

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2021.30278

刘正位, 肖彬, 朱红莲, 匡晶, 季群, 彭静, 李峰, 孙亚林, 柯卫东. 中国野莲居群多样性及群体结构分析[J]. 植物科学学报, 2021, 39(3): 278~287

Liu ZW, Xiao B, Zhu HL, Kuang J, Ji Q, Peng J, Li F, Sun YL, Ke WD. Genetic diversity and population structure of wild lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) in China [J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(3): 278~287

中国野莲居群遗传多样性及群体结构分析

刘正位¹, 肖彬^{1,2}, 朱红莲¹, 匡晶¹, 季群¹,
彭静¹, 李峰¹, 孙亚林¹, 柯卫东^{1*}

(1. 武汉市农业科学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: 以我国长江中下游地区和北方地区 33 个居群的 195 份野莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 为材料, 基于 SLAF 简化基因组测序技术, 对不同区域野莲居群的遗传多样性进行研究。结果显示: 通过测序共得到 742 992 个 SLAF 标签, 挖掘高质量 SNP 位点 1 064 789 个; 供试材料基因型差异明显, 主要可分为长江流域和东北区域 2 个亚群。研究结果支持长江流域野莲和东北区域野莲应分属为亚热带及温带生态型莲。我国野莲居群总多样性较低 ($\pi = 1.04 \times 10^{-5}$), 居群间平均分化系数较高 ($F_{ST} = 0.42$)。长江中下游地区不同湖泊野莲 π 值变幅为 $0.5 \times 10^{-5} \sim 2.2 \times 10^{-5}$, 梁子湖野莲多样性最为丰富。梁子湖区域内各个小湖 π 值为 $3.13 \times 10^{-6} \sim 2.3 \times 10^{-5}$, 表明小湖内不同居群仍存有较大遗传差异。北部地区不同湖泊野莲 π 值变幅为 $3.05 \times 10^{-6} \sim 1.50 \times 10^{-5}$, 山东梁山古代莲多样性最为丰富。长江中下游地区野莲遗传多样性高于北部地区且两者间分化程度较高 ($F_{ST} = 0.34$), 表明野莲居群间和区域间均有较高的分化程度, 原因可能是野莲居群内主要为克隆繁殖, 而居群间基因交流少所致。

关键词: 莲; 野莲居群; 遗传多样性; SLAF 简化基因组测序

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)03-0278-10

Genetic diversity and population structure of wild lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) in China

Liu Zheng-Wei¹, Xiao Bin^{1,2}, Zhu Hong-Lian¹, Kuang Jing¹, Ji Qun¹, Peng Jing¹,
Li Feng¹, Sun Ya-Lin¹, Ke Wei-dong^{1*}

(1. Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430074, China; 2. College of Horticulture,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430074, China)

Abstract: Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) is a special aquatic plant in China. However, habitat destruction by both natural factors and human activity have impacted many wild populations. Furthermore, the genetic diversity of these wild populations remains poorly understood. In this study, the genetic diversity and structure of wild lotus in China were evaluated based on 33 populations using 1 064 789 single nucleotide polymorphism (SNP) loci obtained by specific -locus amplified fragment sequencing (SLAF). Cluster, principal coordinate, and STRUCTURE analyses revealed that the northeast China populations were genetically separated from those of the Yangtze River Basin. Thus, wild lotus from these two regions represented two ecotypes of *N. nucifera*. Low genetic diversity within each population

收稿日期: 2020-10-25, 修回日期: 2021-01-25。

基金项目: 国家重点研发计划专项(2016YFD0100204); 国家特色蔬菜产业技术体系项目(CARS-24-A-12)。

This work was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100204) and National Special Vegetable Industry Technology System of China (CARS-24-A-12).

作者简介: 刘正位(1981-), 男, 博士, 高级农艺师, 研究方向为水生蔬菜遗传育种(E-mail: 287348228@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wdke63@163.com)。

(average $\pi = 1.04 \times 10^{-5}$) and a high degree of genetic differentiation among populations (average $F_{ST} = 0.42$) were found. For the Yangtze River Basin populations, π ranged from 0.5×10^{-5} to 2.2×10^{-5} among the various lakes. The Liangzi Lake area exhibited the highest diversity, with π ranging from 3.13×10^{-6} to 2.3×10^{-5} among the small lakes, indicating that lotus diversity was not evenly distributed. For populations in North China, π ranged from 3.05×10^{-6} to 1.50×10^{-5} , with the Liangshan populations showing the highest diversity. Thus, higher genetic diversity was observed in the Yangtze River Basin populations than in the North China populations. The F_{ST} value from comparison was 0.34, indicating a high degree of genetic differentiation between the areas. Low genetic diversity within populations and high differentiation among populations could be attributed to clonal reproduction within populations and low genetic exchange among populations. Our results indicate that *ex situ* conservation should be supplemented with *in situ* preservation for wild lotus conservation.

Key words: *Nelumbo nucifera*; Wild lotus population; Genetic diversity; Specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF)

莲属(*Nelumbo*)是被子植物中起源最早的属之一,为冰川孑遗植物^[1],现存2个种,莲(*N. nucifera* Gaertn.)与美洲黄莲(*N. lutea* Pers.)。美洲黄莲主要分布于北美洲和南美洲等地,莲主要分布在亚洲。莲在中国及东南亚国家广泛栽培,主要分为藕莲、子莲和花莲。野莲为栽培莲的祖先,目前仍广泛分布于中国以及东南亚等国家,是重要的遗传材料和育种资源,也具有食用、药用、观赏及生态调节等多种用途^[2]。由于近年来对野莲生境河流、湖泊等过度开发利用和破坏,野莲数量急剧减少,亟待保护,研究其遗传多样性具有重要意义。

