

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

何文¹, 张静¹, 黄智林¹, 陈清¹, 汤浩茹¹, 汤福义¹, 王小蓉^{1,2*}

(1 四川农业大学 园艺学院, 四川雅安 625014; 2 四川农业大学 果蔬研究所, 成都 611130)

摘要: 该研究基于 ITS 序列对栽培中国樱桃 [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don] 18 个群体共 154 个个体的遗传多样性及其群体遗传结构进行了分析, 以期从 DNA 序列水平上揭示栽培中国樱桃种质资源的遗传背景, 为保护和利用中国樱桃种质资源提供理论依据。结果表明: (1) 154 条 ITS 序列比对后共定义了 11 个单倍型, 表现出较低的遗传多样性 ($h=0.5590$, $\pi=0.0012$), 群体间遗传多样性也表现出较大差异 ($h=0\sim0.9050$, $\pi=0\sim0.0061$)。 (2) 群体分析显示, 群体间遗传分化水平较低 ($F_{ST}=0.1400$), 只有 14% 的遗传变异来自群体间, 而 86% 的遗传变异来自群体内部。研究认为, 栽培中国樱桃在驯化过程中所产生的奠基者效应以及瓶颈效应可能是导致群体遗传多样性丢失的主要原因, 而较长的世代周期及较短的分化时间可能导致了群体间低的遗传分化; 因此, 对栽培中国樱桃种质应采取就地保护策略; 若需迁地保护种质建议减少采样群体数而增加群体内个体数量的采样策略。

关键词: 中国樱桃; 地方种质; ITS 序列; 遗传多样性; 群体遗传结构

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity and Population Genetic Structure among Local Chinese Cherry Varieties [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don] Based on ITS Sequence

HE Wen¹, ZHANG Jing¹, HUANG Zhilin¹, CHEN Qing¹,
TANG Haoru¹, TANG Fuyi¹, WANG Xiaorong^{1,2*}

(1 College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2 Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In order to effectively preserve, utilize and reveal the genetic background of Chinese cherry [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don], we analyzed the genetic diversity and population genetic structure among 18 populations (total 154 individuals) based on ITS sequence. The results showed that: (1) 11 haplotypes were yielded based on the alignment of 154 ITS fragments, indicating a low level of haplotypes and nuclear diversity ($h=0.5590$, $\pi=0.0012$) with high variation among populations ($h=0\sim0.9050$, $\pi=0\sim0.0061$). (2) Fairly low level of genetic differentiation ($F_{ST}=0.1400$) was found among these populations, with only 14% of total variability from among populations and 86% of genetic variation within groups. These results suggested that founder and bottleneck effect produced by domestication and recent reduction of population probably affected the genetic diversity. The long alternation of generation and short

收稿日期: 2014-01-20; 修改稿收到日期: 2014-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272134); 四川省教育厅重大培育专项 (2011A005)

作者简介: 何文 (1989—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: wen_h07@live.cn

* 通信作者: 王小蓉, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: wangxrtj@163.com

history of differentiation may lead to a low genetic differentiation among populations. According to these results, a conservational plan for sampling or preserving fewer populations but more individuals from each population for the species was proposed.

Key words: Chinese cherry; landraces; ITS sequence; genetic diversity; population genetic structure

中国樱桃(*Cerasus pseudocerasus*)起源和分布于中国,隶属于蔷薇科(Rosaceae)樱属(*Cerasus*)^[1],在中国其栽培历史已达3 000余年之久^[2]。是世界四大樱桃栽培种中的一种,也是中国重要的落叶栽培果树之一。

近年来,随着人们对生活质量有了更进一步的需求,乡村旅游、农家乐蓬勃兴起,中国樱桃的观赏性、早熟性(2~3月开花,4~5月成熟)、安全性(适应性、抗病性强)使得中国樱桃的发展具有广阔的发展利用前景。但是,长期以来,中国樱桃因其果小(平均单果重2~3 g)、储运性差,致使中国樱桃未受到应有的重视,忽视了对其个别性状突出甚至一些综合性状优良的地方种质的保护。据黄晓姣等^[3]报道,在有资料记载的全国104份优良栽培中国樱桃种质,现在很多不复存在。加上世界上另一樱桃栽培种欧洲甜樱桃(*Cerasus avium*)大规模涌入中国市场,一定程度上加剧了栽培中国樱桃种质的破坏和流失。因此,开展中国樱桃资源遗传多样性和群体遗传结构的评价和研究,以此为樱桃的保护和利用提供参考迫在眉睫。相关研究已有较多报道,如RFLP^[4]、RAPD^[5]、ISSR^[6]和SSR^[7-8],但由于研究群体、研究手段以及群体个体数的限制,目前对总的中国樱桃群体,特别有代表性的栽培中国樱桃的遗传多样性缺乏全面的总体的认识和评价^[3]。因此,采用合理的方法技术,对栽培中国樱桃的遗传多样性及群体遗传结构进行广泛深入评价,对于制定科学有效的种质资源保护策略并合理进行对其保护和开发利用具有非常重要的意义。

核糖体基因转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)是位于核糖DNA(rDNA)上18S和28S基因之间的区域片段,主要包括内转录间隔区1(ITS1)、5.8S rDNA、内转录间隔区2(ITS2),其中ITS1和ITS2作为非编码区,承受的进化选择压力较小,相对变化较大^[9]。ITS区段的扩增在植物类群系统演化与发育、植物种质资源鉴定和保护生物学等研究中占有重要地位^[10-11],在蔷薇科甚至樱属植物的近缘属中已有广泛的应用^[12],但在樱属植物的种质资源研究中还未见报道。

