

基于 SSR 标记的荷花品种遗传多样性及群体结构分析

杜凤凤, 刘晓静, 常雅军, 李乃伟, 李丕睿, 姚东瑞^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 采用 SSR 标记技术对 42 个荷花品种(*Nelumbo* spp.)的基因组 DNA 进行扩增,在此基础上,对供试品种进行 UPGMA 聚类分析、群体结构分析和主坐标分析(PCoA)。结果表明:采用 17 对 SSR 引物从 42 个荷花品种的基因组 DNA 中扩增出 77 个位点,多态性位点百分率为 88.31%;每对引物可扩增出 1~9 个多态性位点。根据 Nei's 遗传距离,供试的 42 个荷花品种可被分成 I 和 II 两组,分别包含 3 和 39 个品种;在 Nei's 遗传距离 0.150 处,II 组被进一步分成 II a、II b 和 II c 3 个亚组,分别包含 3、16 和 20 个品种。群体结构分析结果表明:组分概率高于等于 0.80 时,供试的 42 个荷花品种被分成 Pop1、Pop2 和混合群 3 个亚群,分别包含 17、16 和 9 个品种。PCoA 分析结果表明:在 F1 水平上,供试的 42 个荷花品种被分成 2 个部分;其中,Pop1 亚群的品种均分布在第二和第三象限,而 Pop2 亚群的品种则分布在第一和第四象限。总体来看,聚类分析、群体结构分析和 PCoA 分析的结果基本一致。综合分析结果表明:I 组包含美洲黄莲(*N. lutea* Pers.)品种‘艾江南’,且与传统中国莲(*N. nucifera* Gaertn.)品种的亲缘关系最远,故认为该组为美洲黄莲;II 组为中国莲,其中,II c 亚组以传统中国莲品种为主,而 II b 亚组则偏重于美洲黄莲。总体上看,供试的 42 个荷花品种主要被分为中国莲和美洲黄莲两组,而中美杂交莲并没有独立成组,其成因有待进一步研究。

关键词: 荷花品种; SSR 标记; 遗传多样性; UPGMA 聚类分析; 群体结构分析; 主坐标分析(PCoA)

中图分类号: Q946-33; S682.32 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)01-0009-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.01.02

Analyses on genetic diversity and population structure of lotus cultivars (*Nelumbo* spp.) based on SSR markers DU Fengfeng, LIU Xiaojing, CHANG Yajun, LI Naiwei, LI Pirui, YAO Dongrui^①
(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(1): 9-16

Abstract: Genomic DNA of 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.) were amplified by SSR marker technique, on the basis, UPGMA cluster analysis, population structure analysis and principal coordinate analysis (PCoA) of cultivars tested were carried out. The results show that 77 loci are amplified from genomic DNA of 42 lotus cultivars by 17 pairs of SSR primers, percentage of polymorphic locus is 88.31%. Each pair of SSR primer can amplify 1-9 polymorphic loci. According to Nei's genetic distance, 42 lotus cultivars tested can be divided into two groups, i. e. I and II, which contain 3 and 39 cultivars, respectively. At Nei's genetic distance of 0.150, group II is further divided into three subgroups, i. e. II a, II b and II c, which contain 3, 16 and 20 cultivars, respectively. The result of population structure analysis shows that when component probability is above or equal to 0.80, 42 lotus cultivars tested can be divided into three subpopulations, i. e. Pop1, Pop2 and mixed population, which contain 17, 16 and 9 cultivars, respectively. The result of PCoA analysis shows that on F1 level, 42 lotus cultivars tested are divided into two parts. In which, cultivars of Pop1 subpopulation all distribute in the second and the third quadrants, while those of Pop2 subpopulation distribute in the first and the fourth quadrants. Overall, results of cluster analysis, population structure analysis and PCoA analysis are

收稿日期: 2015-06-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31400604); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20151370); 国家海洋公益性行业科研专项(201505023-4); 江苏省中国科学院植物研究所基金资助项目(SQ201403)

作者简介: 杜凤凤(1992—),女,甘肃天水人,硕士研究生,主要从事荷花资源的研究和开发利用。

^①通信作者 E-mail: shuishengzu@126.com

basically identical. The comprehensive analysis result shows that I group contains American lotus (*N. lutea* Pers.) cultivar 'Aijiangnan', and its relationship with traditional Chinese lotus (*N. nucifera* Gaertn.) cultivars is the farthest, so the group is considered to be American lotus. II group is Chinese lotus, in which, II c subgroup is mainly traditional Chinese lotus cultivars, while II b subgroup is lean to American lotus. In general, 42 lotus cultivars tested are mainly divided into two groups of Chinese lotus and American lotus, while Sino-American hybrid lotus has not became into an independent group, the reason needs to be further researched.