目前,研究莲遗传多样性采用的分子标记主要有随机扩增片段多态性标记(RAPD)^[3-6]、简单重复序列(SSR)^[6-15]、扩增片段长度多态性(AFLP)^[15, 16]、相关序列扩增多态性(SRAP)^[17, 18]及SNP标记^[19-22]等。研究方向主要有亚洲莲与美洲莲亲缘关系^[8, 11, 19-22]、栽培莲的分类与分化^[3, 10, 15-21]及亚洲莲生态型的划分^[20, 22-24]等。在野莲遗传多样性方面,郭宏波等^[4]研究了山东、湖北、广东等6个省12份野莲资源的遗传多样性。薛建华等^[2]研究发现中国东北区域野莲遗传分程度低,遗传多样性不高,且东北野莲多样性低于栽培莲。近期大规模莲基因组重测序的分析结果表明,东南亚与中国云南地区野莲遗传多样性最丰富,藕莲与子莲分别驯化于不同区域的野莲^[20]。在野莲居群遗传学方面,Han等^[25, 26]对

长江流域部分野莲居群的遗传多样性进行了研究,发现野莲居群在物种水平上多样性较高,而居群内遗传多样性较低。Li等^[14]比较了俄罗斯部分地区与中国黑龙江野莲居群分化与多样性。其它研究有澳大利亚、印度、泰国等地野莲居群比较分析^[13]、美洲黄莲居群多样性^[12, 27]等。迄今,中国不同区域野莲的遗传多样性与分化仍鲜有报道。

亚洲野莲分布北至俄罗斯南部,南至东南亚国家及澳大利亚,因温度、光照差异而形成了不同生态型。王其超等^[23]和张行言等^[28]根据是否冬季休眠,将分布于中国的莲划分为温带莲,东南亚热带地区为热带莲,且获得了一些分子证据的支持^[16, 22]。柯卫东等^[24]研究发现,东北区域野莲移至长江中下游地区,植株矮小无立叶,一年可结藕2~3次,建议将东北区域野莲划分为温带型,长江流域划分为亚热带型,东南亚划分为热带型,这一观点也得到了近期群体基因组学研究结果的支持^[20]。因此如何划分莲的生态型仍存在一定的争议。

本研究以我国长江中下游流域和北部地区中国野莲集中分布区的33个居群为材料,基于SLAF(specific-locus amplified fragment sequencing)简化基因组测序技术^[22]所开发的全基因组SNP标记,对中国不同地区野莲居群的遗传多样性进行分析,以期为野莲资源保存、保护及生态型划分提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以我国长江中下游地区以及北部地区33个代表性野莲居群195份样品为材料。其中长江中下游地区野莲居群22个，分别为湖南省洞庭湖、江

西省鄱阳湖、湖北省洪湖、汈汊湖和梁子湖等。北部地区野莲居群11个，其中黑龙江9个，辽宁和山东各1个。每个居群依群体大小设取样点2~10个，取样点间距50 m以上，每个点取成熟莲子数粒，记录取样地点、经纬度等。梁山古代莲为山东省梁山县当地农民挖掘的野莲子(表1)。

表 1 33个野莲居群采集地信息

Table 1 Geographic information on 33 wild *Nelumbo nucifera* populations

地区 Region	湖泊 Lake	居群 Population	编号 No.	测序编号 No.	来源 Source	经纬度 Latitude and longitude	样品数 No. of samples
北部 地区	-	桦川野莲	X1	aa,ab,ac,ad	黑龙江省佳木斯市桦川县	47°02'N, 130°52'E	4
	-	青莲寺野莲	X2	ae,af,ag,ah	黑龙江省哈尔滨市宾县	46°00'N, 127°52'E	5
	-	抚远野莲	X3	aj,ak,al,	黑龙江省佳木斯市抚远市	47°55'N, 134°54'E	5
	-	佳木斯野莲	X4	am	黑龙江省佳木斯市前进区	46°54'N, 130°32'E	5
	-	同江野莲	X6	aq,ar,as	黑龙江省佳木斯市同江市	47°54'N, 132°56'E	5
	-	三江口野莲	X7	at,au	黑龙江省同江市同江市	47°50'N, 132°53'E	3
	-	通河野莲	X9	ba,bb	黑龙江省哈尔滨市通河县	45°58'N, 128°50'E	4
	-	白鱼泡野莲	X10	bc,bd	黑龙江省哈尔滨市道外区	45°44'N, 125°11'E	4
	-	方正湖野莲	X11	be,bf,bg	黑龙江省哈尔滨市方正县	45°55'N, 128°55'E	4
	-	铁岭野莲	X8	av,aw,ax,ay	辽宁省铁岭市铁岭县	42°31'N, 123°58'E	5
	-	梁山古代莲	X29	el,em,en,eo,ep,er	山东省济宁市梁山县	35°56'N, 116°29'E	7
	鄱阳湖	南湖围野莲	X22	dd,de,df,dg,dh,di, dj,dk,dl	江西省上饶市南昌县	28°51'N, 116°47'E	9
长江中 下游 地区	洞庭湖	君山洞庭湖野莲	X24	dr,ds,dt,du,dv,dw, dx,dy,dz,ea	湖南省岳阳市君山区	29°45'N, 112°51'E	10
	洪湖	螺山野莲	X20	cr,cs,st	湖北省洪湖市螺山镇	29°51'N, 113°30'E	8
	洪湖	洪湖滨湖野莲	X36	fr,fs,ft,fu,	湖北省洪湖市滨湖街道	29°57'N, 113°35'E	8
	梁子湖	上涉湖野莲2	X38	gd,ge,gf,gg	湖北省武汉市江夏区	30°13'N, 114°26'E	10
	梁子湖	上涉湖野莲3	X41	gp,gq,gr,gs,gt	湖北省武汉市江夏区	30°13'N, 114°27'E	6
	梁子湖	上涉湖野莲4	X37	fx,fy,fz,ga,gb,gc	湖北省武汉市江夏区	30°13'N, 114°27'E	6
	梁子湖	鲁湖野莲2	X33	fl,fm,fn,fo,fp,fq	湖北省武汉市江夏区	30°21'N, 114°26'E	6
	梁子湖	鲁湖野莲3	X23	dm,dn,do,dp,dq	湖北省武汉市江夏区	30°19'N, 114°25'E	6
	梁子湖	鲁湖野莲4	X32	ff,fg,fh,fj,fk	湖北省武汉市江夏区	30°16'N, 114°25'E	6
	梁子湖	三山湖野莲	X14	bq,bp,br,bs,bt,bu	湖北省鄂州市鄂城区	30°30'N, 114°50'E	6
	梁子湖	保安湖扁担塘野莲	X21	cw,cx,cy,cz	湖北省黄石市大冶县	30°23'N, 114°53'E	8
	梁子湖	牛山湖野莲	X24	dr,ds,dt,du,dv,dw, dx,dy,dz,ea	湖北省武汉市江夏区	30°33'N, 114°53'E	6
	梁子湖	斧头湖野莲	X28	ee,ef,eg,eh,ei,ek	湖北省咸宁市嘉鱼县	30°11'N, 114°21'E	8
	梁子湖	西凉湖野莲	X31	ey,ez,fa,fb,fc,fd,fe	湖北省咸宁市	29°59'N, 114°09'E	8
	汈汊湖	汈汊湖野莲	X16	cb,cc,cd,ce,cf,cg	湖北省孝感市汉川市	30°59'N, 113°52'E	6
	汈汊湖	汈汊湖南闸野莲	X17	ch,ci,cj,ck	湖北省孝感市汉川市	30°58'N, 113°55'E	4
	-	小汊湖野莲	X12	bh,bi,bj	湖北省武汉市蔡甸区	30°58'N, 113°53'E	6
	-	黄家湖野莲	X18	cl,cm,cn,co,cp,cq	湖北省武汉市江夏区	30°46'N, 114°28'E	6
	-	青菱湖野莲	X13	bk,bl,bm,bn,bo,bp	湖北省武汉市洪山区	30°40'N, 114°24'E	6
	-	高湖野莲	X15	bv,bw,bx,by,bz,ca	湖北省武汉市蔡甸区	30°54'N, 114°01'E	6
	-	仓湖野莲	X39	gn,go	湖北省咸宁市赤壁市	29°58'N, 113°53'E	2

