

基于叶绿体 DNA 变异的湖北梨属种质系统进化及遗传多样性分析

张靖国¹, 曹玉芬², 陈启亮¹, 杨晓平¹, 范 净¹, 田 瑞¹, 胡红菊¹

(¹湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430064; ²中国农业科学院果树研究所, 兴城 125100)

摘要: 利用 *trnL* intron、*trnL-trnF*、*trnS-psbC* 和 *accD-psaI* 等 4 个叶绿体 DNA 片段对来自湖北省的 88 份梨属种质资源进行系统进化和遗传多样性分析。结果表明, 4 个 cpDNA 片段共检测到变异位点 11 个, 其中单一突变位点 6 个, 插入/缺失 (Indel) 位点 5 个。*accD-psaI* 多态性最高, 其变异位点数、核苷酸多态性和单倍型多样性均为最高。供试梨种质的核苷酸多样性和单倍型多样性分别为 0.00112 和 0.769; Tajima's D 检验值在 $P > 0.10$ 水平上均不显著, 表明所检测的 4 个区域以及合并后的片段均遵循中性进化模型; 4 个序列合并共检测到叶绿体单倍型 10 个, 其中兴山梨种质中检测到的单倍型最多, 荆门其次; Hap2 和 Hap5 是 2 个主要单倍型, 分别占总样本数的 31.82% 和 30.68%; 中介邻接网络图显示东方梨和西洋梨独立进化, 而较为原始的稀有单倍型 Hap8 和 Hap9 均位于荆门, 暗示该地区可能为砂梨的起源中心或多样性中心之一。

关键词: 梨属; 叶绿体 DNA; 湖北; 遗传多样性

Genetic Diversity and Phylogenetics of Pear (*Pyrus* L.) Germplasm Resources from Hubei Province Revealed by Chloroplast DNA Variation

ZHANG Jing-guo¹, CAO Yu-fen², CHEN Qi-liang¹, YANG Xiao-ping¹,

FAN Jing¹, TIAN Rui¹, HU Hong-ju¹

(¹Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064;

²Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100)

Abstract: Four non-coding chloroplast region, *trnL* intron, *trnL-trnF*, *trnS-psbC* and *accD-psaI* were used to assay genetic diversity and phylogenetics of 88 pear accessions from Hubei province. A total of 11 variation sites included 6 SNP sites and 5 indel sites were recognized. Among 4 cpDNA regions, *accD-psaI* exhibited highest polymorphism with the maximum number of variable site, the most abundant haplotype diversity and nucleotide diversity. The values of nucleotide diversity and haplotype diversity of pear accessions identified by four combined cpDNA fragments were 0.00112 and 0.769, respectively. All Tajima's D values showed no statistical significant differences ($P > 0.10$), which indicated that variation of those chloroplast regions followed natural theory of molecular evolution. A total of ten haplotypes were detected by four cpDNA regions merging analysis. The most haplotypes were derived from the germplasms of Jingmen and Xingshan among 13 collection sites. Hap2 and Hap5 were the two major haplotypes, which accounted for 31.82% and 30.68% of the total accessions, respectively. The network analysis of *Pyrus* L. cpDNA sequences showed that *P. communis* L. could be completely separated from oriental pear, and the rare haplotype Hap8 and Hap9 were both located in Jingmen, suggesting that Jingmen may be one of the centers of

收稿日期: 2015-08-10 修回日期: 2015-10-10 网络出版日期: 2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1437.032.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272128); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-29-34); 湖北省农业科技创新中心专项 (2011-620-005-003-01)

第一作者主要从事砂梨种质资源研究。E-mail: chongtianhe@163.com

通信作者: 胡红菊, 研究方向为砂梨种质资源。E-mail: hongjuhu@sina.com

origin or diversity of *Pyrus* L. .

