

中国山荆子和楸子种质资源遗传多样性和遗传结构的荧光 SSR 分析

高 源, 王 昆*, 王大江, 刘立军, 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: 采用荧光 SSR 分子标记对来源于中国 9 个省的苹果属山荆子 8 个种群和楸子 9 个种群共 288 份种质的遗传多样性和种群遗传结构进行了研究。结果显示: 19 对 SSR 引物对 288 份种质共扩增出 416 个多态性等位基因, 平均每个位点等位基因 21.895 个, 多态性位点百分率 (PPB) 为 100%。山荆子和楸子共计 17 个种群总体的遗传多样性较高, 有效等位基因数 (N_e) 为 9.284, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.862, Shannon's 多样性指数 (I) 为 2.432; 种群水平上, 楸子的遗传多样性水平 ($H_e = 0.870$, $I = 2.412$, $N_e = 9.019$) 高于山荆子 ($H_e = 0.848$, $I = 2.350$, $N_e = 8.652$)。分子方差分析 (AMOVA) 表明, 遗传变异主要来自种群内 (95%)。种群间的遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.278, 基因流 (N_m) 为 5.031, 表明楸子和山荆子均为异交的混交类群, 各个种群在过去的某个时间都可能相互发生过基因交流, 抵制了由于基因漂变而导致的种群间遗传分化。通过 NJ 聚类和 Structure 分组划分类群, 种群间遗传距离和类群归属与地理位置不完全相关。

关键词: 山荆子; 楸子; 荧光 SSR; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 07-1225-13

Genetic Diversity and Genetic Structure of *Malus baccata* and *Malus prunifolia* from China as Revealed by Fluorescent SSR Markers

GAO Yuan, WANG Kun*, WANG Dajiang, LIU Lijun, LI Lianwen, and PIAO Jicheng

(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, China)

Abstract: This study used fluorescent SSR molecular marker to analyze the genetic diversity and genetic structure of 17 populations of *Malus baccata* and *Malus prunifolia* from nine provinces. The results showed that 416 polymorphic alleles were amplified by 19 SSR primers, the percentage of polymorphic bands was 100%. The genetic diversity of overall 17 populations was high ($N_e = 9.284$, $H_e = 0.862$, $I = 2.432$), while at population level the genetic diversity of *Malus prunifolia* ($H_e = 0.870$, $I = 2.412$, $N_e = 9.019$) was higher than that of *Malus baccata* ($H_e = 0.848$, $I = 2.350$, $N_e = 8.652$). The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed the genetic differentiation mainly within populations (95%).

收稿日期: 2019-05-20; **修回日期:** 2019-06-10

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-RIP-02); 农业部农作物种质资源保护项目 (NB2015-2130135-39); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303093)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangkun5488@163.com)

The genetic differentiation coefficient (F_{st}) among populations was 0.278, and gene flow (N_m) was 5.031. These results indicated that *Malus baccata* and *Malus prunifolia* were all hybrid groups by outcrossing, and there might have been genetic communication among groups at some time in the past, but at the same time they had resisted genetic differentiation among groups due to gene drift. Neighbour-Joining clustering and Structure grouping were used to classify populations, and the genetic distance between every two populations and group affiliation were not completely related to geographical location.

Keywords: *Malus baccata*; *Malus prunifolia*; fluorescent SSR; genetic diversity; genetic structure

苹果是中国栽培面积和产量最大的树种,但是品种结构不够合理(翟衡 等,2007;宋哲 等,2016),缺乏具有国际市场竞争力的自主培育品种(谢云,2009;束怀瑞,2012),缺乏与现代化集约栽培相适应的优良砧木,如矮砧和抗性砧木等(刘凤之 等,2006)。优新品种是苹果产业自主创新的核心之一(翟衡 等,2005),而扩展亲本遗传背景是育种取得有效突破的重要因素,重点在于野生和地方特优种质资源的创新与利用(王力荣,2012),充分挖掘利用中国原产的砧木资源,扩大基因来源,对于选育适应中国生态条件的苹果砧木意义重大(郝玉金和沙广利,2018)。

山荆子(*Malus baccata*)和楸子(*Malus prunifolia*)均属蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus*)。山荆子是苹果属植物中分布最广、变异较为多样的类群(杜学梅 等,2017),在从塞威士苹果向栽培苹果的驯化过程中参与杂交或基因渗入作用(Duan et al., 2017),是苹果属植物中较多地被用作砧木的珍贵野生资源。楸子是中国苹果属植物栽培种之一,作为栽培种的楸子在各地栽培历史悠久(钱关泽,2005),人为分布极广,但已无成园栽培(李育农,2001),现在更多地被用作观赏树木、园林绿化和砧木。

以往对山荆子和楸子的遗传多样性研究较少。前人对山荆子的地理分布研究(王雷宏 等,2008,2011;杜学梅 等,2017),基于其形态变异的居群遗传多样性研究(Robinson et al., 2001;王雷宏和汤庚国,2007;王雷宏 等,2008;杨锋 等,2015;Dadwal et al., 2018;Kumar et al., 2018),利用RAPD(陈曦 等,2008)、ISSR(王雷宏 等,2010)和SSR(王雷宏 等,2012)分子标记对少数居群的遗传多样性研究等涉及的样本有一定地域局限性。对楸子的研究主要集中在利用形态学 and 同工酶等方法研究其分类归属(Williams, 1982;肖尊安 等,1989;李育农和李晓林,1995);以及其作为砧木利用的优异性状评价和抗性基因的挖掘等方面(钱关泽,2005;王顺才,2011;王顺才 等,2011;傅明洋,2013;秦源 等,2014;高帆 等,2016;Tan et al., 2017;Huang et al., 2018;李海燕 等,2018),尚未开展过遗传多样性的SSR分子标记研究。

本研究中利用荧光SSR分子标记,对广泛来源的234份山荆子和54份楸子种质资源进行了遗传多样性和遗传结构分析,利于充分了解中国苹果属野生种和栽培种的遗传信息,研究种间亲缘关系,为其有效保存和生产利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试种质资源288份,包含234份山荆子和54份楸子,其中19份山荆子和5份楸子取自国家果树种质公主岭寒地果树圃(吉林省公主岭),其余种质均取自国家果树种质兴城梨、苹果圃(辽宁兴城),为近10年间野外考察收集入圃,均在野外通过表型鉴定为山荆子和楸子本种,楸子的地方

