

基于 SSR 分子标记的地被菊遗传多样性分析和指纹图谱构建

李子航¹, 何立飞^{1,2}, 王秀军¹, 郭林繁¹, 罗春燕¹, 李庆卫^{1*}

1 北京林业大学园林学院, 北京 100083

2 北京市花木有限公司, 北京 100032

李子航, 何立飞, 王秀军, 郭林繁, 罗春燕, 李庆卫. 基于 SSR 分子标记的地被菊遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2839-2860.

LI Zihang, HE Lifei, WANG Xiujun, GUO Linfan, LUO Chunyan, LI Qingwei. Genetic diversity analysis and fingerprints of *Chrysanthemum×morifolium* based on SSR molecular markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2839-2860.

摘 要: 为了从分子水平上研究地被菊(*Chrysanthemum×morifolium*)种质资源的遗传多样性并建立地被菊品种的指纹图谱库, 筛选出多态性高的引物用于地被菊品种间鉴定、亲缘关系分析和分子标记辅助选种体系的建立, 本研究利用多态性好、条带清晰、重复性好的 12 对引物对 91 份地被菊材料和 14 份菊属近缘种材料进行简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记和遗传多样性分析, 从 12 对引物中筛选出 9 对核心引物对受试材料进行指纹图谱构建。结果显示, 在 105 个样品中, 12 对引物检测出 104 个等位位点, 范围为 2–26, 平均每个点位检测出 9.25 个等位基因数, 平均每个点位检测得到的有效等位基因数(number of effective alleles, N_e)为 2.745 6, 范围为 1.276 0–4.742 5; Shannon 信息指数(Shannon genetic diversity index, I)变化范围是 0.513 3–2.239 9, 均值是 1.209 0; Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H)范围是 0.216 3–0.789 1, 均值是 0.578 0; 观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)的范围是 0.223 3–0.895 2, 均值是 0.557 5; 期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)的范围是 0.217 4–0.793 3, 均值是 0.580 8; 多态信息含量(polymorphism information content, PIC)值变化范围是 0.211 5–0.774 0, 均值是 0.532 9; 遗传相似性系数(genetic similarity, GS)范围为 0.228 5–1.000 0, 均值是 0.608 3。聚类分析表明, 在遗传距离(genetic distance, GD)=0.30 时, 受试材料可以分为两个类群。Structure 群体结构分析将受试材料分为 3 个种群和 1 个混合种群。从 12 对引物中筛选出可完全区分 105 份受试材料的 9 对核心引物, 构建了 91 份地被菊材料和 14 份菊属近缘种材料的指纹图谱。地被菊材料之间具有显著的遗传差异和丰富的遗传多样性, 对于地被菊的园林应用和品种选育具有重要意义。地被菊品种和菊属近缘种的指纹图谱库的构建, 一定程度上揭示了 105 份实验材料的亲缘关系, 为今后地被菊品种鉴

资助项目: 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程项目(2019-KJC-02-10); 国家重点研发计划(2020YFD100050201)

This work was supported by the Beijing Landscaping Color Extension Green Science and Technology Innovation Project (2019-KJC-02-10) and by the National Key Research and Development Program of China (2020YFD100050201).

*Corresponding author. E-mail: lqw6809@bjfu.edu.cn

Received: 2022-11-16; Accepted: 2023-01-26

定与筛选体系的研究提供了技术支撑。

关键词：地被菊；遗传多样性；简单重复序列分子标记；指纹图谱

Genetic diversity analysis and fingerprints of *Chrysanthemum*×*morifolium* based on SSR molecular markers

LI Zihang¹, HE Lifei^{1,2}, WANG Xiujuan¹, GUO Linfan¹, LUO Chunyan¹, LI Qingwei^{1*}

1 School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Beijing Florascape Co., Ltd., Beijing 100032, China

Abstract: The present study aims to explore the genetic diversity of germplasm resources of *Chrysanthemum*×*morifolium* (hereinafter, *C.*×*morifolium*) at the molecular level and to establish a fingerprint database of *C.*×*morifolium* varieties. We employed 12 pairs of primers with high levels of polymorphism, clear bands, and high degrees of reproducibility to analyze the SSR molecular markers and genetic diversity of 91 *C.*×*morifolium* materials and 14 chrysanthemum-related materials. With regard to constructing the fingerprints of the tested materials, we chose 9 pairs of core primers. The findings revealed that 12 primer pairs detected 104 alleles in 105 samples, ranging from 2 to 26. The average number of observed alleles (N_a) per site was 9.25. The average number of effective alleles (N_e) per site was 2.745 6, with its range being 1.276 0 to 4.742 5. Shannon genetic diversity index (I) values ranged between 0.513 3 and 2.239 9 ($M=1.209$ 0). Nei's gene diversity index (H) ranged between 0.216 3 and 0.789 1 ($M=0.578$ 0). The observed heterozygosity (H_o) ranged between 0.223 3 and 0.895 2 ($M=0.557$ 5). The expected heterozygosity (H_e) ranged between 0.217 4 and 0.793 3 ($M=0.580$ 8). The polymorphism information content (PIC) ranged between 0.211 5 and 0.774 0 ($M=0.532$ 9). The genetic similarity (GS) ranged between 0.228 5 and 1.000 0 ($M=0.608$ 3). Cluster analysis revealed that when the genetic distance (GD) equals to 0.30, the tested materials can be classified into 2 groups. When the GD equals to 0.27, the first group can be divided into 6 subgroups; accordingly, 105 tested materials can be divided into 7 subgroups. The cophenetic correlation test was carried out based on the cluster analysis, and the corresponding results showed that the cluster map correlated with the genetic similarity coefficient ($r=0.952$ 73). According to the results of Structure population analysis, we obtained the optimal population number, with the true number of populations (K) being 3 and the population being divided concerning $Q \geq 0.5$. Three subgroups, i.e., Q1, Q2 and Q3, included 34, 33 and 28 germplasms, respectively, and the remaining 10 germplasms were identified as the mixed population. During the experiment, 9 pairs of core primers were screened among the total of 12 for a complete differentiation regarding 105 tested materials, and the fingerprints of 91 *C.*×*morifolium*

materials and 14 chrysanthemum-related materials were further constructed. Overall, there were significant genetic differences and rich genetic diversity among *C.×morifolium* materials, which would shed light on the garden application and variety selection fields of *C.×morifolium*. The fingerprint database of 105 *C.×morifolium* varieties and chrysanthemum-related species may provide technical support for future research regarding the identification and screening system of *C.×morifolium* varieties.

Keywords: *Chrysanthemum×morifolium*; genetic diversity; simple sequence repeat marker; fingerprint

地被菊(*Chrysanthemum×morifolium* R.)为菊科菊属多年生宿根草本花卉,是利用原产我国的优良野生菊花资源反复杂交选育而诞生的具有园林应用价值的菊花新品种群^[1]。地被菊是多次品种间杂交、反复选育而得出的,其学名与家菊(*Chrysanthemum×morifolium*)相同,是家菊分类下的一种^[2]。地被菊新生植株低矮,顶生头状花序,花朵单生或簇生,花瓣呈管状、舌状,花色鲜艳,绿色期及开花期较长,极具观赏性^[3-5]。目前,地被菊新品种已达上千种^[6-7]。由于地被菊品种繁多,遗传背景复杂,存在种质间亲缘关系不清、同种异名等问题,同时地被菊众多品种携带大量优良基因。通过对地被菊进行遗传多样性分析,研究其亲缘关系和群体结构,构建指纹图谱库,对地被菊的品种鉴定、优良品种选育和园林应用有重要意义。

分子标记(molecular marker)指的是特定基因或标记连锁的一段经过扩增可检测出的 DNA 序列。目前,常用的分子标记有限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[8-9]、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)^[10-12]、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)^[13-15]、简单重复序列间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR)^[16-17]、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)^[18]等,近年来各种分子标记技术在菊属的研究中得到了较多应用。邵青松等^[19]

使用 ISSR 分子标记对 29 份菊花、1 份野菊和 1 份菊花脑种质进行遗传关系分析,使用 22 个引物扩增到 149 条具有多态性的条带。张鲜艳^[20]使用 ISSR 和序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记对保存于南京农业大学中国菊花种质资源保存中心具代表性的菊属及其近缘属植物进行研究,表明菊属及其近缘属野生资源具有丰富的遗传多样性。在众多分子标记手段中,具有重复性、稳定性较高和分析简便等优点的 SSR 分子标记是分析遗传多样性及群体亲缘关系很好的标记方法。SSR 标记技术已经被广泛用于植物品种鉴定^[21-22]、多样性分析^[23-25]、指纹图谱的构建^[26-27]等研究中,在菊属植物的研究中也得到应用。李亚慧^[28]使用磁珠富集发开发了 183 个菊花微卫星序列,共设计了 142 对引物,筛选出 54 对引物可以有效扩增出清晰条带。何仁峰等^[29]将药用菊花 SSR-PCR 反应体系进行优化,从 136 对引物中成功筛选出了 57 对扩增条带清晰、多态性丰富的 SSR 引物。叶松^[30]以 99 个大菊品种为材料,进行遗传多样性研究,说明 SSR 分子标记可用于菊花遗传多样性的研究中。

随着分子标记技术的发展, DNA 分子标记技术作为至今为止最为有效的遗传分析方式,被广泛地应用于指纹图谱的构建。指纹图谱是指能够反映生物个体间差异的电泳图谱,具有类似人类指纹的高度个体特异性和稳定可靠

性^[31]。DNA 指纹图谱可以快速而精准地进行品种的真实性和纯度鉴定,对亲缘关系分析具有重要作用,并用于新品种登记和品种知识产权保护。张轶^[32]利用微卫星文库,成功开发了 35 个菊花特异性 SSR 标记,使用其中 20 个具有特异性的 SSR 位点对 327 个品种 DNA 进行了扩增,建立 SSR 指纹图谱和 19 位十进制分子身份证。杨洁等^[33]采用 SSR 标记对 32 个万寿菊品种(系)构建指纹图谱。然而目前为止,SSR 技术在地被菊构建指纹图谱中尚未使用。

