

# 基于 RSAP 标记的大花三色堇遗传多样性分析

李小梅, 杜晓华, 穆金燕, 刘会超\*

(河南科技学院, 河南新乡 453003)

**摘要:** 采用限制性位点扩增多态性(RSAP)标记技术, 对来源于国内外不同地区的 41 份大花三色堇种质资源遗传多样性进行分析, 并用 Bayesian 法和 UPGMA 法分别对其进行遗传结构和亲缘关系分析。结果表明: 筛选的 26 对 RSAP 引物组合共扩增出 588 条带, 其中多态性条带 567 个, 多态性比率为 97.03%, 平均每对引物扩增出 22.62 个位点和 21.81 个多态性位点, 18 对引物组合的鉴别能力达到 100%, 说明 RSAP 在大花三色堇遗传多样性分析中有较好的适用性和较高的分析效力。41 份大花三色堇种质 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数均值分别为 0.248 9、0.395 1, 高于自花授粉植物烟草, 与异花授粉植物玫瑰相近, 表明大花三色堇遗传多样性较为丰富。遗传结构分析将 41 份大花三色堇种质分为 6 个组群, 组群的划分与种质的地理来源存在较高相关性。基于 Nei's 遗传相似系数, 41 份大花三色堇种质分为 3 大类, 其中第 3 大类又可细分为 4 个亚类, 来源于相同或相近地域的种质大多聚在一起, 表明大花三色堇的种质交流存在地域限制。按地理来源划分的种质群亲缘关系分析显示, 中国种质群与荷兰种质群相距最近, 与德国种质群最远, 提示应加强对德国种质的引进; 按花色划分的 6 个群体 Shannon 信息指数为 0.199 4~0.364 9, 其中白色种质群最高, 黑色种质群最低, 说明白色花遗传多样性基础较广, 而黑色花遗传多样性较低。

**关键词:** 三色堇; RSAP; 遗传多样性; 聚类分析; 遗传结构

**中图分类号:** Q346+.5; Q789 **文献标志码:** A

## Genetic Diversity Analysis of 41 Pansy Germplasms Based on RSAP Markers

LI Xiaomei, DU Xiaohua, MU Jinyan, LIU Huichao\*

(Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

**Abstract:** The genome polymorphism among 41 pansy germplasms which collected from several regions worldwide were investigated by RSAP marker system. The genetic structure and relationships of and between them were analyzed by Bayesian and UPGMA methods, respectively. The results showed 26 RSAP primer combinations amplified 588 bands including 567 polymorphic bands. The polymorphism rate was 97.03%. Each primer combination detected 22.62 loci and 21.81 polymorphism loci averagely. 18 primer combinations can distinguish 41 pansy germplasms individually, showing good applicability and effectiveness of RSAP in pansy genetic diversity analysis. Based on structure analysis, 41 pansy germplasms were divided into 6 groups which indicated high correlations between group divisions and germplasm geographical origins. Nei's genetic diversity index and Shannon information index of these pansy germplasms were 0.248 9 and 0.395 1, respectively, higher than those of tobacco, a self-pollinated plant, and similar to rose, an outbreeding plant. Based on the Nei's genetic similarity coefficient, 41 pansy germplasms were divided into three major categories, in which the third category were subdivided into four classes. The most of germplasms from the same or adjacent regions were gathered together, suggesting pansy germplasm ex-

收稿日期: 2015-07-07; 修改稿收到日期: 2015-08-19

基金项目: 河南省科技攻关项目(152102110088)。

作者简介: 李小梅(1972—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事园艺植物种质资源研究。E-mail: lixiaomei@hist.edu.cn。

\* 通信作者: 刘会超, 博士, 教授, 主要从事园艺植物种质创新与利用研究。E-mail: 13683732063@163.com。

change was restricted to some extent. Further study on genetic relationships among different geographic germplasm groups showed that the nearest genetic distance between Dutch germplasm group and that of China, the furthest between German group and that of China, which suggest it is important for China to introduce pansy germplasm from Germany. The Shannon information indexes of 6 groups divided by flower color were from 0.199 4 to 0.364 9, in which white color groups had the highest one, while dark group had the lowest, revealing rich genetic diversity in the white color flower group and poor diversity in the black color flower group in pansy.

**Key words:** *Viola × wittrockiana*; RSAP; genetic diversity; clustering analysis; genetic structure

大花三色堇(*Viola × wittrockiana*, Gams.),又名蝴蝶花、猫脸花,为堇菜科(Violaceae)堇菜属(*Viola* L.)园艺杂交种,由三色堇(*V. tricolor* L.)、黄堇(*V. lutea* Huds.)及阿尔泰堇菜(*V. altica* Ker Gawl.)杂交获得<sup>[1]</sup>。因其色彩艳丽、花色丰富、花期长、耐寒等优点而成为春秋季节重要的花坛与盆栽花卉,在欧洲、美国和日本十分盛行,近年在中国城乡美化中开始大量应用,市场需求快速增长<sup>[2]</sup>。然而,目前中国大花三色堇生产用种子主要依赖进口,其品种主要为 F<sub>1</sub> 代,价高且适应中国生境的品种较少<sup>[2]</sup>。加快培育具有中国自有知识产权、适应中国生境的大花三色堇品种是当务之急。长期以来大花三色堇育种主要集中在欧美和日本等国的种子企业,因涉及商业秘密,外界对资源间的遗传关系不甚明了。对从各地引进的大花三色堇种质资源进行遗传多样性分析对于大花三色堇种质资源的收集、分类和育种具有重要的指导意义。

