

# 基于荧光 SSR 分析中国原产苹果属植物 17 个种的遗传多样性和遗传结构

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:**【目的】为探讨中国原产苹果属植物的遗传多样性水平以及种群间和种群内的遗传分化程度, 利用荧光 SSR 分子标记, 对新收集的中国原产苹果属植物 17 个种 798 份种质资源的遗传多样性和遗传结构进行分析。【方法】筛选 19 对多态性好的 SSR 引物检测苹果属植物 17 个种的多态性, 利用 GenAlEx 6.501 计算遗传多样性指标、分析种群间的分子变异(AMOVA), 利用 GenepopV4 和 Fstat293 分析种群间的遗传分化, 使用 STRUCTURE 2.3.4 进行贝叶斯聚类并分析种群的遗传结构。【结果】19 对 SSR 引物共检测出 500 个多态性等位基因, 平均等位基因数为 26.3, 平均有效等位基因数为 10.309, 观察杂合度和期望杂合度的平均值分别为 0.681 和 0.886, 香农多样性指数为 2.545。山荆子的观测等位基因数最多, 为 19.947; 中国苹果的有效等位基因数和香农多样性指数最高, 分别为 9.585 和 2.418; 13 个种群内遗传变异占 93%, 而种群间的遗传变异仅占 7%, 遗传变异不显著( $p > 0.001$ )。楸子和中国苹果间的遗传分化系数最低, 为 0.006; 变叶海棠和湖北海棠间的遗传分化系数最高, 为 0.253。【结论】17 种苹果属植物的遗传多样性高于前人对苹果属植物野生种的研究。遗传分化主要存在于种群内, 各种群间有基因交流, 但同时又抵制了由于基因漂变而导致的种群间的遗传分化。新疆野苹果和山荆子可能参与了部分中国苹果的演化过程, 除此之外, 八棱海棠也可能参与了部分中国苹果的起源演化过程。

**关键词:** 苹果属; 中国原产; 荧光 SSR; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)11-1611-12

## Genetic diversity and population structure of 17 species of *Malus* Mill. native to China based on fluorescent SSR analysis

GAO Yuan, WANG Dajiang, WANG Kun\*, CONG Peihua\*, 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 People's Republic of China, Xingcheng 125100, Liaoning, China)

**Abstract:** 【Objective】The study aimed to analyze genetic diversity and population structure of newly collected 798 germplasm resources of 17 species of *Malus* Mill. native to China using fluorescent SSR molecular markers in order to provide references for germplasm collection and preservation of *Malus* and the study of the phylogenetic evolution of each species. 【Methods】19 pairs of polymorphic SSR primers were screened to detect the polymorphism of 17 species of *Malus* Mill. GeneMapper3.0 was used to collect fluorescent labeling SSR data, and GenAlEx 6.501 was used to calculate the indexes of genetic diversity, such as number of polymorphic alleles ( $N_a$ ), number of effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), fixed index ( $F$ ) and shannon diversity index ( $I$ ), and to analyze the molecular variation (AMOVA) among populations. The genetic differentiation among populations were analyzed by GenepopV4 and Fstat293. The Bayesian cluster was carried out using STRUCTURE 2.3.4 to analyze the genetic structure of populations. The characteristic number of allele variation frequency (population number)  $K = 1-20$ , burn in cycle 100 000 and MCMC repetition

收稿日期: 2020-05-13 接受日期: 2020-08-14

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

作者简介: 高源, 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 苹果种质资源研究。Tel: 0429-3598369, E-mail: gaoyuan02@caas.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0429-3598120, E-mail: wangkun5488@163.com; Tel: 0429-3598103, E-mail: congph@163.com

100 000 were set. The mixed model and related allele frequency were used to run different K values for 10 times, and the log function  $\text{Lnp}(D)$  of delta K and likelihood value was calculated. The optimal K value was determined by modeling the number of gene pools (k). Clumpp 1.1.2 software was employed to process the distribution coefficient Q value (the estimation coefficient between each individual in each group) obtained by 10 independent runs, and Ddistract 1.1 software was used to optimize the graph.【Results】500 polymorphic alleles were detected by 19 pairs of SSR primers, with an average allele number of 26.3 and effective allele number of 10.309. The average values of heterozygosity and expected heterozygosity were 0.681 and 0.886 respectively, and the Shannon index was 2.545. The genetic diversity of 17 species of *Malus* was studied. The observed allele number of *Malus baccata* was 19.947. The effective allele number and Shannon index of *Malus domestica* subsp. *chinensis* were 9.585 and 2.418, respectively. The heterozygosity of all populations was higher than 0.5, indicating that the new collection of germplasm resources of *Malus* had not been artificially selected with high intensity, and the genetic diversity was relatively high. The first three species with the largest difference between expected heterozygosity and observed heterozygosity were *Malus yunnanensis*, *Malus ombrophila* and *Malus honanensis*, the next one was *Malus baccata*, and *Malus hupehensis* had the smallest difference. The genetic diversity of *Malus yunnanensis*, *Malus ombrophila* and *Malus honanensis* was the highest, while that of *Malus hupehensis* was the lowest. There were more heterozygotes in the populations of *Malus rockii*, *Malus hupehensis*, *Malus Komarovii*, *Malus transitoria*, *Malus toringoides*, *Malus yunnanensis*, *Malus ombrophila*, *Malus honanensis*, *Malus micromalus*. The genetic diversity of 798 accessions of *Malus* Mill. in this study ( $H_e=0.886$ ,  $I=2.545$ ,  $N_e=10.309$ ) was higher, among which *Malus sieversii* ( $H_e=0.814$ ,  $I=2.041$ ,  $N_e=6.054$ ), *Malus baccata* ( $H_e=0.848$ ,  $I=2.350$ ,  $N_e=8.652$ ), *Malus toringoides* ( $H_e=0.663$ ,  $I=1.355$ ,  $N_e=3.332$ ) and *Malus hupehensis* ( $H_e=0.2628$ ,  $I=0.4015$ ,  $N_e=1.4375$ ) had higher genetic diversity than those species in previous studies. Except for *Malus honanensis*, *Malus yunnanensis*, *Malus ombrophila* and *Malus komarovii* with only one accession in every group, the genetic variation in the remaining 13 populations accounted for 93%, while the genetic variation among populations accounted for only 7%, and the genetic variation was not significant ( $p > 0.001$ ). Different groups had different levels of gene exchange. The lowest genetic differentiation coefficient was 0.006 between *Malus prunifolia* and *Malus domestica* subsp. *chinensis*, followed by 0.007 between *Malus prunifolia* and *Malus asiatica*, and the highest genetic differentiation coefficient was 0.253 between *Malus toringoides* and *Malus hupehensis*. The analysis of population genetic structure of 798 accessions of 17 species showed that when  $k = 2$ ,  $\Delta K$  got the maximum value, and when  $K = 5$ , the rise of  $\text{Lnp}(D)$  slowed down, 5 was an important clustering point. The genetic sources of wild apple species in *Malus sieversii*, *Malus baccata*, *Malus rockii*, *Malus hupehensis*, *Malus halliana*, *Malus kansuensis*, *Malus Komarovii*, *Malus transitoria*, *Malus toringoides*, *Malus yunnanensis*, *Malus ombrophila*, *Malus honanensis* were relatively narrow. Among the five cultivated species tested, only part of *Malus domestica* subsp. *chinensis* contained a large number of genes from group 1, and the other four cultivated species contained a small number of genes from group 1, but mainly from other wild species.【Conclusion】19 pairs of SSR primers were highly polymorphic, and had high transferability between populations. They could be used for the evaluation of genetic diversity and population structure of different species of *Malus* Mill. The genetic diversity of 17 species of *Malus* was higher than that of previous studies. There are abundant genetic variations among and within the species of *Malus* native to China, which was beneficial to the adaptation of different species of *Malus* to various ecological environments. Genetic differentiation mainly existed in populations, and there was gene exchange among different populations, but at the same

time, the genetic differentiation among populations was resisted by gene drift. *Malus sieversii* and *Malus baccata* might be involved in the evolution of some of *Malus domestica* subsp. *chinensis*. In addition, *Malus robusta* might also be involved in the evolution of some of *Malus domestica* subsp. *chinensis*.