类型归并到楸子中。供试材料来自于 9 个省，将来自同一省的同种种质作为 1 个种群，其中山荆子 8 个种群，楸子 9 个种群（表 1）。2016 年春季采集幼叶立即放入装有干燥变色硅胶的自封塑料袋中干燥备用。2017 年在农业部园艺作物种质资源利用重点实验室完成试验。

表 1 来自 9 个省的山荆子和楸子种质资源信息
Table 1 The information of *Malus baccata* and *Malus prunifolia* from nine provinces

来源地编号 Origin code	来源地 Origin	山荆子 <i>Malus baccata</i>			楸子 <i>Malus prunifolia</i>		
		种群代码 Population code	种质编号 Accession code	种质数量 No. of accessions	种群代码 Population code	种质编号 Accession code	种质数量 No. of accessions
1	新疆 Xinjiang	—	—	0	XJQ	286 ~ 288	3
2	甘肃 Gansu	GSS	1 ~ 4	4	GSQ	235 ~ 238	4
3	陕西 Shaanxi	SXXS	234	1	SXXQ	285	1
4	山西 Shanxi	SXS	219 ~ 233	15	SXQ	276 ~ 284	9
5	内蒙古 Inner Mongolia	NMGS	175 ~ 218	44	NMGQ	275	1
6	河北 Hebei	HBS	5 ~ 62	58	HBQ	239 ~ 259	21
7	辽宁 Liaoning	LNS	174	1	LNQ	270 ~ 274	5
8	吉林 Jilin	JLS	155 ~ 173	19	JLQ	265 ~ 269	5
9	黑龙江 Heilongjiang	HLJS	63 ~ 154	92	HLJQ	260 ~ 264	5
总数 Total				234			54

1.2 DNA 提取及 PCR 体系

采用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取供试材料的基因组 DNA。从 Hokanson 等（1998）、Liebhard 等（2002）、Yamamoto 等（2002）和 Guilford 等（1997）报道的序列中选取扩增产物片段长度在 100 ~ 300 bp，经检测具有高度多态性的 19 对 SSR 引物（表 2）。其中，NH009b、NH015a 和 NZ28f4 为梨 SSR 引物，其余 16 对为苹果 SSR 引物。SSR 反向引物和 5'端带有 6FAMTM 荧光标记 SSR 正向引物由上海生工合成。

表 2 SSR 引物及优化条件
Table 2 SSR primers and optimum conditions in this study

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5' - 3') Forward primer sequence	反向引物序列 (5' - 3') Reverse primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
GD 12	TTGAGGTGTTTCTCCCATTGGA	CTAACGAAGCCGCCATTCTTT	58
GD 15	CGAAAGTGAGCAACGAACTCC	ACTCCATCATCGGGTGGTG	59
GD 96	CGGCGGAAAGCAATCACCT	GCCAGCCCTCTATGGTTCCAGA	51
GD 100	ACAGCAAGGTGTTGGGTAAGAAGGT	TGCGGACAAAGGAAAAAAAAAAGTG	60
GD 142	GGCACCCAAGCCCCCTAA	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	56
GD 162	GAGGCAAGTGACAAAGAAAGATG	AAAATGTAACAACCCGTCCAAGTG	58
CH01h01	GAAAGACTTGCACTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	56
CH01f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTTTTCTCCAGC	58
CH02d08	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	55
CH01d08	CTCCGCCGCTATAACACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	60
CH01f07a	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTTGAGCGTAGGAAC	58
COLa	AGGAGAAAGGCGTTTACCTG	GACTCATTCTTCGTCGTCAGT	59
CH05e03	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG	CAAGTTGTTGTACTGCTCCGAC	60
CH02d12	AACCAGATTGCTTGCCATC	GCTGGTGGTAAACGTGGTG	60
CH02b10	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	56
CH01d09	GCCATCTGAACAGAAATGTGC	CCCTTCATTACATTTCAG	56
NH009b	CCGAGCACTACCATTGA	CGTCTGTTTACCGCTTCT	58
NH015a	TTGTGCCCTTTTCTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG	59
NZ28f4	TGCCTCCCTTATATAGCTAC	TGAGGACGGTGAGATTG	57

PCR 体系参照 Cao 等 (2011) 的方法, 扩增产物的纯化体系参照高源等 (2010) 的方法。PCR 反应在 Bio-Rad PTC-200 上进行。PCR 扩增并经过纯化后的 SSR 荧光标记产物在美国 ABI 3730 基因测序仪上进行荧光检测, 收集原始数据。

1.3 数据统计与分析

利用 GeneMapper3.0 软件对 ABI3730 收集数据进行分析, 获得不同样品在每个 SSR 位点的扩增片段长度。利用遗传数据分析软件 GenAlEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2006, 2012) 计算多态性等位基因数 (N_a)、SSR 位点的有效等位基因数 (N_e)、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、固定指数 (F) 及香农多样性指数 (I) 等遗传多样性指标, 并分析种群间的分子变异 (AMOVA)。利用 GenepopV4 (Rousset et al., 2008) 和 Fstat293 (Goudet et al., 1995) 计算种群间的遗传分化系数 F_{st} 和基因流 N_m 。利用 POPULATION 1.2 构建 288 份山荆子和楸子 17 个种群基于 Nei's 遗传距离 DA (Nei et al., 1983) 的 Neighbour-Joining (NJ) 进化树, 并用在线绘图软件 iTOL (Letunic et al., 2016) 绘制。

分析种群的遗传结构使用 STRUCTURE 2.3.4 进行贝叶斯聚类 (Falush et al., 2003) 并确定最佳的类群分组。设定等位变异频率特征数 (遗传群体数) $K = 1 \sim 15$, Burn-in 周期为 100 000, MCMC 的重复次数为 100 000 次, 采用混合模型和相关等位基因频率, 对不同的 K 值进行 10 次重复运行, 然后将后缀为“_f”的结果文件压缩, 上传到“STRUCTURE HARVESTER”网站 (http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/), 根据 Evanno 等 (2005) 的方法计算得到 ΔK 和似然值的对数函数 $\ln p(D)$, 分别针对基因库数 (K) 建模, 确定最佳 K 值。利用 CLUMPP 1.1.2 软件 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) 处理 10 次独立运行得到的分配系数 Q 值 (即每 1 个类群内每个个体之间的估测系数), 然后使用 DISTRUCT 1.1 软件 (Rosenberg et al., 2004) 将计算结果进行图形化输出。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物扩增的多态性