在大花三色堇种质资源研究方面,杜晓华等<sup>[3]</sup>基于表型对来自国内外的 33 份资源进行遗传差异分析。Ko 等<sup>[4]</sup>将 RAPD 标记和表型相结合研究了 30 种堇菜属植物的亲缘关系。Yockteng 等<sup>[5]</sup>利用 ITS 与 ISSR 标记研究了 25 种美丽堇菜亚属植物的系统分类。Culley 等<sup>[6]</sup>用 ISSR 标记分析了美国俄亥俄州 6 个堇菜种质亲缘关系,研究城市生境与种质基因的关系。王健等<sup>[7]</sup>用 RAPD 标记研究了 18 个三色堇自交系的遗传多样性。王涛等<sup>[8]</sup>采用 SRAP 标记研究了 43 份三色堇与角堇资源的遗传多样性。限制性位点扩增多态性(restriction site amplification polymorphism, RSAP)是一种基于基因组上广泛分布的限制性酶切位点多态性的 DNA 标记系统,具有操作简便、稳定、中等产率等特点<sup>[9]</sup>。该标记已在辣椒<sup>[10]</sup>、紫菜<sup>[11]</sup>、红花檵木<sup>[12]</sup>、大白菜<sup>[13]</sup>、龙须菜<sup>[14]</sup>、苕麻<sup>[15]</sup>、重楼属<sup>[16]</sup>、麦冬<sup>[17]</sup>等植物的遗传多样性分析中被广泛应用<sup>[18]</sup>。但目前尚未见其在堇菜属植物上的应用报道。

本研究随机选取了从国外育种公司和国内育种

单位引进后纯化以及本单位选育的 41 份大花三色堇种质资源,采用 RSAP 标记技术对其进行遗传多样性分析和亲缘关系分析,旨在为大花三色堇种质资源的收集、分类与种质创新提供依据,并评价 RSAP 标记系统在大花三色堇遗传多样分析中的适用性及其效力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的 41 份大花三色堇种质资源为多年自交纯化的自交系(表 1),由河南科技学院新乡市草花育种重点实验室提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 RSAP 分析** 以大花三色堇幼嫩叶片为材料,采用 SDS 法提取总 DNA<sup>[19]</sup>。

RSAP 分析方法参照杜晓华等<sup>[10]</sup>的方法进行,采用 10 条 RSAP 引物(表 2),组成 45 对引物组合,对 41 份大花三色堇资源进行分析。PCR 扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系共 25  $\mu$ L,其中模板 DNA 为 20 ng, Mg<sup>2+</sup> 浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶为 1.5 U, 2 条引物均为 600 nmol/L。PCR 扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 45  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增在 Biometra Tgradient PCR 仪上进行。扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,先在 60 W 功率下预电泳 30 min,加样后在 75 W 功率下电泳 2.5~3 h,银染检测,具体参照许绍斌等<sup>[20]</sup>的方法进行。

**1.2.2 数据分析** RSAP 分析产生的多态性条带,按二元数据进行统计,有带记为“1”,无带记为“0”,模糊不清带不统计。每对引物组合的多态性比率(%) = 引物组合扩增的多态性条带数/总条带数  $\times$  100,每个引物的鉴别能力(%) = 此引物组合可鉴别