本研究拟利用ITS序列,对较有代表性的18

个栽培中国樱桃种质群体的遗传多样性及群体遗传结构进行分析,以期从DNA序列水平上了解栽培中国樱桃种质资源的遗传背景,为中国樱桃核心种质的构建、现存资源的保护和利用及樱桃的遗传育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 采样策略

在2009~2013年对中国樱桃资源全面考察的基础上,依据群体大小、繁殖方式及表型差异对中国樱桃主要分布区的18个栽培中国樱桃群体进行样品采集(表1)。以单株为单位采集幼嫩叶片用变色硅胶干燥后带回实验室备用。

1.2 总DNA提取、PCR扩增及测序

总基因组DNA提取采用CTAB法^[13],并采用延长水浴时间,适当延长氯仿/异戊醇与提取液接触时间,舍弃液氮研磨改为直接研磨等手段对CTAB法有所改良。利用ITS通用引物ITS5(5'-GGA-AGTAAAAGCGTAACAAGG-3')和ITS4(5'-TC-CTCCGCTATATGATATGC-3')^[10]进行目的ITS片段的PCR扩增。反应体系为25 μ L,包括10 \times PCR buffer(10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ EDTA) 4.0 μ L、MgCl₂(25 mmol \cdot L⁻¹) 2.4 μ L、dNTP mix(10 mmol \cdot L⁻¹) 2.8 μ L、正反引物各3.5 pmol \cdot L⁻¹、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。PCR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,利用扩增引物进行正反双向测序,对于低质量的测序结果重新扩增测序。比对后的序列已经提交至GenBank并获得登录号(表2)。

1.3 数据分析

利用Lasergene 7.0软件包中的SeqMan程序对正反序列进行拼接,并参照Chromas序列峰图对误读点进行人工校正。用MEGA 5.0软件^[14]中Clustal W程序进行多序列对比。利用DnaSP 5.1软件^[15]对各个群体和总群体的单倍型个数(H)、分

离位点数目(S)、单倍型多样性(h)及核苷酸多样性(π)等遗传多样性指标进行计算。

采用软件 Network 4.2.0.1^[16] 中的最大简约标准对所有单倍型序列进行种内谱系的单倍型网络分析,并用溯祖理论来推测单倍型间的亲缘关系。利用 SAMOVA 1.0 软件^[17] 来进行群体地理划分的空间分子变异分析,设置 $K=2-8$,每个检验均采用 100 次的模拟循环验证,依据最大的 F_{CT} 值来确定最佳的分组。两两群体间的遗传分化系数(F_{ST})利用 Arlequin 3.0 软件包^[18] 进行计算,并利用其中的分子变异分析程序(AMOVA)^[19] 分别估算所有群体及 SAMOVA 划分群体遗传变异的贡献率以及群体遗传分化的固定指数(F_{ST} 、 F_{SC} 和 F_{CT}),所有计算均进行了 1 000 次随机抽样的显著性检验。

采用 MEGA5 软件中 K-2P(Kimura 2-parameter)模型对 18 个群体进行遗传距离计算,并通过 1 000 次重复的自展程序进行标准检测,所得的遗传距离矩阵采用邻接 N-J(Neighbor-Joining)法进行聚类分析。利用 DnaSP 5.1 软件对所有群体进行 Tajima's^[20]、Fu^[21] 的中性检验,并利用 DnaSP 5.1 软件对所有群体的动态扩张进行错配分布分析(mismatch distributions)。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列多态性分析

对表 1 中 18 个栽培中国樱桃种质群体的 154 条 ITS 序列(包括 ITS1、5.8S 和 ITS2)进行序列测

定和比对,共得到长度为 703 bp 碱基,其中 ITS1 和 ITS2 非编码区长度分别为 227 bp 和 276 bp。该区段序列富含 GC 核苷酸碱基,占总核苷酸碱基(703 bp)的 58.8%。所有 154 条 ITS 的 703 bp 中共检测到 19 个核苷酸变异位点,占总位点的 2.7%,没有检测到插入/缺失片段。其中 ITS1 区域检测到 4 处变异位点,占 ITS1 序列的 1.76%,而 ITS2 区域共检测到 15 处变异位点,占其总长度的 5.43%(表 2)。19 个核苷酸变异位点在 154 个个体中共定义了 11 个单倍型,其中单倍型 H1 在所有群体中均有分布,是分布最广也是所有群体遗传构成最主要的单倍型。单倍型 H2 次之,分布于 13 个群体中,在贵州毕节(BJ)群体中分布最多。其余单倍型只分布在少数或单个群体中,是这些群体特有的单倍型(表 1,图 1)。

2.2 群体遗传多样性分析

对所有 18 个群体的 ITS 序列单倍型多样性(h)及核苷酸多样性(π)的检测结果(表 1)表明:栽培中国樱桃种质表现出较低的遗传多样性水平($h=0.559\ 0$, $\pi=0.001\ 2$),而且单个群体间遗传多样性水平表现出较大的差异($h=0\sim0.905\ 0$, $\pi=0\sim0.006\ 1$),其中来自安徽太和(TH)、河南洛阳(LY)及四川眉山(MS)的群体只检测到一种单倍型,表现出最低的遗传多样性水平($h=0$, $\pi=0$)。而来自贵州贵阳(GY)和山东潍坊(WF)的群体包含最多的单倍型,其中贵州贵阳(GY)群体表现出最高的遗传多样性水平($h=0.905\ 0$, $\pi=0.006\ 1$;表 1,图 1)。