**Key words:** *Malus* Mill.; Native to China; Fluorescent SSR; Genetic diversity; Population structure

苹果属(*Malus* Mill.)属于蔷薇科(Rosaceae)、苹果亚科(Maloideae),自1754年苹果属建立以来,该属一直是人们研究的重要类群之一<sup>[1]</sup>。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,原产中国的苹果属植物中有自然分布区并订有学名未经整理的野生种21种,有栽培分布区的栽培种和杂交种共6种<sup>[2]</sup>。全世界除1万余个苹果品种外<sup>[3]</sup>,苹果属植物的许多种在生产中还可被用作砧木、观赏植物和食品加工材料等。苹果属植物野生种也越来越多地受到人们的关注。

中国拥有丰富的原始种和类型,至今许多地方仍有苹果属野生群落分布,如新疆野苹果等<sup>[2]</sup>。目前普遍认为我国苹果属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<sup>[4]</sup>。横断山脉分布区自然分布有西蜀海棠、滇池海棠、丽江山荆子、沧江海棠、小金海棠和马尔康海棠<sup>[5]</sup>以及湖北海棠、山荆子、变叶海棠、河南海棠、陇东海棠和花叶海棠等12种苹果属植物的野生种,以其独特的地理环境,使众多的苹果野生种及其种下类型在复杂的地理环境条件下得以生存。中国苹果属植物野生分布群落除了在两大密集分布区外,我国17个省或自治区均有苹果属植物野生种的分布,其中分布最为广泛的是野生种山荆子,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<sup>[6-7]</sup>。苹果属植物的遗传多样性研究以新疆野苹果为最多,研究内容涉及到表型、核型、孢粉学、化学和分子标记遗传多样性等方面;其次是变叶海棠和湖北海棠,对中国原产苹果属植物多个种的遗传多样性和遗传结构进行综合分析的研究尚未见报道。SSR标记以其丰富的多态性和共显性遗传等特点,被广泛应用于种间和种内的遗传变异分析<sup>[8-9]</sup>,已经成为植物和动物中最重要的分子标记<sup>[10]</sup>。荧光SSR分子标记技术是将SSR和荧光标记技术相结合,高度智能化,实现数据快速收集,工作效率高,避免人工读数造成误差,数据准确,适合大样本量鉴定<sup>[11]</sup>,已经广泛应用到遗传多样性等研究

中。国家苹果资源圃多年致力于中国原产苹果属植物种质资源收集和保存,截至2019年底已经收集保存苹果属植物种质资源1800余份。笔者筛选19对高效的荧光SSR引物对12个不同来源地区的17个种798份苹果属植物种质资源的遗传多样性和种群遗传结构进行分析,旨在揭示中国原产苹果属植物的遗传多样性水平以及种群间和种群内的遗传分化程度,以期为苹果属不同种的进一步有效收集和和保护、种内和种间的亲缘演化关系研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试苹果属17个种的798份种质分别来自于甘肃、河北、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、山东、山西、陕西、四川、新疆和云南共12个省份(表1)。其中有747份采自国家果树种质兴城梨、苹果圃(辽宁兴城),为近10a(年)野外考察新收集材料。在野外通过表型鉴定为苹果属相应的种之后,采集其野生群落的特异类型种质接穗,引入圃内无性繁殖后保存。46份采自国家果树种质公主岭寒地果树圃(吉林省公主岭),5份采自国家果树种质云南特有果树及砧木圃(云南省昆明市)。

### 1.2 方法

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。取2 μL在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,并利用紫外分光光度计检测浓度。

从Hokanson等<sup>[12]</sup>、Liebhard等<sup>[13]</sup>、Yamamoto等<sup>[14]</sup>和Guilford等<sup>[15]</sup>报道的序列中选取扩增产物片段长度为100~300 bp并经检测具有高度多态性的SSR引物19对,除GD15和NH015a在苹果染色体上的位置未知外,其余17对SSR引物均来源于编码区并分别定位于10条染色体上<sup>[14-16-17]</sup>,引物名称和序列见表2。其中,NH009b、NH015a和NZ28f4为梨SSR引物,NH015a定位于梨的第17号染色体上。SSR反向引物和5'端带有6FAM™荧光标记SSR正向引物由上海生工有限公司合成。

表 1 苹果属植物 17 个种的 798 份种质资源

Table 1 798 accessions of 17 species of *Malus* Mill. germplasm resources

序号 Code	供试种 Species	来源地 Origin	数量 Number	序号 Code	供试种 Species	来源地 Origin	数量 Number
1	新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	新疆 Xinjiang	267	13	中国苹果 <i>Malus domestica</i> subsp. <i>chinensis</i>	黑龙江 Heilongjiang	2
2	山荆子 <i>Malus baccata</i>	甘肃 Gansu	4			吉林 Jilin	23
		河北 Hebei	58			内蒙古 Inner Mongolia	1
		黑龙江 Heilongjiang	92			山东 Shandong	1
		吉林 Jilin	19			山西 Shanxi	10
		辽宁 Liaoning	1			新疆 Xinjiang	9
		内蒙古 Inner Mongolia	44	14	花红 <i>Malus asiatica</i>	甘肃 Gansu	1
		山西 Shanxi	15			河北 Hebei	42
		陕西 Shaanxi	1			黑龙江 Heilongjiang	7
3	丽江山荆子 <i>Malus rockii</i>	云南 Yunnan	2			云南 Yunnan	1
4	湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i>	河北 Hebei	1	15	楸子 <i>Malus prunifolia</i>	甘肃 Gansu	4
		云南 Yunnan	1			河北 Hebei	21
5	垂丝海棠 <i>Malus halliana</i>	甘肃 Gansu	12			黑龙江 Heilongjiang	5
6	陇东海棠 <i>Malus kansuensis</i>	甘肃 Gansu	4			吉林 Jilin	5
7	山楂海棠 <i>Malus komarovii</i>	吉林 Jilin	1			辽宁 Liaoning	5
8	花叶海棠 <i>Malus transitoria</i>	四川 Sichuan	10			内蒙古 Inner Mongolia	1
9	变叶海棠 <i>Malus toringoides</i>	四川 Sichuan	21			山西 Shanxi	9
		云南 Yunnan	1			陕西 Shaanxi	1
10	滇池海棠 <i>Malus yunnanensis</i>	云南 Yunnan	1			新疆 Xinjiang	3
11	沧江海棠 <i>Malus ombrophila</i>	云南 Yunnan	1	16	八棱海棠 <i>Malus robusta</i>	河北 Hebei	54
12	河南海棠 <i>Malus honanensis</i>	山西 Shanxi	1			吉林 Jilin	1
13	中国苹果 <i>Malus domestica</i> subsp. <i>chinensis</i>	甘肃 Gansu	4			山西 Shanxi	1
		河北 Hebei	26	17	西府海棠 <i>Malus micromalus</i>	河北 Hebei	4

