

# 基于 ITS 序列的中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃种内遗传多样性及种间关系分析

王浩<sup>1</sup>, 黄智林<sup>1</sup>, 陈涛<sup>2</sup>, 张静<sup>2</sup>, 王燕<sup>2</sup>, 陈清<sup>1</sup>, 汤浩茹<sup>1,2</sup>, 王小蓉<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup> 四川农业大学园艺学院, 成都 611130; <sup>2</sup> 四川农业大学果蔬研究所, 成都 611130)

**摘要:** 对中国樱桃 [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don] (地方种质 35 份, 野生资源 35 份), 欧洲甜樱桃 [*C. avium* (L.) Moench] (18 份) 和毛樱桃 [*C. tomentosa* (Thunb.) Wall.] (7 份) 共 95 份材料的核糖体内转录间隔区 (ITS, internal transcribed spacer) 序列进行了测定和分析, 以期从 ITS 的 DNA 序列变异角度揭示种内遗传多样性及种间遗传关系。结果表明: (1) 96 条 ITS 序列比对后长度为 712 bp, G + C 含量为 58.1%, 检测到 71 个变异位点 (9.97%), 共定义了 37 个单倍型; 中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃的单倍型多样性和核酸多样性分别为 0.840 和 0.00466、0.928 和 0.00396、0.905 和 0.00564, 中国樱桃中栽培种质遗传多样性明显低于其野生资源; (2) 种间遗传关系显示, 中国樱桃与欧洲甜樱桃之间的遗传距离较近 (0.019), 而与毛樱桃遗传距离较远 (0.048); (3) 邻接聚类法和单倍型网络分析显示 3 个种分别聚为 3 个分支, 种间具有较大的遗传分化。同时, 选择 3 个种的代表单倍型进行其 ITS 序列的二级结构预测分析, 3 个种之间 ITS1 区、ITS2 区的二级结构差异较大, 最小自由能差异显著, 进一步揭示了 3 个种间的遗传关系较远。综合分析认为, 3 个樱桃种内均具有较高的遗传多样性, 种间具有较大的遗传分化, 遗传关系较远, 其中毛樱桃与中国樱桃和欧洲甜樱桃的遗传关系均较远。

**关键词:** 中国樱桃; 欧洲甜樱桃; 毛樱桃; ITS 序列; 单倍型; 遗传多样性; 种间关系

**中图分类号:** S 662.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 01-0126-13

## Genetic Diversity and Relationship Analysis Among *Cerasus pseudocerasus*, *C. avium*, and *C. tomentosa* Based on Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences

WANG Hao<sup>1</sup>, HUANG Zhilin<sup>1</sup>, CHEN Tao<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>, CHEN Qing<sup>1</sup>, TANG Haoru<sup>1,2</sup>, and WANG Xiaorong<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; <sup>2</sup>Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In this study, we sampled a total of 95 samples, including 35 landraces and 35 wild individuals of Chinese cherry from 6 populations across 35 counties of 8 provinces in China, 18 cultivars of European sweet cherry from 10 countries in the world, as well as 7 semi-wild Nanking cherry resources

**收稿日期:** 2017-08-03; **修回日期:** 2017-12-28

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31672114)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangxr@sicau.edu.cn)

from 7 counties of 5 provinces in China. Based on internal transcribed spacer (ITS) sequences, we tried to study the genetic diversity within species and interspecific relationship among them. The final ITS dataset contained 712 aligned nucleotides, with 58.1% of G + C content, of which 71 (9.97%) were variable sites. The ITS sequences defined 37 haplotypes. The haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleic acid diversity ( $\pi$ ) of *C. pseudocerasus*, *C. avium*, and *C. tomentosa* were (0.840, 0.00466), (0.928, 0.00396) and (0.905, 0.00564), respectively. Within *C. pseudocerasus*, the genetic diversity of germplasm ( $H_d = 0.726$ ,  $\pi = 0.00224$ ) was significantly lower than that of wild resource ( $H_d = 0.914$ ,  $\pi = 0.00681$ ). Interspecific genetic relationship analysis showed close relationship (0.019) between Chinese cherry and sweet cherry, while they revealed further relationship with Nanking cherry. Both Neighbor-Joining reconstruction and haplotype network showed three distinct branches with obvious genetic differentiation among the three species. In addition, there were significant differences in the secondary structure of the ITS1 and ITS2 regions and t-detection of the minimum free energy. Based on above results, there were high genetic diversity and obvious genetic differentiation among three cherry cultivated species. Close relationship was detected between Chinese cherry and European sweet cherry, while far distance between Nanking cherry with them.

**Keywords:** *Cerasus pseudocerasus*; *C. avium*; *C. tomentosa*; ITS sequence; haplotype; genetic diversity; interspecific relationship

中国樱桃 [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don]、欧洲甜樱桃 [*C. avium* (L.) Moench] 和毛樱桃 [*C. tomentosa* (Thunb.) Wall.] 隶属蔷薇科 (Rosaceae) 李亚科 (Prunoideae) 樱属 (*Cerasus* Mill.) (俞德浚, 1986)。中国樱桃和毛樱桃起源于中国, 其中中国樱桃在中国已有近 3 000 年的栽培历史 (俞德浚, 1979; 刘长江和刘美洲, 1993); 欧洲甜樱桃的野生祖先 ‘Mazzard’ 被认为起源于亚洲西部和欧洲东南部 (Harlan, 1971; Mariette et al., 1997; Hanelt et al., 2001), 4 000—5 000 年前开始栽培驯化 (Janick, 2005; Meyer & Purugganan, 2013), 现在世界各地广泛栽培。在这 3 个樱桃栽培种中, 中国樱桃果实甜酸适度, 风味浓郁, 可溶性固形物含量 11.0%~34.0%, 多数超过 20%, 但果实较小, 不耐储运 (黄晓姣 等, 2013; 陈涛 等, 2016); 而毛樱桃主要是野生和半野生分布 (游泳 等, 1991); 欧洲甜樱桃果实较大 (4.0~15.0 g), 较耐储运 (蔡宇良 等, 2005; 吕秀兰 等, 2005; 贾海慧 等, 2007), 在生产上很受欢迎 (韩礼星 等, 2008)。研究资源遗传多样性和遗传关系对于樱桃良种选育和产业发展意义重大, 培育优缺点互补的品种是育种学家们进一步努力的方向。

对栽培樱桃遗传多样性与种间遗传关系的研究已有报道, 如 RAPD (Cai et al., 2007)、ISSR (Li et al., 2009; 宋常美 等, 2011; Najafzadeh et al., 2014)、RFLP (曹东伟 等, 2007) 和 SRAP (路娟 等, 2009; Abedian et al., 2012) 等分子标记或 DNA 序列 (China Plant BOL Group, 2011; Bai et al., 2014; Chen et al., 2015) 有较多应用。但这些研究只涉及到樱属中某单一一种或种内某一类群的遗传多样性, 使用的标记类型较单一, 所揭示的多态性位点有限, 且不同分子标记的适用性也不尽相同。目前基于 ITS 序列对于中国樱桃、欧洲甜樱桃及毛樱桃 3 个种全面系统的遗传多样性及遗传关系还未见报道。

