

•研究报告•

# 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交

郑硕理<sup>1,2</sup> 田晓玲<sup>3</sup> 黄承玲<sup>3</sup> 王灵军<sup>4</sup> 冯元<sup>4</sup> 张敬丽<sup>1\*</sup><sup>1</sup> (云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201)<sup>2</sup> (湖南省森林植物园, 长沙 410116)<sup>3</sup> (贵州民族大学人文科技学院, 贵阳 550025)<sup>4</sup> (贵州百里杜鹃科研所, 贵州毕节 551518)

**摘要:** 中国西南地区是世界杜鹃属(*Rhododendron*)植物的分布和分化中心, 开展杜鹃属自然杂交研究可为分类修订和新品种选育提供依据。本文以贵州百里杜鹃自然保护区(百里保护区)和云南石宝山分布的大白杜鹃(*Rhododendron decorum*)、马缨杜鹃(*R. delavayi*)及两种间疑似自然杂交后代和人工杂交后代个体为研究材料, 通过形态特征比较、核基因间隔序列ITS以及叶绿体基因片段*trnL-trnF*、*rbcL*和*trnH-psbA*测序特征分析, 发现疑似自然杂交后代与人工杂交后代形态特征介于大白杜鹃与马缨杜鹃之间; 4个DNA片段序列均能区分大白杜鹃和马缨杜鹃, 同一物种的不同居群在叶绿体基因片段*rbcL*、*trnH-psbA*序列存在差异位点; 所有人工杂交后代个体和1个石宝山疑似杂交个体均以大白杜鹃为母本, 所有百里保护区疑似杂交个体和6个石宝山疑似杂交个体以马缨杜鹃为母本。本研究证实了大白杜鹃与马缨杜鹃在百里保护区和云南石宝山存在自然杂交现象, 杂交为双向且自然杂交后代绝大多数以马缨杜鹃为母本。

**关键词:** 杜鹃属; 自然杂交; 形态特征; DNA序列

## Molecular and morphological evidence for natural hybridization between *Rhododendron decorum* and *R. delavayi* (Ericaceae)

Shuoli Zheng<sup>1,2</sup>, Xiaoling Tian<sup>3</sup>, Chengling Huang<sup>3</sup>, Lingjun Wang<sup>4</sup>, Yuan Feng<sup>4</sup>, Jingli Zhang<sup>1\*</sup><sup>1</sup> College of Landscape and Gardening, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201<sup>2</sup> Hunan Forest Botanical Garden, Changsha 410116<sup>3</sup> College of Humanities & Science, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025<sup>4</sup> Institute of Guizhou Baili Rhododendron, Bijie, Guizhou 551518

**Abstract:** The southwestern region of China is the center of differentiation for the genus *Rhododendron*. Studies on the natural hybridization of *Rhododendron* provide solutions for taxonomic problems and enhance the ability to breed new cultivars faster. In this paper, we compared the morphological features and sequenced nuclear internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast *trnL-trnF*, *rbcL*, *trnH-psbA* for *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, and the putative hybrid offspring of these two species. All samples in this study were collected from Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province, the Shibao Mountain of Yunnan Province and Kunming Botanical Garden. Results showed that all putative hybrids (natural and artificial) produced an intermediate morphology. Sequencing results revealed that all artificial hybrids and one collected from the Shibao Mountain inherited cpDNA from *R. decorum*, and all putative hybrids collected from Baili Rhododendron Nature Reserve and six from Shibao Mountain inherited cpDNA from *R. delavayi*. In this study, we have confirmed that natural hybridization between *R. decorum* and *R. delavayi* exists in the Guizhou and Yunnan sites. Hybridization was bilateral, and most of the hybrids were derived from maternal parent *R. delavayi*.

收稿日期: 2017-03-22; 接受日期: 2017-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(31260079)和国家科技支撑计划(2015BAD10B00)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jl200812@yeah.net

**Key words:** *Rhododendron*; natural hybridization; morphological traits; DNA sequences

自然杂交(natural hybridization)在植物进化和物种形成中具有重要作用(Arnold, 1997; Rieseberg, 1997; Barton, 2001; Soltis & Soltis, 2009; Chase et al, 2010)。植物物种间的自然杂交发生频繁,特别是在适应性辐射分化种群中更为频繁(Seehausen, 2004; Grant et al, 2005)。据统计约有25%的物种发生过杂交(Mallet, 2005),在中国西南地区,如松属(*Pinus*) (Mason, 1949; Mao & Wang, 2011)、柳属(*Salix*) (Oberprieler et al, 2013)、橐吾属(*Ligularia*) (Yu et al, 2014)、龙胆属(*Gentiana*) (Li et al, 2008)、报春花属(*Primula*) (Ma et al, 2014)和绿绒蒿属(*Meconopsis*) (Yuan et al, 2007)等类群均存在自然杂交的现象。杜鹃属(*Rhododendron*)常绿杜鹃亚属(subgenus *Hymenanthus*)植物在喜马拉雅地区经历了快速的适应性辐射分化(Milne, 2004),由于种间生殖隔离较弱,种间杂交和基因渐渗容易发生,已有多个自然杂交研究的报道(Zhang et al, 2007; Milne & Abbott, 2008; Ma et al, 2010, 2016; Zha et al, 2008; Yan et al, 2013)。

杜鹃属是杜鹃花科最大的属,也是中国种子植物最大的属。据不完全统计,全世界约有1,025种杜鹃(Chamberlain et al, 1996),亚洲是杜鹃最主要的分布区。这些杜鹃主要集中在中国西南地区(云南、四川、贵州)和毗邻的喜马拉雅地区(不丹、尼泊尔及印度东北部)。中国是世界上杜鹃种类最多的国家,约542种,占世界种类的59%;云南分布最多,约259种,占全国的49%,是杜鹃最主要的分布与分化中心(闵天禄, 1984)。在园艺学领域,已培育出相当多的杜鹃花杂交品种,杜鹃属植物的种间自然杂交被频繁地报道(Kron et al, 1993; Milne et al, 1999, 2003; Milne & Abbott, 2008; Tagane et al, 2008)。开展杜鹃自然杂交研究不仅可为该属物种的形成与分类提供依据,同时也可作为杜鹃新品种培育提供新的思路。

