

ISSR Analysis of Genetic Variation of *Rhododendron decorum* Franch.

Yefang Li¹, Jie Song², Wenling Guan^{1*}, Yuansheng Wu¹

¹College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan

²Flowers Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming Yunnan

Email: 593228699@qq.com, *158066692@qq.com

Received: Nov. 6th, 2018; accepted: Nov. 16th, 2018; published: Nov. 23rd, 2018

Abstract

The distribution of *Rhododendron decorum* Franch. in Yunnan Province has a high ornamental value. In this study, the genetic variation analysis was performed on three populations of *Rhododendron decorum* Franch. variegata distributed in Huize County and Shangri-La City of Yunnan Province using DNA molecular marker SSR technology, using 8 pairs of genomic SSR primers to inherit relationship analysis of 41 individual in *Rhododendron decorum* Franch. with white, pink, pink. The main results are as follows: 1) Genetic diversity analysis showed that a total of 80 loci were amplified, and the genetic diversity of three populations of *Rhododendron decorum* Franch. was higher. 2) Genetic structure analysis showed that the genetic distances of the three different flower color groups were far away. 3) Molecular analysis of variance showed that the variation of *Rhododendron decorum* Franch. was mainly in the population, accounting for 80%, and the variation between groups was only 20%. Therefore, this study suggests that the genetic diversity of different geographical populations of *Rhododendron decorum* Franch. is higher; the level of genetic differentiation is low and the similarity is high; the genetic variation is dominated by intra-population variation. There is no direct relationship between the kinship of *Rhododendron decorum* Franch. and the flower color. Therefore, when protecting the genetic diversity of *Rhododendron decorum* Franch., it is necessary to preserve as many specific individual plants as possible, so as to provide scientific evidence for the evaluation of *Rhododendron decorum* Franch. germplasm, excellent gene excavation and selection of resistant materials in Yunnan.

Keywords

Rhododendron decorum, SSR Marker, Genetic Diversity

大白花杜鹃遗传变异的ISSR分析

李叶芳¹, 宋杰², 关文灵^{1*}, 吴元圣¹

¹云南农业大学, 园林园艺学院, 云南 昆明

*通讯作者。

²云南省农业科学研究所, 花卉研究所, 云南 昆明
Email: 593228699@qq.com, *158066692@qq.com

收稿日期: 2018年11月6日; 录用日期: 2018年11月16日; 发布日期: 2018年11月23日

摘要

大白花杜鹃具有较高的观赏价值。本研究采用DNA分子标记SSR技术对分布于云南省会泽县和香格里拉市的大白花杜鹃3个种群进行遗传变异分析。利用8对基因组SSR引物对白色、粉色、粉红色3类不同花色的41个大白花杜鹃进行遗传关系分析, 主要结果如下: 1) 遗传多样性分析表明, 结果共扩增出位点80个, 3个大白花杜鹃群体的遗传多样性水平较高; 2) 遗传结构分析表明, 3个不同花色类群的遗传距离较远; 3) 分子方差分析表明, 大白花杜鹃的变异主要在种群内, 占80%, 群体间变异仅占20%。因此, 本研究认为: 大白花杜鹃不同地理群体的遗传多样性较高; 遗传分化水平低, 相似度高; 遗传变异以种群内变异为主。大白花杜鹃的遗传多样性与花色多样性无直接关系。所以, 保护大白花杜鹃的遗传多样性时, 应保存尽可能多的特异单株, 为云南大白花杜鹃种质的评价、优异基因挖掘和抗性材料选择等提供科学依据。

关键词

大白花杜鹃, SSR标记, 遗传多样性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

大白花杜鹃(*Rhododendron decorum* Franch.)是杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron* L.)的常绿灌木或小乔木, 又称大白花、白花树、羊角菜、白花菜和白豆花, 为我国特有种, 主要分布在四川、云南、贵州和西藏等地[1]。其花朵较大, 花朵繁多, 有香气, 极具观赏价值。其根、枝、叶可入药, 花冠可食用[2] [3], 因而是杜鹃花属中极具开发潜力的野生种质资源。