本研究中选择具代表性的中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃进行 ITS 序列测定和分析, 以期从 ITS 的 DNA 序列变异角度揭示种内的遗传多样性及 3 个种间的遗传关系, 探讨其在樱属种间关系研究中的应用价值, 为樱桃资源的有效保护、核心种质构建和育种利用以及 ITS 在樱属植物资源鉴定利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2009—2015 年, 在对中国樱桃资源全面调查、收集和评价基础上, 选取中国樱桃栽培品种 (种质) 35 份 [8 省, 35 个县 (市)] 和野生种质 35 份 [6 个群体, 35 个个体]、欧洲甜樱桃 18 个品种 (来自 10 个国家, 均采自中国农业科学院郑州果树研究所)、毛樱桃 7 份 [5 省, 7 个县 (地区), 半野生栽培], 共 95 份材料 (表 1), 采集幼嫩叶片, 变色硅胶干燥后密封袋封存备用。

### 1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及测序

采用改良 CTAB 法 (Chen et al., 2013) 提取基因组 DNA。选取 ITS 通用引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTATATGATATGC-3') (Vijayan et al., 2009) 进行目的片段 PCR 扩增。采用 25  $\mu$ L 反应体系, 包括 10 $\times$  PCR Buffer [10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)、50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> KCl、1.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA] 4.0  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2.4  $\mu$ L, dNTP mix (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2.8  $\mu$ L, 正、反引物各 3.5 pmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (北京天根) 以及 30 ~ 50 ng DNA 模板。扩增反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 53 $^{\circ}$ C 复性 90 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 共 32 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至深圳华大基因公司进行双向测序, 比对后的序列提交至 GenBank 并获得登录号 (KY749248-KY749337)。

### 1.3 数据处理和分析

采用 Lasergene 7.0 软件包的 SeqMan 对正反向序列进行拼接 (Burland, 2000), 参照 Chromas 序列峰图对误读位点进行人工校正。对拼接好的序列采用 MEGA 6.0 (Lewis et al., 2013) 进行比对, 统计序列长度、碱基组成; 采用 Kimura 2-parameter 模型计算单倍型之间的遗传距离, 构建 NJ (Neighbor-Joining) 系统发育树, 同时以自展法 (bootstrap) 进行检验, 1 000 次重复。种间遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) 利用 Arlequin 3.0 软件包 (Excoffier et al., 2005) 进行计算, 并进行 1 000 次随机抽样的显著性检验。利用 DnaSP 5.1 (Librado, 2009) 软件计算单倍型个数 ( $H$ )、单倍型多样性 ( $H_d$ )、核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 等遗传多样性指标。

采用 Network 4.2.0.1 (Forster et al., 2004) 的 Median-joining (MJ) 算法 (Bandelt et al., 1999) 对单倍型数据进行网状支系分析并作图, 并用溯祖理论来推测分析单倍型间的亲缘关系。利用 Vienna RNA server (Hofacker, 2003) 网络工具对 ITS 单倍型进行二级结构预测, 改善和提高系统发育分析的可靠性 (Caetano-Anollés, 2002)。

## 2 结果与分析

### 2.1 ITS 序列特征及遗传多样性分析

中国樱桃 ITS 序列长度范围为 702 ~ 703 bp, 欧洲甜樱桃为 704 ~ 705 bp, 毛樱桃为 709 bp (表 1)。所有扩增序列比对后长度为 712 bp, 共检测到 71 个变异位点 (表 2), 占总位点的 9.97%, ITS1 区存在 40 个, 5.8S 区 3 个, ITS2 区 28 个, 其中 54 个为简约信息位点; 含插入/缺失 10 处, 长度变异较小 (表 1)。3 个樱桃种 ITS 区域的 G + C 含量在 57.86% ~ 59.77% 之间, 其中毛樱桃 (59.77%) 最高, 中国樱桃 (57.86%) 最低 (表 3)。

表 1 供试材料、来源及其遗传特性

Table 1 Sampling location used in this study and genetic characteristics

樱桃 <i>Cerasus</i>	来源 Origin	采样地 Location	品种/编号 Cultivar/Code	单倍型 Haplotype	序列长度/bp Length	
中国樱桃（栽培） <i>C. pseudocerasus</i> （Landrace）	四川 Sichuan	雅安 Yaan	雅安红樱桃 Yaan Hongyingtao	H1	702	
		名山 Mingshan	M64	H2	702	
		荣经 Yingjing	YJ65	H1	702	
		石棉 Shimian	S138	H3	703	
		汉源 Hanyuan	HY153	H2	702	
		丹棱 Danleng	Mei85	H2	702	
		西昌 Xichang	X101, D104, X109	H2, H4, H5	702	
		蒲江 Pujiang	紫樱桃 Ziyingtao	H1	702	
		简阳 Jianyang	白花樱桃 Baihua Yingtao	H3	703	
		峨眉 Emei	EM130	H2	702	
	重庆 Chongqing	青川 Qingchuan	QX541	H2	702	
		北川 Beichuan	BT517, 白樱桃 BaiYingtao	H1, H2	702	
		涪陵 Fuling	F2559	H1	702	
		巴南 Banan	黑珍珠 Heizhenzhu	H1	702	
		陕西 Shaanxi	商南 Shangnan	SX410	H2	702
			汉中 Hanzhong	HZ301	H1	702
			佛坪 Foping	小籽红樱桃 Xiaozi Hongyingtao	H6	702
		安徽 Anhui	西乡 Xixiang	西乡红樱桃 Xixiang Hongyingtao	H6	702
			太和 Taihe	米儿红 Mierhong	H2	702
			贵州 Guizhou	贵阳 Guiyang	大叶红樱桃 Daye Hongyingtao	H7
	毕节 Bijie	玛瑙红 Ma'naohong		H8	703	
	河南 Henan	洛阳 Luoyang		洛阳古樱 Luoyang Guying	H2	702
		郑州 Zhengzhou	燥樱桃 Zaoyingtao	H1	702	
		郑州 Zhengzhou	笨樱桃 Benyingtao	H2	702	
	甘肃 Gansu	天水 Tianshui	大平叶 1 Dapingye 1	H1	702	
		天水 Tianshui	大平叶 2 Dapingye 2	H2	702	
	山东 Shandong	临朐 Linqu	小红樱 Xiaohongying	H2	702	
		五莲 Wulian	红樱桃 Hongyingtao	H1	702	
		诸城 Zhucheng	黄樱桃 Huangyingtao	H1	702	
		安丘 Anqiu	红樱桃 Hongyingtao	H8	703	
		昌邑 Changyi	樱珠 Yingzhu	H2	702	
		昌乐 Changle	红樱桃 Hongyingtao	H2	702	
		中国樱桃（野生） <i>C. pseudocerasus</i> （Wild）	四川 Sichuan	西昌 Xichang	西昌群体 Xichang（5）	H9, H10
	青川 Qingchuan			青川群体 Qingchuan（5）	H1, H2, H8, H12	702 ~ 703
	石棉 Shimian			石棉群体 Shimian（5）	H1, H2, H13, H14	702 ~ 703
雅安 Yaan	雅安群体 Yaan（5）			H1, H8, H15, H16, H17	702 ~ 703	
北川 Beichuan	北川群体 Beichuan（11）			H1, H2, H8, H15, H18, H19, H20, H21	702 ~ 703	
贵州 Guizhou	贵阳 Guiyang		贵阳群体 Guiyang（4）	H2, H7, H11	702 ~ 703	
	欧洲甜樱桃 <i>C. avium</i>		美国 USA	*	滨库 Bing	H22
加拿大 Canada			*	美早 Tieton	H22	704
			*	先锋 Van	H24	704
			*	拉宾斯 Lanpins	H24	704
		*	斯坦勒 Stella	H25	704	
		乌克兰 Ukraine	*	维卡 Vega	H29	705
*			早大果 KpynHonnoAHaЯ	H26	705	
德国 Germany			*	斯卡奈德斯 Scheiders	H30	705
		*	雷佶娜 Regina	H25	704	
		欧洲 Europe	*	那翁 Napoleon	H32	705
*			马扎德 Mazzard	H22	704	
日本 Japan			*	佐藤锦 Satonishiki	H25	704
		*	丰锦 Yutakanihiki	H27	704	
		*	柯迪亚 Kordia	H22	705	
捷克 Czech		*	勃兰特 BID.Burlat	H28	704	
法国 France	*	莫莉 Bigarreau Moreau	H31	704		
意大利 Italy	*	Münchebergi korai	H31	704		
匈牙利 Hungary	*	大紫 Black Tartarian	H23	704		
苏联 Soviet Union	*					

