

徐 君,李 欣,江 君,等. 基于表型和 ISSR 标记的小株型荷花遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):137-141.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.033

基于表型和 ISSR 标记的小株型荷花遗传多样性分析

徐 君,李 欣,江 君,王 欢,姜红卫

(苏州市农业科学院,江苏苏州 215155)

摘要:采用表型性状和简单重复序列间扩增(ISSR)标记,对 36 个碗莲品种(系)进行遗传多样性分析。基于 23 个表型性状,品系间欧氏遗传距离系数平均值为 7.78,范围在 3.54~15.78 间,聚类分析显示,以欧氏距离系数 $E=11.0$,可将所有材料分为 4 组,其中 32 个聚在一个类群。基于 10 个 ISSR 引物,36 个品系共获得 62 条扩增带,其中 44 条具有多态性,多态带百分率为 71.0%,品系间的遗传相似性系数平均值为 0.40,范围在 0.10~0.71 间,以遗传相似系数 $GS=0.60$,可将所有材料分为 3 组。ISSR 标记分析与表型性状分析都说明,碗莲资源遗传背景狭窄,互相关亲缘关系比较接近。

关键词:碗莲;表型;ISSR;遗传多样性

中图分类号:S682.320.3

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2019)19-0137-05

荷花(*Nelumbo nucifera*)是我国十大传统名花之一,深受人们喜爱。小株型荷花品种一般指碗莲,指在口径为 26 cm 以内盆器中可正常生长、开花的一类微型荷花,是人们为了满足在庭院、厅堂、卧室赏荷的需要而逐步培育出来的^[1]。碗莲以亚洲莲为主,其变异主要局限于有限的几个表型性状,虽然品系较多,但遗传背景并不丰富,且许多观赏性状差异并不一定是遗传物质本身存在差异,可能是基因表达差异形成的。因此,系统地研究碗莲品系间的遗传多样性,能够有效减少下一步育种工作中亲本选配的盲目性,提高目标性和预见性。此外,碗莲是荷花的高级进化种,其变异性、遗传多样性研究在荷花进化、品种分类等方面也有重要的意义^[2]。

随着分子标记技术的日益发展,它已经成为研究物种遗传多样性的重要手段。随机扩增多态性 DNA(RAPD)、简单重复序列间扩增(ISSR)、扩增片段长度多态性(AFLP)等技术都已被应用于莲遗传多样性研究^[3-5]。Li 等利用 RAPD 和 ISSR 标记对 70 份中国莲、7 份泰国莲和 2 份美洲黄莲种质进行了遗传变异检测,发现多态位点分别达到了 91.20%(ISSR)和 96.40%(RAPD)^[6]。而 Fu 等利用 AFLP 标记对莲的 138 份主要栽培品种进行了遗传多样性分析,发现多态位点百分率仅为 28.7%^[7]。试验材料的差异、分子标记技术的不同,导致莲品种资源遗传多样性分析结果会产生比较大的差异。针对碗莲的遗传基础研究中,孔德政等采用 RAPD 标记对 8 个碗莲品种进行了遗传分析,并为 8 个品种分别建立了指纹图谱^[2];管志涛等对 23 个碗莲品种的形态学性状进行分析,发现最长距离法是一种非常有效的碗莲品种分类的聚

类方法^[8]。目前碗莲品种多样性研究与应用仍处于探索阶段。本研究以表型性状为基础,在前期构建荷花 ISSR 分子标记反应体系的基础上^[9],系统地进行表型性状、ISSR 标记的遗传多样性研究,旨在深入揭示碗莲各品系间遗传多样性差异,为进一步充分发掘现有资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的碗莲资源材料 36 份,取自苏州市荷塘月色湿地公园苏州市农业科学院荷花资源保存圃。编号、品种名称、种源等信息见表 1。

1.2 表型性状调查

表型性状调查所用 36 个供试品种(系)于 2016 年 3 月统一种植于苏州市荷塘月色湿地公园苏州市农业科学院荷花资源保存圃。采用标准资源保存池,每个品种种植 1 池,每池 4 支种藕,田间管理按常规方法统一进行。性状调查于 7 月下旬至 10 月上旬进行,每个性状调查(测量)4 个样品(数据),调查方法参照《荷花新品种记载项目》记载标准^[10],共记录数量性状 9 个(最长叶径、最短叶径、立叶高、花柄高、花瓣数、最长花径、花瓣纵径、花瓣横径、心皮),质量性状 14 个(株型、初花期、群体花期、着花密度、花香、花蕾型、花型、花态、花瓣尖色、花中色、花基色、雄蕊瓣化、雌蕊成熟形态、青熟花托),质量性状变异及编码见表 2。

