

基于叶绿体 SSR 单倍型分析 普通杏演化关系

魏 潇, 章秋平, 刘威生, 刘 宁, 张玉萍, 徐 铭, 刘 硕, 张玉君, 马小雪

(辽宁省果树科学研究所, 营口 115009)

摘要: 为了研究普通杏的起源和不同品种群间的演化关系, 以梅为组外对照, 利用 9 对叶绿体 SSR 引物检测了来自不同品种群或野生类型的 58 份普通杏种质资源单倍型变化, 并对单倍型网络演化进行了分析。共检测到 22 个等位基因, 组成 15 个单倍型。普通杏以单倍型 H01、H02 和 H03 为优势单倍型, 出现的频率分别为 41.38%、17.24% 和 15.52%。除华南品种群外, 其他品种群的栽培杏均以优势单倍型为主; 西北地区的普通杏仅有单倍型 H01、H02 和 H03, 而新疆伊犁河谷的野生普通杏仅有 2 种单倍型 H01 和 H02。同时, 在东北品种群、华南品种群和西南地方品种中检测的单倍型数目均多于主栽产区。进一步对这些单倍型进行系统进化分析和网络图分析, 发现所有单倍型可分为以 H02 为中心和以 H01、H03 为中心的 2 支, 单倍型 H01、H02 位于网络图的中心。普通杏的叶绿体基因组进化较为保守, 仅在较少部位产生了序列变异。在普通杏扩散过程中, 边缘地区的种质资源不仅在基因组上存在着较多的基因渗透现象, 而且其本身的基因组序列也产生了较多的适应性变异。

关键词: 叶绿体 SSR; 单倍型; 普通杏; 系统进化

Phylogenetic Relationship Analysis of Common Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Revealed by Chloroplast SSR Haplotypes

WEI Xiao, ZHANG Qiu-ping, LIU Wei-sheng, LIU Ning, ZHANG Yu-ping,

XU Ming, LIU Shuo, ZHANG Yu-jun, MA Xiao-xue

(Liaoning Institute of Pomology, Yingkou 115009)

Abstract: In order to investigate the origin of apricot and genetic variation among local populations (*Prunus armeniaca* L.) here we analyzed the haplotype diversity of 58 wild and common apricot accessions by using 9 pairs of polymorphic chloroplast SSR markers. Twenty-two alleles were detected consisting of 15 haplotypes. H01 (haplotype 01), H02 and H03 were 3 dominant haplotypes, which had the highest frequency in common apricot. The other haplotypes had lower frequency and 8 of them occurred only once which could be considered as rare haplotypes. H05 was detected only in *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. & Zucc. Although most of the cultivars groups had dominant haplotypes (except for Southern China cultivars group), the type and number of haplotypes in different cultivars groups were significantly different. The common apricot in Northwest China had only 3 dominant haplotypes, while the wild common apricot in the Ili River valley in Xinjiang had only 2 dominant haplotypes but no other haplotypes. At the same time, the number of haplotypes detected in the Northeast China cultivars group, the Southern China cultivars group and the Southwest local cultivars were more than those of the major producing regions. The phylogenetic tree of 15 haplotypes showed that all common apricot haplotypes were clustered into 2 major branches. The first branch is based on H01 and H03, while the second branch is based on H02. The dominant haplotypes H01 and H02

收稿日期: 2017-11-03 修回日期: 2017-12-07 网络出版日期: 2018-05-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180509.1044.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401826); 辽宁省农业领域青年科技新人才培养计划 (201429)

第一作者研究方向为果树种质资源。E-mail: weixiao6769@163.com

通信作者: 刘威生, 研究方向为果树种质资源。E-mail: wsluilaas@163.com

were in the center of the median-joining network and the other haplotypes were distributed around the dominant haplotypes. It was suggested that most haplotypes in common apricot were evolved from the dominant haplotypes. The rare haplotypes were 1 or 2 mutation steps from H01 and H02, which indicating that they were variation types based on H01 and H02. The semi-wild germplasm resource in Southwest China, Southern China and Northeast China had more rare haplotypes than common apricot in the major producing regions. Only few of mutations in chloroplast genome of common apricot vs. wild apricot were detected. Thus, this work speculated that along with the spreading process of the common apricot, the germplasm resource in cultivars groups differed to the center of origin such as Southwest China, Southern China and Northeast China cultivars groups that maintained higher frequency of introgressions and mutations in their chloroplast genome.

