

基于叶绿体片段序列的苹果属植物遗传多样性

高源, 王大江, 王 昆, 李连文, 朴继成

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

摘要:从叶绿体基因水平上研究中国原产苹果属植物的遗传多样性以及不同种在不同区域范围的单倍型的系统进化关系,为其起源演化、保护和利用提供依据。基于叶绿体基因间区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF*,对来源于12个省区的722份苹果属植物种质进行序列分析,4个区域合并之后片段长度为4 120 bp,共有579个多态性变异位点和100个单倍型,核苷酸多样性(Pi)和单倍型多样性(Hd)分别为0.009 52和0.879,两者最高的区域为 *trnH-psbA* (Hd=0.808, Pi=0.034 09)。Tajima's D 检验中,4个cpDNA区域合并后的Tajima's D 值为-1.503 16,在 $P > 0.10$ 检测水平上不显著,遵循中性模型。AMOVA 分析表明,遗传变异主要存在于种群间和种内居群内。单倍型分布及网络结构分析结果表明,邻接网络中心位置的缺失单倍型闭合成环,苹果属不同种具有不同的演化路线,各个种间以及同种种质在不同地域起源演化过程中具有错综复杂的关系,相对古老的单倍型 H₆ 和 H₁₅ 经历种群扩张,衍生支系较多。苹果属植物叶绿体基因的遗传多样性水平较高,其遗传变异主要发生在种群间和各种居群内,其遗传进化以种群内突变或者随机漂变为主,种内差异和地理隔离造成的各种居群内差异是苹果属植物遗传变异的主要因素。

关键词: 苹果属; 叶绿体基因; 居群; 遗传多样性; 遗传变异

中图分类号: S661.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2020)06-0042-10

doi: 10.7668/hbxb.20191224



Genetic Diversity of *Malus* Mill. Based on the Sequences of Chloroplast Fragments

GAO Yuan, WANG Dajiang, WANG Kun, LI Lianwen, PIAO Jicheng

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Horticultural Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Xingcheng 125100, China)

Abstract: This study aims to explore the genetic diversity of *Malus* at the level of chloroplast gene and the phylogenetic relationship of haplotypes of different species in different regions, so as to provide a basis for its origin and evolution process, protection and utilization. Based on chloroplast intergenic regions *trnH-psbA*, *trnS-trnG* spacer + intron, *trnT-5'trnL* and *5'trnL-trnF*, the sequences of 722 accessions of *Malus* from twelve provinces were analyzed. After four regions merged, the length of four merge regions of chloroplast DNA was 4 120 bp, and the haplotypes of chloroplast DNA fragments were 100, the nucleotide diversity and haplotype diversity of the merged regions were 0.009 52 and 0.879 respectively. The region with highest nucleotide diversity and haplotype diversity was *trnH-psbA* (Hd = 0.808, Pi = 0.034 09). Tajima's test showed that the value of four regions merged was -1.503 16, and it was not significant at the $P > 0.10$ level and followed the neutral theory of molecular evolution. AMOVA showed that genetic variation mainly existed among populations and within intraspecific populations. The results of haplotype distribution and network analysis showed that the missing haplotypes in the center of adjacent networks are closed into a ring, and different species of *Malus* have different evolutionary routes. There were complex relationships among species and germplasm of same species in the process of origin and evolution in different regions.

收稿日期: 2020-08-27

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2018-RIP-02); 农作物种质资源保护(NB2015-2130135-39)

作者简介: 高源(1983-), 女, 山东沂源人, 副研究员, 博士, 主要从事果树种质资源研究。

通讯作者: 王 昆(1971-), 男, 辽宁兴城人, 研究员, 硕士, 主要从事果树种质资源研究。

Relatively old haplotypes H_6 and H_15 experienced population expansion, and there were many derived branches. The genetic diversity of *Malus* at chloroplast gene level was high, and the genetic variation mainly occurs among populations and within intraspecific populations. The genetic evolution of chloroplast genes was dominated by mutation or random drift within populations. The main factors of genetic variation of *Malus* were intraspecific differences and intrapopulation differences caused by geographical isolation.

Key words: *Malus* Mill. ; Chloroplast DNA ; Population ; Genetic diversity ; Genetic variation

遗传多样性研究是揭示物种的进化历史^[1]、分析其进化潜力和未未来命运^[2]、探讨物种稀有或濒危原因^[3]的重要工具。从分子水平上研究植物的遗传多样性水平、遗传结构及其形成机制有利于揭示物种应对环境变化的进化潜力,对其遗传多样性的保护及保护计划的制定都具有非常重要的意义^[4-6]。

苹果属 (*Malus* Mill.), 属蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae)。中国是世界苹果属植物最大的基因中心和遗传多样性中心,拥有丰富的原始种和类型。其中有自然分布区并订有学名未经整理的野生种有 21 种,有栽培分布区的栽培种和杂交种共 6 种,至今许多地方仍有苹果野生群落分布,如新疆野苹果等^[7-8]。目前,普遍认为我国苹果属植物野生种有两大密集分布地区,即以新疆野苹果为主的新疆密集分布区和主要包括四川、云南西部、贵州及西藏东南部地区的横断山脉分布区^[9]。除此之外,苹果属植物野生种在我国 17 个省或自治区均有分布^[10],其中以山荆子分布最广,在各个调查分布区几乎都可以找到,其次为变叶海棠、湖北海棠和三叶海棠。

蔷薇科叶绿体基因组高度保守,非编码区进化速度较快,变异主要以点突变和插入/缺失为主^[11],适用于科和属的系统研究^[12],在植物遗传多样性亲缘演化关系和系统发育等方面发挥着重要作用^[13]。国外学者较早地开展苹果属植物一至两个叶绿体 DNA (cpDNA) 区域的变异研究^[14],国内利用叶绿体基因 *matk* 对苹果属植物的研究得出叶绿体基因 *matk* 并不适用于栽培苹果种内的系统发育分析以及近缘种间及种下类群材料的遗传关系分析的结论^[15-16];仅仅利用一个叶绿体基因区域 *trnL-trnF* 也难以解析具有复杂遗传背景的泰沂山区苹果属植物的系统发育关系^[17]。利用叶绿体基因进行果树种质资源系统发育研究已经由基因间隔区发展到具有多态性的多个基因间隔区组合分析的阶段^[18]。新的苹果参考基因组的发布^[19-20]并未获得完整的叶绿体基因组,要利用叶绿体 DNA 对具有复杂遗传背景的苹果属植物的遗传变异分析,仍然需要用大

