

基于叶绿体 DNA 信息的南方梨属种质的遗传多样性和演化分析

齐 丹^{1,*}, 常耀军^{1,*}, 曹玉芬^{1,**}, 胡红菊², 田路明¹, 董星光¹, 张 莹¹,
霍宏亮¹, 徐家玉¹, 张小双¹, 刘 超¹

(¹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; ²湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430064)

摘 要: 选取 5 个叶绿体 DNA 非编码区 *trnL-trnF*-1、*trnL-trnF*-2、*trnS-psbC*、*accD-psaI*、*rps16-trnQ* 和 1 个基因区域 *rbcL*, 对中国秦岭淮河以南地区的梨 (*Pyrus* L.) 资源进行遗传多样性和演化分析。将 188 份梨资源的测序结果整合得到长度为 5 612 bp (包含缺失片段), 共检测出 13 个单倍型、4 个单一突变位点、16 个简约性信息位点和 14 个插入/缺失片段 (InDels), 单倍型多样性 H_d 为 0.7178, 核苷酸多样性为 0.35×10^{-3} 。*accD-psaI* 区域的分析结果显示该区域的 H_d 值最高, 为 0.7177; *rbcL* 区域的 H_d 值最低, 为 0.0317。其中 162 份梨资源检测出 12 个单倍型, H_d 为 0.713, 核苷酸多样性为 0.29×10^{-3} ; 梨的不同地理群体中湖南省的 10 个梨地方品种的 H_d 最高, 为 0.889; 来自贵州省的 8 个品种的 H_d 最低, 为 0。138 份砂梨地方品种共检测出 8 个叶绿体单倍型, 其中单倍型 H2、H4 和 H5 在 130 份砂梨和 37 份白梨品种中检测到, 单倍型 H6、H10、H11、H12 和 H13 在 8 份砂梨地方品种 ‘青皮钟’、‘甜宵梨’、‘细花红梨’、‘惠阳红梨’、‘麝香梨’、‘塘湖青’、‘红粉’ 和 ‘横县浸泡梨’ 中检测到。Median-joining Network 图显示单倍型 H6 和 H11 为古老单倍型, H1、H4 和 H5 为较进化的单倍型。根据叶绿体 DNA 序列变异信息可推测秦岭淮河以南地区的砂梨和白梨亲缘关系较近, 同时来自湖南地区的砂梨种质资源具有丰富的遗传多样性。

关键词: 梨; 种质; 叶绿体 DNA; 遗传多样性; 演化分析

中图分类号: S 662.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 12-2308-13

Genetic Diversity and Phylogenetics of Pear (*Pyrus* L.) Germplasm Resources from South China Revealed by Chloroplast DNA

QI Dan^{1,*}, CHANG Yaojun^{1,*}, CAO Yufen^{1,**}, HU Hongju², TIAN Luming¹, DONG Xingguang¹, ZHANG Ying¹, HUO Hongliang¹, XU Jiayu¹, ZHANG Xiaoshuang¹, and LIU Chao¹

(¹Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops; Germplasm Resources Utilization, Xingcheng, Liaoning 125100, China; ²Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

收稿日期: 2018-05-10; **修回日期:** 2018-12-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272128); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-29-01); 中国农业科学院科技创新工程项目

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yfcaas@263.net)

Abstract: In this study we investigated 5 chloroplast DNA non-coding regions *trnL-trnF*-1, *trnL-trnF*-2, *trnS-psbC*, *accD-psaI*, *rps16-trnQ* and one gene *rbcL* of pear (*Pyrus* L.) accessions originated from southern area of Qinling Mountain - Huaihe River line to detect the evolutionary relationship and genetic diversity. The aligned length of combined fragment of 188 pear accessions was 5 612 bp (InDels included). A total of 13 haplotypes, 4 singleton variable sites, 16 parsimony informative sites and 14 InDels were recognized after sequencing analysis, and the haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (P_i) were 0.7178 and 0.35×10^{-3} , respectively. Among the chloroplast DNA regions studied, the highest H_d value 0.7177 was detected in the *accD-psaI* intergenic spacer and the lowest one 0.0317 was found in *rbcL* gene region. Twelve haplotypes were identified in 162 pear accessions originated from southern area of Qinling - Huaihe line and their haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (P_i) were 0.713 and 0.29×10^{-3} , respectively. In geography distribution of pears, the highest H_d value (0.889) was detected in 10 accessions from Hunan Province and the lowest one (0) was found in 8 accessions from Guizhou Province. Eight haplotypes were identified in 138 Chinese Sand Pear accessions, of which 3 common cpDNA haplotypes H2, H4 and H5 were shared by 130 Chinese Sand Pear and 37 Chinese White Pear ones and 5 rare cpDNA haplotypes H6, H10, H11, H12 and H13 were detected in 8 Sand Pear local accessions 'Qingpizhong', 'Tianxiaoli', 'Xihua Hongli', 'Huiyang Hongli', 'Shexiangli', 'Tanghuqing', 'Hongfen' and 'Hengxian Jinpaoli'. The Median-joining Network showed H6 and H11 were the ancestral cpDNA haplotypes, whereas H1, H4 and H5 were the advanced ones. A close genetic relationship between *P. pyrifolia* and *P. bretschneideri* from southern area of Qinling - Huaihe line and high genetic diversity of the local cultivated sand pears from Hunan Province could be inferred based on chloroplast DNA variation information.

Keywords: pear; germplasm; chloroplast DNA; genetic diversity; phylogenetic relationship

梨 (*Pyrus*) 在分类上属于蔷薇科 Rosaceae, 苹果族 Maleae, 苹果亚族 Malinae。梨起源于中国的西部和西南山区 (Rubtsov, 1944)。秦岭淮河线是传统意义上的中国南、北方的地理分界线, 其以南大部分地区为亚热带气候, 梨野生资源丰富, 长江中下游区域的砂梨产区更是梨优势产区之一。

不同梨种之间无生殖隔离, 种间杂交现象频繁, 使得梨属植物的遗传背景复杂。基因组 DNA 分子标记广泛应用在梨种质资源的研究上, 如 RAPD (Teng et al., 2002)、SSR (Bao et al., 2007; Cao et al., 2011, 2012; Tian et al., 2012)、AFLP (Bao et al., 2008)、SSAP (Jiang et al., 2015; Yu et al., 2016)、RBIP (Jiang et al., 2016) 等。叶绿体 DNA 进化缓慢, 其变异主要以非编码区域呈现的点突变和片段插入/缺失为主, 可应用在系统进化和分类研究上 (Palmer et al., 1988)。近年来具有母系遗传特征的 cpDNA 标记在梨野生种质资源的收集保护 (Wuyun et al., 2013)、遗传结构 (Liu et al., 2013)、地方品种的遗传多样性 (常耀军 等, 2014; 岳晓燕 等, 2015)、种间亲缘关系 (Roullier et al., 2013)、系统地理学 (Zong et al., 2014)、系统发生和进化 (Zheng et al., 2014; 张靖国 等, 2016; Ferradini et al., 2017) 等领域均有利用。