Key words: lotus cultivars (*Nelumbo* spp.); SSR marker; genetic diversity; UPGMA cluster analysis; population structure analysis; principal coordinate analysis (PCoA)

荷花为睡莲科 (Nymphaeaceae) 莲属 (*Nelumbo* Adans.) 多年生挺水植物, 为中国十大传统名花之一, 兼具观赏、经济及生态价值。荷花是起源最早的被子植物之一, 素有“活化石”之称, 属于冰川孑遗物种^[1]。现存的莲属植物仅有 2 个种, 即中国莲 (*N. nucifera* Gaertn.) 和美洲黄莲 (*N. lutea* Pers.), 二者在花色和花型上具有明显区别, 中国莲的花色以红、粉及白为主, 且花型多样; 而美洲黄莲的花色则以黄为主、花型以少瓣为主。中国莲主要分布在亚洲和大洋洲北部, 而美洲黄莲则原产于北美洲; 虽然二者存在地理分布隔离, 但仍可相互杂交, 并不存在生殖隔离现象^[2-3]。荷花在中国有 2 500 a 以上的栽培历史, 且品种繁多, 目前已超过 800 个品种^[4]。近年来, 通过自然杂交和人工选育培育出大量具有优良园艺学性状的荷花新品种, 深受育种专家和消费者的喜爱, 且栽培面积广、数量多, 但是这些新品种的亲本信息不明、遗传背景复杂, 迄今为止这些品种的亲缘关系和遗传多样性尚不十分清楚, 因此, 亟待明确荷花各品种间的亲缘关系。

由于荷花的形态特征易受外界环境影响, 且种群庞大、遗传背景复杂, 因此 RAPD、ISSR、AFLP 和 SSR 等分子标记技术已经成为研究其遗传多样性和亲缘关系的主要方法^[5-11]。SSR (simple sequence repeat, 简单重复序列) 分子标记技术是以 PCR 为基础的 DNA 多态性检测技术, 具有共显性、稳定性好、多态性高和遗传信息量大的特点, 较其他分子标记具有明显的优势, 是理想的分子标记方法^[12]。

基于此, 作者利用筛选出的扩增条带清晰且多态性好的 SSR 引物, 对供试的 42 个荷花品种进行 SSR 扩增, 并对这些荷花品种进行 UPGMA 聚类分析、群体结构分析和主坐标分析 (PCoA), 以期明确这些荷花品种的遗传多样性特征, 能够在分子水平上对这些荷花品种进行鉴定和分类, 并为荷花品种间的亲缘关系分析和荷花分子标记育种研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 42 个荷花品种包括 25 个中国莲品种、1 个美洲莲品种、10 个杂交莲品种以及 6 个未命名的新品种, 各品种的名称及主要形态特征见表 1。供试的荷花品种均种植于江苏省中国科学院植物研究所内。种植地的地理坐标为北纬 32°04'、东经 118°45', 年均温 15.7 °C, 年均降水量 1 106.5 mm, 年均降水日数 117 d。于 2014 年 4 月初对所有品种进行翻盆, 并采用种藕进行种植, 于同年 5 月初采集植株上萌发的第 2 片和第 3 片立叶, 置于装有硅胶的自封袋中并带回实验室, 备用。

PCR 扩增反应所用试剂及 SSR 荧光引物均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用 CTAB 法^[13] 提取各品种嫩叶的基因组 DNA, 并采用质量体积分数 0.8% 琼脂糖凝胶和 OneDrop 分光光度计 (南京五义科技有限公司) 检测获得的 DNA 样品的质量和浓度。将获得的 DNA 样品稀释至质量浓度 50 ng · μL⁻¹, 置于 -20 °C 冰箱中保存、备用。

1.2.2 SSR-PCR 扩增反应 从已知的荷花 SSR 引物^[10-11] 中选出 34 对引物, 随机选择 4 个荷花品种的基因组 DNA 进行扩增反应, 最终筛选出 17 对扩增条带清晰且多态性好的引物用于 42 个荷花品种基因组 DNA 的 SSR 扩增, 各引物的序列及退火温度见表 2。

反应体系的总体积为 25.0 μL, 包括 50 ng DNA 样品、2.5 μL 10×PCR buffer、0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs、正向和反向引物各 4 μmol · L⁻¹、1 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、相应温度退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共计 35 个循环;

最后于 72 ℃ 延伸 10 min。对扩增产物进行毛细管电泳荧光检测,并用 ABI3730 测序仪(美国 ABI 公司)对扩增产物进行测序分析。

1.3 数据处理和统计分析

根据 SSR 扩增结果获得等位基因的相关数据,对各引物扩增出的总位点数、多态性位点数和片段长度

表 1 供试 42 个荷花品种的名称及主要形态特征

Table 1 Name and main morphological characteristics of 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.) tested

