

新疆野苹果叶绿体 DNA 变异与遗传进化分析

高 源, 王大江, 王 昆, 丛佩华, 张彩霞, 李连文, 朴继成

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

摘要: 利用 4 对叶绿体 DNA 引物对来源于新疆巩留、霍城和新源 3 个地区的 242 份新疆野苹果种质资源的 4 个非编码区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 进行了扩增, 基于 4 个叶绿体基因间区的序列变异, 从母系遗传的角度评价了遗传变异和不同居群的遗传进化关系。结果表明: 4 个叶绿体 DNA 非编码区经测序、拼接、比对和合并之后的片段长度为 3812 bp, 共有 171 个多态性变异位点, 其中包含 6 个单一突变位点、16 个简约信息位点和 149 个插入-缺失位点。在 242 份新疆野苹果种质中, *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 区域的变异位点的数量分别为 68 个、25 个、77 个和 1 个, 单倍型数量分别为 36 个、6 个、6 个和 2 个, 合并之后的叶绿体 DNA 片段的单倍型为 52 个。核苷酸多样性和单倍型多样性最高的区域均为 *trnH-psbA* ($Hd=0.773$, $Pi=0.01982$), 最低的为 *5'trnL-trnF* ($Hd=0.025$, $Pi=0.00002$)。242 份新疆野苹果种质 4 个叶绿体 DNA 区域合并后的遗传多样性较高 ($Hd=0.806$, $Pi=0.00291$)。Tajima's D 检验中, 4 个 cpDNA 区域合并后片段在 $P<0.05$ 水平上显著, 4 个 cpDNA 区域整体不遵循中性进化模型, 自然选择的压力是新疆野苹果遗传进化的主要动力。新疆野苹果的遗传变异主要存在于居群内部, 新疆巩留和新源居群间的遗传距离较近, 与霍城居群间遗传距离相对较远, 居群间的遗传分化与地理距离相关。3 个地区的新疆野苹果各自经历着遗传分化但又存在频繁基因交流, 有向新疆新源的新疆野苹果演化的趋势。

关键词: 新疆野苹果; 叶绿体 DNA; 遗传变异; 遗传进化

Chloroplast DNA Variation and Genetic Evolution of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.

GAO Yuan, WANG Da-jiang, WANG Kun, CONG Pei-hua, ZHANG Cai-xia, LI Lian-wen, PIAO Ji-cheng

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Xingcheng Liaoning 125100)

Abstract: Four non-coding region, *trnH-psbA*, *trnS-trnG* spacer+intron, *trnT-5'trnL* and *5'trnL-trnF* of 242 germplasm accessions of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. from 3 sources of Gongliu, Huocheng and Xinyuan of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China were amplified by four primers. Based on the genetic variation of the four chloroplast intergenic regions, the genetic variation and evolution of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. populations were explored from the perspective of maternal inheritance. The results showed that the length of the four non-coding regions of chloroplast DNA was 3812 bp after sequencing, splicing, alignment and merging, and 171 variable sites were detected, including 6 singleton variable sites, 16 parsimony informative sites and 149 insertion-deletion gaps. Among the 242 accessions of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. the number of variable

收稿日期: 2019-07-19 修回日期: 2019-08-13 网络出版日期: 2019-09-02

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190719002>

第一作者研究方向为果树种质资源研究, E-mail: gaoyuan02@caas.cn

通信作者: 王昆, 研究方向为果树种质资源研究, E-mail: wangkun5488@163.com

丛佩华, 研究方向为果树遗传育种研究, E-mail: congph@163.com

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2016-RIP-02); 农作物种质资源保护与利用专项 (NB2015-2130135-39); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303093)

Foundation project: CAAS Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-2016-RIP-02), Earmarked Fund for Protection and Utilization of Crop Germplasm Resources (NB2015-2130135-39), National Public Welfare Industry (Agriculture) Scientific Research Project (201303093)

sites of the regions *trnH-psbA*, *trnS-trnG* spacer+intron, *trnT-5'trnL* and *5'trnL-trnF* were 68, 25, 77 and 1. The number of haplotypes for the four regions were 36, 6, 6 and 2, and after the four regions merged the haplotypes of chloroplast DNA fragments were 52. The region with the highest nucleotide and haplotype diversity was *trnH-psbA* ($Hd=0.773$, $Pi=0.01982$), and the nucleotide and haplotype diversity of *5'trnL-trnF* was the lowest ($Hd=0.025$, $Pi=0.00002$). The cpDNA diversity of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. with the four chloroplast DNA regions merged was high ($Hd=0.806$, $Pi=0.00291$). Tajima's test showed that all the Tajima's D values are statistically significant at $P<0.05$, indicating that the overall variation of the four chloroplast regions had not followed the neutral theory of molecular evolution, and the pressure of natural selection is the main driving force of genetic evolution of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. The genetic variation of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. mainly existed within populations. The distance between populations from Gongliu and Xinyuan of Xinjiang was closer than that between populations from Huocheng and Gongliu or from Huocheng and Xinyuan of Xinjiang. The genetic differentiation correlated with the geographical distances. *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. from the 3 sources were experiencing genetic differentiation, but also having frequent gene exchanges among different populations, and had a tendency to evolve to Xinyuan population in Xinjiang.

