

· 农业生物技术 ·

基于 SSR 分子标记的 175 份蜡梅种质遗传多样性分析和指纹图谱构建

王秀军¹, 赵彦贝¹, 王静¹, 李子航¹, 张纪堂², 李庆卫^{1*}

1 北京林业大学园林学院 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083

2 鄢陵县林业局, 河南 许昌 461200

王秀军, 赵彦贝, 王静, 李子航, 张纪堂, 李庆卫. 基于 SSR 分子标记的 175 份蜡梅种质遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 252-268.

WANG Xiujun, ZHAO Yanbei, WANG Jing, LI Zihang, ZHANG Jitang, LI Qingwei. Genetic diversity analysis and fingerprinting of 175 *Chimonanthus praecox* germplasm based on SSR molecular marker[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 252-268.

摘要: 理清蜡梅品种资源、构建指纹图谱是推动蜡梅科学研究和产业发展的重要基础。利用简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)分子标记技术, 对鄢陵地区 175 个蜡梅(*Chimonanthus praecox* L.)品种(系)的遗传多样性进行了研究, 使用 NTSYSpc 2.1 软件中的 UPDM 聚类方法分析品种间的遗传多样性。利用基于贝叶斯模型的 Structure v2.3.3 软件解析 175 份种质的遗传结构。通过一般线性模型(general linear model, GLM)对性状和标记进行关联分析。在遗传多样性分析中, 平均等位基因数(number of alleles, Na)为 6.857, 平均期望杂合度(heterozygosity, He)为 0.496 3, 平均观测杂合度(observed heterozygosity, Ho)为 0.503 7, 蜡梅 Nei's 平均基因多样性指数为 0.494 9, 平均 Shannon 信息指数为 0.995 8, 表明鄢陵地区蜡梅群体内具有较丰富的遗传多样性。群体结构和 UPDM 聚类分析均表明可将 175 个品种(系)分为 7 个类群。在 GLM 模型中有 15 个标记位点与 8 个表型性状显著($P < 0.05$)关联, 表型变异解释范围为 14.90%–36.03%。利用 11 对多态信息含量(polymorphic information content, PIC)最高的引物, 构建 175 份蜡梅品种(系)资源 SSR 标记的指纹图谱。本研究综合分析了鄢陵地区蜡梅的遗传多样性与 SSR 分子标记, 并构建了蜡梅核心种质资源库, 为蜡梅新优品种选育、品种鉴定、资源保护与利用等工作提供理论支撑。

关键词: 蜡梅; 种质资源调查; 遗传多样性; 指纹图谱; 简单重复序列(SSR)分子标记

资助项目: 国家林业和草原局课题蜡梅(修订)(2020-LY-008); 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程(2019-KJC-02-10)
This work was supported by the National Forestry and Grassland Administration Subject Wintersweet (Revised) (2020-LY-008) and the Beijing Landscaping Enhances Color and Extends Green Science and Technology Innovation Project (2019-KJC-02-10).

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

Received: 2023-05-08; Accepted: 2023-07-18

Genetic diversity analysis and fingerprinting of 175 *Chimonanthus praecox* germplasm based on SSR molecular marker

WANG Xiujun¹, ZHAO Yanbei¹, WANG Jing¹, LI Zihang¹, ZHANG Jitang², LI Qingwei^{1*}

¹ National Key Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

² Yanling County Forestry Bureau, Xuchang 461200, Henan, China

Abstract: The elucidation of resources pertaining to the *Chimonanthus praecox* varieties and the establishment of a fingerprint serve as crucial underpinnings for advancing scientific inquiry and industrial progress in relation to *C. praecox*. Employing the SSR molecular marker technology, an exploration of the genetic diversity of 175 *C. praecox* varieties (lines) in the Yanling region was conducted, and an analysis of the genetic diversity among these varieties was carried out using the UPDM clustering method in NTSYSpc 2.1 software. We analyzed the genetic structure of 175 germplasm using Structure v2.3.3 software based on a Bayesian model. General linear model (GLM) association was utilized to analyze traits and markers. The genetic diversity analysis revealed a mean number of alleles (N_a) of 6.857, a mean expected heterozygosity (H_e) of 0.496 3, a mean observed heterozygosity (H_o) of 0.503 7, a mean genetic diversity index of Nei's of 0.494 9, and a mean Shannon information index of 0.995 8. These results suggest that the *C. praecox* population in Yanling exhibits a rich genetic diversity. Additionally, the population structure and the UPDM clustering were examined. In the GLM model, a total of fifteen marker loci exhibited significant ($P < 0.05$) association with eight phenotypic traits, with the explained phenotypic variation ranging from 14.90% to 36.03%. The construction of fingerprints for *C. praecox* varieties (lines) was accomplished by utilizing eleven primer pairs with the highest polymorphic information content, resulting in the analysis of 175 SSR markers. The present study offers a thorough examination of the genetic diversity and SSR molecular markers of *C. praecox* in Yanling, and establishes a fundamental germplasm repository of *C. praecox*, thereby furnishing theoretical underpinnings for the selection and cultivation of novel and superior *C. praecox* varieties, varietal identification, and resource preservation and exploitation.

Keywords: *Chimonanthus praecox*; germplasm resources survey; genetic diversity; fingerprinting; simple sequence repeats (SSR) marker

蜡梅(*Chimonanthus praecox* L.)为蜡梅科蜡梅属落叶木本植物,是我国特产的传统名花和经济林树种^[1],具有很高的观赏价值、经济价值与文化价值^[2]。鄱陵,中国著名的花木之都,是蜡梅最重要的产地之一^[3]。鄱陵地区的蜡梅栽培历史悠久,品种资源丰富,但目前对

该地区蜡梅品种资源的研究还处于起步阶段,新优品种培育及园林推广应用等落实程度不高。因此调查并梳理蜡梅品种资源,摸清鄱陵地区蜡梅种质资源,进行遗传多样性研究,建立鄱陵地区蜡梅资源 DNA 指纹图谱,对蜡梅资源管理、品种选育、新优品种研发、鉴定和

推广应用等具有十分重要的意义。

DNA 指纹图谱可以快速、精准地鉴定品种之间的差异,对品种资源鉴定、保护及亲缘关系分析等具有重要作用^[4]。Wu 等^[5]开发了杨梅品种的 DNA 指纹系统,该系统使用 8 个 DNA 片段的多样性信息,能在不失去稳定性的情况下获得非常高的效率,对杨梅的遗传多样性、分子育种和品种保护具有重要的价值。已有研究表明蜡梅在长期的生产栽培过程中,不论是群体内还是群体间都产生了丰富的遗传多样性^[6]。简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)分子标记技术在遗传多样性分析、品种鉴定、关联分析、基因定位和辅助育种等研究中体现了较高的实用性和应用价值,在园林植物^[7]、农作物^[8]、动物^[9]等遗传多样性研究方面均有应用。赵明晓和范国强以素心蜡梅为材料,研究不同方法对蜡梅 SSR 扩增效果的影响,建立了适宜的蜡梅 SSR 分子标记反应体系^[10]。李响等利用蜡梅转录组数据库组装的 Unigene 分析得到表达序列标签微卫星(expressed sequence tag simple sequence repeat, EST-SSR)的候选位点,证明通过蜡梅转录组数据库 EST 信息开发 SSR 标记具有可行性^[11]。杨佳利用从 NCBI 数据库中获得蜡梅 EST 序列来设计引物,在 10 个野生蜡梅居群中获得多态性等位基因片段,证明从蜡梅 EST 序列中开发的 EST-SSR 分子标记具有良好的种间通用性^[12]。Qazi 利用 SSR 分子标记技术鉴别蜡梅杂种 F1 的真实性,发现真杂种率仅为 41.67%,且 F1 代群体的遗传多样性较低^[13]。鄱陵地区长期以来持续开展蜡梅的收集、驯化和培育等工作,汇集了全国不同地区的蜡梅品种资源。但蜡梅相关基础科研发展相对较为薄弱,蜡梅品种资源家底不清,蜡梅性状与遗传多样性研究较少。

本研究通过开展蜡梅品种资源调查,梳理

鄱陵地区蜡梅种质资源,运用 SSR 分子标记的方法,对调查记载的蜡梅栽培群体进行遗传多样性和亲缘关系分析,为蜡梅的品种分类、核心种质库建立以及新优品种研发、鉴定和推广应用等提供科学依据;并以 SSR 标记引物建立鄱陵地区蜡梅种质资源 DNA 指纹图谱,为蜡梅资源的保护和利用以及科学研究和产业应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料于 2020 年采样于鄱陵,鄱陵位于河南省中东部地区(东经 114°02′-114°19′,北纬 33°46′-34°14′),采样地点包括鄱陵县园艺场蜡梅基地、世界蜡梅园、鄱陵梅园、新科梅园、鄱陵县国家花木博览园蜡梅基地、花艺蜡梅资源圃和姚家蜡梅苑等,共 175 份蜡梅品种(系)(附表 1,所有附表和附图已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0000226)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取的方法步骤

DNA 提取参照天根生化科技(北京)有限公司的新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP320)说明书进行操作。

