维普资讯 http://www.cqvip.com

广 西 植 物 Guihaia 20 (4): 377—382, T007 2000 年 11 月

文章编号: 1000-3142(2000)04-0377-06

Q949.772.3

九种杜鹃属植物的遗传分化研究

高连明[1], 张长芹[1], 王中仁[2]

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204; 2. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘 要: 采用水平淀粉凝胶电泳技术, 对 9 种杜鹃属 (*Rhododendron*) 植物的遗传分化进行了初步研究。对 10 个酶系统的 14 个等位酶位点的检测表明, 9 种杜鹃花在种内个体间的遗传变异水平较高, 多态位点比率数为 P=28.6%～57.1%, 等位基因平均数 A=1.3～1.9, 平均预期杂合度 He=0.111～0.319, 平均观察杂合度 Ho=0.083～0.381, 种间的多态位点比率非常高 P=100%, 这说明杜鹃属种间的遗传分化较高, 具有丰富的遗传多样性。杂合性基因多样化比率 Fst=0.683, 表明各种间存在明显的遗传分化现象。

关键词: 杜鹃属; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q949.772.3 **文献标识码**: A

杂交育种 系统分类

Genetic differentiation of nine species of *Rhododendron* revealed by allozyme analysis

GAO Lian-ming[1], ZHANG Chang-qin[1], WANG Zhong-ren[2]

(1. *Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China; 2. *Laboratory of Systemstic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093, China)

Abstract: Genetic diversity of nine species of *Rhododendron* was studied by using horizontal starch gel electrophoresis. Allozyme data for 14 loci of 10 enzymes showed that genetic variability within nine species of *Rhododendron* studied here was high, with P=28.6%～57.1%, A=1.3～1.9, He=0.111～0.319, Ho=0.083～0.381. However, the proportion of polymorphic loci was very high across all species, P=100% which suggested high level of genetic variability among nine species of *Rhododendron*. The Fst was 0.683, which showed that there might exist a high degree of genetic differentiation among nine species of *Rhododendron*.

Key words: *Rhododendron*; genetic diversity; genetic differentiation

收稿日期: 1999-09-14

作者简介: 高连明 (1972-), 男, 在读博士研究生, 硕士期间主要从事杜鹃属植物的引种驯化及杂交育种研究, 现从事杜鹃属的分子地理学研究工作。

基金项目: 云南省应用基础基金项目 (98C090M)

维普资讯 http://www.cqvip.com

物种的遗传多样性是长期进化的产物，也是其生存和发展的前提[1]。了解物种的遗传多样性和群体的遗传结构，可为物种的保护和利用提供重要的理论依据[2]。杜鹃属（*Rhododendron*）是杜鹃花科（Ericaceae）中最大的一个属，全世界约有960余种，广布于亚洲、欧洲和北美洲，特别是温带或热带、亚热带高山地区。我国有杜鹃属植物560多种，主要产于云南、四川和西藏三省区，是现代杜鹃花的分布中心之一[3]。但目前对杜鹃属的遗传分化研究仅见较少的报道[4~6]，而国内目前还未见这方面的报道。本文利用酶电泳技术，对杜鹃属的遗传分化进行初步研究，为杜鹃属的杂交育种提供科学依据，同时为物种间的亲缘关系、系统进化及系统分类等研究积累遗传学资料。

1 材料和方法

1.1 材料来源

本实验材料所用的9种杜鹃花均栽植在中国科学院昆明植物园内，它们来自杜鹃属8个亚属中的5个亚属。对9种杜鹃花进行个体采样，上述材料的代号及样本大小见表1。凭证标本存放于昆明植物园标本室内。1998年4月，将刚萌发新叶的幼枝剪下，插入水中保鲜，备用。