1.3 基因组 DNA 的提取与 ISSR-PCR 反应

荷花基因组 DNA 的提取采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法。PCR 反应体系及程序参照荷花 ISSR-PCR 优化体系^[8],ISSR 引物的筛选以哥伦比亚大学于 2006 年公布的 100 个引物序列为基础,选择条带多态性、稳定性较好的 10 个引物。

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,在紫外光下用 UV 凝胶成像系统观察结果。

1.4 数据处理与分析

所有表型性状数据采用 DPS 7.05 软件处理,质量性状通

收稿日期:2018-05-24

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目(编号:LYKJ[2017]09);

江苏省苏州市科技计划(编号:SNG201508)。

作者简介:徐 君(1982—),男,江苏苏州人,硕士,副研究员,主要从事水生花卉分子生物学研究。E-mail: flyforever007@hotmail.com。

通信作者:姜红卫,硕士,副研究员,主要从事观赏植物育种与栽培研究。E-mail: sanjwh@163.com。

表 1 参试碗莲品种及来源

编号	品种名	种源	编号	品种名	种源
1	红裙绣金	中国荷花研究中心	19	红碗莲	上海
2	一捧雪	中国荷花研究中心	20	桌上莲	杭州
3	解语花	中国荷花研究中心	21	小碧玉	湖南
4	11r-712-6	杂交新材料	22	红丝巾	广东三水
5	花灯初上	武汉东湖花卉盆景研究所	23	白佛手	南京艺莲苑
6	千堆锦	中国荷花研究中心	24	唐婉	中国荷花研究中心
7	冰心玉洁	荆州技工学校	25	玉绣球	中国荷花研究中心
8	金玉满堂	南京艺莲苑	26	童欢	南京艺莲苑
9	春燕	中国荷花研究中心	27	绣生万象	广东三水
10	恋夏	武汉东湖花卉盆景研究所	28	红雀	中国荷花研究中心
11	小佛手	武汉东湖花卉盆景研究所	29	相见欢	中国荷花研究中心
12	洛神	中国荷花研究中心	30	金陵女神	南京艺莲苑
13	香雪海	南京艺莲苑	31	雪翠莲	河北白洋淀荷花大观园
14	红日	中国荷花研究中心	32	蝶恋花	武汉东湖花卉盆景研究所
15	小凤舞	武汉植物园	33	白万万	武汉植物研究所
16	火花(小)	中国荷花研究中心	34	新水蜜桃	南京艺莲苑
17	火花	中国荷花研究中心	35	玫瑰重台	荆州技工学校
18	湘妃女	湖南	36	鼓浪小红	武汉市园林科研所

表 2 参试碗莲质量性状变异及编码

性状	变异范围及表型级别
株型	大型株 = 1; 中型株 = 2; 小型株 = 3
初花期	早 = 1; 较早 = 2; 晚 = 3
群体花(周)期	长 = 1; 短 = 2
着花密度	密 = 1; 较密 = 2; 疏 = 3
花香	浓香 = 1; 香 = 2; 淡香 = 3
花蕾型	桃形 = 1; 长桃形 = 2; 圆桃形 = 3; 橄榄形 = 4
花型	重瓣 = 1; 半重瓣 = 2; 少瓣 = 3; 重台 = 4
花态	杯状 = 1; 碟状 = 2; 碗状 = 3; 球状 = 4; 飞舞状 = 5
花瓣尖色、花中色、花基色	红色 = 1; 白绿色 = 2; 绿白色 = 3; 黄绿色 = 4; 绿黄色 = 5
雄蕊瓣化	无 = 1; 少数瓣化 = 2; 多数瓣化 = 3; 完全瓣化 = 4
雌蕊成熟形态	结实 = 1; 泡化 = 2; 瓣化 = 3
青熟花托	斗形 = 1; 杯形 = 2; 碗形 = 3; 不明显 = 4