Key words: *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.; chloroplast DNA; genetic variation; genetic evolution

新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) 是蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (*Malus* Mill.) 植物野生种, 又称塞威士苹果, 在中国新疆地区还被称为野苹果、牙瓦阿尔玛 (维语) [1]。属于第三纪孑遗植物 [2], 被许多学者研究证实为现代栽培苹果的原始祖先 [3-6]。分布于天山山脉, 包括中国新疆伊犁地区、哈萨克斯坦的阿拉木图州、塔尔迪库勒干州及吉尔吉斯斯坦的伊塞克湖州 [7]。我国境内主要分布于新疆西天山伊犁河谷的新疆野果林内 [8], 集中分布于新源新疆野苹果保护区、巩留莫乎尔乡八连、霍城大西沟乡庙尔沟等海拔 1172.68~1630.30 m 的地区 [9]。新疆野苹果是珍贵的种质资源, 种质类型极为丰富 [10]。除具有可被直接利用以及作为育种原始材料的类型外, 新疆野苹果还具有抗寒、耐虫、耐病和耐旱等优良性状, 适宜作栽培苹果的砧木, 具有亲和力强、种源丰富的特点, 是西北地区及其他产区苹果的主要砧木之一。

近些年考察发现, 苹果小吉丁虫危害严重、未成熟果实过度采摘、种群年龄结构衰老等问题造成新疆野苹果资源的数量和质量均在急剧下降 [11-12]。新疆野苹果已被列为具有生物多样性国际意义的中国优先保护物种和国家二级重点保护植物 [13-15]。因此, 研究新疆野苹果的遗传变异和遗传进化进程, 探讨其遗传多样性和濒危机制, 对其保护和利用具有重大意义。以往, 新疆野苹果的遗传多样性研究主要集中在表型 [16-21] 和 SSR 分子

标记 [22-25] 等方面, 尚未从母系遗传的角度对新疆野苹果居群之间的遗传变异和遗传进化进行系统研究。在植物中, 叶绿体基因组高度保守, 非编码区进化速度较快, 适用于较低的分类阶元 (如科、属) 的系统研究 [26], 利用叶绿体基因组序列可直接进行遗传多样性检测 [27], 在系统发育研究中其母系遗传的特点具有独特优势 [28]。因此, 叶绿体 DNA 在植物系统发育、遗传多样性和亲缘演化关系等研究方面发挥着重要作用 [29]。本研究利用 4 对叶绿体 DNA 引物扩增来自新疆新源、巩留和霍城 3 个地区的 242 份新疆野苹果的 4 个非编码区, 分析 4 个叶绿体 DNA 间区序列的遗传变异, 解析新疆野苹果居群在叶绿体 DNA 水平上的遗传多样性, 探讨新疆野苹果居群间的系统演化关系, 以为该种的多样性保护、有效利用和系统进化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在新疆新源、霍城和巩留的野果林中考察收集新疆野苹果入国家果树种质兴城梨、苹果圃 (辽宁省兴城) 嫁接繁殖保存。于 2017 年春季采集新疆野苹果种质的健康幼嫩叶片, 叶片经硅胶干燥之后备用; 2018 年完成所有材料 4 个叶绿体 DNA 非编码区测序, 所有供试新疆野苹果材料信息见表 1。

表 1 来源于 3 个地区的 242 份新疆野苹果分居群信息
Table 1 Information of 242 accessions of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. of the three source populations

试材编号 Codes of accessions	来源地 Origin	个体数量 Number of accessions	居群代码 Code of population
MS1~MS64, MS125~MS138	新疆巩留	78	MSGL
MS65~MS124	新疆霍城	60	MSHC
MS139~MS242	新疆新源	104	MSXY

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

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。分别用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其浓度和纯度,经检验合格后,提取 DNA 原液,一部分原液于-20℃冷冻保存,一部分原液稀释至 40 ng/μL