表 1 供试的 41 份大花三色堇种质资源信息

Table 1 Basic information of 41 pansy germplasms used in this study

编号 No.	名称 Name	花色 Flower color	花斑 Blotch	花径类型 * Flower diameter type	来源 Origin
S1	SRAB	蓝色 Blue	褐斑 Purple blotch	小花 Small flower	德国 Sperli 公司 Germany Sperli Seeds
S2	SRFY	黄色 Yellow	褐斑 Purple blotch	中花 Medium flower	德国 Sperli 公司 Germany Sperli Seeds
S3	XXL-YB-1	黄色 Yellow	褐斑 Purple blotch	大花 Large flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S4	XXL-YB	黄色 Yellow	褐斑 Purple blotch	大花 Large flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S5	M-YC-1	黄色 Yellow	无 No blotch	中花 Medium flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed company
S6	M-YB-1	黄色 Yellow	红斑 Red blotch	中花 Medium flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S7	M-YC	黄色 Yellow	无 No blotch	大花 Large flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S8	M-BF	蓝色 Blue	黑斑 Black blotch	中花 Medium flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S9	M-W	白色 White	无 No blotch	中花 Medium flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S10	PXP-BT-D	蓝色 Blue	无 No blotch	中花 Medium flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S11	PXP-BT-L	蓝色 Blue	紫斑 Purple blotch	中花 Medium flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S12	P-PS	色渐变 Pink changed	紫斑 Purple blotch	小花 Small flower	美国泛美种子子公司 PanAmerica Seed Company
S13	HCG-X-1	黄色 Blue	无 No blotch	中花 Medium flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S14	HAR2	红色 Red	无 No blotch	大花 Large flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S15	HMB-X-1	白色 White	无 No blotch	小花 Small flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S16	HAR2-1	红色 Red	褐斑 Purple blotch	中花 Medium flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S17	HMB	白色 White	无 No blotch	小花 Small flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S18	08-NL-5	紫色 Purple	无 No blotch	微型花 Mini flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S19	HCG-1	黄色 Yellow	无 No blotch	大花 Large flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S20	08H	紫色 Purple	黄斑 Yellow blotch	小花 Small flower	荷兰花园种业 Ducth Garden Seeds
S21	G1-X-1	黄色 Yellow	无 No blotch	中花 Medium flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S22	G11-5-1	红色 Red	无 No blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S23	G11-6-1	红色 Red	无 No blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S24	G10-B	黑色 Black	无 No blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S25	229. 05	猩红色 Scarlet	黑斑 Black blotch	中花 Medium flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S26	229. 04	白色 White	无 No blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S27	229. 07	白色 White	无 No blotch	中花 Medium flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S28	229. 14	白色 White	紫斑 Purple blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S29	229. 01	黄色 Yellow	无 No blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S30	229. 1	黑色 Black	无 No blotch	小花 Small flower	酒泉金秋园艺 Jiuquan Jinqiu Horticulture
S31	E-01	紫色 Purple	无 No blotch	微型花 Mini flower	上海园林所 Shanghai Institute of Landscape Architecture
S32	EYO	黄色 Yellow	无 No blotch	中花 Medium flower	上海园林所 Shanghai Institute of Landscape Architecture
S33	ER01	猩红色 Scarlet	无 No blotch	中花 Medium flower	上海园林所 Shanghai Institute of Landscape Architecture
S34	EP1	紫色 Purple	黑斑 Black blotch	中花 Medium flower	上海园林所 Shanghai Institute of Landscape Architecture
S35	EWO	白色 White	无 No blotch	中花 Medium flower	上海园林所 Shanghai Institute of Landscape Architecture
S36	CW-1	白色 White	无 No blotch	中花 Medium flower	河南科技学院 Henan Institute of Science & Technology
S37	YP-1	紫白双色 White and purple	黄斑 Yellow blotch	中花 Medium flower	河南科技学院 Henan Institute of Science and Technology
S38	WH	红色 Red	无 No blotch	中花 Medium flower	河南科技学院 Henan Institute of Science and Technology
S39	WO	白色 White	无 No blotch	中花 Medium flower	河南科技学院 Henan Institute of Science and Technology
S40	YL	紫白双色 White and purple	黄斑 Yellow blotch	中花 Medium flower	河南科技学院 Henan Institute of Science and Technology
S41	YP	紫白双色 White and purple	黄斑 Yellow blotch	小花 Small flower	河南科技学院 Henan Institute of Science and Technology

注: \* 依据中国农业百科全书(观赏园艺卷)<sup>[18]</sup>,三色堇的花径≥10 cm 为巨大花,7~9 cm 为大花,5~7 cm 为中花,3~5 cm 为小花,<3 cm 为微型花。  
Note: According to China's Agricultural Encyclopedia (Ornamental Horticulture Roll)<sup>[18]</sup>, pansy giant type; flower diameter≥10 cm, larger type; 7~9 cm, medium type; 5~7 cm, small type; 3~5 cm, minitype; <3 cm.

的材料数/总材料数×100。采用 POPGENE ver-  
sion 1. 32 软件计算每对 RSAP 引物的有效等位基  
因数、Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数。  
采用 MVSP 3. 1 软件计算各材料间和组群间的  
Nei's 相似系数和遗传距离,并进行基于 UPGMA  
法的聚类 and 主坐标作图。  
采用 STRUCTURE 2. 3. 4<sup>[21]</sup> 对所有 RSAP 标  
记数据进行 Bayesian 分析,推测合理组群数目及个  
体所在的组群。组群数目(K)设定为 2~13,假定位  
点是独立的,采用非混合模型(no admixture),将

Length of Burn Period 设为 5000,MCMC(Markov Chain Monte Carlo)设定为 50000,依据软件计算的后验概率  $Ln P(D)$  值计算  $\Delta K$  值,绘制  $\Delta K$  曲线图。按照 G. Evanno<sup>[22]</sup> 提出的依据  $\Delta Ln P(D)$  最大值,推断最合理的组群数目  $K$ 。

表 2 实验用 10 条 RSAP 引物

Table 2 10 RSAP primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primers (5'→3')	限制性位点 Restriction site
R1	ATTACAACGAGTGATCC	GGATCC
R2	CACAGCACCCACTTTAAA	TTTAAA
R3	GACTGCGTACATGAATTC	GAATTC
R4	TATCTGGTGAGGGATATC	GATATC
R5	TTGGGATATCGGAAGCTT	AAGCTT
R6	ATTCAGCACCCACGATC	GATC
R7	ATAGTCCTGAGCGGTAA	TTAA
R8	ATAACTGTGTACCTGCAG	TGCAG
R9	GTACATGCATTACTGCGA	TGCGA
R10	ATTGGA CTGGTCTCTAGA	TCTAGA

2 结果与分析

2.1 RSAP 引物扩增多态性分析

从 45 对引物组合中筛选出 26 对引物组合对 41 份材料 PCR 扩增结果表明(表 3),每对引物组合可扩增出 12~37 条清晰条带,26 对引物组合共扩增出 588 条条带;每对引物组合产生多态性条带 12~34 条,平均单引物组合产生 21.81 条多态性条带,26 对引物组合共产生多态性条带 567 条,多态性比率 97.03%。18 对引物组合的多态性条带百分率为 100%,对 41 份大花三色堇资源的鉴别能力为 100%,意味着使用其中任何一个单引物组合可区分供试的所有种质资源,占到引物组合总数的 69%。其余引物组合的鉴别能力也在 83%~98%之间,能区分大部分种质。RSAP 引物有效等位位点数为 1.18~1.63,平均为 1.40,以 R1-R9 引物组合所得值最大。

