

Application Advance of Molecular Markers in Lotus

Heyun Song^{1,2}, Yunmeng Wang^{1,2}, Xianbao Deng^{1,3}, Heng Sun¹, Mei Yang^{1,3*}

¹Key Laboratory of Plant Germplasm Innovation and Characteristic Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing

³Collaborative Center, Core Botanical Garden of Chinese Academy of Sciences (Wuhan), Wuhan Hubei
Email: songheyun17@mailsucas.edu.cn, yangmei815815@wbucas.cn

Received: Jun. 1st, 2020; accepted: Jun. 24th, 2020; published: Jul. 1st, 2020

Abstract

Lotus is an important aquatic crop in China, which has high ornamental, edible and medicinal value. As a new type of genetic marker, molecular markers have been successfully applied to lotus classification, genetic diversity analysis, germplasm identification, construction of genetic map, and the mapping of important traits. This article systematically reviewed the application of the molecular markers in lotus research, and further discussed the potential prospects.

Keywords

Lotus, Molecular Marker, Germplasm of Identification, Genetic Diversity, Map of Construction

分子标记技术在莲研究中的应用与进展

宋贺云^{1,2}, 王云梦^{1,2}, 邓显豹^{1,3}, 孙恒¹, 杨美^{1,3*}

¹中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 湖北 武汉

²中国科学院大学, 北京

³协同中心、中国科学院核心植物园(武汉), 湖北 武汉

Email: songheyun17@mailsucas.edu.cn, yangmei815815@wbucas.cn

收稿日期: 2020年6月1日; 录用日期: 2020年6月24日; 发布日期: 2020年7月1日

摘要

莲是我国重要的水生经济作物, 集观赏、食用、药用等价值于一身。分子标记作为一种新型遗传标记,

*通讯作者。

目前已成功应用到莲分类、遗传多样性分析、种质鉴定、遗传图谱构建和重要性状定位等领域。本文系统介绍了现阶段常用的几种分子标记技术在莲研究中的应用现状, 并对其应用前景进行了展望。

关键词

莲, 分子标记, 种质鉴定, 遗传多样性, 图谱构建

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)属于山龙眼目莲科(*Nymphaeaceae*)莲属(*Nelumbo*), 是一种多年生水生植物。目前, 莲属在世界上仅存在两个种: 亚洲莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)和美洲黄莲(*Nelumbo lutea* Willd.)。莲在我国具有悠久的栽培历史, 在青铜器时代就已作为粮食被食用, 中国古代的宫殿花园莲也被视为珍贵的观赏植物, 许多文人墨客亦留下了赞美莲花高洁品质的诗词歌赋[1] [2]。莲具有多种价值, 其果实 - 莲子和地下茎 - 莲藕既可食用又可入药, 莲花的花色艳丽, 姿态优雅, 深受大众喜爱, 与花中之王牡丹、花中之魁梅花等并列为我国的十大名花。莲作为我国重要的水生经济作物, 对其研究主要集中在品种分类、生长发育、生理特征、遗传育种等方面。进入二十一世纪以来, 随着分子生物学及相关学科的迅猛发展, 对莲的研究开始深入到分子水平, 包括莲品种鉴定、亲缘关系的分析, 莲系统进化和遗传多样性的研究, 莲基因组测序及遗传图谱的构建, 莲重要基因的挖掘及功能分析等方面, 为进一步解析莲的生长发育分子机理、种质资源保存利用及新品种的培育等奠定了重要的理论基础。

分子标记是指反映个体间 DNA 分子水平上遗传多态性的遗传标记, 该技术作为一种全新的遗传标记方法, 具有准确性高、重现性好、多态性高、稳定性好、检测手段简便快速等突出的优点。自 1974 年第一代分子标记限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)出现以来, 随着基因组测序技术及相关研究技术的兴起, 越来越多的分子标记被开发出来, 包括随机扩增多态性(Random Amplified Polymorphism, RAPD)、扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、相关序列扩增多态性(Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP)、简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)、单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)等不同类型的分子标记。每一种分子标记技术在检测的多态性水平, 位点特异性, 重复性及技术要求等方面侧重点都不尽相同, 不存在一种理想的分子标记技术可以适用于任何一种情况[3] [4]。目前这几种分子标记已应用于莲分类、遗传多样性分析、品种鉴定、遗传图谱构建和重要性状定位等方面的研究中(表 1)。

2. 莲的分类研究

莲是世界上最古老的双子叶植物之一, 它的地理分布广泛, 亚洲莲主要分布在亚洲、大洋洲, 而美洲黄莲主要分布在北美洲[5]。在中国, 莲的观赏价值自古以来就备受关注, 经过长时间的人工栽培和选育, 已产生了丰富的莲品种资源。对莲品种进行科学、实用的分类有助于莲种质资源的保存与管理, 为莲资源的进一步开发和利用奠定理论基础。长期以来, 研究者不断探索品种分类的理论和方法, 取得了重要的成果。目前莲品种是采用“3 种系、6 群、14 类、38 型”的分类系统, 是按照品种演化为主, 形态、应用差异为辅的原理进行的分类[6]。但由于品种间的频繁杂交, 一些形态性状难以准确界定, 此分