群体、进化速率快的多个区域方可实现。因此,本研究在对我国苹果属植物种质资源进行考察收集和保存的基础上,利用叶绿体基因序列 (*trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF*) 研究其遗传多样性水平,解析不同种群内和种内居群的遗传结构和遗传分化,探讨不同种在不同区域范围内单倍型的系统进化关系,推测苹果属植物不同种的起源演化进程。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试 722 份苹果属植物种质来自于 12 个省和地区,分属于苹果属的 15 个种 (表 1)。所有种质为近 10 a 间野外考察新收集材料,通过野外表型鉴定外相应的苹果属各种后,入国家苹果资源圃繁殖保存。因此,供试材料中有 669 份取自辽宁兴城国家果树种质兴城梨、苹果圃,48 份取自吉林省公主岭国家果树种质公主岭寒地果树圃,5 份取自云南省昆明国家果树种质云南特有果树及砧木圃。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

供试材料春季嫩叶的基因组 DNA,采用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取。利用紫外分光光度计和 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 原液的浓度和纯度,经检验合格后稀释至 40 ng/μL 备用。

筛选 26 个叶绿体 DNA 基因间区的 36 对通用引物,经过扩增和预测序检测,挑选扩增稳定、序列无回文结构、poly 结构较少、双向测序可以测通的区域,最终确定 Shaw 等^[21]报道的叶绿体 DNA 序列中的 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),交由上海生工 (Sangon) 有限公司合成。4 对通用引物 PCR 反应体系参照高源等^[22]优化的反应体系,PCR 扩增条件参照 Volk 等^[23]报道的反应条件进行优化,具体反应程序如下:

CP20: 80 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存待用。

CP21 与 CP23 相同: 80 °C 5 min; 96 °C 10 s,

50 °C 退火 5 s, 60 °C 4 min, 30 个循环; 60 °C 10 min, 4 °C 保存待用。

CP22: 96 °C 5 min; 96 °C 1 min, 57 °C 退火 2 min, 72 °C 2.5 min, 34 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C

保存待用。

用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 扩增得到单一条带的 PCR 产物直接进行正、反向测序, 所有材料的 4 个叶绿体 DNA 基因间区测通。

表 1 苹果属植物的 722 份种质资源

Tab. 1 722 germplasm resources of *Malus* Mill.

序号 Code	种名 Species	来源地 Origin	数量 Number	序号 Code	种名 Species	来源地 Origin	数量 Number
1	新疆野苹果	新疆	242	11	中国苹果	吉林	23
2	山荆子	甘肃	4			内蒙古	1
		河北	54			山东	1
		黑龙江	83			山西	5
		吉林	18			新疆	7
		辽宁	1	12	花红	甘肃	1
		内蒙古	42			河北	40
		山西	13			黑龙江	6
3	湖北海棠	河北	1			云南	1
		云南	1	13	楸子	甘肃	4
4	垂丝海棠	甘肃	11			河北	20
5	陇东海棠	甘肃	1			黑龙江	5
6	山楂海棠	吉林	1			吉林	5
7	花叶海棠	四川	9			辽宁	4
8	变叶海棠	四川	17			内蒙古	1
		云南	1			山西	6
9	滇池海棠	云南	1			陕西	1
10	沧江海棠	云南	1			新疆	3
11	中国苹果	甘肃	4	14	八棱海棠	河北	52
		河北	24			吉林	1
		黑龙江	2	15	西府海棠	河北	4

表 2 4 个叶绿体 DNA 基因间区及 4 对通用引物序列基本信息

Tab. 2 Basic information of the four cpDNA intergenic regions and four pairs of cpDNA primers in this study

编号 Code	cpDNA 间区 cpDNA intergenic region	F 序列(5' - 3') Forward sequence(5' - 3')	R 序列(5' - 3') Reverse sequence(5' - 3')	扩增片段长度/bp Amplified fragment length
CP20	<i>trnH-psbA</i>	CGCGCATGGTGGATTACACAATCC	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	200 ~ 400
CP21	<i>trnS-trnG</i> spacer + intron	AGATAGGGATTTCGAACCCTCGGT	GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC	1 300 ~ 1 500
CP22	<i>trnT-5'trnL</i>	CATTACAAATGCGATGCTCT	TCTACCGATTTCGCCATATC	1 000 ~ 1 200
CP23	<i>5'trnL-trnF</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	CGAAATCGGTAGACGCTACG	800 ~ 1 000

1.3 数据统计与分析

人工校对 722 份材料的 4 个叶绿体 DNA 基因间区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 的正反向测序的序列, 使用 MEGA 7.0^[24] 软件拼接、比对和合并, 使用 DnaSP ver5. 10. 01^[25] 软件计算供试种质在叶绿体 DNA 水平的遗传多样性参数以及单倍型, 经过中介邻接网络 (MJ, Median-Joining network) 算法和最大简约 (MP, Maximum Parsimony) 算法计算和优化后, 运用 NetWork ver4. 6. 1. 2 构建叶绿体 DNA 单倍型邻接网络图, 通过 Arlequin v3. 5^[26] 软件对标准分子变异分析 (Analysis of mo-

lecular variation, AMOVA) 评价种群间和种群内的遗传分化。具体参照高源等^[22] 的分析方法。

2 结果与分析

2.1 苹果属植物叶绿体 DNA 变异

4 对叶绿体通用引物对 722 份中国原产苹果属植物种质的 4 个叶绿体 DNA 基因间区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer + intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 进行扩增, 获得序列长度分别为 343, 1 457, 1 336, 984 bp, 合并后的序列长度为 4 120 bp。722 份材料的 4 个叶绿体 DNA 基因间区共有 579 个变异位点 (Vs),

其中 15 个为单一突变位点(Ss)、36 个为简约信息位点(Ps)和 528 个为插入-缺失位点(Is)。其单倍型数目(h)分别为 48, 24, 24, 10 个, 单倍型(基因)多样性(Hd)最高的区域是 *trnH-psbA*, 最低的区域是 *5'trnL-trnF*, 分别为 0.808 和 0.577。核苷酸多样性(Pi)最大和最小的区域分别为 *trnH-psbA* (Pi =

0.034 09)和 *5'trnL-trnF* (Pi = 0.000 78)。722 份苹果属植物种质的 4 个 cpDNA 区域组合后的片段, 共有 100 个单倍型, 核苷酸多样性(Pi)、平均核苷酸差异(K)、单倍型多样性(Hd)、单倍型多样性方差(Vh)和标准差(Sh)分别为 0.009 52, 39.021 33, 0.879, 0.000 06, 0.008 (表 3)。

