

基于叶绿体 DNA 分析的楸子种质遗传多样性研究

高源, 王大江, 王昆*, 丛佩华*, 张彩霞, 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 4 对叶绿体 DNA 引物扩增 49 份楸子 [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.] 种质资源的 4 个叶绿体 DNA 基因间区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 序列, 基于 4 个叶绿体 DNA 基因间区的序列变异, 从母系遗传的角度评价楸子的遗传多样性水平。结果显示: 4 个叶绿体 DNA 基因间区序列经测序、拼接、比对和合并之后的片段长度为 3 790 bp, 共有 173 个多态性变异位点, 其中包含 2 个单一突变位点、20 个简约信息位点和 151 个插入/缺失位点。在 49 份楸子种质中, *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 区域的变异位点的数量分别为 26 个、25 个、120 个和 2 个, 单倍型数量分别为 9 个、7 个、8 个和 3 个, 合并之后的叶绿体 DNA 片段的单倍型有 14 个。核苷酸多样性和单倍型多样性最高的区域均为 *trnH-psbA* ($H_d = 0.775$, $P_i = 0.02143$), 最低的为 *5'trnL-trnF* ($H_d = 0.481$, $P_i = 0.00072$)。49 份楸子种质 4 个叶绿体 DNA 区域合并后的遗传多样性较高 ($H_d = 0.854$, $P_i = 0.00949$)。Tajima's D 检验中, 4 个叶绿体 DNA 区域在 $P > 0.10$ 水平上均不显著, 楸子的 4 个叶绿体 DNA 区域在进化上遵循中性进化模型。楸子的遗传变异主要存在于群体内部, 不同居群间基因交流频繁, 多数居群间遗传分化较少, 与地理距离不完全相关。

关键词: 楸子; 叶绿体 DNA; 单倍型; 遗传多样性

中图分类号: S 661

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 05-0853-11

Genetic Diversity of *Malus prunifolia* Germplasms Based on Chloroplast DNA Analysis

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

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

Abstract: Four intergenic region, *trnH-psbA*, *trnS-trnG* spacer + intron, *trnT-5'trnL* and *5'trnL-trnF* of 49 accessions of newly collected germplasms of *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. were amplified by four primers. Based on genetic variation of 4 chloroplast intergenic regions, the genetic diversity of *Malus prunifolia* among different populations were explored from the perspective of maternal inheritance. The

收稿日期: 2019-12-09; **修回日期:** 2020-04-08

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2018-RIP-02); 农业农村部物种资源保护费专项 (NB2015-2130135-39); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303093)

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

results showed that the length of four intergenic regions of chloroplast DNA was 3 790 bp after sequencing, splicing, alignment and merging, and 173 variable sites were detected including 2 singleton variable sites, 20 parsimony informative sites and 151 insertion/deletion gaps. Among the 49 accessions of *Malus prunifolia*, the number of variable sites of region *trnH-psbA*, *trnS-trnG* spacer + intron, *trnT-5'trnL* and *5'trnL-trnF* were 26, 25, 120 and 2. The number of haplotypes for four regions being were 9, 7, 8 and 3. After four regions being merged the haplotypes of chloroplast DNA fragments were 14. The region with the highest nucleotide and haplotype diversity was *trnH-psbA* ($H_d = 0.775$, $P_i = 0.02143$), and the nucleotide and haplotype diversity of *5'trnL-trnF* was the lowest ($H_d = 0.481$, $P_i = 0.00072$). The cpDNA diversity of *Malus prunifolia* with four chloroplast DNA regions merged was high ($H_d = 0.854$, $P_i = 0.00949$). Tajima's test showed all Tajima's D values were not significant at $P > 0.10$, which indicated that variation of those chloroplast regions followed neutral theory of molecular evolution. The genetic variation of *Malus prunifolia* mainly existed within populations. Gene exchange among different populations is frequent, and genetic differentiation among most of populations is less, which has little relationship with geographical distance.

Keywords: *Malus prunifolia*; chloroplast DNA; haplotype; genetic diversity

楸子 [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.] 属蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (俞德俊, 1979), 是杂种起源的中国苹果属植物栽培种之一, 分布极广, 作为栽培种的楸子在各地栽培历史悠久, 但已无成园栽培 (李育农, 2001; 钱关泽, 2005)。楸子具有诸多优良抗性, 是重要的砧木育种亲本和抗性资源, 常用作砧木和观赏栽培, 有的果实可供食用或加工。现对楸子的研究主要集中于作为砧木的优异性状鉴定评价和抗性基因挖掘等方面 (钱关泽, 2005; 王顺才, 2011; 王顺才等, 2011; 傅明洋, 2013; 秦源, 2014; 高帆等, 2016; Tan et al., 2017; 李海燕等, 2018; Huang et al., 2018), 而其遗传多样性的评价仅见利用 SSR 标记进行研究的报道 (高源等, 2019b)。从多角度充分研究楸子种质资源的遗传多样性和遗传基础是对其充分开发利用的前提。

