

菊花不完全双列杂交 F_1 代遗传关系的 SRAP 分析

吴洋洋¹, 仰小东¹, 杨信程¹, 徐婷婷¹, 管志勇¹, 薛建平², 蒋甲福¹, 陈素梅¹, 房伟民¹, 陈发棣¹, 张 飞^{1,*}

(¹南京农业大学园艺学院, 农业部景观农业重点实验室, 南京 210095; ²上海虹华园艺有限公司, 上海 200070)

摘 要: 利用 SRAP 分子标记研究了 6 个切花菊品种及其 2×4 不完全双列杂交 (NC II) 的 38 个 F_1 代单株的遗传关系。结果表明, 17 对 SRAP 引物组合共获得 229 条带, 其中多态性条带 127 条, 平均每个引物获得 7.5 个多态性条带, 多态性比率为 56.0%, 说明切花菊亲本品种及其杂交后代的分子多样性适中。6 个亲本品种之间的 Nei's 遗传距离介于 0.11 ~ 0.25 之间, 平均为 0.19, 说明亲本品种之间的亲缘关系较近。亲本和杂交后代的遗传相似系数分别介于 0.42 ~ 0.72 和 0.40 ~ 0.85 之间, 杂交后代遗传相似系数的中位数 (0.61) 高于亲本品种 (0.55), 说明杂交产生了一些变异株系, 但是总的遗传基础有变窄或同质化趋势。基于遗传相似系数, UPGMA 聚类将亲本和杂交后代划分为两大类, 聚类结果与母本和杂交组合类型相符, 说明 SRAP 分子标记可有效用于鉴定菊花不同杂交组合后代。

关键词: 菊花; 杂交后代; 不完全双列杂交; 遗传相似性; 分子鉴定; SRAP 标记

中图分类号: S 682.1⁺¹

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 06-1116-09

Genetic Relationship Among Chrysanthemum F_1 Hybrids Derived from an Incomplete Diallel Cross Unraveled by SRAP Markers

WU Yangyang¹, YANG Xiaodong¹, YANG Xincheng¹, XU Tingting¹, GUAN Zhiyong¹, XUE Jianping², JIANG Jiafu¹, CHEN Sumei¹, FANG Weimin¹, CHEN Fadi¹, and ZHANG Fei^{1,*}

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Landscape Agriculture, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China; ²Shanghai Honghua Horticulture Co. Ltd., Shanghai 200070, China)

Abstract: Genetic relationship amongst the 6 cultivars of cut chrysanthemum and their 38 F_1 hybrids derived from a 2×4 incomplete diallel cross was unraveled by SRAP markers. The SRAP genotyping suggested that of the 229 fragments produced by 17 SRAP primer combinations 127 were polymorphic, with an average of 7.5 polymorphic fragments per primer combination, thus indicative of a moderate molecular diversity present in the entries. The Nei's genetic distances were estimated between 0.11 - 0.25 and averaged at 0.19, denoting a close genetic relationship among the parental cultivars. The SRAP-based genetic similarity was calculated at 0.42 - 0.72 and 0.40 - 0.85, respectively, for the parental cultivars

收稿日期: 2017-02-03; **修回日期:** 2017-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370699, 31372092, 31471900, 31572152); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201403039); 上海市种业发展项目 [沪农科种字 (2016) 第 1-14 号]; 江苏省农业三新工程项目 (SXGC[2016]318)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangfei@njau.edu.cn)

and the F₁ hybrids, and the median of genetic similarity (0.61) for the hybrids were higher than that (0.55) for parental cultivars. This suggests a narrowing genetic base or homogenization during hybridization in chrysanthemum, despite the occurrence of some variant lines. Based on genetic similarity matrix, the UPGMA clustering classified the investigated entries into two major groups well congruent with female parents and cross combinations, reinforcing the reliability of SRAP markers in distinguishing F₁ hybrids resulted from different combinations in chrysanthemum.