类系统也受到了很大的挑战。近年来, 分子标记由于不受组织类别、发育阶段和环境条件的影响, 已广泛应用于莲分类研究中, 在澄清品种关系的同时, 对形态特征在品种分类中的作用也做出了分析, 形成了既反映品种遗传关系又实用的品种分类系统。

Table 1. Comparison of different molecular marking techniques and the application in lotus
表 1. 不同分子标记技术的比较及在莲中的应用

标记	重复性	稳定性	多态性	DNA 质量	检测范围	遗传特点	在莲中应用现状	优点	缺点
RAPD	中等	较低	较高	低	全基因组	显性	遗传多样性分析 聚类分析 DNA 指纹图谱绘制	特异性强, 操作简便	稳定性及重复性 较差
AFLP	高	高	较高	高	全基因组	显性	遗传多样性分析 聚类分析 QTL 定位分析	多态性强, 结果稳定, 重复度高	成本较高
SRAP	高	高	高	高	全基因组	共显性	遗传多样性分析 聚类分析 遗传连锁图谱构建 QTL 定位分析	简便、不需预知序 列信息、多态性强	依赖 PCR 反扩增 效率, 分子标记随 机分布
SSR	高	高	高	中等	重复序列区	共显性	遗传多样性分析 聚类分析 DNA 指纹图谱绘制 遗传连锁图谱构建 QTL 定位分析	多态性丰富, 覆盖率高, 重复性好	依赖 PCR 扩增效 率, 现有标记数量 有限, 标记开发难度大
SNP	高	高	高	高	全基因组	共显性	遗传连锁图谱构建 QTL 定位分析	数量多, 分布广泛, 自动化检测	标记开发成本高

经典植物分类学将莲属分为两个种: 中国莲和美洲黄莲。这两个种在植物形态上很接近, 仅植株大小、叶片形状和花色略有差异。中国莲多数植株高大, 叶椭圆形, 花为粉红或红色。美洲黄莲植株矮小, 叶近圆形, 花黄色单瓣[7]。两者虽在地理上被太平洋所间隔, 但不存在生殖隔离, 相互杂交可育。因此中国莲和美洲黄莲是否应该划分为两个独立的种成为学者争论的问题。Les 等[8] 1991 年的研究表明莲属这两个种的叶绿体基因 *rbcL* 序列同源性高达 99.9%。一年后, 黄秀强[9]等人通过核型、染色体组分析及银染的研究结果表明莲属的两个种染色体组高度同源, 相互杂交可育, 不存在生殖隔离。基于以上证据, 他首次提出应将美洲黄莲归为中国莲的一个亚种。王其超等[10]人通过多次重复的杂交实验再次证明了中国莲与美洲黄莲品种杂交可受精结实, 完全不存在生殖隔离, 进一步支持了该观点。21 世纪以来, 分子标记技术被用来分析中国莲和美洲黄莲的亲缘关系。郭宏波等[11] [12] [13]采用 RAPD 分子标记发现美洲黄莲与中国莲的花莲类群遗传背景较为相似, 在 DNA 水平上未表现出明显的特异性, 因此支持美洲黄莲归为中国莲的亚种。然而, 近几年利用 ISSR、AFLP 等分子标记对两者遗传关系的研究结果均表明两者存在较远的遗传距离, 在 DNA 水平上差异显著, 即中国莲和美洲黄莲应独立为两个类群[14] [15] [16] [17]。利用 SSR 分子标记分析中国东北、泰国与美洲的野生莲资源的亲缘关系, 同样支持中国莲、泰国莲独立于美洲黄莲[18]。Huang 等[19]利用基因组重测序技术对中国莲、泰国莲和美洲黄莲进行全基因组测序和分析, 发现美洲黄莲完全独立于中国莲、泰国莲。因此, 现阶段大多数学者认为美洲黄莲作为一个单独的种更为合理, 支持美洲黄莲作为一个独立的种这一观点。

莲在我国拥有悠久的栽培历史。经过长期的人工选择, 按照栽培目的及农业用途栽培莲被划分为三大类: 花莲、子莲和藕莲[20]。花莲具有很高的观赏价值, 经过漫长的人工选择, 其品种较为丰富, 不仅

有池塘大型莲花,也有小型的碗莲和缸莲,花型、花色丰富多样[21]。子莲以采摘莲籽为主要的栽培目的,其莲蓬一般较大、结实率高,如湖南湘莲、福建建莲等[22]。藕莲是我国特色的水生蔬菜,以采收肥大的地下根状茎为主要栽培目的,故其地下茎生长旺盛,较粗壮,开花少,植株比较大。采用不同的分子标记技术对栽培莲的类群划分结果与传统园艺学分类结论基本一致。早在2004年,郭宏波等[11] [12] [13]采用RAPD分子标记将莲属资源分为花莲、子莲和藕莲三大类型,三者之间存在较明显的遗传分化。之后对野生莲与千瓣莲资源进行分析发现野生莲与栽培莲资源类似,均可分为三大类群,推测现代栽培莲是由不同遗传背景的野生莲驯化而来,为野生莲资源的进一步开发和利用奠定了理论基础。这是首次从分子水平上将中国栽培莲进行类群的划分,证实了园艺学分类系统的合理性。同时,该研究还对三个类群的遗传关系进行了初步分析,为莲新品种的选育提供了重要的理论基础。瞿楨等[23]利用SRAP标记也得出类似的结论,即栽培莲三大类群有明显的界限。其中花莲和子莲遗传距离较近,藕莲和子莲具有较远的遗传距离。Hu等[16]利用AFLP和SSR两种分子标记对栽培莲的类群进行划分,也表明三大类群之间存在明显的差异。借助分子标记技术对栽培莲的分类研究是对传统园艺学分类方法的一个有效补充和验证。