目前对大白花杜鹃的研究主要集中在抗旱生理、种子繁殖、扦插、组培、遗传多样性等方面[4] [5] [6] [7] [8], 有关其育种方面的研究极少, 仅见其杂交育种的零星报道[9]。野外调查发现, 大白花杜鹃植株的花色变异较为丰富, 但这些花色是否具有遗传差异还有待研究。为了了解植物遗传多样性, 广泛使用的技术有DNA分子标记技术等, 其原因是该技术具有准确度高且不受其他因素影响等优势, 常见的DNA分子标记有SSR、AFLP、SRAP、ISSR等[10]-[15], 其中SSR (Simple Sequence Repeat)是一种重复性好, 多态性较高的共显性分子标记。例如, 基于SSR标记的杜仲群体遗传多样性及遗传结构[16]; 河北野生狗牙根遗传多样性的SSR分析[17]; 大麦SSR标记遗传多样性及其农艺性状关联分析[18]。鉴于此, 本研究通过SSR标记技术对不同地理种群的遗传基础进行分析, 同时也可根据不同种群的遗传变异为该物种无性系选育和开发利用提供科学依据。

2. 材料和方法

2.1. 材料

供试材料(表1)大白花杜鹃采自云南省会泽县和香格里拉市的3个种群41个个体, 3个种群均含有丰

富的花色，这些花色可分为三个类群：白色、粉色和粉红色。采集植株的新鲜嫩叶片，要求采集植株向阳面的叶片，采集之后马上装进自封袋标记编号并且放入硅胶进行彻底干燥脱水。带回实验室提取基因组 DNA。采样时个体间距离在 10 m 以上，以防止同一无性系的不同分株。

Table 1. Germplasm resources of *Rhododendron decorum* Franch.

表 1. 大白花杜鹃样本来源

编号	个体数	采集地	海拔(m)	经度	纬度	样品采集时间
A	12	会泽野马川	2866	103.4163°E	26.1128°N	2017年5月16日
B	7	会泽驾车乡	2837	103.3379°E	26.0711°N	2017年5月16日
C	22	香格里拉石卡雪山	3370	99.6318°E	27.7952°N	2017年6月12日

2.2. 实验方法

2.2.1. 基因组 DNA 的提取

研究采用 CTAB 法[19]提取叶片基因组 DNA。提取完成后，使用 1%的琼脂糖凝胶电泳来检测所提取 DNA 的纯度，并测定 DNA 浓度后记录(ND-1000 UV Spectrophotometer, 美国)。并将 DNA 稀释至 50 ng/μL 备用。

2.2.2. SSR 分型标记

通过文献调研[8]，本研究选择了 8 对 SSR 引物(表 2)，并将 8 对引物在 5'端直接设计接上带有荧光基团的 M13 序列，采用了灵敏度优良、识别度好、价格适中的绿色荧光-HEX 和蓝色荧光-FAM。采用这 8 对荧光引物进行 PCR 扩增，反应体系为 20 μl，包括：2*MIX (昆明硕擎生物) 10 μL，正向引物 0.5 μL，反向引物 0.5 μL，ddH₂O 8 μL DNA 模板 1 μL (50 ng)。PCR 反应程序为：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 sec，53℃~56℃退火 30 sec，72℃延伸 30 s，循环 30 次，10℃终止程序。产物放置-20℃并且避光保存。