在大多数被子植物中母系遗传的叶绿体基因组高度保守, 非编码区进化速度快 (倪梁红等, 2015), 非编码区中的基因间区具有丰富的遗传变异; 叶绿体基因单倍型是在叶绿体基因里面具有统计学关联性的一类单核苷酸多态性 (SNP); 因此叶绿体基因可直接用于植物遗传多样性检测 (李宏韬等, 2003), 在植物的系统发育研究中具有独特的优势 (张韵洁和李德铢, 2011)。国内外学者利用 1~2 个叶绿体 DNA (Chloroplast DNA, cpDNA) 区域开展苹果属栽培品种和野生近缘种的叶绿体 DNA 变异和亲缘关系等的研究 (Savolainen et al., 1995; Robinson et al., 2001; Coat et al., 2006; Nikiforova et al., 2013)。丁芳兵 (2012) 利用叶绿体基因 *matK* 与核糖体基因 ITS 相结合研究湖北海棠与近缘种的亲缘关系; 朱元娣等 (2014) 利用相同的基因区域研究了新疆野苹果与中国苹果的系统发育; 徐榕雪 (2018) 也利用该区域的内含子序列信息, 构建苹果属 23 个种 27 份材料的系统发育树, 但仅获得遗传变异信息位点 23 个。朱元娣等 (2014) 和徐榕雪 (2018) 都得出了叶绿体基因 *matK* 并不适用于栽培苹果种内的系统发育分析的结论。李慧峰 (2012) 利用 *trnL-trnF* 序列构建的泰沂山区苹果属植物系统树在一定程度上支持表型分类的结果, 但无法有效解决其复杂遗传背景下的系统发育关系。叶绿体基因组用于系统发育的研究已经发展到多个基因及基因间区的多态性位点组合分析的阶段 (Baraket et al., 2009; Potter et al., 2009; Ghada et al., 2010), 叶绿体单个基因或单个基因间区难以满足具有复杂遗传背景的果树种质资源的遗传分析要求。

本研究中对中国原产楸子种质资源广泛收集的基础上, 利用 4 对叶绿体 DNA 引物扩增收集的 49 份楸子种质资源叶绿体 DNA 的 4 个基因间区序列, 分析 4 个叶绿体 DNA 间区序列的遗传变异, 解析楸子群体在叶绿体 DNA 水平上的遗传多样性, 探讨它们之间的亲缘关系, 以期为该种的多样性保护和有效利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 49 份种质中, MP45~MP49 采自国家果树种质公主岭寒地果树圃 (吉林省公主岭), 其余均采自国家果树种质兴城梨、苹果圃 (辽宁省兴城)。供试种质均为野外考察收集, 在野外通过表型鉴定为楸子本种 (楸子的地方类型归并到楸子中) 后, 分别入两个圃嫁接繁殖保存。于 2017 年春季采集楸子种质的健康幼嫩叶片, 经硅胶干燥之后备用; 2018 年在农业部园艺作物种质资源利用重点实验室完成 4 个叶绿体 DNA 基因间区的扩增, 并送测序公司完成测序。49 份材料 (表 1) 来自于 9 个省 (自治区), 包括新疆 3 份、辽宁 4 份、陕西 1 份、黑龙江 5 份、甘肃 4 份、山西 6 份、河北 20 份、内蒙古 1 份、吉林 5 份。

表 1 供试楸子种质资源及叶绿体 DNA 单倍型分布
 Table 1 Germplasm resources of *Malus prunifolia* and their cpDNA haplotype distribution

| 来源地 Origin | 群体代码 Code of population | 数量 Number | 编号 No. | 种质名称 Accession name | 单倍型 Haplotype |
|----------------|----------------------------|--------------|------------------------------|--|------------------|
| 新疆 Xinjiang | MPXJ | 3 | MP1 | 新疆红海棠 Xinjiang Honghaitang | H_14 |
| | | | MP2 | 石海棠 Shihaitang | H_13 |
| | | | MP3 | 伊犁海棠 Yili Haitang | H_12 |
| 辽宁 Liaoning | MPLN | 4 | MP4 | 三道沟小道沟大海棠 Sandaogou Xiaodaogou Dahaitang | H_7 |
| | | | MP5 | 三道沟小五沟海棠 Sandaogou Xiaowugou Haitang | H_2 |
| | | | MP6 | 熊岳海棠 1# Xiongyue Haitang 1 | H_3 |
| | | | MP7 | 三道沟八家海棠 Sandaogou Bajia Haitang | H_2 |
| 陕西 Shaanxi | MPSXX | 1 | MP8 | 富平楸子 Fuping Qiuzi | H_11 |
| | 黑龙江 Heilongjiang | 5 | MP9 | 牡丹江海棠 Mudanjiang Haitang | H_1 |
| MP10 | | | 伊春小果海棠 Yichun Xiaoguohaitang | H_1 | |
| MP11 | | | 伊春大果海棠 Yichun Daguohaitang | H_7 | |
| MP12 | | | 南岔大楸子 Nancha Daqiuzi | H_7 | |
| MP13 | | | 日新海棠 Rixin Haitang | H_1 | |
| 甘肃 Gansu | MPGS | 4 | MP14 | 酒泉楸子 Jiuquan Qiuzi | H_5 |
| | | | MP15 | 张良沟楸子 Zhanglianggou Qiuzi | H_2 |
| | | | MP16 | 石家磨楸子 Shijiamo Qiuzi | H_10 |
| | | | MP17 | 张掖海棠 1 号 Zhangye Haitang 1 | H_10 |
| 山西 Shanxi | MPSX | 6 | MP18 | 保德海棠 Baode Haitang | H_2 |
| | | | MP19 | 向阳村大红海棠 Xiangyangcun Dahong Haitang | H_5 |
| | | | MP20 | 平遥古城海棠 Pingyaogucheng Haitang | H_9 |
| | | | MP21 | 海棠 2 Haitang 2 | H_2 |
| | | | MP22 | 楸子 Qiuzi | H_2 |
| | | | MP23 | 武乡子房苗黄海棠 Wuxiang Zifangmiao Huanghaitang | H_2 |
| 河北 Hebei | MPHB | 20 | MP24 | 楸子 HC-6 Qiuzi HC-6 | H_8 |
| | | | MP25 | 海棠 HL-16 Haitang HL-16 | H_2 |
| | | | MP26 | 海棠 HK-10 Haitang HK-10 | H_3 |
| | | | MP27 | 海棠 HF-16 Haitang HF-16 | H_7 |
| | | | MP28 | 海棠 HF-18 Haitang HF-18 | H_6 |
| | | | MP29 | 海棠 HK-9 Haitang HK-9 | H_3 |
| | | | MP30 | 楸子 HC-1 Qiuzi HC-1 | H_2 |
| | | | MP31 | 白洋淀紫苹果 Baiyangdian Zipingguo | H_2 |
| | | | MP32 | 青县小盘古村海棠 1 号 Qingxian Xiaopangucun Haitang 1 | H_2 |

