

大别山三种杜鹃花资源遗传多样性和遗传结构分析

王书珍, 艾莎, 张霖, 李志良, 向福, 金卫斌

(大别山特色资源开发湖北省协同创新中心, 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室,
黄冈师范学院 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000)

摘要:大别山独特的地理环境为杜鹃花资源提供了独特的生境地, 是中国杜鹃花资源重要的多样性分布中心。该研究以大别山黄杜鹃、云锦杜鹃、满山红 3 个种群为试验材料, 采用 9 个 SSR 标记对其进行扩增, 以期探究种群遗传多样性和遗传结构的特征。结果表明: 9 个标记位点共扩增出 45 个等位基因, 每个位点的等位基因数为 3~7; 3 个种群中 Shannon 信息指数平均值为 0.87~0.91; 平均观察杂合度和期望杂合度为 0.523~0.651 和 0.517~0.536; 总近交系数 F_{IT} 和种群内近交系数 F_{IS} 平均值分别为 0.075 9 和 -0.173 3, 即 3 个种群内均存在近交现象; 9 个位点的平均基因流为 0.927 0; 在聚类分析中, 黄杜鹃和云锦杜鹃亲缘关系最近, 与满山红最远。该研究为杜鹃花属植物的进化研究奠定了基础。

关键词:杜鹃花; 遗传多样性; 遗传结构; 微卫星; 亲缘关系

中图分类号: S 685.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)24-0099-05

杜鹃花是杜鹃花科 (Ericaceae) 杜鹃花属 (*Rhododendron*) 植物的总称, 具有极高的观赏价值和药用价值, 部分种还被用于提取精油、鞣质等活性成分^[1-2]。大白杜鹃可以食用, 黄杜鹃作为植物杀虫剂用于林业保护^[3]。杜鹃花是北温带森林生态系统中的主要成员, 在生态保护、水土保持等方面作用重大^[4]。大别山区地理环境独特, 是除滇藏川外中国野生杜鹃花资源的另一多样性分布中心。

第一作者简介:王书珍(1984-), 女, 博士, 讲师, 现主要从事植物遗传学等研究工作。E-mail: wangshuzhen710@whu.edu.cn.

责任作者:金卫斌(1961-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事生态学等研究工作。E-mail: 530255225@qq.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (NSFC 31500995); 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心团队资助项目 (2015TD07); 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室开放基金资助项目 (2017BX06)。

收稿日期: 2017-07-13

SSR 标记具有在基因组中广泛分布、共显性遗传、多态性丰富、数量众多、重复性好、特异性强等优点, 因而被广泛用于品种鉴定、遗传多样性研究、亲缘关系分析、核心种质资源评价、遗传图谱构建、基因定位等研究中^[5]。该研究利用前期基于 RNA-seq 技术开发的 SSR 标记对大别山区域黄杜鹃 (*Rhododendron molle* (Blume) G. Don)、云锦杜鹃 (*Rhododendron fortunei* Lindl.)、满山红 (*Rhododendron mariesii* Hemsl. et Wils.) 3 种杜鹃花资源的遗传多样性和种群的遗传分化进行比较分析, 探究其亲缘关系, 旨在为杜鹃花新品种的培育和分子标记辅助育种提供参考, 也为制定合理的开发和保护策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄杜鹃 (21 个材料)、云锦杜鹃 (15 个材料)、满山红 (15 个材料) 均取自大别山鹞落坪国家级

自然保护区(东经 $116^{\circ}02'20'' \sim 116^{\circ}10'53''$, 北纬 $30^{\circ}57'20'' \sim 31^{\circ}06'10''$), 9月采集当年生的新鲜叶片, 硅胶保存后用于 DNA 提取。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取与检测

采用改良的 CTAB 法提取 3 种杜鹃基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带完整度^[6]。紫外分光光度计分别检测提取的 DNA 样品的 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{230} 值, 计算 DNA 浓度和纯度, 并将 DNA 浓度稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{g}^{-1}$, 于 -20°C 保存备用。

1.2.2 PCR 反应体系及反应程序

采用 $10 \mu\text{L}$ 的 PCR 反应体系进行扩增, 含 100 ng 基因组 DNA, $5 \mu\text{L}$ 的 $2 \times \text{Taq PCR Mastermix}$, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物 $0.1 \mu\text{L}$, 其余体积用灭菌的去离子水补足。该研究所用的微卫星引物是前期开发的, 具体信息见表 1。PCR 扩增程序: 94°C 预变性 10 min , 35 个扩增循环 (94°C 变性 30 s , 最适合退火温度下退火 40 s , 72°C 延伸 40 s), 最后增加一个 7 min 的 72°C 延伸阶段。PCR 扩增产物采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.3 数据分析