Key words: cpSSR; haplotype; common apricot (*Prunus armeniaca* L.); phylogeny

杏(*Prunus armeniaca* L.)为蔷薇科李属(*Prunus* L.)植物,根据不同区域普通杏的形态特征及生态环境,将杏划分为中亚生态群(包括我国新疆品种)、准葛尔-伊犁生态群、欧洲生态群、华北生态群(包括我国西北、华北等杏主要产区 and 西南地区种质)、华南生态群和东北生态群等6个不同的生态群^[1]。杏起源于中国^[1],我国栽培杏品种历史悠久,约在5000~6000年前我国古代先民就开始采食和利用杏果。据考证,栽培杏有3000多年历史^[2]。

我国栽培杏主要有三大区域,新疆产区、西北产区和华北产区。但是,除了以上3个地区外,在我国西南地区、华南地区以及东北地区也有许多处于半野生状态的地方品种。伊犁野杏被认为是全世界栽培杏的原生起源种群^[3]。何天明等^[4]、苑兆和等^[5]分别利用SSR和AFLP分子标记分析普通杏的演化关系后,认为杏起源于我国伊犁河谷地区。而另有学者认为华北生态群栽培历史悠久,资源变异极为丰富,华北地区是普通杏的原始起源中心^[6-7]。但是,有关我国西南地区、华南地区以及东北地区种质资源演化关系的研究较少,仅张淑青等^[8]、Zhang等^[9]研究中涉及到这些地区的材料,但并未对其种群的形成进行深入分析。

叶绿体微卫星(cpSSR, chloroplast simple sequence repeat)是近年来发展起来的一种高效的分子标记技术,具有重复性好、分布广泛等优点,同时保持了叶绿体基因组(cpDNA, chloroplast DNA)结构简单、相对保守、单亲遗传等特点^[10],能够较好地应用于植物种质资源群体遗传^[11]、物种演化^[12-13]、种群分类^[14]等研究中。Grivet等^[15]根据烟草cpDNA序列设计了一系列通用的cpSSR引物,这些引物经筛选后可在不同植物上应用,但这些引物在高等木本植物中的通用性不好,且多态性比较差,应用价值有限。魏潇等^[16]分析普通桃(*Prunus persica*

L.)叶绿体全序列中cpSSR的分布特点和规律,并成功设计出适宜李属(*Prunus* L.)植物的叶绿体通用SSR引物。本试验拟利用这些cpSSR引物深入分析我国不同地区普通杏(*P. armeniaca* L.),特别是非主栽地区地方种质资源的演化关系,旨在为杏种质资源的有效利用和保护提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试材

本试验共选用61份典型的、具有代表性的地方品种为试材,其中52份栽培普通杏(*P. armeniaca* L.)品种均采自辽宁省果树研究所熊岳国家李杏种质资源圃;6份野生普通杏采自于新疆伊犁地区的新源县和霍城县,由新疆农业大学提供;以3份梅(*Prunus mume* (Sieb.) Sieb. & Zucc.)做为对照,试材由南京农业大学国家果梅杨梅种质资源圃提供。根据地理来源及类型将供试材料划分为10个组群,具体信息参见表1。

1.2 方法

基因组DNA提取采用改良CTAB法,利用1%琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop 2000(Thermo Scientific)测定DNA的质量和浓度,将DNA稀释至20 ng/ μ L备用。根据桃叶绿体基因组全序列(HQ336405)中微卫星的分布规律^[16],设计合成了20对叶绿体SSR引物(表2)。利用这些SSR引物对供试材料进行PCR扩增。PCR反应采用20 μ L反应体系,反应体系参照Schuelke等^[17],5 μ L DNA模板、10 μ L 2 \times Taq Master Mix(北京康为世纪生物公司)、0.2 μ mol/L反向引物、0.04 μ mol/L带M13接头的正向引物和0.16 μ mol/L通用M13荧光引物。PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,15个循环;然后94 $^{\circ}$ C 45 s,52 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,25个循环;最后72 $^{\circ}$ C 5 min。

