

# 基于 ITS 和 *matK* 序列探讨新疆野苹果与中国苹果的系统演化关系

朱元娣<sup>1</sup>, 曹敏格<sup>1</sup>, 许正<sup>2</sup>, 王昆<sup>3</sup>, 张文<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; <sup>2</sup> 新疆伊犁州林业科学院, 新疆伊宁 835000; <sup>3</sup> 中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125100)

**摘要:** 以新疆地区不同居群的 52 份新疆野苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.]、9 份中国苹果品种 (*Malus × domestica* subsp. *chinensis* Li.)、1 份森林苹果 (*M. sylvestris* Miller) 种质为试材, 进行核糖体 DNA 内转录间隔区 (ribosomal DNA internal transcribed spacers, ITS) 和叶绿体成熟酶 K (*matK*) 基因的测序分析。从 GenBank 中获取了 11 个苹果栽培品种、14 个塞威士苹果、26 个苹果属其它种及 1 个外类群欧洲梨 (*Pyrus communis*) 的 ITS 及 *matK* 序列。利用 MEGA (ver. 4.0) 计算不同序列间的碱基组成频率、简约信息位点数、转换/颠换比率、序列间成对距离, 以最大简约法与邻接法进行系统发育分析。结果表明, 采集的“新疆野苹果”与“中国苹果”的 ITS 序列长度在 589 ~ 594 bp, 含有 148 个简约信息位点, 转换/颠换比率 (R) 为 1.029; *MatK* 序列长度为 1 451 ~ 1 461 bp, 没有复制子 II 序列, 含有 16 个简约信息位点, 转换/颠换为 1.442。ITS 分析将中国苹果、新疆野苹果 (来自中国新疆) 和塞威士苹果 (来自 GenBank) 聚类于一个大的发育枝内, 新疆野苹果 5 个居群的系统演化按新源、巩留、霍城和塔城的先后次序发生。*MatK* 序列的系统发育分析将中国苹果和新疆野苹果聚类在一个大的发育枝内, 但自展支持率低。由此说明, 中国苹果由新疆野苹果驯化而来。*matK* 不适于栽培苹果种内的系统发育分析。

**关键词:** 苹果; 新疆野生苹果; 中国苹果; ITS; *matK*; 系统发育分析

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 02-0227-13

## Phylogenetic Relationship Between Xinjiang Wild Apple (*Malus sieversii* Roem.) and Chinese Apple (*Malus × domestica* subsp. *chinensis*) Based on ITS and *matK* Sequences

ZHU Yuan-di<sup>1</sup>, CAO Min-ge<sup>1</sup>, XU Zheng<sup>2</sup>, WANG Kun<sup>3</sup>, and ZHANG Wen<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> Xinjiang Academy of Forestry Science in Yili, Yining, Xinjiang 835000, China; <sup>3</sup> Research Institute of Pomology, China Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

**Abstract:** Revealing the phylogenetic relationship between Xinjiang wild apple (*Malus sieversii* Roem.) and Chinese apple (*Malus × domestica* subsp. *chinensis* Li.) at molecular level would help identify the origin and taxonomy of Chinese apple, and provide theoretical basis for preserving and utilizing wild

收稿日期: 2013-09-10; 修回日期: 2014-01-20

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 项目 (201003021); 北京市教委项目 (201307210610099)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangwen@cau.edu.cn)

apple resources. The sequence of ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) and the coding region of the *matK* gene were sequenced from 52 accessions of Xinjiang wild apple, nine cultivars of Chinese apple, and one accession of *M. sylvestris*. Sequences of ITS and *matK* of 11 cultivars of *Malus × domestica*, 14 accessions of *Malus sieversii*, 26 of other *Malus* spp., and one of *Pyrus communis* were retrieved from GenBank. The MEGA software (ver. 4.0) was used to analyze the divergences, variable sites, parsim-informative sites, the ratio of transition to transversion (R) and pairwise distances. The phylogenetic analysis was conducted by Maximum parsimony (MP) and Neighbor-joining (NJ) methods. The results showed that the size of ITS sequences of Xinjiang wild apple and Chinese apple ranged from 589 bp to 594 bp containing 148 parsim-informative sites with R of 1.029, whereas their *matK* sequences varied from 1 451 bp to 1 461 bp encompassing 16 parsim-informative sites with R of 1.442. Duplication II was not found in the Xinjiang wild apple and Chinese apple accessions. Phylogenetic trees of ITS showed that Chinese apple, the Xinjiang wild apple (from Xinjiang, China), and *M. sieversii* (from GenBank) fallen into a large clade. The systematic evolution of Xinjiang wild apple appeared to occur in a geographical order of Xinyuan, Gongliu, Huocheng, and Tacheng. The *matK* cladograms grouped Chinese apple and the Xinjiang wild apple into one large clade with weak bootstrap support. These results indicated that Chinese apple was domesticated from Xinjiang wild apple and the *matK* gene was not applicable for phylogenetic analysis in intra-species of *Malus × domestica*.

**Key words:** *Malus × domestica* Borkh.; *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.; *Malus × domestica* subsp. *chinensis* Li Y. N.; ITS; *matK*; phylogenetic analysis

苹果属 (*Malus*) 植物分布于北温带, 呈中亚—欧洲和东亚—北美间断分布的格局, 中国是苹果属植物的起源中心之一 (李育农, 1999; 成明昊 等, 2000; Harris et al., 2002)。亚东部地区的塞威士苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.] 为现代栽培苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 的祖先 (Velasco et al., 2010), 自然分布于中亚的天山山脉, 包括哈萨克斯坦、吉尔吉斯斯坦、塔吉克斯坦、乌孜别克斯坦、土库曼共和国和中国新疆的西部天山北麓, 在中国又称为新疆野苹果 (Zhou, 1999; 林培钧和崔乃然, 2000)。新疆的野生苹果林以伊犁地区的新源、巩留和霍城的野生林面积最大, 塔城地区额敏和托里也有少量分布, 各居群分布区域的生态条件差异大, 生态类型丰富, 具有抗寒、耐虫、耐病和耐旱等优良性状, 为珍贵的果树种质资源 (Zhou, 1999; 张春雨 等, 2007)。中国苹果 (*M. × domestica* subsp. *chinensis* Li Y. N.) 古称为“柰”, 俗称“绵苹果”, 魏晋时期就有记载, 广泛栽培于中国北方 (李育农, 1999, 2001; Zhou & Li, 1999)。中国绵苹果及其自然杂交种和栽培驯化形成的变种和品种甚多, 现存有‘绵苹果’、‘中国彩苹’、‘黄甜果’、‘香果’、‘新疆苹果’、‘金沙伊拉姆’、‘二楸子’和‘冬白果’等品种, 形成中国苹果品种群, 与欧洲的栽培苹果品种群并列为栽培苹果的两大品种群 (束怀瑞 等, 1999; 贾敬贤 等, 2006)。中国苹果抗苹果绵蚜虫等病虫害, 为苹果优良的抗性育种材料, 但因其果实成熟后质地沙软、不耐贮存等缺陷, 已被生产淘汰。新疆野生苹果的生境和种质资源因农业生产扩张而渐遭破坏 (Yan et al., 2008)。野生资源各居群的群体性状评价, 是核心种质的确定和资源异地保存的基础 (Geibel et al., 2000; Volk et al., 2005)。从分子水平上研究新疆野苹果各居群与中国苹果的起源演化关系, 确定中国苹果的分类学地位, 有助于苹果种质资源多样性的保护、开发和利用。

