

花莲种质资源的遗传多样性及品种间亲缘关系的探讨

郭宏波, 李双梅, 柯卫东*

(武汉市蔬菜科学研究所, 武汉 430065)

摘要: 利用 17 个随机引物对来自中国和美国的 29 份花莲种质资源材料进行了 RAPD 分析。扩增形成 207 条谱带, 多态带 122 条, 多态率为 58.94%。说明中国花莲具有较丰富的遗传多样性。结果还显示: (1) 花莲种质资源可分为 2 个品种群: 品种群 I 以大花型为主, 少量小花型。品种群 II 以中小型花为主。又在欧氏遗传距离 11.01 处分为 7 个亚品种群。(2) 美洲黄莲与中国莲的花莲之间在 DNA 水平上没有显著差异, 与中小型花关系更近。

关键词: 花莲(*Nelumbo*); 遗传多样性; RAPD; 聚类分析

中图分类号: Q16; S645.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)05-0417-05

Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Flower-lotus Cultivars (*Nelumbo*) by RAPD Markers

GUO Hong-Bo, LI Shuang-Mei, KE Wei-Dong*

(Wuhan Vegetable Research Institute, Wuhan 430065, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was applied to germplasm accessions in 29 flower-lotus cultivars (including both *Nelumbo nucifera* Gaertn. and *N. lutea* Pers.). A total of 207 bands were obtained from 17 selected primers, of which 122 were polymorphic. The results also showed that: (1) Two main groups were gained; those cultivars, with bigger flower, were mainly clustered in one group, and the other contained mass small-flower types. (2) No obvious difference was observed between *N. lutea* and all other cultivars (*N. nucifera*) from their DNA. Furthermore, it seemed that *N. lutea* was close to small-flower cultivars of *N. nucifera*.

Key words: Flower-lotus cultivars (*Nelumbo*); Genetic diversity; RAPD; Cluster analysis

莲属(*Nelumbo*)在经历第四纪冰期后, 现仅幸存两个种: 中国莲(*N. nucifera* Gaertn.)和美洲黄莲(*N. lutea* Pers.)。二者在分布上为太平洋所隔, 但形态差异不太明显。研究表明, 两个种之间人工杂交极易成功^[1], 且染色体组型十分相似^[1], 因此黄秀强等^[1]认为, 两个种染色体组同源, 又不存在生殖隔离, 仅存在地理隔离不足以成为一种, 并建议将美洲黄莲作为中国莲的亚种。在研究了莲属的分类和分布之后, Borsch 和 Barthlott 提出了相同的观点^[2]。

莲在中国分布很广, 种植历史也很悠久。据考古证明, 中国是莲的起源地之一, 又是莲的最大栽培中心^[3], 各种类型、生态型的莲品种资源非常丰富。目前仅国家种质武汉水生蔬菜资源圃征集和保存的近

600 份资源中, 藕莲占 200 多份, 子莲占 26 份, 花莲占 300 余份^[4]。在我国, 根据不同用途莲被分为子莲、花莲和藕莲三大类。子莲和藕莲分别以食用莲子和地下茎为主, 而花莲则用来观赏。

据记载, 花莲在我国至少有 2700 年的栽培历史, 许多优良的花莲品种一直流传至今。20 世纪中期, 特别是 1979 年之后, 我国花莲研究进展十分迅速, 据统计, 90 年代中期, 我国拥有荷花品种已达 300 多个, 其中新品种占 80%^[4]。在花莲资源的整理分类中, 倪学明等^[3]、王其超等^[5]都根据园艺学性状对花莲资源提出了较完善的分类系统。

