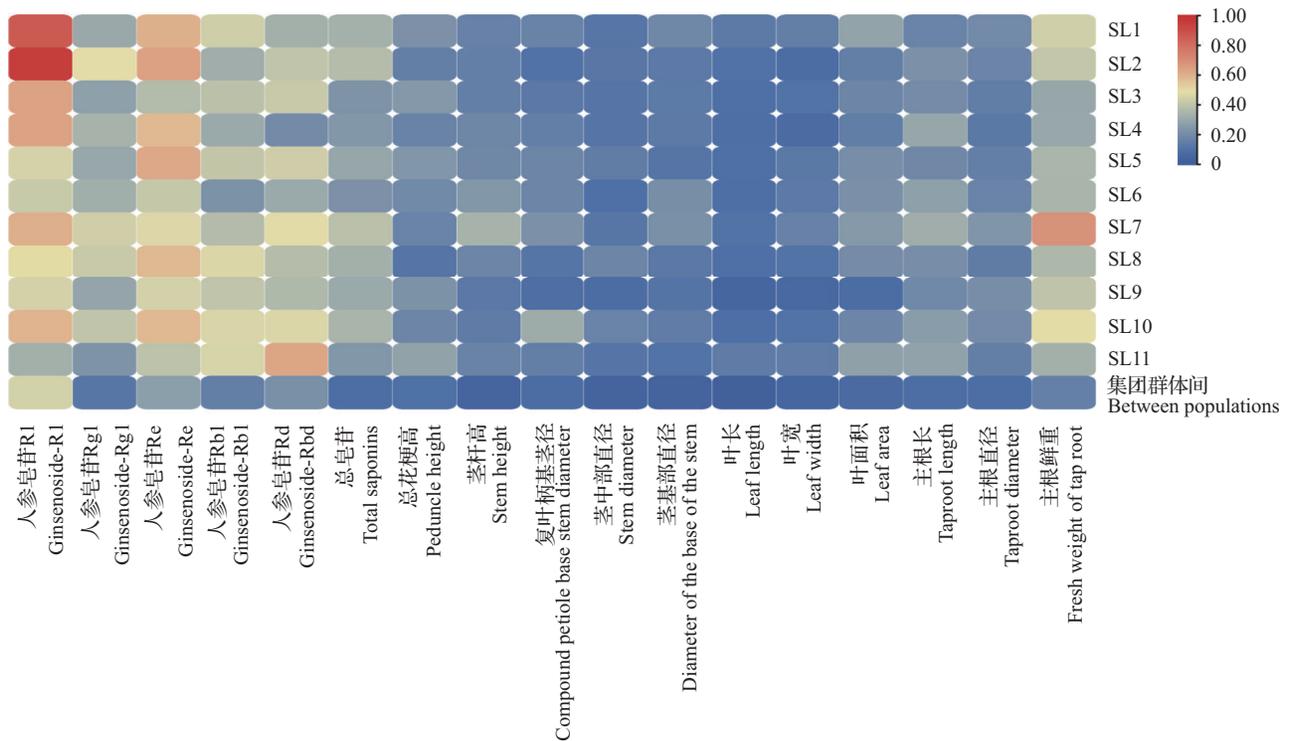


图5 三七群体2021年17个性状的变异系数热图

Fig. 5 The heat map of coefficient of variation for 17 traits in the 11 group populations of *P. notoginseng*

据茎秆颜色、高度、复叶柄夹角、总花梗高度、根形、根的颜色等性状选育获得三七新品种^[9]。但三七新品种依然面临选择效率低、育种周期长等问题,针对皂苷含量的品种选育工作进展尤为缓慢。随着分子标记的开发与应用,张金渝等^[13]通过EST-SSR引物对17个三七品系进行遗传多样性及遗传分化分析,发现相同栽培居群内筛选出的不同品系存在遗传分化,可用EST-SSR标记检测集团选择结果,提高育种效率。前期研究表明,三七群体内单株间总皂苷含量和单体皂苷含量有着较大差异^[2],因此利用分子标记进行群体内皂苷含量的差异单株选择成为研究的重点工作。