Keywords: chrysanthemum; hybrid progeny; incomplete diallel cross; genetic similarity; molecular identification; SRAP marker

近年来, 转基因等各种分子育种方法在菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 种质创新中逐渐扮演重要角色 (成丽娜 等, 2013; 陈发棣 等, 2016), 但杂交育种依然是目前培育菊花新品种的最重要途径。一般认为, 合理的亲本选择和选配是提高菊花杂交育种效率的重要前提之一。目前, 关于菊花品种遗传多样性和亲缘关系的报道甚多 (韩洁 等, 2007; 缪恒彬 等, 2007; 李仁伟 等, 2012; 张冬菊 等, 2014; Zhang et al., 2014), 相关研究结果为菊花杂交育种的亲本选配提供了重要参考依据。然而, 随着育种工作的不断深入, 菊花品种之间的遗传关系已难以厘清, 而且许多研究的聚类结果与外部表型没有必然关系 (Klie et al., 2013; Roein et al., 2013; Li et al., 2016), 这给后续育种工作带来较大困难。作者认为, 在长期的杂交育种和人为选择过程中, 育成菊花新品种的遗传基础变窄和同质化可能是造成这一现象的主要原因。然而, 迄今鲜见关于菊花亲本品种与其杂交后代遗传关系的报道。

目前, 菊花上常用的分子标记主要包括 RAPD、ISSR、AFLP、SRAP、SCoT 等 (Zhang et al., 2010; 李丕睿 等, 2013; Klie et al., 2016; Li et al., 2016)。一般认为, SSR 的共显性有利于分子多态性分析。目前, 关于菊花及其近缘属种 SSR 标记开发和应用方面的研究也有相关报道 (Wang et al., 2013, 2014a, 2014b; Zhang et al., 2014; Li et al., 2016), 但是 SSR 的共显性难以在高倍和高度杂合的菊花中真实表现。相比之下, SRAP 标记具有操作简便快速, 重复性好, 多态性丰富, 成本低等优点, 已经广泛并有效用于菊花遗传资源评价 (李仁伟 等, 2012; 张冬菊 等, 2014; Li et al., 2016)、连锁作图 (Zhang et al., 2011a; Wang et al., 2014a, 2014b; Peng et al., 2015) 和关联分析 (李仁伟 等, 2012; Li et al., 2016; Su et al., 2016) 等方面研究。

本试验拟通过聚类分析研究 SRAP 分子标记在菊花不完全双列杂交后代鉴定中的有效性及亲本品种与杂交后代群体的遗传关系, 同时通过遗传相似系数估算探讨杂交对菊花遗传基础的影响。相关研究结果将进一步丰富菊花杂交育种理论, 为提高菊花杂交育种效率提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料包括 6 个菊花亲本品种 (图 1) 及其 38 个杂交后代。2014 年秋以 ‘南农紫莓’ (ZM)、‘南农霞霞’ (CX) 为母本, 以 ‘南农方舟’ (FZ)、‘南农洒金’ (SJ)、‘南农金灿’ (JC) 和 QX113 为父本, 按照 2 × 4 不完全双列杂交 (NC II) 设计进行人工辅助授粉杂交, 共配制出 8 个杂交组合。2014 年底收取各组合杂交种子, 并于 2015 年春播种, 同时扦插亲本。从各组合内任意筛选 4 ~ 6 个杂交后代用于遗传关系分析, 具体编号为: A1 ~ A5 (ZM × FZ), B1 ~ B4 (ZM × SJ), C1 ~ C5

(ZM × JC), D1 ~ D5 (ZM × QX113), E1 ~ E4 (CX × FZ), F1 ~ F6 (CX × SJ), G1 ~ G5 (CX × JC), H1 ~ H4 (CX × QX113)。



图 1 6 个菊花亲本品种的花序特征
Fig. 1 Inflorescence characteristics of the 6 parental cultivars of chrysanthemum

1.2 DNA 提取与 SRAP 分子标记

在幼苗期取供试材料顶端的新鲜嫩叶，采用改良的 CTAB 法 (Porebski et al., 1997) 提取基因组 DNA，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪检测 DNA 的质量和浓度，稀释浓度至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ， $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。

利用 6 个亲本在 12 个正向引物和 9 个反向引物中筛选出 17 对多态性 SRAP 引物组合。各 SRAP 引物 (表 1) 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。SRAP-PCR 扩增体系参照张飞等 (2009) 的方法并做适当修改，包括 $2 \mu\text{L}$ $10\times$ 缓冲液，终浓度 $0.23 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs， $2.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} ，各 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正、反向引物， 1.0 U *Taq* 酶， 100 ng 的 DNA 模板，用 ddH_2O 补充至 $20 \mu\text{L}$ 。SRAP-PCR 反应程序 (Li & Quiros, 2001): $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 ; $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。扩增反应结束后，取 $5 \mu\text{L}$ 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，电极缓冲液为 $1\times$ TBE，电泳结束后进行醋酸固定、银染显色等步骤，并在胶片观察灯上拍照记录。

