

• 研究报告 •

# 莲品种DNA指纹图谱的构建

薛建华<sup>1\*</sup> 姜 莉<sup>2#</sup> 马晓林<sup>2</sup> 邢艳红<sup>1</sup> 赵思晨<sup>2</sup> 马克平<sup>1</sup><sup>1</sup> (中国科学院植物研究所植被与环境变化国家重点实验室, 北京 100093)<sup>2</sup> (北京市海淀区圆明园管理处, 北京 100084)

**摘要:** 为了克服单纯依据形态特性鉴定品种的局限性, 我们开展了莲品种DNA指纹图谱构建研究, 旨在对其品种的快速准确鉴定及专利权保护等起一定作用。本研究以圆明园保存的72个莲品种为实验材料, 用来自不同地点的1,409份野生莲(*Nelumbo nucifera*)和58份美洲黄莲(*N. lutea*)群体样本作遗传背景参照。从104对核微卫星引物(nSSR)中筛选出15对, 从17对叶绿体微卫星(cpSSR)引物中筛选出2对, 共17对引物作为72个莲品种DNA指纹鉴定的条码。15对nSSR引物共检测到94个等位基因(平均6.27个), 其中11个属于美洲黄莲, 65个属于野生莲, 18个不能区分; 多态信息含量(PIC)介于0.3899–0.8023之间 (平均0.5748)。2对cpSSR引物共检测到13个单倍型, 其中9个属于野生莲, 4个属于美洲黄莲。全部17对引物标记结果显示, 共有19个品种含有美洲黄莲遗传组分, 其中8个母系来源于美洲黄莲; 有36个品种(涉及12对引物)具有至少1个特有基因型; 最少8对引物组合可完全区分68个品种。有2组共4个品种组内全部17对引物均不能区分。本研究通过核心引物组合法使68个莲品种获得特异性DNA指纹。推荐13对nSSR和2对cpSSR共15对引物作为莲品种鉴定的核心条码, 并建议将形态特征与DNA指纹相结合作为莲品种的鉴定标准。

**关键词:** DNA指纹; 微卫星; *Nelumbo*; 品种鉴定; 分子身份证

## Identification of lotus cultivars using DNA fingerprinting

Jianhua Xue<sup>1\*</sup>, Li Jiang<sup>2#</sup>, Xiaolin Ma<sup>2</sup>, Yanhong Bing<sup>1</sup>, Sichen Zhao<sup>2</sup>, Keping Ma<sup>1</sup><sup>1</sup> State Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093<sup>2</sup> Yuanmingyuan Administration, Beijing 100084

**Abstract:** DNA fingerprinting is a fast and accurate method for cultivar identification, which can overcome the limitation of morphological traits. We used DNA fingerprinting to identify 72 lotus (*Nelumbo*) cultivars collected from the Resources Garden of the Yuanmingyuan Park in Beijing. We used 1,409 samples of *N. nucifera* and 58 samples of *N. lutea* as a genetic background reference. Fifteen out of 104 pairs of nucleus microsatellite primers (nSSR) and 2 out of 17 pairs of chloroplast microsatellite primers (cpSSR), for a total of 17 pairs of fluorescent primers, were selected as the barcode for fingerprint identification of the 72 lotus cultivars. For the 15 nSSR primers, 94 alleles were examined (with an average of 6.27). Out of the 94 alleles, 11 belong to *N. lutea*, 65 belong to *N. nucifera*, and the remaining 18 alleles could not be identified. The polymorphism information content (PIC) range between 0.3899 and 0.8023, with an average value of 0.5748. For the two pairs of cpSSR primers, 13 haplotypes were examined. Among them, 9 haplotypes belong to *N. nucifera* and 4 haplotypes belong to *N. lutea*. Results of identification of all 17 pairs of primer markers showed that 19 cultivars included genes from *N. lutea*, and 8 cultivars had female parents from *N. lutea*. There were 36 cultivars (using 12 pairs of primers) which had at least one unique genotype. With a minimum of 8 pairs of primers, 68 cultivars could be distinguished. Among the 72 cultivars, four cultivars in two groups could not be distinguished based on the whole set of 17 primers. Using the core primer combination method, we developed specific DNA fingerprints for each of the 68 lotus cultivars. Based on the above re-

收稿日期: 2015-06-08; 接受日期: 2015-09-13

基金项目: 国家自然科学基金(31270262)、科技基础性工作专项(2013FY112300)、北京市海淀区科委项目(K2012004S)

# 共同第一作者 Equally contributed to this paper

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xuejianhua@ibcas.ac.cn

sults, we recommended 15 pairs of primers including 13 pairs of nSSR and 2 pairs of cpSSR as the core barcode for lotus cultivar identification.

**Key words:** DNA fingerprint; microsatellites; *Nelumbo*; cultivar identification; molecular ID

莲科发现最早的化石是在早白垩纪劳亚古陆的中纬度地区,第三纪广布于欧亚大陆和北美洲,共5个化石属约30个种(Li et al, 2014)。现仅存莲属(*Nelumbo*) 2个种,即分布于亚洲和澳大利亚北部的莲(*Nelumbo nucifera*)和北美洲的美洲黄莲(*N. lutea*)。因此,莲属被认为是孑遗植物(吴征镒等, 2003)。中国是莲的分布和栽培中心,拥有世界上最丰富的种质资源,已有2,000多年的栽培历史,目前有800多个栽培品种(王其超和张行言, 2005; 张行言等, 2011)。莲作为重要的资源植物,具有食用、药用、观赏和净化水体等价值,还蕴藏着丰富的宗教和文化内涵,倍受人们的喜爱。野生莲被《国家重点保护野生植物名录(第一批)》列为II级保护植物,品种莲也被列入《中华人民共和国农业植物新品种保护名录(第八批)》。