备用。
从 Shaw 等^[30]报道的叶绿体 DNA 序列中选取 4 个基因间区 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 对应的 4 对叶绿体通用引物(表 2),交由上海生工(Sangon)生物工程股份有限公司合成。50 μL 的 PCR 反应体系:DNA 模板 2 μL,正向和反向引物(10 μmol/L)各 2.5 μL,d NTP (2.5 mmol/L) 5 μL, 10× Buffer 5 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.6 μL, ddH₂O 32.4 μL。参照 Volk 等^[31]报道的反应条件,对 4 个基因间区的 PCR 扩增条件进行优化(表 3)。242 份种质 4 个叶绿体间区的 PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,对于扩增成功并得到单一条带的样品直接送测序公司进行测序。每个样品在每个叶绿体 DNA 间区的扩增产物均进行正、反向测序,242 份材料的 4 个间区的叶绿体 DNA 序列全部测通。

表 2 4 个叶绿体基因间区及 4 对叶绿体 DNA 引物序列基本信息
Table 2 Basic information of the four cpDNA intergenic regions and four pairs of cpDNA primers in this study

编号 Code	cpDNA 间区 cpDNA intergenic region	F 序列(5'-3') Forward sequence(5'-3')	R 序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')	扩增片段长度(bp) Amplified fragment length
CP20	<i>trnH-psbA</i>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	200~400
CP21	<i>trnS-trnG</i> spacer+intron	AGATAGGGATTCTGAACCCTCGGT	GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC	1300~1500
CP22	<i>trnT-5'trnL</i>	CATTACAAATGCGATGCTCT	TCTACCGATTTCGCCATATC	1000~1200
CP23	<i>5'trnL-trnF</i>	ATTGAACTGGTGACACGAG	CGAAATCGGTAGACGCTACG	800~1000

表 3 4 个叶绿体基因间区的 PCR 扩增条件
Table 3 PCR amplification conditions of the four cpDNA intergenic regions in this study

编号 Code	扩增区域 Region	PCR 反应条件 PCR conditions	退火温度(℃) Annealing temperature
CP20	<i>trnH-psbA</i>	80℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min	56
CP21	<i>trnS-trnG</i> spacer+intron	80℃ 5 min; 96℃ 10 s, 50℃退火 5 s, 60℃ 4 min, 30 个循环; 60℃ 10 min	50
CP22	<i>trnT-5'trnL</i>	96℃ 5 min; 96℃ 1 min, 57℃退火 2 min, 72℃ 2.5 min, 34 个循环; 72℃ 10 min	57
CP23	<i>5'trnL-trnF</i>	80℃ 5 min; 96℃ 10 s, 50℃退火 5 s, 60℃ 4 min, 30 个循环; 60℃ 10 min	50

1.3 数据分析

每个基因间区正反向测序获得的序列进行人工校对,并使用 MEGA 7.0^[32]软件进行序列拼接、序列比对以及 4 个叶绿体 DNA 基因间区片段 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 的合并。所有拼接序列、比对序列都被保存为 FASTA 和 MEGA 格式。

将单个区域片段和合并之后的片段保存后,使用 DnaSP ver5.10.01^[33]软件计算新疆野苹果种质叶绿体 DNA 的遗传多样性参数,包括:变异位点(Vs, Variable sites)、单一突变位点(Ss, Singleton variable sites)、简约信息性位点(Ps, Parsimony informative sites)、核苷酸多样性(Pi, Nucleotide diversity)、平均核苷酸差异(k, Average number of

nucleotide difference)、单倍型数目(h , Number of haplotypes)、单倍型多样性(Hd , Haplotype (gene) diversity)、单倍型多样性方差(Vh , Variance of haplotype diversity)、单倍型多样性标准差(Sh , Standard deviation of haplotype diversity)和 Tajima's D 值(Tajima's D)。Tajima's D 是检验样品叶绿体 DNA 区域是否遵循中性进化模型的重要参数。基于 4 个叶绿体 DNA 区域合并片段的新疆野苹果种质资源的叶绿体基因单倍型保存为 Nexus 文件,分别采用中介邻接网络(MJ, Median-Joining network)算法和最大简约(MP, maximum parsimony)算法进行计算和优化,运用 NetWork ver4.6.1.2 构建种内居群间的叶绿体 DNA 单倍型邻接网络关联图。

用 MEGA 7.0 软件构建新疆野苹果种内居群间基于遗传距离的 Neighbour-Joining^[34] 系统发育树,并划分居群组合。用 DnaSP ver5.10.01 软件计算种内不同居群间的基因流和基因分化,评价种内不同居群间的基因交流。用 Arlequin v3.5^[35] 软件分析分子变异,选择标准分子变异分析(AMOVA, analysis of molecular variation)方法进行计算,用 20000 次排列来检测不同分组变异的差异显著性,评价种群内居群间的遗传分化。