表 1 本研究中的 SRAP 引物序列
Table 1 Sequences of the SRAP primers used in this study

正向引物 Forward primer	序列 Sequence	反向引物 Reverse primer	序列 Sequence
Me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em2	5'-GACTGCGTACGAAT TTGC-3'
Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em5	5'-GACTGCGTACGAATT AAC-3'
Me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	Em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
Me6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	Em7	5'-GACTGCGTACGAAT TATG-3'
Me8	5'-TGAGTCCAAACCGGTGT-3'	Em10	5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'
Me9	5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	Em11	5'-GACTGCGTACGAATTTCCG-3'
Me10	5'-TGAGTCCAAACCGGATG-3'	Em14	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
Me13	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	Em15	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'
Me16	5'-TGAGTCCAAACCGGAGG-3'	Em16	5'-GACTGCGTACGAATTCGG-3'
Me21	5'-TGAGTCCTTCCGGAGT-3'		
Me23	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'		
Me24	5'-TGAGTCCAAACCGGATG-3'		

1.3 数据统计与分析

根据 SRAP-PCR 扩增产物的电泳结果, 在 100 ~ 500 bp 之间, 在某个相同迁移率位置上有 DNA 条带的记为“1”, 没有的记为“0”。根据 1、0 矩阵, 利用 NTsys2.10e 软件 (Rohlf, 2005) 计算亲本之间的 Nei's 遗传距离, 以及亲本和杂交后代之间的 SM 遗传相似系数; 并根据 SM 遗传相似系数矩阵进行 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) 聚类。最后利用 SPSS v20.0 软件 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) 绘制菊花亲本品种及其杂交后代遗传相似系数箱式图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 扩增多态性

用初筛的 17 对 SRAP 引物组合在 6 个菊花亲本品种及其 38 个杂交后代中共扩增得到 229 条带, 其中多态性条带 127 条, 多态性位点百分率为 56.0%, 平均每对引物扩增出 7.5 条多态性条带 (表 2), 说明供试亲本及其杂种在 DNA 水平上存在一定的遗传差异。

2.2 亲本间遗传距离

基于 SRAP 分子标记数据, 6 个菊花亲本品种之间的 Nei's 遗传距离见表 3。

供试亲本间遗传距离在 0.11 (‘南农晨霞’与‘南农洒金’) ~ 0.25 (‘南农方舟’与‘南农金灿’) 之间, 平均遗传距离为 0.19。说明本研究中 6 个菊花亲本品种之间的亲缘关系较近。

表 2 17 对多态性 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 2 The amplified results for the 17 polymorphic SRAP primer combinations

引物组合 Primer combination	扩增条带数 Number of bands scored	多态性条数 Number of polymorphic bands	多态性比率/% Ratio of polymorphic bands
Me2Em2	16	5	31.3
Me16Em2	12	8	66.7
Me5Em5	12	8	66.7
Me1Em6	14	10	71.4
Me1Em7	8	4	50.0
Me5Em7	15	10	66.7
Me6Em10	15	7	46.7
Me13Em11	14	7	50.0
Me24Em11	19	10	52.6
Me9Em14	17	7	41.2
Me23Em14	14	5	35.7
Me6Em15	8	4	50.0
Me8Em15	10	4	40.0
Me16Em15	17	10	58.8
Me21Em15	15	10	66.7
Me1Em16	11	9	81.8
Me10Em10	12	9	75.0
总计 Total	229	127	
平均 Mean	13.5	7.5	56.0

表 3 6 个菊花亲本品种的 Nei's 遗传距离

Table 3 The Nei's genetic distance among the 6 parental cultivars of chrysanthemum

品种 Cultivar	南农紫莓 Nannong Zimei	南农晨霞 Nannong Chenxia	南农方舟 Nannong Fangzhou	南农洒金 Nannong Sajin	南农金灿 Nannong Jincan
南农晨霞 Nannong Chenxia	0.18				
南农方舟 Nannong Fangzhou	0.23	0.16			
南农洒金 Nannong Sajin	0.17	0.11	0.17		
南农金灿 Nannong Jincan	0.21	0.21	0.25	0.21	
QX113	0.19	0.20	0.21	0.19	0.18

