

苹果属栽培种楸子的遗传多样性与遗传结构分析

高 源, 王 昆, 王大江, 张彩霞, 丛佩华, 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: 利用荧光 SSR 分子标记, 对新收集的苹果属栽培种楸子种质资源进行了遗传多样性和群体结构分析, 明确群体内和群体间的遗传多样性和结构, 为苹果属植物种质资源的收集保存和砧木育种亲本选择提供参考。利用荧光 SSR 构建研究材料的指纹数据, 主要利用 GenAEx 6.501 软件分析遗传多样性, 利用 POPULATION 1.2 软件基于 Nei 遗传距离构建 Neighbour-Joining (NJ) 树, 并利用 STRUCTURE 2.3.4 软件进行群体结构分析。结果表明: 19 对 SSR 引物共检测出 390 个多态性等位变异, 平均多态性等位基因数为 20.526, 平均有效等位基因数为 9.399, 观察杂合度和期望杂合度的平均值分别为 0.706 和 0.868, 香农多样性指数为 2.446, 高于以往研究的苹果属植物的遗传多样性。基于 Nei 遗传距离的聚类分析, 在遗传距离 0.9167 处 155 份材料可以分成 3 个类群, 3 个类群间的遗传距离较近, 并没有完全按来源地划分为相应的类群。群体结构分析将 155 份材料划分成了 2 个稳定的群体, 群体结构分组与 NJ 聚类有相似的结果, 其中 150 份材料的 Q 值均大于 0.6, 血缘相对单一。

关键词: 苹果属; 楸子; 荧光 SSR; 遗传多样性; 遗传结构

The Genetic Diversity and Population Structure Analysis of Cultivated Species *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. of *Malus* Mill.

GAO Yuan, WANG Kun, WANG Da-jiang, ZHANG Cai-xia, CONG Pei-hua,

LIU Li-jun, LI Lian-wen, PIAO Ji-cheng

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

Abstract: Genetic diversity and population structure analysis was carried out on the newly collected cultivated species *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. using the fluorescent labelled SSR molecular markers. This work attempted to identify the genetic diversity and population structure, thus providing guidance for future germplasm collection and preservation as well as selecting the parental lines in rootstock breeding. The genetic diversity index, the Neighbour-Joining evolutionary tree and the population structure were analyzed by using GenAEx 6.501, POPULATION 1.2 and STRUCTURE 2.3.4, respectively. Three-hundred and ninety polymorphic alleles were detected by 19 SSR primers, with an average allele number of 20.526 and an average effective allele number of 9.399. The average values of heterozygosity and expected heterozygosity were 0.706 and 0.868, respectively. The Shannon diversity index of *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. was 2.446, higher than that of other *Malus* Mill. species. By cluster analysis using the Nei genetic distance (0.9167), the accessions

收稿日期: 2018-05-22 修回日期: 2018-06-08 网络出版日期: 2018-09-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180911.1733.001.html>

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

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

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

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-RIP-02); 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-27); 农作物种质资源保护与利用专项 (NB2015-2130135-39); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303093)

Foundation project: The Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-2016-RIP-02), The Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-27), The Earmarked Fund for Protection and Utilization of Crop Germplasm Resources (NB2015-2130135-39), The Special Scientific Research Fund of the Agricultural Public Welfare Profession of China, The Ministry of Finance, P.R.China (201303093)

were assigned to three groups. A close genetic diversity among three groups was observed, and the groups divided by genetic diversity and the geographical collecting sites were weakly associated. By analyzing the population structure, these accessions were divided into two groups. However, the Q value of 150 accessions were higher than 0.6, suggesting a relatively single blood relationship.

Key words: *Malus* Mill.; *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.; fluorescent SSR; genetic diversity; population structure

楸子 (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.) 又名柰子^[1]、海红^[2]、海棠果^[3], 是中国苹果属植物栽培种之一。楸子作为栽培种, 在各地栽培历史悠久, 是中国传统的水果之一, 历史上人为分布极广, 在我国华北、西北、东北、华东地区都有栽培^[4]。自西洋苹果引入中国后, 已无成园栽培^[3]。但是楸子的果实中含有很多的糖、酸和单宁物质, 是果品加工、生产果汁、果酒、果酱很有价值的原料; 其观赏性、抗寒和抗旱性强, 还可被用作观赏树木、园林绿化和砧木。前人对楸子的研究主要集中在利用形态学和同工酶等方法研究其分类归属^[5-9], 以及其作为砧木利用的优异性状评价和抗性基因挖掘等方面^[4, 10-15], 尚未开展过楸子的遗传多样性研究。遗传多样性分析利于亲本的选择, 也有助于作物的保护和改良^[16]。中国农业科学院果树研究所国家果树种质兴城梨、苹果圃近十年间陆续开展了中国东北、中国西北、中国华北、中国西南以及俄罗斯西伯利亚等苹果属植物主要分布地区的考察和收集^[17-18], 根据种质资源表型, 收集到大量表型多样性丰富的楸子及其地方类型, 按照钱关泽^[4]遵从的俞德浚先生的处理原则, 其地方类型归并到楸子中, 因此共收集到楸子种质 155 份入国家果树种质兴城梨、苹果圃安全保存。SSR 分子标记因其操作方便、重复性好、多态性好等优点, 已经成为植物和动物中最重要的分子标记^[19]。荧