本研究中对秦岭淮河以南地区的砂梨和白梨地方品种, 川梨、豆梨、滇梨、麻梨野生资源, 以及未知种类的藏梨资源进行叶绿体非编码区域和基因区域的测序, 生成不同资源的叶绿体 DNA 序列信息, 从叶绿体母系遗传角度研究秦岭淮河以南地区梨资源的遗传多样性及演化关系, 为梨种质资源的保护、育种和多样性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

从国家果树种质兴城梨、苹果圃和国家果树种质武昌砂梨圃采集起源地为秦岭淮河以南地区的梨资源 162 份，其中包括砂梨地方品种 138 份、白梨地方品种 14 份、川梨种质资源 3 份、豆梨种质资源 1 份、麻梨种质资源 1 份、滇梨种质资源 1 份和未知分类的藏梨资源 4 份；另取西洋梨品种 3 份和北方白梨品种 23 份作为对照，2 份苹果资源 ‘国光’ 和 ‘元帅’ 作为外类群。共计 190 份材料的名称、起源地及单倍型信息见表 1。

表 1 材料信息及单倍型类型
Table 1 Plant materials used in this study and cpDNA haplotypes determined by combined sequences

种类 Species	来源 Origin	编号 Code	种质名称 Accession name	地点 Location	单倍型 Haplotype
砂梨 <i>Pyrus pyrifolia</i>	湖北 Hubei	1	咸丰秤砣梨 Xianfeng Chengtuoli	咸丰 Xianfeng	5
		2	宣恩秤砣梨 Xuan'en Chengtuoli	宣恩 Xuan'en	2
		3	月半梨 Yuebanli	兴山 Xingshan	4
		4	利川香水梨 Lichuan Xiangshuili	利川 Lichuan	2
		5	兴山 2 号 Xingshan 2	兴山 Xingshan	2
		6	利川玉川梨 Lichuan Yuchuanli	利川 Lichuan	5
		7	长阳小麻皮梨 Changyang Xiaomapi	长阳 Changyang	4
		8	望水白 Wangshuibai	远安 Yuan'an	5
		9	朵朵花 Duoduo	远安 Yuan'an	5
		10	宣恩雪梨 Xuan'en Xueli	宣恩 Xuan'en	2
		11	巴东桐子梨 Badong Tongzili	巴东 Badong	2
		12	迟咸丰 Chixianfeng	利川 Lichuan	4
		13	六月雪 Liuyue	武汉 Wuhan	5
		14	金水酥 Jinshuisu	武汉 Wuhan	5
		15	麻瓢 Mapiao	武汉 Wuhan	5
	湖南 Hunan	16	芝麻酥 Zhimasu	枣阳 Zaoyang	4
		17	甜宵梨 Tianxiaoli	宜章 Yizhang	10
		18	塘湖青 Tanghuqing	靖县 Jingxian	11
		19	怀化香水 Huaihua Xiangshui	怀化 Huaihua	2
		20	隆回巨梨 Longhui Juli	隆回 Longhui	4
		21	早麻梨 Zaomali	临武 Linwu	4
		22	青梨 Qingli	临武 Linwu	4
		23	青皮早 Qingpizao	宜章 Yizhang	2
		24	麝香梨 Shexiangli	临武 Linwu	11
		25	安农 1 号 Annong 1	安江 Anjiang	5
	重庆 Chongqing	26	红粉 Hongfen	怀化 Huaihua	12
		27	白花梨 Baihuali	铜梁 Tongliang	4
		28	瑞福 Ruifu	铜梁 Tongliang	2
		29	金吊子 Jindiaozi	铜梁 Tongliang	4
	浙江 Zhejiang	30	大黄茛 Dahuangchi	乐清 Leqing	5
		31	大恩梨 Da'enli	乐清 Leqing	5
		32	真香 Zhenxiang	丽水 Lishui	2
		33	花红 Huahong	杭州 Hangzhou	4
		34	云和雪梨 Yunhe Xueli	云和 Yunhe	5
		35	翠冠 Cuiguan	未知 Unknown	5
		36	大梅梨 Dameili	未知 Unknown	4
		37	严州雪 Yanzhouxue	建德 Jiande	5
		38	蒲瓜 Pugu	乐清 Leqing	5
		39	雁荡雪 Yandangxue	乐清 Leqing	5
		40	人头 Rentou	乐清 Leqing	5
		41	鹅蛋 E'dan	丽水 Lishui	4
		42	嵊县秋白 Shengxian Qiubai	嵊州 Shengzhou	5
		43	糯稻 Nuodao	义乌 Yiwu	5
		44	义乌子梨 Yiwu Zili	义乌 Yiwu	5

续表 1

种类 Species	来源 Origin	编号 Code	种质名称 Accession name	地点 Location	单倍型 Haplotype
贵州 Guizhou	贵州 Guizhou	45	威宁早梨 Weining Zaoli	威宁 Weining	4
		46	威宁青皮磨盘 Weining Qingpi Mopan	威宁 Weining	4
		47	威宁麻皮九月梨 Weining Mapi Jiuyueli	威宁 Weining	4
		48	威宁白皮九月梨 Weining Baipi Jiuyueli	威宁 Weining	4
		49	惠水金盖 Huishui Jingai	惠水 Huishui	4
		50	威宁大黄 Weining Dahuang	威宁 Weining	4
		51	兴义海子梨 Xingyi Haizili	兴义 Xingyi	4
		52	遵义雪 Zunyixue	遵义 Zunyi	4
	福建 Fujian	53	水梨 Shuili	晋江 Jinjiang	5
		54	葫芦梨 Hululi	古田 Gutian	2
		55	黄皮钟 Huangpizhong	建阳 Jianyang	5
		56	棕包梨 Zongbaoli	南靖 Nanjing	5
		57	建阳大梨 Jianyang Dali	建阳 Jianyang	5
		58	哀家梨 Aijiali	建阳 Jianyang	4
		59	古田青皮梨 Gutian Qingpili	古田 Gutian	4
		60	政和大雪梨 Zhenghe Daxueli	政和 Zhenghe	5
		61	青皮钟 Qingpizhong	建瓯 Jianou	6
		62	饼子 Bingzi	建阳 Jianyang	5
		63	浦城雪 Puchengxue	浦城 Pucheng	2
		64	满顶雪 Mandingxue	浦城 Pucheng	4
	广西 Guangxi	65	北流黄梨 Beiliu Huangli	北流 Beiliu	2
		66	苍梧大砂 Cangwu Dasha	梧州 Wuzhou	4
		67	灌阳青水梨 Guanyang Qingshuili	灌阳 Guanyang	2
		68	柳城雪梨 Liucheng Xueli	柳州 Liuzhou	4
		69	横县浸泡梨 Hengxian Jinpaoli	横县 Hengxian	13
		70	泗安青皮梨 Si'an Qingpili	百色 Baise	2
		71	靖西冬梨 Jingxi Dongli	靖西 Jingxi	2
		72	北流蜜梨 Beiliu Mili	北流 Beiliu	2
		73	荔浦雪梨 Lipu Xueli	荔浦 Lipu	4
		74	粗皮糖梨 Cupi Tangli	灌阳 Guanyang	4
		75	广西梨 Guangxili	未知 Unknown	4
		76	灌阳雪 Guangyangxue	灌阳 Guanyang	5
		77	横县蜜 (绿) Hengxianmi(lü)	横县 Hengxian	2
	广东 Guangdong	78	高要青梨 Gaoyao Qingli	高要 Gaoyao	2
		79	高要黄梨 Gaoyao Huangli	高要 Gaoyao	2
		80	惠阳酸梨 Huiyang Suanli	惠阳 Huiyang	2
		81	惠阳青梨 Huiyang Qingli	惠阳 Huiyang	2
		82	封开惠州梨 Fengkai Huizhouli	封开 Fengkai	2
		83	夜深梨 Yeshenli	封开 Fengkai	2
		84	禾花梨 Hehuali	封开 Fengkai	2
		85	尖叶梨 Jianyeli	高要 Gaoyao	2
		86	细花红梨 Xihua Hongli	惠阳 Huiyang	11
		87	惠阳红梨 Huiyang Hongli	惠阳 Huiyang	11
江西 Jiangxi	江西 Jiangxi	88	洞冠 Dongguan	砚山 Yanshan	4
		89	蒲梨消 Pulixiao	南昌 Nanchang	5
		90	蒲梨 Puli	上饶 Shangrao	5
		91	鸡子消 Jizixiao	上饶 Shangrao	5
		92	细花平头青 Xihua Pingtouqing	上饶 Shangrao	5
		93	粗皮西降坞 Cupi Xijiangwu	婺源 Wuyuan	5
		94	细皮西降坞 Xipi Xijiangwu	婺源 Wuyuan	5
		95	婺源白梨 Wuyuan Baili	婺源 Wuyuan	5
		96	黄皮宵 Huangpixiao	南昌 Nanchang	4
		97	平顶青 Pingdingqing	上饶 Shangrao	5
		98	魁星麻壳 Kuixing Make	上饶 Shangrao	5
		99	荷花 Hehua	上饶 Shangrao	5
		100	细花麻壳 Xihua Make	上饶 Shangrao	5
		101	江湾白梨 Jiangwan Baili	婺源 Wuyuan	5
		102	粗皮酥 Cupisu	婺源 Wuyuan	5
		103	江湾糖梨 Jiangwan Tangli	婺源 Wuyuan	5
		104	大叶雪 Dayexue	婺源 Wuyuan	5