一直以来,人们对莲品种的分类主要根据形态特性,如株形大小、花瓣多少、花色和心皮的瓣化程度等。这种方法形象直观,操作简便,便于推广。然而,单纯依据形态鉴定有一定局限性,如:环境条件变化会使品种表型出现一定可塑性,导致鉴定标准的界限很难把握;鉴定时间受品种不同生活史阶段限制;不能推测品种间的遗传关系;等等。因此,难免出现同物异名或同名异物及谱系关系不清等问题。例如,起源于中国的‘千瓣莲’(王其超和张行言, 2005),引植到日本后被改称为‘妙莲’(Miura & Ikegami, 2012);在中国学者(王其超和张行言, 2005)和日本学者(Miura & Ikegami, 2012)编著的品种图志中,‘孙文莲’形态特征完全不同。这些问题影响了莲种质资源开发利用和保护的进程。

DNA指纹鉴定技术的应用,为实现植物品种的精准鉴定开辟了一条新途径。利用物种基因组中进化速率较快的多个微卫星(或称简单重复序列 simple sequence repeat, SSR)位点的组合,形成具有个体特异性的DNA多态性,其对个体识别能力足以与人类指纹相媲美,还可以转换成数字代码,类似人的身份证号码。因此,被称为DNA指纹或分子身份证。这个技术由英国遗传学家Jeffreys (1985a, b)

发明,最先用于获得人类的个体特异性遗传身份证,后来被广泛用于亲子鉴定、司法鉴定和考古研究等众多领域中。DNA指纹鉴定技术在植物品种真实性、一致性和稳定性鉴定方面得到较好的推广应用。它揭示遗传物质本身的变异,不受外界环境和人为因素等影响,还可实现时时鉴定。国际植物新品种保护联盟(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)于2005年承认植物品种分子测试结果作为品种鉴定的辅助手段(赵久然和王风格, 2009)。2007–2014年,我国农业部已颁布了小麦(NY/T 2470-2013)、玉米(NY/T 1432-2014)、水稻(NY/T 1433-2014)、大豆(NY/T 2595-2014)、西瓜(NY/T 2472-2013)、百合(NY/T 2477-2013)和苹果(NY/T 2478-2013)等15种作物DNA的指纹鉴定技术行业标准。然而,重要资源植物莲品种的DNA指纹鉴定工作尚处于起步阶段。

本研究通过双亲遗传核微卫星(nSSR)和母系遗传的叶绿体微卫星(cpSSR)标记相结合,对圆明园保存的72个莲品种材料进行分子标记,筛选扩增效果好、多态性高的引物作为莲品种鉴定的条码,构建DNA指纹图谱数据库。将DNA指纹与形态特征相结合作为莲品种的鉴定标准,有助于解决目前品种分类方面存在的问题,揭示品种间的遗传关系,对规范分类管理、新品种培育和品种权的保护都有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

2013年我们从中国荷花研究中心(武汉)引植120个莲品种(每个品种3只种藕)于圆明园的资源圃中。以《中国荷花品种图志》(王其超和张行言, 2005)和《中国荷花新品种图志I》(张行言等, 2011)中描述的品种特性为标准,进行连续2年的形态鉴定,拍摄图片,去除死亡、未能开花、表型错误和同一品种3份样本间基因型不一致的样品后,剩余72个品种作为本研究的实验材料(附录1, 图1)。为了区分种间杂交起源的品种,我们选取了来自俄罗斯里海

和远东、印度尼西亚、斯里兰卡、越南、柬埔寨、中国黑龙江流域、吉林珲春图们江流域、河北白洋淀、山东微山湖、湖北洪湖和长湖、云南石屏县异龙湖等地的1,409份野生莲群体样本和来自美国北卡罗莱那州和德克萨斯州的58份美洲黄莲,共1,467份样品的基因型作为遗传背景参照。所有样品均采集新鲜叶片,迅速干燥备用。

## 1.2 微卫星引物的筛选

从中国黑龙江省、俄罗斯里海和斯里兰卡3个不同地理分布区野生莲群体材料中随机各选4份(共12份),从美国德克萨斯州美洲黄莲群体材料中随机选取4份,共16份样品作为筛选引物的DNA样本。从Yang等(2012)基于古莲全基因组中开发的500对核微卫星(nSSR)引物中选择了76对,标记了16个样品,最终选择扩增效果好、有种间和种内多态性、引物间不锁群的16对引物,还从我们(Tian et al, 2008)自主开发的17对引物中优选2对,从Kubo等(2009)开发的11对引物中优选2对,共20对nSSR引物用于正式实验。从莲科叶绿体全基因组中开发的17对多态性cpSSR引物(Xue et al, 2012)中优选6对进行正式实验。

## 1.3 SSR分子标记

用天根生物技术公司生产的植物基因组DNA提取试剂盒(DP305)提取干燥叶片中的总DNA。用美国Quawell超微量分光光度计Q6000检测DNA纯度(光密度OD<sub>260/280</sub>值约为1.8)。PCR反应模板DNA浓度10 ng左右。PCR反应试剂用天根生物技术公司生产的2×Taq PCR MasterMix (KT201)。委托上海生工生物工程有限公司合成在5'端进行4种荧光修饰(FAM, HEX, ROX 和 TAMRA)引物。用Eppendorf PCR仪进行PCR扩增。PCR扩增程序:94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min; 25个循环, 72℃ 10 min。将同一份DNA样本的4种不同荧光PCR产物合并后用ABI 3730XL遗传分析仪进行毛细管电泳检测。用GeneMapper version 4.0软件(Applied Biosystems)进行等位基因判读。

## 1.4 数据分析和DNA指纹数据库的构建

用PowerMarker V3.25软件(Liu & Muse, 2005)统计每对引物扩增1,409份野生莲和58份美洲黄莲两组样品的等位基因数,计算每对引物标记72个品种的等位基因数、基因型数和多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)。参考

