

分类号 S682.1
U D C 635.9

学校代码 10129
学 号 2020202260017

内蒙古农业大学
硕士学位论文

石竹属 18 种花卉材料叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 的 SSR 分析
SSR analysis of chloroplast DNA and mitochondrial DNA
in 18 floral materials of the genus Dianthus

申 请 人： 王艺涵

学科门类： 农学

学科专业： 观赏园艺

研究方向： 观赏植物栽培生理与技术

指导教师： 贺学勤 教授

论文提交日期： 二〇二三年六月

摘 要

石竹属 (*Dianthus* L.) 植物为虫媒花, 自交与杂交现象十分普遍, 导致种类繁多, 命名混乱, 存在多种植物同名或一种植物多名的情况。这限制了对其进化关系的研究以及良种选育工作的开展。叶绿体基因组和线粒体基因组均具备母系遗传的特点。为了确定石竹属花卉的亲缘关系, 以及其遗传多样性状况, 本研究采用实验室获得的 SSR 引物, 对石竹属 18 种花卉材料叶绿体基因组 DNA 和线粒体基因组 DNA 进行了分析。结果如下:

1、对实验室筛选获得的 100 对 SSR 引物进行筛选, 挑选出 30 对具有多态性的 SSR 引物用于石竹属 18 种花卉材料叶绿体 DNA 基因组扩增, 对获得的多态性条带进行聚类, 计算得到的相似系数在 0.45-0.73 之间, 18 种材料聚为两个大类: 第一大类包括: *D. chinensis* cv. 的 Bicolor Rough Red-1、Bicolor Rough Red-2 和 Bicolor Rough Red-3, 以及 *D. caryophyllus* cv. pink、*D. superbus*、*D. knappii* 和 *D. barbatus* cv. 的 Sooty 和 Red; 第二大类包括 *D. chinensis* cv. 的 Bicolor Rough Star-1、Bicolor Rough Star-2、Bicolor Rough Star-3、Unies White、Bicolor Rough Eye-1、Bicolor Rough Eye-2、Bicolor Rough Eye-3、Fantasia Color-1、Fantasia Color-2 和 *D. chinensis* 野生种。

2、利用三对叶绿体基因组 SSR 引物: c18624_g1、c33100_g1 和 c36301_g1 组成的 ‘0、1’ 指纹图谱可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开。

3、对实验室筛选获得的 100 对 SSR 引物进行筛选, 挑选出 28 对具有多态性的 SSR 引物用于石竹属 18 种花卉材料线粒体 DNA 扩增, 对获得的多态性条带进行聚类, 计算得到的相似系数在 0.45-0.80 之间, 18 种材料聚为三个大类。第一大类包括: *D. chinensis* cv. 的 Bicolor Rough Red-1、Bicolor Rough Red-2、Bicolor Rough Red-3、Bicolor Rough Eye-1、Bicolor Rough Eye-2、Bicolor Rough Eye-3、Fantasia Color-1、Fantasia Color-2 和 *D. chinensis* 野生种, 以及 *D. caryophyllus* cv. pink、*D. superbus*; 第二大类包括: *D. chinensis* cv. 的 Bicolor Rough Star-1、Bicolor Rough Star-3、Bicolor Rough Star-2 和 Unies White; 第三大类包括: *D. knappii* 以及 *D. barbatus* cv. 的 Sooty 和 Red。

4、利用 3 对线粒体基因组 SSR 引物: c24596_g1、c30820_g1 和 c37368_g2 组成的 ‘0、1’ 指纹图谱可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开。

综上所述: 中国石竹栽培种花色多样, 遗传背景丰富, 遗传多样性丰富。

关键词: 石竹属; 叶绿体; 线粒体; SSR; 聚类分析; 指纹图谱

SSR analysis of chloroplast DNA and mitochondrial DNA in 18 floral materials of the genus *Dianthus*

Abstract

Plants of the genus *Dianthus* (*Dianthus* L.) are insect-borne flowers, and selfing and hybridisation are common, resulting in a wide variety of species and confusion over nomenclature, with multiple plants having the same name or more than one plant. This has limited the study of their evolutionary relationships and the selection of good species. Both the chloroplast genome and the mitochondrial genome are characterised by matrilineal inheritance. In order to determine the relatedness of flowers of the genus *Dianthus* and their genetic diversity, the chloroplast genomic DNA and mitochondrial genomic DNA of 18 floral materials of the genus *Dianthus* were analysed in this study using SSR primers obtained in the laboratory. The results are as follows:

1. A total of 100 SSR primers were screened in the laboratory, and 30 polymorphic SSR primers were selected for amplifying the chloroplast DNA genome of 18 *Dianthus* floral materials. The polymorphic bands obtained were clustered, and the similarity coefficients calculated ranged from 0.45 to 0.73. The 18 materials were divided into two major groups: The first group included *D. chinensis* cv. Bicolor Rough Red-1, Bicolor Rough Red-2, Bicolor Rough Red-3, *D. caryophyllus* cv. pink, *D. superbus*, *D. knappii*, and *D. barbatus* cv. Sooty and Red. The second group included *D. chinensis* cv. Bicolor Rough Star-1, Bicolor Rough Star-2, Bicolor Rough Star-3, Unies White, Bicolor Rough Eye-1, Bicolor Rough Eye-2, Bicolor Rough Eye-3, Fantasia Color-1, Fantasia Color-2, and the wild species of *D. chinensis*.

2. Using three chloroplast genome SSR primer pairs (c18624_g1, c33100_g, and c36301_g1) to generate a '0,1' fingerprint, the 18 *Dianthus* floral materials could be completely distinguished.

3. A total of 100 SSR primers were screened in the laboratory, and 28 polymorphic SSR primers were selected for amplifying the mitochondrial DNA of 18 *Dianthus* floral materials. The polymorphic bands obtained were clustered, and the similarity coefficients calculated ranged from 0.45 to 0.80. The 18 materials were divided into three major groups. The first group included *D. chinensis* cv. Bicolor Rough Red-1, Bicolor Rough Red-2, Bicolor Rough R-3, Bicolor Rough Eye-1, Bicolor Rough Eye-2, Bicolor Rough Eye-3, Fantasia Color-1, Fantasia Color-2, the wild species of *D. chinensis*, *D. caryophyllus* cv. pink, and *D. superbus*. The second group included *D. chinensis* cv. Bicolor Rough Star-1, Bicolor Rough Star-3, Bicolor Rough Star-2, and Unies White. The third group included *D. knappii* and *D. barbatus* cv. Sooty and Red.

4. Using three mitochondrial genome SSR primer pairs (c24596_g1, c30820_g1, and c37368_g2) to generate a '0,1' fingerprint, the 18 *Dianthus* floral materials could be completely distinguished.

In summary: Chinese gypsophila cultivars have diverse floral colors, rich genetic backgrounds, and abundant genetic diversity.

Key Words: *Dianthus* genus; Chloroplast; Mitochondria; SSR; Cluster analysis; Fingerprint profile

Directed by: Prof. He Xueqin
Applicant for Master degree: (Ornamental Horticulture)
(College of Mechanical and Electrical Engineering, Inner Mongolia Agricultural University,
Hohhot 010010, China.)

目 录

1 引言.....	1
1.1 石竹属观赏植物分布及形态多样性	1
1.2 观赏花卉总 DNA 的 SSR 分析.....	1
1.3 园艺作物细胞器 DNA 的 SSR 分析.....	2
1.4 分子标记在石竹属观赏植物遗传多样性中的应用	2
1.5 目的与意义.....	3
2 材料与方法.....	4
2.1 实验材料.....	4
2.2 花瓣形态指标记录.....	4
2.3 叶绿体与线粒体的分离与完整性观察	5
2.4 叶绿体和线粒体 DNA 的提取.....	5
2.5 DNA 完整性检测及浓度测量.....	5
2.6 SSR 引物筛选及扩增	6
2.7 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测	9
2.8 数据统计.....	9
3 结果与分析.....	10
3.1 石竹属花卉花瓣形态多样性分析	10
3.2 叶绿体基因组 SSR 分析	10
3.2.1 叶绿体提取及完整性检测.....	10
3.2.2 叶绿体 DNA 完整性检测及浓度计算.....	11
3.2.3 SSR 引物的的筛选及扩增.....	11
3.2.4 基于叶绿体 DNA 的 SSR 聚类分析.....	12
3.2.5 基于叶绿体 DNA 的 SSR 指纹图谱.....	13
3.3 线粒体基因组 SSR 分析	14
3.3.1 线粒体的提取及完整性检测.....	14
3.3.2 线粒体 DNA 完整性检测及浓度计算.....	14
3.3.3 SSR 引物筛选及扩增.....	14
3.3.4 基于线粒体 DNA 的 SSR 聚类分析.....	15
3.3.5 基于线粒体 DNA 的 SSR 指纹图谱.....	17
3.4 聚类对比.....	18
4 讨论.....	19
4.1 基于叶绿体基因组 SSR 分析石竹属花卉遗传多样性	19
4.2 基于线粒体基因组 SSR 分析石竹属花卉遗传多样性	20
4.3 基于叶绿体基因组 SSR 分析与线粒体基因组 SSR 分析的石	

竹属花卉多样性比较.....	21
5 结论.....	22
参考文献.....	23

插图和附表清单

1、表 1	石竹属供试材料	4
2、表 2	形态性状测定标准与记载方法	5
3、表 3	SSR-PCR 反应体系 SSR-PCR 反应体系	6
4、表 4	100 对初筛 pcr 筛选	6
5、表 5	石竹属 18 种花卉材料形态特征	10
6、表 6	石竹属 18 种花卉材料叶绿体 SSR-DNA 指纹图谱	19
7、表 7	石竹属 18 种花卉材料线粒体 SSR-DNA 指纹图谱	23
1、图 1	石竹属 18 种花卉材料的花瓣形态	5
2、图 2	叶绿体显微镜下观测	11
3、图 3	叶绿体 DNA 质量检测	11
4、图 4	引物 c18624_g1、c33100_g1 和 c36303_g1 扩增产物的琼脂糖电泳图	11
5、图 5	引物 c33100_g1 扩增叶绿体 SSR 指纹图	12
6、图 6	石竹属 18 种花卉材料叶绿体 SSR 聚类图	13
7、图 7	线粒体显微镜下观测	14
8、图 8	线粒体 DNA 质量检测	14
9、图 9	引物 c24596_g1、c30820_g1 和 c37368_g2 扩增产物的琼脂糖电泳图	15
10、图 10	引物 c30820_g1 扩增线粒体 SSR 指纹图	16
11、图 11	石竹属 18 种花卉材料线粒体的 SSR-DNA 聚类图	17

缩 略 语 表

SSR (Simple Sequence Repeats)	简单重复序列标记
cpSSR(Chloroplast simple sequence repeats)	叶绿体微卫星技术
mtSSR (Mitochondrial simple sequence repeats)	线粒体微卫星技术
SRAP (<i>Sequence—related amplified polymorphism</i>)	相关序列扩增多态性标记
ISSR (inter-simple sequence repeat)	简单序列间重复标记

1 引言

1.1 石竹属观赏植物分布及形态多样性

石竹属 (*Dianthus* L) 是石竹科 (Caryophyllaceae) 中一类常见的多年生或一年生草本植物^[1]。早在明朝时期,《花史》一书中就有记载:“石竹花须每年起根分种则茂”。石竹属花卉的最早描述出现在 1735 年的《*Systema Naturae*》一书中,书中共描述了 15 种石竹^[2-3]。石竹属包括了数百种植物,不仅种类繁多,其分布范围也囊括了欧洲、美洲、亚洲^[4]。

在欧洲地区石竹属花卉的分布范围非常广泛。地中海沿岸地区有许多石竹属花卉,常见的有: *Dianthus superbus* (瞿麦)^[5]、*Dianthus alpinus*^[6]、*Dianthus caryophyllus*^[7] (香石竹) 等。南英格兰地区的海滩上也可以看到一些石竹品种,如 *Dianthus deltoides*^[8] (少女石竹)、*Dianthus gratianopolitanus*^[9]。在东欧地区也有 *Dianthus carthusianorum*^[10]、*Dianthus plumarius*^[11] 等石竹品种。美洲的石竹属花卉分布范围广泛,涵盖了北美洲从阿拉斯加到墨西哥湾的地区,以及南美洲的部分地区^[12]。如: *Dianthus barbatus*^[13] (须苞石竹)、*Dianthus knappii*^[14]、*Dianthus armeria*^[15]、*Dianthus giganteus*^[16] 等。亚洲也分布着种类繁多的石竹属花卉^[17],在伊朗地区发现的 *Dianthus pseudocrinitus*^[18]; 日本独有的石竹品种 *Dianthus superbus* var. *longicalycinus*^[19] 等。我国 *Dianthus chinensis* (中国石竹) 品种繁多^[20],早在 1995 年我国就报道了 17 种中国石竹^[21]。

全世界约有超过 300 种石竹属植物,中国石竹 (*Dianthus chinensis*), 美国石竹 (*Dianthus barbatus*) 和香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 是石竹属花卉中常见的杂交亲本,如中国石竹与美国石竹的一代交配种间杂交种天王星石竹系列^[22]、中国石竹种间杂交种魔琴系列、中国石竹与香石竹杂交种元红^[23] 等。本实验挑选了中国石竹 (*Dianthus chinensis*) 中的野生种以及 12 个栽培品种,美国石竹 (*Dianthus barbatus*) 的 2 个栽培品种, *Dianthus Knappii*, 瞿麦粉色花, 以及香石竹共 5 种石竹属花卉 18 种材料,具有较强的代表性。