表 3 722 份苹果属植物的 4 个叶绿体 DNA 基因间区的多态性

Tab. 3 The polymorphism of four cpDNA intergenic regions of 722 accessions of *Malus* Mill.

cpDNA 区域 cpDNA regions	核苷酸多样性 Pi	平均核苷酸差异 K	单倍型多样性 Hd	单倍型多样性方差 Vh	单倍型多样性标准差 Sh
<i>trnH-psbA</i>	0.034 09	11.693 39	0.808	0.000 10	0.010
<i>trnS-trnG</i> spacer + intron	0.003 37	4.832 00	0.768	0.000 09	0.009
<i>trnT-5'trnL</i>	0.016 26	21.726 73	0.708	0.000 12	0.011
<i>5'trnL-trnF</i>	0.000 78	0.769 20	0.577	0.000 07	0.009
合并 Combined	0.009 52	39.021 33	0.879	0.000 06	0.008

注: Pi. 核苷酸多样性; K. 平均核苷酸差异; Hd. 单倍型多样性; Vh. 单倍型多样性方差; Sh. 单倍型多样性标准差。

Note: Pi. Nucleotide diversity; K. Average number of nucleotide difference; Hd. Haplotype diversity; Vh. Variance of haplotype diversity; Sh. Standard deviation of haplotype diversity.

2.2 苹果属植物的遗传分化

供试的 722 份苹果属植物分属于 15 个种, 将每个种作为一个种群, 每个种群按照来源区域分成不同居群。722 份苹果属植物种质可以为 15 个种群、44 个居群, 种群和居群标准分子变异分析(AMOVA)

结果表明, 种群间的遗传变异占 41.93%, 种内不同居群间的遗传变异占 6.11%, 而种内各居群内的遗传变异占 51.96% (表 4)。所有可遗传变异的相关性均极显著 ($P < 0.001$)。

表 4 苹果属 15 个种和种内居群的分子变异

Tab. 4 Molecular variance analysis for 15 species and groups of species divided by origins of *Malus* Mill.

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of square	变异组分 Variance components	变异百分比/% Percentage of variation	概率值 P
种群间 Among groups	14	5 784.038	9.462 85	41.93	<0.001
种内居群间 Among populations within groups	29	920.464	1.378 28	6.11	<0.001
居群内 Within populations	676	7 926.371	11.725 40	51.96	
总体 Total	719	14 630.874	12.183 60	100.00	<0.001

2.3 苹果属植物种群历史变化动态分析

对 722 份苹果属植物种质的 4 个叶绿体 DNA 基因间区进行 Tajima's 测验 (表 5), Tajima's D 值全部为负值, 最低值和最高值的区域分别 *5'trnL-trnF* 和 *trnH-psbA*, 值分别为 -2.334 90 和 -0.226 34。区域 *trnS-trnG* spacer + intron 和 *5'trnL-trnF* 的 D 值分别在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的水平上显著, 区域 *trnH-*

psbA 和 *trnT-5'trnL* 分别在 $P > 0.10$ 和 $0.10 > P > 0.05$ 水平上不显著。4 个区域组合后, Tajima's D 值为 -1.503 16, 在 $P > 0.10$ 水平上不显著。

2.4 苹果属植物单倍型分布

4 个区域合并之后的叶绿体基因片段共有单倍型 100 个。新疆野苹果的单倍型最多, 242 份新疆野苹果种质有 52 个单倍型, 其中有 72 份种质集中在单倍型 H_15, 有 76 份种质集中在单倍型 H_42, 其余新疆野苹果分散在其余的 50 个单倍型中。山荆子有 24 个单倍型, 其中有 105 份山荆子集中在单倍型 H_6 中, 有 10 份种质落在单倍型 H_10 中, 还有 13 份种质在单倍型 H_18 中。变叶海棠主要集中在单倍型 H_4 中, 花叶海棠也主要集中在 H_4 中, 垂丝海棠主要集中在 H_6 和 H_24, 湖北海棠的 2 份种质中有 1 份独享单倍型 H_3, 另 1 份属单倍型 H_31。中国苹果主要集中在单倍型 H_6、H_10 和 H_15, 花红以 H_6 中最多, 其余分散在 12 个单

表 5 722 份苹果属植物 4 个叶绿体 DNA 基因间区的 Tajima's 测验

Tab. 5 The Tajima's test in four cpDNA intergenic regions of 722 accessions of *Malus* Mill.

cpDNA 区域 cpDNA regions	Tajima's D 值 Tajima's D	显著性 Significance
<i>trnH-psbA</i>	-0.226 34	$P > 0.10$
<i>trnS-trnG</i> spacer + intron	-1.937 09	$P < 0.05$
<i>trnT-5'trnL</i>	-1.527 37	$0.10 > P > 0.05$
<i>5'trnL-trnF</i>	-2.334 90	$P < 0.01$
合并 Combined	-1.503 16	$P > 0.10$

倍型中;楸子以 H_6 中最多,其余种质分散在 13 个单倍型中;八棱海棠共有 8 个单倍型,以 H_6 中种质最多;西府海棠 4 份种质分成了 3 个单倍型。陇东海棠、滇池海棠、沧江海棠和山楂海棠均分别独享一个单倍型。

分别运用中介邻接网络(MJ)算法和最大简约算法(MP)来计算和优化 722 份苹果属植物种质的 4 个叶绿体 DNA 基因间区组合的单倍型关联关系,构建单倍型关联图(图 1)。H 和 mv 分别表示单倍型和中介矢量位点,主干由 23 个中介矢量位点和 20 个单倍型组成,23 个中介矢量位点仍然为缺失单倍型。位于网络图中心区域的单倍型为 mv8、mv9、

mv16、mv17 和 mv18,均为缺失单倍型,其向 3 个方向扩散,其一是由 mv17 向外扩散至 H_6,并形成由 H_6、H_43、H_45 和 mv11 组成的闭合环;其二是由 mv8 逐步经过单倍型 H_21、H_89、mv6,并形成由 mv1、mv4、mv6 和 H_87 组成的闭合环;其三是由 mv16 分化为 mv18 和 H_70, mv18 和 H_70 的亲缘关系较远, mv18 形成 2 个分支, H_70 也有 2 个分支,并在其中一个分支的末端具有星状辐射。由此,由中心区域不断衍生形成有 4 个主要支系,第一支系是以单倍型 H_6 为代表,第二支系以 H_15 为代表,第三支系主要由 H_3、H_4、H_29、H_31、H_41 和 H_51 组成,第四支系以 H_10 为代表。