光 SSR 分子标记技术是将 SSR 和荧光标记技术相结合, 高度智能化, 实现数据快速收集, 工作效率高, 避免人工读数造成误差, 数据准确, 适合大样本量鉴定^[20], 已经广泛应用到遗传多样性等研究中^[21-24]。本研究采用荧光 SSR 分子标记技术对新收集楸子种质资源的遗传多样性和群体遗传结构进行了分析, 明确不同地域楸子的遗传多样性水平和遗传变异, 以期今后更加合理地收集和保存楸子种质资源提供参考, 为苹果砧木等育种亲本的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

楸子的地方类型归并到楸子中, 155 份楸子种质中有 150 份取自中国农业科学院果树研究所国家果树种质兴城梨、苹果圃 (中国辽宁兴城), 均来自于近十年间的野外考察收集并在圃内繁殖的种质资源, 待鉴定评价后给予全国统一编号; 还有 5 份取自国家果树种质公主岭寒地果树圃 (中国吉林公主岭)。155 份楸子资源包括中国东北: 黑龙江 5 份、吉林 5 份、辽宁 5 份; 中国华北: 河北 21 份、内蒙古 1 份、山西 9 份; 中国西北: 甘肃 4 份、陕西 1 份、新疆 3 份; 俄罗斯 101 份 (表 1)。于 2016 年春季采集嫩叶, 并于 2016-2017 年完成试验。

表 1 155 份楸子材料
Table 1 155 accessions of *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.

编号 No.	种质名称 Name	来源地 Origin	编号 No.	种质名称 Name	来源地 Origin	编号 No.	种质名称 Name	来源地 Origin
1	牡丹江海棠	中国黑龙江牡丹江	11	三道沟海棠 2 号	中国辽宁葫芦岛	21	宽城海棠 2 号	中国河北宽城县
2	伊春小果海棠	中国黑龙江伊春	12	三道沟海棠 3 号	中国辽宁葫芦岛	22	承德楸子 2 号	中国河北承德县
3	伊春大果海棠	中国黑龙江伊春	13	熊岳海棠 1 号	中国辽宁熊岳	23	承德楸子 3 号	中国河北承德县
4	南岔大楸子	中国黑龙江伊春	14	三道沟海棠 1 号	中国辽宁葫芦岛	24	白洋淀紫苹果	中国河北安新县
5	日新海棠	中国黑龙江日新村	15	熊岳海棠 2 号	中国辽宁熊岳	25	青县海棠 1 号	中国河北青县
6	四楞海棠	中国吉林公主岭	16	承德楸子 1 号	中国河北承德县	26	博野海棠 1 号	中国河北博野县
7	六密海棠	中国吉林公主岭	17	卢龙海棠	中国河北卢龙县	27	青县海棠 3 号	中国河北青县
8	六楞海棠	中国吉林公主岭	18	宽城海棠 1 号	中国河北宽城县	28	平泉海棠 1 号	中国河北平泉市
9	扁海棠	中国吉林公主岭	19	抚宁海棠 1 号	中国河北抚宁县	29	平泉海棠 4 号	中国河北平泉市
10	紫果海棠	中国吉林公主岭	20	抚宁海棠 2 号	中国河北抚宁县	30	平泉海棠 2 号	中国河北平泉市

表 1(续)