在中国莲的生态型划分方面,张行言等在《中国荷花品种图志》一书中将花莲资源分为热带型和温带型两种类型[24]。热带型莲主要生长在热带地区(如泰国、印度和中国热带地区),其生长常年不停顿,秋季地下茎仍呈鞭状生长,不膨大成变态器官藕。温带型莲具有明显的年生长周期,一般于每年四月份开始萌芽生长,花期多集中在六月至八月,冬季在低温的影响下,生长停顿,地上部位枯萎凋谢,地下茎的前端节数膨大成贮藏器官藕而进入休眠期,第二年春季天气回暖,地下茎开始发芽,由此进入新一轮的生长周期。2007年,柯卫东等[25]对水生蔬菜资源考察收集的过程中发现东北地区的野生莲在武汉生长矮小,地下茎膨大明显提早,不同于长江中下游地区的野莲资源,因此他们建议应将莲按照纬度分布划分为三种生态型:温带型、亚热带型和热带型。之后,有学者从叶绿体序列变异的角度证实东北野莲单倍型和我国中部南部地区的野莲单倍型存在显著差异,认为两者应该属于不同生态型[26]。Yang等[18]利用SSR分子标记对泰国和中国东北野生莲的遗传多样性的研究表明,两者在遗传上存在明显的差异,将中国东北野莲归为温带型,而泰国野莲归为热带型。该研究为两种生态型的划分提供了有利的分子依据,说明按照生态型的分类方法是合理的。基于以上证据,将莲划分为温带型、亚热带型和热带型三种生态型更具有说服力。

3. 种质资源的遗传多样性研究

植物的遗传多样性大小是物种长期进化的产物,遗传变异的丰富程度反映了该物种对环境变化的适应能力,同时也是遗传育种研究的基础和核心。DNA分子标记的使用可以不受环境、材料来源的限制,直接从分子水平上揭示不同莲品种之间的多态性。由于现代农业的发展,莲的栖息地受到了严重破坏,因此评价莲遗传多样性水平对保护莲种质资源尤为重要。早期对莲的研究中,RAPD分子标记的使用最为广泛。郭宏波等[11]在2004年利用RAPD技术对所选取的32份莲品种进行遗传多样性的初步分析,结果显示在扩增形成的207条谱带中存在多态带193条,占比为93.23%,这一结果表明该属植物在我国具有丰富的遗传多样性,并且存在明显的遗传分化。之后,他们又对野生莲和千瓣莲品种资源进行了多态性分析,多态性条带所占的比例分别为56.03%和57.45%,初步表明野生莲和千瓣莲在我国具有丰富的遗传多样性[12] [13]。郑宝东等[27]在2006年利用RAPD标记技术对来自全国不同地区的22个莲子栽培品种及野生品种进行遗传多样性分析,结果显示在扩增出的109条DNA指纹谱带中含多态性片段83条,占总数的76.1%。初步证明这些品种间存在丰富的遗传多样性,但品种间的遗传距离与所采集地区的差异之间并不存在直接的关联。之后,An等[28]利用RAPD技术对来自我国18个不同省份的94份

莲材料进行种群遗传结构的分析,结果显示多态位点达 67.15%,证明莲具有丰富的遗传多样性。但由于 RAPD 技术本身的局限性,如特异性不高、重复性差或不能鉴别纯合子和杂合子等,且 RAPD 技术极易受到各种因素的影响,如基因组 DNA 的复杂性, DNA 模板浓度和质量, PCR 的循环次数,技术设备等,限制了其使用和推广。

AFLP、ISSR、SSR、SRAP 等分子标记也被广泛的应用到莲遗传多样性的评价中。薛建华等[29]利用 RAPD 和 ISSR 两种分子标记对采自黑龙江地区的 47 份野生莲、俄罗斯兴安斯克保护区的两份野生莲及中国其他省的 27 份栽培莲进行遗传多样性分析,结果显示 RAPD 多态性位点中,野生莲的多态位点比例(50.44%)和有效等位基因数(1.1992)均低于栽培莲的(53.98%, 1.2875),用 ISSR 标记显示为同样的结果,说明野生莲群体的遗传多样性低于栽培莲,该研究对黑龙江地区野生莲的遗传多样性进行了客观分析,初步探究了其遗传变异的地理分布规律,为黑龙江地区野生莲资源的遗传多样性保护提供了重要的科学依据。为了对我国现存的野莲资源进行有针对性的保护, Han 等[30]对我国华中地区不同湖泊的野生莲进行了遗传多样性的分析,采用 ISSR 分子标记分析了 6 个种群间及种群内部的遗传变异,发现物种水平上野莲居群具有较高的多态性,多态带占比为 90%,而群体间遗传分化较大,多态带占比仅 35.8%,因此提出就地保护和远征收集具有最高遗传变异的代表性种群等措施来进行野莲资源的保护。Pan 等[31]利用开发出的 23 个 EST-SSR 标记对 39 个中国莲栽培品种、10 个野生莲品种及 1 个美国黄莲进行遗传多样性分析,结果表明栽培莲品种和野生莲品种及不同子莲和藕莲品种间均存在不同程度的遗传分化。李长春等[32]利用 8 个 ISSR 分子标记分析了 39 份莲品种的遗传多样性,在扩增出的 89 条带中含多态带 55 条,多态性比率为 61.8%,并且通过遗传相似系数和聚类分析可以将这些莲品种完全区分开考。Liu 等[33]在 2012 年利用开发的 11 对 SSR 引物对来自世界各地的 71 份莲品种进行了聚类分析,表明中国莲具有丰富的遗传多样性,并对它们的亲缘关系进行了初步分析。综上所述,莲具有丰富的遗传多样性。分子标记技术作为研究莲遗传多样性的一个有效手段,对我国重要莲种质资源的保护具有重要的意义,以便更好的进行莲资源的保存和利用。