利用 19 对 SSR 引物对 288 份山荆子和楸子材料的基因组 DNA 共扩增出 416 个多态性等位基因 (N_a), 每个位点为 13 (GD15) ~ 34 (CH01d08), 平均等位基因数为 21.895 (表 3); 多态性位点百分率 (PPB) 为 100%, 每份样品在每个位点产生 2 个相同 (单峰) 或不同 (双峰) 的等位基因。有效等位基因数 (N_e) 为 2.556 (NZ28f4) ~ 16.806 (CH01d08), 平均值为 9.284。观察杂合度 (H_o) 为 0.476 ~ 0.851, 平均值为 0.635。期望杂合度 (H_e) 为 0.609 ~ 0.940, 平均值为 0.862。香农多样性指数 (I) 为 1.429 ~ 3.084, 平均值为 2.432。而固定指数 (F) 为 0.008 ~ 0.459, 平均值为 0.260, 全部为正值, 说明供试山荆子和楸子种群内杂合子较少。

2.2 不同山荆子和楸子种群的遗传多样性

统计供试种质的有效等位基因数 (N_e)、Shannon's 指数 (I) 和期望杂合度 (H_e), 234 份山荆子分别为 8.652、2.350 和 0.848, 54 份楸子分别为 9.019、2.412 和 0.870 (表 4)。按照来源地和所属种划分所有材料为 17 个种群 (表 1), 黑龙江山荆子的等位基因数最多为 15.684; 河北山荆子的有效等位基因数最多为 8.218, 香农指数最高为 2.278; 辽宁山荆子、内蒙古楸子、陕西山荆子和陕西楸子的等位基因数、有效等位基因数和香农指数均较小, 该 4 个种群的种质数量均为 1 份; 陕西楸

子的观察杂合度 (0.842) 最高, 甘肃楸子 (0.763) 次之; 河北山荆子期望杂合度 (0.852) 最高。所有种群固定指数 (F) 的变化范围为 $-1.000 \sim 0.289$, 甘肃楸子、黑龙江楸子、辽宁山荆子、内蒙古楸子、陕西山荆子、陕西楸子、新疆楸子固定指数 (F) 为负值, 相比于其他固定指数为正值的种群含杂合子较多。

表 3 288 份山荆子和楸子在 19 个 SSR 位点的多态性
Table 3 The genetic diversity of 288 accessions of *Malus baccata* and *Malus prunifolia* at 19 SSR loci

位点 Locus	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	香农指数 I	固定指数 F
GD12	24	7.840	0.552	0.872	2.451	0.367
GD15	13	3.533	0.517	0.717	1.614	0.278
GD96	26	12.933	0.698	0.923	2.776	0.244
GD100	20	12.812	0.646	0.922	2.675	0.299
GD142	24	9.081	0.514	0.890	2.545	0.423
GD162	24	11.726	0.740	0.915	2.711	0.191
CH01h01	21	11.053	0.590	0.910	2.633	0.351
CH01f02	21	9.397	0.569	0.894	2.538	0.363
CH02d08	20	6.248	0.771	0.840	2.229	0.082
CH01d08	34	16.806	0.688	0.940	3.084	0.269
CH01f07a	21	15.085	0.851	0.934	2.860	0.089
COLa	21	11.801	0.722	0.915	2.675	0.211
CH05e03	24	8.322	0.476	0.880	2.440	0.459
CH02d12	23	10.426	0.688	0.904	2.617	0.240
CH02b10	21	3.942	0.545	0.746	1.877	0.270
CH01d09	22	5.192	0.517	0.807	2.236	0.359
NH009b	23	11.400	0.642	0.912	2.650	0.296
NH015a	19	6.237	0.726	0.840	2.160	0.136
NZ28f4	15	2.556	0.604	0.609	1.429	0.008
平均值 Mean	21.895	9.284	0.635	0.862	2.432	0.260

表 4 山荆子和楸子整体和各种群的遗传多样性
Table 4 The genetic diversity among different populations of *Malus baccata* and *Malus prunifolia*

种 Species	种群代码 Population code	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	香农指数 I	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	固定指数 F
山荆子 <i>Malus baccata</i>		19.947	8.652	2.350	0.612	0.848	0.275
	GSS	4.684	4.054	1.406	0.513	0.714	0.289
	HBS	15.474	8.218	2.278	0.601	0.852	0.286
	HLJS	15.684	7.198	2.153	0.624	0.823	0.241
	JLS	9.579	5.985	1.869	0.626	0.779	0.174
	LNS	1.632	1.632	0.438	0.632	0.316	-1.000
	NMGS	11.737	6.495	1.918	0.602	0.760	0.187
	SXS	10.053	6.877	2.007	0.625	0.820	0.230
	SXXS	1.579	1.579	0.401	0.579	0.289	-1.000
		17.421	9.019	2.412	0.732	0.870	0.153
楸子 <i>Malus prunifolia</i>	GSQ	4.842	4.080	1.424	0.763	0.714	-0.065
	HBQ	11.053	6.308	2.002	0.722	0.806	0.090
	HLJQ	4.632	3.662	1.356	0.747	0.695	-0.065
	JLQ	5.842	4.649	1.574	0.705	0.743	0.057
	LNQ	5.684	4.362	1.561	0.716	0.748	0.044
	NMGQ	1.737	1.737	0.511	0.737	0.368	-1.000
	SXQ	9.158	6.845	2.029	0.737	0.843	0.128
	SXXQ	1.842	1.842	0.584	0.842	0.421	-1.000
	XJQ	4.211	3.765	1.333	0.754	0.702	-0.097

注: 种群代码同表 1。
Note: The population code is the same as table 1.

