

## 基于 SSR 分子标记的柴胡遗传多样性与遗传结构分析

宋 芸<sup>1</sup>, 张鑫瑞<sup>1</sup>, 李 政<sup>1</sup>, 孙 哲<sup>1</sup>, 李澳旋<sup>1</sup>, 杜晓蓉<sup>1</sup>, 乔永刚<sup>1,2\*</sup>

(1. 山西农业大学生命科学院, 山西 太谷 030801; 2. 中兽医现代化山西省重点实验室, 山西 太谷 030801)

**摘要:** 为探究柴胡遗传多样性和居群遗传结构, 揭示柴胡的遗传变异情况, 本研究利用 18 对 SSR 分子标记, 对来自山西及周边省份的 62 个柴胡栽培和野生居群共 619 个植株进行遗传多样性以及居群遗传结构分析。结果显示: 62 个柴胡居群均具有较高的遗传多样性, 柴胡野生居群的遗传多样性高于栽培居群, AMOVA 分析表明柴胡居群内遗传变异大于居群间的变异。主坐标分析将柴胡居群分为 3 类, 第一类为来自山西各地的野生柴胡居群, 第二类由来自山西、河北、陕西、辽宁的栽培柴胡居群组成, 第三类由来自山西和甘肃的 34 个栽培柴胡居群组成。STRUCTURE 软件居群遗传结构分析预测 62 个柴胡居群的最佳分组数为 2 组, 第一组组成与主坐标分析中分类为第三类的居群相同, 第二组则包括有主坐标分析中划分为第一类和第二类的居群。主坐标分析、居群遗传结构分析以及 NJ 树聚类均将野生柴胡居群聚为一类, 使其与栽培居群区分开来。本研究为柴胡的种质资源利用、遗传变异研究以及柴胡优质种质资源开发提供理论依据。

**关键词:** 柴胡; SSR; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)04-1193-10

## Genetic diversity and genetic structure analysis of *Bupleurum chinense* DC. based on SSR molecular marker

SONG Yun<sup>1</sup>, ZHANG Xin-rui<sup>1</sup>, LI Zheng<sup>1</sup>, SUN Zhe<sup>1</sup>, LI Ao-xuan<sup>1</sup>,  
DU Xiao-rong<sup>1</sup>, QIAO Yong-gang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Shanxi Key Lab for Modernization of TCM, Taigu 030801, China)

**Abstract:** In order to explore the genetic diversity and structure of *Bupleurum chinense*, we used 18 pairs of SSR molecular markers to analyze the genetic diversity of 619 individuals in 62 cultivated and wild populations of *Bupleurum chinense* from Shanxi and the surrounding provinces. The results show that the 62 *Bupleurum chinense* populations have high genetic diversity, with that of the wild *Bupleurum chinense* populations greater than that of cultivated populations. AMOVA analysis indicated that genetic variation within populations was greater than between populations. Principal coordinate analysis (PCoA) divided the *Bupleurum chinense* populations into 3 groups, the first group containing wild *Bupleurum chinense* populations from all parts of Shanxi, the second group consisting of cultivated *Bupleurum chinense* populations from Shanxi, Hebei, Shaanxi and Liaoning, and the third group consisting of cultivated *Bupleurum chinense* from Shanxi and Gansu. STRUCTURE software cluster genetic structure analysis grouped the 62 *Bupleurum chinense* into two populations: the first group composition was the same as the population classified as the third category in the PCoA analysis, while the second group includes the populations from the first and second categories of the PCoA. PCoA, cluster genetic structure analysis, and NJ tree cluster all gather wild *Bupleurum chinense* population into a single category, distinguishing it from the cultivated

收稿日期: 2021-10-14; 修回日期: 2021-11-09.

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFC1710801); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金.

\*通讯作者 Tel: 13935491202, E-mail: sxndqyg@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1479

populations. This study provides a theoretical basis for the utilization of germplasm resources, genetic variation and the development of quality germplasm resources for *Bupleurum chinense*.

**Key words:** *Bupleurum chinense*; SSR; genetic diversity; genetic structure

柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 为伞形科 (Umbelliferae) 柴胡属 (*Bupleurum* L.) 植物, 有 2 000 多年的药用历史, 《中国药典》记载, 中药材柴胡为柴胡和狭叶柴胡的干燥根<sup>[1]</sup>, 具有多种药理作用<sup>[2]</sup>。近年来随着柴胡药用价值的不断发现, 市场对于柴胡的需求量也逐渐增加。但其野生资源由于过度采挖以及生境破坏等原因数量锐减<sup>[3]</sup>, 中药材柴胡的供应主要依赖人工栽培, 柴胡栽培种质混杂情况严重, 造成药材混淆以及用药安全等问题, 亟需开展柴胡种质资源收集整理与鉴定, 为柴胡优良种质创新提供支撑。另外, 对柴胡种质进行遗传多样性研究, 有助于探究柴胡的起源与进化关系, 为种质鉴定、分类提供理论依据, 同时为良种选育、资源保护等提供有效参考<sup>[4]</sup>。

种质资源遗传多样性可通过表型性状或者分子标记等多种方法进行研究, 表型性状具有不稳定性, 易受外界环境影响, 从而导致评价结果缺乏稳定性<sup>[5]</sup>。分子标记技术可以在 DNA 水平上揭示植物的遗传变异, 受外界环境影响小, 是一种稳定可靠的遗传分析方法<sup>[6]</sup>。随着研究技术的发展, 多种分子标记技术已经普遍运用于植物的遗传多样性分析<sup>[7-10]</sup>。简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 分子标记技术为共显性标记, 具有重复性好、多态性高、稳定性强等优点, 是常用的遗传标记方法<sup>[11]</sup>, 广泛用于图谱构建、种质资源评价与鉴定、遗传多样性分析、辅助育种等领域<sup>[12]</sup>。SSR 分子标记技术已经成功运用于甘草<sup>[13]</sup>、党参<sup>[14]</sup>、黄芪<sup>[15]</sup>、萱草<sup>[16]</sup>等多种药用植物的研究中。

因此, 本实验收集了来自于山西、甘肃、河北、陕西、内蒙古等柴胡主产区的 62 个柴胡栽培和野生居群共 619 份样本, 利用 SSR 分子标记对柴胡进行遗传多样性及居群遗传结构分析, 研究不同居群柴胡的遗传多样性水平、遗传分化、变异程度以及居群结构组成, 以期对柴胡种质资源研究及核心种质构建、优良品种选育等提供一定的理论基础。

## 材料与方法

**材料** 本研究使用 62 个柴胡居群的 619 份材料, 其中栽培种质来自于山西、陕西、甘肃、河北以及内蒙古的 51 个产地, 野生种质采集于山西运城、长治、晋中等地。每个产地均随机选取 10 株柴胡植株, 用无水乙醇擦拭干净新鲜叶片表面, 晾干后采集叶片放入自封袋