4. DNA 指纹图谱构建和品种鉴定

一直以来,对莲品种的分类主要根据形态特征,如花型、花色、花态、花径、花期、株高、雄蕊、雌蕊、莲蓬的形状、主藕的节数和节间形状等[34]。然而大多数形态性状受不同产区环境的影响较大,因此很容易出现同物异名,或者同名异物等问题。

DNA 指纹图谱是指 DNA 样品用特定分子标记技术处理显示出具有特定 DNA 片段的总称[35]。指纹图谱个体特异性高、多态性丰富且不易受环境影响较为稳定,类似人类的指纹,因此称为“指纹图谱”。DNA 指纹图谱是新品种评审的重要依据之一,该技术可为种质资源的准确鉴定提供重要的理论指导。

莲是我国特色的水生蔬菜,其分布广泛且栽培面积较大,随着新品种的不断增加,加强新品种的准确识别与鉴定对于合理优化种植区域进而提高生产效率意义重大。莲传统的分类方法主要是以形态学特征为依据,通常大多数形态性状受不同产区环境的影响较大,因此鉴定起来存在一定的困难。DNA 指纹分析技术能够解决这一难题,为品种间的遗传差异研究提供便利。韩延闯等[36]采用 RAPD 技术成功地绘制了 14 个莲藕品种的 DNA 指纹图谱,并通过实验验证了该图谱中的每个品种均有其特异的 DNA 指纹。该发明专利为莲藕新品种的登记和保护提供了分子依据。全志武等[37]利用 6 对基因组 SSR 标记得到 10 个藕莲品种的 SSR 指纹图谱。10 个藕莲品种的 SSR 指纹图谱互不相同,可以作为各品种的特定图谱,作为品种鉴别的重要依据。碗莲的 DNA 指纹图谱也被成功绘制,还利用 RAPD 分子标记对这些碗莲品种进行了遗传多样性的分析[38]。薛建华等[39]将双亲遗传核微卫星(nSSR)和母系遗传的叶绿体微卫星(cpSSR)两种标记相结合,利用 72 个莲品种材料进行分子标记,成功筛选出扩增效果好、多态性高的

引物鉴定莲品种, 构建了 DNA 指纹图谱数据库。他们进一步提出将形态特征与 DNA 指纹两者相结合作为莲品种的鉴定标准, 为品种的精确鉴定提供了一个有利的参考依据。2017 年, 山东省水稻研究所采用高多态性 InDel 分子标记绘制了 15 个莲藕品种的指纹图谱, 进一步丰富了莲的指纹图谱库[40]。最近, 武汉市农业科学院蔬菜研究所利用 SSR 标记分析了 9 个藕莲新品种的遗传多样性, 并构建了 DNA 指纹图谱, 为藕莲种苗的认证及近似品种的鉴定提供重要参考[41]。李青竹等[42]利用荧光标记 SSR 结合毛细管电泳技术对 72 个不同类型的莲品种进行遗传多样性分析, 构建了指纹图谱。相比传统的形态学品种鉴定方法, DNA 分子标记技术的使用在一定程度上提升了遗传分析的准确性及品种选育的有效性。将形态特征与 DNA 指纹两者结合作为莲品种鉴定的标准, 有助于解决目前品种分类出现的同物异名或同名异物等问题, 对于规范品种分类管理、新品种选育及品种产权的保护等都具有重要意义。但目前莲指纹图谱所涉及到的品种数目还比较少, 相对于近千种的莲品种, 所构建的指纹图谱还远远不够, 应加大测试品种数目。随着基因组学等新兴学科的兴起, 尤其是二代、三代测序技术的迅猛发展, 新型分子标记将会出现, 更高质量的指纹图谱也会在品种鉴定中广泛应用。