表 2 基于 ITS 序列的 18 个栽培中国樱桃群体的 11 个单倍型的序列差异位点

Table 2 Variable sites from the aligned sequences of the ITS spacers in the 11 haplotypes of *C. pseudocerasus*

单倍型 Haplotype	变异位点 Polymorphic site																			登录号 GeneBank
	102	169	206	231	455	461	462	478	483	505	523	556	572	574	580	624	625	635	664	
H1	C	T	G	A	C	G	C	G	C	G	A	T	C	A	C	G	C	A	T	KF241106
H2	G	.	.	KF241107
H3	T	A	A	T	T	.	G	G	.	C	KF241127
H4	A	A	T	T	.	G	G	.	C	KF241112
H5	G	KF241109
H6	.	.	A	KF241130
H7	T	.	.	G	G	T	C	KF241132
H8	G	G	A	KF241121
H9	T	C	.	C	A	G	G	T	C	T	C	.	G	.	KF241102
H10	G	.	.	C	KF241128
H11	A	KF241104

注:所有单倍型序列比对以单倍型 H1 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同单倍型 H1。
Note: All sequences are compared to the reference haplotype Hap 1. The number at the top indicates polymorphic sites. Dots represent nucleotide variants identical to the first sequence.

表 1 18 个栽培中国樱桃群体的采样地理位置及遗传多样性指数
Table 1 Location of the sampled *C. pseudocerasus* (landrace) populations and the estimated genetic diversity indexes

群体编号 Symbol	采样地 Locality	纬度/经度 Latitude(N)/ Longitude(E)	海拔 Altitude /m	样本量 Sample size	ITS 单倍型 Haplotypes										单倍型数目 Number haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
					H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11		
TH	安徽太和 Taihe, Anhui	33°54'/116°25'	36	6	13		2	1							1	0.000 0	0.000 0
LY	河南洛阳 Luoyang, Henan	35°08'/112°39'	206	4	14	3									1	0.000 0	0.000 0
ZZ	河南郑州 Zhengzhou, Henan	34°37'/113°35'	190	4	8										3	0.833 0	0.001 4
WF	山东潍坊 Weifang, Shandong	36°13'/119°04'	14~212	20	2	2									5	0.632 0	0.005 2
HZ	陕西汉中 Hanzhong, Shaanxi	33°13'/106°57'	601	8	8				2						3	0.607 0	0.001 1
FP	陕西佛坪 Foping, Shaanxi	33°31'/107°59'	847	4	3	2			1						3	0.833 0	0.001 7
SN	陕西商南 Shangnan, Shaanxi	33°46'/110°85'	684	4	4	4									2	0.500 0	0.000 7
TS	甘肃天水 Tianshui, Gansu	34°26'/105°56'	1190	4	2	5			1						3	0.833 0	0.001 4
XC	四川西昌 Xichang, Sichuan	27°58'/102°06'	1801	16	1	2			1						3	0.342 0	0.003 6
PJ	四川蒲江 Pujiang, Sichuan	30°09'/103°29'	571	4	6										2	0.667 0	0.001 0
YA	四川雅安 Ya'an, Sichuan	29°58'/102°57'	621	17	2	2	1		1	1					2	0.309 0	0.000 4
SM	四川石棉 Shimian, Sichuan	31°25'/102°18'	1 898	10	1	16									2	0.356 0	0.000 5
MS	四川眉山 Meishan, Sichuan	30°04'/103°26'	748	8	2	1			1						1	0.000 0	0.000 0
HY	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	29°31'/102°38'	1 214~2 003	6	4										3	0.733 0	0.001 2
BC	四川北川 Beichuan, Sichuan	31°97'/104°63'	726~1 014	7	2	1			1						2	0.476 0	0.000 7
FL	重庆涪陵 Fuling, Chongqing	29°42'/107°28'	390~638	8	11	6							1	1	1	0.571 0	0.000 8
BJ	贵州毕节 Bijie, Guizhou	27°18'/105°19'	1 486	17	5	2									2	0.118 0	0.000 2
GY	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	26°39'/106°31'	1 200	7	3	1									5	0.905 0	0.006 1
总群体 Total					91	47	3	1	5	2	1	1	1	1	11	0.559 0	0.001 2

2.3 群体遗传结构分析

对检测到的 11 个单倍型进行基于最大简约标准的单倍型网络分析结果显示:在整个单倍型网络中介图中,11 个单倍型的拓扑结构呈浅星形分布的基因树,单倍型 H1 位于整个网络图的中心部位,而且广泛分布于所有群体中,为最核心的古老单倍型。其余单倍型分别以一步或多步突变而成为较为年轻的单倍型分散在网络图的外部节点(图 2)。

利用 SAMOVA 对所有群体遗传变异的空间分

布分析结果表明,当 $K=3$ 时检测到最大的 F_{CT} 值及最大的群体差异($F_{CT}=0.307\ 2, P=0.002\ 9$),表明所有群体可划分为 3 个组,来自贵州毕节(BJ)的群体和来自贵州贵阳(GY)的群体各自单独为一个组,而来自其他地方的群体成为另一个组(表 3)。分子变异分析(AMOVA)结果表明,18 个群体间的遗传分化不明显($F_{ST}=0.1400, P=0.000\ 0$),大部分的遗传变异主要分布于群体内部(86%),存在于群体间的遗传变异较少(14%)。SAMOVA 分组的分析

