

苹果属植物种质多样性的 SLAF-seq 分析

高源, 王大江, 王昆*, 丛佩华*, 李连文, 朴继成

(中国农业科学院果树研究所, 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100)

摘要: 利用简化基因组测序技术—特异性位点扩增片段测序技术 (Specific-locus amplified fragment sequencing, SLAF-seq) 对 509 份苹果属植物种质进行测序, 获得 586 454 个 SLAF 标签, 其中多态性 SLAF 标签 463 612 个; 经过序列比对, 根据完整性 > 0.94、次要等位基因频率 (MAF) > 0.05, 过滤筛选得到 46 460 个多态性单核苷酸 (SNP) 位点; 基于这些 SNP 位点构建苹果属植物不同种的系统发生树并分析主成分。结果表明, 通过 SLAF-seq 技术能够在全基因组范围内快速开发高通量的 SNP 标记, 并直接用于苹果属植物种质资源遗传多样性研究中。34 种 509 份苹果属植物的多样性水平较高 ($H_e = 0.318$, $I = 0.488$, $A_e = 1.520$), 在多于 1 份试材的种群中, 变叶海棠的遗传多样性水平最高, 中国苹果的遗传多样性水平最低。综合聚类分析和主成分分析结果表明, 供试苹果属植物分为 5 个基本的类群, I 山荆子类群, II 苹果属植物野生种类群, III 苹果栽培品种类群, IV 以中国苹果、八棱海棠、花红、楸子和海棠花为主的类群, V 新疆野苹果类群。野生种丽江山荆子、山楂海棠、陇东海棠、变叶海棠、花叶海棠、滇池海棠和沧江海棠聚类比较紧密, 栽培种之间的亲缘关系相对较近, 栽培品种与东方苹果和森林苹果等野生种聚在一起, 新疆野苹果与中国原产苹果属栽培种的亲缘与起源演化关系有待于进一步考究。

关键词: 苹果属; SLAF-seq; SNP; 遗传多样性

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 10-1869-14

Analysis of Genetic Diversity of Apple Germplasms of *Malus* Using SLAF-seq Technology

GAO Yuan, WANG Dajiang, WANG Kun*, CONG Peihua*, LI Lianwen, and PIAO Jicheng

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: In this study, the specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq) was used to sequence 509 accessions of *Malus* Mill., and 586 454 SLAF tags were obtained, including 463 612 polymorphic SLAF tags. After sequence alignment analysis, 46 460 polymorphic single nucleotide (SNP) loci were screened out according to the filter with integrity > 0.94 and minor allele frequency (MAF) > 0.05. Based on these SNP loci, phylogenetic trees among different species of *Malus* Mill. were constructed and principal component analysis was done. The results showed that high-throughput SNP markers could be rapidly developed in the whole genome by SLAF-seq technology, and could be directly used in the genetic diversity research of apple germplasm resources. Thirty-four species of 509 apple accessions of

收稿日期: 2020-02-14; **修回日期:** 2020-08-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (318018208); 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2018-RIP-02)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangkun5488@163.com, congph@163.com)

Malus Mill. had high levels of diversity. Among groups with more than one accession, *M. toringoides* had the highest level of genetic diversity, and *M. × domestica* subsp. *chinensis* had the lowest level of genetic diversity. The results of cluster analysis and principal component analysis showed that the tested accessions of *Malus* Mill. were divided into 5 basic groups, the group I was *M. baccata*, the group II was wild species of *Malus* Mill., the group III was a cluster of apple cultivars, the group IV mainly contained *M. × domestica* subsp. *chinensis*, *M. robusta*, *M. asiatica*, *M. prunifolia* and *M. spectabilis*, and the group V was *M. sieversii*, *M. rockii*, *M. komarovii*, *M. kansuensis*, *M. toringoides*, *M. transitoria*, *M. yunnanensis* and *M. ombrophila* were clustered together. The relationships among cultivated species of *Malus* Mill. were relatively closer. Cultivars got together with *M. orientalis*, *M. sylveseris* and some other wild species. And the relationship between *M. sieversii* and the cultivated species of *Malus* Mill. in China needed further study. The results provided a reference for further study on the classification, origin and evolution of apple germplasm resources, and provided a basis for further collection and protection.

Keywords: *Malus*; SLAF-seq; SNP; genetic diversity

苹果属 (*Malus* Mill.) 植物共有 35 个种 (俞德俊, 1979; 贾敬贤 等, 2006), 其中野生种 27 个, 栽培种 8 个, 迄今品种已不下 1 万个 (束怀瑞, 1999)。中国是世界苹果属植物 5 大基因中心中最大的中心 (李育农, 2001), 也是栽培植物最早和最重要的 7 个驯化中心之一 (Zamir, 2001), 苹果属植物种质资源丰富多样, 尤其是在中国西南的四川、云南和贵州 (李育农, 1999)。分析苹果属植物不同种的种质资源遗传多样性、亲缘关系及群体结构, 可以揭示其遗传特性, 为研究苹果属植物不同种的起源进化提供参考, 并为种质鉴定、资源利用及育种等提供依据。

利用传统的方法研究苹果属种质资源的遗传多样性和起源演化, 易受环境条件和取样部位等多种因素的影响, 而分子生物学技术的应用可以摆脱这些因素的影响, 从基因水平上解读种质的遗传多样性。SSR 分子标记遵循孟德尔共显性遗传方式, 利用其进行分析发现材料的多态性和亲缘关系的几率很高 (Gianfranceschi et al., 1998; Liebhard et al., 2002), 但全基因组水平的 SSR 分子标记开发是限制其应用的难点之一。SNP 是基因组中最为丰富的标记, 研究 DNA 水平上的多态性最彻底最精确的方法即为直接测定某特定区域的核苷酸序列, 并将其与相关基因组中对应区域的核苷酸序列进行比较, 从而检测出单个核苷酸的差异, 已经被应用到许多作物的遗传多样性评价和遗传连锁图谱的构建 (Rafalski, 2002; Gupta et al., 2008)。目前 3 套苹果参考基因组 (Velasco et al., 2010; Daccord et al., 2017; Zhang et al., 2019) 的发布, 对于分子标记在苹果研究中的应用具有重要的推动作用。SLAF-seq (specific-locus amplification fragment sequencing) 技术具有通量高、准确性高、成本低和周期短等优势, 可以获得多态性 SLAF 标签和大量的特异性 SNP 标记, 已应用于植物种质资源鉴定、遗传图谱构建 (Cai et al., 2015; Ma et al., 2015; Zhu et al., 2015)、遗传多样性 (Feng et al., 2018; 李余良 等, 2018; 李贝贝 等, 2019)、系统发育和进化 (Han et al., 2016) 等方面, 但国内外利用 SLAF-seq 开展苹果属植物的多样性研究鲜有报道。

本试验中利用 SLAF-seq 技术测定了 509 份苹果属植物种质的简化基因组序列, 获得全基因组范围内多态性好、稳定性高、特异性强的 SNP 标记。基于开发的 SNP 标记对苹果属不同种内和种间的遗传多样性及群体结构进行分析, 旨在从基因组水平揭示苹果属不同种间的遗传关系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

509 份 (表 1) 苹果种质材料中有 2 份材料取自国家果树种质云南特有果树及砧木圃 (云南省昆明), 25 份材料取自国家果树种质公主岭寒地果树圃 (吉林省公主岭), 其余 482 份材料均取自国家果树种质兴城梨、苹果圃 (辽宁省兴城)。509 份种质分属于苹果属的 34 个种, 其中中国原产栽培种有 6 个, 分别为中国苹果、楸子、花红、八棱海棠、西府海棠和海棠花; 国外引进栽培种有 3 个, 分别为沙金海棠、朱眉海棠和多花海棠; 苹果种 1 个。编号 449 ~ 484 为国外引进栽培品种, 485 ~ 509 为中国选育栽培品种; 其余 24 个种全部为野生种, 其中 15 个为中国原产野生种 (新疆野苹果、陇东海棠、垂丝海棠、山楂海棠、变叶海棠、花叶海棠、丽江山荆子、滇池海棠、湖北海棠、沧江海棠、毛山荆子、西蜀海棠、锡金海棠、小金海棠、台湾林檎), 9 个为国外引进野生种 (扁果海棠、草原海棠、东方苹果、褐海棠、花冠海棠、乔劳斯基海棠、森林苹果、窄叶海棠、朱眉海棠)。于 2017 年春季采集健康幼嫩叶片, 叶片经硅胶干燥之后备用。