过群落多样性指数命令计算分布频率及多样性指数(H'),数量性状通过基本参数估计命令统计最小值、最大值、变异幅度、平均值、标准差、变异系数。ISSR-PCR 数据统计时选择凝胶电泳结果中的清晰的谱带,扩增产物在相同迁移位置有带赋值 1,无带赋值 0,建立原始数据矩阵,统计各引物总扩增带(amplified bands,简称 AB)、多态带(polymorphic bands,简称 PB)、多态带百分率(percentage of polymorphic bands,简称 PPB)。聚类分析利用统计分析软件 DPS 7.05 进行数据处理。表型数据分析采用数据标准化、欧式距离系数(E)法计算,聚类方法则采用最长距离法。ISSR 标记数据,采用 Jaccard 遗传相似系数,聚类方法同样按最长距离法。记录 36 个碗莲品种(系)相互之间的欧氏遗传距离及 Jaccard 遗传相似系数(GS)(各 630 个值),统计其在不同数值范围内出现的频次。

2 结果与分析

2.1 碗莲基于表型性状的遗传多样性分析

2.1.1 质量性状的变异及遗传多样性 14 个质量性状的统

计分析(表 3)表明,参试 36 个碗莲品种(系)中,未有花态为碟状及球状的资源,未有花瓣尖部及中部为黄绿色、花基部色为红色的资源,其余各性状在其描述级别上基本都有分布,但极不均匀。碗莲为小型荷花,株型绝大多数为中、小型,以中型为多;群体花(周)期有长、短 2 种表型,参试品种中仅玉绣球为短花期,其余表型均为长花期;着花密度有 3 种表型,以密度为密所占比例较高;花香有 3 种表型,以香度适中所占比例较高;花态有 3 种表型,以碗状所占比例较高;花瓣尖色、花中色各有 4 种表型,以红色所占比例较高;雌蕊成熟形态有 3 种表型,以结实所占比例较高;青熟花托有 3 种表型,以斗形所占比例较高。以上 9 个质量性状中占比高的表型分布频率均高于 60%,表现出较高的集中性,其多样性指数相对较低。初花期、花蕾型、花型、花基色、雄蕊瓣化程度 5 个性状频率分布较平均,其多样性指数较高。

2.1.2 数量性状的变异及遗传多样性 数量性状的统计分析(表 4)表明,36 个碗莲品种(系)数值型性状差异较大,9 个数值性状的变异系数在 15.6%~77.7% 间,平均为 33.6%。少瓣型和重台型荷花花瓣数差异较大,因此性状花

表 3 碗莲 14 个质量性状的频率分布及多样性指数

性状	分布频率(%)					多样性指数 <i>H'</i>
	1	2	3	4	5	
株型	2.8	66.7	30.5			1.056 6
初花期	47.2	22.2	30.6			1.516 1
群体花(周)期	97.2	2.8				0.184 3
着花密度	86.1	11.1	2.8			0.682 4
花香	5.6	69.4	25.0			1.098 6
花蕾型	50.0	33.3	16.7	0		1.459 5
花型	33.3	13.9	47.2	5.6		1.668 1
花态	13.9	0	80.5	0	5.6	0.880 5
花瓣尖色	80.5	5.6	11.1	2.8	0	0.981 3
花中色	69.4	13.9	13.9	2.8	0	1.301 6
花基色	0	5.6	8.3	55.5	30.6	1.525 1
雄蕊瓣化程度	38.9	47.2	11.1	2.8		1.537 6
雌蕊成熟形态	83.3	11.1	5.6			0.804 5
青熟花托	72.2	19.4	5.6	2.8		1.175 6

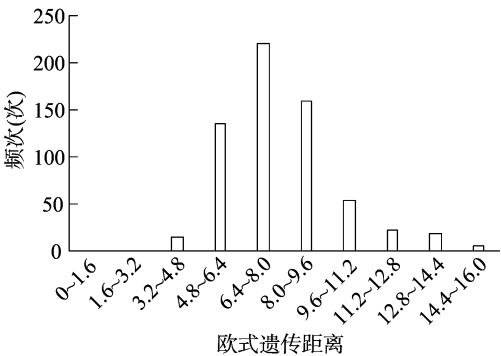
表 4 碗莲 9 个数值型性状的统计分析

性状	最小值	最大值	变异幅度	平均值	标准差	变异系(%)
最大叶茎(cm)	34.0	16.0	18.0	24.0	3.76	15.6
最小叶茎(cm)	29.0	13.0	16.0	19.4	3.53	18.2
立叶高(cm)	45.0	4.0	41.0	22.6	9.30	41.1
花柄高(cm)	66.0	11.0	55.0	33.2	14.55	43.8
花瓣数(个)	131.0	11.0	120.0	47.1	36.65	77.7
花茎(cm)	21.0	8.1	12.9	12.9	2.58	20.0
花瓣纵茎(cm)	14.1	4.8	9.3	7.9	1.61	20.3
花瓣横茎(cm)	7.6	1.7	5.9	4.7	1.11	23.9
心皮数(个)	18.0	0	18.0	8.2	3.41	41.8