序号 No.	品种 ¹⁾ Cultivar ¹⁾	种系 ²⁾ Germ line ²⁾	株型 Plant type	瓣型 Petal form	花色 Flower color
1	宜良千瓣 Yiliangqianban	C	大型 Large	千瓣 Thousands of petals	红色 Red
2	红台莲 Hongtailian	C	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
3	俊杰 13 Junjie 13	C	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
4	新子夜 Xinziye	C	中小型 Medium-small	重瓣 Double petals	红色 Red
5	卓越 13 Zhuoyue 13	C	中小型 Medium-small	重瓣 Double petals	红色 Red
6	红纤指 13 Hongxianzhi 13	C	中小型 Medium-small	少瓣 Few petals	红色 Red
7	星甸红莲 Xingdianhonglian	C	大型 Large	少瓣 Few petals	红色 Red
8	中国红-延安 Zhongguohong-Yan'an	C	大型 Large	半重瓣 Semidouble petals	红色 Red
9	中国红-嘉兴 Zhongguohong-Jiaxing	C	大型 Large	少瓣 Few petals	红色 Red
10	红巨子 Hongjuzi	C	大型 Large	少瓣 Few petals	红色 Red
11	金陵火都 Jinlinghuodu	C	大型 Large	少瓣 Few petals	红色 Red
12	N-1 *	#	大型 Large	少瓣 Few petals	红色 Red
13	N-2 *	#	大型 Large	少瓣 Few petals	红色 Red
14	红统帅 Hongtongshuai	C	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
15	N-3 *	#	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
16	似统帅 Sitongshuai	C	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
17	圣火 Shenghuo	C	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
18	N-4 *	#	大型 Large	重瓣 Double petals	红色 Red
19	N-5 *	#	大型 Large	重瓣 Double petals	粉色 Pink
20	五里情深 Wuliqingshen	C	大型 Large	重瓣 Double petals	粉色 Pink
21	金陵女神 Jinlingnushen	C	大型 Large	重瓣 Double petals	橙色 Orange
22	瑶池之辰 Yaochizhichen	C	大型 Large	少瓣 Few petals	粉色 Pink
23	粉精灵 Fenjingling	C	中小型 Medium-small	少瓣 Few petals	粉色 Pink
24	瑶池之云 Yaochizhiyun	C	大型 Large	重瓣 Double petals	粉色 Pink
25	佛坐莲 13 Fozuolian 13	C	大型 Large	重瓣 Double petals	粉色 Pink
26	风暴 13 Fengbao 13	C	大型 Large	重瓣 Double petals	粉色 Pink
27	大洒锦 Dasajin	C	大型 Large	重瓣 Double petals	复色 Versicolor
28	丽美人 Limeiren	C	中小型 Medium-small	少瓣 Few petals	复色 Versicolor
29	瑶池之星 Yaochizhixing	C	大型 Large	少瓣 Few petals	白色 White
30	婚纱 Hunsha	C	大型 Large	少瓣 Few petals	白色 White
31	玉纤指 Yuxianzhi	H	大型 Large	少瓣 Few petals	白色 White
32	单瓣锦霞 Danbanjinxia	H	大型 Large	少瓣 Few petals	复色 Versicolor
33	粉纤指 13 Fenxianzhi 13	H	中小型 Medium-small	少瓣 Few petals	复色 Versicolor
34	精彩 13 Jingcai 13	H	中小型 Medium-small	重瓣 Double petals	复色 Versicolor
35	红唇 Hongchun	H	中小型 Medium-small	重瓣 Double petals	复色 Versicolor
36	俊愉莲 Junyulian	H	中小型 Medium-small	重瓣 Double petals	复色 Versicolor
37	金陵畅想 Jinlingchangxiang	H	大型 Large	重瓣 Double petals	复色 Versicolor
38	金凤凰 Jinfenghuang	H	中小型 Medium-small	重瓣 Double petals	黄色 Yellow
39	N-6 *	#	大型 Large	重瓣 Double petals	黄色 Yellow
40	金陵凝翠 Jinlingningcui	H	大型 Large	少瓣 Few petals	黄色 Yellow
41	锦衣卫 Jinyiwei	H	大型 Large	少瓣 Few petals	黄色 Yellow
42	艾江南 Aijiangnan	A	中小型 Medium-small	少瓣 Few petals	黄色 Yellow

¹⁾ *: 未命名的新品种 New cultivars unnamed.

²⁾ C: 中国莲 Chinese lotus (*N. nucifera* Gaertn.); #: 未知 Unknown; H: 中美杂交莲 Sino-American hybrid lotus; A: 美洲黄莲 American lotus (*N. lutea* Pers.).

表 2 用于 42 个荷花品种 SSR 分析的 17 对引物的序列和退火温度

Table 2 Sequence and annealing temperature of 17 pairs of primers used for SSR analysis of 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.)

引物编号 Primer code	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')		退火温度/℃ Annealing temperature
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
SSR028	CATTTTGAAGTTTGGGGACAAAAG	GACACTAGGCCCAAAGTAGAGGCT	57
SSR041	GGCAAGGAAGATCTAGCGGTAAGT	CATGCATGAATCTTGGAACTCTTG	58
SSR061	AAAGACCAATGAGAAGTGGGATGA	TCTCGATGTAGCATTAGAACACCG	58
SSR072	ATTTTCGAATCTCCCTCCCACT	GAACAACAAAAAGATGAGGATCTATTG	58
SSR078	GACTAATGAAACAGGGGTTAGGGC	TCTCCAATCTCCCAACGACTCTTA	60
SSR079	TGAATGTGAAAAGAAAAAGTCGCA	TGTACTACTTTCTCGAAGACGGC	55
SSR098	TAGACCAGGCTAGGATGGGCTAG	AGTTAATGACATCTGCAGGCTGGT	60
SSR110	GCCAGCTACACCTTTTGATCTCAG	TTCCCATTTCTCAGTCCAGGTATGT	60
SSR155	GGGAGACTTGTTTTAAAGCCCTA	AAATTGATGGCCCATTTCTGACTTA	57
SSR236	CGATTTAACAAAATGGAACCGCA	TAGTGGAGTAGAGAAAGTAGCGCG	55
SSR257	AGATGGTCCCTACCATTAAACCGAT	GAGTTTTGCTTGGAGGGATAACCT	60
SSR301	TAGAAAAGAGGAAAGAGGGAGGTG	GAAAAGAGGGATTTAATGGGGATG	58
SSR346	GGCGAGAATTGAAGAAGAAATCTG	AGAGCAGCCCAAGAATGTTTGAT	58
SSR355	TTGGATTGAGTAAATGAGGGGAAA	AGAAACTTCCTCAGGTTTCAAGCA	57
SSR362	TAGTTATGGCCTTATGGGGAACCT	AAGGTTTCTGTTTGGGGACCTTTA	58
SSR460	CAAGTGAAGACACCGAAGAGGATT	TATGGAAGCCATAAGAAAATCCGA	57
SSR489	CCACTCGATTTCGTTTGTGTTGT	AAGGTTGAGAGGAAGGGAAAATTG	58