2.3 种群遗传分化

在按照来源地和所属种划分的 17 个种群中，除仅有 1 份材料的辽宁山荆子、内蒙古楸子、陕西山荆子和陕西楸子以外，其余 13 个种群间基因分化系数平均值 F_{st} 为 0.278，基因流 N_m 为 5.031。AMOVA 分析结果（表 5）显示，种群间的遗传变异仅占总变异的 5%，种群内 95%，其中种群内个体间占 22%，个体内占 73%。13 个种群的种群间、种群内和个体内均存在显著的遗传变异($P < 0.001$)，且遗传变异主要分布在种群内和个体内。

表 5 中国山荆子和楸子 13 个种群的分子变异方差分析 (AMOVA)					
Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among 13 populations of <i>Malus baccata</i> and <i>Malus prunifolia</i> in China					
变异来源 Source of variance	自由度 df	平方和 SS	均方差 MSE	方差分量 Variance component	方差分量百分率/% Total variance
种群间 Among populations	12	297.919	24.827	0.392	5
种群内 (个体间) Among individuals	271	2 639.105	9.738	1.860	22
个体内 Within individuals	284	1 709.500	6.019	6.019	73
总体 Total	567	4 646.525		8.270	100

2.4 种群遗传结构

17 个种群的 Nei's 遗传距离介于 0.179 (HBS 和 HBQ) 到 2.218 (NMGQ 和 SXXQ) 之间，Nei's 遗传一致度介于 0.109 (NMGQ 和 SXXQ) 到 0.836 (HBS 和 HBQ) 之间。

进一步分析种群间的遗传关系（图 1），可将 17 个自然种群基于 Nei's 遗传距离进行 NJ 聚类，结果归为 3 类：其中甘肃楸子（GSQ）、陕西楸子（SXXQ）、辽宁山荆子（LNS）、辽宁楸子（LNQ）、新疆楸子（XJQ）归为一类，甘肃山荆子（GSS）、黑龙江楸子（HLJQ）、内蒙古楸子（NMGQ）、陕西山荆子（SXXS）归为一类，内蒙古山荆子（NMGS）、黑龙江山荆子（HLGS）、吉林山荆子（JLS）、河北山荆子（HBS）、河北楸子（HBQ）、吉林楸子（JLQ）、山西山荆子（SXS）、山西楸子（SXQ）归为一类。

用 Structure 进行种群遗传结构相关性分析，设置分析种群数 K 为 1 ~ 15，重复 10 次。根据 Evanno 等（2005）的方法，用最大似然值 ΔK 来确定 K 值。本研究中当 $K = 3$ 时， ΔK 取得最大值，推断来自 9 省份 17 个种群的供试材料分为 3 个类群（图 2），与 NJ 聚类结果相似：新疆楸子、甘肃山荆子和楸子、陕西山荆子和楸子、山西山荆子和楸子、部分河北山荆子、辽宁山荆子、黑龙江楸子和部分山荆子来自同一类群（绿色）；内蒙古山荆子和楸子、少数河北山荆子、大部分吉林山荆子和黑龙江山荆子来自同一类群（红色）；部分河北山荆子、少数吉林山荆子和楸子来自同一类群（蓝色）。

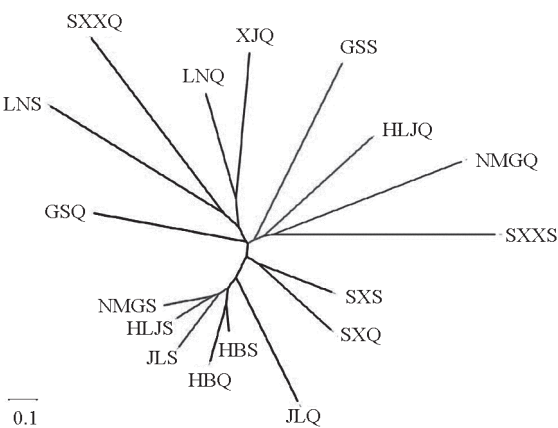


图 1 基于 Nei's 遗传距离的 17 个山荆子和楸子种群的 NJ 聚类图

Fig. 1 The Neighbor-Joining Cluster of 17 populations of *Malus baccata* and *Malus prunifolia* based on Nei's of SSR data

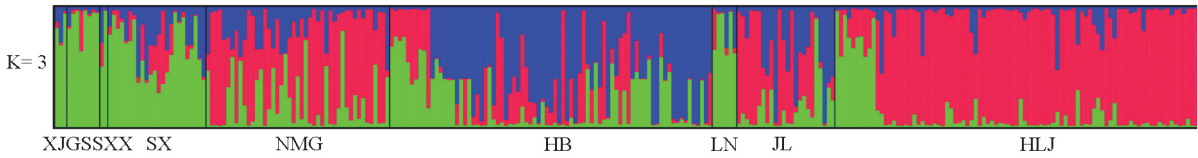


图 2 中国山荆子和楸子来源于 9 省 17 个种群的遗传结构分析图 (K = 3)

Fig. 2 Analysis on genetic structure of 17 populations of *Malus baccata* and *Malus prunifolia* from 9 provinces (K = 3)

同时, 进行种群遗传结构的独立性分析, 当 $K = 6$ 时, ΔK 有明显的升高, 推断供试材料基因来源有新的类群的加入, 9 个居群 17 个种群分类归属更加细化 (图 3)。