2 结果与分析

2.1 新疆野苹果叶绿体 DNA 的多态性

4 对叶绿体通用引物对 242 份新疆野苹果的 4 个叶绿体 DNA 间隔区进行扩增, *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 在所有样本中的序列长度范围分别为 261~285 bp、1376~1394 bp、1064~1085 bp 和 965 bp, 序列比对之后, 4 个区域的片段长度分别为 321 bp、1395

bp、1131 bp 和 965 bp。核苷酸多态性最高的区域为 *trnT-5'trnL*, 包括 4 个单一突变位点, 5 个简约信息位点, 68 个插入-缺失位点; 核苷酸多态性最低的区域为 *5'trnL-trnF*, 仅有 1 个简约信息位点。4 个 cpDNA 区域比对并组合后的序列长度为 3812 bp, 包含 171 个变异位点, 其中 6 个单一突变位点、16 个简约信息位点和 149 个插入-缺失位点(表 4)。

242 份中国原产苹果属植物新疆野苹果的 4 个叶绿体间隔区共有变异位点 171 个, *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 区域的变异位点数目分别为 68 个、25 个、77 个和 1 个, 变异位点集中在区域 *trnT-5'trnL* 上, 是新疆野苹果叶绿体 DNA 片段中核苷酸多态性较高的区域。核苷酸多样性(Pi)和平均核苷酸差异(k)最大和最小的区域分别为 *trnH-psbA* ($Pi=0.01982$, $k=6.79733$) 和 *5'trnL-trnF* ($Pi=0.00002$, $k=0.02459$)。 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF* 区域单倍型数目(h)分别为 36 个、6 个、6 个和 2 个, 以 *trnH-psbA* 区域单倍型(基因)多样性(Hd)最高为 0.773, *5'trnL-trnF* 单倍型(基因)多样性(Hd)最低为 0.025。 *trnT-5'trnL* 的单倍型多样性方差和标准差均为最高, 分别为 0.00119 和 0.034; *trnS-trnG* spacer+intron 区域的单倍型多样性方差和标准差均为最低分别为 0.00011 和 0.010(表 5)。

新疆野苹果 4 个区域组合后的 cpDNA 片段, 共有 52 个单倍型, 其中核苷酸多样性、平均核苷酸差异、单倍型(基因)多样性、单倍型多样性方差和标准差分别为 0.00291、11.97239、0.806、0.00032、0.018。

表 4 242 份新疆野苹果的 4 个 cpDNA 区域的多态性
Table 4 The polymorphism of the four cpDNA regions of 242 accessions of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.

叶绿体 DNA 区域 cpDNA region	长度 (bp) Length	变异位点 Vs	单一突变位点 Ss	简约信息位点 Ps	插入-缺失位点 Is	核苷酸多样性 Pi	平均核苷酸差异 k
<i>trnH-psbA</i>	321	68	1	5	62	0.01982	6.79733
<i>trnS-trnG</i> spacer+intron	1395	25	1	5	19	0.00073	1.05785
<i>trnT-5' trnL</i>	1131	77	4	5	68	0.00306	4.09262
<i>5' trnL-trnF</i>	965	1	0	1	0	0.00002	0.02459
区域合并 Combined region	3812	171	6	16	149	0.00291	11.97239

Vs: Variable sites, Ss: Singleton variable sites, Ps: Parsimony informative sites, Is: Insertion-deletion gaps, Pi: Nucleotide diversity, k: Average number of nucleotide difference, the same as below

表 5 242 份新疆野苹果的 4 个 cpDNA 区域的单倍型多样性
Table 5 The diversity of haplotypes in the four cpDNA regions of 242 accessions of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.

cpDNA 区域 cpDNA regions	单倍型数目 <i>h</i>	单倍型 (基因) 多样性 Hd	单倍型多样性方差 Vh	单倍型多样性标准差 Sh
<i>trnH-psbA</i>	36	0.773	0.00032	0.018
<i>trnS-trnG</i> spacer+intron	6	0.526	0.00011	0.010
<i>trnT-5' trnL</i>	6	0.250	0.00119	0.034
5' <i>trnL-trnF</i>	2	0.025	0.00019	0.014
区域合并 Combined region	52	0.806	0.00032	0.018

h: Number of haplotypes, Hd: Haplotype (gene) diversity, Vh: Variance of haplotype diversity, Sh: Standard deviation of haplotype diversity