RAPD 分子标记技术以其简单、高效、易操作等优点, 在过去的十年中已广泛应用于各种种质资源

收稿日期: 2005-02-21, 修回日期: 2005-06-05。

作者简介: 郭宏波(1977—), 男, 在读博士, 从事植物遗传多样性研究。

* 通讯作者(E-mail: wdke63@163.com)。

研究^[6]、系统与进化研究^[7]。我们过去的工作也表明, RAPD 技术在分析莲的三大类型时是很有效的, 揭示了莲的三种类型不仅仅在形态学上有很大差异, 而且在 DNA 水平上也已存在明显分化, 而且美洲黄莲与中国莲的花莲关系更为接近^[8]。为了进一步估算花莲资源的遗传多样性, 验证美洲黄莲与中国莲的关系, 以及传统的形态学分类的合理性, 本实验选取了不同花色、花型、植株大小的花莲资源

29 份, 其中含有传统品种、新育成品种、美洲黄莲、中美杂交莲等, 试图从 DNA 水平上来揭示花莲资源的遗传关系及其分类学意义。

1 材料与方法

1.1 材料

所有莲资源均取自国家种质武汉水生蔬菜资源圃, 具体名称、花部特征及品种类型见表 1。

表 1 实验材料的来源及特征
Table 1 The resource and characteristics of materials

序号和品种名称 No. and species name	株型、花色、花型 Plant type, flower color, flower type	系谱 Begats
1. 红千叶 <i>N. nucifera</i> cv. hongqianye	大型、红色、重瓣	传统品种
2. 天女散花 <i>N. nucifera</i> cv. tiannüsanhua	中大型、间色、单瓣	不详(带黄色基因)
3. 睡美人 <i>N. nucifera</i> cv. shuimeiren	小型、红色、重台	小桃红自然子→东湖春晓自然子→晓露自然子→睡美人
4. 大洒锦 <i>N. nucifera</i> cv. dasajin	大型、洒锦色、重瓣	传统品种
5. 43-3 <i>N. nucifera</i> cv. 43-3	中大型、间色、单瓣	美洲黄莲×艳新装
6. 金珠落玉盘 <i>N. nucifera</i> cv. jinzhuluo yupan	小型、白色、单瓣	厦门碗莲自然子
7. 小醉仙 <i>N. nucifera</i> cv. xiaozuixian	中小型、粉红色、重瓣	自然子混播中选育
8. 洪湖红 <i>N. nucifera</i> cv. honghuhong	中大型、红色、单瓣	野莲(湖北洪湖)
9. 茉莉莲 <i>N. nucifera</i> cv. molilian	中大型、淡黄色、单瓣	不详
10. 微山红 <i>N. nucifera</i> cv. weishanhong	中大型、红色、单瓣	野生(山东微山湖)
11. 小白鸽 <i>N. nucifera</i> cv. xiaobaige	中小型、白色、重台	白碗自然子→玉碗→小白鸽
12. 重瓣一丈青 <i>N. nucifera</i> cv. Chongbanyizhangqing	大型、白色、重瓣	一丈青自然子→重瓣一丈青
13. 蝶恋花 <i>N. nucifera</i> cv. dielianhua	中大型、间色、单瓣	美洲黄莲自然子→美中红自然子→蝶恋花
14. 娃娃莲 <i>N. nucifera</i> cv. wawalian	小型、白色、单瓣	不详(带黄色基因)
15. 白千叶 <i>N. nucifera</i> cv. baiqianye	大型、白色、重瓣	传统品种
16. 小舞妃 <i>N. nucifera</i> cv. xiaowufei	中型、淡黄色、单瓣	美洲黄莲自然子
17. 素韵 <i>N. nucifera</i> cv. suyun	小花、白色、单瓣	不详
18. 94-299 <i>N. nucifera</i> cv. 94-299	中型、红色、单瓣	不详
19. 大丰 <i>N. nucifera</i> cv. dafeng	大型、白色、重瓣	七锦自然子→大丰
20. 玫红重台 <i>N. nucifera</i> cv. meihongchongtai	中型、红色、重台	实生子混播→红露→玫红重台
21. 锦绣 <i>N. nucifera</i> cv. jinxiu	中小型、红色、重台	大洒锦自然子→锦绣
22. 雏鹅戏水 <i>N. nucifera</i> cv. chu'exishui	小型、黄色、单瓣	不详(带黄色基因)
23. 白鹿矮 <i>N. nucifera</i> cv. Bailu'ai	中大型、白色、重瓣	不详
24. 嫦娥奔月 <i>N. nucifera</i> cv. chang'e benyue	中大型、白色、重瓣	娇容三变×白海莲→白雪公主自然子→嫦娥戏水
25. 碧莲 <i>N. nucifera</i> cv. bilian	中大型、白色、重瓣	传统品种
26. 江尾红花 <i>N. nucifera</i> cv. jiangweihonghua	大型、红色、千瓣	云南呈贡千瓣莲(地方品种)
27. 小洒锦 <i>N. nucifera</i> cv. xiaosajin	大型、洒锦色、重瓣	云南邱北
28. 美洲黄莲 <i>N. lutea</i>	中型、黄色、单瓣	美国佛罗里达州黄莲莲子
29. 千瓣莲 <i>N. nucifera</i> cv. qianbanlian	大型、红色、千瓣	湖北玉泉寺传统品种

