

## 基于ITS2序列和形态学特征对泰山杜鹃属植物系统发育关系的分析

蔡洪月<sup>1</sup>, 邢树堂<sup>1</sup>, 何蓉蓉<sup>2</sup>, 周波<sup>3</sup>, 赵飞<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安271018; <sup>2</sup>山东省天泽农园科技院士工作站, 山东泰安271000; <sup>3</sup>东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

**摘要:** 为明确泰山现有照山白、迎红杜鹃、满山红、杜鹃、羊躑躅的系统分类, 同时探讨杜鹃属(*Rhododendron*)内各亚属的系统发育关系, 本研究以泰山现有杜鹃属的4个亚属5个种8个样本为研究对象, 借助GenBank数据库, 以扫帚岩须和吊钟花为外类群, 分析了杜鹃属9个亚属92个种的内转录间隔区(ITS2)序列并构建分子系统发育树; 同时选取其中18个代表种24个形态性状进行分析及表型性状分支分析树构建。结果表明: 杜鹃属是一个多系类群, 各亚属进化程度基本平衡。在泰山现有杜鹃属5个种中, 照山白、迎红杜鹃、杜鹃、羊躑躅均聚在以各自亚属种为主的大支中, 满山红未能聚在映山红亚属分支中。基于形态学特征的数量聚类结果显示, 距离系数为18的水平线可作为亚属的划分界线。在分子聚类中, 马银花亚属的长蕊组和马银花组与常绿杜鹃亚属的常绿杜鹃组分别得到较高的支持度, 但常绿杜鹃组下的亚组间区分不明显, 羊躑躅亚属和叶状芭亚属均位于系统发育树基部, 符合形态学分类结果。

**关键词:** 杜鹃属; ITS2; 数量分类; 系统发育; DNA条码

杜鹃花是杜鹃属(*Rhododendron*)植物的统称, 杜鹃花种类繁多, 花色丰富, 花和叶兼美, 具有极高的观赏和药用价值, 是世界著名的园林植物之一。杜鹃属植物全属约960个种, 其中我国拥有共计约542个种(不包括种下等级), 遍布全国, 但集中于西南、华南地区(张长芹等2004)。由于杜鹃属植物种类多、分布广、变异大, 分类问题十分复杂, 在系统划分和某些种类的归属上长期众说纷纭, 同时给杂交育种选择亲本带来困难, 难以实现育种目标(庄平2012)。1949年, H. Sleumer根据花芽与营养芽着生位置、花部器官、果实和种子的形态、叶是否覆鳞片及是否常绿等习性特征, 将杜鹃属分为8个亚属, 并采用亚属下分组、组下再分亚组的全面分类系统, 为后来的分类系统奠定了基础。1999年出版的《中国植物志》采纳的是H. Sleumer的系统概念和A. Gray的观点, 将我国杜鹃属植物分为9个亚属(中国科学院中国植物志编辑委员会1999)。

当前用于植物分类学研究的主要方法有形态学标记、同工酶标记和分子标记等(李春楠等2014), 有鉴于各种标记方法在植物分类时存在各自的优缺点, 采用不同的标记方法进行综合分析显得尤为重要, 因此, 本研究采用DNA条形码(DNA barcoding)和数量分类两种方法对泰山杜鹃属植物进行分析。DNA条形码是利用基因组中一段公认的、标准的、相对较短的DNA片段来对物种进行鉴定, 通过该片段所具有的足够的种间变

异及相对稳定的种内变异而创建的一种新的生物身份识别系统, 可以实现对物种的快速自动鉴定(罗亚皇等2013; Alves等2014)。植物通用的DNA条形码仍未最终确定, 但标记效果较好的备选条码有matK、rbcL、ITS2等(刘宇婧2011; 程芳婷等2015)。内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS2)是核糖体DNA中介于5.8S和26S之间的非编码转录间隔区, 在不同物种间变异丰富, 核苷酸序列变化大, 可提供较为详尽的遗传学信息, 且ITS2序列的两端区域极为保守, 能够用通用引物进行扩增及直接测序, 在物种群体遗传多样性、亲缘关系、物种真伪鉴别上有较大的应用价值(Baldwin等1995; 高连明等2012; Wang等2016)。

本研究从分子生物学和形态学角度综合评价了泰山杜鹃属植物的系统分类关系和杜鹃属植物的亚属和组间系统发育关系, 对于分析杜鹃属野生植物资源的遗传多样性, 以及杜鹃属物种进化关系和DNA条形码的确定具有重要的参考价值。

### 材料与方法

#### 1 实验材料

杜鹃属杜鹃亚属(*Rhododendron*)杜鹃组(sect. *Rhododendron*)的照山白(*R. micranthum* Turcz.)、迎红杜鹃亚属(*Rhodorastrum*)的迎红杜鹃(*R. mu-*

收稿 2017-01-09 修定 2017-08-02

资助 科技型中小企业技术创新基金项目(14C26213701966)。

\* 通讯作者(E-mail: bioflower@126.com)。

*cronulatum* Turcz.)、映山红亚属(*Tsutsusi*)轮生叶组(sect. *Brachycalyx*)的满山红(*R. mariesii* Hemsl. et Wils.)和映山红组(sect. *Tsutsusi*)的杜鹃(*R. simsii* Planch.)、羊躑躅亚属(*Pentanthera*)五花药组(sect. *Pentanthera*)的羊躑躅(*R. molle* G. Don), 共计5个种8个样本均采自山东省泰安市天泽农业科技园杜鹃资源圃, 对其进行ITS2序列测定。另外84个种及2个外类群扫帚岩须(*Cassiope fastigiata* D. Don)和吊钟花(*Enkianthus quinqueflorus* Lour.)的ITS2序列来自GenBank (表1)。本研究中涉及到的杜鹃属种涵盖了中国境内杜鹃属中全部9个亚属(表2)。

## 2 全基因组DNA的提取、PCR反应及扩增产物测序

植物叶片鲜样经液氮速冻研磨后, 使用多糖多酚类植物专用全基因组DNA提取试剂盒(艾德莱新型植物基因组DNA快速提取试剂盒)提取总DNA。

采用ITS2通用引物(由赛默飞世尔科技有限公司合成)进行DNA扩增, 正向引物(S2F)为: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向引物(S3R)为: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。扩增反应在Applied Biosystems 2720热循环仪上进行。PCR反应总体系为30  $\mu$ L, 内含2 $\times$ PCR Mix (康