表 1 供试种质名称及原产地

Table 1 The origins of apricot accessions used in this study

品种群	编号	种质名称	原产地或来源	品种群	编号	种质名称	原产地或来源
Cultivars group	Code	Germplasm	Origin	Cultivars group	Code	Germplasm	Origin
西南品种 N01 Southwest China cultivars group	X01	大海杏	中国云南祥云	欧洲品种 N06 European cultivars group	X32	亚 1	亚美尼亚
	X02	晚甜杏	中国云南文山		X33	亚 2	亚美尼亚
	X03	姑咱杏	中国四川康定		X34	Morpark	英国
	X04	酸梅子	中国四川泸定		X35	Bergero	捷克
	X05	花秋杏	中国贵州桐梓		X36	Kecpsar	捷克
	X06	道孚杏	中国四川道孚		X37	Pisana	意大利
西北品种 N02 Northwest China cultivars group	X07	唐王川大接杏	中国甘肃临夏	华南品种 N07 Southern China cultivars group	X38	Tyrinthos	希腊
	X08	金妈妈	中国甘肃兰州		X39	Harcot	加拿大
	X09	张公园	中国陕西三原		X40	SEO	美国
	X10	白沙杏	中国陕西商州		X41	虹桥杏	中国浙江乐清
	X11	牛心杏	中国宁夏		X42	浙江杏	中国浙江
	X12	甜仁黄口外	中国宁夏		X43	仙居杏	中国浙江仙居
华北品种 N03 North China cultivars group	X13	草坯杏	中国陕西乾县	东北品种 N08 Northeast China cultivars group	X44	源东杏	中国浙江
	X14	密陀罗	中国北京延庆		X45	义乌 1 号	中国浙江义乌
	X15	荷包杏	中国天津蓟县		X46	张村早杏	中国浙江
	X16	石片黄	中国河北怀来		X47	六三一	中国黑龙江友谊
	X17	曲阜平黄	中国山东曲阜		X48	东宁 2 号	中国黑龙江东宁
	X18	烟黄 1 号	中国山东烟台		X49	中白	中国黑龙江友谊
新疆品种 N04 Xinjiang cultivars group	X19	红榛杏	中国山东青州	新疆野生普通杏 N09 Xinjiang wild cultivars group	X50	友谊银白	中国黑龙江友谊
	X20	安加娜	中国新疆南疆		X51	早大黄	中国黑龙江友谊
	X21	毛拉肖	中国新疆柯坪		X52	辽阳李子杏	中国辽宁辽阳
	X22	冬杏	中国新疆轮台		X56	XY1	中国新疆新源
	X23	库车 1 号	中国新疆库车		X57	XY2	中国新疆新源
	X24	辣椒杏	中国新疆库车		X58	XY3	中国新疆新源
西亚品种 N05 West Asian cultivars group	X25	托乎提库达优系	中国新疆喀什	梅 N10 <i>P. mume</i>	X59	QSH-1	中国新疆霍城
	X26	赛买提	中国新疆英吉沙		X60	QSH-2	中国新疆霍城
	X27	克孜克西米西	中国新疆阿克苏		X61	QSH-3	中国新疆霍城
	X28	Hacihaliloglu	土耳其		X70	细叶青	中国南京农业大学
	X29	Kabaasi	土耳其		X71	小叶猪肝	中国南京农业大学
	X30	Soganci	土耳其		X72	南京红	中国南京农业大学
	X31	Dilbay	土耳其				

表 2 本研究中叶绿体 SSR 通用引物基本信息

Table 2 Information of cpSSR primers used in this study

标记	分布区域	重复序列	引物序列(5'-3')	退火温度	片段大小
Marker	Location	Repeat motif	Primer sequences(5'-3')	(℃) Ta	(bp) Size
ChlpSSR49	LSC	(T)12	F: AGGGCTCTACCCATTTATTC	55	
ChlpSSR49			R: CCACATCATCGGTAGAGTTT		
ChlpSSR53	LSC	(T)10-(ATTTAA)2	F: TTGCAATGGCTTCTTTATCT	55	

表 2(续)