本试验采取 SSR 分子标记对地被菊遗传多样性进行分析,相对于传统的表观遗传分析和细胞学遗传分析,分子标记有不受环境和植株生长状态的影响,可准确反映种质的遗传特性

的优势。通过对北京林业大学梅菊圃的 91 个地被菊品种和 14 个菊属材料进行 SSR 分子标记的遗传多样性分析和绘制指纹图谱,为地被菊的资源利用和品种保护提供支持,为后续地被菊新品种的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

参试地被菊品种由北京林业大学梅菊圃提供。其中有 91 个地被菊品种,14 个菊属近缘种材料(表 1)。参试材料于 2019 年 10 月 13 日进行采集,将每个品种植株最上方幼嫩叶片 2–3 枚置于锡纸包内,迅速放入液氮中保存,并立即带回实验室放入–80 °C 冰箱中保存备用。

表 1 参试材料列表

Table 1 List of tested materials

No.	Cultivar	Origin	No.	Cultivar	Origin
C001	'BL1332'	Cultivated by our group (2010–2018)	C060	'Xianhong'	Seedling selection of elite cultivar
C002	'BL1336'	Cultivated by our group (2010–2018)	C061	'Xiaochengpian'	Cultivated by our group (2018–2021)
C003	'BL1902'	Cultivated by our group (2010–2018)	C062	'Xiaohuanghua'	Seedling selection of elite cultivar
C004	'BL1903'	Cultivated by our group (2010–2018)	C063	'Xiaoxishi'	Cultivated by our group (2018–2021)
C006	'BL1905'	Cultivated by our group (2010–2018)	C064	'Xiaoxiangbai'	Seedling selection of elite cultivar
C007	'BL1907'	Cultivated by our group (2010–2018)	C065	'Xiehuang'	Cultivated by our group (2018–2021)
C008	'BL1908'	Cultivated by our group (2010–2018)	C066	'Xinhong'	Seedling selection of elite cultivar
C010	'BL5306'	Cultivated by our group (2010–2018)	C067	'Xinwanhuang'	Seedling selection of elite cultivar
C012	'BL5332'	Cultivated by our group (2010–2018)	C068	'Xinyu'	Seedling selection of elite cultivar
C014	'TY51'	Cultivated by our group (2010–2018)	C069	'Xinzi'	Seedling selection of elite cultivar
C015	'WL4'	Cultivated by our group (2018–2021)	C070	'ST01'	Cultivated by our group (2010–2018)

(待续)

(续表 1)

No.	Cultivar	Origin	No.	Cultivar	Origin
C019	‘Aizijin’	Cultivated by our group (2018–2021)	C074	‘Zaobailong’	Seedling selection of elite cultivar
C020	‘Beilincheng’	Seedling selection of elite cultivar	C075	‘Zaoxishi’	Seedling selection of elite cultivar
C022	‘Beilinsi’	Seedling selection of elite cultivar	C076	‘Zaoyinbei’	Seedling selection of elite cultivar
C023	‘Chengshuang’	Cultivated by our group (2018–2021)	C077	‘Zhongqiubai’	Cultivated by our group (2018–2021)
C024	‘Chenghongziye’	Cultivated by our group (2018–2021)	C078	‘Zhongqiucaxia’	Cultivated by our group (2018–2021)
C025	‘Chenghuangjin’	Cultivated by our group (2018–2021)	C079	‘Zhongqiucheng’	Cultivated by our group (2018–2021)
C026	‘Chenghuangpian’	Seedling selection of elite cultivar	C080	‘Zhongqiu hong’	Cultivated by our group (2018–2021)
C027	‘Danhanfen’	Seedling selection of elite cultivar	C081	‘Zhongqiu huang’	Cultivated by our group (2018–2021)
C028	‘Danqiushui’	Cultivated by our group (2018–2021)	C082	‘Zhongqiuzi’	Cultivated by our group (2018–2021)
C029	‘Fanbailu’	Seedling selection of elite cultivar	C083	‘Chongbanzaohuang’	Seedling selection of elite cultivar
C030	‘Guoqingmeihong’	Seedling selection of elite cultivar	C084	‘Chongyanghong’	Seedling selection of elite cultivar
C031	‘Guoqingzijin’	Seedling selection of elite cultivar	C085	‘Zijin zao’	Seedling selection of elite cultivar
C033	‘Hanhuang’	Seedling selection of elite cultivar	C086	‘Ziye NO.1’	Cultivated by our group (2018–2021)
C034	‘Hanluhong’	Seedling selection of elite cultivar	C087	‘ZUixiuqiu’	Seedling selection of elite cultivar
C035	‘Hongchun’	Seedling selection of elite cultivar	C088	<i>Chrysanthemum indicum</i> L. cv. Bozhou	Collected from the wild in Bozhou, Anhui Province in 2008
C036	‘Hongjin zao’	Seedling selection of elite cultivar	C090	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. cv. Dahuaiju	Collected from Henan Province in 2008
C037	‘Hongjindan’	Seedling selection of elite cultivar	C091	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. ‘Dayangju’	Collected from Zhejiang Province in 2008
C038	‘Hongyu’	Seedling selection of elite cultivar	C092	<i>Chrysanthemum indicum</i> L. cv. Guangzhou	Collected from the wild in Guangzhou in 2007
C039	‘Huangjinrong’	Cultivated by our group (2018–2021)	C093	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. cv. Hangbaiju	Collected from Zhejiang Province in 2008
C040	‘Jinbuhuan’	Natural pollinated by ‘Meiaifen’	C094	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. cv. Hanghuangju	Collected from Zhejiang Province in 2008
C041	‘Jindinghongxin’	Seedling selection of elite cultivar	C095	<i>Ajania pacifica</i> K.	Collected from Zhejiang Province in 2008

(待续)

(续表 1)

No.	Cultivar	Origin	No.	Cultivar	Origin
C044	‘Jinruhe’	Seedling selection of elite cultivar	C098	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. cv. Shibai	Collected from Hubei Province in 2007
C045	‘Jinyinju’	Cultivated by our group (2018–2021)	C099	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. cv. Shidafen	Collected from Hubei Province in 2007
C046	‘Liujiinsuiyue’	Seedling selection of elite cultivar	C101	<i>Chrysanthemum indicum</i> L. cv. Tianzhushan	Collected from the wild in Tianzhu Mountain, Anhui Province in 2008
C047	‘Maoxiangyu’	Seedling selection of elite cultivar	C102	<i>Chrysanthemum morifolium</i> R. cv. Xiaohuaiju	Collected from Henan Province in 2008
C048	‘Meihong’	Seedling selection of elite cultivar	C103	<i>Chrysanthemum indicum</i> L. cv. Yichang	Collected from Hubei Province in 2007
C049	‘Meiaifen’	Selected from American early chrysanthemum seed seedlings in 1985	C104	‘yz08’	Cultivated by our group (2010–2018)
C050	‘Qihong’	Natural pollinated by ‘American Red’	C105	‘yz42’	Cultivated by our group (2010–2018)
C051	‘Qianjinkui’	Seedling selection of elite cultivar	C106	‘BL1105’	Cultivated by our group (2018–2021)
C052	‘Qiushui’	Seedling selection of elite cultivar	C108	‘BL10212’	Cultivated by our group (2018–2021)
C053	‘Ruhe’	Natural pollinated by ‘Pudihehua’	C110	‘BL10312’	Cultivated by our group (2018–2021)
C054	‘Sajinhong’	Cultivated by our group (2010–2018)	C111	‘BL10313’	Cultivated by our group (2018–2021)
C055	‘Saixishi’	Cultivated by our group (2018–2021)	C112	‘BL11011’	Cultivated by our group (2018–2021)
C056	‘Sancengjintai’	Cultivated by our group (2010–2018)	C113	‘BL11012’	Cultivated by our group (2018–2021)
C057	‘Taikongai’	Seedling selection of elite cultivar	C114	‘BL11013’	Cultivated by our group (2018–2021)
C058	‘Xishi’	Seedling selection of elite cultivar	C118	‘BL11019’	Cultivated by our group (2018–2021)
C059	‘Xiaguangwandao’	Seedling selection of elite cultivar			

1.2 试验方法

1.2.1 地被菊基因组中 DNA 的提取与检测

所使用的试剂为北京天根生化科技有限公司生产的 DP360 多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒。DNA 提取完成后,使用 QUAWELL-Q5000 微量紫外分光光度计,使用 1 μL 的

Tris-EDTA 缓冲液(Tris-EDTA buffer solution, TE)作空白对照,取 1 μL 的 DNA 提取液,测定其在 260 nm 和 280 nm 的吸光值和浓度值。使用 1%琼脂凝胶电泳进行检测。

1.2.2 引物筛选

SSR 引物来源于国内外文献内的菊属 SSR

研究成果^[14,30,34-35], 选用 119 对 SSR 引物。SSR 引物序列由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。以 4 个地被菊品种和 2 个菊属近缘种材料的基因组 DNA 为模板进行筛选, 选取多态性好、条带清晰、重复性好的引物用于后续步骤。

1.2.3 SSR-PCR 扩增

扩增体系为 20 μL , 包括 40 ng/ μL DNA 1 μL 、2 \times Taq Master Mix 10 μL 、上游引物 0.1 μL 、下游引物 0.3 μL , 剩余体系用 ddH₂O 定量。优化得到的 PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火温度 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将扩增后的 PCR 产物进行毛细管电泳上机检测。取 PCR 产物 0.3 μL 、分子量内标 0.5 μL 和去离子甲酰胺 9.5 μL 混合加入 PCR 板, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却后离心, 1 \times 缓冲液上机检测。

1.2.4 数据处理

将上机结果文件导入 Genemarker 2.2.0, 按位点导出峰图, EXCEL 2016 位点信息表。将 EXCEL 格式的表格进行转码, 利用 Dataformater 软件转换数据格式^[36], 利用 Popgene 32 软件对样品进行哈特-温伯格平衡显著性检验, 获得观测等位基因数(number of alleles, N_a)、有效等位基因数(number of effective alleles, N_e)、Shannon 信息指数(Shannon genetic diversity index, I)、Nei's 基因多样性指数 H 、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)。使用 PIC_CALC 0.6 软件计算多态信息含量 PIC。使用 NTSYS 2.10e 软件计算遗传距离(genetic distance, GD)和遗传相似性系数(genetic similarity, GS), 通过 Orange 3 软件绘制遗传相似性系数热图, 并使用 MEGA 11 软件进行 UPGMA 法聚类分析并绘制聚类树状图。