续表 1

| 来源地 Origin | 群体代码 Code of population | 数量 Number | 编号 No. | 种质名称 Accession name | 单倍型 Haplotype |
|-----------------------|-------------------------------|--------------|-----------|---|------------------|
| | | | MP33 | 博野县小营村海棠 1 号 Boyexian Xiaoyingcun Haitang 1 | H_5 |
| | | | MP34 | 小盘古村黄海棠 1 号 Xiaopangucun Huanghaitang 1 | H_3 |
| | | | MP35 | 平泉号大河北海棠 1 号 Pingquanhao Dahebeihaitang 1 | H_4 |
| | | | MP36 | 平泉海棠 4 号 Ping Quan Haitang 4 | H_4 |
| | | | MP37 | 平泉海棠 2 号 Ping Quan Haitang 2 | H_4 |
| | | | MP38 | 小盘古村海棠 2 号 Xiaopangucun Haitang 2 | H_2 |
| | | | MP39 | 平泉高创沟海棠 3 号 Pingquan Gaochuanggou Haitang 3 | H_4 |
| | | | MP40 | 平泉大河北海棠 3 号 Pingquan Dahebei Haitang 3 | H_4 |
| | | | MP41 | 高创沟白海棠 Gaochuanggou Baihaitang | H_2 |
| | | | MP42 | 高创沟海棠 2 号 Gaochuanggou Haitang 2 | H_4 |
| | | | MP43 | 唐县北店头乡封庄村海棠 2 号 Tangxian Beidiantouxiang Fengzhuangcun Haitang 2 | H_3 |
| 内蒙古 Inner Mongolia | MPNMG | 1 | MP44 | 宁城海棠 Ningcheng Haitang | H_2 |
| 吉林 Jilin | MPJL | 5 | MP45 | 四楞海棠 Sileng Haitang | H_3 |
| | | | MP46 | 六密海棠 Liumi Haitang | H_2 |
| | | | MP47 | 六楞海棠 Liuleng Haitang | H_3 |
| | | | MP48 | 扁海棠 Bianhaitang | H_2 |
| | | | MP49 | 紫果海棠 Ziguo Haitang | H_1 |

1.2 DNA 提取及 PCR 体系

采用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取供试材料春季嫩叶的基因组 DNA。分别用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其浓度和纯度，标准品 λ DNA ($40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 将提取基因组 DNA 的浓度调整到 $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 用于 PCR。

1.3 PCR 扩增和测序

从 Shaw 等 (2005) 报道的叶绿体 DNA 序列中选取 4 个基因间区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 对应的 4 对通用引物 (表 2)，由上海生工 (Sangon) 有限公司合成。50 μL 的 PCR 反应体系：DNA 模板 2 μL ，正向和反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 2.5 μL ，dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (TaKaRa, Japan) 5 μL ， $10\times$ Buffer 5 μL ，*Taq* DNA 聚合酶 ($5 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (TaKaRa, Japan) 0.6 μL ， ddH_2O 32.4 μL 。参照 Volk 等 (2015) 报道的反应条件，对 4 个叶绿体 DNA 基因间区的 PCR 扩增条件进行优化 (表 3)。49 份种质 4 个叶绿体 DNA 基因间区的 PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测，对于扩增成功并得到单一条带的样品直接送测序公司 [上海美吉测序公司 (北京)] 进行测序，测序仪为美国 ABI 3730 DNA Sequencer。每个样品在每个叶绿体 DNA 基因间区的扩增产物均进行正、反向测序，测定 2 次，获得 49 份材料的 4 个叶绿体 DNA 基因间区的完整序列。

表 2 楸子 4 个叶绿体 DNA 基因间区及 4 对叶绿体 DNA 引物序列基本信息
Table 2 Basic information of four cpDNA intergenic regions and four pairs of cpDNA primers in this study

| 编号 Code | cpDNA 间区 cpDNA intergenic region | 正向序列 (5' - 3') Forward sequence | 反向序列 (5' - 3') Reverse sequence | 扩增片段长度/ bp Amplified fragment length |
|------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| CP20 | <i>trnH-psbA</i> | CGCGCATGGTGGATTCAATCC | GTTATGCATGAACGTAATGCTC | ~ 400 |
| CP21 | <i>trnS-trnG</i> spacer + intron | AGATAGGGATTGGAACCTCGGT | GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC | ~ 1 500 |
| CP22 | <i>trnT-5'trnL</i> | CATTACAAATGCGATGCTCT | TCTACCGATTTCGCCATATC | ~ 1 200 |
| CP23 | <i>5'trnL-trnF</i> | ATTTGAACTGGTGACACGAG | CGAAATCGGTAGACGCTACG | ~ 1 000 |

表 3 楸子 4 个叶绿体 DNA 基因间区的 PCR 扩增条件
 Table 3 Amplified reaction of four cpDNA intergenic regions of *Malus prunifolia*

| 编号 Code | 扩增区域 Region | 预变性 Pre-denaturation | 循环 Cycle | | | 循环次数 Number of cycles | 最后延伸 Final extension |
|------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|
| | | | 变性 Denaturation | 退火 Annealing | 延伸 Extension | | |
| CP20 | <i>trnH-psbA</i> | 80 °C 5 min | 94 °C 30 s | 56 °C 30 s | 72 °C 1 min | 35 | 72 °C 10 min |
| CP21 | <i>trnS-trnG</i> spacer + intron | 80 °C 5 min | 96 °C 10 s | 50 °C 5 s | 60 °C 4 min | 30 | 60 °C 10 min |
| CP22 | <i>trnT-5'trnL</i> | 96 °C 5 min | 96 °C 1 min | 57 °C 2 min | 72 °C 2.5 min | 34 | 72 °C 10 min |
| CP23 | <i>5'trnL-trnF</i> | 80 °C 5 min | 96 °C 10 s | 50 °C 5 s | 60 °C 4 min | 30 | 60 °C 10 min |