对 4 个区域进行 Tajima's 检验, Tajima's D 值全部为负值, 区域 *trnT-5'trnL* 的 Tajima's D 值最低为 -2.04087, 5'*trnL-trnF* 的 Tajima's D 值最高为 -0.83512。区域 *trnH-psbA* 和 5'*trnL-trnF* 的 Tajima's D 值在 $P>0.10$ 水平上不显著, 而区域 *trnS-trnG* spacer+intron 和 *trnT-5'trnL* 在 $P<0.05$ 水平上显著。合并后的片段, Tajima's D 值为 -1.78819, 在 $P<0.05$ 水平上显著 (表 6)。

2.2 新疆野苹果的遗传分化

供试新疆野苹果来源于新疆新源、霍城和巩留 3 个地区, 按照来源地区将 242 份新疆野苹果划分为 3 个居群, 其分子变异分析的结果表明遗传变异主要存在于居群内, 占全部变异的 93.17%, 约 6.83% 的变异来自于居群之间, 居群内和居群间的可遗传变异的相关性均极显著 ($P<0.001$) (表 7)。

表 6 242 份新疆野苹果的 4 个 cpDNA 区域的 Tajima's 检验结果

Table 6 Results of Tajima's test in the four cpDNA regions of 242 accessions of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.

cpDNA 区域 cpDNA region	Tajima's D 值 Tajima's D value	显著性 Significance
<i>trnH-psbA</i>	-1.17743	$P>0.10$
<i>trnS-trnG</i> spacer+intron	-2.01838	$P<0.05^*$
<i>trnT-5' trnL</i>	-2.04087	$P<0.05^*$
5' <i>trnL-trnF</i>	-0.83512	$P>0.10$
合并 Combined	-1.78819	$P<0.05^*$

* 代表在 0.05 水平下显著相关
* Represents significant correlation at $P<0.05$

表 7 按 3 个来源地划分的 3 个新疆野苹果居群的分子变异分析
Table 7 Molecular variance analysis of the three source populations of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of square	变异组分 Variance components	变异百分比 (%) Percentage of variation	概率值 <i>P</i>
居群间 Among population	2	77.309	0.41887	6.83	<0.001
居群内 Within population	239	1365.364	5.71282	93.17	<0.001
合并 Total	241	1442.674	6.13169	100	<0.001

3 个新疆野苹果居群两两间分化系数为 0.023~0.114, 巩留和新源居群间遗传分化系数为 0.023, 巩留和霍城居群间的遗传分化系数为 0.114, 新源与霍城居群间的遗传分化系数为 0.070。两两居群间遗传分化系数体现出新疆不同地区之间新疆

野苹果的遗传分化和基因交流程度。

2.3 新疆野苹果居群间的遗传关系

计算来源于新疆霍城、新源和巩留的 3 个新疆野苹果居群的遗传距离并用 Neighbour-Joining 的方法构建聚类树。根据聚类结果, 新疆新源

3 讨论

中国原产苹果属植物新疆野苹果叶绿体 DNA 的多样性研究涉及到的区域有 *trnH-psbA*、*trnS-trnG* spacer+intron、*trnT-5'trnL* 和 *5'trnL-trnF*, 核苷酸多样性和单倍型多样性最高的区域均为 *trnH-psbA*, 两者最低的为 *5'trnL-trnF*。新疆野苹果 4 个叶绿体 DNA 合并区域的遗传多样性较高 ($H_d=0.806$, $P_i=0.00291$)。插入和缺失同样为核苷酸变异的主导, 插入缺失位点为 149 个, 而仅有 6 个单一突变位点, 16 个简约信息位点。Tajima's D 检验全部为负值, 这说明新疆野苹果在进化过程中有明显的种群扩张。*trnS-trnG* spacer+intron 和 *trnT-5'trnL* 两个区域在 $P<0.05$ 水平上显著, 区域 *trnH-psbA* 和 *5'trnL-trnF* 在 $P>0.10$ 水平上不显著, 4 个区域合并之后在 $P<0.05$ 水平上显著。叶绿体 DNA 进化过程中, *trnS-trnG* spacer+intron 和 *trnT-5'trnL* 两个区域是遵循中性进化模型的, 主要由随机漂变产生的遗传分化。但新疆野苹果 4 个区域总体上不遵循中性进化模型, 种群的遗传变异主要来自于自然选择。自然选择的压力是新疆野苹果遗传进化的主要动力。