Botstein等(1980)对PIC值的判定标准,  $PIC > 0.5$ 为高多态性,  $0.25 < PIC < 0.5$ 为中多态性,  $PIC < 0.25$ 为低多态性。根据上述统计结果,参照玉米(赵久然和王凤格, 2009)等DNA指纹条码的选择标准,确定作为莲品种DNA指纹条码的引物。

用以下方法构建72个莲品种的DNA指纹图谱,将每个品种通过不同引物标记获得等位基因片段的大小,按从小到大的顺序依次用阿拉伯数字编码。如果等位基因数超过1位数9以上,则用个位数带下划线表示,如第10个等位基因用“Q”,第11个等位基因用“1”表示,这样保证所有样品DNA条码的位数相同。

## 2 结果

### 2.1 SSR分子标记多态性

20对nSSR引物扩增结果显示,有4对引物(NS050、SSR047、SSR072和SSR053)在栽培品种出现3–4条峰现象,SSR013扩增缺失数据较多,故舍弃这5对引物,最终确定15对nSSR引物作为DNA鉴定的条码(表1,附录2)。15对nSSR标记检测结果显示,1,409份野生莲群体样本共有118个等位基因,58份美洲黄莲共有45个,其中种间共享等位基因10个(包括NS034、SSR016、SSR040和SSR074共4对引物)。15对nSSR标记72个品种共检测到94个等位基因(平均6.27个),其中11个属于美洲黄莲位点,65个属于野生莲位点,10个种间共享,8个特有等位基因。共有19个品种检测到含有美洲黄莲遗传组分(附录2),其中‘希望’仅检测到2对为最少;‘蝶恋花’和‘冰心’各有11对引物为最多。15对nSSR引物扩增72个品种的PIC值介于0.3899–0.8023之间(平均值0.5748)。其中有11对引物的PIC值大于0.5(表1)。本研究所有15对引物均为中多态性至高多态性。

6对cpSSR引物标记全部样本结果显示,其中Lotus17和Lotus12具有相对高的种间和种内多态性,可明显区分品种的母系来源(表1)。6对cpSSR引物标记72个莲品种结果, Lotus17有3种单倍型(2种为美洲黄莲特有, 1种为莲特有); Lotus12有10种单倍型(2种为美洲黄莲特有, 8种为莲特有)。这2对cpSSR引物同时检测到8个品种母系起源于美洲黄莲谱系, 64个品种母系起源于莲谱系。因此,我们优选这2对cpSSR引物作为检测母系遗传的DNA条码。





2.2 不同引物组合的鉴别效率

17对微卫星标记结果显示, 有36个品种(占47.22%)具有至少1个特有基因型, 仅用1对引物即可区分。1个品种(‘绿如意’)具有4个特有基因型, 5个品种(‘建选17号’、‘古代莲’、‘沂蒙颂’、‘黄舞妃’和‘伯里夫人’)具有3个特有基因型。单个引物SSR040的鉴别效率最高, 可区分12个品种(占16.7%)(图1: 1–12), 2对引物组合(SSR040 + SSR030)

表1 17对SSR核心引物扩增的72个莲品种的等位基因数、基因型数及多态信息含量(PIC)  
Table 1 Number of alleles, number of genotype, and polymorphic information content (PIC) of 17 core SSR primers

引物 Primer	72个品种莲 72 lotus cultivars					1,409份野生莲 等位基因数 Alleles number in 1,409 samples of <i>N. nucifera</i>	58份美洲黄莲 等位基因数 Alleles number in 58 samples of <i>N. lutea</i>	种间共享等 位基因数 Shared alleles between species
	等位基因数 Alleles number	基因型数 Genotype number	特有等位 基因数 Specific allele number	PIC	有 <i>N. lutea</i> 成分的品种数 Number in cultivars of <i>Nelumbo lutea</i>			
SSR030 <sup>[1]**</sup>	10	26	0	0.8023	0			
SSR040 <sup>[1]</sup>	12	24	2	0.7426	0	10	5	2
SSR064 <sup>[1]</sup>	8	18	0	0.7199	4	15	1	0
SSR016 <sup>[1]</sup>	9	18	1	0.6576	6	16	6	3
SSR088 <sup>[1]</sup>	5	10	0	0.6284	0	4	2	0
Nelumbo14 <sup>[2]</sup>	6	12	0	0.6051	11	5	5	0
NS034 <sup>[3]</sup>	8	14	1	0.6022	0	9	5	4
SSR067 <sup>[1]</sup>	5	9	0	0.5846	0	6	2	0
SSR285 <sup>[1]</sup>	7	12	3	0.5795	0	6	4	0
SSR074 <sup>[1]</sup>	7	9	0	0.5379	0	10	3	1
Nelumbo13 <sup>[2]</sup>	4	6	1	0.5010	19	5	2	0
SSR472 <sup>[1]</sup>	3	5	0	0.4575	12	3	1	0
SSR049 <sup>[1]</sup>	3	4	0	0.4134	0	7	1	0
SSR482 <sup>[1]</sup>	3	5	0	0.4003	0	4	5	0
SSR045 <sup>[1]</sup>	4	7	0	0.3899	0	3	1	0
Lotus12 <sup>[4]</sup>	10	10	0	—	8	16	3	0
Lotus17 <sup>[4]</sup>	3	3	0	—	8	1	2	0

[1]–[4]代表引物的文献来源。[1]–[4] are references of the primers. [1] Yang et al (2012); [2] Tian et al (2008); [3] Kubo et al (2009); [4] Xue et al (2012).