2.3 菊花亲本品种及其杂交后代的聚类分析

根据基于 SRAP 分子标记的 SM 遗传相似系数, UPGMA 聚类将 6 个菊花亲本品种及其 38 个杂交 F₁ 后代划分为 I 和 II 两大类 (图 2)。

第 I 类为以‘南农紫莓’(ZM)为母本的杂交后代。该类根据父本类型可以明显分为 4 个亚组, 其中, 亚组 a 包括‘南农紫莓’及其与‘南农洒金’(SJ)的 4 个杂交后代 (B1 ~ B4); 亚组 b、c

和 d 分别为‘南农紫莓’及其与‘南农金灿’(JC)、“南农方舟”(FZ)和 QX113 的杂交后代(分别为 C1~C5、A1~A5、D1~D5)。然而, 杂交父本均未聚在第 I 类。

第 II 类为以‘南农晨霞’(CX)为母本的杂交组合后代。该类根据父本类型也可以明显分为 4 个亚组, 亚组 e 包括‘南农晨霞’、‘南农洒金’及其 6 个杂交后代(F1~F6), 其中杂种单株 F3 与父本‘南农洒金’的遗传关系最近; 亚组 f 为父本‘南农方舟’及其 4 个杂交后代(E1~E4); 亚组 g 包括 QX113 及其 4 个杂交后代(H1~H4); 亚组 h 为‘南农金灿’及其 5 个杂交后代(G1~G5)。可见, 4 个父本品种均聚到第 II 类。