櫻桃 <i>Cerasus</i>	来源 Origin	采样地 Location	品种/编号 Cultivar/Code	单倍型 Haplotype	序列长度/bp Length
毛櫻桃	河南 Henan	郑州 Zhengzhou	郑州毛櫻桃 Zhengzhou Maoyingtao	H34	709
<i>C. tomentosa</i>	新疆 Xinjiang	大西沟 Daxigou	新疆毛櫻桃 Xinjiang Maoyingtao	H35	709
	甘肅 Gansu	定西 Dingxi	定西毛櫻桃 Dingxi Maoyingtao	H37	709
		天水 Tianshui	天水毛櫻桃 Tianshui Maoyingtao	H33	709
		平凉 Pingliang	平凉毛櫻桃 Pingliang Maoyingtao	H37	709
	山东 Shandong	昌邑 Changyi	山东毛櫻桃 Shandong Maoyingtao	H34	709
	四川 Sichuan	泸定 Luding	泸定毛櫻桃 Luding Maoyingtao	H36	709

Note: \* Represents samples collected from Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science (CAAS). The numbers in bracket represent the number of samples.

Table 2 Variable sites of the aligned ITS sequences in the 37 haplotypes in three cherry species

单倍型 Haplo- type	变异位点 Polymorphic site																																			
	ITS1																																			
	61	62	67	69	79	81	88	95	96	97	99	100	104	128	130	134	135	136	137	142	144	148	149	151	157	159	163	185	189	203	208	225	230	233	245	
H1	C	C	A	T	C	C	T	T	C	T	G	A	A	G	G	T	C	G	T	T	C	A	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	G	C	G	C
H2	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H5	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	A	A	.	.
H6	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H7	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.
H8	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H9	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	A	A	.	.
H10	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	A	A	.	.
H11	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.
H12	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H13	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H14	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	A	A	.	.
H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H17	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H18	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
H19	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H20	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H21	A	G	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H22	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H23	.	.	.	C	G	G	G	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H24	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	A	.	
H25	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H26	.	.	.	.	G	G	G	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H27	.	.	.	.	G	G	G	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H28	.	.	.	.	G	G	G	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	G	
H29	.	.	.	C	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H30	.	.	.	C	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H31	.	.	.	C	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H32	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	
H33	.	.	.	.	G	.	C	C	.	G	C	T	T	.	.	G	.	.	C	C	.	G	G	C	A	C	G	C	.	T	C	.	.	.	.	
H34	.	.	.	.	G	.	C	C	.	G	C	T	T	.	T	G	.	.	C	C	.	G	G	C	A	C	G	C	.	T	C	.	.	.	.	
H35	.	.	.	.	G	.	C	C	.	G	C	T	T	.	T	G	.	.	.	C	.	G	G	C	A	C	G	C	.	T	C	.	.	.	.	
H36	.	.	.	.	G	.	C	C	T	G	C	C	T	.	.	G	.	.	.	C	G	.	G	G	C	A	C	G	C	.	T	C	.	.	.	
H37	.	.	.	.	G	.	C	C	.	G	C	T	T	.	T	G	.	.	C	C	.	G	G	C	A	C	G	C	.	T	C	.	.	.	.	
单倍型 Haplo- type	变异位点 Polymorphic site																																			
	ITS1																																			
	246	247	251	253	254	280	293	342	436	447	448	455	463	475	478	498	501	502	503	509	525	535	538	540	541	554	579	592	605	607	615	623	626	637	641	642
H1	G	C	C	G	C	C	C	T	A	C	A	A	C	G	T	A	C	T	C	C	A	C	C	A	C	A	G	G	C	G	T	G	T	T	A	T
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

续表 2

单倍型	变异位点 Polymorphic site																																					
Haplo- type	ITS1					5.8S					ITS2																											
	246	247	251	253	254	280	293	342	436	447	448	455	463	475	478	498	501	502	503	509	525	535	538	540	541	554	579	592	605	607	615	623	626	637	641	642		
H8	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
H9	T	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
H10	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H13	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
H14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
H16	.	.	.	.	G	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H18	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
H19	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
H20	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	A	A	.	.	.	.	.		
H23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	A	A	.	.	.	.	.		
H24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.		
H25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.		
H26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	T	.		
H27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.		
H28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	C	.	.	T	A	A	.	C	.	T	.		
H29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	.	A	A	.	.	.	.	T	.	
H30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	T	.	
H31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.		
H32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	T	.		
H33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	T	A	G	G	.	C	T	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	A	G	C	.	.			
H34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	T	A	G	G	.	C	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	G	C	.	.			
H35	.	.	.	.	T	.	.	C	.	C	T	T	A	G	G	.	C	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	G	C	.	.			
H36	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	T	T	.	G	G	.	C	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	G	C	.	.			
H37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	T	.	G	G	.	C	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	G	C	.	.			