表1 材料来源

Table 1 Origin of materials

种类 Species	所属亚属 Subgen.	缩写 Abbrev.	产地 Locality	样品数量 Quantity	凭证标本 Voucher
碎米花 *R. spiciferum*	*Pseudorhorastrum*	SPIC	昆明	10	9704001
粉红爆杖花 *R. duclouxii***	*Pseudorhorastrum*	DUCL	昆明	10	9704003
爆杖花 *R. spinuliferum*	*Pseudorhorastrum*	SPNU	昆明	10	9704004
基毛杜鹃 *R. rigidum*	*Rhododendron*	RIGI	云南	8	9704013
羊踯躅 *R. molle*	*Pentanthera*	MOLL	云南	10	9704026
锦绣杜鹃 *R. pulchrum*	*Tsutsusi*	PULC	云南	10	9704007
大白花杜鹃 *R. decorum*	*Hymenanthes*	DECO	云南	10	9704016
马缨杜鹃 *R. delavayi*	*Hymenanthes*	DELA	云南	10	9704017
露珠杜鹃 *R. irroratum*	*Hymenanthes*	IRRA	云南	10	9704019

* 亚属按 Sleumer 系统划分 Subgenus was divided by Sleumer system

** 粉红爆杖花是碎米花(♀)×爆杖花(♂)的杂交种 *R. duclouxii* is a hybrid of *R. spiciferum*(♀)×*R. spinuliferum*(♂)

1.2 酶电泳实验

取每个单株的新鲜幼嫩叶2~4片，剪碎，用复杂磷酸提取缓冲液（pH=7.5）[7]，冰镇研磨提取酶液，再用6 mm×2 mm小滤纸条蘸取酶液匀浆，置于-70 ℃超低温冰箱中保存备用。取出冰冻的芯子，迅速滴加2%的2-羟基乙醇，然后上胶电泳。采用水平式淀粉凝胶电泳技术，所用水解淀粉为美国Sigma公司产品（S-4501），淀粉胶浓度为12.5%。采用3种凝胶缓冲系统对13种酶系统进行检测，获得酶谱清晰的10个酶系统共14个等位酶位点（表2）。所采用的凝胶缓冲系统 Ⅰ. 硼酸钠/Tris-柠檬酸（pH=8.6）缓冲液，Ⅱ. 柠檬酸三钠/0.005 mol/L 组氨酸缓冲液（pH=7.7），以上2种根据Soltis等（1983）稍加调整而成。Ⅲ. 吗啡啉—柠檬酸缓冲液（pH=7.5），据Werth（1985）[8]调整而成。酶的组织化学染色方法详见文献〔7，9〕。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 等位酶分析及数据处理

等位酶和等位基因的命名如下：酶的缩写字母代表该酶系统，连字符后的阿拉伯数字代表不同的位点，愈靠近正极的位点用愈小的阿拉伯数字表示。如每个基因位点有多个等位基因，则在该位点数字后面再加上小写英文字母的 a、b、c、……等表示[12]。对等位酶位点和等位基因的确定则依据文献〔9～11〕。

遗传多样性以常规的多态位点比率 P（Proportion of polymorphic loci）、等位基因平均数 A（Average number of alleles per locus）、平均预期杂合度 He（Average expected heterozygosity）和平均观察杂合度 Ho（Average observed heterozygosity）来度量。用 Nei（1975）的杂合性基因多样度的比率 Fst（Ratios of gene diversities of heteroygosities）和遗传一致度 I（Genetic identity）来度量居群间遗传分化的大小及来源关系，并进行聚类分析，得出各种间的聚类分支图。上述各项参数的计算均由 BIOSYS-1[12] 软件完成。各遗传参数的意义见文献〔2，13〕。

2 实验结果

本研究对杜鹃属中 9 种杜鹃花进行了 13 个酶系统的检测，其中有 10 个酶系统获得了清晰稳定的酶谱，对 9 种杜鹃花的酶谱分析表明，共获得 16 个等位酶位点，其中 2 个酶位点分离效果不好，不做进一步分析。只对 10 个酶系统的 14 个酶位点进行群体遗传学分析。包括酶系统的种类、缩写、酶分类编码、检测所用缓冲系统及酶位点数目详见表 2。