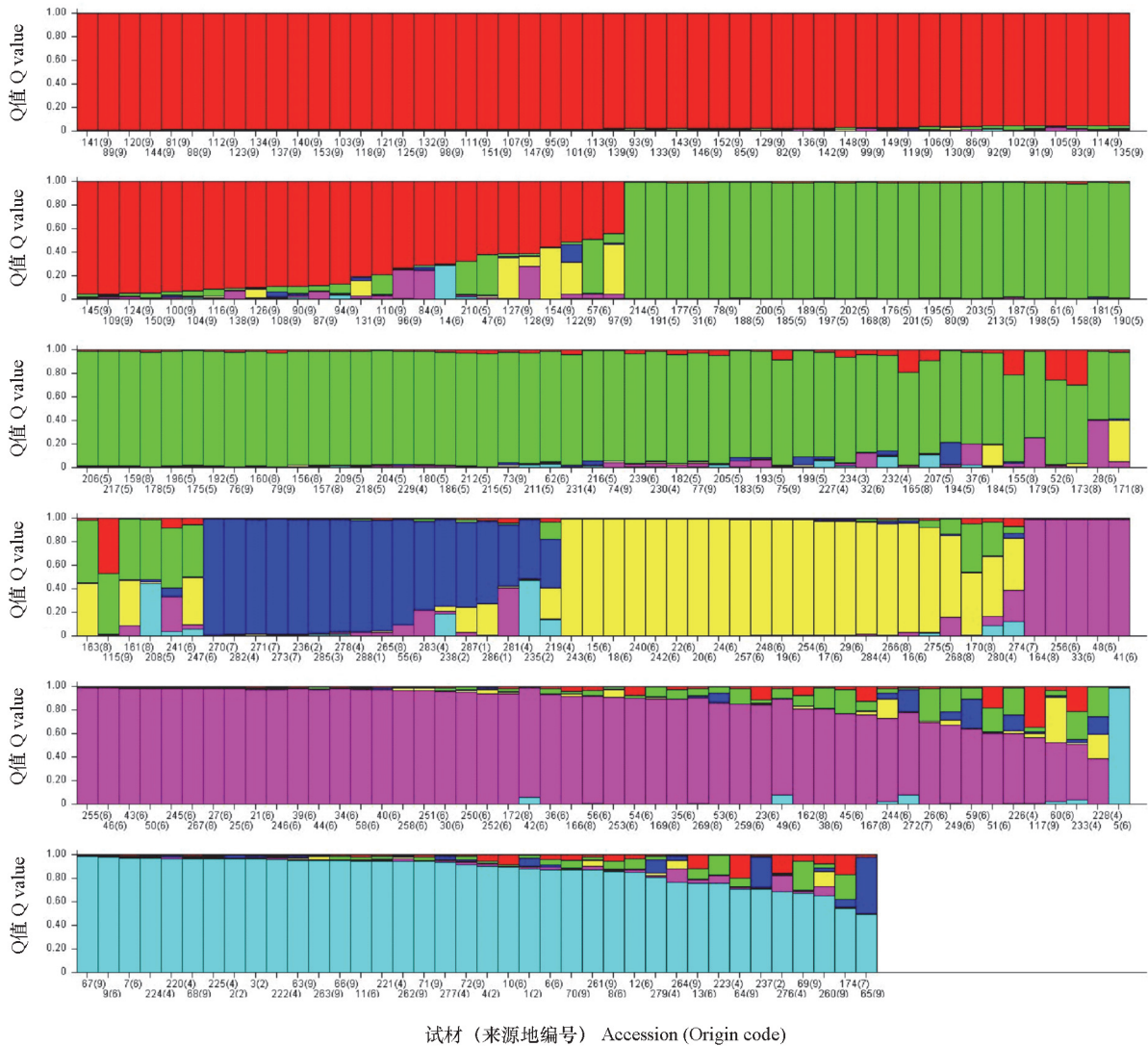


图 3 288 份山荆子和楸子种质资源的遗传结构分析图 (K = 6)

Fig. 3 Analysis on genetic structure of 288 *Malus baccata* and *Malus prunifolia* (K = 6)

1 份内蒙古山荆子和大部分黑龙江山荆子归为一类(红色); 陕西山荆子、内蒙古山荆子、部分山西和黑龙江山荆子、少数河北山荆子、多数吉林山荆子归为一类(绿色); 新疆楸子、甘肃楸子、陕西楸子、山西楸子、辽宁楸子以及 1 份吉林楸子归为一类(蓝色); 甘肃山荆子以及部分山西、河北和黑龙江山荆子归为一类(黄色); 大部分河北山荆子和楸子、少数吉林山荆子和楸子归为一类(紫红色); 1 份山西楸子、1 份内蒙古楸子、2 份吉林楸子、部分河北山荆子和楸子归为一类(湖蓝色)。

3 讨论

3.1 中国苹果属山荆子和楸子的遗传多样性

平均有效等位基因数(N_e)、平均 Shannon's 指数(I)、平均期望杂合度(H_e)等是评价遗传多样性的重要指标。根据已经获得的遗传多样性评价的重要指标, 本研究中山荆子和楸子总体遗传多样性较高($H_e = 0.862$, $I = 2.432$, $N_e = 9.284$), 其中楸子的遗传多样性($H_e = 0.870$, $I = 2.412$, $N_e = 9.019$)高于山荆子的遗传多样性($H_e = 0.848$, $I = 2.350$, $N_e = 8.652$), 同时高于以往研究的三叶海棠(*Malus sieboldii*, $H_e = 0.699$, $I = 1.458$, $N_e = 3.954$; Liu et al., 2012)、山荆子(*Malus baccata*, $H_e = 0.3386$, $I = 0.4961$, $N_e = 1.6021$; 陈曦等, 2008)、湖北海棠(*Malus hupehensis*, $H_e = 0.2628$, $I = 0.4015$, $N_e = 1.4375$; 陈曦等, 2009)、变叶海棠(*Malus toringoides*, $H_e = 0.4389$, $I = 0.6282$, $N_e = 1.81$; 石胜友, 2005)和新疆野苹果(*Malus sieversii*, $H_e = 0.2619$, $I = 0.4082$, $N_e = 1.4252$; Zhang et al., 2007)。地理分布范围是决定物种遗传多样性的主要因素, 1 个物种的分布范围越广, 其遗传多样性水平越高(Karron, 1987)。山荆子是苹果属植物中分布最广, 变异更为多样的类群(杜学梅等, 2017)。而楸子属于苹果属植物栽培种, 已很少有野生群落, 但是人工散播区域极广(李育农, 2001)。供试的山荆子和楸子种质资源来源范围覆盖中国的东北、西北和华北 9 省区, 来源范围广, 跨度大, 这可能是本研究中山荆子和楸子的遗传多样性均较高的原因之一。因此, 近些年对山荆子和楸子种质资源的收集非常有效, 国家果树种质兴城梨、苹果圃中苹果属植物种质资源的遗传多样性水平明显提高。

杂合度观测值和杂合度期望值的相近程度也可以衡量种群的遗传多样性, 值越接近, 种群遗传多样性越高(汤存伟等, 2011)。山荆子期望杂合度与观察杂合度差值大于楸子, 再次体现供试楸子的遗传多样性高于山荆子。因此在未来要进一步加大楸子种质资源的考察收集力度, 进一步丰富楸子种质资源的遗传多样性。按照来源省和物种将供试山荆子和楸子划分为 17 个种群, 除去只有 1 份种质的内蒙古楸子和陕西楸子种群外, 辽宁楸子、吉林楸子、甘肃楸子、黑龙江楸子、新疆楸子、河北楸子和山西楸子的遗传多样性水平均高于同省收集的山荆子的遗传多样性水平; 各省收集的山荆子种群相比较, 以吉林种群遗传多样性水平为最高, 其次是内蒙古、山西和黑龙江种群。种群间的遗传多样性比较可以指导苹果属植物种质资源的收集。按照本研究中各地区山荆子和楸子种质资源遗传多样性水平的高低, 确定辽宁、吉林、甘肃和黑龙江为楸子的优先收集区域, 吉林、内蒙古、山西和黑龙江为山荆子的重点收集区域。