表1 材料来源

Table 1 Sources of materials

种名	GenBank登录号	种名	GenBank登录号	种名	GenBank登录号
<i>R. scabrifolium</i>	KC196050.1	<i>R. lapponicum</i>	KU350183.1	<i>R. trichocladum</i>	EF035054.1
<i>R. spiciferum</i>	KC196048.1	<i>R. fastigiatum</i>	EF035052.1	* <i>R. molle</i>	KT151668.1
<i>R. spinuliferum</i>	KC196047.1	<i>R. xanthostephanum</i>	JX989273.1	<i>R. redowskianum</i>	AF393418.1
<i>R. mollicomum</i>	KC196018.1	<i>R. tephropeplum</i>	JX989272.1	* <i>R. mucronulatum</i>	KT151670.1
<i>R. racemosum</i>	AF393411.1	<i>R. hanceanum</i>	JX989270.1	* <i>R. mucronulatum</i>	KT151671.1
<i>R. virgatum</i>	KC196017.1	<i>R. rubiginosum</i>	EF035048.1	<i>R. dauricum</i>	HM854158.1
<i>R. rex</i> subsp. <i>fictolacteum</i>	EF035053.1	<i>R. edgeworthii</i>	EF035051.1	<i>R. tashiroi</i>	AF393417.1
<i>R. sinogrande</i>	EF035055.1	<i>R. campylogynum</i>	AY877280.1	* <i>R. mariesii</i>	KT151675.1
<i>R. auriculatum</i>	AY962555.1	<i>R. maddenii</i>	AY877281.1	<i>R. dilatatum</i>	AB126639.1
<i>R. chihsinianum</i>	AY962554.1	<i>R. kiangsiense</i>	HQ707060.1	<i>R. schlippenbachii</i>	AB105237.1
<i>R. neriiflorum</i>	AF393408.1	<i>R. excellens</i>	HQ707049.1	* <i>R. simsii</i>	KT151666.1
<i>R. dimitrium</i>	EF035050.1	<i>R. pachypodum</i>	AF393410.1	* <i>R. simsii</i>	KT151667.1
<i>R. annae</i>	AY962559.1	* <i>R. micranthum</i>	KT151672.1	<i>R. indicum</i>	AB105221.1
<i>R. irroratum</i>	AY962558.1	* <i>R. micranthum</i>	KT151673.1	<i>R. pulchrum</i>	HQ707066.1
<i>R. longistylum</i>	JX989271.1	<i>R. anthopogon</i>	X97418.1	<i>R. hunanense</i>	HQ707055.1
<i>R. anthosphaerum</i>	EF035047.1	<i>R. primuliflorum</i>	AF393416.1	<i>R. nakaharai</i>	AF432478.1
<i>R. aberconwayi</i>	EF035046.1	<i>R. vaccinioides</i>	AY877301.1	<i>R. kanehirai</i>	AF432474.1
<i>R. morii</i>	AF432434.1	<i>R. kawakamii</i>	GQ505308.1	<i>R. lasiostylum</i>	GQ505300.1
<i>R. pseudochrysanthum</i>	AF297197.1	<i>R. ellipticum</i>	AF432449.1	<i>R. rivulare</i>	HQ707069.1
<i>R. cyanocarpum</i>	EF035049.1	<i>R. ovatum</i>	AF393424.1	<i>R. rhuyuenense</i>	HQ707068.1
<i>R. delavayi</i>	AY962556.1	<i>R. mitriforme</i> var. <i>setaceum</i>	AF393423.1	<i>R. hypoblematosum</i>	HQ707056.1
<i>R. arboretum</i>	KM605819.1	<i>R. mitriforme</i>	AF393422.1	<i>R. meridionale</i>	EU296743.1
<i>R. formosanum</i>	AF297191.1	<i>R. vialii</i>	AF393421.1	<i>R. longifalcatum</i>	EU296738.1
<i>R. argyrophyllum</i>	X97416.1	<i>R. leptothrium</i>	AF393420.1	<i>R. hainanense</i>	EU296732.1
<i>R. denudatum</i>	AY962553.1	<i>R. bachii</i>	AF393419.1	<i>R. oldhamii</i>	AF297201.1
<i>R. haofui</i>	AY962552.1	<i>R. tutcheriae</i>	AF393436.1	<i>R. breviperulatum</i>	AF432469.1
<i>R. williamsianum</i>	AJ626909.1	<i>R. stamineum</i>	AF393435.1	<i>R. rubropilosum</i>	AF432465.1
<i>R. jingangshanicum</i>	AY962557.1	<i>R. moulmianense</i>	AF393432.1	<i>R. longiperulatum</i>	AF285847.1
<i>R. decorum</i>	FJ873388.1	<i>R. latoucheae</i>	AF393431.1	<i>Cassiope fastigiata</i>	AF393438.1
<i>R. fortune</i>	AF393407.1	<i>R. henryi</i>	AF393430.1	<i>Enkianthus quinqueflorus</i>	KP092597.1
<i>R. hyperythrum</i>	GQ505296.1	<i>R. hancockii</i>	AF393429.1		
<i>R. aureum</i>	AF393409.1	<i>R. cavaleriei</i>	AF393425.1		

\*本研究进行的ITS2序列测定的样本。

表2 杜鹃属中各亚属的样本数量

Table 2 The number of samples in each subgenus

亚属	本文中的组数/ 我国总组数	本文中该 亚属种数
糙叶杜鹃亚属( <i>Pseudorhodorastrum</i> )	3/3	6
常绿杜鹃亚属( <i>Hymenanthes</i> )	1/1	26
杜鹃亚属( <i>Rhododendron</i> )	3/3	18
马银花亚属( <i>Azaleastrum</i> )	2/2	14
毛枝杜鹃亚属( <i>Pseudazalea</i> )	—	1
羊躑躅亚属( <i>Pentanthera</i> )	1/1	1
叶状苞亚属( <i>Therorhodon</i> )	—	1
迎红杜鹃亚属( <i>Rhodorastrum</i> )	—	3
映山红亚属( <i>Tsutsusi</i> )	3/3	23