5. 分子遗传图谱的构建

遗传图谱(genetic linkage map)又称染色体图谱或者连锁图, 是以与目的基因紧密连锁或共分离的遗传标记为路标, 以两个位点的交换率为图距的图谱。遗传图谱作为遗传研究的重要内容之一, 是基因组学研究和数量性状位点 QTL 定位的基础, 同时也是作物遗传育种、目的基因定位与克隆等研究的重要工具之一[43] [44]。2012 年中国科学院武汉植物园与美国伊利诺斯大学香槟分校合作进行“中国古代莲”基因组的测序工作, 组装基因组大小约 804 Mb, 完成了 26685 个基因的注释工作, 并首次绘制了“中国古代莲”的基因组图谱[45]。同年, 中间湖野莲的全基因组测序完成, 组装基因组大小约为 792 Mb, 编码基因 40348 个[46]。2018 年, 利用高分辨率的遗传图谱和 Bio Nano 基因组技术进一步完善了这两个基因组图谱[47]。在此基础上, Yang 等人[48]率先利用中国古代莲和美洲黄莲杂交的 F1 代分离群体, 基因组 SSR 标记和 SRAP 标记分别构建了首张中国古代莲和美洲黄莲的遗传连锁图谱, 其中亚洲莲的遗传图谱包含 7 个连锁群, 47 个标记, 全长 365.67 cM; 美洲黄莲的遗传图谱包含 11 个连锁群, 177 个标记, 全长 524.51 cM。随后, Zhang 等[49]进一步利用 RAD 测序技术对此群体进行加密, 构建了一张包含 9 个连锁群, 562 个 RAD 标记和 156 个 SSR 标记的遗传连锁图, 全长 543.4 Mb。此遗传连锁图的绘制不仅为莲重要农艺性状的 QTL 定位及候选基因的挖掘奠定了理论基础, 同时对更高质量遗传图谱的绘制具有重要的借鉴意义。近几年基于基因组重测序、简化基因组测序等测序技术的不断发展, 促进了莲遗传图谱构建工作的开展。2016 年武汉市蔬菜科学研究所利用鄂子莲 1 号和鄂莲 9 号杂交的 F2 代分离群体, 结合简化基因组测序技术构建了一张由 8 个连锁群构成的遗传图谱, 该图谱含有 891 个分子标记, 全长 556 cM, 平均遗传图距为 0.74 cM [50]。陈岳等[51]以美洲黄莲和亚洲单瓣莲品种“单洒锦”杂交获得的 F1 代群体为研究材料, 利用 EST-SSR 标记和 SSR 标记成功构建了莲的遗传连锁图谱, 包括 8 个连锁群, 88 个 SSR 标记, 覆盖基因组 420.7 cM, 平均遗传图距为 4.8 cM。李玲[52]以温带型莲“白鸽”和热带型莲“冬红花”杂交后代 F2 分离群体为作图群体, 利用全基因组重测序技术获得了该群体的 SNP 标记, 构建了一张遗传连锁图谱, 该图谱含有 9 个遗传连锁群, 862 个 bin、22728 个 SNP, 全长 706.31 cM。目前莲遗传图谱构建工作尚处于初级阶段, 存在着所用标记少、密度低等问题, 需开发更多的分子标记。随着高通量测序技术的发展, 有望开发大量密度高、多态性强的分子标记用于高饱和密度的莲遗传连锁图谱的构建, 将推动莲分子遗传育种的跨越式发展。

6. 农艺性状定位及分子标记辅助选择育种

莲具有多个重要的农艺性状, 如花色、花型、花期、莲子产量和地下茎节数等。这些农艺性状多为

数量性状, 受多基因控制。以已构建的遗传图谱为基础, 结合莲的表型数据, 对这些农艺性状进行 QTL 定位以获得与目标性状紧密连锁的遗传标记, 对莲重要农艺性状的定位、分子标记辅助选择育种具有重要的意义。

中国科学院武汉植物园 Yang 等[53]人在 2014 年选择 210 个莲种质为研究群体, 对其开花相关表型数据(花色、花瓣被数、始花期和持续花期时间)进行了连续两年的观测, 并采用 11 个 AFLP 标记、24 个 SRAP 标记和 38 个 SSR 标记对目标性状进行关联分析。结果共检测到与花色显著相关的标记 13 个分子, 与花瓣被数显著相关的分子标记 14 个; 与莲始花期显著相关的分子标记 3 个; 与开花持续时间显著关联的分子标记 7 个。这些分子标记的发现为莲花色、花瓣被数、始花期等重要农艺性状的精细定位研究提供了重要的理论参考。李玲采用全基因组测序技术开发了大量 SNP 分子标记, 构建莲高密度遗传连锁图谱, 进行花期 QTL 的定位, 共检测到 9 个与花期相关的 QTLs, 对基因进行功能分析最终筛选到三个与莲花期调控相关的主要候选基因[52]。这是国内首次对莲花期性状进行的 QTL 研究, 为进一步揭示莲花期差异的遗传机制、选育长花期莲新品种提供重要的理论基础。为挖掘调控莲株型相关性状的基因, 杨郭阳等[54]以小株型品种“艳阳高照”和大株型品种“建选-35”杂交得到的 F1 代植株为作图群体, 利用 SSR 和 InDel 分子标记构建了荷花遗传连锁图谱, 共检测到 14 个与株型相关的 QTLs 位点, 为开展莲株型的遗传学研究奠定了良好基础。严寒松[55]以花瓣数差异大的花莲“金秋”和子莲“白花建莲”杂交得到的 F2 代植株为作图群体, 利用全基因组重测序的方法开发 SNP 分子标记并构建遗传连锁图, 通过 QTL 定位到了一个与花瓣数性状连锁的高质量 QTL 位点, 最终筛选出了 35 个候选基因和 3 个主要候选基因。这为进一步进行莲花花瓣数调控基因的功能分析及相关分子标记的开发奠定了基础, 将有助于莲花花瓣性状改良的分子标记辅助选择育种。