本研究基于皂苷含量构建集团群体,用24对SSR多态性分子标记探究不同皂苷含量的集团群体第一代群体的遗传多样性。11份集团群体间观察杂合度(H_o)相近(0.4583~0.6042),且群体的观察杂合度(H_o)均高于期望杂合度(H_e),表明不同群体内三七基因型分布不平衡,群体内部遗传多样性丰富。Su等^[17]对92株三七植株,利用41对多态性标记分析样本间遗传多样性,结果表明92个单株间观察杂合度(H_o)为0.5109。本研究中集团群体平均观察杂合度(H_o)为0.5288,与未经驯化的三七栽培群体相近。三七集团群体间遗传分化系数(F_{st})为0.0447,与Pan等^[6]研究中遗传分化系数(F_{st})为

0.0347的结果相近,表明不同群体之间遗传分化低,遗传分化仅发生在群体内单株之间。同时,从11份集团群体中平均基因流(Nm)为11.6189可知群体间存在较强的基因流动,遗传分化程度低。前人研究也表明,三七居群遗传分化系数(F_{st})在0.0016~0.0193之间,居群间几乎没有遗传分化,不同地区居群间的遗传关系较近,各地居群间存在着遗传相似性^[6]。张金渝等^[13]使用EST-SSR对经过3代集团选择的育种材料进行遗传分析,表明相同栽培群体内筛选出的不同品系存在一定程度遗传分化。本研究中第一代集团群体分化程度低,杂合度高,推测与三七为常异花虫媒授粉有关。

虽然三七居群间分化程度低,但居群间和居群内有着较为明显的表型变异。11份集团群体之间根部性状变异系数介于7.95%~44.46%之间。此外,第一代集团群体间单体皂苷三七皂苷R1含量相差27倍,群体之间三七皂苷R1变异系数为44.46%,其他单体皂苷群体间的变异系数介于11.85%~26.98%之间,总皂苷的变异系数为7.87%。单体皂苷三七皂苷R1在群体内和群体间均表现出较大的变异,这种差异为针对三七皂苷R1性状选择提供了依据。第一代集团群体SL8表现为三七皂苷R1含量显著高于其他群体,第一代集团群体SL5、SL6、SL7也表现出较高的单体皂苷含量,表明选择三七

皂苷 R1 含量高的单株构建集团的方法可行。而在当代群体构建时,选择单株未考虑单体皂苷之间的比例,可能是当代植株总皂苷含量有显著差异而第一代群体间无显著差异的原因之一。

在 SSR 引物选择过程中,使用 e-PCR 在同一物种的不同版本基因组信息中进行预扩增时,如扩增产物长度差异 ≥ 3 bp,则该引物可能具备较高的多态性^[26]。本研究获得在两个版本参考基因组中 e-PCR 预扩增条带长度相差 ≥ 20 bp 的 102 对引物,其中 60 对引物可扩增出条带,仅 17 对引物表现出多态性。课题组前期随机选取的 200 对引物中,有 68 对能够扩增出条带,41 对表现出多态性^[10]。尽管在引物筛选中 e-PCR 能够提高正确性,但多态引物比例并未增加,推测引物扩增效率和多态性与基因组组装质量及群体结构有关。三七中 SSR 分子标记与性状的关联分析可获得与皂苷含量相关联的位点或基因,已有研究通过 SSR 标记与皂苷含量的关联分析,克隆获得可能调控三七中皂苷合成的基因 *PnDof1*,将该基因在三七细胞系中过表达后细胞系中三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd 含量显著升高^[17]。本研究中获得 SSR 标记未获得性状关联位点和基因,推测与群体构建方式和 SSR 标记密度相关。因此,后续研究需加强三七基因组水平的多态性 SSR 标记开发和性状的关联分析研究。通过已构建的 SL8 群体开发更多三七皂苷 R1 含量 SSR 分子标记并开展关联分析。

在与三七同属的人参中,已有相应的 SSR 分子标记组合可以区分人参品种^[27]。目前三七也已有多个品种,并且从其转录组和基因组中鉴定出了许多 SSR 位点^[9-10]。本研究通过皂苷含量构建集团群体,基于三七基因组开发了 SSR 标记并对集团群体农艺性状进行遗传评价,为高皂苷育种材料的选择和品种选育提供参考。在后续的研究中,可通过筛选特异的 SSR 标记或 SSR 组合来区分不同的三七品种。SSR 标记在三七中的开发和应用前景广阔,不仅有助于三七种质资源的保护与利用,还将推动三七育种和产业的可持续发展。