表 2 19 对 SSR 引物及优化条件

Table 2 19 pairs of SSR primers and optimum conditions

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C
GD 12	TTGAGGTGTTTCTCCATTGGA	CTAACGAAGCCGCCATTCTTT	58
GD 15	CGAAAGTGAGCAACGAACTCC	ACTCCATCATCGGGTGGTG	59
GD 96	5'CGGCGGAAAGCAATCACCT	GCCAGCCCTCTATGGTTCCAGA	51
GD 100	ACAGCAAGGTGTGGGTAAGAAGGT	TGCGGACAAAGGAAAAAAAAAAGTG	60
GD 142	GGCACCCAAGCCCTAA	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	56
GD 162	GAGGCAAGTGACAAAGAAAGATG	AAAATGTAAACAACCCGTCCAAGTG	58
CH01h01	GAAAGACTTGCACTGGGAGC	GGAGTGGGTTGAGAAGGTT	56
CH01f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTGTTTTCTCCAGC	58
CH02d08	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	55
CH01d08	CTCCGCCGTATAACACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	60
CH01f07a	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTTGAGCGTAGGAAC	58
COLa	AGGAGAAAGGCGTTTACCTG	GACTCATTCTTCGTCGTCCTG	59
CH05e03	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG	CAAGTTGTGTACTGCTCCGAC	60
CH02d12	AACCAGATTGCTTGCCATC	GCTGGTGGTAAACGTGGTG	60
CH02b10	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	56
CH01d09	GCCATCTGAACAGAATGTGC	CCCTTCATTCACATTTCCAG	56
NH009b	CCGAGCACTACCATTGA	CGTCTGTTTACCGTTCT	58
NH015a	TTGTGCCCTTTTTCTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG	59
NZ28f4	TGCCTCCCTTATATAGCTAC	TGAGGACGGTGAGATTTG	57



PCR体系参照Cao等<sup>[8]</sup>的方法,扩增产物的纯化体系参照高源等<sup>[9]</sup>的方法。PCR反应在Bio-Rad PTC-200上进行。荧光SSR的PCR产物经过纯化后在美国ABI 3730基因测序仪上进行荧光检测,收集原始数据。

### 1.3 数据统计与分析

利用GeneMapper3.0软件对ABI3730收集数据进行分析,获得不同样品在每个SSR位点的扩增片段长度。利用遗传数据分析软件GenAlEx 6.501计算多态性等位基因数( $N_a$ )、SSR位点的有效等位基因数( $N_e$ )、观察杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、固定指数( $F$ )及香农多样性指数( $I$ )等遗传多样性指标,并分析种群间的分子变异(AMOVA)。利用GenePopV4和Fstat293计算种群间的遗传分化系数 $F_{st}$ 和遗传多样性 $H_t$ 、种群内遗传多样性 $H_s$ 、种群间的遗传多样性 $D_{st}$ 、遗传分化系数 $G_{st}$ 和基因流 $N_m$ 。使用STRUCTURE 2.3.4进行贝叶斯聚类<sup>[20]</sup>,分析种群遗传结构并确定最佳的分组。首先设定等位变异频率特征数(遗传群体数) $K = 1 \sim 20$ ,设定Burn-in周期为100 000, MCMC的重复次数为100 000次,采用混合模型和相关等位基因频率,对不同的K值进行10次重复运行,然后将后缀为“\_f”的结果文件压缩,上传到“STRUCTURE HARVESTER”网站([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)),计算得到Delta K和似然值的对数函数 $\text{Ln}p(D)$ ,分别针对基因库数目(K)建模,确定最佳K值。利用CLUMPP 1.1.2软件处理10次独立运行得到的分配系数Q值(即每一个类群内每个个体之间的估测系数),然后使用DISTRICT 1.1软件将计算结果进行图形化输出。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR扩增产物的多态性

利用19对具有明显多态性的荧光SSR引物对苹果属17个种798份种质的基因组DNA进行扩增,共扩增出500个多态性等位基因( $N_a$ ),多态性等位基因数为19(NZ28f4)~37(GD12),平均等位基因数为26.3(表3)。每份样品在每个位点产生2个相同(单峰)或不同(双峰)的等位基因。有效等位基因数( $N_e$ )为3.944(NZ28f4)~21.983(CH01d08),平均值为10.309。观察杂合度( $H_o$ )为0.506~0.791,平均值为0.681。期望杂合度( $H_e$ )为0.746~0.955,平均期望杂合度为0.886。香农多样性指数( $I$ )为1.831~

表3 不同SSR位点的遗传多样性特征

Table 3 The characteristics of genetic diversity of different SSR loci

位点 Locus	等位基 因数 $N_a$	有效等位 基因数 $N_e$	香农多样 性指数 $I$	观察杂 合度 $H_o$	期望杂 合度 $H_e$
GD12	37.000	9.517	2.618	0.612	0.895
GD15	24.000	4.747	1.831	0.742	0.789
GD96	31.000	11.700	2.720	0.761	0.915
GD100	21.000	9.875	2.493	0.706	0.899
GD142	28.000	13.181	2.764	0.596	0.924
GD162	24.000	11.283	2.721	0.773	0.911
CH01h01	21.000	8.462	2.472	0.526	0.882
CH01f02	23.000	11.294	2.666	0.637	0.911
CH02d08	26.000	6.514	2.292	0.707	0.846
CH01d08	36.000	21.983	3.264	0.791	0.955
CH01f07a	23.000	11.228	2.700	0.756	0.911
COLa	22.000	9.056	2.512	0.647	0.890
CH05e03	29.000	13.190	2.793	0.506	0.924
CH02d12	26.000	12.406	2.736	0.779	0.919
CH02b10	31.000	9.299	2.527	0.706	0.892
CH01d09	29.000	8.781	2.574	0.543	0.886
NH009b	29.000	13.943	2.827	0.726	0.928
NH015a	21.000	5.469	2.003	0.708	0.817
NZ28f4	19.000	3.944	1.851	0.722	0.746
平均值 Mean	26.316	10.309	2.545	0.681	0.886

3.264,平均值为2.545。

### 2.2 苹果属17个种的遗传多样性分布

对苹果属17个供试种的遗传多样性进行研究(表4),山荆子的观测等位基因数最多,为19.947;中国苹果的有效等位基因数和香农多样性指数最高,分别为9.585和2.418;全部种群的杂合度均高于0.5,说明新收集的苹果属植物种质资源材料均未经过高强度的人工选择,遗传多样性相对较高。根据杂合度的意义,杂合度观测值和杂合度期望值的相近程度也可以衡量种群的遗传多样性,它们的值越接近,种群遗传多样性越高。丽江山荆子的观察杂合度最高,为0.816;中国苹果的期望杂合度最高,为0.875;期望杂合度与观察杂合度差值最大前3个种依次为滇池海棠、沧江海棠和河南海棠,其次为山荆子,最小的为湖北海棠。湖北海棠的遗传多样性最低,而滇池海棠、沧江海棠和河南海棠的遗传多样性最高,这3个种虽然均只有1份材料,说明这3个种的供试材料具有代表性,除此3个种之外,遗传多样性较高的为山荆子。固定指数在丽江山荆子、湖北海棠、山楂海棠、花叶海棠、变叶海棠、滇池海棠、沧

表4 苹果属17个种的遗传多样性

Table 4 The genetic diversity among the 17 species of *Malus* Mill.