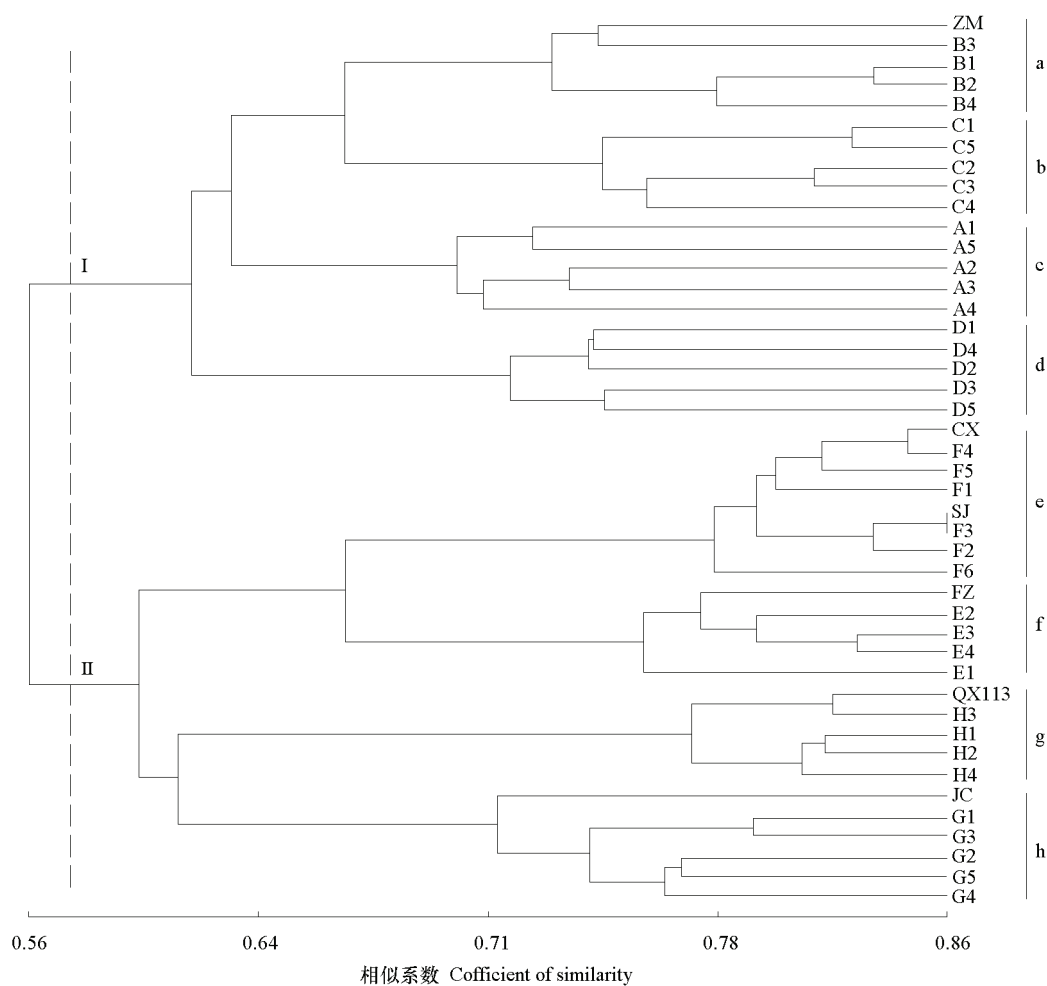


图 2 基于 Dice 相似系数的 6 个菊花亲本品种及其 38 份杂交后代的 UPGMA 聚类

ZM: 南农紫莓; CX: 南农晨霞; SJ: 南农洒金; FZ: 南农方舟; JC: 南农金灿。A: ZM × FZ; B: ZM × SJ; C: ZM × JC; D: ZM × QX113; E: CX × FZ; F: CX × SJ; G: CX × JC; H: CX × QX113。

Fig. 2 UPGMA dendrogram of the 6 parental chrysanthemum cultivars and their 38 hybrid progenies, based on Dice similarity

ZM: Nannong Zimei; CX: Nannong Chenxia; SJ: Nannong Sajin; FZ: Nannong Fangzhou; JC: Nannong Jincan. A: ZM × FZ; B: ZM × SJ; C: ZM × JC; D: ZM × QX113; E: CX × FZ; F: CX × SJ; G: CX × JC; H: CX × QX113.

2.4 菊花亲本及其杂交后代的遗传相似系数比较

图 3 为 6 个菊花亲本品种及其 38 个杂交后代遗传相似性系数的箱式图。由图 3 可知, 6 个亲本品种的遗传相似系数在 0.42~0.72 之间, 38 个杂交后代的遗传相似系数介于 0.40~0.85 之间。从遗

传相似系数的中位数来看, 杂交后代 (0.61) 高于亲本品种 (0.55)。

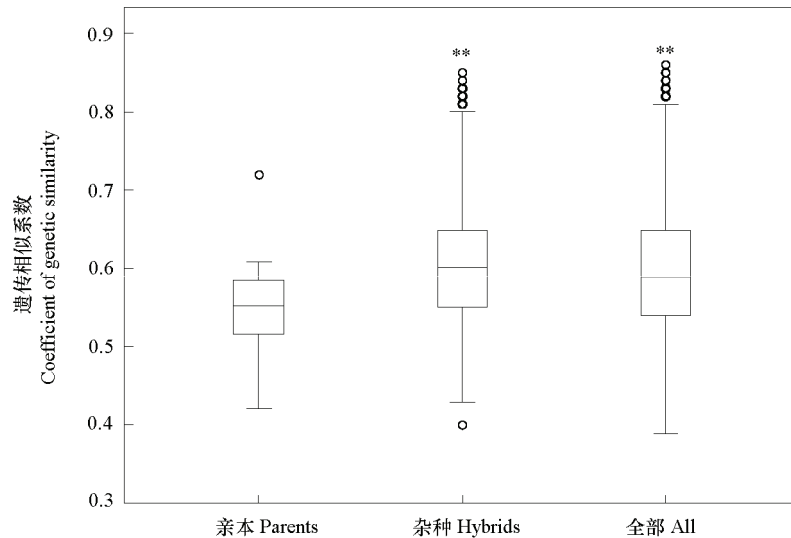


图 3 菊花亲本品种及其杂交后代遗传相似系数的箱式图

** 表示杂种或全部样本的遗传相似系数均值在 0.01 水平显著高于亲本品种。

Fig. 3 Box plots of the coefficients of genetic similarity for the parental cultivars and their hybrids of cut chrysanthemum

** indicates the mean genetic similarity of hybrids or all samples is significantly higher than that of the parental cultivars at $P < 0.01$.

