

张景, 李晓东, 宗庆波, 等. 半夏 SSR 分子标记开发与遗传多样性[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 19-26.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.003

# 半夏 SSR 分子标记开发与遗传多样性

张景<sup>1</sup>, 李晓东<sup>1</sup>, 宗庆波<sup>2</sup>, 何贝贝<sup>1</sup>,  
拉基<sup>1</sup>, 景纳良<sup>1</sup>, 王柯月<sup>1</sup>, 钟淑梅<sup>3</sup>, 舒少华<sup>1</sup>

1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 湖北省果茶办公室, 武汉 430070;  
3. 九州通医药集团九信中药研究院, 武汉 430051

**摘要** 对半夏转录组数据进行分析, 设计开发 SSR 引物, 利用筛选出的 SSR 引物分析不同居群间半夏的遗传多样性, 为半夏分子标记辅助育种提供支撑。结果显示: 筛选出的 19 对多态性较高的引物在 17 个半夏居群中共检测到 49 个多态性位点, 具有较高的多态性; 利用 UPGMA 作图共将 17 个半夏居群分为 3 个类群; 通过分子方差分析(AMOVA)发现半夏居群内的变异达到 88%, 说明群体与群体间的差异相对较小, 遗传变异主要来源于个体间; 居群间平均分化系数  $F_{st}$  为 0.124, 居群间基因流  $N_m$  值为 1.765, 表明居群间能正常地进行基因交流, 且居群间遗传分化受基因流的影响较大。本研究利用 SSR 技术开发的 19 对 SSR 引物在不同半夏居群间具有一定的通用性、多态性, 能将 17 份半夏材料明确区分。

**关键词** 半夏; 转录组; 简单重复序列分子标记; 遗传多样性; 居群

**中图分类号** S 567.239 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0019-08

半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.) 是天南星科多年生草本植物, 其药用部位为干燥块茎, 具有燥湿化痰、消痞散结的功效<sup>[1]</sup>, 现代药理研究发现半夏具有镇咳、止呕、抗炎抗病毒等作用<sup>[2]</sup>。半夏作为药材使用历史悠久, 以野生资源为主, 主要分布于四川、湖北、安徽、江苏、河南和浙江等地。近年来, 由于半夏生长环境的不断恶化、人为过度采集, 使半夏野生资源急剧减少<sup>[3]</sup>, 因此, 有必要开展半夏资源的保护和种质资源遗传多样性的研究<sup>[4]</sup>。同时, 半夏分布广泛, 种质资源比较丰富, 药用品质也存在不同<sup>[5]</sup>, 并且难以从形态上识别。目前生产中, 发现极少数块茎为红色的半夏品种具有高产、高抗性等特征, 但是却没有一套完整的选育方法。

SSR(simple sequence repeats, SSR) 标记因其多态性高、重复性好、覆盖面广等优点, 广泛运用于 QTL 图谱绘制、遗传多样性分析和分子标记辅助育种等方面<sup>[6-7]</sup>。Bernadette 等<sup>[8]</sup>利用 SSR 分子标记构建了四倍体苜蓿的遗传图谱; 李磊等<sup>[9]</sup>从 50 对 ISSR 引物中筛选到 5 对多态性高的引物, 从而实现

在分子水平对 5 种叶型半夏的鉴定与区分; 徐敏等<sup>[10]</sup>通过开发 9 对 SSR 引物发现五味子居群间有一定的基因流, 居群内存在着丰富的遗传多样性; Feng 等<sup>[11]</sup>研究结果表明, SSR 标记具有很高的重复性和信息量, 可用于评价药用菊科植物的遗传多样性和亲缘关系。

目前对半夏的栽培<sup>[12]</sup>、药理作用<sup>[13-14]</sup>等方面已有一些研究, 但关于半夏种质资源遗传多样性和分子标记辅助育种等方面的研究相对较少。由于采用高通量测序方法开发 SSR 标记在植物中被广泛应用<sup>[15-17]</sup>, 本研究基于半夏转录组数据, 设计开发 SSR 引物, 对不同居群半夏之间的种群结构、遗传多样性进行分析, 旨在为半夏资源保护、遗传多样性研究和分子辅助育种提供参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

半夏材料共 17 份, 包括从全国收集的 14 份材料以及从湖北省江汉平原地区野生半夏资源中选育

收稿日期: 2021-08-02

基金项目: 国家重点研发计划项目“中药材生态种植技术研究及应用”(2017YFC1700700); 湖北省技术创新重大项目“湖北省重点道地药材品种选育及配套关键技术研究”(2017ACA175); 知音英才计划项目“半夏优良品种培育及产业化”; 湖北省农业科技创新行动

