

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2022.60820

李静, 刘正位, 朱红莲, 匡晶, 彭静, 王直新, 季群, 柯卫东. 莲花色性状 QTL 定位及分子标记开发[J]. 植物科学学报, 2022, 40(6): 820~828  
 Li J, Liu ZW, Zhu HL, Kuang J, Peng J, Wang ZX, Ji Q, Ke WD. Mapping of quantitative trait loci and development of closely linked markers of flower color in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertner) [J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(6): 820~828

## 莲花色性状 QTL 定位及分子标记开发

李 静, 刘正位, 朱红莲, 匡 晶, 彭 静, 王直新, 季 群, 柯卫东 \*

(武汉市农业科学院, 武汉 430070)

**摘要:** 莲(*Nelumbo nucifera* Gaertner)花色是决定其观赏价值的重要农艺性状之一, 但其分子遗传机制尚不清楚。本研究以莲‘满天星’(红花)为母本, ‘巨无霸’(白花)为父本构建  $F_2$  分离群体。利用简化基因组测序技术(SLAF-seq)构建高密度遗传图谱, 根据  $F_2$  群体连续两年的表型数据, 对莲的红花、白花性状进行 QTL 分析, 开发与该性状紧密连锁的 PARMS(Penta-primer amplification refractory mutation system, 五引物扩增受阻突变体系)分子标记。结果显示: 莲的遗传图谱全长为 1046.82 cM, 包含 8 个连锁群、共 6376 个上图标记, 两个相邻标记间的平均图距为 0.16 cM。在第 6 连锁群上检测出 1 个稳定控制莲红花、白花性状的 QTL, 贡献率为 49.957%, 于该定位区域预测到 18 个基因, 其中 5 个为控制莲红花、白花性状的候选基因。同时, 开发了 3 个与莲红花、白花性状紧密连锁的 PARMS 标记, 能有效区分  $F_2$  群体中的红花和白花表型。

**关键词:** 莲; 花色; QTL 定位; SNP 分子标记

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)06-0820-09

## Mapping of quantitative trait loci and development of closely linked markers of flower color in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertner)

Li Jing, Liu Zheng-Wei, Zhu Hong-Lian, Kuang Jing, Peng Jing,  
 Wang Zhi-Xin, Ji Qun, Ke Wei-Dong \*

(Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** As one of the key agronomic traits that determine ornamental value, the genetic mechanism of flower color in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertner) requires further exploration. In this study, an  $F_2$  segregating population was obtained with the lotus cultivar ‘Mantianxing’ (red flower) as the female parent and ‘Juwuba’ (white flower) as the male parent. A high-density genetic map of the lotus was constructed using specific locus amplified fragment sequencing (SLAF-Seq). Combined with the phenotypic information of the  $F_2$  individuals obtained over two consecutive years, QTL mapping of the flower color trait was carried out. PARMS molecular markers linked to this trait were also developed. The integrated map spanned a genetic distance of 1046.82 cM, which consisted of 6376 SLAF markers on eight linkage groups, with an average genetic distance of 0.16 cM between adjacent markers. A QTL potentially responsible for red and white flower colors was stably detected on the sixth linkage group, with a contribution rate of 49.957%. Eighteen genes were located in the QTL interval, five of which were identified as candidate genes associated with flower color. Three PARMS markers were developed that could be effectively used for genotyping red and white

收稿日期: 2022-06-12, 修回日期: 2022-08-03。

基金项目: 国家特色蔬菜产业技术体系项目(CARS-24-A-12)。

This work was supported by a grant from the Earmarked Fund for CARS (CARS-24-A-12).

作者简介: 李静(1994-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向为蔬菜分子生物学(E-mail: Lijing9406@163.com)。

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

flowers in  $F_2$  individuals.

**Key words:** Lotus; Flower color; QTL mapping; SNP markers

花色一般指花瓣的颜色，能保护花器官免受病虫和紫外线等不利因素的伤害<sup>[1]</sup>。对于异花授粉植物来说，鲜艳的花色还能够作为吸引和指示昆虫、鸟类等动物的重要视觉信号，帮助植物进行虫媒传粉和种子传播，促进植物的后代繁衍<sup>[2]</sup>。对于观赏性园艺作物，花色在遗传育种工作中是主要目标性状之一，其遗传调控机制已有较多研究，在桃(*Amygdalus persica* L.)、月季(*Rosa chinensis* Jacq.)等园艺植物中成功鉴定了控制花色的关键 QTLs<sup>[3,4]</sup>。莲(*Nelumbo nucifera* Gaertner)作为我国十大名花之一，既是重要的园林观赏植物，也是主要的水生蔬菜之一<sup>[5]</sup>，具有红、粉、白、黄色、复色等丰富多样的花色类型，但目前国内关于莲的花色遗传控制机理仍少有研究。