Table 2. Origin sequences of SSR primer pairs

表 2. SSR 原引物序列

引物	序列	修饰	片段大小	退火温度(°C)
Primer	Sequences(5'-3')	Modification	Fragment size/bp	Anneal temperature/°C
RDW1	R:GAAGGTGATCGTGTCGGAAT F:GCCTCTAACTACTTGCTCCA	5'-FAM	239~260	53
RDW15	R:GCATAACAAAACAGCAAACAG F:GAATCGAAAATAAGCCTTGG	5'-FAM	202~228	54
RDW16	R:CACCAAGCATCATGCCTCTA F:GGTGATCGTGTCGGAATACA	5'-FAM	241~270	54
RDW31	R: TGCCTCTAACTACTTGCTCC F:AAGGTGATCGTGTCGGAATA	5'-FAM	238~262	54
RDW35	R:GTGACTTCGGATTTCGTGGAG F:TAAGGTTGGTGTAGCGTGTA	5'-HEX	207~231	55
RDW38	R:AACAGCGACGAGAAAAGC F:GTGTTTAAAATTGTCGGC	5'-HEX	121~171	53
RDW44	R:CAAAACCCACTTGTTAGAT F:AGATCCGTATTTCTTGAGG	5'-HEX	206~236	54
RDW46	R:AGCAAGATAGAAACTCTGTAAC F:TCTCCAGAAGTACGCAAAT	5'-HEX	304~341	56

2.2.3. PCR 产物包装及测序

PCR 产物编号排序放入 96 孔板送出, 进行 STR 毛细电泳管进行测序, 公司选择为昆明硕擎生物公司, 测序仪器为 ABI3730XL, 采用的内标 Marker 为 Liz500。

2.3. 数据处理

测序公司返还获取 STR 毛细电泳扫描板数据包, 利用软件 Gene Mapper3.7 读取荧光数据, 并记录不同大小荧光标记的 PCR 扩增片段的基因型数据, 同时将数据录入 Office Excel 2010 中。

3. 实验结果与分析

本研究从已报到的 42 对 SSR 引物中筛选 8 对[8]进行 PCR 扩增, 送公司进行 STR 毛细电泳管测序, 利用软件 Gene Mapper3.7 读取荧光数据, 并记录基因型数据。如图 1 所示为选用的其中一对荧光引物所标记的条带示意图, 引物名称为 RDW35 样品名称为 C10 均标注于图片左上角。图中峰高超过 4000, 结果可靠。

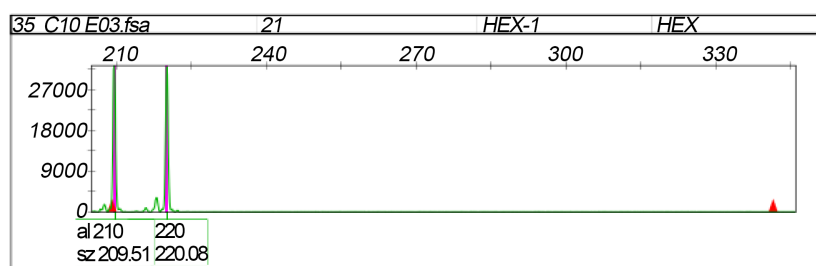


Figure 1. The results of fluorescent SSR of *Rhododendron decorum* Franch.

图 1. 大白花杜鹃微卫星位点荧光检测结果

本研究采用 GeneALEX6.5 [20] [21] 计算了大白花杜鹃 3 个花色类群的遗传多样性信息, 如表 3 所示, 每个类群的每位点等位基因数(N_a)为 7.125~11.5, 有效等位基因数(N_e)为 5.211~7.561, 最低值均为 C 类群, 最高值均为 A 类群。Shannon's 遗传多样性指数(I)本身没有遗传学意义, 主要用于与相关研究进行比较, 本研究中其均值为 2.008, 最低值出现在 C 类群, 最高值出现在 B 类群。观测杂合度(H_o)最低为 C 类群(0.713), 最高为 A 类群(0.800)。遗传多样性(H_e)有高到低依次为: B、A、C。近交系数(F)为 0.024~0.098。表中得出 A 种群的等位基因较多、遗传多样性指数较高, A 种群的杂合度较高。总体上, 大白花杜鹃的遗传多样性指数为 0.825, 可以看出大白花杜鹃具有很高的遗传多样性。

Table 3. Genetic diversity detection of three flower color groups of *Rhododendron decorum*