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 取 100 mg 幼嫩莲叶, 放入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 捣碎使其呈匀浆状。加入抽提缓冲液 400 μ L, 涡旋 5 s 后静置 1 h 以上。再加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 轻轻倒转振荡 30 min, 室温下 13 000 r/min 离心 1 min, 提取上清, 再加入等体积的氯仿: 异戊醇(24: 1), 轻轻倒转振荡 10 min, 室温下 13 000 r/min 离心 3 min, 取上清, 加入等体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇, 冰浴中静置 1 h 以上。最后 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离

心 5 min, 去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 1~2 次, 晾干 DNA, 加入 50 mL 无菌 ddH₂O 溶解。DNA 溶解后加入 1 μ L RNase(10 mg/mL) 去除 RNA。DNA 的浓度以 0.8% 的琼脂糖凝胶检测。

1.2.2 PCR 扩增 25 μ L 反应体系中包括如下成分: 莲模板 DNA 1 μ L 约 20 ng, 10 mmol/L dNTPs 0.25 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 2 μ L, 随机引物 25 μ mol/L 4 μ L, DNA 聚合酶 0.3 μ L(5 U/ μ L)(购自上海生工公司), 其余体积以 ddH₂O 填充。在 GenAmp 9600(PE9600, 美国 PE 公

司产)PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增,具体条件如下:94℃,3 min;92℃ 30 s,35℃ 40 s,72℃ 1 min,2 个循环;再 92℃ 30 s,38℃ 40 s,72℃ 1 min,38 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物在含 0.5 μg/mL EB 的 1.8% 凝胶上电泳(5 V/cm) 1 h,ZF-501 型多功能紫外透射仪上观察,美能达 DYNAX600si 相机拍照。

1.2.3 RAPD 多态性带形的确定 每个样品的电泳带按有或无记录,电泳带存在时赋值为 1,否则赋值为 0。统计分析用数据分析软件包 NTSYS 2.0 版本进行,以欧氏距离法计算遗传距离,利用 UPGMA 进行聚类分析,构建分子系统树。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

供试的 17 个随机引物(见表 2)扩增后都得到稳定的谱带。扩增片段分子量在 0.2~2 kb 之间。该 17 个引物在供试每个品种中获得的标记数目为 207 条,其中多态性带 122 条,占 58.93%。单个引物获得的标记数在 6~19 之间。供试引物可将 29 个莲品种划分为数个类型,当将 17 个引物图谱综合起来