续表 1					
种类 Species	来源 Origin	编号 Code	种质名称 Accession name	地点 Location	单倍型 Haplotype
白梨（中国南方） <i>Pyrus bretschneideri</i> （South China）	云南 Yunnan	105	巴克斯 Bakesi	丽江 Lijiang	2
		106	花红 Huahong	未知 Unknown	2
		107	秋白（砂）Qiubai (sha)	未知 Unknown	5
		108	红火把 Honghuoba	未知 Unknown	4
		109	野生砂梨 Yesheng Shali	未知 Unknown	2
		110	宝珠梨 Baozhuli	呈贡 Chenggong	4
		111	富源黄 Fuyuanhuang	富源 Fuyuan	4
		112	水汁梨 Shuizhili	鹤庆 Heqing	2
		113	细把清水 Xiba Qingshui	瑞宁 Ruining	4
		114	火把 Huoba	瑞宁 Ruining	4
		115	黄皮水芽变 Huangpi Shuiyabian	昆明 Kunming	4
		116	昆明麻 Kunming Ma	昆明 Kunming	5
		117	海东 Haidong	丽江 Lijiang	2
		118	牛头 Niutou	丽江 Lijiang	2
		119	甩梨 Shuaili	临沧 Lincang	4
		120	蜜香 Mixiang	陆良 Luliang	4
		121	甜酸 Tiansuan	陆良 Luliang	4
		122	巍山红雪梨 Weishan Hongxueli	未知 Unknown	4
		123	云汁梨 Yunzhili	大理 Dali	2
	四川 Sichuan	124	大麻梨 Damali	苍溪 Cangxi	4
		125	香麻 Xiangma	未知 Unknown	4
		126	德昌蜂蜜 Dechang Fengmi	德昌 Dechang	2
		127	长把酥 Changbasu	会理 Huili	2
		128	桑皮梨 Sangpili	简阳 Jianyang	4
		129	红苕棒 Hongtiaobang	简阳 Jianyang	4
		130	木瓜 Mugua	简阳 Jianyang	2
		131	红香 Hongxiang	金川 Jinchuan	4
		132	陈家大麻 Chenjia Dama	金川 Jinchuan	4
		133	黄皮 Huangpi	泸定 Luding	5
		134	西昌后山梨 Xichang Houshanli	西昌 Xichang	4
		135	盐源油芝麻 Yanyuan Youzhima	西昌 Xichang	2
		136	硬雪 Yingxue	西昌 Xichang	4
		137	红皮酥 Hongpisu	会理 Huili	4
		138	黄鸡腿 Huangjitui	成都 Chengdu	4
	四川 Sichuan	139	馨香 Xinxiang	金川 Jinchuan	2
		140	金川雪 Jinchuanxue	金川 Jinchuan	4
		141	早荏 Zaochi	西昌 Xichang	4
		142	龙灯早 Longdengzao	金川 Jinchuan	4
		143	崇化大梨 Chonghua Dali	金川 Jinchuan	2
		144	金花 Jinhua	金川 Jinchuan	4
		145	汉源白 Hanyuanbai	汉源 Hanyuan	4
		146	懋功 Maogong	小金 Xiaojin	4
		147	早梨 Zaoli	大金 Dajin	4
		148	青皮蜂蜜 Qingpi Fengmi	泸定 Luding	5
		149	安宁早 Anningzao	金川 Jinchuan	4
		150	石门水冬瓜 Shimen Shuidonggua	金川 Jinchuan	5
		151	红皮鸡蛋 Hongpi Jidan	金川 Jinchuan	5
		152	八月雪 Bayuexue	未知 Unknown	5
川梨 <i>Pyrus pashia</i>	江西 Jiangxi	153	金沙乌 Jinshawu	昆明 Kunming	4
	云南 Yunnan	154	维西大果川梨 <i>P. pashia</i> ‘Weixi Daguo Chuanli’	未知 Unknown	7
		155	乌梨 Wuli	未知 Unknown	2
滇梨 <i>Pyrus pseudopashia</i>	云南 Yunnan	156	滇梨 1 <i>P. pseudopashia</i> ‘Dianli 1’	未知 Unknown	8
未知 Unkown	四川 Sichuan	157	藏梨 3 号 Zangli 3	甘孜 Ganzi	2
		158	藏梨 4 号 Zangli 4	甘孜 Ganzi	2
		159	德荣棠梨 Derong Tangli	甘孜 Ganzi	3
		160	德荣豆梨 Derong Douli	甘孜 Ganzi	2
麻梨 <i>Pyrus serrulata</i>	湖北 Hubei	161	麻梨 1 号 <i>P. serrulata</i> ‘Mali 1’	神农架 Shennongjia	2