使用 Structure 2.3.3 软件, 基于混合模型对 105 种地被菊材料进行群体结构分析, 并计算遗传相似性权重值(genetic similarity weight

value, Q)。将群体数(true number of populations, K)范围设定为 1–6, 设置 MCMC 值开始时的不作数迭代次数为 5 000 次, 再将不作数迭代后的马尔科夫链蒙特卡洛值(number of Markov Chain Monte Carlo, MCMC)设为 50 000 次。每个 K 值重复运行 10 次, 以最大似然值为原则选定最佳 K 值作为群体结构最优系数, 并进行 K 值折线图和群体遗传结构图绘制。

1.3 核心引物的筛选与指纹图谱的构建

从引物的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)选取多对引物作为核心引物建立指纹图谱。根据确立的各个样品片段长度, 将不同引物的不同片段分别进行编号, 2 个字母编号代表 1 个引物, 0 表示该引物在该品种下无清晰条带扩增。根据引物排列顺序与扩增条带的片段大小, 构建了各种质的字母指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度与纯度质量检测

根据微量紫外分光光度计的检测结果可知(表 2), OD_{260}/OD_{280} 的比值均介于 1.6–1.9 之间, 证明提取的 DNA 较为纯净, 浓度最高的 317.53 ng/ μL , 浓度最低的 38.58 ng/ μL , 能够满足 SSR-PCR 对 DNA 纯度和浓度的要求(20 ng/ μL)。

2.2 SSR 引物的筛选和多态性检测

SSR 引物筛选和多态性检测由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。以 6 份参试材料('矮紫金'、'繁白露'、'寒露红'、'美矮粉'、'神农香菊'和'宜昌野菊')的基因组 DNA 为材料, 对 119 对候选引物进行初筛, 筛选出 12 对能稳定扩增出清晰条带的引物, 如表 3 所示。

2.3 地被菊种质资源的遗传多样性

通过荧光 PCR 和毛细管电泳测序, 可得到各点位上等位基因的片段大小(图 1)。

表 2 DNA 纯度与浓度检测结果

Table 2 The concentration and purity of DNA

No.	OD_{260}/OD_{280}	Concentration (ng/ μ L)	No.	OD_{260}/OD_{280}	Concentration (ng/ μ L)
C019	1.66	183.95	C049	1.71	145.72
C029	1.63	278.36	C064	1.66	317.53
C031	1.65	38.58	C097	1.68	175.06
C034	1.66	238.43	C103	1.70	165.11

表 3 SSR 引物序列表

Table 3 SSR primer sequences

Primer name	SSR motif	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Size (bp)
GCCM-016	(GA) ₈ (AG) ₁₃	AAACAGCACAAACCCAAAGG	CTTACACCGCAAAGAAGGC	156–199
GCCM-018	(GT) ₉	TATCCACGGCCCATAGAAAG	GAAGGAGGGACCCTGTAGGA	312–334
GCCM-045	(CA) ₈	GGTGAGGTGCAGAACAAAGGATA	ACCAGATTGGAATGAAACGAAA	234–246
GCCM-059	(CCA) ₅	TGAGATCATTCCCAACCTCC	CTAGCGTCCAAAGAATTGGC	206–214
GCCM-067	(TGA) ₅	ACCAAAGGCAGCTCACAGTT	CCTCCCTCACTCATCTCTGC	203–212
GCCM-069	(AG) ₈	CGATCACCATTCTTTTCCCA	CCGATAAGTTCGTCCTTGGT	208–240
GCCM-095	(ATCC) ₈	GGAGAAGAAAGTAAACCACCGA	TGAGATTGGGAAGTTGAGGC	190–209
GCCM-100	(CCAA) ₄	CCCCCTCTTCTTCTCAACC	CAATAGAAAGCGCGTGACAA	216–226
GCCM-104	(ATC) ₅	AGCTAAAACAAACAAGCGGC	GCGTTAACTGTGTGCGTTGA	198–204
GCCM-105	(CAA) ₅	CTGTTGAGCAGTTCAGGCAC	GTGTGATCGAGGCGATTTTT	227–230
GCCM-110	(ATG) ₅	TGGTTATGGGTGACCCTGAT	AAGAAAGTGCAGGCCAAGAA	166–169
GCCM-113	(CAA) ₄	ACAGTACACACACAGCCAACAC	GTAATGCTTCCGTCTGCATAGC	265–292

依照各位点的片段长度, 利用 Popgene 32 软件计算得到 12 对引物的多态性信息(表 4)。105 个样品中检测出 104 个等位位点, 每个引物检测到的多态性条带范围是 2–26 条, 平均每个点位检测到 9.25 个等位基因数, 每个点位检测得到的有效等位基因数平均为 2.745 6, 其中 GCCM-016 最多(4.742 5), GCCM-110 最少(1.276 0); Shannon 信息指数变化范围是 0.513 3–2.239 9, 均值是 1.209 0; Nei's 基因多样性指数范围是 0.216 3–0.789 1, 均值是 0.578 0; 观

测杂合度的范围是 0.223 3–0.895 2, 均值是 0.557 5; 期望杂合度的范围是 0.217 4–0.793 3, 均值是 0.580 8; 多态信息含量 PIC 值变化范围是 0.211 5–0.774 0, 均值是 0.532 9, 可以满足对参试材料的遗传多样性分析。

2.4 地被菊种质资源的遗传相似性系数

通过 SSR 标记分析, 105 份地被菊受试材料间的遗传相似性系数(GS)在 0.228 5–1.000 0 之间(图 2), 平均为 0.608 3。其中‘金乳荷’(C044)与‘金路易’(C043)、“yz42”(C105)与‘成双’(C023)、

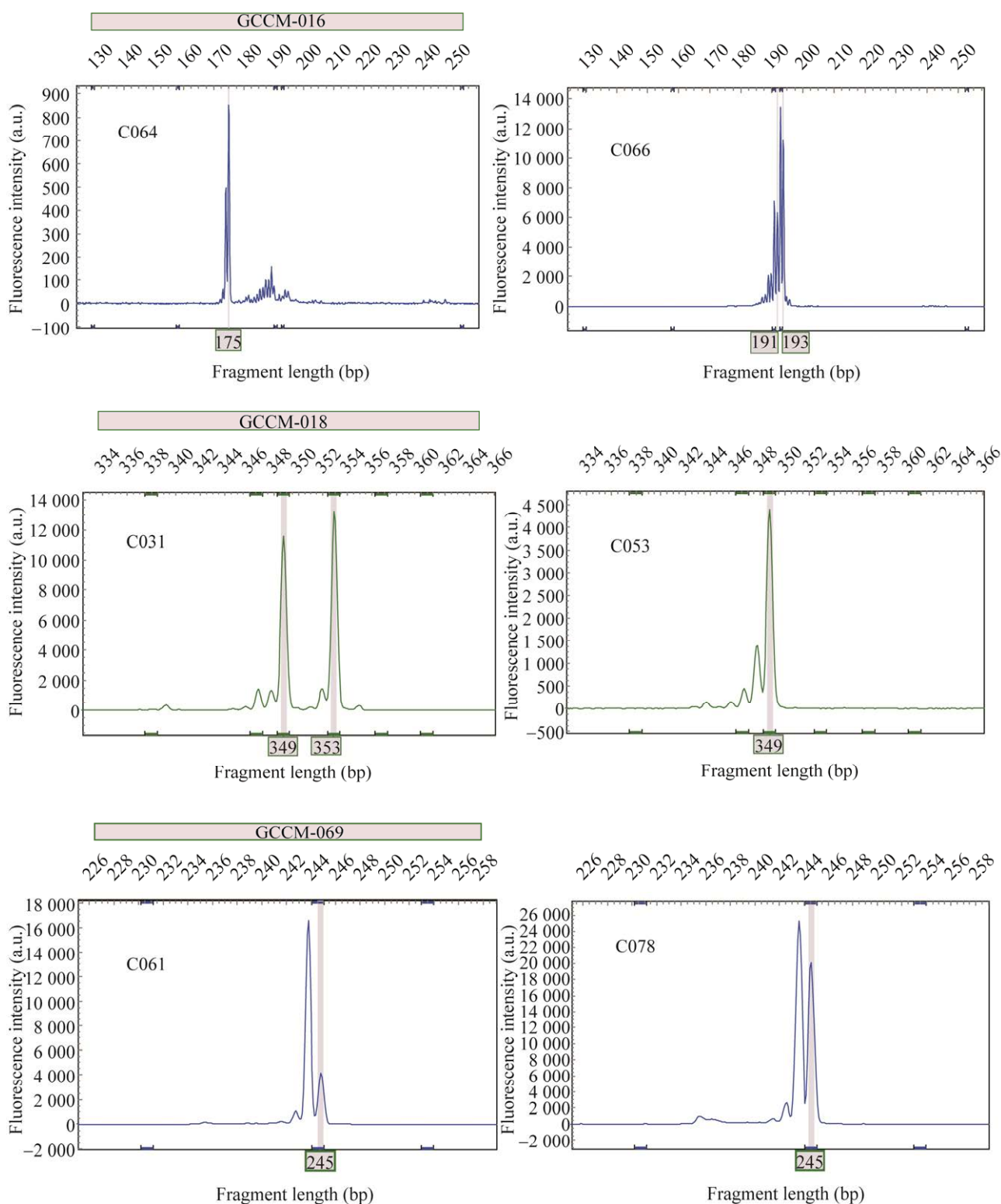


图 1 引物 GCCM-016、GCCM-018、GCCM-069 在不同样品中的扩增结果

Figure 1 Amplification of different samples using primers GCCM-016, GCCM-018, and GCCM-069.