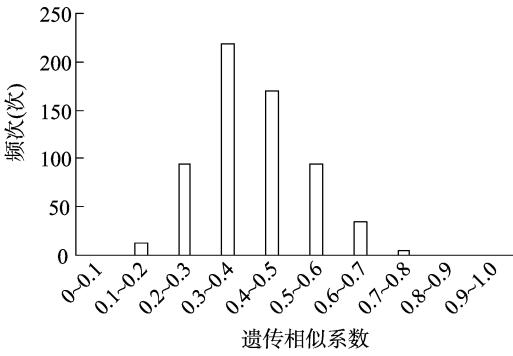
瓣数变异系数达到 77.7%。立叶高、花柄高的变异系数超过了 40%，最大叶茎、最小叶茎、花茎、花瓣纵茎、花瓣横茎等性状的变异系数也都在 20% 左右。本研究所记录的数量性状多数是与株型大小有关的数据,结果显示,碗莲种质资源数值型性状的变化幅度和变异系数均较大,不同品系株型之间有明显差异。

2.1.3 表型性状的遗传距离及聚类分析 由图 1、图 2 可知,基于 23 个表型性状,36 个碗莲品种(系)间欧氏距离系数平均值为 7.78,变幅为 3.54 ~ 15.78。所有材料中,以唐婉和红日间的欧氏距离系数最小,为 3.54,2 个材料均由中国荷花研究中心育成,株型、花型、花态等性状均一致,区别仅在于红

日为红莲型,唐婉则为花瓣尖红的粉莲型;小碧玉和白万万间的欧氏距离系数最大,为 15.78,小碧玉为所有材料中株型最小的,白万万则为所有材料中株型最大的。以距离 1.6 为标准,统计 36 个碗莲品种(系)630 个两两间距离系数在 10 个范围内的出现频度,DPS 7.05 基本参数正态性检验发现,系数频度呈正态分布,频度峰值出现在系数 6.4 ~ 8.0 之间,共有 220 个。36 个品种(系)间按最长距离法聚类,以系数 $E = 11.00$,可将所有材料分为 4 组,第 1 类群包含 36 个材料中的 32 个,小碧玉、新水蜜桃、白万万、玉绣球分类较远。第 1 类群以系数 $E = 9.45$,可再分为 3 类,各组间花瓣平均数差距较大,为重要的分类性状。