张景, E-mail: 793352118@qq.com

通信作者: 舒少华, E-mail: shushaohua@mail.hzau.edu.cn

的 3 份材料,所有收集到的材料经湖北中医药大学陈科力教授鉴定为天南星科植物半夏(*P. ternata*),收集到的材料种植于华中农业大学药用植物资源圃。详见表 1。

表 1 半夏试验材料

Table 1 *P. ternata* germplasm

编号 Number	来源 Locality	编号 Number	来源 Locality
HBTM	湖北天门 Tianmen, Hubei	JXJX	江西 Jiangxi
HBWS	湖北五三 Wusan, Hubei	JSYC	江苏盐城 Yancheng, Jiangsu
HBJZ	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	HNCD	湖南常德 Changde, Hunan
HBLK	湖北 Hubei	HNSX	河南嵩县 Songxian, Henan
HBZJ	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	HNJS	湖南吉首 Jishou, Hunan
AHSS	安徽宿松 Susong, Anhui	HTX1	从江汉平原野生荆半夏中选育得到 Breeding from Jing Pinellia ternata in Hubei Jiangnan Plain
GZKL	贵州凯里 Kaili, Guizhou	HTX2	
CQWZ	重庆万州 Wanzhou, Chongqing	HTX3	
YNWS	云南文山 Wenshan, Yunnan		

## 1.2 DNA 提取

选取幼嫩的半夏叶片置于液氮中速冻带回,采用改良的 CTAB 法进行半夏基因组 DNA 的提取,利用微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度与质量,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.3 SSR 引物开发

半夏转录组数据由云南农业大学杨生超教授提供。针对不同的 Unigene 设计 SSR 引物共 2 000 对。利用生物信息学软件(Primer-blast)对引物进行比对,筛选出 266 对引物并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.4 多态性 SSR 引物筛选

利用 2 个不同居群半夏的叶片 DNA(HTX1、HBLK)进行 PCR 扩增,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳筛选能够扩增出目的产物大小且条带清晰明亮的引物。利用初筛的引物分别对 17 份不同居群的半夏 DNA 进行 PCR 扩增,利用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测初筛引物的多态性。

## 1.5 PCR 扩增

采用 20  $\mu\text{L}$  体系:PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$ , dNTP 0.6  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2  $\mu\text{L}$ , Primer F 0.6  $\mu\text{L}$ , Primer R 0.6  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 12.8  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预热 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  模板延伸 45 s, 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。利用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测扩增产物,在 120 V 电压下电泳 90 min,硝酸银染色,显色液及蒸馏水洗净,观察并统