表 1 用于 SLAF 测序分析的 34 种苹果属植物种质资源
Table 1 Thirty-four species of *Malus* Mill. germplasm resources for SLAF-seq analysis

所属种 Species	编号 (数量) Code (Number)	名称 Name
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	1 ~ 161 (161)	GB-13, GB-1, GB-9, GB-7, GB-12, GB-8, GB-2, GB-15, GB-1, GB-19, GB-14, GB-16, GB-13, GB-5, GB-4, GB-6, GB-7, GB-12, GB-10, GD-15, GD-12, GD-11, GD-16, GD-11, GD-5, GD-22, GD-21, GD-4, GD-7, GD-9, GD-13, GD-10, GD-17, GD-9, GD-3, GD-8, GD-17, GD-6, GD-12, 26005, 26026, 26010, 26011, 26015, 26030, 26002, 26006, 26003, 26029, 26007, 26025, 26004, 26008, 26012, 26020, 26010, 26002, 26014, 26019, 26027, 26021, 26018, 26002, 26023, 27020, 27014, 27003, 27018-1, 27016, 27012, 27004, 27002, 27007, 27013, 27019, 27017-1, 27017-2, 27011, 27008, 27006-1, 27015, 27006-2, 27018-2, 27009, 27010, 28006, 28003, 28005, 28001, 28011, 28007, 28013, 28008, 28002, 28010, 28014, 28012, 28009, 苹果王 (Pingguowang), 11-43, 11-42, 11G5, 11-44, 11-46, XY-81, XY-79, XY-57, XY-20, XY-53, XY-25, XY-27, XY-58, XY-32, XY-23, XY-11, XY-7-8, XY-12, XY-77, XY-66, XY-18, XY-37, XY-16, XY-12, XY-68, XY-83, XY-19, XY-59, XY-51, XY-84, XY-30, XY-65, XY-61, XY-35, XY-64, XY-21, XY-38, XY-22, XY-85, XY-88, XY-89, XY-29, XY-82, XY-67, XY-90, XY-33, XY-80, XY-28, XY-43, XY-26, XY-24, XY-16, XY-55, XY-71, XY-39, 11G1, 11G2, 11G3, 11G4, 11-01
中国苹果 <i>Malus × domestica</i> subsp. <i>chinensis</i>	162 ~ 194 (33)	新疆巩留浓 1 号, 霍城白果子, 大皮沟红秋, 大皮沟绿秋, 敦煌红肉苹果, 武威甜果子, 武威红果子, 夏力蒙, 石洞彩苹 1#, 石洞槟子 1#, 达子营尖嘴子, 小古城香果 1#, 南窑彩苹 120, 南窑彩苹 1#, 南窑槟子 1#, 陈家窑黄楸果, 下井沟槟子 1#, 小矾山槟子, HL-8, HQ-8, HK-5, 双果实生, 黄太平, 向阳村林檎, 向阳村秋果, 向阳村大果林檎, 平遥甜槟子, 郝家村疙瘩村柰子, 郝家村小果子, 郝家村夏苹果, 中阳县武家村乡野苹果, 崂山柰子, 香果 Xinjiang Gongliu 1#, Huocheng Baiguozhi, Dapigou Hongqiu, Dapigou Lüqiu, Dunhuang Hongroupingguo, Wuwei Tianguozi, Wuwei Hongguozi, Xialimeng, Shidong Caiping 1, Shidong Binzi 1, Daziying Jianzuizi, Xiaogucheng Xiangguo 1, Nanyao Caiping 120, Nanyao Caiping 1, Nanyao Binzi 1, Chenjiayao Huangqiuguo, Xiajinggou Binzi 1, Xiaofanshan Binzi, HL-8, HQ-8, HK-5, Shuangguoshisheng, Huangtaiping, Xiangyangcun Linqin, Xiangyangcun Qiuguo, Xiangyangcun Daguo Linqin, Pingyao Tianbinzi, Haojiacun Gedacun Naizi, Haojiacun Xiaoguozi, Haojiacun Xiapingguo, Zhongyangxian Wujiacunxiang Yepingguo, Laoshan Naizi, Xiangguo
	446 ~ 448 (3)	中国彩苹, 柰子, 绵苹果 Zhongguocaiping, Naizi, Mianpingguo
山荆子 <i>Malus baccata</i>	195 ~ 328 (134)	铁力山定子 1 号, 镜泊湖山定子, 三间房山定子, 带岭山定子 1 号, 胜山山定子, 金山屯山定子 1 号, 正岔河山定子, 振华伟山定子, 伊春山定子, 南岔山定子 1 号, 牡丹江 1