马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi*)生长于我国西南地区,为云南省广布种,贵州省西北部也有分布,并且常常与大白杜鹃(*R. decorum*)、露珠杜鹃(*R. irroratum*)和迷人杜鹃(*R. agastum*)同域生长。从分类地位上看,这4种杜鹃同属于常绿杜鹃亚属常绿杜鹃组(section *Ponticum*),其中马缨杜鹃属于树形杜

鹃亚组(subsection *Arborea*),大白杜鹃属于云锦杜鹃亚组(subsection *Fortunea*),迷人杜鹃和露珠杜鹃属于露珠杜鹃亚组(subsection *Irrorata*) (Wu et al, 2005)。Cox (1995)最早在中国西南地区发现类似马缨杜鹃与大白杜鹃的杂交后代,Chamberlain (1982, 2003)推测迷人杜鹃为马缨杜鹃与大白杜鹃的杂交后代。Zhang等(2007)通过DNA序列比较和形态性状分析,证实了迷人杜鹃为马缨杜鹃与大白杜鹃的杂交后代,马缨杜鹃为母本,大白杜鹃为父本。然而,Zha等(2008, 2010)研究表明迷人杜鹃是马缨杜鹃与露珠杜鹃的杂交后代,且主要以F<sub>1</sub>代为主。在贵州百里杜鹃自然保护区(百里保护区)和云南石宝山均发现有形态性状介于大白杜鹃和马缨杜鹃之间的疑似杂交个体,且这些个体同两种杜鹃的人工杂交后代高度相似。为了验证这些疑似杂交个体是否为自然杂交后代,本研究以贵州百里保护区和云南石宝山的马缨杜鹃、大白杜鹃,以及二者疑似自然杂交后代和昆明植物园栽培的人工杂交后代个体为研究材料,通过核基因和叶绿体基因的序列比较分析,研究其自然杂交的真实性及杂交方向,通过形态特征比较,验证人工杂交后代的真实性,为杜鹃花的分类学和新品种选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

样品于2013年4月采自百里保护区和云南石宝山。这两个地方是我国西南地区云贵高原杜鹃属植物集中分布区域,分别位于贵州省大方县和黔西县交界处(27°08'–28°20' N, 105°45'–106°04' E)和云南省大理州剑川县境内(26°22' N, 99°50' E)。其中百里保护区共采集28份样品,石宝山17份,5份人工杂交后代样品采自中国科学院昆明植物园(表1)。采集植株健康的幼嫩叶片,用变色硅胶干燥处理后作为提取DNA的材料。

### 1.2 DNA提取、PCR扩增和数据处理

采用改良的CTAB法提取总DNA (Doyle & Doyle, 1987; Kobayashi et al, 1998)。利用ITS、*trnL-trnF*、*trnH-psbA*、*rbcL*序列引物进行扩增(White et al, 1990; Taberlet et al, 1991; Krewss & Erickson,

表1 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的来源和数量  
Table 1 Sources and sample size of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, and putative hybrids used in this study

编号 Code	种类 Taxon	地点 Site	经纬度 Latitude and longitude	海拔 Altitude (m)	个体数量 Sample size
BLM (1–10)	马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	贵州百里杜鹃自然保护区 Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province	27°15' N 105°58' E	1,700–1,800	10
BLD (1–10)	大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	贵州百里杜鹃自然保护区 Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province	27°15' N 105°58' E	1,700–1,800	10
BLH (1–8)	疑似杂交后代 Putative hybrids	贵州百里杜鹃自然保护区 Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province	27°15' N 105°58' E	1,700–1,800	8
SBSM (1–5)	马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	云南大理石宝山 Shibao Mountain of Dali, Yunnan	26°22' N 99°50' E	2,400–2,600	5
SBSD (1–5)	大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	云南大理石宝山 Shibao Mountain of Dali, Yunnan	26°22' N 99°50' E	2,400–2,600	5
SBSH (2/3/4/5/7/8/9)	疑似杂交后代 Putative hybrids	云南大理石宝山 Shibao Mountain of Dali, Yunnan	26°22' N 99°50' E	2,400–2,600	7
AH (1–5)	人工杂交后代 Artificial hybrids	昆明植物园 Kunming Botanical Garden			5
总计 Total					50

表2 大白杜鹃、马缨杜鹃、人工杂交后代与疑似杂交后代的形态特征对比  
Table 2 Comparison of morphological characters of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, artificial and putative hybrids

形态特征 Morphological characters	大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	疑似自然杂交与人工杂交后代 Putative and artificial hybrids	马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>
花冠颜色 Corolla color	白色 White	粉红 Pink	红色 Red
花冠裂片数 No. of corolla lobes	6–8, 通常7 6–8, usually 7	5–6, 无规律 5–6, irregular	5
叶片形状 Leaf shape	长圆形 Oblong	长圆形至披针形 Oblong to lanceolate	披针形 Lanceolate
叶片毛被 Ventral leaf surface indumentum	无毛 Glabrous	稀疏毛被 Thin indumentum	浓密海绵状毛被 Woolly indumentum
果实表面特征 Fruit surface character	有腺体 Glands	有腺体或毛被或两者均有 Glands or/and indumentum	密被棕红色毛被 Continuous brownish red indumentum
花期 Flowering period	5–6月 May to June	4月中旬–5月中旬 Mid-April to mid-May	3月–5月 March to May

2007), 序列长度及引物详情见附录1。聚合酶链式反应(PCR)在PERKIN ELMER 9600型PCR仪上进行, 各序列PCR反应体系及程序见附录2。PCR扩增产物首先经过1%琼脂糖凝胶电泳检验。成功扩增的产物再使用北京全式金公司PCR产物纯化试剂盒纯化, 纯化后的产物作为测序反应的模板DNA。DNA片段测序在ABI 3730xl自动测序仪上进行。15个疑似杂交后代与5个人工杂交后代ITS序列使用天根公司Lethal. Based Fast Cloning Kit试剂盒进行克隆后再次测序, 获得克隆序列。