表 3. 大白花杜鹃 3 个花色类群的遗传多样性检测

Pop	sample	N	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
A	18	16.500	11.500	7.561	2.082	0.800	0.829	0.024
B	14	11.750	11.375	7.365	2.182	0.798	0.853	0.061
C	9	8.125	7.125	5.211	1.761	0.713	0.795	0.098

用 8 个 SSR 标记对 3 个大白花杜鹃不同类群进行了分析(表 4), 共检测到 80 个等位基因, 平均每个位点等位基因数(N_a)为 10 个。遗传多样性(H_e)范围为: 0.753~0.890, 最高值位点在 RDW38 存在 13 个等位基因, 具有的有效等位基因数(N_e)并不是最多; 观测杂合度(H_o)范围为 0.649~0.939。类群内固定指数(F_{is})范围为-0.055~0.251, 均值为 0.492; 总类群间固定指数(F_{it})范围为-0.026~0.297, 均值为 0.751; 基

因流(Nm)范围为 3.883~14.120, 均值为 7.381; Shannon's 遗传多样性指数(I)范围为 1.630~2.325, 其均值为 2.008。

Table 4. Genetic diversity of 8 SSR marker locus in *Rhododendron decorum*

表 4. 大白花杜鹃 8 个 SSR 标记位点遗传多样性

Primer code	N	Na	Ne	I	Ho	He	F	Fis	Fit	Fst	Nm
RDW1	12.667	7.000	4.066	1.630	0.745	0.753	0.011	0.011	0.028	0.017	14.120
RDW15	11.333	9.000	6.624	1.989	0.752	0.838	0.102	0.102	0.140	0.042	5.658
RDW16	13.333	8.000	4.272	1.672	0.815	0.754	-0.090	-0.081	-0.037	0.041	5.898
RDW31	13.667	7.667	4.234	1.656	0.823	0.756	-0.089	-0.088	-0.066	0.021	11.915
RDW35	12.333	12.000	7.520	2.208	0.649	0.863	0.255	0.247	0.268	0.028	8.567
RDW38	12.333	13.000	8.981	2.325	0.657	0.877	0.252	0.251	0.297	0.060	3.883
RDW44	12.333	11.667	9.337	2.314	0.939	0.890	-0.055	-0.055	-0.026	0.027	9.010
RDW46	9.000	11.667	8.663	2.273	0.782	0.874	0.103	0.105	0.147	0.046	5.180

AMOVA 分析(表 5)显示, 有 20%的变异发安生在种群间, 80%的变异发生在种群内。

Table 5. Analysis of molecular structure variance (AMOVA) of three flower color groups of *Rhododendron decorum*

表 5. 大白花杜鹃 3 个花色类群遗传结构分子方差(AMOVA)分析

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Indiv	38	158.353	4.167	0.699	20%
Within Indiv	41	113.500	2.768	2.768	80%
Total	81	280.878		3.481	100%

由表 6 可知, 大白花杜鹃三个花色类群(A、B、C)间 Nei's 遗传距离范围为 0.252~0.402。B 和 C 之间的遗传距离最远为 0.042, A 和 B、A 和 C 之间的遗传距离较为相近, 分别为 0.252、0.256。

Table 6. Nei's genetic distance between *Rhododendron decorum*

表 6. 大白花杜鹃类群间 Nei's 遗传距离

	A	B	C
A	0.000		
B	0.252	0.000	
C	0.256	0.402	0.000

利用三个种群的 Nei's 遗传距离进行主坐标分析, 图 2 所示, 看出三个种群之间的遗传距离都较远。

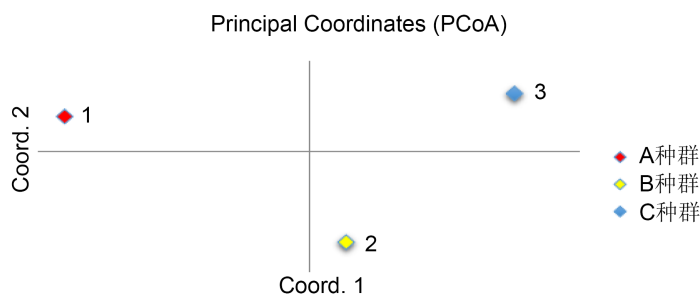


Figure 2. Results of PCoA for 3 populations

图 2. 三个种群的主坐标分析

利用 41 个个体的遗传距离进行主坐标分析, 图 3 所示, 看出 A 种群和 C 种群的个体在遗传距离上较为集中, 而 B 种群的个体较为分散, 且个体 B1 与其它个体的遗传距离都较远。说明 B1 与其他个体间的遗传距离都很远。