续表 1

所属种 Species	编号 (数量) Code (Number)	名称 Name
		号, 牡丹江 4 号, 牡丹江 6 号, 牡丹江 8 号, 牡丹江 10 号, 牡丹江 12 号, 牡丹江 14 号, 牡丹江 16 号, 牡丹江 19 号, 牡丹江 21 号, 牡丹江 23 号, 牡丹江 24 号, 牡丹江 26 号, 牡丹江 28 号, 牡丹江 30 号, 大皮沟 1 号, 大皮沟 3 号, 大皮沟 5 号, 大皮沟 7 号, 大皮沟 9 号, 大皮沟 11 号, 大皮沟 13 号, 大皮沟 15 号, 大皮沟 19 号, 绥棱 1 号, 绥棱 3 号, 绥棱 5 号, 绥棱 7 号, 绥棱 9 号, 绥棱 11 号, 绥棱 13 号, 镜泊公园 1 号, 镜泊大坝 1 号, 石头合子 1 号, 石头合子 2 号, 一面坡林场 1 号, 一面坡 2 号, 张家川山定子, 聂河村山定子 2 号, 榆中山定子 3#, 石洞山定子 2#, 达子营山定子 2#, 小古城山定子 1#, 南窑山定子 1#, 陈家窑山定子 1#, 小矾山山定子 1#, HL-5, HF-10, HC-36, HC-5, 向阳村山定子 1 号, 油房村山定子 2 号, 油房村山定子 1 号, 河底乡山定子 1, 阳城山定子, 油房村山定子 3 号, 灵空山定子, 山西山定子, 山定子晚熟白果, 山定子 5, 山定子 4, 灵空山定子 6 号, 刀把嘴山定子 1#, 郝家村山定子, 老八间 9 号, 老八间 7 号, 黑山头山丁子 5 号, 室伟山丁子 10 号, 角刀木山丁子 1 号, 临江山丁子 3 号, 临江山丁子 43 号, 临江山丁子 17 号, 室伟山丁子 11 号, 老八间山丁子 11 号, 黑山头山丁子 2 号, 临江山丁子 37 号, 莫尔道嘎山丁子 3 号, 老八间 10 号, 临江山丁子 20 号, 根河山丁子 4 号, 黑山头山丁子 1 号, 好里堡山丁子 1 号, 临江山丁子 42 号, 太平山定子 5 号, 黑山头山定子 3 号, 太平山定子 7 号, 老八间 8 号, 角刀木山定子 3 号, 上户村山定子 1 号, 角刀木山定子 11 号, 老八间山定子 5 号, 老八间山丁子 6 号, 老八间山丁子 12 号, 莫尔道嘎山丁子 1 号, 老八间山丁子 3 号, 角刀木山丁子 4 号, 好里堡山丁子 3 号, 太平山丁子 2 号, 角刀木山丁子 5 号, 木端山丁子 2 号, 老八间 1 号, 临江山丁子 2 号, 室伟山丁子 9 号, 室伟山丁子 2 号, 根河山丁子 1 号, 3 号山荆子, 4 号山荆子, 5 号山荆子, 6 号山荆子, 7 号山荆子, 8 号山荆子, 大果山荆子, 兴玉果园山荆子, 牡丹江山荆子, 短把山荆子, 尚志山荆子, 本园大果山荆子, 兴玉果园硬肉山荆子, 超矮山荆子, 灰皮山荆子, 吉林山荆子, 苏联山荆子, 本早大果山荆子, 大叶山荆子
		Tieli Shandingzi 1, Jingpohu Shandingzi, Sanjianfang Shandingzi, Dailing Shandingzi 1, Shengshan Shandingzi, Jinshantun Shandingzi 1, Zhengchahe Shandingzi, Zhenghuawei Shandingzi, Yichun Shandingzi, Nancha Shandingzi 1, Mudanjiang 1, Mudanjiang 4, Mudanjiang 6, Mudanjiang 8, Mudanjiang 10, Mudanjiang 12, Mudanjiang 14, Mudanjiang 16, Mudanjiang 19, Mudanjiang 21, Mudanjiang 23, Mudanjiang 24, Mudanjiang 26, Mudanjiang 28, Mudanjiang 30, Dapigou 1, Dapigou 3, Dapigou 5, Dapigou 7, Dapigou 9, Dapigou 11, Dapigou 13, Dapigou 15, Dapigou 19, Suiling 1, Suiling 3, Suiling 5, Suiling 7, Suiling 9, Suiling 11, Suiling 13, Jinggongyuan 1, Jingpodaba 1, Shitouhezi 1, Shitouhezi 2, Yimianpo Linchang 1, Yimianpo 2, Zhangjiachuan Shandingzi, Niehecun Shandingzi 2, Yuzhong Shandingzi 3, Shidong Shandingzi 2, Daziying Shandingzi 2, Xiaogucheng Shandingzi 1, Nanyao Shandingzi 1, Chenjiayao Shandingzi 1, Xiaofanshan Shandingzi 1, HL-5, HF-10, HC-36, HC-5, Xiangyangcun Shandingzi 1, Youfangcun Shandingzi 2, Youfangcun Shandingzi 1, Hedixiang Shandingzi 1, Yangcheng Shandingzi, Youfangcun Shandingzi 3, Lingkong Shandingzi, Shanxi Shandingzi, Shandingzi Wanshu Baiguo, Shandingzi 5, Shandingzi 4, Lingkong Shandingzi 5, Daobazui Shandingzi 1, Haojiacun Shandingzi, Laobajian 9, Laobajian 7, Heishantou Shandingzi 5, Shiwei Shandingzi 10, Jiaodaomu Shandingzi 1, Linjiang Shandingzi 3, Linjiang Shandingzi 43, Linjiang Shandingzi 17, Shiwei Shandingzi 11, Laobajian Shandingzi 11, Heishantou Shandingzi 2, Linjiang Shandingzi 37, Moerdaoga Shandingzi 3, Laobajian 10, Linjiang Shandingzi 20, Genhe Shandingzi 4, Heishantou Shandingzi 1, Haolibao Shandingzi 1, Linjiang Shandingzi 42, Taiping Shandingzi 5, Heishantou Shandingzi 3, Taiping Shandingzi 7, Laobajian 8, Laobajian 8, Jiaodaomu Shandingzi 3, Shanghucun Shandingzi 1, Jiaodaomu Shandingzi 11, Laobajian Shandingzi 5, Laobajian Shandingzi 6, Laobajian Shandingzi 12, Moerdaoga Shandingzi 1, Laobajian Shandingzi 3, Jiaodaomu Shandingzi 4, Haolibao Shandingzi 3, Taiping Shandingzi 2, Jiaodaomu Shandingzi 5, Muduan Shandingzi 2, Laobajian 1, Linjiang Shandingzi 2, Shiwei Shandingzi 9, Shiwei Shandingzi 2, Genhe Shandingzi 1, Shanjingzi 3, Shanjingzi 4, Shanjingzi 5, Shanjingzi 6, Shanjingzi 7, Shanjingzi 8, Daguo Shanjingzi, Xingyuguoyuan Shanjingzi, Mudanjiang Shanjingzi, Duanba Shanjingzi, Shangzhi Shanjingzi, Benyuan Daguo Shanjingzi, Xingyuguoyuan Yingrou Shanjingzi, Chaoai Shanjingzi, Huipi Shanjingzi, Jilin Shanjingzi, Sulian Shanjingzi, Benzao Daguo Shanjingzi, Daye Shanjingzi
楸子 <i>Malus prunifolia</i>	329 ~ 353 (25)	牡丹江海棠, 伊春小果海棠, 伊春植物园大果海棠, 南岔大楸子, 日新海棠, 酒泉楸子, 张良沟楸子, 石家磨楸子, 张掖海棠 1 号, HF-18, HK-9, 保德海棠, 向阳红大红海棠, 平遥古城海棠, 楸子, 武乡子房庙海棠, 刀把嘴武乡 2#, 太原晋祠海棠, 隰县海棠, 宁城海棠, 四楞海棠, 六密海棠, 六楞海棠, 扁海棠, 紫果海棠 Mudanjiang Haitang, Yichun Xiaoguo Haitang, Yichun Zhiwuyuan Daguo Haitang, Nancha Daquzi, Rixin Haitang, Jiuquan Qiuzi, Zhanglianggou Qiuzi, Shijiamo Qiuzi, Zhangye Haitang 1, HF-18, HK-9, Baode Haitang, Xiangyangcun Dahong Haitang, Pingyaocheng Haitang, Qiuzi, Wuxiangzifangmiao Haitang, Daobazui Wuxiang 2, Taiyuan Jinci Haitang, Xixian Haitang, Ningcheng Haitang, Sileng Haitang, Liumi Haitang, Liuleng Haitang, Bianhaitang, Ziguo Haitang