以分别收集于新疆新源、霍城和巩留的新疆野苹果划分为 3 个居群, 新疆野苹果的分子遗传变异主要存在于居群内, 这与秦伟等^[23]和董研等^[24]得出的结论相一致。3 个居群两两间的分化系数并不高, 基因交流频繁, 最高的只有 0.114, 为中度遗传分化。霍城新疆野苹果与巩留和新源的遗传分化均高于巩留和新源新疆野苹果居群间的遗传分化, 霍城与巩留和新源的新疆野苹果居群间的基因流要少于巩留和新源新疆野苹果居群间的基因流。新源和巩留新疆野苹果之间的亲缘关系要更近。这与杨美玲^[36]对新疆野苹果居群遗传关系研究得出的结论相同。从地理位置上来讲, 新疆巩留和新源两县邻接, 与霍城的地理距离相对较远, 居群间的遗传分化与地理距离相关。这与 Zhang 等^[22]和张春雨等^[37]对新疆野苹果的遗传分化研究得出的结论相同。

新疆野苹果 4 个叶绿体 DNA 合并区域的单倍型分析表明, 位于躯干中心主线上 3 个主要的单倍型缺失, 位于躯干中心 3 个闭合环中包含了来自巩留、霍城和新源的新疆野苹果, 但没有一个单倍型同时涵盖 3 个区域的新疆野苹果, 位于中心区域未缺失的单倍型均为衍生单倍型, 并非最古老的单倍型。3 个闭合环中以新疆霍城地区的新疆野苹果居多, 说明新疆霍城地区相对较老的叶绿体单倍型居多,

分化相对较早。随着邻接网络向外围延伸, 偏离中心区域并含有新疆野苹果最多的两个单倍型 H6 和 H3 的闭合环中, 由未知单倍型通过两个分支演化至 H3, 含有 3 个区域的新疆野苹果的单倍型 H6 为其中一个分支, 而 H3 中包含了 50 份新疆新源的新疆野苹果。从邻接网络的中心至外围, 霍城新疆野苹果更多的是位于靠近中心的单倍型, 而新疆新源的新疆野苹果则更多的是位于靠近外围的单倍型, 巩留新疆野苹果多为种间类型。新疆霍城地区新疆野苹果原始类型相对更多, 3 个地区的新疆野苹果各自经历着遗传分化但又存在频繁的基因交流, 有向新疆新源的新疆野苹果演化的趋势。整个单倍型网络图中星状辐射较少, 显示出新疆野苹果各居群在历史上发生越过瓶颈后迅速扩增的次数较少。通过网络分析和 Tajima's D 检验共同说明新疆野苹果在历史上有明显的种群扩张, 但少有遇到瓶颈后迅速的扩张。新疆野苹果叶绿体 DNA 变异和遗传进化分析, 为新疆野苹果的保护和利用提供参考, 为苹果砧木等育种亲本的选择提供理论依据。

参考文献

- [1] 李育农. 苹果属植物种质资源研究. 北京: 中国农业出版社, 2001: 65-67
Li Y N. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 65-67
- [2] 张新时. 伊犁野果林的生态地理特征和群落学问题. 植物学报, 1973, 15(2): 239-253
Zhang X S. On the eco-geographical characters and the problems of classification of the wild fruit-tree forest in the Ili Valley of Sinkiang. *Acta Botanica Sinica*, 1973, 15(2): 239-253
- [3] 李育农. 世界苹果和苹果属植物基因中心的研究初报. 园艺学报, 1989, 16(2): 101-107
Li Y N. An investigation of the genetic center of *M. pumila* and *Malus* in the world. *Acta Horticulturae Sinica*, 1989, 16(2): 101-107
- [4] 冯涛, 张红, 陈学森, 张艳敏, 何天明, 冯建荣, 许正. 新疆野苹果果实形态与矿质元素含量多样性以及特异性状单株. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 270-276
Feng T, Zhang H, Chen X S, Zhang Y M, He T M, Feng J R, Xu Z. Genetic diversity of fruit morphological traits and content of mineral element in *Malus sieversii* (Ldb.) Roem. and its elite seedlings. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2006, 7(3): 270-276
- [5] Harris S A, Robinson J P, Juniper B E. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 2002, 18: 426-430
- [6] Duan N B, Bai Y, Sun H H, Wang N, Ma Y M, Li M J, Wang X, Jiao C, Legall N, Mao L Y, Wan S B, Wang K, He T M, Feng S Q, Zhang Z Y, Mao Z Q, Shen X, Chen X L, Jiang Y M, Wu S J, Yin C M, Ge S F, Yang L, Jiang S H, Xu H F, Liu J X, Wang D Y, Qu C Z, Wang Y C, Zuo W F, Xiang L, Liu C,

