

基于 TRAP 标记的苹果属种间遗传多样性分析

索相敏, 郝 婕, 冯建忠, 鄢新民, 王献革, 李学营*

(河北省农林科学院石家庄果树研究所, 石家庄 050061)

摘要:【目的】了解苹果属资源遗传多样性, 以期为种间亲缘关系分析提供分子水平上的可靠依据。【方法】利用 TRAP(Target Region Amplified Polymorphism) 分子标记对苹果属 30 个种和梨属 3 个种共 33 份材料进行了遗传多样性分析。【结果】筛选出的 16 对引物组合共扩增出 407 条有效条带, 其中多态性条带 404 条, 多态性百分率达 99.26%。UPGMA 聚类结果显示, 当遗传相似系数 $GS=0.666$ 时能很好地区分苹果属与梨属材料, 当 $GS=0.680$ 时可将苹果属 30 个种分为 I 和 II 两个亚类。主坐标分析中材料所属类群同 UPGMA 聚类结果有较高的符合度, 基本与传统系谱一致。但群体结构分析结果同 UPGMA 聚类和主坐标聚类结果有一定的差异性, 其中 23 份材料的协变量 Q 值 ≥ 0.6 , 亲缘关系相对单一。【结论】开发出 TRAP 标记引物组合 16 对, 可有效地区分苹果属种质材料的遗传多样性, 为苹果属种间亲缘关系分析提供了新的分子证据。

关键词: 苹果属; 遗传多样性; TRAP 标记; 群体结构分析

中图分类号:S661.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2019)12-1609-10

Analysis of genetic diversity of *Malus* species resources by TRAP markers

SUO Xiangmin, HAO Jie, FENG Jianzhong, YAN Xinmin, WANG Xian'ge, LI Xueying*

(Shijiazhuang Pomology Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061, Hebei, China)

Abstract:【Objective】*Malus* Mill. is a germplasm resource with important economic value in fruit cultivation and production. Breeders often use the interspecific hybridization for rootstock breeding. The genetic diversity analysis of parental materials would significantly effect apple breeding. Although there are abundant data available for the study of genetic evolutionary classification of apple plants, there are controversies on the standards of classification of different based on for different methods. The TRAP marker has the characteristics of good polymorphism, high stability and easy operation. In this study, we developed more genomes of 30 species of *Malus* and 3 species of *Prunus* by developing TRAP markers for phylogenetic evolution studies, from EST sequences. The genetic diversity information of apple genus was revealed horizontally, which would provide reference for the identification of genus relationship, parental selection, evolution analysis and utilization of germplasm resources.【Methods】DNA was extracted from young leaves of 30 species of *Malus* and 3 species of *Pyrus* by improved CTAB method. PCR amplification was performed using 4 fixed primers and 8 random primers, agarose gel electrophoresis detection. The genetic similarity coefficient (GS) was calculated by NTSYS-PC software, and cluster analysis was performed by unweight pair group method using arithmetic averages (UPGMA). The main coordinate analysis was performed using the EIGEN program. The population genetic structure of the test materials was analyzed using Structure 2.3.1 software. Three species of pear were used as tests for reliability in data statistics.【Results】In this study, 16 pairs of primer combinations amplified 407 effective fragments in 33 samples, with the fragment size ranged from 100 bp to 1 200

收稿日期: 2019-05-28

接受日期: 2019-10-18

基金项目: 国家苹果产业技术体系专项资金(CARS-27); 河北省科技支撑计划项目(16226312D-2); 河北省农林科学院创新工程课题资助; 河北省农林科学院人才工程课题资助

作者简介: 索相敏, 女, 副研究员, 硕士, 主要从事果树资源与育种研究。Tel: 13833138757, E-mail: suoxiangmin@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13731163696, E-mail: nkylxy@126.com

bp, of which 404 were polymorphic, and the average percentage of polymorphic was 99.26%. The number of alleles amplified by each primer combination was between 17 and 50, and the average number of alleles amplified by each primer pair was 25.44. UPGMA cluster analysis showed that the average genetic similarity coefficient GS of 33 species of *Malus* and *Pyrus* was 0.711, of which 30 species of *Malus* were $GS=0.725$. When $GS=0.666$, three species of *Pyrus* could be regarded as the first major group, while the other 30 species of *Malus* could be regarded as the second largest category. When $GS=0.680$, 30 species of *Malus* could be divided into two subgroups, three species of *M. doumeri*, *M. ioensis* and *M. angustifolia* could be divided into one subgroup, and the other 27 species could be divided into another subgroup. Using the principal coordinate analysis method, which is the same as the UPGMA method, 33 test materials were divided into 3 categories. The three species of pear were in the first major group; the three species of *M. doumeri*, *M. ioensis* and *M. angustifolia* of the apple genus were in the second largest category, and the other 27 species were in the third largest category. The third category could be divided into four sub-categories. The first sub-categories included *M. komarovii*, *M. ombrophilia* and *M. yunnanensis*, the *M. ombrophilia* and *M. yunnanensis* were closely related. The second subcategory included three materials of the *M. sikkimensis*, *M. toringoides* and *M. transitoria*. The third subclass includes: *M. baccata*, *M. mandshurica*, *M. rockii*, *M. hupehensis*, *M. spectabilis*, *M. micromalus*, *M. sieboldii*, *M. kansuensis*, *M. prattii*, *M. honanensis*, *M. soulardii* and *M. xiaojinensis*; the fourth subcategory included *M. halliana*, *M. sieversii*, *M. asiatica* var. *rinki*, *M. prunifolia*, *M. robusta*, *M. domestica* subsp. *chinensis*, *M. orientalis*, *M. sylvestris* and *M. fusca*. Structure 2.3.1 software divided 33 test materials into three subgroups, the first subgroup included 13 species of *M. baccata*, *M. mandshurica*, *M. rockii*, *M. sikkimensis*, *M. sieboldii*, *M. kansuensis*, *M. komarovii*, *M. toringoides*, *M. transitoria*, *M. ombrophilia*, *M. yunnanensis*, *M. xiaojinensis* and *M. ioensis*. The second subgroup included 15 species of *M. hupehensis*, *M. halliana*, *M. sieversii*, *M. asiatica* var. *rinki*, *M. prunifolia*, *M. spectabilis*, *M. micromalus*, *M. prattii*, *M. honanensis*, *M. soulardii*, *M. robusta*, *M. domestica* subsp. *chinensis*, *M. orientalis*, *M. sylvestris* and *M. fusca*. The third subgroup included *Malus doumeri*, *Malus angustifolia*, and three pear species of *P. bretschneideri*, *P. pyrifolia* and *P. communis*. It seemed that the UPGMA clustering graph and the main coordinate clustering results were similar to the traditional pedigree, but there were obvious differences in the classification order of the group and the system. The results of population structure analysis were different from the cluster analysis of genetic similarity coefficient and the analysis of principal coordinate clustering. 【Conclusion】The 16 pairs of TRAP markers were developed using TRAP marker technology for the genetic diversity analysis of apple germplasm materials. From the EST level, there were 33 species of apple species and 3 species of pear genus. The analysis results showed that the clustering results of UPGMA method and the main coordinate clustering results were similar, which is similar to the traditional pedigree, but there are some differences between the clustering results and the analysis of the population results. Relationship analysis provided molecular evidence for the relationship between the species of *Malus* genus.