标记 Marker	分布区域 Location	重复序列 Repeat motif	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	退火温度 (℃) Ta	片段大小 (bp) Size
ChlpSSR53			R: CTTTCACATGATTTCGGAAT		
ChlpSSR71	LSC	(A)11	F: GAGACAAAGGCATAAAAACAA	55	263/274/276
ChlpSSR71			R: AGCTCTAATAAAGGGAAGC		
ChlpSSR13	LSC	(A)13	F: TCTCTTAAGACTGAGAGCGG	55	157/158
ChlpSSR13			R: ACCTTTTCAATTGTAGCCAA		
ChlpSSR18	LSC	(AT)5	F: ATGTCGGAGATATACCCCTT	55	256/268
ChlpSSR18			R: GAGATGCATTTTGGCTATTC		
ChlpSSR12	LSC	(A)12-(ATAAAT)2	F: TGCTATTATAACCTTCCCGA	55	220/221
ChlpSSR12			R: AAATGAAAGAAAGAAGGGCT		
TPSep9	LSC	(TCAAA)3	F: CTCAAGGGCAAGAATCTAAGGT	55	232/235/236/241
TPSep9			R: CCGTTTTTTGTGATTTCTTTCT		
ChlpSSR38	SSC	(T)10	F: GCATAGGGGATTGTTGTTAG	55	173/174
ChlpSSR38			R: TAATAGGTTCTTCGGTTGGA		
ChlpSSR15	SSC	(A)13	F: TCCGAAAATTCTGTGTTTTT	55	208/209
ChlpSSR15			R: CGAGACATAATCAAAGGCTC		
ChlpSSR05	LSC	(T)9	F: TTGAAAACGAATCCTAATG	55	210
ChlpSSR05			R: ATTTTCTTTTTCCTTTGTATTATC		
ChlpSSR08	LSC	(A)11	F: GTGGTTTTTTAGCCTGTTTTG	55	318
ChlpSSR08			R: TGCGGTGAATATTTGTTGTA		
ChlpSSR11	LSC	(A)12	F: ATAAAGTGCATTACAAGGGC	55	291
ChlpSSR11			R: AGATTCATCGGTCAACTCTG		
ChlpSSR14	LSC	(A)13	F: AACAATTTGAAAGAAGCGAG	55	202
ChlpSSR14			R: AAGGAATCCGTTGGAATAGT		
ChlpSSR17	LSC	(AT)5	F: AAGAATACCATGCTGCATCT	55	264
ChlpSSR17			R: GAGTGTGTGCGAGTTGTTTA		
ChlpSSR41	LSC	(T)10	F: GCCAAACAAAACTTTAGGA	55	301
ChlpSSR41			R: AAGCGGTATTCAAGCTCTTA		
ChlpSSR45	LSC	(T)11	F: TCTTTACGTTTTCCTTTCA	55	136
ChlpSSR45			R: AAGCTTTGACGAACGATCTA		
ChlpSSR51	LSC	(T)12-(A)11	F: ATGACCAAAATGAACTCCTG	55	288
ChlpSSR51			R: TCATCCTTTTACGGTCATTT		
ChlpSSR54	LSC	(T)14	F: GAGGGCTTGTTATTCAACAG	55	183
ChlpSSR54			R: TAGCATATGGAAATCGTGTC		
ChlpSSR56	LSC	(T)16	F: GCCAAGTATCACAACTCTC	55	299
ChlpSSR56			R: CCCATTAAACAACATCGAAT		
ChlpSSR69	SSC	(A)10	F: TCAAAAACAAGTACATGCTCG	55	317
ChlpSSR69			R: ATAGAATTGGCAACAGCAAT		

LSC: 大拷贝区; SSC: 小拷贝区

LSC: large single copy, SSC: small single copy

PCR 产物纯化后按比例稀释 30 倍,取 1 μ L 加入 7 μ L 甲酰胺和 0.05 μ L Liz-500 Size-Standard(内标),经 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,冰上冷却 10 min 后,在 DNA 遗传分析仪(ABI 3730 XL)上检测。利用 ABI Gene Mapper V3.0 软件读取片段大小。

1.3 数据分析

利用 GenAlEx 6.41 软件计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon's 指数(I)、多样性指数(h)以及无偏多样性指数(uh)。利用 MEGA 6.0 软件和 Juukes-Cantor 模型计算所有样品及群体间的遗传距离,并用邻接法 NJ 进行聚类分析。基于所有 SSR 位点的单倍型,采用 MEGA 6.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining)构建谱系树。为了明晰单倍型的地理分布与遗传谱系的相关性,采用软件 Network 4.2 中的最大简约法对所有单倍型

进行谱系的单倍型网络分析,以此来推测单倍型间的演化关系。

2 结果与分析

2.1 叶绿体 SSR 引物的多态性及单倍型分布

根据桃(*P. persica* L.)叶绿体全基因组序列,设计了 20 对叶绿体 SSR 引物,仅有 9 对引物能够在本研究试材中产生多态性片段,来自 10 个自然群体的 61 份试材中共检测到 22 个等位基因(表 2、表 3)。9 对引物的多态性比较如表 3 所示,其中 TPS09 标记扩增到的等位基因最多为 4 个,ChlpSSR49 标记和 ChlpSSR71 标记为 3 个,其余标记仅有 2 个,而 ChlpSSR18 标记和 ChlpSSR53 标记在普通杏材料中无多态性,仅与对照材料梅产生差异,表明叶绿体基因组遗传明显具有保守性。