对于大多数开花植物，花色的特异性主要与类黄酮、类胡萝卜素和生物碱这 3 大类色素相关。过去，莲的花色形成机理研究主要集中于运用高效液相色谱法对花瓣的化学组成物质进行系统分析，以探索色素和花色之间的联系<sup>[5-8]</sup>。随着莲基因组测序的完成<sup>[9, 10]</sup>，功能基因组学迅速发展，可以运用分子生物学手段试图解析花色形成的基因调控网络。如 Deng 等<sup>[11]</sup>通过比较蛋白组学分析，发现莲的红花性状与总花青苷含量正相关，受花青苷合酶基因 *NnANS* 表达水平的影响，而 *NnANS* 的表达与该基因启动子区甲基化状态有关。Wang 等<sup>[12]</sup>也发现莲花青苷的积累与类黄酮生物合成途径关键基因 *NnANS* 和 *NnDFR* 的表达相关，从而决定莲的红、白花色差异。研究也发现，bHLH 家族的 *NnTT8* 蛋白可与 MYB 转录因子互作，并调控莲花青苷的生物合成<sup>[13]</sup>。Sun 等<sup>[14]</sup>对红、黄花类型莲品种中的 *NnMYB5* 基因进行了序列分析，发现红花莲中 *NnMYB5* 具有正常调控功能，但在黄色花品种中由于第 2 个外显子有两个碱基的替换或单碱基的缺失使密码子提前终止，造成 *NnMYB5* 基因无法正常表达，认为这可能是导致花色差异的原因。此外，也有研究利用代谢组学技术找出在类黄酮代谢途径中与莲品种的黄、白花色差异相关的主要代谢物质和关键酶<sup>[15]</sup>。这些研究为进一步揭示莲花色遗传调控机制提供了参

考，然而，采用正向遗传学开展莲花色性状 QTL 定位还鲜有报道。

简化基因组测序技术(SLAF-seq)能够高效、大规模地完成 SNP 标记的开发，标记可靠，测序耗时短，成本低等优点较为突出<sup>[16]</sup>。目前已被广泛应用于桃、辣椒(*Capsicum annuum* L.)、茄子(*Solanum melongena* L.)、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)等园艺植物的遗传图谱构建和 QTLs 定位研究<sup>[17-20]</sup>。本研究以红花莲品种‘满天星’和白花莲品种‘巨无霸’为亲本材料获得了  $F_2$  分离群体，采用 SLAF-seq 构建了高密度遗传连锁图谱，对红花、白花性状进行了遗传分析，获得了控制莲红花、白花性状的 QTL 位点及其分子标记，可应用于莲育种中花色性状的高效筛选，也有助于进一步挖掘莲的花色相关基因，以期为揭示莲红花、白花的遗传调控机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以红花莲‘满天星’为母本，白花莲‘巨无霸’为父本，杂交后得到  $F_1$ ， $F_1$  自交产生  $F_2$ (图 1)。

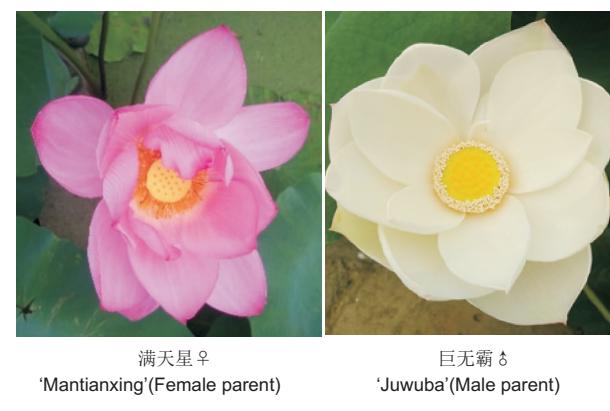


Fig. 1  $F_2$  群体的亲本表型  
Fig. 1 Phenotypes of parents in  $F_2$  population

### 1.2 实验设计和性状考察

本研究的实验地点在国家种质武汉水生蔬菜资源圃，于 2017、2018 年春季将父、母本和  $F_1$  各 3 株， $F_2$  共 175 株定植在 2 m × 1.5 m 的水泥池中，随机区组排列。每个水泥池内填土达到 30 cm 深度，1 支藕定植于一个水泥池，按常规方法进行田

间栽培管理。

在 2017、2018 年的夏季，参照《莲种质资源描述规范和数据标准》<sup>[21]</sup>，利用目测法，结合英国皇家园艺学会比色卡 (RHSCC) 进行比色，调查鉴定亲本、F<sub>1</sub> 及 F<sub>2</sub> 群体整个开花期内的花瓣颜色。根据花瓣颜色的深度，分为深红、浅红、白色 3 个等级。对 3 个花色等级进行赋值，将白、浅红、深红分别赋予 1、2 和 3。利用 Excel 2007 软件进行花色表型数据统计与分析。

### 1.3 基因组 DNA 提取及 SLAF 文库的构建

对 F<sub>2</sub> 遗传分离群体中的两个亲本和 175 个子代的每份样品播种 1 粒莲子，萌发后取幼叶，采用 CTAB 法提取莲的基因组 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测 DNA 质量与浓度，于 -20℃ 冰箱中保存备用。

将 DNA 样品送至北京百迈克生物科技有限公司，采用 SLAF-seq 技术进行高通量测序。以莲的基因组<sup>[9]</sup> ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/APLB01? display=contigs](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/APLB01?display=contigs)) 为参考，选用限制性内切酶 Rsa I + Hae III 进行酶切。获得相应的酶切片段后，对其进行 3' 端加 polyA 处理，然后连接上测序接头，对酶切片段进行 PCR 扩增，并切胶回收目的片段。文库质检合格后在 Illumina HiSeqTM2500 平台进行双端测序，测序长度为 150 bp。将水稻 (*Oryza sativa L.*) 作为对照 (Control)，采用相同的方法进行酶切处理，参与建库和测序，以评估本次建库实验的准确性。

