

基于表型和 SRAP 标记的切花菊品种遗传多样性分析

张冬菊^{1,2}, 李世超¹, 吴鹏夫¹, 张晓¹, 李秋香¹, 杨树华¹, 贾瑞冬¹,
葛红^{1,*}

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: 利用 45 个表型性状和 SRAP 标记分析 56 个切花菊品种的遗传多样性。表型变异分析结果表明: 21 个性状表现出品种内一致性高及品种间特异性强; 主成分分析发现, 主成分贡献值较大的性状有花序直径、花序类型和瓣型等花部性状, 其次是叶部和茎秆性状, 说明所选用的切花菊品种在分类时应以花部性状为主, 叶部和茎秆性状为辅; 表型性状基于遗传距离 UPGMA 聚类, 将 56 个切花菊品种分为平瓣类、匙瓣类、桂瓣类、匙瓣—平瓣类和管瓣类, 聚类结果大致按照花径—瓣型—花型分类。14 对 SRAP 引物组合扩增 56 个切花菊品种的 DNA, 共扩增出 454 条带, 其中多态性带 423 条, 占扩增带数的 93.17%, 多态性含量 PIC 值在 0.72 ~ 0.89 之间, 平均为 0.82, 说明切花菊品种在分子水平上具有丰富的遗传多样性。基于 SRAP 标记的 UPGMA 聚类分析显示: 品种间遗传相似系数在 0.64 ~ 0.97 之间, 将 56 个切花菊品种分为平瓣类—匙瓣、桂瓣类和管瓣类, 聚类结果大致按照花径—瓣型—花型分类。Mantel 检验相关性系数为 0.682, 两种聚类结果有相似之处, 均能很好体现试验切花菊品种间的遗传关系。

关键词: 切花菊; 表型性状; SRAP 标记; 品种分类; 遗传多样性

中图分类号: S 682.1⁺¹

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 01-0118-13

Genetic Diversity Analysis in Cut Chrysanthemum Cultivars Based on Morphology and SRAP Markers

ZHANG Dong-ju^{1,2}, LI Shi-chao¹, WU Peng-fu¹, ZHANG Xiao¹, LI Qiu-xiang¹, YANG Shu-hua¹,
JIA Rui-dong¹, and GE Hong^{1,*}

(¹*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;* ²*College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract: Based on phenotypic analysis and SRAP markers, genetic diversity among 56 cultivars of cut chrysanthemum were analyzed. Variation analysis showed that there were 21 characters which presented the high consistency within cultivars and the distinct specificity between cultivars. Principal component analysis showed that flower characters such as inflorescence diameter, inflorescence form and petal type et al contributed mainly to the principal components, while leaf and stem characters as a secondary

收稿日期: 2013-07-30; **修回日期:** 2013-12-20

基金项目: 国家‘863’计划课题 (2011AA100208); 农业部‘948’计划项目 (2012-G17); 公益性 (农业) 行业科研专项 (200903008); 中国农业科学院基本科研业务费项目 (00320212016); 中国农业科学院科技创新工程项目; 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gehong@caas.cn)

contribution. The results indicated that it would be necessary to primarily consider the flower traits, then leaf and stem traits, as the criterion of classification and identification for cut chrysanthemum. Phenotypic UPGMA clustering analysis showed that 56 cut chrysanthemum cultivars were classified into flat type, spatulate type, irregular type, spatulate-flat type and tubiform type groups, which were mainly according to three-grades classification as Inflorescence diameter - Petal type - Inflorescence form. 14 SRAP primer pairs were screened and generated 423 polymorphic bands among 454 bands in total, which the percentage of polymorphic bands reached 93.17%. The values of polymorphism information content (*PIC*) ranged from 0.72 to 0.89 with an average of 0.82. These results indicated there was abundant genetic diversity among cut chrysanthemum cultivars. UPGMA clustering analysis with SRAP markers showed 56 cultivars with the genetic coefficient ranged from 0.64 to 0.97 were divided into spatulate-flat type, irregular type and tubiform type groups, which were also according to three-grades classification as Inflorescence diameter - Petal type - Inflorescence form. Mantel's test with correlation coefficient of 0.682 indicated that the high accordance between phenotypic and molecular markers analysis, suggesting both analysis could well reflect the genetic relationship of cut chrysanthemum cultivars.

Key words: cut chrysanthemum; phenotypic characters; SRAP marker; cultivar classification; genetic diversity

菊花 (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.) 品种数量庞大, 变异丰富, 且表型性状受环境因素的影响较大, 为菊花的品种分类和鉴定带来很大困难。遗传多样性一般指种内的遗传多样性, 种内的多样性是物种以上各水平多样性的最重要来源, 种内的遗传变异程度也决定其进化的潜势 (Solbrig, 1991; 钱迎倩和马克平, 1994)。

近年来 SRAP 标记技术 (Li & Quiros, 2001) 在观赏植物遗传多样性分析、亲缘关系和遗传连锁图谱构建等研究中的应用逐步增多, 目前已在矮牵牛 (叶为, 2007)、红花檵木 (李达, 2008)、牡丹 (王燕青, 2008)、槭树 (胡颖, 2009)、桂花 (李梅 等, 2009)、大花蕙兰 (马红勃 等, 2011)、百合 (孙明伟 等, 2011)、安祖花 (于翠 等, 2012) 等有相关报道。

前人对菊花品种遗传多样性的研究, 主要集中在大菊品种表型性状的变异分析, 以及结合 RAPD、ISSR、AFLP、SRAP 等分子标记的分析上, 研究发现其表型聚类大体上按瓣型分类, 亚类中花型、花径相近的聚在一起, 而且存在平瓣—匙瓣品种聚在一起的现象; 同时分子标记扩增条带多态性百分率在 69% ~ 99.60% 之间, 表明在基因型上也具有丰富的遗传多样性 (秦贺兰 等, 2002; 吴在生 等, 2007; 欧阳彩虹 等, 2010; 李仁伟 等, 2012)。而近几年对切花菊品种的报道较少, 尚未见结合表型性状和 SRAP 分子标记对切花菊品种遗传多样性研究的报道。本研究中应用表型性状和 SRAP 分子标记对 56 个切花菊品种进行遗传多样性分析, 在形态学水平和分子水平上探讨其遗传多样性, 实现对切花菊品种遗传多样性分析和品种分类鉴定, 为育种提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所花卉室菊花种质资源保存中心保存的 56 个切花菊品种 (表 1)。所有材料采用插穗扦插繁殖, 每个品种 50 ~ 100 株, 日常水肥和光照管理。