进行统计分析,并根据公式“ $PPL = (N/T) \times 100\%$ ”计算每对引物扩增的多态性位点百分率。其中,PPL 为多态性位点百分率;N 为每对引物扩增的多态性位点数;T 为每对引物扩增的总位点数。

基于 Nei's 遗传距离、采用 PowerMarker V3.25 软件构建供试的 42 个荷花品种的 UPGMA 聚类图;利用 STRUCTURE V2.2 软件进行基于混合模型的群体结构分析^[14];利用 XLSTAT 2014 软件进行主坐标分析(PCoA),并绘制二维图。

2 结果和分析

2.1 供试荷花品种的 SSR 扩增结果分析

利用筛选出的 17 对 SSR 引物对供试 42 个荷花品种的基因组 DNA 进行 SSR 扩增反应,扩增结果见表 3。

由表 3 可以看出:17 对引物共扩增出 77 个位点(即等位基因),其中 68 个为多态性位点,多态性位点百分率为 88.31%;每对引物可扩增出 3~9 个位点,平均每对引物扩增位点数为 4.5 个;每对引物可扩增出 1~9 个多态性位点,平均每对引物可扩增出 4.0 个多态性位点。每对引物扩增的片段长度差异较大,引物 SSR078 和 SSR079 扩增出的片段长度均较短,分别为 148~174 和 134~148 bp;而引物 SSR155 和

SSR236 扩增出的片段长度则较长,分别为 285~301 和 276~320 bp。

表 3 42 个荷花品种基因组 DNA 的 SSR 扩增结果¹⁾Table 3 SSR amplification results of genomic DNA of 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.)¹⁾

引物编号 Primer code	T	N	PPL/%	片段长度/bp Fragment length
SSR028	8	8	100.00	180-216
SSR041	4	4	100.00	214-232
SSR061	2	1	50.00	158-166
SSR072	9	9	100.00	210-244
SSR078	7	7	100.00	148-174
SSR079	5	4	80.00	134-148
SSR098	7	7	100.00	203-249
SSR110	4	4	100.00	161-191
SSR155	3	2	66.67	285-301
SSR236	3	2	66.67	276-320
SSR257	3	2	66.67	176-214
SSR301	4	3	75.00	197-223
SSR346	4	3	75.00	173-225
SSR355	4	4	100.00	266-284
SSR362	4	3	75.00	174-184
SSR460	3	2	66.67	211-239
SSR489	3	3	100.00	160-172
总计 Total	77	68		
平均值 Average	4.5	4.0		

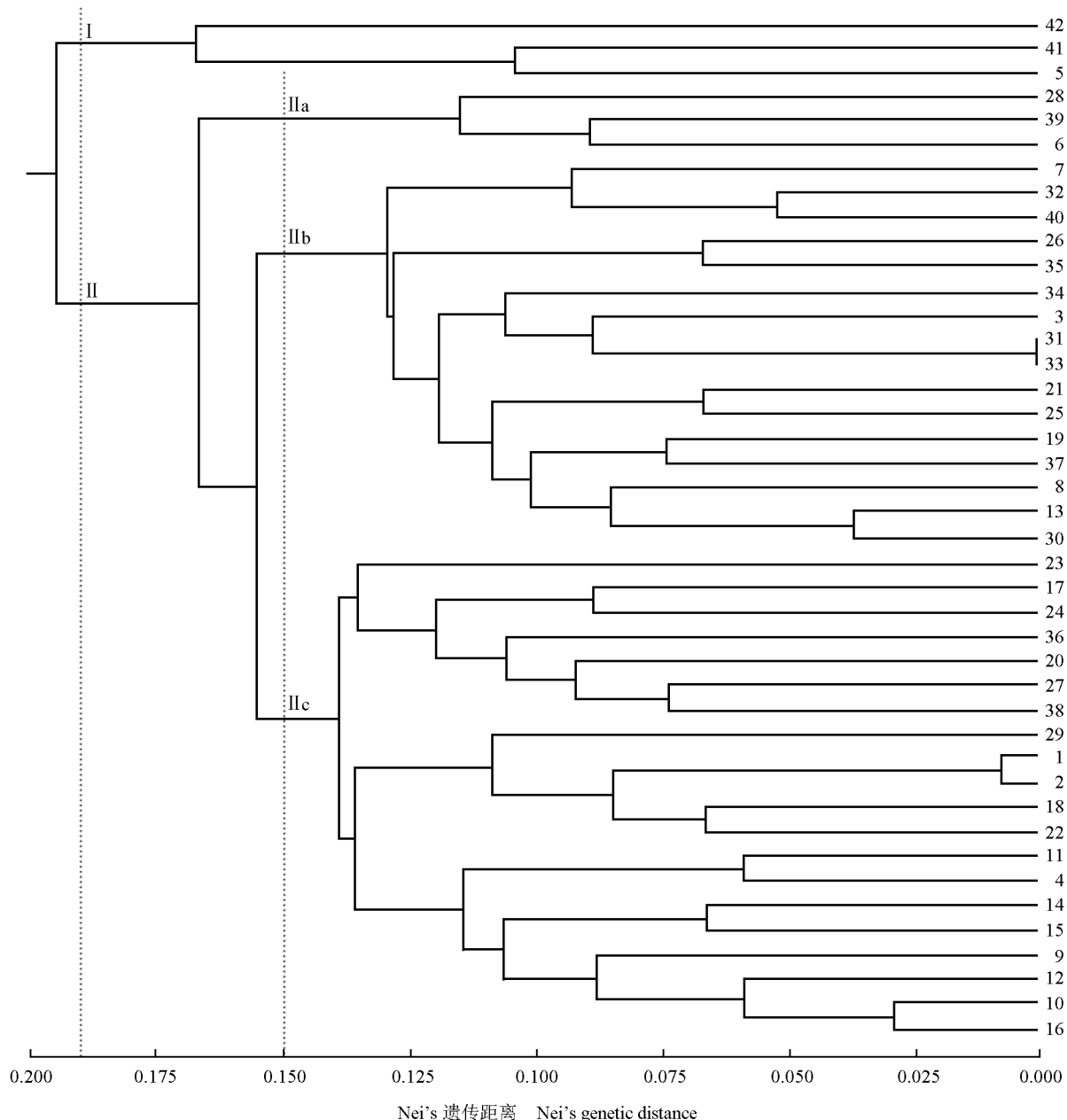
¹⁾ T: 位点总数 Total number of loci; N: 多态性位点数 Number of polymorphic loci; PPL: 多态性位点百分率 Percentage of polymorphic loci.