←

图1 本研究中72个莲品种花的形态图

Fig. 1 The floral morphologies of 72 lotus cultivars used in this study

1. 建选17号‘Jian Xuan Shiqihao’; 2. 沂蒙颂‘Yimeng Song’; 3. 绿如意‘Lvruyi’; 4. 蟹爪红‘Xiezhuo Hong’; 5. 卓越‘Zhuoyue’; 6. 红唇‘Hong Chun’; 7. 千瓣莲‘Qianban Lian’; 8. 红樱桃‘Hongyingtao’; 9. 白芍药莲‘Bai Shaoyao Lian’; 10. 案头春‘Antou Chun’; 11. 一丈青‘Yizhangqing’; 12. 白湘莲‘Baixianglian’; 13. 黄舞妃‘Huang Wu Fei’; 14. 冰心‘Bing Xin’; 15. 珠峰翠影‘Zhufeng Cuiying’; 16. 新红‘Xin Hong’; 17. 大洒锦‘Dasajin’; 18. 中日友谊莲‘Zhong-ri Youyi Lian’; 19. 心洁‘Xin Jie’; 20. 晨光‘Chenguang’; 21. 星空牡丹‘Xingkong Mudan’; 22. 梔子碗莲‘Zhizi Wanlian’; 23. 粉千叶‘Fen Qianye’; 24. 日出‘Richu’; 25. 素质冰姿‘Suzhi Bing Zi’; 26. 红牡丹‘Hong Mudan’; 27. 古代莲‘Gudai Lian’; 28. 白雪公主‘Baixue Gongzhu’; 29. 紫重阳‘Zi Chongyang’; 30. 伯里夫人‘Boli Furen’; 31. 玫园秀色‘Meiyuan Xiu Se’; 32. 丹鹤‘Dan He’; 33. 金凤展翅‘Jinfeng Zhanchi’; 34. 英华‘Yinghua’; 35. 杏花春雨‘Xinghua Chunyu’; 36. 喜笑颜开‘Xixiaoyankai’; 37. 普者黑白荷‘Puzhehei Baihe’; 38. 粉楼春‘Fenlou Chun’; 39. 建乡壮士‘Jianxiang Zhuangshi’; 40. 希望‘Xiwang’; 41. 红领巾‘Honglingjin’; 42. 丹凤朝阳‘Dangfeng Chaoyang’; 43. 小洒锦‘Xiaosajin’; 44. 普者黑红荷‘Puzhehei Honghe’; 45. 蝶恋花‘Die Lian Hua’; 46. 小精灵‘Xiao Jingling’; 47. 红边玉蝶‘Hongbian Yudie’; 48. 佛见笑‘Fojianxiao’; 49. 莺莺‘Yingying’; 50. 奔月‘Benyue’; 51. 粉娃娃‘Fenwalian’; 52. 睡美人‘Shui Meiren’; 53. 东湖夕照‘Donghu Xi Zhao’; 54. 粉青莲‘Fen Qing Lian’; 55. 红湘莲‘Hongxianglian’; 56. 姬妃莲‘Jifei Lian’; 57. 点额妆‘Dian E Zhuang’; 58. 曙光‘Shuguang’; 59. 露半唇‘Lu Ban Chun’; 60. 桃红宿雨‘Tao Hong Su Yu’; 61. 春桃‘Chun Tao’; 62. 彩蝶‘Cai Die’; 63. 小佛手‘Xiao Foshou’; 64. 飞虹‘Fei Hong’; 65. 红楼‘Hong Lou’; 66. 粉霞‘Fen Xia’; 67. 丹绣球‘Dan Xiuqiu’; 68. 钗头凤‘Chai Tou Feng’; 69. 红盏托珠‘Hong Zhan Tuo Zhu’; 70. 平山芙蓉‘Pingshan Furong’; 71. 中山红台‘Zhongshan Hongtai’; 72. 至尊千瓣‘Zhizun Qianban’

可区分38个品种(占52.78%)(图1: 1–38), 3对引物组合 (SSR040+SSR030+SSR016) 可区分 57 个品种 (79.17%)(图 1: 1–57)。最佳引物组合 (Lotus12+SSR040+SSR030+SSR016+SSR285+NS034+Nelumbo14+SSR074) 共 8 对可完全区分 68 个品种 (占 94.44%)(图1: 1–68)。其余4个品种用全部17对引物也只能区分到组水平: 第一组是‘红盞托珠’和‘平山芙蓉’(图1: 69–70), 第二组是‘中山红台’和‘至尊千瓣’图1: 71–72)。即每个组内2个品种用全部17对引物标记时仍具有相同的基因型。

2.3 莲品种DNA指纹图谱的构建

15对nSSR二倍体共有30位数字, 2对cpSSR单倍型共有2位数字, 全部17对引物扩增DNA条码由32位数字组成。将每个品种通过17对引物标记所获得的基因型片段大小直接进行编码(表2), 构建72个品种莲的DNA指纹图谱(附录1)。结果表明, 68个品种具有特异性DNA指纹。‘中山红台’和‘至尊千瓣’具有相同的DNA指纹, ‘红盞托珠’和‘平山芙蓉’具有相同的DNA指纹。

3 讨论

3.1 莲品种遗传背景参照的选择

由于栽培莲的历史悠久, 分布范围广泛, 不同

地区甚至国家之间的交流频繁, 品种来源及其关系非常复杂。我国的莲品种资源可归纳为两大类谱系起源: (1)种间杂交谱系。莲属2个种在更新世(约1.5 Ma)分化(Xue et al, 2012), 仅存在地理隔离, 无生殖隔离, 杂交可育。如‘友谊牡丹莲’和‘黄舞妃’等都是种间杂交育成。还有些品种是从天然杂交种子中选育, 不清楚是否是种间杂交而来。本研究检测的19个种间杂交品种中(附录2), 仅有6个已知为种间杂交起源, 其余13个均为本研究检测查明。(2)莲谱系。属于莲种内谱系的品种, 仅有少数亲本来源明确, 绝大多数未知。例如, ‘千瓣莲’、‘宜良千瓣’和‘中山红台’等一些雄蕊完全瓣化、不能结实的千瓣型和重台型品种, 属于我国民间流传下来的早期传统品种, 具体来源很难考证。本研究选择58份美洲黄莲和来自不同地理分布点的1,409份野生莲群体材料作为遗传背景参照, 有利于分析判断种间和种内不同地域的遗传组分, 为后续揭示品种起源研究等奠定基础。此外, 本研究将2对叶绿体微卫星引物作为DNA指纹的条码, 可有效鉴定母系来源。