Key words: *Pyrus* L. ; cpDNA; Hubei province; genetic diversity

梨(*Pyrus* L.)为蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomoideae)植物。根据其原生分布将其分为西方梨和东方梨。西方梨主要分布于欧洲、北非、西亚等地。东方梨原产东亚,主要分布于中国,主要栽培种有砂梨(*P. pyrifolia* Nakai)、白梨(*P. bretschneideri* Rehder)、秋子梨(*P. ussuriensis*)和新疆梨(*P. sikiangensis*)等。最新的分子生物学证据显示砂梨和白梨可能起源于共同的祖先;分布于我国长江流域的野生砂梨^[1]。

湖北省地处长江中游,具有南北气候过渡特征,境内梨种质资源丰富。据不完全统计,湖北梨属(*Pyrus* L.)植物数量超过300份,涵盖砂梨(*P. pyrifolia* Nakai)、白梨(*P. bretschneideri* Rehder)、豆梨(*P. calleryana* Decne)、杜梨(*P. betulaeifolia* Bge.)、麻梨(*P. serrulata* Rehder)等种。深入了解其遗传多样性和特异种质系统发育特征,对明晰梨属种质资源的起源演化、基因资源分布、发掘和保护利用等具有重要意义。但迄今研究报道甚少^[2]。

基于SSR分子标记已经在梨属植物的遗传多样性分析、亲子鉴定、遗传图谱构建等方面广泛应用^[2-4]。相比于核基因组,叶绿体DNA(cpDNA)因其具有单拷贝、重组少和母系遗传等优点而被用于起源进化、种质鉴定、遗传多样性分析等研究^[5-8]。尽管叶绿体基因组进化速率仅为核基因组的1/3,

但其中部分非编码区如*trnL-trnF*和*accD-psaI*在梨cpDNA中显示出较快的进化速率,在梨的系统进化和遗传多样性研究已有报道^[6-8]。胡春云等^[7]通过对梨属19个种共26个样本的*trnL-trnF*和*accD-psaI*序列分析,揭示了可疑种间杂交种的母系祖先,并认为*accD-psaI*相比于*trnL-trnF*具有更高的进化速率,更适合用于种及种下分类水平的梨属植物系统关系研究。X. Zheng等^[6]等利用基于*trnL-trnF*、*accD-psaI*和1个低拷贝核基因*LFY2int2-N*检测信息得到的发育树和系统进化网络进行梨属植物系统发育重建,探讨部分杂种起源和梨属植物演化史。

本研究以收集于湖北省13个县市的88份梨属植物为试材,选取4个cpDNA高变区对其系统进化和遗传多样性进行分析,旨在为湖北地方梨种质资源保护和利用提供分子证据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料收集自湖北省13个县市(图1)共88份基因型,全部保存于“国家果树种质武昌砂梨圃”。以6份白梨、砂梨和秋子梨代表品种为参照,以西洋梨品种康佛伦斯和红考密斯作为外类群用于系统发育分析(表1)。