Key words: *Malus* Mill.; Genetic diversity; TRAP; Group structure analysis

苹果属(*Malus* Mill.)为果树栽培和生产中具有重要经济价值的种质资源,育种者常常利用种间远缘杂交进行砧木育种,亲本材料的遗传多样性分析对苹果育种发展有着重要意义^[1-3]。苹果属植物遗传进化分类研究已有丰富的资料可查,但基于不同方

式,不同标准的分类存在较大的争议^[4-7]。基于近年分子技术的发展,利用分子标记技术揭示苹果种质资源材料间的亲缘关系,从基因组水平上分析材料间的差异性,进而辅助育种工作者选择适宜的苹果杂交亲本组合已经成为主流^[8-11]。但是不同标记揭

示的基因组位点有所不同,所能揭示差异位点的序列信息也未必转录表达。

TRAP标记(目标区域扩增多态性或靶位点区域扩增多态性)技术在21世纪初发展起来,通过在NCBI数据库中查找相关基因EST序列,依据选定的目标候选基因cDNA或者EST序列设计一个固定引物(fixed primer)^[12],同时针对外显子或内含子的特点,设计富含GC或AT核心区的任意序列即随机引物(Arbitrary primer),然后扩增出同目标基因相关的PCR片段^[13],对片段分离后读取的数据进行分析,以实现目的基因EST区域多样性检测。与其他基于PCR的分子标记相比,TRAP标记有着经济快速且多态性好、目标明确且稳定性高、操作简单且易测序的优点^[14]。TRAP标记在经济作物茶树^[15]、草坪草^[16]、甘蔗^[17]、烟草^[18]、中药^[19-20]、木薯^[21]、蓖麻^[22-23]和植物病原菌^[24-25]等的研究中已有报道,但在苹果属植物遗传多样性的研究中报道较少^[10-11,26]。

笔者通过开发更多可用于亲缘进化研究的TRAP标记,对苹果属30个种及梨属3个种的基因组进行扫描,从EST序列水平上揭示苹果属种间的遗传多样性信息,为苹果属种间亲缘关系鉴定、亲本选配、进化分析及种质资源的利用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

分析了苹果属30个种和梨属3个种共33份材料(表1),其中海棠花来自中国农业大学上庄试验站;山楂海棠来自吉林省农业科学院果树研究所资源圃;台湾林檎来自杭州植物园;苹果属其他27种来自辽宁兴城中国农业科学院果树研究所国家苹果种质资源圃;梨属3个种(作为外属材料用于验证数据分析结果的可靠性)来自河北省农林科学院石家庄果树研究所梨资源圃。春季采集幼嫩叶片,硅胶干燥保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采集供试材料的幼嫩叶片,参考韩骞等^[27]、刘卫国等^[28]的方法,通过改进的CTAB小样法提取基因组DNA。获取的基因组DNA通过Nano Drop 2000c超微量紫外分光光度计并结合1%(w)的琼脂糖凝胶电泳测定浓度和质量,TE溶液稀释至250 ng·μL⁻¹,保存DNA于-20℃备用。

1.2.2 引物筛选与PCR扩增 依据Hu等^[29]引物设

表1 供试材料
Table 1 Materials used in the experiment

编号	材料名称	学名	原产地
Code	Material name	Latin name	Origin place of materials
1	山荆子	<i>Malus baccata</i> (L.) Borkh.	中国辽宁
2	毛山荆子	<i>Malus mandshurica</i> (Komarov.) Likh.	中国辽宁
3	丽江山荆子	<i>Malus rockii</i> Schneid.	中国四川
4	湖北海棠	<i>Malus hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.	中国四川
5	垂丝海棠	<i>Malus halliana</i> (Anon.) Koehne	中国江苏
6	锡金海棠	<i>Malus sikkimensis</i> (Wenzig.) Koehne	中国四川
7	新疆野苹果	<i>Malus sieversii</i> (Ledeb.) Boem.	中国新疆
8	杏子**	<i>Malus asiatica</i> var. <i>rinki</i> (Woide.) Asami	中国
9	楸子	<i>Malus prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	中国四川
10	海棠花	<i>Malus spectabilis</i> (Ait.) Borkh.	中国华北
11	西府海棠	<i>Malus micromalus</i> Mak.	中国四川
12	三叶海棠	<i>Malus sieboldii</i> (Regel.) Rehd.	中国四川
13	陇东海棠	<i>Malus kansuensis</i> (Batal.) Schneid.	中国四川
14	山楂海棠	<i>Malus komarovii</i> (Sarg.) Rehd.	中国吉林
15	变叶海棠	<i>Malus toringoides</i> (Rehd.) Hughes	中国四川
16	花叶海棠	<i>Malus transitoria</i> (Batal.) Schneid.	中国甘肃
17	西蜀海棠	<i>Malus prattii</i> (Hemsl.) Schneid.	中国四川
18	沧江海棠	<i>Malus ombrophilia</i> Hand.-Mazz.	中国四川
19	河南海棠	<i>Malus honanensis</i> Rehd.	中国河南
20	滇池海棠	<i>Malus yunnanensis</i> (Franch.) Schneid.	中国四川
21	台湾林檎	<i>Malus doumeri</i> (Boig.) Chev.	中国台湾
22	大鲜果	<i>Malus soulardii</i> (Bailey.) Britton.	中国辽宁
23	小金海棠	<i>Malus xiaojinensis</i> Cheng et Jiang	中国四川
24	扁棱海棠	<i>Malus robusta</i> (Carr.) Rehd.	中国河北
25	中国苹果	<i>Malus domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> Li.	中国
26	草原海棠	<i>Malus ioensis</i> (Wood.) Brit.	北美
27	东方苹果	<i>Malus orientalis</i> Uglitz	高加索
28	森林苹果	<i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill.	东欧
29	窄叶海棠	<i>Malus angustifolia</i> (Ait.) Michx	北美
30	褐海棠	<i>Malus fusca</i> (Raf.) Schnerd.	北美
31	白梨*	<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd.	中国河北
32	砂梨*	<i>Pyrus pyrifolia</i> (Burm.f.) Naki.	中国长江流域
33	西洋梨*	<i>Pyrus communis</i> L.	亚洲西部

注:*表示梨属材料;**表示花红变种。

Note: * indicates pear material; ** indicates flower red variety.