表 3 26 对引物组合对 41 份大花三色堇扩增结果

Table 3 Amplification results of 26 RSAP primers on 41 pansy accessions

引物组合 Primer combination	总条带数 Number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Percentage of polymorphic bands/%	有效等位基因数 Effective number of alleles	可鉴别资源数 Discriminating number	鉴别能力 Discrimination/%
R1-R2	21	21	100	1.29	41	100
R2-R3	28	28	100	1.29	41	100
R1-R4	20	20	100	1.41	41	100
R1-R5	12	12	100	1.28	34	83
R1-R6	24	21	87.50	1.30	41	100
R1-R7	23	22	95.65	1.55	37	90
R1-R9	28	25	89.29	1.63	41	100
R1-R10	19	19	100	1.27	41	100
R2-R6	23	23	100	1.46	41	100
R2-R8	26	25	95.15	1.42	41	100
R2-R9	19	19	100	1.27	41	100
R2-R10	23	21	91.30	1.45	41	100
R3-R5	27	27	100	1.45	41	100
R3-R7	19	19	100	1.30	40	98
R3-R8	17	17	100	1.21	39	95
R3-R9	27	27	100	1.18	35	85
R3-R10	16	16	100	1.43	40	98
R4-R5	21	21	100	1.45	41	100
R4-R7	26	26	100	1.50	41	100
R4-R8	20	19	95	1.51	41	100
R5-R7	23	23	100	1.34	41	100
R5-R9	21	21	100	1.38	39	95
R5-R10	29	22	75.9	1.56	41	100
R6-R7	22	22	100	1.42	41	100
R7-R9	37	34	91.9	1.57	41	100
R8-R9	17	17	100	1.51	41	100
平均 Average	22.62	21.81	97.03	1.40	40.12	98
总计 Total	588	567	—	36.41	—	—

2.2 大花三色堇种质资源遗传多样性与聚类分析

利用 POPGENE version 1.32 软件计算各位点 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数,结果显示,41 份大花三色堇种质的平均 Nei's 遗传多样性指数为 0.248 9;平均 Shannon 信息指数为 0.395 1。高于自花授粉植物普通烟草遗传多样性指数 0.157<sup>[23]</sup>,与异花授粉玫瑰的遗传多样性指数(0.266 5)和 Shannon 信息指数(0.403 3)<sup>[24]</sup>相近。

Bayesian 分析结果表明,参试的 41 份大花三色堇种质最合理组群数为 6(表 4)。依据“Q 值>0.6 视为谱系相对单一”的标准<sup>[25]</sup>,37 份种质(90%)可划分到相应的组群中,其中德国 Sperli 公司和美国泛美子公司(除 M-YC-1 外)的所有种质,及荷兰花园种业 3 份种质(HCG-X-1、HAR2 和 HAR2-1)和河南科技学院 1 份种质(YB)归属组群 I;荷兰花园种业的其余 5 份种质归属组群 II;上海园林所

表 4 41 份大花三色堇种质的遗传结构  
Table 4 Genetic structure of 41 pansy germplasms

编号 No.	名称 Name	组群 Cluster					
		I	II	III	IV	V	VI
S1	SRAB	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S2	SRFY	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S3	XXL-YB-1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S4	XXL-YB	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S5	M-YC-1	0.077	0.000	0.000	0.000	0.000	0.923
S6	M-YB-1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S7	M-YC	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S8	M-BF	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S9	M-W	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S10	PXP-BT-D	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S11	PXP-BT-L	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S12	P-PS	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S13	HCG-X-1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S14	HAR2	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S15	HMB-X-1	0.395	0.605	0.000	0.000	0.000	0.000
S16	HAR2-1	0.668	0.332	0.000	0.000	0.000	0.000
S17	HMB	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S18	08-NL-5	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S19	HCG-1	0.236	0.764	0.000	0.000	0.000	0.000
S20	08H	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S21	G1-X-1	0.001	0.000	0.999	0.000	0.000	0.000
S22	G11-5-1	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
S23	G11-6-1	0.000	0.000	0.499	0.000	0.500	0.000
S24	G10-B	0.011	0.000	0.889	0.000	0.100	0.000
S25	229.05	0.017	0.403	0.478	0.000	0.102	0.000
S26	229.04	0.580	0.259	0.161	0.000	0.000	0.000
S27	229.07	0.000	0.000	0.057	0.943	0.000	0.000
S28	229.14	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S29	229.01	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S30	229.1	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S31	E-01	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S32	EYO	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S33	ER01	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S34	EP1	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S35	EWO	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S36	CW-1	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S37	YP-1	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
S38	WH	0.000	0.000	0.158	0.842	0.000	0.000
S39	WO	0.000	0.000	0.195	0.804	0.000	0.000
S40	YL	0.000	0.000	0.409	0.591	0.000	0.000
S41	YP	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