注：所有单倍型序列比对以单倍型 H1 为基准，表头数字表示核苷酸变异位点，圆点表示该位点核苷酸相同于单倍型 H1。  
Note: All sequences are compared to the reference haplotype H1. The number at the top indicates polymorphic sites. Dots represent nucleotide variants identical to the first sequence.

表 3 樱桃 ITS 序列特征及遗传多样性分析				
Table 3 Analysis of the sequence characteristics and genetic diversity of ITS in three cherry species				
品种/地方种质/编号 Cultivar/Local germplasm/Code	单倍型数量 Number of haplotype	单倍型多样性 Diversity of haplotype	核苷酸多样性 Diversity of nucleotide	G + C 含量/% G + C content
中国樱桃 <i>Cerasus pseudocerasus</i> (70 samples)	21	0.840	0.00466	57.86
栽培 Landrace (35 samples)	8	0.726	0.00224	58.47
野生 Wild (6 populations, 35 individuals)	17	0.914	0.00681	58.37
欧洲甜樱桃 <i>C. avium</i> (18 samples)	11	0.928	0.00396	58.10
毛樱桃 <i>C. tomentosa</i> (7 samples)	5	0.905	0.00564	59.77

所有变异位点共定义了 37 个单倍型（表 2，表 3）。21 个单倍型（H1 ~ H21）属于中国樱桃。H1 和 H2 是中国樱桃最主要的两个单倍型，有 13 个单倍型单独分布，属于中国樱桃中特有。H22 ~ H32 共 11 个单倍型属于欧洲甜樱桃，其中 H22 为主要类型，有 8 个为欧洲甜樱桃特有。H33 ~ H37 属于毛樱桃，H34 和 H37 分别在两个毛樱桃种质中分布，其余单倍型为毛樱桃群体内特有单倍型。  
单倍型多样性 ( $H_d$ ) 和核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 是评价遗传多样性的重要指标。根据单倍型多样性 ( $H$ ) 和核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 数据表明，在物种水平上，中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃均具有较高的遗传多样性水平。在中国樱桃种内，栽培种质的遗传多样性水平明显低于野生群体（表3）。

2.2 遗传距离与遗传分化分析

采用 Kimura-2 参数遗传距离模型计算进化距离。结果（表 4）表明，3 个物种间遗传分化达到极显著水平，反映了 3 个种之间遗传差异较大。同时，在中国樱桃种内，栽培种质和其野生群体遗传分化（0.0545）也达到显著水平，两者之间遗传距离为 0.005。3 个种间遗传距离较近的是中国樱桃和欧洲甜樱桃，为 0.018，而中国樱桃和欧洲甜樱桃与毛樱桃之间遗传距离均较较远，分别为 0.048 和 0.050。

表 4 遗传距离（左下角）与遗传分化（右上角）比较  
Table 4 The comparison of genetic distance (below) and genetic differentiation (above)

樱桃 <i>Cerasus</i>	中国樱桃（栽培） <i>C. pseudocerasus</i> (Landrace)	中国樱桃（野生） <i>C. pseudocerasus</i> (Wild)	欧洲甜樱桃 <i>C. avium</i>	毛樱桃 <i>C. tomentosa</i>	中国樱桃 <i>C. pseudocerasus</i>
中国樱桃（栽培） <i>C. pseudocerasus</i> (Landrace)	—	0.0545*	0.8401**	0.9397**	0.00384
中国樱桃（野生） <i>C. pseudocerasus</i> (Wild)	0.005	—	0.7031**	0.8635**	- 0.00325
欧洲甜樱桃 <i>C. avium</i>	0.018	0.020	—	0.9041**	0.7594**
毛樱桃 <i>C. tomentosa</i>	0.048	0.050	0.048	—	0.8994**

注：\*\*差异达极显著水平（ $P < 0.01$ ）；\* 差异达显著水平（ $P < 0.05$ ）。  
Note: \*\* indicates most significant difference ( $P < 0.01$ ); \* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ).

2.3 系统发育及单倍型网络分析

邻接（Neighbor-Joining, NJ）聚类分析表明（图 1, A），37 个 ITS 单倍型以较高的支持率（92%~100%）聚成 3 支，其中 Clade I 包含单倍型 H1~H21, Clade II 包含单倍型 H22~H32, Clade III 包含单倍型 H33~H37，分属中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃。单倍型网络分析（图 1, B）结果与 NJ 聚类结果一致。中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃所具有的 ITS 单倍型被明显地分为 3 类，分别与 Clade I、Clade II 和 Clade III 对应。在 Clade I 即中国樱桃单倍型聚类中，单倍型 H2 处于其中心位置，且存在于较大部分中国樱桃种质中（表 1），为核心的古老单倍型，其余单倍型则分散于该分支的外围，成为网络图的外部节点；单倍型 H1 的出现频率也较高。分别代表欧洲甜樱桃和毛樱桃的单倍型网络聚类 Clade II 和 Clade III 未见核心古老单倍型，仅显示 H22 和 H37 分别是欧洲甜樱桃（Clade II）和毛樱桃（Clade III）种质中出现频率较高的单倍型。

此外，单倍型 NJ 聚类和网络分析均表明，中国樱桃和欧洲甜樱桃遗传距离较近；而毛樱桃与它们的遗传距离较远，表现出较远亲缘关系。

2.4 二级结构分析

为了进一步了解 3 个樱桃种的 ITS 区序列二级结构上的差异，结合系统发育树及各单倍型所代表的样品数量，选择了 H1、H2、H22 和 H37 等 4 个单倍型进行二级结构预测分析（图 2）。结果显示，5.8S 区域的二级结构基本相同，ITS1 区和 ITS2 区的二级结构差异较大，中国樱桃的单倍型 H1、H2 最小自由能为  $-1\,037.63\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $-1\,039.72\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，甜樱桃的单倍型 H22 最小自由能为  $-1\,052.69\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，毛樱桃的单倍型 H37 的最小自由能为  $-1\,073.20\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。对所有单倍型的 ITS 全长序列进行二级结构预测，将得到的最小自由能进行  $t$  检测，3 个种之间差异显著（ $P < 0.05$ ）。4 个单倍型的 RNA 二级结构显示（图 2），下半部分的茎环结构较为相似，上半部分存在较大差异，结合最小自由能和二级结构图的数据，支持基于 3 个种的 ITS 序列构建的系统发育树。