计原则设计 16 条固定引物和 4 条随机引物, TRAP 标记引物序列及其组合信息见表 2。PCR 扩增体系 (25 μL): 10×buffer(含 MgCl₂) 2.5 μL; 25 ng·μL⁻¹; DNA 2 μL; 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL; 10 μmol·L⁻¹ 引

物(left primer/right primer)各 0.5 μL; Biolabs Taq 聚合酶 5 U·μL⁻¹ 0.2 μL; 加水至 25 μL。TARP PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 2 min; 前 5 个循环(94 °C 变性 45 s, 35 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min); 后扩增 35 个循环(94 °C 变性 45 s, 特异引物 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min); 最后 72 °C 延伸 7 min。TRAP 标记扩增 PCR 产物使用 1.5% 的琼脂糖凝胶, 180 V 电压电泳 15 min 检测, 使用凝胶成像系统(Syngene, G:BOX-CHEMI-XRQ)记录结果。

1.2.3 数据处理与统计分析 TRAP 标记为显性标记, 将胶片上具有相同迁移率的条带记为 1, 无带和弱带以 0 记录。通过 Popgene32^[27] 统计分析计算有效等位基因数、Shannon 指数等相关遗传参数。以 NTSYS-PC 软件计算材料间的遗传相似性系数(genetic similarity coefficient, GS), 以非加权平均数法(unweight pair group method using arithmetic averages, UPGMA)进行聚类分析作图。利用 EIGEN 程序进行主坐标分析。以 Structure 2.3.1 软件分析供试材料的群体遗传结构, 估计最佳群体组群数 K^[30], 设置 K 的取值范围在 1~6, 设参数 iterations 为 10 000 次, 参数 burn-in period 为 100 000 次, 重复 12 次, 计算参数 Q 值。以似然值最大的原则, 当 K 值持续增大时, 通过对 ΔK 的计算确定 K 值。将梨属 3 个种作为数据统计中可靠性的检验。

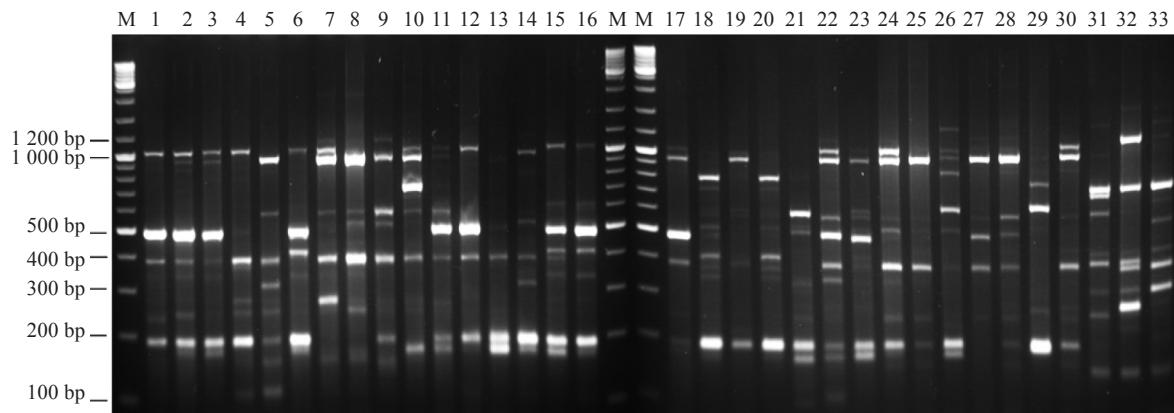
2 结果与分析

2.1 TRAP 标记多态性分析

33 份材料基因组 DNA 经 PCR 扩增后, 以琼脂糖凝胶电泳的方式获得分离片段图谱, 分离结果显示, 利用筛选出的 16 对引物组合在供试的 33 份材料中共扩增出 407 条有效条带, 片段大小在 100~1 200 bp 之间, 其中多态性条带有 404 条, 多态性百分率达 99.26%。各引物组合扩增的有效条带数分布在 17~50 条之间, 平均每对引物扩增出有效条带为 25.44 条; 其中标记 D4 AY729667 扩增的有效条带最少, 为 17 条, 而标记 D11 EU635450 扩增的最多, 为 33 条; 丽江山荆子扩增最多, 为 124 条, 西洋梨扩增最少, 为 88 条。图 1 为引物 D11 和 EU635450 组合的扩增结果, 共扩增有效条带 31 条, 多态性条带 31 条, 多态性百分率达 100%。33 个种的平均观察等位基因数 (Na) 为 1.992 6, 有效等位基因数为 1.442 5, Nei's 基因多样性指数 (Ne) 为 0.274 9, Shannon's 信息指数

表 2 TRAP 引物序列
Table 2 Sequence of TARP primers

基因代码 Gene code	固定引物序列(左) Fixed primer sequence (L)		随机引物序列(右) Random primer sequence (R)		随机引物序列(左) Random primer sequence (L)	固定引物序列(右) Fixed primer sequence (R)
	Random primer sequence (R)	Random primer sequence (L)	Random primer sequence (R)	Random primer sequence (L)		
AY729667	5'-CCGTCTTACTGTCCCTG-3'	D10 5'-GACTGCGTACGAATTGTC-3'	D4 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	D5 5'-TGAGTCCAAACCGGAAAG-3'	5'-GGCTCTGTGTCCTTGCT-3'	5'-GGCTCTGTGTCCTTGCT-3'
HQ992996	5'-GTGAAACAAGCCAAAAGAGG-3'	D11 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	D5 5'-TGAGTCCAAACCGGAAAG-3'	D5 5'-TGAGTCCAAACCGGAAAG-3'	5'-AATACGGGATGACCTTCACCTA-3'	5'-CTCGGGAAATCTCCACCTA-3'
HQ594056	5'-GGGACGGTCATAATAAGG-3'	JF268781 5'-TTGGGTGTATGGAGCGCT-3'	5'-AGGAATAGCAGGTCTGG-3'	5'-AGGAATAGCAGGTCTGG-3'	5'-CAAGCACTGAGACGAAGAG-3'	5'-CAAGCACTGAGACGAAGAG-3'
EU635450	5'-GGTCCCCATTGAAAGGTA-3'	GU321223 5'-ATGTCCTTCCACCCAG-3'	5'-AAGCACCGTGAAGTAGGA-3'	5'-AAGCACCGTGAAGTAGGA-3'	5'-CGTCTCACCTGATTTGG-3'	5'-CGTCTCACCTGATTTGG-3'
KX633241	5'-ACTGACTAAGCCGTGCCA-3'	GU321225 5'-CCTTACTCCAGGGCTTC-3'			5'-GTCCACCGATTGTCGCTTC-3'	