苹果属17个种 17 species of <i>Malus</i> Mill.	等位基因数 $N_a$	有效等位基因数 $N_e$	香农多样性指数 $I$	观察杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	固定指数 $F$
新疆野苹果 <i>Malus sieversii</i>	17.526	6.054	2.041	0.687	0.814	0.154
山荆子 <i>Malus baccata</i>	19.947	8.652	2.350	0.612	0.848	0.275
丽江山荆子 <i>Malus rockii</i>	3.263	3.119	1.106	0.816	0.632	-0.296
湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i>	2.789	2.579	0.912	0.579	0.539	-0.050
垂丝海棠 <i>Malus halliana</i>	9.737	6.590	2.013	0.768	0.824	0.072
陇东海棠 <i>Malus kansuensis</i>	4.158	3.324	1.267	0.592	0.674	0.120
山楂海棠 <i>Malus komarovii</i>	1.368	1.368	0.255	0.368	0.184	-1.000
花叶海棠 <i>Malus transitoria</i>	5.526	3.485	1.379	0.732	0.685	-0.079
变叶海棠 <i>Malus toringoides</i>	6.316	3.332	1.355	0.785	0.663	-0.165
滇池海棠 <i>Malus yunnanensis</i>	1.737	1.737	0.511	0.737	0.368	-1.000
沧江海棠 <i>Malus ombrophila</i>	1.684	1.684	0.474	0.684	0.342	-1.000
河南海棠 <i>Malus honanensis</i>	1.526	1.526	0.365	0.526	0.263	-1.000
中国苹果 <i>Malus domestica</i> subsp. <i>chinensis</i>	17.526	9.585	2.418	0.699	0.875	0.202
花红 <i>Malus asiatica</i>	14.474	7.710	2.230	0.715	0.853	0.159
楸子 <i>Malus prunifolia</i>	17.421	9.019	2.412	0.732	0.870	0.153
八棱海棠 <i>Malus robusta</i>	15.263	7.453	2.240	0.774	0.854	0.090
西府海棠 <i>Malus micromalus</i>	4.526	3.814	1.370	0.776	0.706	-0.117

江海棠、河南海棠和西府海棠中均为负值,相比于其他种群的杂合子较多。

平均有效等位基因数( $N_e$ )、平均香农指数( $I$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )等是评价遗传多样性的重要指标。17个种的798份苹果属植物材料的遗传多样性( $H_e=0.886, I=2.545, N_e=10.309$ )较高,其中新疆野苹果(*Malus sieversii*,  $H_e=0.814, I=2.041, N_e=6.054$ )、山荆子( $H_e=0.848, I=2.350, N_e=8.652$ )、变叶海棠( $H_e=0.663, I=1.355, N_e=3.332$ )和湖北海棠( $H_e=0.539, I=0.912, N_e=0.579$ )等的遗传多样性均高于以往研究的新疆野苹果(*Malus sieversii*,  $H_e=0.2619, I=0.4082, N_e=1.4252$ )<sup>[21]</sup>、山荆子遗传多样性(*Malus baccata*,  $H_e=0.3386, I=0.4961, N_e=1.6021$ )<sup>[22]</sup>、( $I=0.5285, N_e=1.6169$ )<sup>[23]</sup>、变叶海棠(*Malus toringoides*,  $H_e=0.4389, I=0.6282, N_e=1.81$ )<sup>[24]</sup>和湖北海棠(*Malus hupehensis*,  $H_e=0.2628, I=0.4015, N_e=1.4375$ )<sup>[25]</sup>的遗传多样性。

### 2.3 苹果属17个种的遗传分化

如表5所示,以供试苹果属每个种作为种群计算种群间的遗传分化系数,除去只有1份材料的河南海棠、滇池海棠、沧江海棠和山楂海棠,其余13个种群内遗传变异占93%,而种群间的遗传变异仅占7%,遗传变异不显著( $p > 0.001$ )。

基于SSR数据计算苹果属13个种群的遗传分

表5 13个苹果属植物种群的分子变异分析

Table 5 Analysis of molecular variance for 13 populations of *Malus* Mill.

变异来源 Source of variation	自由度 $df$	平方和 Sum of square	均方差 Mean square error	变异百分比 Percentage of variation/%
种群间 Among populations	12	827.298	68.942	7
种群内 Within populations	1575	12538.359	7.961	93
总和 Total	1587	13365.657		100

化系数(表6),揭示苹果属各种之间的遗传差异和基因流。13个种之间的两两遗传分化系数为0.006~0.253,其中楸子和中国苹果间的遗传分化系数最低(0.006),其次为楸子和花红间的遗传分化系数(0.007),变叶海棠和湖北海棠间的遗传分化系数最高,为0.253。

花红与中国苹果、西府海棠、楸子、八棱海棠、丽江山荆子和山荆子间的遗传分化系数分别为0.012、0.038、0.007、0.044、0.032和0.040;中国苹果与西府海棠、楸子、八棱海棠、丽江山荆子、山荆子和垂丝海棠间的遗传分化系数分别为0.033、0.006、0.034、0.023、0.035和0.043;楸子与西府海棠、八棱海棠、丽江山荆子、山荆子和垂丝海棠间的遗传分化系数分别为0.030、0.032、0.025、0.029、0.040;八棱海棠与丽江山荆子和山荆子间的遗传分化系数分别为0.064、

表 6 苹果属植物 13 个种群的遗传分化  
Table 6 The genetic differentiation of 13 populations of *Malus* Mill.

花红	中国苹果	西府海棠	楸子	八棱海棠	丽江山荆子	山荆子	垂丝海棠	湖北海棠	陇东海棠	新疆野苹果	变叶海棠	花叶海棠
<i>Malus asiatica</i>	<i>Malus domestica</i> subsp. <i>chinensis</i>	<i>Malus micromalus</i>	<i>Malus prunifolia</i>	<i>Malus robusta</i>	<i>Malus rockii</i>	<i>Malus baccata</i>	<i>Malus halliana</i>	<i>Malus hupehensis</i>	<i>Malus kansuensis</i>	<i>Malus sieversii</i>	<i>Malus toringoides</i>	<i>Malus transitionalis</i>
0.000	21.124	6.349	35.786	5.442	7.478	5.949	4.396	2.818	2.546	3.294	1.383	1.748
0.012	0.000	7.394	41.293	7.099	10.478	6.947	5.498	3.299	3.158	4.791	1.561	1.898
0.038	0.033	0.000	8.179	2.707	3.156	3.942	2.856	2.135	1.426	2.113	0.895	1.183
0.007	0.006	0.030	0.000	7.568	9.831	8.379	5.949	3.707	3.198	3.893	1.672	1.950
0.044	0.034	0.085	0.032	0.000	3.668	5.660	4.313	2.223	2.239	3.255	1.555	1.791
0.032	0.023	0.073	0.025	0.064	0.000	7.029	3.660	1.874	2.087	2.259	0.954	1.246
0.040	0.035	0.060	0.029	0.042	0.034	0.000	3.556	4.445	2.247	2.696	1.346	1.602
0.054	0.043	0.080	0.040	0.055	0.064	0.066	0.000	2.216	2.231	2.194	1.369	2.285
0.081	0.070	0.105	0.063	0.101	0.118	0.053	0.101	0.000	1.291	1.510	0.737	0.836
0.089	0.073	0.149	0.072	0.100	0.107	0.100	0.101	0.162	0.000	1.729	1.038	1.146
0.071	0.050	0.106	0.060	0.071	0.100	0.085	0.102	0.142	0.126	0.000	1.243	1.302
0.153	0.138	0.218	0.130	0.139	0.208	0.157	0.154	0.253	0.194	0.167	0.000	1.659
0.125	0.116	0.174	0.114	0.123	0.167	0.135	0.099	0.230	0.179	0.161	0.131	0.000