3 讨论

常规杂交育种是菊花最重要育种途径, 而科学选配亲本、摸清目标性状的遗传规律将有助于杂交育种效率的提高(张飞等, 2010)。因此, 目前菊花育种工作者将重点投在菊花品种资源评价(韩洁等, 2007; 缪恒彬等, 2007; Klie et al., 2013; Roein et al., 2013; Zhang et al., 2014; 张冬菊等, 2014; Li et al., 2016)及相关性状在 F₁ 代的遗传规律等方面(张飞等, 2010; Zhang et al., 2011b; Wang et al., 2014b; Peng et al., 2015; 唐海强等, 2015)。本研究中利用 SRAP 分子标记探讨了切花菊亲本品种及与其不完全双列杂交后代之间的遗传关系, 研究结果将有助于进一步在 DNA 水平理解菊花杂交后代的遗传变异, 指导菊花杂交育种实践。

3.1 SRAP 标记的多态性及在菊花杂种鉴定中的应用

在以往研究中, SRAP 标记在菊花品种资源中表现出较好的多态性。李仁伟等(2012)研究发现 SRAP 标记在 58 个传统大菊中的多态性位点比率约为 80%; 张冬菊等(2014)发现 SRAP 标记在 59 份切花菊中的多态性位点比率高达 93.2%; 最近, Li 等(2016)报道 159 份切花菊 SRAP 多态性位点比例为 83.7%。本研究中, 17 对 SRAP 引物组合在 6 份切花菊亲本品种及 38 个不完全双列杂交 F₁ 代的多态性位点比率为 56%, 明显低于在品种中的报道。

杂种鉴定是植物杂交育种工作的重要环节(韩国辉等, 2010; 吴静等, 2013)。由于绝大多数菊花品种自交不亲和, 通过严格的人工控制授粉技术创造的杂交后代为真杂种, 所以在菊花品种间杂交育种实践中一般不需进行杂种鉴定, 杂种鉴定多用于菊花及其近缘种属的远缘杂交中(李辛雷等, 2005; 赵宏波等, 2008)。现有文献表明, SRAP 分子标记在其他许多作物单个杂交组合后代的分子鉴定和遗传关系研究中表现出较好的可信度和鉴别力(Riaz et al., 2008; Huang et al., 2014),

而目前关于不同杂交组合后代的分子鉴定研究还比较少。韩国辉等(2010)利用 SSR 分子标记有效鉴定了沙田柚两个杂交组合后代的杂种性质及其遗传多样性; Bianco 等(2011)利用 ISSR 分子标记鉴定了菊苣不同杂交组合后代的杂种性质,但目前尚无 SRAP 标记在不同杂交组合后代分子鉴定的相关报道。本研究中, SRAP 分子标记可以根据母本及杂交组合类型将 6 个切花菊品种及其 38 个不完全双列杂交后代明显区分开,说明 SRAP 分子标记可以有效用于菊花不同杂交组合后代的分子鉴定。

3.2 菊花杂交亲本对其后代遗传基础的影响

在杂交育种过程中,一般认为遗传差异较大的亲本之间杂交产生丰富变异的几率也比较大;相同条件下,菊花的高倍性和高度杂合性会进一步增加杂交后代的遗传变异。前期在菊花遗传研究中也发现超亲分离个体普遍存在(Zhang et al., 2011b; Wang et al., 2014a; Peng et al., 2015; 唐海强等, 2015)。本研究中,菊花亲本品种及其杂交后代的遗传相似系数分别介于 0.42 ~ 0.72 和 0.40 ~ 0.85,可以判断杂交后代中也出现一些差异较大的个体,为选育优异育种中间材料提供机会。

但是,本研究中菊花杂交后代遗传相似系数的中位数显著高于亲本品种,这在一定程度上说明菊花的遗传基础在杂交过程中进一步变窄,类似研究在黑莓中也有报道(Stafne & Clark, 2004)。这种在长时间且强烈的杂交过程中产生的同质化会逐渐丧失遗传变异度;同时,由于菊花存在近交衰退现象,遗传相似度较大的品种间杂交产生劣变的几率也逐渐增强,为菊花杂交育种工作带来一定难度。因此,在今后菊花育种工作中,应多选遗传差异较大的品种进行杂交,最大限度确保杂交后代延续菊花的遗传多样性,且应避免同一个亲本品种反复用于各种杂交育种实践。