编号 No.	种质名称 Name	来源地 Origin	编号 No.	种质名称 Name	来源地 Origin	编号 No.	种质名称 Name	来源地 Origin
31	青县海棠 2 号	中国河北青县	73	俄 22 号	俄罗斯	115	A4	俄罗斯
32	平泉海棠 5 号	中国河北平泉县	74	俄 23 号	俄罗斯	116	A5	俄罗斯
33	平泉海棠 3 号	中国河北平泉县	75	克 1 号	俄罗斯	117	克 2 号	俄罗斯
34	高创沟白海棠	中国河北平泉县	76	俄 24 号	俄罗斯	118	克 3 号	俄罗斯
35	高创沟海棠 2 号	中国河北平泉县	77	莫大 1 号	俄罗斯	119	迈 17 号	俄罗斯
36	唐县海棠 2 号	中国河北唐县	78	莫大 2 号	俄罗斯	120	克 4 号	俄罗斯
37	宁城海棠	中国内蒙古宁城县	79	俄 18 号	俄罗斯	121	克 5 号	俄罗斯
38	保德海棠	中国山西太谷	80	迈 2 号	俄罗斯	122	迈 10 号	俄罗斯
39	向阳红海棠	中国山西汾阳市	81	莫大 3 号	俄罗斯	123	俄 12 号	俄罗斯
40	平遥海棠	中国山西平遥县	82	莫大 4 号	俄罗斯	124	俄 13 号	俄罗斯
41	沁源海棠 2 号	中国山西沁源县	83	迈 6 号	俄罗斯	125	迈 11 号	俄罗斯
42	沁源楸子	中国山西沁源县	84	迈 7 号	俄罗斯	126	迈 12 号	俄罗斯
43	武乡黄海棠	中国山西武乡县	85	迈 8 号	俄罗斯	127	迈 13 号	俄罗斯
44	武乡海棠 2 号	中国山西武乡县	86	迈 9 号	俄罗斯	128	俄 10 号	俄罗斯
45	晋祠海棠	中国山西太原市	87	索菲亚 1 号	俄罗斯	129	俄 11 号	俄罗斯
46	隰县海棠	中国山西隰县	88	索菲亚 2 号	俄罗斯	130	俄 12 号	俄罗斯
47	酒泉楸子	中国甘肃酒泉市	89	索菲亚 3 号	俄罗斯	131	俄 13 号	俄罗斯
48	张良沟楸子	中国甘肃酒泉市	90	克 9 号	俄罗斯	132	迈 3 号	俄罗斯
49	石家磨楸子	中国甘肃武山县	91	克 10 号	俄罗斯	133	迈 4 号	俄罗斯
50	张掖海棠 1 号	中国甘肃张掖市	92	贞女红海棠 1 号	俄罗斯	134	迈 5 号	俄罗斯
51	富平楸子	中国陕西富平	93	贞女红海棠 2 号	俄罗斯	135	莫大 6 号	俄罗斯
52	新疆红海棠	中国新疆石河子	94	贞女红海棠 3 号	俄罗斯	136	莫大 7 号	俄罗斯
53	石河子海棠	中国新疆石河子	95	贞女红海棠 4 号	俄罗斯	137	莫大 8 号	俄罗斯
54	伊犁海棠	中国新疆伊犁	96	迈 1 号	俄罗斯	138	莫大 9 号	俄罗斯
55	夏宫海棠 1 号	俄罗斯	97	俄 8 号	俄罗斯	139	俄 14 号	俄罗斯
56	长果 1 号	俄罗斯	98	俄 9 号	俄罗斯	140	俄 15 号	俄罗斯
57	巴 3	俄罗斯	99	俄 10 号	俄罗斯	141	巴普洛夫海棠 1 号	俄罗斯
58	巴 1	俄罗斯	100	俄 11 号	俄罗斯	142	巴普洛夫海棠 2 号	俄罗斯
59	巴 4	俄罗斯	101	俄 3 号	俄罗斯	143	巴普洛夫海棠 3 号	俄罗斯
60	巴 6	俄罗斯	102	俄 4 号	俄罗斯	144	巴普洛夫海棠 4 号	俄罗斯
61	巴 8	俄罗斯	103	俄 5 号	俄罗斯	145	克 6 号	俄罗斯
62	夏宫海棠 2 号	俄罗斯	104	俄 6 号	俄罗斯	146	克 7 号	俄罗斯
63	长果 2 号	俄罗斯	105	俄 7 号	俄罗斯	147	克 8 号	俄罗斯
64	巴 2	俄罗斯	106	俄 19 号	俄罗斯	148	索菲亚 4 号	俄罗斯
65	巴 5	俄罗斯	107	俄 20 号	俄罗斯	149	索菲亚 5 号	俄罗斯
66	巴 7	俄罗斯	108	A1	俄罗斯	150	索菲亚 6 号	俄罗斯
67	巴 9	俄罗斯	109	俄 21 号	俄罗斯	151	索菲亚 7 号	俄罗斯
68	俄 1 号	俄罗斯	110	迈 14 号	俄罗斯	152	俄 14 号	俄罗斯
69	俄 2 号	俄罗斯	111	迈 15 号	俄罗斯	153	俄 15 号	俄罗斯
70	莫大 10 号	俄罗斯	112	迈 16 号	俄罗斯	154	俄 16 号	俄罗斯
71	莫大 11 号	俄罗斯	113	A2	俄罗斯	155	俄 17 号	俄罗斯
72	莫大 5 号	俄罗斯	114	A3	俄罗斯			

1.2 DNA 提取及 SSR 扩增

采用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取供试材料春季嫩叶的基因组 DNA。从 Hokanson 等^[25]、Liebhard 等^[26]、Yamamoto 等^[27] 和 Guilford 等^[28] 报道的序列中选取扩增产物片段长度在

100~300 bp 之间的 SSR 引物 19 对,引物名称编号和序列见表 2。其中, NH009 b、NH015 a 和 NZ28 f4SSR 为梨 SSR 引物。SSR 反向引物和 5' 端带有 6 FAM™ 荧光标记 SSR 正向引物由上海生工有限公司合成。