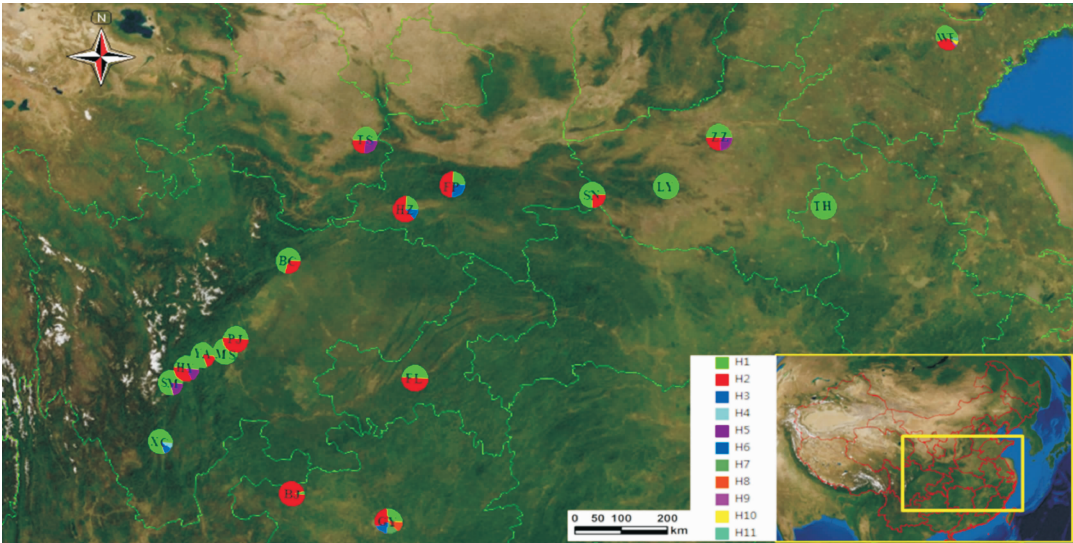


图 1 18 个栽培中国樱桃群体的 ITS 序列单倍型分布
饼图代表各单倍型在该群体中的分布比例,标注框内不同颜色代表不同的 ITS 序列单倍型,群体代号同表 1

Fig. 1 Geographical distribution of ITS haplotypes for 18 populations of *C. pseudocerasus*
Different patterns were assigned for each haplotype according to the legend at the right side of the figure. Population symbols are identified in Table 1

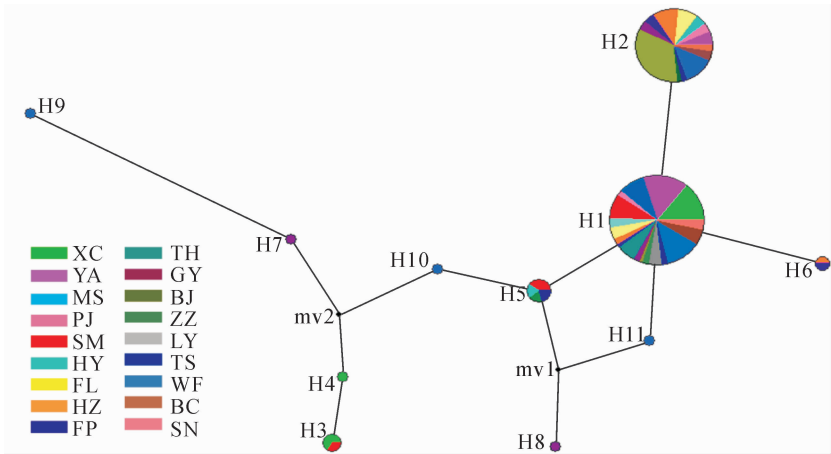


图 2 基于 ITS 序列的 18 个栽培中国樱桃群体的单倍型网络中介图
圆圈的大小代表各单倍型的频率,标注框内不同的颜色代表不同的群体

Fig. 2 Median-joining network of ITS haplotypes (H1~H11), for 18 populations of *C. pseudocerasus*
Circumference size is proportional to the haplotype frequency. Different patterns were assigned for each population as shown in the key

表 3 18 个栽培中国樱桃群体的 SAMOVA 分析

K 值 K value	群体分组 Population grouping	F_{CT}	P 值 P value
2	(BJ) (XC, YA, MS, PJ, SM, HY, FL, HZ, FP, TH, GY, ZZ, LY, TS, WF, BC, SN)	0.277 6	0.054 7
3	(BJ) (GY) (XC, YA, MS, PJ, SM, HY, FL, HZ, FP, TH, ZZ, LY, TS, WF, BC, SN)	0.307 2	0.002 9
4	(BJ) (GY) (XC) (YA, MS, PJ, SM, HY, FL, HZ, FP, TH, ZZ, LY, TS, WF, BC, SN)	0.303 8	0.000 0
5	(BJ) (GY) (XC) (HZ) (YA, MS, PJ, SM, HY, FL, FP, TH, ZZ, LY, TS, WF, BC, SN)	0.293 5	0.000 0
6	(BJ) (GY) (XC) (HZ) (FP) (YA, MS, PJ, SM, HY, FL, TH, ZZ, LY, TS, WF, BC, SN)	0.283 2	0.000 0
7	(BJ) (GY) (XC) (WF) (SM) (YA, MS, HY, TH, ZZ, LY, TS, BC, SN) (PJ, FL, HZ, FP)	0.273 0	0.000 0
8	(BJ) (GY) (XC) (WF) (SM) (MS, TH, LY) (YA, HY, ZZ, BC, TS, SN) (PJ, FL, HZ, FP)	0.277 0	0.000 0