表 1 供试 56 个切花菊材料
Table 1 The samples of cut chrysanthemum

编号 Code	名称 Name	花型 Inflorescence form	瓣型 Petal type	花色 Flower color	整枝方式 Pruning mode	花序直径/mm Inflorescence diameter
1	HH03	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	120.00 ± 11.04
2	HH07	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	洋红 Magenta	标准菊 Standard	117.00 ± 6.28
3	HH13	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	24.00 ± 1.15
4	HH14	平桂型 Flat anemone type	柱瓣 irregular	白色 White	射散菊 Spray	62.60 ± 7.99
5	HH15	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	23.40 ± 3.44
6	HH21	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	粉色 Pink	射散菊 Spray	55.40 ± 11.92
7	HH22	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	粉色 Pink	射散菊 Spray	27.38 ± 2.17
8	HH23	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	粉色 Pink	射散菊 Spray	19.30 ± 1.09
9	HH29	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	黄色 Yellow	射散菊 Spray	45.42 ± 5.79
10	HH43	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	24.58 ± 1.64
11	HH44	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	26.33 ± 5.15
12	HH45	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	24.02 ± 1.38
13	HH46	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	粉色 Pink	射散菊 Spray	19.18 ± 2.32
14	C015	平桂型 Flat anemone type	柱瓣 irregular	白色 White	射散菊 Spray	51.26 ± 2.24
15	C012	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	洋红 Magenta	射散菊 Spray	24.84 ± 2.06
16	早春白 Zaochunbai	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	86.12 ± 6.69
17	C017	风车型 Windmill type	匙瓣 Spatulate	深红 Red	射散菊 Spray	75.67 ± 6.49
18	C021	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	黄色 Yellow	标准菊 Standard	113.44 ± 24.04
19	C022	风车型 Windmill type	匙瓣 Spatulate	深红 Red	射散菊 Spray	58.89 ± 5.05
20	神马 Jinba	莲座型 Lotus-set type	匙瓣 Spatulate	白色 White	标准菊 Standard	128.13 ± 18.29
21	精典 Jingdian	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	黄色 Yellow	标准菊 Standard	97.80 ± 6.46
22	C027	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	黄色 Yellow	射散菊 Spray	61.27 ± 5.23
23	银风 Yinfeng	莲座型 Lotus-set type	匙瓣 Spatulate	白色 White	标准菊 Standard	104.43 ± 9.13
24	精云 Jingyun	翻卷型 Reflexed type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	94.01 ± 10.10
25	C038	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	绿色 Green	射散菊 Spray	45.42 ± 3.10
26	白东洋 Baidongyang	翻卷型 Reflexed type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	97.07 ± 15.98
27	新农白扇 Xinnong Baishan	叠球型 Globular type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	120.00 ± 7.07
28	赤贝壳 Chibeike	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	洋红 Magenta	射散菊 Spray	60.17 ± 5.58
29	C057	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	黄色 Yellow	标准菊 Standard	110.16 ± 15.56
30	C058	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	黄色 Yellow	标准菊 Standard	112.52 ± 7.75
31	清风 Qingfeng	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	黄色 Yellow	射散菊 Spray	50.05 ± 4.28
32	银岭 Yinling	叠球型 Globular type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	108.78 ± 14.09
33	球白 Qiubai	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	35.76 ± 1.43
34	C075	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	肉桂 Cinnamon	标准菊 Standard	89.07 ± 6.74
35	C076	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	洋红 Magenta	射散菊 Spray	59.46 ± 7.50
36	望之光 Wangzhiguang	平盘型 Flat-pan type	平瓣 Ligulate	双色 bi-color	标准菊 Standard	82.92 ± 7.30
37	精之波 Jingzhibo	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	白色 White	标准菊 Standard	126.67 ± 7.91
38	精山之鹤 Jingshanzhihe	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	121.40 ± 9.32
39	紫色凯旋 Zise Kaixuan	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	紫色 Purple	标准菊 Standard	96.08 ± 11.14
40	安琳谱 Anlinpu	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	粉红 Pink	标准菊 Standard	145.40 ± 10.08
41	白马 Baima	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	白色 White	标准菊 Standard	88.60 ± 5.60

续表1

编号 Code	名称 Name	花型 Inflorescence form	瓣型 Petal type	花色 Flower color	整枝方式 Pruning mode	花序直径/mm Inflorescence diameter
42	精海 Jinghai	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	82.69 ± 4.54
43	日本早白 Riben Zaobai	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	71.41 ± 11.13
44	C095	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	白色 White	射散菊 Spray	57.48 ± 3.90
45	C097	宽带型 Broadband type	平瓣 Ligulate	黄色 Yellow	射散菊 Spray	58.66 ± 7.37
46	C099	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	桃红 Pink	射散菊 Spray	48.28 ± 4.15
47	粉 Fen	平桂型 Flat anemone	柱瓣 irregular	粉红 Pink	射散菊 Spray	62.07 ± 5.06
48	夏 3 Xia 3	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	112.82 ± 10.31
49	神 9 Shen 9	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 White	标准菊 Standard	112.50 ± 11.12
50	谢谢 Xiexie	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	黄色 Yellow	标准菊 Standard	102.90 ± 4.91
51	意思 Yisi	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	白色 Yellow	标准菊 Standard	138.50 ± 10.29
52	特新 Texin	匙球型 Spheric-spoon type	匙瓣 Spatulate	白色 White	标准菊 Standard	131.50 ± 7.50
53	C043	叠球型 Globular type	匙瓣 Spatulate	黄色 Yellow	标准菊 Standard	95.79 ± 12.36
54	富士 Fuji	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 Yellow	标准菊 Standard	117.50 ± 12.30
55	SD	芍药型 Peony type	平瓣 Ligulate	白色 Yellow	标准菊 Standard	98.10 ± 11.82
56	HH27	风车型 Windmill type	管瓣 Tubiform	洋红 Magenta	射散菊 Spray	32.10 ± 2.41