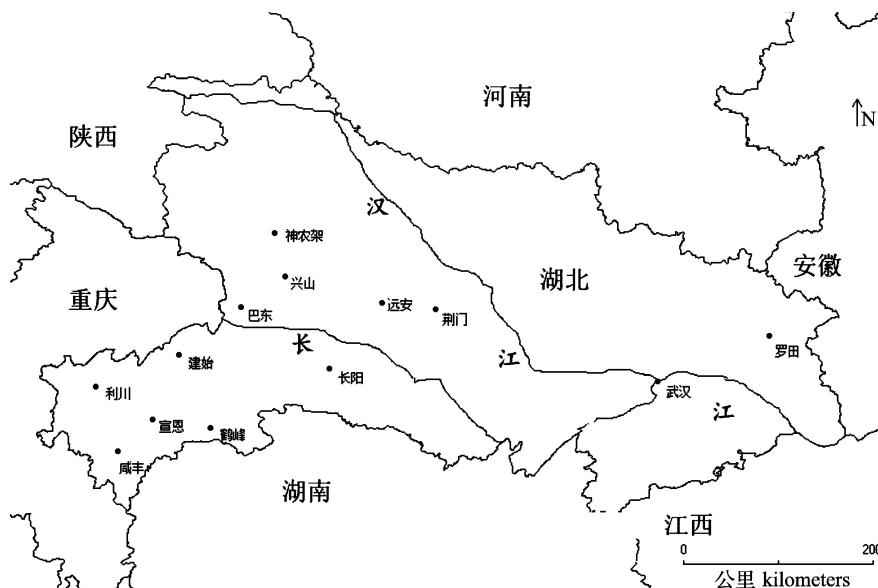


图1 供试湖北梨种质采集地示意图

Fig. 1 *Pyrus* L. collection sites in Hubei province

表 1 供试梨种质及其叶绿体 DNA 单倍型分布

Table 1 Pear accessions used in this study and their cpDNA haplotype distribution

种类 Species	编号 Code	品种名称 Variety name	原产地 Origin	单倍型 Haplotypes	种类 Species	编号 Code	品种名称 Variety name	原产地 Origin	单倍型 Haplotypes
砂梨 <i>P. pyrifolia</i>	1	鹤峰雪花梨	湖北鹤峰	Hap2		49	兴山 21 号	湖北兴山	Hap7
	2	利川香水	湖北利川	Hap2		50	兴山 22 号	湖北兴山	Hap5
	3	利川玉川	湖北利川	Hap3		51	兴山 23 号	湖北兴山	Hap5
	4	宣恩雪梨	湖北宣恩	Hap2		52	兴山 25 号	湖北兴山	Hap2
	5	宣恩杨洞梨	湖北宣恩	Hap5		53	兴山 26 号	湖北兴山	Hap7
	6	宣恩秤砣梨	湖北宣恩	Hap5		54	兴山 27 号	湖北兴山	Hap5
	7	建始秤砣梨	湖北建始	Hap2		55	兴山 29 号	湖北兴山	Hap2
	8	建始迟咸丰	湖北建始	Hap5		56	兴山 33 号	湖北兴山	Hap7
	9	建始早谷梨	湖北建始	Hap1		57	兴山 36 号	湖北兴山	Hap2
	10	巴东桐子梨	湖北巴东	Hap6		58	甜棠梗子	湖北荆门	Hap8
	11	巴东酸梨	湖北巴东	Hap5		59	青皮梨	湖北荆门	Hap7
	12	巴东京梨	湖北巴东	Hap7		60	麻棠梗子	湖北荆门	Hap2
	13	巴东平头梨	湖北巴东	Hap7		61	白棠梗子	湖北荆门	Hap2
	14	咸丰白结	湖北咸丰	Hap6		62	望水白	湖北荆门	Hap2
	15	咸丰杨洞梨	湖北咸丰	Hap5		63	水麻梨	湖北荆门	Hap2
	16	咸丰雪苹果	湖北咸丰	Hap6		64	果果梨	湖北荆门	Hap7
	17	咸丰 80-1	湖北咸丰	Hap5		65	红庆梨	湖北荆门	Hap5
	18	咸丰红桔梨	湖北咸丰	Hap5		66	桐子梨	湖北荆门	Hap5
	19	咸丰秤砣梨	湖北咸丰	Hap1		67	团早梨	湖北荆门	Hap7
	20	晚咸丰	湖北咸丰	Hap6		68	大茶梨	湖北荆门	Hap2
	21	雪萍	湖北咸丰	Hap5		69	猪尾巴	湖北荆门	Hap5
	22	长阳芝麻梨	湖北长阳	Hap4		70	猴嘴	湖北荆门	Hap2
	23	长阳青皮梨	湖北长阳	Hap2		71	半斤梨	湖北荆门	Hap5
	24	长阳蜜蜂梨	湖北长阳	Hap5		72	硬头白	湖北荆门	Hap7
	25	长阳湘玉梨	湖北长阳	Hap5		73	罗田秤砣梨	湖北罗田	Hap2
	26	酸扁头	湖北远安	Hap5		74	罗田冷水梨	湖北罗田	Hap5
	27	十里香	湖北远安	Hap6		75	罗田酸梨	湖北罗田	Hap7
	28	龙团梨	湖北远安	Hap2		76	罗田麻壳梨	湖北罗田	Hap7
	29	金棒头	湖北远安	Hap5		77	罗田冬梨	湖北罗田	Hap5
	30	朵朵花	湖北远安	Hap5		78	罗田短柄梨	湖北罗田	Hap5
	31	望水白	湖北远安	Hap2		79	罗田长柄梨	湖北罗田	Hap10
	32	兴山 1 号	湖北兴山	Hap2		80	六月雪	湖北武汉	Hap5
	33	兴山 2 号	湖北兴山	Hap2		81	麻壳	湖北武汉	Hap2
	34	兴山 3 号	湖北兴山	Hap4		82	白雪	湖北武汉	Hap2
	35	兴山 4 号	湖北兴山	Hap2		83	黄皮香	湖北武汉	Hap7
	36	兴山 6 号	湖北兴山	Hap2		84	香水梨	湖北荆门	Hap9
	37	兴山 7 号	湖北兴山	Hap7		85	丰水	日本	Hap5
	38	兴山 8 号	湖北兴山	Hap10	豆梨 <i>P. calleryana</i>	86	武豆 2 号	湖北武汉	Hap2
	39	兴山 9 号	湖北兴山	Hap2		87	荆豆 11 号	湖北荆门	Hap5
	40	兴山 10 号	湖北兴山	Hap7	杜梨 <i>P. betulafolia</i>	88	杜梨	湖北荆门	Hap9
	41	兴山 11 号	湖北兴山	Hap6	麻梨 <i>P. serrulata</i>	89	麻梨	湖北神农架	Hap7
	42	兴山 12 号	湖北兴山	Hap7	白梨 <i>P. bretschneideri</i>	90	鸭梨	河北	Hap5
	43	兴山 13 号	湖北兴山	Hap2		91	雪花梨	河北	Hap5
	44	兴山 14 号	湖北兴山	Hap5		92	砀山酥梨	安徽	Hap5
	45	兴山 15 号	湖北兴山	Hap5	新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	93	库尔勒香梨	新疆	Hap2
	46	兴山 18 号	湖北兴山	Hap2	秋子梨 <i>P. ussuriensis</i>	94	花盖梨	辽宁	Hap11
	47	兴山 19 号	湖北兴山	Hap2	西洋梨 <i>P. communis</i>	95	康佛伦斯	英国	Hap12
	48	兴山 20 号	湖北兴山	Hap7		96	红考密斯	美国	Hap13