2.2 供试荷花品种的 UPGMA 聚类分析

依据 SSR 标记分析结果计算荷花各品种间的 Nei's 遗传距离, 并据此对 42 个荷花品种进行

UPGMA 聚类分析, 结果见图 1。

由图 1 可以看出: 在 Nei's 遗传距离 0.190 处, 供试的 42 个荷花品种被分成 2 个大组, I 组仅包括



1: 宜良千瓣 Yiliangqianban; 2: 红台莲 Hongtailian; 3: 俊杰 13 Junjie 13; 4: 新子夜 Xinziye; 5: 卓越 13 Zhuoyue 13; 6: 红纤指 13 Hongxianzhi 13; 7: 星甸红莲 Xingdianhonglian; 8: 中国红-延安 Zhongguohong-Yan'an; 9: 中国红-嘉兴 Zhongguohong-Jiaxing; 10: 红巨子 Hongjuzi; 11: 金陵火都 Jinlinghuodu; 12: N-1; 13: N-2; 14: 红统帅 Hongtongshuai; 15: N-3; 16: 似统帅 Sitongshuai; 17: 圣火 Shenghuo; 18: N-4; 19: N-5; 20: 五里情深 Wuliqingshen; 21: 金陵女神 Jinlingnǚshen; 22: 瑶池之辰 Yaochizhichen; 23: 粉精灵 Fenjingling; 24: 瑶池之云 Yaochizhiyun; 25: 佛坐莲 13 Fozuolian 13; 26: 风暴 13 Fengbao 13; 27: 大洒锦 Dasajin; 28: 丽美人 Limeiren; 29: 瑶池之星 Yaochizhixing; 30: 婚纱 Hunsha; 31: 玉纤指 Yuxianzhi; 32: 单瓣锦霞 Danbanjinxia; 33: 粉纤指 13 Fenxianzhi 13; 34: 精彩 13 Jingcai 13; 35: 红唇 Hongchun; 36: 俊愉莲 Junyulian; 37: 金陵畅想 Jinlingchangxiang; 38: 金凤凰 Jinfenghuang; 39: N-6; 40: 金陵凝翠 Jinlingningcui; 41: 锦衣卫 Jinyiwei; 42: 艾江南 Aijiangnan.

图 1 基于 SSR 标记的 42 个荷花品种的 UPGMA 聚类图
Fig. 1 UPGMA dendrogram of 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.) based on SSR markers

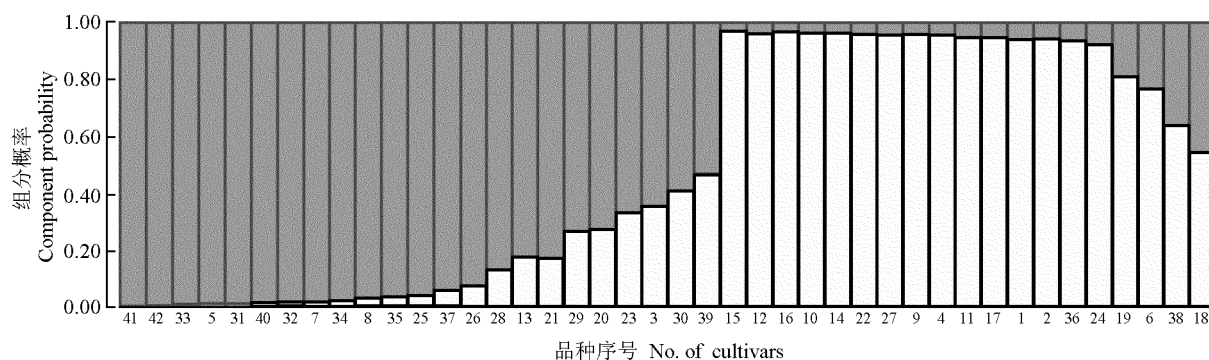
3个荷花品种,分别为品种‘艾江南’、‘锦衣卫’和‘卓越13’;Ⅱ组包含其余39个荷花品种。在Nei's遗传距离0.150处,Ⅱ组还可以进一步分成Ⅱa、Ⅱb和Ⅱc 3个亚组,其中,Ⅱa亚组包含品种‘丽美人’、‘N-6’和‘红纤指13’;Ⅱb亚组包含16个荷花品种,其中中国莲品种有7个、中美杂交莲品种有7个、未命名的新品种有2个;Ⅱc亚组包含20个荷花品种,其中中国莲品种有15个(包括传统中国莲品种‘宜良千瓣’和‘红台莲’等)、中美杂交莲品种有2个、未命名的新品种有3个。