续表 1

所属种 Species	编号 (数量) Code (Number)	名称 Name
花红 <i>Malus asiatica</i>	354 ~ 371 (18)	铁力建设营沙果, 日新沙果, 日新沙果 1 号, 伊春沙果, 南岔沙果 2, 乌马河振华伟沙果, 南岔沙果 1, 酒泉沙果, 小古城早沙果 - 1, 栾庄沙果, 小矾山沙果 1#, HL-9, HF-3, HQ-7, HQL-1, HK-3, HQ-2, 花红 Tielijiansheyingshaguo, Rixin Shaguo, Rixin Shaguo 1, Yichun Shaguo, Nancha Shaguo 2, Wumahe Zhenhuawei Shaguo, Nancha Shaguo 1, Jiuquan Shaguo, Xiaogucheng Zaoshaguo-1, Luanzhuang Shaguo, Xiaofanshan Shaguo 1, HL-9, HF-3, HQ-7, HQL-1, HK-3, HQ-2, Huahong
八棱海棠 <i>Malus robusta</i>	372 ~ 405 (34)	光面砧子, 热砧子, 短枝砧子, 晚白海棠, 河北平顶海棠, 八棱海棠, 冷海棠, 早白海棠, 红海棠, 热砧子短枝, 石洞平顶 1#, 三块石海棠, 达子营八棱 2#, 达子营晚白海棠 1#, 板达峪热砧子 1#, 瑞云观八棱 1#, 瑞云观冷砧子 1#, 大古城大眼砧子 1#, 大古城热砧子 1#, 大古城平顶 5#, 大古城八棱, 小古城冷砧子 1#, 小古城热砧子, 下井沟平顶 1#, 下井沟甜果子 1#, 下井沟光面砧子 2, 小矾山海棠, 小矾山八棱, 紫色小矾山八棱, HF-2, HL-3, HC-32, 刀把嘴八棱, 冷海棠 Guangmian Gunzi, Regunzi, Duanzhi Gunzi, Wanbai Haitang, Hebei Pingding Haitang, Baleng Haitang, Lenghaitang, Zaobai Haitang, Honghaitang, Regunzi Duanzhi, Shidong Pingding 1, Sankuaishi Haitang, Daziying Baleng 2, Daziying Wanbai Haitang 1, Bandayu Regunzi 1, Ruiyunguan Baleng 1, Ruiyunguan Lengggunzi 1, Dagucheng Dayangunzi 1, Dagucheng Regunzi 1, Dagucheng Pingding 5, Dagucheng Baleng, Xiaogucheng Lengggunzi 1, Xiaogucheng Regunzi, Xiaijinggou Pingding 1, Xiaijinggou Tianguozi 1, Xiaijinggou Guangmian Gunzi 2, Xiaofanshan Haitang, Xiaofanshan Baleng, Zise Xiaofanshan Baleng, HF-2, HL-3, HC-32, Daobazui Baleng, Lenghaitang
陇东海棠 <i>Malus kansuensis</i>	406 ~ 409 (4)	陇东海棠 - 1, 陇东海棠 - 2, 五棱陇东, 五棱陇东 2 号 Longdong Haitang-1, Longdong Haitang-2, Wuleng Longdong, Wuleng Longdong 2
垂丝海棠 <i>Malus halliana</i>	410 ~ 418 (9)	垂丝 1 - 4, 垂丝 1 - 9, 酒泉倒挂, 倒挂 2 号, 倒挂 4 号, 倒挂 3 号, 倒挂 6 号, 张掖倒挂, 倒挂 5 号 Chuisi 1-4, Chuisi 1-9, Jiuquan Daogua, Daogua 2, Daogua 4, Daogua 3, Daogua 6, Zhangye Daogua, Daogua 5
山楂海棠 <i>Malus komarovii</i>	419 (1)	
变叶海棠 <i>Malus toringoides</i>	420 ~ 422 (3)	变叶海棠 - 1, 变叶海棠 - 2, 变叶海棠 - 3 Bianye Haitang-1, Bianye Haitang-2, Bianye Haitang-3
花叶海棠 <i>Malus transitoria</i>	423 (1)	
丽江山荆子 <i>Malus rockii</i>	424 (1)	
滇池海棠 <i>Malus yunnanensis</i>	425 (1)	
湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i>	426 (1)	
沧江海棠 <i>Malus ombrophila</i>	427 (1)	
毛山荆子 <i>Malus manshurica</i>	428 (1)	
西蜀海棠 <i>Malus prattii</i>	429 (1)	
锡金海棠 <i>Malus sikkimensis</i>	430 (1)	
小金海棠 <i>Malus xiaojinensis</i>	431 (1)	
沙金海棠 <i>Malus sargentii</i>	432 (1)	
台湾林檎 <i>Malus doumeri</i>	433 (1)	
西府海棠 <i>Malus micromalus</i>	434 (1)	
海棠花 <i>Malus spectabilis</i>	435 (1)	
扁果海棠 <i>Malus platycarpa</i>	436 (1)	
草原海棠 <i>Malus ioensis</i>	437 (1)	
东方苹果 <i>Malus orientalis</i>	438 (1)	
多花海棠 <i>Malus floribunda</i>	439 (1)	
褐海棠 <i>Malus fusca</i>	440 (1)	
花冠海棠 <i>Malus coronaria</i>	441 (1)	
乔劳斯基海棠 <i>Malus tschonoskii</i>	442 (1)	
森林苹果 <i>Malus sylveseris</i>	443 (1)	
窄叶海棠 <i>Malus angustifolia</i>	444 (1)	
珠眉海棠 <i>Malus zumi</i>	445 (1)	
苹果 (国外引进品种) <i>Malus × domestica</i> (Introduced Cultivars)	449 ~ 484 (36)	澳洲青苹, 赫尔斯太, 磅, 酸王, 瑞丹, 宝斯库普, 弗洛里那, 红玉, 国光, 乔纳金, 红星, 元帅, 艳红, 新红星, 蜜脆, 藤牧 1 号, 米丘林纪念, 女游击队员, 苏伊列波, 王林, 津轻, 新世界, 红王将, 乐乐富士, 千秋, 世界一, 惠, 工藤, 红金嘎拉, 毕斯马克, 弗来堡, 西蒙飞, 发现, 桔苹, 桃苹, 舞美 Granny Smith, Heersitai, Mere de Menage, Suanwang, Ruidan, Belld de Boskoop, Florina, Jonathan, Ralls, Jonagold, Starking Del., Delicious, Strk Spur Ultra Red Delicious, Red Delicious, Honycrisp, Mato, MiqulinJinian, Nüyoujiduiyuan, Suyisiliebo, Orin, Tsugaru, Xinshijie, Beni Shogun, Lelefushi, Qianqiu, Shijieyi, Megumi, Gongteng, Red Golden

续表 1

所属种 Species	编号 (数量) Code (Number)	名称 Name
苹果 (中国育成品种) <i>Malus × domestica</i> (Chinese bred cultivars)	485 ~ 509 (25)	Gala, Bismark, Freyberg, Simonffy Piros, Discovery, Cox's Orange Pippin, Peach, Maypole 东光, 早翠绿, 眉短 1 号, 锦红, 斯托诺维, 胜利, 宁秋, 战寒香, 新红, 伏帅, 烟红蜜, 中秋, 露香, 脆红, 丹霞, 岱绿, 北京 0201, 金红, 国庆, 金光, 绿光, 宁丰, 龙红, 龙冠, 黄太平 Dongguang, Zaocuilü, Meiduan 1, Jinhong, Situonuowei, Shengli, Ningqiu, Zhanhanxiang, Xinhong, Fushuai, Yanhongmi, Zhongqiu, Luxiang, Cuihong, Danxia, Dailü, Beijing 0201, Jinhong, Guoqing, Jinguang, Lüguang, Ningfeng, Longhong, Longguan, Huangtaiping

1.2 DNA 的提取

采用 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒 (德国, QIAGEN) 提取供试材料春季正常叶片基因组 DNA。分别用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计 (美国 DeNovix, DS-11 型) 检测其浓度和纯度, 对照 λ DNA ($40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 将提取基因组 DNA 的浓度调整到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 酶切建库

以 2010 年已经发表的苹果基因组作为参考基因组进行酶切预测。参考基因组信息: 苹果 (*Malus pumila* Mill.) 基因组 (Velaso et al., 2010) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=apple>), 组装出的基因组大小为 1 874.77 Mb, GC 含量为 45.32%。利用 SLAF-predict 软件, 通过苹果基因组进行方案预测, 确定酶切组合并进行酶切, 将获得的酶切片段的 3' 端进行加 A 处理, 在加有 poly A 的酶切片段上连接测序接头, 经过 PCR 扩增和切胶回收目的片段, 构建文库。

1.4 测序及数据开发

在 Illumina HiSeqTM 2500 (美国 Illumina 公司, HiSeq 2500 型) 上对检验合格的文库进行测序, 测序结果经过去接头、低质量阅读框和污染处理而获得干净序列即 SLAF 标签。评估测序获得序列的 GC 含量和 Q30 指标, 检验测序质量。

在不同样品间有差异的 SLAF 标签即为多态性 SLAF 标签。通过 BWA 软件 (Li & Durbin, 2009) 将 SLAF 标签与苹果参考基因组 (Velaso et al., 2010) 以及在不同样品间进行比对, 将其定位到参考基因组上获得多态性的 SLAF 标签。利用 GATK (McKenna et al., 2010) 和 SAMtools (Li et al., 2009) 两种方法在多态性 SLAF 中开发 SNP, 筛选两种方法共同得到的 SNP 作为开发的标记数据集。根据完整度 > 0.94 , 次要等位基因频率 (MAF) > 0.05 过滤 (Sunseri et al., 2018), 筛选多态性的 SNP, 用于进一步的数据统计和分析。

1.5 数据统计与分析

基于筛选多态性 SNP, 使用 MEGA X (Kumar et al., 2018) 的 Neighbor-joining 算法 (Saitou & Nei, 1987), 设置 Bootstrap 为 1 000, 构建供试苹果种质的系统进化树。样品间遗传距离的大小用系统进化树的分支长度体现, 长度越短即代表两份种质间的亲缘关系越近。利用 EIGENSOFT6.0 (Price et al., 2006) 完成所有样品的主效成分分析 (Principle components analysis, PCA) (de Hoon et al., 2004)。基于 SNP 获得的主成分分析结果, 供试种质在 PCA 结构图上的距离越近即表示其亲缘关系越近。

2 结果与分析

2.1 建库与测序质量评估

利用 SLAF-predict 软件, 参照 2010 年苹果基因组, 确定选择 *Rsa* I + *Hae*III 酶组合进行酶切, 筛选 SLAF 标签长度范围为 314 ~ 414 bp, 共预测到 180 960 个 SLAF 标签, SLAF 标签在基因组上分布基本均匀 (图 1)。以水稻的测序数据 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 为对照, 将水稻的测序数据与苹果参考基因组进行比对, 双端比对效率为 95.19%, 酶切效率为 92.79%, 酶切反应正常, SLAF 建库正常。

对所有供试苹果属植物种质测序共获得 1 521.9 Mb 的读长数据, 各种质样品获得的读长数在 1 189 223 ~ 1 968 102 范围内, 测序平均 Q30 为 91.58%, 所有测序样品的 Q30 值均在 80% 以上; 平均 GC 含量为 40.04%, GC 含量普遍较低。用于评估试验建库的准确性的水稻测序获得 0.45 Mb 的数据量。测序结果的碱基错误率低, 测序数据达到要求。