续表 1					
种类	来源	编号	种质名称	地点	单倍型
Species	Origin	Code	Accession name	Location	Haplotype
豆梨 <i>Pyrus calleryana</i>	湖北 Hubei	162	豆梨 <i>P. calleryana</i> ‘Douli’	荆门 Jinmen	9
白梨（中国北方）	河北 Hebei	163	白瓢 Baipiao	昌黎 Changli	5
<i>Pyrus bretschneideri</i> （North China）	山东 Shandong	164	白枝母秧 Baizhi Muyang	兴隆 Xinglong	5
		165	佛见喜 Fojianxi	遵化 Zunhua	5
		166	胎黄 Taihuang	交河 Jiaohe	5
		167	象牙 Xiangya	定县 Dingxian	5
		168	雪花 Xuehua	定县 Dingxian	5
		169	鸭梨 Yali	未知 Unknown	5
		170	红枝母秧 Hongzhi Muyang	兴隆 Xinglong	5
		171	鸡蛋罐 Jidanguan	青龙 Qinglong	2
		172	博山池 Boshanchi	博山 Boshan	2
		173	济南小白 Jinan Xiaobai	长清 Changqing	5
		174	济南小黄梨 Jinan Xiaohuangli	济南 Jinan	5
		175	栖霞大香水 Qixia Daxiangshui	栖霞 Qixia	5
		176	大凹凹 Da’aoao	青岛 Qingdao	2
		177	大核白 Dahebai	建昌 Jianchang	2
		178	鹅头梨 Etouli	建昌 Jianchang	2
		179	六瓣 Liuban	建昌 Jianchang	2
		180	洋红霄 Yanghongxiao	建昌 Jianchang	5
		181	油红霄 Youhongxiao	建昌 Jianchang	5
	安徽 Anhui	182	砀山酥梨 Dangshan Suli	砀山 Dangshan	5
西洋梨（对照） <i>Pyrus communis</i> （Control）	山西 Shanxi	183	金梨 Jinli	万荣 Wanrong	5
	河南 Henan	184	夏梨 Xiali	原平 Yuanping	4
		185	郑州鹅梨 Zhengzhou Eli	郑州 Zhengzhou	2
		186	红茄 Red Clapp’s Favorite		1
	美国 America	187	康佛伦斯 Conference		1
	英国 England	188	巴梨 Bartlett		1
	美国 America	189	国光 Ralls		14
	美国 America	190	元帅 Golden		15
	（Out group）				

1.2 叶绿体 DNA 非编码区和基因区域的测序

选取 6 对叶绿体通用引物（表 2），扩增程序参照 Chang 等（2017）的方法，将 PCR 产物进行正反双向测序，由美吉生物（北京）有限公司完成，对有差异的样品进行重复测序，避免错配引起的碱基突变。

表 2 引物序列信息
Table 2 Primers information

基因区域	正向序列（5′ - 3′）	反向序列（5′ - 3′）	参考文献
Gene region	Forward sequence	Reverse sequence	Reference
<i>trnL-trnF</i> -1	CGAAATCGGTAGACGCTACG	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet et al., 1991
<i>trnL-trnF</i> -2	GGTTCAAGTCCTCTATCCC	ATTTGAAGTGGTGACACGAG	Taberlet et al., 1991
<i>trnS-psbC</i>	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC	GGTCGTGACCAAGAAACCAC	Parducci & Szimidt, 1999
<i>rbcL</i>	TGTCACCAAAAACAGAGACT	TTCCATACTTCACAAGCAGC	Parani et al., 2000
<i>accD-psaI</i>	TTATTCGATCCAATCGTACCAC	AGAAGCCATTGCAATTGCCGAAA	Liu et al., 2012
<i>rps16-trnQ</i>	ACCACATCGTTTCAAACGAAG	GCTATTCCGAGGTTTCAATCC	Katayama et al., 2012

1.3 数据分析

利用软件 MEGA 5.0（Tamura et al., 2011）对测序结果进行序列比对和人工校正，将数据保存成 FAS 格式用于下一步的分析；利用软件 DnaSP 5.1（Librado & Rozas, 2009）计算叶绿体 DNA

序列的变化参数：样品的单倍型个数 (haplotype, H)、单倍型多样性 (haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, P_i) 等。利用软件 NetWork ver4.6 (Bandelt et al., 1999), TCS ver1.21 (Clement et al., 2000) 分析单倍型的进化关系, 不同大小的缺失位点处理为单一碱基突变 (胡春云 等, 2011)。利用软件 MEGA 5.0 构建群体的 Neighbor-joining 进化树, 依此划分不同群体组合, 并利用 Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) 计算群体组合的标准分子变异分析 (standard AMOVA analysis)。

2 结果与分析

2.1 叶绿体 DNA 扩增区域序列分析

将序列进行比对和人工对齐, 6 对引物在 188 份梨资源的扩增片段分别是 *trnL-trnF*-517、*trnL-trnF*-423、*trnS-psbC*-1532、*rbcL*-1286、*accD-psaI*-993 和 *rps16-trnQ*-861。将扩增得到的片段合并在一起, 长度为 5 612 bp, 在 188 份梨资源中得到 34 个突变, 包括 4 个单一突变位点, 16 个简约性信息位点, 14 个插入/缺失 (InDels); 检测到 13 个叶绿体单倍型, 单倍型多样性 (H_d) 为 0.7178 (表 3)。作为外类群的 2 份苹果资源的单倍型是 H14 和 H15; 对照 3 份西洋梨的单倍型为 H1, 23 份北方白梨的叶绿体单倍型为 H2、H4 和 H5。138 份砂梨地方品种共检测出 8 个叶绿体单倍型, 其中单倍型 H2、H4 和 H5 在 130 份砂梨和 37 份白梨品种中检测到, 单倍型 H6、H10、H11、H12 和 H13 在 8 份砂梨地方品种 (‘青皮钟’、‘甜宵梨’、‘细花红梨’、‘惠阳红梨’、‘麝香梨’、‘塘湖青’、‘红粉’和‘横县浸泡梨’) 中检测到。不同叶绿体 DNA 区域 H_d 从 *rbcL*-1286 的 0.0317 到 *accD-psaI*-993 的 0.7177 不等。核苷酸多态性 P_i 的最高值出现在叶绿体的 *trnL-trnF*-423 序列, 为 1.82×10^{-3} , 最低在 *rps16-trnQ*-861 序列, 为 0.011×10^{-3} 。*accD-psaI*-993 序列的单倍型数最多, 为 11 个, 最少的是 *trnL-trnF*-517 和 *rbcL*-1286 序列, 为 2 个。整合片段的 Tajima’s D 值在 $P > 0.10$ 时表现不显著, 不能排除中性零假说, 则认为不同叶绿体 DNA 区域 *trnL-trnF*-517、*trnL-trnF*-423、*trnS-psbC*-1532、*rbcL*-1286、*accD-psaI*-993 和 *rps16-trnQ*-861 的序列片段组合遵循中性进化模型。

表 3 6 个叶绿体 DNA 区域的多态性信息
Table 3 The polymorphic information of 6 cpDNA gene regions

基因区域 Gene region	单一突变位点 Singleton variable site	简约性信息位点 Parsimony informative site	插入/ 缺失 InDels	单倍型 H	单倍型多 样性 H_d	核苷酸多 样性 $P_i (\times 10^{-3})$	平均核苷 酸差异 K	Tajima’s D value
<i>trnL-trnF</i> -517	0	3	0	2	0.0410	0.18	0.095	- 1.32028
<i>trnL-trnF</i> -423	1	4	2	6	0.6070	1.82	0.753	- 0.24293
<i>trnS-psbC</i> -1532	1	2	0	4	0.4702	0.32	0.484	- 0.10133
<i>rbcL</i> -1286	0	5	0	2	0.0317	0.12	0.159	- 1.57903
<i>accD-psaI</i> -993	1	2	9	11	0.7177	0.71	0.481	- 0.11321
<i>rps16-trnQ</i> -861	1	0	3	4	0.5145	0.02	0.011	- 0.95924
合并 Combined	4	16	14	13	0.7178	0.35	1.808	- 1.28083