参考文献

- [1] 王莹,褚扬,李伟,马晓慧,魏振平.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展.中草药,2015,46(9):1381-1392
Wang Y, Chu Y, Li W, Ma X H, Wei Z P. Advances in study on saponins in *Panax notoginseng* and their pharmacological activities. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(9): 1381-1392
- [2] Hong D Y Q, Lau A J, Yeo C L, Liu X K, Yang C R, Koh H L, Hong Y. Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(22): 8460-8467
- [3] 张金渝,肖慧,金航,崔秀明.三七栽培居群间表型变异式样研究.中国中药杂志,2009,34(24):3295-3298
Zhang J Y, Xiao H, Jin H, Cui X M. Patterns of phenotypic variation among cultivated populations of *Panax notoginseng*. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(24): 3295-3298
- [4] 肖慧,金航,张金渝,萧凤回,段承俐,崔秀明.三七表型多样性研究.西南农业学报,2008(1):147-151
Xiao H, Jin H, Zhang J Y, Xiao F H, Duan C L, Cui X M. Study on phenotypic diversity of *Panax notoginseng*. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2008(1): 147-151
- [5] 张金渝,杨维泽,崔秀明,金航,虞泓,陈中坚,沈涛,杨涛.三七栽培居群遗传多样性的 EST-SSR 分析.植物遗传资源学报,2011,12(2):249-254
Zhang J Y, Yang W Z, Cui X M, Jin H, Yu H, Chen Z J, Shen T, Yang T. Genetic diversity analysis of populations of *Panax notoginseng* using EST-SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(2): 249-254
- [6] Pan Y Z, Wang X Q, Sun G L, Li F S, Gong X. Application of RAD sequencing for evaluating the genetic diversity of domesticated *Panax notoginseng* (Araliaceae). PLoS ONE, 2016, 11:e0166419
- [7] 陈中坚,崔秀明,孙玉琴,王朝梁.三七主要农艺性状的相关和通径分析.中国中药杂志,2004(1):41-43
Chen Z J, Cui X M, Sun Y Q, Wang C L. Correlation and path analysis of main agronomic traits in *Panax notoginseng*. China Journal of Chinese Materia Medica, 2004(1): 41-43
- [8] 陈中坚,王勇,曾江,李忠义,田玉玲.三七植株的性状差异及其对三七产量和质量影响的调查研究.中草药,2001(4):71-73
Chen Z J, Wang Y, Zeng J, Li Z Y, Tian Y L. Studies on characteristic distinction and its affect on yield and quality of *Panax notoginseng*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001(4): 71-73
- [9] 李满桥,梁绮文,闫静,陈中坚,王勇,魏富刚,张广辉,刘冠泽,杨生超.三七遗传改良的研究进展.中草药,2022,53(10):3241-3250
Li M Q, Liang Q W, Yan J, Chen Z J, Wang Y, Wei F G, Zhang G H, Liu G Z, Yang S C. Research progress on genetic improvement of *Panax notoginseng*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(10): 3241-3250
- [10] 揭应碧,卢迎春,宋婉玲,韦坤华,张广辉,杨生超.三七基因组 SSR 位点分析和多态性引物开发.热带作物学报,2018,39(7):1351-1358
Jie Y B, Lu Y C, Song W L, Wei K H, Zhang G H, Yang S C. Analysis of SSR Loci information in *Panax notoginseng* genomes and polymorphic primers development. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(7): 1351-1358