计条带,拍照保存图像。

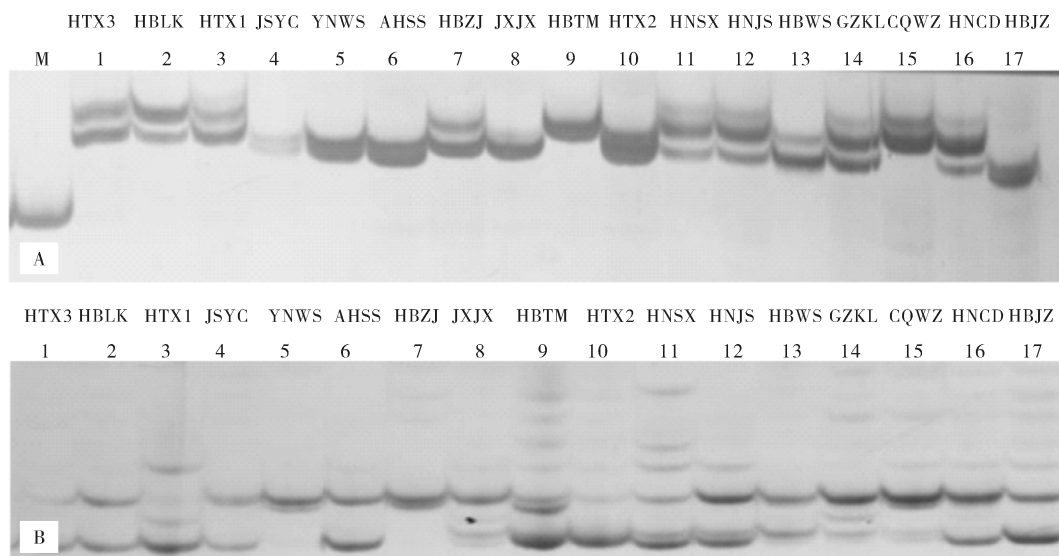
## 1.6 数据统计与分析

统计 17 份半夏样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,在同一迁移位置上有条带的记作“1”,无条带的记作“0”,利用 Excel 表格建立 1/0 矩阵,利用 PowerMarkerV3.25 软件计算引物多态信息含量(polymorphism index content, PIC)、多态性频率(frequency of polymorphism, FP)、等位基因数(allele number, AN)。利用 POPGENE Version1.32、GenAIEX6.502 软件对不同居群半夏的遗传多样性参数进行计算,包括 Shannon 信息指数(I)、有效等位基因数(effective allele number, Ne)、居群间基因流(interpopulation gene flow, Nm)、居群间遗传分化系数(coefficients of genetic differentiation between populations, Gst)。利用 NTsys2.10 软件中的 UPGMA(非加权算术平均值聚类法)进行聚类分析,绘制亲缘关系树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 多态性 SSR 引物筛选

本试验从转录组数据中筛选得到 266 对引物,经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测,筛选出 75 对能成功扩增出目的片段大小且条带清晰明亮的引物。利用筛选得到的 75 对引物对 17 份半夏材料的 DNA 样品进行 PCR 扩增,产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,对结果进行多态性分析,筛选出 19 对多态性好的引物(表 2),部分引物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图见图 1。



M 为 600 bp marker; A、B 分别为引物 Unigene23904 和 Unigene49309 扩增产物凝胶电泳图; 编号 1~17 为 17 个半夏居群 DNA。M is 600 bp marker; A and B were primers Unigene23904 and Unigene49309 amplification products gel electrophoresis map, respectively. 17 *Pinellia ternata* strains DNA were numbered 1-17.

图 1 部分 SSR 引物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of partial SSR primers

表 2 19 对 SSR 引物信息

Table 2 The information of 19 pairs of SSR primers

引物编号 Primer number	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	重复单元 Repeating unit	退火 温度/°C T <sub>m</sub>	产物 大小/bp Base pair
Unigene43114	F:CGGCTTCTTACTGCTCCAAC	R:CTCCCTCTCTCTCAACGCAG	(AG) <sub>8</sub>	56.4	232
Unigene36801	F:GGGGAAGGAACCACTCTCTC	R:AAGCGTTGTTTCAGCTTCTCC	(AG) <sub>7</sub>	55.6	187
Unigene80838	F:GGAGGAAGGAAGAAACCAGG	R:AAGTGCCTGAAGGAGTGGAC	(AG) <sub>6</sub>	55.4	260
Unigene14934	F:ACCACCATGTCGTCCTCTGT	R:CCGTTCTGGAACTCTCTGC	(AG) <sub>6</sub>	56.1	164
Unigene79688	F:AGCATTGCCCTTTTACACG	R:CCGCTCCGATACTACTGGTG	(AG) <sub>8</sub>	55.7	223
Unigene30561	F:ATTGAAGGCCAAATCCTCCT	R:TTTGGTGAATGCCAGTATGC	(AG) <sub>9</sub>	53.1	145
Unigene21157	F:CGCTGCTCTGTAACCAGCAT	R:CTCCAGCAGGCAGTAAGAGC	(CGG) <sub>6</sub>	57.9	140
Unigene23904	F:GGGGATGCTGTAGTAGTGGG	R:CACAACCTCCTCCGCAG	(CCG) <sub>5</sub>	55.8	247
Unigene24724	F:TCGAGAAGGAGAAGGTCAGC	R:AACCAAACCTTCGTGGCAAAC	(CCG) <sub>5</sub>	53.5	132
Unigene49309	F:TCCAGCTTCACTTCTCCTG	R:CCACCATGTCTTCTCCAGT	(CGG) <sub>5</sub>	57.4	250
Unigene11299	F:CAAACACAGCCATCACCATC	R:CGCCACAGAAAGGAGAAAGA	(AT) <sub>6</sub>	55.4	213
Unigene24447	F:AACTCGTGCTACTGCTTCGC	R:GTGCCGACAAACAGAGGACT	(AT) <sub>6</sub>	54.6	206
Unigene09414	F:GAGGCGTCGTTGTCATATCC	R:CTCTCTCTTCCGGCGTATC	(AGG) <sub>5</sub>	57.4	228
Unigene39115	F:ACATACGGCCTTTCACAAG	R:GTGATCCTTCTCGTCCTGC	(AGG) <sub>5</sub>	55.4	217
Unigene73431	F:AATCAGCCATGCTAGCCAAC	R:CAAGGTGGAGCCAAGTGAAT	(AAT) <sub>5</sub>	55.4	168
Unigene59713	F:GGCTCAGGTGTGAATGGAAT	R:AGACGAATCAAATGCTTGGC	(ATC) <sub>5</sub>	53.4	165
Unigene74097	F:CCATCTCCTTGGTGGTCATT	R:GAAGTCATGTAGCGGCAAC	(ATC) <sub>6</sub>	55.4	154
Unigene40932	F:ACTTGCCCCACTTCTCTTC	R:CTCCTCTCTTTCAGCTTCCC	(CGG) <sub>5</sub>	57.4	200
Unigene 23856	F:TCTATACCTGCTCCGCCATC	R:CCACCTCCACCTTCTCTG	(CGG) <sub>5</sub>	57.8	275