1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[9]。通过 1% 的琼脂糖电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度,将样品 DNA 浓度稀释到 30 ng/ μ L 保存并用于后续 PCR 分析。

1.3 叶绿体 DNA 引物的筛选及 PCR 扩增

如表 2 所示,经过筛选最终确定选用 4 对具有较高多态性的叶绿体通用引物^[7,10]。PCR 扩增体系为 40 μ L,含 DNA 模板 60 ng,引物

0.4 μ mol/L,1 \times LAMP Master Mix(康为世纪生物科技有限公司)。PCR 扩增在 BioRad-S1000 型 PCR 仪上进行。扩增程序为 90 $^{\circ}$ C 预变性 90 s;90 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经纯化后直接用上下游引物对其进行测序(ABI3730XL 测序仪),每个 cpDNA 片段均进行正、反向测序,纯化和测序反应均在武汉擎科生物科技有限公司进行。

表 2 本研究中用到的 cpDNA 引物

Table 2 Chloroplast DNA primer pairs used in this study

序号 Code	扩增区域 Region	正向引物 Forward sequences(5'-3')	反向引物 Reverse sequences(5'-3')	片段长度(bp) Fragment length
1	<i>trnL</i> intron	CGAAATCGGTAGACGCTACG	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	487
2	<i>trnL-trnF</i>	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	ATTGAACTGGTGACACGAG	413
3	<i>trnS-psbC</i>	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC	GGTCGTGACCAAGAAACCAC	1518
4	<i>accD-psaI</i>	CTTATTCGATCCAATCGTACCAC	AGAAGCCATTGCAATTGCCGGA	944