3.2 山荆子和楸子种群的遗传结构

按照种质来源地和物种划分种群, 除仅有 1 份材料的 4 个种群外, 13 个种群间遗传分化系数为 0.278, 略高于双子叶植物基因分化系数的平均值 0.273(蔡宇良, 2006)。分子遗传变异分析表明, 山荆子和楸子种群的遗传变异主要存在于种群内(95%)的个体间(22%)和个体内(73%)。遗传

分化是反映遗传结构的重要指标(陈娇 等, 2013; 高天翔 等, 2016), 而基因流(N_m)是影响遗传分化的重要因素, 一般认为 $N_m \geq 1$, 阻止遗传漂变产生遗传分化; $N_m < 1$, 居群间基因交流较少, 遗传漂变是遗传分化的主要因素(Wright, 1931)。本研究中楸子和山荆子的 N_m 为 5.031, 种群内变异占总变异的 95%, 表明楸子和山荆子均为异交的混交类群, 各个种群在过去的某个时间相互都可能曾发生过基因交流, 但同时这又抵制了由于基因漂变而导致的种群间遗传分化。

黑龙江、吉林、内蒙古和山西山荆子类群归属相对单一, 收集种质多来源于深山中人类活动影响较小的野生群落。河北山荆子和楸子聚类比较紧密, 相互交错。通过 NJ 聚类 and Structure 分组分类群, 种群间遗传距离和类群归属与地理位置不完全相关, 各种群间均有基因渗透。这主要有两方面的原因: 一方面, 植物种群遗传结构受交配方式影响(Silva et al., 2003), 山荆子和楸子均为异交种, 山荆子以种子传播为主, 种子量大, 寿命长, 有利于遗传变异在居群中的保存。而楸子属于人为分布, 推测其在人为扩散过程中极易发生属内种间自然杂交, 导致种间的基因互渗。另一方面, 本研究中各种群大小不一致对种群遗传结构可能会有一定的影响, 研究居群的大小及其有效居群的代表性, 会影响对居群遗传结构的评价(Estoup & Anges, 1998)。因此, 随着苹果属植物种质资源的考察收集工作的逐步开展, 不同地理居群、不同种群种质资源数量的增加将是对其遗传结构评价的进一步补充。

通过近些年的野外实地考察发现, 山荆子仍然为苹果属植物中分布范围最广的种, 在各调查区域均有发现(王大江 等, 2017), 而楸子除被用作砧木和园林绿化外, 能够收集到的资源却越来越少。遗传多样性对种群和物种的长期生存和发展起着关键作用, 所以收集和保护工作应该以保持最大遗传变异基因库为目标(Zhou et al., 2010)。本研究中的山荆子和楸子种质资源的遗传多样性较高, 种群间遗传分化小于种群内。因此在苹果属山荆子和楸子的保护策略上, 应根据区域种质资源遗传多样性, 确定优先和重点考察收集区域, 进行针对性地收集和异地保存。在本研究中, 楸子种质资源的数量仅是山荆子数量的 1/4, 但其遗传多样性高于山荆子, 因此应加大楸子的考察力度, 加快保存数量较少的陕西楸子的收集; 另外黑龙江、吉林、内蒙古和山西山荆子体现出来的遗传多样性水平明显较高, 应作为山荆子考察收集重点。

References

- Cai Yu-liang. 2006. Genetic analysis of the wild cherry germplasm and identification of cultivated cherry varieties using DNA fingerprints [Ph. D. Dissertation]. Xi'an: Northwest University. (in Chinese)
- 蔡宇良. 2006. 野生樱桃种质资源的遗传分析及其栽培品种的 DNA 指纹鉴定 [博士学位论文]. 西安: 西北大学.
- Cao Y, Tian L, Gao Y, Yuan J, Zhang S. 2011. Evaluation of genetic identity and variation in cultivars of *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai from China using microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 86 (4): 331 - 336.
- 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 Xi. 2009. A study on variation patterns and genetic diversity of *Malus hupehensis* populations [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 陈 曦. 2009. 湖北海棠 (*Malus hupehensis*) 不同居群变异式样及遗传多样性的研究 [博士学位论文]. 南京: 南京林业大学.
- Chen Xi, Tang Geng-guo, Zheng Yu-hong, Wang Lei-hong. 2008. RAPD analysis of genetic diversity of *Malus baccata* (L.) Borkh. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*, 28 (10): 1954 - 1959. (in Chinese)

- 陈 曦, 汤庚国, 郑玉红, 王雷宏. 2008. 苹果属山荆子遗传多样性的 RAPD 分析. 西北植物学报, 28 (10): 1954 – 1959.
- Dadwal V, Agrawal H, Sonkhla K, Joshi R, Gupta M. 2018. Characterization of phenolics, amino acids, fatty acids and antioxidant activity in pulp and seeds of high altitude Himalayan crab apple fruits (*Malus baccata*). *Journal of Food Science and Technology*, 55 (6): 2160 – 2169.
- Du Xue-mei, Yang Ting-zhen, Gao Jing-dong, Wang Qian, Cai Hua-cheng, Li Chun-yan, Gong Gui-hua. 2017. Wild *Malus baccata* (L.) Borkh. in China: Natural distribution, utilization and study status. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 33 (5): 24 – 28. (in Chinese)
- 杜学梅, 杨廷桢, 高敬东, 王 骞, 蔡华成, 李春燕, 弓桂花. 2017. 中国野生山荆子的自然分布及利用研究现状. *中国农学通报*, 33 (5): 24 – 28.
- 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. 2017. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communication*, 8 (1): 249.
- Estoup A, Angès B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations//Carvalho G R. *Advances in molecular ecology*. Amsterdam: IOS Press: 55 – 86.
- Evanno G, Regnaut S, Gouset J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14 (8): 2611 – 2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard J K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567 – 1587.
- Fu Ming-yang. 2013. Drought and salinity tolerance evaluation and characterization of genetic difference among different biotypes of *Malus prunifolia* [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 傅明洋. 2013. 楸子不同类型抗旱耐盐性评价及遗传差异分析[博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Gao Fan, Liang Dong, Xia Hui, Tang Yue-ming, Xu Ying-huan, Hou Shuai. 2016. Analysis of cloning and expression of dehydrin gene in *Malus prunifolia*. *Genomics and Applied Biology*, 35 (2): 436 – 441. (in Chinese)
- 高 帆, 梁 东, 夏 惠, 唐月明, 徐颖欢, 侯 帅. 2016. 楸子脱水素基因的克隆及表达分析. *基因组学与应用生物学*, 35 (2): 436 – 441.
- 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.
- Gao Yuan, Wang Kun, Tian Lu-ming, Cao Yu-fen, Liu Feng-zhi. 2010. Identification of apple cultivars by TP-M13-SSR technique. *Journal of Fruit Science*, 27 (5): 833 – 837. (in Chinese)
- 高 源, 王 昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. 2010. 应用 TP-M13-SSR 技术鉴定苹果品种. *果树学报*, 27 (5): 833 – 837.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *The Journal of Heredity*, 86 (6): 485 – 486.
- Guiford P, Prakash H S, Zhu J M, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 249 – 254.
- Hao Yu-jin, Sha Guang-li. 2018. Progress in breeding of apple nutrition rootstock. *Deciduous Fruits*, 50 (1): 3 – 7. (in Chinese)
- 郝玉金, 沙广利. 2018. 苹果营养系砧木选育进展. *落叶果树*, 50 (1): 3 – 7.
- Hokanson S C, Szeewc-Mcfadden A K, Lamboy W F, Mcferson J R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 671 – 683.
- Huang L L, Li M J, Zhou K , Sun T T, Hu L Y, Li C Y, Ma F W. 2018. Uptake and metabolism of ammonium and nitrate in response to drought stress in *Malus prunifolia*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127: 185 – 193.
- Jakobsson M, Rosenberg N A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801 – 1806.
- Karron J D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and wide spread plant