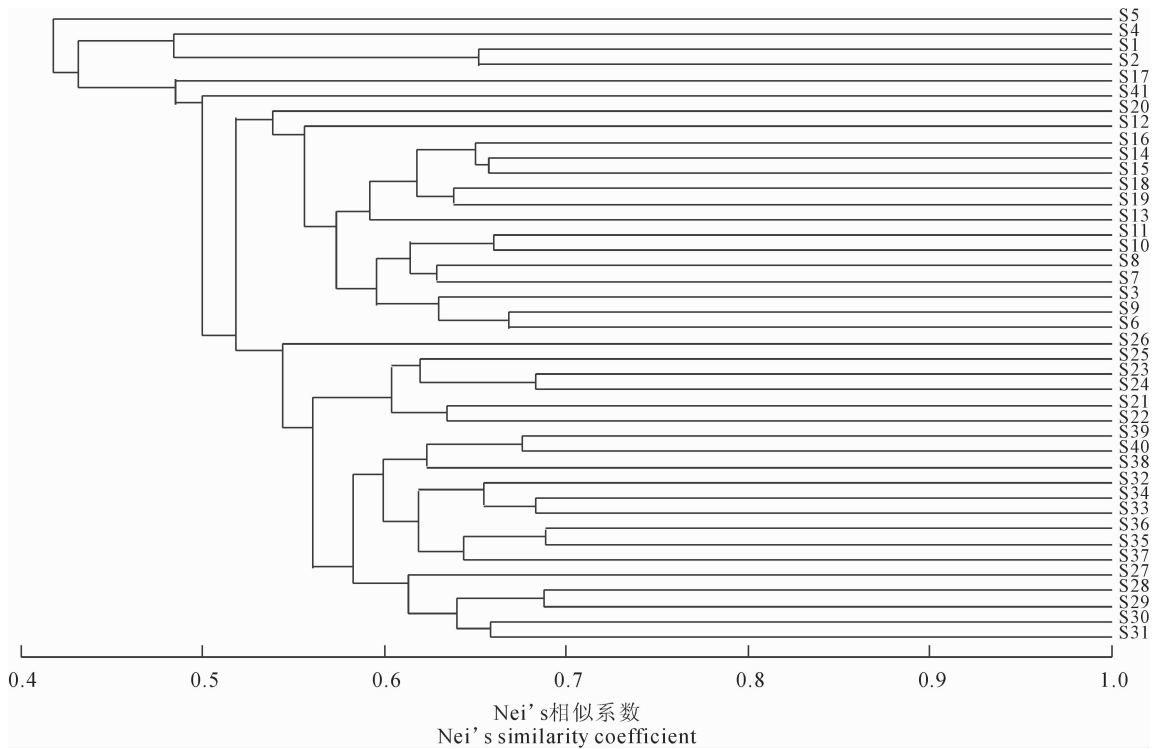


图1 41份大花三色堇的 RSAP 聚类图

物种代号同表 1

Fig. 1 Dendrogram of 41 pansy accessions based on RSAP

The code numbers of germplasms are as same as those in Table 1

所有种质与酒泉金秋园艺和河南科技学院的绝大多数种质归属组群Ⅲ；酒泉金秋园艺 1 份种质(229.07)和河南科技学院 2 份种质(WH 和 WO)归属组群Ⅳ；酒泉金秋园艺 1 份种质(G11-5-1)归属组群Ⅴ；美国泛美 1 份种质(M-YC-1)归属组群Ⅵ。酒泉金秋园艺 3 份种质(G11-6-1、229.04 和 229.05)和河南科技学院的 1 份种质(YL)在任何组群中的 Q 值  $\leq 0.6$ , 说明其谱系较为复杂。如果不考虑 G11-5-1 和 M-YC-1, 则绝大多数(35 份)种质可归属为 4 个组群, 大多数种质的组群归属与其地理来源存在较高的相关性。

基于 Nei's 相似系数的亲缘关系分析表明, 41 份材料间的平均遗传相似系数为 0.522, 其中来自德国 Sperli 的 'SRFY' 与上海园林所的 ER01 亲缘关系最远, 遗传相似系数 0.318; 上海园林所的 EWO 与河南科技学院自选的 CW-1 之间, 酒泉金秋园艺的 '229.01' 与 '229.14' 之间的亲缘关系最近, 遗传相似系数 0.688。基于 UPGMA 法的聚类结果显示(图 1), 在相似系数 0.430 处, 41 份材料可聚为三大类, 其中美国泛美的 'M-YC-1' 单独为 I 类; 德国 Sperli 种质和美国泛美的 'XXL-YB' 聚为第 II 类; 其余 37 份种质为第 III 类。第 III 类在相似系数

0.518 处, 又可分为 4 个亚类: 荷兰花园种业的 'HMB' 单独为 A 亚类; 河南科技学院 YP 为 B 亚类; C 亚类包括了美国泛美和荷兰花园种业的绝大多数种质资源; D 亚类包括了上海园林所、酒泉金秋园艺及河南科技学院几乎所有材料(除 YP 外)。聚类结果显示, 来源地相近的种质绝大多数聚为一类, 表明大花三色堇种质遗传多样性基础与来源地相关性较高。

### 2.3 不同地理来源大花三色堇种质资源遗传多样性与聚类分析

为进一步分析地理来源对大花三色堇种质遗传多样性影响, 综合遗传结构分析结果和聚类结果, 将 41 份材料按照地理来源划分为 4 个种质群: 德国种质群、美国种质群、荷兰种质群和中国种质群。从 Shannon 信息指数看(表 5), 从高到低依次为: 中国种质群 > 荷兰种质群 > 美国种质群 > 德国种质群。从各地理种质群 Nei's 遗传多样性指数看, 中国种质群最大(0.238 5), 其次为荷兰种质群(0.209 5), 再次为美国种质群(0.196 5), 德国种质群最小(0.057 8)。