1.4 数据统计与分析

对于每个基因间区正反向测序获得的序列进行人工校对, 并使用 MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) 软件进行序列拼接、序列比对以及 4 个叶绿体 DNA 基因间区片段 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 的合并。所有拼接序列、比对序列都被保存为 FASTA 和 MEGA 格式。构建楸子种质不同居群间基于遗传距离的 Neighbour-Joining 系统发育树, 并划分居群组合。

将单个区域片段和合并之后的片段保存后, 使用 DnaSP ver5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) 软件计算楸子种质叶绿体 DNA 的遗传多样性参数, 包括: 变异位点 (V_s)、单一突变位点 (S_s)、简约信息性位点 (P_s)、核苷酸多样性 (P_i)、平均核苷酸差异 (k)、单倍型数目 (h)、单倍型多样性 (H_d)、单倍型多样性方差 (V_h)、单倍型多样性标准差 (S_h) 和 Tajima's D 值 (Tajima's D); 计算种内不同居群间遗传分化系数, 包括: 基因流 (N_m)、群体固定系数 (F_{st})、基因差异分化系数 (G_{st}) 和核苷酸分化系数 (N_{st}), 评价种内不同居群间的基因交流。Tajima's D 是检验样品叶绿体 DNA 区域是否遵循中性进化模型的重要参数。

4 个叶绿体 DNA 区域合并片段的楸子种质的叶绿体基因单倍型保存为 Nexus 文件, 分别采用中介邻接网络 (Median-Joining network, MJ) 算法和最大简约 (Maximum Parsimony calculation, MP) 算法进行计算和优化, 运用 NetWork ver4.6.1.2 构建叶绿体 DNA 单倍型邻接网络关联图。

2 结果与分析

2.1 楸子叶绿体 DNA 的多态性

利用 4 对叶绿体通用引物对 49 份中国原产苹果属栽培种楸子的 4 个叶绿体 DNA 间隔间区进行扩增, *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 在 49 份楸子样本中的序列长度范围分别为 261 ~ 278、1 367 ~ 1 383、1 064 ~ 1 093 和 937 ~ 965 bp。将各区域对位排列后, 上述片段的长度分别为 285、1 383、1 157 和 965 bp (表 4)。长度为 1 157 bp 的非编码区 *trnT-5'trnL* 的核苷酸多态性最高, 包括 11 个简约信息性位点, 1 个单一突变位点, 108 个插入/缺失位点; 长度为 285 bp 的非编码区 *trnH-psbA* 有 2 个简约信息位点, 24 个插入/缺失位点; 长度为 1 383 bp 的非编码区 *trnS-trnG* spacer + intron 有 1 个单一突变位点, 5 个简约信息位点, 19 个插入/缺失位点; *5'trnL-trnF* 多态性最低, 仅有 2 个简约信息性位点。4 个叶绿体基因片段合并后, 序列长度范围为 3 676 ~ 3 693 bp, 对位排列后的长度为 3 790 bp, 共有多态性位点 173 个, 其中单一突变位点 2 个, 简约信息性位点 20 个, 插入/缺失位点 151 个 (表 4)。

49 份中国原产苹果属栽培种楸子的 4 个叶绿体间隔间区共有变异位点 173 个, *trnH-psbA*、

trnS-trnG spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 区域的变异位点分别为 26 个、25 个、120 个和 2 个，变异位点差别较大的区域集中在 *trnT-5'trnL* 区域上，说明它是椴子 cpDNA 片段中核苷酸多态性较高的区域。区域 *trnH-psbA* 核苷酸多样性 (P_i) 最高，为 0.0214；区域 *5'trnL-trnF* 的平均核苷酸差异 (k) 最大，为 25.95238；区域 *5'trnL-trnF* 的核苷酸多样性 (P_i) 和平均核苷酸差异 (k) 均为最小 (表 4)。

trnH-psbA、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 区域单倍型数 (h) 分别为 9 个、7 个、8 个和 3 个，以 *trnH-psbA* 区域单倍型 (基因) 多样性 (H_d) 最高，为 0.775；*5'trnL-trnF* 单倍型 (基因) 多样性 (H_d) 最低，为 0.481。*5'trnL-trnF* 的单倍型多样性方差 (V_h) 和单倍型多样性标准差 (S_h) 均为最高，分别为 0.00517 和 0.072；*trnS-trnG* spacer + intron 区域单倍型多样性方差和标准差均为最低，分别为 0.00205 和 0.045 (表 5)。

4 个区域合并之后的叶绿体基因片段，共有单倍型 14 个，各种质所属单倍型见表 1。核苷酸多样性 (P_i)、平均核苷酸差异 (k)、单倍型 (基因) 多样性 (H_d)、单倍型多样性方差 (V_h)、单倍型多样性标准差 (S_h) 分别为 0.00949、39.10884、0.854、0.00125、0.035 (表 4，表 5)。

表 4 椴子 49 份种质的 4 个 cpDNA 区域多态性信息

Table 4 The polymorphic information of four cpDNA regions of 49 accessions of *Malus prunifolia*

| cpDNA 区域 cpDNA region | 长度/ bp Length | 变异位点 Variable site (V_s) | 单一突变位点 Singleton variable site (S_s) | 简约信息位点 Parsimony informative site (P_s) | 插入/缺失位点 Insertion/deletion gaps (I_s) | 核苷酸多样性 Nucleotide diversity (P_i) | 平均核苷酸差异 Average number of nucleotide difference (k) |
|-------------------------------------|---------------------|------------------------------------|--|--|---|---|--|
| <i>trnH-psbA</i> | 285 | 26 | 0 | 2 | 24 | 0.02143 | 7.35204 |
| <i>trnS-trnG</i> spacer + intron | 1 383 | 25 | 1 | 5 | 19 | 0.00349 | 5.09184 |
| <i>trnT-5'trnL</i> | 1 157 | 120 | 1 | 11 | 108 | 0.01943 | 25.95238 |
| <i>5'trnL-trnF</i> | 965 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0.00072 | 0.712590 |
| 合并 Combined | 3 790 | 173 | 2 | 20 | 151 | 0.00949 | 39.10884 |