3.2 核心引物的使用数量

确定核心引物的基本原则主要包括: 扩增成功率高、条带清晰、变异位点容易区分、多态性高、染色体定位清楚、引物之间尽量不连锁等(赵久然和

表2 17对SSR核心引物等位基因编码标准  
Table 2 Alleles encoded standard of 17 core SSR primers

引物 Primer	编码 Code											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0 <sup>a</sup>	1	2
Lotus12	374 <sup>*</sup>	375	379 <sup>*</sup>	380	385	390	395	400	410	415		
SSR040	205 <sup>+</sup>	211	213 <sup>*</sup>	215	217	223	225	229	231	233	235	237 <sup>+</sup>
SSR030	130 <sup>*</sup>	142	145	148	151	154	160	163	166	169		
SSR016	190 <sup>*</sup>	215	218	221	224	233	236	242	254 <sup>+</sup>			
SSR285	262	272	274	276	292 <sup>+</sup>	300 <sup>+</sup>	316 <sup>+</sup>					
NS034	98	102	104	112	114	116	118	124 <sup>+</sup>				
Nelumbo14	147	149	151	153	171 <sup>*</sup>	173 <sup>*</sup>						
SSR074	154	160	163	169	172	178	181					
SSR049	233	245	248									
SSR064	178 <sup>*</sup>	187	190	193	199	202	205	208				
SSR067	238	244	247	253	262 <sup>*</sup>							
SSR088	285	297	301	305 <sup>*</sup>	309 <sup>*</sup>							
SSR482	172	200	203									
Lotus17	231 <sup>*</sup>	242	246 <sup>*</sup>									
Nelumbo13	142 <sup>*</sup>	146	156 <sup>+</sup>	160								
SSR045	187 <sup>*</sup>	211	214	217								
SSR472	196 <sup>*</sup>	223	229									

\*只来自美洲黄莲; <sup>+</sup>只来自品种莲。<sup>a</sup>表示等位基因数加上10, 如1表示第11号等位基因。  
\*Alleles from *Nelumbo lutea*; <sup>+</sup> Alleles from lotus cultivars. <sup>a</sup>indicates that the number should plus 10, e.g. 1 represents 11 (1+10=11).



王风格, 2009; 赵久然等, 2015)。由于不同品种类群的遗传背景不同, 核心引物数量各异。例如, 18对核心引物可区分105个甜瓜品种(系)(宋海斌等, 2012); 47对核心引物区分184个甘蓝型油菜品种(赖运平等, 2014); 而40对引物才能将51个新陆早棉花品种完全区分开, 说明这些棉花品种的遗传多样性狭窄(聂新辉等, 2014)。

综合分析表明, 本研究中除多态性较低的引物SSR045和SSR472外, 其余15对(13对nSSR和2对cpSSR)均可作为核心引物。尽管最少8对引物就可以完全分开68个品种, 但随着品种数量的增加, 分辨率也会随之下降。因此, 核心引物需要不断补充完善。例如, 鉴定体系最完善的玉米核心引物已由20对基本核心引物(NY/T 1432-2007)增加到40对(NY/T 1432-2014)。另外, 本研究中13对nSSR引物均不在连锁群中(Yang et al, 2012), 但这些引物的染色体定位目前尚不清楚, 但古莲全基因组测序已经完成了86.7%, 并已完成基因组框架图谱的构建(Ming et al, 2013), 染色体定位工作有待于后续完成。

### 3.3 莲品种真实性、稳定性和一致性的判定标准

绝大多数物种的品种都是以种子进行扩繁的, 由于有性生殖过程中发生DNA重组, 难免会影响种子的纯度, 使DNA指纹检测品种一致性和稳定性的判定标准难度增加。以玉米为例: (1)品种一致性的检测标准。一个品种一次至少随机检测20个样本, 用10对核心引物标记, 如果单个和所有引物位点平均值的一致性大于95%, 可认为品种的一致性高, 介于85-95%之间为中, 小于85%为差(赵久然和王风格, 2009)。(2)品种真实性的判定标准。首先用20对核心引物标记位点比较, 品种间差异位点数 $\geq 2$ , 判定为不同品种; 品种间差异位点数 = 1, 判定为相近品种; 品种间差异位点数 = 0, 判定为疑似品种。如果是疑似品种, 则需要进一步用20对扩展核心引物进行检测, 如果品种间的位点完全相同, 判定为相同品种或极近似品种(赵久然和王风格, 2009)。

莲品种的扩繁是通过无性繁殖(种藕)方式实现的, 不发生DNA重组, 由于发生突变的概率非常低, 理论上同一个莲品种克隆繁殖的所有不同个体应该具有完全相同的DNA指纹图谱。从克隆繁殖的意义上来看, 莲品种DNA指纹的一致性和稳定性优于

玉米、水稻和大豆等通过有性繁殖方式扩繁的类群, 莲品种DNA指纹具有较高的一致性和稳定性, 我们建议判定同一个品种的标准应该是所有位点都100%相同。判定品种的真实性, 如果两个品种用15对核心引物检测的所有基因型都相同, 认为是亲缘关系较近或疑似品种, 需要用更多位点检测。

本研究中, 有两组内部未能区分的4个品种, 组内2个品种的形态也非常相似: ‘红盏托珠’和‘平山芙蓉’都属于粉色重瓣型(图1: 69-70), ‘至尊千瓣’与‘中山红台’都属于粉红色重台型(图1: 71-72)。表明这2组品种内部遗传关系非常近, 或者为疑似同一个品种, 有待于进一步检测。这种现象在其他品种中也同样出现过。如赵胜杰等(2014)用23个SSR引物标记54个无籽西瓜品种时, 有3组内部2个品种之间无法区分; Madhou等(2013)用11对SSR引物标记88个来自西班牙、毛里求斯和法国的荔枝(*Litchi chinensis*)栽培品种, 仅得到42份不同的DNA指纹, 澄清了一些同物异名品种; 陈昌文等(2011)用16对SSR引物标记237份中国桃品种, 得到202份种质的DNA指纹, 还有35份不能区分, 原因之一可能是这些品种之间遗传关系非常近, 也有些是芽变品种(即SSR标记适合分辨杂交起源的品种, 很难区分芽变及诱变等方式起源的品种)。