为世纪2×Es Taq Master Mix) 15 μL、正向和反向引物(10 mmol·L<sup>-1</sup>)各1 μL、DNA模板2 μL、ddH<sub>2</sub>O 11 μL。PCR反应程序为: 94°C预变性4 min; 94°C变性30 s、55°C退火30 s、72°C延伸1 min进行30个循环; 72°C延伸7 min。PCR产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

对PCR扩增产物进行双向测序, 由上海生工生物公司完成。

### 3 形态学性状的选取及编码原则

选取泰山杜鹃属植物5个种及近缘种13个种, 组成18个分类运算单位(operational taxonomic unit, OTU), 选取24个形态性状进行聚类分析(表3)。性状选取主要依据泰山杜鹃属植物在形态特征上的差异性、相似性及其演化规律(赵冰等2007)。各类特征性状的编码方法取决于性状的类型, 为正确反映分类群间的差异程度, 采用逻辑顺序赋值。参考《中国植物志》(中国科学院中国植物志编辑委员会1999)及《山东植物志》(陈汉斌等1997)中的形态描述来确定形态学性状数据。

### 4 序列分析、形态学数据统计及系统树构建

使用Chromos 2.4.1对测序峰图进行序列人工校对, 去除低质量序列。将得到的序列与GenBank数据库进行BLASTn比对分析([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_)

表3 性状及编码

Table 3 List of characters and their coding

序号	性状	性状及编码
1	生长习性	矮小灌木(0); 灌木(1); 大灌木或乔木(2)
2	落叶习性	常绿(0); 半常绿(1); 落叶(2)
3	茎上附属物	无(0); 鳞片(1); 鳞及毛(2); 毛(3); 毛及腺体(4)
4	叶片质地	纸质(0); 革质(1); 厚革质(2)
5	叶形	长圆至椭圆(0); 披针形(1); 倒披针形(2); 卵形(3); 倒卵形(4); 长圆形至长圆状披针形(5)
6	叶尖	渐尖或长锐尖(0); 短渐尖、锐尖至钝尖(1); 钝圆(2); 钝圆成突尖(3)
7	叶基	楔形(0); 宽楔至钝(1); 钝圆至浅心形(2); 圆形(3)
8	叶上附属物	无或不明显(0); 被鳞片(1); 毛(2); 鳞及毛(3)
9	叶下附属物	一色鳞有间隙(0); 一色鳞重叠(1); 两色鳞兼有(2); 鳞及毛(3); 无或脱净(4); 厚层毛(5); 薄层毛(6); 沿叶脉具毛(7)
10	花序位置	顶生(0); 腋生于枝顶(1)
11	花序类型	伞形(0); 总状伞形(1); 短总状(2); 簇生(3); 单生(4)
12	花朵数	≤5 (0); 6~10 (1); >10 (2)
13	花梗长度	≤1 (0); 1~3 (1); 3~6 (2); >6 (3)
14	萼裂片形状	退化为不规则状(0); 圆齿状(1); 三角形(2); 长圆形(3); 盘状(4)
15	萼裂片附属物	无(0); 鳞片(1); 鳞及毛(2); 毛(3); 毛及腺体(4); 腺体(5)
16	萼裂片边缘	无(0); 柔毛(1); 毛及鳞(2); 毛及腺体(3); 腺体(4)
17	花冠类型	漏斗形(0); 漏斗状钟形(1); 钟形及宽钟形(2); 辐状(3)
18	花冠颜色	白色(0); 黄色(1); 白或带粉色(2); 粉红色(3); 紫红至红色(4)
19	花冠附属物	无(0); 内有毛(1); 外被毛(2); 外被鳞内有毛(3); 外被鳞内无毛(4)
20	花裂片数目	5 (0); >5 (1)
21	雄蕊数目	10 (0); 5 (1); >10 (2)
22	花丝附属物	无(0); 中部以下被微柔毛(1); 基部疏被短毛(2)
23	子房附属物	无(0); 鳞(1); 毛(2); 鳞及毛(3); 腺体(4); 腺及毛(5)
24	花柱附属物	无(0); 基部被毛(1); 基部被毛到中部(2); 基部被毛及鳞片(3); 密生腺体(4)

TYPE=BlastSearch&LINK\_LOC=blasthome), 并进行T-Coffee比对分析(<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>) (Notredame等2000; Di Tommaso等2011)。连同下载于GenBank的ITS序列, 使用基于隐马尔可夫模型的HMMer注释方法除去两端5.8S和26S区段, 获得ITS2间隔序列(Keller等2009)。使用MEGA 6.0内置的ClustalW算法对序列进行分析比对, 用MEGA 6.0软件进行亚属内和亚属间遗传距离的计算(王冬梅等2014), 采用最大简约法(maximum parsimony method), 以扫帚岩须和吊钟花为外类群构建系统发育树。运用自展分析(bootstrap analysis) 1 000次重复, 评估简约树中各分支的自展支持率。

应用SPSS软件对形态学标记进行聚类分析, 原始数据矩阵经Z得分标准化处理后, 应用系统聚类法, 标注个案为种名, 聚类方法为组间联接, 度量标准为Pearson相关性进行聚类分析, 得到泰山杜鹃属种及近缘种聚类图。

## 实验结果

### 1 PCR扩增结果、T-Coffee多序列比对及系统发育树分析

以样品总DNA为模板, 反应体系中加入ITS2引物进行PCR, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 结果表明获得的目的基因片段与预期的大小(460 bp)一致(图1)。说明预设PCR反应体系和反应条件适合于泰山杜鹃属植物DNA样品ITS2片段的扩增。

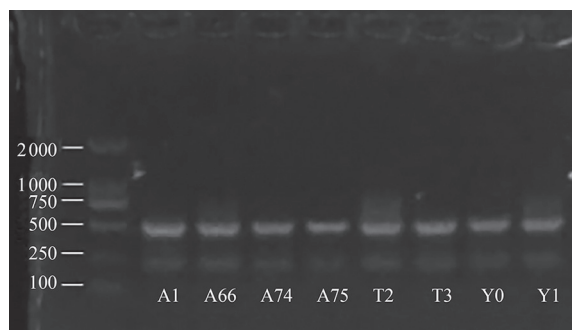


图1 泰山杜鹃属植物ITS2片段PCR产物电泳分析  
Fig.1 Electrophoresis analysis of ITS2 PCR products of genus *Rhododendron* from Mountain Tai