时,供试莲品种可被清楚地区分开。图 1 为引物 OPC02 的扩增产物电泳图。

表 2 筛选出引物的编号及序列
Table 2 Base sequence of the selected 17 primers in this study

引物号 Code	序列 Base sequence	扩增条带数 Total bands	多态条带数 Polymorphic bands
OPC02	GTGAGGCGTC	11	7
OPC05	GATGACCGCC	12	8
OPP09	GTGGTCCGCA	10	6
OPS17	TGGGGACCAC	11	5
OPB04	GGAAGTGGAGT	13	8
OPG12	CAGCTCACGA	19	10
OPH05	AGTCGTCCCC	14	7
OPY09	AGCAGCGCAC	11	7
OPI14	TGACGGCGGT	14	8
OPM02	ACAACGCCTC	14	8
OPN20	GGTGCTCCGT	11	6
OPB06	TGCTCTGCC	9	5
OPG10	AGGGCCGTCT	14	8
OPG13	CTCTCCGCCA	11	7
OPA09	GGGTAACGCC	10	7
OPH04	GGAAGTCGCC	6	4
OPI20	AAAGTGCGGC	17	11
总数 Total		207	122

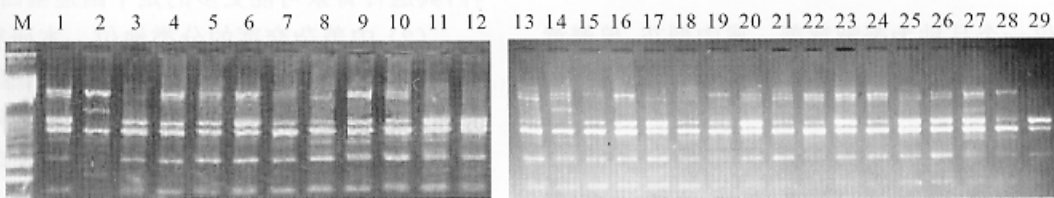


图 1 引物 OPC02 对 29 个品种的扩增产物电泳图
Fig. 1 The amplified result of all 29 samples by primer OPC02

2.2 花莲 29 份材料的聚类结果

应用 NTSYS-PC 软件包中的 UPGMA 聚类法构建 29 个花莲品种的分子系统关系(见图 2),各参试品种的欧氏遗传距离从 5.62 至 13.31 不等,表明花莲品种的相对遗传变异较大,从中可看出不同品种之间的遗传关系。在遗传距离 12.54 处,可将参试品种初步分为 2 个品种群:其中品种群 I 以大型花为主,兼有少量中小型花,含有 22 个品种,17 个大型花,5 个小型花。品种群 II 以中小型花为主,含有 7 个品种,黄莲在此品种群中。

进一步分析可以看出,在欧氏遗传距离 11.01 处,可将所有的资源分为 7 个亚组。

I:该亚组含 8 个品种。除大洒锦花瓣白色边缘带紫红色斑、金珠落玉盘白色、43-3 等品种带黄色基因但花以红色为基色外,其余 5 个品种全为红色

或粉红色花。其中 2 个传统品种红千叶和大洒锦与野生的洪湖红和微山红关系较近,同属大花型聚为一类,睡美人、金珠落玉盘、小醉仙同为小花型品种,花色虽不同也聚为一类。