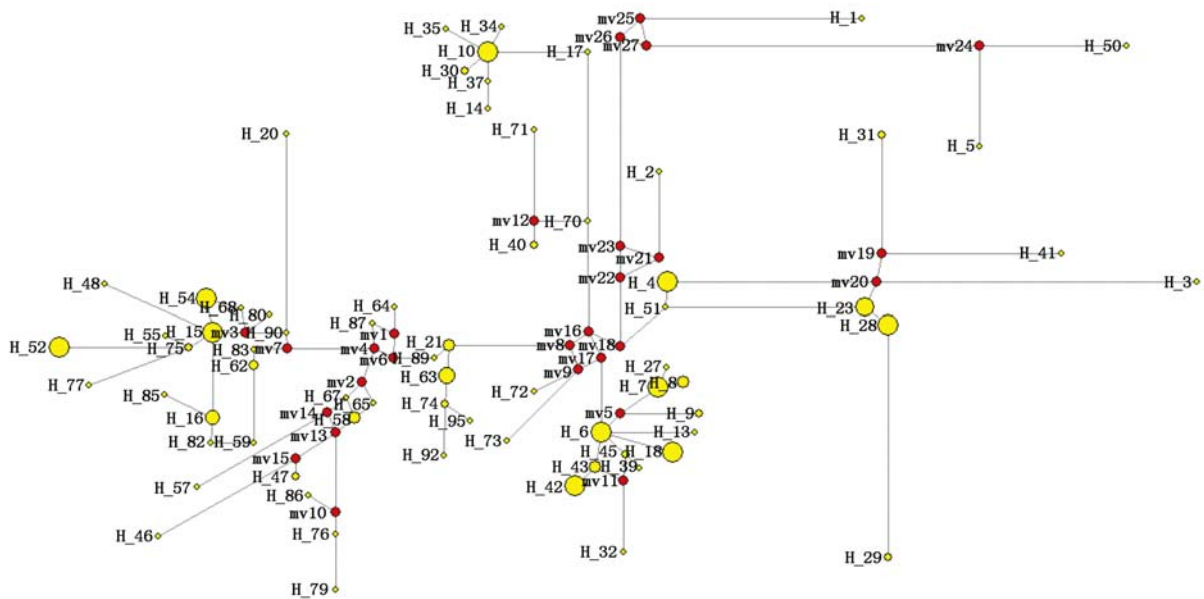


图 1 苹果属 15 个种的 4 个 cpDNA 区域组合的单倍型网络图

Fig. 1 Haplotype networks for cpDNA haplotypes of 15 species of *Malus* Mill. based on four combined chloroplast DNA fragments

2.4.1 第一支系单倍型分布 网络图中 H_6 代表一个单倍型组合,包含单倍型 H_6、H_11、H_12、H_19、H_26、H_33、H_36、H_38、H_44。单倍型 H_6 包含 30 份八棱海棠、4 份垂丝海棠、13 份花红、16 份楸子、105 份山荆子(河北 24 份、黑龙江 45 份、吉林 12 份、辽宁 1 份、内蒙古 14 份、山西 9 份)、1 份西府海棠、1 份新疆野苹果和 19 份中国苹果, H_11 包含 3 份花红和 3 份山荆子, H_12 包含 1 份八棱海棠和 2 份山荆子, H_19 包含 1 份山荆子, H_26 包含 2 份山荆子, H_33 包含 2 份花红和 1 份山荆子, H_36 包含 1 份花红, H_38 包含 1 份八棱海棠, H_44 包含 1 份八棱海棠。H_6 单倍型组合共包含了 114 份山荆子、33 份八棱海棠、19 份中国苹果、19 份花红、16 份楸子、4 份垂丝海棠、1 份新疆野苹果和 1 份西府海棠。以 H_6 为中心形成星状辐射,向 5 个分支扩散,第一分支为经由 mv5 形成 H_9 和 H_7 单倍型,

H_7 进一步衍生为 H_8 和 H_27;第二分支为 H_13,第三分支为 H_18,第四分支和第五分支分别为 H_43 和 H_45,与 H_6 和 mv11 形成闭合环, mv11 向外围衍生为 H_32, H_43 向外围衍生为 H_24。H_7 包括 4 份楸子(吉林 1 份、黑龙江 3 份)、33 份山荆子(黑龙江 17 份、吉林 1 份、内蒙古 15 份)和 1 份中国苹果(吉林), H_27 包括 1 份内蒙古山荆子, H_8 包括 4 份山荆子(黑龙江 3 份和内蒙古 1 份)。H_9 包括 2 份山荆子(内蒙古 1 份和黑龙江 1 份), H_13 为 1 份黑龙江山荆子, H_18 为 1 份花红(河北)、6 份楸子(河北)和 13 份山荆子(河北 12 份、吉林 1 份)。H_45 包括 1 份河北山荆子, H_43 包括 3 份山荆子(甘肃 1 份和河北 2 份)和 1 份中国苹果(新疆)。H_39 为 1 份楸子(河北), H_32 为 1 份山荆子(河北)。H_24 节点包含 H_24 和 H_25 2 个单倍型, H_24 包括 4 份垂丝海棠(甘肃)、2 份楸子(甘

肃)和4份山荆子(甘肃1份、黑龙江1份和内蒙古2份),H₂₅包括1份楸子(陕西)、1份山荆子(内蒙古)和1份新疆野苹果(巩留)。以H₆为中心的星状辐射区域,共包含了14份楸子、64份山荆子、4份垂丝海棠、2份中国苹果、1份花红和1份新疆野苹果,主要以山荆子散布在各单倍型中,闭合环向外围演化形成的3个单倍型。

2.4.2 第二支系单倍型分布 单倍型H₂₁由2份新疆霍城的新疆野苹果和1份中国苹果白太平构成,H₈₉由1份新疆霍城的新疆野苹果,H₈₇也是新疆霍城的1份新疆野苹果。H₂₁衍生H₆₃的分支,此分支还包含H₇₄、H₈₈、H₉₂、H₉₄和H₉₅,分支包含8份新疆霍城的新疆野苹果和2份新疆源的新疆野苹果。

mv4有2条衍生路线,一条衍生至mv2,一条衍生至mv7。衍生至mv2的路线经过2个邻接的闭合环,形成3个分支。2个闭合环中有3个未缺失的单倍型H₅₈、H₆₅和H₆₇,分别包含4份新疆野苹果(霍城3份和新疆源1份)、1份新疆野苹果(新疆源)和1份新疆野苹果(新疆源)。3个分支其一为单倍型H₅₇,对应1份新疆野苹果(新疆源);其二为单倍型H₄₆和H₄₇,分别由1份花叶海棠独享;其三由内向外的衍生单倍型依次为H₇₆、H₇₉和H₈₆,分别对应1份霍城新疆野苹果、1份巩留新疆野苹果和1份巩留新疆野苹果。