1.4 数据分析

应用 Clustal X 2.1^[11]对不同 DNA 片段分别进行比对排序和人工校对。将插入/缺失(indel)处理为单个突变事件,并编码为核苷酸替换(T/C)。将 4 段基因序列各自分析并按照 *trnL* intron、*trnL-trnF*、*trnS-psbC* 和 *accD-psaI* 的顺序连接合并成一条序列后进行分析。利用 DnaSP v5^[12]进行单倍型确定,并计算变异位点(variable sites)、单一突变位点(SNP sites)、插入缺失位点(Indel sites)、核苷酸多样性(P_i , nucleotide diversity)、平均核苷酸差异(k , average number of nucleotide differences)、单倍型数目(h , number of haplotypes)、单倍型多样性(H_d , haplotype diversity)、单倍型多样性方差(V_h , variance of haplotype diversity)、单倍型多样性标准差(S_h , standard deviation of haplotype diversity)和 Tajima's D 值。采用 Network v4.6 软件构建基于叶绿体 DNA 单倍型间的关联图。

2 结果与分析

2.1 序列多样性和单倍型分析

trnL intron、*trnL-trnF*、*trnS-psbC* 和 *accD-psaI* 等 4 对叶绿体引物在所有样本中扩增到的片段长度范围依次为 552 ~ 616 bp、446 ~ 464 bp、1343 ~ 1552 bp 和 696 ~ 930 bp,比对排序后的序列长度分别为

547 bp、442 bp、1331 bp 和 848 bp(表 3)。在 88 份湖北原产梨属植物中,共检测到 11 个变异位点,不同的 cpDNA 区域检测到的变异位点数不同,其中 *trnL* intron 仅检测到 1 个变异位点,为最少;而 *accD-psaI* 检测到 6 个变异位点,为最多。变异位点分为单一突变位点(SNP)和插入缺失位点(Indel)2 种。Indel 位点主要发生在 *accD-psaI* 区域。插入/缺失处理为一次突变事件,并编码为 T/C 替换用于后续分析。4 个 cpDNA 区域组合后产生 10 个单倍型,依次命名为 Hap1 ~ Hap10(表 4),每个梨种质对应的单倍型见表 1,对照的 4 个白梨和砂梨品种均为 Hap5,而库尔勒香梨为 Hap2,秋子梨品种花盖梨和 2 个西洋梨品种具有较为特殊叶绿体变异类型,分别命名为 Hap11 ~ Hap13。

叶绿体基因片段 *accD-psaI* 在所检测的 4 个区域中拥有最高的变异位点数、核苷酸多态性(0.00328)和平均核苷酸差异(1.898)(表 3),而 *trnL* intron 的相应值均为最小。如表 5 所示, *accD-psaI* 同样具有最高的叶绿体单倍型多样性。单倍型多样性方差和标准差最高的为 *trnS-psbC* ($V_h = 0.00115$, $S_h = 0.034$)。Tajima's D 检验值在 -0.91012 ~ 1.65316 之间,在 $P > 0.10$ 水平上均不显著,表明所检测的 4 个区域以及合并后的片段均遵循中性进化模型。

表 3 供试 88 份湖北梨种质的 cpDNA 片段多态性

Table 3 The polymorphic information of cpDNA fragments of 88 pear accessions in this study

区域	长度 (bp)	变异位点	单一变异位点	插入缺失位点	核苷酸多态性 (P_i)	平均核苷酸差异 (k)
Region	Length	Variable site	SNP site	Indel site	Nucleotide diversity	Average number of nucleotide differences
<i>trnL</i> intron	547	1	1	0	0.00008	0.045
<i>trnL-trnF</i>	442	2	2	0	0.00184	0.812
<i>trnS-psbC</i>	1331	2	2	0	0.00036	0.484
<i>accD-psaI</i>	848	6	1	5	0.00328	1.898
合并 Total	3173	11	6	5	0.00112	3.239