1.2.2 引物筛选与荧光毛细管电泳

从已发表的蜡梅及近缘物种夏蜡梅的分子标记相关文献中确定 168 对 SSR 引物(附表 2)^[10,14-17],再随机选取 8 个蜡梅 DNA 样品进行 PCR 扩增,筛选出能够稳定扩增出清晰条带的引物,PCR 扩增的反应体系和反应程序参照 Nie 等的方法^[18]。通过扩增位点片段筛选出 21 对能够稳定扩增出清晰条带的引物(表 1)。通过 Genemarker v2.2.0^[19]软件得到 175 个蜡梅样品的基因型数据。

1.3 群体结构分析

使用 Structure 2.3.3^[20]的贝叶斯聚类方法进

表 1 筛选出的 21 对引物序列表

Table 1 The sequence of the 21 primer pairs screened

Primers	Base sequence (5'→3')	Base sequence (5'→3')	Output (bp)
Locus5	AAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGTG	TAGCTGCTGAGAGTAAGACCACG	124-136
Locus6	AAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGTG	CCTTAGCTGCTGAGAGTAAGACC	128-140
Locus8	ACCAACAAAACAACGATGAGAAT	TATCCGAATTCCAATTCCTCTCT	118-127
Locus31	ATGTATAGCAGTATTTTAGTATCA	TATTTTGTCTTGGTTATCAT	112-138
Locus63	GAACCGTCGGATGAAGAAGATG	CAGATGCCCCACTACCCTATT	275-281
Locus65	CTGCTCGCAAAGATAACG	CCTAACTCGGAGCACATACT	373-397
Locus66	AGCTGCTGAAGGAGGAGAAG	TTGGAGACGGCGAAGTGG	228-243
Locus67	CGCCGCCCGATTCCTCC	CGCCTGCCTATACCTTTGATTG	291-329
Locus71	GTGTGCGACGTGGGTGTT	GGCGATTTCTGTTTCCTTTCT	255-258
Locus76	TCTTCTCCATTCCTTCACAAAA	TCTGTGTACTTTCTCATTTCGCA	118-156
Locus77	ACCAACAAAACAACGATGAGAAT	TTCCTCTCTCCTAGCCCTTATGT	105-133
Locus78	ATTGTAACCATGGAAGGAGGAAC	TGAAGCATCAATCATAGCAAATG	117-283
Locus79	ATCAATTTTGACTTGTAACGGC	TGATCTGCGCAACAAAGATAAAT	126-174
Locus80	GTTTTGGTAGCGTTTGGTTAGTG	AACCTTCTTCATACTAGCCTCCG	168-200
Locus93	TCGAGTATTACATTCCTCTTG	GCAATACATACATGCACATAGCC	117-121
Locus106	ATCGGGTTTAGCAGACTTAGCTT	ACTTTGAAAGATTCACACTCCG	169-175
Locus116	AAGTCTCATCTCCAATATGGGGT	TGAGAATCATGTTGAGAGTCAGG	154-164
Locus119	ACCACTGTGAGTTGTTTCGTTTGT	GGCAACACTCAAACGAATTTTAC	140-142
Locus122	ACTTAATGGGCTTTTGTGGTTT	TGAAAAGGTTGGATTGTTTATGG	132-134
Locus144	TTCAAAGTAGCTCAAGCATTGTG	AGTTGGTCATGCGATTCAAAAT	123-151
Locus155	TATTGTCCAAGCTTTCTTTCAA	TCCATCAGATCCAATAAGTACCG	164-184

行群体结构的分析, 参数 Length of burnin period 设置为 5 000, Number of MCMC Reps after burnin 设置为 50 000, 设定 K 值为 1-10, Number of iterations 为 20 次。将 Structure 的输出结果打包后上传至 Structure Harvester 进行计算, 获取最佳 K 值。

1.4 遗传多样性分析

多样性指数是描述物种多样性的重要指标, 按 Shannon-Weaver 信息指数进行运算。数值性状如中被片长度、长宽比等进行 10 级分类, 一级 $<X-2\delta$, 10 级 $>X+2\delta$, 中间每级差 0.5δ , δ 为标准差, X 为平均数。二元性状及多元性状按赋值进行统计计算。

统计各品种(系)的扩增片段大小总数, 将每对引物下的位点数按照从小到大的顺序分别编码为 A、B、C、D 等, 形成原始数据矩阵, 再使用 Popgene 软件计算观测等位基因数

(number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、Shannon 信息指数 (Shannon's information index, I)、Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity index, H)、期望杂合度 (heterozygosity, H_e) 和观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o); 利用 PIC_CALC 软件计算多态信息含量 (polymorphic information content, PIC)。对每个样品的扩增条带按有 (记为 1)、无 (记为 0), 形成原始数据矩阵, 利用 NTSYS-pc2.10e 软件中的 SAHN 程序对距离矩阵进行 UPGAM 聚类分析并用 MEGA 11 绘制聚类树状图, 计算遗传距离和遗传一致度, 用 Dcenter 命令和 Eigen 程序进行主成分分析, 利用 SPSS19.0^[21] 软件进行相关性分析。

1.5 关联分析

利用 TASSEL 2.1 软件, 通过一般线性模型

(general linear model, GLM)将性状和标记进行关联分析^[22], 通过 OmicShare Tools (<https://www.omicshare.com/tools>)进行数据可视化, 确定标记位点和表型变异解释率。

1.6 DNA 指纹图谱构建

根据 1.2.2 中 SSR 扩增出的 175 份蜡梅品种(系)的片段长度, 将不同引物的不同片段分别编号, 每对引物由 2 个字母组成。根据 11 对核心引物 PIC 值从大到小的排列顺序和各样品扩增出条带的片段大小, 运用 Excel 2021 软件将筛选出的所有多态性引物的品种分组情况进行统计对比, 挑选出条带清晰且能区分所有蜡梅品种(系)的最佳引物组合, 为 175 个蜡梅品

种(系)资源构建对应的 DNA 指纹图谱。根据 SSR 引物扩增的条带图对 175 个蜡梅品种(系)进行分组。

2 结果与分析

2.1 蜡梅遗传多样性水平分析

根据得到的 175 个蜡梅品种 SSR 的扩增结果, 利用 Popgene 软件计算出 21 对引物的多态性信息, 21 对引物在 11 条染色体上均匀分布(附图 1)。以 locus80 引物为例, 其在 6 个品种上的扩增产物毛细管电泳结果见图 1, 可见该引物具有较高的多态性。结果显示(表 2), 175 个样品中共检测到 144 个等位位点, 每对引物检

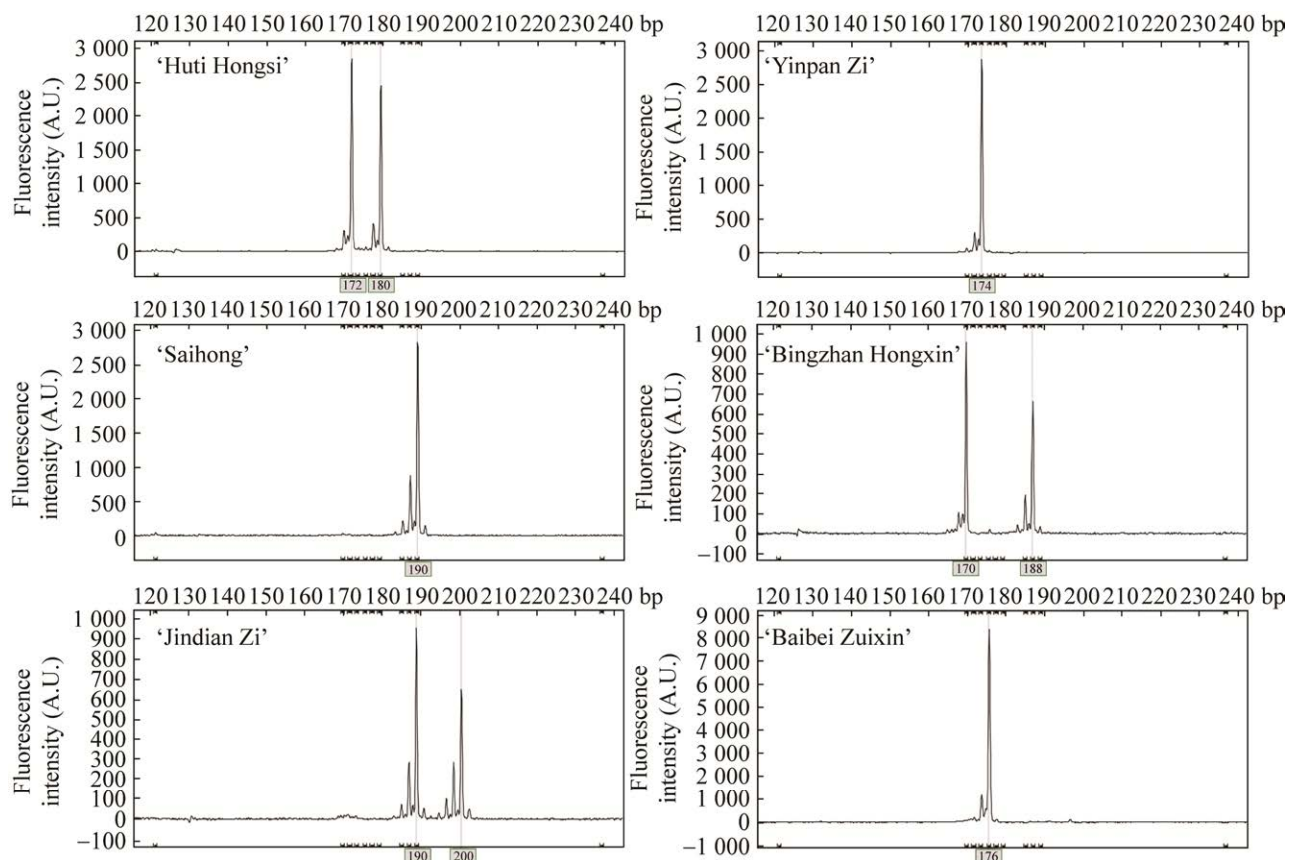


图 1 SSR 引物 locus80 在 6 个蜡梅样本(‘虎蹄红丝’, ‘银盘紫’, ‘腮红’, ‘冰盏红心’, ‘金殿紫’和‘白被醉心’)中的毛细管电泳图

Figure 1 Capillary electrophoresis of locus80 primer in six samples (‘Huti Hongsi’ ‘Yinpan Zi’ ‘Saihong’ ‘Bingzhan Hongxin’ ‘Jindian Zi’ and ‘Baibei Zuixin’).