表4 SSR位点多态性信息表

Table 4 Polymorphism at the SSR locus

Primer	Number of alleles (N_a)	Number of effective alleles (N_e)	Shannon's diversity index (I)	Nei's gene diversity index (H)	Observed heterozygosity (H_o)	Expected heterozygosity (H_e)	Polymorphism information content (PIC)
GCCM-016	26.000 0	4.742 5	2.239 9	0.789 1	0.663 2	0.793 3	0.774 0
GCCM-018	7.000 0	3.886 5	1.524 6	0.742 7	0.451 9	0.746 3	0.704 4
GCCM-045	4.000 0	2.285 0	0.970 7	0.562 4	0.798 1	0.565 1	0.501 0
GCCM-059	11.000 0	3.701 4	1.580 4	0.729 8	0.415 8	0.733 5	0.686 8
GCCM-067	4.000 0	2.467 8	1.037 3	0.594 8	0.895 2	0.597 6	0.529 8
GCCM-069	5.000 0	2.015 0	0.830 9	0.503 7	0.761 9	0.506 1	0.410 9
GCCM-095	7.000 0	3.011 5	1.309 0	0.667 9	0.609 5	0.671 1	0.619 8
GCCM-100	18.000 0	3.554 4	1.754 2	0.718 7	0.451 9	0.722 1	0.690 7
GCCM-104	2.000 0	1.495 3	0.513 3	0.331 2	0.419 0	0.332 8	0.276 4
GCCM-105	5.000 0	2.692 6	1.098 3	0.628 6	0.759 6	0.631 6	0.555 4
GCCM-110	7.000 0	1.276 0	0.543 7	0.216 3	0.223 3	0.217 4	0.211 5
GCCM-113	15.000 0	1.819 8	1.105 9	0.450 5	0.240 4	0.452 7	0.433 8
\bar{x}	9.250 0	2.745 6 \pm 1.058 9	1.209 0 \pm 0.503 3	0.578 0 \pm 0.175 6	0.557 5 \pm 0.222 0	0.580 8 \pm 0.176 5	0.532 9 \pm 0.175 6

‘BL5332’(C012)与‘WL5’(C016)之间的遗传遗传相似性系数为 1, 即品种间的差异位点数为 0, 判定为疑同品种。‘国庆梅红’(C030)与‘圆冠紫’(C073)‘BL10312’(C110)与‘红金早’(C036)之间的遗传相似性系数大于 0.95, ‘重阳红’(C084)与‘鲜红’(C060)‘yz42’(C105)与‘金银菊’(C045)之间的遗传相似系数大于 0.9, 判定为相似品种。需结合田间表型调查结果对疑同品种和相近品种进行进一步鉴定, 从而确定是否为同一种质。‘ST10’(C071)与菊花脑(C096)之间的遗传相似性系数最小为 0.228 5, 说明这两个品种间的遗传背景相差较大, 亲缘关系较远。

2.5 地被菊种质资源的聚类分析

基于 Nei's 遗传距离, 利用 UPGMA 方法对 105 份进行聚类分析, 其结果(图 3)表明, 利用 SSR 标记可以将 105 份地被菊和菊属近缘种

材料相互区分开, 在 $GD=0.30$ 时可将材料分为 2 个大类群(I、II、III、IV、V、VI属于第一类群, VII属于第二类群), 在 $GD=0.27$ 时可将第一大类群细分为 6 个小类(I、II、III、IV、V、VI), 按此可将 105 份地被菊和菊属近缘种材料分为 7 个类群。类群 I 包含了 75 个受试材料, 占全部受试材料的 71.4%, 是最大的类群, 其中包含了大部分的地被茶菊品种以及亳州野菊(C088)和大怀菊(C090) 2 个菊属近缘种, 其中地被茶菊‘TY51’(C014)‘YY3’(C018)‘早银杯’(C076)‘毛香玉’(C047)和‘早白龙’(C074), 花色均为白色, 重瓣程度高, 有较高的茶用价值; 类群II由 6 个菊属近缘种组成, 其中‘杭白’(C093)和‘杭黄’(C094)是两个传统茶菊品种, 大洋菊(C091)和菊花脑(C096)也可用于做茶; 类群III由 4 个地被菊品种组成; 类群IV中的 8 个地被菊品种之间

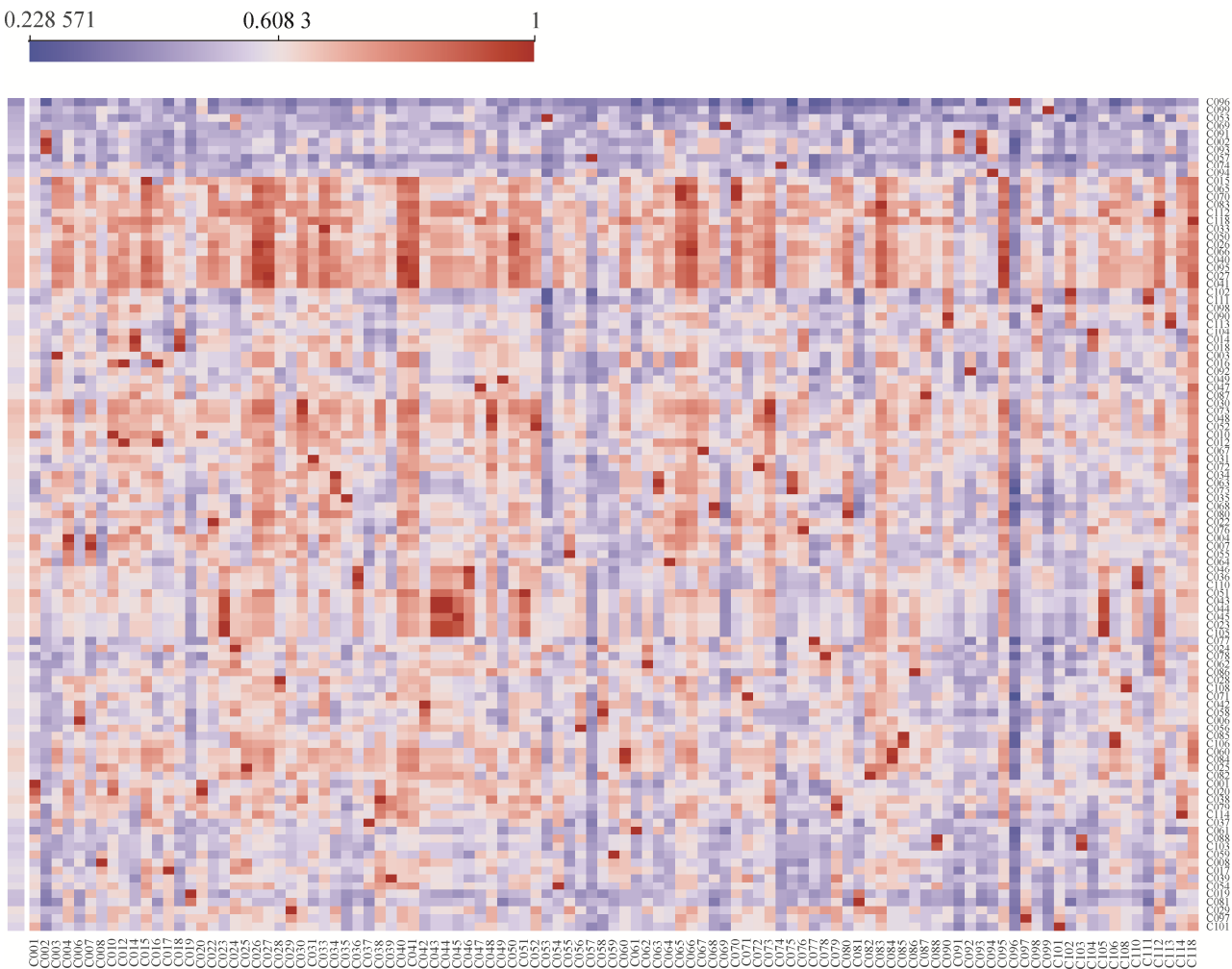


图 2 105 份受试材料的遗传相似系数热图

Figure 2 Heat map of genetic similarity coefficient of 105 tested materials.

遗传相似系数较高，花色均为暖色系，性状表现相似；类群 V 和类群 VI 分别含有 2 个地被菊品种；类群 VII 中含有 6 个菊属近缘种以及 2 个地被菊品种，菊属近缘种包括沁阳的菊属近缘种小怀菊(C102)，引种来的野菊品种神农香菊(C097)、天柱山野菊(C101)和宜昌野菊(C103)，两个菊属品种‘食白’(C098)和‘食大粉’(C099)。将结果进行 cophenetic 相关性分析以验证聚类结果的可靠性，检验结果表明聚类图与遗传距离相关($r=0.952\ 73$)，可知聚类结果可靠。

2.6 地被菊种质资源的种群结构

使用 Structure2.3.3 软件将 SSR 数据进行分析，

结果显示当 $K=3$ 时， ΔK 值最大(图 4)，以此确定 K 值为 3，将 105 个参试品种种质划分为 3 个种群(图 5)，计作 Q1、Q2、Q3。将 105 个参试品种的所属种群概率分布 Q 值进行统计(表 5)。通过 Q 值统计可见，在 105 个样品中有 95 个样品的 $Q\geq 0.5$ ，占比为 90.47%，说明大部分种质遗传背景单一。结合 Q 值统计和种群结构图可知，红色区域表示的 Q1 种群包括 34 份种质，绿色区域 Q2 种群包括 33 份种质，蓝色区域 Q3 种群包括 28 份种质，剩余 10 份种质 $Q<0.5$ ，占比为 9.52%，因种群信息较为复杂，无法明确划分种群，归为混合种群 Q4。

除‘矾菊’(C095)和‘天柱山野菊’(C101)归属在 Q4 内, 14 个菊属近缘种种质中的 12 个均归属于 Q3 种群; 其中地被茶菊品种‘TY51’(C014)和‘YY3’(C018)归属在 Q2 种群。

2.7 核心引物的选择和片段对应编码的确定

根据表 5 中的多态信息含量 PIC 值进行从大到小的排序, 经过组合后, 发现选取 12 对

引物中的 PIC 值排序中的前 9 对引物即可将 105 个种质完全区分, 最后选定的 9 对引物排序结果是: GCCM-016、GCCM-018、GCCM-110、GCCM-059、GCCM-095、GCCM-105、GCCM-067、GCCM-045 和 GCCM-113。