表 3 9 对叶绿体 SSR 引物的多态性比较

Table 3 The polymorphisms of 9 pairs cpSSR primers

多态性参数 Parameters of polymorphism	标记 Marker								
	ChlpSSR12	ChlpSSR13	ChlpSSR15	ChlpSSR18	ChlpSSR38	ChlpSSR49	ChlpSSR53	ChlpSSR71	TPS09
等位基因数 N_a	2	2	2	2	2	3	2	3	4
有效等位基因数 N_e	1.038	1.226	1.493	1.000	1.066	1.038	1.000	1.483	1.148
Shannon's 指数 I	0.045	0.210	0.434	0.000	0.083	0.045	0.000	0.393	0.176
多样性指数 h	0.028	0.139	0.290	0.000	0.050	0.028	0.000	0.262	0.108
无偏多样性指数 uh	0.033	0.165	0.344	0.000	0.058	0.033	0.000	0.311	0.129

N_a : the number of alleles, N_e : effective number of alleles, I : Shannon's information index, h : Nei's genetic diversity index, uh : unbiased Nei's genetic diversity index

22 个等位基因在 61 份材料中组成了 15 个单倍型,各单倍型在不同位点上的变异如表 4 所示,并对各单倍型出现的频率和各品种群中单倍型的种类数目做了统计(表 5)。单倍型 H01、H02 和 H03 在普通杏中出现的频率较高,分别是 41.38%、17.24% 和 15.52%,为优势单倍型;其他单倍型出现的频率较低,而 H06、H07、H08、H10、H12、H13、H14、H15 仅出现了 1 次,为稀有单倍型。单倍型 H05 是对照梅特有的单倍型。

在普通杏中(华南品种群除外),尽管以优势单倍型(H01、H02 和 H03)为主,但是在不同品种群中检测到的单倍型种类存在明显差异。在新疆野生普通杏中仅有 2 种单倍型(H01 和 H02),而新疆品种群中的栽培品种有 4 种单倍型,西北品种群仅有 3 种优势单倍型(H01、H02 和 H03)。其他品种群除了含有优势单倍型还有其他单倍型。华北和西亚品种群均有 3 种单倍型,新疆栽培品

种、西南品种群和东北品种群均有 4 种单倍型,欧洲品种群有 5 种单倍型。尽管在华南品种群并未检测到普通杏的优势单倍型,但该生态群检测到的单倍型数目最多(6 种),且有 3 种稀有单倍型是该品种群特有类型。同时,处于半野生状态的西南品种群和东北品种群的单倍型数目也均多于我国西北和华北品种群。

2.2 单倍型的聚类分析

为了分析不同单倍型间的遗传关系,利用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-joining 法对 15 个单倍型构建系统发育树。结果如图 1 所示,梅特有的单倍型 H05 位于最外侧,而所有普通杏的叶绿体单倍型可以聚为 2 大支。其中,第 1 支以单倍型 H01 和 H03 为中心,和单倍型 H04、H06、H07、H08、H09、H10、H15 聚类在一起,但单倍型 H04、H07、H10 以及 H15 距中心单倍型较远。第 2 支以单倍型 H02 为基础,与 H11、H12、H13 和 H14 聚类在一起。

表 4 各单倍型在不同 SSR 位点上的变异

Table 4 Variation of haplotypes in different cpSSR loci

单倍型 Haplotype	微卫星标记位点 SSR locus								
	SSR15	SSR53	SSR49	SSR13	SSR12	SSR71	TPS09	SSR38	SSR18
H01	208	301	234	158	221	276	236	174	268
H02	209	301	234	158	221	276	236	174	268
H03	208	301	234	158	221	263	236	174	268
H04	208	301	234	157	221	276	236	174	268
H05	209	303	231	158	220	276	241	174	256
H06	208	301	233	158	221	276	236	174	268
H07	208	301	234	157	220	274	236	174	268
H08	208	301	234	158	221	276	232	174	268
H09	208	301	234	158	221	276	235	174	268
H10	208	301	234	158	221	276	236	173	268
H11	209	301	234	157	221	263	236	174	268
H12	209	301	234	157	221	276	235	174	268
H13	209	301	234	157	221	276	236	174	268
H14	209	301	234	158	221	263	236	174	268
H15	209	301	234	158	221	276	236	173	268

表 5 15 种单倍型在 10 个品种群体上的分布

Table 5 Distribution of 15 haplotypes in 10 natural populations

单倍型 Haplotype	品种群 Cultivars group											频率(%) Frequency
	西南	西北	华北	新疆	西亚	欧洲	华南	东北	新疆野生	梅	总计	
	N01	N02	N03	N04	N05	N06	N07	N08	N09	N10	Total	
H01	2	4	2	5	4	1	0	2	4	0	24	41.38
H02	1	1	0	1	1	2	0	2	2	0	10	17.24
H03	2	2	3	0	0	2	0	0	0	0	9	15.52
H04	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	3	5.17
H05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	—
H06	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.72
H07	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1.72
H08	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1.72
H09	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	3.45
H10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1.72
H11	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	3.45
H12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1.72
H13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1.72
H14	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1.72
H15	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1.72
种类数 Kinds number	4	3	3	4	3	5	6	4	2	1	—	—