注: 对角线的下方为遗传分化系数  $F_{st}$ , 对角线上方为基因流  $N_m$ 。Note: The data below the diagonal is  $F_{st}$ , and above the diagonal is  $N_m$ .

0.042; 山荆子和丽江山荆子间的遗传分化系数为 0.034; 以上两两种群间的遗传分化系数均为 0~0.05。

花红与垂丝海棠、湖北海棠、陇东海棠、新疆野苹果和花叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.054、0.081、0.089、0.071、0.125; 中国苹果与湖北海棠、陇东海棠、新疆野苹果、变叶海棠和花叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.070、0.073、0.050、0.138、0.116; 西府海棠与八棱海棠、丽江山荆子、山荆子、垂丝海棠、湖北海棠、陇东海棠和新疆野苹果之间的遗传分化系数分别为 0.085、0.073、0.060、0.080、0.105、0.149、0.106; 楸子与湖北海棠、陇东海棠、新疆野苹果、变叶海棠和花叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.063、0.072、0.060、0.130、0.114; 八棱海棠与垂丝海棠、湖北海棠、陇东海棠、新疆野苹果、花叶海棠和变叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.055、0.101、0.100、0.071、0.139、0.123; 丽江山荆子与垂丝海棠、湖北海棠、陇东海棠和新疆野苹果间的遗传分化系数分别为 0.064、0.118、0.107、0.100; 山荆子与垂丝海棠、湖北海棠、陇东海棠、新疆野苹果和花叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.066、0.053、0.100、0.085、0.135; 垂丝海棠与湖北海棠、陇东海棠、新疆野苹果和花叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.101、0.101、0.102、0.099; 湖北海棠与新疆野苹果、陇东海棠与新疆野苹果、变叶海棠与花叶海棠间的遗传分化系数分别为 0.142、0.126、0.131; 以上两两种群间的遗传分化系数均为 0.05~0.15。

花红与变叶海棠、西府海棠与变叶海棠、西府海棠与花叶海棠、丽江山荆子与变叶海棠、丽江山荆子与花叶海棠、山荆子与变叶海棠、垂丝海棠与变叶海棠、湖北海棠与花叶海棠、陇东海棠与花叶海棠、陇东海棠与变叶海棠、新疆野苹果与变叶海棠、新疆野苹果与花叶海棠两两间的遗传分化系数分别为 0.153、0.218、0.174、0.208、0.167、0.157、0.154、0.230、0.194、0.179、0.167、0.161, 以上两两种群间的遗传分化系数为 0.15~0.25。种群间的遗传分化系数体现其间的基因交流程度。

## 2.4 苹果属 17 个种的遗传结构

基于 SSR 分子标记数据对 17 个种 798 份材料进行种群遗传结构分析, 设置分析群体数 K 为 1~20, 重复 10 次。用  $\Delta K$  来确定 K 值, 当 K=2 时,  $\Delta K$  取得最大值(图 1-A)。随着 K 值的增加,  $\text{Ln}p(D)$ —

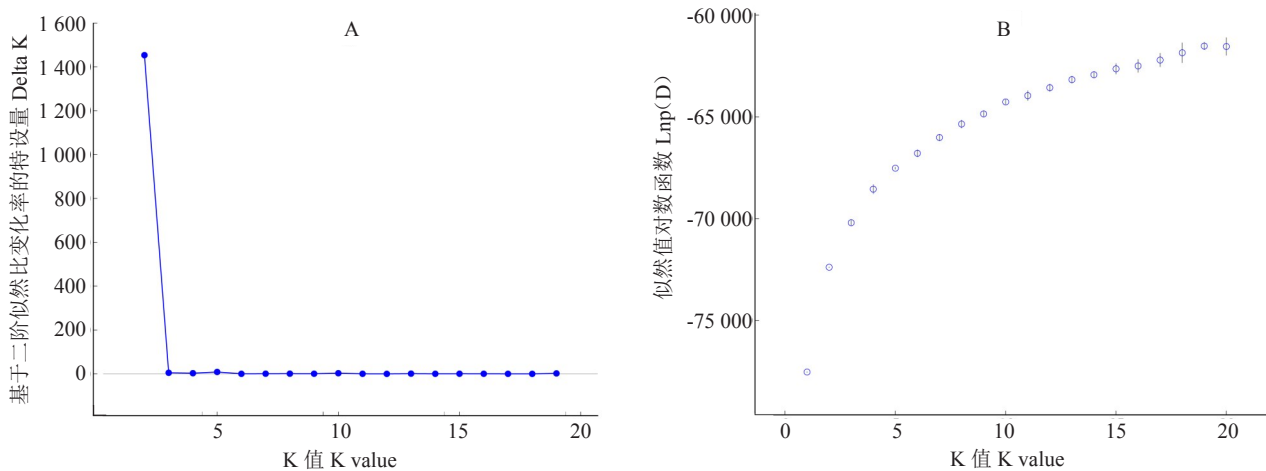


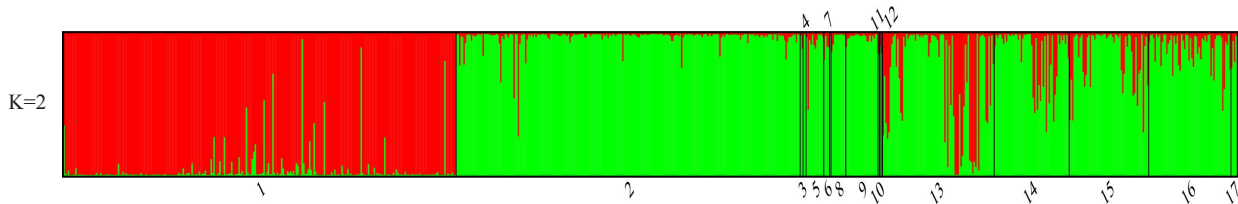
图 1 K 值与 Lnp(D)、ΔK 值变化趋势图

Fig. 1 Line chart of K with Lnp(D) and ΔK

直上升,无明显的拐点,但在K=5时曲线的坡度开始变小,Lnp(D)上升减缓,表明在K=5时是其一个重要的分群点(图1-B)。

首先,取K值为2时,将798份材料划分为2个类群(图2),具有2个可能的基因来源,苹果属植物

野生种新疆野苹果、山荆子、丽江山荆子、湖北海棠、垂丝海棠、陇东海棠、山楂海棠、花叶海棠、变叶海棠、滇池海棠、沧江海棠和河南海棠基因来源相对单一。但是新疆野苹果以类群1为主,有极少量的类群2的基因渗入;而其他苹果属植物野生种主要为