各引物扩增所得的各片段对应的编码见表 6。

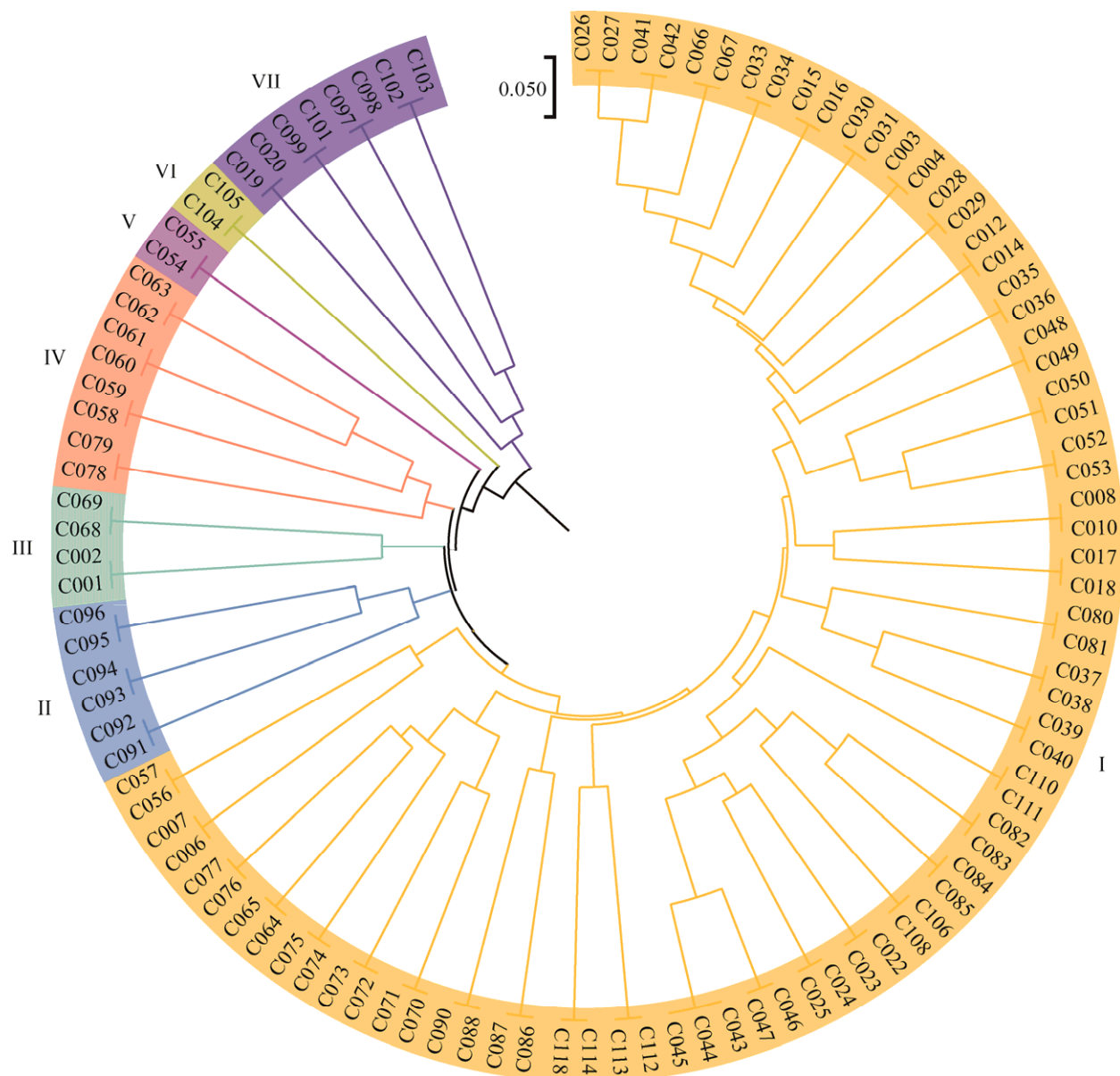


图 3 105 份受试材料的聚类分析图

Figure 3 Cluster dendrogram of 105 tested materials.

(待续 5)

No.	Probability distribution			Population	Group	No.	Probability distribution			Population	Group
	Q1	Q2	Q3				Q1	Q2	Q3		
C068	0.783	0.107	0.110	Q1	A3	C054	0.124	0.221	0.655	Q3	A5
C070	0.700	0.194	0.106	Q1	A1	C056	0.223	0.236	0.541	Q3	A1
C071	0.553	0.156	0.290	Q1	A1	C057	0.051	0.035	0.914	Q3	A1
C073	0.713	0.222	0.065	Q1	A1	C059	0.120	0.097	0.783	Q3	A4
C075	0.891	0.049	0.060	Q1	A1	C064	0.203	0.160	0.636	Q3	A1
C076	0.713	0.063	0.224	Q1	A1	C069	0.089	0.109	0.803	Q3	A3
C080	0.875	0.079	0.046	Q1	A1	C074	0.270	0.043	0.687	Q3	A1
C083	0.523	0.429	0.048	Q1	A1	C088	0.065	0.088	0.846	Q3	A1
C084	0.729	0.106	0.165	Q1	A1	C090	0.291	0.044	0.665	Q3	A1
C085	0.531	0.401	0.069	Q1	A1	C091	0.092	0.059	0.849	Q3	A2
C087	0.803	0.044	0.153	Q1	A1	C092	0.100	0.173	0.727	Q3	A2
C104	0.605	0.091	0.303	Q1	A6	C093	0.155	0.116	0.728	Q3	A2
C106	0.536	0.394	0.070	Q1	A1	C094	0.085	0.051	0.864	Q3	A2
C118	0.848	0.076	0.075	Q1	A1	C096	0.067	0.059	0.874	Q3	A2
C004	0.393	0.519	0.088	Q2	A1	C097	0.162	0.262	0.577	Q3	A7
C007	0.396	0.514	0.090	Q2	A1	C098	0.084	0.144	0.772	Q3	A7
C008	0.103	0.624	0.273	Q2	A1	C099	0.048	0.270	0.682	Q3	A7
C015	0.259	0.676	0.065	Q2	A1	C102	0.355	0.055	0.590	Q3	A7
C017	0.223	0.634	0.143	Q2	A1	C103	0.118	0.123	0.760	Q3	A7
C019	0.111	0.742	0.146	Q2	A7	C108	0.107	0.225	0.668	Q3	A1
C023	0.059	0.901	0.040	Q2	A1	C111	0.318	0.037	0.645	Q3	A1
C024	0.057	0.886	0.057	Q2	A1	C113	0.145	0.052	0.803	Q3	A1
C025	0.187	0.621	0.192	Q2	A1	C020	0.225	0.417	0.357	Q4	A7
C029	0.294	0.660	0.046	Q2	A1	C028	0.394	0.242	0.364	Q4	A1
C036	0.064	0.704	0.232	Q2	A1	C047	0.437	0.071	0.492	Q4	A1
C038	0.205	0.656	0.139	Q2	A1	C052	0.389	0.494	0.117	Q4	A1
C040	0.270	0.680	0.050	Q2	A1	C061	0.241	0.493	0.266	Q4	A4
C042	0.088	0.589	0.323	Q2	A1	C062	0.182	0.376	0.443	Q4	A4
C043	0.083	0.856	0.061	Q2	A1	C067	0.326	0.204	0.470	Q4	A1
C044	0.082	0.859	0.060	Q2	A1	C072	0.166	0.385	0.449	Q4	A1
C045	0.067	0.802	0.131	Q2	A1	C095	0.486	0.464	0.050	Q4	A2
C046	0.088	0.824	0.088	Q2	A1	C101	0.257	0.257	0.486	Q4	A7

表 6 各引物扩增所得各片段对应编码
Table 6 The code of fragments of primers

Primer name	Code	Size (bp)	Primer name	Code	Size (bp)	Primer name	Code	Size (bp)
GCCM-016	A	129		E	327		D	212
	B	135		F	329	GCCM-045	A	188
	C	139		G	331		B	198
	D	147		H	335		C	208
	E	149		I	341		D	214
	F	157		J	345		E	230
	G	159		K	347		F	232
	H	161		L	349		G	234
	I	163		M	353		H	236
	J	165		N	355		I	238
	K	167		O	357		J	240
	L	169	GCCM-110	A	164		K	242
	M	171		B	167		L	244
	N	175	GCCM-059	A	220		M	246
	O	177		B	226		N	250
	P	179	GCCM-095	A	203		O	256
	Q	183		B	205		P	258
	R	185		C	209		Q	262
	S	189		D	213	GCCM-113	R	264
	T	191		E	215		A	238
	U	193		F	225		B	253
	V	195		G	265		C	257
	W	197	GCCM-105	A	222		D	262
	X	199		B	225		E	265
	Y	203		C	228		F	272
	Z	209		D	231		G	274
				E	237		H	280
GCCM-018	A	315	GCCM-067	A	203		I	283
	B	317		B	206		J	289
	C	323		C	209		K	292
	D	325						

2.8 地被菊种质资源指纹图谱的构建

根据引物排列顺序与扩增条带的片段大小

(0 表示无清晰条带), 构建了各种质的字母指纹图谱(表 7)。

表 7 91 个地被菊与 14 个菊属近缘种种质资源指纹图谱

Table 7 Fingerprints of 105 ground-cover chrysanthemum and chrysanthemum-related varieties