利用Dnastar pack软件包中的SeqMan完成DNA序列的编辑和拼接, 各序列边缘根据GenBank近缘种确定, 相同序列经过对比寻找碱基差异。序列拼接后, 导入MEGA软件以Kimura 2-parameter模式重复1,000次获得NJ树(neighbor-joining tree), 所有的序列都提交到GenBank, 并获得登录号(KY81-4953-KY815002; KY853044-KY853193; KY882364-

KY882457)。

1.3 形态特征比较

选择15份大白杜鹃、15份马缨杜鹃、15份疑似自然杂交后代与5份人工杂交后代的标本用于形态特征比较, 包括花冠裂片数、叶片形状、叶片毛被、果实表面特征等(表2)。

用游标卡尺测量花序直径、花冠直径、叶长和叶宽。除花序直径外, 每一份标本其余性状均测量5次, 取平均值。花序直径、花序花朵数、花冠直径、花冠裂片数、叶长/叶宽、雄蕊数通过SPSS进行Duncan单因子方差检测( $P = 0.05$ )。

2 结果

2.1 核基因ITS序列变异

大白杜鹃、马缨杜鹃、疑似杂交后代以及人工杂交后代的ITS序列长度为654 bp, 共计6个变异位点。这6个位点能区分不同物种, 即大白杜鹃为A1

型, 马缨杜鹃为A2型, 疑似杂交后代和人工杂交后代在这6个位点均表现为疑似亲本碱基种类的杂合状态, 为A3型。经过克隆测序, 所有疑似杂交后代和人工杂交后代均获得了A1、A2型ITS序列, 说明它们拥有双亲的基因型(表3)。此外部分克隆测序结果为A4型, 是A1、A2型碱基信号的杂合。

2.2 叶绿体基因序列变异

2.2.1 trnL-trnF序列

马缨杜鹃与大白杜鹃的trnL-trnF序列的929个位点中共有9个变异位点(表4), 全部为碱基替换。大白杜鹃为B1型, 马缨杜鹃为B2型。所有人工杂交个体(5个)同大白杜鹃一致, 即B1型, 百里保护区的疑似杂交后代全部8个个体与马缨杜鹃一致, 为B2型, 石宝山疑似杂交后代中只有1个个体为B1型, 其余6

个个体为B2型。

2.2.2 rbcL序列

马缨杜鹃与大白杜鹃的rbcL序列长度为527 bp, 共有5个变异位点, 贵州百里保护区的大白杜鹃为C1型, 马缨杜鹃为C2型; 大理石宝山大白杜鹃为C3型, 马缨杜鹃为C4型。所有人工杂交个体为C1型, 百里保护区疑似杂交后代为C2型, 1个石宝山疑似杂交后代(SBSH5)为C3型, 其余6个石宝山疑似杂交后代为C4型。贵州百里保护区居群的大白杜鹃与大理石宝山居群的大白杜鹃在第8号位点存在一个C/G碱基替换, 两个居群的马缨杜鹃在相同位点也有C/G碱基替换(表5)。

2.2.3 trnH-psbA序列

在381 bp的trnH-psbA序列中一共存在23个差

表3 大白杜鹃与马缨杜鹃的ITS序列差异位点及疑似杂交后代克隆序列  
Table 3 The location of variable sites based on ITS and clone sequences of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids

编号 Code	克隆数量 Clone numbers	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)						类型 Type		
			94	101	114	203	494	505	A1	A2	A4
大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	0	A1	T	G	G	T	T	C	15	0	0
马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	0	A2	C	C	T	G	C	T	0	15	0
AH、BLH、SBSH		A3	Y	S	K	K	Y	Y			
克隆测序 Clone sequences											
BLH1	2								1	1	0
BLH2	4								1	2	1
BLH3	3								2	1	0
BLH4	3								2	1	0
BLH5	3								1	1	1
BLH6	5								1	1	3
BLH7	4								2	1	1
BLH8	4								2	1	1
AH1	3								1	2	1
AH2	3								1	2	0
AH3	4								2	2	0
AH4	3								2	1	0
AH5	4								2	2	1
SBSH2	6								4	2	0
SBSH3	8								5	3	0
SBSH4	5								4	1	0
SBSH5	5								4	1	0
SBSH7	7								5	2	0
SBSH8	7								6	1	0
SBSH9	5								3	2	0
克隆数量总计 Total clone numbers									53	31	10

AH、BLH和SBSH含义见表1; K = G + T; S = C + G; Y = C + T。  
The means of AH, BLH, and SBSH see Table 1; K = G + T; S = C + G; Y = C + T.

表4 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的trnL-trnF序列差异位点

Table 4 The location of variable sites based on trnL-trnF sequences of Rhododendron decorum, R. delavayi and putative hybrids

编号 Code	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)								
		147	622	623	624	626	627	629	646	831
大白杜鹃 <i>Rhododendron decorum</i>	B1	G	T	T	T	T	T	T	C	T
马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	B2	T	A	A	A	A	A	A	A	C
AH、SBSH5	B1	G	T	T	T	T	T	T	C	T
BLH、SHSH2/3/4/7/8/9	B2	T	A	A	A	A	A	A	A	C

AH、BLH和SBSH含义见表1。The means of AH, BLH, and SBSH see Table 1.

表5 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的rbcL序列差异位点

Table 5 The location of variable sites based on rbcL sequences of Rhododendron decorum, R. delavayi and putative hybrids

编号 Code	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)				
		8	30	263	398	407
BLD	C1	C	G	T	C	C
BLM	C2	C	T	A	T	T
SBSD	C3	G	G	T	C	C
SBSM	C4	G	T	A	T	T
AH	C1	C	G	T	C	C
BLH	C2	C	T	A	T	T
SBSH5	C3	G	G	T	C	C
SBSH2/3/4/7/8/9	C4	G	T	A	T	T

AH、BLH、SBSH、BLM、BLD、SBSM和SBSD含义见表1。  
The means of AH, BLH, SBSH, BLM, BLD, SBSM, and SBSH see Table 1.