基因序列的多态性信息是植物分类的最本质证据, 核 DNA 和叶绿体 DNA 的序列的系统发育数据可确认和修正现存的分类系统。在多种 DNA 分子标记技术中, 核基因组的核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacers of nuclear ribosome, ITS) 序列 (Eriksson et al., 2003; Potter et al.,

2007) 和叶绿体成熟酶 K (maturase K, *matK*) 基因 (Robinson et al., 2001; Potter et al., 2002, 2007; Campbell et al., 2007) 因其进化速度快而广泛地应用于植物系统发育分析。基于 *matK* 和 ITS 序列的系统发育分析 (Robinson et al., 2001; Potter et al., 2002), 以及苹果属内 23 个基因的多位点连接的序列比对分析 (Velasco et al., 2010), 确证现代的栽培苹果起源于塞威士苹果, 二者是相同的种, 排除森林苹果 (*M. sylvestris* Miller) 参与了栽培苹果的杂种起源学说 (Coart et al., 2006)。但这些研究中不包括源自新疆的野生苹果和中国苹果品种群的试材。

关于新疆野苹果各居群的演化路径和中国苹果的起源, 已有的研究从生态地理学、形态学、孢粉学、染色体学和同工酶标记进行了推理和论证。染色体核型分析表明, 新疆野苹果的染色体核型比‘绵苹果’对称程度高, 是比‘绵苹果’更原始的种类 (梁国鲁和李晓林, 1993; 李育农, 1999; Zhou, 1999)。孢粉学结果显示, ‘绵苹果’花粉粒的 P/E (极轴/赤道轴) 值比新疆野苹果的小, 而新疆新源地区野苹果的花粉 P/E 值比其他居群野苹果的小, 推测新疆野苹果是‘绵苹果’的起源种, 新源的野苹果为原始类型 (杨晓红和李育农, 1995; 张元明和阎国荣, 2001)。过氧化物酶同工酶分析表明, 新疆野苹果、东方苹果 (*M. orientalis*)、森林苹果 (*M. sylvestris* Miller) 和‘绵苹果’的酶带数最少, 亲缘关系最近 (李育农和李晓林, 1995)。但是基于基因序列的系统发育研究未见报道。而且, 现存的‘绵苹果’仅是中国苹果的代表品种之一, 中国苹果其他的代表性品种与新疆野苹果的亲缘关系研究依然缺乏。

本研究中通过对现存的新疆野生苹果资源、中国苹果品种和苹果属的种质资源进行 ITS 和 *MatK* 序列分析, 辅以从 GenBank 获取的苹果栽培品种、苹果属其他种类和外类群的 ITS 和 *matK* 序列信息, 综合进行系统发育分析, 探索新疆野苹果各居群的演化路径及与中国苹果的系统发育关系, 以期确立中国苹果在苹果属的分类学地位, 为中国现有的苹果种质资源的保护及利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新疆野生苹果材料于 2006 年采自新疆伊犁新源 (S9)、巩留 (S10) 和霍城 (S11) 及塔城额敏 (S12) 和托里 (S13) 林区, 采用分层抽样法抽取样本。采集苹果新梢幼叶, 用硅胶干燥, 常温保存 (王化坤 等, 2006)。「绵苹果」、「中国彩苹」、「香果」和新疆地方栽培品种于 2007 年采自辽宁兴城中国农业科学院果树研究所, 其他苹果属样品采自中国农业大学上庄试验基地 (表 1), 苹果属植物分类体系参照文献 (李育农, 2001)。本研究中将取自 GenBank 的材料称为塞威士苹果, 将采自新疆地区的试材称为新疆野苹果。表中括号内数字表示用于分子标记分析的试材份数。采自新疆新源地区 10 份试材为 S9-01 ~ S9-10; 巩留 9 份样本为 S10-01 ~ S10-09; 霍城 8 份样本为 S11-01 ~ S11-08; 额敏 10 份样本为 S12-01 ~ S12-10; 托里 8 份样本为 S13-01 ~ S13-08。

### 1.2 叶片总 DNA 提取

经硅胶干燥的叶片, 用 CTAB 法提取总 DNA (王化坤 等, 2006)。

### 1.3 ITS 和 *matK* 序列的 PCR 扩增和测序

根据 Robinson 等 (2001) 设计特异引物, 用于苹果 ITS 序列的 PCR 扩增和测序。正向引物序列: 5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG-3'; 反向引物序列: 5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'。用于苹果 *matK* 序列 PCR 扩增的正向引物为 5'-ACTGTATCGCACTATGTATCA-3'和反向引物为 5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3'; 根据 Coart 等 (2006) 设计 3 对特异引物,

用于 *matK* 序列分段测序, 分别是 P1F (5'-CTGTATCGCACTATGTATCA-3') 和 P1R (5'-GGAGGC AAGAATAATCGTGGAT-3'), P2F (5'-CTTCGCTATTGGGTGAAAGATCC-3') 和 P2R (5'-AATTTTCTA GCATTTGACCCCG-3'); P3F (5'-GTGGTCTCAACCAAGAAGG-3') 和 P3R (5'-AACTAGTCGG ATG GAGTAG-3')。PCR 扩增 ITS 序列的反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min、56 °C 退火 50 s、72 °C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 扩增 *matK* 序列的反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min、53 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 扩增产物通过 1.2% 琼脂糖胶电泳检测, 回收目的片段, 进行 PCR 产物测序。

#### 1.4 ITS 和 *matK* 序列的数据分析和系统学分析

测序获得的 DNA 序列在 GenBank 上进行 Blast 比对, 整合并切除两端引物后, 用 Clustal X 软件进行对位排列, 个别位点做必要的人工校正, 选择适当的外类群, 用 PHYLIP 软件进行系统发育分析。空位被处理为缺失, 删除那些难于对位排列的内含子区域。不同序列间的碱基组成频率、变异位点 (出现两种以上碱基类型的位点)、简约信息位点数 (即特殊的变异位点, 该位点上不仅存在两种以上的碱基类型, 而且每种碱基类型均出现在两个以上的类群中)、转换/颠换比率、序列间成对距离等用 MEGA (ver. 4.0) 计算。利用两条序列之间各位点核苷酸替换数的估计值分析遗传距离。用 Phylip 的邻接法 NJ (Neighbor-joining method) 与最大简约法 MP (Maximum parsimony method) 构建系统发育树。在邻接法 NJ 分析中, 用 Kimura-2 参数计算各序列间的遗传距离, 并用自展法 (bootstrap) 进行 1 000 次检测。在最大简约法 MP 分析中, 空位作缺失处理, 采用 1 000 次自展法以确保获得更真实的进化树。自展数值 75% ~ 100% 表示强支持率, 50% ~ 74% 表示弱支持率, < 50% 表示不支持。