由mv4衍生至mv7的形成2个邻接的闭合环,其一由mv7、H₉₀、H₈₃、H₆₂、H₅₉、H₈₂、H₁₆、H₁₅和mv3组成,其二由mv3、H₁₅、H₅₄和H₆₈组成,mv3和H₁₅为2个闭合环的连接点。H₁₅是2个闭合环的连接点之一,同时又是网络图上最大的星状辐射的中心。由mv7经历2条进化路径,趋同演化汇合于H₁₅。H₁₅代表最大的一个星状辐射的中心,包含单倍型组合H₁₅、H₆₀、H₆₁、H₆₆和H₉₈,单倍型H₁₅包含14份八棱海棠、1份垂丝海棠、5份花红、7份楸子、8份山荆子、72份新疆野苹果和21份中国苹果,72份新疆野苹果中有14份来源于巩留、9份来源于霍城、49份来源于新疆源,单倍型H₆₀包括1份新疆源新疆野苹果,H₆₁为1份新疆源新疆野苹果,H₆₆为1份霍城新疆野苹果,H₉₈为1份巩留新疆野苹果。最大的辐射中心H₁₅单倍型组合共包含76份新疆野苹果、21份中国苹果、14份八棱海棠、8份山荆子、7份楸子、5份花红和1份垂丝海棠,其中51份为新疆源的新疆野苹果。H₅₄与H₁₅相连,H₅₄代表单倍型组合包含单倍型H₅₄、H₄₂、H₆₉、H₇₈、H₈₁、

H₉₃、H₉₆和H₉₉,H₅₄包括6份新疆野苹果,其中来源于巩留3份、霍城2份和新疆源1份;H₄₂包括77份新疆野苹果,其中来源于巩留36份、霍城13份和新疆源28份;H₆₉包括3份新疆野苹果,其中来源于霍城2份和巩留1份,H₇₈包括2份新疆野苹果,其中来源于巩留1份和霍城1份;H₈₁包括1份来源于霍城的新疆野苹果,H₉₃和H₉₆分别包括来源于霍城的1份和巩留的1份新疆野苹果,H₉₉包括1份巩留新疆野苹果。H₅₄单倍型组合中全部为新疆野苹果,其中新疆源新疆野苹果43份、新疆霍城新疆野苹果20份、新疆新疆源新疆野苹果29份。H₆₈包括1份新疆源的新疆野苹果,H₉₀为1份新疆霍城新疆野苹果。mv7向上的闭合环,经由全部为新疆野苹果的单倍型以及mv3,演化为H₁₅。H₈₃为1份新疆霍城新疆野苹果,H₆₂为1份霍城和2份新疆源新疆野苹果,H₅₉为1份新疆源新疆野苹果,H₈₂为1份霍城新疆野苹果,H₁₆为2份花红和4份中国苹果。mv7向下的闭合环,经过4个新疆野苹果独享的单倍型和1个花红和新疆野苹果的混合单倍型,演化为H₁₅。

mv7经过一步突变衍生单倍型H₉₀,H₉₀进一步向外围经过48步突变衍生扩散形成单倍型H₂₀,由1份山楂海棠独享单倍型H₂₀。

单倍型H₁₅为最大的星状辐射中心,向外围分别演化为H₇₅、H₄₈、H₅₂、H₇₇和H₅₅,H₇₅为1份新疆源新疆野苹果,H₄₈为1份甘肃的中国苹果,H₅₅为1份新疆源的新疆野苹果,H₇₇为1份巩留的新疆野苹果。H₅₂为单倍型组合,还包含单倍型H₄₉、H₅₆、H₈₄、H₉₇和H₁₀₀。单倍型H₅₂为21份新疆野苹果(巩留10份、霍城4份和新疆源7份),H₄₉为2份新疆野苹果(霍城1份和新疆源1份)和1份甘肃中国苹果,H₅₆为2份新疆源的新疆野苹果,H₈₄为1份霍城新疆野苹果,H₉₇为1份巩留新疆野苹果,H₁₀₀为1份巩留新疆野苹果。以H₁₅为中心的星状辐射向外围扩散形成的所有单倍型中共包含了14份巩留新疆野苹果、6份霍城新疆野苹果、11份新疆源新疆野苹果和2份甘肃的中国苹果。

2.4.3 第三支系单倍型分布 mv18第1个分支衍生为H₅₁并形成H₅₁、H₄、H₂₃和mv20组成的闭合环,另外一个分支是分别由mv21、mv22和mv23以及mv25、mv26和mv27组成的2个闭合环相连接。第1个分支的H₅₁为1份四川的变叶海棠,H₄为22份四川的变叶海棠和1份云南的变叶海棠,H₂₃为1份垂丝海棠和9份山荆子(甘肃、黑

龙江、内蒙古和山西)。单倍型 H₅₁ 分别经由 H₄ 和 H₂₃ 演化为 mv20。H₂₃ 依次衍生为 H₂₈ 和 H₂₉。H₂₈ 为 2 份八棱海棠、1 份垂丝海棠、9 份花红、3 份楸子、1 份山荆子和 1 份中国苹果;H₂₉ 单倍型为 2 份西府海棠,位于网络图最外围。mv20 经过 29 个突变位点演化为 H₃,H₃ 为 1 份云南的湖北海棠;经过 1 个突变位点演化为 mv19,并形成 H₃₁ 和 H₄₁ 2 个单倍型。H₃₁ 为 1 份湖北海棠和 1 份新疆野苹果,H₄₁ 为 1 份八棱海棠。mv18 的第 2 个分支经过第 1 个闭合环后在最外围形成单倍型 H₂,包括 1 份云南的花红;经过第 2 个闭合环在最外围形成单倍型 H₁、H₅ 和 H₅₀,其分别为 1 份沧江海棠、1 份滇池海棠和 1 份陇东海棠。

2.4.4 第四支系单倍型分布 mv16 衍生的单倍型 H₇₀ 为 1 份新疆的楸子,H₇₀ 向外围扩展为 mv12 和 H₁₇。mv12 衍生为最外围的单倍型 H₇₁ 和 H₄₀,分别为 1 份新疆的中国苹果和 1 份山西楸子、1 份山西中国苹果。H₁₇ 衍生成单倍型 H₁₀ 为