### 1.4 高密度遗传图谱的构建

为了获得高质量的遗传连锁图谱，需要对多态性 SNP 标签进行筛选和过滤。首先，为了保证子代分型的正确性，除去父母本测序深度 10 × 以下的标签；其次，对子代的 SNP 深度不足 3 × 的标签，矫正为缺失；对完整度进行过滤，筛选 100 个子代中至少有 90 个个体有确定基因型的多态性标签；最后除去偏分离  $P < 0.01$  的标签。

将筛选出的可用于遗传作图的 SNP 标签，与参考基因组<sup>[10]</sup> 进行定位，分为几个不同的连锁群。SNP 标签之间分别计算 MLOD (Modified logarithm of odds) 值<sup>[20]</sup>，过滤掉与其他 SNP 标签之间 MLOD 值均低于 3 的标签。以连锁群为单位，采用 HighMap 软件<sup>[22]</sup> 分别分析各个连锁群内标记的线性排列，估算相邻标记之间的遗传距离，最终

得到高密度遗传连锁图谱。

### 1.5 QTL 分析

利用 QTL-ICI Mapping 4.1 软件，采用加性-完备复合区间作图法 (ICIM-ADD) 对 F<sub>2</sub> 群体的花色表型数据和遗传图谱信息进行分析，进行 LOD 阈值置换检验，计算出合理的 LOD 阈值以对花色性状进行 QTL 定位，分别在各个连锁群进行 QTL 检测，判断控制红花、白花性状的 QTL 是否存在，估算 QTL 位点的贡献率等参数。

### 1.6 分子标记的开发

通过网站 (<http://www.snpway.com/>) 设计 PARMS 荧光标记引物，包括正向引物 1、2 和反向引物。正向引物的 5' 端连接有荧光标签序列，其中正向引物 1 和 2 的 5' 端分别连接 5'-GAAG-GTGACCAAGTTCATGCT-3' FAM 序列和 5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3' HEX 序列。上述 PARMS 引物组由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应体系为 10 μL，其中包括：5 μL 2 × PARMS Mastermix (内含通用荧光引物 2 条)，正向引物 1 和 2 各 0.15 μL，0.4 μL 通用反向引物，1 μL 莲基因组 DNA 模板和 3 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序为：94℃ 3 min；然后 94℃ 20 sec 10 个循环，65℃ (每个循环退火温度降低 0.8℃，10 个循环运行完毕时退火温度为 57℃)，1 min；接着 94℃ 20 sec 30 个循环，57℃ 1 min。

用包含 FAM、HEX 和 ROX 的 3 种荧光检测通道的酶标仪对获得的 PCR 产物进行检测，获得各荧光强度信号值，然后通过 SNPdecoder 工具 (<http://www.snpway.com/snpdecoder01/>) 读取荧光信号值文件，自动进行基因分型，得到相应的基因型结果，输出为散点图，完成对 PCR 扩增产物的基因分型。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据统计和评估

利用 Illumina HiSeq TM2500 测序平台进行 SLAF-seq 文库的测序分析，共获得 673.07 M reads 数据，测序质量值  $\geq 30$  的碱基所占百分比 (Q30) 平均为 95.38%，GC 碱基含量平均为 40.98%。‘巨无霸’和‘满天星’分别获得 30 185 375、25 066 317 reads 数据，平均 Q30 分别为 95.71% 和 95.72%，平均 GC 含量分别为 38.36% 和 38.30%；子代群

体获得了 3 530 378 reads 数据, 平均 Q30 为 95.38%, 平均 GC 含量为 40.97% (表 1)。

表 1 样品测序数量

Table 1 Quantity of sequencing samples

样品编号 Sample ID	序列数 Total reads	Q30 百分数 Q30 percentage / %	GC 含量 GC content / %
父本 P	30 185 375	95.71	41.91
母本 M	25 066 317	95.72	41.35
子代 Offspring	3 530 378	95.38	40.97
对照 Control	1 107 638	95.02	40.83
总数 Total	673 067 772	95.38	40.98

## 2.2 建库评估

以水稻‘日本晴’的测序数据为对照 (Control), 通过 SOAP 软件<sup>[22]</sup>将水稻的测序 reads 与莲参考基因组<sup>[10]</sup>进行比对, 双端比对效率为 90.35%, 酶切效率为 92.37%, 本次 SLAF 建库质量合格, 准确可靠。

## 2.3 SNP 标记与 SLAF 标签开发

使用 GATK 和 SAMtools 对亲本和子代进行数据比对和 SNP 开发。亲本‘满天星’和‘巨无霸’分别获得了 1 330 918 和 1 247 286 个 SNP 标签, 杂合比率均为 5.87% (表 2)。通过生物信息学分析, 共开发 1 162 950 个莲的 SLAF 标签, 母本和父本分别为 430 946 和 390 219 个 (表 3)。

用遗传学通用的 2 等位编码规则对多态性 SLAF 标签进行编码基因型, 96 602 个标签被成功分成 8 种基因分离类型, 分别为 ab × cd、ef × eg、hk × hk、lm × ll、nn × np、aa × bb、ab × cc 以及 cc × ab。由于本研究为 F<sub>2</sub> 群体, 因此适