表 2 19 对 SSR 引物及优化条件

Table 2 19 pairs of SSR primers and optimal PCR conditions

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence	反向引物序列 (3'-5') Reverse primer sequence	退火温度 (℃) Annealing temperature
GD 12	TTGAGGTGTTTCTCCATTGGA	CTAACGAAGCCGCCATTTCTTT	58
GD 15	CGAAAGTGAGCAACGAAGTCC	ACTCCATCATCGGGTGGTG	59
GD 96	CGGCGGAAAGCAATCACCT	GCCAGCCCTCTATGGTTCCAGA	51
GD 100	ACAGCAAGGTGTTGGGTAAGAAGGT	TGCGGACAAAGGAAAAAAAAAAGTG	60
GD 142	GGCACCCAAGCCCCTAA	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	56
GD 162	GAGGCAAGTGACAAAGAAAGATG	AAAATGTAACAACCCGTCCAAGTG	58
CH01 h01	GAAAGACTTGCAAGTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	56
CH01 f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTTTCTCTCCAGC	58
CH02 d08	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	55
CH01 d08	CTCCGCCGCTATAACACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	60
CH01 f07 a	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTTGAGCGTAGGAAC	58
COLa	AGGAGAAAAGCGTTTACCTG	GACTCATTCTTCGTCGTCAGTG	59
CH05 e03	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG	CAAGTTGTTGTACTGCTCCGAC	60
CH02 d12	AACCAGATTTGCTTGCCATC	GCTGGTGGTAAACGTGGTG	60
CH02 b10	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	56
CH01 d09	GCCATCTGAACAGAATGTGC	CCCTTCATTCACATTCCAG	56
NH009 b	CCGAGCACTACCAATTGA	CGTCTGTTTACCGTTCT	58
NH015 a	TTGTGCCCTTTTCTCCTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG	59
NZ28 f4	TGCCTCCCTTATATAGCTAC	TGAGGACGGTGAGATTTG	57

PCR 体系参照 Cao 等^[21] 的方法,扩增产物的纯化体系参照高源等^[22] 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,即指纹数据。利用遗传数据分析软件 GenAlEx 6.501^[29-30] 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。基于 Nei 遗传距离 D_A ^[31], 利用 POPULATION 1.2 分别构

建 155 份材料的 Neighbour-Joining (NJ) 树,并在线绘图软件 iTOL (interactive tree of life)^[32] 绘制。使用 STRUCTURE 2.3.4 进行贝叶斯聚类^[33], 分析群体的遗传结构并确定最佳的群体分组。首先设定 $K=1\sim 8$, 设定 Burn-in 周期为 100000, MCMC 的重复次数为 100000 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/), 通过 ΔK 确定最佳 K 值^[34]。利用 CLUMPP 1.1.2 软件^[35] 处理 10 次独立运行得到的分配系数,然后使用 DISTRUCT 1.1 软件^[36] 将计算结果进行图形化输出。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增产物的多态性

利用 19 对具有明显多态性的 SSR 引物对 155 份楸子材料的基因组 DNA 进行扩增,共扩增出 390 个多态性等位基因(Na),多态性等位基因数为 9(GD15)~33(CH01 d08),平均值为 20.526(表 3)。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(Ne)为 2.475(NZ28 f4)~13.558(GD96),平均值为 9.399。观察杂合度(Ho)为 0.465~0.890,平均值为 0.706。期望杂合度(He)为 0.596~0.926,平均值为 0.868。香农多样性指数(I)为 1.221~2.925,平均值为 2.446。而固定指数(F)只有在 GD15 中为负值,其余均为正值,说明供试楸子内含有的杂合子较少。

表 3 不同 SSR 位点的遗传多样性特征
Table 3 The characteristics of genetic diversity of different SSR loci

位点 Locus	多态性等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	香农多样性指数 I	观察杂合度 Ho	期望杂合度 He	固定指数 F
GD12	22	7.710	2.405	0.632	0.870	0.274
GD15	9	2.588	1.221	0.645	0.614	-0.051
GD96	25	13.558	2.830	0.871	0.926	0.060
GD100	18	10.092	2.519	0.594	0.901	0.341
GD142	22	11.274	2.627	0.826	0.911	0.094
GD162	22	9.994	2.583	0.652	0.900	0.276
CH01 h01	20	9.328	2.529	0.465	0.893	0.480
CH01 f02	18	11.317	2.584	0.774	0.912	0.151
CH02 d08	18	8.846	2.438	0.781	0.887	0.120
CH01 d08	33	11.373	2.925	0.723	0.912	0.208
CH01 f07 a	21	10.050	2.613	0.890	0.900	0.011
COLa	19	9.524	2.503	0.742	0.895	0.171
CH05 e03	23	10.144	2.592	0.568	0.901	0.370
CH02 d12	22	12.688	2.760	0.813	0.921	0.118
CH02 b10	22	8.647	2.510	0.626	0.884	0.292
CH01 d09	24	9.796	2.619	0.755	0.898	0.159
NH009 b	22	12.813	2.715	0.839	0.922	0.090
NH015 a	19	6.357	2.093	0.671	0.843	0.204
NZ28 f4	11	2.475	1.416	0.555	0.596	0.069
平均值 Mean	20.526	9.399	2.446	0.706	0.868	0.181

Na : Number of different alleles, Ne : Number of effective alleles, I : Shannon diversity index, Ho : Observed heterozygosity, He : Expected heterozygosity, F : Fixation index, the same as below