1.2 实验方法

1.2.1 SLAF-seq 建库、测序与 SNP 位点挖掘

每份样品播种莲子 1~2 粒, 萌发后取幼叶, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[29]。DNA 样品采用 SLAF 简化基因组测序技术进行测序和分析^[30]。首先对参考基因组^[31]进行电子酶切, 筛选双酶切方案。对样本 DNA 进行酶切和建库。采用 Illumina 平台 Hiseq2500 进行双端测序, 测序长度为 PE150。初过滤后, 利用 SLAF 技术进行 SLAF 标记的开发, 采用 Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA.1) 软件将数据比对到参考基因组上, 将比对到基因组同一位置且高度可靠的测序片段作为一个 SLAF 标签, 以 SLAF 标签为基础采用 GATK 和 Samtools2.6.1 两种方法发掘纯合 SNP 位点, 以交集作为高质量 SNP 位点, 进行进一步的群体遗传学分析。

1.2.2 莲居群遗传多样性和基因组结构分析

利用 vcftools_0.1.13 软件计算不同莲群体内的多样性指数 π 和群体间的遗传分化系数 F_{ST} , 基于 perl 脚本计算多态信息含量 (PIC)、等位基因预期杂合度 (H_e) 和等位基因观察杂合度 (H_o)、Nei's 多样性指数、Shannon 多样性指数 (I), 进行遗传多样性分析。采用 PHYLIP 软件的最小临近法构建系统进化树, 重复检验 1000 次, 利用 MEGA6 软件构建进化树; 利用 GCTA 软件进行主成分 (PCA) 分析, R 软件绘制 PCA 散点图。利用 Admixture 软件进行群体结构分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果与群体遗传结构分析

2.1.1 测序数据统计与 SNP 挖掘

本研究共获得 742 992 个 SLAF 标签, 平均测序深度达到 12.47 \times 。SLAF 标签在基因组上均匀分布, 绝大多数区域 SLAF 标签达 500 个/Mb, 多态性 SLAF 标签占 42.97%。以 SLAF 标签为基础, 共获得 1 064 789 个高度可靠的 SNP 标记 (表 2)。长江中下游地区野莲不同居群 SNP 数约为 667 824~3 756 586, 平均 6 511 594 个。北部地区 SNP 数为 1 065 979~2 075 500, 平均 4 578 593。野莲基因组杂合度约为 1.08%~11.04%, 平均 2.61%, 远小于其它野生植物的基因组杂合度。上涉湖 3 个野莲居群基因组杂合度分别为 5.17%、7.35% 和

11.64%, 远高于其它野莲居群。

2.1.2 群体遗传结构分析

本研究利用 1 064 789 个 SNP 标记, 对 33 个野莲居群 195 个样品进行系统树构建、主成分分析和群体遗传结构分析。系统树分析结果表明, 不同区域野莲被明显的分为 2 个分支 (图 1: A), 第 1 个分支主要为长江中下游地区野莲, 包括江西鄱阳湖、湖南洞庭湖野莲居群以及湖北洪湖、汈汊湖、梁子湖等地的野莲居群 23 个, 其中梁山古代莲与长江流域野莲聚在一起; 第 2 个分支为东北地区野莲, 包括辽宁铁岭野莲以及黑龙江省等地的野莲居群 10 个。同一湖泊不同居群基本在同一分支上, 且同一居群的样本基本聚在一起, 表明野莲群体具有明显的地域性。主成分分析结果与系统树类似 (图 1: B), 在第 1 主成分上长江中下游地区野莲和东北区域野莲被明显分开, 梁山古代莲位于长江中下游地区与东北地区野莲居群之间, 与其地理分布相一致。本研究在群体遗传结构分析中, 假定类群数 (K) 为 1~5, 结果发现 (图 1: C), 当 $K = 2$ 时, 东北地区与长江中下游地区野莲居群被分为 2 个不同祖先基因组成分, 山东梁山古代莲与长江中下游地区野莲居群基因组成分相同, 说明梁山古代莲与长江中下游地区野莲基因组结构更为相近。当 $K = 3$ 时, 梁山古代莲与长江中下游地区野莲分开, 可分为东北野莲、梁山古代莲和长江流域野莲 3 个祖先基因组成分, 梁山古代莲为长江中下游地区野莲与东北野莲的过渡类型。