表 2　电泳检测所用酶系统、凝胶缓冲系统和位点数目

Table 2　The enzyme system and electrophoretic data

酶系统 Enzyme	缩写 Abbreviation	酶分类编号 EC no.	缓冲系统 Gelbuffer	位点数目 No. of loci
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotrans-ferase	AAT	E. C. 2. 6. 1. 1	I	1
乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	ADH	E. C. 1. 1. 1. 1	I	1
6-磷酸葡萄糖脱氢酶 6-Phosphate dehydrogenase	G6PD	E. C. 1. 1. 1. 49	II	1
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	IDH	E. C. 1. 1. 1. 42	II	1
亮氨酸氨基肽酶 Leucina-amino peptidase	LAP	E. C. 3. 4. 11. 1	III	1
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	MDH	E. C. 1. 1. 1. 37	I	3
6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-Phosphogluconate dehydrogenase	PGD	E. C. 1. 1. 1. 44	II	2
磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucor isomarase	PGI	E. C. 5. 3. 1. 9	I	2
磷酸葡萄糖变位酶 *Phosphoglucomutase*	PGM	E. C. 2. 7. 5. 1	II	1
莽草酸脱氢酶 Shikemate dehydrogenase	SKD	E. C. 1. 1. 1. 25	II	1

2.1 遗传变异性

对杜鹃属 9 种杜鹃花的群体遗传学分析表明，在所确定的 14 个等位酶位点中，全部是多

维普资讯 http://www.cqvip.com

态的，多态位点比率P=100%，多态位点的等位基因较为丰富。在各种杜鹃花内部个体间存在较高的遗传变异性，多态位点比率P=28.6%～57.1%。根据对9种杜鹃花14个酶位点计算出的遗传变异性指标表明，种间遗传分化明显（表3）。

由表3可看出：等位基因频率A为1.3～1.9，平均预期杂合度He为0.111～0.319，平均观察杂合度Ho为0.083～0.381，固定系数F为-0.646～0.252，除羊踯躅（MOLL）外，固定系数F均为负值，说明各种内部的杂合体较多，基因交流频繁。

表3 杜鹃属9个种在14个位点的遗传变异性指标

Table 3 Genetic variability at 14 loci in nine species of *Rhododendron*

Species (abbr.)	A	P	Ho	He	F
1. SPIC	1.6	42.9	0.286	0.248	-0.15
2. DUCL	1.6	42.9	0.295	0.226	-0.305
3. SPNU	1.6	42.9	0.286	0.227	-0.260
4. RIGI	1.4	35.7	0.214	0.200	-0.07
5. MOLL	1.3	28.6	0.083	0.111	0.252
6. PULC	1.4	35.7	0.321	0.195	-0.646
7. DECO	1.5	42.9	0.357	0.235	-0.519
8. DELA	1.9	57.1	0.381	0.319	-0.194
9. IRRO	1.7	35.7	0.265	0.224	-0.183

2.2 种间的遗传分化大小

由表3数据可知，各种间的遗传多样性较为丰富，可能存在明显的遗传分化。对10个酶系统的14个等位酶位点进行F-统计量分析，结果见表4。由表4可知，在种间，杂合性基因多样化比率Fst的平均值为0.683，表明具有较高的遗传分化。在14个等位酶位点中，AAT、G6PD、MDH-2、PGD-1、SKD杂合性基因多样比率Fst=1，说明各种间具有显著的遗传分化，等位基因完全不同。

表4 14个等位酶位点的F-统计量

Table 4 Summary of F-statistics of 14 loci

位点 Locus	AAT	ADH	G6PD	IDH	LAP	MDH-1	MDH-2	MDH-3	PGD-1	PGD-2	PGI-1	PGI-2	PGM	SKD	Mean
F(IS)	—	-0.068	—	-0.878	-0.393	0.928	—	0.308	—	0.628	0.909	0.600	-0.667	—	-0.345
F(IT)	1.000	0.652	1.000	0.220	0.223	1.000	1.000	-0.260	1.000	0.308	0.955	0.840	-0.123	1.00	0.571
F(ST)	1.000	0.784	1.000	0.585	0.442	1.000	1.000	-0.82	1.000	-0.86	0.506	0.599	0.326	1.00	0.683