1.2 观赏花卉总 DNA 的 SSR 分析

分子标记技术: Simple Sequence Repeats (SSR), 又称微卫星分子标记技术, 是一种常用于分子生物学和遗传学研究的分子标记技术^[24]。它可以通过分析 DNA 序列中的短重复序列对观赏花卉的遗传多样性进行分析^[25-26]。张旻桓等人^[27]利用筛选的 14 对 SSR 引物对 47 份牡丹资源 376 份样品的总 DNA 进行扩增, 分析其遗传多样性和亲缘关系, 结果表明: 江南牡丹品种中来源于湖南牡丹的品种相对其他来源的品种具有较高的遗传多样性。陈敏敏等人^[28]使用 16 对 SSR 标记对 65 个百合种质资源的总 DNA 进行扩增, 以检测其遗传信息, 分析遗传多样性, 结果表明这些标记可以为百合的种质鉴定和遗传多样性研究提供分子标记。Olejnik 等人^[29]利用 14 对 SSR 引物分析 97 个菊花品种的总 DNA, 评估其遗传多样性。结果表明使用 14 个选定的 SSR 标记可以将 97 种菊花分为四个大类。杨洁等人^[30]利用 SSR 标记对 32 个万寿菊属品种(系)进行遗传多样性分析及指纹图谱构建。结果表明: 48 对 SSR 引物中共筛选出 8 对多态性较好的引物, 在 32 个万寿菊材料总 DNA 中共扩增出 23 条谱带, UPGMA 聚类分析表明, 在相似系数 0.46 处可分为 2 大类群。谭晨等人^[31]采用 20 对 SSR 分子标记分析 27 个羽衣甘蓝主要栽培品种的总 DNA, 研究其亲缘关系和遗传多样性。结果表明, 27 份供试材料遗传距离变化范围在 0.419~0.855 之间, 各材料间存在一定的遗传多样性, 在遗传系数 0.63 处可将羽衣甘蓝品种分为 3 类。刘晓芬等人^[32]利用 13 个选定的 EST-SSR 标记对 129 个春兰品种

的遗传多样性进行研究,对129个春兰品种的总DNA扩增,共检测到具有多态性的等位基因111个,利用13个选定的SSR标记可以将129个春兰品种分为两大类。

1.3 园艺作物细胞器 DNA 的 SSR 分析

叶绿体简单序列重复: Chloroplast simple sequence repeats (cpSSR) 标记作为一种分子标记具有基因组较小、保守且仅从母本遗传的特点^[33],因此在亲缘关系和分类学研究中得到了广泛应用。郭琦等人^[34]利用 11 个牡丹样本,共检测到 139 个 cpSSR 位点。通过进一步的毛细管电泳检测,在 60 份牡丹种质中扩增出 19 个 cpSSR 标记,在这 19 个 cpSSR 标记中,有 12 个具有多态性。基于树状图显示的亲缘关系,可将 60 种牡丹划分为两个簇。周晓君等人^[35]比较了 6 个芍药属材料的 cpDNA,共发现了 143 个 SSR 位点,结果表明芍药属叶绿体基因组相对保守。王祎玲^[36]利用 cpSSR 分子标记研究发现,太行菊和长裂太行菊都具有较高的遗传多样性。Bock 等人^[37]对 8 个菊科物种的叶绿体基因组进行了测序,并对其 SSR 特征进行了比较和统计分析,结果表明叶绿体基因组结构高度保守。

线粒体基因组的大小和所包含的基因数量通常保持相对稳定^[38]。在园艺作物遗传多样性的研究中应用广泛:张跃建等人^[39]在甜瓜线粒体基因组上共发现 808 个 SSR 位点,并对 328 个位点进行了标记的开发。使用 11 份甜瓜变种进行 PCR 筛选及分析后,获得了由 89 对高多态性引物组成的核心标记,张大川等人^[40]对中国牛蒡属两种植物的线粒体基因组特征进行了分类和分,并析构建了线粒体基因组的系统发育树将这两种牛蒡属植物合并为菊科的一个分支。刘桂等人^[41]利用从 6 个芸苔线粒体基因组序列设计的 31 个多态性 SSR 引物在 92 份芸苔属材料中扩增出 48 条条带。在这 48 条条带中,13 条清晰且可重复的条带可用于区分不同物种的线粒体。李海梅等人^[42]研究线粒体基因组 SSR 标记技术,从 72 对标记中共筛选出 4 对在 30 份黄瓜品种呈现出多态性的引物。

植物的叶绿体基因组 DNA 与线粒体基因组 DNA 相较于总 DNA 小的多^[43],因此利用线粒体基因组与叶绿体基因组 SSR 构建指纹图谱可以更精准。张丹等人^[44]从具有多态性的 16 对 cpSSR 引物和 10 对 (mtSSR) 引物中挑选 4 对可以将 20 种党参材料完全区分。王崇等人^[45]根据 11 对 cpSSR 引物的扩增结果对引物多样性进行分析,构建的指纹图谱可将 104 种甘薯区分开。在观赏作物中: Singh 等人^[46]将 cpSSR 标记应用于剑兰的指纹图谱构建。

1.4 分子标记在石竹属观赏植物遗传多样性中的应用

石竹属花卉有着丰富的遗传多样性^[47]。在过去的几十年里,人们对其进行了广泛的研究^[48-50]。2013 年 12 月,《DNA Research》公布了对香石竹 *Dianthus caryophyllus* L. 进行的总 DNA 测序,其序列长度为 622MB,八木正文^[51]使用不同的新一代测序平台的组合测定香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L. cv. 'Francesco') 的全基因组序列。其总长度为 568,887,315 bp。武悦等^[52]通过高通量测序技术对瞿麦幼苗叶片的转录组进行测序,测得其长度为 15,384,267 bp。随着石竹属花卉测序结果的公布,分子标记法成为研究石竹遗传多样性主要方式。

Smilder 等人^[53-54]等通过 8 对 SSR 引物可将香石竹的 82 个品种完全区分开,每个 SSR 分子标记能够扩增出 4-16 个等位基因,有效等位基因数在 1.9-6.0 之间。傅小鹏等人^[55]使用 170 个 SRAP 位点和 10 对 ISSR 标记研究 24 种石竹属花卉的遗传多样性,结果表明所有个体的遗传相似性在 0.25 到 0.72 之间,在相似性 0.7 时可以将石竹全部区分开。Yagi 等人^[55]将 178 个 SSR 位点映射到 16 个连锁群中。这是首次报道主要

基于 SSR 标记的石竹属遗传连锁图谱。在 Kimura 等人^[56]的研究中: 41 个石竹品种中的 39 个品种, 除突变品种外, 利用 13 个 SSR 标记产生的 32 个等位基因和 15 个多态条带, 成功地进行了区分。蒋劭妍^[57]使用 10 个 SSR 标记分析了来自种内杂交的 2 个石竹品种的亲本, 并确认了亲本品种的杂交性。SRAP 和 ISSR 分子标记, 对在新疆收集的石竹属植物资源进行了种间指纹图谱分子构建及 4 个种种间及种内的遗传多样性的研究, 从 80 对 SRAP 引物中成功筛选出 16 对多态引物, 从 50 对 ISSR 中筛选出 6 对多态引物。结果表明: 瓣组与齿瓣组可以明显的区分开来, 其组内的遗传距离较小, 不同组物种之间的遗传距离相比较远, 平均遗传距离为 0.5424。王晶等人^[58]利用 SRAP 分子标记构建了 44 份石竹属花卉种质的指纹图谱。经遗传多样性分析, 44 份石竹属花卉被划分为五大类群。王永峰等人^[59]通过 SSR 分子标记筛选出 33 对引物, 在 28 种石竹属花卉中共扩增出 258 条带, 将 28 种石竹聚为三个大类, 利用 33 对引物中的 3 对构建指纹图谱, 可以将 28 种石竹属花卉完全区分开。

姜钟洙等人^[60]测定了中国石竹 (*Dianthus chinensis*) 的完整叶绿体基因组序列, 其长度为 149,570 bp。Jeong 等人^[61]测定了石竹科 (Caryophyllaceae) 植物长蕊石头花 (*Gypsophila oldhamiana* Miq) 的完整叶绿体基因组序列。其长度为 152,675 bp。凌丽珍等人^[62]测得石竹科植物山蚂蚱草 (*Silene jennisensis*) 完整叶绿体序列长度为 150,299 bp。随着石竹属花卉叶绿体基因组测序结果公布, 科学家们开始利用石竹属花卉叶绿体基因组研究其遗传多样性。高亚芳等人^[63]通过对石竹科药用植物金铁锁 (*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu) 叶绿体基因组的测序、组装和注释, 明确了其基因组成, 进而利用叶绿体全基因组构建系统发育进化树, 解析了石竹科属间的系统发育关系。

1.5 目的与意义

石竹属 (*Dianthus L*) 植物为虫媒花, 自交与杂交现象十分普遍^[64-65]。这就导致石竹属花卉种类繁多, 命名混乱, 存在多种植物同名或一种植物多名的情况^[59]。这限制了对其进化关系的研究以及良种选育工作的开展。为了更好地确定石竹属花卉的亲缘关系, 揭示其遗传结构, 探索遗传多样性, 本研究利用实验室获得的 SSR 分子标记, 对石竹属 18 种花卉材料的叶绿体基因组与线粒体基因组进行了分析, 以期探寻材料之间的遗传多样性, 从而构建相应的指纹图谱。本研究可为今后育种材料亲本配制和品种鉴别提供科学依据, 因此具有一定的实际价值和理论意义。

2 材料与方法

2.1 实验材料

中国石竹栽培种中的双色花，按照双色的分布情况，分为 3 大类：第一大类 (*D. chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Star 系列)，为白色部分占整个花瓣花色的 2/3 以上；第二大类 (*D. chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Eye 系列)，为白色部分占整个花瓣花色的 1/3 以下；第三大类 (*D. chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Red 系列)，无白色。本试验在种植于内蒙古农业大学温室中的中国石竹品种中，从 3 种双色花类型中各挑选了 3 个花色的石竹品种、2 种花色类型奇异的品种 (*D. chinensis* 栽培种奇异花 Fantasia Color 系列)；同时选取了中国石竹纯白色花 (*D. chinensis* 栽培种白色花 Unies White 系列)、香石竹粉色花、2 种须苞石竹 (*D. barbatus* 栽培种系列)、*D. Knappii* 以及从大青山收集的中国石竹和瞿麦野生种共 18 种花卉材料(表 1)。除大青山收集的中国石竹和瞿麦野生种外，其余材料均购自 www.outsidepride.com。

18 种花卉材料的叶片均采自植株的第 4-5 叶，放入冰盒中带回实验室，用于提取叶绿体和线粒体。每个材料取 3 株分别进行收集。

2.2 花瓣形态指标记录

花瓣外形中的数量指标采用直尺进行测量，而质量指标则采用照相进行记录，指标及其测量标准见表 2，每个材料取 3 株分别进行收集，形成对照。石竹属 18 种花卉材料开花形态如图 1。

表 1 石竹属供试材料
Table.1 Test material of the genus Dianthus

序号 No.	花色类型 flower color types	拉丁名 scientific name	简称 Abbreviations
1	<i>D. chinensis</i> 栽培种双色花 Bicolor Rough Star 系列	<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Star-1	<i>Dch</i> -BRS-1
2		<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Star-2	<i>Dch</i> -BRS-2
3		<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Star-3	<i>Dch</i> -BRS-3
4	<i>D. chinensis</i> 栽培种双色花 Bicolor Rough Eye 系列	<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Eye-1	<i>Dch</i> -BRE-1
5		<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Eye-2	<i>Dch</i> -BRE-2
6		<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Eye-3	<i>Dch</i> -BRE-3
7	<i>D. chinensis</i> 栽培种双色花 Bicolor Rough Red 系列	<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Red-1	<i>Dch</i> -BRR-1
8		<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Red-2	<i>Dch</i> -BRR-2
9		<i>D. chinensis</i> cv. Bicolor Rough Red-3	<i>Dch</i> -BRR-3
10	<i>D. chinensis</i> 栽培种 白色花 Unies White 系列	<i>D. chinensis</i> cv. Unies White	<i>Dch</i> -UW
11	中国石竹野生种	<i>D. chinensis</i>	<i>Dch</i>
12	香石竹粉色花	<i>D. caryophyllus</i> cv. pink	<i>Dca</i> -Pink
13	<i>D. chinensis</i> 栽培种奇异花 Fantasia Color 系列	<i>D. chinensis</i> cv. Fantasia Color-1	<i>Dch</i> -FC-1
14		<i>D. chinensis</i> cv. Fantasia Color-2	<i>Dch</i> -FC-2
15	<i>D. barbatus</i> 栽培种系列	<i>D. barbatus</i> cv. Sooty	<i>Db</i> a-Sooty
16		<i>D. barbatus</i> cv. Red	<i>Db</i> a-Red
17	<i>D. Knappii</i>	<i>D. knappii</i>	<i>Dkn</i>
18	瞿麦粉色花	<i>D. superbus</i>	<i>Dsu</i>

表 2 形态性状测定标准与记载方法

Table.2 Morphological trait determination standards and documentation methods

性状 Characteristics	测定标准与记载方法 Measurement standards and documentation methods
花直径	采用游标卡尺进行测定(单位: cm)
花瓣边缘锯齿深裂程度	分为 3 类: 浅裂(花瓣边缘至基部的 1/3 左右)、半裂(花瓣边缘至基部的 1/2 左右)、深裂(花瓣边缘分裂至基部左右)。
花序类型	花单生枝端、花集成聚伞花序
有无口红	分为 2 类: 无或有
花瓣是否含有白色	分为 2 类: 无或有