2.2 4 个楸子群体的遗传多样性

将所有楸子材料按照来源省份的地理区划分为 4 个群体,分别为中国东北群体、中国华北群体、中国西北群体和俄罗斯群体。俄罗斯群体的多态性等位基因数、有效等位基因数和香农多样性指数均为最高,分别为 16.737、8.469 和 2.314(表 4);全部群体的观察杂合度均高于 0.5,中国西北群体的观察杂合度最高为 0.770;俄罗斯群体的期望杂合度最高为 0.852;期望杂合度与观察杂合度差值最小的为中国西北群体,差值最大的为俄罗斯群体;固定指

数在各个群体均为正值,其中在中国西北群体中最小为 0.046,相比于其他群体其杂合子较多。

2.3 4 个楸子群体的遗传距离与遗传分化

计算划分群体后的 Nei 遗传距离和遗传分化系数(表 5),揭示各个楸子群体的遗传差异。可以看出,中国华北群体与中国西北群体间遗传距离最大为 0.561,中国西北群体与俄罗斯群体间的遗传距离次之为 0.536,而中国华北群体与俄罗斯群体间的遗传距离最小为 0.201。4 个群体两两间遗传分化系数为 0.016~0.043,俄罗斯群体与中国华北群体间的遗传分化

表 4 4 个楸子群体的遗传多样性
Table 4 The genetic diversity among the four geographical groups of *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.

楸子群体 Population of <i>Malus prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	多态性等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	香农多样性指数 <i>I</i>	观察杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	固定指数 <i>F</i>
中国东北群体 Population of Northeast China	10.579	7.077	2.089	0.723	0.843	0.137
中国华北群体 Population of North China	14.053	7.502	2.215	0.727	0.840	0.130
中国西北群体 Population of Northwest China	7.947	6.098	1.885	0.770	0.816	0.046
俄罗斯群体 Population of Russia	16.737	8.469	2.314	0.693	0.852	0.183

表 5 4 个楸子群体间的遗传距离和遗传分化系数
Table 5 The genetic distance and genetic differentiation coefficient among the four groups of *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.

楸子群体 Populations of <i>Malus prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	中国东北群体 Population of Northeast China	中国华北群体 Population of North China	中国西北群体 Population of Northwest China	俄罗斯群体 Population of Russian
中国东北群体	0.000	0.028	0.033	0.024
中国华北群体	0.364	0.000	0.043	0.016
中国西北群体	0.398	0.561	0.000	0.041
俄罗斯群体	0.310	0.201	0.536	0.000

对角线下方的值为群体间 Nei 遗传距离,对角线上方的值为群体间遗传分化系数 (*Fst*)
The data below the diagonal is Nei genetic distance and above the diagonal is *Fst*

系数最低为 0.016,而中国西北群体与中国华北群体间的遗传分化系数最高为 0.043。群体遗传分化主要存在于群体内部,群体间遗传分化较少。俄罗斯群体与中国东北群体间的遗传距离和遗传分化系数均大于其与中国华北群体间的,中国西北群体与中国华北群体间的遗传距离和遗传分化系数均大于其与中国东北群体间的,而中国华北群体与中国西北群体间的遗传距离和遗传分化系数均大于其与俄罗斯群体间的。除此之外的其他两两群体间的遗传距离和遗传分化与地理距离相关,中国东北群体与其他 3 个群体间的遗传距离和遗传分化与地理距离完全相关。