异位点, 包括4个碱基位点的插入或缺失及19个位点的碱基替换。大理石宝山居群的大白杜鹃D2与百里保护区居群的大白杜鹃D1之间存在9个位点的差异, 即1个碱基插入或缺失, 8个碱基替换; 石宝山马缨杜鹃D4与百里保护区马缨杜鹃D3在第214个

位点存在A/C碱基替换(表6)。疑似杂交后代与人工杂交后代该序列片段结果与rbcL序列结果一致。

2.3 分子证据的联合分析

人工杂交后代与疑似杂交后代的ITS序列存在亲本物种碱基的杂合位点, 经过克隆测序获得大白杜鹃和马缨杜鹃的ITS序列, 分子证据支持疑似杂交后代为大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交后代。3个叶绿体基因序列中, trnL-trnF序列仅能区分大白杜鹃与马缨杜鹃, 无法区分同一物种的不同地理居群。rbcL和trnH-psbA序列在区分不同物种的基础上, 还能区分出贵州居群和云南居群, 且结果一致。即人工杂交后代AH的叶绿体基因序列同百里保护区的大白杜鹃一致, 百里保护区的疑似杂交后代BLH的叶绿体基因序列同该群落内的马缨杜鹃相同, 石宝山疑似杂交后代SBSH5个体的叶绿体基因序列同该群落内的大白杜鹃一致, 其余SBSH个体叶绿体基因序列同该群落内的马缨杜鹃一致, 叶绿体基因序列变异见附录3。联合ITS、trnL-trnF、rbcL、trnH-psbA序列片段分子系统树可将研究材料分为3支(图1),

表6 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的trnH-psbA序列差异位点

Table 6 The location of variable sites based on trnH-psbA sequences of Rhododendron decorum, R. delavayi and putative hybrids

编号 Code	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)																		
		1	2	128	135	211	214	245	254	254	299	313	333	337	340	344	348	351	358	365-369
BLD	D1	G	A	T	C	G	C	G	A	C	A	A	G	T	G	G	T	T	T	AATTC
SBSD	D2	—	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	A	A	A	A	G	G	*****
BLM	D3	*	*	A	G	A	C	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	*	G——
SBSM	D4	*	*	A	G	A	A	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	*	G——
AH	D1	G	A	T	C	G	C	G	A	C	A	A	G	T	G	G	T	T	T	AATTC
SBSH5	D2	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	A	A	A	A	G	G	*****
BLH	D3	*	*	A	G	A	C	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	*	G——
SBSH2/3/4/7/8/9	D4	*	*	A	G	A	A	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	.	G——

\*表示该位置碱基与 D1 类型的碱基一致, “-”表示缺失或插入; AH、BLH、SBSH、BLM、BLD、SBSM 和 SBSH 含义见表 1。

\* means that this site is identical with D1 type, “-” Absent or insert; The means of AH, BLH, SBSH, BLM, BLD, SBSM, and SBSH see Table 1.

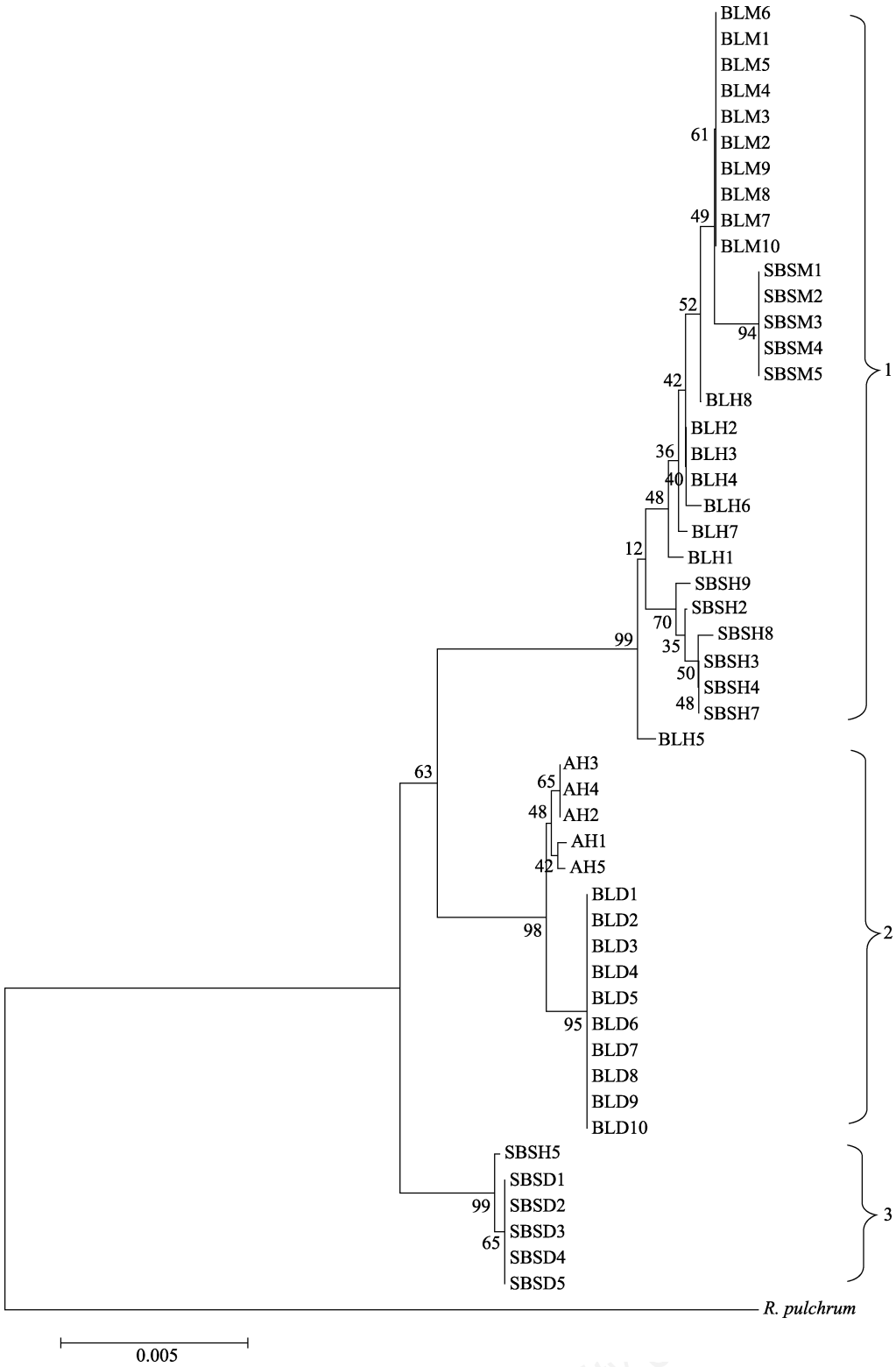


图1 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的联合ITS、*trnL-trnF*、*rbcL*、*psbA-trnH*序列片段的聚类图。AH、BLH、SBSH、BLM、BLD、SBSM和SBSD含义见表1。

Fig. 1 Clustering chart of combined ITS, *trnL-trnF*, *rbcL*, *psbA-trnH* sequence of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids. The means of AH, BLH, SBSH, BLM, BLD, SBSM, and SBSD see Table 1.