结合上述分析结果, 本研究中野莲居群依据其地理来源可明显划分为两大亚群, 即长江中下游地区野莲亚群和东北地区野莲亚群, 表明不同区域野莲基因组具有明显差异。结合前人的研究^[24], 将东北区域野莲划分为温带型莲, 长江中下游地区野莲为亚热带莲。山东梁山古代莲在地理位置、性状、聚类上均介于东北和长江中下游地区之间, 推测其为温带莲和亚热带莲的过渡类型。

2.2 野莲居群遗传多样性与分化

2.2.1 长江流域不同湖泊野莲遗传多样性与分化

本研究对长江中下游流域各个主要湖泊的 147 份野莲样品进行了遗传多样性分析。结果显示, 野莲居群总核苷酸多样性 $\pi = 2.3 \times 10^{-5}$, 多态信息含量 PIC = 0.24, 观测杂合度 $H_o = 0.11$, 期望杂合度 $H_e = 0.29$, Shannon 多样性指数 $I = 0.46$, <http://www.plantscience.cn>

表2 SLAF 简化基因组测序与 SNP 信息统计
Table 2 SLAF sequencing and SNP information statistics

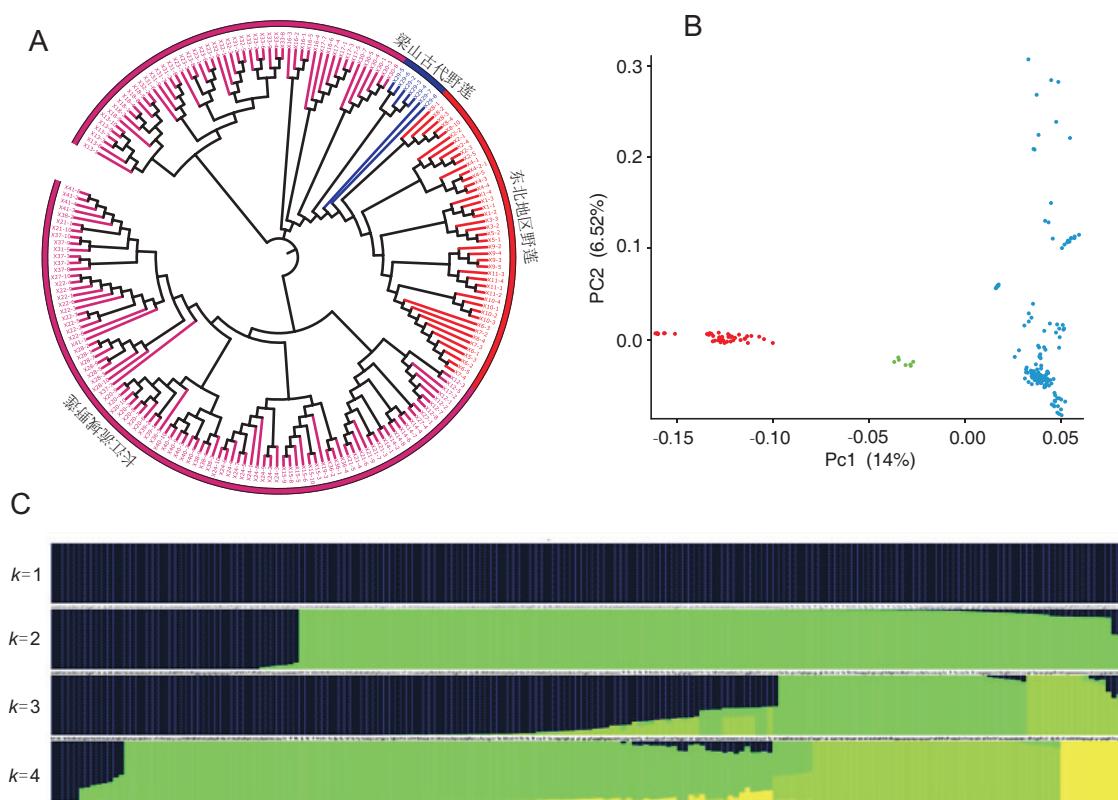
居群 Population	总片段数 Total reads	SLAF 数 SLAF number	测序深度(X) Sequence depth	SNP 数 SNP number	杂合度(%) Heter ratio
X1	9 657 604	672 644	11.62	1 494 352	1.09
X2	16 448 889	1 029 917	14.35	2 075 500	1.29
X3	5 978 638	958 227	15.53	1 885 211	1.25
X4	15 288 965	915 515	15.32	1 818 765	1.52
X6	10 254 788	959 248	13.63	1 518 992	1.13
X7	14 429 806	546 062	12.18	1 065 979	1.27
X9	15 158 805	764 546	13.84	1 507 490	2.10
X10	11 420 074	766 924	13.88	1 510 405	1.31
X11	11 626 458	777 880	11.57	1 532 641	2.14
X8	7 564 185	983 838	14.04	1 936 558	2.81
X29	22 916 957	1 434 401	14.37	2 808 082	3.48
X22	23 789 726	1 817 598	11.67	3 538 024	1.31
X24	23 860 084	1 913 100	11.30	3 756 586	2.43
X20	18 604 875	1 271 252	13.11	2 505 962	2.11
X36	11 321 819	906 781	11.21	1 790 639	1.98
X38	22 526 196	1 760 593	11.54	3 490 356	5.17
X41	13 775 102	878 698	14.32	1 821 681	11.64
X37	14 206 289	1 048 713	12.26	2 139 516	7.35
X33	15 918 143	1 175 078	12.28	2 294 042	1.79
X23	13 691 229	1 101 653	11.28	2 180 074	2.09
X32	13 139 044	932 602	13.09	1 844 652	1.76
X14	16 362 893	1 168 523	12.76	2 279 635	1.89
X21	22 214 039	1 575 291	12.48	3 118 487	5.53
X24	15 382 972	1 090 936	12.91	2 169 379	1.08
X28	16 362 514	1 238 245	11.91	2 449 971	1.82
X31	18 048 312	1 352 236	12.20	2 671 337	3.57
X16	17 380 072	1 262 742	12.38	2 420 424	2.28
X17	14 843 282	1 096 565	12.25	2 151 928	2.46
X12	17 424 319	1 147 007	13.79	2 245 083	1.82
X18	12 042 022	1 188 437	9.03	2 336 056	2.96
X13	13 888 515	1 207 961	10.28	2 368 729	2.30
X15	12 911 283	1 159 006	10.06	2 286 228	1.90
X39	5 738 536	340 039	15.34	667 824	1.62