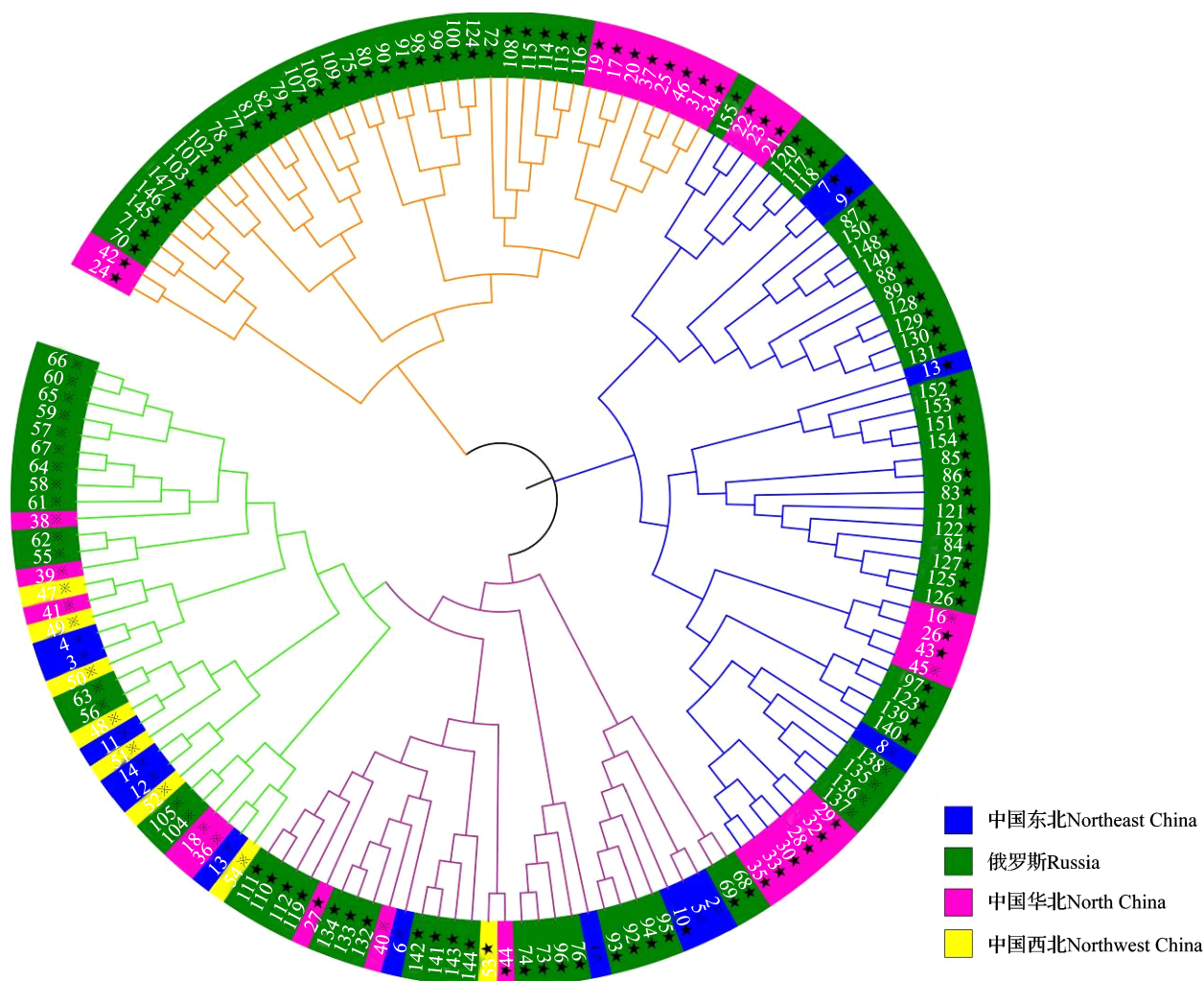
2.4 基于 Nei 遗传距离的聚类分析

基于所有供试材料的 SSR 数据的 Nei 遗传距离进行 NJ 聚类。在遗传距离 0.9167 处,155 份材料可以分成 3 个类群(图 1)。3 个类群间的遗传距离较近,每个类群中包含的各地区的种质数量不同,并没有完全按来源地划分为相应的类群。其中类群 I 包含俄罗斯 30 份以及中国华北地区河北省的 7 份、山西省 1 份和内蒙古自治区 1 份材料;类群 II 包含俄罗斯的 34 份以及中国华北地区河北省的 11 份和山西省 2 份材料、中国东北地区吉林省的 3 份和辽宁省 1 份材料;类群 III 遗传多样性丰富,地区

和省份组成最为复杂,包含俄罗斯的 38 份、中国华北地区河北省 3 份和山西省 5 份、中国东北地区黑龙江省 5 份、吉林省 2 份和辽宁省 4 份以及中国西北地区全部材料。来自俄罗斯和中国华北地区的材料在 3 个类群中均有分布,但在类群 I 和 II 中相对比较集中,中国东北地区的材料分布在类群 II 和 III 中,中国西北地区的材料只分布在类群 III 中。

2.5 群体遗传结构分析

基于 SSR 分子标记数据对 155 份楸子材料进行群体结构分析,设置分析群体数 K 为 1~8,重复 10 次。根据得到的结果(图 2A),随着 K 值的增加,LnP (D)一直上升,无明显的拐点。因此,根据 Evanno 等^[34]的方法,用 ΔK 来确定 K 值,当 K=2 时,ΔK 取得最大值(图 2B)。155 份材料具有 2 个可能的基因来源,不同地区的材料、不同种质的基因混杂程度不同(图 3);155 份材料划分为 2 个类群,不同来源地的材料在群体中均有分布(图 4)。类群 I 包含 45 份材料,类群 II 包含 110 份材料。各个地理区域的材料均有分化,中国西北材料相对分化较少,中国东北材料次之,中国华北和俄罗斯材料分化较多;中国华北地区尤其是来自河北材料与俄罗斯的多数材料基因来源相似。



在黑色分支处划分为 3 个类群,橘色分支为类群 I,蓝色分支为类群 II,紫色和绿色分支为类群 III
 Three groups were divided at black branch, the first part with orange branches is group I, the second part with blue branches is group II, the third part with purple and green branches is group III