中, 带回实验室进行柴胡 DNA 提取。材料采集详细信息见表 1。材料由乔永刚副教授根据形态鉴定为柴胡属柴胡, 本实验室利用 ITS2 序列鉴定为柴胡属柴胡。

**基因组总 DNA 提取** 采用十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法<sup>[17]</sup> 对收集来的柴胡叶片进行基因组总 DNA 的提取。用琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整性, 用核酸蛋白检测仪检测 DNA 的质量和浓度。将 DNA 浓度统一稀释至  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 保存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  备用。

**PCR 扩增及产物检测** 依据 SSR 通用性的特征, 搜集文献<sup>[18-20]</sup> 中所报道的柴胡引物信息, 选用 35 对 SSR 引物利用琼脂糖凝胶电泳和毛细管电泳进行引物多态性筛选, 最终确定 18 对多态性较好、重复性较高的 SSR 引物用于实验。筛选出的引物详细信息如表 2 所示。在每对引物的前引 5' 端标记荧光染料, 进行荧光 PCR 扩增, 将扩增后的荧光产物利用 ABI 3730 型遗传分析仪进行检测, 使用 Genemapper 4.0<sup>[21]</sup> 软件分析扩增片段峰型, 结合分子质量内标进行 DNA 片段长度计算。普通引物由上海生工生物有限公司合成, 荧光标记引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

**SSR 数据统计及分析** 利用 GenAlEx 6.503<sup>[22]</sup> 对 18 对 SSR 引物和 619 份柴胡种质资源的遗传多样性和遗传分化进行分析, 获得遗传多样性指数: 等位基因数 (number of allele,  $N_a$ )、有效等位基因数 (number of effective allele,  $N_e$ )、Shannon's 信息指数 (Shannon's information index,  $I$ )、期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ )、观测杂合度 (observed heterozygosity,  $H_o$ )、无偏期望杂合度 (unbiased expected heterozygosity,  $uH_e$ ) 和遗传多样性指数 (gene diversity,  $H$ ); 利用 GenAlEx 6.503 进行居群间及居群内分子变异方差检验 (AMOVA), 分析居群内和居群间的遗传变异分布, 并进行主坐标分析 (PCoA) 来进一步评估和聚类。利用 Power Marker<sup>[23]</sup> 软件分析 SSR 位点的多态性信息含量 (polymorphic information content,  $PIC$ ), 计算柴胡各居群间的 Nei's 遗传距离, 并基于 Nei's 遗传距离在 MEGA X<sup>[24]</sup> 构建 Neighbor-Joining 聚类树<sup>[25]</sup>。利用 STRUCTURE V2.3.4<sup>[26]</sup> 软件分析居群遗传结构, 推测最佳群体数目, 其中将群体数目 ( $K$ ) 设为 1~10, 每个  $K$  值进行模拟运算 10 次, MCMC 值分别设为 10 000、100 000 次, 将分析结果转入在线网站 Structure Harvester (

**Table 1** Material source information of *Bupleurum chinense*

Population No.	Location of population	Geographic coordinate	Number of samples	Type
SXDT01	Hunyuan, Datong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXDT02	Lingqiu, Datong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXDT03	Hunyuan, Datong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXDT04	Guangling, Datong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
YSXDT	Guangling, Datong City, Shanxi Province	39°76'62" 114°29'08"	10	Wild
SXXZ	Ningwu, Xinzhou City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXJZ01	Heshui, Jinzhong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXJZ02	Yushe, Jinzhong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXJZ03	Pingyao, Jinzhong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXJZ04	Taigu, Jinzhong City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
YSXJZ01	Lingshi, Jinzhong City, Shanxi Province	36°87'49" 111°94'66"	10	Wild
YSXJZ02	Pingyao, Jinzhong City, Shanxi Province	37°02'73" 112°22'34"	10	Wild
SXLL01	Shilou, Lvliang City, Shanxi Province	/	9	Cultivated
SXLL02	Lvliang City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXLL03	Linxian, Lvliang City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
YSXLL	Xiaoyi, Lvliang City, Shanxi Province	37°22'03" 111°46'36"	10	Wild
YSXLF	Xiangning, Linfen City, Shanxi Province	35°97'39" 110°85'26"	10	Wild
SXCZ01	Shangdang, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXCZ02	Wuxiang, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXCZ03	Wuxiang, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXCZ04	Qinyuan, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXCZ05	Wuxiang, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXCZ06	Zhangzi, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXCZ07	Wuxiang, Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
YSXCZ01	Qinyuan, Changzhi City, Shanxi Province	36°6779" 112°3237"	10	Wild
YSXCZ02	Qinxian, Changzhi City, Shanxi Province	36°70'21" 112°55'21"	10	Wild
YSXCZ03	Xiangyuan, Changzhi City, Shanxi Province	36°66'85" 112°95'39"	10	Wild
YSXJC	Lingchuan, Jincheng City, Shanxi Province	35°59'82" 113°21'27"	10	Wild
SXYC01	Jishan, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC02	Wenxi, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC03	Wanrong, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC04	Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC05	Xinjiang, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC06	Jiangxian, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC07	Jiangxian, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC08	Wanrong, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC09	Jishan, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
SXYC10	Xinjiang, Yuncheng City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
YSXYC01	Jishan, Yuncheng City, Shanxi Province	35°61'04" 110°98'94"	10	Wild
YSXYC02	Xinjiang, Yuncheng City, Shanxi Province	35°52'00" 111°22'76"	10	Wild
NMG	Chifeng City, Inner Mongolia Province	/	10	Cultivated
LPLY	Lingyuan City, Liaoning Province	/	10	Cultivated
HBBD01	Anguo, Baoding City, Hebei Province	/	10	Cultivated
HBBD02	Anguo, Baoding City, Hebei Province	/	10	Cultivated
HBCD	Chengde City, Hebei Province	/	10	Cultivated
HBCC	Chicheng, Zhangjiakou City, Hebei Province	/	10	Cultivated
HBHD	Handan City, Hebei Province	/	10	Cultivated
GSLX01	Longxi, Dingxi City, Gansu Province	/	10	Cultivated
GSLX02	Longxi, Dingxi City, Gansu Province	/	10	Cultivated
GSLN01	Longnan City, Gansu Province	/	10	Cultivated
GSLN02	Longnan City, Gansu Province	/	10	Cultivated
GSDX	Dingxi City, Gansu Province	/	10	Cultivated
GS01	Gansu Province	/	10	Cultivated
GS02	Gansu Province	/	10	Cultivated
GS03	Gansu Province	/	10	Cultivated
GS04	Gansu Province	/	10	Cultivated
SXBJ	Taibai, Baoji City, Shaanxi Province	/	10	Cultivated
GZ	Guizhou Province	/	10	Cultivated
WCD01	Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
WCD02	Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
WCD03	Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated
WCD04	Changzhi City, Shanxi Province	/	10	Cultivated