- congeners. *Evolutionary Ecology*, 1 (1): 47 - 58.
- Kumar C, Singh S K, Pramanik K K, Verma M K, Srivastav M, Singh R, Bharadwaj C, Naga K C. 2018. Morphological and biochemical diversity among the *Malus* species including indigenous Himalayan wild apples. *Scientia Horticulturae*, 233: 204 - 219.
- Letunic I, Bork P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 8 (44): W242 - W245.
- Li Hai-yan, Geng Da-li, Niu Chun-dong, Li Cui-ying, Guan Qing-mei. 2018. Drought resistance of root system of apple rootstocks *Malus prunifolia* and G935. *Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed)*, 46 (5): 1 - 7. (in Chinese)
- 李海燕, 耿达立, 牛春东, 李翠英, 管清美. 2018. 苹果砧木富平楸子和 G935 根系抗旱性评估. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 46 (5): 1 - 7.
- Li Yu-nong. 2001. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 李育农. 2001. 苹果属植物种质资源研究. 北京: 中国农业出版社.
- Li Yu-nong, Li Xiao-lin. 1995. Research on peroxidase isozyme in *Malus* Mill. *Journal of Southwest Agricultural University*, 17 (5): 371 - 377. (in Chinese)
- 李育农, 李晓林. 1995. 苹果属植物过氧化物酶同工酶酶谱的研究. *西南农业大学学报*, 17 (5): 371 - 377.
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder C D, Tarchini R, Van De Weg E, Gessler C. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 10: 217 - 241.
- Liu Feng-zhi, Wang Kun, Cao Yu-fen, Gao Yuan, Gong Xin. 2006. Advances and prospect in researches on apple germplasm resources in China. *Journal of Fruit Science*, 23 (6): 865 - 870. (in Chinese)
- 刘凤之, 王 昆, 曹玉芬, 高 源, 龚 欣. 2006. 我国苹果种质资源研究现状与展望. *果树学报*, 23 (6): 865 - 870.
- Liu J, Zheng X Y, Daniel P, 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.
- Nei M, Tajima F, Tatenos Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153 - 170.
- Peakall R, Smouse P E. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288 - 295.
- Peakall R, Smouse P E. 2012. GenAlEx6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28: 2537 - 2539.
- Qian Guan-ze. 2005. The taxonomic study of the genus *Malus* Mill. [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 钱关泽. 2005. 苹果属 (*Malus* Mill.) 分类学研究 [博士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Qin Yuan. 2014. Researches on cloning, expression analysis and transformation of *MPSnRK2.4* gene [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 秦 源. 2014. 楸子 *SnRK2.4* 基因的克隆、表达和转化研究 [硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Robinson J P, Harris S A, Juniper B E. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematic and Evolution*, 226 (1/2): 35 - 58.
- Rosenberg N A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137 - 138.
- Rousset F. 2008. GENPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103 - 106.
- Shi Sheng-you. 2005. Studies on the origin and differentiation of genetic diversity in *Malus toringoides* [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 石胜友. 2005. 变叶海棠起源及其遗传多样性分化研究 [博士论文]. 重庆: 西南大学.
- Shu Huai-rui. 2012. Researches on sustainable development strategy of China's fruit industry. *Deciduous Fruits*, 44 (1): 1 - 4. (in Chinese)
- 束怀瑞. 2012. 中国果树产业可持续发展战略研究. *落叶果树*, 44 (1): 1 - 4.
- Silva M A, Eguiarte L E. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral

- characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany*, 90 (3): 377 - 387.
- Song Zhe, Wang Hong, Li Cheng-hui, Yu Nian-wen, Zhang Xiu-mei, Li Hong-jian. 2016. The main problems, development trends and solutions of the apple industry in China. *Jiangsu Agricultural Science*, 44 (9): 4 - 8. (in Chinese)
- 宋哲, 王宏, 里程辉, 于年文, 张秀美, 李宏建. 2016. 我国苹果产业存在的主要问题、发展趋势及解决办法. *江苏农业科学*, 44 (9): 4 - 8.
- Tan Y X, Li M J, Yang Y L, Sun X, Wang N, Liang B W, Ma F W. 2017. Overexpression of *MpCYS4*, a phytoalexin gene from *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. enhances stomatal closure to confer drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* and apple. *Frontiers in Plant Science*, 8: 33.
- Tang Cun-wei, Yu Xiong, Liu Wu-jun, Zhang Hao, Shi Liang, Xing Wei-ting, Cheng Li-ming, Huang Xi-xia, Ma Xiao-yan. 2011. Study on genetic diversity and genetic differentiation of 13 sheep populations in Xinjiang uygur autonomous region. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 32 (1): 13 - 19. (in Chinese)
- 汤存伟, 余雄, 刘武军, 张浩, 石亮, 邢巍婷, 程黎明, 黄锡霞, 马晓燕. 2011. 新疆 13 个绵羊群体遗传多样性及遗传分化的研究. *家畜生态学报*, 32 (1): 13 - 19.
- Wang Da-jiang, Wang Kun, Gao Yuan, Zhao Ji-rong, Liu Li-jun, Gong Xin, Li Lian-wen. 2017. Preliminary investigation of modern distribution of *Malus* resources in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 18 (6): 1116 - 1124. (in Chinese)
- 王大江, 王昆, 高源, 赵继荣, 刘立军, 龚欣, 李连文. 2017. 我国苹果属资源现代分布调查初报. *植物遗传资源学报*, 18 (6): 1116 - 1124.
- Wang Lei-hong, Tang Geng-guo. 2007. Phenotypic variations of exsiccate-specimen of *Malus baccata* (L.) Borkh. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*, 27 (8): 1690 - 1694. (in Chinese)
- 王雷宏, 汤庚国. 2007. 山荆子腊叶标本表型性状变异分析. *西北植物学报*, 27 (8): 1690 - 1694.
- Wang Lei-hong, Tang Geng-guo, Xia Hai-wu, Cai Hua. 2008. Study on leaf venation of *Malus baccata* (L.) Borkh. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 32 (2): 39 - 42. (in Chinese)
- 王雷宏, 汤庚国, 夏海武, 蔡华. 2008. 山荆子叶脉序的研究. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 32 (2): 39 - 42.
- Wang Lei-hong, Yang Jun-xian, Zheng Yu-hong, Tang Geng-guo. 2011. Simulation of the geographical distribution of the fruit of *Malus*. *Journal of Beijing Forestry University*, 33 (3): 70 - 73. (in Chinese)
- 王雷宏, 杨俊仙, 郑玉红, 汤庚国. 2011. 苹果属山荆子地理分布模拟. *北京林业大学学报*, 33 (3): 70 - 73.
- Wang Lei-hong, Zheng Yu-hong, Tang Geng-guo. 2010. ISSR analysis of genetic diversity of eight populations in *Malus baccata*. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*, 30 (7): 1337 - 1343. (in Chinese)
- 王雷宏, 郑玉红, 汤庚国. 2010. 8 个山荆子居群遗传多样性的 ISSR 分析. *西北植物学报*, 30 (7): 1337 - 1343.
- Wang Lei-hong, Zheng Yu-hong, Tang Geng-guo. 2012. Analyses of genetic diversity and genetic relationship of eight populations of *Malus baccata* based on SSR marker. *Journal of Plant Resources and Environment*, 21 (1): 42 - 46. (in Chinese)
- 王雷宏, 郑玉红, 汤庚国. 2012. 基于 SSR 标记的 8 个山荆子居群遗传多样性和遗传关系分析. *植物资源与环境学报*, 21 (1): 42 - 46.
- Wang Li-rong. 2012. Review for the past three decades and developmental suggestions for fruit germplasm resource in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 13 (3): 343 - 349. (in Chinese)
- 王力荣. 2012. 我国果树种质资源科技基础性工作 30 年回顾与发展建议. *植物遗传资源学报*, 13 (3): 343 - 349.
- Wang Shun-cai. 2011. Studies on response mechanism and resistance-related genes expression analysis of two apple rootstocks to drought stress [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 王顺才. 2011. 两种苹果砧木对干旱的响应机理及抗性基因表达分析研究[博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wang Shun-cai, Liang Dong, Shi Shou-guo, Ma Feng-wang, Shu Huai-rui. 2011. Cloning and expression analysis of two novel drought-tolerance genes coding glycine-rich RNA-binding proteins in *Malus* plants. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 29 (5): 75 - 81. (in Chinese)
- 王顺才, 梁东, 师守国, 马锋旺, 束怀瑞. 2011. 苹果中新抗旱相关基因 GR-RBPs 的克隆与表达分析. *干旱地区农业研究*, 29 (5): 75 - 81.
- Williams A H. 1982. Chemical evidence from the flavonoides relevant of the classification of *Malus* species. *Bat J Linnean Soc*, 84 (1): 31 - 39.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16 (2): 97 - 159.

- Xiao Zun-an, Cheng Ming-hao, Li Xiao-lin. 1989. Fuzzy cluster analysis of *Malus* spp. with isoenzyme profiles. Journal of Southwest Agricultural University, 11 (5): 485 - 490. (in Chinese)
- 肖尊安, 成明昊, 李晓林. 1989. 苹果属植物两种同工酶的模糊聚类分析. 西南农业大学学报, 11 (5): 485 - 490.
- Xie Yun. 2009. Problems and countermeasures in the development of apple industrialization in China. Journal of Yangtze University (Nat Sci Edit), 6 (1): 85 - 87. (in Chinese)
- 谢 云. 2009. 我国苹果产业化发展中存在的问题及对策研究. 长江大学学报 (自然科学版), 6 (1): 85 - 87.
- Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N. 2002. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Molecular Ecology Notes, (2): 14 - 16.
- Yang Feng, Liu Zhi, Yi Kai, Liu Yan-jie, Wang Qiang, Sun Jian-she. 2015. Studies on geographical regions and analysis on genetic diversity of phenotypic of natural population of '*Malus baccata* (L.) Borkh' in Northeast of China. Journal of Plant Genetic Resources, 16 (3): 490 - 496. (in Chinese)
- 杨 锋, 刘 志, 伊 凯, 刘延杰, 王 强, 孙建设. 2015. 东北山定子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.] 野生居群表型遗传多样性分析及生态地理分布研究. 植物遗传资源学报, 16 (3): 490 - 496.
- Zhai Heng, Shi Da-chuan, Shu Huai-rui. 2007. Current status and developing trend of apple industry in China. Journal of Fruit Science, 24 (3): 355 - 360. (in Chinese)
- 翟 衡, 史大川, 束怀瑞. 2007. 我国苹果产业发展现状与趋势. 果树学报, 24 (3): 355 - 360.
- Zhai Heng, Zhao Zheng-yang, Wang Zhi-qiang, Shu Huai-rui. 2005. Analysis of the development trend of the world apple industry. Journal of Fruit Science, 22 (1): 44 - 50. (in Chinese)
- 翟 衡, 赵政阳, 王志强, 束怀瑞. 2005. 世界苹果产业发展趋势分析. 果树学报, 22 (1): 44 - 50.
- Zhang C Y, Chen X S, He T M, Liu X L, Feng T, Yuan Z H. 2007. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. Journal of Genetics and Genomics, 34 (10): 947 - 955.
- Zhou T H, Qian Z Q, Li S, Guo Z G, Huang Z H, Liu Z L, Zhao G F. 2010. Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Saruma henryi* Oliv. (Aristolochiaceae) and its implications for conservation. Population Ecology, 52 (1): 223 - 231.