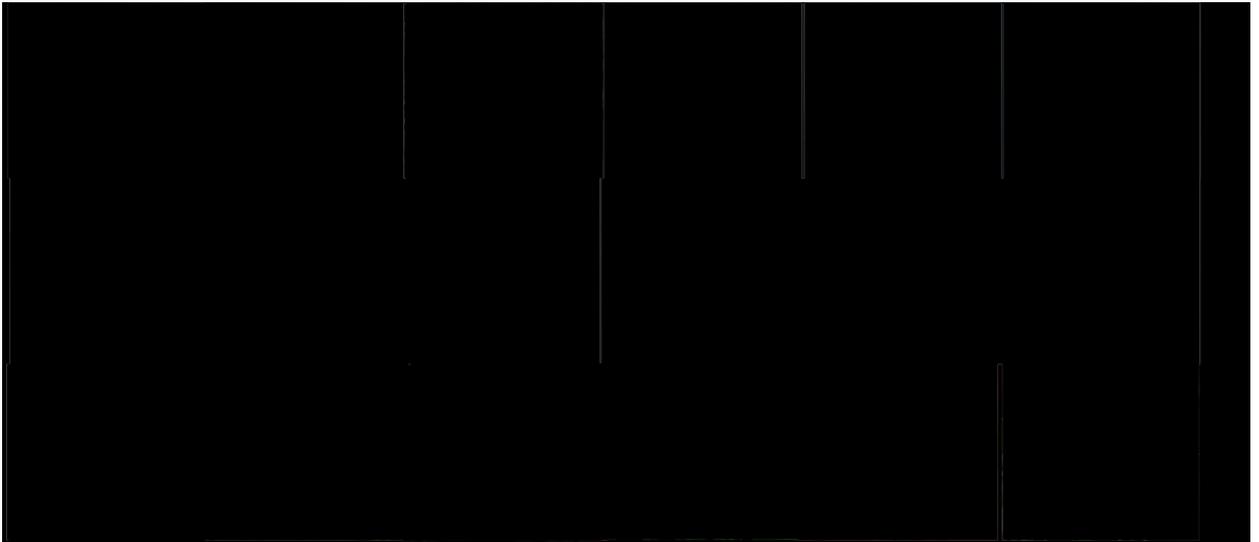


图 1 石竹属 18 种花卉材料的花瓣形态. 品种名称同表 1

Fig.1 Petal morphologies of 18 floral materials in Dianthus. Plant Species are same as those in Table 1

2.3 叶绿体与线粒体的分离与完整性观察

分别采用叶绿体分离和叶绿体酶提取试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司生产)和植物线粒体提取试剂盒(碧云天生物技术公司生产)分离叶绿体和线粒体,将分离后得到的叶绿体与线粒体储存在 4℃ 冰箱。在 Olympus BX53 显微镜下观察叶绿体与线粒体的完整性,并拍照。

2.4 叶绿体和线粒体 DNA 的提取

从 18 种花卉样本的三组重复中取出预先分离得到的叶绿体和线粒体,利用改良过的 CTAB 法^[66-67],逐步对叶绿体和线粒体中的其他物质剔除,经过一系列抽提步骤,最终使 DNA 呈现游离状态,经过沉淀、离心得到完整的叶绿体与线粒体 DNA。将提取到的叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 分别溶解在 DEPC 水中,制备成叶绿体 DNA 溶液和线粒体 DNA 溶液,做好标记并储存在 -80℃ 冰箱中。

2.5 DNA 完整性检测及浓度测量

在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测^[68],采用凝胶成像系统观测并记录;使用紫外分光光度计(UV1800)测定叶绿体 DNA 溶液和线粒体 DNA 溶液在吸光度 260nm 与 280 nm 下的比值,计算 DNA 含量。

2.6 SSR 引物筛选及扩增

从本实验室获得的 SSR 引物序列中, 根据扩增产物 100-500bp, GC 含量 35%-65%, 四碱基重复次数不多于 4, G 或 C 的单碱基重复少于 35, 两个引物 Tm 值差异控制在 4℃ 范围内, 初筛得到 100 对引物。

用 4 种石竹属花卉: *Dch-BRS-1*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRR-1*、*Dca-Pink* 的叶绿体 DNA 与线粒体 DNA 作为模板, 对初筛得到的 100 对引物扩增, SSR-PCR 反应体系如 (表 3)。扩增反应程序: 93℃ 预变性 3min; 93℃ 变性 30s, 57.3℃-62.2℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 34 个循环; 最后 72℃ 延伸 2min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶进行检测, 从中挑选出具有多态性的叶绿体 SSR 引物 30 对; 线粒体 SSR 引物 28 对 (表 4)。用于随后试验。

表 3 SSR-PCR 反应体系
Table.3 SSR-PCR reaction systems

试剂 Reagents	添加量 Amount added
Taq Mix	12.5μL
DEPC H ₂ O	8.5μL
Forward primer	1μL
Reversed primer	1μL
DNA	2μL
Total	25μL

表 4 100 对初筛引物 PCR 筛选
Table.4 PCR screening of 100 primer pairs for primary screening

引物名称 Primer name	退火温度 (℃) Annealing temperature	PCR 扩增温度 (℃) PCR amplification temperature	预测带大小 (bp) Predicted band size	叶绿体条带 Chloroplast DNA	线粒体条带 Mitochondrial DNA
c13378_g1	60.73	60.5	274		
c16233_g1	58.01	58.0	254		
c16684_g1	59.90	60.0	247		
c17052_g1	60.03	60.0	194		
c17240_g1	60.25	60.5	268		
c17790_g1	60.11	60.0	145	有	有
c17790_g1	60.11	60.0	145		
c18624_g1	60.04	60.0	257		
c21199_g1	59.89	60.0	160		
c21709_g1	59.15	59.5	267		
c22379_g1	60.11	60.0	112	有	
c22808_g1	59.96	60.0	243	有	
c24148_g1	58.00	58.0	108		
c24596_g1	59.90	60.0	190	有	有
c24616_g1	59.96	60.0	109		
c25452_g1	59.97	60.0	214		
c25801_g1	59.90	60.0	120		
c25933_g1	59.97	60.0	208		
c26745_g1	59.97	60.0	244		
c27142_g1	60.04	60.0	128	有	
c27798_g1	59.53	59.5	205	有	有
c27966_g1	59.63	59.5	275		有
c28612_g1	59.33	59.5	127		有

续表 4-2

引物名称 Primername	退火温度 (°C) Annealing temperature	PCR 扩增温度 (°C) PCR amplification temperature	预测带大小 (bp) size	叶绿体条带 Chloroplast DNA	线粒体条带 Mitochondrial DNA
c26503_g1	58.93	60.0	183		
c28886_g1	60.42	60.5	223		
c29133_g1	59.91	60.0	195		
c29396_g1	59.90	60.0	212		
c30306_g1	58.24	59.5	254		
c30311_g1	59.90	60.0	197	有	
c30675_g1	59.97	60.0	267	有	
c30744_g1	59.97	60.0	199		
c30820_g1	59.55	59.5	187	有	
c30947_g1	59.96	60.0	183		有
c31148_g1	60.18	60.0	147	有	
c31176_g2	59.81	60.0	149		
c31187_g1	60.03	60.0	245	有	
c31424_g2	59.97	60.0	245	有	
c31580_g1	59.96	60.0	270		
c31614_g1	59.93	60.0	255	有	
c31701_g1	57.18	58.0	265		
c31792_g1	58.37	58.5	252		
c32142_g1	60.11	60.0	244		
c32276_g2	60.25	60.5	271	有	
c32295_g1	59.96	60.0	181		
c32321_g1	60.04	60.0	152		
c32336_g1	60.00	60.0	180		
c32448_g1	59.19	59.5	246	有	有
c32503_g1	60.03	60.0	124		
c32696_g1	59.97	60.0	206		
c32697_g1	59.48	59.5	164		有
c32706_g1	59.96	60.0	266		
c32927_g1	59.14	59.5	242		
c32976_g1	59.41	59.5	224		
c33053_g1	59.80	60.0	280	有	
c33072_g1	59.67	59.5	260		
c33100_g1	58.28	59.5	243	有	
c33259_g1	57.26	59.5	205		
c33402_g1	60.18	60.0	240		有
c33811_g1	59.97	60.0	268		有
c33890_g2	60.11	60.0	208		
c33934_g1	59.96	60.0	177	有	有
c33947_g1	59.71	59.5	222	有	
c34060_g1	59.24	59.5	161		
c34172_g1	59.96	60.0	228	有	有

续表 4-3

引物名称 Primername	退火温度 (°C) Annealing temperature	PCR 扩增温度 (°C) PCR amplification temperature	预测带大小 (bp) size	叶绿体条带 Chloroplast DNA	线粒体条带 Mitochondrial DNA
c34352_g1	59.96	60.0	202	有	
c34447_g1	59.96	60.0	261		有
c34520_g3	59.28	59.5	196		有
c34569_g1	60.11	60.0	272		有
c35005_g1	59.29	59.5	249		
c35330_g1	60.03	60.0	262		
c35356_g2	60.11	60.0	207		有
c35429_g1	59.96	60.0	235		有
c35454_g1	60.11	60.0	225		有
c35667_g1	60.25	60.5	254		
c35915_g1	60.04	60.0	173		有
c35957_g1	60.11	60.0	171		有
c36018_g1	59.30	59.5	224		
c36303_g1	60.11	60.0	231	有	有
c36305_g1	59.93	60.0	223		有
c36347_g1	60.04	60.0	222		
c36489_g2	60.04	60.0	246		
c36533_g1	60.20	60.0	182	有	
c36558_g2	60.04	60.0	163	有	
c37098_g2	60.18	60.0	236		有
c37127_g1	59.54	59.5	250	有	有
c37166_g1	59.83	60.0	181	有	有
c37284_g3	60.03	60.0	218	有	有
c37368_g2	60.18	60.0	161		
c37435_g1	59.83	60.0	197	有	有
c37647_g1	59.47	59.5	216	有	有
c38147_g1	60.04	60.0	247		
c38635_g1	60.04	60.0	271		
c38712_g2	59.82	59.5	241	有	
c38800_g1	60.32	60.5	185		
c38903_g1	60.04	60.0	278		
c38951_g3	59.89	60.0	269		
c39244_g1	59.89	60.0	257		
c39252_g2	59.97	60.0	253		
c39806_g1	60.04	60.0	277		
c47581_g1	59.89	60.0	164		

2.7 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配制：6 mL 40%丙烯酰胺（Arc：Bis=39：1），3 mL 10 ×TBE，21 mL 去离子水，最后加入 300 μL 20%过硫酸铵，25 μL TEMED（现用现加）。

凝胶电泳：将 8%的预先配置的非变性胶液倒入安装完毕的玻璃板内，胶凝固后将玻璃板垂直放置在电泳槽内。使用移液器加入 10μL 已扩增的 DNA 样品，220 V 电压电泳 120 min。

凝胶银染：将电泳后的凝胶放入 500ml 固定液（10%醋酸）中固定 30 min，倒掉固定液，用去离子水漂洗 2-3 次，每次 5 min。加入 500 ml 染色液（含 0.5g AgNO₃，750 μL37%甲醛），染色 30 min，倒掉染色液，去离子水漂洗 2 次，每次 10~20 s。加入 500 ml 显影液（含 15 g 无水碳酸钠，750 μL 37%甲醛，120 μL1%硫代硫酸钠），100 rpm/min 下摇动，直至条带显出后停止摇动。倒掉显影液，加入 500 ml10%醋酸终止反应，然后用去离子水漂洗 2 次，放入 5%甘油中浸泡 2 h。制成干胶后扫描并统计带型。

2.8 数据统计

用“0”和“1”表示 SSR 扩增产物的多态性条带是否存在。如果有条带，用“1”表示；如果没有条带，用“0”表示。根据这种方法，建立一个由“0”和“1”组成的矩阵，反映不同材料之间的多态性条带个数。

用 EXCEL2010 软件记录数据。用 NTSY-PC2.11 软件对样品进行分析。用 SIMQUAL 方法估算样品之间的遗传相似度；用 SAHN 功能，按照 UPGMA 方法对样品进行聚类；用 Tree Plot 功能制作聚类结果的树形图。

3 结果与分析

3.1 石竹属花卉花瓣形态多样性分析

石竹属 18 种花卉材料花瓣外形如 (图 1)。按照石竹属花卉的花直径大小可分为大花 (4.0 cm 及以上)、中花 (2.0-3.9 cm) 和小花 (2 cm 及以下) 三类。大花类包括 *Dca-Pink* 和 *Dsu*, 中花类包括: *Dch-BRS-1*、*Dch-BRS-2*、*Dch-BRS-3*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRE-2*、*Dch-BRE-3*、*Dch-BRR-1*、*Dch-BRR-2*、*Dch-BRR-3*、*Dch-UW*、*Dch*、*Dch-FC-1*、*Dch-FC-2*, 小花类包括 *Db*a-Sooty、*Db*a-Red、*Dkn* (表 5)。

按花瓣边缘齿裂程度 18 种花卉材料可分为三类: 浅裂: *Dch-BRS-1*、*Dch-BRS-2*、*Dch-BRS-3*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRE-3*、*Dch-BRR-1*、*Dch-BRR-3*、*Dch-UW*、*Dch*、*Dca-Pink*、*Dch-FC-1*、*Db*a-Sooty、*Db*a-Red、*Dkn*; 半裂: *Dch-BRR-2*、*Dch-FC-2*; 深裂: *Dch-BRE-2*、*Dsu* (图 1, 表 5)。

石竹属 18 种花卉材料除 *Db*a-Sooty 和 *Db*a-Red 的花聚成伞状花序外, 其余材料花均为单生枝端。*Dch-BRS-1*、*Dch-BRS-2*、*Dch-BRS-3*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRE-2*、*Dch-BRE-3*、*Dch-BRR-1*、*Dch-BRR-2*、*Dch-BRR-3*、*Dch-FC-1*、*Dch-FC-2* 均有口红, 其余花卉材料无口红; *Dch-BRS-1*、*Dch-BRS-2*、*Dch-BRS-3*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRE-2*、*Dch-BRE-3*、*Dch-UW*、*Dch-FC-1*、*Dch-FC-2* 花瓣含有白色, 其余石竹属花卉中花瓣均不含白色。(图 1, 表 5)

表 5 石竹属 18 种花卉材料形态特征
Table.5 Morphological characteristics of petals in 18 floral materials of *Dianthus*