合该群体的有效标签为 aa × bb 类型的多态性标签, 标签总数为 94 119 个, 占总开发数目的 4.23%, 可用于遗传图谱的构建。

表 2 样品 SNP 信息统计

Table 2 SNP information of samples

样品编号 Sample ID	检测到的 SNP 总数 Total SNP	样品中 SNP 个数 SNP number	杂合比率 Heterozygous ratio / %
母本 M	2 226 481	1 330 918	5.87
父本 P	2 226 481	1 247 286	5.87
子代 Offspring	2 226 481	831 806	4.96

表 3 SLAF 标签统计

Table 3 SLAF tag statistics of samples

样品编号 Sample ID	SLAF 标签数 SLAF number	测序总深度 Total depth	平均深度 Average depth
母本 M	430 946	22 997 679	53.37
父本 P	390 219	28 238 972	72.37
子代 Offspring	211 304	3 237 238	15.18

## 2.4 莲的高密度遗传图谱构建

通过在参考基因组的中定位, 将筛选出的 94 119 个 SNP 标签分为 8 个连锁群。用 HighMap 软件分析获得各连锁群内标记的线性排列, 估算相邻标记之间的遗传距离, 构建了莲的高密度遗传连锁图谱。该遗传连锁图谱共有 6376 个上图标记, 总图距为 1 046.82 cM(图 2), 两个相邻标记间的平均图距为 0.16 cM。其中, LG8 为最短连锁群, 图距为 58.13 cM; LG1 为最长连锁群, 图距为 186.26 cM(表 4)。上图标记的完整度为 99.90%, 能够保证图谱基因分型的准确性。

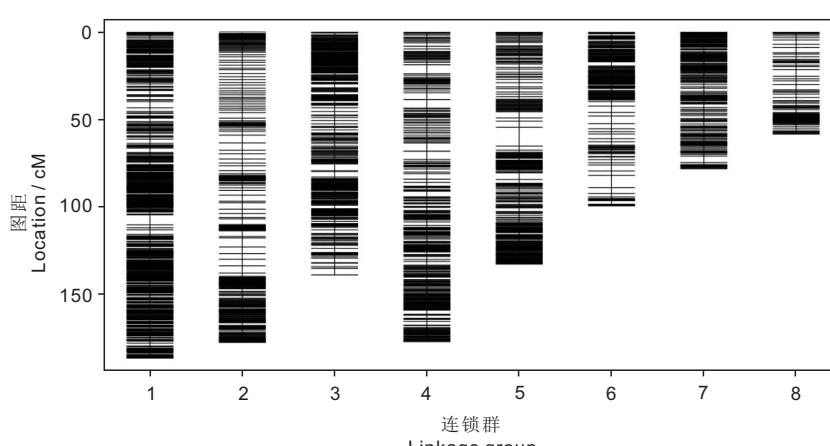
图 2 F<sub>2</sub> 分离群体的遗传图谱Fig. 2 Genetic map constructed with F<sub>2</sub> population

表 4 连锁群的基本信息统计  
Table 4 Basic characteristics of lotus linkage groups

连锁群 Linkage group ID	标记数 Total marker	总图距 Total distance / cM	平均图距 Average distance / cM	最大 Gap Max Gap / cM	Gap < 5 cM / %
1	1781	186.26	0.10	5.76	99.94
2	884	177.29	0.20	5.05	99.89
3	859	138.72	0.16	3.95	100
4	763	176.83	0.23	5.28	99.87
5	896	132.46	0.15	10.70	99.89
6	589	99.17	0.17	7.09	99.83
7	417	77.96	0.19	3.84	100
8	187	58.13	0.31	3.73	100
总计 Total	6376	1046.82	0.16	10.70	99.83

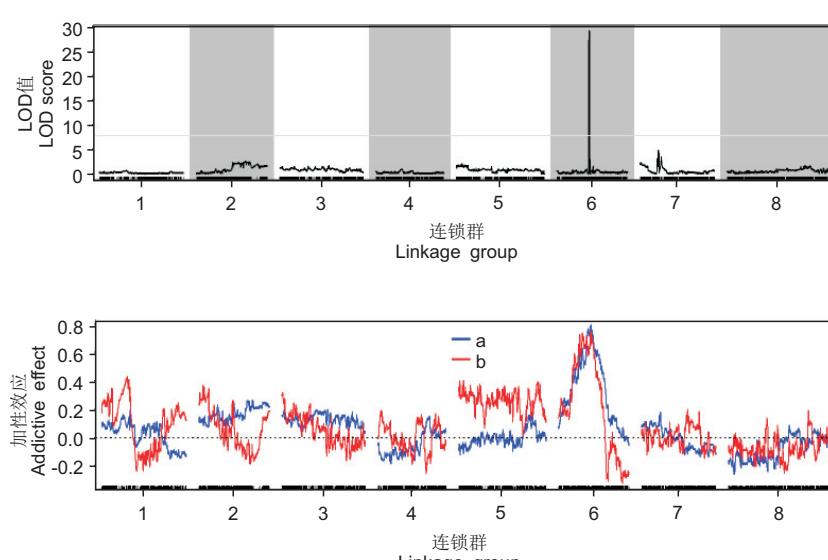
## 2.5 花色 QTL 分析及基因预测

对亲本和 175 株  $F_2$  群体的花瓣颜色进行连续两年的调查。两年间,  $F_1$  均为红花, 2017 年  $F_2$  群体中白色 35 株, 深红 24 株, 浅红 109 株, 其余 7 株由于生长发育不良未统计; 2018 年  $F_2$  中白色 37 株, 深红 22 株, 浅红 113 株, 其余 4 株由于生长发育不良未统计。综上可知, 两年的花色表型数据基本一致。