表 4 18 个栽培中国樱桃群体的分子变异分析

变异来源 Source of variation		自由度 df	平方和 Sum of squares	变异组成 Variance component	变异所占比例 Percentage of variation/%	固定指数 Fixation index
总群体 All locations	群体间 Among populations	17	21.933	0.088 9	14	$F_{ST}=0.140\ 0(P=0.000\ 0)$
	群体内 Within population	136	74.255	0.546 0	86	
	总变异 Total	153	96.188	0.634 9		
SAMOVA 分组 SAMOVA groups	组间 Among groups	2	11.923	0.248 9	30.72	$F_{CT}=0.307\ 2(P=0.002\ 9)$
	组内群体间 Among populations within group	15	10.010	0.015 3	1.89	$F_{SC}=0.027\ 3(P=0.000\ 0)$
	群体内 Within population	136	74.255	0.546 0	67.39	$F_{ST}=0.326\ 1(P=0.001\ 0)$
	总变异 Total	153	96.188	0.810 2		

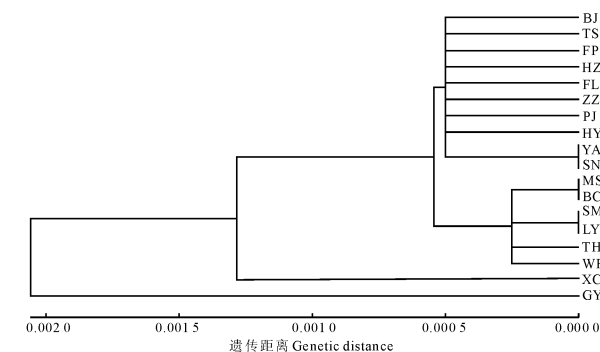


图 3 基于 K-2P 遗传距离的 18 个栽培中国樱桃群体的 N-J 聚类图
标尺为遗传距离, 群体编号同表 1

Fig. 3 Neighbor-joining (NJ) clustering of 18 populations of *C. pseudocerasus* based on K-2P genetic distance of ITS sequences among populations
The scale is the genetic distance; Population symbols are identified in Table 1

也表现出类似的遗传分化, 67.39% 的遗传变异来自群体内部 ($F_{ST}=0.326\ 1, P=0.001\ 0$), 组内群体间的遗传变异只占 1.89% ($F_{SC}=0.027\ 3, P=0.000\ 0$), 组间也存在较大的遗传分化 ($F_{CT}=0.307\ 2, P=0.002\ 9$), 占遗传变异的 30.72% (表 4)。

18 个群体两两群体间的遗传分化分析结果表明, 群体间遗传分化系数 F_{ST} 表现出较大的变化,

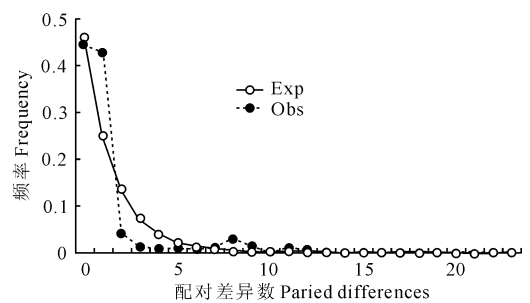


图 4 18 个栽培中国樱桃群体的错配分布分析图
实线代表预期分布曲线, 虚线代表变异位点的观测分布曲线
Fig. 4 Mismatch distribution of ITS sequences in 18 populations of *C. pseudocerasus*

Showing the observed pairwise nucleotide site difference (dotted line) and expected (solid line) obtained with DnaSP
 $F_{ST}=0\sim0.914\ 8$, 其中来自贵州毕节群体(BJ)和四川眉山群体(MS)间的遗传分化最大 $F_{ST}=0.914\ 8$, 而且除四川蒲江群体(PJ)、陕西佛坪群体(FP)和陕西汉中群体(HZ)外, 贵州毕节群体(BJ)与其它群体间均存在显著的遗传分化。其它群体间的遗传分化均较小, 且多数不显著(表 5)。

基于 K-2P 遗传距离的 N-J 群体聚类结果表明, 18 个群体在遗传聚类为 0.001 3 的位置可以分为 3 个较大的分支, 其中贵州贵阳群体(GY)和四川西昌群体(XC)与其它群体间的遗传距离较大, 分别

表 5 栽培中国樱桃群体两两之间的遗传分化系数
Table 5 Pairwise differences among *C. pseudocerasus* populations