2.2 梨叶绿体单倍型的地理分布和多态性分析

根据起源地的不同将秦岭淮河以南 162 份梨资源划分为 10 个组, 分别为云南 YN、四川 SC (包括重庆 3 份资源)、贵州 GZ、浙江 ZJ、福建 FJ、广东 GD、广西 GX、江西 JX、湖北 HB 和湖南

HN.162 份梨资源的叶绿体多样性 H_d 值为 0.713, P_i 为 0.29×10^{-3} , 含有 12 个叶绿体单倍型 H2 ~ H13, 数量分别是 43、1、59、48、1、1、1、1、1、4、1 和 1 个。单倍型 H2、H4 和 H5 为常见单倍型, 在地理位置上分布广泛, 单倍型 H4 在秦岭淮河以南地区均有分布; 单倍型 H2 在除贵州、江西的 8 个地区有分布; 单倍型 H5 在除贵州、广东的 8 个地区有分布。仅在云南地区出现的单倍型为 H7 和 H8; 仅四川地区出现的单倍型为 H3; 仅福建地区出现的单倍型为 H6; 仅广西地区出现的单倍型为 H13; 仅湖北地区出现的单倍型为 H9; 仅湖南出现的单倍型为 H10 和 H12。单倍型数在秦岭淮河以南 10 个地区的排列为, $HN > YN > SC = FJ = GX = HB > ZJ = GD > JX > GZ$; 不同地区的遗传多样性显著不同, 单倍型多样性 H_d 在 0 (GZ) 到 0.889 (HN) 之间, 核苷酸多样性 P_i 在 0 (GZ) 到 0.37×10^{-3} (HB) 之间 (表 4)。

表 4 10 个群体的 cpDNA 单倍型分布和相关多样性指数
Table 4 Chloroplast DNA haplotypes distribution and the related statistics of diversity in the 10 populations

来源代号 Location code	样本数 Number of individuals	单倍型个数 Number of haplotype														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
YN	23		8		11	2		1	1							
SC	35		10	1	20	4										
GZ	8				8											
ZJ	15		1		3	11										
FJ	12		2		3	6	1									
GD	11		8		1							2				
GX	13		6		5	1								1		
JX	17				1	16										
HB	18		6		4	7				1						
HN	10		2		3	1					1	2	1			
合并 Combined	162	0	43	1	59	48	1	1	1	1	1	4	1	1	0	0

来源代号 Location code	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 $P_i (\times 10^{-3})$	平均核苷酸差异 K
YN	0.668	0.29	1.557
SC	0.595	0.29	1.503
GZ	0	0	0
ZJ	0.448	0.19	1.029
FJ	0.712	0.25	1.303
GD	0.473	0.15	0.800
GX	0.679	0.30	1.564
JX	0.209	0.07	0.353
HB	0.725	0.37	1.935
HN	0.889	0.28	1.467
合并 Combined	0.713	0.29	1.517

注: YN 为云南, SC 为四川和重庆, GZ 为贵州, ZJ 为浙江, FJ 为福建, GD 为广东, GX 为广西, JX 为江西, HB 为湖北, HN 为湖南。
Note: YN: Yunnan, SC: Sichuan and Chongqing, GZ: Guizhou, ZJ: Zhejiang, FJ: Fujian, GD: Guangdong, GX: Guangxi, JX: Jiangxi, HB: Hubei, HN: Hunan.

2.3 群体遗传变异分析

计算分布在秦岭淮河以南的 10 个梨地方群体的遗传距离, 构建 Neighbor-joining 聚类树。湖北地区与其他地区群体遗传距离较远, 江西、浙江和广东地区群体遗传距离较近, 四川、贵州和云南地区群体遗传距离较近。通过比较群体间的遗传距离, 在聚类树上将 10 个群体划分为 3 个群体组合 (图 1), Group I 由湖北 (HB) 1 个群体构成, Group II 由浙江 (ZJ)、江西 (JX) 和广东 (GD) 3 个群体构成, Group III 由四川 (SC)、贵州 (GZ)、云南 (YN)、湖南 (HN)、广西 (GX) 和福建

(FJ) 6 个群体构成。分子变异分析 (AMOVA) 显示遗传变异主要存在于群体内部, 占总变异的 74.66%, 其次是群体组合占总变异的 20.45%, 群体组合内部的群体之间的变异最小, 为 4.89%。

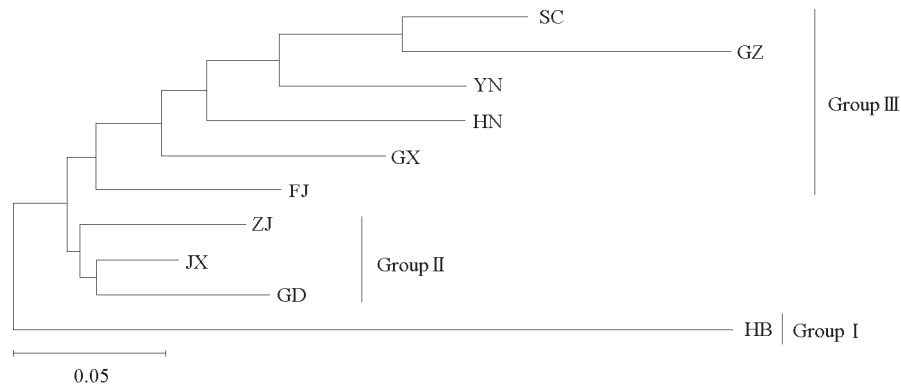


图 1 基于群体遗传距离构建的 NJ 树

YN: 云南; SC: 四川和重庆; GZ: 贵州; ZJ: 浙江; FJ: 福建; GD: 广东; GX: 广西; JX: 江西; HB: 湖北; HN: 湖南。

Fig. 1 NJ tree based on population genetic distance

YN: Yunnan; SC: Sichuan and Chongqing; GZ: Guizhou; ZJ: Zhejiang; FJ: Fujian; GD: Guangdong; GX: Guangxi; JX: Jiangxi; HB: Hubei; HN: Hunan.