表 5 椴子 49 份种质的 4 个 cpDNA 区域的单倍型多样性

Table 5 The diversity of haplotypes in four cpDNA regions of 49 accessions of *Malus prunifolia*

| cpDNA 区域 cpDNA region | 单倍型数 Number of haplotypes (h) | 单倍型 (基因) 多样性 Haplotype (gene) diversity (H_d) | 单倍型多样性方差 Variance of haplotype diversity (V_h) | 单倍型多样性标准差 Standard deviation of haplotype diversity (S_h) |
|-------------------------------------|---|---|--|---|
| <i>trnH-psbA</i> | 9 | 0.775 | 0.00233 | 0.048 |
| <i>trnS-trnG</i> spacer + intron | 7 | 0.761 | 0.00205 | 0.045 |
| <i>trnT-5'trnL</i> | 8 | 0.625 | 0.00510 | 0.071 |
| <i>5'trnL-trnF</i> | 3 | 0.481 | 0.00517 | 0.072 |
| 合并 Combined | 14 | 0.854 | 0.00125 | 0.035 |

对 4 个区域进行 Tajima's D 测验，区域 *trnH-psbA* 和 *5'trnL-trnF* 的 Tajima's D 值为正值，区域 *trnS-trnG* spacer + intron 和 *trnT-5'trnL* 的为负值，区域 *trnS-trnG* spacer + intron 的最低，*5'trnL-trnF* 的最高。4 个区域的 D 值在 $P > 0.10$ 水平上不显著。合并后的片段，Tajima's D 值为 0.02876，在 $P > 0.10$ 水平上差异不显著 (表 6)。4 个区域和合并后的片段均遵循中性进化模型。

表 6 楸子 49 份种质的 4 个 cpDNA 区域的 Tajima's D 测验结果

Table 6 Results of Tajima's D test in four cpDNA regions of 49 accessions of *Malus prunifolia*

| cpDNA | Tajima's D | 显著性 Significance |
|----------------------------------|------------|------------------|
| <i>trnH-psbA</i> | 0.85881 | $P > 0.10$ |
| <i>trnS-trnG</i> spacer + intron | - 0.30129 | $P > 0.10$ |
| <i>trnT-5'trnL</i> | - 0.12786 | $P > 0.10$ |
| <i>5'trnL-trnF</i> | 1.05536 | $P > 0.10$ |
| 合并 Combined | 0.02876 | $P > 0.10$ |

2.2 楸子的遗传分化

将 49 份楸子按照 9 个来源省份分为 9 个群体 (表 1), 分析群体间的基因流和遗传分化。群体间 3 个遗传分化系数 ($F_{st} = 0.03752$, $N_m = 6.41$; $G_{st} = 0.09707$, $N_m = 2.33$; $N_{st} = 0.03729$, $N_m = 6.45$) 均不高, 3 个遗传分化系数体现出来的 9 个群体间的遗传变异分别为 3.752%、9.707%和 3.729%, 群体内的遗传变异分别为 96.248%、90.293%和 96.271%, 群体遗传变异主要存在于群体内部。

由于陕西、内蒙古楸子群体均只有 1 份材料, 所以只对其余 7 个楸子群体计算两两群体间的分化系数 (表 7)。甘肃和山西楸子群体间遗传分化系数最低, 为 - 0.1508, 辽宁和新疆楸子群体、黑龙江和新疆楸子群体、辽宁与黑龙江、山西、河北和吉林楸子群体、山西和甘肃、河北楸子群体、河北和吉林楸子群体的遗传分化系数均为负值, 甘肃和新疆楸子群体的遗传分化系数最高, 为 0.2709。楸子不同群体间遗传分化较少, 基因交流频繁, 与地理距离不完全相关。

表 7 楸子 7 个来源地区群体间遗传分化系数 (F_{st})

Table 7 The genetic differentiation coefficient (F_{st}) among the seven groups of *Malus prunifolia* from seven sources

| 群体 Population | MPXJ | MPLN | MPLHJ | MPGS | MPSX | MPHB |
|---------------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|
| MPLN | - 0.1239 | | | | | |
| MPLHJ | - 0.0843 | - 0.1337 | | | | |
| MPGS | 0.2709 | 0.0125 | 0.1877 | | | |
| MPSX | 0.1349 | - 0.0854 | 0.0878 | - 0.1508 | | |
| MPHB | 0.1383 | - 0.1258 | 0.0801 | 0.0422 | - 0.0127 | |
| MPJL | 0.2096 | - 0.1327 | 0.1283 | 0.0726 | 0.0259 | - 0.0363 |

2.3 楸子居群间的遗传关系

计算 9 个楸子群体间的遗传距离, 并用 Neighbour-Joining 法构建聚类树。根据聚类结果, 9 个楸子群体可以分为 4 个类群 (图 1), 类群 I 为陕西、山西和河北群体, 类群 II 为内蒙古和甘肃群体,

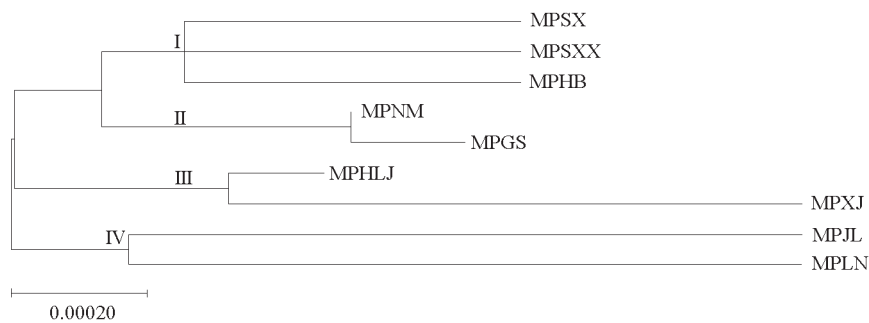


图 1 按来源省份划分的 9 个楸子群体间基于遗传距离一致性的 NJ 树

Fig. 1 Consensus Neighbor-Joining tree of nine populations of *Malus prunifolia* grouped by original provinces based on the genetic distance