1.2 研究方法

1.2.1 表型性状的测定

参照中华人民共和国农业部（2010）《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南（试行稿）——菊花》，分别于 2011 年和 2012 年的 10—11 月，测定 56 份切花菊品种的 17 个数量性状和 28 个质量性状，每个品种 10~15 个重复，为减少试验误差，同一性状由同一个人测试完成。

1.2.2 基因组 DNA 提取及检测

切花菊嫩叶基因组 DNA 提取参照改良 CTAB 法（Doyle & Doyle, 1990; 郭宁, 2010），1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度，稀释到 $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ， $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增及引物筛选

SRAP-PCR 扩增参照张飞等（2009）和 Shao 等（2010）方法，优化 PCR 扩增体系，反应缓冲液含 $2 \mu\text{L}$ 的 $10\times$ Buffer 缓冲液，终浓度 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Mg^{2+} ， $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTPs，各 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的正反向引物， 1.0 U Taq 酶， 50 ng DNA 模板， ddH_2O 补至 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为： $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ； $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min ， $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 复性 1 min ， $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min ，共 5 个循环； $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min ， $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 复性 1 min ， $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min ，共 35 个循环； $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min ； $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

扩增反应结束后，进行 7% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后进行固定、银染、显影等步骤，并拍照记录。PCR 及银染等试剂均产自 GeneView，购自北京鼎国昌盛生物试剂公司。

1.3 数据统计与分析

表型性状根据 DUS 测试指南中各性状的测试时期、测试部位、测试工具、测试方法及性状编码等要求，每个品种随机选择 10~15 株进行测量，测量记录 45 个表型性状；用 Excel 2003 记录统计，用 SPSS10.0 软件分析切花菊表型性状的变异分析、主成分分析，按照遗传距离进行聚类分析。

根据 PCR 扩增产物的电泳结果，在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带（含弱带）的记为“1”，无 DNA 条带的记为“0”。用 NTsys2.10a 分析软件按照遗传相似系数进行 UPGMA

(Unweighted pair-group method using arithmetic averages) 聚类分析以及一致性检验和 Mantel 检测。遗传多样性分析采用多态性信息量 (Polymorphism Information Content, *PIC*) 指标。按照 Anderson 等 (1993) 的计算方法, 标记 *i* 的 *PIC* 值计算公式为: $PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$, 其中 p_{ij} 表示标记 *i* 第 *j* 种带型出现的频率, 标记 *i* 的带型数从 1 到 *n*。*PIC* 值的范围为 0~1, 0 表示无多态性, 1 表示具有非常高的多态性。

2 结果与分析

2.1 切花菊品种表型性状分析

2.1.1 表型性状的变异分析

由表型性状变异分析 (表 2、表 3) 可知, 切花菊各个表型性状变异范围较大, 说明试验所选的切花菊品种性状间存在丰富的变异。

由表 2 可知, 所选数量性状中品种内变异系数小于 0.15 且品种间变异系数大于 0.30 的性状有: 株高、舌状花轮数、花序直径、舌状花长、舌状花宽、管状花直径等 6 个性状。

表 2 56 个切花菊数量性状变异分析
Table 2 Variation analysis of 56 cut chrysanthemum

性状 Characteristics	最大值 Maximum	最小值 Minimum	标准差 Standard deviation	品种内变异系数 Coefficient of variation within cultivars	品种间变异系数 Coefficient of variation between cultivars
舌状花轮数 Layers of ray florets	22.80	1.00	6.28	0.07	0.73
株高 Plant height	139.60	9.53	24.50	0.09	0.57
叶柄长度 Petiole length	42.50	8.78	7.11	0.11	0.29
叶长 Leaf length including petiole	132.52	49.40	20.17	0.11	0.21
叶宽 Leaf width	87.50	20.90	13.40	0.15	0.26
叶片长宽比 Leaf ratio length/width	2.64	1.27	0.31	0.10	0.25
顶生裂叶长度 Length of terminal lobe	41.36	15.15	6.12	0.18	0.22
最低位裂刻深度 Depth of lowest lateral sinus	26.84	9.49	4.53	0.14	0.27
花序直径 Inflorescence diameter	138.50	19.18	35.10	0.14	0.45
花序高度 Inflorescence height	69.30	7.83	14.53	0.16	0.50
舌状花数量 Ray floret number	780.80	15.20	181.36	0.16	0.88
舌状花管筒长度 Length of corolla tube	49.41	1.95	10.51	0.15	1.09
舌状花长 Ray floret length	115.29	11.19	21.80	0.11	0.52
舌状花宽 Ray floret width	26.80	3.71	4.91	0.10	0.50
舌状花长宽比 Ray floret ratio length/width	8.66	2.30	1.62	0.14	0.27
管状花直径 Diameter of tubiform florets	59.50	4.39	9.71	0.14	0.74
叶边缘锯齿数量 Number of indentations	106.40	16.10	20.60	0.15	0.45

由表 3 可知, 质量性状 (含假质量性状) 中品种间变异系数大于等于 0.35 的主要有: 舌状花类型数量、舌状花主要类型、舌状花龙骨数量、舌状花纵向姿态、舌状花顶端形状、舌状花内外侧颜色比较、花心中部深色区、花蕾形状、花序类型、茎强度、茎的曲直性、植株类型、叶基部形状、叶先端形状、托叶大小等 15 个性状。以上这 21 个性状表现出品种内一致性高且品种间特异性强, 可以用于菊花品种的分类与鉴定。

表 3 56 个切花菊质量性状品种间变异系数
Table 3 Coefficient of variation between cultivars of qualitative characters