### 3.4 莲品种DNA指纹鉴定的应用前景

中国有记载的品种莲达800多个, 在民间还有一些品种并没有被记录。长期以来, 我国对莲品种专利权方面的保护力度非常不够, 莲品种一旦从培育者手中流出, 基本处于无专利保护状态。单纯依据形态鉴定很难实现对品种的规范分类和品种专利权的有效保护。国际上应用DNA指纹技术维护品种专利权已有不少成功案例。例如, Archak等(2007)筛选了8个SSR标记位点检测印度香米(*Oryza sativa*)的纯度, 如果掺假达1%以上就可以被检测出来; Faria等(2008)用2个SSR标记位点能够检测来自葡萄牙4个葡萄(*Vitis vinifera*)品种的组成及其含量, 成为检测葡萄酒原料是否纯正的技术手段。因此, 我们建议采用形态特性与DNA指纹图谱相结合作为对品种的鉴定标准, 实现对莲品种的准确鉴定, 有效保护品种专利权, 具有良好的应用前景。

### 参考文献

- Archak S, Lakshminarayana Reddy V, Nagaraju J (2007) High-throughput multiplex microsatellite marker assay for

- detection and quantification of adulteration in Basmati rice (*Oryza sativa*). *Electrophoresis*, 28, 2396–2405.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314–331.
- Chen CW, Cao K, Wang LR, Zhu GR, Fang WC (2011) Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species. *Scientia Agricultura Sinica*, 44, 2081–2093. (in Chinese with English abstract) [陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超 (2011) 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建. *中国农业科学*, 44, 2081–2093.]
- Faria MA, Nunes E, Oliveira MBPP (2008) Relative quantification of *Vitis vinifera* L. varieties in musts by microsatellite DNA analysis. *European Food Research and Technology*, 227, 845–850.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985a) Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature*, 316, 76–79.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985b) Hypervariable ‘Minisatellite’ regions in human DNA. *Nature*, 314, 67–73.
- Kubo N, Hirai M, Kaneko A, Tanaka D, Kasumi K (2009) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*). *Aquatic Botany*, 90, 191–194.
- Lai YP, Wang LR, He QL, Zhang ZF, Zhang XM, Du YY, Yu Y (2014) Screening of SSR core primers and fingerprinting construction of *Brassica napus* L. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 27, 2290–2299. (in Chinese with English abstract) [赖运平, 王丽容, 何巧林, 张浙峰, 张新明, 堵苑苑, 余毅 (2014) 甘蓝型油菜核心SSR引物筛选及指纹图谱构建. *西南农业学报*, 27, 2290–2299.]
- Li Y, Svetlana P, Yao JX, Li CS (2014) A review on the taxonomic, evolutionary and phytogeographic studies of the lotus plant (*Nelumbonaceae*: *Nelumbo*). *Acta Geologica Sinica*, 88, 1252–1261.
- Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21, 2128–2129.
- Madhou M, Normand F, Bahorun T, Hormaza JJ (2013) Fingerprinting and analysis of genetic diversity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) accessions from different germplasm collections using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 387–396.
- Miura K, Ikegami S (2012) *Photographic Reference Book of World Lotus Flowers*. Bensei Publish Company, Tokyo. (in Japan)
- Ming R, VanBuren R, Liu YL, Yang M, Han YP, Li LT, Zhang Q, Kim MJ, Schatz MC, Campbell M, Li JP, Bowers JE, Tang HB, Lyons E, Ferguson AA, Narzisi G, Nelson DR, Blaby-Haas CE, Gschwend AR, Jiao YN, Der JP, Zeng FC, Han J, Min XJ, Hudson KA, Singh R, Grennan AK, Karpowicz SJ, Watling JR, Ito K, Robinson SA, Hudson ME, Yu QY, Mockler TC, Carroll A, Zheng Y, Sunkar R, Jia RZ, Chen NC, Arro J, Wai CM, Wafula E, Spence A, Han YN, Xu LM, Zhang JS, Peery R, Haus MJ, Xiong WW, Walsh JA, Wu J, Wang ML, Zhu YJ, Paull RE, Britt AB, Du CG, Downie SR, Schuler MA, Michael TP, Long SP, Ort DR, Schopf JW, Gang DR, Jiang N, Yandell M, dePamphilis CW, Merchant SS, Paterson AH, Buchanan BB, Li SH, Shen-Miller J (2013) Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Genome Biology*, 14, R41.
- Nie XH, You CY, Li XF, Qin JH, Huang C, Guo HL, Wang XQ, Zhao WX, Lin ZX (2014) Construction of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity for Xinluzao cotton varieties. *Acta Agronomica Sinica*, 40, 2104–2117. (in Chinese with English abstract) [聂新辉, 尤春源, 李晓方, 秦江鸿, 黄聪, 郭欢乐, 王夏青, 赵文霞, 林忠旭 (2014) 新陆早棉花DNA指纹图谱的构建及遗传多样性分析. *作物学报*, 40, 2104–2117.]
- Song HB, Cui XB, Ma HY, Zhu ZC, Luan FS (2012) Construction of DNA fingerprint database based on SSR marker for varieties (Lines) of *Cucumis melo* L. *Scientia Agricultura Sinica*, 45, 2676–2689. (in Chinese with English abstract) [宋海斌, 崔喜波, 马鸿艳, 朱子成, 栾非时 (2012) 基于SSR标记的甜瓜品种(系)DNA指纹图谱库的构建. *中国农业科学*, 45, 2676–2689.]
- Tian HL, Chen XQ, Wang JX, Xue JH, Wen J, Mitchell G, Zhou SL (2008) Development and characterization of microsatellite loci for lotus (*Nelumbo nucifera*). *Conservation Genetics*, 9, 1385–1388.
- Wang QC, Zhang XY (2005) *Lotus Flower Cultivars in China*. China Forestry Publishing House, Beijing. (in Chinese) [王其超, 张行言 (2005) 中国荷花品种图志. 中国林业出版社, 北京.]
- Wu ZY, Lu AM, Tang YC, Chen ZD, Li DZ (2003) *The Families and Genera of Angiosperms in China*. Science Press, Beijing. (in Chinese) [吴征镒, 路安民, 汤彦承, 陈之端, 李德铎 (2003) 中国被子植物科属综论. 科学出版社, 北京.]
- Xue JH, Dong WP, Zhou SL (2012) *Nelumbonaceae*: Systematic position and species diversification revealed by the complete chloroplast genome. *Journal of Systematics and Evolution*, 50, 477–487.
- Xue JH, Wang S, Zhou SL (2012) Polymorphic chloroplast microsatellite loci in *Nelumbo* (*Nelumbonaceae*). *American Journal of Botany*, 99, E240–E244.
- Yang M, Han YN, VanBuren R, Ming R, Xu LM, Han YP, Liu YL (2012) Genetic linkage maps for Asian and American lotus constructed using novel SSR markers derived from the genome of sequenced cultivar. *BMC Genomics*, 13, 653.
- Zhang XY, Chen LQ, Wang QC (2011) *New Lotus Flower Cultivars in China I*. China Forestry Publishing House, Beijing. (in Chinese) [张行言, 陈龙清, 王其超 (2011) 中国荷花新品种图志I. 中国林业出版社, 北京.]
- Zhao JR, Wang FG (2009) *Research and Application of Maize Cultivars’ DNA Fingerprint Identification Technology*. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. (in Chinese) [赵久然, 王凤格 (2009) 玉米品种DNA指纹