- Zhang D Y, Gao Y, Xu Y M, Xu K N, Chao T, Fazio G, Shu H R, Zhong G Y, Cheng L L, Fei Z J, Chen X S. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communication*, 2017, 8 (2): 249
- [7] 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. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (6): 1013-1019
- Wang K, Liu F Z, Gao Y, Wang D J, Gong X, Liu L J. The natural distribution, diversity and utilization of wild apple species in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 (6): 1013-1019
- [8] 阎国荣. 塞威士苹果 (*Malus sieversii*) 在我国的自然分布及现状. 中国植物学会六十五周年年会学术报告及论文摘要汇编. 北京: 中国林业出版社, 1998: 306-307
- Yan G R. The distribution and situation of *Malus sieversii* in China. A compilation of academic reports and abstracts of papers at the 65th anniversary conference of the Chinese Botanical Society. Beijing: China Forestry Press, 1998: 306-307
- [9] 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. *植物遗传资源学报*, 2017, 18 (6): 1116-1124
- Wang D J, Wang K, Gao Y, Zhao J R, Liu L J, Gong X, Li L W. Preliminary investigation of modern distribution of *Malus* resources in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18 (6): 1116-1124
- [10] 林培钧, 崔乃然. 天山野果林资源: 伊犁野果林综合研究. 北京: 中国林业出版社, 2000: 84-219
- Lin P J, Cui N R. Wild fruit forest resources in Tianshan Mountains: comprehensive study on Yili wild fruit forest. Beijing: China Forestry Press, 2000: 84-219
- [11] 闫秀娜, 李芳, 阎国荣, 于玮玮. 濒危植物新疆野苹果种子的萌发特性. *天津农学院学报*, 2015, 22 (2): 33-36
- Yan X N, Li F, Yan G R, Yu W W. Preliminary exploration on seed germination in endangered plant *Malus sieversii*. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2015, 22 (2): 33-36
- [12] 刘忠权, 陈卫民, 许正, 梁巧玲. 新疆天山西部野苹果林分布与苹果小吉丁虫危害现状研究. *北方园艺*, 2014, 38 (17): 121-124
- Liu Z Q, Chen W M, Xu Z, Liang Q L. *Malus sieversii* forest distribution and *Agrilus mali* Matsumura status of damage in the west part of Tianshan Mountains. *Northern Horticulture*, 2014, 38 (17): 121-124
- [13] 羊海军, 崔大方, 许正, 林培钧. 中国天山野果林种子植物组成及资源状况分析. *植物资源与环境学报*, 2003, 12 (2): 39-45
- Yang H J, Cui D F, Xu Z, Lin P J. Analysis on the components and resource situation of seed plants in the wild fruit forest in Tianshan Mountain in China. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2003, 12 (2): 39-45
- [14] 国家环境保护局. 中国生物多样性保护行动计划. 北京: 中国环境科学出版社, 1994
- State Environmental Protection Agency. China action plan for biodiversity conservation. Beijing: China Environmental Science Press, 1994
- [15] 傅立国. 中国植物红皮书. 北京: 科学出版社, 1992
- Fu L G. China plant red data book. Beijing: Science Press, 1992
- [16] 冯涛, 陈学森, 张艳敏, 张春雨, 张小燕, 吴传金. 新疆野苹果叶片抗氧化能力及多酚组分的研究. *中国农业科学*, 2008, 41 (8): 2386-2391
- Feng T, Chen X S, Zhang Y M, Zhang C Y, Zhang X Y, Wu C J. Antioxidation and phenolic constituents in Xinjiang wild apple [*Malus sieversii* (Lebed.) Roem.] leaf. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (8): 2386-2391
- [17] 冯涛. 新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Lebed.) Roem.) 部分表型性状遗传多样性研究. 泰安: 山东农业大学, 2007: 43-46
- Feng T. Study on genetic diversity of phenotypic traits in *Malus sieversii* (Lebed.) Roem. Taian: Shandong Agricultural University, 2007: 43-46
- [18] 张小燕. 新疆野苹果化学成分的遗传多样性研究. 泰安: 山东农业大学, 2008: 40-44
- Zhang X Y. Study on variations of chemical components in *Malus sieversii*. Taian: Shandong Agricultural University, 2008: 40-44
- [19] 闫鹏, 韩立群, 梅闯, 刁永强, 许正, 张学超, 马凯, 艾沙江·买买提, 王继勋. 新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) 植物学性状遗传多样性及相关性分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17 (4): 683-689
- Yan P, Han L Q, Mei C, Diao Y Q, Xu Z, Zhang X C, Ma K, Aisajan M, Wang J X. Genetic diversity and correlation analysis of botanical characters in Xinjiang wild apple (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17 (4): 683-689
- [20] 刘彬, 张云秀, 李芳, 于玮玮, 阎国荣. 新疆野苹果果实 VC 及可溶性蛋白含量的测定分析. *天津农学院学报*, 2016, 23 (4): 14-17
- Liu B, Zhang Y X, Li F, Yu W W, Yan G R. Measurement and comparison of vitamin C and soluble protein content of *Malus sieversii* fruits. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2016, 23 (4): 14-17
- [21] 刁永强, 许正, 闫鹏, 陈淑英, 张学超, 刘君. 新疆野苹果资源类型表型性状鉴定及优异资源的初步筛选. *经济林研究*, 2019, 37 (1): 17-24, 49
- Diao Y Q, Xu Z, Yan P, Chen S Y, Zhang X C, Liu J. Phenotypic characteristic identification and preliminary selection of excellent resources in *Malus sieversii* resource types. *Non-wood Forest Research*, 2019, 37 (1): 17-24, 49
- [22] Zhang C Y, Chen X S, He T M, Liu X L, Feng T, Yuan Z H. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34 (10): 947-955
- [23] 秦伟, 沙红, 刘立强, 廖康, 耿文娟, 王云. 新疆野苹果资源遗传多样性 SSR 分析. *果树学报*, 2012, 29 (2): 161-165
- Qin W, Sha H, Liu L Q, Liao K, Geng W J, Wang Y. SSR analysis for genetic diversity of *Malus sieversii* from Xinjiang, China. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29 (2): 161-165
- [24] 董研, 张军, 任亚超, 韩志校. 中国新疆野苹果天然群体遗传多样性 SSR 分析. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (5): 771-777
- Dong Y, Zhang J, Ren Y C, Han Z X. Study on genetic diversity of natural population in *Malus sieversii* with microsatellite. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 (5): 771-777