利用 QTL-Ici Mapping 4.1 软件, 采用加性-完备复合区间作图法 (ICIM-ADD) 对连续两年群体的表型数据和遗传图谱信息进行分析计算, 在 8 条连锁群进行 QTL 检测, 位于第 6 连锁群上有一个稳定控制莲红花、白花性状的 QTL 能被成功

检测 (图 3)。它定位在两个 SNP 标记 Marker 153799 和 Marker 54993 之间, 从 63.446 cM 到 63.732 cM, 区间大小 0.286 cM, 最大 LOD 值为 10.859, 贡献率为 49.957%, 可能是控制花色的关键作用位点。

根据莲基因组数据库 (<http://nelumbo.bio-cloud.net/home>) 提供的基因预测和注释信息, 对花色 QTL 定位区间进行序列分析, 检测到与花色 QTL 紧密连锁的 SNP 标记 Marker 153799 和 Marker 54993 都位于莲的第 4 号染色体上, 其物理距离为 441.834 kb, 共有 18 个基因在此标记区域内, 其中 6 个无注释。根据 12 个有注释的基因信息可知, 它们在 RNA 加工和修饰、细



a 表示加性效应, b 表示显性效应。  
a refers to additive effect, b refers to dominance effect.

图 3 连续两年花色基因的 QTL 检测  
Fig. 3 QTL analysis of flower color gene over two years

胞代谢和生殖发育、免疫应答、信号转导、蔗糖合成等方面发挥功能(表5)。根据前人的研究<sup>[23,24]</sup>, 我们推测其中蔗糖合成酶基因(*Nn4g24757*, *Nn4g24760*, *Nn4g24763*)、B-box型锌指蛋白基因(*Nn4g24768*)、MYB-like转录因子(*Nn4g24770*)可能与莲的红、白花形成有关, 并把它们作为控制花色性状的主要候选基因。

## 2.6 花色紧密连锁的荧光分子标记开发

基于 SLAF-seq 数据, 在花色 QTL 定位区间 Marker 153799 和 54993 之间找到 9 个 SNP 位点。根据这些 SNP 的多态性特点, 设计了 8 对 PARMS 荧光引物。以双亲和 F<sub>1</sub> 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 初步了解标记基因分型情况及其与花色表型的一致性。通过筛选, 3 对引物(Marker 153798、Marker 54975、Marker 153787)分型良好, 其相关信息见表 6。将筛选出的 3 对引物在 F<sub>2</sub> 群体中进行验证, 均可以明确区分红花和白花这两种基因型(图 4), 携带 A 等位变异的纯合型白花

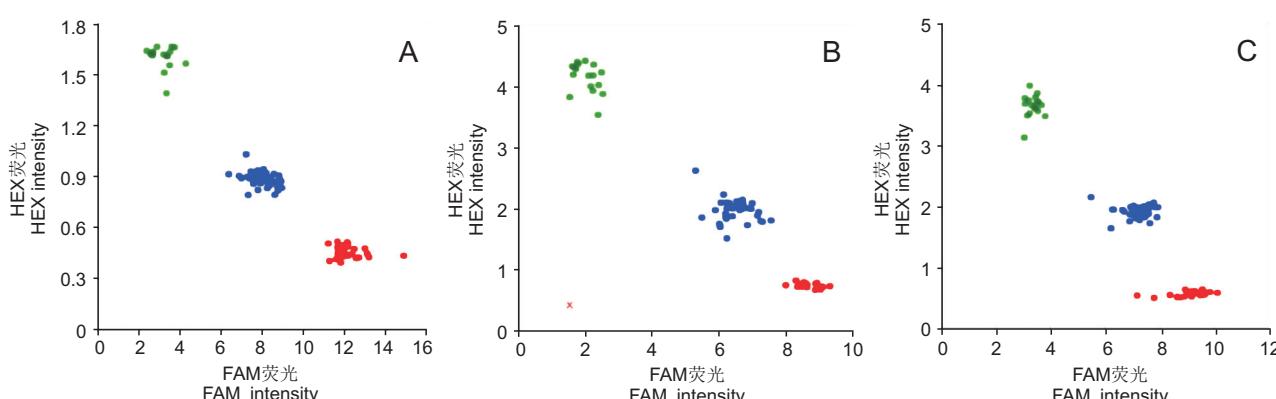
材料是聚合在 Y 轴附近的绿点, 携带 G 等位变异的纯合型红花材料是聚合在 X 轴附近的红点, 聚合在中间区域的蓝点是携带 A/G 等位变异的杂合型材料, 有 1 个没有检测到荧光信号的样品用“×”表示。