表5 9种杜鹃花之间的遗传相似性

Table 5 Genetic similarity of nine species of Rhododendron

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SPIC		0.984	0.925	0.263	0.093	0.155	0.488	0.345	0.390
DUCL	0.016		0.956	0.266	0.075	0.167	0.466	0.339	0.407
SPNU	0.078	0.045		0.247	0.075	0.167	0.471	0.319	0.441
RIGI	1.336	1.324	1.400		0.384	0.449	0.255	0.487	0.256
MOLL	2.377	2.586	2.585	0.958		0.329	0.289	0.290	0.203
PULC	1.865	1.791	1.790	0.801	1.112		0.375	0.509	0.279
DECO	0.717	0.763	0.753	1.367	1.242	0.980		0.685	0.673
DELA	1.064	1.083	1.142	0.720	1.239	0.676	0.379		0.578
IRRO	0.942	0.900	0.819	1.363	1.595	1.276	0.395	0.549	

Below diagonal: Nei (1978) unbiased genetic distance; Above diagonal: Nei (1978) unbiased genetic identity

2.3 种间的遗传一致度及聚类分支图

根据9种杜鹃花每个酶位点的基因频率计算出9种杜鹃花之间的遗传一致度大小见表5。从表5可以看出，碎米花、粉红爆杖花和爆杖花杜鹃之间的遗传相似性最高，为0.925～

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.984，这3种杜鹃与其它杜鹃的遗传相似性则较低，而与羊踯躅之间的遗传相似性最低，为0.075～0.093，说明它们之间的亲缘关系最远。

根据种间的遗传一致度和遗传距离，按照Nei(1978)[14]的方法进行不加权平均聚类分析，结果如图1，从分支图中可以看出，这9种杜鹃花之间的亲缘关系的远近，遗传相似性愈高，亲缘关系愈近。

3　讨　论

等位酶电泳技术是目前检测遗传多样性最为普遍的方法之一，且简便易于操作。目前裸子植物是迄今研究最为详细的类群之一[15]。由于裸子植物寿命长，风媒异花授粉，结实量大，基因交流频繁，十分有利于维持高水平的遗传变异性和低水平的群体分化[16]。而杜鹃同样具有寿命长，异花授粉，结实量大，基因交流频繁等特点，因此在种内有较高的遗传变异性和较低的遗传分化。本研究的检测结果表明，羊踯躅(MOLL)在种内个体间存在较低的遗传变异性和较高的遗传分化，P=28.6%，He=0.111，Ho=0.083，其它8种杜鹃花的检测结果为P=35.7%～57.1%，He=0.195～0.319，Ho=0.214～0.381，Fst=0.683(平均值)，表明种内个体之间存在较高的遗传变异和较低的遗传分化，种间个体间遗传分化明显。

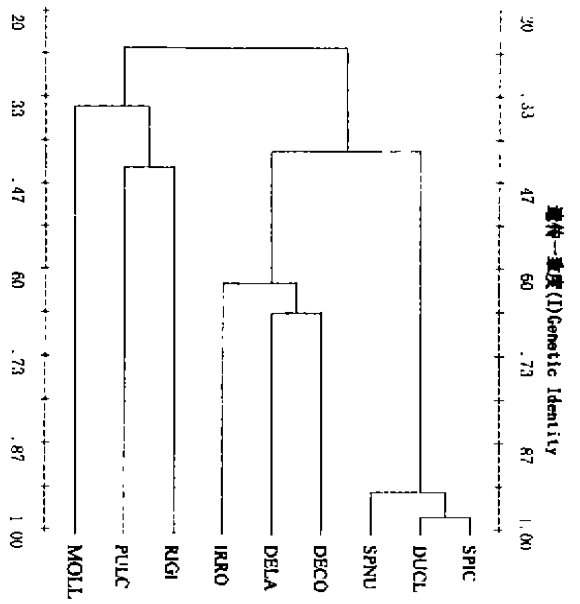


图1　9种杜鹃花的聚类分支图

Fig. 1　Cladogram of nine species based on cluster analysis of allozymes

本研究中，羊踯躅的多态位点比率P=28.6%，He=0.111，Ho=0.083，说明在羊踯躅种内遗传变异水平较低。固定指数F=0.252，表明种内杂合体较少。因为羊踯躅亚属在中国仅有羊踯躅一种，所以在自然界很难同本属的其它种类进行基因交流，如果居群不大或分布较分散，必然导致遗传上的漂变，其直接后果就是遗传变异的下降和种内出现分化。因此它与其它种类的杜鹃花遗传一致度较低I=0.075～0.329。在本研究的9种杜鹃花中，马缨花(DELA)的遗传变异最高，为p=57.1%，He=0.319，Ho=0.381。可能由于其在自然界中易于受粉且自然杂交频繁，寿命长，地理分布广，结实量大等原因。