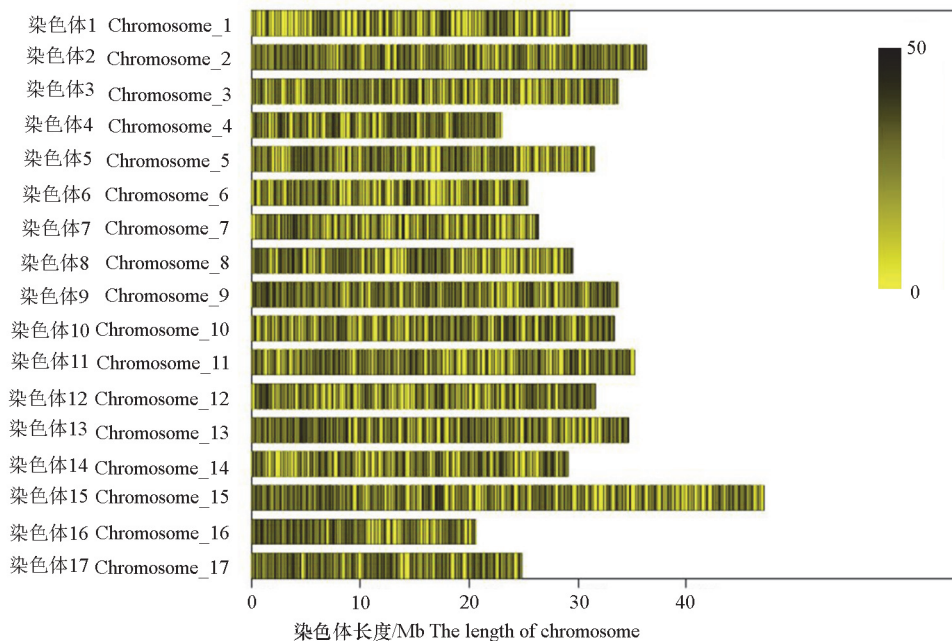


图 1 SLAF 标签在苹果参考基因组 17 条染色体上的分布

染色体上黑线代表 SLAF 标签定位的位置, 黑色越深的区域为 SLAF 标签集中分布的区域。

Fig. 1 The distribution of SLAF tags in 17 chromosomes of reference apple genome

Black lines in chromosomes indicated the position of SLAF tags. The darker regions showed the centralized distribution area of tags.

2.2 SLAF 标签与多态性 SNP 标记筛选

对 509 份苹果属植物种质测序获得 586 454 个 SLAF 标签, 平均测序深度为 6.42 \times 。通过 BWA 软件比对获得 463 612 个多态性 SLAF 标签, 开发 5 896 021 个群体 SNP, 根据完整度 > 0.94, MAF > 0.05 过滤, 共得到 46 460 个多态性 SNP 位点, 用于后续的群体结构分析。

2.3 苹果属植物的多样性

供试 509 份苹果属植物的观测等位基因数 (A_o)、期望等位基因数 (A_e)、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、Nei 多样性指数 (N_{ei})、香农指数 (I) 和多态性信息含量 (PIC) 分别为 2、1.520、0.188、0.318、0.318、0.488 和 0.259 (表 2)。按照所属种划分种群, 含有 1 份以上供试材料的种群有 11 个, 所有种群的观测等位基因数相等, 变叶海棠的各项遗传多样性指数均为最高, 中国苹果除观察杂合度外的其余各项遗传多样性指数均为最低, 观察杂合度最低的为山荆子。

表 2 供试苹果属植物总体和各种群的多样性
 Table 2 The genetic diversity of all accessions and different species of *Malus* Mill.

种 Species	观测等位 基因数 A_o	期望等位基因数 A_e	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Nei 多样 性指数 N_{ei}	香农指数 I	多态性信 息含量 PIC
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	2	1.560	0.320	0.333	0.334	0.504	0.268
中国苹果 <i>Malus</i> × <i>domestica</i> subsp. <i>chinensis</i>	2	1.447	0.272	0.288	0.292	0.453	0.239
山荆子 <i>Malus baccata</i>	2	1.519	0.255	0.315	0.317	0.484	0.257
楸子 <i>Malus prunifolia</i>	2	1.572	0.370	0.342	0.349	0.517	0.276
花红 <i>Malus asiatica</i>	2	1.576	0.409	0.343	0.353	0.518	0.276
八棱海棠 <i>Malus robusta</i>	2	1.674	0.474	0.380	0.386	0.559	0.300
陇东海棠 <i>Malus kansuensis</i>	2	1.498	0.273	0.315	0.360	0.488	0.260
垂丝海棠 <i>Malus halliana</i>	2	1.584	0.412	0.342	0.362	0.514	0.274
变叶海棠 <i>Malus toringoides</i>	2	1.712	0.595	0.401	0.482	0.587	0.316
苹果 (国外引进品种) <i>Malus</i> × <i>domestica</i> (Introduced cultivars)	2	1.603	0.332	0.354	0.359	0.530	0.284
苹果 (中国育成品种) <i>Malus</i> × <i>domestica</i> (Chinese bred cultivars)	2	1.483	0.283	0.296	0.302	0.459	0.242
总体 Total	2	1.520	0.188	0.318	0.318	0.488	0.259

2.3 苹果属植物系统发育分析

基于筛选获得的多态性 SNP 计算遗传距离, 得出 509 份苹果属植物的聚类图 (图 2), 可以将其大致分为 5 个类群。

类群 I 包括 142 份苹果属植物种质资源, 即 3 份新疆野苹果、2 份中国苹果、2 份楸子、1 份八棱海棠、4 份垂丝海棠、1 份湖北海棠、1 份毛山荆子、1 份小金海棠、1 份西府海棠, 其余 126 份全部为山荆子。

类群 II 紧邻类群 I, 共计 59 份苹果属植物种质资源, 包括 6 个栽培种和 13 个野生种, 栽培种分别为中国苹果、楸子、花红、沙金海棠、多花海棠和苹果, 野生种分别为山荆子、陇东海棠、垂丝海棠、山楂海棠、变叶海棠、花叶海棠、丽江山荆子、滇池海棠、沧江海棠、西蜀海棠、扁果海棠、草原海棠和窄叶海棠。该类群是 5 个类群中包含野生种最多的, 其中 3 个野生种扁果海棠、草原海棠和窄叶海棠均起源于北美, 7 个野生种丽江山荆子、山楂海棠、陇东海棠、变叶海棠、花叶海棠、滇池海棠和沧江海棠的遗传距离较近, 聚类比较紧密。栽培种苹果的 5 份种质除黄太平外, 其余全部为中国育成品种, 分别为龙冠、龙红、金红和新红。

类群 III 紧邻类群 II 和 IV, 包括 72 份苹果属植物种质资源, 即 1 份森林苹果、1 份东方苹果、1 份乔劳斯基苹果、2 份山荆子、2 份楸子、1 份花红、2 份八棱海棠和 7 份中国苹果外, 其余全部为苹果。55 份苹果种质中, 36 份为国外引进栽培苹果品种, 19 份为中国育成苹果品种。