No.	Cultivar	SSR fingerprinting	No.	Cultivar	SSR fingerprinting
C001	'BL1332'	JKKLBBBCDCBCBC0EE	C060	'Xianhong'	UUKKABCDCCBBBDGGDD
C002	'BL1336'	NNKOBBCBCCABBDLLKK	C061	'Xiaochengpian'	UUKKABCCCEBBBFBPBB
C003	'BL1902'	TUFHABCDCCBBBDGIEK	C062	'Xiaohuanghua'	QQAkBBCCEFBBCDKLDG
C004	'BL1903'	TUKKBBBCDEBCBDKLEK	C063	'Xiaoxishi'	TUKKABCCCCBBBDLLKK
C006	'BL1905'	LRKKABCDCEBCBDJJBD	C064	'Xiaoxiangbai'	NNKKBBCBCCBCABLLHK
C007	'BL1907'	TUKKBBBCDEBCBDDLEK	C065	'Xiehuang'	TUKKBBBCDCBCBB0HK
C008	'BL1908'	COAJABCDCEBBBCKKEH	C066	'Xinhong'	TUKKBBBCDCBCBDLLDK
C010	'BL5306'	UUAJABCDCCBCCLLEE	C067	'Xinwanhuang'	EGKKBBBCCBCCBCLLEK
C012	'BL5332'	CUKKABBCDCBCCLLDK	C068	'Xinyu'	QUKKBBBCDCBBBDLLKK
C014	'TY51'	OUKLABBCCFBCBCGLKK	C069	'Xinzi'	0ADBBCDFFBCBCKKDK
C015	'WL4'	TUKKABCDCEBCBCIKKEE	C070	'ST01'	TUKKBBBCDCBCBBIKHK
C016	'WL5'	TUAKABCDCCBDBCGLIEK	C071	'ST10'	UUKKBBBCDCCBCBBLDD
C017	'WL7'	GUKKBBCCCEBBBDIKKEE	C072	'ST08'	OUKKBBACBCBCBCLLI
C018	'YY3'	TUKLABBCCFBCBCGLDK	C073	'Yuanguanzi'	UUKKBBBCCDBBBDLLEK
C019	'Aizijin'	OUKKBBBCCECEBCIKBE	C074	'Zaobailong'	DDCJBBCCFBCBCGGKK
C020	'Beilincheng'	UUKLABBDCBCBCKKEE	C075	'Zaoxishi'	TUKKBBCCCCBBBDLLKK
C022	'Beilinsi'	TUKKBBBCDFFBCBBLHH	C076	'Zaoyinbei'	TUKLBBBCFBCBDGLFK
C023	'Chengshuang'	WWKKBBBCDEEBCBCGLEE	C077	'Zhongqiubai'	TUKKBBBCDEFBBBCLLD
C024	'Chenghongziye'	0KKBBCCCEBCBCKK0	C078	'Zhongqiuchaixia'	OOKKBBCCCEBCBDKLD
C025	'Chenghuangjin'	UYKKABCDCEBBBCLLEE	C079	'Zhongqiucheng'	OUAKBBCCDCCBCKKDI
C026	'Chenghuangpian'	TUKKBBBCDEBCBCLLKK	C080	'Zhongqiu hong'	TUKKABCDCCBCBDLLKK
C027	'Danhanfen'	UUKKABCDCCBCBCLLKK	C081	'Zhongqiu huang'	UUKKBBBCECEBCDKKEE
C028	'Danqiushui'	TUKKABCDCEBCBCKKHK	C082	'Zhongqiu zi'	UVKKBBBCDEEBCBCLLDE
C029	'Fanbailu'	TUKKBBBCDEEBCBDLLDE	C083	'Chongbanzaohuang'	TUKKBBBCDEBCBCLLEK
C030	'Guoqingmeihong'	SUKKBBBCCDBBBDLLEK	C084	'Chongyanghong'	RUKKABCDCCBBBDGGDD
C031	'Guoqingzijin'	OULMABCCCCBCBCLLDJ	C085	'Zijin zao'	CTKKABCCCEBBBDJJKK
C033	'Hanhuang'	UUKKBBBCDCBCBCKLKK	C086	'Ziye NO.1'	OOKLBBCCCEBBBCLLBE
C034	'Hanluhong'	TUKKABCCCCBBBDLLEK	C087	'ZUixiuqiu'	UXKLABBCCFBCBDGLKK
C035	'Hongchun'	UUIIABCDCCFBEBCLLKK	C088	<i>C. indicum</i> cv. Bozhou	0KKBBCCCCBCBCNOAA
C036	'Hongjin zao'	ZZKKABBCCEBCBCJLEE	C090	<i>C. morifolium</i> cv. Dahuaiju	TUOBBBCCCCBCBDLOKK
C037	'Hongjindan'	FFKKABCDCCBBBCPPDE	C091	<i>C. morifolium</i> 'Dayangju'	NN0ABBCBCBBABLLDD
C038	'Hongyu'	0KKBBBCDCBBBDKKDE	C092	<i>C. indicum</i> cv. Guangzhou	PROBBBCCDCCBCKLEE
C039	'Huangjinrong'	0KKBBBCDCBBBKKDE	C093	<i>C. morifolium</i> cv. Hangbaiju	0KOBBCCCABBDLLDD
C040	'Jinbuhuan'	TUKKABCDCEBCBCLLEE	C094	<i>C. morifolium</i> cv. Hanghuangju	0KKABBBCCABBCQR0
C041	'Jindinghongxin'	UUKKABCDCCBCBCLLEK	C095	<i>A. pacifica</i>	TUKKABCDCEBCBCLLEK
C042	'Jinlinglong'	OOKKBBBCDEBCBCKKDI	C096	<i>C. indicum</i>	MMLLABBCDFBCBDKLEE
C043	'Jinluyi'	CWKKBBBCDEBCBCGLEE	C097	<i>C. indicum</i> var. <i>aromaticum</i>	TUKKBBBACBCBBHHEE
C044	'Jinruhe'	CWKKBBBCDEBCBDGLEE	C098	<i>C. morifolium</i> cv. Shibai	OUOOABBCCFBCBCJK0
C045	'Jinyinju'	FGKKBBBCDEEBCBCGLEE	C099	<i>C. morifolium</i> cv. Shidafen	CYLNABBBCCBCKKEE
C046	'Liu jinsuiyue'	0KKABBCEEBCBDJLEE	C101	<i>C. indicum</i> cv. Tianzhushan	UUKLBBCCCCBCBBJMEF

(待续)

(续表 7)

No.	Cultivar	SSR fingerprinting	No.	Cultivar	SSR fingerprinting
C047	‘Maoxiangyu’	KLKLABCCCCBCBCGKKK	C102	<i>C. morifolium</i> cv. Xiaohuaiju	TUOOAB0CDBCBDIK0
C048	‘Meihong’	OUKKBBCDCCBBBDLLEE	C103	<i>C. indicum</i> cv. Yichang	UUKKBBCCCBCBCNOGG
C049	‘Meiaifen’	OULLBBCCDBBBCGLKK	C104	‘yz08’	WXKLABBCFFBCBBGLKK
C050	‘Qihong’	LLKKBBCDCDBCCLLDK	C105	‘yz42’	VWKKBBBCDEEBCBCGLEE
C051	‘Qianjinkui’	WWKKBBCDDEBCBCFLEE	C106	‘BL1105’	TUKKABCCCEBBBDJJKK
C052	‘Qiushui’	OUKKBBBCCCBBDJLDE	C108	‘BL10212’	TUKKABCDCEBCBCEKFF
C053	‘Ruhe’	BLLBBCEDEFBCBKKEE	C110	‘BL10312’	RSKKABBCCEBCBCJLEE
C054	‘Sajinhong’	HIKKABCDDBCBCOOEE	C111	‘BL10313’	TUOOABBCDDBCBDLOKK
C055	‘Saixishi’	TUKKBBBCEEBCBACEK	C112	‘BL11011’	UUKKBBCDCEBCBCLLEE
C056	‘Sancengjintai’	AAKKABCCCEBCCLLDE	C113	‘BL11012’	TUOOBBBCCCBBCDLODD
C057	‘Taikongai’	HHAKBBBCGGABABKQHK	C114	‘BL11013’	TUBGBBCDCDBCBCJKEE
C058	‘Xishi’	OKKBBCDEEBCBCFKDK	C118	‘BL11019’	UUBEABCCCCBCBCLLKK
C059	‘Xianguangwandao’	0LLBBCCCCBBBCBKCD			

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性是植物在环境适应力研究中的一项重要指标，遗传多样性差的物种会导致其在自然界中的衰退。传统分类学按植物的表型性状分类，但观察到的表型性状在不同环境中误差较大，传统方法的分析很难准确还原遗传多样性。分子标记技术的使用能够从根源上避免错误，使结果更加精确。

本次试验的地被菊是多年来培育和从各地引种至北京林业大学梅菊圃，因此具有丰富的种类和广泛的来源地。筛选出的 12 对引物能够在 105 份地被菊和菊属近缘种种质资源中表现出多态性，平均每个点位检测到 9.25 个等位基因数，而有效等位基因数平均为 2.745 6，两者相差较大。有效等位基因数是反映群体遗传变异大小的一个重要指标，其数值越接近所检测到的等位基因绝对数，表明等位基因在群体中分布越均匀，若两者差异大说明等位基因在群体中分布不均匀^[37]，因此也表明所检测到位点的等位基因在 105 份地被菊和菊属近缘种种质

资源中分布不均匀。Shannon 信息指数(I')、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Nei's 基因多样性指数(H)都是用来衡量供试材料群体遗传多样性的有效指标^[38]，这些指标均值较高，说明该群体有较高的遗传多样性，引物有较好的鉴别能力。供试材料的遗传相似系数平均为 0.608 3，说明地被菊和菊属其他植物材料之间的遗传相似系数较高，遗传多样性较丰富，这主要是因为地被菊多为实生选种得出的新品种，所选择的亲本多为各地观赏性状表现良好的地被菊品种或其他菊属近缘种，亲本来源的丰富提高了地被菊种质资源的遗传多样性。‘金乳荷’(C044)与金路易’(C043)等品种之间的遗传相似性系数为 1，需结合田间观测判断是否为同物异名，由此可见，SSR 标记适用于地被菊品种鉴定和遗传多样性的研究中。多态信息含量 PIC 是用来衡量位点多态性程度的信息^[39]，当多态信息含量值大于 0.5 时，表明该标记具有高度丰富的多态信息；当多态信息含量值介于 0.25 到 0.50 时，说明该标记可以合理提供多态信息；当多态信息含量值小于 0.25 时，说明该标记具有较低反映多态信息的能力^[40]。