图 1 基于 Nei 遗传距离的 NJ 聚类图

Fig. 1 The Neighbor-Joining cluster based on Nei of SSR data

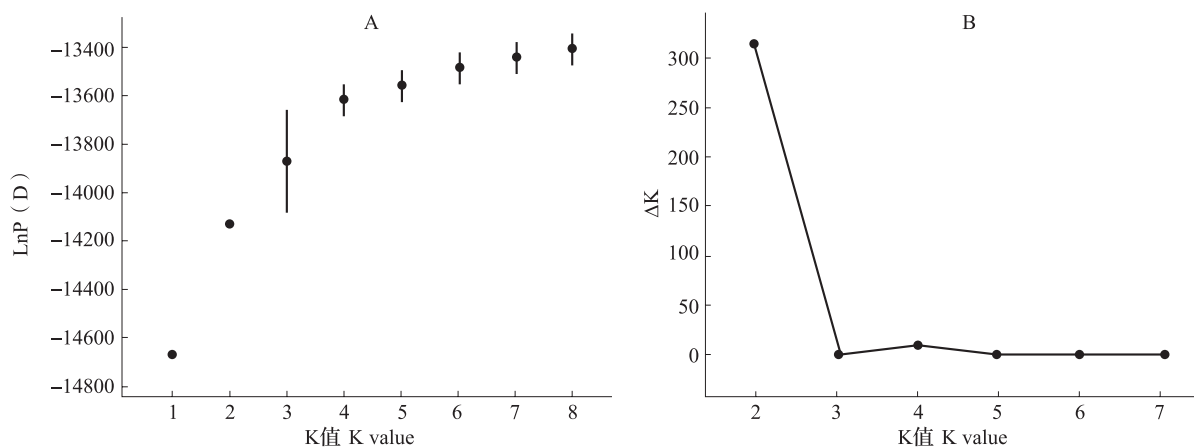


图 2 K 值与 LnP(D)、ΔK 值变化趋势图

Fig. 2 Line chart of K with LnP(D) and ΔK

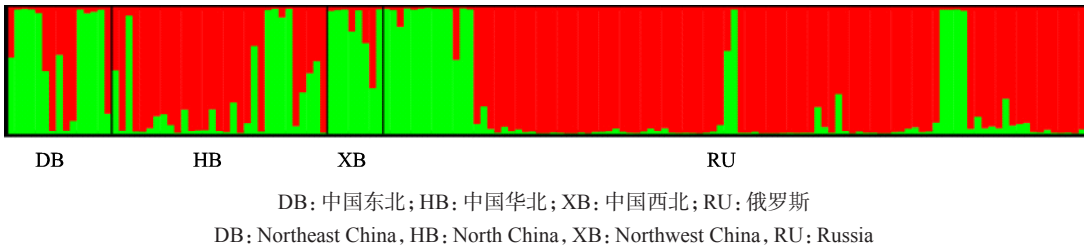
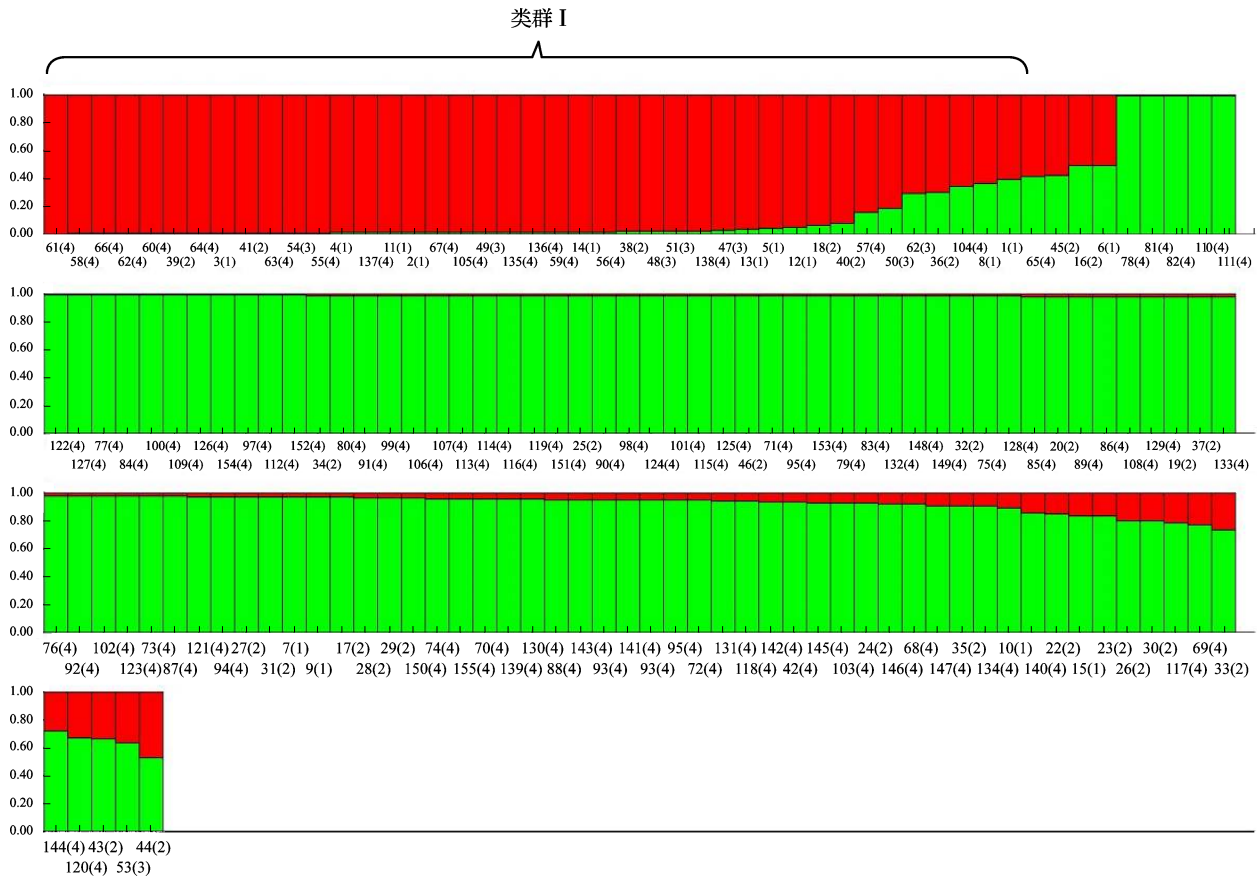