根据每个个体产生的条带有无和 PAGE 凝胶上的位置确定其基因型, 并经 Popgene 32.0 软件统计等位基因数 (N_a)、观察杂合度 (H_o)、期望

杂合度 (H_e)、Shannon 信息指数 (I), 各群体间的遗传距离 (D) 和遗传一致度, 以及遗传分化系数等多项遗传多样性指数^[7]。采用 Arlequin 3.1 软件进行 AMOVA (分子方差) 分析, 统计遗传差异发生的分布情况^[5]。基于 Nei's 遗传距离, 采用 MEGA 软件进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 杜鹃花种群在 9 个位点的遗传多样性

9 个微卫星位点共扩增出 45 个等位基因, 每个位点观测到的等位基因数为 $3 \sim 7$, 扩增的 DNA 片段长度为 $152 \sim 268 \text{ bp}$ (表 1)。RsE-103、RsE-110、RsE-125 等 3 个位点上观测等位基因最多, 为 7 个。RsE-104 和 RsE-129 两个位点等位基因数最少, 仅扩增 3 个。每个位点的等位基因数在 3 个群体内差异较大, 并且均有特异等位基因出现。RsE-19 和 RsE-23 位点在满山红内均是单态性的, 在黄杜鹃和云锦杜鹃中是多态性位点, 并且在云锦杜鹃中多态性最强 (表 2)。RsE-103 在黄杜鹃和满山红中扩增效果一致, 均扩增出 4 个等位基因, 但是在云锦杜鹃中仅检测到 2 个等位基因 (表 2)。RsE-110 在黄杜鹃和云锦杜鹃中扩增效果一致 (6 个等位基因), 但是在满山红中仅扩增出 4 个等位基因。RsE-125 和 RsE-129 在云锦杜鹃中扩增的等位基因数最多, 分别为 6 个和 3 个 (表 2)。

表 1

微卫星标记的引物信息

Table 1

Primer information of microsatellite markers

位点 Locus	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	基序 Motif	退火温度 Tm/ $^{\circ}\text{C}$	片段大小 Size range/bp	等位基因 Allele/个
RsE-19	ATCCCATCCCATCTCTCTC	CACAGATGAGAGAAGAGAGC	(CT)28	56	230~268	4
RsE-23	TTTTCACCTCCCTCCCTCTG	ACTGATGGGTGGAAGTAGTA	(AG)37	55	230~258	5
RsE-103	GAAAACCCACCATTCCAAA	TCTTCTTTTCGTTAGGGTTCC	(AG)25	55	240~254	7
RsE-104	AACATCTCTACTGTTGGTCC	TGGAAGGAGTTGAAGAAGTC	(AG)28	54	245~263	3
RsE-110	TAACCTGCCAGTGAATTAC	TCTACGTACGCCATTGAAAT	(CT)22	55	224~236	7
RsE-117	GCTATTCACCTCGTCAAATGC	ATTGTGGGAATGAAGGTCTC	(GA)22	57	229~243	5
RsE-123	CCCTTCCTCTTCTCAAATCC	CGTCATTTTCACACACAGAG	(CT)20	57	174~190	4
RsE-125	CTCTCCCAAAATTAGCCGAT	GAATTGGCTGTGGATGATG	(CT)21	58	230~252	7
RsE-129	TGAAGCTGTTTGTAGACTCCC	CATGATGGGAAAGCAAAGTG	(TC)22	58	152~181	3

由表 2 可知, 黄杜鹃种群的 Shannon 信息指数为 $0.45 \sim 1.49$, 平均值为 0.88 。Shannon 信息

指数在云锦杜鹃和满山红中分别为 $0.24 \sim 1.63$ 和 $0.00 \sim 1.35$, 平均值分别为 0.87 和 0.91 。平

均观察杂合度在 3 个杜鹃种群中分别为 0.651 (黄杜鹃)、0.610 (云锦杜鹃)、0.523 (满山红)。平均期望杂合度在黄杜鹃中为 0.536, 在云锦杜鹃和满山红中分别为 0.517 和 0.534 (表 2)。黄杜鹃和云锦杜鹃内均存在 H_O 大于 H_E 的情况, 即杂合子过剩现象。相反, 满山红中 H_O 小于 H_E , 存