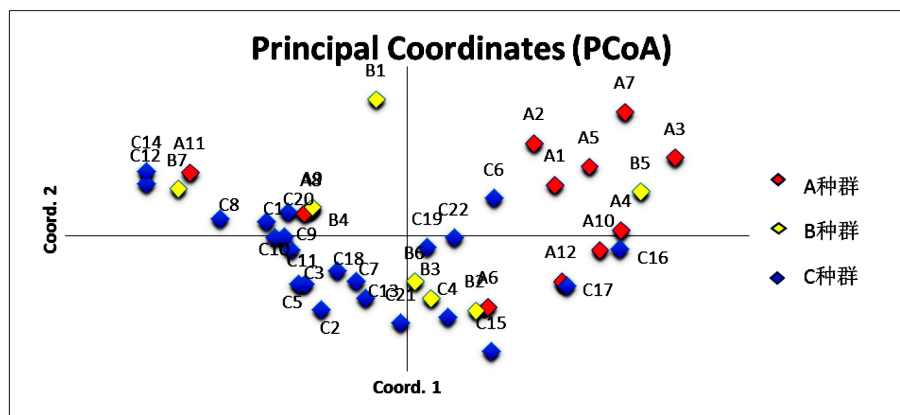


Figure 3. Results of PCoA for 41 individuals

图 3. 41 个个体的主坐标分析

4. 结论与讨论

本文将 41 个大白花杜鹃根据花色不同, 分为白色、粉色、粉红色 3 个类群, 遗传距离范围为 0.252~0.402。遗传多样性和遗传结构分析结果表明: 大白花杜鹃具有很高的遗传多样性和杂合度, 大白花杜鹃的遗传多样性高与其分布范围广、花周期长、种子具翅、异花授粉等生物特性相符合。3 个群体 41 个个体基于 8 对基因组 SSR 引物位点的观测杂合度在 0.649~0.939 之间, 平均为 0.770; 期望杂合度在 0.753~0.890 之间, 平均为 0.825, 高于 Naito 等对日本的 *R. metternichii* var. *hondoense* 研究结果(HE = 0.639 - 0.792) [22], 高于王雪芹的研究结果(HE = 0.758) [8]。在遗传结构上表明, 各个地理种群之间的遗传变异不大, 主要的遗传变异集中于个体间的变异。不同花色群体之间的遗传差异较小, 差异主要集中在个体间。这个结果与 Liu 等研究长白山的牛皮杜鹃(*Rhododendron aureum* Georgi)结果相似[23]。这说明花色的多样性与遗传多样性无直接关联。研究表明, 分布范围较广且以异交为主、种子靠风传播的木本植物的遗传多样性差异往往存在于居群内, 而居群间的遗传多样性差异低。据此, 在大白花杜鹃中有较高的居群内遗传变异是合理的[2]。研究表明, 人类采集活动对大白花杜鹃遗传多样性及遗传结构的影响不显著[8]。因此, 可以推测, 在野外该物种能够维持较高的遗传多样性和杂合度以更好的适应环境。本研究利用 SSR 分析标记技术对云南省两个地区的大白花杜鹃种质资源遗传多样性进行初步分析, 从而为新品种选育和优异基因发掘提供依据。

基金项目

云南省花卉育种重点实验室开放基金项目(项目编号 FKL-201502)。

参考文献

- [1] 胡琳贞. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 李志敏, 董锐, 孙航. 云南中部地区几种常见野菜调查研究[J]. 云南师范大学学报, 2002, 22(4): 46-51.
- [3] 唐丹林, 张光凡, 陈孝泉. 大白杜鹃、尖叶杜鹃的营养成分的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1992, 29(2): 316-318.