**Table 2** SSR primer information. HEX: Hexachloro fluorescein; TAMRA: Carboxy tetramethylrhodamine; FAM: Carboxy fluorescein; ROX: Carboxy-6-rhodamine

Primer No.	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Fluorescent labelling	Primer No.	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Fluorescent labelling
CH1	SSR1	F: ACGGTGGAACATCCCATCA R: ATTTCTCATTGCCTTGGTGC	HEX	CH10	SSR13	F: TTCTCCGTTCTGGGTTTATGA R: GAGTTTCCGCTCAAAGATGC	FAM
CH2	SSR2	F: ATTAATTTGCTAAGGAGAGTTGAAA R: CTTGACGGCATGATCAGCTA	TAMRA	CH11	SSR16	F: GGGAGAAAGGTGAGGAAGAAG R: TAGGAAGGGATATGTGACTGTTG	HEX
CH3	SSR3	F: TGTTCATGCCACCATCTTTG R: CCAGAAAGTCAAAAAGCCAACA	FAM	CH12	SSR18	F: GCGAAGACTGAGTGGCTTGATG R: AGAAAACCATAACCATGCCTGCTA	FAM
CH4	SSR4	F: TTTCCATTGATCCCATTGTG R: ATCAAACAGCAATTGCCAAA	TAMRA	CH13	SSR19	F: CAATGGCTGTTTCATCTGTTCTG R: GCAACTCCCAATCCCCAAATGA	HEX
CH5	SSR5	F: CTCAGCGAAATGCAGAGTCA R: GCGAAAAGTACTACATACCTTCA	ROX	CH14	SSR20	F: TGGTGGACGAAAGATGGGTG R: TGTGGTGAATGTCCAGAGCC	FAM
CH6	SSR6	F: GAAGAACAGCATCATTGGGAGA R: GGGGTGTCTGAACATTAACAG	TAMRA	CH15	SSR22	F: CCCAGAACAAGGAAAAGCAGC R: CAGCACCAACAATGCATATCTCC	ROX
CH7	SSR7	F: AGAAGAACAGGCACAACTCAG R: TTTCCACTCCGATTGGTTCGT	TAMRA	CH16	SSR25	F: TTCTACATTTTGGGCGTTTAC R: ACCTGCTTGAGATGATTTTGA	ROX
CH8	SSR8	F: GTCTTCACGCTTGGTTCATC R: TTCTATGACCAGCAATACAACA	HEX	CH17	SSR26	F: TTGGGCATGACAATCACAGAA R: GAAAATTATTAGGGTTTGAAGGGT	TAMRA
CH9	SSR9	F: CACTAATCTCACTCTTCTGCTT R: AAGACTGGCTTTGTCCAACA	HEX	CH18	SSR27	F: CATAAAACAAAAGGCAAATCG R: GTCGTAATGAATCCAAATGAG	HEX

biology.ucla.edu/structureHarvester/) 进行预测确定最佳居群数<sup>[27]</sup>。

## 结果与讨论

### 1 SSR引物筛选结果

根据文献<sup>[18-20]</sup>中所报道的柴胡引物信息, 选用35对SSR引物利用琼脂糖凝胶电泳和毛细管电泳进行引物多态性筛选。使用产地SXYC06、SXLL03、SXYC08、SXJZ04的10个样品混样对引物SSR1~SSR9进行PCR扩增以及琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果如图1A、B所示。引物SSR1~SSR9扩增产物稳定性和多态性良好, 可用于后续实验。

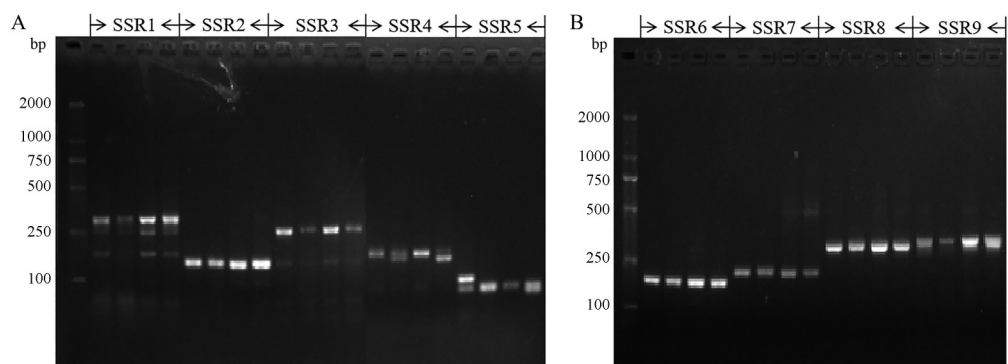
其次用产地SXYC07的10个样品混样对引物SSR10~SSR35进行PCR扩增以及琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图2A、B所示。26对引物中共有7对引物没有产生扩增产物或者扩增效果较差, 剩余19对引物进

行后续毛细管电泳筛选。将上步筛选出的19对SSR引物对产地SXYC06、SXLL03、SXYC08、SXJZ04的10个柴胡样品混样进行PCR扩增以及利用岛津DNA/RNA分析专用微芯片电泳仪MCE-202 MultiNA进行毛细管电泳分析, 电泳结果在MultiNA Viewer软件中进行可视化处理, 结果如图3。引物SSR13、SSR16、SSR18、SSR19、SSR20、SSR22、SSR25、SSR26、SSR27电泳结果条带明亮, 扩增产物稳定性及多态性较好, 可用于后续实验。

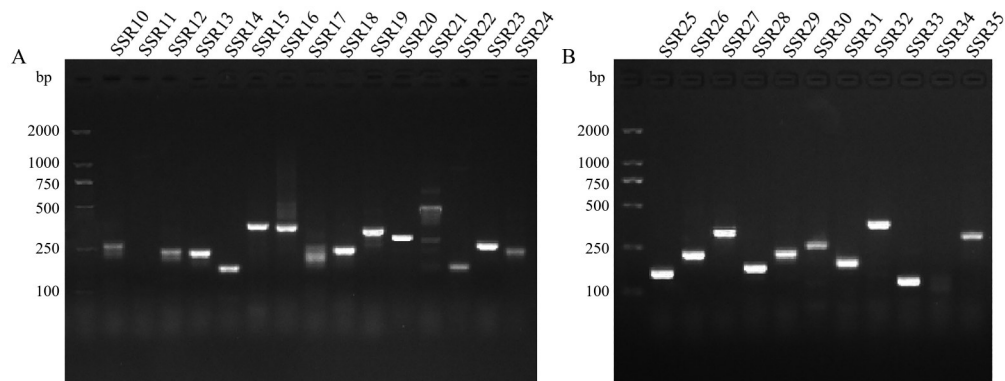
最终从35对SSR引物中筛选出SSR1~SSR9、SSR13、SSR16、SSR18、SSR19、SSR20、SSR22、SSR25、SSR26、SSR27共18对引物进行实验。将18对SSR引物重新进行命名以便后续数据分析。