类群III为黑龙江和新疆群体，类群IV为吉林和辽宁群体。除类群III的黑龙江和新疆群体外，其余 3 个类群与地理距离相关。

2.4 榭子叶绿体 DNA 单倍型的中介网络关系

利用中介邻接网络 (MJ) 算法计算，并用最大简约算法 (MP) 来优化由 MJ 计算过的结果，构建苹果属榭子的 4 个叶绿体 DNA 区域组合的单倍型关联图 (图 2)。单倍型和中介矢量位点分别用 H 和 mv 表示。网络图的躯干 (Tarso) 为 mv2、mv4、mv5、mv6，分化时间早，但是在本试验中均为缺失的单倍型。mv2 衍生中介位点 mv1，mv4 衍生单倍型 H₁₄，mv5 衍生单倍型 H₅ 和中介位点 mv3，mv6 衍生单倍型 H₃。H₃ 包含 4 份河北榭子、2 份吉林榭子和 1 份辽宁榭子，H₅ 包含 1 份甘肃榭子、1 份河北榭子和 1 份山西榭子，H₁₄ 为新疆的 1 份榭子 (表 1)。mv1 和 mv3 也是榭子叶绿体基因单倍型进化过程中缺失的单倍型。由 mv1 衍生单倍型 H₂ 和 H₁₀。H₂ 包含 16 份榭子材料，分别是甘肃的 1 份、河北的 6 份、吉林的 2 份、辽宁的 2 份、内蒙古的 1 份和山西的 4 份；H₁₀ 包含 2 份甘肃榭子。H₁₀ 衍生单倍型 H₁₁，为 1 份陕西榭子。单倍型 H₂ 衍生单倍型 H₁、H₄ 和 H₈；H₁ 为黑龙江 3 份和吉林 1 份榭子材料；H₄ 为河北 6 份榭子；H₈ 为河北 1 份榭子。mv3 衍生的单倍型 H₁₃ 和 H₉。H₁₃ 为新疆的 1 份榭子，H₉ 为山西的 1 份榭子。H₉ 衍生单倍型 H₇，H₇ 衍生单倍型 H₆。H₇ 包含 1 份河北、2 份黑龙江和 1 份辽宁榭子，H₆ 仅为 1 份河北榭子。

H₄、H₈、H₆ 为河北榭子独占的单倍型，H₁₃ 为新疆榭子独占的单倍型，H₉ 为山西榭子独占的单倍型，H₁₁ 为陕西榭子独占的单倍型。由单一来源的种质独占的 6 个单倍型均位于单倍型网络图的外围。

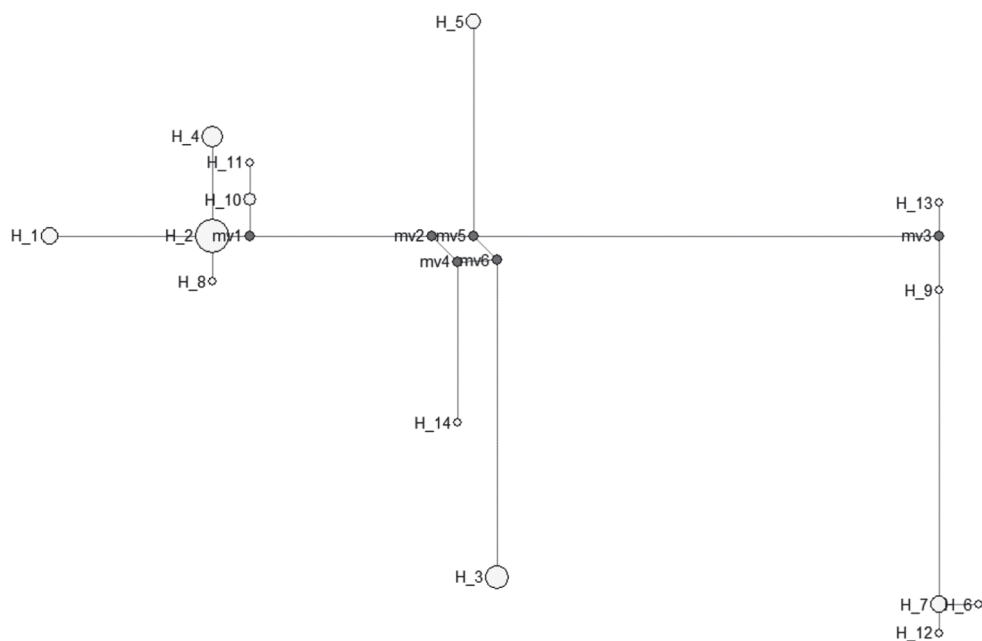


图 2 榭子 4 个 cpDNA 区域组合的单倍型邻接网络图

Fig. 2 Haplotype joining networks of four chloroplast DNA regions combined of *Malus prunifolia*

3 讨论

中国原产苹果属植物楸子叶绿体 DNA 的多样性研究涉及到的区域有 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF*, 核苷酸多样性和单倍型多样性最高的区域均为 *trnH-psbA*, 不同于梨属植物 cpDNA 多样性最高的区域为 *accD-psaI* 和 *trnL-trnF* (Kimura et al., 2003)。同一科不同属以及同一属不同种之间叶绿体 DNA 的多样性具有一定的差异, 并且单倍型多样性高低的区域也具有一定差异。