注: 居群编号同表1。下同。

Note: Numbers corresponding to populations are shown in Table 1. Same below.

表明长江流域野莲居群遗传多样性较低。居群单核苷酸多样性依次排序为: 梁子湖>洪湖>汈汊湖>洞庭湖>鄱阳湖, 梁子湖野莲居群遗传多样性最高。而根据多态信息含量、期望杂合度、Shannon 指数等遗传多样性参数, 汴汊湖、洪湖、洞庭湖居群

的遗传多样性较高, 梁子湖和鄱阳湖居群遗传多样性则较低(表3)。各个大湖间平均群体分化系数 $F_{ST} = 0.41$, 达到显著分化水平, 鄱阳湖与洞庭湖野莲居群分化程度最高, $F_{ST} = 0.63$ 。梁子湖与洪湖分化程度最低, $F_{ST} = 0.09$ 。



A: 中国野莲居群的聚类树分析。B: PCA 主成分分析; 红点代表东北地区野莲居群, 蓝点代表长江流域野莲居群, 绿点梁山古代莲野莲居群。C: 遗传结构分析($K=1 \sim 4$); 每份样品用1个垂直线条表示, 每个垂直线条的颜色表示该样品祖先群的比例。

A: Cluster analysis of wild *Nelumbo* populations in China. B: Principal component analysis; blue, red, and green dots indicate wild *Nelumbo* populations from North China, Yangtze River Basin, and Shandong Province, respectively. C: Population genetic structure ($K = 1 \sim 4$); each sample is represented by a vertical line, and line color indicates ancestral population proportion.

图1 中国野莲居群遗传结构分析
Fig. 1 Population structure analysis of wild *Nelumbo nucifera*

表3 长江中下游地区主要湖泊野莲居群间的遗传多样性

Table 3 Parameters of genetic diversity among wild *Nelumbo nucifera* populations in Yangtze River Basin

湖泊 Lakes	<i>N</i>	H_o	H_e	PIC	π	<i>Nei's</i>	<i>I</i>
苍湖	4935	0.649	0.439	0.341	4.40×10^{-6}	0.585	0.629
洞庭湖	31 660	0.213	0.350	0.280	1.61×10^{-5}	0.367	0.525
鄱阳湖	23 748	0.302	0.359	0.286	1.22×10^{-5}	0.382	0.534
高湖	15 120	0.360	0.372	0.294	8.33×10^{-6}	0.413	0.550
洪湖	32 919	0.177	0.357	0.282	1.69×10^{-5}	0.369	0.526
黄家湖	22 690	0.355	0.398	0.312	1.34×10^{-5}	0.441	0.580
梁子湖	51 397	0.130	0.317	0.260	2.23×10^{-5}	0.320	0.488
青菱湖	21 416	0.320	0.364	0.290	1.14×10^{-5}	0.403	0.542
小汊湖	23 041	0.240	0.373	0.297	1.26×10^{-5}	0.413	0.553

注: *N*, 多态位点数; H_o , 观察杂合度; H_e , 预期杂合度; PIC, 多态信息含量; π , 核苷酸多样性; *Nei's*, *Nei's* 多样性指数; *I*, Shannon 多样性指数。下同。

Notes: *N*, Number of poly markers; H_o , Observed heterozygosity; H_e , Expected heterozygosity; PIC, Polymorphism information content; π , Nucleotide diversity; *Nei's*, *Nei's* diversity index; *I*, Shannon diversity index. Same below.

2.2.2 湖泊内小湖间及小湖内不同野莲居群的遗传多样性与分化

湖泊常由多个水域相连的相邻小湖组成,如梁子湖,位于长江中游南岸,为湖北第二大湖,流域面积达 3260 km^2 。牛山湖、保安湖、三山湖、斧头湖、西凉湖、鲁湖和上涉湖等均属于梁子湖区域。该区域野莲数量多、范围广。本研究以梁子湖区域7个小湖的11个野莲居群为代表,对野莲居群遗传多样性进行了分析(表4)。结果表明,各小湖野莲平均单核苷酸指数 π 值为 1.30×10^{-5} ,上涉湖最高,牛山湖最低。牛山湖、斧头湖观测杂合度与期望杂合度较为相近,其它小湖期望杂合度明显高于观测杂合度。小湖野莲群体平均分化系数 $F_{ST}=0.40$,表明各个小湖间野莲缺乏基因交流,分化程度较高。

进一步分析小湖内不同野莲居群多样性(数据

未展示),上涉湖3个居群 π 值为 $2.03 \times 10^{-5} \sim 2.49 \times 10^{-5}$,鲁湖为 $8.4 \times 10^{-6} \sim 1.13 \times 10^{-5}$,表明同一小湖内不同居群间野莲遗传多样性也存在差异,但差异较小。上涉湖、鲁湖内居群间平均分化系数 F_{ST} 分别为0.29和0.32,也小于小湖居群间的分化系数。