表 2 SSR 位点多态性信息表

Table 2 Polymorphism information of SSR loci

Primer	Na	Ne	I	Ho	He	H	PIC
Locus5	3	1.704 8	0.723 8	0.585 4	0.414 6	0.413 4	0.366 4
Locus6	3	1.638 9	0.679 7	0.609 1	0.390 9	0.389 8	0.343 2
Locus8	4	1.833 6	0.772 7	0.544 1	0.455 9	0.454 6	0.389 4
Locus31	5	1.053 2	0.150 8	0.949 3	0.050 7	0.050 5	0.050 7
Locus63	3	1.593 0	0.666 1	0.626 7	0.373 3	0.372 2	0.333 5
Locus65	9	3.208 3	1.536 3	0.309 7	0.690 3	0.688 3	0.661 8
Locus66	4	2.802 6	1.140 6	0.355 0	0.645 0	0.643 2	0.580 3
Locus71	2	1.953 5	0.681 2	0.510 5	0.489 5	0.488 1	0.369 0
Locus67	14	3.276 5	1.593 9	0.303 2	0.696 8	0.694 8	0.653 9
Locus76	13	3.148 3	1.513 8	0.315 7	0.684 3	0.682 4	0.647 6
Locus77	4	1.841 9	0.775 5	0.541 6	0.458 4	0.457 1	0.391 1
Locus78	26	5.359 2	2.295 9	0.184 3	0.815 7	0.813 4	0.801 5
Locus79	10	2.845 3	1.317 2	0.349 6	0.650 4	0.648 5	0.593 0
Locus80	11	3.327 5	1.558 6	0.298 5	0.701 5	0.699 5	0.664 8
Locus93	3	1.241 8	0.365 9	0.804 7	0.195 3	0.194 7	0.178 6
Locus106	3	1.522 6	0.626 9	0.655 8	0.344 2	0.343 2	0.310 6
Locus116	4	1.556 3	0.651 5	0.641 5	0.358 5	0.357 4	0.315 7
Locus119	2	1.433 6	0.479 9	0.696 7	0.303 3	0.302 4	0.257 0
Locus122	2	1.507 7	0.519 6	0.662 3	0.337 7	0.336 7	0.279 8
Locus144	10	3.355 2	1.489 9	0.296 0	0.704 0	0.702 0	0.655 3
Locus155	9	2.947 1	1.372 4	0.337 4	0.662 6	0.660 7	0.604 4
Mean	6.857	2.340 5	0.995 8	0.503 7	0.496 3	0.494 9	0.449 9
St.Dev	5.842	1.049 0	0.537 3	0.200 5	0.200 5	0.199 9	0.192 9

测到多态性条带范围为 2–26 条, 平均每个位点观测等位基因数(Na)为 6.857 个, 其中位点最多的有 26 个, 位点最少的只有 2 个; 平均每个位点能够检测到的有效等位基因数(Ne)为 2.340 5, 其中位点 78 最多(5.359 2), 位点 31 最少(1.053 2); Shannon 信息指数(I)的变化为 0.150 8–2.295 9, 均值为 0.995 8, 表明供试蜡梅材料有着丰富的遗传多样性; Nei's 基因多样性指数范围是 0.050 5–0.813 4, 均值为 0.494 9; 期望杂合度(He)在 0.050 7–0.815 7, 均值为 0.496 3, 观测杂合度(Ho)变化范围为 0.184 3–0.949 3, 均值为 0.503 7。多态信息含量值(PIC)的变化范围是 0.050 7–0.801 5 之间, 均值为 0.449 9, 表明能够满足对供试材

料进行遗传多样性分析的要求。

2.2 群体结构分析

当 $K=7$ 时, ΔK 有明显的峰值, 因此确定 $K=7$ 为最优 K 值(图 2A)。表明 175 份蜡梅品种(系)可分为 7 个类群, 当某一材料在某个组群中的 Q 值 ≥ 0.6 时, 认为该材料遗传结构相对单一^[23], Q 值大于或等于 0.6 的 131 份蜡梅种质材料(占参试材料的 74.9%)划归到相应的 7 个组群中, 其余 44 份遗传结构具有复杂的混合来源, 无法明确其归属的组群。G1 (见图 2B 红色部分) 15 份; G2 (见图 2B 绿色部分) 13 份; G3 (见图 2B 蓝色部分) 36 份; G4 (见图 2B 黄色部分) 19 份; G5 (见图 2B 品红色部分) 21 份; G6 (见图 2B 青色部分) 24 份; G7 (见图 2B 桔

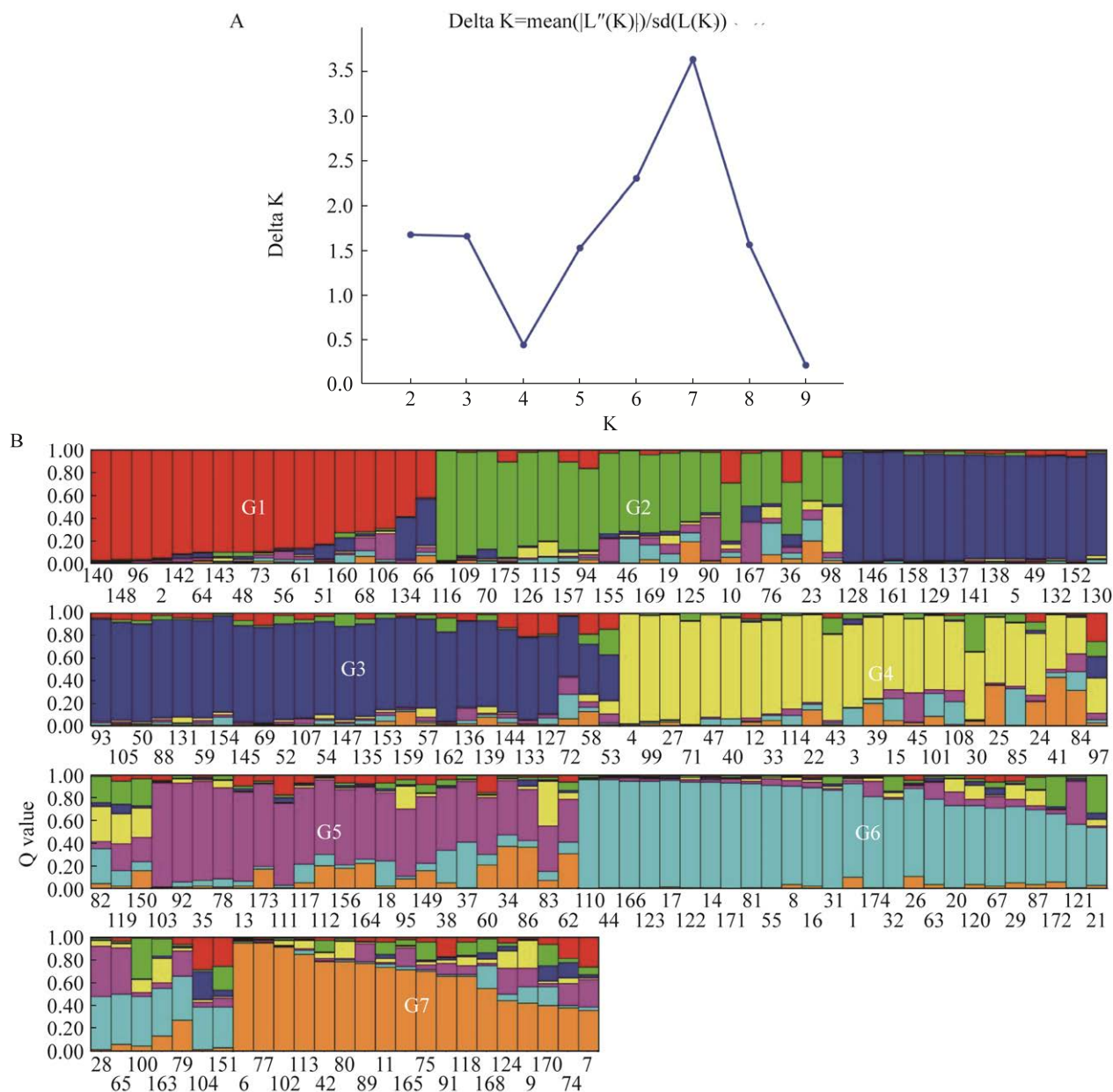


图 2 蜡梅品种(系)群体结构分析的 ΔK 值分布(A)和群体结构图(B)

Figure 2 Distribution of ΔK values for structure analysis (A) and population structure diagram (B) in *Chimonanthus praecox*.