现阶段对莲重要遗传性状遗传定位的研究十分有限, 因此莲重要农艺性状的遗传调控机制目前仍不清楚, 这在很大程度上阻碍了莲遗传育种产业的快速发展。目前, 杂交育种仍是莲育种的主要育种方式。这种育种方法主要是通过表型特征来确定亲缘关系, 而莲藕的许多重要农艺性状遗传能力往往较弱, 此外, 环境、基因间互作、基因型与环境互作等诸多因素也会产生不确定性, 影响植株的表型选择而降低筛选效率。由于莲的许多农艺性状遗传机理复杂, 无法直接找到调控性状的关键基因, 导致育种效率低、周期长[56]。迫切需要开发莲的分子育种技术。其中分子标记辅助选择(Molecular Marker Assisted Selection, MAS)以 QTL 作图和基因定位为基础, 直接从 DNA 水平上入手, 通过遗传标记对目标基因进行间接选择。MAS 受环境影响小且数量多分布广泛, 能够在一定程度上弥补传统育种的不足, 减少育种筛选工作人力物力和时间的大量投入, 大大缩短育种周期, 在莲育种方面有着巨大的发展潜力。

7. 问题与展望

我国莲研究起步相对较早, 最初采用传统的形态学、细胞学等方法进行分类、生长发育、品种鉴定及育种等方面的研究。随着分子生物学技术的不断发展, 逐渐深入到分子水平, 研究内容包括莲基因组测序、莲遗传图谱的构建、莲种质资源的鉴定与保存、莲系统进化及遗传多样性研究、莲重要基因的挖掘与功能验证等, 对莲产业的发展有重大的意义。

近年来, 随着测序技术的快速发展, 基于莲基因组序列开发了大量的分子标记, 为莲生物学研究奠定了重要的理论基础[45] [46] [47] [48]。目前针对莲分子标记的使用中存在的主要问题及提出的建议如下: (1) 加强 DNA 指纹图谱技术在莲品种鉴定方面的应用。DNA 指纹图谱作为新品种评审的重要依据之一, 对莲品种的精确鉴定具有重要的实用价值。然而, 目前莲指纹图谱供试品种太少, 实际应用意义并不大。因此, 应该加强对不同莲品种 DNA 指纹图谱的绘制, 进一步丰富 DNA 指纹图谱库。同时加大测试品种数目, 提高品种鉴定的准确度。在此过程中可以加强新型分子标记的开发, 如 SSR、SNP 等, 有望提高

遗传分析的准确性,为种苗的认证及近似品种的鉴定、新品种的登记和保护等提供重要的理论参考。(2) 加大新型 SNP 分子标记的开发。21 世纪初,莲基因组信息的不完善在很大程度上限制了莲的分子研究,此后随着莲全基因组测序完成及二代、三代测序技术的兴起,莲的分子研究取得了重大突破。但仍存在许多不足,例如在莲的遗传多样性研究中,现存的分子标记会存在特异性不高、重复性差、多态性不高等问题,会对研究结果产生一定的影响。因此可以利用全基因组重测序对莲品种进行测序,开发覆盖全基因组的 SNP 分子标记进行分析,有望得到更全面、更准确的分析结果。(3) 构建更高密度遗传连锁图谱,并加强不同遗传图谱的整合。遗传连锁图是基因组研究和数量性状位点 QTL 定位的基础,同时也是目的基因定位与克隆、遗传育种等研究的重要工具。目前莲遗传图谱构建工作尚处于初级阶段,遗传图谱数量不足且质量欠佳,饱和和密度不高,分子标记间遗传距离较远,无法实现目的基因的精确定位,直接利用存在一定困难。因此需加大力度开发大量密度高、多态性强的分子标记用于构建高饱和密度的莲遗传连锁图谱,同时还可以进行不同遗传图谱的整合构建更高质量的遗传连锁图。基于基因组重测序、简化基因组测序等测序技术的不断发展,相信更高密度的遗传连锁图谱必将推动莲分子遗传育种的健康发展。(4) 开发与功能基因连锁的分子标记,加强农艺性状的 QTL 定位和基因挖掘研究,进行分子辅助选育工作。现阶段分子标记在莲的遗传育种方面的研究甚少,由于现有的分子标记大多在基因组中的位置都是随机的,特异性不高,导致标记鉴定与分子标记辅助选择育种之间存在很大的脱节[57]。因此,可以从功能基因入手,开发与功能基因紧密连锁或者在功能基因中的分子标记,将该类分子标记用于筛选杂交亲本材料,直接筛选出优质、高产、抗病等具有优良品质的莲新品种。此外,目前莲中重要功能基因的研究十分有限,如抗病性、花色、花型、产量等,这严重阻碍了莲藕重要应用价值的利用。因此,应加强农艺性状的 QTL 定位和基因挖掘研究,并进行分子辅助选育工作,这对缩短莲品种选育周期有很大帮助,有利于莲优质新品种的快速培育,提升莲藕产业的市场竞争力。