在纯合子过剩现象。经过 Bonferroni 校正 ($P < 0.005$), 黄杜鹃中有 3 个位点 (RsE-103、RsE-123、RsE-125) 严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡 (HWE)。云锦杜鹃种群中, RsE-23、RsE-117、RsE-125 等 3 个位点严重偏离平衡。满山红的 7 个多态性 SSR 位点处仅 RsE-103 偏离平衡。

表 2

3 个杜鹃种群的遗传多样性信息

Table 2

Genetic diversity of three *Rhododendron* species

	黄杜鹃 <i>R. molle</i>					云锦杜鹃 <i>R. fortunei</i>					满山红 <i>R. mariesii</i>				
位点	等位	Shannon	观察杂	期望杂	Hardy-	等位	Shannon	观察杂	期望杂	Hardy-	等位	Shannon	观察杂	期望杂	Hardy-
Locus	基因	信息	合度	合度	Weinberg	基因	信息	合度	合度	Weinberg	基因	信息	合度	合度	Weinberg
	Na	指数 I	H_O	H_E	平衡 HWE	Na	指数 I	H_O	H_E	平衡 HWE	Na	指数 I	H_O	H_E	平衡 HWE
RsE-19	2.00	0.69	0.625	0.525	0.637	4.00	1.11	0.800	0.651	0.320	1.00	0.00	0.000	0.000	—
RsE-23	2.00	0.58	0.529	0.401	0.165	3.00	0.94	0.000	0.611	0.000	1.00	0.00	0.000	0.000	—
RsE-103	4.00	1.32	1.000	0.740	0.001	2.00	0.68	0.857	0.508	0.007	4.00	1.21	0.222	0.706	0.000
RsE-104	2.00	0.62	0.632	0.444	0.056	2.00	0.69	0.917	0.518	0.005	3.00	1.08	0.571	0.703	0.011
RsE-110	6.00	1.49	1.000	0.758	0.007	6.00	1.46	0.917	0.746	0.456	4.00	1.26	0.500	0.733	0.062
RsE-117	4.00	1.15	0.750	0.676	0.051	2.00	0.24	0.000	0.129	0.000	5.00	1.33	1.000	0.711	0.532
RsE-123	2.00	0.45	0.000	0.290	0.000	2.00	0.24	0.133	0.129	0.847	4.00	1.35	1.000	0.774	0.054
RsE-125	4.00	1.04	0.846	0.619	0.000	6.00	1.63	0.929	0.815	0.001	5.00	1.27	0.714	0.703	0.102
RsE-129	2.00	0.55	0.476	0.372	0.178	3.00	0.81	0.933	0.545	0.014	2.00	0.65	0.700	0.479	0.120
平均值	3.11	0.88	0.651	0.536		3.33	0.87	0.610	0.517		3.22	0.91	0.523	0.534	
St. Dev	1.45	0.38	0.309	0.170		1.66	0.48	0.428	0.242		1.56	0.56	0.381	0.314	

2.2 种群间的遗传分化

从表 3 可以看出,在 9 个微卫星位点处,3 种杜鹃花的 F_{it} 为 $-0.5171 \sim -0.7426$,平均值为 -0.0759 。 F_{is} 为 $-0.5690 \sim -0.4538$,平均值为 -0.1733 。如此低的 F_{is} 和 F_{it} 值表明 3 个杜鹃花种群内存在近交现象。 $RsE-129$ 位点处的种群内近交系数 F_{is} 和总近交系数 F_{it} 都是最小的,而 $RsE-23$ 的种群内近交系数 F_{is} 和总近交系数 F_{it} 都是最大的。 F_{st} 值为 $0.0331 \sim 0.5287$,平均值为 0.2124 ,表明 21.24% 的遗传变异发生在种群间,而发生在种群内的遗传变异占 78.76%。9 个位点的 F_{st} 差异较大,即不同的位点对环境压力的遗传分化程度不同。位点 $RsE-129$ 、 $RsE-110$ 、 $RsE-104$ 、 $RsE-125$ 处的基因流 (Nm) 均大于 1,尤其是 $RsE-129$ 位点高达 7.2971,此 4 个位点较高的基因交流水平能够抵抗遗传漂变导致的种群分化。其余 5 个位点处的基因流均小于 1,较低的基因流表明此位点很可能由于遗传漂变而产生分化^[8]。