### 2 SSR扩增产物的多态性

本实验利用所筛选出的18对引物对619个柴胡个体进行SSR产物扩增, 结果表明, 扩增产物长度在



**Figure 1** The SSR-PCR amplification electrophoresis of *Bupleurum chinense* mixed samples by primer SSR1~SSR9. A: Primer SSR1~SSR5; B: Primer SSR6~SSR9



**Figure 2** The SSR-PCR amplification electrophoresis of *Bupleurum chinense* mixed samples by primer SSR10–SSR35. A: Primer SSR10–SSR24; B: Primer SSR25–SSR35

89~385 bp 之间, 18 对 SSR 引物扩增出的等位基因数范围是 8~54, 共扩增出 558 个等位基因, 平均每个引物扩增出的等位基因数为 31, 引物 CH1 扩增出的等位基因数最多, 共扩增出 54 个等位基因, 而引物 CH15 扩增出的等位基因数最少, 为 8 个等位基因。

对 18 对柴胡 SSR 引物进行遗传多样性分析, 结果如表 3 所示, 18 对引物中多态性最高的为 CH8, 多态性最低的为 CH14, 所有引物的多态性信息含量范围为 0.228 (CH14)~0.964 (CH8), 平均值为 0.791。所有引物的等位基因数的范围为 2.532 (CH15)~8.290 (CH9), 平均为 5.564; 有效等位基因数的范围为 1.351 (CH14)~6.967 (CH1), 平均为 4.031; Shannon's 信息指数范围为 0.408 (CH14)~1.967 (CH8), 平均为 1.389; 遗传多样性指数的范围为 0.230 (CH14)~0.965 (CH8), 平均为 0.804。综合多个指数发现, 18 对 SSR 引物中引物 CH14 和 CH15 的多态性较低, 其他引物均含有较高的多态性信息含量。

### 3 不同居群柴胡遗传多样性分析

对不同居群的柴胡材料进行遗传多样性分析, 结果如表 4 所示, 不同居群的柴胡等位基因数的范围为 4.389~6.833, 平均为 5.564; 有效等位基因数范围为 3.001~4.959, 平均为 4.031; 等位基因数和有效等位基因数的变化表明柴胡居群间存在有等位基因差异, 但遗传差异不大。Shannon's 信息指数值最高为 1.685, 最低为 1.130, 平均为 1.389; 观察各居群间的期望杂合度、观测杂合度以及 Shannon's 信息指数值可知, 不同的柴胡居群的遗传多样性水平较高。且各居群之间的观测杂合度均小于期望杂合度, 且固定指数  $F$  均大于 0。

### 4 居群遗传分化分析

对柴胡的 62 个居群进行遗传分化分析, 结果如表 5 所示, 居群内近交系数 ( $Fis$ ) 的范围为 -0.038~0.979, 柴胡在引物 CH11 的居群内近交系数最小, 说明其在

**Table 3** Genetic diversity of 18 SSR locus in *Bupleurum chinense*.

$Na$ : Number of allele;  $Ne$ : Number of effective allele;  $I$ : Shannon's information index;  $Ho$ : Observed heterozygosity;  $He$ : Expected heterozygosity;  $uHe$ : Unbiased expected heterozygosity;  $H$ : Gene diversity;  $PIC$ : Polymorphic information content

Locus	$Na$	$Ne$	$I$	$Ho$	$He$	$uHe$	$H$	$PIC$
CH1	7.645	6.967	1.963	0.032	0.847	0.902	0.957	0.956
CH2	5.774	4.417	1.558	0.218	0.745	0.785	0.937	0.933
CH3	6.194	4.179	1.517	0.367	0.708	0.747	0.882	0.874
CH4	5.048	3.722	1.389	0.228	0.701	0.739	0.845	0.828
CH5	6.081	4.119	1.539	0.466	0.737	0.775	0.886	0.876
CH6	6.210	4.906	1.650	0.069	0.771	0.812	0.916	0.910
CH7	4.016	2.555	1.036	0.339	0.549	0.579	0.781	0.758
CH8	7.742	6.856	1.967	0.018	0.846	0.892	0.965	0.964
CH9	8.290	6.274	1.932	0.313	0.825	0.869	0.942	0.939
CH10	6.065	4.464	1.583	0.332	0.748	0.789	0.882	0.872
CH11	4.742	2.892	1.135	0.588	0.567	0.597	0.747	0.720
CH12	6.032	4.179	1.527	0.611	0.732	0.770	0.832	0.816
CH13	4.355	2.574	1.002	0.239	0.497	0.525	0.700	0.687
CH14	2.581	1.351	0.408	0.207	0.206	0.217	0.230	0.228
CH15	2.532	1.822	0.575	0.327	0.322	0.339	0.503	0.476
CH16	5.774	3.778	1.432	0.727	0.701	0.738	0.830	0.812
CH17	6.306	4.513	1.577	0.752	0.749	0.789	0.833	0.814
CH18	4.758	2.986	1.211	0.422	0.622	0.655	0.804	0.781
Mean	5.564	4.031	1.389	0.347	0.660	0.695	0.804	0.791

引物 CH11 表现的杂合不足最明显, 而在引物 CH8 的居群内近交系数最大, 说明其在引物 CH8 表现的杂合过量最明显, 居群内近交系数的平均值为 0.419, 表明柴胡各居群总体表现为杂合子不足。总居群近交系数 ( $Fit$ ) 的范围为 0.095 (CH17)~0.981 (CH8), 柴胡各居群的总居群近交系数为 0.531, 也同样说明总居群表现为杂合子不足。居群间遗传分化系数 ( $Fst$ ) 的范围为 0.099 (CH17)~0.358 (CH15), 柴胡总居群的居群间分化系数为 0.182, 表明柴胡遗传分化有 81.8% 来自居群内, 18.2% 来自居群间。基因流 ( $Nm$ ) 的范围为 0.447 (CH15)~2.263 (CH17), 柴胡居群总的基因流为 1.305 ( $Nm > 1$ ), 表明柴胡居群间的基因流处于较高的水平。