参考文献

- [1] 刘艳玲. 莲野生居群遗传多样性评价及高密度遗传连锁图谱的构建[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [2] 张晨昕. 中国传统文化中莲的审美意象研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京林业大学, 2017.
- [3] 王印肖, 徐秀琴, 韩宏伟. 分子标记在品种鉴定中的应用及前景[J]. 河北林业科技, 2006(S1): 46-49.
- [4] Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. (2008) Advances in Molecular Marker Techniques and Their Applications in Plant Sciences. *Plant Cell Reports*, **27**, 617-631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>
- [5] 郭宏波, 柯卫东. 莲属分类与遗传资源多样性及其应用[J]. 黑龙江农业科学, 2009(4): 106-109.
- [6] 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(1): 19-26.
- [7] 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: 2-9.
- [8] Les, D.H., Garvin, D.K. and Wimpee, C.F. (1991) Molecular Evolutionary History of Ancient Aquatic Angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 10119-10123. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10119>
- [9] 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.
- [10] 王其超, 张行言. 二元分类法在荷花品种分类中的应用[J]. 北京林业大学学报, 1998(2): 33-37.
- [11] 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(4): 328-332.
- [12] 郭宏波, 柯卫东, 李双梅, 彭静. 野生莲资源的 RAPD 分析[J]. 植物学通报, 2005(S1): 64-67.
- [13] 郭宏波, 柯卫东. 千瓣莲品种资源的 RAPD 分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 66-68.
- [14] Zuo, L., Xiu, Q.L., Gituru, R.W., et al. (2010) Genetic Diversity and Classification of *Nelumbo* Germplasm of Different Origins by RAPD and ISSR Analysis. *Scientia Horticulturae*, **125**, 724-732. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.005>
- [15] Kubo, N., Hirai, M., Kaneko, A., Tanaka, D. and Kasumi, K. (2009) Classification and Diversity of Sacred and Amer-

- ican *Nelumbo* Species: The Genetic Relationships of Flowering Lotus Cultivars in Japan Using SSR Markers. *Plant Genetic Resources*, **7**, 260-270. <https://doi.org/10.1017/S1479262109356580>
- [16] Hu, J.H., Pan, L., Liu, H., *et al.* (2012) Comparative Analysis of Genetic Diversity in Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Using AFLP and SSR Markers. *Molecular Biology Reports*, **39**, 3637-3647. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1138-y>
- [17] Yang, M., Han, Y.N., Xu, L.M., Zhao, J.R. and Liu, Y.L. (2012) Comparative Analysis of Genetic Diversity of Lotus (*Nelumbo*) Using SSR and SRAP Markers. *Scientia Horticulturae*, **142**, 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.021>
- [18] Yang, M., Liu, F., Han, Y., Xu, L.M., Juntawong, N. and Liu, Y.L. (2013) Genetic Diversity and Structure in Populations of *Nelumbo* from America, Thailand and China: Implications for Conservation and Breeding. *Aquatic Botany*, **107**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.01.001>
- [19] Huang, L., Yang, M., Li, L., *et al.* (2018) Whole Genome Re-Sequencing Reveals Evolutionary Patterns of Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of Integrative Plant Biology*, **60**, 2-15. <https://doi.org/10.1111/jipb.12606>
- [20] 倪学明. 莲的品种分类研究[J]. 园艺学报, 1983, 1(3): 207-210.
- [21] 王其超, 张行言. 中国荷花品种选登——选自《中国荷花品种图志》·续志[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2000(7): 59.
- [22] 陈平平. 中国莲的起源与演化[J]. 生物学通报, 1999(11): 28-29.
- [23] 瞿桢, 魏英辉, 李大威, 肖丽舟, 徐金星, 谢克强, 周明全, 胡中立. 莲品种资源的 SRAP 遗传多样性分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2008(3): 21-25.
- [24] 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.
- [25] 柯卫东, 李峰, 黄新芳, 等. 水生蔬菜种质资源研究及利用进展[J]. 中国蔬菜, 2007(8): 72-75.
- [26] Li, J.K., Zhou, E.X., Li, D.X. and Huang, S.Q. (2010) Multiple Northern Refugia for Asian Sacred Lotus, an Aquatic Plant with Characteristics of Ice-Age Endurance. *Australian Journal of Botany*, **58**, 463-472. <https://doi.org/10.1071/BT10002>
- [27] 郑宝东, 郑金贵, 曾绍校. 中国莲子种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国食品学报, 2006(1): 138-143.
- [28] An, N., Guo, H.B. and Ke, W.D. (2009) Genetic Variation in Rhizome Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) Germplasms from China Assessed by RAPD Markers. *Agricultural Sciences in China*, **8**, 31-39. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60006-7](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60006-7)
- [29] 薛建华, 卓丽环, 周世良. 黑龙江野生莲遗传多样性及其地理式样[J]. 科学通报, 2006(3): 299-308.
- [30] Han, Y. C., Teng, C. Z., Zhong, S., Zhou, M.Q., Hu, Z.L. and Song, Y.C. (2007) Genetic Variation and Clonal Diversity in Populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in Central China Detected by ISSR Markers. *Aquatic Botany*, **86**, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.09.007>
- [31] Pan, L., Quan, Z., Shuangmei, L.I., *et al.* (2007) Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in the Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Molecular Ecology Resources*, **7**, 1054-1056. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01774.x>
- [32] 李长春, 戴余军, 苏超, 李建华, 田春元, 姚国新. 利用 ISSR 分子标记对 39 份莲藕种质资源的遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2011(12): 96-98.
- [33] Liu, Y.L., Yang, M., Xiang, Q.Y., Xu, L., Zeng, X. and Bao, M. (2012) Characterization of Microsatellite Markers and Their Application for the Assessment of Genetic Diversity among Lotus Accessions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **137**, 180-188.
- [34] 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: 84-85.
- [35] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Kuiper, M., *et al.* (1995) AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- [36] 韩延闯, 刁英, 胡中立, 周明全. 一种莲藕 DNA 指纹图谱构建的分子标记方法[P]. 中国专利: CN1482257, 2004-03-17.
- [37] 全志武, 汪静, 潘磊, 等. 10 个莲藕品种 SSR 指纹图谱的构建与品种鉴定[J]. 中国蔬菜, 2008(3): 15-17.
- [38] 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.
- [39] 薛建华, 姜莉, 马晓林, 邴艳红, 赵思晨, 马克平. 莲品种 DNA 指纹图谱的构建[J]. 生物多样性, 2016, 24(1): 3-11.
- [40] 律文堂, 尹静静, 刘蓬, 刘永, 吴宝杰, 吴修, 李效尊. 莲藕品种资源 InDel 指纹图谱的构建[J]. 长江蔬菜, 2017(18): 94-96.