鉴定技术研究与应用. 中国农业科学技术出版社, 北京.]  
Zhao JR, Wang FG, Yi HM, Tian HL, Yang Y (2015) Progress of construction of Chinese maize varieties standard DNA fingerprint database. *Crops*, 165, 1–6. (in Chinese with English abstract). [赵久然, 王风格, 易红梅, 田红丽, 杨扬 (2015) 我国玉米品种标准DNA指纹库构建研究及应用进展. 作物杂志, (165), 1–6.]  
Zhao SJ, Zhu HJ, Lu XQ, He N, Liu WG (2014) Studies on

DNA fingerprinting and genetic diversity of seedless watermelon (*Citrullus lanatus*) varieties using core simple sequence repeat (SSR) markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 22, 188–194. (in Chinese with English abstract) [赵胜杰, 朱红菊, 路绪强, 何楠, 刘文革 (2014) 利用核心简单重复序列(SSR)标记分析无籽西瓜品种的DNA指纹及遗传多样性. 农业生物技术学报, 22, 188–194.]

(责任编辑: 王艇 责任编辑: 时意专)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 72个莲品种的DNA指纹编码

Appendix 1 DNA fingerprint codes of 72 lotus cultivars

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2015157-1.pdf>

### 附录2 ‘千瓣莲’ SSR030(a)和NS034(b)引物毛细管电泳检测峰图

Appendix 2 Capillary electrophoresis profiles of ‘Qianbanlian’ at fluorescent marker locus SSR030 (a) and NS034 (b)

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2015157-2.pdf>

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. 生物多样性, 2016, **24** (1), 3–11.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2015157>