2.3 供试荷花品种的群体结构分析

利用STRUCTURE V2.2软件对供试的42个荷花品种进行基于混合模型的群体结构分析。设定推测亚群数 $K=1\sim6$,运行结果显示, $L(K)$ 随着 K 值发生变化但并没有明显的最大值,根据计算出的 ΔK 值绘制 ΔK 值随 K 值变化的散点图,在 $K=2$ 时 ΔK 值出现明显的最大值,随后急剧下降,据此推测出的42个荷花品种的群体结构模型见图2。

由图2的群体结构模型可以看出:组分概率高于等于0.80时,供试的42个荷花品种被分成Pop1、Pop2和混合群3个亚群。其中,Pop1亚群共有17个荷花品种,包括1个美洲莲品种、8个中美杂交莲品种、7个中国莲品种和1个未命名新品种;Pop2亚群共有16个荷花品种,包括12个中国莲品种、3个未命名新品种及1个中美杂交莲品种(‘俊愉莲’);其余5个中国莲品种、2个中美杂交莲品种及2个未命名新品种则为混合群。

与UPGMA聚类分析结果相比,Ⅰ组的全部荷花品种(3个品种)、Ⅱa亚组中33.33%的荷花品种(仅1个品种)及Ⅱb亚组中81.25%的荷花品种(13个品种)属于Pop1亚群;Ⅱb亚组中6.25%的荷花品种(仅1个品种)及Ⅱc亚组中75.00%的荷花品种(20个品种)属于Pop2亚群;Ⅱa亚组中66.67%的荷花品种(2个品种)、Ⅱb亚组中12.50%的荷花品种(2个品种)及Ⅱc亚组中25.00%的荷花品种(5个品种)属于混合群。



1: 宜良千瓣 Yiliangqianban; 2: 红台莲 Hongtailian; 3: 俊杰 13 Junjie 13; 4: 新子夜 Xinziye; 5: 卓越 13 Zhuoyue 13; 6: 红纤指 13 Hongxianzhi 13; 7: 星甸红莲 Xingdianhonglian; 8: 中国红-延安 Zhongguohong-Yan'an; 9: 中国红-嘉兴 Zhongguohong-Jiaxing; 10: 红巨子 Hongjuzi; 11: 金陵火都 Jinlinghuodu; 12: N-1; 13: N-2; 14: 红统帅 Hongtongshuai; 15: N-3; 16: 似统帅 Sitongshuai; 17: 圣火 Shenghuo; 18: N-4; 19: N-5; 20: 五里情深 Wuliqingshen; 21: 金陵女神 Jinlingnushen; 22: 瑶池之辰 Yaochizhichen; 23: 粉精灵 Fenjingling; 24: 瑶池之云 Yaochizhiyun; 25: 佛坐莲 13 Fozuolian 13; 26: 风暴 13 Fengbao 13; 27: 大洒锦 Dasajin; 28: 丽美人 Limeiren; 29: 瑶池之星 Yaochizhixing; 30: 婚纱 Hunsha; 31: 玉纤指 Yuxianzhi; 32: 单瓣锦霞 Danbanjinxia; 33: 粉纤指 13 Fenxianzhi 13; 34: 精彩 13 Jingcai 13; 35: 红唇 Hongchun; 36: 俊愉莲 Junyulian; 37: 金陵畅想 Jinlingchangxiang; 38: 金凤凰 Jinfenghuang; 39: N-6; 40: 金陵凝翠 Jinlingningcui; 41: 锦衣卫 Jinyiwei; 42: 艾江南 Aijiangnan.

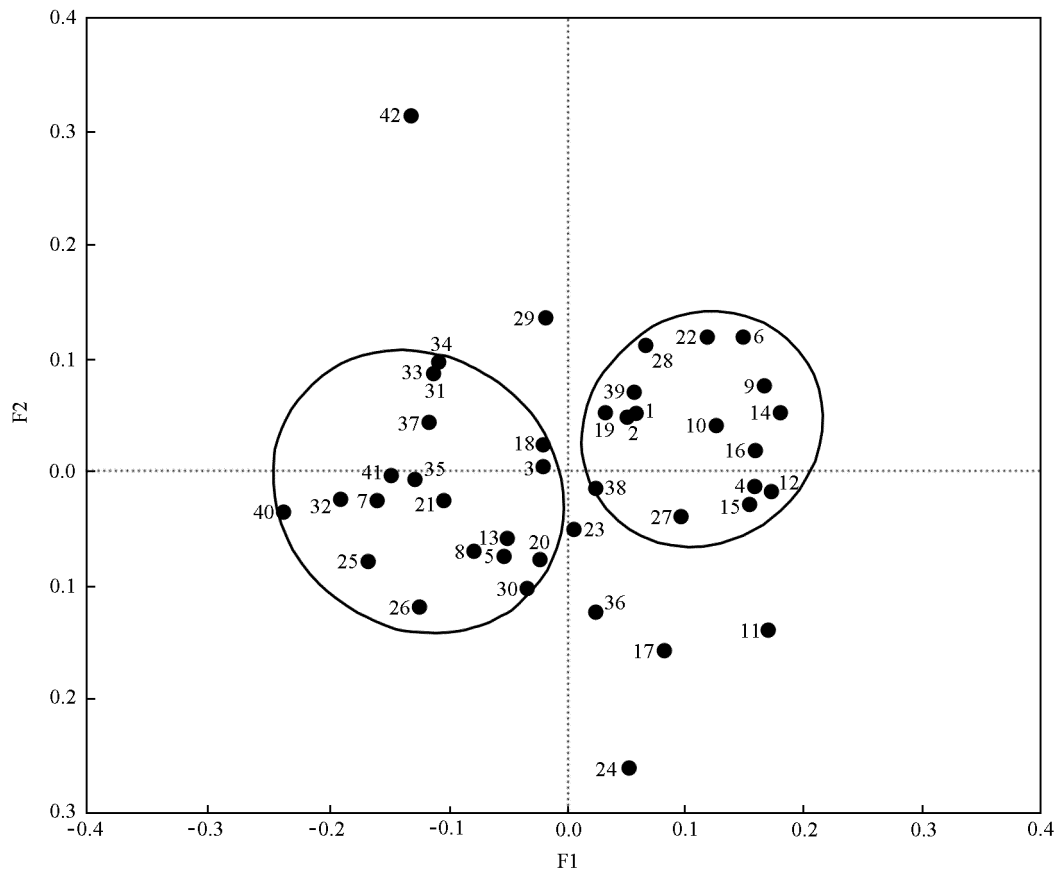
图2 42个荷花品种的群体结构模型
Fig. 2 Population structure model of 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.)