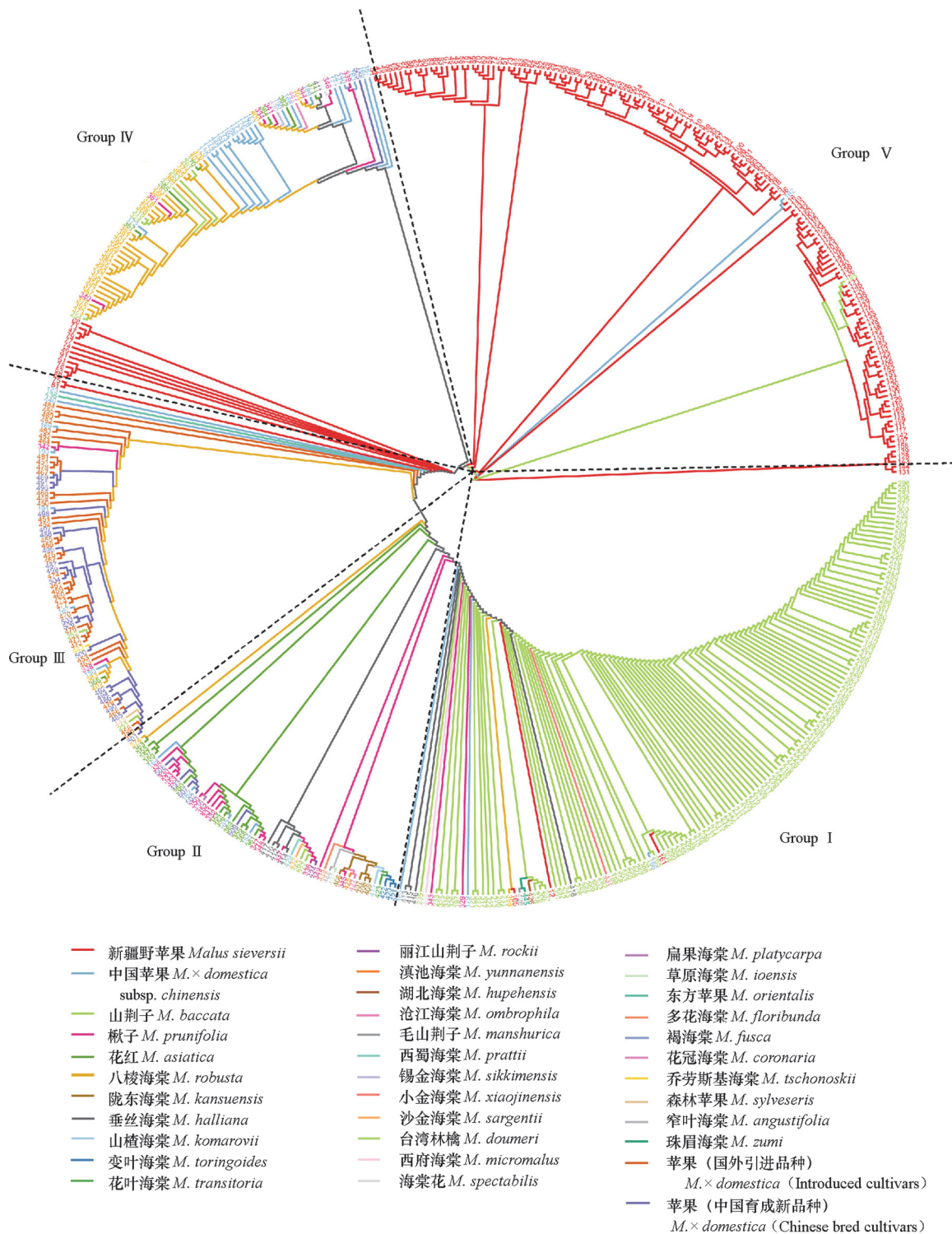


图2 基于 SNP 位点的 509 份苹果属种质的进化树
 Fig. 2 Polygenetic tree of 509 accessions of *Malus* Mill. based on SNP loci

类群IV共计 90 份苹果属植物种质资源, 包括 5 个栽培种和 8 个野生种, 5 个栽培种为除西府海棠之外的全部中国原产的苹果属植物, 分别是中国苹果、楸子、花红、八棱海棠、海棠花, 8 个野生种为新疆野苹果、山荆子、垂丝海棠、小金海棠、台湾林檎、草原海棠、褐海棠和花冠海棠。该类群以八棱海棠、中国苹果和新疆野苹果的数量为最多, 其中八棱海棠有 26 份、中国苹果有 20 份、新疆野苹果有 14 份。

类群V共计 146 份苹果属植物种质资源, 除了 1 份山荆子、1 份中国苹果, 其余为新疆野苹果。

2.4 基于 SNP 标记的苹果属不同种主成分分析

利用 EIGENSTRAT 软件对 509 份苹果属植物种质的多态性 SNP 进行 PCA 分析, 509 份种质按照种划分的三维 PCA 聚类见图 3。主成分分析结果与基于遗传距离的系统进化分析结果相类似。大部分的山荆子和新疆野苹果各自成群, 丽江山荆子、花叶海棠、变叶海棠、陇东海棠、滇池海棠、沧江海棠、山楂海棠等苹果属野生种相对比较接近, 八棱海棠、楸子、花红、中国苹果等栽培种聚在一起。栽培种苹果的大部分种质, 无论是国外引进品种还是中国育成品种, 均聚在一起。

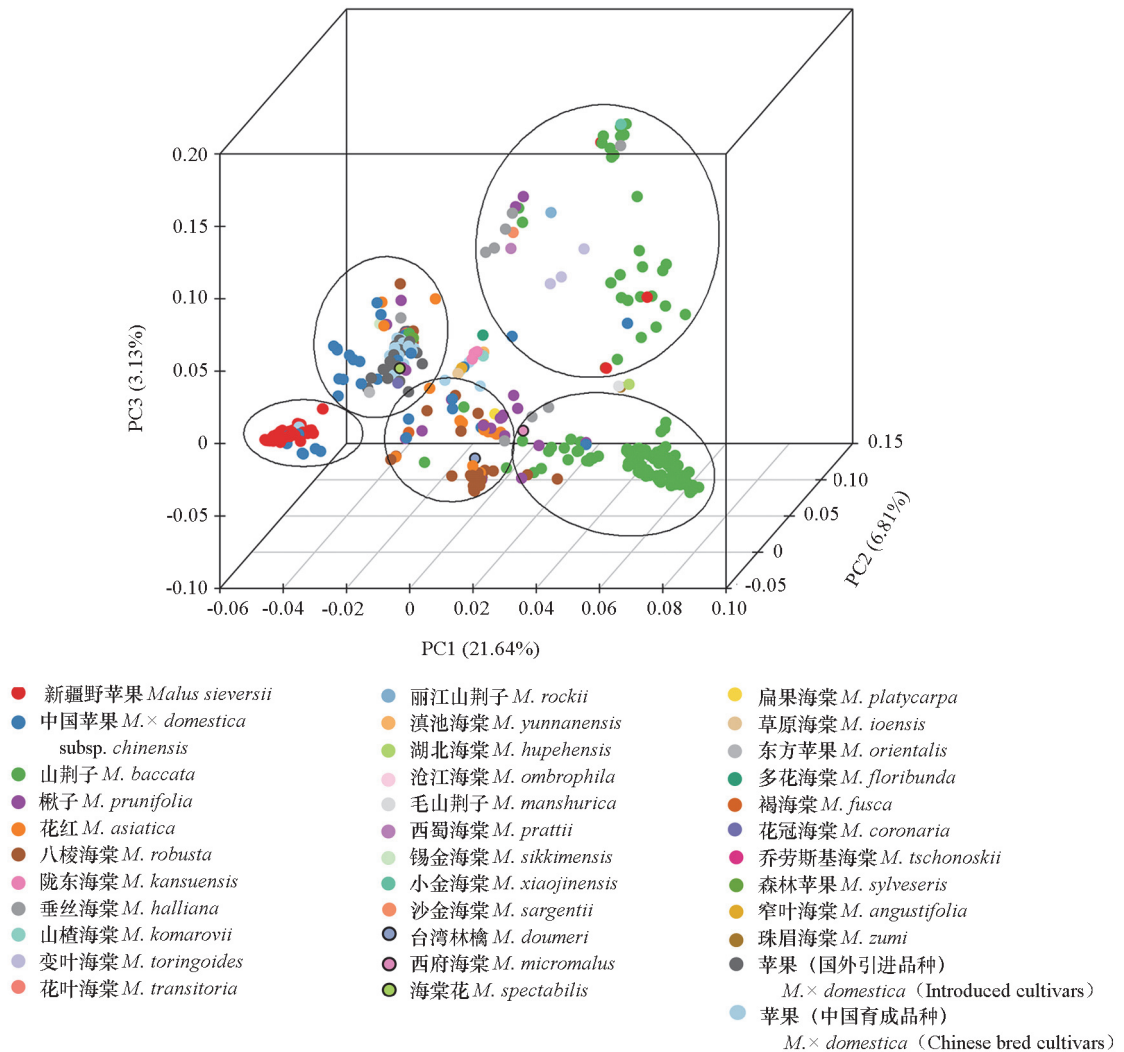


图 3 苹果属 509 份种质的 PCA 聚类图

Fig. 3 PCA plot of 509 accessions of *Malus* Mill.