表 5 标记区域内的基因注释  
Table 5 Gene annotation of marked region

基因 Gene ID	注释 Annotation
<i>Nn4g24753</i>	RNA binding; cellular metabolic process; innate immune response
<i>Nn4g24754</i>	Hypothetical protein V493_03831
<i>Nn4g24755</i>	Cul4-RING ubiquitin ligase complex
<i>Nn4g24756</i>	Uncharacterized protein
<i>Nn4g24757</i>	Sucrose synthase activity
<i>Nn4g24760</i>	Sucrose synthase activity
<i>Nn4g24763</i>	Sucrose synthase activity
<i>Nn4g24765</i>	RNA processing and modification
<i>Nn4g24767</i>	Signal transduction mechanisms
<i>Nn4g24768</i>	B-box zinc finger protein 20
<i>Nn4g24769</i>	General function prediction only
<i>Nn4g24770</i>	PREDICTED: putative Myb family transcription factor At1g14600

表 6 SNP 信息及分子标记引物序列  
Table 6 SNP information and primer sequences of molecular markers

标记名 Marker	SNP 标记位置		引物名称		引物序列(5'-3') Primer sequence
	Scaffold	Position	Primer		
Marker153798	KN709517.1	687 425	975ColF_G	GAAGGGTACCAAGTTCATGCTTACCATACCGATTCCCTTATCCTCAG	
			975ColF_A	GAAGGGTCGGAGTCACCGGATTACCATAACGATTCCCTTATCCTCAA	
			975ColR	GTACCTGAATGGACAGATGCAATG	
Marker54975	KN708907.1	63 718	798ColF_G	GAAGGGTACCAAGTTCATGCTTGTATCCATGTTCTCCATTTCCG	
			798ColF_A	GAAGGGTCGGAGTCACCGGATTGGTTATCCATGTTCTCCATTTCCA	
			798ColR	CACAGGTGAAACGTAGAACAACTTC	
Marker153787	KN709517.1	631 489	787ColF_G	GAAGGGTACCAAGTTCATGCTCGAAGGGGTATTACTGTTATGACCTAG	
			787ColF_A	GAAGGGTCGGAGTCACCGGATTGCAAGGGGTATTACTGTTATGACCTAA	
			787ColR	ACTCGAGAAGAAGGTGGATTCAA	



A: Marker 153798 的基因分型结果; B: Marker 54975 的基因分型结果; C: Marker 153787 的基因分型结果。  
A: Genotyping result of Marker 153798; B: Genotyping result of Marker 54975; C: Genotyping result of Marker 153787.

图 4 3 个标记在 F<sub>2</sub> 部分单株中的基因分型检测结果

Fig. 4 Genotyping results of F<sub>2</sub> plants using three markers

### 3 讨论

高密度遗传图谱是开展基因组组装和 QTL 定位的重要工具。2012 年, 利用 SSR 和 SRAP 标记, Yang 等<sup>[25]</sup>获得了中国古代莲和美洲黄莲(*N. lutea* Pers)的遗传图谱, 这也是莲属植物中首次成功构建连锁图。通过 RAD 测序技术, 中国古代莲和美洲黄莲的遗传图被进一步完善<sup>[26]</sup>。2016 年, Liu 等<sup>[27]</sup>利用子莲‘满天星’和藕莲‘巨无霸’为双亲, 构建了  $F_2$  作图群体, 对获得的 96 株  $F_2$  材料, 通过 dd-RAD 测序技术发掘 SNP 标记, 最终得到总图距为 581.3 cM, 平均图距为 0.74 cM, 共有 8 个连锁群的栽培莲遗传图谱。本研究在前人的研究基础上, 进一步扩大作图群体, 对 168 株  $F_2$  材料利用 SLAF-seq 技术进行群体基因分型, 得到了更为精细的遗传图谱, 其总图距为 1046.82 cM, 两个相邻标记间的平均图距 0.16 cM, 表明其密度更大、精度更高、准确性更强。

由于遗传机理复杂, 莲重要农艺性状的研究受到一定制约<sup>[28]</sup>, 重要功能基因的挖掘及相关分子机制的解析比较滞后, 但也有人基于转录组、蛋白组或代谢组学的方法研究了莲的地下茎膨大、花色、莲子淀粉含量等重要性状<sup>[11, 15, 29, 30]</sup>。近年来, 莲的基因组信息越来越完善, QTL 定位研究也取得了重要进展, 莲子产量、地下茎、花期、开花数、花瓣数、株型等多个重要农艺性状已有相关 QTLs 被成功鉴定<sup>[26, 31, 32]</sup>。但对于花色性状的遗传定位研究, 目前仅王芸等<sup>[32]</sup>从花莲材料中鉴定出 1 个控制红花、白花性状的 QTL。而本研究的实验材料是以子莲和藕莲为亲本构建的  $F_2$  遗传群体, 获得了花色相关 QTL, 并对定位区间内的候选基因进行了预测, 开发了与花色紧密连锁的 PARMS 荧光分子标记, 在一定程度上填补了以正向遗传学手段探索挖掘控制莲花色性状功能基因的空白, 为未来莲分子标记辅助育种体系的构建提供了可行性方向。

研究表明, 莲的红花表型受花青苷含量的影响<sup>[5, 11, 13]</sup>。在本研究中, 蔗糖合成酶基因(*Nn4g24757*, *Nn4g24760*, *Nn4g24763*)、B-box 型锌指蛋白基因(*Nn4g24768*)、MYB-like 转录因子(*Nn4g24770*)作为预测的候选基因, 虽然目前尚无研究证明它们与莲的花瓣着色有关, 但它们