	XC	YA	MS	PJ	SM	HY	FL	GY	BJ	BC	ZZ	LY	WF	TH	TS	HZ	FP	SN
XC																		
YA	0.132 4 *																	
MS	0.056 0	0.050 4																
PJ	0.070 8	0.116 7	0.515 2															
SM	0.049 5	0.122 1 *	0.080 5	0.330 8														
HY	0.044 5	0.005 8	0.192 8 *	0.160 3	0.070 0													
FL	0.050 2 *	0.150 6	0.428 6	0.230 8	0.347 2 * *	0.070 5												
GY	0.010 3	0.227 7 * *	0.135 1 * *	0.014 5	0.120 4 *	0.012 3	0.104 1 *											
BJ	0.456 5 * *	0.728 5 * *	0.914 8 * *	0.443 9	0.817 3 * *	0.551 5 *	0.400 9 *	0.361 1 * *										
BC	0.070 1	0.072 0	0.191 9	0.125 3	0.152 4	0.122 1	0.049 2	0.074 7	0.654 4 * *									
ZZ	0.027 2	0.008 0	0.186 5	0.111 1	0.051 7	0.239 4	0.009 0	0.067 9	0.660 8 * *	0.109 2								
LY	0.032 0	0.035 9	0.000 0	0.333 3	0.025 6	0.045 9	0.304 4 *	0.004 4	0.897 8 * *	0.057 2	0.000 0							
WF	0.079 5	0.001 1	0.013 8	0.109 8	0.024 4	0.090 9	0.031 2	0.062 9	0.277 0 * *	0.071 0	0.129 8	0.068 6						
TH	0.024 0	0.019 2	0.000 0	0.441 9	0.040 0	0.133 3	0.376 6	0.083 2	0.907 2 * *	0.137 6	0.111 1	0.000 0	0.014 9					
TS	0.027 2	0.008 0	0.186 4	0.111 1	0.051 7	0.239 4	0.009 0	0.067 9	0.660 8 * *	0.109 2	0.333 3	0.000 0	0.129 8	0.111 1				
HZ	0.198 1 * *	0.278 3 *	0.476 2 * *	0.170 7	0.414 6 * *	0.010 8	0.085 7	0.117 8 *	0.211 5	0.064 9	0.065 3	0.355 3	0.019 9	0.425 5 *	0.065 3			
FP	0.086 8 * *	0.181 6	0.413 6 * *	0.222 2	0.313 4 *	0.096 2	0.116 4	0.007 1	0.429 7	0.044 9	0.083 3	0.222 2	0.069 3	0.336 0 *	0.083 3	0.180 3		
SN	0.007 1	0.160 7	0.186 4	0.166 7	0.079 8	0.191 5	0.079 8	0.023 0	0.716 7 * *	0.240 4	0.200 0	0.000 0	0.137 7	0.111 1	0.200 0	0.034 5	0.111 1	

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 ($P<0.05$).

单独成为一个分支,其它群体聚在一起成为两个小的分支(图 3)。

对所有群体的中性检验结果表明,所有群体的 Tajima's D 值为显著的负值(Tajima's D = -1.779 0, $P < 0.05$);而 Fu and Li's $D^* = -1.809 8$ ($P > 0.10$)以及 Fu and Li's $F^* = -2.155 8$ ($0.05 < P < 0.10$)均为负值,但统计检验不存在显著性。群体的错配分布分析结果显示,错配分布曲线呈单峰曲线(图 4),表明栽培中国樱桃种质可能经历过近期的群体扩张。

3 讨 论

3.1 ITS 序列多样性及其应用

ITS 是高等生物核糖体内转录间隔序列,以高度串联重复的方式排列分布于细胞核基因组中。由于其长度的保守和核苷酸序列的高度变异以及各重复单元间具有协同进化的特性,ITS 已经成为在序列水平上探讨物种系统进化及多样性研究的有效手段^[22-28]。个体内 ITS 多态性已经在蔷薇科许多物种中报道,甚至是纯合的二倍体物种^[12],但是 ITS 在有些物种中未完成协同进化,因此,在利用 ITS 序列对物种进行遗传进化分析时首先要进行个体内多态性及假基因的检测^[27-29]。

此外,本研究对 154 个 ITS 序列扩增产物直接测序比对后没有发现个体内 ITS 多态性。基于 Fe-liner 等^[25]的 ITS 序列多态拷贝及假基因拷贝的检测标准,表明中国樱桃不存在个体内 ITS 序列的多态性,其基因组中成千上万的 ITS 拷贝已经完全消除了不同拷贝间的序列差异,完成了协同进化而具有系统学意义。这也凸显了 ITS 序列片段在中国樱桃系统学及多样性研究中具有潜在利用价值。而且,本研究中,ITS2 区段的核苷酸变异水平明显大于 ITS1 区段的核苷酸变异,表明 ITS2 在整个 ITS 功能序列中具有更快的进化速率,因此 ITS2 更适用于中国樱桃遗传多样性及系统学研究。

3.2 栽培中国樱桃群体遗传多样性

单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)是反映 DNA 序列遗传多样性的重要指标。本研究基于 ITS 区段序列变异对 154 份栽培中国樱桃种质的遗传多样性分析结果显示,相比于以前基于 ISSR^[6]、SSR^[7]及叶绿体序列^[30] ($h = 0.562$, $\pi = 0.001 8$)对野生中国樱桃的遗传多样性分析,栽培中国樱桃种质表现出较低的遗传多样性水平($h = 0.559$, $\pi = 0.001 2$)。这可能与标记自身的属性和有效群体大小等因素有关^[30]。特别地,中国樱桃在漫长的进化

过程中经历的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的较强的瓶颈效应可能是造成其遗传多样性低的主要原因^[30-31],尤其是在近期的驯化过程中,栽培中国樱桃比野生中国樱桃还经历了较强的人工选择压力,这些因素都可能导致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,遗传背景狭窄化。与此同时,相比于叶绿体 DNA 序列变异($h = 0.152$, $\pi = 0.000 6$)^[31],ITS 序列在栽培中国樱桃群体中表现出相对较高的遗传多样性。这可能是由于具有双亲的核基因序列反映的有效群体比单倍体单亲遗传的细胞质基因序列的有效群体大,因而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比细胞质基因组小,从而能够反映出相对较高的遗传多样性水平。