2.4 叶绿体单倍型系统进化分析

以苹果的两个单倍型 H14、H15 作为外类群, 构建梨单倍型的 Median-joining Network 图(图 2), 显示单倍型 H6 和 H11 为古老单倍型, H1、H4 和 H5 为较进化的单倍型(单倍型 H6 和 H11 位于躯

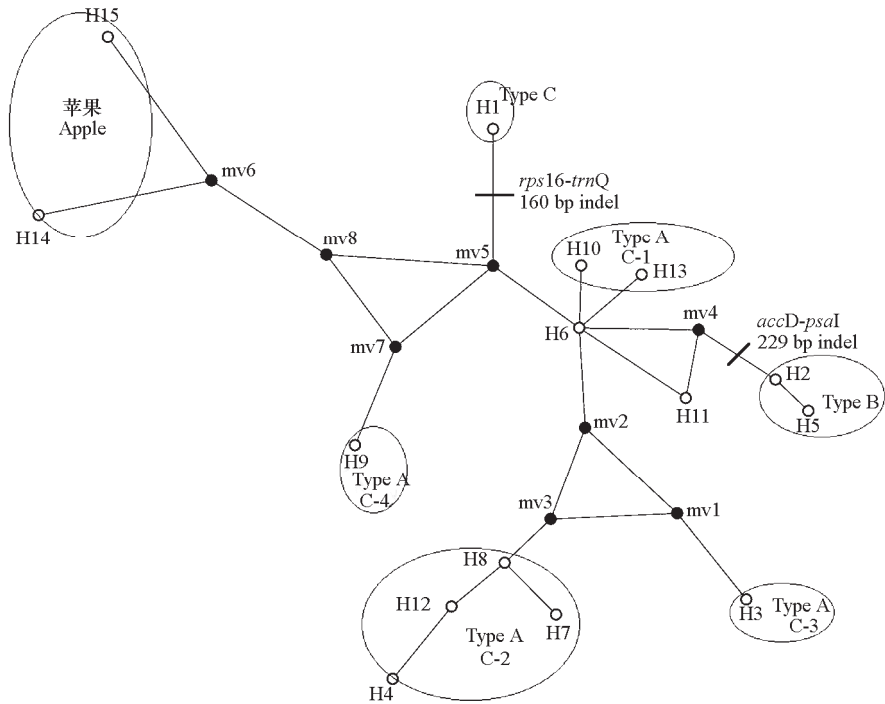


图 2 15 个叶绿体单倍型的 Median-joining Network 图

Fig. 2 Median-joining Network of 15 haplotypes

干位置上, 两者在序列上表现为一个碱基的变异, 其他单倍型以不同数量的碱基差异和插入/缺失片段由此延伸出去, 矢量载体 mv 代表可能出现的原始单倍型)。梨属种质的单倍型 (除原始单倍型) 均能分成如下 3 种类型: 没有大片段缺失的 Type A, 在 *accD-psaI* 中长度为 229 bp 大片段缺失的 Type B 以及在 *rps16-trnQ* 中长度为 160 bp 大片段缺失的 Type C。Type A 包含 8 个单倍型, 可分为 4 个组 C-1 ~ C-4, C-1 组的单倍型 H10 和 H13 由 H6 派生出来; C-2 组的单倍型 H8、H7、H12 和 H4 由变量 mv2、mv3 延伸出来; C-3 组的单倍型 H3 由 mv2、mv1 延伸出来; C-4 组的单倍型 H9 由 mv5、mv7 延伸出来。Type B 包含 2 个单倍型 H2 和 H5, 在 *accD-psaI* 中长度为 229 bp 大片段缺失。Type C 包含 1 个单倍型 H1, 在 *rps16-trnQ* 中长度为 160 bp 大片段缺失。

利用软件 TCS ver1.21 基于 Parsimony 算法构建 13 个梨单倍型的 TCS 网络图 (图 3), 呈现梨单倍型 H1 ~ H13 的序列变异和梨属种类构成, 单倍型的进化关系同 Median-joining Network 图一致。单倍型 H6 位于中心位置, 其他单倍型与 H6 的序列差异见图 3。单倍型 H2 在 5 个梨属种的 43 份资源中检测出, 包含 36 份砂梨资源、2 份白梨资源、1 份川梨资源、1 份麻梨资源和 3 份未知 (藏梨) 资源; 单倍型 H4 由 3 个梨属种类的 59 份资源组成, 包含 50 份砂梨栽培品种, 8 份白梨资源, 1 份川梨资源; H5 在 2 个梨属种的 48 份资源检测出, 包含 44 个砂梨栽培品种和 4 个白梨栽培品种; 单倍型 H1 仅在 3 个西洋梨品种中检测出, 单倍型 H3、H7、H8 和 H9 在野生资源中检测出, 单倍型 H6、H10、H11、H12 和 H13 在砂梨地方品种在检测出。

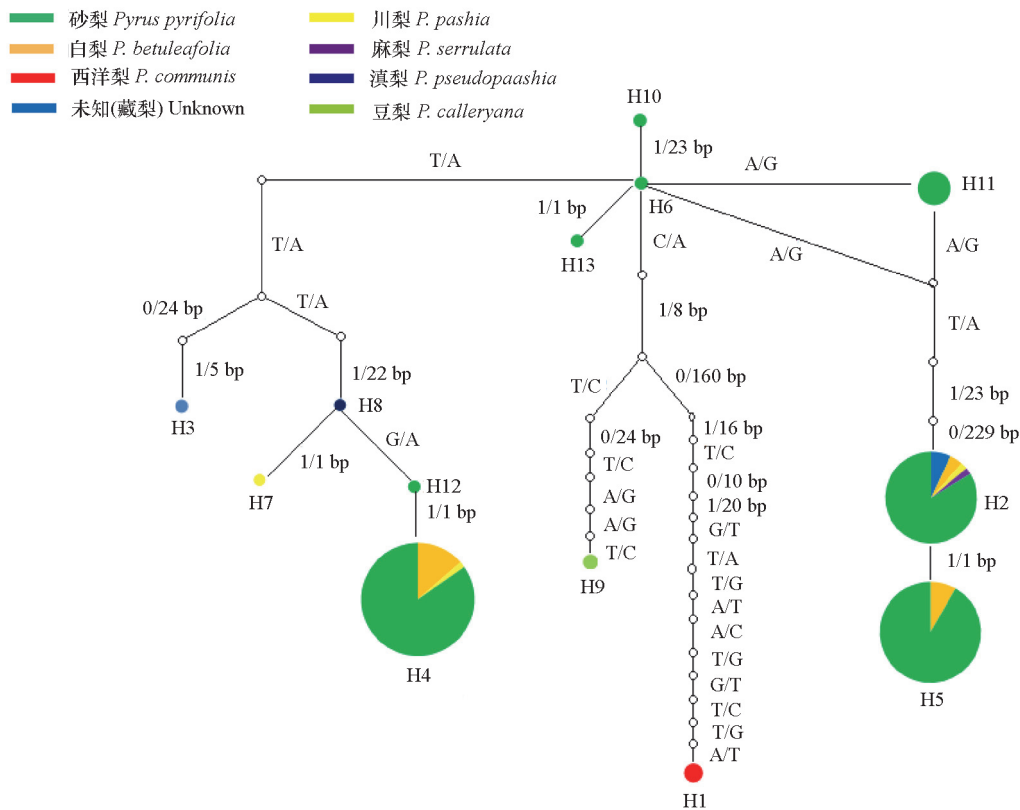


图 3 梨 13 个叶绿体单倍型的 TCS Network 图

0 和 1 分别表示 InDels 缺失和插入变异, “/” 之后的数字表示插入或缺失变异长度。

Fig. 3 TCS Network based on 13 haplotypes

0 and 1 in the alignment indicate deletion and insertion for certain InDels, respectively. The number after “/” represents the length of InDels.