百里保护区的马缨杜鹃、石宝山的马缨杜鹃与百里保护区的疑似杂交后代和云南石宝山的杂交后代(除SBSH5个体)聚为一支(分支1), 人工杂交后代与百里保护区的大白杜鹃聚为一支(分支2), SBSH5个体与石宝山的大白杜鹃聚为一支(分支3)。

## 2.4 形态学证据

马缨杜鹃与大白杜鹃同为常绿大灌木至小乔木, 在花冠颜色、花冠裂片数、叶片形状、叶片毛被、果实表面特征和花期6个性状上易于区别(图2, 表2)。花序直径和花朵数等各性状间差异显著, 花序直径表现为:  $AH > \text{大白杜鹃} = BLH > \text{马缨杜鹃} = SBSH$  ( $F = 2.665, P = 0.05$ ); 花序花朵数表现为:  $AH > \text{马缨杜鹃} > BLH > SBSH > \text{大白杜鹃}$  ( $F = 6.721, P = 0.05$ ); 花冠直径表现为:  $\text{大白杜鹃} = AH > BLH > \text{马缨杜鹃} > SBSH$  ( $F = 41.512, P = 0.05$ ); 花冠裂片数表现为:  $\text{大白杜鹃} > AH > SBSH > \text{马缨杜鹃} = SBSH$  ( $F = 29.473, P = 0.05$ ); 雄蕊数表现为:  $\text{大白杜鹃} > AH > \text{马缨杜鹃} = BLH = SBSH$  ( $F = 36.127, P = 0.05$ ); 叶长/叶宽表现为:  $\text{马缨杜鹃} = BLH > AH = SBSH > \text{大白杜鹃}$  ( $F = 51.929, P = 0.05$ ) (图3)。通过形态学比较, 20个马缨杜鹃和大白杜鹃的疑似杂交个体的形态学特征介于大白杜鹃与马缨杜鹃之间, 个别性状超过或低于这两种杜鹃, 如花序直径、花冠直径。

## 3 讨论

### 3.1 马缨杜鹃与大白杜鹃存在自然杂交

前人关于杜鹃花自然杂交的相关研究(Zhang et al, 2007; Tagane et al, 2008; Ma et al, 2010; Zha et al, 2010; Yan et al, 2013)均基于形态特征的推测。植株形态特征呈现中间性状、不完全的育性以及疑似亲本在地理上的同域分布等现象暗示着可能存在杂交(Gottlieb, 1972)。本研究所选的疑似杂交个体形态特征表现为大白杜鹃与马缨杜鹃的中间性状, 同时, 大白杜鹃与马缨杜鹃花期重叠, 两者有共同的传粉昆虫中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*), 两者双向人工授粉均可育, 杂交后代种子具有很高的活力(张长芹等, 1998; 张敬雨等, 2007)。通过以上证据推测15个野外疑似杂交个体可能为大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交后代。本研究中, 分子证据证实了基于形态学的推测, 即疑似杂交后代的ITS序列有6个位点均表现为疑似亲本碱基种类的杂合状态,

表明它们拥有父母双方的基因型。杜鹃属植物的叶绿体通常为母系遗传, 本研究中3个叶绿体基因序列分析结果表明, 除了云南石宝山发现的1个杂交个体SBSH5具有大白杜鹃的单倍型外, 其余自然杂交个体均具有马缨杜鹃的单倍型, 而所有人工杂交个体的单倍型与大白杜鹃相同, 即绝大部分的自然杂交个体的母本为马缨杜鹃。这是因为杜鹃属植物为雄蕊先熟, 早开花的柱头更易接受后期开放花朵的花粉(Milne & Abbott, 2008), 而马缨杜鹃花期早于大白杜鹃, 更容易成为母本(Zhang et al, 2007; Ma et al, 2010; Zha et al, 2010)。

### 3.2 杜鹃自然杂交的启示

杂交既能产生杂种优势, 有利于后代群体的壮大(卢宝荣等, 2010); 也能产生劣势, 造成群体衰退或者小居群被大居群同化(王峥峰和彭少麟, 2012)。狭域分布的小居群通常更容易受到环境改变而濒危。然而, 在狭域分布物种蓝果杜鹃(*R. cyanocarpum*)与马缨杜鹃的自然杂交中, 杂交并未加剧蓝果杜鹃的濒危, 并且两者间存在强生殖隔离(Ma et al, 2016), 可见杂交对蓝果杜鹃的保护可能更有利。相反, 日本屋久岛的*R. ericarpum*海边居群被*R. indicum*河岸居群渐渗, 使得屋久岛鲜有基因纯和的*R. ericarpum* (Tagane et al, 2008), 从而不利于*R. ericarpum*的保护。杂交种棱果沙棘(*Hippophae gonocarpa*)不仅未表现出杂交优势, 其适应性未超过亲本, 甚至在一定程度上与亲本竞争光和水分<sup>①</sup>。大白杜鹃与马缨杜鹃均为广布物种, 杂交后代迷人杜鹃在调查范围内与大白杜鹃、马缨杜鹃、露珠杜鹃也存在一定程度的竞争, 可能对亲本的生存产生一定程度的压力。中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)与美味猕猴桃(*A. deliciosa*)在倍性上存在差异, 理论上而言在经历过足够长的分隔后应产生一定的分化, 但恰好同域分布的两者存在不完全的生殖隔离, 从而构成了中华/美味猕猴桃复合体(刘亚令, 2006)。大白杜鹃、马缨杜鹃、露珠杜鹃均为二倍体( $2n = 26$ ) (Zhang et al, 2007), 也存在不完全的生殖隔离。而已经存在的迷人杜鹃回交群体暗示着这一杂交进程可能还会继续发展, 其发展方向、程度以及后果未知, 值得持续关注。