品种名称 Species Name	花直径/cm Flower Dia meter	花瓣边缘齿裂程度 Degree of petal margi n tooth cleavage	花序类型 Inflorescence Ty pe	有无口红 Flower throat circle	花瓣是否含有白色 Do the petals contai n white
<i>Dch-BRS-1</i>	3.45	浅裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-BRS-2</i>	3.52	浅裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-BRS-3</i>	3.44	浅裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-BRE-1</i>	3.53	浅裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-BRE-2</i>	3.62	深裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-BRE-3</i>	3.46	浅裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-BRR-1</i>	3.65	浅裂	单生枝端	有	否
<i>Dch-BRR-2</i>	3.38	半裂	单生枝端	有	否
<i>Dch-BRR-3</i>	3.46	浅裂	单生枝端	有	否
<i>Dch-UW</i>	3.67	浅裂	单生枝端	无	是
<i>Dch</i>	3.90	浅裂	单生枝端	无	否
<i>Dca-Pink</i>	4.88	浅裂	单生枝端	无	否
<i>Dch-FC-1</i>	3.63	浅裂	单生枝端	有	是
<i>Dch-FC-2</i>	3.55	半裂	单生枝端	有	是
<i>Db</i> a-Sooty	1.26	浅裂	聚成伞状花序	无	否
<i>Db</i> a-Red	1.33	浅裂	聚成伞状花序	无	否
<i>Dkn</i>	1.58	浅裂	单生枝端	无	否
<i>Dsu</i>	5.12	深裂	单生枝端	无	否

3.2 叶绿体基因组 SSR 分析

3.2.1 叶绿体提取及完整性检测

选取样品 *Dch-BRS-1*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRR-1*、*Dca-Pink* 分离出的叶绿体在显微镜下观察 (图 2), 可以看出利用叶绿体试剂盒提取的叶绿体呈椭圆形, 直径约为 3 μ m。叶绿体内部有两层膜结构, 且膜结构完整, 证明提取到的叶绿体具有完整性。

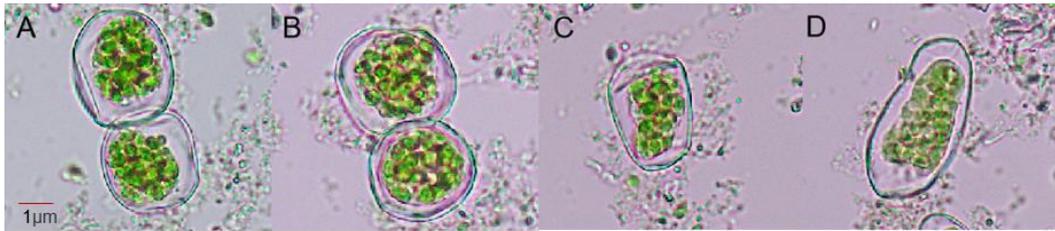


图 2 叶绿体显微镜下观测

Fig.2 Chloroplast microscopic observation

A: *Dch-BRS-1* B: *Dch-BRE-1* C: *Dch-BRR-1* D: *Dca-Pink*

3.2.2 叶绿体 DNA 完整性检测及浓度计算

石竹属 18 种花卉材料叶绿体 DNA 在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测 (图 3)。在约 15000bp 处有条清晰明亮的条带。经计算, 其 OD260/OD280 值均介于 1.6~1.8 之间。表明提取的 DNA 符合 SSR-PCR 扩增要求。

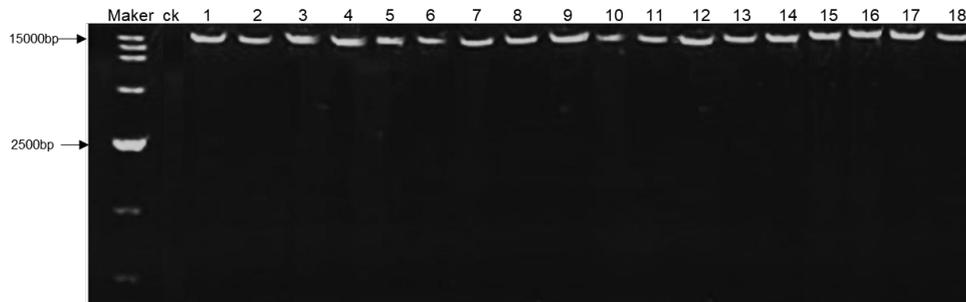


图 3 叶绿体 DNA 质量检测.M:DNAMarker(DL15000)名称同表 1

Fig.3 Chloroplast DNA quality assay.M:DNAMarker (DL15000) Species names are same as those in Table 1

3.2.3 SSR 引物的的筛选及扩增

用石竹属 4 种花卉材料: *Dch-BRS-1*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRR-1*、*Dca-Pink* 的叶绿体 DNA 为模板, 对挑选出的 100 对引物进行 PCR 扩增, PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶进行检测。挑选目的带处扩增出清晰条带的叶绿体 SSR 引物 30 对, 用于遗传多样性分析和指纹图谱构建 (图 4、表 4)。

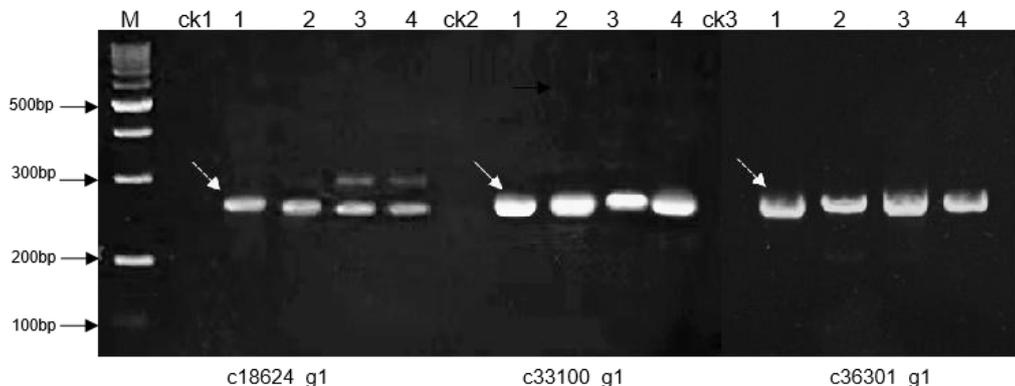


图 4 引物 c18624_g1、c33100_g1 和 c36303_g1 扩增产物的琼脂糖电泳图 1-4 分别为 *Dch-BRS-1*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRR-1*、*Dca-Pink*; CK1 为 c18624_g1 引物无模, CK2 为 c33100_g1 引物无模板, CK3 为 c36303_g1 引物无模板; M 为 DNA Ladder makers 50bp, 白色箭头所指为目的带

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of amplification products by c18624_g1, c33100_g1 and c36303_g1. 1-4 were *D.chinensis* cv.BRS-1, *D.chinensis* cv.BRE-1, *D.chinensis* cv.BRR-1, *D.caryophyllus* cv.pink; CK1: c18624_g1 primer without template; CK2: c33100_g1 primer without template; CK3: c36303_g1 primer without template; M: DNA Ladder makers 50bp, The white arrow points to the destination band

3.2.4 基于叶绿体 DNA 的 SSR 聚类分析

石竹属 18 种花卉材料叶绿体 DNA，利用筛选出的 30 对引物扩增，扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行检测。引物 c33100_g1 的 SSR 指纹图如图 5。在 243bp 附近 *Db*a-Red 没有扩增出条带，*Dch*-BRS-3、*Dch*-BRE-2、*Dch*-BRE-3、*Dch*-BRR-3、*Dca*-Pink、*Db*a-Sooty、*Dkn* 扩增出两条条带，其余样品扩增出一条条带。

采用 0/1 赋值法对胶板上扩增出的目的带处的清晰条带进行记录，出现清晰条带记为“1”，无条带的记为“0”，建立“0”和“1”型矩阵。

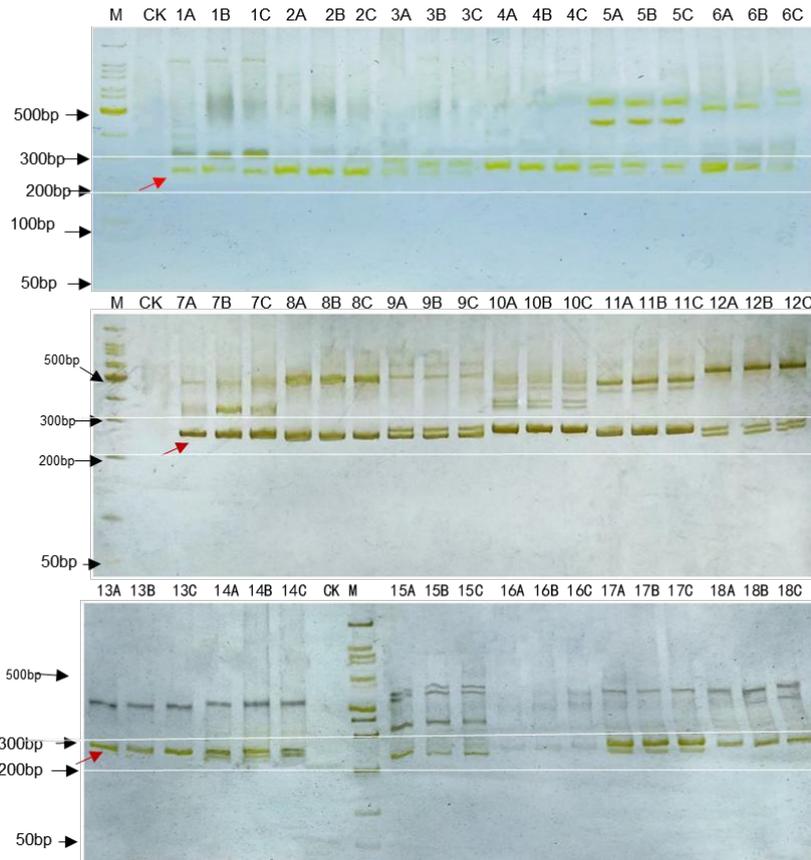


图 5 引物 c33100_g1 扩增叶绿体 SSR 指纹图，品种名称同表 1，A,B,C 分别表示样品的重复，分别为 3 次重复。CK:c33100_g1 引物无模版，M: DNA Ladder makers 50bp 红色箭头所指为目的带

Fig.5 Primer c33100_g1 Amplified chloroplast SSR fingerprint map, species name is the same as Table1, A,B, C denote the replicates of samples with 3 replicates, respectively,CK:c33100_g1 primer without template, M:DNA Ladder makers 50bp red arrow pointing to the target band

石竹属 18 种花卉材料间的遗传相似系数在 0.45-0.73 之间。当相似系数为 0.45 时，18 种花卉材料聚为两个大类：第 I 大类包括 *Dch*-BRR-1、*Dch*-BRR-3、*Dch*-BRR-2、*Dca*-Pink、*Dsu*、*Db*a-Sooty、*Db*a-Red 和 *Dkn*，在相似系数 0.5 时，第 I 大类分为三个亚群：第一亚群包括 *Dch*-BRR-1、*Dch*-BRR-3、*Dch*-BRR-2，在相似系数 0.54 时又分为两个次亚群，第一次亚群包括 *Dch*-BRR-1 和 *Dch*-BRR-3，第二次亚群包括 *Dch*-BRR-2；第二亚群包括 *Dca*-Pink、*Dsu*；第三亚群包括 *Db*a-Sooty、*Db*a-Red、*Dkn*，在相似系数 0.52 时又分为两个次亚群，第一次亚群为 *Db*a-Sooty、*Db*a-Red，第二次亚群包括 *Dkn*。

第 II 大类包括 *Dch*-BRS-1、*Dch*-BRS-3、*Dch*-BRS-2、*Dch*-UW、*Dch*、*Dch*-BRE-1、*Dch*-FC-2、*Dch*-BRE-3、*Dch*-FC-1、*Dch*-BRE-2，当相似系数为 0.54 时，第 II 大

类分为三个亚群：第一亚群包括 *Dch-BRS-1*、*Dch-BRS-3*、*Dch-BRS-2*、*Dch-UW*，相似系数 0.64 时，分为三个次亚群，第一次亚群包括 *Dch-BRS-1* 和 *Dch-BRS-3*，且二者极为相似，无法区分，第二次亚群为 *Dch-BRS-2*，第三次亚群为 *Dch-UW*；第二亚群包括 *Dch*，第三亚群包括：*Dch-BRE-1*、*Dch-FC-2*、*Dch-BRE-3*、*Dch-FC-1*、*Dch-BRE-2*，相似系数 0.61 时又分为三个次亚群，第一次亚群包括 *Dch-BRE-1*，*Dch-FC-2*，第二次亚群包括 *Dch-BRE-3* 和 *Dch-FC-1*，第三次亚群为 *Dch-BRE-2*。