References

- Bianco C L, Fernández J A, Migliaro D, Crinò P, Egea-Gilabert C. 2011. Identification of F₁ hybrids of artichoke by ISSR markers and morphological analysis. *Molecular Breeding*, 27 (2): 157 - 170.
- Chen Fa-di, Chen Su-mei, Fang Wei-min, Zhang Fei, Jiang Jia-fu, Teng Nian-jun, Guan Zhi-yong, Wang Hai-bin, Song Ai-ping, Zhao Shuang. 2016. Discovery of excellent chrysanthemum germplasms and germplasm enhancement. *Science Foundation in China*, 30 (2): 112 - 116. (in Chinese)
- 陈发棣, 陈素梅, 房伟民, 张 飞, 蒋甲福, 滕年军, 管志勇, 王海滨, 宋爱萍, 赵 爽. 2016. 菊花优异种质资源挖掘与种质创新研究. *中国科学基金*, 30 (2): 112 - 116.
- Cheng Li-na, Wei Qian, Muhammad Imtiaz, Gao Jun-ping, Hong Bo. 2013. Advances in application of transgenic breeding technology in the traits improvement of chrysanthemum. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (9): 1813 - 1825. (in Chinese)
- 成丽娜, 魏 倩, Muhammad Imtiaz, 高俊平, 洪 波. 2013. 转基因育种技术在菊花性状改良中的应用进展. *园艺学报*, 40 (9): 1813 - 1825.
- Han Guo-hui, Xiang Su-qiong, Wang Wei-xing, Wei Xu, He Bo, Li Xiao-lin, Liang Guo-lu. 2010. Identification and genetic diversity of hybrid progenies from Shatian pummelo by SSR. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (22): 4678 - 4686. (in Chinese)
- 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 魏 旭, 何 波, 李晓林, 梁国鲁. 2010. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析. *中国农业科学*, 43 (22): 4678 - 4686.
- Han Jie, Hu Nan, Li Yu-ge, Shang Fu-de. 2007. Genetic diversity of chrysanthemum cultivars revealed by AFLP analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 1041 - 1046. (in Chinese)
- 韩 洁, 胡 楠, 李玉阁, 尚富德. 2007. 菊花品种资源遗传多样性的 AFLP 分析. *园艺学报*, 34 (4): 1041 - 1046.
- Huang C Q, Liu G D, Bai C G, Wang W Q, Tang J. 2014. Application of SRAP markers in the identification of *Stylosanthes guianensis* hybrids. *Molecular Biology Reports*, 41 (9): 5923 - 5929.

- Klie M, Menz I, Lind M, Debener T. 2013. Lack of structure in the gene pool of the highly polyploid ornamental chrysanthemum. *Molecular Breeding*, 32: 339 - 348.
- Klie M, Menz I, Marcus L, Debener T. 2016. Strigolactone pathway genes and plant architecture: association analysis and QTL detection for horticultural traits in chrysanthemum. *Molecular Genetics and Genomics*, 291: 957 - 969.
- 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 (2): 455 - 461.
- Li P, Zhang F, Chen S, Jiang J, Wang H, Su J, Fang W, Guan Z, Chen F. 2016. Genetic diversity, population structure and association analysis in cut chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Molecular Genetics and Genomics*, 291: 1117 - 1125.
- Li Pi-rui, Jiang Jia-fu, Chen Su-mei, Guan Zhi-yong, Liao Yuan, Fang Wei-min, Chen Fa-di. 2013. Establishment an optimization of SCoT molecular marker system in *Chrysanthemum* and its application of analysis on genetic diversity. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (10): 2015 - 2025. (in Chinese)
- 李丕睿, 蒋甲福, 陈素梅, 管志勇, 廖 园, 房伟民, 陈发棣. 2013. 菊属植物 SCoT 分子标记技术在遗传多样性分析中的应用. *园艺学报*, 40 (10): 2015 - 2025.
- 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.
- Li Xin-lei, Chen Fa-di, Cui Na-xin. 2005. Identification of interspecific hybrids in *Dendranthema*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28 (1): 24 - 28. (in Chinese)
- 李辛雷, 陈发棣, 崔娜欣. 2005. 菊属种间杂种的鉴定. *南京农业大学学报*, 28 (1): 24 - 28.
- 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.
- Peng H, Zhang F, Jiang J, Chen S, Fang W, Guan Z, Chen F. 2015. Identification of quantitative trait loci for branching traits of spray cut chrysanthemum. *Euphytica*, 202: 385 - 392.
- Porebski S, Bailey L G, Baum B R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15 (1): 8 - 15.
- Riaz A, Li G, Quresh Z, Swati M S, Quiros C F. 2008. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding*, 120 (5): 411 - 415.
- Rooin Z, Asil M H, Sabouri A, Dadras A R. 2013. Genetic structure of *Chrysanthemum* genotypes from Iran assessed by AFLP and phenotypic traits. *Plant System and Evolution*, 300: 493 - 503.
- Rohlf F J. 2005. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software, New York.
- Stafne E T, Clark J R. 2004. Genetic relatedness among eastern North American blackberry cultivars based on pedigree analysis. *Euphytica*, 139: 95 - 104.
- Su J, Zhang F, Li P, Guan Z, Fang W, Chen F. 2016. Genetic variation and association mapping of waterlogging tolerance in chrysanthemum. *Planta*, 244: 1241 - 1252.
- Tang Hai-qiang, Zhang Fei, Chen Fa-di, Fang Wei-min, Wang Chu-chu, Chen Su-mei. 2015. Heterosis and mixed genetic analysis of inflorescence traits of anemone-typed chrysanthemum. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (5): 907 - 916. (in Chinese)
- 唐海强, 张 飞, 陈发棣, 房伟民, 王楚楚, 陈素梅. 2015. 托桂型菊花花器性状杂种优势与混合遗传分析. *园艺学报*, 42 (5): 907 - 916.
- Wang C, Zhang F, Guan Z, Chen S, Jiang J, Fang W, Chen F. 2014a. Inheritance and molecular markers for aphid (*Macrosiphoniella sanbourni*) resistance in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Scientia Horticulturae*, 180: 220 - 226.
- Wang H, Jiang J, Chen S, Qi X, Peng H, Li P, Song A, Guan Z, Fang W, Liao Y, Chen F. 2013. Next-generation sequencing of the *Chrysanthemum*