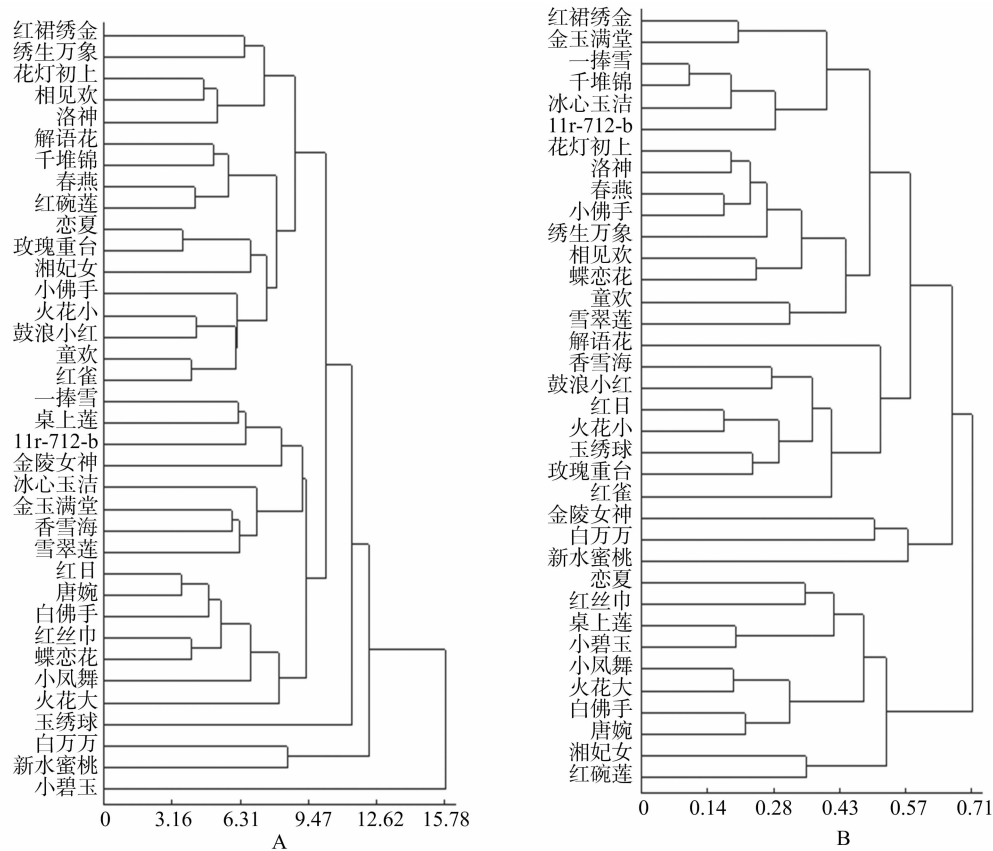


A. 基于农艺性状



B. 基于ISSR标记

图1 碗莲品系间遗传距离(遗传相似性系数)的频数分布



A—基于农艺性状的结果，Level1 ($E=11.00$)，Level2 ($E=9.45$)；B—基于 ISSR 标记的结果，Level1 ($GS=0.60$)

图2 基于表型性状和 ISSR 标记的聚类分析

2.2 碗莲基于 ISSR 分子标记的遗传多样性分析

2.2.1 ISSR 标记多态性 由表 5 可知,用所筛选的 10 个 ISSR 引物,对 36 个荷花品种(系)进行扩增,共产生 62 条大小在 150~1 600 bp 间的条带,其中 44 条具有多态性,多态百分率为 71.0%。引物 UBC895 扩增出的清晰条带最多,为 11

条;引物 UBC846 的扩增条带数最少,仅有 2 条。所有引物扩增产物的多态性比率均高于 40%,引物 UBC840、UBC848 扩增条带的多态性比率最高,为 100%。总体上,10 个 ISSR 标记在碗莲基因组中能揭示较多的信息量。

表 5 ISSR 引物序列及扩增多态性

引物	引物序列	总扩增带数 (条)	多态带数 (条)	多态带比率 (%)
UBC808	(AG) ₈ C	5	2	40.0
UBC811	(GA) ₈ C	6	3	50.0
UBC817	(CA) ₈ A	4	2	50.0
UBC836	(AG) ₈ YA	6	5	83.3
UBC840	(AG) ₈ YT	7	7	100.0
UBC842	(GA) ₈ YG	8	6	75.0
UBC846	(CA) ₈ RT	2	1	50.0
UBC848	(CA) ₈ RG	3	3	100.0
UBC895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	11	8	72.7
UBC899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	10	7	70.0
合计	—	62	44	71.0

注:Y=(C 或 T),R=(A 或 G)。

2.2.2 ISSR 标记的遗传相似系数及聚类分析 由图 1、图 2 可知,以 36 个碗莲品种和 62 个位点的谱带数据为原始矩阵,共获得 630 个两两不同品种间的遗传相似系数,系数平均值为 0.40,变幅为 0.10~0.71,所有材料中,以千堆锦和一捧雪之间的遗传距离系数最小,为 0.10,白佛手与玉绣球间的遗传

传距离系数最大,为 0.71。以系数 0.1 为标准,统计 36 个碗莲品种(系)630 个两两间距离系数在 10 个范围内出现的频度,DPS 7.05 基本参数正态性检验发现,系数频度呈偏态分布,说明大部分资源遗传距离比较接近,峰值出现在系数为 0.3~0.4 之间,共有 219 个。以 0.60 为阈值可以把 36 个碗

莲品种分为 3 组。

3 讨论与结论

表型标记和分子标记是最常用的遗传多样性分析方法,分子标记体现的是材料间 DNA 水平的变异,具有取样较少、试验简单、不受环境影响等优点,但试验表明,不同的标记、不同的反应引物甚至不同的反应条件都会引起结果的误差^[12]。表型分析记录的数据较为直观,是种质资源研究中的基础,但由于表型是基因与环境互作表达的结果,性状的表达易受环境影响。徐福荣等通过对表型性状和 SSR 标记的比较,认为 SSR 标记在鉴定云南省水稻主要品系的工作中更为可靠^[13],而石胜友等通过表型性状与 AFLP 标记的比较,认为积累相关表型性指标是分子生物学技术在芒果遗传育种工作中进一步应用的基础^[14]。2 种分析方法各有优缺点,在资源遗传多样性研究工作中,可结合使用,以达到更好的效果。