在楸子中, 核苷酸序列的变异同样以位点插入和缺失为主, 4 个叶绿体 DNA 区域合并之后, 有 151 个插入/缺失位点, 其中只有 2 个单一突变位点和 20 个简约信息位点, 而插入/缺失位点的数量是单一突变和简约信息位点总数的 6 倍以上。楸子 4 个叶绿体 DNA 合并区域的遗传多样性 ($H_d = 0.854$, $P_i = 0.00949$) 高于相同区域的新疆野苹果 (高源等, 2019a) 叶绿体 DNA 的遗传多样性 ($H_d = 0.806$, $P_i = 0.00291$)。Tajima's D 检验中, 4 个区域在 $P > 0.10$ 水平上差异不显著, 合并之后的叶绿体 DNA 片段在 $P > 0.10$ 水平上差异不显著, 说明楸子的 4 个叶绿体 DNA 区域在进化上同样遵循中性进化。

按照楸子的来源地划分群体, 楸子的遗传变异主要来自于群体的内部, 群体间的遗传变异仅占 3.75%, 楸子不同居群间存在基因交流但同时又抵制了由于随机漂变而产生的遗传分化, 这与基于 SSR 分子标记研究结果一致 (高源等, 2019b)。除去仅有 1 份材料的陕西和内蒙古楸子居群, 其他居群两两间的遗传分化系数仅为 $-0.1508 \sim 0.2709$, 其中有 9 个居群组合间的遗传分化系数为负数, 说明楸子不同居群间的基因交流频繁。按照 Wright (1978) 对 F_{st} 的划分值, 多数楸子群体间遗传分化较少, 与地理距离关系不大。这与利用 SSR 的方法研究结论 (高源等, 2019b) 相同。新疆楸子和甘肃楸子间的遗传分化系数最高 (0.2709), 为高度的遗传分化。比较值得注意的是, 计算群体间的遗传距离, 黑龙江楸子和新疆楸子遗传距离较近, 并聚到一起。除此之外的楸子居群间的遗传距离均与地理距离相关。这种地理距离较大的群体被划分到同一居群组合的原因可能是因为楸子在中国栽培历史久远, 在西洋苹果引入中国之前楸子也是多个地区栽培种之一, 人为引入可以作为一种解释。

在楸子 4 个叶绿体 DNA 区域组合的单倍型中介邻接网络图中, 位于中心位置的躯干均为缺失单倍型, 最原始的叶绿体单倍型有可能还未收集到, 也有可能随着历史的发展已经流失。H_2 为中心躯干衍生出的单倍型, 包含了 6 个来源地区的楸子, 是最接近于中心而又未缺失的单倍型, 其为相对古老的单倍型。以 H_2 为中心形成小的星状辐射, 向外围形成 3 个单倍型, 其中有 2 个单倍型为河北楸子独享单倍型, 另外 1 个单倍型为黑龙江和吉林楸子共享单倍型, 河北大部分楸子的产生相对较晚。大部分河北、黑龙江、吉林和陕西的楸子多由种群扩张而来, 少部分的河北、黑龙江、吉林和辽宁楸子以及新疆楸子和山西楸子由原始单倍型直接进化而来。对于缺失的单倍型, 应该加大资源收集的力度, 尤其是新疆和山西地区, 直接由中心躯干衍生而来的单倍型是对楸子进一步考察收集的重点。

References

- Baraket G, Olfa S, Khaled C, Messaoud M, Mohamed M, Mokhtar T, Amel S. 2009. Chloroplast DNA analysis in Tunisian fig cultivars (*Ficus carica* L.): sequence variations of the *trnL-trnF* intergenic spacer. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36 (11): 828 - 835.
- Coart E, Glabeke S, Loose M D, 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.
- Ding Fang-bing. 2012. Sequence analysis of *matK* and ITS between *Malus hupehensis* and its relative species [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 丁芳兵. 2012. 湖北海棠 (*Malus hupehensis*) 及近缘种的 *matK* 和 ITS 序列分析 [博士学位论文]. 南京: 南京林业大学.
- Fu Ming-yang. 2013. Drought and salinity tolerance evaluation and characterization of genetic difference among different biotypes of *Malus prunifolia* [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 傅明洋. 2013. 楸子不同类型抗旱耐盐性评价及遗传差异分析 [博士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Gao Fan, Liang Dong, Xia Hui, Tang Yue-ming, Xu Ying-huan, Hou Shuai. 2016. Analysis of cloning and expression of dehydrin gene in *Malus prunifolia*. *Genomics and Applied Biology*, 35 (2): 436 - 441. (in Chinese)
- 高帆, 梁东, 夏惠, 唐月明, 徐颖欢, 侯帅. 2016. 楸子脱水素基因的克隆及表达分析. *基因组学与应用生物学*, 35 (2): 436 - 441.
- Gao Yuan, Wang Da-jiang, Wang Kun, Cong Pei-hua, Zhang Caixia, Li Lian-wen, Piao Ji-cheng. 2019a. Chloroplast DNA variation and genetic evolution of *Malus sieversii* M. Roem. *Journal of Plant Genetic Resources*, Doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.20190719002. (in Chinese)
- 高源, 王大江, 王昆, 丛佩华, 张彩霞, 李连文, 朴继成. 2019a. 新疆野苹果叶绿体 DNA 变异与遗传进化分析. *植物遗传资源学报*, Doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.20190719002.
- Gao Yuan, Wang Kun, Wang Da-jiang, Zhang Cai-xia, Cong Pei-hua, Liu Li-jun, Li Lian-wen, Piao Ji-cheng. 2019b. The genetic diversity and population structure analysis of cultivated species *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. of *Malus* Mill. *Journal of Plant Genetics Resources*, 20 (1): 68 - 78. (in Chinese)
- 高源, 王昆, 王大江, 张彩霞, 丛佩华, 刘立军, 李连文, 朴继成. 2019b. 苹果属栽培种楸子的遗传多样性与遗传结构分析. *植物遗传资源学报*, 20 (1): 68 - 78.
- Ghada B, Ahmed B A, Khaled C, Olfa S, Messaoud M, Mokhtar T, Amel S. 2010. Molecular evolution of chloroplast DNA in fig (*Ficus carica* L.): footprints of sweep selection and recent expansion. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38 (4): 563 - 575.
- Huang L L, Li M J, Zhou K, Sun T T, Hu L Y, Li C Y, Ma F W. 2018. Uptake and metabolism of ammonium and nitrate in response to drought stress in *Malus prunifolia*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127: 185 - 193.
- Kimura T, Iketani H, Kotobuki K, Matsuta N, Ban Y, Yamamoto T H. 2003. Genetic characterization of pear varieties revealed by chloroplast DNA sequences. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 7: 241 - 247.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology Evolution*, 33 (7): 1870 - 1874.
- Li Hai-yan, Geng Da-li, Niu Chun-dong, Li Cui-ying, Guan Qing-mei. 2018. Drought resistance of root system of apple rootstocks *Malus prunifolia* and G935. *Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed)*, 46 (5): 1 - 7. (in Chinese)
- 李海燕, 耿达立, 牛春东, 李翠英, 管清美. 2018. 苹果砧木富平楸子和 G935 根系抗旱性评估. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 46 (5): 1 - 7.
- Li Hui-feng. 2012. Studies on the taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) of Taiyi-Mountains [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 李慧峰. 2012. 泰沂山区苹果属植物系统学研究 [博士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Li Yu-nong. 2001. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. Beijing: China Agricultural 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.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451 - 1452.
- Ni Liang-hong, Zhao Zhi-li, Mi Ma. 2015. Advances in research on chloroplast genome of medicinal plants. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 38 (9): 1990 - 1994. (in Chinese)
- 倪梁红, 赵志礼, 米玛. 2015. 药用植物叶绿体基因组研究进展. *中药材*, 38 (9): 1990 - 1994.
- Nikiforova S V, Cavalieri D, Velasco R, Goremykin V. 2013. Phylogenetic analysis of 47 chloroplast genomes clarifies the contribution of wild