3 讨论

本研究中利用 SLAF 技术对 509 份苹果属植物种质资源的测序, 以 Velasco 等 (2010) 的苹果参考基因组为参照。经过严格控制多态性 SNP 过滤指标 (完整度 > 0.94, MAF > 0.05), 开发 46 460 个多态性 SNP 位点, 并全部用于 34 种苹果属植物多样性鉴定和群体结构分析, 取得了良好的结果, 为苹果属植物种质亲缘关系鉴定和分类奠定基础。SLAF 测序技术开发的 SNP 有效标记多、在染色体上的密度大、一致性好, 成本远远低于其他高通量测序方法, 能够满足特异分子标记开发和遗传进化等研究需求, 是一种开发染色体特异分子标记的理想手段。

有效等位基因数、香农信息指数和期望杂合度等是评价遗传多样性的重要指标。包含 34 个种的 509 份苹果属植物 SNP 标记的遗传多样性水平较高 ($H_e = 0.318$, $I = 0.488$, $A_e = 1.520$), 多于 1 份种质的供试种群中, 变叶海棠的遗传多样性最高 ($H_e = 0.401$, $I = 0.587$, $A_e = 1.712$), 其次是八棱海棠 ($H_e = 0.380$, $I = 0.559$, $A_e = 1.674$), 中国苹果的遗传多样性最低 ($H_e = 0.288$, $I = 0.453$, $A_e = 1.447$)。供试苹果属种质 SNP 标记的遗传多样性低于苹果属野生种 SSR 标记遗传多样性 ($H_e = 0.86$, $I = 2.07$; Gharghani et al., 2009), 还低于山荆子 ($H_e = 0.848$, $I = 2.350$, $N_e = 8.652$; 高源 等, 2019)、楸子 ($H_e = 0.870$, $I = 2.412$, $N_e = 9.019$; 高源 等, 2019)、三叶海棠 ($H_e = 0.699$, $I = 1.458$, $N_e = 3.954$; Liu et al., 2012) 和变叶海棠 ($H_e = 0.4389$, $I = 0.6282$, $N_e = 1.81$; 石胜友, 2005) 等 SSR 标记的遗传多样性。基于单核苷酸变异的种质遗传多样性指数小于微卫星序列变异多样性指数, 因此不同标记方法检测的遗传多样性结果之间难以进行纵向的比较, 但在同种标记之下, 各种群遗传多样性可进行横向比较, 通过多角度和多层次全面解析种质遗传的多样性。

综合聚类分析和主成分分析的结果, 34 个种的苹果属植物分为 5 个明显的类群, I 山荆子类群, II 苹果属植物野生种类群, III 苹果栽培品种类群, IV 以 5 个苹果属植物栽培种中国苹果、八棱海棠、花红、楸子和海棠花为主的类群, V 新疆野苹果类群。山荆子是中国原产苹果属植物中分布最为广泛、变异更为多样的类群 (杜学梅 等, 2017), 笔者在野外调查区域均有发现 (王大江 等, 2017)。有研究表明其参与了中国栽培苹果的起源驯化过程 (Duan et al., 2017)。在本研究中, 山荆子类群中不仅有新疆野苹果、垂丝海棠、湖北海棠、毛山荆子和小金海棠 5 个野生种, 还有中国苹果、楸子、八棱海棠和西府海棠的加入, 说明山荆子在苹果属植物的起源演化过程中起到了比较重要的作用。供试苹果属植物野生种中有 13 个均聚在类群 II, 说明苹果属植物野生种间亲缘关系相对更近, 而陇东海棠、变叶海棠、花叶海棠、滇池海棠、沧江海棠和山楂海棠 6 个野生种中, 除山楂海棠主要分布在中国吉林省长白山地区, 其余 5 个种在中国的西南地区均有野生分布。陇东海棠、变叶海棠、花叶海棠和山楂海棠均是叶片有裂刻的种, 只是裂刻的深浅不一。这 6 个野生种可能具有相似的起源种, 在演化过程中逐渐出现分化。类群 II 中还包含了 5 份苹果栽培品种, 均为小果型, ‘黄太平’ 原产于前苏联, 但是以中国华北的海棠种子所育出的实生树中选出, ‘新红’ 亲本为 ‘元帅’ × ‘花红’, ‘金红’ 亲本为 ‘金冠’ × ‘红太平’, ‘龙冠’ 亲本为 ‘金冠’ × ‘K9’ (不详 × ‘铃铛果’), 龙红亲本为 ‘铃铛果’ × ‘富士’, 5 个栽培品种的亲本均可追溯至近缘野生种, 与野生种亲缘关系较近。类群 III 中除苹果栽培品种外, 还有山荆子、森林苹果、东方苹果和乔劳斯基海棠 4 个野生种, 再次印证了山荆子可能参与了栽培苹果的起源驯化过程的观点 (Duan et al., 2017)。东方苹果主要分布在高加索、俄罗斯南部、安纳托利亚北部、亚美尼亚、格鲁吉亚东部、土耳其、伊朗北部的山区 (Vartapetyan & Akhvediani, 1990; Volk et al., 2009) 以及伊朗西部、东部和中部 (Browicz, 1969)。森林苹果 [*Malus sylvestris* (L.) Mill.] 最早发现于新石器时代 (Bieneik & Litynska-zajac, 2001), 是

中欧唯一的原生的野生苹果种。东方苹果和森林苹果被多次证明参与西洋栽培苹果品种的演化进程 (Coart et al., 2003; Larsen et al., 2006; Jacques et al., 2009), 本研究的聚类结果也证明了两者与栽培苹果品种有较近的亲缘关系。中国原产苹果属植物栽培种的代表种中国苹果在“西洋苹果”引入中国之前, 是中国的苹果生产中的主要栽培种, 在中国已有 2 000 多年的栽培历史 (陆秋农和贾定贤, 1999; 李育农, 2001)。而新疆野苹果被认为是现代栽培苹果的祖先 (Duan et al., 2017), 但在新疆野苹果的类群中却只有 1 份中国苹果和 1 份山荆子, 只有少数新疆野苹果和多数中国苹果种质聚集在以栽培种为主的类群 V, 即以苹果属植物栽培种中国苹果、八棱海棠、楸子、花红和海棠花为主的类群, 新疆野苹果与中国原产苹果属植物栽培种中国苹果、八棱海棠、花红和楸子间的亲缘关系和起源进化关系有待于进一步考究。这些研究结果都将为后期进一步研究苹果属植物的起源演化提供参考。

随着测序技术的不断进步, 测序成本逐渐减低, 可以对更多的试材进行测序和 SNP 标记的开发, 在全基因组范围内更充分地利用 SNP 分子标记数量多、通量高、基因易分型等优势鉴定品种、解析遗传多样性和亲缘关系、阐释性状形成机理等, 为苹果属植物的分类提供依据, 指导苹果种质资源的收集保护和育种利用。

References

- Bieneik A, Litynska-Zajac M. 2001. New finds of *Malus sylvestris* Mill. (wild apple) from Neolithic sites in Poland. *Veget Hist Archaeobot*, 10: 105 - 106.
- Browicz K. 1969. Distribution of woody Rosaceae in W. Asia. III. *Eriolobus trilobatus* (Poir.) Roem. *Arboretum Kornickie*, 14: 5 - 23.
- Cai C F, Cheng F Y, Wu J, Zhong Y, Liu G X. 2015. The first high-density genetic map construction in tree peony (*Paonia* Sect. *Moutan*) using genotyping by specific-locus amplified fragment sequencing. *PLoS ONE*, Doi: 10.1371/journal.pone.0128584.
- Coart E, Vekemans X, Smulders M J M, Wagner I, Huylbroeck J, Bockstaele E, Roldan-Ruiz I. 2003. Genetic variation in the endangered wild apple [*Malus sylvestris* (L.) Mill.] in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 12: 845 - 857.
- Daccord N, Celton J M, Linsmith G, Becker C, Choisine N, Schijlen E, Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Pierro E A, Gouzy J, Rees D J G, Guérif P, Muranty H, Durel C E, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, Weg E, Bucher E. 2017. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics*, 49 (7): 1099 - 1108.
- de Hoon M J, Imoto S, Nolan J, Miyano S. 2004. Open source clustering software. *Bioinformatics*, 20 (9): 1453 - 1454.
- Du Xue-mei, Yang Ting-zhen, Gao Jing-dong, Wang Qian, Cai Hua-cheng, Li Chun-yan, Gong Gui-hua. 2017. Wild *Malus baccata* (L.) Borkh. in China: natural distribution, utilization and study status. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 33 (5): 24 - 28. (in Chinese)
- 杜学梅, 杨廷楨, 高敬东, 王 骞, 蔡华成, 李春燕, 弓桂花. 2017. 中国野生山定子的自然分布及利用研究现状. *中国农学通报*, 33 (5): 24 - 28.
- Duan N B, Bai Y, Sun H H, Wang N, Ma Y M, Li M J, Wang X, Jiao C, Legall N, Mao L Y, Wan S B, Wang K, He T M, Feng S Q, Zhang Z Y, Mao Z Q, Shen X, Chen X L, Jiang Y M, Wu S J, Yin C M, Ge S F, Yang L, Jiang S H, Xu H F, Liu J X, Wang D Y, Qu C Z, Wang Y C, Zuo W F, Xiang L, Liu C, Zhang D Y, Gao Y, Xu Y M, Xu K N, Chao T, Fazio G, Shu H R, Zhong G Y, Cheng L L, Fei Z J, Chen X S. 2017. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage for fruit enlargement. *Nature Communication*, 8: 249.
- Feng J Y, Li M, Zhao S, Zhang C, Yang S T, Qiao S, Pu Z G. 2018. Analysis of evolution and genetic diversity of sweet potato and its related different polyploidy wild species *I. trifida* using RAD-seq. *BMC Plant Biology*, 18 (1): 181.
- Gao Yuan, Wang Kun, Wang Da-jiang, Liu Li-jun, Li Lian-wen, Piao Ji-cheng. 2019. Genetic diversity and genetic structure of *Malus baccata* and