1. 新疆野苹果;2. 山荆子;3. 丽江山荆子;4. 湖北海棠;5. 垂丝海棠;6. 陇东海棠;7. 山楂海棠;8. 花叶海棠;9. 变叶海棠;10. 滇池海棠;11. 沧江海棠;12. 河南海棠;13. 中国苹果;14. 花红;15. 楸子;16. 八棱海棠;17. 西府海棠。下同。

1. *Malus sieversii*; 2. *Malus baccata*; 3. *Malus rockii*; 4. *Malus hupehensis*; 5. *Malus halliana*; 6. *Malus kansuensis*; 7. *Malus komarovii*; 8. *Malus transitoria*; 9. *Malus toringoides*; 10. *Malus yunnanensis*; 11. *Malus ombrophila*; 12. *Malus honanensis*; 13. *Malus domestica* subsp. *chinensis*; 14. *Malus asiatica*; 15. *Malus prunifolia*; 16. *Malus robusta*; 17. *Malus micromalus*. The same below.

图 2 798 份苹果属植物种质资源的遗传结构分析图 (K=2)

Fig. 2 Analysis on genetic structure (K=2) of 798 germplasms of *Malus* Mill.

类群2,有少量的类群1的基因渗入。

取K值为5时,将798份材料划分为5个类群(图3),具有5个可能的基因来源,与苹果属植物的栽培种相比,野生种新疆野苹果、山荆子、丽江山荆

子、湖北海棠、垂丝海棠、陇东海棠、山楂海棠、花叶海棠、变叶海棠、滇池海棠、沧江海棠和河南海棠基因来源仍然相对单一。但是新疆野苹果以类群1(红色)为主,另外4个类群的基因均有极少量渗入,

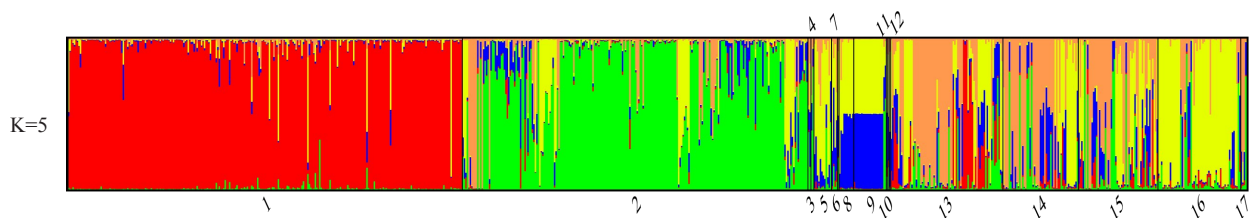


图 3 798 份苹果属植物种质资源的遗传结构分析图 (K=5)

Fig. 3 Analysis on genetic structure (K=5) of 798 germplasms of *Malus* Mill.



其中以类群2(绿色)和4(黄色)渗入相对较多。山荆子以类群2(绿色)为主,其他的类群3(橘色)和4(黄色)基因相对较多,其中有5份山荆子材料全部为类群3,丽江山荆子基因来源混杂,湖北海棠主要为类群2,陇东海棠主要为类群4和5(蓝色),山楂海棠为类群4,花叶海棠和变叶海棠主要为类群4和5,滇池海棠和沧江海棠主要混有类群2、4和5的基因,而河南海棠主要为类群4和5。中国原产苹果属植物栽培种基因来源复杂,但也有主要的分类归属,中国苹果主要来源于类群3,花红和楸子主要来源于类群2和3,八棱海棠主要来源于类群4,西府海棠主要来源于类群3。通过对17个种分为5个类群的种群结构分析,再次体现出新疆野苹果的特殊性。值得注意的是,新疆野苹果除类群1外,另外一个主要基因来源为类群4,与八棱海棠的主要基因来源一致,但是八棱海棠仅含有极少量的类群1的基因。供试的5个栽培种中,只有中国苹果部分材料中含有大量的类群1基因,其余4个栽培种中均含有极少量的类群1的基因,反而主要来自于其他野生种类群。

### 3 讨论

#### 3.1 中国原产苹果属植物17个种的遗传多样性

利用19对SSR引物,对中国原产苹果属植物的17个种进行了遗传多样性分析,在群体中多态位点的百分率为100%,19个位点在种群间可转移性高,可作为有效的遗传标记用于苹果属植物各种的遗传多样性和遗传结构分析。

19对SSR引物在798份苹果属植物种质中共扩增出500个等位基因,平均每个位点扩增26.3个( $N_a = 26.3$ ),所利用的SSR位点的多态性远高于前人在梨<sup>[26-27]</sup>和樱桃<sup>[28]</sup>等中的研究结果。798份苹果属植物的遗传多样性( $H_c = 0.886, I = 2.545, N_e = 10.309$ )高于前人对苹果属植物野生种的研究( $H_c = 0.86, I = 2.07$ )<sup>[29]</sup>。相较于前人对苹果属植物的研究而言,本研究苹果属植物的遗传多样性高于以往对新疆野苹果<sup>[21]</sup>、山荆子<sup>[22-23]</sup>、变叶海棠<sup>[24]</sup>、湖北海棠<sup>[25]</sup>和三叶海棠<sup>[30]</sup>等苹果属植物进行的遗传多样性研究。本研究的苹果属植物来源广泛,包含了苹果属植物的5个栽培种和12个野生种,种质来源范围从中国西南的云南到中国东北的黑龙江、从中国东部的河北到最西部的新疆,地域跨度大、来源广泛。收集材料原生境复杂,多来自于野生分布区,由于地理

因素造成的种质隔离对苹果属植物不同种的遗传分化和遗传多样性的形成同样有重要影响。

以种为单位分析苹果属17个种的遗传多样性水平,全部种群的杂合度均高于0.5,说明新收集的苹果属植物种质资源未经过高强度的人工选择,人为因素影响相对较小,这与大部分苹果属植物种质均来源于原始区域有较大关系。平均有效等位基因数( $N_e$ )、平均香农多样性指数( $I$ )、平均期望杂合度( $H_c$ )等是评价遗传多样性的重要指标。同时,根据杂合度的意义,期望杂合度和观察杂合度之间的差值同样可以作为遗传多样性高低的重要参考指标。综合两种遗传多样性指标的判定方式,中国苹果( $H_c = 0.875, I = 2.418, N_e = 9.585$ )、楸子( $H_c = 0.870, I = 2.412, N_e = 9.019$ )和山荆子( $H_c = 0.848, I = 2.350, N_e = 8.652$ )为遗传多样性水平较高的前3个种。但对于试材较少的种而言,在利用两种判别法进行判定时,湖北海棠( $H_c = 0.539, I = 0.912, N_e = 2.579$ )、山楂海棠( $H_c = 0.184, I = 0.255, N_e = 1.368$ )、陇东海棠( $H_c = 0.674, I = 0.912, N_e = 3.324$ )、滇池海棠( $H_c = 0.368, I = 0.511, N_e = 1.737$ )和沧江海棠( $H_c = 0.342, I = 0.474, N_e = 1.684$ )的遗传多样性水平评价结果却有所不同,这可能是这几个种的试材过少,1份或者2份材料难成种群,造成种的遗传多样性水平评价结果有偏差,但遗传多样性的评价结果可以作为这几个种遗传多样性水平的参考。例如,在供试17个种中遗传多样性水平较低的、只有2份种质的湖北海棠( $H_c = 0.539, I = 0.912, N_e = 2.579$ )的遗传多样性高于前人研究的湖北海棠的遗传多样性( $H_c = 0.2628, I = 0.4015, N_e = 1.4375$ )<sup>[25]</sup>。以上充分说明中国原产苹果属植物种间和种内都存在丰富的遗传变异,有利于不同种的苹果属植物对于多种生态环境的适应。