II:该亚组有 3 个品种,其共同特征是都带有美洲黄莲的黄色基因,属中型和小型花,花色黄白色或间色。

III:该亚组含 5 个品种,均为白色花。其中白鹿矮、嫦娥奔月、大丰、碧莲属大型花,重瓣,亲缘关系较近,仅素韵为单瓣小型花,与其关系相对较远。

IV:重瓣一丈青和白千叶为大型白花重瓣,而蝶恋花带黄色基因,属单瓣中型花,间色。

V:江尾红花和千瓣莲为千瓣,距离较近。但小洒锦和江尾红花又都来自云南,因此聚在一起,三者都为大型花。

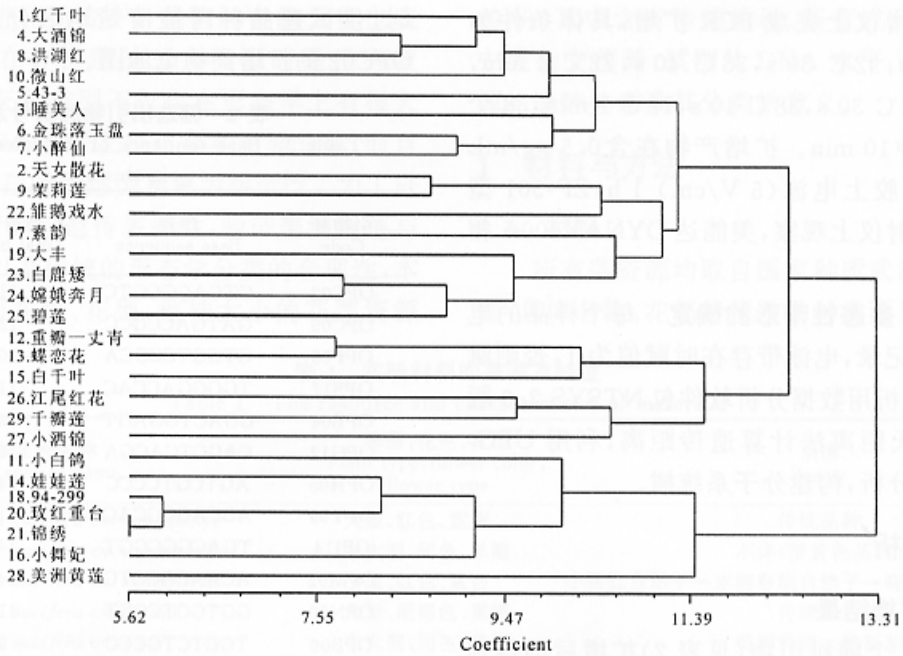


图 2 花莲 29 个品种聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 29 lotus cultivars with flower based on RAPD markers

Ⅵ: 该亚组含有 6 个品种, 为中小型花品种群, 虽有各色花, 但红花品种之间距离更近。带黄色基因的小舞妃与白色重瓣花的小白鸽与红花品种的距离则较远。

Ⅶ: 仅一个品种为美洲黄莲。属中型花, 单瓣黄色。

3 讨论

(1) 中国莲与美洲黄莲的关系。莲属 (*Nelumbo*) 有两个种, 中国莲 (*N. nucifera* Gaertn.) 和美洲黄莲 (*N. lutea* Pers.)。二者的分布被太平洋所隔, 前者遗传资源极为丰富, 在株型、花型、花色、根状茎、果实及种子等方面表现出极为丰富的遗传多样性, 而后者植株较小, 叶色深绿, 花单瓣黄色。但两个种之间有性杂交极易成功, 完全不存在生殖隔离, 二者染色体都是 $2n=16$ ^[9]。黄秀强等^[1]认为, 两个种仅存在地理隔离, 虽然在形态、花色、花型等方面存在差异, 但在严格意义上应属一个物种。二者的差异是基因型差异, 并建议将美洲黄莲作为亚种处理, 定名为 *N. nucifera*. Gaertn. ssp. *lutea* (Pers.) CHH, comb. Nov.。

在将美洲黄莲与中国莲(含花莲、子莲和藕莲)进行 RAPD 分析后, 美洲黄莲与花莲聚在一起, 没有表现出明显的差异^[10]。本研究中美洲黄莲与花莲仍表现出较近的亲缘关系, 并与中小型花品种关系更为密切说明美洲黄莲在 DNA 水平上与中国莲遗

传背景相似, 甚至只能作为中国莲的一个特殊品种。供试材料中带黄色基因的杂交品种没有与美洲黄莲聚在一起, 因为它们都是中国莲和美洲黄莲的杂交种, 其遗传背景可能更多的是中国莲基因。