4 个地理种群遗传相似系数范围为 0.854 4 ~ 0.963 6(表 5), 其中荷兰与中国种质群之间的遗传

相似系数最高,为 0.963 6,遗传距离最近;而德国和中国种质群的遗传相似系数最低,为 0.854 4,遗传距离最远。基于群体间的 Nei's 遗传相似系数,采用 MVSP 软件作出了地理群体间的三维坐标图(图 2),从图 2 可见,荷兰种质群与中国种质群相距最近,其次为美国种质群,德国种质群相距其他种质群较远。

2.4 不同花色大花三色堇种质资源的遗传多样性

为了解大花三色堇花色的种质资源遗传多样性,将 41 份材料按花色划分为 6 个花色群:黄色群、蓝色群、白色群、红色群(包括粉色)、紫色群和黑色群。经 Popgene version 1.32 软件计算得到大花三色堇 6 个花色群 Shannon 信息指数变化范围为 0.199 4~0.364 9(表 6),各花色群多样性指数由高到低依次为:白色群、紫色群、红色群、紫色群、蓝色群、黑色群。总体来看,白色群 Shannon 信息指数

表 5 大花三色堇 4 个地理种质群间的 Nei's 遗传相似系数(对角线上方)、遗传距离(对角线下方)和 Shannon 信息指数

Table 5 Nei's genetic similarity coefficient (above diagonal),genetic distance (below diagonal) and Shannon information index among the four groups of pansy populations separated by geographical distributions					Shannon 信息指数 Shannon information index
群体 Group	I	II	III	IV	
I		0.915 2	0.869 7	0.854 4	0.084 3
II	0.088 6		0.962 9	0.948 5	0.307 8
III	0.139 6	0.037 8		0.963 6	0.319 8
IV	0.157 4	0.052 9	0.037 0		0.372 5

注: I. 德国种质群; II. 美国种质群; III. 荷兰种质群; IV. 中国种质群。图 3 同。

Note: I. German germplasm group; II. American germplasm group; III. Dutch germplasm group; IV. Chinese germplasm group. The same as Fig. 3.

表 6 大花三色堇 6 个花色群体间 Nei's 遗传相似系数(对角线上方)、遗传距离(对角线下方)和 Shannon 信息指数  
Table 6 Nei's genetic similarity coefficient (above diagonal),genetic distance (below diagonal) and Shannon information index among six pansy groups separated by flower color

群体 Groups	蓝色 Blue	黄色 Yellow	白色 White	红色 Red	紫色 Purple	黑色 Black	Shannon 信息指数 Shannon information index
蓝色 Blue		0.978 6	0.956 6	0.956 5	0.936 1	0.883 6	0.216 7
黄色 Yellow	0.021 6		0.981 3	0.977 3	0.966 2	0.911 7	0.350 3
白色 White	0.044 4	0.018 8		0.990 5	0.992 4	0.934 6	0.364 9
红色 Red	0.044 5	0.022 9	0.009 6		0.976 0	0.938 5	0.353 1
紫色 Purple	0.066 0	0.034 4	0.007 7	0.024 3		0.929 7	0.355 8
黑色 Black	0.123 8	0.092 5	0.067 6	0.063 5	0.072 9		0.199 4

要高于其他花色群,说明白色群的遗传多样性较为丰富;而黑色群和蓝色群的 Shannon 信息指数相对偏低,遗传多样性较低。

6 个花色群的遗传相似系数为 0.883 6~0.992 4(表 6),其中白色群体与黄色群体、白色群体与紫色群体间的遗传相似系数在 99% 以上;而蓝

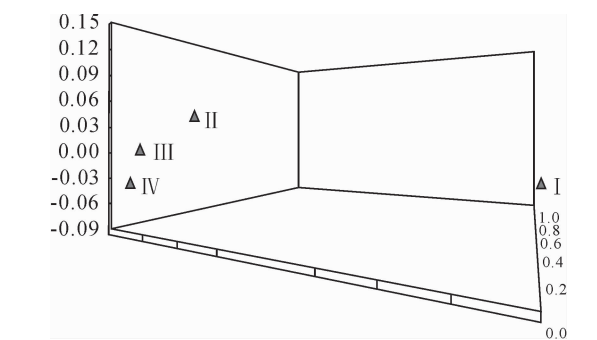


图 2 4 个大花三色堇地理种质群三维分布图  
坐标值代表在不同主坐标上各地理群体间的遗传距离  
Fig. 2 3-dimension distributions of four pansy geographical groups  
Coordinate values represent genetic distances between different geographic population in different main coordinates

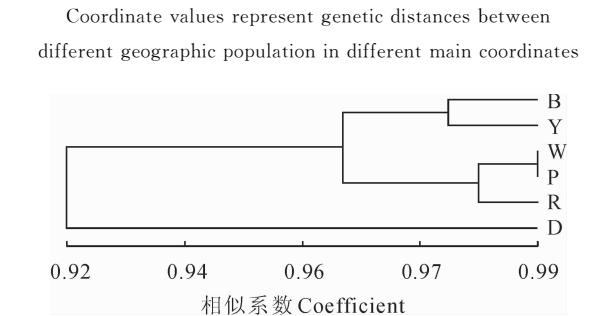


图 3 大花三色堇 6 个花色群的 RSAP 聚类图  
B 代表蓝色群;Y 代表黄色群;W 代表白色群,  
P 代表紫色群;R 代表红色群;D 代表黑色群

Fig. 3 RSAP dendrogram of 6 pansy groups divided by flower color  
B stands for blue group;Y stands for yellow group;W stands for white group;P stands for purple group;R stands for red group, D stands for black group.