色部分) 12 份, 大部分资源为混合类型, 说明 G1 和 G3、G2 和 G5、G5 和 G6、G7 和 G5 之间的遗传分离程度高, 存在一些杂合度较高的蜡梅品种(图 2B)。

2.3 蜡梅种质亲缘关系分析

2.3.1 聚类分析

根据 SSR 扩增结果分析得到, 175 个蜡梅样品的遗传相似系数变化范围是 0.431 3–0.885 2,

平均值为 0.658 2, 根据遗传相似系数绘制聚类图(图 3)。结果显示, 供试材料的 175 个样品可通过 21 对引物完全区别。为了后续更好地比较不同组群间的差异, 可划分为三大类, 其中 II 和 III 可以进一步划分出 3 个亚类, 共七小类(分别包含 14、30、26、22、29、26 和 28 份材料)。第 I 类均为红心品种, 花型以碗型和喇叭型居多; II-1 中包含红心蜡梅和晕心

蜡梅品种, 花型以喇叭型为主, 花被片数约在 13-18, 雄蕊个数在 5-6; II-2 和 II-3 包含红心、晕心和素心 3 个蜡梅品种, 以中晚花期为主; 第 III-1 类和第 III-2 类为晕心和素心品种, 以早花期和中花期为主, 爪的颜色为黄色和绿色; 第 III-3 类包含素心、晕心和红心蜡梅品种, 花被片数大都在 16-20 之间, 中被片边缘以平展居多。

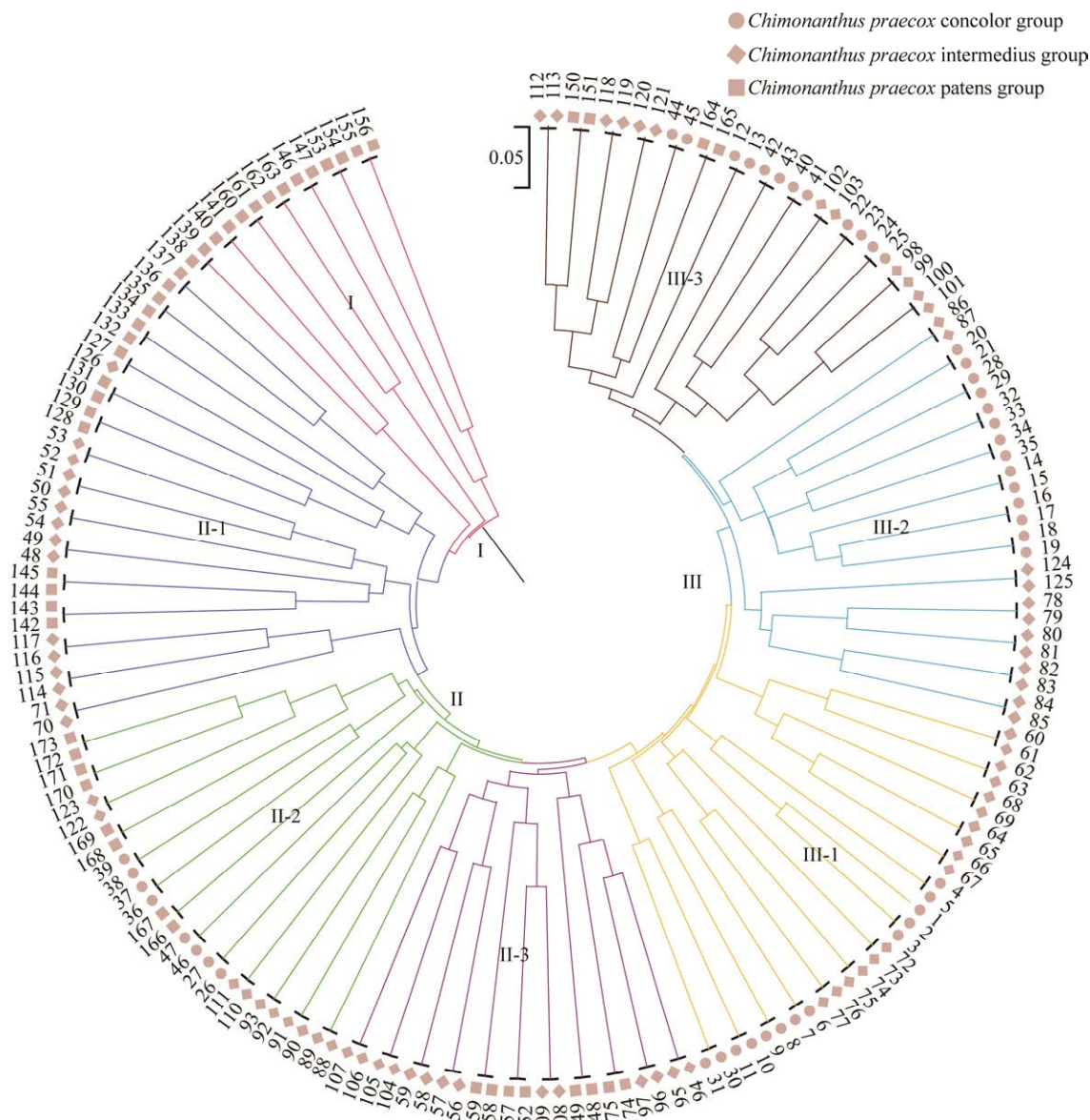


图 3 175 个蜡梅品种聚类图

Figure 3 Cluster analysis of 175 *Chimonanthus praecox* varieties.

2.3.2 主成分分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 软件对 175 份供试材料进行主成分分析, 其中第一主坐标贡献率为 7.58%, 第二主坐标贡献率为 7.43%, 第三主坐标贡献率为 5.47%。根据第一和第二主坐标生成的二维图(图 4)对供试样品间亲缘关系进行比较分析。根据二维图可以看出 175 个蜡梅样品分散在各个方向, 表明供试材料间遗传变异丰富, 拥有较广阔的遗传背景。该二元主成分分析结果不仅体现了参试蜡梅种质间的亲缘关系, 且与群体结构的组群划分大致吻合。

2.4 蜡梅表型性状与 SSR 标记关联分析

利用 TASSEL 2.1 软件中的 GLM 模型对表型分布频率符合或接近于正态分布的表型进行表型性状与 SSR 标记的关联分析(正态分布情

况见附图 2)。在 GLM 模型中有 15 个标记位点与 8 个表型性状显著($P<0.05$)关联, 表型变异解释范围在 14.90%–36.03%。与花被片数、中被片数、中被片长宽比极显著关联($P<0.01$)的位点有 2 个; 与中被片形状极显著关联的位点有 4 个。与雄蕊数、中被片颜色、中被片形状和中被片长度显著关联的位点有 12 个。另外, 还出现同一标记位点与多个性状关联的情况, locus63 和 locus80 均与花被片数、中被片数、雄蕊数和中被片形状关联; locus119 与中被片长度和花径关联; locus122 与花被片数和中被片数关联(图 5)。