M. DNA 分子质量标记;1~33. 材料序号。

M. DNA molecular weight markers; 1-33. Accessions code.

图 1 D11 和 EU635450 组合引物对 33 份苹果属和梨属材料的扩增

Fig. 1 Amplification of primer D11-EU635450 between *Malus* and *Pyrus* materials

(I) 为 0.430 6。其中基因流(Nm)为 1.284 2, 遗传分化系数(Fst)为 0.280 2, H_o 平均值为 0.447 3, He 平均值为 0.356 7。

2.2 遗传相似性系数聚类分析

采用 UPGMA 法进行聚类分析, 苹果属和梨属 33 个种的遗传相似系数 GS 平均值为 0.711, 其中苹果属 30 个种 $GS=0.725$ 。沧江海棠和滇池海棠 GS 最大, 为 0.953, 二者亲缘关系最近; 丽江山荆子和白梨 GS 最小, 为 0.567, 二者亲缘关系最远。供试的所有苹果属中西蜀海棠和草原海棠 GS 最小, 为 0.638, 其次为湖北海棠和草原海棠、西蜀海棠和窄叶海棠, 这 3 组种间亲缘关系最远。从图 2 可知, 在 $GS=0.666$ 时可将供试材料中的梨属 3 个种做为第一大类, 其余苹果属 30 个种做为第二大类, 能清晰区分梨属材料和苹果属材料, 说明 TARP 标记数据分析可信度高; 在 $GS=0.680$ 时可将苹果属 30 种分为 2 个亚类。山荆子和毛山荆子等 27 种为亚类 I, 包括了传统分类学中的真苹果组和花楸苹果组; 台湾林檎、草原海棠和窄叶海棠 3 种为亚类 II, 包括了传统分类学中的多胜海棠组和绿苹果组。

在 $GS=0.728$ 时可将苹果属 2 个亚类又分为 4 个小类, 亚类 I 分为第一小类和第二小类; 亚类 II 分为第三小类和第四小类。第一小类: 山荆子、毛山荆子、丽江山荆子、湖北海棠、垂丝海棠、新疆野苹果、槟子、楸子、海棠花、西府海棠、三叶海棠、陇东海棠、扁棱海棠、中国苹果、东方苹果、森林苹果、大鲜果、西蜀海棠和褐海棠, 这一类大多为传统分类学中的

真苹果组, 但还包括了花楸苹果组的三叶海棠、陇东海棠、西蜀海棠和褐海棠。第二小类: 锡金海棠、山楂海棠、变叶海棠、花叶海棠、沧江海棠、河南海棠、滇池海棠和小金海棠, 这类主要包括了传统分类学中的花楸苹果组, 但却包括了真苹果组的锡金海棠。第三小类: 台湾林檎, 为传统分类学中的多胜海棠组。第四小类: 草原海棠和窄叶海棠, 为传统分类学中的绿苹果组。

在 $GS=0.744$ 时, 山楂海棠和台湾林檎分别作为一个单独的小类, 与其他供试材料保持了更多的独立性(图 2)。

2.3 主坐标聚类分析

采用主坐标分析法对 33 份材料聚类结果(图 3)分析发现: 33 份供试材料分为 3 个大类。梨属 3 个种作为第一大类; 苹果属的台湾林檎、草原海棠和窄叶海棠 3 个种作为第二大类, 其中草原海棠和窄叶海棠亲缘关系更近, 其余 27 种组成第三大类, 同 UPGMA 法聚类结果相同。其中第三大类又分为 4 个小类组, 第 1 小类包括: 山楂海棠、沧江海棠和滇池海棠, 沧江海棠与滇池海棠亲缘关系较近; 第 2 小类包括锡金海棠、变叶海棠和花叶海棠 3 份材料; 第 3 小类包括: 山荆子、毛山荆子、丽江山荆子、湖北海棠、海棠花、西府海棠、三叶海棠、陇东海棠、西蜀海棠、河南海棠、大鲜果和小金海棠; 第 4 小类包括: 垂丝海棠、新疆野苹果、槟子、楸子、扁棱海棠、中国苹果、东方苹果、森林苹果和褐海棠。