2.2.3 北方野莲居群的遗传多样性

虽然野莲在中国东北区域也分布较广,但仅在黑龙江、松花江等流域水泡子、沟渠内零星分布,水域间不相互流通,未发现大面积的野莲居群。黑龙江、辽宁、山东等地的10个野莲居群遗传多样性分析表明(表5),山东梁山古代莲($\pi=1.5 \times 10^{-5}$)>辽宁铁岭野莲($\pi=1.21 \times 10^{-5}$)>黑龙江省野莲($\pi=6.33 \times 10^{-6}$)。说明在我国北部,随着纬度的上升,野莲群体多样性逐渐降低。

表4 梁子湖区域小湖野莲居群间的遗传多样性

Table 4 Parameters of genetic diversity among wild *Nelumbo nucifera* populations in Liangzi Lake region

梁子湖区域小湖 Small lakes in Liangzi Lake region	<i>N</i>	H_o	H_e	PIC	π	Nei's	<i>I</i>
鲁湖	25 952	0.185	0.324	0.262	1.23×10^{-5}	0.336	0.494
牛山湖	7154	0.340	0.297	0.244	3.13×10^{-6}	0.330	0.462
保安湖	37 539	0.290	0.319	0.260	1.73×10^{-5}	0.345	0.490
三山湖	20 931	0.277	0.371	0.295	1.14×10^{-5}	0.410	0.550
斧头湖	18 133	0.263	0.280	0.230	7.92×10^{-6}	0.306	0.439
西凉湖	32 950	0.229	0.341	0.277	1.69×10^{-5}	0.371	0.515
上涉湖	43 149	0.188	0.368	0.294	2.32×10^{-5}	0.379	0.548
平均	25 335	0.243	0.341	0.274	1.30×10^{-5}	0.375	0.514

表5 我国北部地区主要湖泊野莲居群间遗传多样性参数

Table 5 Parameters of genetic diversity among wild *Nelumbo nucifera* populations in North China

居群 Population	<i>N</i>	H_o	H_e	PIC	π	Nei's	<i>I</i>
桦川野莲	5838	0.429	0.353	0.284	3.38×10^{-6}	0.415	0.531
青莲寺野莲	7843	0.402	0.317	0.258	3.90×10^{-6}	0.357	0.487
抚远野莲	16 391	0.191	0.353	0.286	9.18×10^{-6}	0.397	0.533
佳木斯野莲	10 254	0.412	0.383	0.303	6.28×10^{-6}	0.433	0.564
同江野莲	6310	0.418	0.332	0.269	3.36×10^{-6}	0.374	0.505
三江口野莲	4320	0.524	0.396	0.313	3.05×10^{-6}	0.491	0.581
通河野莲	10 608	0.481	0.392	0.310	6.79×10^{-6}	0.458	0.575
白鱼泡野莲	5563	0.459	0.362	0.290	3.36×10^{-6}	0.426	0.541
方正湖野莲	13 221	0.410	0.408	0.320	8.86×10^{-6}	0.480	0.594
铁岭野莲	20 842	0.366	0.367	0.293	1.21×10^{-5}	0.413	0.546
梁山古代莲	29 334	0.315	0.344	0.277	1.50×10^{-5}	0.375	0.518

2.2.4 长江流域和北部地区野莲居群遗传多样性比较分析

低纬度的长江中下游流域,其野莲居群核苷酸多态性($\pi = 2.3 \times 10^{-5}$)高于高纬度的北部地区($\pi = 1.6 \times 10^{-5}$)(表6)。长江流域居群间遗传分化($F_{ST} = 0.41$)低于北部地区($F_{ST} = 0.59$),山东省野莲与长江流域、东北地区野莲间均为中等程度遗传分化(F_{ST} 值分别为0.20、0.29),且与长江流域野莲分化更小,表明梁山古代莲为两者的过渡类型,且基因型更接近于长江流域野莲。长江流域与东北地区之间遗传分化系数 $F_{ST} = 0.34$,分化程度较高(表7)。

表6 不同区域野莲的遗传多样性参数

Table 6 Parameters of genetic diversity among wild *Nelumbo nucifera* populations in different areas of China

区域 Region	<i>N</i>	H_o	H_e	<i>PIC</i>	π	<i>Nei's I</i>	<i>I</i>
北部地区	31 914	0.114	0.348	0.280	1.6×10^{-5}	0.353	0.523
长江流域	59 829	0.116	0.287	0.288	2.3×10^{-5}	0.288	0.450

表7 不同区域野莲遗传分化参数(F_{ST})

Table 7 Parameters of genetic differentiation among wild *Nelumbo nucifera* populations

区域 Region	遗传分化参数 F_{ST}
长江流域居群间	0.41
北部地区居群间	0.59
东北 vs 长江流域	0.34
梁山古代莲 vs 东北地区	0.29
梁山古代莲 vs 长江流域	0.20

3 讨论

3.1 野莲居群的遗传多样性与分化

本研究发现,野莲居群内遗传多样性较低,这与前人采用SSR标记分别对黑龙江、长江中下游地区野莲居群以及美洲黄莲居群的研究结果一致^[22, 25-27]。野莲居群的遗传多样性水平也明显低于其他野生植物居群,如一年生草本野生大豆(*Glycine soja* Sieb. & Zuss.)居群($\pi = 2.94 \times 10^{-3}$)^[32]和多年生野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)居群($\pi = 3.00 \times 10^{-3}$)^[33]等。莲既可有性生殖又可无性繁殖,在风调雨顺年份,其主要通过地下茎无性繁殖,数年间即可形成大规模的野莲居群。而发生爆发性洪灾或极度干旱年份,原有居群死亡

后,少数莲子发芽可再次形成新居群。这种反复的奠基者效应使得野莲居群遗传背景趋向单一,多样性降低,这也使野莲居群基因组杂合度远小于其他野生的无性繁殖植物居群。野莲总的居群间平均遗传分化系数 F_{ST} 达0.42,存在明显的遗传分化。原因可能是不同野莲居群间由于水系相隔、莲子粒重较大(约1g)等因素,不同居群间基因交流较少。此外,由于单朵莲花花粉量极大,授粉昆虫(主要为蜂类)不需采集多个不同居群花粉即可满载,这也减少了居群间基因交流的概率,这些可能是莲居群间分化程度较高的原因。