2.5 鄱陵地区蜡梅 DNA 指纹图谱构建

根据表 5 中的多态信息含量 PIC 值, 按照从大到小的顺序排序, 经排列组合后发现, 选取 PIC 值最大的前 11 对引物组合, 可以将 175 个

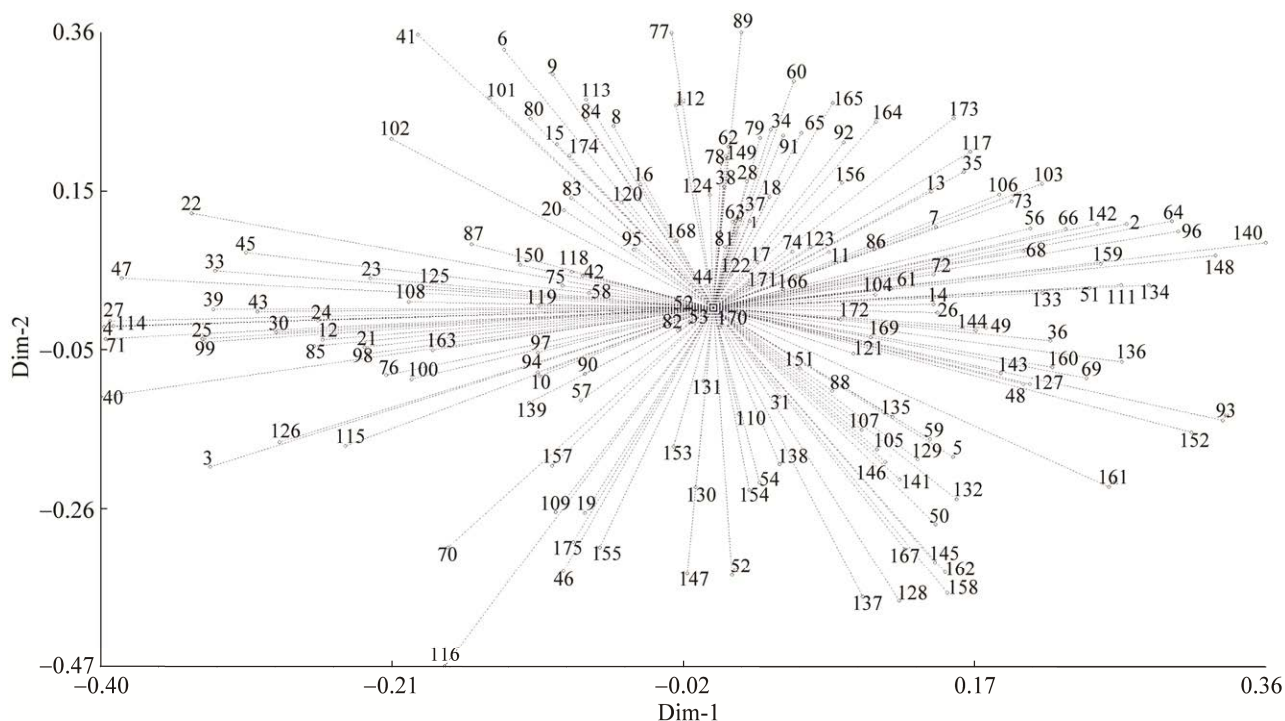


图 4 175 份蜡梅种质资源二元主成分分析 1–175 为附表 1 中的 175 个蜡梅品种

Figure 4 Two-dimensional principal component analysis of 175 *Chimonanthus praecox* germplasm resources. 1–175 corresponds to the 175 *C. praecox* varieties in supplementary Table 1.

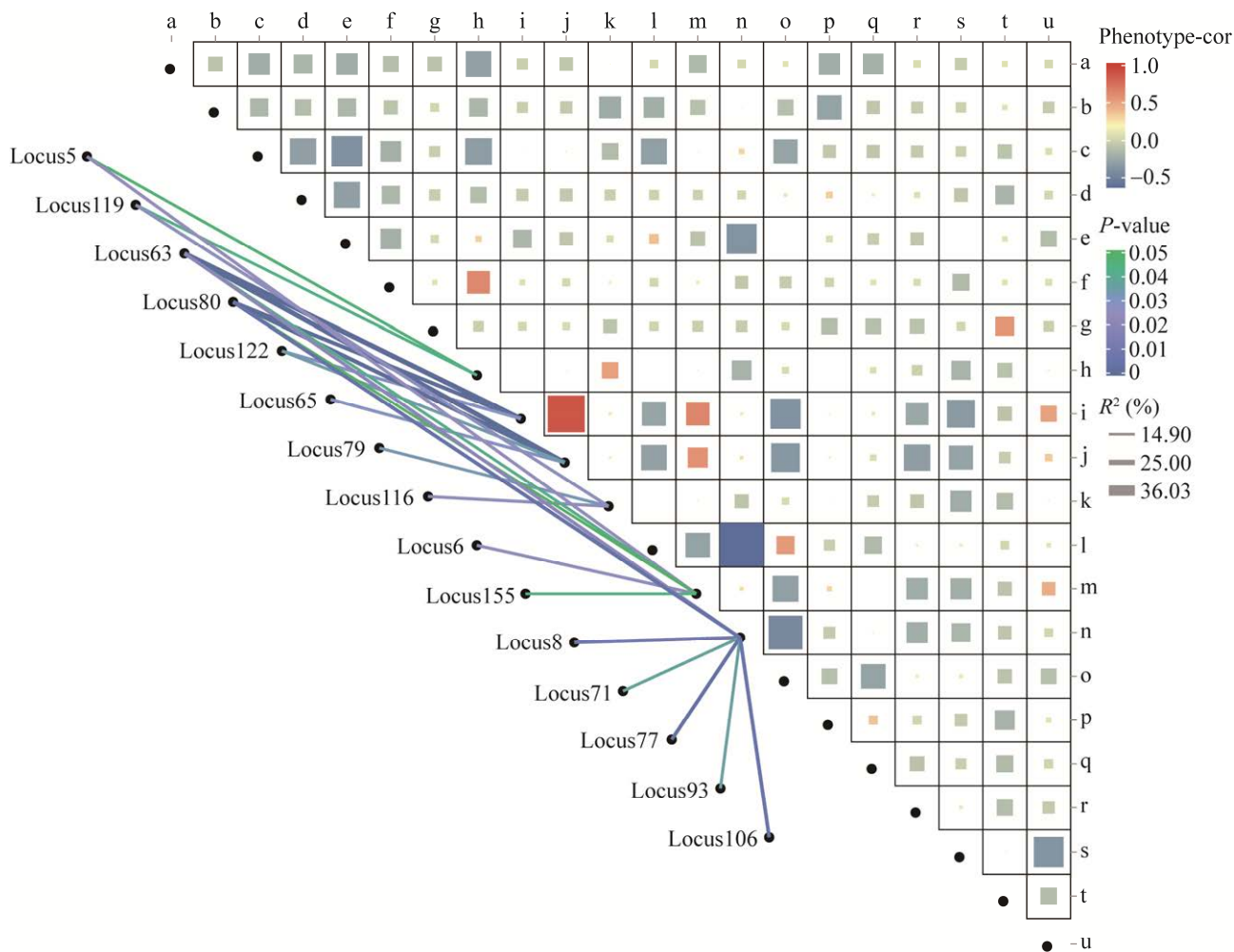


图 5 GLM 模型的关联分析结果 a: 磬口型; b: 荷花型; c: 碗型; d: 钟型; e: 喇叭型; f: 盘碟型; g: 中被片颜色; h: 花径; i: 花被片数; j: 中被片数; k: 中被片长度; l: 中被片长宽比; m: 雄蕊数; n: 中被片形状; o: 中被片先端形状; p: 中被片先端状态; q: 中被片边缘状态; r: 内被片斑晕情况; s: 爪的颜色; t: 花蕾颜色; u: 花期

Figure 5 Association analysis results of GLM models. a: Chime mouth type; b: Lotus type; c: Bowl type; d: Bell type; e: Trumpet type; f: Disc disc type; g: Middle tepal color; h: Flower diameter; i: Number of tepals; j: Number of middle tepals; k: Length of middle tepals; l: Length to width ratio of middle tepals; m: Number of stamens; n: Shape of middle tepals; o: Shape of apex of middle tepals; p: State of apex of middle tepals; q: State of edge of middle tepals; r: Condition of inner tepal spotting; s: Color of claw; t: Color of bud; u: Flowering stage.

蜡梅品种完全区分。选定的 11 对引物 PIC 值从大到小的顺序名称为 locus78、locus80、locus65、locus144、locus67、locus76、locus155、locus79、locus66、locus77 和 locus8, 然后对以

上引物的扩增片段进行编号(附表 3), 为 175 个蜡梅品种资源构建对应的字母指纹图谱(表 3)。175 个蜡梅品种的 SSR 指纹图谱均具有唯一性, 每一条指纹信息代表一个独立品种。