色群和黑色群的遗传相似系数最低,为 0.883 6。基于各花色群体间 Nei's 遗传相似系数聚类结果显示(图 3),在遗传相似系数 0.964 处,6 个花色群聚成 3 类,其中,黑色群体单独为一类,黄色和蓝色群体聚为一类,红色、白色和紫色群体聚为一类。

### 3 讨 论

#### 3.1 RSAP 在种质资源多样性分析中的适用性

操作简便、重复性高、在基因组分布均匀、成本低是理想 DNA 标记的重要内容<sup>[26]</sup>。以揭示基因组限制性位点多态性为目的的 RSAP 标记系统与 RFLP 和 AFLP 相比,操作更简便,只需一步 PCR 就能完成,但具有与 AFLP 和 SRAP(相关序列扩增多态性)相媲美的产率<sup>[27]</sup>。在三色堇上,本研究单次 RSAP-PCR 可扩增 12~37 条带,明显优于 RAPD 标记<sup>[28]</sup>,与 SRAP-PCR 扩增的 13~30 条带<sup>[8]</sup>相近。由于 SRAP 仅检测基因开放阅读框区(ORF)多态性<sup>[29]</sup>,而 RSAP 检测的限制性位点在基因组分布更加广泛,因此对基因组变异的反映会更全面,分析效力可能更高。这一推断在辣椒<sup>[27]</sup>和三色堇遗传多样性分析中均得到印证。例如,王涛等<sup>[8]</sup>在对 43 份三色堇和角堇的 SRAP 分析中,筛选的 21 对引物组合中 6 对鉴别能力达到 100%;而本研究采用 RSAP 对 41 份大花三色堇的分析显示,26 对引物组合中就有 18 对引物组合(69.2%)的鉴别能力达到了 100%。从分析成本来看,SRAP 获得了 500 条多态性条带,合成了引物 19 条引物;而 RSAP 合成 10 条引物,即获得了 567 条多态性条带,应用成本上更低。综上所述,在种质资源多样性分析上 RSAP 具有一定优势。当然,SRAP 标记的优势在于,发现与目标性状关联的 DNA 标记,从而实现基因的定位、克隆或标记辅助选择<sup>[26]</sup>。

#### 3.2 大花三色堇种质资源多样性与种质交流

从遗传多样性来看,大花三色堇种质的多样性

指数高于自花授粉植物普通烟草<sup>[23]</sup>,接近异花授粉植物玫瑰<sup>[24]</sup>,这与大花三色堇的异花授粉习性<sup>[28]</sup>相一致。同为异花授粉植物,玫瑰栽培历史久,遗传改良和种质创新时间长;三色堇栽培时间相对短<sup>[1]</sup>;但由于三色堇常用做一二年栽培,有性杂交造成的基因重组频繁,可能是其在遗传多样性上与玫瑰接近的主要原因,这也反映出近百年来大花三色堇的育种成就比较突出。

基于 Bayesian 的遗传结构分析和基于 Nei's 相似系数的聚类结果均表明,来源地相同或相近的大花三色堇种质资源亲缘关系较近,这与杜晓华等<sup>[3]</sup>基于表型的聚类结果和王健等<sup>[7]</sup>采用 RAPD 的研究结论一致,说明大花三色堇的种质交流存在一定的地域限制。原因可能在于:当前大花三色堇育种主要集中在德国、美国和日本等几家种子公司,为了自身利益,延长品种使用寿命,各公司无形中限制了种质交流。来源于国内几个单位的种质亲缘关系较近,反映了国内资源在遗传多样性上仍存在一定的局限性,需要继续加强种质资源的引进和创新。中国种质群与德国种质群的亲缘关系较远,提示应要加强德国种质的引进。

#### 3.3 花色遗传多样性

有关花色研究表明,花色素的形成是一个复杂的生化代谢过程,涉及许多不同基因编码的酶。此外,花色的呈现还受花瓣细胞的结构、细胞液 pH 等多种因素的影响<sup>[30]</sup>。因此不同花色类型的遗传基础不同。本研究通过 DNA 标记对三色堇花色遗传多样性分析表明,大花三色堇白色群体的遗传多样性指数最高,说明白色在三色堇中的遗传基础广泛,这可能与三色堇为自然早春开花植物,因授粉媒介的关系白色类型花占主导地位<sup>[31]</sup>。大花三色堇黑色群体的遗传多样性指数较低,说明黑色类型品种培育在大花三色堇品种选育中受到一定制约。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG Q SH(张其生),BAO M ZH(包满珠),LU X X(卢兴霞),*et al.* Research advances in breeding of pansy (*Viola × wittrockiana*) [J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学报),2010,**45**(1):128-133(in Chinese).
- [2] WANG X Y(王新悦). Breed passionately-visiting ZHU Chaowei, Asian technology consultant of Banner Seed Company in Germany [J]. *China Flowers & Horticulture*(中国花卉园艺),2012,(13):20-22(in Chinese).
- [3] DU X H(杜晓华),LIU H CH(刘会超),LIU M G(刘孟刚),*et al.* Preliminary analysis on genetic difference of 33 pansy cultivars [J]. *Journal of Northwest Forestry University*(西北林学院学报),2010,**25**(4):78-82(in Chinese).
- [4] KO M K,YANG J,JIN Y H,*et al.* Genetic relationship of *Viola* species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*,1998,**73**(5):601-605.
- [5] YOCKTENG R,BALLARD H E,MANSION G,*et al.* Relationships among pansies (*Viola section Melanium*) investigated using ITS and