2.4 群体结构分析

利用 Structure 2.3.1 软件对 33 份供试材料的群

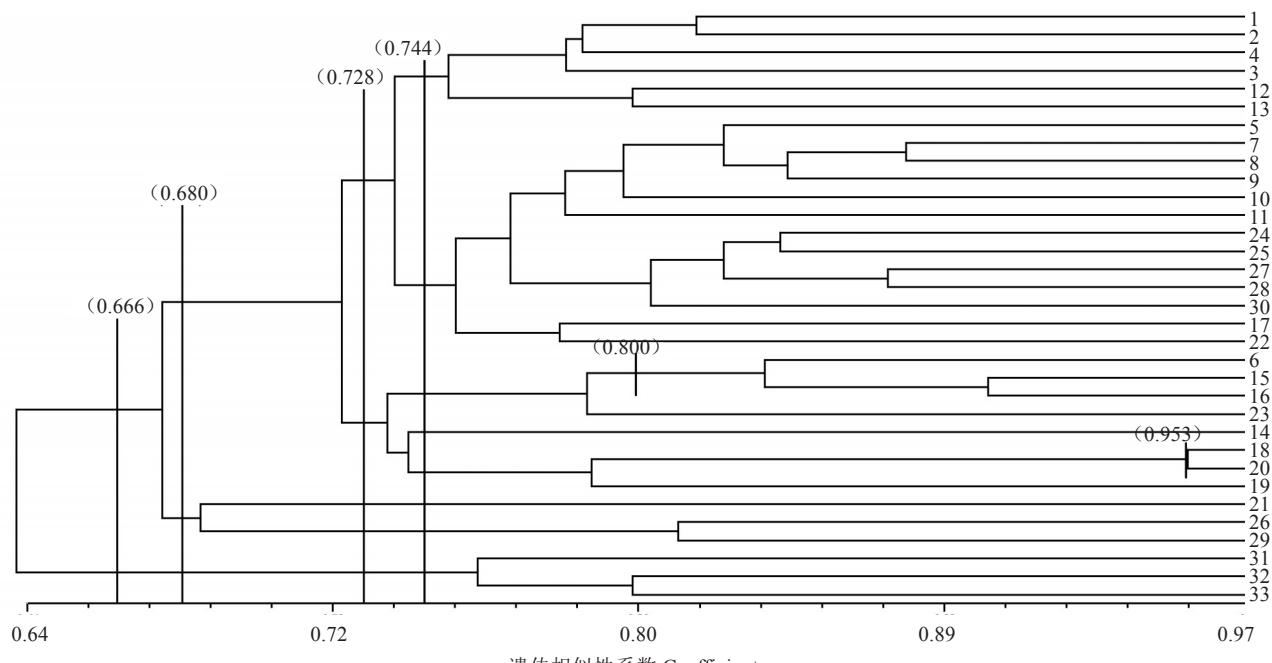


图 2 33 份苹果属和梨属材料的遗传多样性聚类分析

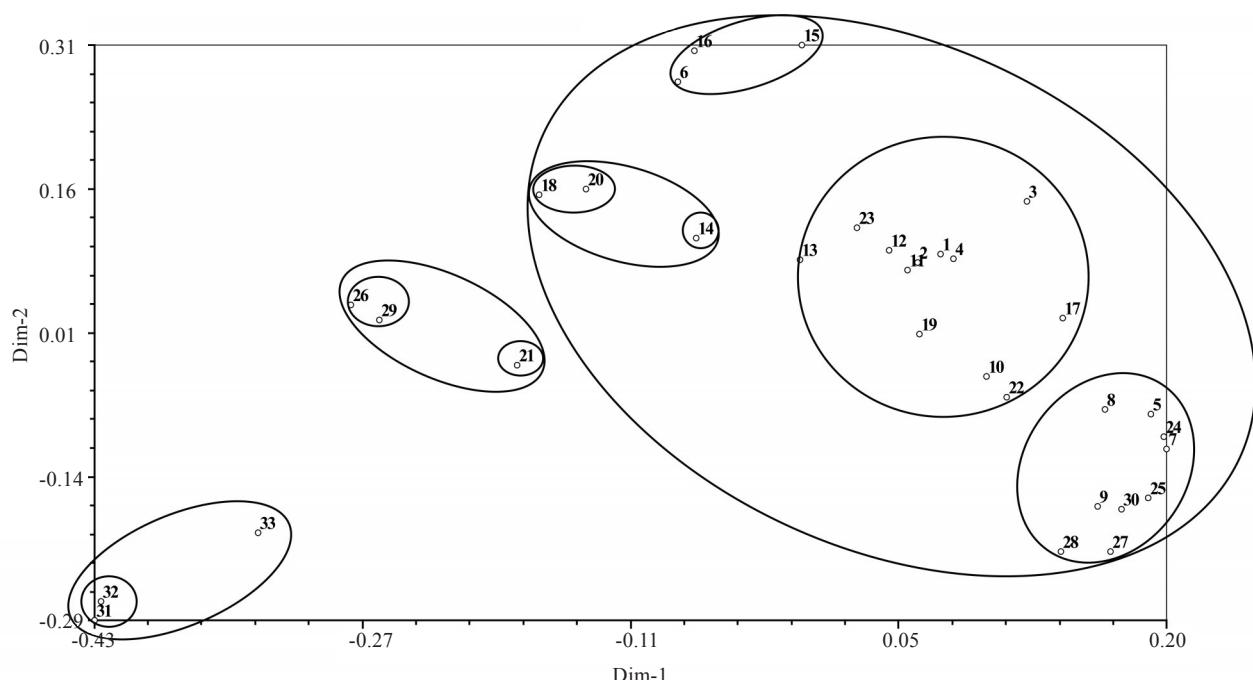
Fig. 2 Cluster analysis of 33 materials between *Malus* and *Pyrus* base on TRAP data

图 3 33 份苹果属和梨属材料主坐标聚类分析

Fig. 3 Principal coordinates of *Malus* and *Pyrus* 33 materials base on TRAP data

体结构分析表明,样本的等位基因频率特征类型数K呈现持续增加趋势(图4-A),当K=3时 ΔK 的取值最大(图4-B),参照Evanno等^[31]的研究,将33份供试材料分为3个亚群,绘制供试种质群体结构图(图5),由此将33份供试材料分为3个亚群。第一亚群

包括:山荆子、毛山荆子、丽江山荆子、锡金海棠、三叶海棠、陇东海棠、山楂海棠、变叶海棠、花叶海棠、沧江海棠、滇池海棠、小金海棠和草原海棠13种;第二亚群包括:湖北海棠、垂丝海棠、新疆野苹果、槟子、楸子、海棠花、西府海棠、西蜀海棠、河南海棠、大

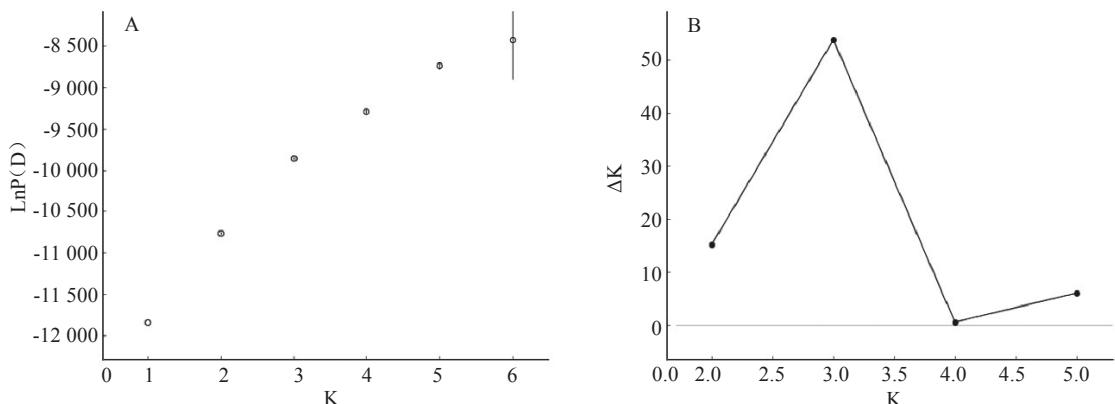


图4 K 值与 $\ln P(D)$ 折线图(A)及 K 值与 ΔK 值折线图(B)
Fig. 4 Line chart of K and $\ln P(D)$ (A) and ΔK with the change of K values (B)