(2) 中美杂交莲的分类地位。本研究共用了 6 个中美杂交莲品种, 在 7 个亚组的 4 个亚组中均有分布。在各亚组中多数表现出与其它品种存在一定的差异。但多与中小型花的关系较近, 这可能与它们杂交亲本的遗传背景有很大关系。同时也说明中国莲与美洲黄莲的杂交后代, 与中国莲相比, 其遗传相似性似乎要更大些。除了在花色方面可能表现出一定的差异性外, 其它性状与中国莲也较为相似, 这与它们在农艺性状上的表现是一致的。

在花莲品种的园艺学分类中, 倪学明等^[3]、王其超等^[5]将中美杂交莲作为品种分类的一级分类标准。如果中美杂交莲仅在花色(有些杂交种并未表现黄花, 而是白花、间色、红花等)存在一定差异, 能否将不同品种划分到不同花型中, 而不以中美杂交种作为一个标准, 值得进一步探讨。

(3) 实验利用了 4 个传统重瓣品种、2 个野莲、2 个千瓣莲、1 个黄莲, 其余都为杂交种。有些是从不知亲本的混合实生苗中选出, 有些是从只知道母本而不知其父本的实生苗中选出, 因此其遗传背景较为复杂。在分子水平上表现出更大相似性的品种, 在花这一特定的农艺性状上, 与园艺学分类并不十分吻合。从聚类图中不难看出, 品种群 I 以大型花为

主,兼有少量小型花,品种群Ⅱ中以中小型花为主。这与王其超等^[5]将植株的大小与花径作为二级分类标准是一致的,说明该标准较为合理。

野生莲和传统品种都分在大花型品种群或亚群中,可能暗示在中国莲的起源及栽培中,先有大花品种,再逐步选育出中小型品种。

(4) 江尾红花是云南呈贡的千瓣莲品种,在图2中它与湖北当阳玉泉寺的千瓣莲关系较近,但二者也存在一定的遗传差异,说明它们虽然都是花部器官全部瓣化了的资源,但由于地理上的差异而出现一定的分化。大洒锦是我国传统品种,大型白花重瓣,在瓣缘上有较大紫红色斑块。据中国荷花中心张行言教授介绍,小洒锦在我国遗失多年,近年在云南邱北普者黑发现小洒锦,也是大型白花重瓣,在瓣缘上的紫色斑块较小。但在同一湖中同时存在红花重瓣,白花重瓣和小洒锦3个品种。图2中大洒锦和小洒锦距离较远,二者变异可能来自不同的地区,而小洒锦与江尾红花亲缘关系较近,可能都是原产云南的缘故。

致谢:本文承蒙中国荷花研究中心王其超教授审阅并提出宝贵意见,谨以谢忱!

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Borsch T, Barthlott W. Classification and distribution of genus *Nelumbo* Adans (Nelumboaceae) [J]. *Beitr Biol Pflanzen*,1995,68:421-450.
- [3] 中国科学院武汉植物研究所. 中国莲[M]. 北京:科学出版社,1987. 1-20.
- [4] 柯卫东,李峰,刘玉平,黄新芳. 我国莲资源及育种研究综述(上)[J]. 长江蔬菜,2003(4):5-9.
- [5] 王其超,张行言,胡春根. 荷花品种分类新系统[J]. 武汉植物学研究,1997,15(1):19-26.
- [6] Asante I K, Offei S K. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes[J]. *Euphytica*,2003,131:113-119.
- [7] Singh A P, Dwivedi S, Bharti S, Srivastava A, Singh V, Khanuja S P S. Phylogenetic relationships as in *Ocimum* revealed by RAPD markers[J]. *Euphytica*,2004,136:11-20.
- [8] 郭宏波,柯卫东,李双梅,彭静. 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.
- [9] Langlet O, Soderberg E. Uber die chromosome enablen einiger Nymphaeaceae[J]. *Acta Horti Bergiani*,1927,9(4):85-104.
- [10] 郭宏波. 莲属(*Nelumbo*)资源分类[D]. 武汉:华中农业大学,2003. 7.