附录1 72个莲品种的DNA指纹编码  
Appendix 1 DNA fingerprint codes of 72 lotus cultivars

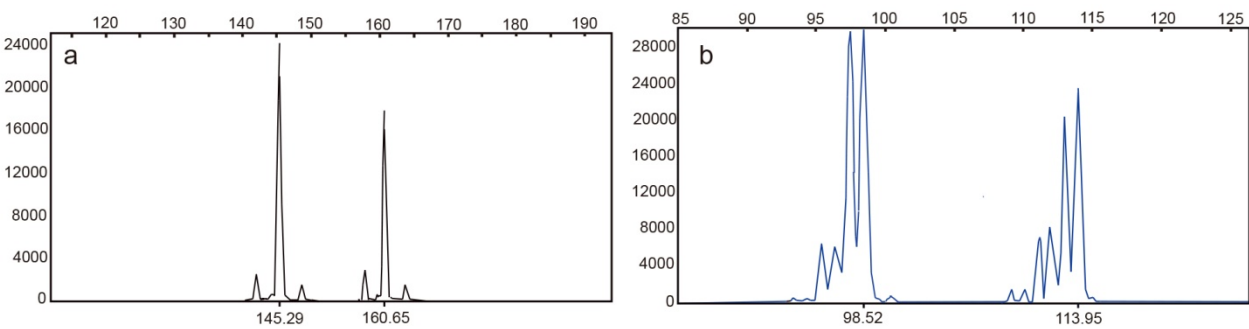
编号 Number	种质名称 Germplasm name		DNA指纹编码 <sup>a</sup> DNA fingerprint code
1	建选17号	Jian Xuan Shiqihao	62522881118444411223422112222233
2	沂蒙颂	Yimeng Song	51933343315234612272313332242323
3	绿如意*	Lvrui	46936141756461411223512112121233
4	蟹爪红**	Xiezhua Hong	330 <sup>b</sup> 13461115234612483522113122233
5	卓越*	Zhuoyue	42637583711261622263323222142222
6	红唇*	Hong Chun	42038881316331611443312122121223
7	千瓣莲	Qianban Lian	74137331415334633242423132342223
8	红樱桃	Hongyingtao	4113534331522462266333322442323
9	白芍药莲	Bai Shaoyao Lian	56667443355336622664413222442233
10	案头春	Antou Chun	53848341355234612443311122242323
11	一丈青	Yizhangqing	57939473315244622222412222442222
12	白湘莲	Baixianglian	97733481317336622564411122242233
13	黄舞妃**	Huang Wu Fei	35514181527451311221314113121213
14	冰心**	Bing Xin	38817181512351411113524113121212
15	珠峰翠影**	Zhufeng Cuiying	32278481315251411223323123122212
16	新红*	Xin Hong	52214441525251411123514112121213
17	大洒锦	Dasajin	42944371315224622252212122242223
18	中日友谊莲	Zhong-ri Youyi Lian	52880461311236622482322122242322
19	心洁*	Xin Jie	42947441155461411223312112122212
20	晨光**	Chenguang	10014331635221622552514111141212
21	星空牡丹	Xingkong Mudan	52227891117244411222312112242233
22	栀子碗莲	Zhizi Wanlian	52837481115334411443312112222223
23	粉千叶	Fen Qianye	52877441255334612463312122222222
24	日出	Richu	52860443315344612243312222222322
25	素质冰姿	Suzhi Bing Zi	52236441355344612263411122242223
26	红牡丹	Hong Mudan	52840341315226622243312122222322
27	古代莲	Gudai Lian	98855444411226622662422222444422
28	白雪公主	Baixue Gongzhu	50278441155236611452322112242222
29	紫重阳	Zi Chongyang	52933441115236622243333112222323
30	伯里夫人*	Boli Furen	59917133316261633142525222141412
31	玫园秀色	Meiyuan Xiu Se	52940341315224612243312122222323
32	丹鹤	Dan He	08878223311236622882422222442222
33	金凤展翅*	Jinfeng Zhanchi	65513181527441411223514112121213
34	英华*	Yinghua	59937342715351622223422222242312
35	杏花春雨	Xinghua Chunyu	50088441215334612462323122222322
36	喜笑颜开	Xixiaoyankai	42977481311334411462322122242222
37	普者黑白荷	Puzhehei Baihe	49949371315224622552212122242223
38	粉楼春	Fenlou Chun	40288341315234612562222122242322
39	建乡壮士	Jianxiang Zhuangshi	62233481357444612223413122242233
40	希望**	Xiwang	32867381315354612443313123122223
41	红领巾**	Honglingjin	32213361315244612283512123122213
42	丹凤朝阳**	Dangfeng Chaoyang	32218463315236622883334223122222
43	小洒锦	Xiaosajin	42949371315224622252212122242223
44	普者黑红荷	Puzhehei Honghe	42949471315224622252212122242223
45	蝶恋花*	Die Lian Hua	52213131525251411113514112121213
46	小精灵*	Xiao Jingling	52218441512341411243522112121322
47	红边玉蝶	Hongbian Yudie	52234481157342411263413112222233

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. 生物多样性, 2016, **24** (1), 3–11.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2015157>

编号 Number	种质名称 Germplasm name		DNA指纹编码 <sup>a</sup> DNA fingerprint code
48	佛见笑	Fojianxiao	29178343311336622262423222343322
49	莺莺*	Yingying	52234881512331411243511112122212
50	奔月	Benyue	52978341315336622262223122242322
51	粉娃莲	Fenwalian	52978441215334612462323122242322
52	睡美人	Shui Meiren	59988341155344611243313112222322
53	东湖夕照	Donghu Xi Zhao	59178441111334611333323112222222
54	粉青莲	Fen Qing Lian	82424891178344411223412112222233
55	红湘莲	Hongxianglian	82424881178344411223412112222233
56	姬妃莲	Jifei Lian	82867281317222622242412122242223
57	点额妆	Dian E Zhuang	92233441311336622554411122442233
58	曙光	Shuguang	52138341355344411262312122242222
59	露半唇	Lu Ban Chun	52138343355344612262312222442223
60	桃红宿雨	Tao Hong Su Yu	59988441111336611443333112223322
61	春桃	Chun Tao	5998844221533661144333322222322
62	彩蝶	Cai Die	59988441255334611443333122222222
63	小佛手	Xiao Foshou	59988441211334611443333122223322
64	飞虹	Fei Hong	49938341155116622462333112222222
65	红楼	Hong Lou	49938341155236622462333112222222
66	粉霞	Fen Xia	59988441215335712462323122222322
67	丹绣球	Dan Xiuqiu	59988441115334611443333122222222
68	钗头凤	Chai Tou Feng	69988441215334612462323122222322
69	红盞托珠	Hong Zhan Tuo Zhu	59988441215334612462323122222322
70	平山芙蓉	Pingshan Furong	59988441215334612462323122222322
71	中山红台	Zhongshan Hongtai	4493366334433461222222222242233
72	至尊千瓣	Zhizun Qianban	4493366334433461222222222242233

\*父系来自美洲黄莲谱系; \*\*母系来自美洲黄莲谱系; <sup>b</sup>表示等位基因数加上10, 如1表示第11号等位基因编码。  
\*Male parent was from *Nelumbo lutea* ; \* \* Female parent was from *N. lutea*. <sup>a</sup> 引物编码顺序 Coding primers order: Lotus12, SSR040, SSR030, SSR016, SSR285, NS034, Nelumbo14, SSR074, SSR049, SSR064, SSR067, SSR088, SSR482, Lotus17, Nelumbo13, SSR045, SSR472. <sup>b</sup> The number should plus ten, e.g., 1 represents 11 (1+10=11) of alleles..

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. 生物多样性, 2016, **24** (1), 3–11.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2015157>



附录2 ‘千瓣莲’ SSR030 (a)和NS034 (b)荧光引物毛细管电泳检测峰图  
Appendix 2 Capillary electrophoresis profiles of ‘Qianbanlian’ at fluorescent marker locus SSR030 (a) and NS034 (b)