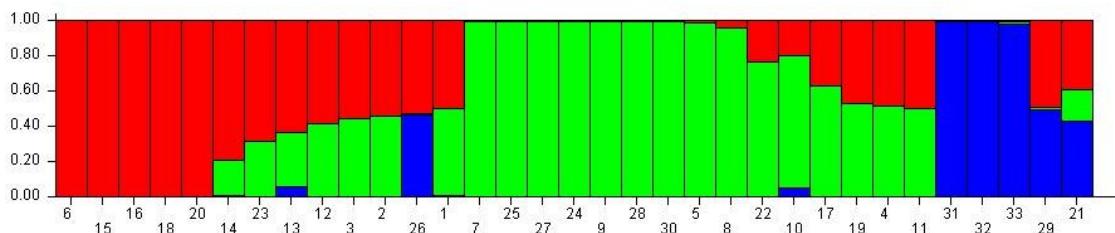


图5 基于TRAP标记的33份供试材料群体遗传结构
Fig. 5 Population structure of 33 materials based on TRAP markers

鲜果、扁棱海棠、中国苹果、东方苹果、森林苹果和褐海棠15个种;第三亚群包括台湾林檎、窄叶海棠和3个梨属种。

当 $K=3$ 时,3个亚群的遗传固定指数分别为0.384 7、0.438 9、0.439 6皆大于0.05,说明3个亚群可独立成群。第三亚群类包括编号苹果属2个种及梨属3个种材料,这也印证了苹果属和梨属是2个亲缘关系较近的属,可能属间曾有过部分基因的交

流。当 $K=3$ 时从33份材料的最大协变量Q值的分布看,23份材料的协变量 $Q \geq 0.6$,占供试材料的69.7%,说明此部分材料间的亲缘关系单一。10份材料的协变量 $Q < 0.6$,占供试材料的30.3%,说明山荆子、毛山荆子、丽江山荆子、湖北海棠、西府海棠、三叶海棠、河南海棠、台湾林檎、草原海棠和窄叶海棠10种的遗传背景复杂,材料间亲缘关系也较为复杂(表3和表4)。

表3 数学模型的各类群最大Q值分布表

Table 3 Distribution of Q-value of lines in five groups by model-based cluster method

K值 K value	群体 Groups	亚群亲本数 Number of parent materials	Q值范围 Ranges of Q				
			$Q < 0.6$	$Q \geq 0.6$	$Q \geq 0.7$	$Q \geq 0.8$	$Q \geq 0.9$
K=3	1 红色 Red	13	5(38.46%)	2(15.38%)	1(7.69%)	0(0%)	5(38.46%)
	2 绿色 Green	15	3(20.00%)	1(6.67%)	2(13.33%)	0(0%)	9(60.00%)
	3 蓝色 Blue	5	2(40.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0%)	3(60.00%)

表4 $K=3$ 时协变量Q范围内的材料数

Table 4 Numbers of materials in the ranges of covariate Q when $K=3$

K的取值 K value	Q值范围 Ranges of Q			
	$Q < 0.5$	$0.5 \leq Q < 0.6$	$0.6 \leq Q < 0.9$	$Q \geq 0.9$
K=3	3(9.09%)	7(21.21%)	6(18.18%)	17(51.52%)

3 讨论

本研究中16对引物组合在供试的33份材料中共扩增出407条有效条带,其中多态性条带404条,多态性百分率达99.26%,平均每对引物扩增出有效条带为25.44条。而李政等^[32]使用80个SSR标记对

48份苹果材料分析获得有效位点254个,平均每对引物8.47个,以及高源等^[3]利用19对荧光SSR标记对155份苹果属栽培种楸子的遗传多样性进行分析,获得390个等位基因,平均20.526个。与以上研究结果相比,本研究的TRAP标记检测分析中单标记能扩增到的有效条带数更多,每组引物贡献的有效条带更为丰富。说明TRAP标记在苹果属种间的遗传分析中可以获取更为丰富的遗传信息,可作为苹果属材料遗传分析的优选标记。

在UPGMA法进行聚类时显示,当GS=0.666时可将供试材料分为2个大类,能清楚地分开苹果属材料与梨属材料,对不同属材料的有效区分,说明TRAP标记的可靠性。当GS=0.680时苹果属材料分为I、II两个亚类,亚类I包括传统分类学中的真苹果组和花楸苹果组,亚类II包括了传统分类学中的多胜海棠组和绿苹果组,这一结果与Robinson等^[7]利用matK和ITS序列及张宁等^[33]和李佳等^[34]用AFLP研究的结果相似,多胜海棠组和绿苹果组亲缘关系相近,真苹果组和花楸苹果组亲缘关系相近。在分子系统学研究中多数研究者认为,三叶海棠与真苹果组中的山荆子系相近,本研究也支持这一结论。锡金海棠的归属一直存在较大争议,形态学中它既有真苹果组中的特征又有花楸苹果组中的特征,当GS=0.800时以及主坐标分析中都将锡金海棠与变叶海棠和花叶海棠3个种单独为1个分支,这说明锡金海棠与花楸苹果组中的变叶海棠和花叶海棠亲缘关系更近。27个种归属亚类I的结果显示,苹果属种间遗传基础狭窄,与高源等^[3]利用荧光SSR标记在155份苹果属栽培种楸子及269份苹果属山荆子^[35]中的研究结果相似。当GS=0.680时,亚类II中东南亚苹果基因中心的国内种地域间并无明显的界限,说明国内苹果属种间基因交流广泛,遗传基础狭窄;而西亚苹果基因中心高加索材料东方苹果,北美洲苹果基因中心的褐海棠归属亚类I,说明在起源上种质资源有基因交流,但东亚苹果基因中心的台湾林檎及北美洲苹果基因中心的草原海棠和窄叶海棠独立为亚类II也说明对外引种有一定的空间,对丰富国内种质资源遗传背景、进行种间远缘杂交,向外引种拓展种质资源的遗传基础依然具有重要的意义。

尽管UPGMA法聚类图与主坐标聚类结果与传统系谱相近,但在组、系的分类阶元上存在着明显的

差异,可能与苹果属植物既有野生种又有栽培种,还有许多种间杂种有关,在分子水平上的亲缘关系分析可能会与利用某些性状为基础的形态学亲缘关系分析存在一定差异,而且不同的分子标记技术之间也可能存在差异。比如前人研究认为中国苹果由新疆野苹果进化而来,但二者却没有单独聚在一起,扁棱海棠和西府海棠应归为1个种,但二者也没有聚在一起,这些都需要新的证据来补充。