3 讨论

叶绿体基因间隔区 *accD-psaI* 出现 9 个插入/缺失片段, 其中最长的缺失片段为 229 bp, 出现在单倍型 H2 和 H5 上, 这两种单倍型大部分为地方品种; *rps16-trnQ* 区域 160 bp 的大片段缺失出现在西洋梨品种的单倍型 H1 上。如叶绿体 Median-joining Network 图所示, 利用这两个区域的大片段缺失, 可将本研究的 162 份南方梨资源划分为 Type A、Type B 和 Type C, Type A 和 Type B 由秦岭淮河以南的梨种质组成, 两者亲缘关系近; Type C 由西洋梨品种组成。这与 Katayama 等 (2012) 利用叶绿体高变区 *accD-psaI* 和 *rps16-trnQ* 的大片段缺失对试验材料分类的结果相似。在前人的研究中浙江省野生豆梨群体的单倍型多样性 H_d 为 0.719 (Liu et al., 2012), 中国北方杜梨实生群体的单倍型多样性 H_d 为 0.807 (Zong et al., 2014), 云南川梨野生群体的单倍型多样性 H_d 为 0.718 (Liu et al., 2013), 中国北方 132 份栽培和野生梨属种质的单倍型多样性 H_d 为 0.7960 (Chang et al., 2017), 辽宁省地方梨种质的单倍型多样性 H_d 为 0.557 (常耀军 等, 2014), 本研究中梨资源的单倍型多样性 H_d 为 0.7178, 比较发现呈现较高单倍型多样性的研究均使用相同的叶绿体高变区 *accD-psaI* 区域, 而没有应用该区域研究的 H_d 值较低 (常耀军 等, 2014), 可见叶绿体 DNA 基因间隔区 *accD-psaI* 区域变异丰富可适用于梨属种间、种内的亲缘关系研究。

川梨起源于喜马拉雅山区, 其表型性状介于东方梨和西方梨之间, 通常被认为是连接东方梨和西方梨的纽带 (Rubtsov, 1944)。本研究的 3 份川梨资源乌梨 (H2)、金沙乌 (H4) 和维西大果川梨 (H7) 检测到 3 种单倍型, 种内遗传多样性高, 其中单倍型 H2 和 H4 是梨地方品种的主要单倍型, 推测川梨可能参与了梨地方品种的起源, 这与 Zheng 等 (2014) 的研究结果一致。作为对照的 3 个西洋梨品种检测到独有的叶绿体单倍型 H1, TCS Network 图显示其与其他单倍型差异显著, 推测东西方梨是独立分化的, 这与 Ferradini 等 (2017) 利用 *accD-psaI* 区域对西方梨起源的研究结果一致。

资源考察时收集于甘孜藏族自治州的 4 份野生资源 (编号 ‘藏梨 3 号’、‘藏梨 4 号’、‘德荣豆梨’和 ‘德荣棠梨’) 分类地位未知, 检测出两个叶绿体单倍型, 即 ‘藏梨 3 号’、‘藏梨 4 号’和 ‘德荣豆梨’的单倍型 H2, 和仅出现在 ‘德荣棠梨’的单倍型 H3。单倍型 H2 是常见单倍型, 包含砂梨、白梨、麻梨、川梨和未知分类的藏梨共 5 个不同的梨属种类; 单倍型 H3 在 TCS Network 图中与 ‘滇梨 1’的单倍型 H8 亲缘关系较近。目前关于藏梨资源的研究较少, 仅见 Xue 等 (2017) 利用 SSR 分子标记对藏梨资源进行的研究报道, 显示其与云、贵、川 3 省的砂梨地方品种亲缘关系较近。藏梨资源分类地位的明确需要更多的西南地区梨野生资源, 同时结合表型数据。

Teng 等 (2002) 利用 RAPD 标记研究东亚地区梨栽培品种的亲缘关系, 发现砂梨系统和白梨系统的亲缘关系近, 其他分子标记方法 AFLP (Bao et al., 2008)、SSR (Bao et al., 2007; Tian et al., 2012) 也得出同样结论。Liu 等 (2015) 基于全基因组 SSR 分子标记对收集的梨资源的遗传多样性和群体结构分析, 推测砂梨和白梨来自于同一个祖先。滕元文 (2017) 建议使用 *Pyrus pyrifolia* White Pear Group 作为白梨系统的新名称。本研究中的 130 份砂梨地方品种和 37 份白梨地方品种共享 3 个单倍型 H2、H4 和 H5, 从叶绿体 DNA 母系遗传的特征可以推断出秦岭淮河以南地区的地方砂梨和白梨品种亲缘关系较近, 但单倍型 H2 和 H4 还包含其他梨属种类, 不能确定秦岭淮河以南地区的砂梨和白梨起源于同一母系祖先。

8 份砂梨品种显示出稀有叶绿体单倍型 H6、H10、H11、H12 和 H13, 同其他地方品种相比, 显示出独特的母系遗传背景。这些呈现稀有单倍型的梨地方品种往往具有特异性状, 如 ‘麝香梨’

果实香气浓郁似麝香, ‘青皮钟’果实耐储运, ‘甜宵梨’果实成熟早(蒲富慎和王宇霖, 1963)等。随着梨新品种的出现和推广, 许多栽培历史悠久的梨地方品种被取代, 加强梨地方品种的收集保护、特异性状的挖掘尤为重要。本研究中同时发现湖南地区的砂梨地方品种遗传多样性丰富, 可为资源考察和地方品种收集提供一定的依据。