表 1 试验材料及其来源

Table 1 List of plant materials used in this study and their original resources

分类群 Taxon	试材代号 Code	来源 Resource	ITS sequences *	<i>matK</i> sequences *
<b>苹果组 Sect. <i>Malus</i> Langent</b>				
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S1	GenBank	AF186486	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S2	GenBank	AF186487	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S3	GenBank	AF186488	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S4	GenBank	AF186489	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S5	GenBank	AF186490	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S6	GenBank	AF186491	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S7	GenBank	AF186492	
塞威士苹果 <i>Malus sieversii</i>	S8	GenBank	AF186493	
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	S9	新源 Xinyuan	(10)	(5)
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	S10	巩留 Gongliu	(9)	(6)
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	S11	霍城 Huocheng	(8)	(4)
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	S12	额敏 Ermin	(10)	(4)
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	S13	托里 Tuoli	(8)	(2)
新疆红肉苹果 <i>Malus sieversii</i> f. <i>neidzwetzkyana</i>	S14	新源 Xinyuan	(1)	(1)
红肉苹果 <i>Malus neidzwetzkyana</i>	S15	GenBank	AF186497	
森林苹果 <i>Malus sylvestris</i>	S16	GenBank		AM042563
森林苹果 <i>Malus sylvestris</i>	S17	SES	(1)	(1)
道生苹果 <i>Malus praecox</i>	S18	SES	(1)	(1)
东方苹果 <i>Malus orientalis</i>	S19	GenBank	AF186499	
土库曼苹果 <i>Malus turkmenorum</i>	S20	SES	(1)	(1)
花红 <i>Malus asiatica</i> Nakai.	S21	GenBank	EF442030	
西府海棠 <i>Malus micromalus</i> Mak.	S22	GenBank	EF525565	
楸子 <i>Malus prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	S23	GenBank	AF186500	
崂山柰子 <i>Laoshannaizi</i> ( <i>Malus prunifolia</i> )	S24	SES	(1)	(1)
海棠花 <i>Malus spectabilis</i>	S25	SES	(1)	(1)

续表 1

分类群 Taxon	试材代号 Code	来源 Resource	ITS sequences*	<i>matK</i> sequences*
大鲜果 <i>Malus soulardii</i>	S26	SES	(1)	(1)
柰子 Naizi (名称有待考证 Name is unclear)	S27	辽宁兴城 Xingcheng, Liaoning	(1)	(1)
<b>栽培苹果 <i>Malus</i> × <i>domestica</i> Borkh.</b>				
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Peinette Simirenko’	S28	GenBank	AF186478	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Leathercoat’	S29	GenBank	AF186477	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Bramley’s Seedling’	S30	GenBank	AF186479	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Ashmeads Kernal’	S31	GenBank	AF186480	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Autumn Pearmain’	S32	GenBank	AF186481	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘D’Archy Spice’	S33	GenBank	AF186482	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Esopus Spitzenburg’	S34	GenBank	AF186483	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘American mother’	S35	GenBank	AF186484	
<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	S36	GenBank	U16195	
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Elstar’	S37	GenBank		AM042561
<i>M.</i> × <i>domestica</i> ‘Reinette de France’	S38	GenBank		AM042562
<b>中国苹果 <i>Malus</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> Li.</b>				
绵苹果 <i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Mianpingguo’	S39	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
中国彩苹	S40	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
<i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Zhongguo Caiping’				
黄甜果 <i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Huangtianguo’	S41	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
香果 <i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Xiangguo’	S42	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
<b>新疆地方品种 Xinjiang local varieties</b>				
新疆苹果	S43	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
<i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Xinjiang Pingguo’				
金沙依拉姆	S44	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
<i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Jinsha Yilamu’				
二楸子 <i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Erqiuzi’	S45	新疆 Xinyuang	(1)	(1)
冬白果 <i>M.</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> ‘Dongbaiguo’	S46	辽宁兴城 Xincheng, Liaoning	(1)	(1)
<b>山荆子组 Sect. <i>Baccatus</i> Jiang</b>				
毛山荆子 <i>Malus mandshurica</i> (Komorov.) Likh.	S47	GenBank	EF525563	
丽江山荆子 <i>Malus rockii</i> Schneid.	S48	GenBank	EU150111	
湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.	S49	GenBank	AF186503	
垂丝海棠 <i>Malus halliana</i> (Anon.) Koehne	S50	GenBank	AF186502	
<b>花楸苹果组 Sect. <i>Sorbomalus</i> Zabel</b>				
三叶海棠 <i>Malus sieboldii</i> (Regel.) Rehd.	S51	GenBank	EU150117	
沙金海棠 <i>Malus sargentii</i> (Rehd.) Asami.	S52	GenBank	AF186507	DQ860466
花叶海棠 <i>Malus transitoria</i> (Batal.) Schneid.	S53	GenBank	AF186519	
滇池海棠 <i>Malus yunnanensis</i> (Franch.) Schneid.	S54	GenBank	AF186509	
河南海棠 <i>Malus honanensis</i> Rehd.	S55	GenBank	AF186510	
西蜀海棠 <i>Malus prattii</i> (Hemsl.) Schneid.	S56	GenBank	AF186511	
陇东海棠 <i>Malus kansuensis</i> (Batal.) Schneid.	S57	GenBank	AF186512	
沧江海棠 <i>Malus ombrophilia</i> Hand.-Mazz.	S58	GenBank	AF186513	
褐海棠 <i>Malus fusca</i> (Raf.) Schneid.	S59	GenBank	AF186516	
变叶海棠 <i>Malus toringoides</i> (Rehd.) Hughes	S60	GenBank	AF186517	
佛罗伦萨海棠 <i>Malus florentina</i> (Zuccagni) Schneid.	S61	GenBank	AF186520	
<b>绿苹果组 Sect. <i>Chloromeles</i> (Decene) Rehd.</b>				
窄叶海棠 <i>Malus angustifolia</i> (Ait.) Michx.	S62	GenBank	EF127042	
	S63	GenBank	AF186523	
野香海棠 <i>Malus coronaria</i> (L.) Mill.	S64	GenBank	AF186525	
草原海棠 <i>Malus ioensis</i> (Wood.) Brit.	S65	GenBank	AF186526	
<b>多胜海棠组 Sect. <i>Docyniopsis</i> Schneid.</b>				
乔劳斯基海棠 <i>Malus tschonoskii</i> (Maxm.) Schneid.	S66	GenBank	AF186528	
台湾林檎 <i>Malus doumeri</i> (Boig.) Chev.	S67	GenBank	AF186529	
三裂叶海棠组 Sect. <i>Eriolobus</i> (D.C.) Schneid.				
三裂叶海棠 <i>Malus trilobata</i> (Labill.) Schneid.	S68	GenBank	AF186522	DQ860463
外类群 Outgroup				
欧洲梨 <i>Pyrus communis</i>	S69	GenBank	EU150087	DQ860473

注: \*: 括号中数字表示份数; SES: 上庄试验站。

Note: \*: The number in parenthesis mark indicated the amount of collected samples; SES: Shangzhuang Experimental Station.