本研究中,长江流域野莲居群多样性整体高于北部野莲多样性,且北部野莲内部,从山东到辽宁再到黑龙江其遗传多样性也是逐渐降低。因此,我国野莲遗传多样性由南向北逐渐降低。推测我国野莲可能起源于南方地区,并由南向北进行传播与扩散,从而形成目前的野莲分布格局。

3.2 野莲生态型的划分

植物在长期进化过程中,常常分化出不同生态型以适应不同区域气候条件。目前,亚洲莲生态型划分主要有2类:2种生态型或3种生态型。2005年,王其超等^[23]首次依据花莲在武汉地区的生长规律将其划分为温带型和热带型。其后,Yang等^[22]对不同区域野莲进行了遗传多样性研究,并支持2类生态型的划分方法,将中国野莲划分为温带型,泰国莲划分为热带型。需要注意的是,该研究在我国仅涉及到黑龙江省野莲,未研究不同地区野莲间的遗传分化。柯卫东等^[24]比较了我国东北、长江流域及新加坡野莲在武汉定植的性状表现,发现来自东北的野莲为极矮小和极早熟,可结藕2~3次,长江流域野莲结藕1次,新加坡等热带地区野莲不结藕。据此,根据纬度将莲划分为3类生态型,即:温带莲、亚热带莲和热带莲。本研究发现,东北野莲与长江中下游野莲居群在基因组水平上分化明显,可分为2个类群。因此,笔者认为将野莲按纬度划分为3种生态型较为合适。温带型莲主要位于我国东北地区及俄罗斯南部地区;亚热带型野莲则广泛分布于长江中下游地区、珠江流域;热带型主要分布于泰国、越南、柬埔寨、印度等东南亚、南亚等国。山东梁山古代莲在武汉种植时,1年结藕1次,不开花,株高居于长江区域野莲和东北野莲之间,兼具温带莲和亚热带莲的部分特

性，在遗传分化上也位于两者之间，该区域野莲可能是温带莲和亚热带莲过渡类型。据研究^[34]，梁山古代莲距今有600—700年。我们发现其莲子破壳后可正常生长，开红色单瓣花，与现代野莲相同，其基因组与现代野莲也并无明显差异，说明莲在数百年中进化较为缓慢。

3.3 野莲居群的保护策略

野莲是栽培莲的祖先，是极其重要的种质资源，如何制定野莲保护策略是亟待解决的问题。本研究发现，野莲居群间变异远大于居群内变异，因此在现有条件下，应多保存不同居群资源。居群内部遗传多样性较低，同一居群内应少保存不同单株。在长江中下游地区，应重视野莲资源丰富、遗传多样性较高的梁子湖、洪湖等居群的保护，也应适量保存分化程度较高的洞庭湖、鄱阳湖等地的野莲居群。东北野莲较为特殊，一方面其具有极早熟基因，在育种中有较高的应用潜力；一方面其难以适应长江流域短光照条件。据此，可在中国黑龙江、辽宁等地区建立野莲原生境保护区，以加强这种特殊类型的野莲资源保护。已有的研究表明，野莲基因组具有极高纯度，且成熟莲子寿命极长。是否可以采取收集野莲莲子保存于种子库，代替目前种质资源圃或原生境保护区的保存模式，以节约大量资金与土地资源，还有待进一步研究。此外，在野莲资源保护中，应注意防止外源基因特别是栽培莲基因的污染。本研究团队在收集上涉湖野莲材料时发现该湖周边种植有大量子莲，研究结果也显示上涉湖野莲的遗传多样性、基因组杂合度均显著高于其他野莲居群，推测该野莲资源可能已被子莲基因污染。因此，在对核心野莲居群进行原生境保护时，应注意加强隔离和防护，防止外源基因污染。

参考文献：

- [1] Qiu YL, Chase M, Les D, Parks C. Molecular phylogenetics of the Magnoliidae: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcL* [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1993, 80(3): 587–606.
- [2] 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, 51(3): 299–308.
- Xue JH, Zhuo LH, Zhou SL. Genetic diversity and geographical pattern of wild lotus in Heilongjiang province [J]. *Science Bulletin*, 2006, 51 (3): 299–308.
- [3] 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.
- Guo HB, Ke WD, Li SM, Peng J. RAPD cluster analysis of different types of lotus resources [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5 (4): 328–332.
- [4] 郭宏波, 柯卫东, 李双梅, 彭静. 野生莲资源的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 2005(s1): 64–67.
- Guo HB, Ke WD, Li SM, Peng J. RAPD analysis of wild lotus resources [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2005 (S1): 64–67.
- [5] An N, Guo HB, Ke WD. Genetic variation in rhizome lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) germplasms from China assessed by RAPD markers [J]. *J Integr Agr*, 2009, 8(1): 31–39.
- [6] Li Z, Liu XQ, Gituru RW, Juntawong N, Zhou MQ, Chen LQ. Genetic diversity and classification of *Nelumbo* germplasm of different origins by RAPD and ISSR analysis [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 125(4): 724–732.
- [7] Chen YY, Zhou RC, Lin XD, Wu KQ, Qian X, Huang SZ. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars [J]. *Aquat Bot*, 2008, 89(3): 311–316.
- [8] 徐玉仙, 张微微, 莫海波, 李春, 曹建国, 田代科. 基于EST-SSR 标记的莲属种质资源遗传多样性分析 [J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5): 595–604.
- Xu YX, Zhang WW, Mo HB, Li C, Cao JG, Tian DK. Genetic diversity analysis of nelumbo accessions based on EST-SSR markers [J]. *Journal of Plant Classification and Resources*, 2015, 37 (5): 595–604.
- [9] Kubo N, Hirai M, Kaneko A, Tanaka D, Kasumi K. Development and characterization of Simple Sequence Repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Aquat Bot*, 2009, 90(2): 191–194.
- [10] Pan L, Xia Q, Quan Z, Liu H, Ke WD, Ding Y. Development of novel EST-SSRs from sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and their utilization for the genetic diversity analysis of *N. nucifera* [J]. *J Hered*, 2010, 101(1): 71.
- [11] Kubo N, Hirai M, Kaneko A, Tanaka D, Kasumi K. Classification and diversity of sacred and American *Nelumbo* species: the genetic relationships of flowering lotus cultivars in Japan using SSR markers [J]. *Plant Genet Resour*, 2009, 7(3): 260–270.
- [12] Li C, Mo HB, Tian DK, Xu YX, Meng J, Tilt K. Genetic diversity and structure of American lotus (*Nelumbo lutea* Willd.) in north America revealed from microsatellite markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 189: 17–21.
- [13] Mekbib Y, Huang S, Ngarega B, Li Z, Shi T, et al. The level of genetic diversity and differentiation of tropical lotus, *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Nelumbonaceae) from Australia, India, and Thailand [J]. *Bot Stud*, 2020, 61: 15.
- [14] Li ZZ, Islam MR, Huang SX, Yang D, Yang XY. Genetic diversity comparisons of wild populations of *Nelumbo nucifera* [J]. *Plant Science Journal*