## 2.2 半夏遗传多样性分析

利用筛选出的 19 对多态性高的引物,进行遗传系数分析,由表 3 可知,19 对 SSR 引物在 17 份半夏

材料中共检测到多态性位点 49 个,平均每对引物有 2.5 个多态性位点;等位基因数(N<sub>e</sub>)一共有 76 个,平均值为 3.8;Nei 基因多样性指数(H<sub>e</sub>)范围为

0.606~1.762, PIC 范围为 0.40~0.96, 平均为 0.60。0.64。结果表明筛选出的引物多态性高, 所选半夏材多态性频率 FP 的变幅为 0.44~0.85, 平均值为 料遗传多样性丰富。

表 3 半夏居群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *P. ternata* populations

引物编号 Primer number	多态性位点数 NP	多态性位点百分数/% PPL	等位基因数 Ne	基因多样性指数 He	多态信息量 PIC	多态性频率 FP
Unigene43114	4	100	4	1.762	0.48	0.60
Unigene36801	4	100	5	1.318	0.46	0.68
Unigene80838	3	100	6	1.115	0.70	0.74
Unigene14934	3	100	4	0.876	0.96	0.75
Unigene79688	4	100	7	0.924	0.96	0.85
Unigene30561	3	100	5	1.222	0.60	0.73
Unigene79595	3	100	4	1.447	0.54	0.65
Unigene21157	3	100	6	1.298	0.80	0.80
Unigene23904	2	100	3	0.972	0.54	0.62
Unigene24724	2	67	4	1.005	0.46	0.66
Unigene49309	3	100	4	0.916	0.40	0.50
Unigene11299	1	100	2	0.606	0.84	0.44
Unigene24447	2	67	3	1.095	0.58	0.71
Unigene39115	1	50	2	0.691	0.50	0.53
Unigene73431	1	100	2	0.606	0.80	0.44
Unigene59713	2	67	3	0.959	0.44	0.60
Unigene74097	3	100	5	1.088	0.40	0.57
Unigene40932	3	100	4	1.401	0.48	0.63
Unigene23856	2	100	3	0.924	0.62	0.59

根据遗传相似系数聚类分析结果将对应的 SSR 分子标记的带型结果导入 GenAlEX6.502 软件中, 由分子方差分析(AMOVA)可知, 88% 的变异来源于个体间, 12% 的变异来源于群体间 ( $P < 0.001$ ) (表 4), 这说明群体与群体间的差异相对较小, 但群体内的遗传多样性水平较高, 而遗传变

异主要来源于个体间<sup>[18]</sup>。

另外居群间平均分化系数  $G_{st}$  为 0.124, 小于 0.15 (Wright), 说明居群间遗传分化较小。总的基因流估算值  $N_m$  为 1.765, 大于 1 (Wright), 表明居群间能正常地进行基因交流, 且居群间遗传分化受基因流的影响较大。

表 4 半夏居群分子方差分析

Table 4 Analysis of molecular variance(AMOVA) in *P. ternata* populations

变异 Variance	自由度 Degree of freedom	离差平方 Squares of deviations	变异来源 Source	方差分量比例/% Proportion of variance component
居群间 Intro-population	2	33.747	16.873	12
个体间 Intro-individual	14	161.077	11.505	88
个体内 Inter-individual	17	0.000	0.000	0
总计 Total	33	194.824	28.379	100

### 2.3 半夏群体聚类分析

将 19 对多态性高的引物的读带结果按 0/1 矩阵格式在 Excel 中排版, 通过 NTSYSpc 2.10 软件中的 Similarity 计算遗传相似度。相似度结果(表 5)表明, 不同居群半夏的遗传相似度有差异, 其中 HNJS(湖南吉首)与 HNSX(河南嵩县)的遗传相似度最高, 为 0.906。以遗传相似系数为标准, 利用

UPGMA 法构建聚类图。由图 2 可知, 17 个半夏居群间遗传相似度为 0.63~0.91, 以遗传相似系数 0.70 为标准, 将 17 个居群分成 5 个类群, 其中 1 个类群较大, 其他 4 个类群较小。各类群内又可做亚类群分类, 从下至上分类情况如下:

第 1 类为云南文山和湖北荆州, 第 2 类和第 3 类分别为重庆万州和 HTX1(选育材料), 第 4 类为

江苏盐城和江西(JXJX),第 5 类为湖北(HBWS)、析结果表明,不同居群的半夏遗传结构不严格按照 HTX2(选育材料)、湖南常德、河南嵩县、湖南吉首、产地划分,表明不同居群半夏有较大的基因交流程 湖北荆州、安徽宿松、贵州凯里、湖北(HBLK)、度,具有较近的亲缘关系。 HTX3(选育材料)、湖北天门聚成一大类。聚类分

表 5 不同居群半夏遗传相似度

Table 5 Genetic similarity of different *P. ternata* populations

居群 Populations	HBWS	GZKL	HNCD	HTX2	HBLK	HBZJ	HNSX	HTX3	HBTM	HNJS	AHSS	JXJX	YNWS	JSYC	HTX1	CQWZ	HBJZ
HBWS	1.000																
GZKL	0.679	1.000															
HNCD	0.774	0.717	1.000														
HTX2	0.830	0.585	0.755	1.000													
HBLK	0.698	0.679	0.698	0.604	1.000												
HBZJ	0.774	0.604	0.660	0.679	0.736	1.000											
HNSX	0.793	0.774	0.793	0.736	0.755	0.717	1.000										
HTX3	0.660	0.717	0.774	0.679	0.811	0.698	0.679	1.000									
HBTM	0.736	0.755	0.698	0.679	0.736	0.698	0.755	0.774	1.000								
HNJS	0.849	0.755	0.849	0.793	0.736	0.774	0.906	0.698	0.811	1.000							
AHSS	0.642	0.698	0.717	0.698	0.679	0.755	0.736	0.717	0.566	0.717	1.000						
JXJX	0.623	0.642	0.623	0.679	0.660	0.660	0.642	0.623	0.698	0.660	0.642	1.000					
YNWS	0.623	0.604	0.585	0.755	0.585	0.660	0.642	0.660	0.623	0.623	0.717	0.660	1.000				
JSYC	0.698	0.642	0.660	0.717	0.736	0.736	0.642	0.736	0.660	0.660	0.717	0.736	0.736	1.000			
HTX1	0.755	0.660	0.566	0.660	0.717	0.642	0.698	0.604	0.642	0.679	0.623	0.604	0.679	0.679	1.000		
CQWZ	0.717	0.660	0.642	0.698	0.566	0.528	0.660	0.604	0.679	0.679	0.585	0.566	0.604	0.642	0.660	1.000	
HBJZ	0.604	0.585	0.528	0.698	0.528	0.604	0.585	0.604	0.566	0.642	0.698	0.528	0.755	0.679	0.623	0.623	1.000