本研究利用表型性状和 ISSR 标记研究了 36 份碗莲资源的遗传多样性。所采集的 23 个表型性状,主要是基于《荷花新品种记载项目》记录的碗莲花、叶、株型等性状,其中有 19 个性状与花有关,涵盖了花色、花型、高度、大小、生理期等各方面,较为全面地反映了碗莲花的特征,这些性状在实际工作中便于观察和获取,且均属于稳定性状,是新品种登记项目中利用的主要数据,因此这些数据能够较好地展现观赏碗莲花性状的遗传多样性。分析结果显示,虽然碗莲资源各性状在描述级别上大部分都有分布,但分布极不均匀,尤其是作为观赏花卉比较重要的花色、花态等几个指标,如参试的碗莲资源中 69.4% 为红花莲品种,黄莲品种仅有金玉满堂 1 个,而花态为碗状的资源占总体的 80.5%,没有花态为碟状和球状的资源。除玉绣球、小碧玉、新水蜜桃、白万万等个别品系,各资源间欧式遗传距离较为接近。碗莲资源 ISSR 标记显示,虽然多态带的比例达到 71.0%,但除新水蜜桃、白万万、金陵女神等个别品系,各资源间遗传相似系数较为接近,品系间遗传相似系数主要分布在 0.3~0.4 间。表型数据分析显示,各资源间欧氏遗传距离频数呈正态分布,而根据 ISSR 标记数据分析可知,各资源间遗传相似系数呈偏态分布,说明 ISSR 标记分析碗莲资源相互间遗传距离结果比表型标记分析所得结果要更接近。表型鉴定和 ISSR 标记结果都说明,碗莲品种遗传背景较为狭窄,互相间亲缘关系比较接近,分析原因,可能是由于大部分品系是从几个主要材料杂交选育而来的。

碗莲是荷花的高级进化种,近年来,随着育种工作者的辛

勤工作,包括碗莲在内的荷花新品种不断涌现^[15]。但从遗传多样性角度而言,碗莲的遗传背景仍相对狭窄,可根据多样性鉴定结果,有针对地引进黄莲资源、花态为碟状及球状、相对株型较大的资源,通过进一步的杂交选育,丰富碗莲资源的遗传多样性。

参考文献:

- [1] 段春燕, 候小改. 碗莲高效栽培管理技术[J]. 种子, 2005, 24(11): 83.
- [2] 孔德政, 刘艺平, 杨秋生. 8 个碗莲品种的 DNA 指纹鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 147-150.
- [3] 郭宏波, 柯卫东, 李双梅, 等. 不同类型莲资源的 RAPD 聚类分析[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(4): 328-332.
- [4] 汪 岚, 韩延闯, 彭欲率, 等. ISSR 标记技术在莲藕遗传研究中的运用[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(3): 20-22.
- [5] 彭欲率, 韩延闯, 汪 岚, 等. 应用 AFLP 技术检测莲藕遗传多样性的初步研究[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 823-827.
- [6] 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(4): 724-732.
- [7] 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(5): 339-349.
- [8] 管志涛, 刘艺平, 孔德政. 碗莲品种形态学性状聚类分析的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(28): 8858, 8899.
- [9] 徐 君, 李静会, 李 欣, 等. 荷花 ISSR 引物筛选及反应体系优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 42-44.
- [10] 王其超, 张行言. 荷花新品种性状记载项目的制定[J]. 中国园林, 2012, 28(1): 74-77.
- [11] 陈昆松, 李 方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.
- [12] 王彦华, 侯喜林, 徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 899-902.
- [13] 徐福荣, 董 超, 杨文毅, 等. 基于表型性状和 SSR 分子标记的云南省水稻主要育成品种(系)的遗传相似性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 700-708.
- [14] 石胜友, 武红霞, 王松标, 等. 杧果种质遗传多样性的表型分析和 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(3): 449-456.
- [15] 张行言, 陈龙清. 中国荷花新品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011: 1-2.