- [25] 马衣努尔姑·吐地, 张延辉, 秦伟, 司洪章, 杨新峰. 基于 SSR 分子标记技术的新疆苹果资源指纹图谱的构建. 新疆农业大学学报, 2016, 39(1): 26-34
Maunur T, Zhang Y H, Qin W, Si H Z, Yang X F. Construction of fingerprint of apple resources in Xinjiang based on SSR molecular markers. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2016, 39(1): 26-34
- [26] 倪梁红, 赵志礼, 米玛. 药用植物叶绿体基因组研究进展. 中药材, 2015, 38(9): 1990-1994
Ni L H, Zhao Z L, Mi M. Advances in research on chloroplast genome of medicinal plants. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(9): 1990-1994
- [27] 李宏韬, 赵淑青, 赵彦修, 张慧. 叶绿体基因工程简介. 遗传, 2003, 25(4): 495-498
Li H T, Zhao S Q, Zhao Y X, Zhang H. The introduction of chloroplast gene engineering. Hereditas, 2003, 25(4): 495-498
- [28] 张韵洁, 李德铎. 叶绿体系统发育基因组学的研究进展. 植物分类与资源学报, 2011, 33(4): 365-375
Zhang Y J, Li D Z. Advances in phylogenomics based on complete chloroplast genomes. Plant Diversity and Resources, 2011, 33(4): 365-375
- [29] 付涛, 王志龙, 钱萍仙, 李文, 袁冬明, 严春风. 高等植物 DNA 条形码最新研究进展及其应用. 核农学报, 2016, 30(5): 887-896
Fu T, Wang Z L, Qian P X, Li W, Yuan D M, Yan C F. The latest research progress and application of the DNA barcode in higher plants. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(5): 887-896
- [30] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, Farmer S B, Liu W S, Miller J, Siripun K C, Winder C T, Schilling E E, Small R L. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast and sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany, 2005, 92(1): 142-166
- [31] Volk G M, Henk A D, Baldo A, Fazio G, Chao C T, Richards C M. Chloroplast heterogeneity and historical admixture within the genus *Malus*. American Journal of Botany, 2015, 102(7): 1198-1208
- [32] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [33] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 2009, 25: 1451-1452
- [34] Saito N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [35] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 2010, 10: 564-567
- [36] 杨美玲. 新疆野苹果 (*Malus sieversii*) 生物学特性和居群遗传多样性研究. 天津: 天津农学院, 2014: 52-55
Yang M L. Biological characteristics and genetic diversity of population of *Malus sieversii*. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2014: 52-55
- [37] 张春雨, 陈学森, 林群, 苑兆和, 张红, 张小燕, 刘崇祺, 吴传金. 新疆野苹果群体遗传结构和遗传多样性的 SRAP 分析. 园艺学报, 2009, 36(1): 7-14
Zhang C Y, Chen X S, Lin Q, Yuan Z H, Zhang H, Zhang X Y, Liu C Q, Wu C J. SRAP markers for population genetic structure and genetic diversity in *Malus sieversii* from Xinjiang, China Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(1): 7-14