表 3 9 个微卫星位点的遗传分化和基因流信息

Table 3 Summary of genetic variation and gene flow at 9 loci

位点	种群内近交系数	总近交系数	遗传分化系数	基因流
Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
RsE-19	-0.271 1	0.100 8	0.292 6	0.604 4
RsE-23	0.453 8	0.742 6	0.528 7	0.222 9
RsE-103	-0.110 0	0.112 9	0.200 8	0.994 9
RsE-104	-0.340 1	-0.236 4	0.077 4	2.980 9
RsE-110	-0.128 5	-0.062 6	0.058 4	4.033 6
RsE-117	-0.200 1	0.126 4	0.272 1	0.668 8
RsE-123	0.003 4	0.220 1	0.217 4	0.899 9
RsE-125	-0.224 0	-0.020 3	0.166 5	1.251 7
RsE-129	-0.569 0	-0.517 1	0.033 1	7.297 1
平均值	-0.173 3	0.075 9	0.212 4	0.927 0

2.3 3个杜鹃种的聚类分析

3个种群间 Nei's 遗传距离(D)为 0.516 3~0.683 8,遗传一致度为 0.380 0~0.661 1(表 4)。黄杜鹃和云锦杜鹃的遗传距离最小,遗传一致度

表 4

3 个种群间遗传距离和遗传一致度

Table 4

The genetic distance and genetic identify

	黄杜鹃 <i>R. molle</i>	云锦杜鹃 <i>R. fortunei</i>	满山红 <i>R. mariesii</i>
黄杜鹃 <i>R. molle</i>	—	0.683 8	0.516 3
云锦杜鹃 <i>R. fortunei</i>	0.380 0	—	0.585 3
满山红 <i>R. mariesii</i>	0.661 1	0.535 6	—

注:数字表示分支长度。

Note: Number representing length.

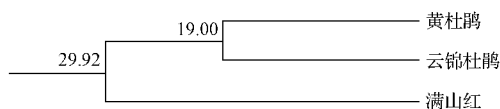


图 1 根据 Nei's 遗传距离绘制的 UPGMA 聚类树

Fig. 1 Dendrogram based on Nei's genetic distance with the method of UPGMA

最大(0.683 8)。黄杜鹃和满山红的遗传距离最大,遗传一致度最小(0.516 3)。因此,在聚类分析中,黄杜鹃和云锦杜鹃首先被聚类在一起,满山红则独立成一支(图 1)。

3 讨论

微卫星标记被用于多个物种的遗传多样性和遗传变异研究^[9-11]。此外,微卫星有较强的跨物种检测效率,因此选择近缘物种中的微卫星标记进行分析是十分可行的^[5]。遗传多样性代表的是物种适应环境的能力,多样性越高,则物种越容易在新的环境中生存,更能适应环境的变化。该研究所选的微卫星位点,扩增的等位基因为 3~7 个,能够反映出 3 个杜鹃种群的遗传多样性和遗传变异情况。

平均期望杂合度常用来反映群体的遗传多样性程度,并且不受样本大小的影响^[12]。TAKEZAKI 等^[13]认为种群内每个微卫星位点的期望杂合度在 0.3~0.8,则具有较高的遗传多样性。在黄杜鹃、云锦杜鹃、满山红 3 个杜鹃种群中,平均期望杂合度分别为 0.536、0.517、0.534,因此 3 个种群内均存在丰富的遗传多样性。反映种群内近交系数的 F_{is} 和总近交系数的 F_{it} 值均在 -1~1 范围内,大于 0 表示杂合子缺失,小于 0 表示杂合子过剩^[3]。黄杜鹃和云锦杜鹃内杂合子过剩现象,满山红则纯合子相对过剩,可能是不同的杜鹃

种对环境压力近交程度不同。

吕召云等^[14]的研究表明,当代表种群间分化程度的 F_{st} 小于 0.05 时,种群间分化很小或几乎无分化; F_{st} 值在 0.05~0.15 时,种群间呈中度分化; F_{st} 在 0.15~0.25 时,种群间明显分化;当 F_{st} 大于 0.25 时,种群间极度分化。在所检测的 9 个 SSR 位点处,1 个位点(RsE-129)处几乎无分化,2 个位点属于中度分化,3 个位点明显分化,还有 3 个位点属于极度分化。面对相同的选择压,黄杜鹃、云锦杜鹃、满山红基因组的不同位点表现出不同的分化程度,与以往结果一致^[15]。