从聚类分析分支图可以清楚的看出这9种杜鹃之间的亲缘关系和系统位置。亲缘关系越近，其遗传一致度越高I=0.925～0.984，在分支图上聚在一起，距离较近；亲缘关系越远，其遗传一致度越低，在分支图上的距离也越远。如同为糙叶杜鹃亚属的碎米花，粉红碎米花和爆杖花，它们的遗传一致度最高，在分支图上聚为一支，表明三者的亲缘关系最近；虽然马缨花、大白花杜鹃和露珠杜鹃同为常绿杜鹃亚属，但它们各自属于不同的亚组，遗传一致度较低，虽然在分支图上也聚为1支，但亲缘关系则较远。亚属之间的遗传一致度就更低了，

维普资讯 http://www.cqvip.com

在分支图上的距离也较远。

致谢 本文得到中国科学院植物研究所侯鑫先生的大力帮助。

参考文献：

[1] 葛 颂，洪德元. 遗传多样性及其检测方法 [C]. 见：钱迎倩，马克平主编. 生物多样性研究的原理和方法 [M]. 北京：中国科学技术出版社，1994，123～140

[2] 王中仁编著. 植物等位酶分析 [M]. 北京：科学出版社，1996

[3] 方瑞征，闵天禄. 杜鹃属植物区系的研究 [J]. 云南植物研究，1995，17 (4)：359～379

[4] Iqbal M J, Gray LE, Paden D W *et al*. Research Note: Feasibility of *Rhododendron* DNA Profiling by RAPD Analysis [J]. *Plant Varieties and Seeds*, 1994, 7: 59～63

[5] Iqbal M J, Paden D W, Lane Rayburn A. Clonal Stability of RAPD Markers in Three *Rhododendron* Species [J]. *Environ Hort*, 1995, **13** (1): 43～46

[6] Krebs S L, Normal Segregation of Allozyme Markers in Complex *Rhododendron* Hybrids [J]. *Journal of Heredity*, 1996, 7: 131～135

[7] Soltis D. E, Haufler C H, Darrow D C *et al*., Starch Gel Electroohresis of Ferns: A Compilation of Grinding Buffers, Gel and Electrode Buffers, and Staining Schedules [J]. *Amer Fern J*, 1983, **73** (1): 9～27

[8] Werth C R. Implementing and Isozyme Laboratory at a Field Station [J]. *Virginia J Sci*, 1985, **36** (1): 53～76

[9] 葛 颂，黄敏仁，许 农. 马尾松 GOT、LDH 和 MDH 同工酶的遗传方式和连锁关系 [J]. 遗传学报，1987，**14**：428～435

[10] 王中仁. 等位酶分析的遗传学基础 [J]. 生物学多样性，1994，**2** (3)：149～156

[11] 王中仁. 等位酶分析的遗传学基础 [J]. 生物学多样性，1994，**2** (4)：213～219

[12] Swofford D L, Selander R B. BIOSYS-I, a computer program for the analysis of allelicvariation in population genetics and biochemical systematics, releaseI [M]. 7. -D. L. Swofford, Illinois Natural History Survey Il, USA. 1989