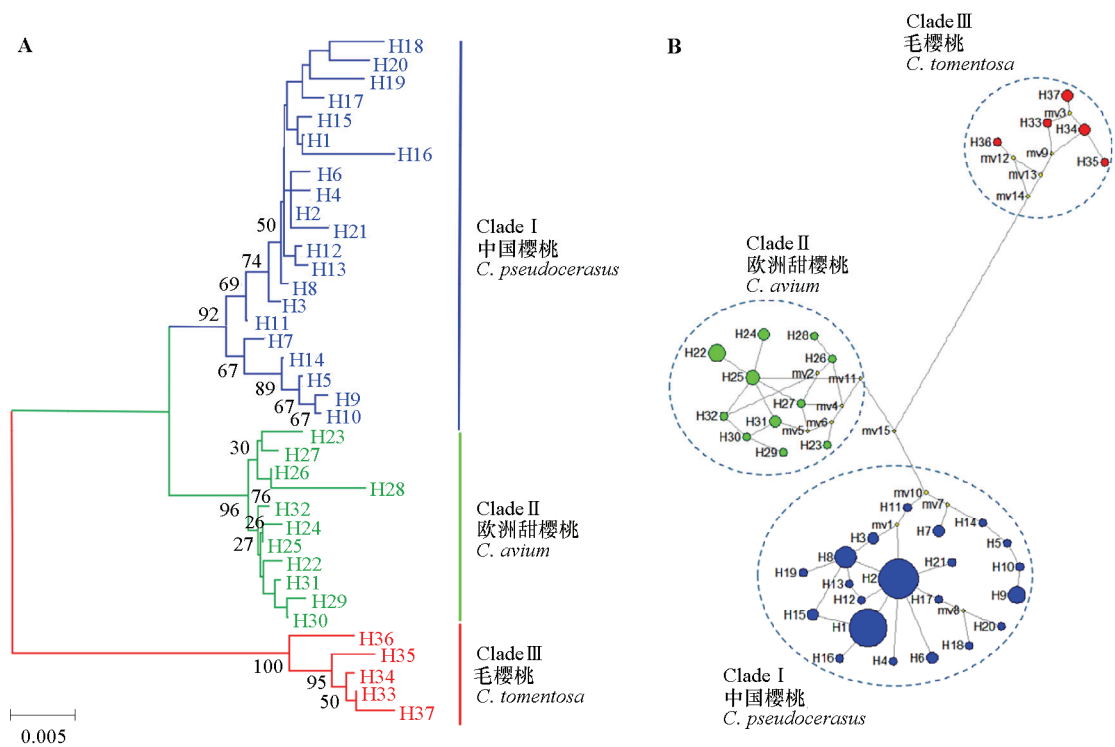


图1 樱桃单倍型系统发育树

A: 邻接法 (分支上的数字代表该分支的自展支持率 bootstrap 值, 1 000 次重复); B: 单倍型网络中介图 (圆圈大小代表个单倍型的频率, mv1 ~ mv14 表示 14 个缺失的单倍型)。Clade I、II 和 III 分别代表中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃。  
**Fig. 1 The phylogenetic results based on haplotype analysis in three cherry species**  
A: Neighbor-Joining tree (the number on each branch denotes bootstrap, 1 000 replications); B: Median-joining network (Circumference size is proportional to the haplotypes frequency. All mutations are shown in the network, mv1 ~ mv14 median vector) . Clade I , II , and III represents *Cerasus pseudocerasus* , *C. avium* and *C. tomentosa* , respectively.

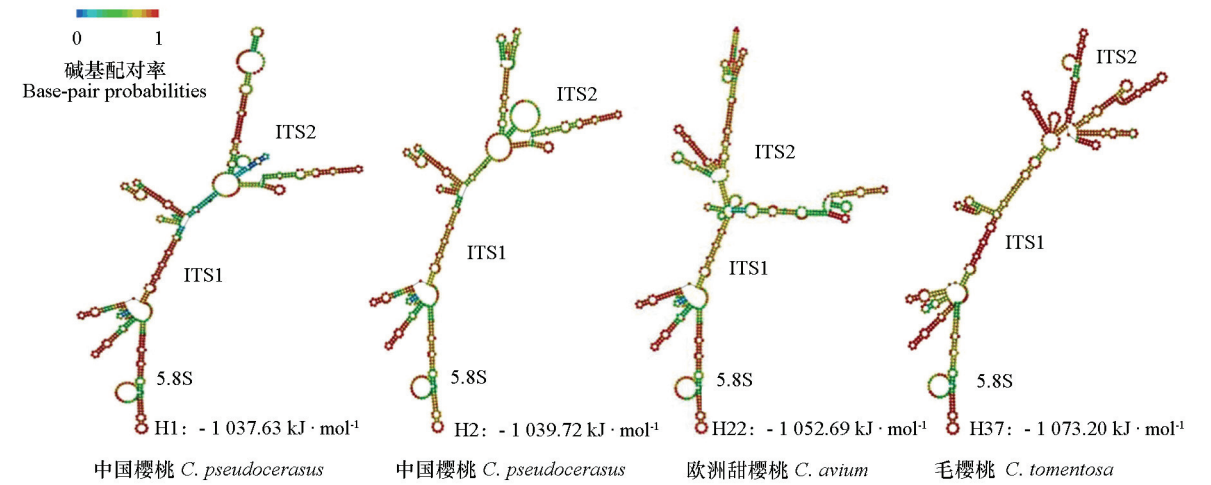


图2 樱桃 ITS 二级结构模型图及其最小自由能

**Fig. 2 Secondary structure model of ITS sequences and the minimum free energy in three cherry species**



## 3 讨论

### 3.1 樱桃 ITS 序列遗传多样性分析

单倍型多样性和核苷酸多样性是从 DNA 序列水平反映物种遗传多样性的重要指标(Chen et al., 2013)。本研究中, 基于核基因 ITS 序列对 3 个樱桃种共 96 份种质的遗传多样性分析结果表明, 中国樱桃、欧洲甜樱桃和毛樱桃均具有较高的遗传多样性水平, 与陈娇等(2013)和高天翔等(2016)基于核基因 SSR 标记对中国樱桃的研究结果以及基于 RAPD (Cai et al., 2007) 和 SSR (宛甜 等, 2013) 标记对欧洲甜樱桃和毛樱桃的研究结果一致, 但与基于叶绿体 DNA 序列研究显示中国樱桃、欧洲甜樱桃及毛樱桃种内遗传多样性较低的结果 (Katayama & Uematsu, 2005; Chen et al., 2013; Pervaiz et al., 2015) 不一致, 这与所选标记的属性有关。由于核基因序列反映的有效群体远大于细胞质 DNA 序列, 在群体进化过程中核基因所经历的群体历史动态变化的剧烈程度远小于细胞质基因组, 因此应用属于核 DNA 的 ITS 序列分析时能够反映出相对较高的遗传多样性水平, 而叶绿体 DNA 序列分析时常表现较低的遗传多样性水平 (Schaal et al., 1998; Gong et al., 2011; Khadivi-Khub et al., 2014)。