A1、A66: 杜鹃; A74: 羊躑躅; A75: 满山红; T2、T3: 照山白; Y0、Y1: 迎红杜鹃。

片段克隆测序后与GenBank数据库进行BLASTn比对分析, 结果显示克隆所得片段包括部分5.8S和28S核糖体RNA序列和完整ITS2序列。将本研究8个样本序列进行T-Coffee多序列比对, 发现5.8S核糖体部分RNA序列完全相同, ITS2序列存在着碱基插入或替换的变化, 说明所分析的杜鹃样本在进化的过程中形成了不同的分支, 而部分28S核糖体RNA序列存在着C和T碱基的替换, 保守性较高(图2)。

将本研究采集的样本ITS2序列提交GenBank(参考序列号为KT151666.1、KT151667.1、KT151668.1、KT151670.1、KT151671.1、KT151672.1、KT151673.1、KT151675.1), 并对所有杜鹃属种ITS2序列进行进化分析, 结果显示序列长度范围为227~233 bp, 当空位(gap)作为缺失处理时, 排序后的长度为242 bp, 其中有55个变异位点, 36个为系统发育的简约信息位点, 分别占22.7%和14.9%。排列后的序列经MEGA 6.0软件分析, 得到9个亚属内与亚属间的绝对遗传距离(表4)。糙叶杜鹃亚属(*Pseudorhodorastrum*)与杜鹃亚属、迎红杜鹃亚属间遗传距离较小, 均在0.01左右; 常绿杜鹃亚属(*Hymenanthes*)内绝对遗传距离只有0.006, 迎红杜鹃亚属内绝对遗传距离也较小, 为0.003。

以扫帚岩须和吊钟花为外类群(Gao等2002), 使用最大简约法构建出系统发育树, 采用自展分析获得各分支的支持强度结果(图3)。94个种被区分为4个大支和4个单支。马银花亚属(*Azaleastrum*)中的马银花组(*sect. Azaleastrum*)和长蕊组(*sect. Choniastrum*)各聚一支, 且支持率较高。常绿杜鹃亚属全部被分至一支, 映山红亚属除大字杜鹃(*R. schlippenbachii*)外被分至一支, 但该大支中含有马银花亚属马银花组一支。羊躑躅亚属与叶状苞亚属(*Therorhodion*)均为单支, 且处于系统发育树的基部, 其中叶状苞亚属位于整个发育树除外类群的最基部, 但支持率不高。毛枝杜鹃亚属(*Pseudazalea*)与迎红杜鹃亚属则不同, 均被聚在亚属种交错但以杜鹃亚属种为主的大支中。

### 2 数量分类结果

依据形态学标记统计的数据矩阵, 计算得到18个种的聚类图(图4), 系统聚类分析的结果表明: 亚属内聚类距离均小于亚属间, 距离系数为18的

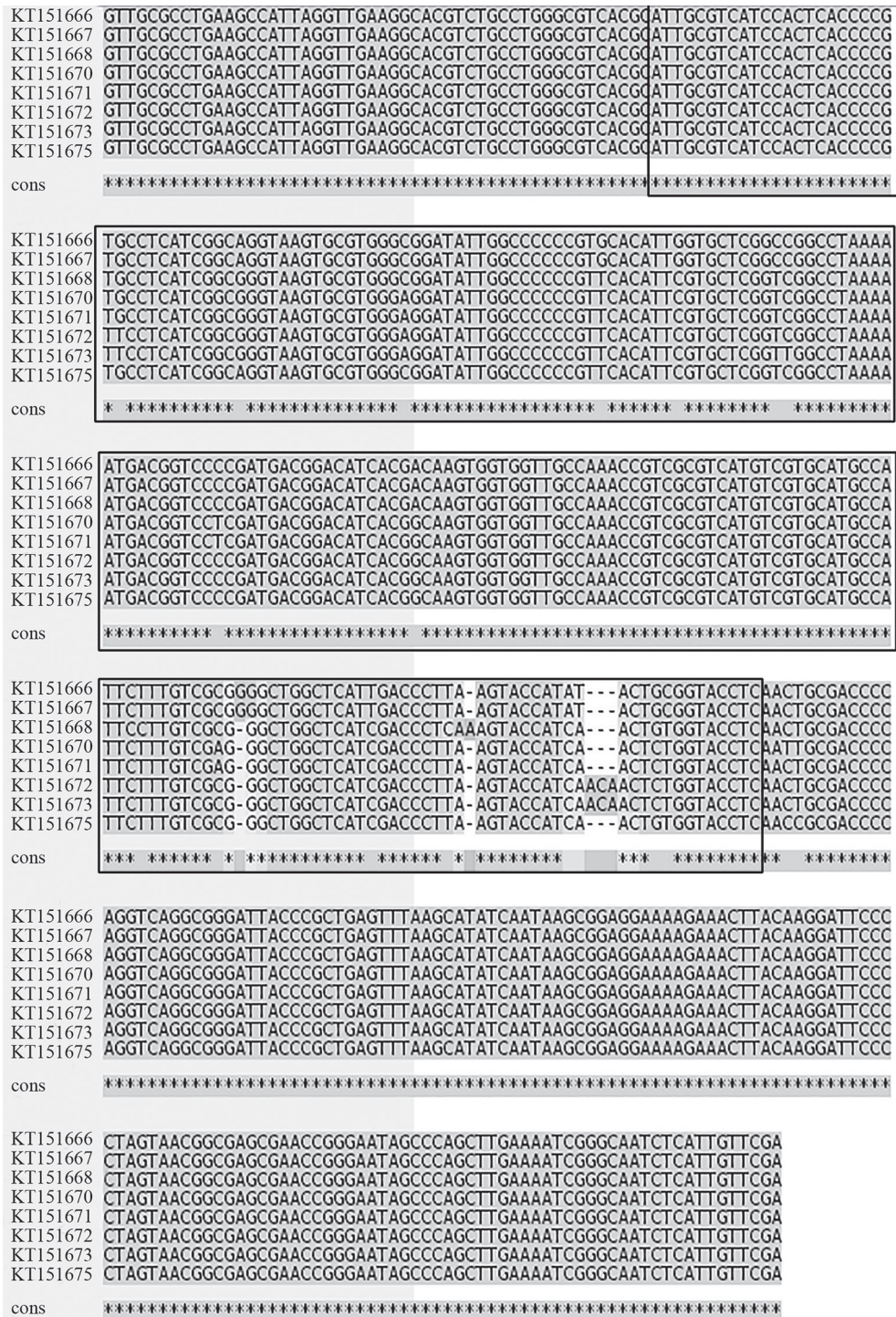


图2 泰山杜鹃属植物ITS2序列的T-Coffee多序列比对

Fig.2 T-Coffee alignment of ITS2 sequences of genus *Rhododendron* from Mountain Tai