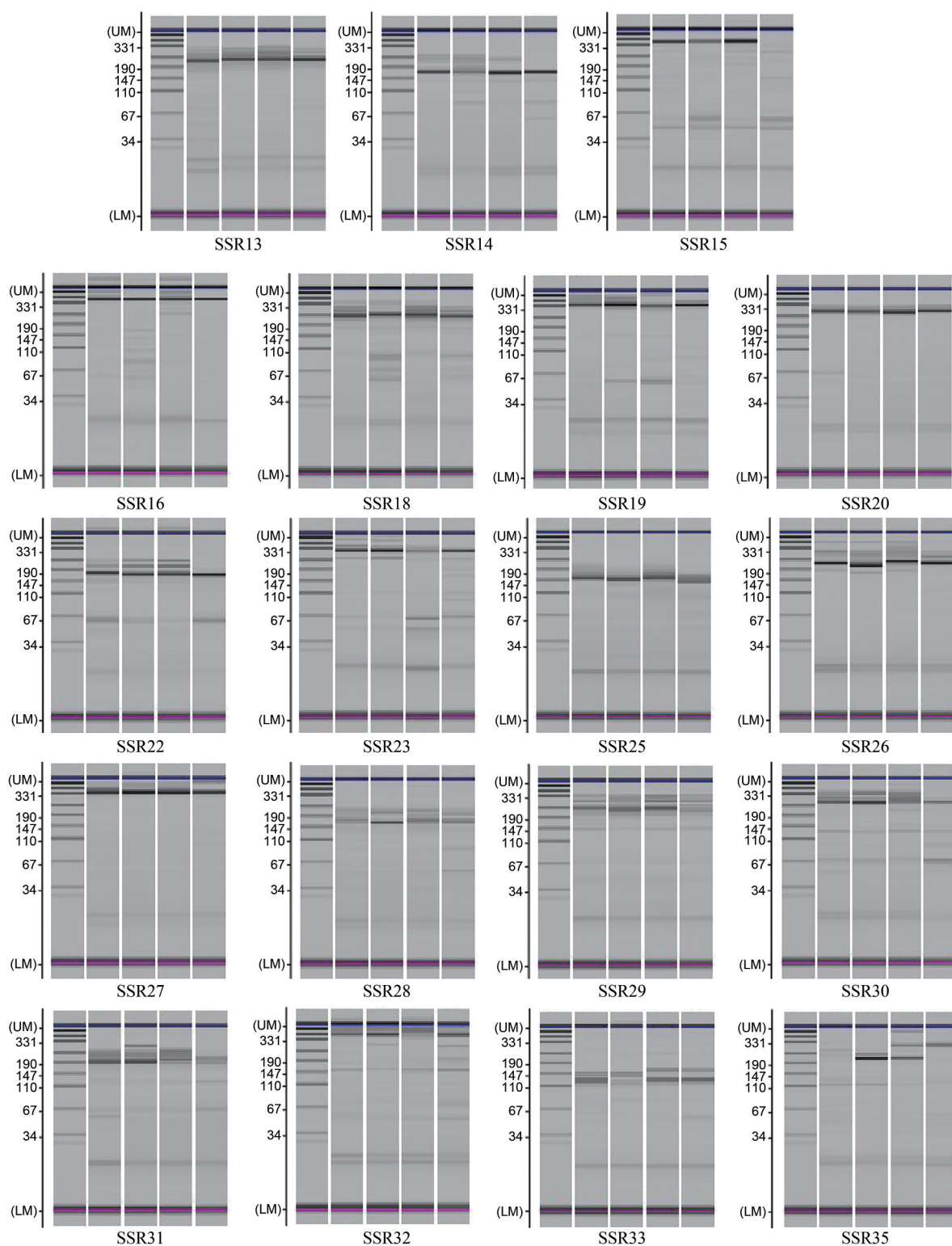


Figure 3 The SSR-PCR amplification electrophoresis of *Bupleurum chinense* mixed samples from four origins by 19 SSR primers

### 5 居群分子方差分析 (AMOVA)

利用 GenAlEx 6.503 软件对柴胡 62 个居群进行分子方差分析 (AMOVA), 结果如表 6 所示, 62 个柴胡居群间的遗传变异率为 13%, 居群内的遗传变异率为 87%, 居群内的遗传变异率大于居群间的遗传变异率,

说明柴胡的遗传变异主要发生在居群内, 这与遗传分化的分析结果是一致的。

### 6 居群主坐标分析 (PCoA)

为了进一步研究柴胡不同居群在遗传方面的相似性和进化情况, 将结果进行可视化, 使其清晰明了, 利

**Table 4** Genetic diversity analysis of *Bupleurum chinense* population. *F*: Fixation index

Population No.	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>I</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>F</i>	Population No.	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>I</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>F</i>
SXDT01	4.500	3.255	1.174	0.219	0.587	0.589	SXYC04	5.278	3.787	1.322	0.232	0.633	0.554
SXDT02	6.778	4.925	1.642	0.543	0.743	0.229	SXYC05	5.167	3.799	1.283	0.230	0.615	0.656
SXDT03	6.722	4.951	1.682	0.546	0.772	0.283	SXYC06	5.722	4.211	1.466	0.489	0.701	0.278
SXDT04	4.778	3.333	1.168	0.278	0.571	0.457	SXYC07	6.111	4.410	1.500	0.556	0.707	0.162
YSXDT	6.056	4.239	1.498	0.522	0.699	0.228	SXYC08	6.167	4.507	1.494	0.632	0.686	0.034
SXXZ	4.389	3.001	1.130	0.164	0.569	0.627	SXYC09	6.389	4.342	1.550	0.461	0.715	0.320
SXJZ01	5.500	4.009	1.349	0.425	0.646	0.276	SXYC10	6.667	4.936	1.600	0.459	0.726	0.327
SXJZ02	4.556	3.493	1.172	0.240	0.576	0.513	YSXYC01	5.889	4.281	1.470	0.452	0.686	0.283
SXJZ03	6.556	4.903	1.609	0.463	0.737	0.334	YSXYC02	5.556	3.926	1.416	0.434	0.681	0.322
SXJZ04	5.500	3.910	1.376	0.319	0.653	0.464	NMG	5.167	3.601	1.289	0.250	0.628	0.520
YSXJZ01	6.333	4.379	1.546	0.463	0.714	0.314	LPLY	5.833	4.259	1.495	0.241	0.707	0.615
YSXJZ02	6.833	4.959	1.685	0.496	0.769	0.334	HBBD01	4.778	3.444	1.193	0.231	0.579	0.505
SXLL01	4.722	3.414	1.250	0.217	0.629	0.659	HBBD02	6.833	4.735	1.643	0.502	0.750	0.311
SXLL02	4.667	3.342	1.183	0.266	0.584	0.482	HBCD	6.167	4.305	1.505	0.444	0.703	0.349
SXLL03	4.778	3.606	1.160	0.197	0.552	0.585	HBCC	5.389	3.636	1.338	0.363	0.647	0.418
YSXLL	6.333	4.531	1.547	0.617	0.723	0.127	HBHD	6.556	4.718	1.598	0.435	0.731	0.380
YSXLF	5.444	4.116	1.418	0.485	0.680	0.282	GSLX01	5.278	3.739	1.328	0.262	0.635	0.573
SXCZ01	6.167	4.691	1.534	0.251	0.705	0.603	GSLX02	4.667	3.435	1.226	0.328	0.611	0.430
SXCZ02	5.000	3.825	1.285	0.256	0.621	0.530	GSLN01	5.111	3.710	1.316	0.217	0.645	0.577
SXCZ03	5.111	3.856	1.277	0.244	0.613	0.518	GSLN02	5.722	4.149	1.434	0.428	0.674	0.309
SXCZ04	4.500	3.501	1.190	0.222	0.591	0.529	GSDX	4.556	3.265	1.173	0.261	0.587	0.444
SXCZ05	5.000	3.702	1.257	0.250	0.607	0.539	GS01	5.389	3.934	1.355	0.267	0.649	0.545
SXCZ06	4.889	3.620	1.221	0.198	0.589	0.625	GS02	5.111	3.775	1.250	0.244	0.597	0.496
SXCZ07	5.444	4.050	1.327	0.204	0.619	0.611	GS03	5.667	3.925	1.450	0.165	0.694	0.759
YSXCZ01	6.444	4.688	1.604	0.561	0.741	0.216	GS04	4.944	3.605	1.235	0.339	0.601	0.336
YSXCZ02	5.389	4.021	1.384	0.478	0.677	0.259	SXBJ	6.000	4.511	1.519	0.362	0.713	0.458
YSXCZ03	6.667	4.673	1.553	0.418	0.703	0.359	GZ	5.167	3.527	1.233	0.324	0.590	0.360
YSXJC	6.444	4.817	1.648	0.435	0.766	0.423	WCD01	4.556	3.479	1.216	0.244	0.608	0.540
SXYC01	5.056	3.693	1.253	0.257	0.597	0.486	WCD02	5.833	3.977	1.424	0.257	0.673	0.579
SXYC02	5.833	4.309	1.454	0.417	0.687	0.337	WCD03	5.278	3.751	1.329	0.213	0.634	0.653
SXYC03	5.556	3.751	1.346	0.356	0.647	0.374	WCD04	6.056	4.671	1.550	0.218	0.722	0.708
Average	5.564	4.031	1.389	0.347	0.660	0.433							