- cifera* (*Nelumbonaceae*) in Russia and China using microsatellite markers [J]. *Plant Syst Evol*, 2020, 306 (5) : 79.
- [15] Hu JH, Pan L, Liu HG, Wang SZ, Wu ZH, et al. Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4) : 3637–3647.
- [16] Fu J, Xiang QY, Zeng XB, Yang M, Wang Y, Liu YL. Assessment of the genetic diversity and population structure of lotus cultivars grown in China by amplified fragment length polymorphism [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2011, 136 (5) : 491–496.
- [17] 瞿桢, 魏英辉, 李大威, 肖丽舟, 徐金星, 等. 品种资源的SRAP遗传多样性分析 [J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30 (3) : 21–25.
- Qu Z, Wei YH, Li DW, Xiao LZ, Xu JX, et al. Genetic diversity analysis of *Nelumbo nucifera* based on SRAP markers [J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2008, 30 (3) : 21–25.
- [18] Yang M, Han YN, Xu LM, Zhao JR, Liu YL. Comparative analysis of genetic diversity of lotus (*Nelumbo*) using SSR and SRAP markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 30 (3) : 21–25.
- [19] Huang LY, Yang M, Li L, Li H, Yang D, et al. Whole genome re-sequencing reveals evolutionary patterns of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2018, 60 (1) : 4–17.
- Liu ZW, Zhu HL, Zhou JH, Jiang SJ, Wang Y, et al. Re-sequencing of 296 cultivated and wild lotus accessions unravels its evolution and breeding history [J]. *Plant J*, 2020, 104(6) : 1673–1684.
- [21] Li Y, Zhu FL, Zheng XW, Hu ML, Dong C, et al. Comparative population genomics reveals genetic divergence and selection in lotus, *Nelumbo nucifera* [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1) : 146.
- [22] Yang M, Liu F, Han YN, Xu LM, Juntawong N, Liu YL. Genetic diversity and structure in populations of *Nelumbo* from America, Thailand and China: implications for conservation and breeding [J]. *Aquat Bot*, 2013, 107(107) : 1–7.
- [23] 王其超, 张行言. 中国荷花品种图志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [24] 柯卫东, 李峰, 黄新芳, 刘义满, 彭静. 水生蔬菜种质资源研究及利用进展 [C]//中国园艺学会. 第二届全国水生蔬菜学术及产业化研讨会论文集. 武汉: 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 2007: 72–75.
- [25] Han YC, Teng CZ, Sheng Z, Zhou MQ, Hu ZL, Song YC. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (*Nelumbonaceae*) in central China detected by ISSR markers [J]. *Aquat Bot*, 2007, 86 (1) : 69–75.
- [26] Han YC, Teng CZ, Wahiti GR, Zhou MQ, Hu ZL, Song YC. Mating system and genetic diversity in natural populations of *Nelumbo nucifera* (*Nelumbonaceae*) detected by ISSR markers [J]. *Plant Syst Evol*, 2009, 277 (1) : 13–20.
- [27] Islam MR, Zhang Y, Li ZZ, Liu H, Yang XY. Genetic diversity, population structure, and historical gene flow of *Nelumbo lutea* in USA using microsatellite markers [J]. *Aquat Bot*, 2019, 160 (3) : 103162.
- [28] 张行言, 王其超. 热带型荷花的发现与荷花品种分类系统 [J]. 中国园林, 2006(7) : 82–85.
- Zhang YX, Wang QC. Preliminary study of the eco-types of genetic resources of tropical lotus [J]. *Landscape Plants*, 2006(7) : 82–85.
- [29] Liu ZW, Zhu HL, Liu YP, Kuang J, Zhou K, et al. Construction of a high-density, high-quality genetic map of cultivated lotus (*Nelumbo nucifera*) using next-generation sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1) : 466.
- [30] Sun XW, Liu DY, Zhang XF, Li WB, Liu H, et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale *de novo* SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3) : e58700.
- [31] Wang Y, Fan GY, Liu YM, Sun FM, Shi CC, et al. The sacred lotus genome provides insights into the evolution of flowering plants [J]. *Plant J*, 2013, 76 (4) : 557–567.
- [32] Zhou ZK, Jiang Y, Wang Z, Gou ZH, Lyu J, et al. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 4 (33) : 408–414.
- [33] Huang XH, Kurata N, Wei XH, Wang ZX, Wang A, et al. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice [J]. *Nature*, 2012, 490 (7421) : 497–501.
- [34] 李效尊, 杨百战, 尹静静, 杜绍印, 崔太昌, 等. 梁山古莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的种质资源价值研究 [J]. 长江蔬菜, 2015, 396(22) : 41–43.

(责任编辑: 周媛)