## 2 结果与分析

### 2.1 ITS 序列及系统发育树分析

测序获得的序列和从 GenBank 上获取的苹果属种质的序列, 共 105 个, 用 ClustalX 进行对位排列, 比较其碱基序列差异, 以 “\*.PHY” 格式保存。经 MEGA 软件转化格式后载入序列, 统计分析。根据 Kimura-2 参数的遗传距离模型计算各样本序列间的遗传距离, 构建系统发育树。以欧洲梨 (*Pyrus communis*) 作为外类群, 构建 NJ 和 MP 系统发育树。

所采集的新疆野苹果与中国苹果各品种的 ITS 序列长度在 589 ~ 594 bp 之间, A、T、C、G 平均含量分别为 17.2%、17.1%、34.4% 和 31.3%, G 和 C 含量超过了 65.7%, 明显高于 A 和 T 含量。序列含有 291 个多态位点、134 个单一位点 (singleton sites) 和 148 个简约信息位点, 转换/颠换比率 (R) 为 1.029。

新疆野苹果各居群的大多数个体间的 ITS 序列差异较小, 遗传距离在 0.00 ~ 0.02 之间, 而来自托里 (S13-01)、巩留 (S10-03) 和霍城 (S11-02) 个体的遗传距离大, 在 0.05 ~ 0.13 之间, 表明新疆野苹果各居群的遗传多样性。新疆地方品种和新疆红肉苹果 (*M. sieversii* f. *neidzwetzkyana*) 与新疆野苹果 (不包括 S13-01、S10-03 和 S11-02) 和塞威士苹果的遗传距离为 0.00 ~ 0.02。‘绵苹果’、‘黄甜果’、‘香果’ 和 ‘中国彩苹’ 与新疆野苹果 (不包括 S13-01、S10-03 和 S11-02) 和塞威士苹果的遗传距离在 0.01 ~ 0.06 之间。塞威士苹果与欧洲的栽培苹果 ‘Esopus Spizenburg’ (AF186483)、‘Bramley’s Seedling’ (AF186479)、‘American mother’ (AF186484)、‘D’Archy Spice’ (AF186482) 和 ‘Autumn Pearmain’ (AF186481) 的遗传距离在 0.00 ~ 0.02 之间。与新疆野苹果和塞威士苹果的遗传距离最小的是海棠花, 其次是崂山柰子 (*M. prunifolia*)、柰子、土库曼苹果 (*M. turkmenorum*)、花红 (*M. asiatica* Nakai.)、大鲜果 (*M. soulardii*)、西府海棠 (*M. micromalus*) 和毛山荆子 (*M. mandshurica*)。ITS 序列的遗传距离分析表明, 新疆野苹果和塞威士苹果为同一个种。含新疆地方栽培品种在内的中国苹果与新疆野苹果亲缘关系近, 共聚类在一个大的进化枝内。

ITS 的 NJ 进化树上 (图 1), A 组主要包括花楸苹果组 (Sect. *Sorbomalus*) 的滇池海棠 (*M. yunnanensis*)、西蜀海棠 (*M. prattii*)、沧江海棠 (*M. ombrophilia*)、河南海棠 (*M. honanensis*)、陇东海棠 (*M. kansuensis*) 和褐海棠 (*M. fusca*)。B 组中一个进化枝为绿苹果组 (Sect. *Chloromeles*) 的草原海棠 (*M. ioensis*)、野香海棠 (*M. coronaria*) 和窄叶海棠 (*M. angustifolia*), 一个进化枝由花楸苹果组的佛罗伦萨海棠 (*M. florentica*) 和三裂叶海棠组的三裂叶海棠 (*M. trilobata*) 组成, 另一进化枝由多胜海棠组 (Sect. *Docyniopsis*) 中的台湾林檎 (*M. doumeri*) 和乔劳斯基海棠 (*M. tschonoskii*) 组成。C 组包括花楸苹果组的变叶海棠 (*M. toringoides*) 和花叶海棠 (*M. transitoria*)。D 组包括苹果组 (Sect. *Malus*) 的崂山柰子、花红、西府海棠和大鲜果, 与山荆子组 (Sect. *Baccatus*) 的毛山荆子、丽江山荆子 (*M. rockii*)、湖北海棠 (*M. hupehensis*) 和垂丝海棠 (*M. halliana*), 以及花楸苹果组的三叶海棠 (*M. sieboldii*)、沙金海棠 (*M. sargentii*) 聚为一类。E 和 F 两组均属于苹果组 (Section *Malus*), 塞威士苹果 (来自 GenBank) 与新疆野苹果 (来自中国新疆)、中国苹果栽培品种和欧洲的各栽培品种均分散的聚在一起。E 组中栽培品种 ‘D’Archy Spice’、‘U16195’ 与塞威士苹果及红肉苹果 (*M. neidzwetzkyana*) 聚为一类, 楸子 (*M. prunifolia*) 与东方苹果聚为一组; ‘中国彩苹’ 则与 S11-08 (采自霍城的新疆野生苹果) 和森林苹果聚在一起; 栽培苹果 ‘Autumn Pearmain’、海棠花 (*M. spectabilis*) 与 ‘新疆红肉苹果’ 聚为一大组, 柰子与土库曼苹果聚在一起。F 组由 8 个姊妹进化枝组成, 新疆野苹果 5 个居群的株系在各进化枝中混杂分布, 但各居群的系统演化总体按新源、巩留、霍城、额敏和托里的先后次序发生。‘黄甜果’、‘绵苹果’ 与塔城地区 (额敏和托里) 的新疆

野生苹果聚为一类，与栽培品种 ‘Peinette Simirenko’ 和其它新疆野生苹果形成第 1 个小的进化枝；来自霍城等地的新疆野苹果和部分来自 GenBank 的塞威士苹果形成第 2 个进化枝；新疆地方品种 ‘金沙依拉姆’、道生苹果 (*M. praecox*)、巩留的新疆野苹果聚在一起形成第 3 个进化枝；栽培品种 ‘Leathercoat’ 与新源的新疆野苹果聚在一起形成第 4 个进化枝；栽培品种 ‘Esopus Spitzenburg’、‘Bramley’s Seedling’ 和 ‘American mother’ 与塞威士苹果 (AF186488) 聚在一起形成第 5 个进化枝；栽培品种 ‘Ashmeads Kernal’ 与 3 份来自不同居群的新疆野苹果聚为第 6 个进化枝；‘新疆苹果’ 和新源的新疆野生苹果聚为第 7 个进化枝；第 8 个进化枝由 ‘香果’ 和 ‘冬白果’ 组成。A 组、B 组、D 组和 F 组聚类结果具有强的自展支持率 (> 75%)。