方框内为完整ITS2序列, 前后分别为部分5.8S和28S核糖体RNA序列。

水平线可作为亚属的划分界线, 聚类结果与经典形态学分类结果拟合性较好。从图4中可以看出, 9个亚属的18个种杜鹃被聚为三大支, 除大字杜鹃

外, 各亚属种均各自聚在一起。马银花亚属的组间关系亦得到支持, 长蕊组的长蕊杜鹃和鹿角杜鹃与马银花组的马银花聚在第一大支的一个小支中,

表4 杜鹃属内各亚属间与亚属内遗传距离  
Table 4 Genetic distance between subgenuses and within subgenus in *Rhododendron*

	<i>Hymenanthes</i>	<i>Rhododendron</i>	<i>Azaleastrum</i>	<i>Tsutsusi</i>	<i>Rhodorastrum</i>	<i>Pentanthera</i>	<i>Pseudorhodorastrum</i>	<i>Therorhodon</i>	<i>Pseudazalea</i>
<i>Hymenanthes</i>	0.00628								
<i>Rhododendron</i>	0.02825	0.00946							
<i>Azaleastrum</i>	0.04066	0.03823	0.02155						
<i>Tsutsusi</i>	0.04565	0.04234	0.04673	0.02036					
<i>Rhodorastrum</i>	0.02658	0.00881	0.03638	0.04131	0.00300				
<i>Pentanthera</i>	0.02967	0.02357	0.03824	0.04214	0.02591	—			
<i>Pseudorhodorastrum</i>	0.03280	0.01109	0.04194	0.04565	0.01134	0.02511	0.01179		
<i>Therorhodon</i>	0.04905	0.04663	0.05615	0.05984	0.04476	0.04661	0.05037	—	
<i>Pseudazalea</i>	0.02443	0.00578	0.03320	0.03813	0.00300	0.02279	0.00829	0.04155	—

且长蕊组内的距离远小于两组之间的距离,但其组间距离较远,雄蕊数马银花组为5,长蕊组为10,这在很大程度上影响了其亚属内聚类距离的计算结果。种数量较少的糙叶杜鹃亚属、毛枝杜鹃亚属、羊躑躅亚属和叶状苞亚属在本研究中仅有1个种,它们处在各自的分支中,且处在树状图的基部位置。杜鹃亚属的大字杜鹃未与杜鹃亚属的其他种聚在一支,而是聚在物种较为复杂的第三大支中,其分类地位值得探讨。

## 讨 论

### 1 泰山乡土杜鹃的系统发育关系分析

本研究测序的5种泰山杜鹃属植物中,除迎红杜鹃被分在以杜鹃亚属植物为主的分支外,其他种均被分在各自亚属的大支中,说明ITS2序列在泰山乡土杜鹃的分类中有较好的区分效果。该分支中一个迎红杜鹃样本与同亚属兴安杜鹃聚在一起,但与另外一个迎红杜鹃样本间距离较远,中间包含有多个杜鹃亚属种,表明迎红杜鹃个体差异较大,推测可能原因是处在泰山上不同的小环境下,种群间长时间的地理隔离,加之自然的选择作用,促使迎红杜鹃向不同的方向分化,从而导致利用ITS2的分类结果与数量分类学和形态学分类不能完全拟合。表4中的数据显示迎红杜鹃亚属内种间绝对遗传距离为0.003,小于其他亚属,表明ITS2序列在迎红杜鹃亚属种的分类鉴定上有较好的应用效果,即有较小的亚属内遗传距离和较大的亚属间遗传距离。但迎红杜鹃的两个样本没有聚在一起,王海等(2014)的研究结果表明迎红杜鹃分布区域广泛,不同居群间产生了叶片大小、花冠红紫色的深浅、花径大小等差异,本研究结果从分子水平支持这一结果。

无论是分子系统聚类结果还是形态学聚类结果,羊躑躅均处在基部位置,照山白处在杜鹃亚属为主的分支中,杜鹃在映山红亚属的分支中,与经典分类学相符;形态学聚类中,满山红与映山红亚属聚在一起,但是分子聚类中,满山红却聚在杜鹃亚属分支中,其在分子系统学中的位置尚需其他证据进一步研究。