性状 Characteristics	品种间变异系数 Coefficient of variation between cultivars	性状 Characteristics	品种间变异系数 Coefficient of variation between cultivars
舌状花纵向姿态 Longitudinal profile of outer ray florets	0.52	舌状花内轮纵向姿态 Longitudinal profile of inner ray florets	0.34
叶柄姿态 Petiole attitude	0.30	托叶大小 Stipule size	0.50
叶基部形状 Predominant shape of leaf base	0.38	舌状花顶端形状 Shape of tip on ray floret	0.36
叶先端形状 Shape of tip on leaf	0.36	花序类型 Inflorescence form	0.64
叶缘锯齿深浅 Depth of indentations	0.26	花心中部深色区 Presence of dark spot at centre	0.81
花托纵切面形状 Profile in cross section on flower disc	0.27	舌状花内侧颜色数量 Number of colors of inner side ray floret	0.26
舌状花类型数量 Number of types of ray florets	0.36	植株类型 Plant type	0.35
舌状花主要类型 Predominant type of ray floret	0.47	茎曲直性 Stem straight degree	0.35
舌状花毛刺有无 Ligule spent burr	0.34	托叶分布 Stipule distribution	0.20
舌状花基部朝向 Attitude of basal ray floret	0.28	花蕾形状 Flowerbud shape	0.46
舌状花最宽处横切面形状 Profile in cross section at widest point	0.31	舌状花内外侧颜色比较 Color of outer side compared to inner side	0.51
舌状花龙骨数量 Keels number of ray floret	0.39	花心类型 Flower disc type	0.30
舌状花上边面质地 Upper surface of ray floret	0.21	茎强度 Stem intensity	0.37
舌状花边缘卷曲 Rolling of ray floret margin	0.23	花色 Flower colour	0.30

2.1.2 表型性状的主成分分析

通过 KMO 和 Bartlett 检验可知, KMO 值为 $0.642 > 0.5$, 偏相关性很弱; Bertlett 球型检验, 拒绝单位相关阵的原假设, $P < 0.001$, 适于做主成分分析。

由主成分分析(表 4)可知, 前 5 个主成分的累计方差贡献率为 75.801%, 说明前 5 个主成分占性状全部信息的 75.801%。各表型性状在主成分分析中的系数绝对值大于 0.5, 则归于该主成分中。

第 1 主成分可概括为花序形态因子, 包括花序直径(0.907)、花序类型(0.837)和舌状花类型数量(0.741)和舌状花主要类型(0.696)。

第 2 主成分可概括为舌状花形态因子, 包括舌状花内外侧颜色比较(0.667)、舌状花顶端形状(-0.636)和舌状花纵向姿态(0.583)。第 3 主成分可概括为叶部形态因子, 包括叶基部形状(-0.748)和叶先端形状(-0.568)。第 4 主成分可概括为茎秆形态因子, 包括茎曲直性(-0.524)和茎强度(0.505)。第五主成分可概括为管状花形态因子, 包括管状花直径(0.697)和花心中部深色区(-0.556)。

这些因子的综合表现主要是切花菊的花部形态, 其中花序直径、花型类型、舌状花类型数量和舌状花主要类型, 是切花菊分类鉴定中最有影响力的花部性状; 其次是叶部和茎秆形态。

表 4 切花菊表型性状的主成分分析
Table 4 Principal component analysis of phenotypic traits for cut chrysanthemum

主成分 Principal component	第1主成分 First principal component	第2主成分 Second principal component	第3主成分 Third principal component	第4主成分 Fourth principal component	第5主成分 Fifth principal component
特征值 Eigenvalues	5.694	2.783	1.753	1.690	1.459
百分率% Percentage	29.115	18.774	10.871	9.571	7.470
累计百分率% Cumulative percentage	29.115	47.889	58.760	68.331	75.801
叶片先端形状 Shape of tip on leaf	0.298	- 0.283	- 0.568	0.262	- 0.039
叶片基部形状 Predominant shape of leaf base	0.196	- 0.183	- 0.748	- 0.177	- 0.109
托叶大小 Stipule size	- 0.026	- 0.214	0.485	- 0.275	0.297
舌状花类型数量 Number of types of ray florets	0.741	- 0.101	0.067	- 0.056	- 0.112
舌状花主要类型 Predominant type of ray floret	0.696	- 0.100	0.195	0.018	- 0.151
舌状花龙骨数量 Keels number of ray floret	0.205	- 0.245	0.102	- 0.223	0.167
舌状花纵向姿态 Longitudinal profile of inner ray florets	- 0.361	0.583	0.165	- 0.230	0.137
舌状花内外侧颜色比较 Ray floret color of outer side compared to inner side	- 0.237	0.667	0.231	- 0.226	- 0.002
花心中部深色区 Presence of dark spot at centre	- 0.376	- 0.198	- 0.013	- 0.007	- 0.556
茎曲直性 Stem straight degree	0.065	- 0.074	0.021	- 0.524	- 0.406
花蕾形状 Flowerbud shape	- 0.299	0.371	0.220	0.266	0.057
花序类型 Inflorescence form	0.837	0.158	- 0.210	- 0.025	0.121
茎强度 Stem intensity	0.436	- 0.224	0.054	0.505	0.097
舌状花轮数 Layers of ray florets	0.262	0.022	- 0.094	0	0.251
花序直径 Inflorescence diameter	0.907	- 0.154	0.034	- 0.073	- 0.005
舌状花宽度 Ray floret width	0.358	0.246	- 0.004	- 0.275	- 0.206
舌状花长度 Ray floret length	0.257	- 0.045	0.242	0.080	- 0.125
舌状花顶端形状 Shape of tip on ray floret	- 0.276	- 0.636	0.226	0.055	- 0.106
植株类型 Plant type	- 0.237	- 0.283	0.081	0.131	0.182
株高 Plant height	- 0.284	0.376	- 0.318	0.405	- 0.267
管状花直径 Diameter of tubiform florets	- 0.187	- 0.200	- 0.265	- 0.011	0.697

2.1.3 表型性状的聚类分析

将表型性状原始数据进行标准化处理,按照卡方聚类进行 UPGMA 聚类,聚类结果如图 1。当以 0.76 为阈值时将 56 个切花菊品种分为 5 类。第 I 类包括 HH03 等 8 个品种,瓣型均为平瓣类,按整枝方式均为标准菊,按花径为中、大菊品种;花色除紫色凯旋为紫色外,其他品种均为白色花。第 II 类包括 HH07 等 27 个品种,其中除 C017、C022 为匙瓣类、风车型外,其余均为平瓣类,部分品种在亚类中按花型(宽带型)聚集在一起,按整枝方式为射散菊、小菊类,花色主要是白色系、红色系和黄色系。

第 III 类包括 HH14 等 3 个品种,均为桂瓣类,花型属于平桂型,射散菊,中小菊类。第 IV 类包括 C021 等 17 个品种,均为标准菊、中大菊类,大部分为匙瓣品种,其中神 9、富士、精之波等品种为平瓣类,头状花序中夹杂有匙瓣,从花型来看 17 个品种中平瓣的芍药型与匙瓣的匙球型等花型