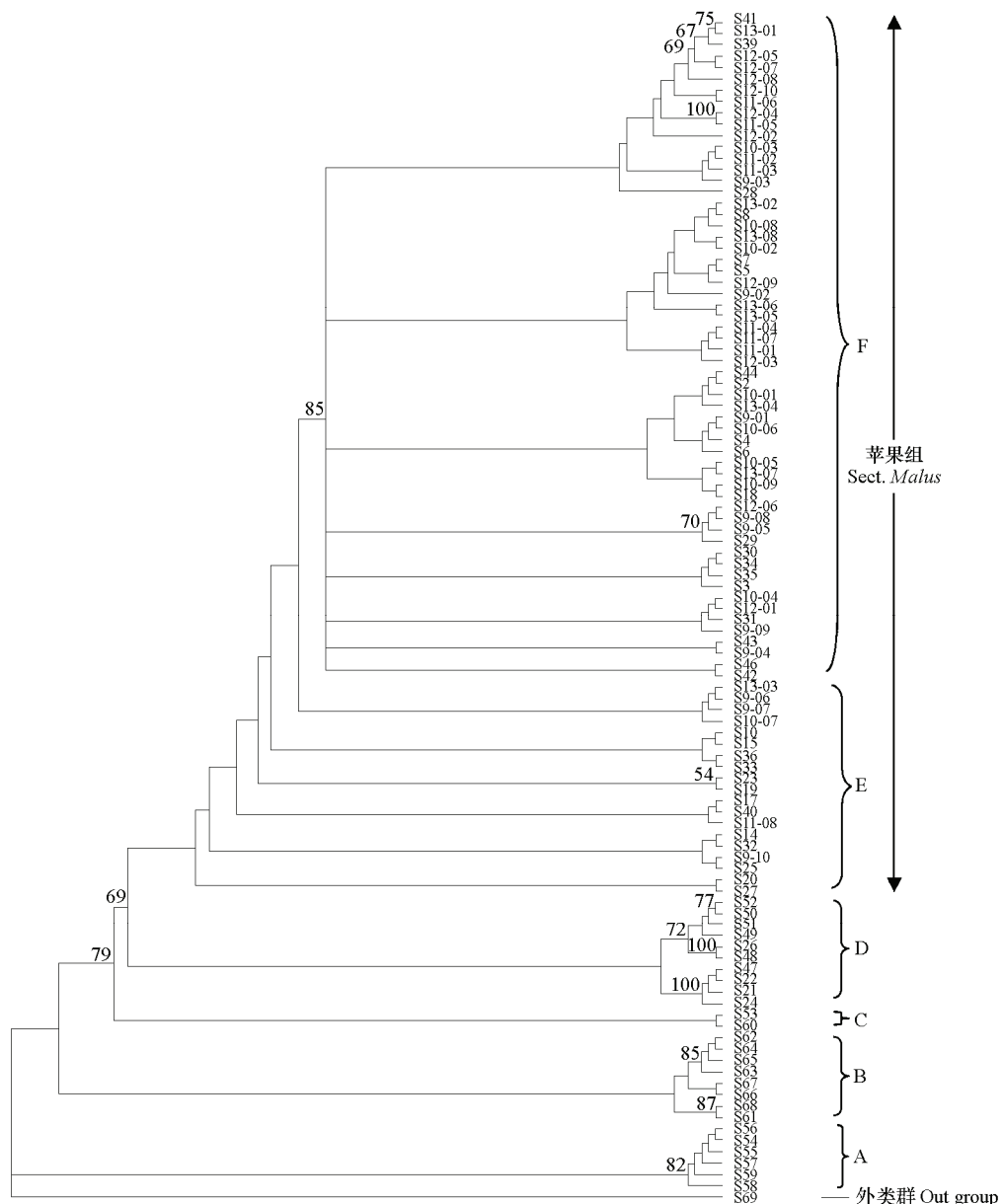


图 1 基于苹果属 ITS 序列和邻接法 (NJ) 构建的系统发育树

分支上的数值代表自展支持率；S1 ~ S69 为样本代号。下同。

Fig. 1 A phylogenetic tree constructed by neighbour-joining method with ITS sequences of *Malus* spp.

Numbers above branches indicated bootstrap support values. S1 - S69 presented the sample's code. The same below.





## 2.2 *matK* 序列分析及系统发育分析

利用特异引物 PCR 扩增分析所采集的 21 份新疆野苹果、1 份森林苹果、7 个中国苹果品种 (含 4 个新疆地方栽培品种)、1 份土库曼苹果、1 份道生苹果、1 份崂山柰子和 1 份柰子共 33 份种质试材的 *matK* 序列, 长度为 1 451 ~ 1 461 bp, 含有 91 个变异位点数、16 个简约信息位点数、转换/颠换率 (R) 为 1.442、序列间平均距离为 0.01。森林苹果的 *matK* 序列 3'端编码区含有不完全重复的复制子 I 序列 ATTTAAATATTTAAAT (下划线表示一个 8 bp 的复制序列) 和完全重复的复制子 II 序列 AATTAAGAGATAACAAAAAATTAAGAGATAACAAAA (下划线表示一个 18 bp 的复制序列)。其他 32 份试材的 *matK* 序列仅含有复制子 I。在含有复制子 II 的 *matK* 基因序列中, 338 位点和 1 027 位点的碱基均是 T, 而不含有复制子 II 的 *matK* 序列中, 338 位点为 G 或 T, 1 027 位点的碱基为 C。

所测序的 *matK* 序列及 GenBank 获取的苹果属植物 *matK* 序列共 39 个, 用 ClustalX 进行对位排列以 "\*.PHY" 格式进行保存, 经 MEGA 软件中的程序转化格式后载入序列, 进行系统发育分析。基于 *matK* 序列的 NJ 进化树 (图 3) 显示, 不同居群的新疆野苹果 (不包括 T2)、中国苹果和栽培苹果分散聚类在苹果组内的一个大的进化枝 Clad I 内, 与道生苹果和土库曼苹果亲缘关系近, 与森林苹果亲缘关系远。由于所测序试材 *matK* 序列的变异位点比较少, 大部分仅在序列的 338 和 1 027 两个位点变异, 所以苹果组内的各进化枝自展支持率较低, 不能区分新疆野苹果各居群的演化关系, 但仍支持将中国苹果与新疆野苹果聚为一类, 表明中国苹果起源于新疆野苹果, 在长期的人工选择过程中没有其它野生苹果基因的渗入。