- nankingense* (Asteraceae) transcriptome permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *PLoS ONE*, 8 (4): E62293.
- Wang H, Qi X, Gao R, Wang J, Dong B, Jiang J, Chen S, Guan Z, Fang W, Liao Y, Chen F. 2014b. Microsatellite polymorphism among *Chrysanthemum* sp. polyploids: the influence of whole genome duplication. *Scientific Report*, 4: 6730.
- Wu Jing, Cheng Fang-yun, Zhang Dong. 2013. Utilizing 'Hing Noon' in the crossing breeding of tree peonies and early identification of some hybrids by AFLP makers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 33 (8): 1551 - 1557. (in Chinese)
- 吴 静, 成仿云, 张 栋. 2013. '正午' 牡丹的杂交利用及部分杂种 AFLP 鉴定. *西北植物学报*, 33 (8): 1551 - 1557.
- Zhang Dong-ju, Li Shi-chao, Wu Peng-fu, Zhang Xiao, Li Qiu-xiang, Yang Shu-hua, Jia Rui-dong, Ge Hong. 2014. Genetic diversity analysis in cut chrysanthemum cultivars based on morphology and SRAP markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (1): 118 - 130. (in Chinese)
- 张冬菊, 李世超, 吴鹏夫, 张 晓, 李秋香, 杨树华, 贾瑞冬, 葛 红. 2014. 基于表型和 SRAP 标记的切花菊品种遗传多样性分析. *园艺学报*, 41 (1): 118 - 130.
- Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W, Chen Y, Li F. 2011a. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). *Molecular Breeding*, 27: 11 - 23.
- Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W, Deng Y, Chang Q, Liu P. 2011b. Genetic analysis and associated SRAP markers for flowering traits of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Euphytica*, 177: 15 - 24.
- Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W, Li F. 2010. A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 125: 422 - 428.
- 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 Fei, Fang Wei-min, Chen Fa-di, Chen Su-mei. 2010. Combining ability analysis on ornamental characters of chrysanthemum. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (4): 589 - 596. (in Chinese)
- 张 飞, 房伟民, 陈发棣, 陈素梅. 2010. 菊花观赏性状的配合力分析. *园艺学报*, 37 (4): 589 - 596.
- Zhang Y, Dai S, Hong Y, Song X. 2014. Application of genomic SSR locus polymorphisms on the identification and classification of chrysanthemum cultivars in China. *PLoS ONE*, 9: e104856.
- Zhao Hong-bo, Chen Fa-di, Fang Wei-min, Guo Wei-ming, Xie Wei. 2008. Creating novel germplasms of chrysanthemum by employing the *Ajania pacifica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (7): 2077 - 2084. (in Chinese)
- 赵宏波, 陈发棣, 房伟民, 郭维明, 谢 伟. 2008. 利用亚菊属矾菊获得栽培菊花新种质. *中国农业科学*, 41 (7): 2077 - 2084.