- [41] 孙亚林, 朱红莲, 刘正位, 匡晶, 柯卫东. 基于 SSR 的藕莲新品种(系)指纹图谱构建[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(4): 96-99.
- [42] 李青竹, 许俊旭, 王桢, 吉琴, 顾云, 杨柳燕. 利用 SSR 荧光标记构建七十二个莲属荷花品种指纹图谱[J]. 北方园艺, 2020(4): 65-73.
- [43] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- [44] Morrell, P.L., Buckler, E.S. and Ross-Ibarra, J. (2011) Crop Genomics: Advances and Applications. *Nature Reviews Genetics*, **13**, 85-96. <https://doi.org/10.1038/nrg3097>
- [45] Ming, R., Vanburen, R., Liu, Y.L., Yang, M. and Shen-Miller, J. (2013) Genome of the Long-Living Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Genome Biology*, **14**, Article No. R41. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r41>
- [46] Wang, Y., Fan, G., Liu, Y., et al. (2013) The Sacred Lotus Genome Provides Insights into the Evolution of Flowering Plants. *Plant Journal*, **76**, 557-567. <https://doi.org/10.1111/tbj.12313>
- [47] Gui, S.T., Peng, J., Wang, X.L., et al. (2018) Improving *Nelumbo nucifera* Genome Assemblies Using High-Resolution Genetic Maps and BioNano Genome Mapping Reveals Ancient Chromosome Rearrangements. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, **94**, 721-734. <https://doi.org/10.1111/tbj.13894>
- [48] Yang, M., Han, Y., Vanburen, R., Ming, R., Xu, L.M., Han, Y.P. and Liu, Y.L. (2012) Genetic Linkage Maps for Asian and American Lotus Constructed Using Novel SSR Markers Derived from the Genome of Sequenced Cultivar. *BMC Genomics*, **13**, Article No. 653. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-653>
- [49] Zhang, Q., Li, L.T., Vanburen, R., et al. (2014) Optimization of Linkage Mapping Strategy and Construction of a High-Density American Lotus Linkage Map. *BMC Genomics*, **15**, Article No. 372. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-372>
- [50] Liu, Z.W., Zhu, H.L., Liu, Y.P., Kuang, J., Zhou, K., Liang, F., Liu, Z.H., Wang, D.P. and Ke, W.D. (2016) Construction of a High-Density, High-Quality Genetic Map of Cultivated Lotus (*Nelumbo nucifera*) Using Next-Generation Sequencing. *BMC Genomics*, **17**, Article No. 466. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2781-4>
- [51] 陈岳, 张微微, 莫海波, 付乃峰, 田代科. EST-SSR 标记构建莲(*Nelumbo Adans.*)遗传连锁图谱[J]. 分子植物育种, 2017, 15(6): 2265-2273.
- [52] 李玲. 莲高密度遗传连锁图谱的构建及花期 QTL 定位[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [53] Yang, M., Zhu, L.P., Xu, L.M. and Liu, L.Y. (2014) Population Structure and Association Mapping of Flower-Related Traits in Lotus (*Nelumbo Adans.*) Accessions. *Scientia Horticulturae*, **175**, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.017>
- [54] 杨郭阳. 荷花遗传连锁图谱的构建及株型相关性状 QTLs 分析[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [55] 严寒松. 中国莲高密度遗传图谱的构建及花瓣数控制基因的定位[D]: [硕士学位论文]. 福建: 福建农林大学, 2019.
- [56] 王亚琦, 孙子淇, 郑峥, 黄冰艳, 董文召, 汤丰收, 张新友. 作物分子标记辅助选择育种的现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 6-12.
- [57] 李元龙, 王中华. 分子标记技术在作物育种中的应用与展望[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2016, 44(3): 140-145, 183.