2.3 单倍型网络图分析

为了进一步分析这些叶绿体单倍型的演化关系,绘制了叶绿体单倍型网络中介图(Median-joining network),如图 2 所示。梅的单倍型 H05 为外类群。在普通杏中,单倍型 H01、H02 和 H03 频率较高,为优势单

倍型。H01 和 H02 处于网络图的中心位置,其他单倍型的频率较低,围绕 H01 和 H02 呈发散状分布。单倍型 H11、H12、H13 和 H14 由 H02 衍生而来,其他单倍型均由 H01 衍生而来,与聚类结果一致。由此可见,所有普通杏的单倍型是以优势单倍型为中心演化而成的。

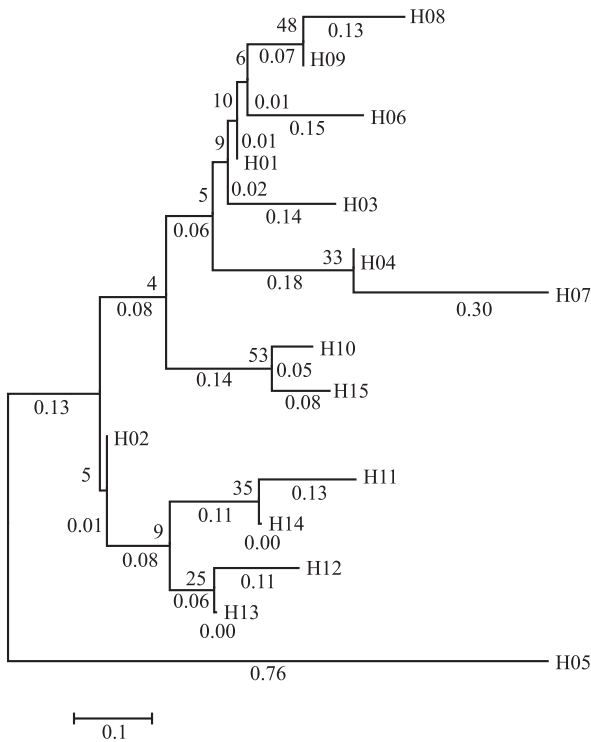
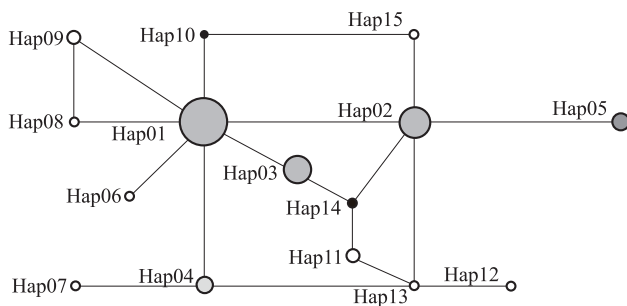


图1 基于邻接法构建的15个单倍型分子谱系树
Fig.1 Phylogenetic tree for 15 cpDNA haplotypes of common apricots based on Neighbor-joining (NJ)



圆圈大小代表单倍型频率,灰色表示主要单倍型,
白色表示我国地方种质特有单倍型
The size of circle represented frequency of the haplotype,
gray circle represented the main haplotype, and white circle
represented the haplotype in local germplasm only in China

图2 普通杏的单倍型网络中介图
Fig.2 Median-Joining network for cpDNA haplotypes in *P. armeniaca* L.

新疆品种群和野生普通杏均以单倍型 H01 和 H02 为主,而我国西北品种群则以 3 种优势单倍型为主 (H01、H02 和 H03)。与我国三大主产区杏品种群相比,我国杏栽培边缘区域的品种群则包含有较多的变异,如华南品种群含有 6 个稀有单倍型、东北品种群含有 2 个稀有单倍型 (H11 和 H12)、西南品种群也含有 1 个稀有单倍型 (H06)。而这些稀有单倍型均距单倍型