① 唐洁涓 (2009) 棱果沙棘自然杂交带亲本与杂交后代的适应性分析. 硕士学位论文, 西北师范大学, 兰州。



图2 大白杜鹃、马缨杜鹃、疑似杂交后代与人工杂交后代的花序和叶片  
Fig. 2 Flowers and leaves of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, putative and artificial hybrids

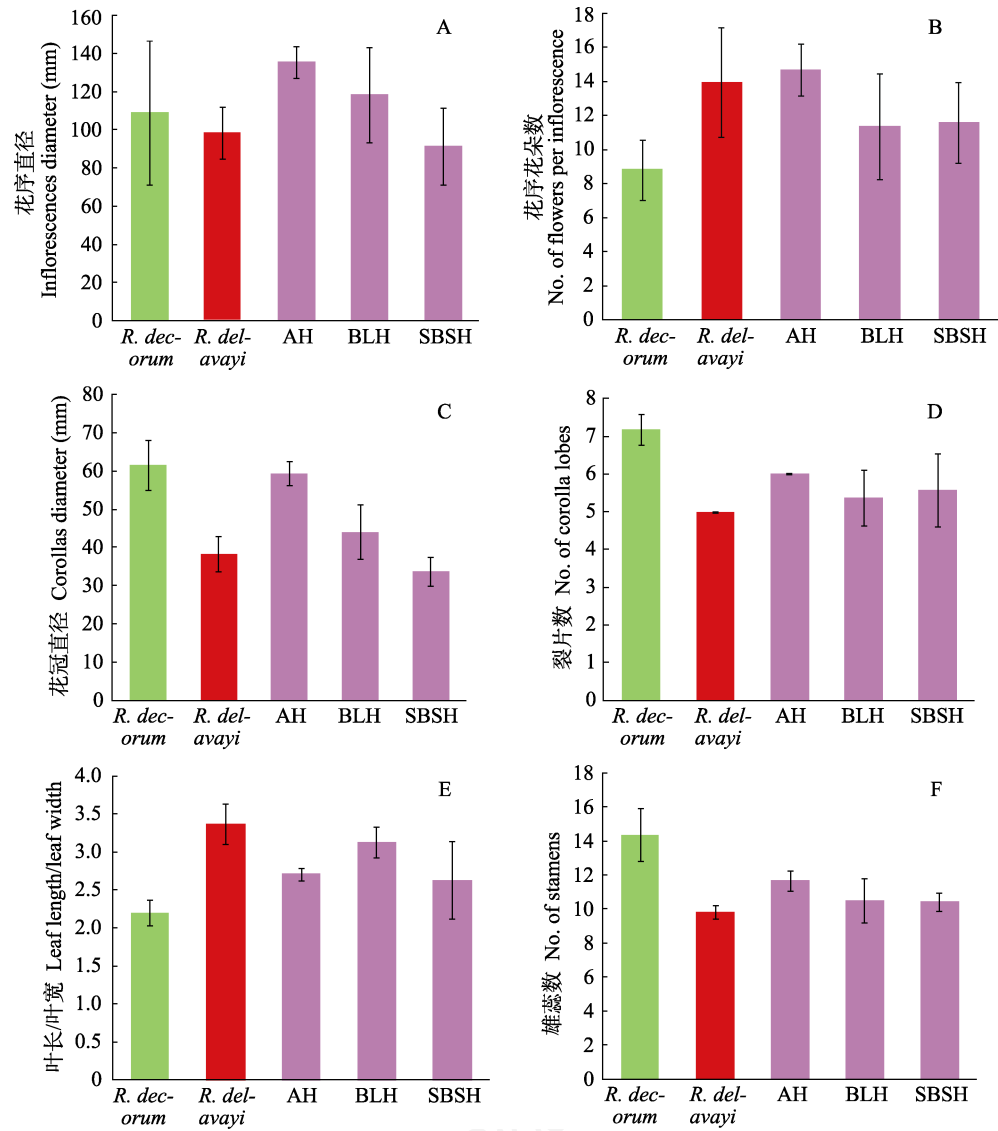


图3 大白杜鹃、马缨杜鹃、疑似杂交后代与人工杂交后代部分数量性状。AH、BLH和SBSH含义见表1。  
Fig. 3 Part of quantitative characters of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, putative and artificial hybrid. The means of AH, BLH, and SBSH see Table 1.

贵州百里保护区和云南大理石宝山都已经被开发为风景旅游区,对当地的生态环境产生了一定的干扰,尤其是百里保护区,上层林木的砍伐使得大面积的杜鹃花纯林出现,且发生大量不同种杜鹃之间的自然杂交现象。这些群落目前处于生长旺盛期,但也存在着种群结构不稳定,核心种类分布地带人类活动相对频繁的特点,且中间夹杂着被开垦的农田,生境片段化严重,直接威胁到百里保护区作为品种基因库和种质资源库的功能,也将会影响到百里保护区旅游景观的可持续发展(张长芹等, 2015)。在实际生产生活中要注意保护生态环境,避免生态过度干扰而引起物种濒危或产生物种间基因渐渗。

从园艺观赏的角度而言,大白杜鹃与马缨杜鹃的杂交后代花大,花色柔和,观赏价值很高,自然杂交后代通过扩繁就能盆栽观赏、景观绿化,或作为亲本进一步育种,缩短育种年限。此外,百里杜鹃保护区内存在丰富的杜鹃花自然杂交种质资源,为我国杜鹃花培育提供了很好的资源,值得继续深入研究。