### 2 杜鹃属植物的亚属和组间系统发育关系

作为外类群的扫帚岩须和吊钟花分属岩须属

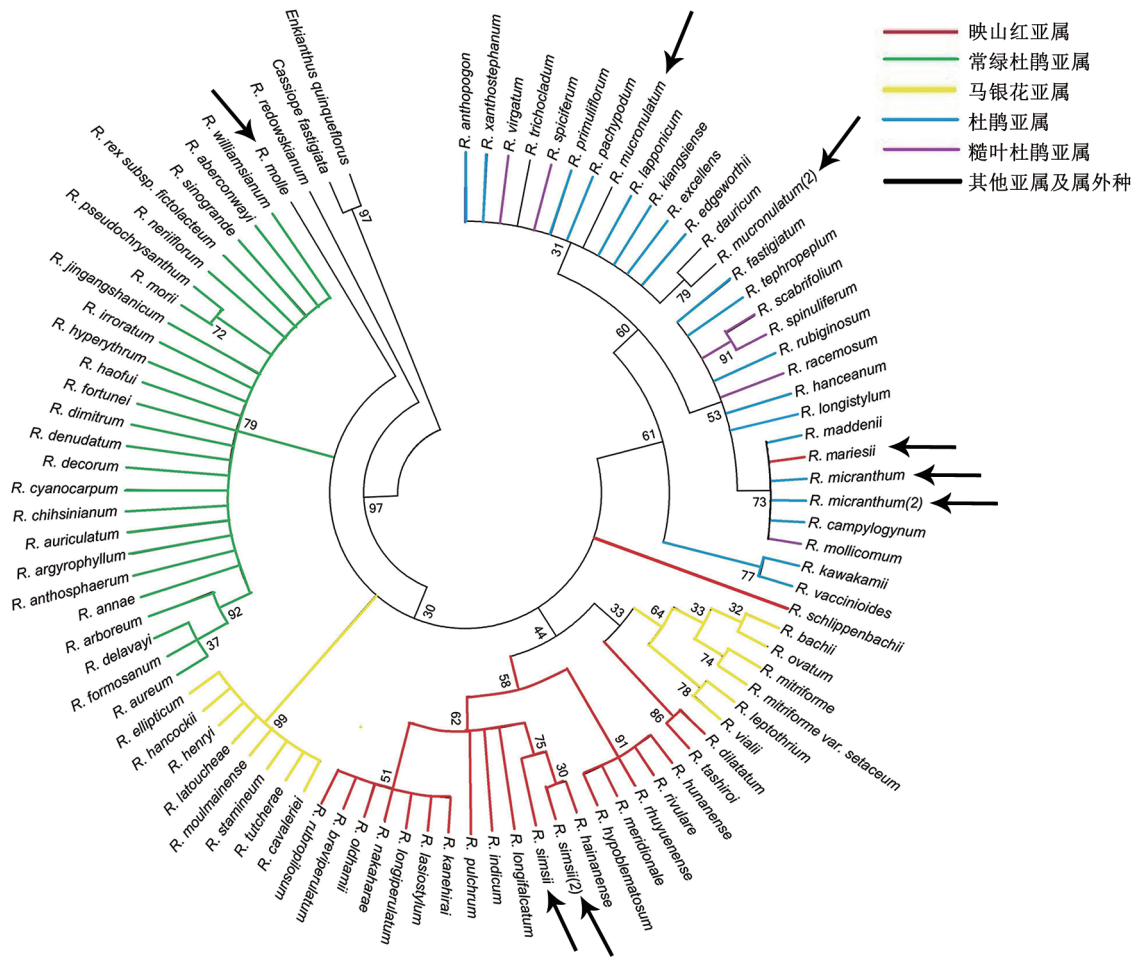


图3 基于ITS2序列用最大简约法构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on ITS2 sequences by using maximum parsimony method

(*Cassiope*)和吊钟花属(*Enkianthus*), 均处于系统发育树的最基部, 与羊躑躅亚属、叶状苞亚属、常绿杜鹃亚属、马银花亚属、映山红亚属等相比, 处在更基部的位置, 说明这些属的演化地位比较古老; Yan等(2015)的研究也发现在杜鹃花科岩须属、吊钟花属、杜鹃属这三个属间的ITS2序列可提供丰富的系统发育信息。与其他亚属相比, 叶状苞亚属处在仅次于外类群的基部位置, 说明其在杜鹃属中的位置较为原始, 这与Gao等(2002)的研究结果较为一致。闵天禄和方瑞征(1990)认为杜鹃属系统进化方向是花冠由大到小, 雄蕊和子房室减少, 花序由顶生变为腋生等, 所以常绿杜鹃亚属在系统发育中处于原始地位, 糙叶杜鹃亚属在形态构造上代表着后起的进化类群, 迎红杜鹃亚属和杜鹃亚属则为中间的过渡类群。在本研究

中的数量分类结果显示, 花序腋生、子房5室的迎红杜鹃处在聚类图的基部, 雄蕊5、子房5室的羊躑躅也处在基部, 与上述观点相符, 但常绿杜鹃亚属的2个种未聚在聚类图基部, 这可能与本研究中数量分类的指标均为定性指标, 未涉及叶片大小和花冠大小等定量指标有关。ITS2序列数据分析中, 常绿杜鹃亚属与杜鹃亚属的平均遗传距离为0.028, 与糙叶杜鹃亚属平均遗传距离为0.032, 杜鹃亚属与糙叶杜鹃亚属平均遗传距离为0.011, 证实常绿杜鹃亚属与杜鹃亚属亲缘关系较与糙叶杜鹃亚属亲缘关系近, 杜鹃亚属、迎红杜鹃亚属居于常绿杜鹃亚属和糙叶杜鹃亚属之间, 为上述观点提供了间接证据。

杜鹃属绝大部分物种的分子分类结果与经典的形态学分类结果拟合较好, 属内遗传距离较小,

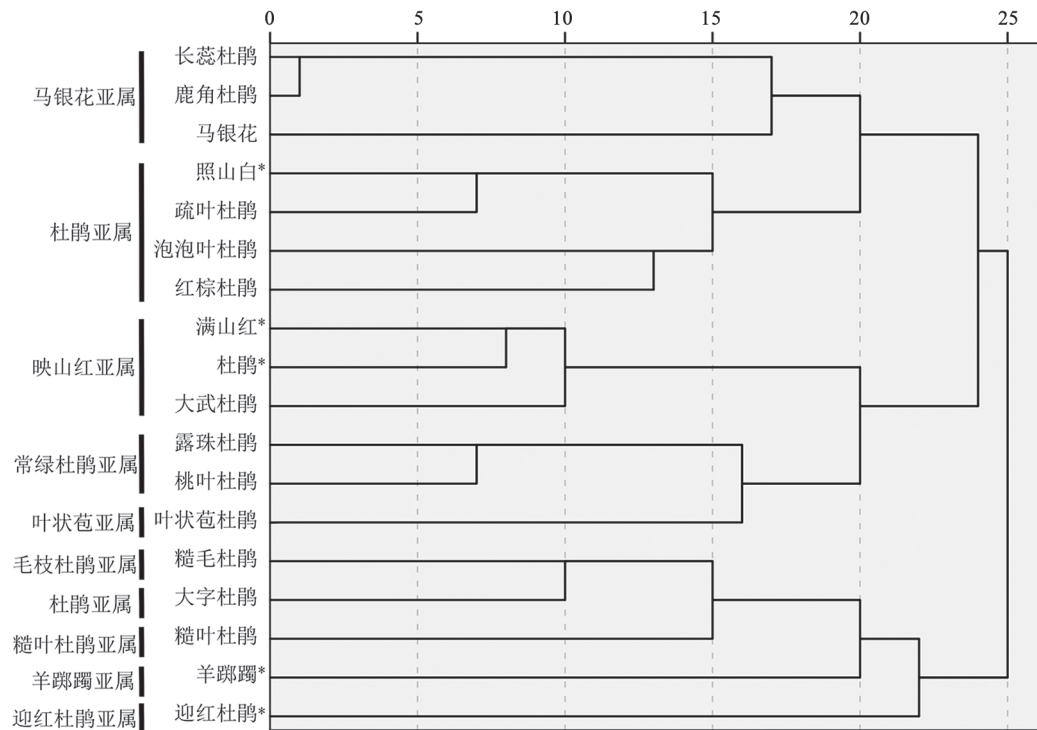


图4 基于数量分类的泰山杜鹃属种及近缘种的聚类图

Fig.4 Dendrogram of *Rhododendron* species and close species in Mountain Tai based on quantitative taxonomy