基于数学模型的群体结构分析是关联分析的前提^[36-37],也是关联作图的重要因素。以上结果中UPGMA法聚类同主坐标分析的聚类材料所属类群符合度较高,但群体结构分析的结果同以上两种分类方式有一定的差异,可能是因为GS聚类是基于遗传距离的聚类,主要体现材料间亲缘上的远近关系,而群体结构分析的聚类是基于哈德温伯格的数学模型,避免了主观因素的干扰,因此通过群体结构的分析,为后期精确关联作图奠定了基础。当K取值为3时从33份材料的最大协变量Q值的分布看,23份材料的协变量Q≥0.6,占供试材料的69.7%,说明此部分材料间的亲缘关系单一;根据群体结构分析材料归属情况显示,分类结果与地理来源关系不明显,这一结果同高源等^[34]在苹果属山荆子中的研究相似。为丰富苹果属种质资源的遗传多样性,需要引进更多野生资源或国外种质资源。

利用TRAP标记技术从EST水平上分析了苹果属30个种、梨属3个种共33份材料的遗传背景,结果显示:UPGMA法聚类结果与主坐标聚类结果相似性较高,与传统系谱相近,但与群体结果分析存在一定差异,探讨了各种间的亲缘关系,为苹果属种间亲缘关系分析提供了分子证据。

参考文献 References:

- [1] 段乃彬.栽培苹果起源、演化及驯化机理的基因组学研究[D].泰安:山东农业大学,2017.
DUAN Naibin. Genomic analyses provide new insights into apple evolution, domestication and genetic diversity[D]. Tai' an: Shandong Agricultural University, 2017.
- [2] 辛培刚,相法国,陈学森,沈向,林尚安.我国原生、引入和育成苹果品种的类群划分及亲本溯源[J].山东农业大学学报(自然科学版),1998,29(2): 189-200.
XIN Peigang, XIANG Faguo, CHEN Xuesen, SHEN Xiang, LIN Shang'an. Classification of and relation for the native, introduced and bred apple cultivars in China[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 1998, 29

- (2): 189-200.
- [3] 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. 苹果属栽培种楸子的遗传多样性与遗传结构分析[J]. 植物遗传资源学报,2019,20(1): 48-59.
GAO Yuan, WANG Kun, WANG Dajiang, ZHAO Jirong, ZHANG Caixia, CONG Peihua, LIU Lijun, LI Lianwen, PIAO Jicheng. The genetic diversity and population structure analysis of cultivated species *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. of *Malus* Mill.[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 48-59.
- [4] 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srp分析[J]. 园艺学报,2009,36(1):7-14.
ZHANG Chunyu, CHEN Xuesen, LIN Qun, YUAN Zhaohe, ZHANG Hong, ZHANG Xiaoyan, LIU Chongqi, WU Chuanjin. SRAP markers for population genetic structure and genetic diversity in *Malus sieversii* from Xinjiang, China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(1): 7-14.
- [5] 陆秋农,贾定贤. 中国果树志·苹果卷[M]. 北京:中国农业科技出版社,中国林业出版社,1999.
LU Qiong, JIA Dingxian. Chinese fruit tree Zhi: Apple roll [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, China Forestry Press, 1999.
- [6] 邢丽敏,槐心体,张新忠,王忆,韩振海. 苹果实生砧木资源重要性状的遗传多样性分析[J]. 果树学报,2013,30(4): 516-525.
XING Limin, HUAI Xinti, ZHANG Xinzong, WANG Yi, HAN Zhenhai. Genetic diversity in morphology, stress tolerance and graft-compatibility among species, ecotypes and their segregation within populations of apple rootstock resources[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(4): 516-525.
- [7] ROBINSON J P, HARRIS S A, JUNIPER B E. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh.[J]. Plant Systematics and Evolution, 2001, 226(1/2): 35-58.
- [8] 徐榕雪,汤庚国. 观赏及砧木用苹果品种的SRAP-PCR反应体系优化及其多态性检测[J]. 河北农业大学学报,2016,39(5): 69-74.
XU Rongxue, TANG Gengguo. Optimization of SRAP-PCR and polymorphism detection of apple (*Malus* Mill.) cultivars for ornamental and stock usage[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2016, 39(5): 69-74.
- [9] 高源,刘凤之,曹玉芬,王昆. 苹果属种质资源亲缘关系的SSR分析[J]. 果树学报,2007,24(2): 129-134.
GAO Yuan, LIU Fengzhi, CAO Yufen, WANG Kun. Analysis of genetic relationship for *Malus* germplasm resources by SSR-markers[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(2): 129-134.
- [10] 李佳,石琰璟,沙广利,黄粤,马荣群,孙吉禄. 基于AFLP和SSR分子标记的苹果属植物亲缘关系研究[J]. 中国农学通报,2014,30(4): 113-119.
LI Jia, SHI Yanjing, SHA Guangli, HUANG Yue, MA Rongqun, SUN Jilu. The genetic relationship of malus species based on AFLP and SSR markets analysis[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(4): 113-119.
- [11] 徐曼,李厚华,郭亦博,赵冰,王亚杰,高艳. 苹果属海棠亲缘关系的AFLP分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(8): 159-164.
XU Man, LI Houhua, GUO Yibo, ZHAO Bing, WANG Yajie, GAO Yan. AFLP analysis on genetic relationship of crabapples [J]. Journal of Northwest A & F University(Natural Science Edition), 2015, 43(8): 159-164.
- [12] 王亚楠,韩莹琰,范双喜,卜斌. 紫色叶用莴苣遗传多样性及亲缘关系的TRAP分析[J]. 中国蔬菜,2015(3): 25-32.
WANG Yanan, HAN Yingyan, FAN Shuangxi, BU Bin. Analysis of genetic diversity and relationship in purple lettuce by TRAP technique[J]. China Vegetables, 2015(3): 25-32.
- [13] HU J G, VICK B A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(3): 289-294.
- [14] LI J, KLINDWORTH D L, SHIREEN F, CAI X, HU J, XU S S. Molecular characterization and chromosome-specific TRAP-marker development for Langdon durum D- genome disomic substitution lines[J]. Genome, 2006, 49(12): 1545-1554.
- [15] 郭春芳,唐玉海,孙云,张木清. 11个茶树品种遗传多样性的ISSR和TRAP比较分析[J]. 中国农学通报,2008,24(1): 340-346.
GUO Chunfang, TANG Yuhai, SUN Yun, ZHANG Muqing. Comparison of genetic diversity of eleven tea (*Camellia sinensis*) cultivars using ISSR and TRAP markers[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(1): 340-346.
- [16] 李会彬,赵玉婧,梁中银,郭丽果,王丽宏,边秀举. 基于SRAP和TRAP标记的河北野生狗牙根种质遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(5): 1013-1019.
LI Huibin, ZHAO Yujing, LIANG Zhongyin, GUO Liguo, WANG Lihong, BIAN Xiuju. Genetic diversity analysis of wild bermudagrass (*Cynodon dactylon*) using SRAP and TRAP markers in Hebei province[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(5): 1013-1019.
- [17] 阙友雄,陈天生,许莉萍,陈如凯. 甘蔗重要种质的TRAP标记遗传多样性分析[J]. 农业生物技术学报,2009,17(3): 496-503.
QUE Youxiong, CHEN Tiansheng, XU Liping, CHEN Rukai. Genetic diversity among key sugarcane clones revealed by TRAP markers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(30): 496-503.
- [18] 王一伊,向秋燕,阎文昭,蒲志刚,邢小军,刘东阳,冯俊彦. 利用TRAP标记分析83份烟草种质资源遗传多样性及遗传演化关系[J]. 西南农业学报,2016,29(3): 503-510.
WANG Yiyi, XIANG Qiuyan, YAN Wenzhao, PU Zhigang, XING Xiaojun, LIU Dongyang, FENG Junyan. Assessment of genetic diversity and evolutionary relatives of 83 tobacco germ-