**致谢:** 感谢贵州百里杜鹃管委会黄家湧对调查、采样的支持和帮助。感谢编委和三位匿名审稿人在论文评审时的建议和指导。感谢新西兰植物与食品研究院Dr. Huaibi Zhang对英文摘要的修改。感谢邓强提供部分图像资料。

## 参考文献

- Arnold ML (1997) Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, New York.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10, 551–568.
- Chamberlain DF (1982) A revision of *Rhododendron*. II. Subgenus *Hyemantes*. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 39, 209–486.
- Chamberlain DF (2003) *Rhododendrons* in the wild: a taxonomist's view. In: *Rhododendrons* in Horticulture and Science (eds Argent G, McFarlane M), pp. 42–52. The Royal Botanic Garden, Edinburgh.
- Chamberlain DF, Hyam R, Argent G, Fairweather G, Walter KS (1996) The Genus *Rhododendron*, Its Classification and Synonymy. Alden Press, Oxford.
- Chase MW, Paun O, Fay MF (2010) Hybridization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts. *BMC Biology*, 8, doi:10.1186/1741-7007-8-45.
- Cox PA (1995) Note of natural hybrids and intraspecific variation of *Rhododendron* in China. In: Scientific Investigation of the Plant on Cangshan Mountain (eds Duan CZ, Liao SC, Li QL, Li XW). Yunnan Science and Technology Press, Kunming. (in Chinese) [Cox PA (1995) 中国杜鹃属植物的天然杂交及种内变异. 见: 苍山植物科学考察(段诚忠, 廖士长, 李琼兰, 李锡文). 云南科技出版社, 昆明.]
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Gottlieb LD (1972) Leaves of confidence in the analysis of hybridization in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 59, 435–446.
- Grant PR, Grant BR, Petren K (2005) Hybridization in the recent past. *The American Naturalist*, 166, 56–67.
- Kobayashi N, Horikoshi T, Katsuyama H, Handa T, Takayangi K (1998) A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 4, 72–80.
- Kreuss WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plant: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2, e508.
- Kron KA, Gawn LM, Chase MW (1993) Evidence for introgression in azaleas (*Rhododendron*; Ericaceae): chloroplast DNA and morphological variation in a hybrid swarm on Georgia. *American Journal of Botany*, 80, 1095–1099.
- Li XJ, Wang LY, Yang HL, Liu JQ (2008) Confirmation of natural hybrid between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) based on molecular evidence. *Frontiers of Biology in China*, 3, 470–476.
- Liu YL (2006) The Genetic Structure and Introgression Among Natural Populations of *Actinidia*. PhD dissertation, Central China Agricultural University, Wuhan. (in Chinese with English abstract) [刘亚令 (2006) 猕猴桃属植物自然居群的遗传结构与种间基因渐渗研究. 博士学位论文, 华中农业大学, 武汉.]
- Lu BR, Xia H, Wang W, Yang X (2010) Impact of natural hybridization and introgression on biological in invasion of plant species. *Biodiversity Science*, 18, 577–589. (in Chinese with English abstract) [卢宝荣, 夏辉, 汪魏, 杨箫 (2010) 天然杂交与遗传渐渗对植物入侵性的影响. 生物多样性, 18, 577–589.]
- Ma YP, Zhang CQ, Zhang JL, Yang JB (2010) Natural hybridization between *Rhododendron delavayi* and *R. cyanocarpum* (Ericaceae), from morphological, molecular and reproductive evidence. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 844–851.
- Ma YP, Xie WJ, Tian XL, Sun WB, Wu ZK, Milne RI (2014) Unidirectional hybridization and reproductive barriers between two heterostylous primrose species in north-west Yunnan, China. *Annals of Botany*, 113, 763–775.
- Ma YP, Xie WJ, Sun WB, Tobias M (2016) Strong reproduc-

- tive isolation despite occasional hybridization between a widely distributed and a narrow endemic *Rhododendron* species. *Scientific Reports*, 6, 19146.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Mao JF, Wang XR (2011) Distinct niche divergence characterizes the homoploid hybrid speciation of *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *The American Naturalist*, 177, 424–439.
- Mason HL (1949) Evidence for the Genetic Submergence of *Pinus remorata* Genetics, Paleontology and Evolution. Princeton University Press, Princeton.
- Milne RI (2004) Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection *Pontica*, a group with a Tertiary relict distribution. *Molecular Phylogenetic & Evolution*, 33, 389–401.
- Milne RI, Abbott RJ (2008) Reproductive isolation among two interfertile *Rhododendron* species: low frequency of post-F<sub>1</sub> hybrid genotypes in alpine hybrid zones. *Molecular Ecology*, 17, 1108–1121.
- Milne RI, Abbott RJ, Wolff K, Chamberlain DF (1999) Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany*, 86, 1776–1785.
- Milne RI, Terzioğlu S, Abbott RJ (2003) A hybrid zone dominated by fertile F<sub>1</sub>s: maintenance of species barriers in *Rhododendron*. *Molecular Ecology*, 12, 2719–2729.
- Min TL (1984) A revision of subgenus *Hymenanthes* (*Rhododendron* L.) in Yunnan-Xizang. *Acta Botanica Yunnanica*, 6, 141–171. (in Chinese with English abstract) [闵天禄 (1984) 滇藏常绿杜鹃亚属的修订. 云南植物研究, 6, 141–171.]
- Oberprieler C, Dietz L, Harlander C, Heilmann J (2013) Molecular and phytochemical evidence for the taxonomic integrity of *Salix alba*, *S. fragilis*, and their hybrid *S. × rubens* (Salicaceae) in mixed stands in SE Germany. *Plant Systematics & Evolution*, 299, 1107–1118.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology & Systematics* 28, 259–389.
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 198–207.
- Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of the three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105–1109.
- Tagane S, Hiramatsu M, Okubo H (2008) Hybridization and asymmetric introgression between *Rhododendron eriocarpon* and *R. indicum* on Yakushima Island, Southwest Japan. *Journal of Plant Research*, 121, 387–395.
- Wang ZF, Peng SL (2003) Plant hybridization and its harmful genetic consequences. *Biodiversity Science*, 11, 333–339. (in Chinese with English abstract) [王峥嵘, 彭少麟 (2003) 杂交产生的遗传危害——以植物为例. 生物多样性, 11, 333–339.]
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T), pp. 315–322. Academic, San Diego.
- Wu ZY, Raven PH, Hong DY (2005) *Flora of China*, Vol. 14. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Yan LJ, Gao LM, Li DZ (2013) Molecular evidence for natural hybridization between *Rhododendron spiciferum* and *R. spinuliferum* (Ericaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 51, 426–434.
- Yu JJ, Pan L, Pan YZ, Gong X (2014) Natural hybrid between *Ligularia vellea* and *L. subspicata* (Asteraceae: Senecioneae). *Plant Diversity and Resources*, 36, 219–226.
- Yuan CC, He XB, Yuan QM, Shi SH (2007) Genetic relationship between a natural hybrid *Meconopsis × cookei* (Papaveraceae) and its parents based on cpDNA *trnL-trnF* region sequence. *Acta Botanica Yunnanica*, 29, 103–108.
- Zha HG, Milne RI, Sun H (2008) Morphological and molecular evidence of natural hybridization between two distantly related *Rhododendron* species from the Sino-Himalaya. *Botanical Journal of Linnean Society*, 156, 119–129.
- Zha HG, Milne RI, Sun H (2010) Asymmetric hybridization in *Rhododendron agastum*: a hybrid taxon comprising mainly F<sub>1</sub>s in Yunnan, China. *Annals of Botany*, 105, 89–100.
- Zhang JL, Zhang CQ, Gao LM, Yang JB, Li HT (2007) Natural hybridization origin of *Rhododendron agastum* (Ericaceae) in Yunnan, China: inferred from morphological and molecular evidence. *Journal of Plant Research*, 120, 457–463.
- Zhang JL, Zhang CQ, Wu ZK, Qiao Q (2007) The potential roles of interspecific pollination in natural hybridization of *Rhododendron* species in Yunnan, China. *Biodiversity Science*, 15, 658–665. (in Chinese with English abstract) [张敬丽, 张长芹, 吴之坤, 乔琴 (2007) 探讨种间传粉在杜鹃花属自然杂交物种形成中的作用. 生物多样性, 15, 658–665.]
- Zhang CQ, Feng BJ, Lü YL (1998) Hybridization study of the genus *Rhododendron*. *Acta Botanica Yunnanica*, 20, 94–96. (in Chinese with English abstract) [张长芹, 冯宝均, 吕元林 (1998) 杜鹃花属的杂交育种研究. 云南植物研究, 20, 94–96.]
- Zhang CQ, Huang CL, Huang JY, Wang LJ, Zhang JL, Sun WB, Ma YP (2015) Investigation of germplasm resources of the genus *Rhododendron* in Baili Nature Reserve in Guizhou. *Plants Diversity and Resources*, 37, 357–364. (in Chinese with English abstract) [张长芹, 黄承玲, 黄家勇, 王灵军, 张敬丽, 孙卫邦, 马永鹏 (2015) 贵州百里杜鹃自然保护区杜鹃花属种质资源的调查. 植物分类与资源学报, 37, 357–364.]