表3 175个蜡梅品种资源的指纹图谱

Table 3 Fingerprints of 175 *Chimonanthus praecox* resources

No.	Cultivar	SSR fingerprinting	No.	Cultivar	SSR fingerprinting
1	'Xiao Qinkou'	WWJJDGBLLCCCCACBBCDCD	89	'Guifei Zuijiu'	WWCCDDGGLLCCDDAABBDDDD
2	'Jinzhu'	GWBCCEEAABCCDDAABBDDDD	90	'Yuwan Zanghong'	SWBJCDBIBCBCCFAAAABDBD
3	'Yanbai'	WWBDDDBGBBEECCCCACCCCC	91	'Sai hong'	KWBDDDFGGBKBBCCAABCDddd
4	'Jin Qingkou'	WWBJDDGGBBEECCCCAADDdD	92	'Xiangya Hongsi'	NWBCDDGGCCCCDHABABDBD
5	'Feng Feiwu'	CIBDEIDDBBBCCDDAACDCD	93	'Zhuang Yuanzhong'	UWDECHAEBFABDHAABDCDCD
6	'Luanbei Jinwan'	KWJDDGGKLFDDCCBBDDDD	94	'Juanyun'	CVCJDDBBBKCCDFACABDDDD
7	'Zaola'	CGBBFFBGBKAADDACBCDDDD	95	'Husu'	WWBCDDGGCCCCDAAABDDDD
8	'Yin Qingkou'	WWDDDDGGBBEECCDCBCDDDD	96	'Yu Linglong'	WXBCEEEEBBCCEEAABCDddd
9	'Dahua Donglü'	NNJBBBGBCCCCACBCDDDD	97	'Yinhe'	COBJDFBBBCDECDAAABDDDD
10	'Jinpan'	CNBCDEBEELJKDACACDDDD	98	'Fenmian Hanchun'	CCBBDfBGBCCCDCCAADDdD
11	'Changban Yinzhao'	KNBDCCBEFFCCDDCCBCDDDD	99	'Suwan Ziban'	NNBDDDBBBBCCDDCCAADDdD
12	'Yangguang'	WWBJDDBBBBCCCCAAAADDdD	100	'Jinwan Qianban'	CWBDBDBBCCCCDDCCACDCD
13	'Jinzhong Suxin'	TWCDBDBGBBBBDHAABCDBD	101	'Bingyan'	WWBBDGGGCCCCCCCCBCDDDD
14	'Yuhu Bingxin'	WWDDBBGGBBCCDCBCCCCC	102	'Maonao'	GGJDDGGBCAADDCCBCDDDD
15	'Su Yuwan'	WWBDDDBBBBCCCCCBDDDD	103	'Huang Denglong'	CCBDDGGCCCCDAAABBDBD
16	'Baixue Gongzhu'	WWDJDDBBCCEEDACBBDDDD	104	'Daiyu'	PWBBDfAGBCCDDCDBBCDCD
17	'Baihua Suxin'	WWBDCDBGBBCCDCBCDCD	105	'Huanghe'	PWIJCFBEBBCCDBBBDCCD
18	'Dahua Suxin'	GWBBBBDBGLDEDDACBCBDBD	106	'Jin Zifeng'	CGBBDEGGCCCCCAABBDDDD
19	'Lüwan Suxin'	CCBBCDBBCEEDHAAAACDCD	107	'Dan Zhuang Lülei'	MYBCEEBBCIBCCBBACDCD
20	'Waigang'	CWBJDDBBBBEECDCCBDDDD	108	'Duobei Yunjuan'	WWBBDBGBBCCCDCCABDDDD
21	'Qinkou Suxin'	WWDDGGBGDFEEDDCCABDDDD	109	'Hongxin Bozhou'	GLBBCDEGCFCFGCCAACDCD
22	'Jinbei'	WWBJDDBGBLCCDCCABDDDD	110	'Feihuang'	WWBBDDBBEEEDDCCBCCCC
23	'Jin Zhonghuang'	CWDJBDGBCCDDCCACDDDD	111	'Youbao Pipa'	EGBBBBBEBBCCDDAABCBBBB
24	'Huangjian'	NNBDDDBGBFBDDCCACDDDD	112	'Shi Baban'	WWJDDDBGLCCDDBCBDBD
25	'Xuhe'	KKBDFFBBBBEEDDCCACDDDD	113	'Juanbei Yunxin'	WWJJCDBGBCCDDCCBCDDDD
26	'Duobei Suxin'	GWJJGGBGBBCCDDAABBCCCC	114	'Sihong Danyu'	CCBDDDBGBLECCCCABDDDD
27	'Guanghui'	WWBJDDBBBBEEDDCCAADDdD	115	'Feiyan'	GNBBDDBGEBKEEDDCCAADDdD
28	'Jinbei'	WWJBBBBBBEEDDCCBCBDBD	116	'Qingwu Feiyang'	JJBHCDDBCCFEFGCCAACCCC
29	'Changbei Suxin'	NNBDDDBBBCEDDACBBDDDD	117	'Yupan Hongrun'	WWBDDGGBLCCDHABBCDDDD
30	'Feicui'	JNBGGGBBCCCCDCCAADDdD	118	'Lingdang'	GTJJDGBBBCCDDA AACDDDD
31	'Dahua Bozhou'	CWBBCDBBBBCCCCCBCCCC	119	'Chuniao Chuchao'	WZBCDGGGBCCCHACABDDDD
32	'Lühua'	CCDDCCBBBEEECCEBBDDDD	120	'Jinlü Zuihua'	WWBJDGBGBBDECDCCBCDDDD
33	'Juan bei Suxin'	CWBJDDBBBECCDCCACDDDD	121	'Jinyu Hongzhuang'	WWDJCGBGCEBBDHBCBBBCBC
34	'Jin Houshi'	KWJDDGGBECCDBCBDBD	122	'Biyu Xiuhua'	NNBDDGGCLEEDHCCBCDCD
35	'Jin Pifeng'	WWBDDFGGBBCCDDAABCBBBB	123	'Yu Jiaorong'	WWDGGGGCCCCCACBCDCD

(待续)

(续表 3)

No.	Cultivar	SSR fingerprinting	No.	Cultivar	SSR fingerprinting
36	'Jianbo Suxin'	JXBDCDBGBCCD GABBCDCD	124	'La Hongsi'	WWBCCDBBBBBBDDBBBCDDDD
37	'Bingyu'	CCBDDGGCCCCC CCBCCDCD	125	'Xin Guifei'	LLJGGBBCCCCDDBCABDDDD
38	'Jindie'	WWBCDDGGCFBDDCCBDDDD	126	'Juanlian Xinyun'	CCDDDDBBKKEECECCAADDD
39	'Huang Yuqiu'	NWBCCBBBBCCCCACDDDD	127	'Zhaoxia'	OWBICFBABACCHAABBCDCD
40	'Yuzhong'	WWBBDGBBBECCCCAACDCD	128	'Liaoban Yiran'	ZZEECDEEGDDDEJIBBCCCC
41	'Diaozhong Suxin'	WWJJDDBGCCCCC CCBDDDD	129	'Changbo Hongsi'	HRCCCCADBBICDBBBCCDCD
42	'Jiang Nanbai'	GGJJIIBCLCCDAAAADDD	130	'Jinpan Yurui'	WYIJCCDFBIHHCDCABCDCD
43	'Yang Zhouhuang'	CCBDDDBGCCCDACAADDD	131	'Jinlian Hongyu'	BEBBCDEEBJHCCDCBDDDD
44	'Su Foshou'	WWJJDDBGEECHHCBCDCD	132	'Huangyan Danxin'	PPBDDDEAAEECCDDCCCCC
45	'Jusu'	LWJJDDBGCECCACABDBD	133	'Mohe'	EOJKDDAFBBBBCBDDDDDD
46	'Huangyan Wansu'	WWDDCDGGBCCDFBBAACCC	134	'Taiyang'	OBBBBDAFBBBBBCDAABDADAD
47	'Qianhuang Wansu'	WWBBGGGBCCECCCCABDDDD	135	'Qiyang'	GOBJGABBBDDCDBBABCDCD
48	'Xiaguang'	GVCCEEGABBJCEAABCDDDD	136	'Mohong'	TTBCCDAABFCCCCAEBCCDCD
49	'Yin Gouya'	YYFFBDBFBAADEFFBDDDD	137	'Yanchi Xiayi'	UYBCCFFGBDDEAEACBCCCC
50	'Ningmei Yilan'	MMBDDDABBIBCEEAAAACCC	138	'Yin Panzi'	EPBJDEDJAMEECIDGBCCDCD
51	'Yinhong'	TVABCDBFAICDDAABDDDD	139	'Zaohong'	DEBJCDBDAMCCCDEEACDDDD
52	'Lüzhua Qianyun'	YYBHDDGGBCCCEEAAAACCC	140	'Xiaohua'	GWBEEEEEAABCDEAABCDDDD
53	'Ehuang Xiaguan'	ACHHBDGFB BBBBCCCCAADDD	141	'Xiaojing Nongnei'	ERABBDGFBBCADDFADCD
54	'Yunbian hongsi'	TYABCCBGBBEFDDCCADCD	142	'Qingwu Hongniang'	GGCCFFAGBBCCCAABDDDD
55	'Zixin Qingkou'	WWBJDGGGBCCCDACBCCDCD	143	'Bingzhan Hongxin'	GPBBDGEFBBBBBEAABCDDDD
56	'Bing Huanghou'	GPBBDFFGCCBDDAABDDDD	144	'Baibei Zuixin'	WYAJCDBGABCDCCAABCCDCD
57	'Feilian'	TYBIDHGGBCAACCFABDDDD	145	'Moji'	AQBGCDABCEFFHAABCCCC
58	'Mo Gouya'	BBBJDFABCLCCADBCBDDDD	146	'Yaochi Xianzi'	FFBEAFCCBBGGCEEEACDCD
59	'Yuzan'	QTBJCFGBBBBCCACABCDCD	147	'Yinzi'	CEFJCB BBBDDCDAAAABCCCC
60	'Jinman Siyun'	GWBDDDBGCMBCCCACBDDDD	148	'Mozhong'	GPBBDFAEBCBCCDAABCDDDD
61	'Hefeng Lüxiu'	TWBBDHBBBLBBEHHBDDDD	149	'Jin Dianzi'	CWBBDDDBGCKBBCHCCBDDDD
62	'Ehuang Hongsi'	CCBJDDBGBCACCDACBDDDD	150	'Hongxin Tuer'	CWBJDGBGCCCDABABDDDD
63	'Jinbei Huangrui'	WWBJDDBFCCDDDDCCBCCDCD	151	'Jin Jianzhou'	GWBBGDGCCCCBDCBCCDCD
64	'Xiaojia Biyu'	EGCGDEFFBMCCDEAABCDDDD	152	'Zi Yuzhan'	EGBBCCDEBDDHCDAFBCCDCD
65	'Huangban'	WWBDDDBBBCCCCAABCDDDD	153	'Gouya'	RTDJCEDGCLBEACBCCDCDCD
66	'Luanbei Dianyuan'	WYBCCDEFBICLDDADBCDDDD	154	'Mozhong Dianjin'	WWDDDFBHHBBBCCCEEADCCCC
67	'Jinhuang'	UWBCCDBGBCCDDCCBDDDD	155	'Jin Panzi'	TWBBDDDEGABC MFGACAABCBC
68	'Jinzhong Yunjian'	GGCCDDBBBCCDAABDDDD	156	'Jinlong Zixue'	WWBFDDBBCCBDDDBCDDDD
69	'Yanzhi'	OQAJCEAFBBBEDFDDDDDD	157	'Jinjian Hongxin'	GGBBDEBGBBCEDDCCABCDCD