#### 3.2 中国原产苹果属植物种间的遗传分化

以每个种作为一个群体,除仅有1份材料的4个种以外,苹果属植物13个种间的遗传变异远远小于种内的遗传变异。群体间的遗传分化系数可区分群体间和群体内相对遗传变异大小,是解释群体遗传变异程度的主要依据<sup>[31-32]</sup>。Wright<sup>[33]</sup>认为,若群体 $F_{st}$ 值为0~0.05,则表明其各亚群间不存在分化;若 $F_{st}$ 值为0.05~0.15,为中度分化;若 $F_{st}$ 值为0.15~0.25,则为高度分化。13个种中遗传分化系数最低的两个种群组合为中国苹果和楸子、楸子与花红,这3个种

均为苹果属植物栽培种。遗传分化系数介于0~0.05的为无遗传分化的种群组合,除丽江山荆子、山荆子和垂丝海棠3个野生种外,其他种质全部为中国苹果、花红、楸子、西府海棠和八棱海棠5个栽培种。遗传分化系数介于0.05~0.15的种群组合为中度遗传分化,处于中度遗传分化的种群组合数量最多,栽培种与野生种间的遗传分化多为中度遗传分化。遗传分化系数介于0.15~0.25的种群组合为高度遗传分化,除花红与变叶海棠、西府海棠与变叶海棠、西府海棠与花叶海棠,处于高度遗传分化的种群组合多为野生种间。群体越稳定,度量群体间遗传差异程度的 $F_{st}$ 值越大,基因流越大,种群间交流越频繁。反之当 $F_{st}$ 值比较低时,则对应的群体基因稳定性越差,基因交流越频繁<sup>[22]</sup>。总体而言,栽培种间基因交流最频繁,其次是栽培种与野生种间,野生种与野生种间的遗传分化最强,基因交流最少。人为因素在种群间遗传分化的过程中还是起到重要作用,由于地理隔离造成的来自于不同原生境的苹果属植物,遗传分化主要存在于种群内,各种群间有基因交流,但同时又抵制了由于基因漂变而导致的种群间的遗传分化。

### 3.3 中国原产苹果属植物种群遗传结构

根据Structure分析结果,在 $K=2$ 时, $\Delta K$ 取得最大值,苹果属植物17个种可以分为两个类群,其中类群1为大部分新疆野苹果以及一部分中国苹果、少部分花红和楸子,类群2为除新疆野苹果外的全部野生种以及西府海棠,类群1和2有基因渗透。在 $K=5$ 这个重要的分群点,17种苹果属植物可以分为5个类群,5种颜色代表5个可能的基因来源。5个可能基因来源种分别为新疆野苹果(红色)、山荆子(绿色)、花红/中国苹果(橘色)、八棱海棠(黄色)、变叶海棠(蓝色),蓝色基因库很难在供试的苹果属植物材料中找到较纯的种质。值得注意的是山荆子、中国苹果和花红3个种中均有橘色基因库较纯的材料;而在山荆子、花红、垂丝海棠和八棱海棠中也含有黄色基因库较纯的材料。说明山荆子在部分中国苹果和花红的起源过程中起到重要作用;山荆子和垂丝海棠在花红和八棱海棠的起源过程中也起到比较重要的作用。新疆野苹果中掺有少量的黄色、蓝色、绿色和橘色基因;山荆子中混杂着另外4个基因库的基因,并以黄色基因库基因为主;中国苹果以橘色基因库为主,但也混有另外4种基因库的基因,有

部分材料以红色(新建野苹果)和绿色(山荆子)基因为主,也有部分材料以黄色和绿色基因为主,其与花红的遗传结构相似,说明中国苹果的一部分种质在起源进化的过程中有新疆野苹果和山荆子基因。垂丝海棠和八棱海棠均有黄色基因库比较纯的种质,且以八棱海棠居多,八棱海棠也有可能参与了部分中国苹果的起源演化过程。各栽培种间基因混杂,再次证明了栽培种间的遗传分化不明显,基因交流频繁。丽江山荆子和湖北海棠主要来源于绿色和黄色基因库,陇东海棠、山楂海棠、变叶海棠、花叶海棠、滇池海棠、沧江海棠主要来源于黄色和蓝色基因库,但少数几份变叶海棠因还掺有绿色基因而稍有不同。野生种间遗传结构相似,而与栽培种明显不同,栽培种的基因来源更为复杂。

按照传统的理论,中国苹果起源于新疆野苹果<sup>[2]</sup>,其包含大量的西洋苹果引入中国之前栽培历史悠久的地方品种,中国苹果中应含有大量的新疆野苹果基因。但种群遗传结构的分析结果只证明了少数种质具有新疆野苹果的基因,而多数中国苹果种质与花红和楸子具有相似的基因来源。且中国苹果的遗传结构中有部分山荆子基因的掺入,其在演化过程中有可能有山荆子参与。这与Duan等<sup>[34]</sup>取得的研究结果一致。除此之外,八棱海棠也可能参与了其起源演化过程。因此,中国苹果与新疆野苹果以及苹果属其他各种种的起源演化关系需要进一步考究。

## 4 结 论

19对SSR引物的多态性好,在种群间可转移性高,可以用于中国原产苹果属植物不同种的遗传多样性和遗传结构评价。中国原产苹果属植物种间和种内都存在丰富的遗传变异,有利于不同种的苹果属植物对于多种生态环境的适应。人为因素在种群间遗传分化的过程中起到重要作用,由于地理隔离造成的来自于不同原生境的苹果属植物,遗传分化主要存在于种群内,各种群间有基因交流,但同时又抵制了由于基因漂变而导致的种群间的遗传分化。新疆野苹果和山荆子可能参与了部分中国苹果的演化过程,除此之外,八棱海棠也可能参与了部分中国苹果的起源演化过程。