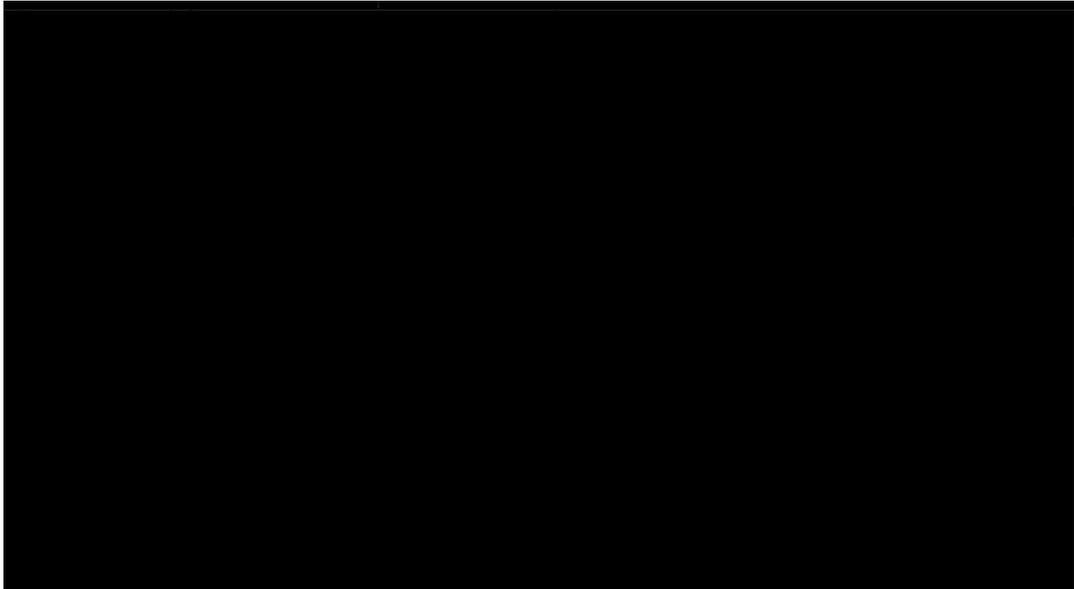


图 6 石竹属 18 花卉材料叶绿体 SSR 聚类图

Fig.6 SSR clustering map of chloroplasts of 18 floral materials of Dianthus

3.2.5 基于叶绿体 DNA 的 SSR 指纹图谱

采用 3 对叶绿体 DNASSR 引物，分别为 *c18624_g1*、*c33100_g1*、*c36301_g1*，组成的‘0、1’指纹可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开（表 6）

表 6 石竹属 18 种花卉材料叶绿体 SSR-DNA 指纹图谱

Table.6 SSR-DNA fingerprinting of chloroplasts from 18 floral materials of the genus Dianthus

品种名称 Species Name	<i>c18624_g1</i>	<i>c33100_g1</i>	<i>c36301_g1</i>	指纹图谱 Fingerprint Mapping
<i>Dch-BRS-1</i>	11	01	10	110110
<i>Dch-BRS-2</i>	00	01	01	000101
<i>Dch-BRS-3</i>	10	11	00	101100
<i>Dch-BRE-1</i>	01	01	01	010101
<i>Dch-BRE-2</i>	11	01	00	110100
<i>Dch-BRE-3</i>	10	11	01	101101
<i>Dch-BRR-1</i>	10	01	01	100101
<i>Dch-BRR-2</i>	01	01	11	010111
<i>Dch-BRR-3</i>	01	01	00	010100
<i>Dch-UW</i>	10	01	10	010110
<i>Dch</i>	11	01	11	110111
<i>Dca-Pink</i>	10	11	10	101110
<i>Dch-FC-1</i>	10	10	10	101010
<i>Dch-FC-2</i>	10	11	11	101111
<i>Dba-Sooty</i>	11	1	11	110111
<i>Dba-Red</i>	01	0	10	010010
<i>Dkn</i>	00	11	01	001101
<i>Dsu</i>	01	10	01	011001

3.3 线粒体基因组 SSR 分析

3.3.1 线粒体的提取及完整性检测

选取样品 *Dch-BRS-1*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRR-1*、*Dca-Pink* 分离出的线粒体，利用健那绿染色后在显微镜下观察（图 7），可以看出利用试剂盒提取的线粒体呈圆形，直径约为 $1.5\mu\text{m}$ ，线粒体内有完整的质粒，膜结构完整，证明提取到的线粒体具有完整性。

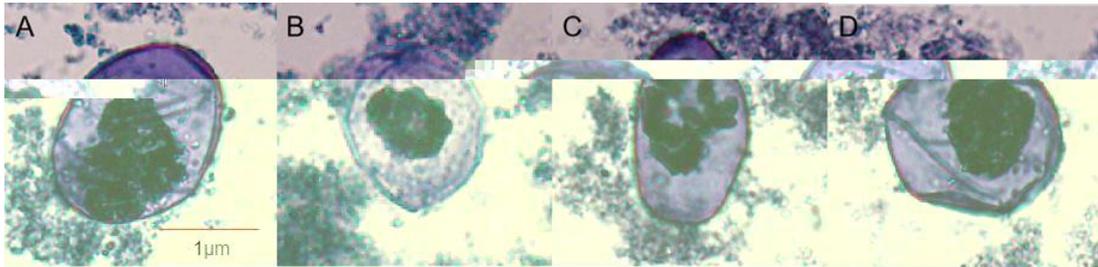


图 7 线粒体显微镜下观测

Fig.7 Mitochondrial microscopic observation

A: *Dch-BRS-1* B: *Dch-BRE-1* C: *Dch-BRR-1* D: *Dca-Pink*

3.3.2 线粒体 DNA 完整性检测及浓度计算

石竹属 18 种花卉材料线粒体 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测（图 8）。在约 17000bp 处有条清晰明亮的条带。经计算其 OD260/OD280 值均介于 1.6~1.8 之间。表明提取的 DNA 符合 SSR-PCR 扩增要求。

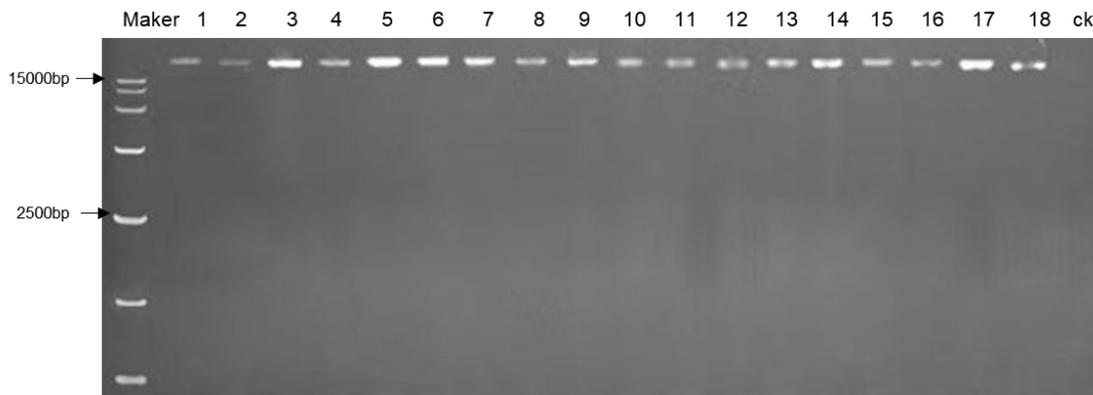


图 8 线粒体 DNA 质量检测. M:DNA marker(DL 15000)名称同表 1

Fig.8 Mitochondrial DNA quality testing. M:DNA marker(DL 15000) Species names are same as those in Table 1

3.3.3 SSR 引物筛选及扩增

以石竹属 4 种花卉材料：*Dch-BRS-1*、*Dch-BRE-1*、*Dch-BRR-1*、*Dca-Pink* 的线粒体 DNA 为模板，对挑选出的 100 对引物进行 PCR 扩增，PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶进行检测。挑选能扩增出目的处有清晰条带的线粒体 SSR 引物 28 对，用于遗传多样性分析和指纹图谱构建（图 9、表 4）。

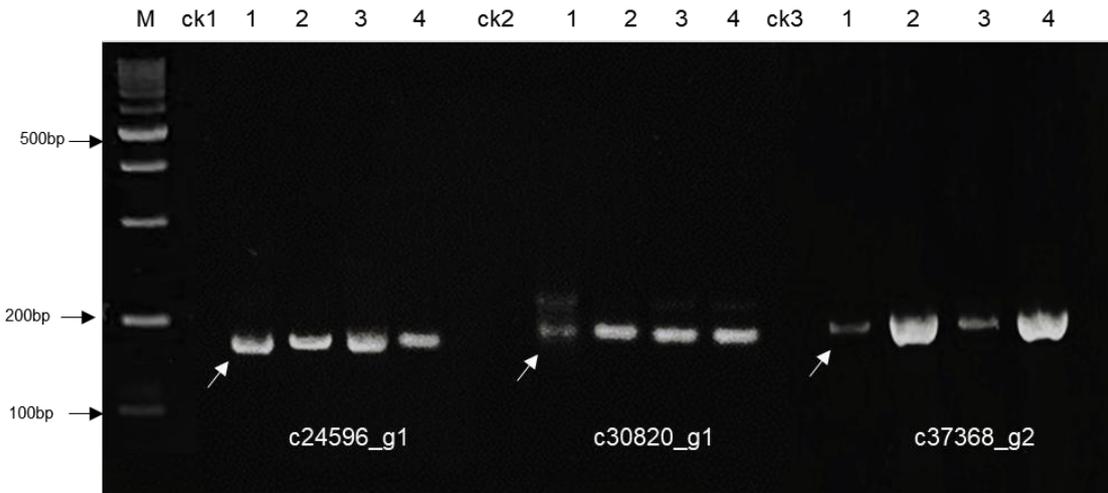


图9 引物 c24596_g1、c30820_g1 和 c37368_g2 扩增产物的琼脂糖电泳图 1-4 分别为中国石竹 *Dch*-BRS-1、*Dch*-BRE-1、*Dch*-BRR-1、*Dca*-Pink；CK1 为 c24596_g1 引物无模，CK2 为 c30820_g1 引物无模板，CK3 为 c37368_g2 引物无模板；M 为 DNA Ladder makers 50bp，白色箭头所指为目的带

Fig.9 Agarose gel electrophoresis of amplification products by c24596_g1, c30820_g1 and c37368_g2. 1-4 were *D.chinensis* cv.BRS-1, *D.chinensis* cv.BRE-1, *D.chinensis* cv.BRR-1, *D.caryophyllus* cv.pink; CK1: c24596_g1 primer without template; CK2: c30820_g1 primer without template; CK3: c37368_g2 primer without template; M: DNA Ladder makers 50bp, The white arrow points to the destination band

3.3.4 基于线粒体 DNA 的 SSR 聚类分析

石竹属 18 种花卉材料线粒体 DNA，用筛选出的 28 对引物扩增，扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行检测。引物 c30820_g1 线粒体 SSR 电泳检测图如（图 10）。由聚丙烯酰胺检测图可以得出：在 161bp 处 *Dsu* 没有扩增出条带，*Dch*-BRS-1、*Dch*-BRE-1、*Dch*-BRE-2、*Dch*-BRE-3、*Dch*-BRR-2、*Dch*-FC-1、*Dba*-Red 扩增出一条条带，其余线粒体 DNA 样品在目的带处扩增出 2 条条带。*Dch*-BRE-2 仅第三个重复扩增出 2 条条带，因此看做 *Dch*-BRE-2 扩增出一条条带（图 10）。

采用 0/1 赋值法对胶板上扩增出的目的带处的清晰条带进行记录，出现清晰条带记为“1”，无条带的记为“0”，建立“0”和“1”型矩阵。

石竹属 18 种花卉材料间的遗传相似系数在 0.45-0.80 之间。当相似系数为 0.5 时，聚为三大类：第 I 大类包括 *Dch*-BRR-2、*Dch*-BRR-1、*Dch*-BRR-3、*Dca*-Pink、*Dsu*、*Dch*、*Dch*-BRE-1、*Dch*-BRE-2、*Dch*-BRE-3、*Dch*-FC-1、*Dch*-FC-2，在相似系数 0.53 时 11 种石竹分为 2 个亚群：第一亚群包括 *Dch*-BRR-2、*Dch*-BRR-1、*Dch*-BRR-3、*Dca*-Pink、*Dsu*、*Dch*，在相似系数 0.57 时又分为三个次亚群：第一次亚群包括 *Dch*-BRR-2，第二次亚群包括 *Dch*-BRR-1 和 *Dch*-BRR-3，第三次亚群包括 *Dca*-Pink、*Dsu* 和 *Dch*；第二亚群包括 *Dch*-BRE-1、*Dch*-BRE-2、*Dch*-BRE-3、*Dch*-FC-1、*Dch*-FC-2，在相似系数 0.53 时，又分为两个次亚群：第一次亚群包括 *Dch*-BRE-1、*Dch*-BRE-2，第二次亚群包括 *Dch*-BRE-3、*Dch*-FC-1、*Dch*-FC-2，其中 *Dch*-BRE-3 和 *Dch*-FC-1 比较接近。

第 II 大类包括 *Dch*-BRS-1、*Dch*-BRS-3、*Dch*-UW、*Dch*-BRS-1，在相似系数 0.57 时分为两个亚群：第一亚群包括 *Dch*-BRS-2、*Dch*-BRS-3、*Dch*-UW，在相似系数 0.63 时又分为两个次要群，第一次亚群为 *Dch*-BRR-2 和 *Dch*-BRR-3，第二次亚群为 *Dch*-UW；第二亚群包括 *Dch*-BRS-1。