H01 或 H02 有 1 个或 2 个突变步长,这表明这些稀有单倍型是以这 2 个单倍型为基础产生的变异类型。

3 讨论

3.1 叶绿体基因组在群体分化研究中的作用及叶绿体 SSR 标记的多态性

叶绿体基因相当保守,突变类型主要表现为点突变、碱基插入或缺失,进化速率平均每年每个位点约为 $0.2 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-9}$,仅为核基因的 $1/3$ ^[18-19]。在高度混合或变异较多的群体分化研究中,低速突变的叶绿体基因组有着独特的作用^[20-21]。本研究通过 9 对叶绿体 SSR 引物对 61 份普通杏及对照材料进行分析,共检测到 22 个等位基因,这表明杏叶绿体基因组多态性较差,具有明显的保守性。

叶绿体基因组 SSR 不仅具有核基因组 SSR 标记的共显性、重复性好等固有特点,而且还具有很好的种属通用性^[13],因而更适合在种间和较复杂的分类群上进行起源、进化、分类及种质资源多样性分析等研究。然而,适合李属 (*Prunus* L.) 的叶绿体 SSR 引物报道很少^[22]。作者在分析李属桃 (*P. persica* L.) 叶绿体全基因组 SSR 分布规律的基础上^[16],设计了 74 对叶绿体 SSR 引物,并随机选取了其中 20 对引物在普通杏 (*P. armeniaca* L.) 中进行检测,结果发现仅有 7 对表现出多态性 (本研究中有 2 对引物仅在梅上产生差异),这一事实再次证明叶绿体基因组进化特性极其保守,其变异仅发生在很少部位的序列上。

3.2 普通杏不同生态群间的演化关系

通过比较本研究中不同品种群间的单倍型差异,发现大部分群体以优势单倍型 (H01、H02 和 H03) 为主。新疆伊犁河谷的野生普通杏仅有优势单倍型 H01 和 H02,其单倍型数目明显少于新疆栽培品种群,且没有其他单倍型;同样,西北杏仅有优势单倍型 H01、H02 和 H03,而没有其他单倍型。而其他品种群除了有优势单倍型之外,还有其他单倍型。从单倍型网络图上看, H03 是由 H01 衍生而来,因此,含有优势单倍型 H01 和 H02 的新疆伊犁地区可能是栽培普通杏的起源中心,而我国陕甘宁等西北地区可能是次生中心。本研究的叶绿体研究结论与核基因组的 AFLP 标记^[5]和 SSR 标记^[23]检测的研究结果相似。

根据文献记载,杏资源最初是沿着丝绸之路,从中国北方和新疆地区传播到伊朗、土库曼斯坦、高加索等中亚地区,再传播至意大利、希腊等欧洲国家^[1]。基于 15 个叶绿体单倍型的分布频率分析,发现我国三大主产区 (新疆、西北和华北) 地方品种群的单倍

型数目多于新疆伊犁河谷的野生普通杏;在华北品种群中高频率出现的单倍型 H03 却在新疆品种中检测不到。表明在普通杏扩散早期,这两个区域的杏资源就形成了隔离,而且在以后的栽培驯化中也并无相互交流。而在形成较晚的欧洲品种群中,均能检测到这 2 个品种群的单倍型,表明在人为引种过程中欧洲品种群则融合了华北品种和中亚品种的特点,这与基于表型多样性的检测结果一致^[24]。华北、西北、新疆和西亚等品种群中除优势单倍型之外含有较少的其他低频单倍型,且低频单倍型距优势单倍型 H01 仅存在 1 个突变步长,表明杏种质在从起源中心向外自然传播过程中,叶绿体基因组也产生了细微变异。

对于一种植物来说,其自然分布范围与该种的发生历史、传播能力和条件、分布区适宜该植物范围的大小、人为影响等因素有关^[25]。一般认为,分类群始终保持由起源中心向四周扩散,而在扩散过程中这些边缘种质很容易产生新的突变和变异^[25]。本研究结果显示,我国西南品种群、华南品种群和东北品种群中的稀有单倍型均由以 H01 和 H02 为基础的突变衍生而成,且单倍型数目也比主产区品种群的单倍型多。基于核 SSR 标记变异研究,张淑青等^[8]分析认为我国西南品种群的多样性较高是由于近缘种梅的基因混合造成;Zhang 等^[9]也认为华南品种群和东北品种群存在着近缘种基因渗透现象。结合本研究可以看出,生长在普通杏边缘地区的种质资源不仅在基因组上存在着较多的近缘种基因渗透,而且由于生境的多样性变化其本身的基因组序列也产生了较多的适应性变异。