(待续)

(续表 3)

No.	Cultivar	SSR fingerprinting	No.	Cultivar	SSR fingerprinting
70	'Jiaorong'	CCBH EGBG BKDEDFCDACCD CD	158	'Zixin Rumeng'	EQCECD AEFJEIFFFGBBCCCC
71	'Jinhe Ziwen'	WWBDDDGGBBEEFFCCAADDDD	159	'Bingling Huanxiao'	MTDDIICCBCCDDFFBDDDD
72	'Danzhuang Huangyan'	PWCFBFBGCF AHDDCCBCDCD	160	'Kouhong'	GGAADFBBBCCBDAABBCDCD
73	'Suyi Danzhuang'	PWBGDDFGBLCCDEAABCDDDD	161	'Bingling'	EEEEEDDBBFDDBCBCCCC
74	'Jinwan Baoxin'	TTBJCIBBBBCCDACABDDDD	162	'Jinshan Hongxin'	EGDHCEBDBNCCDDAAABCCCC
75	'Huti Hongsi'	KKCJDDGGFLCDDACACDDDD	163	'Yuguan'	WWJJDDFGCCCCDDCCACDCD
76	'Hongyun Changbei'	NWCJDGBGCKCCCCACAACCCC	164	'Luoyang'	TTCJDDFGCCCCCHACBDDDD
77	'Jinqing Tanxiang'	GGJJIIECCCCDDCCBCDDDD	165	'Xiaran Huangyan'	GWDJBCBGCKCCDGAABCDDDD
78	'Jin Zhanhua'	CCCJDBGCCCECDCCBCBDBD	166	'Yanguo Qingxue'	NWBBGGBGLLCCDDCCBCCCC
79	'Hongxia'	WWBJDDFGBCCDDCCBDDDD	167	'Jianbei Hongxin'	NSABBCGIACBBCGBBBBBCBC
80	'Jinwan Tanxiang'	KWJJCDBGBBCCCCCBCDDDD	168	'Jinwu Cangjiao'	LWBJCDBBCEAACDABCCDCD
81	'Jindie Qianyun'	NWBDBCGBECCCCCBDDDD	169	'Jianzi'	CCBBDEGGBCCDGBCCDCD
82	'Hongfo'	CCBCDDBBCCCCCCCCBCCCC	170	'Juanlian Jinbei'	GWBJCDFGBCACDDCCBCCDCD
83	'Huangpan Hongsi'	CCCCDDBGBLCECDCCBCCDD	171	'Yucui'	WWBDDDBCCCEEDHCCBCCDCD
84	'Jinxiang Hongyun'	WWBJFGBBCLCECBCBDDDD	172	'Chushui Furong'	KWBBGGGGCCCCFHBCBCCDCD
85	'Hongsi Jinlian'	WWBBDGBBBEECDCCABDDDD	173	'Jinyun Biri'	GTCCDDGGCCCCDAABDDDD
86	'Fujin'	GGFJCDBFCCCCDACBCBCBC	174	'Yuyi Hongxin'	WWBDDDBGCCECDCCBDDDD
87	'Danzhuang Diewu'	WWCJGGBBCLCCCHCCBDDDD	175	'Jinlong Tanzhua'	GGBBDDBBBHBBDGCCACDCD
88	'Xiao Dingdang'	UWCCCCBDBEDDDEBBAADDD			

3 讨论与结论

SSR 分子标记被广泛应用于分类鉴定、亲缘关系分析、体细胞杂种鉴定、遗传图谱构建和基因定位等方面^[24-25], 能够从分子水平研究物种的遗传多样性, 探讨种内及其近缘种属植物的起源与变化。本研究利用 21 对 SSR 引物对 175 份蜡梅种质资源进行遗传多样性分析, 结果显示供试群体平均等位基因数(N_a)为 6.857, 平均期望杂合度(H_e)为 0.496 3, 平均观测杂合度(H_o)为 0.503 7, 表明鄱陵地区蜡梅群体内有比较丰富的遗传多样性; 蜡梅 Nei's 平均基因多样性指数为 0.494 9, 平均 Shannon 信

息指数为 0.995 8, 表明各位点的遗传多样性存在较大差异, 该蜡梅群体具有较高的遗传多样性。该结果与靖相密^[26]、赵凯歌^[6]对蜡梅栽培群体遗传多样性的研究结果类似。多态信息含量(PIC)是微卫星 DNA 变异程度高低的一个指标, 反映微卫星 DNA 多态高低^[27]。本研究 21 对引物中, $PIC > 0.5$ 的有 9 对, $0.25 < PIC < 0.5$ 的有 10 对, 位点表现出较高的多态性。群体结构分析表明, 可将供试材料分为 7 个组群, 其中 G1 和 G3、G2 和 G5、G5 和 G6、G7 和 G5 之间存在一些杂合度较高的品种, 同时也表明鄱陵地区的蜡梅具有丰富的遗传背景。通过聚类图分析可以发现, 175 份蜡梅栽培品种资源首先被

聚为两类。第一大类包含了大部分蜡梅栽培品种, 第二大类中, 品种内被片均为深紫红色, 爪的颜色也均为红色, 表明内被片斑晕情况相同的品种能够较早地被聚为一类, 该性状特征在蜡梅品种分类中具有重要地位。这个结果在陈龙清等^[28]、芦建国等^[29]的研究中也得到证实, 目前根据内被片斑晕特征将蜡梅划分为素心品种群、晕心品种群及红心品种群的分类标准得到专业学者们的认可^[29-31]。综合聚类结果, 发现内被片斑晕情况、花被片数、花色、花蕾颜色、中被片长宽比、中被片长度、花径和中被片形状等性状相似的品种能够明显的被聚在一起, 这与赵冰等^[1]、叶丽娟^[32]的研究结果类似。在表型遗传聚类中占重要地位的花型特征在 SSR 分子遗传聚类图中却没有表现明显的聚类关系, 可能由于蜡梅是异交为主的植物, 后代产生广泛的变异和分离, 而数量性状具有微效性和累加性, 需要多个数量性状点发生变异, 才有可能引起表型上的变化, 花型特征作为品种分类的依据有待进一步研究验证。关联分析的为蜡梅复杂性状基因定位和实现分子辅助育种提供了一种快捷、有效的途径。本研究关联到更多与蜡梅花部表型相关的性状, 在 GLM 模型中关联到花径、花被片数等 8 个性状(附表 4), 该模型考虑群体结构 Q 对关联分析的影响, 具有较高的统计效率^[33]; 数量性状中存在同一标记与多个性状相关联或同一数量性状和多个标记相关联情况, 可能是基因之间相互关联所导致的^[34]。

DNA 指纹图谱因具有多位点性、高变异性和简单稳定的遗传性等特点, 被认为是品种鉴定最简单有效的方法^[35]。引物的多态信息含量值(PIC)越高, 越具有区分鉴定品种特异性的能力, 可以作为核心引物构建 DNA 指纹图

谱^[36]。核心引物筛选在节约资金和时间成本方面具有重要意义, 在较大容量植物样品的初步研究中可被优先选用。蜡梅栽培历史悠久, 品种资源复杂丰富, 本研究利用 21 对 SSR 引物对 175 个蜡梅品种进行遗传多样分析, 并从中选取 11 对多态信息含量(PIC)最高的引物作为核心引物为每个品种构建 DNA 指纹图谱, 结果表明 175 个蜡梅品种的 SSR 指纹图谱均具有唯一性, 每一条指纹信息代表一个独立品种, 为蜡梅品种构建更为简单、稳定的 DNA 指纹图谱, 可以为鄱陵地区蜡梅品种鉴定提供理论依据。

本研究通过综合分子遗传聚类与主成分分析, 揭示了鄱陵地区蜡梅品种丰富的遗传多样性。利用 GLM 模型发现 15 个标记位点与 8 个表型性状显著($P < 0.05$)关联; 得到 11 对多态信息含量(PIC)最高的引物为蜡梅品种构建 DNA 指纹图谱, 为蜡梅品种鉴定与筛选体系的研究提供了技术支撑。

REFERENCES

- [1] 赵冰, 张启翔. 蜡梅种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2008, 28(3): 315-320.
ZHAO B, ZHANG QX. Genetic diversity of germplasm resources of *Chimonanthus praecox* based on ISSR analysis[J]. Bulletin of Botanical Research, 2008, 28(3): 315-320 (in Chinese).
- [2] 陈龙清, 赵凯歌, 杜永芹. 蜡梅属品种国际登录(2016-2018)[J]. 中国园林, 2020, 36(z1): 40-43.
CHEN LQ, ZHAO KG, DU YQ. Internationally registered cultivars in *Chimonanthus lindley* (2016-2018)[J]. Chinese Landscape Architecture, 2020, 36(z1): 40-43 (in Chinese).
- [3] 芦建国, 荣娟. 鄱陵蜡梅品种资源调查及其产业开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(3): 50-53.
LU JG, RONG J. Yanling *Chimonanthus* germplasm resources survey and its industrialization development and utilization[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2012,