可能通过调控花青苷的积累进而影响花色形成。这是因为, 首先, 蔗糖能够作为一种信号分子, 植物体内的蔗糖的大量积累能够特异性激活下游花青苷生物合成相关基因的表达<sup>[24, 33, 34]</sup>, 而蔗糖合成酶是高等植物体内控制蔗糖合成的关键酶之一, 我们推测蔗糖合成酶基因 *Nn4g24757*、*Nn4g24760*、*Nn4g24763* 的表达可能通过调控植物体内蔗糖含量, 进而影响莲的花青苷合成途径。其次, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、苹果(*Malus pumila* M.)、沙梨(*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai)等植物中发现 B-box 锌指蛋白能够与光调控因子 HY5 形成蛋白复合体, 特异性识别和结合与花青苷形成有关的 MYB 转录因子、结构基因 *DFR* 和 *ANS* 启动子上的 G-box 并影响其表达<sup>[23, 35]</sup>。据此, 我们猜测 *Nn-BBX20*(*Nn4g24768*)也可能通过类似的作用机制形成莲的红花表型。在很多园艺植物中都发现 MYB 转录因子能够调控 *PAL*、*CHS* 等多种参与花青苷生物合成途径的结构基因的表达水平<sup>[14, 36, 37]</sup>, 而候选基因 *Nn4g24770* 具有类似 MYB 转录因子的 DNA-bind 结构域, 可能在花青苷合成代谢中发挥转录调控功能。此外, 我们还发现, QTL 区间中有两个相邻的 SNP (Marker 153799 和 Marker 153798) 刚好在该基因的编码区。序列分析发现, 红、白花材料中该基因编码的蛋白质存在两个氨基酸的突变, 这可能会导致蛋白功能的差异。因此, 以上 5 个基因可能是控制莲的红、白花性状的关键基因。为验证上述推测, 还需开展对获得的花色 QTL 进行精细定位、候选基因的表达分析、功能验证等工作。

### 参考文献:

- [1] 杨茹涵, 刘进, 李加纳, 钱伟, 梅家琴. 甘蓝花色性状 QTL 定位及候选基因变异分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(5): 1271–1277.
- [2] Yang RH, Liu J, Li JN, Qian W, Mei JQ. QTL Mapping and variation analysis of candidate gene for flower color in *Brassica oleracea* L. [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(5): 1271–1277.
- [3] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds [J]. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(6): 212–217.
- [4] Chen MQ, Xu MY, Xiao Y, Cui DD, Qin YQ, et al. <http://www.plantscience.cn>

- Fine mapping identifies SmFAS encoding an anthocyanidin synthase as a putative candidate gene for flower purple color in *Solanum melongena* L. [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 789.
- [4] Gitonga VW, Stolker R, Koning-Boucoiran CFS, Aelaei M, Visser RGF, et al. Inheritance and QTL analysis of the determinants of flower color in tetraploid cut roses [J]. *Mol Breed*, 2016, 36(10): 143.
- [5] Chen S, Xiang Y, Deng J, Liu YL, Li SH. Simultaneous analysis of anthocyanin and non-anthocyanin flavonoid in various tissues of different lotus (*Nelumbo*) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62291.
- [6] Deng J, Chen S, Yin XJ, Wang K, Liu YL, et al. Systematic qualitative and quantitative assessment of anthocyanins, flavones and flavonols in the petals of 108 lotus (*Nelumbo nucifera*) cultivars [J]. *Food Chem*, 2013, 139(1-4): 307-312.
- [7] Katori M, Watanabe K, Nomura K, Yoneda K. Cultivar differences in anthocyanin and carotenoid pigments in the petals of the flowering lotus (*Nelumbo* spp.) [J]. *Jpn Soc Horticult Sci*, 2002, 71(6): 812-817.
- [8] Yang RZ, Wei XL, Gao FF, Wang LS, Zhang HJ, et al. Simultaneous analysis of anthocyanins and flavonols in petals of lotus (*Nelumbo*) cultivars by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(1): 106-112.
- [9] Ming R, Vanburen R, Liu YL, Yang M, Han YP, et al. Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) [J]. *Genome Biol*, 2013, 14(5): R41.
- [10] 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.
- [11] Deng J, Fu ZY, Chen S, Damaris RN, Wang K, et al. Proteomic and epigenetic analyses of lotus (*Nelumbo nucifera*) petals between red and white cultivars [J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(8): 1546-1555.
- [12] Wang YJ, Chen YQ, Yuan M, Xue ZY, Jin QJ, Xu YC. Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes in sacred lotus [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2016, 141(6): 573-582.
- [13] Deng J, Li JJ, Su MY, Lin ZY, Chen L, Yang PF. A bHLH gene *NnTT8* of *Nelumbo nucifera* regulates anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 158: 518-523.
- [14] Sun SS, Gugger PF, Wang QF, Chen JM. Identification of a *R2R3-MYB* gene regulating anthocyanin biosynthesis and relationships between its variation and flower color difference in lotus (*Nelumbo Adans.*) [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2369.
- [15] Zhu HH, Yang JX, Xiao CH, Mao TY, Zhang J, Zhang HY. Differences in flavonoid pathway metabolites and transcripts affect yellow petal colouration in the aquatic plant *Nelumbo nucifera* [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 277.
- [16] 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.
- [17] Shi P, Xu Z, Zhang SY, Wang XJ, Ma XF, et al. Construction of a high-density SNP-based genetic map and identification of fruit-related QTLs and candidate genes in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 438.
- [18] Wei QZ, Wang WH, Hu TH, Hu HJ, Wang JL, Bao CL. Construction of a SNP-based genetic map using SLAF-Seq and QTL analysis of morphological traits in eggplant [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 178.
- [19] Zhang XF, Wang GY, Dong TT, Chen B, Du HS, et al. High-density genetic map construction and QTL mapping of first flower node in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 167.
- [20] Zhu WY, Huang L, Chen L, Yang JT, Wu JN, et al. A high-density genetic linkage map for cucumber (*Cucumis sativus* L.): based on specific length amplified fragment (SLAF) sequencing and QTL analysis of fruit traits in cucumber [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 437.
- [21] 柯卫东, 李峰. 莲种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 52-58.
- [22] Li RQ, Li YR, Kristiansen K, Wang J. SOAP: short oligonucleotide alignment program [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [23] Fang HC, Dong YH, Yue XX, Hu JF, Jiang SH, et al. The B-box zinc finger protein MdBBX20 integrates anthocyanin accumulation in response to ultraviolet radiation and low temperature [J]. *Plant Cell Environ*, 2019, 42(7): 2090-2104.
- [24] Das PK, Shin DH, Choi SB, Park YI. Sugar-hormone cross-talk in anthocyanin biosynthesis [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(6): 501-507.
- [25] Yang M, Han YN, Vanburen R, Ming R, Xu LM, et al. Genetic linkage maps for Asian and American lotus constructed using novel SSR markers derived from the genome of sequenced cultivar [J]. *BMC Genom*, 2012, 13(1): 653.
- [26] Zhang Q, Li LT, Vanburen R, Liu YL, Yang M, et al. Optimization of linkage mapping strategy and construction of a high-density American lotus linkage map [J]. *Plant Science Journal*