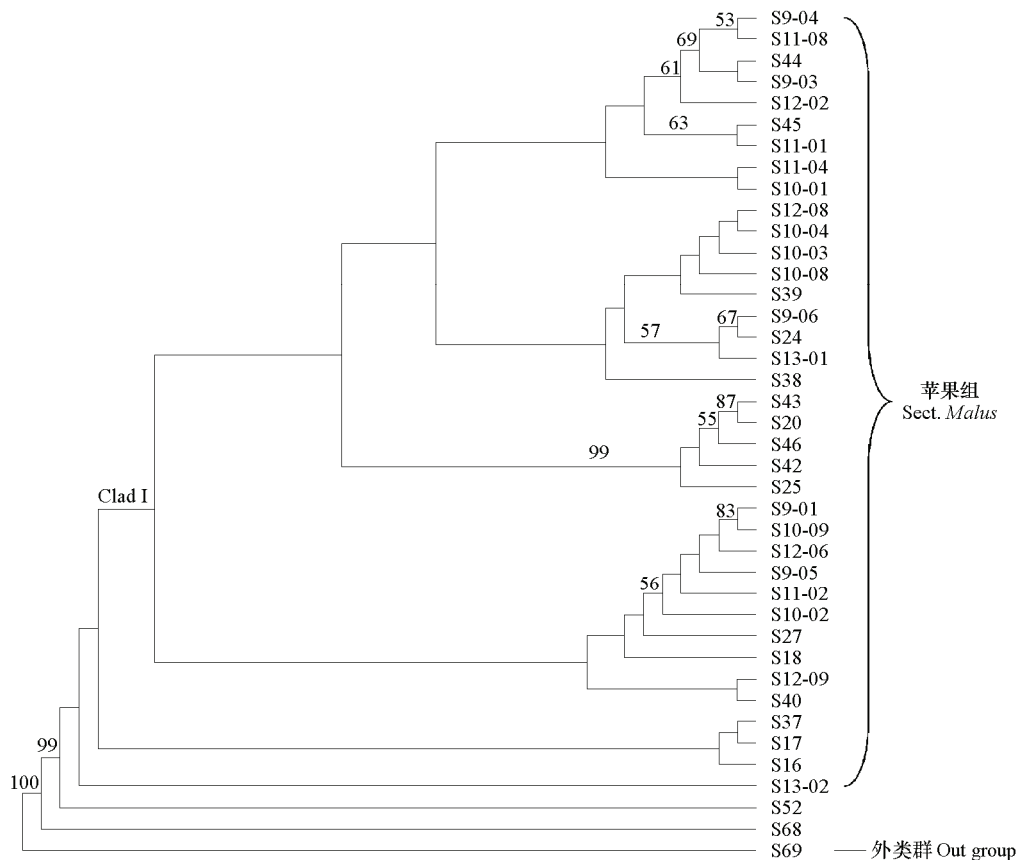


图 3 基于苹果属 *matK* 序列和邻接法 (NJ) 构建的系统发育树

Fig. 3 A phylogenetic tree constructed by neighbour-joining method with *matK* sequences of *Malus* spp.

MP 进化树 (图 4) 基本支持 NJ 进化树苹果组内的聚类结果, 但各小进化枝的系统演化关系有差异, 并且将亲缘关系较远的沙金海棠 (DQ860466) 聚类在苹果组内。基于 *matK* 序列的 NJ 进化树比 MP 方法更能反应苹果属植物的亲缘和进化关系。

与 ITS 序列分析相比, 由于 *matK* 基因在苹果种内进化率极低, 不适合做种内的亲缘关系鉴定。

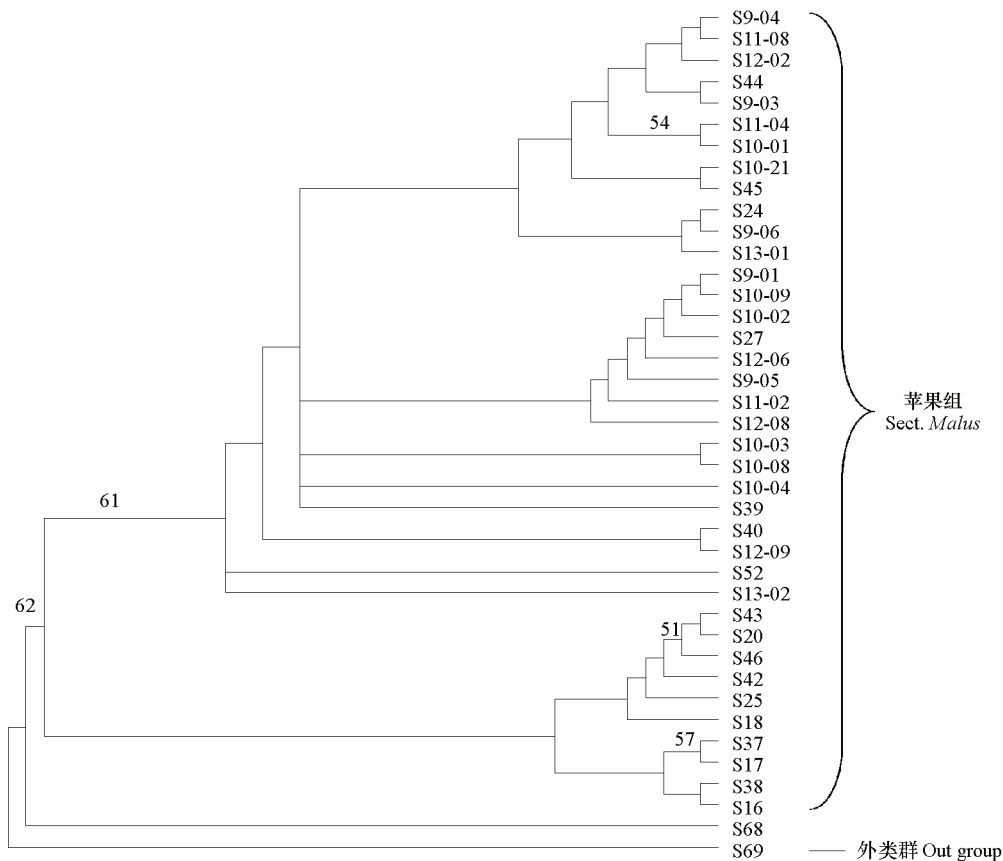


图 4 基于苹果属 *matK* 序列和最大简约法 (MP) 构建的系统发育树

Fig. 4 A phylogenetic tree constructed by Maximum parsimony method with *matK* sequences of *Malus* spp.