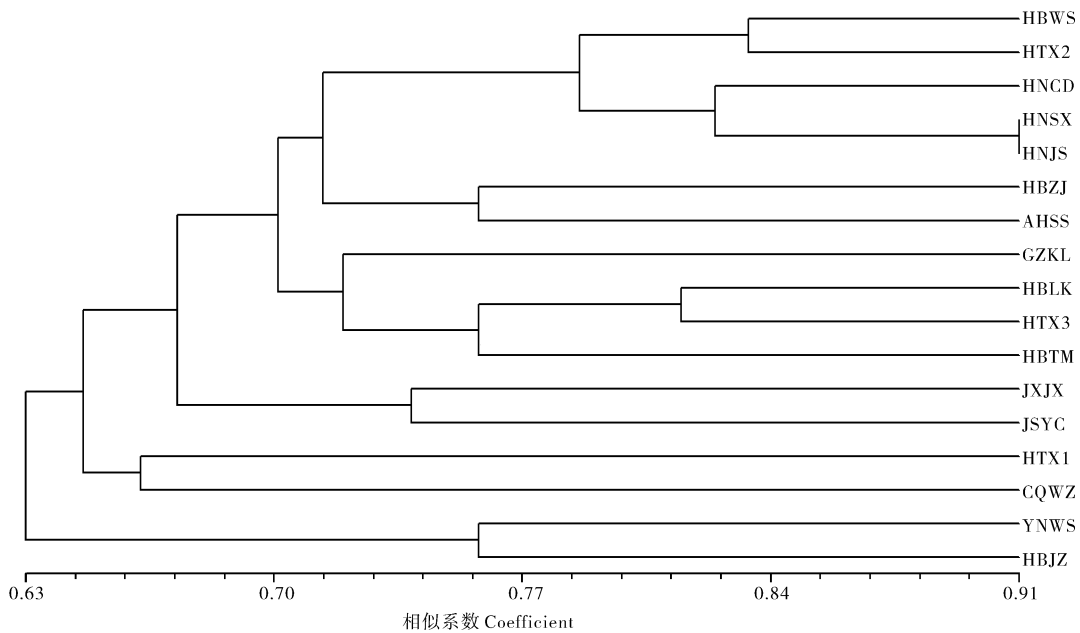


图 2 半夏遗传相似度聚类图

Fig.2 Genetic similarity clustering map of *P. ternata* populations



### 3 讨 论

本研究基于转录组数据,设计开发 SSR 引物,利用多态性 SSR 引物进行半夏遗传多样性分析,结果表明:所开发的 19 对 SSR 引物多态性高,能将 17 份半夏材料明确区分。通过分子方差分析(AMOVA)发现半夏的遗传变异主要来源于居群内。由遗传多样性分析可知,不同产地的半夏具有丰富的遗传多样性;由遗传距离与聚类结果可知,不同居群半夏遗传结构非严格按照产地划分。

#### 3.1 SSR 引物多态性

Botstein 等<sup>[19]</sup>认为  $PIC < 0.25$ 、 $0.25 < PIC < 0.50$ 、 $PIC > 0.50$  分别表示引物多态性为较低、中等、较高。本试验共筛选了 76 对 SSR 引物,其中筛选的 19 对引物的 PIC 范围为 0.40~0.96,平均为 0.60,高于 Du 等<sup>[20]</sup>、陆欢等<sup>[21]</sup>的研究结果,说明本试验所筛选的 SSR 引物多态性高。同时 19 对引物的  $N_e$ 、PIC、FP 均大于平均值,说明这 19 对引物整体的均一性较好,在一定程度上反映出这 19 对引物多态性比较丰富,对 17 份材料的区分能力较好,为下一步的遗传多样性分析提供了依据。

#### 3.2 半夏遗传多样性

利用 19 对多态性较高的 SSR 引物对 17 个半夏居群进行遗传多样性分析,结果显示每对引物的多态性位点平均为 2.4 个,多态性位点百分数平均为 92.2%,等位基因数的平均值为 3.8 个, $N_e$  基因多样性指数平均为 1.03,表明本研究收集的 17 份半夏材料蕴含了比较丰富的遗传变化信息,显示了较高水平的基因多样性。而张君毅<sup>[22]</sup>采用 SRAP 分子标记方法对 24 个居群半夏进行遗传多样性分析,从中筛选出 29 对引物,共检测到 286 个位点,多态性位点百分数占 48.3%; $N_e$ 's 基因多样性指数平均值为 0.198,同样也证明了半夏居群存在丰富的遗传多样性。

研究遗传多样性有助于分析生物多样性的起源和进化,并为植物分类提供有益的资料,进而为植物育种和保护策略制定基础<sup>[23]</sup>,因此,遗传育种的前提是做好天然居群及居群间遗传多样性和遗传变异的研究。郑丹书<sup>[24]</sup>对半夏居群间、居群内的分化程度进行分析,结果表明半夏居群内部存在较大变异,占 67.18%;而居群间的变异程度较小,为 32.82%;由 POPGENE3.2 计算得出  $G_{st} = 0.4112$ ,  $N_m =$

0.7159,结果也阐明了半夏居群大部分的变异(58.88%)存在于居群内部,而导致居群存在较高分化水平的主要原因可能是基因流。本研究发现半夏居群间分化系数  $F_{st}$  为 0.124,说明居群间遗传分化较小。而通过分子方差分析(AMOVA)发现居群内的变异达到 88%,也验证了半夏的遗传变异主要来源于居群内。而  $N_m$  值为 1.765,表明居群间能正常地进行基因交流,且居群间遗传分化受基因流的影响较大。由遗传多样性分析可知,不同居群半夏具有丰富的遗传多样性;根据聚类结果分析可知,不同居群半夏遗传结构不严格按照产地划分,表明不同居群半夏有较大的基因交流程度,具有较近的亲缘关系,造成这种现象的原因可能是:①由于栽培材料在长期的驯化过程中出现了遗传分化以及部分材料的来源混乱导致的<sup>[25]</sup>;②也可能是因为人为的半夏引种栽培干扰较大,加之多地区品种遗传背景高度复杂,而半夏常以无性繁殖为主,且世代交替频繁,从而导致种质一致性差<sup>[26]</sup>。