丰厚的品种聚在一起，花色主要是白色系和黄色系。第 V 类仅 HH27 1 个品种，属于管瓣类，风车型。

从整体看，通过表型聚类的分类结果大致按照花径—瓣型—花型分类，匙瓣品种没有单独聚在一起，而是夹杂在平瓣品种中，观测中也会发现平瓣品种中夹杂有少量匙瓣的现象，这与张树林（1965）提出的不把匙瓣单独列出作为分类的看法有相似之处。

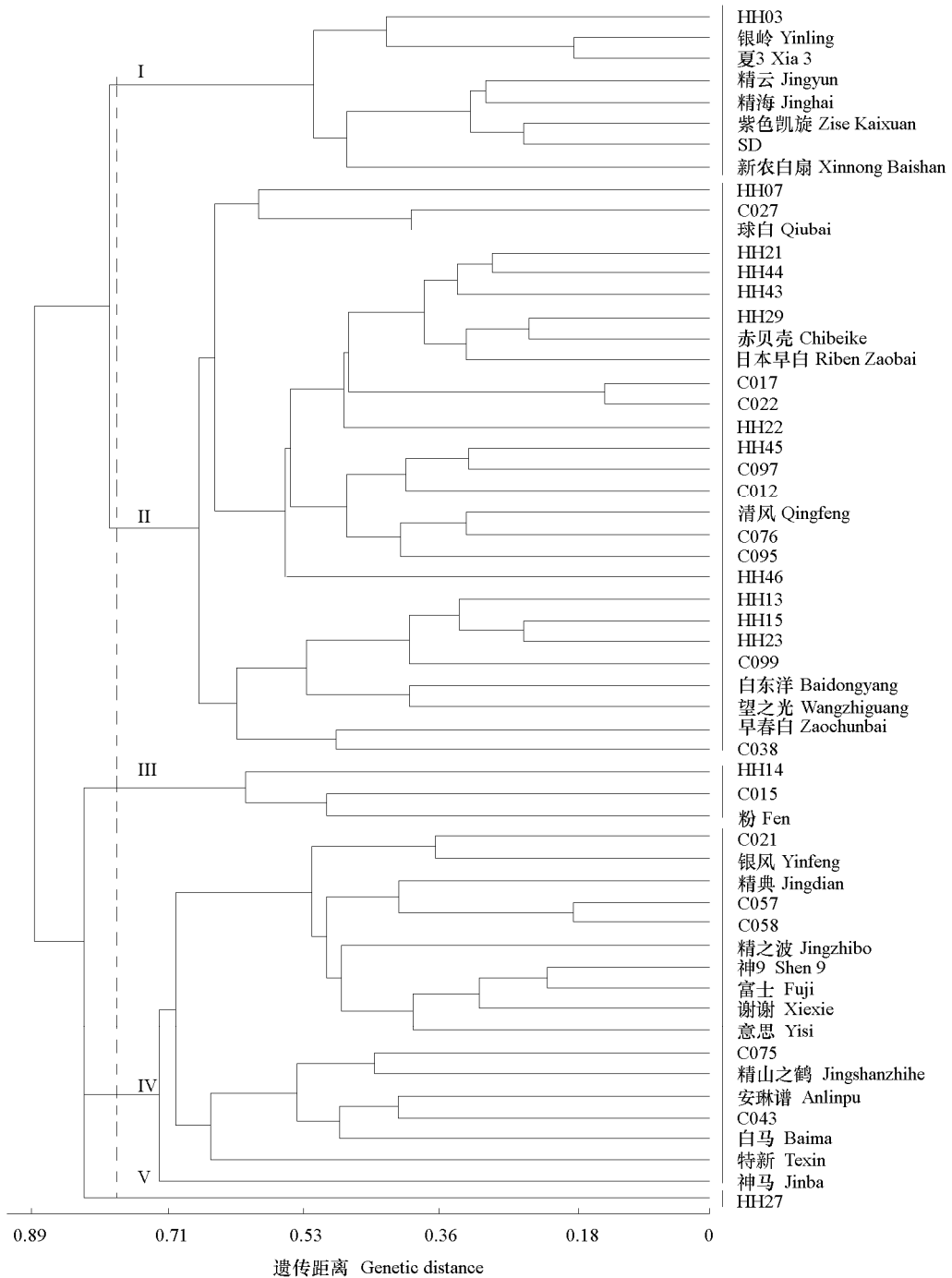


图 1 基于 56 个切花菊表型性状的 UPGMA 聚类结果

Fig. 1 UPGMA dendrogram for phenotypic traits of 56 cut chrysanthemum

2.2 SRAP 扩增结果及遗传多样性分析

2.2.1 切花菊品种 SRAP 扩增条带多态性分析

利用 4 个表型差异较大的切花菊品种对 100 对 SRAP 引物组合进行筛选,初步筛选出 25 对带型清晰、多态性较好的引物对 56 个切花菊品种进行 SRAP 扩增。淘汰扩增效果差、带型不易辨认的引物,最终确定 14 对引物组合(表 5),共扩增出 454 条条带,其中多态性条带为 423 条,多态性位点百分率是 93.17%,平均每对引物扩增出 30.21 条多态性条带。每个引物扩增的 SRAP 条带数在 23 ~ 36 条,其中 Me8-Em3 引物组合产生条带最多为 36 条,多态性位点百分率高达 97.22%。依据 Vanhala 等(1998)多态信息含量的划分,多态性含量 *PIC* 值在 0.72 ~ 0.89 之间,平均为 0.82,为高度多态性座位,说明切花菊品种群体的遗传差异较大,在分子水平具有丰富的遗传多样性。

表 5 选择的 14 对 SRAP 引物组合及多样性统计
Table 5 14 pairs of SRAP primer combinations and statistics of genetic diversity

引物组合 Primer combinations	扩增条带数 Number of bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率/% Percentage of Polymorphism loci
Me1(GATA)-Em2(TAAC)	30	26	86.67
Me2(GAGC)-Em1(TAAT)	33	31	93.94
Me2(GAGC)-Em5(TTGA)	31	29	93.55
Me3(GAAT)-Em4(TTGC)	34	32	94.12
Me4(GACC)-Em8(TCAG)	33	31	93.94
Me5(GAAG)-Em3(TAGC)	23	21	91.30
Me7(GACG)-Em1(TAAT)	32	29	90.63
Me7(GACG)-Em5(TTGA)	31	28	90.32
Me8(GATG)-Em3(TAGC)	36	35	97.22
Me8(GATG)-Em7(TGCT)	31	29	93.55
Me8(GATG)-Em10(TCGG)	35	33	94.28
Me9(GTAA)-Em1(TAAT)	36	33	91.67
Me9(GTAA)-Em4(TTGC)	28	26	92.86
Me9(GTAA)-Em9(TCAC)	36	34	94.44
总数 In total	454	423	93.17

Me: TGAGTCCAAACCGG-NNN; Em: GACTGCGTACGAATT-NNN.