### 3 讨论

苹果属植物经过地理变迁和系统发育, 最原始的类群是在东亚分布的多胜海棠组 (Sect. *Docyniopsis*), 其次是地中海分布的三裂叶海棠组 (Sect. *Eriolobus*) 和佛罗伦萨海棠系、北美分布的绿苹果组 (Sect. *Chloromeles*) 和中国黄河以南地区分布的花楸苹果组 (Sect. *Sorbomalus*), 较进化的类群是中亚分布的苹果组 (Sect. *Malus*) 和中国横断山脉分布的山荆子组 (Sect. *Baccatae*) (成明昊 等, 2000; 钱关泽和汤庚国, 2005)。本研究中所构建 ITS 的 NJ 进化树结果基本上反应了苹果属植物的系统演化关系。A 组聚类的是花楸苹果组较为原始的滇池海棠系和陇东海棠系, B 组聚类了多胜海棠组、三裂叶海棠组、佛罗伦萨海棠和绿苹果组, C 组聚类了花楸苹果组较为进化的三叶海棠系, D 组将苹果组、花楸苹果组和山荆子组的部分种类混合聚为一类, 苹果组聚类在 E 和 F 组。楸子、海棠花、森林苹果和东方苹果与塞威士苹果和一些栽培苹果品种聚类在 E 组, 表明这 4 个种与塞威士苹果的亲缘关系近。这一结果与 Velaso 等 (2010) 苹果属内多基因序列的系统发育分析结果类似。新疆野苹果和来自 GenBank 的塞威士苹果分散聚类在一起, 从分子数据支持中国的新

疆野苹果与中亚的塞威士苹果是同一种。‘绵苹果’、‘香果’、‘中国彩苹’和‘黄甜果’与新疆地方栽培品种和新疆野苹果交错聚类在一起, 表明现存的中国苹果品种与新疆野苹果在起源演化上的地理相关性, 与已有的研究结果(李育农, 1999; Zhou & Li, 1999; 林培钧和崔乃然, 2000; 张艳敏等, 2009)一致。

塞威士苹果由于长期自然实生繁殖, 种内具有较多的变异类型, 如吉尔吉斯苹果(*M. sieversii* subsp. *kighisroum*)、西撒利克苹果(*M. sieversii* var. *hissaric*)和红肉苹果等(Wiedow et al., 2003; Forsline & Aldwinckle, 2004)。中国新疆野苹果不同居群具有丰富的遗传多样性, 巩留居群的遗传多样性最丰富, 其次是霍城和新疆, 裕民居群的多样性水平最低(冯涛等, 2007; 高源等, 2007; 张春雨等, 2007)。苹果属植物花粉外壁纹饰具有进化和分类学的意义(贺超兴和徐柄生, 1991), 但花粉粒大小和 P/E 值大小是否能作为属内进化指标, 仍有待更多的数据证明。据报道, 新疆的野苹果花粉粒 P/E (1.389) 比霍城野苹果的花粉粒 P/E (1.199) 大, 认为新疆野苹果较为原始, 推测新疆野苹果的发祥地是新疆, 由此向西发展, 经巩留、伊宁至霍城而成为后期类群(杨晓红和李育农, 1995; 张元明和阎国荣, 2001)。但苹果属的 *M. florentina*、*M. prattii* 和 *M. baccata* 花粉粒 P/E 值分别是 1.78、1.89 和 1.96, 而栽培苹果和红肉苹果的花粉粒 P/E 值分别为 2.33 和 2.20 (Joneghani, 2008)。这一结果与上述报道的结果相反。本研究中通过分析各居群的 ITS 序列, 证明新疆野生苹果 5 个居群中, 有先新疆、巩留、霍城后塔城的系统发生先后关系。但不同居群的个体交错聚类在一起, 应将不同居群的新疆野苹果作为一个整体进行研究。

植物中 *matK* 基因具有 3 种类型: 即存在复制子 I 和复制子 II; 缺失复制子 II; 缺失复制子 I 和 II。复制子 I 和复制子 II 在植物的系统发育分析中起关键作用 (Robinson et al., 2001; Potter et al., 2002; Coart et al., 2006)。苹果属的东方苹果、褐海棠、西蜀海棠、滇池海棠、野香海棠、草原海棠、乔劳斯基海棠和三裂叶海棠中均发现缺失复制子 I 和 II 的 *matK* 基因, 湖北海棠、山荆子、毛山荆子、三叶海棠、变叶海棠、佛罗伦萨海棠、褐海棠、塞威士苹果、森林苹果和栽培苹果品种中发现缺失复制子 II 的 *matK* 基因, 而部分塞威士苹果、森林苹果、楸子和栽培苹果品种有复制子 I 和复制子 II 均存在的 *matK* 基因 (Robinson et al., 2001; Coart et al., 2006)。因此, 复制子 II 是否缺失不能判定塞威士苹果、森林苹果和栽培苹果之间的亲缘演化。同时, 苹果属植物存在同名异物现象、取样数量和样本纯度等问题降低了 *matK* 基因在苹果属内系统发育分析的可靠性。本研究所测序的新疆野苹果和中国苹果品种的 *matK* 基因中均缺失复制子 II, 能用于系统发育分析的简约信息位点少, 不适用于低分类阶元(种间和种内)的系统发育分析。

本研究中利用 ITS/*matK* 序列分析了中国苹果品种和新疆野苹果各居群的系统发育关系。分子数据证明现存的中国苹果各品种与新疆野苹果遗传距离很近, 由新疆野苹果驯化而来。新疆野苹果 5 个居群的系统演化按伊犁的新疆、巩留、霍城和塔城的先后次序发生。苹果种内 *matK* 序列简约信息位点少, 不适于栽培苹果种内的系统发育分析。

## References

- Campbell C S, Evans R C, Morgan D R, Dickinson T A, Arsenault M P. 2007. Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Systematics and Evolution*, 266: 119 - 145.
- Cheng Ming-hao, Zhang Yun-gui, Li Xiao-lin. 2000. Studies on the flora of the genus *Malus* Mill. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (suppl.): 469 - 474. (in Chinese)
- 成明昊, 张云贵, 李晓林. 2000. 苹果属植物区系地理学研究. *园艺学报*, 27 (增刊): 469 - 474.
- Coart E, van Glabeke S, de Loose M, Larsen A S, Roldan-Ruiz I. 2006. Chloroplast diversity in the genus *Malus*: New insights into the relationship between the european wild apple [*Malus sylvestris* (L.) Mill.] and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology*,