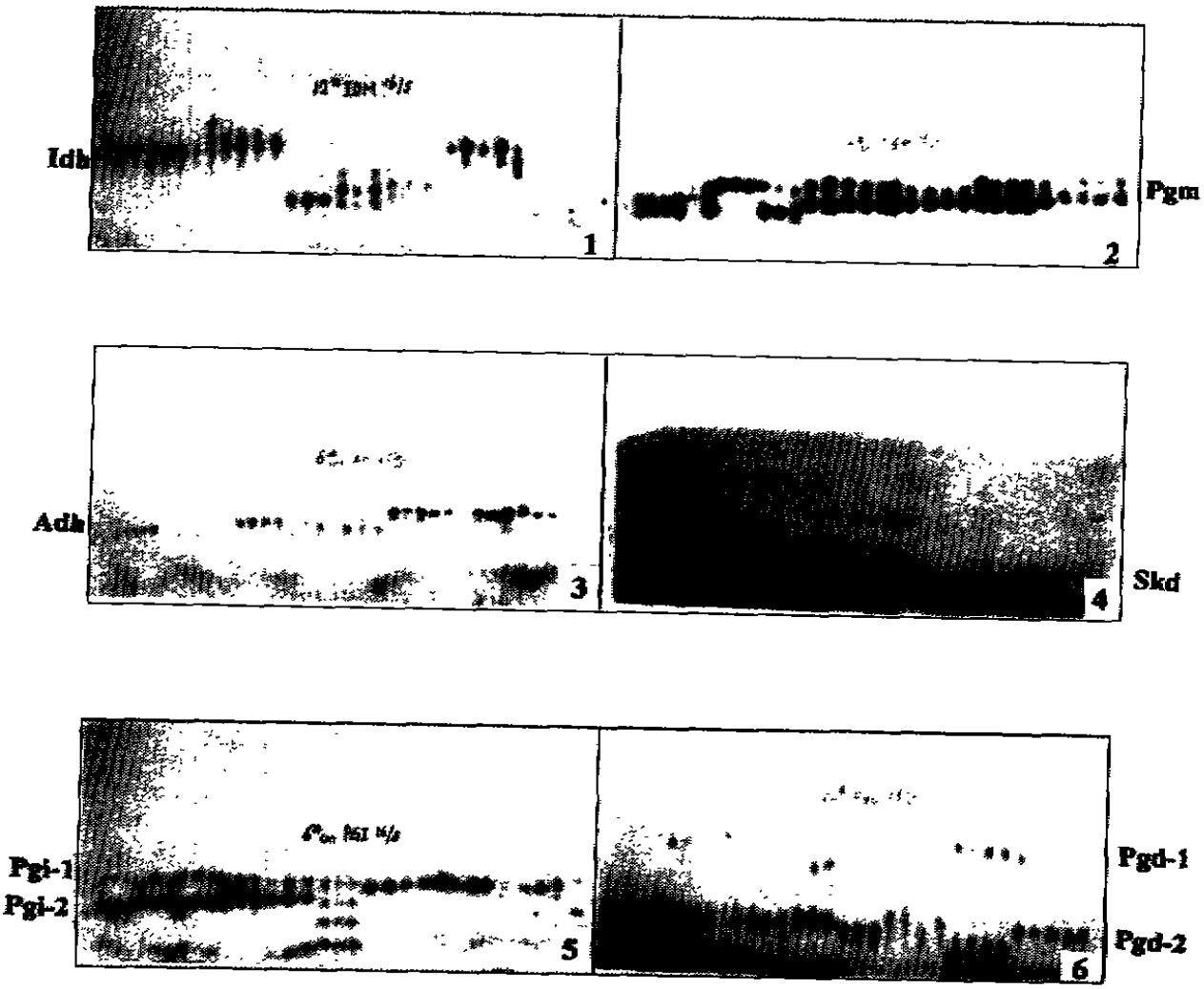
[13] Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution [M]. North Holland Publ. Co. , Amsterdam and New York. 1975

[14] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distancefrom a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, **8**: 583～590

[15] 葛 颂，王海群，张灿明等. 八面山银杉林的遗传多样性和群体分化 [J]. 植物学报，1997，**39** (3)：266～271

[16] El-Kassaby Y A. Genetic Variation Within and Among Conifer Populations: Review and Evaluation of Methods [C]. In: Fineschi S, Maluolti M E *et al*. Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees [M]. The Netherlands: Academic Publishing, 1991. 61～76

维普资讯 http://www.cqvip.com



1-4. 酶系统 Idh、Pgm、Adh 和 Skd 的多态位点的酶谱分离式样。5-6. 为酶系统 Pgi 和 Pgd 的酶谱式样，Pgi 和 Pgd 各有 2 个多态位点。
1-4. Band patterns of polymorphic loci of Idh, Pgm, Adh and Skd. Figs 5-6. Band patterns of Pgi and Pgd with two polymorphic loci.