(责任编辑: 高连明 责任编辑: 黄祥忠)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 本研究中所用4个序列引物

Appendix 1 Primers of four intergenic spacer used in this study

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017090-1.pdf>

### 附录2 本研究所用4个序列体系及程序

Appendix 2 The systems and procedures of four intergenic spacer used in this paper

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017090-2.pdf>

### 附录3 杂交后代叶绿体序列类型详情

Appendix 3 The details of four cpDNA sequences type of hybrid

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017090-3.pdf>

郑硕理, 田晓玲, 黄承玲, 王灵军, 冯元, 张敬丽. 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交. 生物多样性, 2017, 25 (6): 627–637.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017090>

2 附录 1 本研究中所用 4 个序列引物

Appendix 1 Primers of four intergenic spacer used in this study

序列名称	引物	引物序列	序列长度
Gene region	Primer	Primer sequence (5'→3')	Sequences length (bp)
ITS	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	654
	ITS5	CGT AAC AAG GTT TCC GTA GC	
<i>trnL-trnF</i>	<i>trn-c</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	929
	<i>trn-f</i>	ATT TGA ACT GGT GAG ACG AG	
<i>trnH-psbA</i>	fwd	CTT ATG CAT CAA CGT AAT GCT C	381
	rev	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa-F</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	527
	<i>rbcLa-R</i>	CTA AAA TCA AGT CCA CCR CG	

6

附录 2 本研究所用 4 个序列体系及程序

8 Appendix 2 The systems and procedures of four intergenic spacer used in this paper

名称	PCR 程序	PCR 体系 (25 μL)
Gene region	PCR procedure	PCR system
ITS	94℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	52℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
} 35 cycles		
<i>trnL-trnF</i>	94℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	56℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
} 35 cycles		
<i>trnH-psbA</i>	95℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	52℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
} 35 cycles		
<i>rbcL</i>	94℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	55℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
} 35 cycles		

2 × Mix (天根公司): 0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μL dNTP each, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3),  
10 100 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> 等其他稳定剂和增强剂。  
2 × Mix (TIANGEN BIOTECH CO. LTD.): 0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μL dNTP each, 20  
12 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> with other stabilizer and reinforcing agent.

郑硕理, 田晓玲, 黄承玲, 王灵军, 冯元, 张敬丽. 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交. 生物多样性, 2017, 25 (6): 627–637.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017090>

14

附录 3 杂交后代叶绿体序列类型详情

16

Appendix 3 The details of four cpDNA sequences type of hybrid

	<i>trnL-trnF</i> 类型		<i>rbcL</i> 类型				<i>psbA-trnH</i> 序列			
	<i>trnL-trnF</i> Types		<i>rbcL</i> Types				<i>psbA-trnH</i> Types			
	B1	B2	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4
马缨杜鹃 <i>Rhododendron delavayi</i>	15	0	0	10	0	5	0	0	10	5
大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	0	15	10	0	5	0	10	5	0	0
BL putative hybrid (BLH1)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH2)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH3)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH4)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH5)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH6)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH7)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH8)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Artificial hybrid (AH1)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH2)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH3)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH4)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH5)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
SBS putative hybrid (SBSH2)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH3)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH4)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH5)	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
SBS putative hybrid (SBSH7)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH8)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH9)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1

BL: 贵州百里杜鹃保护区; SBS: 云南大理石宝山。

18

BL: Baili Rhododendron Nature Reserve; SBS: Shibao Mountain of Dali, Yunnan.

20