- 15: 2171 - 2182.
- Eriksson T, Hibbs M S, Yoder A D, Delwiche C F, Donoghue M J. 2003. The phylogeny of rosoidae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the *trnL/F* region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences*, 164 (2): 197 - 211.
- Feng Tao, Zhang Yan-min, Chen Xue-sen. 2007. Study on the age structure and desity of the wild apple forest of *Malus sieversii*. *Journal of Fruit Science*, 24 (5): 571 - 573. (in Chinese)
- 冯 涛, 张艳敏, 陈学森. 2007. 新疆野苹果居群年龄结构及郁闭度研究. *果树学报*, 24 (5): 571 - 573.
- Forsline P L, Aldwinckle H S. 2004. Evaluation of *Malus sieversii* seedling populations for disease resistance and horticultural traits. *Acta Horticulturae*, 663 (2): 529 - 534.
- Gao Yuan, Liu Feng-zhi, Cao Yu-fen, Wang Kun. 2007. Analysis of genetic relationship for *Malus* germplasm resources by SSR markers. *Journal of Fruit Science*, 24 (2): 129 - 134. (in Chinese)
- 高 源, 刘凤之, 曹玉芬, 王 昆. 2007. 苹果属种质资源亲缘关系的 SSR 分析. *果树学报*, 24 (2): 129 - 134.
- Geibel M, Dehmer K J, Forsline P L. 2000. Biological diversity in *Malus sieversii* populations from Central Asia. *Acta Horticulture*, 538: 43 - 49.
- Harris S A, Robinson J P, Juniper B E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 18: 426 - 430.
- He Chao-xing, Xu Bing-sheng. 1991. Pollen morphology of the genus *Malus* and its taxonomic and evolutionary significance. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 29 (5): 445 - 451. (in Chinese)
- 贺超兴, 徐炳生. 1991. 苹果属花粉形态特征及其分类学和进化学意义. *植物分类学报*, 29 (5): 445 - 451.
- Jia Jing-xian, Jia Ding-xian, Ren Qing-mian. 2006. Crops and their wild relatives in China. Volume of fruit crops. Beijing: China Agriculture Press: 57 - 58. (in Chinese)
- 贾敬贤, 贾定贤, 任庆棉. 2006. 中国作物及其野生近缘植物·果树卷. 北京: 中国农业出版社: 57 - 58.
- Joneghani V N. 2008. Pollen morphology of the genus *Malus* (Rosaceae). *Iranian Journal of Science & Technology*, 32 (A2): 89 - 97.
- Li Yu-nong. 1999. An investigation and studies on the origin and evolution of *Malus domestica* Borkh. in the world. *Acta Horticulturae Sinica*, 6 (4): 213 - 220. (in Chinese)
- 李育农. 1999. 苹果起源演化的考察研究. *园艺学报*, 6 (4): 213 - 220.
- Li Yu-nong. 2001. Research of germplasm resources of *Malus* Mill. Beijing: China Agriculture Press: 95 - 191. (in Chinese)
- 李育农. 2001. 苹果属植物种质资源研究. 北京: 中国农业出版社: 95 - 191.
- Li Yu-nong, Li Xiao-lin. 1995. Studies on the pox isoenzyme banding patterns of the genus *Malus* in the world. *Journal of Southwest Agricultural University*, 15 (8): 371 - 377. (in Chinese)
- 李育农, 李晓林. 1995. 苹果属植物过氧化物酶同工酶酶谱的研究. *西南农业学报*, 15 (8): 371 - 377.
- Liang Guo-lu, Li Xiao-lin. 1993. Studies on the chromosome of *Malus* in China. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 31 (3): 236 - 251. (in Chinese)
- 梁国鲁, 李晓林. 1993. 中国苹果属植物染色体研究. *植物分类学报*, 31 (3): 236 - 251.
- Lin Pei-jun, Cui Nai-ran. 2000. Wild fruit forests in Tianshan Mountains - comprehensive resources on wild forests in Xinjiang, China. Beijing: China Forestry Publishing House: 84 - 141. (in Chinese)
- 林培钧, 崔乃然. 2000. 天山野果林资源——伊犁野果林综合研究. 北京: 中国林业出版社: 84 - 141.
- Potter D, Eriksson T, Evans R C, Oh S, Smedmark J E E, Morgan D R, Kerr M, Robertson K R, Arsenault M, Dickinson T A, Campbell C S. 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 266: 5 - 43.
- Potter D, Gao F, Bortiri P E, Oh S, Baggett S. 2002. Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast *matK* and *trnL-trnF* nucleotide sequence data. *Plant Systmatics and Evolution*, 231: 77 - 89.
- Qian Guan-ze, Tang Geng-guo. 2005. A review on the plant taxonomic study on the genus *Malus* Miller. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 29 (3): 94 - 98. (in Chinese)
- 钱关泽, 汤庚国. 2005. 苹果属植物分类学研究进展. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 29 (3): 94 - 98.

- Robinson J P, Harris S A, Juniper B E. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus × domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution*, 226: 35 - 58.
- Shu Huai-rui, Yu Shao-fu, Wang Yu-lin. 1999. *Pomology*. Beijing: China Agriculture Press: 42 - 105. (in Chinese)
- 束怀瑞, 于绍夫, 王宇霖. 1999. *果树学*. 北京: 中国农业出版社: 42 - 105.
- Velasco R, Zharkikh A, Affoutit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Ri A D, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q Z, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan C, Bus V, Chagné D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, Peer Y V, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42: 833 - 839.
- Volk G M, Richards C M, Reilley A A, Henk A D, Forsline P L. 2005. Ex situ conservation of vegetatively propagated species: Development of a seed-based core collection for *Malus sieversii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130 (2): 203 - 210.
- Wang Hua-kun, Tao Jian-min, Xue Hua-bo. 2006. A simple DNA extraction method using silica-gel-dried leaves of fruit tree in summer and autumn. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (5): 75 - 77. (in Chinese)
- 王化坤, 陶建敏, 薛华柏. 2006. 一种简便的果树夏秋梢硅胶干燥叶 DNA 提取方法. *江苏农业科学*, (5): 75 - 77.
- Wiedow C, Dehmer K J, Geibel M. 2003. Molecular diversity in populations of *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem. *Acta Horticulturae*, 663: 539 - 543.
- Yan G R, Long H, Song W Q, Chen R Y. 2008. Genetic polymorphism of *Malus sieversii* populations in Xinjiang, China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55 (1): 171 - 181.
- Yang Xiao-hong, Li Yu-nong. 1995. Studies on the pollen morphology of *Malus sieversii* (Led.) Roem. and the exploration its evolution. *Journal of Southwest Agricultural University*, 17 (2): 107 - 114. (in Chinese)
- 杨晓红, 李育农. 1995. 塞威士苹果 *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem. 花粉形态研究及其演化的探索. *西南农业大学学报*, 17 (2): 107 - 114.
- Zhang Chun-yu, Chen Xue-sen, He Tian-ming, Liu Xiao-li, Feng Tao, Yuan Zhao-he. 2007. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34 (10): 947 - 955. (in Chinese)
- 张春雨, 陈学森, 何天明, 刘晓丽, 冯涛, 苑兆和. 2007. 中国新疆野苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.] 群体遗传结构的 SSR 分析. *遗传学报*, 34 (10): 947-955.
- Zhang Yan-min, Feng Tao, Zhang Chun-yu, He Tian-ming, Zhang Xiao-yan, Liu Zun-chun, Wang Yan-ling, Shu Huai-rui, Chen Xue-sen. 2009. Advances in research of the *Malus sieversii* (Led.) Roem. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (3): 447 - 452. (in Chinese)
- 张艳敏, 冯涛, 张春雨, 何天明, 张小燕, 刘遵春, 王艳玲, 束怀瑞, 陈学森. 2009. 新疆野苹果研究进展. *园艺学报*, 36 (3): 447 - 452.
- Zhang Yuan-ming, Yan Guo-rong. 2001. Studies on the pollen morphology of *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem. *Bulletin of Botanical Research*, 21 (3): 380 - 383. (in Chinese)
- 张元明, 阎国荣. 2001. 塞威士苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.] 花粉形态的研究. *植物研究*, 21 (3): 380 - 383.
- Zhou Z Q. 1999. The apple genetic resources in China: The wild species and their distributions, informative characteristics and utilization. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46: 599 - 609.
- Zhou Z Q, Li Y N. 1999. Evidence for the origin of Chinese soft apple. *Asian Agriculture History*, 3 (1): 35 - 37.