本次试验 PIC 值均大于 0.25, 均值是 0.532 9, 可知 12 对引物的 PIC 值较高, 可以满足对参试材料的遗传多样性分析。

3.2 聚类分析与种群结构分析

地被菊是菊花一类品种群, 菊花是菊属部分野生种天然杂交再经人工选育形成的, 由于长期的人工栽培和定向选择, 菊花的变异和进化速度大大高于自然群体^[41]。聚类结果显示不同类群间遗传距离较大, 类群内部遗传距离较小, 茶菊类‘TY51’ (C014)、‘YY3’ (C018)、‘早银杯’ (C076)、‘毛香玉’ (C047) 和‘早白龙’ (C074) 均聚集在一个分支中, 与菊属近缘种有所区别, 例如广州野菊 (C092)、神农香菊 (C097)、天柱山野菊 (C101)、宜昌野菊 (C103)、菊花脑 (C096)、食大粉 (C099)、大洋菊 (C091)、杭黄 (C094)、杭白 (C093) 等受试材料, 在各分支中, 均有较大的遗传距离。梅菊圃中的地被菊大部分为实生选种得出的新品种, 因此无法确定某品种的亲本来源, 在进行聚类分析之后, 得出的分析结果可为亲本来源作重要参考。

群体结构分析的原理是将群体先设定为 K 个种群, 根据哈特-温伯格平衡将各个个体归到每个种群, 计算第 i 个个体的变异源自第 K 个种群的可能性 Q ^[42], Q 值越大, 表示该个体属于该种群的可能性越大。本试验中将 $Q > 0.5$ 作为划分依据, 将群体划分为 3 个种群和 1 个混合种群。得到的群体遗传结构图中的每 1 条竖条代表 1 个样本, 这个个体所属的种群及其血统可以通过每 1 条竖条的颜色比例看出; 有的竖条颜色单一, 表示其血统纯正; 有的竖条有 2–3 种颜色, 表示其很大程度上是由亲本杂交的不同种群所得。竖条中颜色的比例, 也就是亲本血统的比例。本次试验的基因结构图中没有完全血统纯正的样本, 所有样本都是杂交得到的, 说明在培育地被菊的过程中, 基因交流

非常频繁。

本研究通过 UPGMA 聚类分析和群体结构分析将受试材料进行划分, 两者在分类的结果上存在差异, 聚类分析在 $GD=0.30$ 时将材料划分了 2 个大类, 群体结构分析根据 K 值和 Q 值划分为 3 个种群和 1 个混合种群。产生这种差异的原因可能是两种方法的分类依据不同, UPGMA 聚类分析依据遗传距离 (GD), 反映的是受试材料间亲缘关系的远近, 而群体结构分析服从哈特-温伯格平衡, 是建立在数学模型的基础上来计算受试材料的 Q 值。因此, Structure 软件的遗传结构分析的结果避免了人为因素对群体划分的影响, 具有较高的准确性^[43]。两种方法都能较好地地区分地被菊品种与菊属近缘种之间的关系, 但也有部分品种与菊属近缘种混在同一类群或种群中, 以此判断这些品种与菊属近缘种之间的遗传关系更为密切, 并可在之后的品种亲本鉴定中参考分类结果。

3.3 指纹图谱的构建

依据传统表型性状进行品种鉴定往往会受到环境因子等综合因素的影响, 而 DNA 指纹图谱能在 DNA 水平上直接揭示观赏植物品种间的遗传差异特征, 其精确性、多态性、稳定性均较表型性状品种鉴定高, 且不受环境及自身生长状态的影响, 能为品种的完善和保护提供直接有效的理论依据。在菊属植物的研究中, 韩洁等^[44]采用 AFLP-银染技术, 为 45 个菊花栽培品种建立了指纹图谱; 缪恒斌等^[45]使用 ISSR 分子标记技术构建小菊的指纹图谱。SSR 相比 AFLP 和 ISSR 分子标记技术, 更快速稳定, 相比于数字指纹图谱中以“0-1”的表示方法, 字母指纹图谱数据量更小且易辨认, 更加直观。

引物的多样性指数高、特异性强对于构建指纹图谱具有巨大的优势^[46]。因此在构建指纹图谱时, 需要选择 PIC 值高的引物进行指纹图

谱编码,达到尽少的引物区别尽多的种质的目标。构建指纹图谱的 9 对引物的 PIC 值均值是 0.610 6,大于 0.5,符合高度多态性位点的要求,可将 9 对引物作为核心引物对供试群体进行品种鉴定。这些引物在今后的试验中直接用于试验,可节省试验经费和时间,而开发更多的核心引物,可进一步构建更为简单稳定的地被菊品种 DNA 指纹图谱。

4 结论

本研究利用 12 对引物对 105 个地被菊品种和菊属近缘种进行了遗传多样性分析,结果表明,这些材料之间具有显著的遗传差异和丰富的遗传多样性,在园林应用、品种选育等方面具有重要意义;利用 9 对引物构建了 105 份地被菊品种和菊属近缘种的指纹图谱库,为今后地被菊品种鉴定与筛选体系的研究提供了技术支撑。

REFERENCES

- [1] 陈俊愉,崔娇鹏. 地被菊培育与造景[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 1-5.
CHEN JY, CUI JP. Ground *Chrysanthemum* Cultivation and Landscaping[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2006: 1-5 (in Chinese).
- [2] 陈俊愉. 菊花起源: 汉英双语[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2012: 68-75.
CHEN JY. The Origin of Garden *Chrysanthemum*[M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 2012: 68-75 (in Chinese).
- [3] 王彭伟, 陈俊愉. 地被菊新品种选育研究[J]. 园艺学报, 1990, 17(3): 223-228.
WANG PW, CHEN JY. Studies on breeding ground-cover *Chrysanthemum* new cultivars[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1990, 17(3): 223-228 (in Chinese).
- [4] 陈发棣, 房伟民, 赵宏波, 管志勇, 许高娟. 菊花新品种: 地被菊系列[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1167, 1181.
CHEN FD, FANG WM, ZHAO HB, GUAN ZY, XU GJ. New varieties of *Chrysanthemum*—ground cover varieties[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(6): 1167, 1181 (in Chinese).
- [5] 付少平. 地被菊的栽培管理及园林应用[J]. 中国园艺文摘, 2012, 28(2): 136-137.
FU SP. Cultivation, management and landscape application of ground cover *Chrysanthemum*[J]. Chinese Horticulture Abstracts, 2012, 28(2): 136-137 (in Chinese).
- [6] 李哲, 姚弘, 陈婷. 地被菊繁殖与栽培养护相关技术综述[J]. 现代园艺, 2017, 7(13): 76-77.
LI Z, YAO H, CHEN T. Summary of related techniques of ground cover *Chrysanthemum* propagation, cultivation and maintenance[J]. Xiandai Horticulture, 2017, 7(13): 76-77 (in Chinese).
- [7] 崔娇鹏. 地被菊抗旱节水性初步研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
CUI JP. Preliminary studies on drought resistance of the ground-cover *Chrysanthemums*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2005 (in Chinese).
- [8] 李正男, 鞠明岫, 马强, 张磊, 孙平平, 相宁. 菊花绿变病植原体在中国的发生及分子鉴定[J]. 植物检疫, 2020, 34(3): 37-42.
LI ZN, JU MX, MA Q, ZHANG L, SUN PP, XIANG N. The occurrence and molecular identification of *Chrysanthemum virescence* phytoplasma in China[J]. Plant Quarantine, 2020, 34(3): 37-42 (in Chinese).
- [9] 吴国盛. 部分菊属与亚菊属植物亲缘关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
WU GS. Studies on phylogenetic relationships between several taxa of *Dendranthema* and *Ajanina*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [10] KUMAR S, KUMAR M, YADAV HK, SHARMA S, KUMAR S. Genetic diversity and population structure analysis of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) germplasm based on RAPD markers[J]. Journal of Environmental Biology, 2017, 38(3): 457-464.
- [11] KAUL A, KUMAR S, GHANI M. *In vitro* mutagenesis and detection of variability among radiomutants of *Chrysanthemum* using RAPD[J]. Advances in Horticultural Science, 2011, 25(2): 106-111.
- [12] 田赞, 雒新艳, 戴思兰. 菊花芽变和相似品种的 RAPD 分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(6): 1223-1232.
TIAN Y, LUO XY, DAI SL. RAPD analysis of sporting and similar cultivars in *Chrysanthemum*[J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(6): 1223-1232 (in Chinese).
- [13] 李沛瞳, 迟天华, 刘颖鑫, 范宏虹, 王海滨, 管志勇, 房伟民, 陈发棣, 张飞. 异色菊×菊花脑种间杂交 F₁