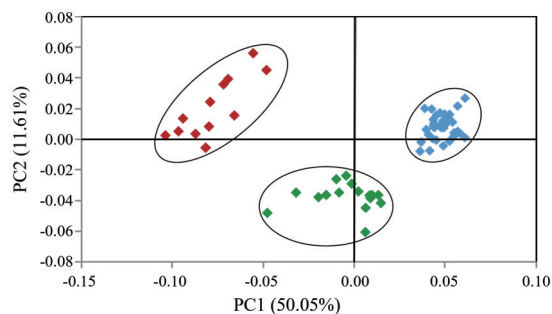
**Table 5** Genetic differentiation analysis of *Bupleurum chinense* population. *F<sub>is</sub>*: Within-population inbreeding coefficient; *F<sub>it</sub>*: Total population inbreeding coefficient; *F<sub>st</sub>*: Inter-group genetic differentiation coefficient; *N<sub>m</sub>*: Gene flow

Locus	<i>F<sub>is</sub></i>	<i>F<sub>it</sub></i>	<i>F<sub>st</sub></i>	<i>N<sub>m</sub></i>	Locus	<i>F<sub>is</sub></i>	<i>F<sub>it</sub></i>	<i>F<sub>st</sub></i>	<i>N<sub>m</sub></i>
CH1	0.962	0.967	0.125	1.757	CH10	0.556	0.622	0.147	1.445
CH2	0.707	0.767	0.203	0.979	CH11	-0.038	0.212	0.241	0.789
CH3	0.482	0.581	0.191	1.062	CH12	0.165	0.265	0.120	1.827
CH4	0.674	0.729	0.166	1.252	CH13	0.519	0.653	0.279	0.646
CH5	0.367	0.473	0.168	1.242	CH14	-0.006	0.104	0.109	2.038
CH6	0.911	0.925	0.157	1.347	CH15	-0.016	0.348	0.358	0.447
CH7	0.383	0.562	0.290	0.612	CH16	-0.037	0.125	0.156	1.355
CH8	0.979	0.981	0.122	1.796	CH17	-0.004	0.095	0.099	2.263
CH9	0.621	0.668	0.124	1.773	CH18	0.322	0.476	0.227	0.852
Mean	0.419	0.531	0.182	1.305					

**Table 6** Analysis of molecular variance among/within populations of *Bupleurum chinense*. *df*: Degree of freedom; *SS*: Sum of squares; *MS*: Mean square; *Est. Var.*: Estimate variance; % of total variation: Percentage of total variants

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Est. Var.</i>	% of total variation
Among populations	61	1 564.369	25.645	0.969	13
Within populations	1 176	7 394.706	6.288	6.288	87
Total	1 237	8 959.074	-	7.257	100

用 GenAlEx 6.503 软件依据 Nei's 遗传距离对柴胡 62 个居群进行主坐标分析 (PCoA)。结果显示对总变异率贡献较多的 3 个主坐标特征值共为 68.37%，其中第一主坐标占总变异率的 50.05%，第二主坐标占总变异率的 11.61%，第三主坐标解释了总变异率的 6.71%。根据结果绘制二维坐标图，如图 4 所示，柴胡 62 个居群被分为 3 大类，第一类为图中标记为红色的柴胡居群，主要由来自山西各地的野生柴胡居群组成；第二类由标记为



**Figure 4** Principal coordinate analysis of 62 *Bupleurum chinense* populations

绿色的16个柴胡居群组成,主要来自山西运城、河北、陕西、辽宁等地;剩下的34个标记为蓝色的柴胡居群组成第三类,主要来自山西长治、山西大同、甘肃等地。

### 7 居群遗传结构分析

使用STRUCTURE V2.3.4软件对柴胡62个居群的遗传结构进行分析,将分组数K值的范围设为1~10,对每个K值进行10次重复模拟运算,并且绘制K值与 $\Delta K$ 的关系图。STRUCTURE软件是基于贝叶斯模型进行群体结构的分析,当 $\Delta K$ 值达到最大时的K值即为模拟最佳的群体数。如图5A所示,当 $\Delta K$ 最大时( $\Delta K = 533.066$ ), $K = 2$ ,表明可以将62个柴胡居群分为2组,分组结果如图5B所示,第一组主要包括来自山西长治、山西大同、甘肃、内蒙古等地的34个栽培居群,其组成与主坐标分析中分为第三类的居群相同。第二组则主要来自山西运城、河北、陕西、辽宁的栽培柴胡居群以及收集于山西各地的野生柴胡居群组成,第二组包括主坐标分析中的第一类和第二类居群。由上说明,STRUCTURE软件的群体预测结果与主坐标分