- plasms based on TRAP markers[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2016, 29(3): 503-510.
- [19] 王庆浩, 张伯礼. 不同产地丹参的 TRAP 分子标记研究[J]. 药学学报, 2009, 44(8): 927-930.
WANG Qinghao, ZHANG Bolix. TRAP analysis of *Salvia miltiorrhiza* Bge from different places of production[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2009, 44 (8): 927-930.
- [20] 刘玲, 吴睿, 牛志韬, 薛庆云, 刘薇, 丁小余. 基于 TRAP 分子标记的铁皮石斛野生居群的分析与鉴别[J]. 药学学报, 2016, 51(12): 1926-1933.
LIU Ling, WU Rui, NIU Zhitao, XUE Qingyun, LIU Wei, DING Xiaoyu. Molecular identification of wild populations of *Dendrobium officinale* based on target region amplification polymorphism[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2016, 51 (12): 1926-1933.
- [21] CARMO C D, SANTOS D B, ALVES L B, OLIVEIRA G A F, OLIVEIRA E J. Development of TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) as new tool for molecular genetic analysis in *Cassava*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33 (6): 1953-1966.
- [22] SIMOES K S, SILVA S A, MACHADO E L, BRASILEIRO H S. Development of TRAP primers for *Ricinus communis* L.[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(2): 100-113.
- [23] SIMOES K S, SILVA S A, MACHADO E L, SILVA M S. Genetic divergence in elite castor bean lineages based on TRAP markers[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(3): 100-112.
- [24] QIU C S, YAN W J, DENG W Q, SONG B, LI H H. Genetic diversity analysis of *Hypsizygus marmoreus* with target region amplification polymorphism[J]. The Scientific World Journal, 2014: 1-7.
- [25] 宋艳艳, 谢士昌, 高小宁, 冯浩, 黄丽丽, 韩青梅. 陕西关中地区苹果褐斑病菌遗传多样性分析[J]. 西北农业学报, 2018, 27 (10): 1-8.
SONG Yanyan, XIE Shichang, GAO Xiaoning, FENG Hao, HUANG Lili, HAN Qingmei. Genetic diversity of *Diplocarpon mali* isolated from Guanzhong plain of Shaanxi province[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(10): 1-8.
- [26] 高华, 樊红科, 万怡震, 王雷存, 赵政阳, 王西平. 苹果栽培品种的 SSR 鉴定及遗传多样性分析[J]. 西北农业学报, 2011, 20 (2): 153-158.
GAO Hua, FAN Hongke, WAN Yizhen, WANG Leicun, ZHAO Zhengyang, WANG Xiping. SSR analysis of genetic diversity of apple cultivars[J].Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2011, 20(2): 153-158.
- [27] 韩骞, 王辉, 王进茂, 赵健如, 杨敏生. 利用 SSR 引物通用性分析杨柳科树种遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 904-911.
HAN Qian, WANG Hui, WANG Jinmao, ZHAO Jianru, YANG Minsheng. Genertic diversity analysis of Salicaceae cultivars by transferability of SSR primers[J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(5): 904-911.
- [28] 刘卫国, 易干军, 张秋明, 刘岩. 菠萝 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 51-54.
LIU Weiguo, YI Ganjun, ZHANG Qiuming, LIU Yan. Extraction of DNA and construction of AFLP fingerprinting in pineapple[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(1): 51-54.
- [29] HU J G, VIVCK B A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(30): 289-294.
- [30] GUPTA P K, RUSTGI S, KULWAL P L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 57(4): 461-485.
- [31] EVANNO G S, REGNAUT S J, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14 (8): 2611-2620.
- [32] 李政, 左力辉, 杨敏生, 张军. 3 类苹果资源遗传多样性的 SSR 对比分析[J]. 河北农业大学学报, 2017, 40(40): 50-56.
LI Zheng, ZUO Lihui, YANG Minsheng, ZHANG Jun. Genetic diversity analysis of three apple populations by SSR markers[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2017, 40(4): 50-56.
- [33] 张宁, 沈红香, 高遐虹, 姚允聪, 王洋, 冯永庆. 苹果属部分观赏品种与中国野生种的亲缘关系[J]. 园艺学报, 2007, 34(5): 1227-1234.
ZHANG Ning, SHEN Hongxiang, GAO Xiaohong, YAO Yuncong, WANG Yang, FENG Yongqing. Phylogenetic relationship between ornamental and wild species of *Malus* in China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(5): 1227-1234.
- [34] 李佳, 石琰璟, 沙广利, 黄粤, 马荣群, 孙吉禄. 41 份苹果属植物亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 果树学报, 2013, 30(5): 725-731.
LI Jia, SHI Yanjing, SHA Guangli, HUANG Yue, MA Rongqun, SUN Jilu. The genetic relationship of 41 *Malus* germplasm resources revealed by AFLP analysis[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(5): 725-731.
- [35] 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.
GAO Yuan, WANG Kun, WANG Dajiang, ZHAO Jirong, ZHANG Caixia, CONG Peihua, LIU Lijun, LI Lianwen, PIAO Jicheng. The genetic diversity and population structure analysis on *Malus baccata* (L.) Borkh. from 7 sources[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(19): 3766-3777.
- [36] KLINE J B, MOORE D J, CLEVENGER C V. Activation and association of the Tec tyrosine kinase with the human prolactin receptor: mapping of a Tec/Vav1-receptor binding site[J]. Molecular Endocrinology, 2001, 15(5): 832-841.
- [37] HARRIS B P, STOKSBURY K D E. The spatial structure of local surficial sediment characteristics on Georges Bank, USA[J]. Continental Shelf Research, 2010, 30(17): 1840-1853.