小星状辐射的中心,H₁₀ 包含 3 份八棱海棠、8 份花红、4 份楸子和 16 份山荆子(河北 8 份、黑龙江 8 份)和 13 份中国苹果(河北 2 份、黑龙江 1 份、吉林 8 份、内蒙古 1 份和山东 1 份)。星状辐射的外围有单倍型 H₁₄、H₃₀、H₃₄、H₃₅ 和 H₃₇,分别为 1 份黑龙江山荆子、1 份新疆楸子和 1 份河北西府海棠、1 份河北楸子、1 份河北花红、1 份河北花红。以 H₁₀ 为中心的性状辐射主要包含苹果属植物的栽培种。

2.5 苹果属植物种群遗传关系

计算供试苹果属植物 15 个种间的遗传距离并用 Neighbour-Joining 的方法构建聚类树(图 2)。通过种群遗传距离的比较,在 Neighbor-Joining 聚类树可以识别 4 个种群组合,花红、山荆子、西府海棠、八棱海棠、楸子、变叶海棠、花叶海棠、湖北海棠和垂丝海棠被归在种群组合 I 中,中国苹果和新疆野苹果归在种群组合 II 中,滇池海棠、沧江海棠和陇东海棠归在种群组合 III 中,山楂海棠单独成为种群 IV。

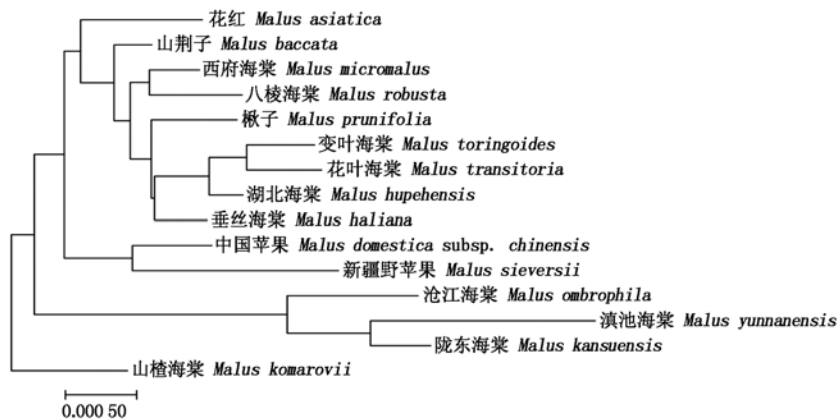


图 2 基于群体间遗传距离构建的苹果属 15 个种的一致性 NJ 树

Fig. 2 Consensus Neighbor-Joining tree of 15 species of *Malus* Mill. based on the genetic distance of populations

3 讨论

3.1 苹果属植物遗传多样性

722 份苹果属植物的 4 个叶绿体 DNA 区域中,核苷酸多样性和单倍型多样性最高的区域均为 *trnH-psbA* ($P_i = 0.03409$, $H_d = 0.808$),最低的区域均为 *5'trnL-trnF* ($P_i = 0.00078$, $H_d = 0.577$)。4 个叶绿体 DNA 合并区域的遗传多样性 ($P_i = 0.00852$, $H_d = 0.879$),明显高于 170 个物种的平均数值 ($0.826 \sim 0.670$)^[27]。在叶绿体 DNA 水平上,苹果属植物具有高水平的遗传多样性。中国原产苹果属植物具有较高核苷酸多样性和单倍型多样性,表明其由一个大而稳定的种群经过长时间演化所产生或是 2 个不同系群的种群二次接触,这与 Clegg 等^[28]的理论是相一致的。

3.2 苹果属植物起源演化分析

722 份中国原产苹果属植物 4 个叶绿体 DNA 区域的 Tajima's D 检验全部为负值,苹果属植物在进化过程中有明显的种群扩张。区域 *trnS-trnG* spacer + intron 和 *5'trnL-trnF* 的 D 值分别在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的水平上显著,区域 *trnH-psbA* 和 *trnT-5'trnL* 分别在 $P > 0.10$ 和 $0.10 > P > 0.05$ 水平上不显著。4 个 cpDNA 区域片段组合后的 Tajima's D 值为 -1.50316 ,在 $P > 0.10$ 检测水平上不显著。区域 *trnS-trnG* spacer + intron 和 *5'trnL-trnF* 的遗传进化过程不符合中性进化模型,自然选择为其遗传变异主要动力;而区域 *trnH-psbA* 和 *trnT-5'trnL* 则符合中性进化模型,遗传变异主要来自于种群内突变或随机漂变。整体符合中性进化模型,说明苹果属植物的遗传进化以种群内突变或者随机漂变为主。

中国原产苹果属植物按照种和来源划分为 15 个种群和 44 个居群。考虑到地理因素造成的遗传分化,按照地理来源划分的居群内的遗传差异是变异的主要因素,种群内居群间的遗传变异最少,说明种内差异和地理隔离造成的各种居群内差异是苹果属植物遗传变异的主要因素,这与高原等^[29]利用 SSR 分子标记方法对苹果属植物研究取得的结果相一致。

根据不同种群间的遗传距离进行聚类,种群组合 I 的 9 个种中,包括主要分布于云南和四川横断山区的 4 个野生种变叶海棠、湖北海棠、花叶海棠和垂丝海棠,及野生种山荆子与 4 个栽培种楸子、八棱海棠、西府海棠和花红;中国苹果与新疆野苹果归为一组;滇池海棠、沧江海棠和陇东海棠归为一组;山楂海棠独成一组,与其他种的遗传距离均较远。苹果属植物各种的分类归属与其种属关系和地理分布明显相关,这与张春雨等^[30]对苹果属植物的遗传关系研究得出相同的结论。

722 份苹果属植物种质的 4 个叶绿体 DNA 区域合并片段的单倍型邻接网络图中,各地方种群所属的单倍型呈现一种混杂的分布格局,有的种独享单倍型,有的单倍型涵盖多个地区的多个种。邻接网络中心位置的单倍型 mv8、mv9、mv16、mv17 和 mv18 形成闭合环,由中心区域向不同的方向衍生出苹果属各种,但其全部为缺失单倍型,有可能这些最原始的单倍型材料已经流失灭绝,也有可能是在我们已经密集搜集的区域还没有遇到。

由网络中心区域不断衍生形成的 4 个主要支系充分体现苹果属植物不同种具有不同的演化路线。

第一支系以单倍型 H₆ 为中心,H₆ 包含了二分之一供试的山荆子种质、垂丝海棠、八棱海棠、楸子、花红和三分之一供试的中国苹果。并形成以单倍型 H₆ 为中心的星状辐射,星状辐射的外围单倍型均以山荆子居多,说明山荆子具有明显的种群扩张。单倍型 H₆ 也是相对较老的单倍型。