### 参考文献 References:

- [1] 陆秋农,贾定贤. 中国果树志·苹果卷[M]. 北京: 中国林业出

- 版社,1999: 121.
- LU Qionong, JIA Dingxian. Chinese fruit tree · Apple [M]. Beijing: China Forestry Press, 1999: 121.
- [2] 李育农. 苹果属植物种质资源研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 23-25.
- LI Yunong. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 3-17.
- [3] 束怀瑞. 苹果学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 1-107.
- SHU Huairui. Apple[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1999: 1-107.
- [4] 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.
- ZHANG Xinzhong, WANG Yi, HAN Zhenhai. 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.
- [5] 成明昊, 李晓林, 王玫, 曾维光, 吴福寿, 金强. 变叶海棠变异类型的研究[J]. 园艺学报, 1992, 19(3): 233-239.
- CHENG Minghao, LI Xiaolin, WANG Mei, ZENG Weiguang, WU Fushou, JIN Qiang. A study on the variant types of *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1992, 19(3): 233-239.
- [6] 王昆, 刘凤之, 高源, 王大江, 龚欣, 刘立军. 中国苹果野生种自然地理分布、多型性及利用价值[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1013-1019.
- WANG Kun, LIU Fengzhi, GAO Yuan, WANG Dajiang, GONG Xin, LIU Lijun. The natural distribution, diversity, and utilization of wild apple species in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(6): 1013-1019.
- [7] 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.
- WANG Dajiang, WANG Kun, GAO Yuan, ZHAO Jirong, LIU Lijun, GONG Xin, LI Lianwen. Preliminary investigation of modern distribution of *Malus* resources in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(6): 1116-1124.
- [8] GODOY J A, JORDAN P. Seed dispersal by animals: Exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites[J]. Molecular Ecology, 2001, 10(9): 2275-2283.
- [9] ASUKA Y, TOMARU N, NISIMURA N, YAMAMOTO S. Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-growth beech forest revealed by microsatellite markers[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(5): 1241-1250.
- [10] ZHANG D P, CARBAJULCA D, OJEDA L, ROSSEL G, MILLA S, HERRERA C, GHISLAIN M. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweet potato varieties from Latin America [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2004, 51(2): 115-120.
- [11] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 董玉琛, 张学勇. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 144-149.
- HAO Chenyang, WANG Lanfen, JIA Jizeng, DONG Yuchen, ZHANG Xueying. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 144-149.
- [12] HOKANSON S C, SZEWC-MCFADDEN A K, LAMBOY W F, MCFERSON J R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(5/6): 671-683.
- [13] LIEBHARD R, GIANFRANCESCHI L, KOLLER B, RYDER C D, TARCHINI R, VAN DE WEG E, GESSLER C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 30(4): 431-436.
- [14] YAMAMOTO T, KIMURA T, SHODA M, BAN Y, HAYASHI T, MATSUTA N. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. Molecular Ecology Notes, 2010, 2(1): 14-16.
- [15] GUIFORD P, PRAKASH S, ZHU J M, RIKKERINK E, GARDINER S, BASSETT H, FORSTER R. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94(2): 249-254.
- [16] CELTON J M, TUSTIN D S, CHAGNED D, GARDINER S E. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences[J]. Tree Genetics & Genomes, 2009, 5(1): 93-107.
- [17] SILFVERBERG- DILWORTH E, MATASCI C L, VAN DE WEG W E, VAN KAAUWEN M P W, WALSER M, KODDE L P, SOGLIO V, GIANFRANCESCHI L, DUREL C E, COSTA F, YAMAMOTO T, KOLLER B, GESSLER C, PATOCCHI A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome[J]. Tree Genetics & Genomes, 2006, 2(4): 202-224.
- [18] CAO Y, TIAN L, GAO Y, YUAN J, ZHANG S. Evaluation of genetic identity and variation in cultivars of *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai from China using microsatellite markers[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2011, 86(4): 331-336.
- [19] 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. 应用 TP-M13-SSR 技术鉴定苹果品种[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 833-837.
- GAO Yuan, WANG Kun, TIAN Luming, CAO Yufen, LIU Fengzhi. Identification of apple cultivars by TP-M13-SSR technique [J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(5): 833-837.
- [20] FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies [J]. Genetics, 2003, 164: 1567-1587.
- [21] ZHANG C Y, CHEN X S, HE T M, LIU X L, FENG T, YAUN



- Z H. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(10): 947-955.
- [22] 陈曦, 汤庚国, 郑玉红, 王雷宏. 苹果属山荆子遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(10): 1954-1959.  
CHEN Xi, TANG Gengguo, ZHENG Yuhong, WANG Leihong. RAPD analysis of genetic diversity of *Malus baccata* (L.) Borkh.[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(10): 1954-1959.
- [23] 王雷宏, 郑玉红, 汤庚国. 基于 SSR 标记的 8 个山荆子居群遗传多样性和遗传关系分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2012, 21(1): 42-46.  
WANG Leihong, ZHENG Yuhong, TANG Gengguo. Analyses of genetic diversity and genetic relationship of eight populations of *Malus baccata* based on SSR marker[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2012, 21(1): 42-46.
- [24] 石胜友. 变叶海棠起源及其遗传多样性分化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2005.  
SHI Shengyou. Studies on the origin and differentiation of genetic diversity in *Malus toringoides*[D]. Chongqing: Southwest University, 2005.
- [25] 陈曦. 湖北海棠(*Malus hupehensis*)不同居群变异式样及遗传多样性的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2009.  
CHEN Xi. A study on variation patterns and genetic diversity of *Malus hupehensis* populations[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2009.
- [26] 张怀山, 鄢秀芹, 鲁敏, 王道平, 安华明. 基于 EST-SSR 标记的贵州野生刺梨居群遗传多样性分析[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(6): 1098-1108.  
ZHANG Huaishan, YAN Xiuqin, LU Min, WANG Daoping, AN Huaming. Analysis of the genetic diversity of wild *Rosa roxburghii* populations in Guizhou province based on EST-SSR marker[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(6): 1098-1108.
- [27] LIU J, ZHENG X Y, POTTER D, HU C Y, TENG Y W. Genetic diversity and population structure of *Pyrus Calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang province, China[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 45: 69-78.
- [28] 陈娇, 王小蓉, 汤浩茹, 陈涛, 黄晓姣, 梁勤彪. 基于 SSR 标记的四川野生中国樱桃遗传多样性和居群遗传结构分析[J]. *园艺学报*, 2013, 40(2): 333-340.  
CHEN Jiao, WANG Xiaorong, TANG Haoru, CHEN Tao, HUANG Xiaojiao, LIANG Qinbiao. Assessment of genetic diversity and populations genetic structure in wild Chinese cherry from Sichuan province using SSR markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(2): 333-340.
- [29] GHARGHANI A, ZAMANI Z, TALAIE A, ORAGUZIE N C, FATAHI R, HAJNAJARI H, WIEDOW C, GARDINER S E. 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[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2009, 56(6): 829-842.
- [30] 孙萍, 宗宇, 刘晶, 胡春云, 滕元文. 基于 SSR 标记的清凉峰地区三叶海棠遗传多样性研究[J]. *果树学报*, 2013, 30(1): 8-15.  
SUN Ping, ZONG Yu, LIU Jing, HU Chunyun, TENG Yuanwen. Study on genetic diversity of *Malus sieboldii* in Qingliangfeng region based on SSR markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(1): 8-15.
- [31] 汤存伟, 余雄, 刘武军. 新疆 13 个绵羊群体遗传多样性及遗传分化的研究[J]. *家畜生态学报*, 2011, 32(1): 13-19.  
TANG Cunwei, YU Xiong, LIU Wujun. Genetic diversity and genetic differentiation of 13 sheep populations in Xinjiang[J]. *Journal of Livestock Ecology*, 2011, 32(1): 13-19.
- [32] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.
- [33] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations[M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978: 4.
- [34] DUAN N B, BAI Y, SUN H H, ·····, CHEN X S. Genome resequencing reveals the history of apple and supports a two-stage for fruit enlargement[J]. *Nature Communication*, 2017, 8(1): 249.