2.4 供试荷花品种的主坐标分析

利用XLSTAT 2014软件对供试的42个荷花品种的SSR标记分析数据进行主坐标分析(PCoA),结果见图3。

由图3可以看出:在F1水平上,供试的42个荷花品种被分成2个部分,与其群体结构分析的结果基

本一致,仅个别品种的划分存在差异。其中,属于Pop1亚群的品种均分布在第二和第三象限,而属于Pop2亚群的品种则分布在第一和第四象限。并且,F1和F2水平上的遗传变异率均比较低,分别占总变异率的11.62%和8.45%,表明供试的这些荷花品种的杂合度较高。



1: 宜良千瓣 Yiliangqianban; 2: 红台莲 Hongtailian; 3: 俊杰 13 Junjie 13; 4: 新子夜 Xinziye; 5: 卓越 13 Zhuoyue 13; 6: 红纤指 13 Hongxianzhi 13; 7: 星甸红莲 Xingdianhonglian; 8: 中国红-延安 Zhongguohong-Yan'an; 9: 中国红-嘉兴 Zhongguohong-Jiaxing; 10: 红巨子 Hongjuzi; 11: 金陵火都 Jinlinghuodu; 12: N-1; 13: N-2; 14: 红统帅 Hongtongshuai; 15: N-3; 16: 似统帅 Sitongshuai; 17: 圣火 Shenghuo; 18: N-4; 19: N-5; 20: 五里情深 Wuliqingshen; 21: 金陵女神 Jinlingnǚshen; 22: 瑶池之辰 Yaochizhichen; 23: 粉精灵 Fenjingling; 24: 瑶池之云 Yaochizhiyun; 25: 佛坐莲 13 Fozuolian 13; 26: 风暴 13 Fengbao 13; 27: 大洒锦 Dasajin; 28: 丽美人 Limeiren; 29: 瑶池之星 Yaochizhixing; 30: 婚纱 Hunsha; 31: 玉纤指 Yuxianzhi; 32: 单瓣锦霞 Danbanjinxia; 33: 粉纤指 13 Fenxianzhi 13; 34: 精彩 13 Jingcai 13; 35: 红唇 Hongchun; 36: 俊愉莲 Junyulian; 37: 金陵畅想 Jinlingchangxiang; 38: 金凤凰 Jinfenghuang; 39: N-6; 40: 金陵凝翠 Jinlingningcui; 41: 锦衣卫 Jinyiwei; 42: 艾江南 Aijiangnan.

图 3 42 个荷花品种主坐标分析 (PCoA) 的二维散点图

Fig. 3 Two-dimensional scatter figure of principal coordinate analysis (PCoA) on 42 lotus cultivars (*Nelumbo* spp.)

3 讨论和结论

对荷花不同群体的遗传多样性研究已有较多的研究报道,但获得的研究结果有明显差异:利用 ISSR 和 AFLP 技术检测出的荷花群体多态性水平均较低 (37.6% ~ 55.8%)^[6,9,15],而 Yang 等^[16]利用 SSR 技术对野生荷花不同种源进行的相关研究结果则表明各种源间具有较高的多态性 (88%)。造成这一差异的原因可能与所用的分子标记和引物及涉及的供试群体不同有关。本研究利用筛选出的 17 对 SSR 引物对供试的 42 个荷花品种基因组 DNA 进行扩增,扩增出的多态性位点百分率为 88.31%,每对引物扩增出

的位点数和多态性位点数最高均为 9 个,并有 8 对引物扩增出的多态性位点百分率达到 100.00%,说明供试荷花品种间具有很高的基因多样性。

对植物进行群体结构研究有利于其种质资源的保存和有效利用,此方面研究已有较多的研究报道^[16-21]。作者基于数学模型法、借助 STRUCTURE 软件并根据 42 个荷花品种的 SSR 标记分析数据对其进行群体结构分析,结果显示有 9 个荷花品种属于混合群体,这可能与长期育种造成的基因渐渗有关。综合 UPGMA 聚类分析、PCoA 分析及群体结构分析结果,Ⅰ组包含具有代表性的美洲黄莲品种‘艾江南’,且与传统中国莲品种的亲缘关系最远,故认为该组为美洲黄莲;相应地,Ⅱ组为中国莲,其中Ⅱc 亚组以传统中