第二支系中,由缺失单倍型经过 2 条线路趋同演化至单倍型 H₁₅,在这个过程中有个最大的单倍型 H₅₄ 全部为新疆野苹果,衍化成的 H₁₅ 包含了新疆野苹果、山荆子、垂丝海棠和 4 个栽培种中国苹果、八棱海棠、楸子和花红。H₁₅ 包含的 76 份新疆野苹果中有 51 份来自新疆新源,除此之外还包含了三分之一供试的中国苹果种质。此支系的衍化过程可以说明三点:第一,新疆野苹果在进化过程中有向新疆新源的新疆野苹果趋同进化的趋势;第二,新疆野苹果起源要早于 4 个栽培种中国苹果、八棱海棠、

楸子、花红的部分种质,栽培种中的部分单倍型由新疆野苹果的单倍型演化而来;第三,单倍型 H₁₅ 包含了 4 个栽培种和 2 个野生种,是相对比较古老的单倍型。以 H₁₅ 为中心的星状辐射,向外围种群扩张,外围单倍型以新疆野苹果为主。说明在新疆野苹果的进一步演化过程中,由于人类活动与苹果属植物的栽培种以及山荆子和垂丝海棠之间有基因交流。第一支系中有个比较特殊的分支,山楂海棠远离以新疆野苹果为主的衍生路线,在外围独享一个单倍型。山楂海棠与新疆野苹果的遗传距离较远,从未知单倍型经过多步突变演化形成。部分栽培苹果由新疆野苹果演化而来,本研究中部分栽培苹果的起源演化过程与前人推断结论相一致^[31],但本研究中还有一部分苹果栽培种的发展演化与新疆野苹果并不相关。

第三支系单倍型 H₃、H₄、H₂₉、H₃₁、H₄₁、H₅₁ 均分别为湖北海棠、变叶海棠和花叶海棠、西府海棠、湖北海棠、八棱海棠以及变叶海棠,根据单倍型由内而外的衍化顺序,由中心到外围的分生顺序依次为变叶海棠、花叶海棠、八棱海棠、湖北海棠和西府海棠。变叶海棠和花叶海棠经历了分化又趋同演化,湖北海棠分化要晚于变叶海棠和花叶海棠,西府海棠的分化要晚于苹果属植物的其他 3 个栽培种八棱海棠、花红和楸子。

第四支系以山荆子和中国苹果为主的单倍型 H₁₀ 为中心,形成小的星状辐射,向外围种群扩张形成了山荆子、楸子、花红和西府海棠。山荆子与部分中国苹果有共享单倍型,说明山荆子与在中国栽培两千多年的中国苹果的起源演化过程明显相关,Duan 等^[31]认为山荆子参与了在中国栽培苹果的驯化过程,而本结果再次证明了该结论。西府海棠还是出现在外围,再次说明其分化时间要晚于苹果属的其他供试栽培种。中国苹果并未在外围单倍型中出现,中国苹果的部分单倍型分化要早于楸子、花红和西府部分单倍型。第四支系云南的花红、滇池海棠、沧江海棠和陇东海棠各在外围独享一个单倍型,其中云南的花红在其中一支分支上分化时间要早,滇池海棠、沧江海棠和陇东海棠在另一分支,滇池海棠和陇东海棠的亲缘关系要近于沧江海棠,滇池海棠的分化时间要略晚于陇东海棠。

参考文献:

- [1] Byrne M, Macdonald B. Phylogeography and conservation of three oil mallee taxa, *Eucalyptus kochii* ssp. *kochii*, ssp. *plenissima* and *E. horistes* [J]. *Australian Journal of Botany*, 2000, 48(3): 305 - 312. doi:10.1071/BT99017.
- [2] 潘丽芹, 季华, 陈龙清. 荷叶铁线蕨自然居群的遗传