此外, 本研究中, 中国樱桃栽培种质的遗传多样性水平明显低于野生资源, 且栽培种质的单倍型数量只有相同采样数量的野生资源单倍型的一半。这与 Chen 等(2015)和 Zhang 等(2016)基于 SSR 标记对中国樱桃栽培种质及野生资源遗传多样性的研究结果一致。此结果表明中国樱桃栽培种质在长期的驯化选择过程中经历了较为严重的奠基者效应以及在近期有效群体动态变化中产生了较强的瓶颈效应, 使其群体中低频率等位基因严重丢失而高频率等位基因在群体中有效固定, 从而导致其总群体的遗传多样性严重丢失, 遗传背景狭窄。此外, 与中国樱桃野生资源相比, 栽培种质较低的遗传多样性可能与人们对良种推广繁殖的偏向性, 遭受较明显人工选择压力和多采用无性繁殖有关 (Doebley et al., 2006; Miller & Gross, 2011; Meyer & Purugganan, 2013)。

### 3.2 中国樱桃、欧洲甜樱桃与毛樱桃的遗传关系

ITS 系统发育树表明, 3 个樱桃种被分为 3 个大的分支。中国樱桃与欧洲甜樱桃构成一个次级分支, 分别以 92%和 96%的自展支持率分开, 且包含所有的中国樱桃单倍型和欧洲甜樱桃单倍型; 毛樱桃则以 100%的自展支持率被单独分为一支, 表明 3 个樱桃物种具有相对独立的进化方式。3 个樱桃种间均没有检测到物种间的共享 ITS 单倍型, 说明樱桃种间的基因交流或基因渐渗较微弱, 单倍型网络分析以及物种间较大且极显著的遗传分化系数也证明此观点。这可能与樱桃的地理起源有关, 以往研究表明欧洲甜樱桃及其近缘类群起源于欧洲 (Mariette et al., 1997; Hanelt et al., 2001), 而中国樱桃起源和分布于中国 (俞德浚, 1986), 在其漫长的进化过程中, 巨大的地理隔离导致的生殖隔离促使了物种的形成, 种间共有的同源基因逐渐消失从而造成了物种间较大的遗传分化。中国樱桃栽培种质与野生资源的遗传分化最小, 而且存在较多的共享单倍型, 说明他们具有共同的进化祖先而且彼此间基因交流较频繁。就 3 个樱桃栽培种, 基于遗传距离、系统发育关系和单倍型网络支系分析均显示, 中国樱桃与欧洲甜樱桃的 ITS 序列的同源性相对于毛樱桃较高, 遗传关系较近, 说明在整个樱桃的进化过程中, 毛樱桃最先被分化出来而形成单独的物种独立进化, 中国樱桃和欧洲甜樱桃是在后续进化过程中慢慢产生的遗传分化。这与张琪静(2007)、蔡宇良等(2006)和刘艳玲等(2007)的研究结果类似。此外, 依据形态学特征及物种分类均表明中国樱桃和欧洲甜樱桃均属典型樱亚属, 具有相对较近的遗传关系, 而毛樱桃则属矮生樱亚属, 该结果也与现有的樱属分

类框架 (俞德浚, 1986) 一致。

相对于 DNA 序列和氨基酸序列, RNA 二级结构可以提供结构差异信息, 更能反映出一些在一级结构中较难发现的现象 (Kole et al., 2012), 可以作为研究物种分子系统学的一种重要手段。本研究中 3 个物种 ITS 区序列的二级结构结果显示, 中国樱桃单倍型 H1 与 H2 的二级结构相似, 毛樱桃二级结构 (H37) 与中国樱桃 (H1, H2) 和欧洲甜樱桃 (H22) 差异较大。二级结构的预测结果有效地验证了 NJ 系统聚类树结果, 中国樱桃与欧洲甜樱桃的亲缘关系较为密切, 而毛樱桃与中国樱桃和欧洲甜樱桃亲缘关系则相对较远。本研究结果说明利用 ITS 序列可以有效地从分子水平进行樱桃种质资源亲缘关系的分析, 为进一步的资源创新和育种提供理论依据。

### 3.3 ITS 序列在鉴定樱桃种内遗传资源中的应用评价

ITS 序列承受的进化选择压力小, 进化速率快 (Kornkven et al., 1998), 在植物类群系统关系、种质资源鉴定和保护生物学等研究中广泛应用 (Álvarez & Wendel, 2003; Kelch & Baldwin, 2003)。但在不同植物类群和不同分类等级上, 由于分化的时间和速率不一样, ITS 序列所代表的信息量也不相同 (王化坤 等, 2010)。在本研究中, 3 个樱桃种被分为 3 个独立的分支, 但 69 份中国樱桃中存在的 21 个单倍型在系统树中形成的次级分支中, 相当一部分的次级分支自展支持率不超过 50%, 部分中国樱桃地方种质和野生资源 ITS 序列相同, 欧洲甜樱桃与毛樱桃也存在类似的结果。这与何文等 (2014) 利用 ITS 序列对栽培中国樱桃研究结果类似, 来自 18 个群体共 154 个个体的 ITS 序列共定义了 11 个单倍型, 该结果表明, ITS 序列在种内水平具有高度保守性。此外, ITS 序列虽然表现出较高的物种分辨率, 可以将亲缘关系很近的两个物种有效区分, 但在 3 个樱桃栽培种内的品种或地方种质的鉴别, ITS 序列还存在一定局限。付涛等 (2015) 在对樱属植物种质资源系统鉴定方法的研究中, 结果显示, 中山樱和毛叶山樱 ITS 序列相似度很高, 甚至完全一样, 浙闽樱、尾叶樱、迎春樱和钟花樱序列相似度也很高, 因此, 对于近期分化的物种, 其 ITS 序列进化较慢, 单纯依赖 ITS 序列很难将其全部区分开来, 必须借助于形态学分类和其他分子序列或标记等才能将其有效的区分开来。

## References

- Abedian M, Talebi M, Golmohammadi H R, Sayed-Tabatabaei B E. 2012. Genetic diversity and population structure of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP markers. *Biochemical Systematics & Ecology*, 40 (40): 112 – 117.
- Álvarez I, Wendel J F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3): 417 – 434.
- Bai W N, Wang W T, Zhang D Y. 2014. Contrasts between the phylogeographic patterns of chloroplast and nuclear DNA highlight a role for pollen-mediated gene flow in preventing population divergence in an East Asian temperate tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 81: 37 – 48.
- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1): 37 – 48.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Bioinformatics Methods and Protocols*, 132: 71 – 91.
- Cai Y L, Cao D W, Zhao G F. 2007. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 111 (3): 248 – 254.
- Cai Yu-liang, Li Shan, Cao Dong-wei, Qian Zeng-qiang, Zhao Gui-fang, Han Ming-yu. 2006. Use of amplified DNA sequences for the genetic analysis of the cherry germplasm. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (2): 249 – 254. (in Chinese)
- 蔡宇良, 李 珊, 曹东伟, 钱增强, 赵桂仿, 韩明玉. 2006. 利用 DNA 扩增片段序列对樱桃种质资源的遗传分析. *园艺学报*, 33 (2): 249 – 254.
- Cai Yu-liang, Li Shan, Chen Yi-ping, Zhao Gui-fang, Fu Run-min. 2005. Determination and analysis of main fruit inclusions of different varieties of *Prunus avium*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 25 (2): 304 – 310. (in Chinese)