国莲品种为主,而Ⅱb亚组则偏重于美洲黄莲;6个未命名的新品种均被划分到Ⅱ组,说明它们也属于中国莲,但N-6、N-2、N-5和N-4与传统中国莲品种间的亲缘关系都较远,且杂合度较高,具有混合的遗传组分。同时,Ⅱ组品种数量多,且在花型、花色等性状上多样性丰富,是培育新品种的重要基因资源。

荷花的传统分类系统是根据其种源、株型、花型及花色划分为3个种系,即中国莲、中美杂交莲及美洲黄莲^[4]。聚类 and 群体结构分析结果显示:中国莲和美洲黄莲被划分在不同组中,但中美杂交莲却没有独立成组,而是混杂在其他组中。这一结果与基于ISSR和SRAP标记的相关研究结果一致^[6,22]。表明荷花杂交种的分类依赖其源自亲本的遗传组分比例,将中美杂交莲作为独立的分类单元的做法欠妥。

Li等^[7]和Han等^[23]的研究结果显示:基于荷花的某些形态特征(如花色和株型等)的传统分类结果与相关分子标记的分类结果部分吻合。但本研究结果并未发现传统分类与基于SSR标记的分类结果间存在明确的相关性,二者关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王其超,张行言. 中国荷花品种图志[M]. 北京:中国林业出版社,2005.
- [2] 黄秀强,陈俊愉,黄国振. 莲属两个种亲缘关系的初步研究[J]. 园艺学报,1992,19(2):164-170.
- [3] 王其超,张行言. 中国荷花品种图志:续志[M]. 北京:中国建筑工业出版社,1999.
- [4] 张行言,陈龙清,王其超. 中国荷花新品种图志I[M]. 北京:中国林业出版社,2011.
- [5] 郭宏波,柯卫东,李双梅,等. 野生莲资源的RAPD分析[J]. 植物学通报,2005(S1):64-67.
- [6] CHEN Y Y, ZHOU R C, LIN X C, et al. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars[J]. Aquatic Botany, 2008, 89: 311-316.
- [7] LI Z, LIU X Q, GITURU R W, et al. Genetic diversity and classification of *Nelumbo* germplasm of different origins by RAPD and ISSR analysis[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125: 724-732.
- [8] FU J, XIANG Q Y, ZENG X B, et al. Assessment of the genetic diversity and population structure of lotus cultivars grown in China by amplified fragment length polymorphism[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2011, 136: 339-349.
- [9] HU J H, PAN L, LIU H G, et al. Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 39: 3637-3647.
- [10] YANG M, HAN Y N, VANBUREN R, et al. Genetic linkage maps for Asian and American lotus constructed using novel SSR markers derived from the genome of sequenced cultivar [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 653-664.
- [11] MING R, VANBUREN R, LIU Y L, et al. Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) [J]. Genome Biology, 2013, 14: 41-47.
- [12] PARK Y J, LEE J K, KIM N S. Simple sequence repeat polymorphisms (SSRPs) for evaluation of molecular diversity and germplasm classification of minor crops[J]. Molecules, 2009, 14: 4546-4569.
- [13] DOYLE J L, DOYLE J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [14] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics, 2000, 155: 945-959.
- [15] TIAN H L, XUE J H, WEN J, et al. Genetic diversity and relationships of lotus (*Nelumbo*) cultivars based on allozyme and ISSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2008, 116: 421-429.
- [16] YANG M, LIU F, HAN Y N, et al. Genetic diversity and structure in populations of *Nelumbo* from American, Thailand and China: implications for conservation and breeding [J]. Aquatic Botany, 2013, 107: 1-7.
- [17] 孙明伟,袁素霞,徐有明,等. 基于SRAP标记的百合部分种及品种遗传结构分析[J]. 园艺学报,2011,38(8):1498-1506.
- [18] ZHANG P, LI J Q, LI X L, et al. Population structure and genetic diversity in a rice core collection (*Oryza sativa* L.) investigated with SSR markers[J]. PLoS One, 2011, 6: e27565.
- [19] ZHANG F, GE Y Y, WANG W Y, et al. Genetic diversity and population structure of cultivated bromeliad accessions assessed by SRAP markers[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 141: 1-6.
- [20] GAWENDA I, SCHRÖDER-LORENZ A, DEBENER T. Marker for ornamental traits in *Phalaenopsis orchids*: population structure, linkage disequilibrium and association mapping [J]. Molecular Breeding, 2012, 30: 305-316.
- [21] SONG B H, WINDSOR A J, SCHMID K J, et al. Multilocus patterns of nucleotide diversity, population structure and linkage disequilibrium in *Boechera stricta*, a wild relative of *Arabidopsis* [J]. Genetics, 2009, 181: 1021-1033.
- [22] YANG M, HAN Y N, XU L M, et al. Comparative analysis of genetic diversity of lotus (*Nelumbo*) using SSR and SRAP markers [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 142: 185-195.
- [23] HAN Y C, TENG C Z, CHANG F H, et al. Analysis of genetic relationships in *Nelumbo nucifera* using nuclear ribosomal ITS sequence data, ISSR and RAPD markers [J]. Aquatic Botany, 2007, 87: 141-146.

(责任编辑:佟金凤)