2.2.2 基于 SRAP 扩增条带的聚类分析

将电泳条带转化为 0-1 矩阵,按遗传相似系数进行 UPGMA 聚类,一致性检验得出的聚类结果协表征矩阵和相似系数矩阵间的相关系数为 0.736,表明聚类结果能很好地体现试验切花菊品种间的遗传关系。

聚类结果如图 2,以 0.675 为阈值将 56 个切花菊品种大致分为 4 类。

第 I 大类包括 39 个品种,图 2 中由上到下为早春白、望之光等,为平瓣—匙瓣类,进一步又分为两个亚类。第 I 亚类包括早春白等 28 个品种,均为平瓣类,其中有部分标准菊,为中大菊类,花型为芍药型,部分为射散菊、小菊类,花型为宽带型品种。第 II 亚类包括 C012 等 11 个品种,除 C017、C022 为匙瓣类、风车型,其他均为平瓣类、标准菊、中大菊类品种。

第 II 类包括 C021 等 13 个品种,除 HH23 为平瓣、射散菊、小菊类外,其余均为匙瓣类品种,标准菊、中大菊类,花型多为匙球型。

第 III 类包括 C015 等 3 个品种,分别为 C015、粉、HH14,3 个品种均为桂瓣类,射散菊、中小菊类,花型属于平桂型。

第IV类为 HH27 1 个品种，为管瓣类，射散菊、小菊类品种，花型为风车型。

SRAP 聚类结果能较好地反应供试材料的遗传多样性，分类结果大致按照花径—瓣型—花型分类，将表型性状标记聚类和 SRAP 分子标记聚类的遗传距离矩阵进行 Mantel 检验，得出 r 值为 0.682，说明两种标记对 56 个切花菊品种进行聚类时效果较好，能很好地体现试验切花菊品种间的遗传关系。