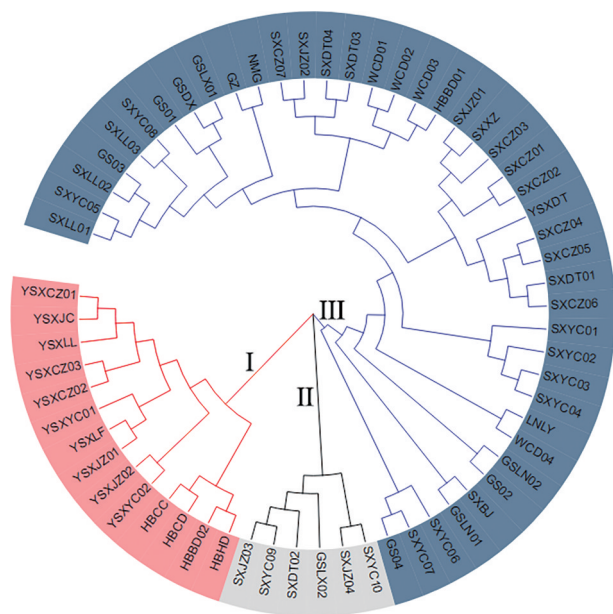
析的结果一致。

### 8 居群聚类分析

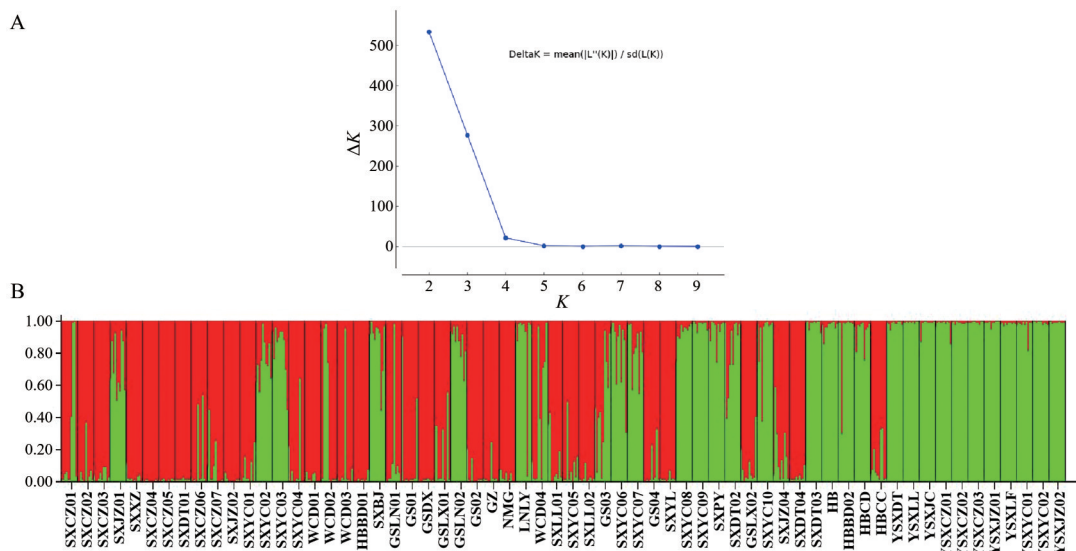
使用MEGA X软件基于不同居群间的Nei's遗传距离对柴胡62个居群构建NJ树,结果如图6所示,62个柴胡居群被分为3类,第一类由来自山西各地的野生柴胡居群以及来自河北的4个栽培居群组成,第二类由来自山西晋中、运城、大同和甘肃陇西的6个栽培居群组成,剩下的42个柴胡栽培居群聚为第三类。

### 讨论

遗传多样性是评价生物多样性的一个重要部分,



**Figure 6** NJ clustering results of 62 *Bupleurum chinense* populations based on Nei's genetic distance



**Figure 5** Genetic structure analysis of 62 *Bupleurum chinense* populations. A: Estimation of number of populations for K ranging from 2 to 10 by  $\Delta K$  values; B:  $K = 2$ , genetic structure of 62 *Bupleurum chinense* populations

也是造成生物多样性的基础原因。广义的遗传多样性是指所有生物中所包含遗传信息的总和,而狭义的遗传多样性是指物种之间存在的遗传变异,即种内的不同居群之间或者居群内不同的个体之间的遗传变异<sup>[28]</sup>。丰富的遗传多样性是物种适应环境变化的物质基础,物种为了适应环境的变化而发生进化,遗传变异就产生在进化的过程中,变异的丰度越大,物种的遗传多样性越高,则说明物种适应环境的能力越强<sup>[29]</sup>。遗传多样性可以通过形态学特征、生化特征、分子标记等方法进行研究,而随着分子标记技术的发展,其在种群遗传多样性研究、物种鉴定以及物种起源等方面得到了广泛的应用<sup>[30,31]</sup>。

对柴胡种质资源进行遗传多样性研究,可以为开发利用以及保护柴胡资源提供理论依据。前人曾利用不同的分子标记对多种药用植物进行了遗传多样性分析。Song 等<sup>[32]</sup>利用简单序列间重复 (ISSR)、序列相关扩增多态性 (SRAP) 相结合的方法研究发现博落回具有较高的遗传多样性,群体内遗传多样性水平最高的前两个群体为云南孟连和云南芒市,其个体可作为种质筛选和保存过程中的优良种质候选。朱巧等<sup>[33]</sup>利用 49 对 SSR 分子标记探讨了黄精属 6 种植物的遗传多样性和群体结构,4 个地区来源群体间的遗传多样性指数从大到小依次为西部地区 > 华中地区 > 华南地区 > 华东地区。分子标记技术在柴胡种质资源研究方面的应用也很广泛,战晴晴等<sup>[18]</sup>经多态性筛选,获得 28 条 ISSR 和 14 对 SSR 多态性引物并构建柴胡遗传图谱。吴素瑞等<sup>[19]</sup>以 2 个柴胡选育品系和 4 份其他柴胡栽培种质为材料,筛选扩增效果好、多态性高的 SSR 引物并依据遗传距离构建聚类树图。但利用 SSR 对柴胡居群的遗传多样性进行研究还未有报道。

多态性信息含量是反映分子标记能力的一个重要参数,如果该标记的 PIC 值 > 0.5,则该标记被认为是高度多态的,如果 PIC 值在 0.25~0.5 之间,则该标记具有中度多态性,如果 PIC 值 < 0.25,则该标记为低度多态性标记<sup>[34]</sup>。本实验中所选取的 18 对 SSR 引物中,CH14 的 PIC 值为 0.228,为低多态性引物,CH15 的 PIC 值为 0.476,为中多态性引物,剩余 16 对 SSR 引物的 PIC 值均大于 0.5,具有高度多态性,说明可以用于柴胡遗传多样性的研究。

本实验利用 18 对 SSR 引物对来自不同省份的 62 个柴胡居群共 619 个样本进行遗传多样性分析,结果得出柴胡居群具有丰富的遗传多样性,说明柴胡在进化的过程中发生了复杂的遗传变异。野生柴胡居群均具有较高的遗传多样性,对柴胡的种质资源保护和利用有重要的价值,应当加强对野生柴胡种质资源研究,