#### 参考文献 References

- [1] 李丽,王慧娟,盖成万.半夏的药理和临床研究进展[J].中医药信息,2006(5):38-40.LI L, WANG H J, GAI C W. Pharmacological and clinical research progress of *Pinellia ternata* [J]. Information of traditional Chinese medicine, 2006 (5): 38-40 (in Chinese).
- [2] 王志强,李炳超.半夏药理作用研究进展[J].山西医药杂志(下半月刊),2009,38(1):65-67.WANG Z Q, LI B C. Research progress on pharmacological action of *Pinellia ternata* [J]. Shanxi medical journal (second half), 2009, 38 (1): 65-67 (in Chinese).
- [3] ZHANG J Y, GUO Q S, ZHENG D S. Genetic diversity analysis of *Pinellia ternata* based on SRAP and TRAP markers [J]. Biochemical systematics and ecology, 2013, 50: 258-265.
- [4] 杨俊宝,朱秀志,罗成科,等.半夏种质资源的随机扩增多态性 DNA 技术分析[J].中国中医药信息杂志,2007(1):42-44. YANG J B, ZHU X Z, LUO C K, et al. Analysis of random amplified polymorphic DNA technology of *Pinellia ternata* germplasm resources [J]. Chinese journal of TCM information, 2007 (1): 42-44 (in Chinese).
- [5] 陈德飞,杨施城.半夏的真伪鉴别[J].黑龙江中医药,2010,39(3):45-46. CHEN D F, YANG S C. Identification of standard and false Banxia [J]. Heilongjiang journal of traditional Chinese medicine, 2010, 39(3): 45-46 (in Chinese).
- [6] RAJWANT K K, MANO J K, RAI K S. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants [J]. Euphytica,

- 2011, 177(3):309-334.
- [7] AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. Plant cell reports, 2008, 27(4):617-631.
- [8] BERNADETTE J, SANDRINE F, PHILIPPE B. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers [J]. BMC plant biology, 2003(3):1-19.
- [9] 李磊, 陈敏, 张明, 等. 4 种叶型性状半夏和掌叶半夏的 ISSR 分析 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2008(1):86-89. LI L, CHEN M, ZHANG M, et al. The analysis of germplasms evaluation of four different leaf types and characters of *Pinellia ternata* and *Pinellia pedatisecta* by ISSR [J]. Journal of Southwest China Normal University (natural science edition), 2008(1):86-89 (in Chinese with English abstract).
- [10] 徐敏, 吴生, 刘小霞, 等. 秦岭地区华中五味子 SSR 遗传多样性分析 [J]. 中药材, 2013, 36(8):1215-1218. XU M, WU S, LIU X X, et al. Genetic diversity analysis of *Schisandra sphenanthera* in Qinling Mountains based on SSR markers [J]. Journal of Chinese medicinal materials, 2013, 36(8):1215-1218 (in Chinese with English abstract).
- [11] FENG S, HE R, LU J, et al. Development of SSR markers and assessment of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* cultivars [J]. Frontiers in genetics, 2016(7):1-11.
- [12] 孟祥海, 张跃进, 张欢强, 等. 遮荫对半夏生物学特性的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007(3):219-222. MENG X H, ZHANG Y J, ZHANG H Q, et al. Effects of shading treatment on biological characteristics of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit [J]. Journal of Northwest A&F University (natural science edition), 2007(3):219-222 (in Chinese with English abstract).
- [13] YOON J S, SEO J C, HAN S W. *Pinelliae* rhizoma herbal-acupuncture solution induced apoptosis in human cervical cancer cells, SUN-17 [J]. Chin Med, 2006; 34(3):401-408.
- [14] WANG L, ZHAO Y J, ZHANG Y Y. Determination of the total alkaloids of *Pinellia* tuber and its anti-vomiting study in minks [J]. Chin Pharm Bull, 2005(21):864-867.
- [15] 孟令芝. 基于高通量测序技术的连翘转录组分析及 SSR 分子标记的开发 [D]. 太原: 山西农业大学, 2014. MENG L Z. Transcriptome analysis of *Forsythia suspensa* based on high-throughput sequencing technology and development of SSR molecular markers [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [16] 田尊哲, 高庆波, 陈世龙, 等. 基于高通量测序分析青藏高原特有植物蓝玉簪龙胆 (*Gentiana veitchiorum*) 的 SSR 和 SNP 特征 [J]. 植物研究, 2016, 36(5):747-752. TIAN Z Z, GAO Q B, CHEN S L, et al. Analysis of SSR and SNP characteristics of *Gentiana veitchiorum*, an endemic plant in Qinghai Tibet Plateau based on high-throughput sequencing [J]. Plant research, 2016, 36(5):747-752 (in Chinese with English abstract).
- [17] 许玉兰, 白青松, 张瑞丽, 等. 云南松基因组微卫星富集文库的序列特征分析 [J]. 生物技术, 2014, 24(4):62-66. XU Y L, BAI Q S, ZHANG R L, et al. Sequence analysis of microsatellite enriched library of *Pinus yunnanensis* genome [J]. Biotechnology, 2014, 24(4):62-66 (in Chinese with English abstract).
- [18] 文自翔, 赵团结, 郑永战, 等. 中国栽培和野生大豆农艺品质性状与 SSR 标记的关联分析 I. 群体结构及关联标记 [J]. 作物学报, 2008(7):1169-1178. WEN Z X, ZHAO T J, ZHENG Y Z, et al. Correlation analysis of agronomic quality traits and SSR markers of cultivated and wild soybean in China I. Population structure and related markers [J]. Journal of crops, 2008(7):1169-1178 (in Chinese with English abstract).
- [19] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American journal of human genetics, 1980, 32(3):314-331.
- [20] DU Q, PAN W, XU B, et al. Polymorphic simple sequence repeat (SSR) loci within cellulose synthase (PtoCesA) genes are associated with growth and wood properties in *Populus tomentosa* [J/OL]. New phytologist, 2013, 197 [2021-08-02]. <https://doi.org/10.1111/nph.12072>.
- [21] 陆欢, 张丹, 章炉军, 等. 金针菇种质资源 5 个农艺性状与 SSR 标记的关联分析 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(1):96-106. LU H, ZHANG D, ZHANG L J, et al. Association analysis of five agronomic traits and SSR markers in *Flammulina velutipes* germplasm resources [J]. Acta agrobiotechnology sinica, 2015, 23(1):96-106 (in Chinese with English abstract).
- [22] 张君毅. 半夏遗传多样性分子标记及质量评价研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007. ZHANG J Y. Molecular markers of genetic diversity and quality evaluation of *Pinellia ternata* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese with English abstract).
- [23] GITZENDANNE M A, SOLTIS P S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners [J]. American journal of botany, 2000, 87(6):783-792.
- [24] 郑丹书. 半夏遗传多样性分子标记研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2013. ZHENG D S. Molecular markers for genetic diversity of *Pinellia ternata* [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [25] 李婷. 不同产地半夏种质初步评价研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2008. LI T. Preliminary evaluation of *Pinellia ternata* germplasm from different habitats [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [26] 薛梅, 陈成彬, 马小军. 中国不同地理居群半夏遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23):2849-2851. XUE M, CHEN C B, MA X J. Genetic diversity of *Pinellia ternata* in different geographical populations of China [J]. Chinese journal of traditional Chinese medicine, 2008, 33(23):2849-2851 (in Chinese with English abstract).