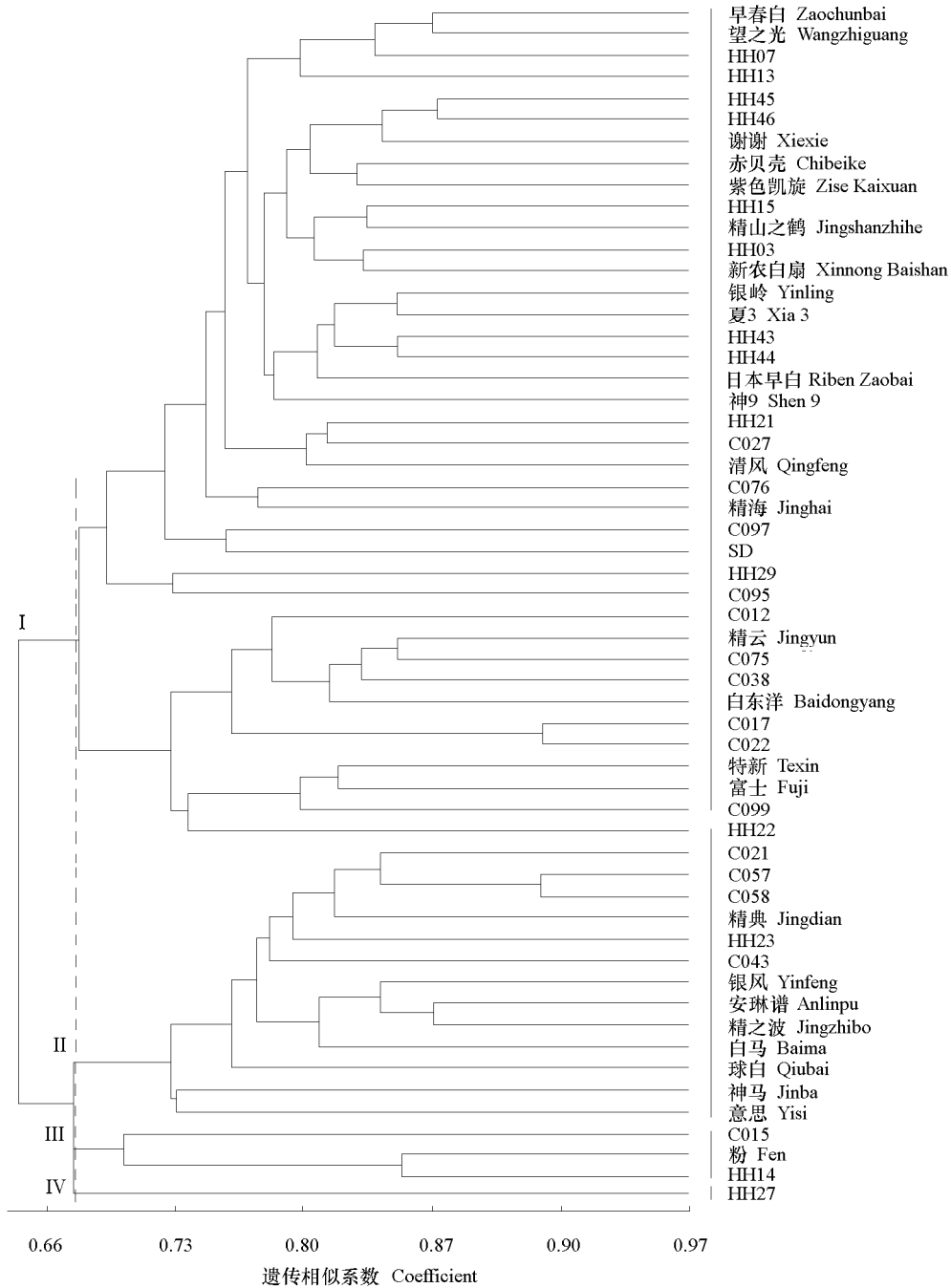


图 2 基于 56 个切花菊 SRAP 扩增条带的 UPGMA 聚类结果

Fig. 2 UPGMA dendrogram for SRAP bands of 56 cut chrysanthemum

3 讨论

3.1 切花菊品种的聚类分析与分类

本试验中对 56 个切花菊品种的 45 个表型性状分析发现,切花菊品种间表型性状存在丰富变异,对筛选出 21 个特异性状做主成分分析发现,花部形态影响率依次是花径—花型—瓣型。切花菊品种表型性状和分子标记 UPGMA 聚类结果均按照花径—瓣型—花型分类,但花色在聚类结果中的规律不是很明显,可能是由于供试品种数量不够。以上研究结果与李鸿渐和邵建文(1990)提出按‘花径—瓣型—花型—花色’的四级分类法有相似之处。聚类结果的亚类中花型相似而瓣型不同(平瓣和匙瓣品种)的聚在一起,说明菊花的平瓣类品种和匙瓣类品种在基因型上有一定的相似性,从分子水平上说明瓣型相对其他性状变异程度较低,能够充分表达切花菊基因型对应的表现型,分子标记聚类直观体现在瓣型上。这与张树林(1965)、李宝琴(2009)提出的不把匙瓣列为单独的瓣型的结果相似之处。

研究中还发现,切花菊品种分类时应以花部性状为主,叶部性状和植株茎秆特性作为辅主性状。而前人研究的大菊品种分类依据主要是花部性状(欧阳彩虹等,2010;李仁伟等,2012),由于大菊品种瓣型、花型十分丰富,分类时依据花部特征基本上能将大菊品种分开,而切花菊相对大菊品种来说瓣型、花型相对变异少些。另外,主成分分析提取的主成分贡献率较分散,累积贡献率增长缓慢,推测可能是因为相关性强的变量不够集中,性状分属于多类,说明切花菊表型性状在演化中的多样性,这也是性状变异丰富的主要原因。

3.2 SRAP 分子标记结合形态学研究切花菊遗传多样性的可行性

本研究中 SRAP 扩增条带的多态性位点百分率达 93.17%,与已报道用于菊花遗传多样性研究的几种标记相比,高于 RAPD 标记的 69%(秦贺兰等,2002)、AFLP 标记的 72.95%(吴在生等,2007),略低于 ISSR 标记的 96.07%(缪恒彬等,2007),但本研究中平均每对 SRAP 引物扩增出 32.4 条带,均高于其他几个分子标记。本研究中表型性状和 SRAP 分子标记聚类的遗传距离矩阵进行 Mantel 检验得出相关性系数为 0.682,说明两种标记相结合能很好地体现试验切花菊品种间的遗传关系,提供可靠结果。SRAP 标记结合表型性状适于切花菊品种的遗传多样性研究。Ferriol 等(2003)用 SRAP 标记研究甜瓜遗传多样性时认为 SRAP 标记所提供的遗传信息与作物的形态差异和进化历史更符合。

本试验中所用切花菊涵盖了小菊、中大菊类,据陈俊愉(2001)的《中国花卉品种分类学》中记载:切花菊为异源多倍体植物,遗传背景复杂,小菊系(6 cm 以下)染色体倍性为 $2n = 4x \sim 6x + 2 = 36 \sim 56$,反应野菊的种源组成,而中大菊系(6 cm 以上)染色体倍性为 $2n = 6x - 2 \sim 8x + 3 = 52 \sim 75$,反应毛华菊的种源组成,花径与染色体数之间存在着正相关趋势。菊花的栽培演化中,来源背景不同的菊花由于植株茎秆等各性状适合作切花而作为切花菊在栽培生产演变成切花用菊,本试验中由于选择的菊花品种和引物不同,SRAP 扩增条带的多态性位点百分率也不同,深入探讨有待进一步研究。

References

- Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, Tanksley S D, Sorrells M E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36 (1): 181 - 186.
- Chen Jun-yu. 2001. *China floricultural taxonomy*. Beijing: China Forestry Publishing House: 218 - 231. (in Chinese)