- ISSR markers[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2003, **241**(3-4): 153-170.
- [6] CULLEY T M, SBITA S J, WICK A. Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the perennial herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR makers [J]. *Annals of Botany*, 2007, **100**(1): 91-100.
- [7] WANG J(王 健), BAO M ZH(包满珠). Application of RAPD on analysis of genetic relationship between inbred lines and prediction of heterosis in pansy (*Viola wittrockiana*) [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 2007, **25**(1): 19-23 (in Chinese).
- [8] WANG T(王 涛), XU J(徐 进), ZHANG X X(张西西), et al. Genetic relationship of 43 cultivars of *Viola tricolor* and *Viola cornuta* using SRAP marker [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2012, **45**(3): 496-502 (in Chinese).
- [9] DU X H(杜晓华), WANG D Y(王得元), GONG ZH H(巩振辉). Development and refinement of a new marker technique-restriction site amplified polymorphism (RSAP) [J]. *Journal of Northwest A&F University* (Natural Science Edition) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2006, **34**(9): 45-54 (in Chinese).
- [10] DU X H(杜晓华), GONG ZH H(巩振辉), WANG D Y(王得元). Estimation and comparison of genetic distances among elite inbred lines in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) by RSAP and SSR [J]. *Journal of Northwest A&F University* (Natural Science Edition) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2007, **35**(7): 97-102 (in Chinese).
- [11] QIAO L X(乔利仙), WENG M L(翁曼丽), et al. The application of RSAP marker technique in diversity detection and germplasms identification of *Porphyr*a [J]. *Periodical of Ocean University of China* (中国海洋大学学报), 2007, **37**(6): 951-956 (in Chinese).
- [12] LI X L(李炎林), XIONG X Y(熊兴耀), et al. Establishment and optimization of RSAP-PCR reaction for *Loropetalum chinese* var. [J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Natural Sciences Edition) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2009, **35**(1): 65-68, 75 (in Chinese).
- [13] ZHANG M K(张明科), ZHANG L G(张鲁刚), GONG ZH H(巩振辉), et al. New primers design and reaction system optimization of restriction site amplified polymorphism (RSAP) marker technique [J]. *Journal of Northwest A&F University* (Natural Science Edition) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2009, **37**(2): 148-154, 147 (in Chinese).
- [14] WANG J G(王津果), SUI ZH H(隋正红), ZHOU W(周 伟), et al. RSAP analysis on *Gracilariopsis lemaneiformis* and conversion of SCAR marker [J]. *Periodical of Ocean University of China* (中国海洋大学学报), 2014, **44**(4): 47-53 (in Chinese).
- [15] ZOU Z ZH(邹自征), CHEN J H(陈建华), LUAN M B(栾明宝), et al. Genetic relationship of ramie germplasm revealed by RSAP, SRAP, and SSR markers [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2012, **38**(5): 840-847 (in Chinese).
- [16] XIN B H(辛本华), TIAN M L(田孟良), WU B L(吴镔镔), et al. Genetic diversity analysis of Paris by RSAP markers [J]. *China Journal of Chinese Material Medica* (中国中药杂志), 2011, **36**(24): 3 425-3 427 (in Chinese).
- [17] XU H CH(徐护朝), ZHANG J Y(张君毅), XU C(徐 灿). Genetic diversity of different populations of lilyturf revealed by RSAP analysis [J]. *China Journal of Chinese Material Medica* (中国中药杂志), 2014, **39**(20): 3 922-3 927 (in Chinese).
- [18] 中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书(观赏园艺卷)[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 366-367.
- [19] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [20] XU SH B(许绍斌), TAO Y F(陶玉芬), YANG ZH Q(杨昭庆), et al. A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas* (遗传), 2002, **24**(3): 335-336 (in Chinese).
- [21] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, **155**(2): 945-959.
- [22] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(8): 2 611-2 620.
- [23] QI J M(祁建民), LIANG J X(梁景霞), et al. Genetic diversity and evolutionary analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm resources based on ISSR and SRAP markers [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2012, **38**(8): 1 425-1 434 (in Chinese).
- [24] XU Z D(徐宗大), ZHAO L Y(赵兰勇), ZHANG L(张 玲), et al. Analysis of genetic diversity and construction of fingerprint of *Rosa rugosa* by SRAP [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2011, **44**(8): 1 662-1 669 (in Chinese).
- [25] XU G B(徐刚标), WU X Q(吴雪琴), JIANG G X(蒋桂雄), et al. Genetic diversity and population structure of an endangered species: *Tsoongiodendron odoratum* Chun [J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), 2014, **15**(2): 255-261 (in Chinese).
- [26] GEORGE A. Principles of Plant Genetics and Breeding (Second Edition) [M]. New York: John Wiley & Sons, Ltd. 2012: 389-423.
- [27] DU X H, WANG D Y, GONG ZH H. Comparison of RSAP, SRAP and SSR for genetic analysis in hot pepper [J]. *Indian Journal of Horticulture*, 2010, **64**(4): 66-71.
- [28] 王健. 三色堇杂交育种、RAPD 标记辅助育种及组织培养的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [29] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **103**: 455-461.
- [30] 戴思兰. 园林植物遗传学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2010.
- [31] FREY F M. Opposing natural selection from herbivores and pathogens may maintain floral-color variation in *Claytonia virginica* (Portulacaceae) [J]. *Evolution*, 2004, **58**(11): 2 426-2 437.