## Development of SSR molecular markers and genetic diversity analysis in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.

ZHANG Jing<sup>1</sup>, LI Xiaodong<sup>1</sup>, ZONG Qingbo<sup>2</sup>, HE Beibei<sup>1</sup>, LA Ji<sup>1</sup>,  
JING Naliang<sup>1</sup>, WANG Keyue<sup>1</sup>, ZHONG Shumei<sup>3</sup>, SHU Shaohua<sup>1</sup>

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University,  
Wuhan 430070, China;

2. Hubei Province Fruit Tea Office, Wuhan 430070, China;

3. Jiuxin Institute of Traditional Chinese Medicine, Jiuzhoutong Pharmaceutical Group,  
Wuhan 430051, China

**Abstract** SSR primers were designed and developed according to unigenes by analyzing the transcriptome data of *Pinellia ternata*. The screened SSR primers were used to analyze the genetic diversity among different populations of *Pinellia ternata* and provide support for molecular marker-assisted breeding of *Pinellia ternata*. The results showed that the selected 19 pairs of primers with high polymorphism detected 49 polymorphic loci in 17 *Pinellia* populations, indicating that the polymorphism is high. The 17 *Pinellia* populations were divided into 3 taxa using UPGMA mapping. The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the variation within the *Pinellia* population reached 88%, indicating that the difference between populations is relatively small, and the genetic variation mainly comes from between individuals. The average differentiation coefficient  $F_{st}$  between populations was 0.124, and the gene flow  $N_m$  value was 1.765, indicating that gene exchange can be carried out normally among populations, and the genetic differentiation among populations is greatly affected by gene flow. The 19 pairs of SSR primers developed by SSR technology in this article have certain versatility and polymorphism among different *Pinellia* populations, and can clearly distinguish 17 *Pinellia* materials.

**Keywords** *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; transcriptome; simple sequence repeats molecular marker; genetic diversity; population

(责任编辑:张志钰)