- 代 SSR 遗传多态性分析、耐旱性鉴定及关联分析[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(2): 238-246.
- LI PT, CHI TH, LIU YX, FAN HH, WANG HB, GUAN ZY, FANG WM, CHEN FD, ZHANG F. Genetic polymorphism analysis, evaluation of drought tolerance and association analysis using SSR markers in the interspecific *Chrysanthemum dichrum* × *C. nankingense* F1 hybrids[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(2): 238-246 (in Chinese).
- [14] MEKAPOGU M, KWON OK, HYUN DY, LEE KJ, AHN MS, PARK JT, JUNG JA. Identification of standard type cultivars in *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum*) using SSR markers[J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2020, 61(1): 153-161.
- [15] LUO C, CHEN DL, CHENG X, LIU H, LI YH, HUANG CL. Application of simple sequence repeat (SSR) markers to the genetic diversity of a *Chrysanthemum* germplasm collection[J]. Acta Horticulturae, 2019(1263): 61-72.
- [16] NASRI F, ZAKIZADEH H, VAFAEE Y, MOZAFARI AA. *In vitro* mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2022, 149(3): 657-673.
- [17] 程华, 李琳玲, 张心玲, 方佳, 郑永生, 姜德志, 程水源. 应用 ISSR-PCR 对 10 个菊花品种进行遗传多样性分析[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(20): 4292-4297.
- CHENG H, LI LL, ZHANG XL, FANG J, ZHENG YS, JIANG DZ, CHENG SY. Genetic diversity analysis of ten *Chrysanthemum morifolium* cultivars using ISSR-PCR[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(20): 4292-4297 (in Chinese).
- [18] NGUYEN TK, HA STT, LIM JH. Analysis of *Chrysanthemum* genetic diversity by genotyping-by-sequencing[J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2020, 61(5): 903-913.
- [19] 邵清松, 郭巧生, 张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1971-1975.
- SHAO QS, GUO QS, ZHANG ZY. ISSR analysis for genetic diversity of *Chrysanthemum morifolium*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2009, 40(12): 1971-1975 (in Chinese).
- [20] 张鲜艳. 菊属及其近缘属植物遗传多样性及亲缘关系初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- ZHANG XY. Studies on genetic diversity and phylogenetic relationship of *Dendranthema* and its related genera[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [21] 徐悦, 黄兰, 李金花, 邓煜, 张建国, 曾艳飞. 基于表型和 SSR 标记的陇南油橄榄品种鉴定与遗传多样性分析[J]. 林业科学研究, 2022, 35(4): 33-43.
- XU Y, HUANG L, LI JH, DENG Y, ZHANG JG, ZENG YF. Identification and genetic diversity analysis of olive cultivars in Longnan based on phenotype and SSR markers[J]. Forest Research, 2022, 35(4): 33-43 (in Chinese).
- [22] 关利平, 王玲玲, 曹珂, 王力荣. 桃品种鉴定的 SSR 核心引物筛选及其应用[J]. 中国果树, 2021(6): 33-38.
- GUAN LP, WANG LL, CAO K, WANG LR. Screening of SSR core primers for variety identification of peach and its application[J]. China Fruits, 2021(6): 33-38 (in Chinese).
- [23] 罗芊芊, 赵明水, 肖德卿, 金国庆, 庞春梅, 祁祥斌, 周志春. 基于 SSR 标记羊角槭子一代和子二代的遗传多样性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(5): 66-73.
- LUO QQ, ZHAO MS, XIAO DQ, JIN GQ, PANG CM, QI XB, ZHOU ZC. Analysis on genetic diversity of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* based on SSR markers[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2022, 31(5): 66-73 (in Chinese).
- [24] 程林涛, 孙晓阳, 谢福春, 宋航, 蒋佳, 朱慧森, 白小明, 陈雅君. 基于表型性状和 SSR 分子标记的草地早熟禾遗传多样性分析和分子身份证构建[J]. 中国草地学报, 2022, 44(9): 1-10.
- CHENG LT, SUN XY, XIE FC, SONG H, JIANG J, ZHU HS, BAI XM, CHEN YJ. Genetic diversity analysis and molecular ID construction of Kentucky bluegrass based on phenotypic traits and SSR molecular markers[J]. Chinese Journal of Grassland, 2022, 44(9): 1-10 (in Chinese).
- [25] 赵靓, 罗燕杰, 肖思文, 蔡亚南, 何立飞, 逆羽静, 李庆卫. 基于表型和 SSR 标记的梅花种质资源遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(13): 4458-4469.
- ZHAO L, LUO YJ, XIAO SW, CAI YN, HE LF, TI YJ, LI QW. Genetic diversity analysis on *Prunus mume* germplasm resources based on phenotypic traits and SSR markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2019,

- 17(13): 4458-4469 (in Chinese).
- [26] 聂兴华, 刘松, 王碧瑶, 李琰, 练蔓青, 秦岭, 郑瑞杰, 邢宇. 基于 SSR 标记的我国主栽日本栗品种(系)遗传结构分析和指纹图谱构建[J]. 核农学报, 2022, 36(11): 2104-2114.
- NIE XH, LIU S, WANG BY, LI Y, LIAN MQ, QIN L, ZHENG RJ, XING Y. Genetic structure analysis and fingerprinting construction of the main Japanese chestnut cultivars (lines) using SSR markers in China[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(11): 2104-2114 (in Chinese).
- [27] 位明明, 黄肖, 李维国, 黄华孙. 利用 SSR 荧光标记构建 37 个中国橡胶树栽培品种指纹图谱[J]. 热带作物学报, 2022, 43(8): 1565-1576.
- WEI MM, HUANG X, LI WG, HUANG HS. Using the SSR fluorescent labeling to establish SSR fingerprints for 37 cultivars in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(8): 1565-1576 (in Chinese).
- [28] 李亚慧. 菊花微卫星位点引物开发及遗传多样性分析[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2012.
- LI YH. Development of microsatellite loci primers in *Chrysanthemum* and genetic diversity analysis[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [29] 何仁锋, 冯尚国, 陈喆, 沈晓霞, 沈宇峰, 王志安, 王慧中. 药用菊花 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 367-378.
- HE RF, FENG SG, CHEN Z, SHEN XX, SHEN YF, WANG ZA, WANG HZ. Optimization and primer screening of SSR-PCR reaction system in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on orthogonal design[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(2): 367-378 (in Chinese).
- [30] 叶松. 菊花表型性状与 SSR、SCoT 分子标记的关联分析[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2017.
- YE S. Association analysis of phenotypic traits with SSR and SCoT molecular markers in *Dendranthema morifolium* (Ramat.) tzvel.[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2017 (in Chinese).
- [31] 梅洪娟, 马瑞君, 庄东红. 指纹图谱技术及其在植物种质资源中的应用[J]. 广东农业科学, 2014, 41(3): 159-164.
- MEI HJ, MA RJ, ZHUANG DH. Fingerprinting technology and its application in plant germplasm resources[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(3): 159-164 (in Chinese).
- [32] 张轶. 基于三种标记的中国传统菊花品种鉴定及分类研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- ZHANG Y. Studies on the identification and classification of Chinese traditional *Chrysanthemum* cultivars based on three types of markers[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014 (in Chinese).
- [33] 杨洁, 宋江琴, 唐楠, 唐道城. 万寿菊属品种(系)遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 分子植物育种, 2021, 19(10): 3367-3376.
- YANG J, SONG JQ, TANG N, TANG DC. Analysis of genetic diversity and fingerprinting of marigold cultivars (lines)[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(10): 3367-3376 (in Chinese).
- [34] JO KM, JO Y, CHU H, LIAN S, CHO WK. Development of EST-derived SSR markers using next-generation sequencing to reveal the genetic diversity of 50 *Chrysanthemum* cultivars[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2015, 60: 37-45.
- [35] SHIM EJ, HEO EJ, YOON MK, SOH EH, HONG JH. Construction of SSR marker database of *Chrysanthemum* varieties collected in Korea[J]. Korean Journal of Breeding Science, 2015, 47(4): 366-375.
- [36] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 杨爱国, 张忠锋, 任民. SSR 数据格式转换软件 DataFormater[J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 265-270.
- FAN WQ, GE HM, SUN X, YANG AG, ZHANG ZF, REN M. Dataformater, a software for SSR data formatting to develop population genetics analysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(1): 265-270 (in Chinese).
- [37] 王芝懿, 李振芳, 彭婵, 陈英, 张新叶. 基于荧光 SSR 标记的紫薇遗传多样性分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2023, 47(2): 61-69.
- WANG ZY, LI ZF, PENG C, CHEN Y, ZHANG XY. Genetic diversity analysis of *Lagerstroemia indica* based on fluorescent SSR markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2023, 47(2): 61-69 (in Chinese).
- [38] 李鸥, 曹顶臣, 张研, 顾颖, 张晓峰, 鲁翠云, 孙效文. 利用 EST-SSR 分子标记研究鲤的饲料转化率性状[J]. 水产学报, 2009, 33(4): 624-631.
- LI O, CAO DC, ZHANG Y, GU Y, ZHANG XF, LU CY, SUN XW. Studies on feed conversion ratio trait of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using EST-SSR marker[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(4): 624-631 (in Chinese).
- [39] 吕宝忠. 多态信息量(PIC)等于杂合度吗?[J]. 遗传, 1994, 16(4): 31-33.

- LÜ BZ. Does the polymorphism information content equal the heterozygosity?[J]. *Hereditas*, 1994, 16(4): 31-33 (in Chinese).
- [40] 肖志娟, 翟梅枝, 王振元, 许静, 李丽, 杨惠. 微卫星 DNA 在分析核桃遗传多样性上的应用[J]. *中南林业科技大学学报*, 2014, 34(2): 55-61.
- XIAO ZJ, ZHAI MZ, WANG ZY, XU J, LI L, YANG H. Application of microsatellite DNA on analyzing genetic diversity of *Juglans regia*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2014, 34(2): 55-61 (in Chinese).
- [41] 戴思兰, 王文奎, 黄家平. 菊属系统学及菊花起源的研究进展[J]. *北京林业大学学报*, 2002, 24(S1): 234-238.
- DAI SL, WANG WK, HUANG JP. Advances of researches on phylogeny of *Dendranthema* and origin of *Chrysanthemum*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2002, 24(S1): 234-238 (in Chinese).
- [42] PRITCHARD JK, STEPHENS M, ROSENBERG NA, DONNELLY P. Association mapping in structured populations[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2000, 67(1): 170-181.
- [43] 王琰琰, 王俊, 刘国祥, 钟秋, 张华述, 骆铮珍, 陈志华, 戴培刚, 佟英, 李媛, 蒋勋, 张兴伟, 杨爱国. 基于 SSR 标记的雪茄烟种质资源指纹图谱库的构建及遗传多样性分析[J]. *作物学报*, 2021, 47(7): 1259-1274.
- WANG YY, WANG J, LIU GX, ZHONG Q, ZHANG HS, LUO ZZ, CHEN ZH, DAI PG, TONG Y, LI Y, JIANG X, ZHANG XW, YANG AG. Construction of SSR fingerprint database and genetic diversity analysis of cigar germplasm resources[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(7): 1259-1274 (in Chinese).
- [44] 韩洁, 胡楠, 李玉阁, 尚富德. 菊花品种资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *园艺学报*, 2007, 34(4): 1041-1046.
- HAN J, HU N, LI YG, SHANG FD. Genetic diversity of *Chrysanthemum* cultivars revealed by AFLP analysis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(4): 1041-1046 (in Chinese).
- [45] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 房伟民, 石丽敏. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3735-3740.
- MIAO HB, CHEN FD, ZHAO HB, FANG WM, SHI LM. Genetic diversity and construction of fingerprinting of *Chrysanthemum* cultivars by ISSR markers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(11): 3735-3740 (in Chinese).
- [46] 胡春龙. 基于 SSR 标记构建白蜡种质资源分子身份证及其遗传多样性分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2015.
- HU CL. Establishment of molecular ID for *Fraxinus* based on SSR markers and analysis of genetic diversity[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2015 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)