- 陈俊愉. 2001. 中国花卉品种分类学. 北京: 中国林业出版社: 218 - 231.
- Doyle J J, Doyle J L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13 - 15.
- Ferriol M, Pico B, Nuez F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 107: 271 - 282.
- Guo Ning. 2010. Genetic diversity of natural populations of *Rosa Laxa* Retz. and *Rosa platyacantha* Schrenk in Tianshan Mountains of Xinjiang[M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 郭宁. 2010. 新疆天山山脉地区疏花蔷薇与宽刺蔷薇天然群体遗传多样性分析[硕士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Hu Ying. 2009. Study on establishment of SRAP techniques and genetic diversity in the *Genus acer* L.[M. D. Dissertation]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. (in Chinese)
- 胡颖. 2009. 槭属植物 SRAP 技术体系的建立及遗传多样性研究[硕士论文]. 郑州: 河南农业大学.
- Li Bao-qin. 2009. Classification and core collection of chrysanthemum varieties[M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 李宝琴. 2009. 大菊品种分类研究及核心种质构建初探[硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Li Da. 2008. Genetic diversity and classification of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* based on AFLP and SRAP markers[M. D. Dissertation]. Changsha: Hunan Agricultural University. (in Chinese)
- 李达. 2008. 红花檵木的 AFLP 与 SRAP 分析及品种分类研究[硕士论文]. 长沙: 湖南农业大学.
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 455 - 461.
- Li Hong-jian, Shao Jian-wen. 1990. Investigation, collection and classification of chrysanthemum cultivars in China. *Journal of Nanning Agricultural University*, 13 (1): 30 - 36. (in Chinese)
- 李鸿渐, 邵建文. 1990. 中国菊花品种资源的调查收集和分类. *南京农业大学学报*, 13 (1): 30 - 36.
- Li Mei, Hou Xi-lin, Hao Ri-ming. 2009. Analysis of genetic relationships of *Osmanthus fragrans* based on SRAP markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (11): 1667 - 1675. (in Chinese)
- 李梅, 侯喜林, 郝日明. 2009. 基于 SRAP 分子标记的桂花品种亲缘关系研究. *园艺学报*, 36 (11): 1667 - 1675.
- Li Ren-wei, Wang Chen, Dai Si-lan, Luo Xin-yan, Li Bao-qin, Zhu Jun, Lu Jie, Liu Qian-qian. 2012. The association analysis of phenotypic traits with SRAP markers in chrysanthemum. *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (7): 1355 - 1364. (in Chinese)
- 李仁伟, 王晨, 戴思兰, 雒新艳, 李宝琴, 朱珺, 卢洁, 刘倩倩. 2012. 菊花品种表型性状与 SRAP 分子标记的关联分析. *中国农业科学*, 45 (7): 1355 - 1364.
- Ma Hong-bo, Lai Yun-ying, Xu Xu-ming, Chen Chang-ming, Shang Wei, Luo Zhi-hua, Jiang Qiu-ping. 2011. Genetic diversity analysis of *Hybrid Cymbidium's* germplasm resources based on SRAP markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 12 (4): 551 - 556. (in Chinese)
- 马红勃, 赖翌英, 许旭明, 陈昌铭, 尚伟, 罗志花, 江秋萍. 2011. 基于 SRAP 标记的大花蕙兰种质资源遗传多样性分析. *植物遗传资源学报*, 12 (4): 551 - 556.
- Miao Heng-bin, Chen Fa-di, Zhao Hong-bo. 2007. Genetic relationship of 85 chrysanthemum [*Dendranthema × grandiflora* (Ramat.) Kitamura] cultivars revealed by ISSR analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (5): 1243 - 1248. (in Chinese)
- 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波. 2007. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析. *园艺学报*, 34 (5): 1243 - 1248.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. 2010. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability (trial draft) - chrysanthemum. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 中华人民共和国农业部. 2010. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南(试行稿)——菊花. 北京: 中国农业出版社.
- Ouyang Cai-hong, He Qiao, Qin Guo-xin, Guo Qi-gao, Han Guo-hui, Wang Yong, Qin Bing, Liang Guo-lu. 2010. Genetic diversity of 25 chrysanthemum [*Dendranthema × grandiflora* (Ramat.) Kitamura] cultivars revealed by ISSR analysis. *Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science Edition*, 30 (3): 201 - 204. (in Chinese)
- 欧阳彩虹, 何桥, 秦国新, 郭启高, 韩国辉, 王勇, 秦冰, 梁国鲁. 2010. 25 个菊花品种遗传多样性的 ISSR 分析. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 30 (3): 201 - 204.

- 钱迎倩, 马克平. 1994. 生物多样性研究的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社: 13 - 36.
- Qin He-lan, You Jie, Gao Jun-ping. 2002. RAPD analysis of 18 *Chrysanthemum* cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (5): 488 - 490. (in Chinese)
- 秦贺兰, 游 捷, 高俊平. 2002. 菊花 18 个品种的 RAPD 分析. *园艺学报*, 29 (5): 488 - 490.
- Shao Qing-song, Guo Qiao-sheng, Deng Yan-ming, Guo Hai-peng. 2010. A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 1160 - 1169.
- Solbrig O T. 1991. From genes to ecosystems-A research agenda for biodiversity. Pairs: IUBS.
- Sun Ming-wei, Yuan Su-xia, Xu You-ming, Liu Chun, Ming Jun. 2011. Genetic relationship of some *Lilium* species and cultivars based on SRAP marker. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1498 - 1506. (in Chinese)
- 孙明伟, 袁素霞, 徐有明, 刘 春, 明 军. 2011. 基于 SRAP 标记的百合部分种及品种遗传结构分析. *园艺学报*, 38 (8): 1498 - 1506.
- Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, Vilkki J, Maki-Tanila. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poult Sci*, 77: 783 - 790.
- Wang Yan-qing. 2008. Using SRAP marker to construct the DNA fingerprint of excellent varieties of *Peaonia suffruticosa* in Heze city [M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 王燕青. 2008. 利用 SRAP 标记构建菏泽牡丹优良品种指纹图谱 [硕士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Wu Zai-sheng, Li Hai-long, Liu Jian-hui, Zuo Zhi-rui, Tian Rui-chang. 2007. Analyses of genetic diversity among 65 chrysanthemum cultivars Based on AFLP. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 31 (5): 67 - 70. (in Chinese)
- 吴在生, 李海龙, 刘建辉, 左志锐, 田瑞昌. 2007. 65 个菊花栽培品种遗传多样性的 AFLP 分析. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 31 (5): 67 - 70.
- Ye Wei. 2007. Studies on genetic relationships of *Petunia hybrida* inbred lines using morphological traits, ISSR and SRAP [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 叶 为. 2007. 应用表型性状、ISSR 和 SRAP 进行矮牵牛自交系亲缘关系的研究 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Yu Cui, Jin Mao-yong, Zhang Bao-zhu, Ming Jun, Yuan Su-xia, Wang Zhao, Chu Li-hong, Liu Chun. 2012. Genetic linkage map of *Anthurium andraeanum* based on SRAP molecular markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1151-1158. (in Chinese)
- 于 翠, 金茂勇, 张宝珠, 明 军, 袁素霞, 王 钊, 储丽红, 刘 春. 2012. 基于 SRAP 分子标记的安祖花遗传连锁图谱构建. *园艺学报*, 39 (6): 1151 - 1158.
- Zhang Fei, Chen Fa-di, Fang Wei-min, Li Feng-tong, Liu Pu-sheng. 2009. Optimization and establishment of SRAP-PCR reaction system of *Dendranthema × grandiflorum*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 18 (3): 44 - 49. (in Chinese)
- 张 飞, 陈发棣, 房伟民, 李风童, 刘浦生. 2009. 菊花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立. *植物资源与环境学报*, 18 (3): 44 - 49.
- Zhang Shu-lin. 1965. Classification research of chrysanthemum varieties. *Acta Horticulturae Sinica*, 4 (1): 35 - 48. (in Chinese)
- 张树林. 1965. 菊花品种分类的研究. *园艺学报*, 4 (1): 35 - 48.