表 4 供试 88 份湖北梨地方种质中检测到的变异位点

Table 4 The variations in tested cpDNA regions among 88 accessions

区域	变异位点	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10
Domain	Varitation site										
<i>trnL</i> intron	1	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<i>trnL-trnF</i>	2	C	C	C	C	T	T	T	C	C	C
	3	T	T	T	T	T	T	G	T	T	T
<i>trnS-psbC</i>	4	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A
	5	A	T	T	T	A	A	A	A	A	A
	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	7	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>accD-psaI</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	9	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	11	C	G	G	C	C	C	C	C	C	C

0 和 1 分别表示相应 Indel 为缺失或者插入

0 and 1 indicate deletion and insertion for certainindel

表 5 通过 DnaSP 软件获得的叶绿体单倍型信息

Table 5 Chloroplast DNA haploypes and the diversity by using DnaSP

区域	单倍型数 (h)	单倍型多样性 (H_d)	单倍型多样性方差 (V_h)	单倍型多样性标准差 (S_h)	中性检验
Region	Number of haplotypes	Haplotype diversity	Variance of haplotype diversity	Standard Deviation of haplotype diversity	Tajima's D test
<i>trnL</i> intron	2	0.045	0.00092	0.030	-0.91012
<i>trnL-trnF</i>	3	0.643	0.00041	0.020	1.65316
<i>trnS-psbC</i>	3	0.469	0.00115	0.034	0.35089
<i>accD-psaI</i>	6	0.720	0.00034	0.019	1.36940
合并 Total	10	0.769	0.00055	0.023	1.29276

2.2 湖北省不同地区梨种质的单倍型分布

88 份湖北梨地方品种按其来源地可以分为 13 组,由表 6 可以看出,湖北不同地区具有不同的单倍型组成。Hap2 和 Hap5 是湖北 2 种主要的单倍型,广泛分布于湖北不同地区,分别占总样本数的 31.82% 和 30.68%。多数地区含有 3 种以上单倍

型。其中兴山县含有 6 种单倍型,最为丰富,其次为荆门,有 5 种单倍型,且含有特异的 Hap8 和 Hap9。鄂西南的利川、建始和咸丰还存在 Hap1 和 Hap3 稀有单倍型。分别来自咸丰、建始和宣恩的秤砣梨具有不同的单倍型 (Hap1、Hap2、Hap5),表明其为同名异物种质,且亲缘关系较远。

表 6 10 种单倍型在湖北各地区的分布
Table 6 Distribution of ten pear cpDNA haplotypes among different areas of Hubei

编号 Code	来源地 Origin	样品数 Size	单倍型 Haplotypes									
			Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10
1	鹤峰	1		1								
2	利川	2		1	1							
3	建始	3	1	1			1					
4	宣恩	3		1			2					
5	咸丰	8	1				4	3				
6	巴东	4					1	1	2			
7	长阳	4		1		1	2					
8	神农架	1							1			
9	远安	6		2			3	1				
10	兴山	26		11		1	5	1	7			1
11	荆门	18		6			5		4	1	2	
12	罗田	7		1			3		2			1
13	武汉	5		3			1		1			
	合计 Total	88	2	28	1	2	27	6	17	1	2	2

2.3 基于 4 个 cpDNA 片段合并数据的中介网络图

中介网络图(medium-join network)揭示了 13 种单倍型间的相互关系(图 2)。mv 代表可能存在的原始单倍型。可以明显看出作为外类群中的 2 个西洋梨品种单倍型 Hap12、Hap13 与其他东方梨单倍型相距甚远,独立进化成枝。在 mv1 的另一端为东

方梨单倍型。其中 Hap4、Hap5、Hap6、Hap7 聚为一枝,这 4 个单倍型在 *accD-psaI* 区均存在 1 个 229 bp 的大片段缺失,显示出较为进化的单倍型。Hap8、Hap9 位于中介网络图的躯干上且依次与 mv1 相连,显示其较为原始的进化地位。