- 蔡宇良, 李 珊, 陈怡平, 赵桂仿, 付润民. 2005. 不同甜樱桃品种果实主要内含物测试与分析. *西北植物学报*, 25 (2): 304 - 310.
- Cao Dong-wei, Cai Yu-liang, Yang Juan, Zhao Gui-fang. 2007. PCR-RFLP analysis of *Prunus pseudocerasus*. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 35 (5): 173 - 178. (in Chinese)
- 曹东伟, 蔡宇良, 杨 娟, 赵桂仿. 2007. 中国樱桃的 PCR-RFLP 分析. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 35 (5): 173 - 178.
- Caetano-Anollés G. 2002. Tracing the evolution of RNA structure in ribosomes. *Nucleic Acids Research*, 30 (11): 2575 - 2587.
- Chen Jiao, Wang Xiao-rong, Tang Hao-ru, Chen Tao, Huang Xiao-jiao, Liang Qin-biao. 2013. Assessment of genetic diversity and populations genetic structure in wild Chinese cherry from Sichuan province using SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (2): 333 - 340. (in Chinese)
- 陈 娇, 王小蓉, 汤浩茹, 陈 涛, 黄晓姣, 梁勤彪. 2013. 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. *园艺学报*, 40 (2): 333 - 340.
- Chen Tao, Chen Qing, Luo Ya, Huang Zhi-lin, Zhang Jing, Tang Hao-ru, Wang Xiao-rong. 2015. Phylogeography of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary patterns and demographic history. *Plant Biology*, 17 (4): 787 - 797.
- Chen Tao, Li Liang, Zhang Jing, Huang Zhi-lin, Zhang Hong-wei, Liu Yin, Chen Qing, Tang Hao-ru, Wang Xiao-rong. 2016. Genetic resources survey of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) landraces based on investigation, collection and comparative evaluation. *Journal of Fruit Science*, 33 (8): 917 - 933. (in Chinese)
- 陈 涛, 李 良, 张 静, 黄智林, 张洪伟, 刘 胤, 陈 清, 汤浩茹, 王小蓉. 2016. 中国樱桃种质资源的考察, 收集和评价. *果树学报*, 33 (8): 917 - 933.
- Chen Tao, Wang Xiao-rong, Tang Hao-ru, Chen Qing, Huang Xiao-jiao, Chen Jiao. 2013. Genetic diversity and population structure of Chinese cherry revealed by chloroplast DNA *trnQ-rps16* intergenic spacers variation. *Genetic Resources & Crop Evolution*, 60 (6): 1859 - 1871.
- China Plant BOL Group. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (49): 19641 - 19646.
- Doebley J F, Gaut B S, Smith B D. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127 (7): 1309 - 1321.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47 - 50.
- Forster P, Bandelt H J, Röhl A. 2004. Network 4.2.0.1. Software available free at [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com). Fluxus Technology Ltda.
- Fu Tao, Wang Zhi-long, Lin Li, Lin Le-jing. 2015. Study on the identification method of a system of the *Cerasus* plants germplasm resources. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (12): 2455 - 2468. (in Chinese)
- 付 涛, 王志龙, 林 立, 林乐静. 2015. 樱属植物种质资源系统鉴定方法的研究. *园艺学报*, 42 (12): 2455 - 2468. (in Chinese)
- Gao Tian-xiang, Cai Yu-liang, Feng Ying, Zhao Xiao-jun. 2016. Genetic diversity and genetic structure of *Prunus pseudocerasus* populations from China as revealed by SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (6): 1148 - 1156. (in Chinese)
- 高天翔, 蔡宇良, 冯 瑛, 赵晓军. 2016. 中国樱桃 14 个自然居群遗传多样性和遗传结构的 SSR 评价. *园艺学报*, 43 (6): 1148 - 1156.
- Gong X, Luan S S, Hung K H, Hwang C C, Lin C J, Chiang Y C, Chiang T Y. 2011. Population structure of *Nouelia insignis* (Asteraceae), an endangered species in southwestern China, based on chloroplast DNA sequences: recent demographic shrinking. *Journal of Plant Research*, 124 (2): 221 - 230.
- Hanelt P, Buttner R, Mansfeld R. 2001. Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals). Springer. Science & Business Media.
- Harlan J R. 1971. Agricultural origins: centers and noncenters. *Science*, 174 (4008): 468 - 474.
- Han Li-xing, Huang Zhen-guang, Zhao Gai-rong, Li Ming, Qi Xiu-juan, Li Yu-hong. 2008. The development status and prospect of sweet cherry industry in China. *China Fruit*, (1): 58 - 60. (in Chinese)
- 韩礼星, 黄贞光, 赵改荣, 李 明, 齐秀娟, 李玉红. 2008. 我国甜樱桃产业发展现状和展望. *中国果树*, (1): 58 - 60.
- He Wen, Zhang Jing, Huang Zhi-lin, Chen Qing, Tang Hao-ru, Tang Fu-yi, Wang Xiao-rong. 2014. Genetic diversity and population genetic structure among local Chinese Cherry varieties [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don] based on ITS sequence. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 34 (3): 463 - 472. (in Chinese)