另一方面,本研究发现栽培中国樱桃群体的遗传多样性分布存在较大的差异,分布于贵州省贵阳的群体(GY)具有最高的单倍型和核苷酸多样性水平,该结果与宋常美等^[6]的研究结果相似,表明贵阳分布的中国樱桃群体,在驯化过程中所经历的选择压力相对较小,遗传多样性丢失相应较少,种质资源类型较为丰富。因此,贵阳群体是今后栽培中国樱桃资源开发和保护的主要地区。毕节群体(BJ)表现了较低的遗传多样性水平,但其单倍型分布相比其他群体存在较大差异,群体内主要分布单倍型 H2,而且与其它群体间也存在较大的遗传分化,说明该群体在驯化过程中单倍型 H2 作为高频率的单倍型在有限的群体范围内被优先固定而成为主导单倍型,其他类型低频率的单倍型逐渐丢失。

3.3 栽培中国樱桃群体遗传结构

群体的遗传结构能够反映群体在进化过程中所经历的突变、重组、遗传漂变及选择效应等因素^[32],也与物种的种子传播机制、生长特征等自身的生物学特性有关。本研究中栽培中国樱桃群体间变异小,遗传分化水平较低($F_{ST} = 0.140 0$),而大部分变异存在于群体内部。此与以往利用不同的标记类型对中国樱桃或其近缘种的研究结果类似,如对野生中国樱桃^[7,31],欧洲甜樱桃(*C. avium*)^[33]和马哈利樱桃(*C. mahaleb*)^[34]群体间也存在较低遗传分化,且这些研究都认为以取食樱桃果实为生的动物或鸟类长距离传播种子引起的群体之间广泛的基因交流是造成群体间遗传分化小的主要原因,但在我们近几年的实地考察和对种子繁育发现一个重要事实:樱桃种子在离开母体后常温下 1 周左右就会逐渐丧

失生活能力,因此本研究结果似乎并不支持种子是强基因流的主要载体这一结论^[30]。相反地,与一年生大田作物相比,种子传播可能不是造成栽培樱桃群体总的遗传分化较小的主要因素,更可能与多年生木本的较长世代周期特性和栽培驯化较短的分化时间有关^[35-36]。

此外,单倍型网络中介分析显示单倍型 H1 位于网络图的中心,为最古老的高频率单倍型,已经在很多群体中得到固定,浅星形的单倍型频率较低,由古老单倍型衍生,但由于进化历史较短而没有在较多的群体中固定。遗传距离聚类也表现出类似的特性。此可能与中国樱桃为多年生木本果树,具有较长的世代周期有关^[35]。因为世代周期越长,时代重叠也较严重,其在整个进化与驯化过程中所繁殖的后代数不仅比一年生植物少,而且在重叠的世代间也会存在广泛的基因交流。这些因素可能使得当发生遗传漂变时,有限的单倍型因其有效的进化历史短暂,还未在不同的群体中得以固定,从而导致各个群体间的遗传分化较小,遗传变异主要分布于群体内部。

通过群体两两序列变异的错配分布分析基于中性进化零假设的中性检验可对群体在整个进化过程中的动态历史变化过程进行分析。在本研究中,基于 Tajima's D、Fu and Li's D* 和 Fu and Li's F* 的中性进化零假设检验,18 个栽培中国樱桃群体的 Tajima's D 值均为显著的负值,同样核苷酸序列错

配分布为明显的单峰曲线,表明栽培中国樱桃种质在整个进化过程中经历了显著的群体扩张事件(包括群体大小和范围的扩张)。此可能与中国樱桃地方种质在驯化栽培过程中经历了长期的人工选择有关^[31]。这样部分具有优良性状的个体被选择而大规模繁殖,使其群体有了较大规模的扩张,致使遗传多样性显著降低。

3.4 栽培中国樱桃种质的保护策略

了解物种遗传多样性的水平及分布是确定科学有效物种保护策略的必需条件^[37]。作为中国樱桃遗传改良最为直接和重要的种质资源,栽培中国樱桃种质多样性的研究却一直没有被引起重视。栽培中国樱桃种质遗传多样性及群体遗传结构的研究对于制定实际有效的中国樱桃种质保护策略具有重要意义。本研究表明栽培中国樱桃种质群体间的遗传分化较低($F_{ST}=0.140\ 0$),86% 的遗传变异来自群体内部,而且单倍型频率在不同群体中的分布也存在较大的差异,低频率单倍型占多数,而这些低频率单倍型可能会随着有效群体大小的减小、遗传漂变而丢失。因此建议对栽培中国樱桃种质采取就地保护策略。如需迁地保护建立种质资源圃时建议减少采样群体数而增加群体内个体数的保护策略。而对于具有较高遗传多样性和较多低频率单倍型的群体(如贵州贵阳 GY 群体)应优先考虑群体内多个体数的迁地保护策略。

参考文献:

- [1] 俞德浚. 中国植物志(第 38 卷)[M]. 北京:科学出版社,1985:10—218.
- [2] 刘长江,刘美州. 山西侯马铸铜遗址种子类遗物的鉴定[M]. 北京:文物出版社,1993:65—71.
- [3] HUANG X J(黄晓蛟),WANG X R(王小蓉),CHEN T(陈 涛), *et al.* Research progress of genetic diversity in *Cerasus pseudocerasus* and their wild relative populations, and utilize progress of cultivation resources[J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2013, **30**(3): 470—479 (in Chinese).
- [4] CAO D W(曹东伟),CAI Y L(蔡宇良),YANG J(杨 娟), *et al.* PCR-RFLP analysis of *Prunus pseudocerasus*[J]. *Journal of Northwest A&F University* (Nat. Sci. Ed.) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2007, **35**(5): 173—178 (in Chinese).
- [5] CAI Y L(蔡宇良),LI SH(李 珊),CAO D W(曹东伟), *et al.* Use of amplified DNA sequence for the genetic analysis of the cherry germplasm[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2006, **33**(2): 249—254 (in Chinese).
- [6] SONG CH M(宋常美),WEN X P(文小鹏),YANG E T(杨尔泰). Cherry germplasm from Guizhou Province analyzed by ISSR markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2011, **38**(8): 1 531—1 538 (in Chinese).
- [7] CHEN J(陈 娇),WANG X R(王小蓉),TANG H R(汤浩茹), *et al.* Assessment of genetic diversity and populations genetic structure in wild Chinese cherry from Sichuan Province using SSR markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2013, **40**(2): 333—340 (in Chinese).
- [8] WAN T(宛 甜),CAI Y L(蔡宇良),FENG Y(冯 瑛), *et al.* Genetic diversity and genetic structure of wild *Prunus tomentosa* Thunb. based on simple sequence repeats markers[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(8): 1 544—1 550 (in Chinese).
- [9] HILLIS D M, DIXON M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference[J]. *Quarterly Review of Biology*, 1991, **66**(4): 411—453.
- [10] VIJAYAN K, ZHANG W J, TSOU C H. Molecular taxonomy of *Camellia* (Theaceae) inferred from nrITS sequences[J]. *American Jour-*

- nal of Botany*, 2009, **96**(7): 1 348—1 360.
- [11] VIJAYAN K, TSOU C H. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective[J]. *Current Science* (Bangalore), 2010, **99**(11): 1 530—1 541.
- [12] ZHENG X Y(郑小艳), CAO J SH(曹家树), TENG Y W(滕元文). Research progress of plant molecular phylogenetic analyses based on DNA sequence data—a case review in Rosaceae[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2009, **36**(12): 1 827—1 836(in Chinese).
- [13] LI M M, CAI Y L, QIAN Z Q, *et al.* Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl., and its implications for conservation[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2009, **56**(4): 455—464.
- [14] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2 731—2 739.
- [15] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(11): 1 451—1 452.
- [16] FORSTER P, BANDELT H J, ROHL A. Network 4. 2. 0. 1. Software available free at www.fluxus-engineering.com[M/CD]. Fluxus Technology Ltda, 2004.
- [17] CAIEDO A L, SCHAAL B A. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene[J]. *Molecular Evolution*, 2004, **13**(7): 1 871—1 882.
- [18] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin(version 3. 0): An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolution Bioinformatics Online*, 2005, **1**: 47—50.
- [19] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. *Genetics*, 1992, **131**(2): 479—491.
- [20] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585—595.
- [21] FU Y X, LI W H. Statistical tests of neutrality of mutations[J]. *Genetics*, 1993, **133**(3): 693—709.
- [22] PATTI F P, GAMBI M C. Phylogeography of the invasive polychaete *Sabella spallanzanii* (Sabellidae) based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 2(ITS2) of nuclear rDNA[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, **215**: 169—177.
- [23] ROBINSON J P, HARRIS S A, JUNIPER B E. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2001, **226**: 35—58.
- [24] ALVAREZ I, WENDEL J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 2003, **29**(3): 417—434.
- [25] FELINER G N, ROSSELLO J A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **44**(2): 911—919.
- [26] LIU Y L(刘艳玲), XU L M(徐立铭), CHENG ZH P(程中平). Phylogenetic analysis of stone fruits such as peach, plum, apricot, mume and cherry based on ITS sequences[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2007, **34**(1): 23—28(in Chinese).
- [27] ZHENG X Y, CAI D Y, YAO L H, *et al.* Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, **48**(3): 892—903.
- [28] LI X Y(李学营), PENG J Y(彭建营), BAI R X(白瑞霞). Use of ITS sequences based on nuclear rDNA for phylogenetic research of seed plants [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(4): 829—834(in Chinese).
- [29] YANG F S, QIN A L, LI Y F, *et al.* Great genetic differentiation among populations of *Meconopsis integrifolia* and its implication for plant speciation in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e37196
- [30] CHEN T(陈 涛), WANG X R(王小蓉), LUO H(罗 华), *et al.* Chloroplast DNA *trnQ-rps16* variation and genetic structure of nine wild Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) populations[J]. *Hereditas*(遗传), 2012, **34**(11): 1 475—1 483(in Chinese).
- [31] CHEN T, WANG X R, TANG H R, *et al.* Genetic diversity and population structure of Chinese cherry revealed by chloroplast DNA *trnQ-rps16* intergenic spacers variation[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2013, **60**(6): 1 859—1 871.
- [32] SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 1987, **236**: 787—792.
- [33] MARIETTE S, TAYAUD M, ARUNYAWAT U, *et al.* Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus[J]. *BMC Genetics*, 2010, **11**(1): 77.
- [34] JORDANO P, GODOY J A. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal dispersed tree[J]. *Molecular Ecology*, 2000, **9**(9): 1 293—1 305.
- [35] MILLER A J, GROSS B L. From forest to field: perennial fruit crop domestication[J]. *American Journal of Botany*, 2011, **98**(9): 1 389—1 414.
- [36] MEYER R S, PURUGGANAN M D. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, **14**(12): 840—852.
- [37] GAO L Z, GE S, HONG D Y. Allozyme variation and population genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. in China [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **101**(3): 494—502.