第 III 大类包括：*Dkn*、*Dba*-Sooty、*Dba*-Red，其中 *Dba*-Sooty 和 *Dba*-Red 之间相似性极高，无法区分。

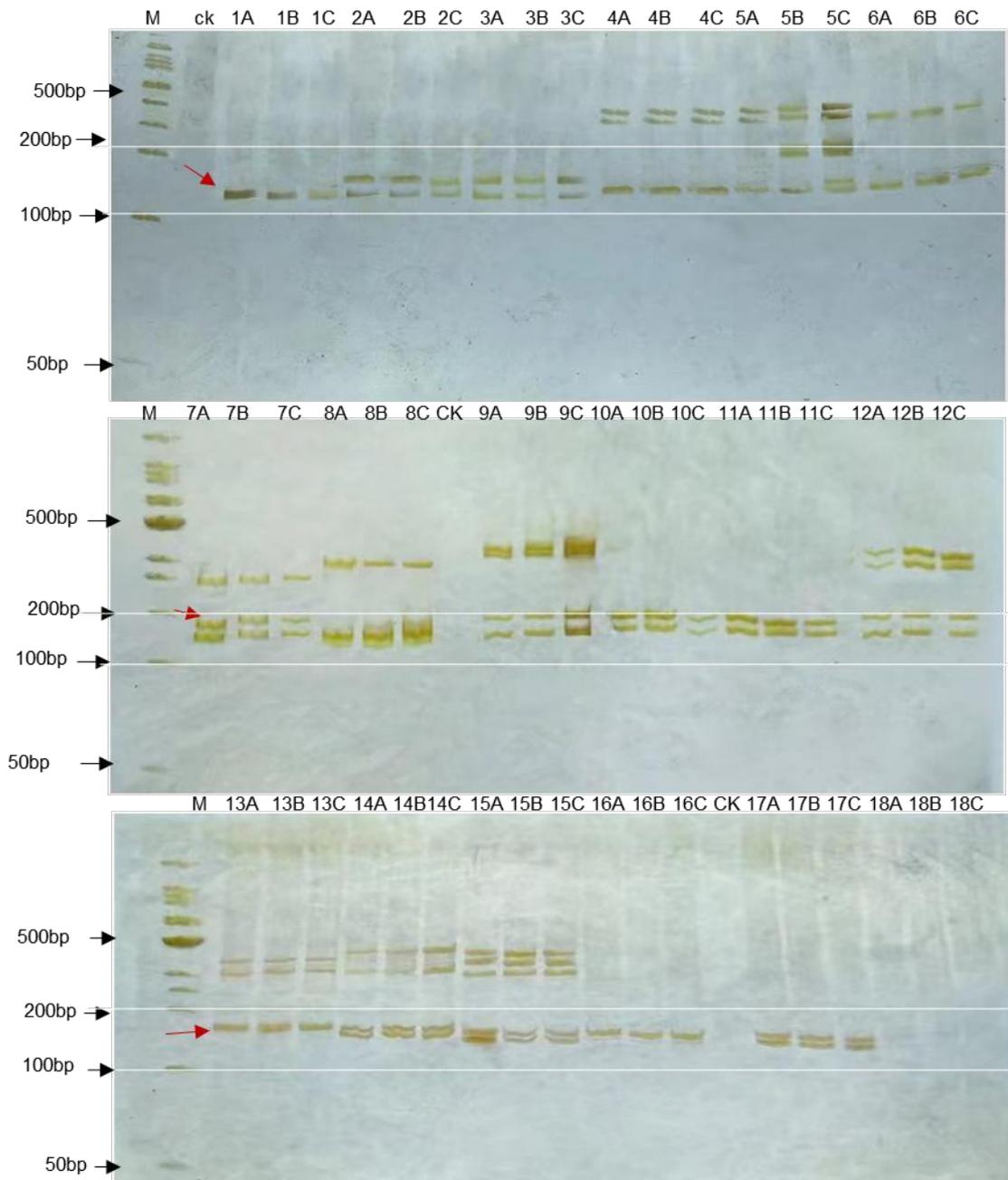


图 10 引物 c30820_g1 扩增线粒体 SSR 指纹图, 品种名称同表 1, A,B,C 分别表示样品的重复, 分别为 3 次重复, CK: c30820_g1 引物无模版, M: DNA Ladder makers 50bp 红色箭头所指为目的带
 Fig.10 Primer c30820_g1 Amplified mitochondria SSR fingerprint map, species name is the same as Table1, A, B,C denote the replicates of samples with 3 replicates, respectively, CK: c30820_g1 primer without template, M: DNA Ladder makers 50bp red arrow pointing to the target band

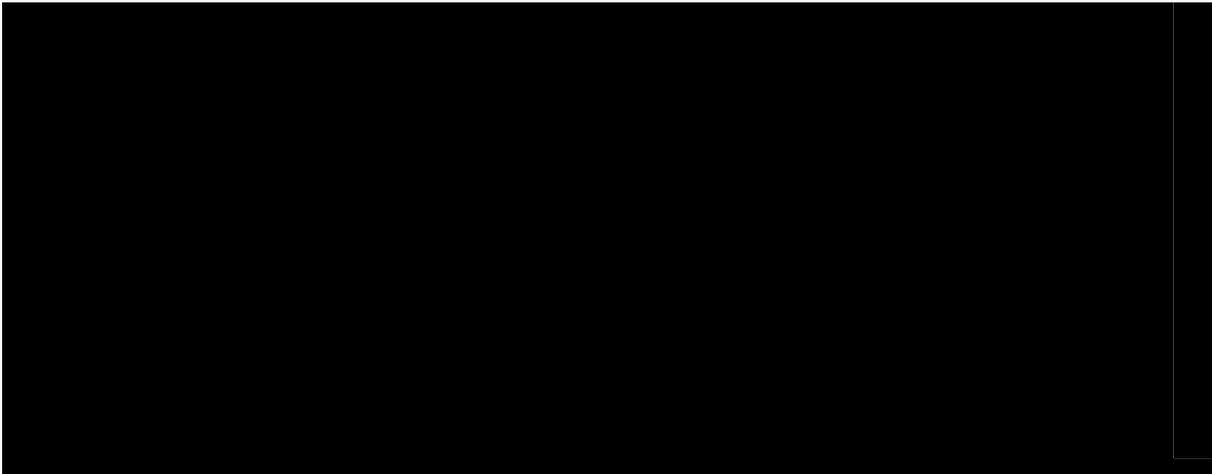


图 11 石竹属 18 种花卉材料线粒体的 SSR-DNA 聚类图
 Fig.11 SSR-DNA clustering map of mitochondria of 18 floral materials of Dianthus

3.3.5 基于线粒体 DNA 的 SSR 指纹图谱

采用 3 对 SSR 引物, 分别为 c24596_g1、c30820_g1, c37368_g2, 组成的 ‘0、1’ 指纹图谱可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开 (表 7)

表 7 石竹属 18 种花卉材料品种线粒体 SSR-DNA 指纹图谱
 Table.7 Mitochondria SSR-DNA fingerprinting of 18 floral materials of Dianthus

品种名称 Species Name	C24596_g1	c30820_g1	c37368_g2	指纹图谱 Fingerprint Mapping
<i>Dch</i> -BRS-1	10	01	00	100100
<i>Dch</i> -BRS-2	00	11	11	001111
<i>Dch</i> -BRS-3	10	11	11	101111
<i>Dch</i> -BRE-1	11	01	10	110110
<i>Dch</i> -BRE-2	00	01	01	000101
<i>Dch</i> -BRE-3	10	01	11	100111
<i>Dch</i> -BRR-1	01	11	00	011100
<i>Dch</i> -BRR-2	11	01	00	110100
<i>Dch</i> -BRR-3	01	11	01	011101
<i>Dch</i> -UW	10	11	01	101101
<i>Dch</i>	00	11	10	001110
<i>Dca</i> -Pink	01	11	11	011111
<i>Dch</i> -FC-1	00	10	00	001000
<i>Dch</i> -FC-2	00	11	01	001101
<i>Db</i> a- Sooty	11	11	00	111100
<i>Db</i> a-Red	11	10	11	111011
<i>Dkn</i>	11	11	01	111101
<i>Dsu</i>	00	00	00	000000

3.4 聚类对比

将 18 种石竹叶片的叶绿体 DNA-SSR 聚类图和线粒体 DNA-SSR 聚类图进行比较 (图 6、图 11), 利用叶绿体 DNA-SSR 聚类, 可将石竹属 18 种花卉材料分为两个大类, 若干亚群与次亚群; 利用线粒体 DNA-SSR 聚类, 可将石竹属 18 种花卉材料分为三个大类, 若干亚群以及次亚群, 对于同一材料在聚类图中的位置两种聚类方式存在差异, *D.chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Star 系列的三种花卉材料, 两种聚类方式得到的聚类图中位置差异较大, 利用叶绿体 DNA-SSR 进行聚类时, 三种花卉材料均属于第 II 大类, 利用线粒体 DNA-SSR 进行聚类分析时, 三种石竹被划分到了第 I 大类; *D.chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Red 系列的三种石竹两种聚类方式下位置相差不大, 均属于第 I 大类。利用叶绿体 DNA-SSR 进行聚类分析, *Dch-BRS-1* 与 *Dch-BRS-3* 两者无法被很好地进行区分, 通过线粒体 DNA-SSR 聚类可以将两者区分开。通过线粒体 DNA-SSR 聚类分析, 无法将 *DbA-Sooty* 与 *DbA-Red* 区分开, 通过叶绿体 DNA-SSR 聚类分析, 可以将两者区分开。

4 讨论

4.1 基于叶绿体基因组 SSR 分析石竹属花卉遗传多样性

SSR 技术具备简单、灵活、高效等特点^[69], 在之前的研究中, 利用转录组获得的 SSR 分子标记已用于玫瑰^[70]、牡丹^[71-72]、百合^[73]、菊花^[74-75]等多种观赏型植物遗传多样性的研究。本实验利用实验室从中国石竹转录组测序中获得的 6545 对引物, 筛选 100 对引物进行实验 (表 4)。

目前, 叶绿体基因组的 SSR 技术研究植物遗传多样性已经成为热点^[76]。田春育等人^[77]发现苜蓿属植物的叶绿体基因组具有高度的保守性, 通过叶绿体基因组对 6 种苜蓿分类, 结果与形态学分类结果基本一致。李斌等人^[78]选取了 7 个不同品种的中华百合进行全基因组测序, 并对测序结果进行生物信息学分析, 筛选出了一批叶绿体基因组标记。这些标记经过验证, 表明它们具有多态性、稳定性和可重复性。Antonio Lupini 等人^[79]使用 4 个叶绿体 SSR 微卫星标记来分析 16 个不同的古老横生栎种群。研究发现, 这些种群中的遗传多样性水平相对较高, 但各个种群之间存在着一定的遗传差异。王宏霞等人^[80]用叶绿体基因组数据, 从蒙古韭的叶绿体基因组中鉴定出了 17 个 SSR 位点, 并对其特征进行了统计和分析。结果表明这些叶绿体微卫星位点可以为蒙古韭的遗传多样性和亲缘关系的研究提供有用的分子标记, 杜磊等人^[81]使用了 200 个 SSR 标记共筛选出 47 个具有多态性的叶绿体 SSR 标记, 可以对 9 个不同类型的薏苡材料进行亲缘关系分析。本实验利用 4 种花卉材料叶绿体基因组基因为模板, 通过 PCR 扩增, 筛选到 30 对具有多态性的 SSR 引物, 多态率为 30% (图 4, 表 4)。

魏潇等人^[82]等使用叶绿体 SSR 标记对 26 个普通杏品种进行了分析, 并通过构建系统发育树来研究这些品种之间的亲缘关系。研究结果显示, 26 个普通杏品种可分为四个主要类群。郭欣等人^[83]用了 185 对叶绿体 SSR 引物共检测到 34 个等位基因, 利用 34 个等位基因。将 282 种牡丹分为 3 个不同的组。陈碧云等人^[84]利用 SSR 标记, 对 30 份甘蓝型油菜种质资源的叶绿体基因组 DNA 进行了扩增和分析。共检测到 9 个多态位点和 16 个等位变异类型。利用叶绿体基因组 DNA 多态性构建了甘蓝型油菜的遗传相似性矩阵和系统发育树。本实验利用 30 对叶绿体 SSR 引物, 对石竹属 18 种花卉材料进行聚类分析, 在相似系数 0.45 时将 18 种石竹样品分为 2 个大类。第 I 个大类包括 8 种石竹, 这些石竹分别为中国石竹栽培种、香石竹和瞿麦, 以及 *D. barbatus* 栽培种系列, 依据其类型不同 8 种石竹分为三个亚群, 从花瓣颜色看 8 种石竹材料的花瓣均无白色部分, 说明花瓣没有白色是第 I 大类的共同特征, 第 II 大类共包含 10 种石竹, 其均为中国石竹。从第 II 大类分的三个亚群可以看出, 野生的中国石竹区别于其他中国石竹栽培种, 从颜色看, 第 II 大类中所有石竹除中国石竹野生种外, 全部包含白色。综上所述: 叶绿体 DNA-SSR 聚类时, 与石竹系列、花瓣中是否含有白色有着密不可分的关系 (图 1, 图 6)。聚类结果与石竹形态学特征的分类基本吻合, 但部分聚类结果与形态学特征不一致, 如 *Dch-BRE-2* 和 *Dch-FC-2* 花瓣形态存在明显区别, 但被划分在了同一个次亚群, 其可能的原因是形态特征通常是定量的, 这意味着它们很容易受环境控制^[85]。除了 *Dch-BRS-1* 和 *Dch-BRS-3* 外, 其余 16 种石竹在相似系数 0.7 时可以完全区分 (图 6)。

张静珍^[86]从 10 对叶绿体 SSR 引物中筛选出 2 对引物, 构建了 64 个山药品种的指纹图谱, 可将 64 个山药品种区分开。刘小飞等人^[87]通过四对叶绿体 SSR 引物引物将 12 份白掌种质资源有效地区分开, 构建了 12 份种质的指纹图谱 ID, 本研究中, 利用 *c18624_g1*、*c33100_g* 和 *c36301_g1* 三对叶绿体 SSR 引物组成的‘0、1’指纹可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开。

4.2 基于线粒体基因组 SSR 分析石竹属花卉遗传多样性

测序技术的不断更新迭代,越来越多观赏类植物线粒体测序结果被公布。山丹和兰州百合的线粒体基因组长度分别为 988,986bp 和 924,401bp^[88]。芸薹属植物线粒体基因组 (mtDNA) 长度为 219,975 bp^[89]。基于这些线粒体测序结果,植物线粒体基因组 SSR 成为一种具有很高的多态性和遗传信息^[90]的分子标记。付东辉等^[91]研究了芸薹属植物 (*Brassica*) 线粒体基因组中 SSR 和 CMS 基因的重复序列特征,并开发了这些序列的特异性标记。对芸薹属 6 个物种的线粒体基因组进行了分析。张明亮^[92]筛选出 3 对引物在南水 8 号杂种一代及其双亲中呈现多态性 mtSSR 引物,结果表明:线粒体 SSR 引物可以用于南水 8 号种子纯度鉴定。赵朝贤等人^[93]利用 6 种苔藓的 mt 基因组,并检测到 475 个 SSR,结果表明,苔藓植物的线粒体基因组中普遍存在简单序列重复,并且这些重复序列的长度和数量存在较大的差异,可以用于鉴定苔藓的亲缘关系。本研究利用 4 种花卉材料的线粒体 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,共找到 28 对具有多态性的 SSR 引物,用于研究石竹属 18 种花卉材料的遗传多样性,多态率为 28% (图 8, 表 4)。