- 何 文, 张 静, 黄智林, 陈 清, 汤浩茹, 汤福义, 王小蓉. 2014. 基于 ITS 序列对栽培中国樱桃遗传多样性及其群体遗传结构的分析. 西北植物学报, 34 (3): 463 - 472.
- Hofacker I L. 2003. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research*, 31 (13): 3429 - 3431.
- Huang Xiao-jiao, Wang Xiao-rong, Chen Tao, Chen Jiao, Tang Hao-ru. 2013. Research progress of germplasm diversity in Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus*). *Journal of Fruit Science*, 30 (3): 470 - 479. (in Chinese)
- 黄晓姣, 王小蓉, 陈 涛, 陈 娇, 汤浩茹. 2013. 中国樱桃遗传资源多样性研究进展. 果树学报, 30 (3): 470 - 479.
- Janick J. 2005. The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breeding Reviews*, 25 (25): 5 - 320.
- Jia Hai-hui, Zhang Xiao-yan, Chen Xue-sen, Chen Xiao-liu, Zhao Chun-zhi. 2007. Survey of partial physiological index of different cherry cultivars. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 38 (2): 93 - 195. (in Chinese)
- 贾海慧, 张小燕, 陈学森, 陈晓流, 赵春芝. 2007. 甜樱桃和中国樱桃果实性状的比较. 山东农业大学学报(自然科学版), 38 (2): 193 - 195.
- Katayama H, Uematsu C. 2005. Structural analysis of chloroplast DNA in *Prunus* (Rosaceae): evolution, genetic diversity and unequal mutations. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (7): 1430 - 1439.
- Kelch D G, Baldwin B G. 2003. Phylogeny and ecological radiation of New World thistles (*Cirsium*, *Cardueae*-Compositae) based on ITS and ETS rDNA sequence data. *Molecular Ecology*, 12 (1): 141.
- Khadiji-Khub A, Zamani Z, Fattahi R, Wunsch A. 2014. Genetic variation in wild *Prunus* L. subgen. *Cerasus* germplasm from Iran characterized by nuclear and chloroplast SSR markers. *Trees*, 28 (2): 471 - 485.
- Kole R, Krainer A R, Altman S. 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11 (2): 125 - 140.
- Kornkven A B, Watson L E, Estes J R. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 85 (12): 1787 - 1795.
- Lewis P O, Kumar S, Tamura K, Nei M. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology & Evolution*, 30 (12): 2725 - 2729.
- Li Miao-miao, Cai Yu-liang, Qian Zeng-qiang, Zhao Gui-fang. 2009. Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl. and its implications for conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56 (4): 455 - 464.
- Librado P. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451 - 1452.
- Liu Chang-jiang, Liu Mei-zhou. 1993. The seed identification of the relics from Houma Copper Casting sites in Shanxi province. Beijing: Cultural Relic Press. (in Chinese)
- 刘长江, 刘美洲. 1993. 山西侯马铸铜遗址种子类遗物的鉴定. 北京: 文物出版社.
- Liu Yan-ling, Xu Li-ming, Cheng Zhong-ping. 2007. Phylogenetic analysis of stone fruits such as peach, plum, apricot, mume and cherry based on ITS sequences. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 23 - 28. (in Chinese)
- 刘艳玲, 徐立铭, 程中平. 2007. 基于 ITS 序列探讨核果类果树桃, 李, 杏, 梅, 樱的系统发育关系. 园艺学报, 34 (1): 23 - 28.
- Lu Juan, Zhang Shao-ling, Liu Qing-zhong, Wu Jun, Zhang Rui-ping, Liaoyang Wen-ke, Chen Ting. 2009. Optimization of SRAP-PCR system and its application in genetic diversity analysis of cherry. *Journal of Fruit Science*, 26 (2): 163 - 169. (in Chinese)
- 路 娟, 张绍铃, 刘庆忠, 吴 俊, 张瑞萍, 廖杨文科, 陈 婷. 2009. 樱桃 SRAP-PCR 体系优化及其遗传多样性分析. 果树学报, 26 (2): 163 - 169.
- Lü Xiu-lan, Liu Yang-qing, Zhou Yong-qing, Gong Rong-gao, Wang Zhi-hui. 2005. Economic traits and quality analysis of sweet cherry in different nature area of Sichuan. *South China Fruits*, 34 (3): 75 - 76. (in Chinese)
- 吕秀兰, 刘杨青, 周永清, 龚荣高, 汪志辉. 2005. 四川不同生态区甜樱桃果实经济性状及品质分析. 中国南方果树, 34 (3): 75 - 76.
- Mariette S, Lefranc M, Legrand P, Taneyhill D, Frascaria-Lacoste N, Machon N. 1997. Genetic variability in wild cherry populations in France. effects of colonizing processes. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (6 - 7): 904 - 908.
- Meyer R S, Purugganan M D. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics*, 14 (12): 840 - 852.

- Miller A J, Gross B L. 2011. From forest to field: perennial fruit crop domestication. *American Journal of Botany*, 98 (9): 1389 - 1414.
- Najafzadeh R, Arzani K, Bouzari N. 2014. Genetic diversity assessment and identification of new sour cherry genotypes using inter-simple sequence repeat markers. *International Journal of Biodiversity*, 2014 (8): 1 - 9.
- Pervaiz T, Sun X, Zhang Y, Tao R, Zhang J, Fang J. 2015. Association between chloroplast and mitochondrial DNA sequences in Chinese *Prunus* genotypes (*Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus avium*). *BMC Plant Biology*, 15 (1): 4.
- Song Chang-mei, Wen Xiao-peng, Yang Er-tai. 2011. Cherry germplasm from Guizhou Province analyzed by ISSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1531 - 1538. (in Chinese)
- 宋常美, 文晓鹏, 杨尔泰. 2011. 贵州樱桃种质资源的 ISSR 分析. *园艺学报*, 38 (8): 1531 - 1538.
- Schaal B, Hayworth D, Olsen K M, Rauscher J, Smith W. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7 (4): 465 - 474.
- Vijayan K, Zhang W J, Tsou C H. 2009. Molecular taxonomy of *Camellia* (Theaceae) inferred from nrITS sequences. *American Journal of Botany*, 96 (7): 1348 - 1360.
- Wan Tian, Cai Yu-liang, Feng Ying, Zhang Xue, He Heng-liu. 2013. Genetic diversity and genetic structure analysis of wild *Prunus tomentosa* Thumb. based on simple sequence repeats marker. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 33 (8): 1544 - 1550. (in Chinese)
- 宛甜, 蔡宇良, 冯瑛, 张雪, 何恒流. 2013. 野生毛樱桃 SSR 遗传多样性和遗传结构分析. *西北植物学报*, 33 (8): 1544 - 1550.
- Wang Hua-kun, Tao Jian-min, Qu Shen-chun, Fang Jing-gui, Ma Rui-juan, Zhang Zhen, Lou Xiao-ming. 2010. Molecular evolution and phylogeny of stone fruit trees based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (3): 363 - 374. (in Chinese)
- 王化坤, 陶建敏, 渠慎春, 房经贵, 马瑞娟, 章镇, 娄晓鸣. 2010. 核果类果树 ITS 序列分子进化及系统发育关系研究. *园艺学报*, 37 (3): 363 - 374.
- You Yong, Guo Ming-jun, Yang Zhi-hui, Xiao Feng-xiang, Wang Li-guo, Tian Xin-sheng. 1991. The present situation and the development and utilization of *Prunus tomentosa*. *Journal of Biology*, 6: 24 - 25. (in Chinese)
- 游泳, 郭明军, 杨志辉, 肖凤祥, 王立果, 田新生. 1991. 毛樱桃资源的现状和开发利用. *生物学杂志*, 6: 24 - 25.
- Yu De-jun. 1979. Taxonomy of fruit trees in China. Beijing: Agricultural Press. (in Chinese)
- 俞德浚. 1979. 中国果树分类学. 北京: 农业出版社.
- Yu De-jun. 1986. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (Tomus 38). Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 俞德浚. 1986. 中国植物志 (第 38 卷). 北京: 科学出版社.
- Zhang Jing, Chen Tao, Wang Jue, Chen Qing, Luo Ya, Zhang Yong, Tang Hao-ru, Wang Xiao-rong. 2016. Genetic diversity and population structure in cherry [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don] along Longmenshan Fault Zones in China with newly developed SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 212: 11 - 19.
- Zhang Qi-jing. 2007. Studies on *P. tomentosa* genetic diversity and relationships with relative species in *Prunus* [M. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 张琪静. 2007. 毛樱桃资源遗传多样性及与李属近缘种亲缘关系的研究 [硕士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.