References

- Bandelt H J, Forster P, Roehl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution*, 16: 37 – 48.
- Bao L, Chen K S, Zhang D, Cao Y F, Yamamoto T, Teng Y W. 2007. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 959 – 971.
- Bao L, Chen K S, Zhang D, Li X G, Teng Y W. 2008. An assessment of genetic variability and relationships within Asian pears based on AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. *Scientia Horticulturae*, 116 (4): 374 – 380.
- Cao Y F, Tian L M, Gao Y, Liu F. 2012. Genetic diversity of cultivated and wild Ussurian pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in China evaluated with M13-tailed SSR markers. *Genetic Resources & Crop Evolution*, 59 (1): 9 – 17.
- Cao Y F, Tian L M, Gao Y, Yang J, Zhang S L. 2011. Evaluation of genetic identity and variation in cultivars of *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai from China using microsatellite markers. *Journal of Pomology & Horticultural Science*, 86 (4): 331 – 336.
- Chang Y J, Cao Y F, Zhang J M, Tian L M, Dong X G, Zhang Y, Qi D, Zhang X S. 2017. Study on chloroplast DNA diversity of cultivated and wild pears (*Pyrus* L.) in Northern China. *Tree Genetics & Genomes*, 13 (2): 44.
- Chang Yao-jun, Cao Yu-fen, Zhang Jin-mei, Tian Lu-ming, Dong Xing-guang, Zhang Ying, Qi Dan, Zheng Ying-chun. 2014. Studies on genetic diversity of pear germplasm resources in Liaoning Province of China based on chloroplast DNA analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (7): 1307 – 1316. (in Chinese)
- 常耀军, 曹玉芬, 张金梅, 田路明, 董星光, 张 莹, 齐 丹, 郑迎春. 2014. 基于叶绿体 DNA 分析的辽宁省梨属种质遗传多样性研究. *园艺学报*, 41 (7): 1307 – 1316.
- Clement M, Posada D, Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657 – 1659.
- Excoffier L, Lischer H E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 10: 564 – 567.
- Ferradini N, Lancioni H, Torricelli R, Russi L, Ragione I D, Cardinali I, Marconi G, Gramaccia M, Concezzi L, Achilli A, Veronesi F, Albertini E. 2017. Characterization and phylogenetic analysis of ancient Italian landraces of pear. *Frontiers in Plant Science*, 8: 751.
- Hu Chun-yun, Zheng Xiao-yan, Teng Yuan-wen. 2011. Characterization and phylogenetic utility of non-coding chloroplast regions *trnL-trnF* and *accD-psaI* in *Pyrus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2261 – 2272. (in Chinese)
- 胡春云, 郑小艳, 滕元文. 2011. 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. *园艺学报*, 38 (12): 2261 – 2272.
- Jiang S, Zheng X Y, Yu P Y, Yue X Y, Maqsood A, Cai D Y, Teng Y W. 2016. Primitive genepools of Asian pears and their complex hybrid origins inferred from fluorescent sequence-specific amplification polymorphism (SSAP) markers based on LTR Retrotransposons. *PLoS ONE*, 11 (2): e0149192.
- Jiang S, Zong Y, Yue X Y, Joseph P, Teng Y W, Cai D Y. 2015. Prediction of retrotransposons and assessment of genetic variability based on developed retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) markers in *Pyrus* L. *Molecular Genetics & Genomics*, 290 (1): 225 – 237.
- Katayama H, Tachibana M, Iketani H, Zhang S L, Uematsu C. 2012. Phylogenetic utility of structural alterations found in the chloroplast genome of pear: hypervariable regions in a highly conserved genome. *Tree Genetics & Genomes*, 8 (2): 313 – 326.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451 – 1452.
- Liu J, Sun P, Zheng X Y, Potter D, Li K M, Hu C Y, Teng Y W. 2013. Genetic structure and phylogeography of *Pyrus pashia* (Rosaceae) in Yunnan Province, China, revealed by chloroplast DNA analyses. *Tree Genetics & Genomes*, 9: 433 – 441.
- Liu J, Zheng X Y, Potter D, Hu C Y, Teng Y W. 2012. Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang

- Province, China. Biochemical Systematics and Ecology, 45: 69 – 78.
- Liu Q W, Song Y, Liu L, Zhang M Y, Sun J M, Zhang S L, Wu J. 2015. Genetic diversity and population structure of pear (*Pyrus* spp.) collections revealed by a set of core genome-wide SSR markers. Tree Genetics & Genomes, 11 (6): 1 – 22.
- Palmer J D, Jansen R K, Michaels H J, Chase M W, Manhart J R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden, 75 (4): 1180 – 1206.
- Parani M, Lakshmi M, Ziegenhagen B, Fladung M, Senthilkumar P, Parida A. 2000. Molecular phylogeny of mangroves VII PCR-RFLP of *trnS-psbC* and *rbcL* gene regions in 24 mangrove and mangrove-associate species. Theoretical and Applied Genetics, 100: 454 – 460.
- Parducci L, Szmidt A. 1999. PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies*. Theor Appl Genet, 98: 802 – 808.
- Pu Fu-shen, Wang Yu-lin. 1963. Pomology of China. Pears, Vol 3. Shanghai: Shanghai Sci Technol Press: 1 – 16. (in Chinese)
- 蒲富慎, 王宇霖. 1963. 中国果树志 · 梨. 上海: 上海科学技术出版社: 1 – 16.
- Roullier C, Duputié A, Wennekes P, Benoit L, Bringas V, Rossel G, Tay D, McKey D, Lebot V. 2013. Disentangling the origins of cultivated sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. PLoS ONE, 8 (5): e62707.
- Rubtsov G A. 1944. Geographical distribution of the genus and trends and factors in its evolution. Am Nat, 7: 358 – 366.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol, 17 (5): 1105 – 1109.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 665: 2731 – 2739.
- Teng Yuan-wen. 2017. Advances in the research on phylogeny of the genus *Pyrus* and the origin of pear cultivars native to East Asia. Journal of Fruit Science, 34 (3): 370 – 378. (in Chinese)
- 滕元文. 2017. 梨属植物系统发育及东方梨品种起源研究进展. 果树学报, 34 (3): 370 – 378.
- Teng Yuan-wen, Tanabe K, Tamura F, Itai A. 2002. Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127 (2): 262 – 270.
- Tian L M, Gao Y, Cao Y F, Dong X G. 2012. Identification of Chinese white pear cultivars using SSR markers. Genetic Resources & Crop Evolution, 59 (3): 317 – 326.
- Wuyun T, Ma T, Uematsu C, Katayama H. 2013. A phylogenetic network of wild Ussurian pears (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in China revealed by hypervariable regions of chloroplast DNA. Tree Genetics & Genomes, 9: 167 – 177.
- Xue L, Liu Q W, Qin M F, Zhang M Y, Wu X, Wu J. 2017. Genetic variation and population structure of “Zangli” pear landraces in Tibet revealed by SSR markers. Tree Genetics & Genomes, 13 (1): 26.
- Yu P Y, Jiang S, Wang X X, Bai S L, Teng Y W. 2016. Retrotransposon-based sequence-specific amplification polymorphism markers reveal that cultivated *Pyrus ussuriensis* originated from an interspecific hybridization. European Journal of Horticultural Science, 81 (5): 264 – 272.
- Yue Xiao-yan, Huang Xin-zhong, Zong Yu, Teng Yuan-wen. 2015. Genetic diversity of cultivated pears from Fujian Province revealed by cpDNA haplotypes and nuclear microsatellites. Acta Horticulturae Sinica, 42 (1): 119 – 130. (in Chinese)
- 岳晓燕, 黄新忠, 宗宇, 滕元文. 2015. 福建省梨地方品种的遗传多样性研究. 园艺学报, 42 (1): 119 – 130.
- Zhang Jing-guo, Cao Yu-fen, Chen Qi-liang, Yang Xiao-ping, Fan Jing, Tian Rui, Hu Hong-ju. 2016. Genetic diversity and phylogenetics of pear (*Pyrus* L.) germplasm resources from Hubei Province revealed by chloroplast DNA variation. Journal of Plant Genetic Resources, 17 (4): 766 – 772. (in Chinese)
- 张靖国, 曹玉芬, 陈启亮, 杨晓平, 范净, 田瑞, 胡红菊. 2016. 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, 17 (4): 766 – 772.
- Zheng X Y, Cai D Y, Potter D, Postman J, Liu J, Teng Y W. 2014. Phylogeny and evolutionary histories of *Pyrus* L. revealed by phylogenetic trees and networks based on data from multiple DNA sequences. Molecular Phylogenetics & Evolution, 80: 54 – 65.
- Zong Y, Sun P, Liu J, Yue X Y, Niu Q F, Teng Y W. 2014. Chloroplast DNA-based genetic diversity and phylogeography of *Pyrus betulaefolia* (Rosaceae) in Northern China. Tree Genetics & Genomes, 10: 739 – 749.