孙炳蕊等人^[94]利用 34 个线粒体 SSR 标记对其课题组选育的 19 份胞质来自于不同地区普通野生稻水稻材料的 CMS 基因进行了遗传多样性分析,结果表明线粒体 SSR 标记 R34 可将这 19 份不育材料明显区分开来。张帅^[95]使用 11 个甜瓜变种的线粒体 SSR 进行 PCR 筛选和分析后,成功地开发出由 89 对高多态性引物组成的核心标记,并利用 UPGMA 聚类分析对 80 个甜瓜材料进行了分类。丁佳麒等^[96]对棉花的线粒体基因组进行了测序,利用了 160 个线粒体 SSR 位点对 29 种棉花材料的遗传多样性进行研究,结果表明利用这 160 个 SSR 位点可以将这 29 种棉花分成 17 个不同的类群。

植物线粒体 SSR 序列的长度通常在 100-400bp 之间,其中包含的短重复序列通常比较多,这使得它们具有很高的多态性^[97]。本研究中,筛选出的所有引物的预测带所在范围均在 100-300bp,利用 28 对线粒体 SSR 引物在相似系数 0.5 时可以将石竹属 18 种花卉材料分为三个大类:第 I 大类包括 11 种石竹。分别为中国石竹栽培种以及香石竹和瞿麦,在相似系数为 0.53 时第 I 大类被分为两个亚群,从花瓣的颜色看,第一亚群的 6 种石竹均无白色部分;第二个亚群包括 5 种石竹,均为中国石竹栽培种,从花瓣形态看,5 种石竹花瓣大小差异不大;且均为:花瓣边缘白色,内部彩色;均有口红。第 II 大类石竹包括四种石竹,均为中国石竹栽培种,从形态上看,四种石竹花瓣差异不大,且花瓣均包含大量白色,第 III 大类包含的石竹为 *D.barbatus* 栽培种系列以及 *Dkn*,从花瓣形态看,三种石竹花瓣小于其他石竹品种。从花序类型看前两者均为聚成伞状花序,都属于 *D.bartatu* (须苞石竹) (图 1, 图 11)。综上所述,利用线粒体 SSR 进行聚类时:聚类依据石竹的系列,以及花瓣大小和花瓣中白色部分的多少。利用线粒体 SSR 对石竹属花卉进行聚类与石竹品种以及形态学的分类结果相近,但却将部分 *D.chinensis* 栽培种与 *D.barbatus* 栽培种系列聚在同一个大类中。也存在部分聚类结果不符合形态分类特点,如 *Dch-FC-2* 和 *Dch-FC-1* 的花瓣形态相似性低,但分在同一个次亚群,有可能是使用的线粒体 SSR 标记的数量有限^[98]。除了 *Dbá-Sooty* 和 *Dbá-Red* 无法区分,其余 16 种石竹在相似系数 0.68 时可以完全区分 (图 11)。

赵宇等人^[99]利用黄瓜线粒体基因组开发的 13 对线粒体 SSR 标记构建了 21 份黄瓜品种的线粒体 DNA 指纹图谱,为黄瓜品种特异性、真实性、纯度鉴定、遗传亲缘关系分析等提供了重要的参考。本实验中利用 3 对线粒体 SSR 引物,分别为 *c24596_g1*、*c30820_g1* 和 *c37368_g2* 组成的“0、1”指纹可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开。

4.3 基于叶绿体基因组 SSR 分析与线粒体基因组 SSR 分析的石竹属花卉多样性比较

多数被子植物的叶绿体基因组和线粒体基因组均具备母系遗传的特点^[100], 利用植物叶绿体基因组和线粒体基因组结合研究可以帮助我们了解植物的起源和进化^[101], 确定它们之间的遗传关系和差异, 进而更好的了解植物种群遗传多样性^[102-103]。Maghuly 等人^[104]采用单亲遗传的叶绿体简单重复序列 (cpSSRs)、线粒体简单重复序列 (mtSSR) 以及双亲遗传的核简单重复序列 (nSSRs) 分析奥地利挪威云杉不同亚群的遗传多样性。基于相似系数构建了 UPGMA 树状图。可以将 450 个样本分为 2 个类群。张瑞杰等人^[105]利用叶绿体和线粒体 SSR 分析的结果。通过对多态性叶绿体和线粒体 SSR 引物的检测, 发现存在多样性条带和等位基因, 遗传相似系数在 0.538-1.000 之间, 材料可以分为五类。王庆彪等人^[106]使用来自拟南芥叶绿体基因组的 32 个 SSR 引物以及来自油菜线粒体 (mt) 基因组序列的另外 21 个 SSR 引物, 生成了 6 种不同的卷心菜 (*Brassica oleracea L. var. capitata*) 的指纹图谱。结果表明, 11 对 cpSSR 引物和 6 对 mtSSR 引物揭示了 6 种卷心菜 CMS 类型的多态性。沙秀芬等人^[107]利用 PCR 技术和 DNA 测序, 开发了 10 个线粒体 SSR 和 5 个叶绿体 SSR。对来自中国、日本、韩国和越南等地的 28 个丹参种质资源进行了遗传多样性分析。研究结果表明, 这些标记可以有效地评估丹参种质资源的遗传多样性水平。

在本实验中, 利用线粒体与叶绿体的 DNA 进行 SSR 聚类, 石竹属 18 种花卉材料在两种聚类方式下的聚类结果有类似性: 叶绿体和线粒体聚类下的第 I 大类包括的都是花瓣不含有白色的石竹品种, 以及香石竹和瞿麦两个石竹品种, 第 II 大类均包括 *D.chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Star 系列的石竹品种, 以及 *D.chinensis* 栽培种白色花 Unies White 系列的石竹品种。叶绿体和线粒体 DNA-SSR 聚类中, 第 I 大类的第一亚群均为 *D.chinensis* 栽培种双色花 Bicolor Rough Red 系列的石竹品种。并且两种聚类方式都将 *D.barbatus* 栽培种系列的石竹聚在同一个亚群, 将瞿麦与香石竹聚在同一个次亚群。两种 DNA-SSR 聚类之间也存在诸多差异性: 叶绿体 DNA-SSR 聚类: 第 I 大类的三个亚群, 将类型不同的三种石竹分别聚为三个亚群。线粒体 DNA-SSR 聚类: 第 I 大类按花瓣有无白色分为两个亚群。两种聚类方式产生的聚类图中, 次亚群包含的石竹具有很强的相似性, 但石竹属 18 种花卉材料所处的位置存在差异性。分析可能的原因: 可能是线粒体和叶绿体基因组的大小、结构及突变率等方面可能存在差异, 这些差异可能导致它们在遗传多样性和基因频率分布上的差异^[108], 从而影响聚类分析的结果。

综上所述: 中国石竹栽培种花色多样, 与基于 SSR 分析其叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 揭示的遗传多样性一致。

5 结论

1、对实验室筛选获得的 100 对 SSR 引物进行筛选，挑选出 30 对具有多态性的 SSR 引物用于石竹属 18 种花卉材料叶绿体 DNA 基因组扩增，对获得的多态性条带进行聚类，计算得到的相似系数在 0.45-0.73 之间，18 种材料聚为两个大类。

2、利用三对叶绿体基因组 SSR 引物：c18624_g1、c33100_g1 和 c36301_g1 组成的 ‘0、1’ 指纹图谱可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开。

3、对实验室筛选获得的 100 对 SSR 引物进行筛选，挑选出 28 对具有多态性的 SSR 引物用于石竹属 18 种花卉材料线粒体 DNA 扩增，对获得的多态性条带进行聚类，计算得到的相似系数在 0.45-0.80 之间，18 种材料聚为三个大类。

4、利用 3 对线粒体基因组 SSR 引物：c24596_g1、c30820_g1 和 c37368_g2 组成的 ‘0、1’ 指纹图谱可将石竹属 18 种花卉材料完全区分开。

参 考 文 献

- [1] Constantinidis T. *Dianthus haematocalyx* subsp. *phitosianus* (Caryophyllaceae), a new serpentine endemic from Greece[J]. *Phyton; annales rei botanicae*, 1999, 39(2): 277-291.
- [2] 张衡. 农杆菌介导的中国石竹基因瞬时过表达体系建立及验证[D]. 内蒙古自治区, 内蒙古农业大学, 2022.
- [3] Linnaeus. *Systema Naturae*[M]. London, Order of the Trustees British Museum, 1956
- [4] 张晓瑜. 中国石竹中羟基丙酮酸还原酶基因的鉴定及分析[D]. 内蒙古自治区, 内蒙古农业大学, 2022.
- [5] Hardion L, Pouvreau M, Schwoertzig E, et al. Performance, genetic and ecological insights for the conservation of the endangered large pink, *Dianthus superbus* L.(Caryophyllaceae) in semi-natural grassland[J]. *Botany Letters*, 2019, 166(1): 104-112.
- [6] 吴捷, 李京, 白卉. 高山石竹组织培养及植株再生[J]. *中国林副特产*, 2009, 06(6):39
- [7] Taghizadeh M, Khadivi A. Identification of Superior Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Cultivars Based on Morphological Traits[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2022, 93(1):245-255.
- [8] Markovic M, Popovic M, Vilotic D. Micropropagation of *Dianthus deltoides* L. through shoot tip and nodal cuttings culture[J]. *Archives of Biological Sciences*, 2013, 65(1):17.
- [9] Fraga M, Alonso M, Ellul P, et al. Micropropagation of *Dianthus gratianopolitanus*[J]. *Hortscience*, 2004, 39(5):1083-1087.
- [10] Zalecka R, Wierzbicka M. The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L.(Caryophyllaceae) to growth on a zinc-lead heap in southern Poland[J]. *Plant and Soil*, 2002, 246: 249-257.
- [11] 宛淑艳. 常夏石竹快速繁殖技术研究[J]. *北方园艺*, 2009, (5):4.
- [12] Ara B, Lh C, BoB, et al. Geographic and phylogenetic patterns in *Silene* section *Melandrium* (Caryophyllaceae) as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 57(3):978-991.
- [13] Abdushaeva Y M. Anatomical and Morphological Characters of *Dianthus Barbatus*[C]//IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2021, 852(1): 012001.
- [14] Peruzzi L, Uzunov D. Typification and taxonomic status of *Dianthus balbisii* subsp. *knappi* comb. et stat. nov. (Caryophyllaceae) [J]. *Phytologia Balcanica*, 2008, 14 (1): 45-49
- [15] Lehr J H. A New Color Form of *Dianthus Armeria*[J]. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1963, 1(01): 207-207.
- [16] Ljiljana Radojević, Dušica Čalić-Dragosavac, Jovanka Špirić, et al. In vitro propagation of *Dianthus ciliatus* ssp. *dalmaticus* and *D. giganteus* ssp. *croaticus* (Caryophyllaceae) from stem segment cultures[J]. *Botanica Serbica*, 2010, 34(2): 153-161.
- [17] 沈琼桃. "石竹"的种类识别,经济用途和地理分布[J]. *中国林副特产*, 2001, (4):2.
- [18] Vaezi J, Behroozian M, Memariani F, et al. *Dianthus pseudocrinitus* (Caryophyllaceae), a new species from Northeast of Iran identified by morphological and molecular data[J]. *Phytotaxa*, 2014, 156(2):59-73.
- [19] Shimizu M, Hayashi T, Shimizu K, et al. A pyran-type glycoside from *Dianthus superbus* var. *Longicalycinus*[J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(1):245-247.
- [20] 高亚南, 薛慧, 贺学勤. SNP、柠檬酸和苹果酸对干旱下中国石竹幼苗形态及生理指标的影响[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2022, 43(04):7-11+24.
- [21] 鲁德全. 中国石竹属的分类、演化和分布[J]. *植物研究*, 1995, (04):455-459.
- [22] 豆丽萍, 穆妮妮, 刘亚亚, 等. 庆阳市草本花卉引种初报[J]. *甘肃林业技*, 2012, 37(03):69-71.
- [23] 杨娟, 池坚, 叶志琴, 等. 地被石竹新品种“元红”的选育[J]. *北方园艺*, 2021, (22):178-180+2.
- [24] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. SSR 分子标记的研究进展[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 18(04):429-436.
- [25] 罗兵, 孙海燕, 徐港明, 等. SSR 分子标记研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(12):5210-5212+5246.
- [26] 蒋锦雷. 观赏园艺植物遗传图谱中分子标记技术的研究进展[J]. *南方农机*, 2022, 53(10):64-66.
- [27] 张旻桓, 姚奕平, 黄宇, 等. 基于 SSR 标记的江南牡丹品种群遗传多样性及亲缘关系[J]. *中南林业科技大学学报*, 2023, 43(01):164-172.