\*为泰山杜鹃属种。

常绿杜鹃亚属、马银花亚属、映山红亚属最为典型。马银花亚属中，马银花组和长蕊组分别得到较高的支持度，这与高连明等(2003)和李美芹等(2016)的研究结果较为一致，说明马银花亚属植物在进化中较为独立，物种形成的时间较短，ITS2片段还未产生较多的变异。常绿杜鹃亚属中仅常绿杜鹃组(sect. *Ponticum*)一组，该组种均聚在了同一分支，但亚组间区分不明显，原因可能是常绿杜鹃组内种间基因交流较为普遍，同时所处环境类似，进化较为同步。

假映山红组(sect. *Tsusiopsis*)大武杜鹃(*R. tashiroi*)的系统位置一直存在争议，不同学者根据其形态特征分在不同组(刘仁林2007)，从系统发育树可见该种与轮生叶组的三叶杜鹃聚在一支，内部支持率较高，为86，因此本实验分析结果支持大武杜鹃分在轮生叶组。此外，系统位置一直存在争议的大字杜鹃，在分子聚类和形态聚类中均未与映山红亚属或羊躑躅亚属聚在一起，而是与杜鹃亚属距离较近，处在马银花亚属与杜鹃亚属为主的两个大支中间，且没有与轮生叶组聚为一支，故本研

究不支持将该种归并在轮生叶组的观点，其系统位置仍需其他方面的证据进行更深入的研究。

本研究中部分亚属关系尚未明确，第一大支中迎红杜鹃亚属的迎红杜鹃与糙叶杜鹃亚属的糙毛杜鹃、杜鹃亚属的樱草杜鹃(*R. primuliflorum*)、云上杜鹃(*R. pachypodum*)聚在一起，3个亚属植物混在同一分支中；照山白的两个样本与满山红聚在一起，它们分属映山红亚属与杜鹃亚属，但该分支除满山红外再无映山红亚属种；叶状苞亚属位于发育树最基部，但该亚属在中国境内均仅有1个种，聚类结果说服力有限。以上情况的存在说明基于ITS2序列的分子标记也存在一定的局限性，后续研究还需结合更多的样本及分子序列进行深入分析。

#### 参考文献

- Alves TS, Chauveau O, Eggers L, de Souza-Chies TT (2014). Species discrimination in *Sisyrinchium* (Iridaceae) assessment of DNA barcodes in a taxonomically challenging genus. *Mol Ecol Resour*, 14: 324–335
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Potrer JM, Wojciechowski MF, Campbell