减少无科学依据的人为采挖,优化野生柴胡的生境条件,同时对野生资源进行科学的移栽驯化,从中培育优良种质,提高柴胡药材质量。

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<sup>[35]</sup>。主坐标分析将 62 个柴胡居群分为 3 类,其中一类主要由来自山西各地的野生柴胡居群组成。以及通过 STRUCTURE 软件对柴胡群体结构进行预测得到的群体最佳分组数  $K$  为 2,第一组组成与主坐标分析中分为第三类的居群相同。第二组则包括主坐标分析中的第一类收集于山西各地的野生柴胡居群和第二类的栽培柴胡居群。而基于 Nei's 遗传距离对柴胡 62 个居群构建的 NJ 树也将来自山西各地的野生柴胡居群聚为一类。来自山西、河北、甘肃等地的柴胡栽培居群聚在一起反映柴胡主产地相互之间种子交易频繁,相互引种现象较为普遍。以上结果表明 SSR 分子标记可以将来自山西相同地区的柴胡栽培居群和野生居群明显的分类,说明野生柴胡居群和栽培柴胡居群的遗传背景不同,柴胡野生居群遗传多样性比柴胡栽培居群高,具有丰富的遗传变异,适应环境变化的能力强于栽培居群,具有较高的进化潜力;且山西省为柴胡的道地产区,野生柴胡药材质量好,有效成分含量较高,山西野生柴胡资源单独分类对更好地利用柴胡资源,进行核心种质研究有重要意义,后续可将野生柴胡居群作为优良种质的候选,进行引种驯化,使其在保持较高的遗传多样性和适应环境变化能力的同时,提高柴胡药材产量。

**作者贡献:** 宋芸负责主要实验操作、部分实验设计;张鑫瑞负责部分实验实施、数据分析和文献检索;李政、孙哲、李澳旋、杜晓蓉负责样品采集、参与数据统计分析;乔永刚负责实验设计、结果分析、论文撰写与修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 293.
- [2] He TN. Gentianaceae in Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol 55 (中国植物志:55卷) [M]. Beijing: Science Press, 1983.
- [3] Zhang GX, Wang H, Liu Y, et al. Survey and analysis of cultivated *Bupleurum* spp. germplasm resources in China [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2021, 23: 772-780, 799.
- [4] Li Q, Su X, Ma H, et al. Development of genic SSR marker resources from RNA-seq data in *Camellia japonica* and their application in the genus *Camellia* [J]. Sci Rep, 2021, 11: 9919.
- [5] Ge SY, Meng YJ, Li GM, et al. Research progress on genetic diversity in Chinese medicinal plants [J]. Chin Tradit Herb

- Drugs (中草药), 2006, 10: 1584-1589.
- [6] Grover A, Sharma PC. Development and use of molecular markers: past and present [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36: 290-302.
- [7] Jena RC, Chand PK. Multiple DNA marker assisted diversity analysis of Indian mango (*Mangifera indica* L.) populations [J]. Sci Rep, 2021, 11: 10345.
- [8] Roncallo PF, Beaufort V, Larsen AO, et al. Genetic diversity and linkage disequilibrium using SNP (KASP) and AFLP markers in a worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) collection [J]. PLoS One, 2019, 14: e0218562.
- [9] Wang H, Yang B, Wang H, et al. Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for *Rhododendron* species [J]. Sci Rep, 2021, 11: 8597.
- [10] Yan W, Li J, Zheng D, et al. Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers [J]. Peer J, 2019, 7: e7173.
- [11] Luo H, Wang X, Zhan G, et al. Genome-wide analysis of simple sequence repeats and efficient development of polymorphic SSR markers based on whole genome re-sequencing of multiple isolates of the wheat stripe rust fungus [J]. PLoS One, 2015, 10: e0130362.
- [12] Kumar C, Kumar R, Singh SK, et al. Development of novel g-SSR markers in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda and their application in genetic diversity, population structure and cross species transferability studies [J]. PLoS One, 2020, 15: e0237538.
- [13] Song F, Lu JH, Han C, et al. Comparison between SCoT and EST-SSR markers in detection of genetic diversity of wild *Glycyrrhiza* L. species [J]. J Shihezi Univ (Nat Sci) (石河子大学学报:自然科学版), 2017, 35: 213-219.
- [14] Cao LY, Gu C, Sun HF, et al. Evaluation of genetic diversity and structure of some medicinal plants of *Codonopsis* based on SSR markers [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 45-52.
- [15] Liu YL, Geng YP, Xie XD, et al. Genetic diversity and genetic structure analysis of *Astragalus* based on SSR molecular marker [J]. Acta Agrest Sin (草地学报), 2019, 27: 1154-1162.
- [16] Li S, Ji F, Hou F, et al. Characterization of *Hemerocallis citrina* transcriptome and development of EST-SSR markers for evaluation of genetic diversity and population structure of *Hemerocallis* collection [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 686.
- [17] Shahzadi I, Ahmed R, Hassan A, et al. Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis [J]. Genet Mol Res, 2010, 9: 386-393.
- [18] Zhan QQ, Sui C, Wei JH, et al. Construction of genetic linkage map of *Bupleurum chinense* DC. using ISSR and SSR markers [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 517-523.
- [19] Wu SR, Gao K, Zhao LZ, et al. Studies on identification of *Bupleurum* cultivated germplasm using SSR molecular markers [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2015, 17: 1806-1812.
- [20] Chu CR, Xu J, Du ML, et al. Genome survey analysis and SSR loci mining of *Bupleurum falcatum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 3960-3966.
- [21] Chatterji S, Pachter L. Reference based annotation with GeneMapper [J]. Genome Biol, 2006, 7: R29.
- [22] Peakall R, Smouse PE. GenAlEx6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update [J]. Bioinformatics, 2012, 28: 2537-2539.
- [23] Liu KJ, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21: 2128-2129.
- [24] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 2018, 35: 1547-1549.
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406-425.
- [26] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Mol Ecol, 2005, 14: 2611-2620.
- [27] Earl DA, Vonholdt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method [J]. Conserv Genet Resour, 2012, 4: 359-361.
- [28] Li XH, Wang KJ. Research progress of genetic diversity in wild soybean (*Glycine soja* Siebold & Zucc.) [J]. J Plant Genet Resour (植物遗传资源学报), 2020, 21: 1344-1356.
- [29] Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17: 422-433.
- [30] Guo B, Hao X, Han L, et al. Unraveling the genetic diversity and structure of *Quercus liaotungensis* population through analysis of microsatellite markers [J]. Peer J, 2021, 9: e10922.
- [31] Hayward AC, Tollenaere R, Dalton-Morgan J, et al. Molecular marker applications in plants [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1245: 13-27.
- [32] Song MF, Guan YH, Zhang Y, et al. Genetic diversity assessment of a Chinese medicinal endemic species, *Aspidopterys obcordata* var. *obcordata*, by combined molecular marker methods (ISSR & SRAP) [J]. Biochem Genet, 2021, 59: 283-299.
- [33] Zhu Q, Deng X, Zhang SB, et al. Genetic diversity of 6 species in *Polygonatum* by SSR marker [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 2935-2943.
- [34] Sharma P, Mehta G, Sharma S, et al. Development and validation of heat-responsive candidate gene and miRNA gene based SSR markers to analysis genetic diversity in wheat for heat tolerance breeding [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48: 381-393.
- [35] Essid A, Aljane F, Neily MH, 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: 335-346.