- BMC Genom, 2014, 15(1): 372.
- [27] Liu ZW, Zhu HL, Liu YP, Kuang J, Zhou K, et al. 2016. Construction of a high-density, high-quality genetic map of cultivated lotus (*Nelumbo nucifera*) using next-generation sequencing [J]. *BMC Genom*, 2016, 17(1): 466.
- [28] 宋贺云, 王云梦, 邓显豹, 孙恒, 杨美. 分子标记技术在莲研究中的应用与进展 [J]. 植物学研究, 2020, 9(4): 284–293.  
Song HY, Wang YM, Deng XB, Sun H, Yang M. Application advance of molecular markers in lotus [J]. *Botanical Research*, 2020, 9(4): 284–293.
- [29] Cao DD, Damaris RN, Zhang Y, Liu MH, Li M, Yang PF. Proteomic analysis showing the signaling pathways involved in the rhizome enlargement process in *Nelumbo nucifera* [J]. *BMC Genom*, 2019, 20(1): 766.
- [30] Sun H, Li JJ, Song HY, Yang D, Deng XB, et al. Comprehensive analysis of AGPase genes uncovers their potential roles in starch biosynthesis in lotus seed [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 427.
- [31] 刘正位, 郭丹丹, 彭静, 朱红莲, 匡晶, 等. 莲子产量相关性状的 QTL 定位 [J]. 园艺学报, 2020, 47(8): 1565–1576.  
Liu ZW, Guo DD, Peng J, Zhu HL, Kuang J, et al. QTL mapping of six seed yield related traits in lotus [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(8): 1565–1576.
- [32] 王芸, 刘正位, 匡晶, 季群, 王春丽, 等. 莲重要农艺性状的 QTL 定位 [C]//中国园艺学会 2019 年学术年会暨成立 90 周年纪念大会论文摘要集. 郑州: 中国园艺学会, 2019: 228.
- [33] Solfanelli C, Poggi A, Loret E, Alpi A, Perata P. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 637–646.
- [34] 路静, 马齐军, 刘晓, 康慧, 刘亚静, 等. 苹果蔗糖转运蛋白 MdSUT2 调控花青素积累的研究 [J]. 园艺学报, 2019, 46(1): 1–10.  
Lu J, Ma QJ, Liu X, Kang H, Liu YJ, et al. Studies on the regulation of anthocyanin accumulation by apple sucrose transporter MdSUT2 [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(1): 1–10.
- [35] Bai SL, Tao RY, Tang YX, Yin L, Ma YJ, et al. BBX16, a B-box protein, positively regulates light-induced anthocyanin accumulation by activating MYB10 in red pear [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(10): 1985–1997.
- [36] Naing AH, Kim CK. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 98(1–2): 1–18.
- [37] Zong Y, Zhu XB, Liu ZG, Xi XY, Li GM, et al. Functional MYB transcription factor encoding gene AN2 is associated with anthocyanin biosynthesis in *Lycium ruthenicum* Murray [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 169.
- [38] Zhang N, Chen L, Ma S, Wang RF, He Q, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of the white flower gene *Brwf* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6080.

(责任编辑: 李惠英)