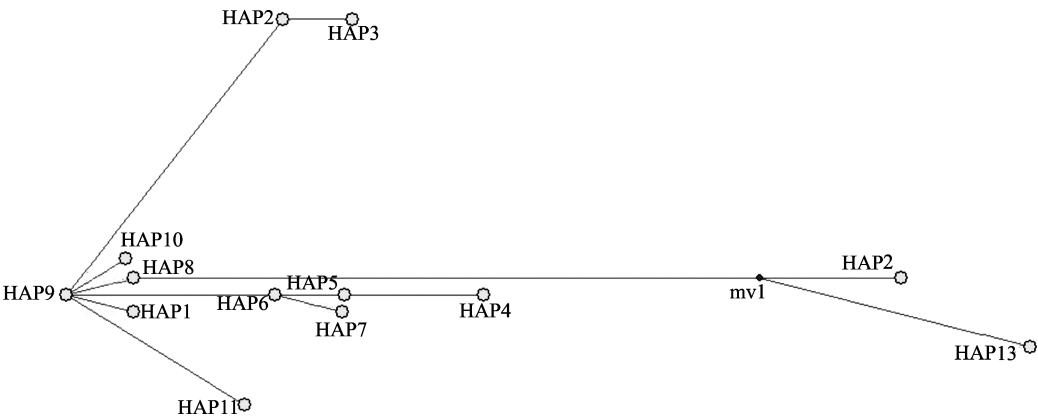


图 2 基于 4 个叶绿体基因片段合并后单倍型的中介网络图
Fig.2 Median-Joining network based on the haplotypes of 96 pear accessions in combination of four cpDNA fragments

3 讨论

梨属植物自交不亲和且种间生殖隔离不明显,部分杂交种间的形态学差异不易区分。俞德浚等^[13]认为果皮颜色是区分砂梨和白梨的一个重要特征,黄绿皮为白梨,褐皮为砂梨。但部分砂梨品种

的果皮也为黄绿色,如宝珠梨、蒲瓜梨、云和雪梨等。滕元文等^[1]认为,越来越多的分子生物学证据显示,白梨作为砂梨的一个变种或者生态型更为适宜,白梨、砂梨(含日本梨)可能起源于共同的祖先,分布于我国长江流域的野生砂梨^[1]。

叶绿体 DNA(cpDNA)在大部分被子植物中为

母系遗传,因此在分子系统学研究具有独特的价值。尽管梨叶绿体基因组高度保守^[14],但部分变异频率较高的非编码区基因片段适合用于种内或种间分析^[7]。本研究所用的4个叶绿体基因片段均符合中性进化模型,适合遗传多样性研究。其中 *accD-psaI* 显示出最高的核苷酸多态性,这与前人研究结果一致^[7]。与来自辽宁省梨种质的遗传多样性相比 ($H_d=0.577, P_i=0.00055$)^[8],湖北梨种质显示出更高的遗传多样性 ($H_d=0.769, P_i=0.00112$)。可能的原因是本研究用到了进化更快的 *accD-psaI* 基因片段和数量更为丰富的种质资源。分别来自鄂西南3个县市(咸丰、建始和宣恩)的砮梨的单倍型不同,表明 cpDNA 可从母系遗传角度进行梨的种质鉴定。

基于4个 cpDNA 片段组合序列构建的中介网络图从母系进化背景上证实了东方梨和西方梨独立进化的观点^[7]。东方梨野生种中,豆梨(*P. calleryana* Decne)的2份种质荆豆11号和武豆2号单倍型分别为 Hap5 和 Hap2,显示了其种内丰富的遗传多样性,这与浙江豆梨居群的研究结果一致^[15]。但豆梨作为一个种在本研究中并未得到区分,表明豆梨与砮梨在系统进化中的近缘关系。本研究中杜梨(*P. betulaefolia* Bge.)具有罕见的单倍型 Hap9 且位于中介网络图主干上,表明其分化较早且可能在东西方梨演化中起过渡作用,这与 X. Zheng 等^[6]基于多种 DNA 序列的分子系统学研究结果相一致。此外,新疆梨被认为是东方梨和西方梨的杂种起源,本研究中新疆梨品种库尔勒香梨单倍型为 Hap2,显示其母系亲本为东方梨起源。