- Malus prunifolia* from China as revealed by florescent SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (7): 1225 - 1237. (in Chinese)
- 高源, 王昆, 王大江, 刘立军, 李连文, 朴继成. 2019. 中国山荆子和楸子种质资源遗传多样性和遗传结构的荧光 SSR 分析. *园艺学报*, 46 (7): 1225 - 1237.
- Gharghani A, Zamani Z, Talaie A, Oraguzie N C, Fatahi R, Hajnajari H, Wiedow C, Gardiner S E. 2009. Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56 (6): 829 - 842.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc, Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet*, 96: 1069 - 1076.
- Gupta P K, Rustgi S, Mir R R. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*, 101: 5 - 18.
- Han Y P, Zhao X, Liu D Y, Li Y H, Lightfoot D A, Yang Z J, Zhao L, Zhou G, Wang Z K, Huang L, Zhang Z W, Qiu L J, Zheng H K, Li W B. 2016. Domestication footprints anchor genomic regions of agronomic importance in soybeans. *New Phytologist*, 209: 871 - 884.
- Jacques O, Vandermijnsbrugge K, Lemaire S, Antofie A, Lateur M. 2009. Aturaldistribution and variability of wild apple (*Malus sylvestris*) in Melgium. *Belg J Bot*, 142 (1): 39 - 49.
- Jia Jing-xian, Jia Ding-xian, Ren Qing-mian. 2006. Crops and their wild relatives in China. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 贾敬贤, 贾定贤, 任庆棉. 2006. 中国作物及其野生近缘植物. 北京: 中国农业出版社.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6): 1547 - 1549.
- Larsen A S, Asmussen C B, Coart E, Olrik D C, Kjær E D. 2006. Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genetics & Genomes*, 2: 86 - 97.
- Li Bei-bei, Zhang Heng, Jiang Jian-fu, Zhang Ying, Fan Xiu-cai, Fang Jing-gui, Liu Chong-huai. 2019. Analysis of genetic diversity of grape germplasms using SLAF-seq technology. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (11): 2109 - 2118. (in Chinese)
- 李贝贝, 张恒, 姜建福, 张颖, 樊秀彩, 房经贵, 刘崇怀. 2019. 基于 SLAF-seq 技术的葡萄种质遗传多样性分析. *园艺学报*, 46 (11): 2109 - 2118.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25 (14): 1754 - 1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Durbin R. 2009. The sequence alignment/map (SAM) format and SAM tools. *Bioinformatics*, 25 (16): 2078 - 2079.
- Li Yu-liang, Suo Hai-cui, Han Fu-guang, Liu Jian-hua, Hu Jian-guang, Gao Lei, Li Wu. 2018. Analysis of genetic diversity of sweet and wax corn germplasms using SLAF-seq technology. *Journal of Maize Sciences*, 27 (4): 71 - 78. (in Chinese)
- 李余良, 索海翠, 韩福光, 刘建华, 胡建广, 高磊, 李武. 2018. 基于 SLAF-seq 技术分析甜、糯玉米种质遗传多样性. *玉米科学*, 27 (4): 71 - 78.
- Li Yu-nong. 1999. Progree in research on the origin and evolution of genus *Malus* in the world. *Journal of Fruit Science*, 16 (S): 8 - 19. (in Chinese)
- 李育农. 1999. 世界苹果属植物的起源演化研究新进展. *果树科学*, 16 (增刊): 8 - 19.
- Li Yu-nong. 2001. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. Beijing: China Agriculture Press. (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.
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Mol Breed*, 10: 217 - 241.
- Liu J, Zheng X Y, Daniel P, Hu C Y, Teng Y W. 2012. Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang Province, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45: 69 - 78.
- Lu Qiu-nong, Jia Ding-xian. 1999. China fruit tree · apple. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 陆秋农, 贾定贤. 1999. 中国果树志 · 苹果卷. 北京: 中国林业出版社.
- Ma J Q, H L, Ma C L, Jin J Q, Li C F, Wang R K, Zheng H K, Yao M Z, Chen L. 2015. Large-scale SNP discovery and genotyping for constructing a high-density genetic map of tea plant using Specific-Locus Amplified Fragment Sequencing (SLAF-seq). *PLoS ONE*, 10 (6): e0128798.
- Mckenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A. 2010. The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing

- next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20 (9): 1297 - 1303.
- Price A L, Patterson N J, Plenge R M, Weinblatt M E, Shadick N A, Reich D. 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38 (8): 904 - 909.
- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 94 - 100.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406 - 425.
- Shi Sheng-you. 2005. Studies on the origin and differentiation of genetic diversity in *Malus toringoides* [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 石胜友. 2005. 变叶海棠起源及其遗传多样性分化研究[博士论文]. 重庆: 西南大学.
- Shu Huai-rui. 1999. Apple. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 束怀瑞. 1999. 苹果学. 北京: 中国农业出版社.
- Sunseri F, Lupini A, Mauceri A, De Lorenzis G, Araniti F, Brancadoro L, Mercati F. 2018. Single nucleotide polymorphism profiles reveal an admixture genetic structure of grapevine germplasm from Calabria, Italy, uncovering its key role for the diversification of cultivars in the Mediterranean Basin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24 (3): 345 - 359.
- Vartapetyan V V, Akhvediani S N. 1990. Study of polymorphism in *Malus orientalis* Uglitzk. in western and eastern Georgia. *Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR*, 137 (2): 373 - 376.
- 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, Dal Ri A, 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, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan A 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, van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 4: 833 - 839.
- Volk G M, Richards C M, Henk A D, Reiley A A, Reeves P A, Forsline P L, Aldwinckle H S. 2009. Capturing the diversity of wild *Malus orientalis* from Georgia, Armenia, Russia and Turkey. *J Am Soc Hort Sci*, 134: 453 - 459.
- Wang Da-jiang, Wang Kun, Gao Yuan, Zhao Ji-rong, Liu Li-jun, Gong Xin, Li Lian-wen. 2017. Preliminary investigation of modern distribution of *Malus* resources in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 18 (6): 1116 - 1124. (in Chinese)
- 王大江, 王 昆, 高 源, 赵继荣, 刘立军, 龚 欣, 李连文. 2017. 我国苹果属资源现代分布调查初报. *植物遗传资源学报*, 18 (6): 1116 - 1124.
- Yu De-jun. 1979. Taxonomy of China fruits. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 俞德俊. 1979. 中国果树分类学. 北京: 中国农业出版社.
- Zamir D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2: 983 - 989.
- Zhang L Y, Hu J, Han X L, Li J J, Gao Y, Richards C M, Zhang C X, Tian Y, Liu G M, Gul H, Wang D J, Tian Y, Yang C X, Meng M H, Yuan G P, Kang G D, Wu Y L, Wang K, Zhang H T, Wang D P, Cong P H. 2019. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour. *Nature Communication*, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09518-x>.
- Zhu Y F, Yin Y F, Yang K Q, Li J H, Sang Y L, Huang L, Fan S. 2015. Construction of a high-density genetic map using specific length amplified fragment markers and identification of a quantitative trait locus for anthracnose resistance in walnut (*Juglans regia* L.). *BMC Genomics*, 16: 614.