- [4] 龙毅, 刘作易, 毛堂芬, 等. 大白杜鹃芽的诱导增殖研究[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(3): 14-15.
- [5] 黄承玲, 陈训, 高贵龙. 3种高山杜鹃对持续干旱的生理响应及抗旱性评价[J]. 林业科学, 2011, 47(6): 48-55.
- [6] 周艳, 李朝蝉, 周洪英, 等. 大白杜鹃扦插繁殖技术研究[J]. 种子, 2012, 31(4): 123-126.
- [7] 黄承玲, 赵孝梨, 刘广超. 2种高山杜鹃种子萌发特性研究[J]. 种子, 2017, 36(1): 40-42.
- [8] 王雪芹. 横断山地区温带木本竹子的系统发育和适应性进化研究——兼论食花文化对大白花杜鹃遗传多样性的影响[D]: [博士学位论文]. 北京: 中科院大学, 2013.
- [9] 解玮佳, 王继华, 彭绿春, 等. 大白杜鹃与露珠杜鹃杂交亲和性及其杂交果实发育动态研究[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(1): 90-96.
- [10] 闫红飞, 李令茂, 康健, 等. 小麦抗叶锈近等基因系 TcLr38 的 SRAP-SSRL(eSSR)分析[J]. 河北农业大学学报, 2015, 38(5): 6-10.
- [11] 康健, 张林, 张梦雅, 等. 小麦叶锈菌特异分子标记建立[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(4): 63-67.
- [12] Kubil, C., Sawkins, M., Meyer, W.A., *et al.* (2001) Genetic Diversity in Seven Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) Cultivars Based on SSR Markers. *Crop Science*, **41**, 1565-1572. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151565x>
- [13] George, J., Dobrowolski, M.P., Van Zijl de Jong, E., *et al.* (2006) Assessment of Genetic Diversity in Cultivars of White Clover (*Trifolium repens* L.) Detected by SSR Polymorphisms. *Genome*, **49**, 919-930. <https://doi.org/10.1139/g06-079>
- [14] Hand, M.L., Cogan, N.O.I. and Forster, J.W. (2012) Molecular Characterisation and Interpretation of Genetic Diversity within Globally Distributed Germplasm Collections of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and Meadow Fescue (*F. pratensis* Huda.). *Theoretical and Applied Genetics*, **124**, 1127-1137. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1774-6>
- [15] 魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 62-67.
- [16] 李洪果, 贾宏炎, 李志武, 等. 基于 SSR 标记的杜仲群体遗传多样性及遗传结构[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(5): 79-85.
- [17] 李会彬, 王丽宏, 孙鑫博, 等. 河北野生狗牙根遗传多样性的 SSR 分析[J]. 河北农业大学学报, 40(6): 61-71.
- [18] 赖勇, 王鹏喜, 范贵强, 等. 大麦 SSR 标记遗传多样性及其农艺性状关联分析[J]. 中国农业科学, 46(2): 233-242.
- [19] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16-17.
- [20] Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006) GeneAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- [21] Peakall, R. and Smouse, P.E. (2012) GeneAIEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching—An Update. *Bioinformatics*, **10**, 1093.
- [22] Naito, K., Isagi, Y., Kameyama, Y., *et al.* (1999) Population Structures in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* Assessed with Microsatellites and Their Implication for Conservation. *Journal of Plant Research*, **112**, 405-412. <https://doi.org/10.1007/PL00013895>
- [23] Liu, Y.F., Xing, M., Zhao, W., *et al.* (2012) Genetic Diversity Analysis of *Rhododendron aureum* Georgi(Ericaceae) Located on Changbai Mountain Using ISSR and RAPD Markers. *Plant Systematics and Evolution*, **298**, 921-930. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0601-0>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: br@hanspub.org