- [28] Chen M, Nie G, Li X, et al. Development of EST-SSR markers based on transcriptome sequencing for germplasm evaluation of 65 lilies (*Lilium*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50(4): 3259-3269.
- [29] Olejnik A, Parkitna K, Kozak B, et al. Assessment of the Genetic diversity of chrysanthemum cultivars using SSR markers[J]. *Agronomy*, 2021, 11(11): 2318.
- [30] 杨洁, 宋江琴, 唐楠, 等. 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
- [31] 谭晨, 刘慧春, 张加强, 等. 观赏羽衣甘蓝主要品种间的 SSR 遗传多样性分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(16):5395-5402.
- [32] Liu X, Huang Y, Li F, et al. Genetic diversity of 129 spring orchid (*Cymbidium goeringii*) cultivars and its relationship to horticultural types as assessed by EST-SSR markers[J]. *Scientia horticulturae*, 2014, 174: 178-184.
- [33] Park I, Song J, Yang S, et al. A comprehensive study of the genus *Sanguisorba* (Rosaceae) based on the floral micromorphology, palynology, and plastome analysis[J]. *Genes*, 2021, 12(11): 1764.
- [34] Guo Q, Guo L, Li Y, et al. Development and Characterization of Microsatellite Markers Based on the Chloroplast Genome of Tree Peony[J]. *Genes*, 2022, 13(9): 1543.
- [35] 周晓君, 张凯, 彭正锋, 等. 矮牡丹与芍药属其他 5 个种叶绿体基因组特征的比较[J]. *林业科学*, 2020, 56(04):82-88.
- [36] 王祎玲. 太行菊属濒危植物群体遗传分化及保护策略研究[D]. 山西省, 山西师范大学, 2017.
- [37] Bock R, Knoop V.Genomics of Chloroplasts and Mitochondria (Advances in Photosynthesis and Respiration)[J].*Advances in Photosynthesis & Respiration*, 2012, 35(3): 377-377.
- [38] 李淑芹. 园林植物遗传育种[M]. 重庆, 重庆大学出版社, 2006.
- [39] 张跃建, 寿伟松, 沈佳. 甜瓜(*Cucumis melo* L.)线粒体基因组标记的开发及应用[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(12):3980-3994.
- [40] Zhang D , Xing Y , Xu L ,et al.Comparative Analysis of the Mitochondrial Genome Sequences of two Medicinal Plants: *Arctium Lappa* and *A. Tomentosum*[J]. 2020, 29(5): 1-21
- [41] Liu G, Zhao Z, Xiao M, et al. Repetitive sequence characterization and development of SSR and CMS-gene-specific markers in the Brassica mitochondrial genomes[J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35(11): 1-12.
- [42] 李海梅, 沈佳, 赵娟, 等. 黄瓜线粒体基因组 SSR 标记开发及其在种子纯度鉴定中的应用[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(05):764-771.
- [43] 王杰, 贺文闯, 向坤莉, 等. 基因组时代的植物系统发育研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2023, 40(01):227-236.
- [44] 张丹, 杜晨晖, 裴香萍, 等. 党参线粒体和叶绿体微卫星标记的开发及应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(23):153-162.DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20211419.
- [45] 王崇, 王连军, 杨新笋, 等. 104 个甘薯品种的 cpSSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(06):1549-1556.
- [46] Niraj, Singh, Ashish, et al. Development of cpSSR markers for analysis of genetic diversity in *Gladialus* cultivars - ScienceDirect[J]. *Plant Gene*, 2017, 10:31-36.
- [47] Wang J, Li J, Shi G, et al. Genetic Diversity of *Dianthus* Plants Revealed by SRAP Markers[J]. *bioRxiv*, 2021, 04(01): 425199.
- [48] 胡瑞, 包满珠, 吴晓庆, 等. 香石竹表型多样性分析及利用[J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34(02): 16-23.
- [49] Rabei S H, El Gamal I A, Nada R M. Effect of Genetic Diversity on the Distribution of Endemic Species of the Genus *Silene* (Caryophyllaceae) in Saint Katherine Protectorate, Sinai, Egypt [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2021, 39(2):364-375.
- [50] 武雯, 蔡友铭, 邹惠渝, 等. 利用 RAPD 分子标记研究中国石竹与香石竹的遗传多样性[C]//中国植物学会.第六届全国系统与进化植物学青年学术研讨会论文摘要集, 2000, 46 (04): 72-74
- [51] Yagi Masafumi, Kosugi Shunichi, Hirakawa Hideki, et al. Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 2014,21(3).
- [52] 武悦, 单飞彪, 闫文芝, 等. 基于高通量测序的瞿麦叶片转录组分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(05):1522-1529.

- [53] Smulders, M. J. M., Rus-Kortekaas, et al. Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*[J]. *Genome*, 2000, 43(1):208-10
- [54] Smulders, M. J. M., Noordijk, et al. Microsatellite genotyping of carnation varieties[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003,106(7), 1191-5
- [55] Fu X P, Ning G G, Gao L P, et al. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using II molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits[J]. *Scientia horticulturae*, 2008, 117(3): 263-270.
- [56] Kimura T, Yagi M, Nishitanic, et al. Development of SSR markers in carnation (*Dianthus caryophyllus*)[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2009, 78(1): 115-123.
- [57] 蒋劲妍. 新疆石竹属种间分子鉴别及种内遗传多样性分析[D]. 江苏省, 南京林业大学, 2011.
- [58] 王晶, 李建, 史根生, 等. 基于 SRAP 标记研究石竹属花卉遗传多样性[J]. *安徽省, 安徽农业大学学报*, 2022, 49(04):558-564.
- [59] 王永峰. 基于 SSR 标记的 28 种石竹属花卉遗传多样性分析[D]. 内蒙古自治区, 内蒙古农业大学, 2021.
- [60] Kang J S, Lee B Y, Kwak M. The complete chloroplast genome sequences of *Lychnis wilfordiia* and *Silene capitata* and comparative analyses with other Caryophyllaceae genomes[J]. *PLoS I*, 2017, 12(2): e0172924.
- [61] Jeong J R, Koo H J, Yun H, et al. Complete chloroplast genome of *Gypsophila oldhamiana* Miq. (Caryophyllales: Caryophyllaceae)[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2021, 6(12): 3381-3382.
- [62] Ling L Z. Characterization of the complete chloroplast genome and phylogenetic analysis of *Silene jensenseensis* (Caryophyllaceae)[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(1): 476-477.
- [63] 高亚芳, 刘莹莹, 杨从卫等. 金铁锁叶绿体基因组序列及其系统发育分析[J]. *中草药*, 2019, 50(2):5532-5536.
- [64] 蔡友铭, 张露, 张博, 等. 利用 RAPD 标记对中国石竹属花卉亲缘关系的研究[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2002, (04):31-34.
- [65] 赵朝立, 李光远. 观赏及药用植物石竹人工栽培技术[J]. *中国林副特产*, 2013, (02):57-58.
- [66] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. *实验室研究与探索*, 2009, 28(9):14-16
- [67] 陈向明. 用 CTAB 法提取植物 DNA 的技术改进[J]. *合肥教育学院学报*, 2000, (4):14-16
- [68] 黄永莲. 琼脂糖凝胶电泳实验技术研究[J]. *湛江师范学院学报*, 2009, 30(06):83-85.
- [69] Kim J J, Han B G, Lee H. I, et al. Development of SNP-based human identification system[J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2010, 124(2): 125-131
- [70] Jeon J H, Kim S C. Comparative analysis of the complete chloroplast genome sequences of three closely related East-Asian wild roses (*Rosa* sect. *Synstylae*; Rosaceae)[J]. *Genes*, 2019, 10(1): 23.
- [71] 贺丹, 吴芳芳, 张佼蕊, 等. 牡丹转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(06):1428-1433.
- [72] Wu J, Caic, Cheng F, et al. Characterisation and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences[J]. *Molecular breeding*, 2014, 34: 1853-1866.
- [73] 舒珂, 李建红, 陈璐, 等. 卷丹百合远缘杂交及杂种后代的鉴定[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2022, 48(05):556-562.
- [74] 吴超, 郭方其, 徐丹彬, 等. 多头菊头状花序转录组 SSR 特点分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(18):6067-6075.
- [75] Han Z, Ma X, Wei M, et al. SSR marker development and intraspecific genetic divergence exploration of *Chrysanthemum indicum* based on transcriptome analysis[J]. *BMC genomics*, 2018, 19: 1-10.
- [76] 柴嘉男, 刘光瑞, 刘宝龙, 等. 普通念珠藻的基因组组装与进化分析[J]. *分子植物育种*, 2023, 16(04) 1-14.
- [77] 田春育, 李志勇, 刘倩, 等. 苜蓿属不同物种叶绿体基因组结构比较及亲缘关系分析[J]. *中国草地学报*, 2021, 43(10):1-8.
- [78] Li B, Lin F, Huang P, et al. Development of nuclear SSR and chloroplast genome markers in diverse *Liriodendron chinense* germplasm based on low-coverage whole genome sequencing[J]. *Biological Research*, 2020, 53: 1-12.

- [79] Antonio Lupini, Meriem Miyassa Aci, Antonio Mauceri, et al. Genetic diversity in old populations of sessile oak from Calabria assessed by nuclear and chloroplast SSR[J]. *Journal of Mountain Science*, 2019, 16(5): 1111–1120.
- [80] 王宏霞, 李文麒. 蒙古韭叶绿体微卫星特征分析[J]. *北方园艺*, 2023, (03):1-7
- [81] 杜方. 百合属的起源、分类及资源多样性[J]. *中国农业大学学报*, 2023, 28(04):68-79.
- [82] 魏潇, 章秋平, 刘威生, 等. 基于叶绿体 SSR 单倍型分析普通杏演化关系[J]. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(04):705-712.
- [83] Guo X, Cheng F, Zhong Y. Genetic Diversity of *Paeonia rockii* (Flare Tree Peony) Germplasm Accessions Revealed by Phenotypic Traits, EST-SSR Markers and Chloroplast DNA Sequences[J]. *Forests*, 2020, 11(6):672.
- [84] 陈碧云, 吕培军, 许鲲, 等. 利用 SSR 标记研究甘蓝型油菜叶绿体基因组 DNA 多态性[J]. *中国油料作物学报*, 2023, 45(01):46-55
- [85] ZELJKOVIĆ M K, BOSANČIĆ B, ĐURIĆ G, et al. Genetic diversity of pear germplasm in Bosnia and Herzegovina, as revealed by SSR markers[J]. *Zemdirbyste-Agriculture*, 2021, 108(1): 71-78.
- [86] 张静珍. 基于叶绿体 DNA 分析的山药种质遗传多样性研究[D]. 湖北省, 长江大学, 2022.
- [87] 刘小飞, 孙映波, 黄丽丽, 等. 白掌 SSR 引物筛选及 12 份种质资源亲缘关系分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(20):6802-6810. ,
- [88] Qi X, Wang K, Yang L, et al. The complete mitogenome sequence of the coral lily (*Lilium pumilum*) and the Lanzhou lily (*Lilium davidii*) in China[J]. *Open Life Sciences*, 2020, 15(1):1060-1067
- [89] Yang K, Nath U K, Biswas M K, et al. Whole-genome sequencing of *Brassica oleracea* var. capitata reveals new diversity of the mitogenome[J]. *PloS one*, 2018, 13(3): e0194356.
- [90] 冯慧敏. 基于细胞质基因组分析的芭蕉属植物系统发育及栽培香蕉的起源研究[D]. 海南省, 海南大学, 2018
- [91] 付东辉. 芸薹属植物线粒体基因组中 SSR 和 CMS 基因特异性标记的重复序列特征及开发[D]. 江西省, 江西农业大学, 2015.
- [92] 高明亮. ‘南水 8 号’ 黄瓜制种技术研究[D]. 江苏省, 南京农业大学, 2020.
- [93] Zhao C X, Zhu R L, Liu Y. Simple sequence repeats in bryophyte mitochondrial genomes[J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2016, 27(1): 191-197.
- [94] 孙炳蕊, 范芝兰, 李晨, 等. 含不同地区野生稻胞质的水稻雄性不育材料线粒体 SSR 标记分析[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(09):2392-2404.
- [95] 张帅. 温州蜜柑线粒体基因组组装及胞质杂种‘华柚 2 号’细胞质雄性不育基因发掘[D]. 湖北省, 华中农业大学, 2020.
- [96] 丁佳麒. 棉花线粒体 SSR160 位点分子标记挖掘及其对 atpA mRNA 稳定性的影响[D]. 吉林省, 长春理工大学, 2021.
- [97] Šafránková I. Occurrence of *Peronospora dianthicola* on carnations in the Czech Republic[J]. *Plant Protection Science*, 2012, 48(2): 72-73.
- [98] Shaji S, Vijayakumar A, KB S, et al. Genetic diversity analysis using SSR markers for high temperature tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. *Vegetable Science*, 2020, 47(2): 176-182.
- [99] 赵宇, 沈佳, 李季, 等. 黄瓜线粒体 DNA 指纹图谱的构建及其在杂交品种纯度鉴定中的应用[J]. *中国瓜菜*, 2017, 30(03): 5-10.
- [100] 刘晶. 中国豆梨与川梨的遗传多样性和群体遗传结构研究[D]. 浙江省, 浙江大学, 2013.
- [101] Francisconi A F, Cauz-Santos L A, Morales Marroquín J A, et al. Complete chloroplast genomes and phylogeny in three *Euterpe* palms (*E. edulis*, *E. oleracea* and *E. precatoria*) from different Brazilian biomes[J]. *PloS one*, 2022, 17(7): e0266304.
- [102] 马骞. 利用中高度重复序列和分子标记对栽培稻与几个野生稻基因组的比较分析[D]. 湖北省, 中南民族大学, 2009.
- [103] 刘山林, 邱娜, 张纾意, 等. 基因组学技术在生物多样性保护研究中的应用[J]. *生物多样性*, 2022, 30(10):334-354.
- [104] Maghuly, Pinsker, Praznik, et al. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.][J]. *FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT*, 2006, 222(1-3):266-271.

- [105] 张瑞杰, 田蓉, 闫晋强, 等. 甘蓝种和芥菜型油菜细胞质的遗传多样性[J]. 西北农业学报, 2012, 21(10): 59-64.
- [106] Wang Q, Zhang Y, Fang Z, et al. Chloroplast and mitochondrial SSR help to distinguish allo-cytoplasmic male sterile types in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)[J]. *Molecular breeding*, 2012, 30: 709-716.
- [107] 沙秀芬, 彭芳, 陶珊等. 丹参线粒体和叶绿体微卫星标记开发及多样性分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(12): 2215-2223.
- [108] Birky C. The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models[J]. *Annual Review of Genetics*, 1976, 26(1):26-33.