对照品种的变异位点对比分析显示胡春云等^[7]认为的砮梨和白梨中的主要单倍型即为 Hap5。而在湖北13个地区的88份梨种质中检测到10个单倍型中属于 Hap5 的种质仅占本研究试材的1/3,从母系上表明湖北梨种质存在较为丰富的遗传多样性。其中来自兴山的梨种质数量和检测到的叶绿体单倍型变异最多,其中以 Hap2 为主,此外还含有较为稀有的单倍型有 Hap4 和 Hap10。荆门梨种质中检测到的单倍型较为丰富,尤其是特异含有较为原始的单倍型 Hap8 和 Hap9,而属于 Hap8 的仅有1份种质,即来自荆门的野生砮梨甜棠梗子,印证了前人的推测即长江流域野生砮梨是砮梨、白梨等的共同起源^[1],但仍需要收集更多的种质进一步核实。属于 Hap9 的有2份种质即杜梨和香水梨。香水梨源自荆门,其果实葫芦形,需后熟,有香味,肉质与西洋

梨相似,暗示其复杂的遗传背景。杨军等^[16]基于形态学和 SSR 标记对45份荆门棠梨及其近缘野生梨资源研究发现其具有丰富的遗传多样性。综上所述表明荆门可能为砮梨起源中心或遗传多样性中心之一,但仍需要围绕该地区收集更多的资源进行证实,因此今后应该重点加强对该地区的梨种质资源收集保护和利用研究。

参考文献

- [1] 滕元文,柴明良,李秀根. 梨属植物分类的历史回顾及新进展[J]. 果树学报,2004,21(3):252-257
- [2] 田瑞,胡红菊,张靖国,等. 湖北省梨地方资源遗传变异和亲缘关系的 SSR 分析[J]. 湖北农业科学,2013,52(22):5496-5501
- [3] Cao Y, Tian L, Gao Y, et al. Evaluation of genetic identity and variation in cultivars of *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai from China using microsatellite markers[J]. J Hort Sci Biotech, 2011, 86(4):331-336
- [4] Bao L, Chen K, Zhang D, et al. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus L.*) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers[J]. Genet Resour Crop Evol, 2007, 54(5):959-971
- [5] 王荣升,魏鑫,曹立荣,等. 基于叶绿体基因多样性的中国水稻起源进化研究[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(5):686-693
- [6] Zheng X, Cai D, Potter D, et al. Phylogeny and evolutionary histories of *Pyrus L.* revealed by phylogenetic trees and networks based on data from multiple DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2014, 80:54-65
- [7] 胡春云,郑小艳,滕元文. 梨属叶绿体非编码区 *trnL-trnF* 和 *accD-psaI* 特征及其在系统发育研究中的应用价值[J]. 园艺学报,2011,38(12):2261-2272
- [8] 常耀军,曹玉芬,张金梅,等. 基于叶绿体 DNA 分析的辽宁省梨属种质遗传多样性研究[J]. 园艺学报,2014,41(12):1307-1316
- [9] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19:11-15
- [10] Taberlet P, Gielly L, Pauton G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Mol Biol, 1991, 17:1105-1109
- [11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25:4876-4882
- [12] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25:1451-1452
- [13] 俞德浚,谷粹芝. 中国植物志·第36卷[M]. 北京:科学出版社,1979:355-356
- [14] Katayama H, Tachibana M, Iketani H, et al. Phylogenetic utility of structural alterations found in the chloroplast genome of pear: hypervariable regions in a highly conserved genome[J]. Tree Genet Genomes, 2012, 8:313-326
- [15] Liu J, Zheng X, Potter D, et al. Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang province, China[J]. Biochem Syst Ecol, 2012, 45:69-78
- [16] 杨军,曹玉芬,吴俊,等. 荆门棠梨野生居群遗传多样性分析[J]. 园艺学报,2011,38(S):2471