- 多样性研究[J]. 生物多样性, 2005, 13(2): 122 - 129. doi:10.3321/j.issn:1005-0094.2005.02.005.
- Pan L Q, Ji H, Chen L Q. Genetic diversity of the natural populations of *Adiantum reniforme* var. *sinense*[J]. *Biodiversity Science*, 2005, 13(2): 122 - 129.
- [3] Bellusci F, Palermo A M, Pellegrino G, Musacchio A. Genetic diversity and spatial structure in the rare, endemic orophyte *Campanula pseudostenocodon* Lac. (Apenines, Italy), as inferred from nuclear and plastid variation[J]. *Plant Biosystems*, 2008, 142(1): 24 - 29. doi:10.1080/11263500701872150.
- [4] Wuyun T, Amo H, Xu J S, Ma T, Uematsu C, Katayama H. Population structure of and conservation strategies for wild *Pyrus ussuriensis* Maxim. in China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0133686. doi:10.1371/journal.pone.0133686.
- [5] Lopez L, Retuerto R, Roiloa S, Santiso X, Barreiro R. A multi-faceted approach for assessing evolutionary significant conservation units in the endangered *Omphalodes littoralis* subsp. *gallaecica* (*Boraginaceae*) [J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2015, 17(1): 54 - 65. doi:10.1016/j.ppees.2014.09.003.
- [6] Torres-Cambas Y, Ferreira S, Cordero-Rivera A, Lorenzo-Carballa M O. Identification of evolutionarily significant units in the Cuban endemic damselfly *Hypolestes trinitatis* (Odonata: Hypolestidae) [J]. *Conservation Genetics*, 2017, 18: 1229 - 1234. doi:10.1007/s10592-017-0959-1.
- [7] 闫鹏, 韩立群, 梅闯, 刁永强, 许正, 张学超, 马凯, 艾沙江·买买提, 王继勋. 新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) 植物学性状遗传多样性及相关性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 683 - 689. doi:10.13430/j.cnki.jpgr.2016.04.012.
- Yan P, Han L Q, Mei C, Diao Y Q, Xu Z, Zhang X C, Ma K, Aisajan M, Wang J X. Genetic diversity and correlation analysis of botanical characters in Xinjiang wild apple (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(4): 683 - 689.
- [8] 刁永强, 许正, 闫鹏, 陈淑英, 张学超, 刘君. 新疆野苹果资源类型表型性状鉴定及优异资源的初步筛选[J]. 经济林研究, 2019, 37(1): 17 - 24, 49. doi:10.14067/j.cnki.1003-8981.2019.01.003.
- Diao Y Q, Xu Z, Yan P, Chen S Y, Zhang X C, Liu J. Phenotypic characteristic identification and preliminary selection of excellent resources in *Malus sieversii* resource types [J]. *Nonwood Forest Research*, 2019, 37(1): 17 - 24, 49.
- [9] 张新忠, 王忆, 韩振海. 我国苹果属 (*Malus* Mill.) 野生资源研究利用的现状分析[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(3): 8 - 15. doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.03.02.
- Zhang X Z, Wang Y, Han Z H. Analysis on present research and utilization status of wild apple germplasm resources (*Malus* Mill.) in China [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(3): 8 - 15.
- [10] 王大江, 王昆, 高源, 赵继荣, 刘立军, 龚欣, 李连文. 我国苹果属资源现代分布调查初报[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1116 - 1124. doi:10.13430/j.cnki.jpgr.2017.06.013.
- Wang D J, Wang K, Gao Y, Zhao J R, Liu L J, Gong X, Li L W. Preliminary investigation of modern distribution of *Malus* resources in China [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(6): 1116 - 1124.
- [11] Palmer J D, Jansen R K, Michaels H J, Chase M W, Manhart J R. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1988, 75(4): 1180 - 1206. doi:10.2307/2399279.
- [12] 倪梁红, 赵志礼, 米玛. 药用植物叶绿体基因组研究进展[J]. 中药材, 2015, 38(9): 1990 - 1994. doi:10.13863/j.issn1001-4454.2015.09.046.
- Ni L H, Zhao Z L, Mi M. Advances in research on chloroplast genome of medicinal plants [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2015, 38(9): 1990 - 1994.
- [13] 付涛, 王志龙, 钱萍仙, 李文, 袁冬明, 严春风. 高等植物 DNA 条形码最新研究进展及其应用[J]. 核农学报, 2016, 30(5): 887 - 896. doi:10.11869/j.issn.100-8551.2016.05.0887.
- Fu T, Wang Z L, Qian P X, Li W, Yuan D M, Yan C F. The latest research progress and application of the DNA barcode in higher plants [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, 30(5): 887 - 896.
- [14] Savolainen V, Corbaz R, Moncousin C, Spichiger R, Manen J F. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90(7-8): 1138 - 1141. doi:10.1007/bf00222934.
- [15] 朱元娣, 曹敏格, 许正, 王昆, 张文. 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[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 227 - 239. doi:10.16420/j.issn.0513-353x.2014.02.027.
- Zhu Y D, Cao M G, XU Z, Wang K, Zhang W. Phylogenetic relationship between Xinjiang wild apple (*Malus sieversii* Roem.) and Chinese apple (*Malus × domestica* subsp. *chinesensis*) based on ITS and *matK* sequences [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(2): 227 - 239.
- [16] 徐榕雪. 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[D]. 南京: 南京林业大学, 2018: 66 - 74.
- Xu R X. Taxonomic status and phylogenetic relationships of some *Malus* plants based on molecular marker technology [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2018: 66 - 74.
- [17] 李慧峰. 泰沂山区苹果属植物系统学研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012: 32.
- Li H F. Studies on the taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) of Taiyi-Mountains [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2012: 32.
- [18] Potter D, Luby J J, Harrison R E. Phylogenetic relationships among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences [J]. *Systematic Botany*, 2009, 25(2): 337 - 348. doi:10.2307/2666646.
- [19] Daccord N, Celton J M, Linsmith G, Becker C, Choisne N, Schijlen E, van de Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Di 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, de Weg E, Troggio M, Bucher E. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development [J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(7): 1099 - 1106. doi:10.1038/ng.3886.
- [20] Zhang L Y, Jiang H, Han X L, Li J J, Gao Y, Rich-

- ards 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. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour[J]. *Nature Communication*, 2019, 10: 1494. doi:10.1038/s41467-019-09518-x.
- [21] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, Farmer S B, Liu W S, Miller J, Siripun K C, Winder C T, Schilling E E, Small R L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis[J]. *American Journal of Botany*, 2005, 92(1): 142–166. doi:10.3732/ajb.92.1.142.
- [22] 高源, 王大江, 王昆, 丛佩华, 张彩霞, 李连文, 朴继成. 新疆野苹果叶绿体 DNA 变异与遗传进化分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(3): 579–587. doi:10.13430/j.cnki.jpgr.20190719002.
- Gao Y, Wang D J, Wang K, Cong P H, Zhang C X, Li L W, Piao J C. Chloroplast DNA variation and genetic evolution of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(3): 579–587.
- [23] Volk G M, Henk A D, Baldo A, Fazio G, Chao C T, Richards C M. Chloroplast heterogeneity and historical admixture within the genus *Malus*[J]. *American Journal of Botany*, 2015, 102(7): 1198–1208. doi:10.3732/ajb.1500095.
- [24] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2016, 7(33): 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.
- [25] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187.
- [26] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin Suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [27] Petit R J, Aguinalgalde I, de Beaulieu J L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Müller-Starck G, Demesure-Musch B, Palmé A, Martín J P, Rendell S, Vendramin G G. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity[J]. *Science*, 2003, 300(5625): 1563–1565. doi:10.1126/science.1083264.
- [28] Clegg M T, Gaut B S, Learn J G H, Morton B R. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(15): 6795–6801. doi:10.1073/pnas.91.15.6795.
- [29] 高源, 王昆, 王大江, 赵继荣, 张彩霞, 丛佩华, 刘立军, 李连文, 朴继成. 7 个来源地区山荆子的遗传多样性与群体结构分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(19): 3766–3777. doi:10.3864/j.issn.0578-1752.2018.19.013.
- Gao Y, Wang K, Wang D J, Zhao J R, Zhang C X, Cong P H, Liu L J, Li L W, Piao J C. The genetic diversity and population structure analysis on *Malus baccata* (L.) Borkh from 7 sources[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(19): 3766–3777.
- [30] 张春雨, 陈学森, 林群, 苑兆和, 张红, 张小燕, 刘崇祺, 吴传金. 新疆野苹果群体遗传结构和遗传多样性的 SRAP 分析[J]. *园艺学报*, 2009, 36(1): 7–14. doi:10.3321/j.issn:0513-353X.2009.01.002.
- Zhang C Y, Chen X S, Lin Q, Yuan Z H, Zhang H, Zhang X Y, Liu C Q, Wu C J. SRAP markers for population genetic structure and genetic diversity in *Malus sieversii* from Xinjiang, China [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(1): 7–14.
- [31] 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. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage for fruit enlargement [J]. *Nature Communication*, 2017, 8(1): 249. doi:10.1038/s41467-017-00336-7.