- CS, Donoghue MJ (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*, 82: 247–277
- Chen HB, Zhen YJ, Li FZ (1997). *Flora of Shandong Province 2*. Qingdao: Qingdao Publishing House, 856–861 (in Chinese) [陈汉斌, 郑亦津, 李法曾(1997). 山东植物志(下卷). 青岛: 青岛出版社, 856–861]
- Cheng FT, Li ZH, Liu CY, Yuan C, Li XT, Liu ZL (2015). DNA barcoding of the genus *Rehmannia* (Scrophulariaceae). *Plant Sci J*, 33 (1): 25–32 (in Chinese with English abstract) [程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 原超, 李雪童, 刘占林(2015). 地黄属植物的DNA条形码研究. *植物科学学报*, 33 (1): 25–32]
- Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita (1999). *Flora of China Tomus 57 (2)*. Beijing: Science Press, 7–436 (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1999). 中国植物志第57卷第2分册. 北京: 科学出版社, 7–436]
- Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobittg M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF, Notredame C (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res*, 39: W13–W17
- Gao LM, Li DZ, Zhang CQ (2003). Phylogenetic relationships of *Rhododendron* section *Azaleastrum* (Ericaceae) based on ITS sequences. *Acta Phytotaxon Sin*, 41 (2): 173–179 (in Chinese with English abstract) [高连明, 李德铢, 张长芹(2003). 基于ITS序列探讨杜鹃花属马银花组的系统发育. *植物分类学报*, 41 (2): 173–179]
- Gao LM, Li DZ, Zhang CQ, Yang JB (2002). Infrageneric and sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) inferred from ITS sequence data. *Acta Bot Sin*, 44 (11): 1351–1356
- Gao LM, Liu J, Cai J, Yang JB, Zhang T, Li DZ (2012). A synopsis of technical notes on the standards for plant DNA barcoding. *Plant Divers Resour*, 34 (6): 592–606 (in Chinese with English abstract) [高连明, 刘杰, 蔡杰, 杨俊波, 张挺, 李德铢(2012). 关于植物DNA条形码研究技术规范. *植物分类与资源学报*, 34 (6): 592–606]
- Keller A, Schleicher T, Schultz J, Müller T, Dandekar T, Wolf M (2009). 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 430 (1): 50–57
- Li CN, Fu QJ, Chen Y, Zhao FK, Sun Y, Cui HR (2014). Analysis of genetic diversity of the major *Tagetes patula* varieties in China using SRAP markers. *Plant Physiol J*, 50 (9): 1429–1434 (in Chinese with English abstract) [李春楠, 傅巧娟, 陈一, 赵福康, 孙瑶, 崔海瑞(2014). 利用SRAP标记分析中国主栽孔雀草品种的遗传多样性. *植物生理学报*, 50 (9): 1429–1434]
- Li MQ, Pan YY, Qian PX, Lu D, Ming M, Rao HY, Liu R, Xie XH, Wu YY (2016). Development of EST-SSR primers for azalea and genetic analysis of cultivars. *Plant Physiol J*, 52 (3): 356–364 (in Chinese with English abstract) [李美芹, 潘叶羽, 钱萍仙, 卢丹, 明萌, 饶慧云, 刘蓉, 谢晓鸿, 吴月燕(2016). 杜鹃花EST-SSR标记的开发及遗传多样性分析. *植物生理学报*, 52 (3): 356–364]
- Liu RL (2007). Study on the systematic classification of subgenus *Tsutsusi* (Sweet) Pojarkova of *Rhododendron* in China (PhD thesis). Nanchang: Jiangxi Forestry University (in Chinese with English abstract) [刘仁林(2007). 中国杜鹃属映山红亚属植物系统分类研究(博士论文). 南昌: 江西林业大学]
- Liu YJ (2011). Application of DNA barcoding in species identification of Colocasieae (Araceae) (Master's thesis). Beijing: Minzu University of China (in Chinese with English abstract) [刘宇婧(2011). DNA条形码在天南星科芋族植物研究中的应用(硕士论文). 北京: 中央民族大学]
- Luo YH, Liu J, Gao LM, Li DZ (2013). Applications and advances of DNA barcoding in ecological studies. *Plant Divers Resour*, 35 (6): 761–768 (in Chinese with English abstract) [罗亚皇, 刘杰, 高连明, 李德铢(2013). DNA条形码在生态学中的应用与展望. *植物分类与资源学报*, 35 (6): 761–768]
- Min TL, Fang RZ (1990). The phylogeny and evolution of genus *Rhododendron*. *Acta Bot Yunnan*, 12 (4): 352–365 (in Chinese with English abstract) [闵天禄, 方瑞征(1990). 杜鹃属的系统发育与进化. *云南植物研究*, 12 (4): 352–365]
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000). T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 302: 205–217
- Wang DM, Wang WW, Sun X, Xu NJ (2014). Molecular identification and halophilic characteristics of a strain of *Dunaliella* D3. *Plant Physiol J*, 50 (3): 315–323 (in Chinese with English abstract) [王冬梅, 王玮蔚, 孙雪, 徐年军(2014). 一株杜氏藻的分子鉴定与耐盐特性. *植物生理学报*, 50 (3): 315–323]
- Wang H, Liu QC, Wang KL, Jiang XQ, Liu QH (2014). Studies on the wild germplasm resources of *Rhododendron mucroulatum* in Jiaodong Peninsula. *J Plant Genet Res*, 15 (3): 511–518 (in Chinese with English abstract) [王海, 刘庆超, 王奎玲, 姜新强, 刘庆华(2014). 胶东半岛野生迎红杜鹃种质资源研究. *植物遗传资源学报*, 15 (3): 511–518]
- Wang XY, Zheng SH, Liu Y, Han JP (2016). ITS2, a better DNA barcode than ITS in identification of species in *Artemisia* L. *Chin Herb Med*, 8 (4): 352–358
- Yan LJ, Liu J, Michae M, Zhang L, Zhang XM, Li DZ, Gao LM (2015). DNA barcoding of *Rhododendron* (Ericaceae), the largest Chinese plant genus in biodiversity hotspots of the Himalaya-Hengduan Mountains. *Mol Ecol Resour*, 15: 932–944
- Zhang CQ, Gao LM, Xue RG, Yang JQ (2004). A general review of the research and conservation statue of Chinese *Rhododendron*. *Guangxi Sci*, 11 (4): 354–362 (in Chinese with English abstract) [张长芹, 高连明, 薛润光, 杨静全(2004). 中国杜鹃花的保育现状和展望. *广西科学*, 11 (4): 354–362]
- Zhao B, Luo XY, Zhang QX (2007). A study on numerical classification of the wintersweet cultivars. *Acta Horti Sin*, 34 (4): 947–954 (in Chinese with English abstract) [赵冰, 雒新艳, 张启翔(2007). 蜡梅品种的数量分类研究. *园艺学报*, 34 (4): 947–954]
- Zhuang P (2012). Discuss on the *Rhododendron* geographical distribution types and their cause of formation in China. *Guihaia*, 32 (2): 150–156 (in Chinese with English abstract) [庄平(2012). 中国杜鹃花属植物地理分布型及其成因的探讨. *广西植物*, 32 (2): 150–156]

## Phylogenetic relationship analysis of genus *Rhododendron* (Ericaceae) from Mountain Tai based on ITS2 sequences and morphological traits

CAI Hong-Yue<sup>1</sup>, XING Shu-Tang<sup>1</sup>, HE Rong-Rong<sup>2</sup>, ZHOU Bo<sup>3</sup>, ZHAO Fei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>Shandong Tianze Academician Workstation, Taian, Shandong 271000, China; <sup>3</sup>College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** A study to evaluate the relationships in subgenus of *Rhododendron* and clarify classification of the native *R. micranthum*, *R. mucronulatum*, *R. mariesii*, *R. simsii* and *R. molle* in Mountain Tai was undertaken using both morphological traits and molecular analysis of the DNA sequence variation of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions. Phylogenetic tree was constructed, using maximum parsimony method, based on ITS2 sequences of 92 species, 9 subgenera, which included 8 samples of 5 species from Mountain Tai, 84 samples from GenBank database, *Cassiope fastigiata* and *Enkianthus quinqueflorus* as outgroups; phylogenetic analysis was performed on the basis of 24 phenotypic characters of 18 species representing 9 subgenera. The results revealed that *Rhododendron* is a polyphyletic group, and evolutionary degree of each subgenus is balanced. Among the 5 species from Mountain Tai, the *R. mariesii* failed to gather in the branch of subg. *Tsutsusi*, and other 4 species were located in the major branches of their own subgenera. The quantitative cluster analysis based on morphological features showed that the line of distance coefficient of 18 can be used as the demarcation line of the subgenus. The monophyly of sect. *Choniastrum* (subg. *Azaleastrum*), sect. *Azaleastrum* (subg. *Azaleastrum*) and sect. *Ponticum* (subg. *Hymenanthes*) was strongly supported, while there was no significant difference between subsections in sect. *Ponticum*. Subgs. *Pentanthera* and *Therorhodium* were located at the base of phylogenetic tree, which was consistent with morphological classification results.

**Key words:** *Rhododendron*; ITS2; numerical taxonomy; phylogeny; DNA barcode

Received 2017-01-09 Accepted 2017-08-02

This work was supported by the Medium and Small Scale Enterprises Technology Innovation Fund (Grant No. 14C26213701966).

\*Corresponding author (E-mail: bioflower@126.com).