2 个种群间 Nei's 遗传距离越小,亲缘关系越近,遗传一致度越小,亲缘关系越远^[15]。该研究发现黄杜鹃和云锦杜鹃亲缘关系最近,满山红与二者的亲缘关系相对较远。与满山红相比,黄杜鹃和云锦杜鹃的生境条件相对比较接近,较短的地理距离使得种群间基因交流频繁,因此黄杜鹃和云锦杜鹃 2 个物种进化方向较为一致。该研究为后续大别山野生杜鹃资源的保护和可持续性利用提供了依据,也丰富了目前杜鹃花科物种进化的研究案例。

参考文献

- [1] PRAKASH D, UPADHYAY G, SINGH B N, et al. Free radical scavenging activities of Himalayan *Rhododendrons* [J]. Current Science, 2007, 92(4): 1583-1598.
- [2] 兰熙, 张乐华, 张金政, 等. 杜鹃花属植物育种研究进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1829-1838.
- [3] KLOCKE J A, HU M Y, CHIU S F, et al. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle* [J]. Phytochemistry, 1991, 30(6): 1797-1800.
- [4] 刘晓青, 苏家乐, 陈璐, 等. 杜鹃花品种(种)间杂交 F1 代主要观赏性状的遗传表现 [J]. 江苏农业学报, 2012(2): 459-460.
- [5] WANG S, PAN L, HU K, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica cha-*

- rantia (Cucurbitaceae)[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(8): e75-e78.
- [6] WANG S, LI Z, JIN W, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Rhododendron simsii* (Ericaceae)[J]. Plant Species Biology, 2017, 32: 100-103.
- [7] WU Z H, WANG S Z, HU J H, et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Sagittaria trifolia* var. *sinensis* (Alismataceae)[J]. American Journal of Botany, 2011, 98(2): 36-38.
- [8] WHITLOCK M C, MCCAULEY D E. Indirect measures of gene flow and migration: F_{st} not equal to $1/(4Nm + 1)$ [J]. Heredity, 1999, 82(2): 117-125.
- [9] BARKER J S, MOORE S S, HETZEL D J, et al. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): Microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci[J]. Animal Genetics, 2015, 28(2): 103-115.
- [10] BAKOUMÉ C, WICKNESWARI R, SIJU S, et al. Genetic diversity of the world's largest oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) field genebank accessions using microsatellite markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2015, 62(3): 349-360.
- [11] ABEBE A S, MIKKO S, JOHANSSON A M. Genetic diversity of five local Swedish chicken breeds detected by microsatellite markers[J]. PloS One, 2015, 10(4): e0120580.
- [12] FRANKHAM R, BALLOU J D, BRISCOE D A. Introduction to conservation genetics[M]. New York: Cambridge University Press, 2002.
- [13] TAKEZAKI N, NEI M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA[J]. Genetics, 1996, 144: 389-399.
- [14] 吕召云, 杨茂发, 师沛琼, 等. 贵州省烟蚜遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(13): 2685-2694.
- [15] 师沛琼, 杨茂发, 吕召云, 等. 贵州省烟青虫遗传多样[J]. 中国农业科学, 2014, 47(9): 1836-1846.

Genetic Diversity and Genetic Structure of Three *Rhododendron* Species Located on Dabie Mountains

WANG Shuzhen, AI Sha, ZHANG Lin, LI Zhiliang, XIANG Fu, JIN Weibin

(Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000)

Abstract: Dabie Mountains provides unique habitat for *Rhododendron* resources, and is an important diversity distribution center of *Rhododendron* genus in China. In this study, three *Rhododendron* species, including *Rhododendron molle* (Blume) G. Don, *Rhododendron fortunei* Lindl., and *Rhododendron mariesii* Hemsl. et Wils., were selected for genetic diversity and genetic structure analysis with 9 microsatellite markers. The results showed that 45 alleles were obtained, and observed number of alleles per locus ranged from 3 to 7. Shannon index ranged from 0.87 to 0.91. Moreover, H_O and H_E were in the ranges of 0.523–0.651 and 0.517–0.536, respectively. The mean value of F_{it} and F_{is} were 0.075 9 and -0.173 3, respectively, indicating inbreeding took place in all three populations. The average gene flow at each locus was 0.927 0. In the cluster analysis, *R. molle* was clustered with *R. fortunei*, inferring closer relations between these two species. This study would lay the foundation for the evolutionary study of *Rhododendron* species.

Keywords: *Rhododendron*; genetic diversity; population structure; microsatellite; relationship