- species to the domesticated apple maternal line. *Molecular Biology Evolution*, 30 (8): 1751 - 1760.
- Potter D, Luby J J, Harrison R E. 2009. Phylogenetic relationships among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, 25 (2): 337 - 348.
- Qian Guan-ze. 2005. The taxonomic study of the genus *Malus* Mill. [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 钱关泽. 2005. 苹果属 (*Malus* Mill.) 分类学研究 [博士学位论文]. 南京: 南京林业大学.
- Qin Yuan. 2014. Researches on cloning, expression analysis and transformation of *MPSNRK 2.4* gene [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 秦源. 2014. 楸子 *SnRK2.4* 基因的克隆、表达和转化研究 [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Robinson J, Harris S A, Juniper B E. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Syst Evol*, 226: 35 - 58.
- Saito N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406 - 425.
- Savolainen V, Corbaz R, Moncousin C, Spichipier R, Manen J F. 1995. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples. *Theor Appl Genet*, 90: 1138 - 1141.
- Shaw J, Lickey E B, Beck J T, Farmer S B, Liu W S, Miller J, Sipipun K C, Winder C T, Schilling E E, Small R L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast and sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92 (1): 142 - 166.
- Tan Y X, Li M J, Yang Y L, Sun X, Wang N, Liang B W, Ma F W. 2017. Overexpression of *MpCYS4*, aphycystatin gene from *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. enhances stomatal closure to confer drought tolerance in transgenic arabidopsis and apple. *Frontiers in Plant Science*, 8: 33.
- Volk G M, Henk A D, Baldo A, Fazio G, Chao C T, Richards C M. 2015. Chloroplast heterogeneity and historical admixture within the genus *Malus*. *American Journal of Botany*, 102 (7): 1198 - 1208.
- Wang Shun-cai. 2011. Studies on response mechanism and resistance-related genes expression analysis of two apple rootstocks to drought stress [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 王顺才. 2011. 两种苹果砧木对干旱的响应机理及抗性基因表达分析研究 [博士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wang Shun-cai, Liang Dong, Shi Shou-guo, Ma Feng-wang, Shu Huai-rui. 2011. Cloning and expression analysis of two novel drought-tolerance genes coding glycine-rich RNA-binding proteins in *Malus* plants. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 29 (5): 75 - 81. (in Chinese)
- 王顺才, 梁东, 师守国, 马锋旺, 束怀瑞. 2011. 苹果中新抗旱相关基因 GR-RBPs 的克隆与表达分析. *干旱地区农业研究*, 29 (5): 75 - 81.
- Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Xu Rong-xue. 2018. Taxonomic status and phylogenetic relationships of some *Malus* plants based on molecular marker technology [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 徐榕雪. 2018. 基于分子标记技术的部分苹果属植物分类地位及亲缘关系研究 [博士学位论文]. 南京: 南京林业大学.
- 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.
- Zhang Yun-jie, Li De-zhu. 2011. Advances in phylogenomics based on complete chloroplast genomes. *Plant Diversity and Resources*, 33 (4): 365 - 375. (in Chinese)
- 张韵洁, 李德铤. 2011. 叶绿体系统发育基因组学的研究进展. *植物分类与资源学报*, 33 (4): 365 - 375.
- Zhu Yuan-di, Cao Min-ge, Xu Zheng, Wang Kun, Zhang Wen. 2014. Phylogenetic relationship between Xinjiang wild apple (*Malus sieversii* Roem.) and Chinese apple (*Malus × domestica* subsp. *chinesensis*) based on ITS and *matK* sequences. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (2): 227 - 239. (in Chinese)
- 朱元娣, 曹敏格, 许正, 王昆, 张文. 2014. 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. *园艺学报*, 41 (2): 227 - 239.