- 31(3): 50-53(in Chinese).
- [4] 张安世, 韩臣鹏, 齐秀娟, 张中海. 基于ISSR标记的猕猴桃品种 遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 植物资源与环境学报, 2017, 26(3): 19-26.
ZHANG AS, HAN CP, QI XJ, ZHANG ZH. Genetic diversity analysis and fingerprinting construction of cultivars of *Actinidia* spp. based on ISSR marker[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2017, 26(3): 19-26 (in Chinese).
- [5] WU B, ZHONG Y, WU QQ, CHEN FY, ZHONG GY, CUI YP. Genetic diversity, pedigree relationships, and a haplotype-based DNA fingerprinting system of red bayberry cultivars[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 563452.
- [6] 赵凯歌. 用形态标记和分子标记研究蜡梅栽培种质的遗传多样性[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2007.
ZHAO KG. Studies on genetic diversity of cultivated *Chimonanthus praecox* using morphological and molecular markers[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [7] WANG Y, YUE D, LI XZ. Genetic diversity of *Toona ciliata* populations based on SSR markers[J]. Journal of Resources and Ecology, 2020, 11(5): 466.
- [8] YANG XF, QIN WM, WANG LC, ZHANG M, NIU ZG. Long-term variations of surface solar radiation in China from routine meteorological observations[J]. Atmospheric Research, 2021, 260: 105715.
- [9] LI JL, ZHAO B, CHEN Y, ZHAO BH, YANG NS, HU SS, SHEN JY, WU XS. A genetic evaluation system for New Zealand white rabbit germplasm resources based on SSR markers[J]. Animals, 2020, 10(8): 1258.
- [10] 赵明晓, 范国强. 蜡梅SSR反应体系建立及引物筛选[J]. 河南农业大学学报, 2011, 45(1): 46-50.
ZHAO MX, FAN GQ. Establishment of *Chimonanthus* SSR reaction system and its primer selection[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2011, 45(1): 46-50 (in Chinese).
- [11] 李响, 杨楠, 赵凯歌, 陈玉星, 唐锐君, 陈龙清. 蜡梅转录组EST-SSR标记开发与引物筛选[J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(S1): 25-32.
LI X, YANG N, ZHAO KG, CHEN YX, TANG RJ, CHEN LQ. Development and primer selection of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Chimonanthus praecox*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2013, 35(S1): 25-32 (in Chinese).
- [12] 杨佳. 蜡梅EST-SSR分子标记的开发及其遗传多样性, 遗传结构的研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2012.
YANG J. Genetic diversity and genetic structure of *Chimonanthus praecox* (L.) Link revealed by EST-SSR markers[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2012 (in Chinese).
- [13] QAZI SHOAIB ALI. 蜡梅的杂交F₁代真实性鉴定及遗传多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2018.
QAZI SA. Identification and diversity analysis of wintersweet (*Chimonanthus praecox*) crossing progenies using SSR molecular markers[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [14] YANG J, DAI PF, ZHOU TH, HUANG ZH, FENG L, SU HL, LIU ZL, ZHAO GF. Genetic diversity and structure of wintersweet (*Chimonanthus praecox*) revealed by EST-SSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 150: 1-10.
- [15] 陈玉星. 蜡梅两种分子标记的开发及F₁代杂交群体分离方式的评价[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2014.
CHEN YX. The development of two molecular markers in wintersweet (*Chimonanthus praecox*) and the evaluation of segregation patterns in an F₁ hybrid population[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [16] 黄耀辉, 张超, 周莉花, 赵宏波. 基于转录组序列的夏蜡梅SSR位点特征与引物开发[J]. 浙江农林大学学报, 2017, 34(4): 589-596
HUANG YH, ZHANG C, ZHOU LH, ZHAO HB. Development and primer screening of SSR markers based on transcriptome sequences in *Sinocalycanthus chinensis*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2017, 34(4): 589-596 (in Chinese).
- [17] 吴静, 黄耀辉, 董彬, 张超, 付建新, 周莉花, 赵宏波. 夏蜡梅SSR引物适用性分析及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(3): 58-66.

- WU J, HUANG YH, DONG B, ZHANG C, FU JX, ZHOU LH, ZHAO HB. Suitability test of SSR primer of *Sinocalycanthus chinensis* and its application in genetic diversity[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2018, 42(3): 58-66 (in Chinese).
- [18] NIE XH, WANG ZH, LIU NW, SONG L, YAN BQ, XING Y, ZHANG Q, FANG KF, ZHAO YL, CHEN X, WANG GP, QIN L, CAO QQ. Fingerprinting 146 Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) accessions and selecting a core collection using SSR markers[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(5): 1277-1286.
- [19] HOLLAND MM, PARSON W. GeneMarker® HID: a reliable software tool for the analysis of forensic STR data[J]. Journal of Forensic Sciences, 2011, 56(1): 29-35.
- [20] FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies[J]. Genetics, 2003, 164(4): 1567-1587.
- [21] BRYMAN A, CRAMER D. Quantitative Data Analysis with IBM SPSS 17, 18 and 19: a Guide for Social Scientists[M]. Hove: Routledge, 2011.
- [22] BRADBURY PJ, ZHANG ZW, KROON DE, CASSTEVENS TM, RAMDOSS Y, BUCKLER ES. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples[J]. Bioinformatics, 2007, 23(19): 2633-2635.
- [23] 张晨, 云岚, 李珍, 王俊, 郭宏宇, 盛誉, 石子英, 徐学宝. 新麦草种质的SSR遗传多样性及群体结构分析[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 48-59.
- ZHANG C, YUN L, LI Z, WANG J, GUO HY, SHENG Y, SHI ZY, XU XB. Genetic diversity and structure analysis in *Psathyrostachys nevski* population using SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 48-59 (in Chinese).
- [24] LIU YL, GENG YP, SONG ML, ZHANG PF, HOU JL, WANG WQ. Genetic structure and diversity of *Glycyrrhiza* populations based on transcriptome SSR markers[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2019, 37(5): 401-412.
- [25] PAVANI M, SUNDARAM RM, RAMESHA MS, KAVI KISHOR PB, KEMPARAJU KB. Prediction of heterosis in rice based on divergence of morphological and molecular markers[J]. Journal of Genetics, 2018, 97(5): 1263-1279.
- [26] 靖相密. 基于ISSR标记的蜡梅遗传多样性研究[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2008.
- JING XM. Genetic diversity of *Chimonanthus praecox* (L.) link based on ISSR markers[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2008 (in Chinese).
- [27] 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).
- [28] 陈龙清, 鲁涤非. 蜡梅品种分类研究及武汉地区蜡梅品种调查[J]. 北京林业大学学报, 1995, 17(S1): 103-107.
- CHEN LQ, LU DF. Studies on cultivar classification of wintersweet and investigation of its cultivars in Wuhan[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1995, 17(S1): 103-107 (in Chinese).
- [29] 芦建国, 谢贵霞. 武汉地区蜡梅品种资源调查与分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(2): 155-158.
- LU JG, XIE GX. The investigation on cultivars resources of *Chimonanthus praecox* in Wuhan city[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2012, 36(2): 155-158 (in Chinese).
- [30] 王淼博. 蜡梅品种分类及系统构建研究[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2013.
- WANG MB. Studies on the cultivar classification and system construction of wintersweet[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2013 (in Chinese).
- [31] 余焰. 武汉地区蜡梅品种资源调查及品种标准株数据库构建[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2014.
- YU S. Resources survey and database construction of wintersweet cultivars in Wuhan[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2014 (in Chinese).

- [32] 叶丽娟. 基于ISSR分子标记的蜡梅遗传多样性研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2011.
YE LJ. Genetic diversity of *Chimonanthus praecox* (L.) link based on ISSR makers[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [33] 袁欣捷, 方荣, 周坤华, 雷刚, 黄月琴, 陈学军. 辣椒重要农艺性状关联分析与优异等位变异发掘[J]. 核农学报, 2020, 34(12): 2658-2672.
YUAN XJ, FANG R, ZHOU KH, LEI G, HUANG YQ, CHEN XJ. Association analysis of important agronomic traits in pepper (*Capsicum annuum* L.) and mining of elite alleles[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(12): 2658-2672 (in Chinese).
- [34] LI J, ALVAREZ B, SIWABESSY J, TRAN M, HUANG Z, PRZESLAWSKI R, RADKE L, HOWARD F, NICHOL S. Application of random forest, generalised linear model and their hybrid methods with geostatistical techniques to count data: predicting sponge species richness[J]. Environmental Modelling & Software, 2017, 97: 112-129.
- [35] 孙泽硕, 蒋冬月, 柳新红, 沈鑫, 李因刚, 屈雨飞, 李永华. 基于SSR标记的42份樱花品种的聚类分析及DNA指纹图谱构建[J]. 园艺学报, 2023, 50(3): 657-668.
SUN ZS, JIANG DY, LIU XH, SHEN X, LI YG, QU YF, LI YH. Cluster analysis and construction of DNA fingerprinting of 42 oriental cultivars of flowering cherry based on SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(3): 657-668 (in Chinese).
- [36] 胡春龙, 张晨, 刘翠兰, 李丽, 燕丽萍, 吴德军, 夏阳, 邢世岩, 王开芳. 基于SSR标记构建白蜡种质资源分子身份证[J]. 山东农业科学, 2015, 47(5): 6-9, 22.
HU CL, ZHANG C, LIU CL, LI L, YAN LP, WU DJ, XIA Y, XING SY, WANG KF. Establishment of molecular ID for *Fraxinus* germplasms based on SSR markers[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 47(5): 6-9, 22 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)