本研究通过 9 对叶绿体 SSR 引物检测了来自不同品种群或野生类型的 58 份普通杏种质资源单倍型变异,结果认为普通杏的叶绿体基因组进化较为保守,仅在很少部位发生了序列变异。基于本研究中 15 个单倍型的分布和网络关系,认为栽培普通杏起源于新疆伊犁地区,我国陕甘宁等西北地区是栽培普通杏的一个重要次生中心;在普通杏扩散过程中,边缘地区的种质资源不仅在基因组上存在着较多的基因渗透现象,而且其本身的基因组序列也产生了较多的适应性变异。

参考文献

- [1] 张加延,张钊. 中国果树志·杏卷. 北京:中国林业出版社, 2003:17-46
- [2] Gu M. Apricot cultivars in China. *Acta Horticulturae*, 1988, 209: 63-67
- [3] Zhebentyayeva T N, Reighard G L, Gorina V M, Abbott A G. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic var-

- iability in apricot germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 435-444
- [4] 何天明,陈学森,张大海,徐麟,刘宁,高疆生,许正. 中国普通杏种质资源若干生物学性状的频度分布. *园艺学报*, 2007, 34 (1): 17-22
- [5] 苑兆和,陈学森,张春雨,何天明,冯建荣,冯涛. 普通杏群体遗传结构的荧光 AFLP 分析. *园艺学报*, 2008, 35 (3): 319-328
- [6] Topp B L, Russell D M, Neumuller M, Dalbo M, Liu W S. Plum//Badenes M. L. and Byrne D. H. *Fruit Breeding. Media*; Springer Science Business, 2012: 571-621
- [7] Liu W S, Liu N, Yu X H, Zhang Y P, Sun M, Xu M, Zhang Q P, Liu S. Kernel-using apricot resources and its utilization. *Acta Horticulturae*, 2012, 864: 189-191
- [8] 张淑青,刘冬成,刘威生,张爱民,李绍华. 普通杏品种 SSR 遗传多样性分析. *园艺学报*, 2010, 37 (1): 23-30
- [9] Zhang Q P, Liu D C, Liu S, Liu N, Wei X, Zhang A M, Liu W S. Genetic diversity and relationships of common apricot (*Prunus armeniaca* L.) in China based on simple sequence repeat (SSR) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2014, 61: 357-368
- [10] 王化坤,姜晓鸣,章镇. 叶绿体微卫星在植物种质资源研究中的应用. *分子植物育种*, 2006, 4 (3S): 92-98
- [11] Moran M E, Vedel F, Raquin C, Brachet S, Sihachahr D, Frascaria-lacoste N. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology*, 2002, 11 (3): 613-617
- [12] Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M, Pastorelli R, Salvini D, Paule L, Frascaria-lacoste N, Hardy O J, Vekamans X, Vendramin G G. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology*, 2004, 13 (11): 3437-3452
- [13] Xu D H, Abe J, Gai J Y, Shimamoto Y. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origin of cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105 (5): 645-653
- [14] Sukhotu T, Kamijima O, Hosaka K. Nuclear and chloroplast DNA differentiation in Andean potatoes. *Genome*, 2004, 47 (1): 4625
- [15] Grivet D, Henize B, Vendramin G G, Petit R J. Genome walking with consensus primers application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*, 2001, 1 (4): 345-349
- [16] 魏潇,章秋平,刘威生,杨巍. 桃叶绿体全序列微卫星分布规律研究. *辽宁农业科学*, 2013 (2): 5-8
- [17] Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 233-234
- [18] Badenes M L, Parfitt D E. Phylogenetic relationships of the cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 1035-1041
- [19] Demesure B, Comps B, Petit R J. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 1996, 50: 2515-2520
- [20] 张靖国,曹玉芬,陈启亮,杨晓平,范净,田瑞,胡红菊. 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. *植物遗传资源学报*, 2016, 17 (4): 766-772
- [21] 王荣升,魏鑫,曹立荣,乔卫华,张万霞,杨庆文. 基于叶绿体基因多样性的中国水稻起源进化研究. *植物遗传资源学报*, 2011, 12 (5): 686-693
- [22] Ohta S, Nishitani C, Yamamoto T. Chloroplast microsatellites in *Prunus*, Rosaceae. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5 (4): 837-840
- [23] 包文泉,乌云塔娜,王淋,赵罕,杜红岩. 野生杏和栽培杏的遗传多样性和遗传结构分析. *植物遗传资源学报*, 2017, 18 (2): 201-209
- [24] 赵海娟,刘威生,刘宁,张玉萍,章秋平,刘硕. 普通杏 (*Prunus armeniaca*) 种质资源数量性状的遗传多样性分析. *果树学报*, 2014, 31 (1): 20-29
- [25] 徐刚标. 植物群体遗传学. 北京:科学出版社, 2009: 160-254