- [11] 董林林, 陈中坚, 王勇, 魏富刚, 张连娟, 徐江, 尉广飞, 王瑞, 杨娟, 刘伟林, 李西文, 余育启, 陈士林. 药用植物DNA标记辅助育种(一): 三七抗病品种选育研究. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 56-62
Dong L L, Chen Z J, Wang Y, Wei F G, Zhang L J, Xu J, Wei G F, Wang R, Yang J, Liu W L, Li X W, Yu Y Q, Chen S L. DNA marker-assisted selection of medicinal plants (I). Breeding research of disease-resistant cultivars of *Panax notoginseng*. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(1): 56-62
- [12] Luo H M, Sun C, Sun Y Z, Wu Q, Li Y, Song J Y, Niu Y Y, Cheng X L, Xu H X, Li C Y, Liu J Y, Steinmetz A, Chen S L. Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers. BMC Genomics, 2011, 12(Suppl 5): S5
- [13] 张金渝, 杨维泽, 崔秀明, 虞泓, 金航, 陈中坚, 沈涛. EST-SSR 标记对三七选育品种的研究. 中国中药杂志, 2011, 36(2), 97-101
Zhang J Y, Yang W Z, Cui X M, Yu H, Jin H, Chen Z J, Shen T. Studies on EST-SSR markers in selected lines of *Panax notoginseng*. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(2): 97-101
- [14] Chen W, Kui L, Zhang G H, Zhu S S, Zhang J, Wang X, Yang M, Huang H C, Liu Y X, Wang Y, Li Y H, Zeng L P, Wang W, He X H, Dong Y, Yang S C. Whole-genome sequencing and analysis of the Chinese herbal plant *Panax notoginseng*. Molecular Plant, 2017, 10(6): 899-902
- [15] Zhang D, Li W, Xia E H, Zhang Q J, Liu Y, Zhang Y, Tong Y, Zhao Y, Niu Y C, Xu J H, Gao L Z. The medicinal herb *Panax notoginseng* genome provides insights into ginsenoside biosynthesis and genome evolution. Molecular Plant, 2017, 10(6): 903-907
- [16] 揭应碧. 三七 SSR 标记开发及遗传多样性分析. 昆明: 云南农业大学, 2018
Jie Y B. SSR marker development and genetic diversity analysis in *Panax notoginseng*. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2018
- [17] Su L L, Zhang Y P, Yang Y, Qu Y, Cui X M, Ge F, Liu D Q. Development of SSR markers on the basis of the *Panax notoginseng* transcriptome for agronomic and biochemical trait association analyses. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2023 (34): 100475
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 12-13
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2020 edition. I. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 12-13
- [19] 中华人民共和国农业部. NY/T 2353-2013 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 三七. 北京: 中国农业出版社, 2013
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 2353-2013 guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability-*Panax notoginseng*. Beijing: China Agriculture Press, 2013
- [20] 陈中坚, 孙玉琴, 王炳艳, 朱艳, 崔秀明. 三七叶面积的测定及其计算方法研究. 现代中药研究与实践, 2003(S1): 64-29
Chen Z J, Sun Y Q, Wang B Y, Zhu Y, Cui X M. Study on the measurement and calculation methods of leaf area of *Panax notoginseng*. Research and Practice on Chinese Medicines, 2003(S1): 64-29
- [21] Schuler G D. Electronic PCR: Bridging the gap between genome mapping and genome sequencing. Trends in Biotechnology, 1998, 16: 456-459
- [22] 陈新民, 何中虎, 史建荣, 夏兰芹, Rick Ward, 周阳, 蒋国梁. 利用 SSR 标记进行优质冬小麦品种(系)的遗传多样性研究. 作物学报, 2003 (1): 13-19
Chen X M, He Z H, Shi J R, Xia L Q, Rick W, Zhou Y, Jiang G L. Genetic diversity of high quality winter wheat varieties (lines) based on SSR markers. Acta Agronomica Sinica, 2003 (1): 13-19
- [23] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 董玉琛, 张学勇. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析. 作物学报, 2005 (2): 144-149
Hao C Y, Wang L F, Jia J Z, Dong Y C, Zhang X Y. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers. Acta Agronomica Sinica, 2005 (2): 144-149
- [24] 张媛媛, 束爱萍, 张立娜, 曹桂兰, 韩龙植. 中国不同省份籼稻地方品种的遗传结构分析. 作物学报, 2011, 37(12): 2173-2178
Zhang Y Y, Shu A P, Zhang L N, Cao G L, Han L Z. Analysis of genetic structure for *Indica* rice landraces from different provinces in China. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(12): 2173-2178
- [25] 刘金洋, 周琰琰, 林云, 刘萌萌, 薛晨晨, 陈景斌, 闫强, 吴然然, 陈新, 袁星星. 南方 90 份秋播区蚕豆粒型性状的 SSR 关联分析. 植物遗传资源学报, 2023, 24(6): 1602-1618
Liu J Y, Zhou Y Y, Lin Y, Liu M M, Xue C C, Chen J B, Yan Q, Wu R R, Chen X, Yuan X X. Associate studies of seed size-related traits and SSR markers of 90 Faba beans in autumn sowing areas. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(6): 1602-1618
- [26] 熊登坤, 鲍大鹏, 边银丙. 利用电子 PCR 分析草菇基因组 SSR 标记多态性. 微生物学通报, 2014, 41(10): 2070-2075
Xiong D K, Bao D P, Bian Y B. Polymorphism analysis of genomic SSR markers of *Volvariella volvacea* by electronic PCR. Microbiology China, 2014, 41(10): 2070-2075
- [27] Kim N H, Choi H I, Ahn I O, Yang T J. EST-SSR marker sets for practical authentication of all nine registered ginseng cultivars in Korea. Journal Ginseng Research, 2012, 36(3): 298-307