图 3 种质资源的遗传结构分析图
Fig. 3 Analysis on genetic structure



横坐标为试材编号及地理种群编号 (1: 中国东北; 2: 中国华北; 3: 中国西北; 4: 俄罗斯), 纵坐标为 Q 值;
标识部分为类群 I , 剩余部分为类群 II

The abscissa is the code of accessions and populations divided by geographical position
(1: Northeast China, 2: North China, 3: Northwest China, 4: Russia), the ordinate is Q value.
The first part with signs is Group I , and the left part is Group II

图 4 155 份楸子种质资源的分组 (K=2)
Fig. 4 Results of the model based clustering (K=2) of 155 germplasm of *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.

根据计算出来的各个群体中的 Q 值分布, 当某一材料在某群体中的 $Q \geq 0.6$ 时, 认为该材料血缘比较单一, $Q < 0.6$ 则认为该材料拥有混合来源^[37]。本研究有 150 份材料 $Q \geq 0.6$, 说明大部分楸子的血缘相对单一; 仅有 5 份材料拥有混合来源, 仅占 3.23%, 分别是中国东北地区吉林省的 1 份、中国华北地区河北省的 1 份和山西省的 2 份以及俄罗斯的 1 份。在 $Q \geq 0.6$ 的 150 份材料中, 中国东北

材料分属于类群 I 和 II 的数量分别是 11 份和 4 份, 中国华北材料中分属于类群 I 和 II 的数量分别是 7 份和 24 份, 中国西北材料中除 1 份属于类群 II 以外, 其余全部属于类群 I, 俄罗斯材料中分属于类群 I 和 II 的数量分别是 19 份和 82 份。
根据 Structure 分析划分群体结果在 NJ 聚类图 (图 1) 中进行标识, 群体结构分析结果与 NJ 聚类结果相类似。聚类类群 I 和 II 中除 6 份材料外其余

全部落到 Structure 分组类群 II 中, 聚类类群 III 的绿色分支部分全部在 Structure 分组类群 I 中, 紫色分支线部分除 5 份材料外其余全部在 Structure 分组类群 II 中。

3 讨论

多态性等位基因数 (N_a) 是衡量 SSR 位点多态性和群体变异程度高低的重要指标。19 对 SSR 引物在 155 份楸子材料中共扩增出 390 个等位基因, 平均每个位点扩增 20.526 个 ($N_a=20.526$), 高于前人利用 SSR 标记对三叶海棠^[38]、刺梨^[39]、豆梨^[40]和樱桃^[41]等野生果树种质资源进行研究的成果。

平均有效等位基因数 (N_e)、平均香农多样性指数 (I)、平均期望杂合度 (H_e) 等是评价遗传多样性的重要指标。本研究中 155 份楸子种质资源的遗传多样性 ($H_e=0.868$, $I=2.446$, $N_e=9.399$) 高于以往研究的三叶海棠^[38] (*Malus sieboldii* (Ledeb.) M. Roem.) ($H_e=0.699$, $I=1.458$, $N_e=3.954$)、山荆子 (*Malus baccata* (L.) Borkh.) ($H_e=0.3386$, $I=0.4961$, $N_e=1.6021$)^[42]、湖北海棠^[43] (*Malus hupehensis* (Pamp.) Rehder) ($H_e=0.2628$, $I=0.4015$, $N_e=1.4375$)、变叶海棠^[44] (*Malus toringoides* (Rehder) Hughes) ($H_e=0.4389$, $I=0.6282$, $N_e=1.81$) 和新疆野苹果^[45] (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) ($H_e=0.2619$, $I=0.4082$, $N_e=1.4252$), 与苹果属野生种^[46] ($H_e=0.86$, $I=2.07$) 的遗传多样性相接近。一般认为杂合度高于 0.5 的种群没有经过高强度的人工选择, 具有较高的遗传多样性^[47], 本研究中楸子群体杂合度均高于 0.5, 均未经过高强度的人工选择。虽然是属于苹果属植物栽培种, 但供试楸子种质的遗传多样性处于较高的水平。推测原因, 其一是本研究中的楸子材料来源广泛, 地域跨度大, 从中国华北、中国西北到中国东北, 再到俄罗斯而且包含了国外种质资源考察收集的种质; 其二是材料来源比较复杂, 有的是来自于半野生群落, 有的是来自于生产园附近; 其三探究其历史, 其可做栽培品种、可做砧木, 文献记载中很少有野生群落, 但是人为分布极广^[3], 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。但是从其群体结构分析结果看, 其群体的基因来源又比较单纯, 推测只是少数几个遗传多样性较高的种的种间杂交导致的基因互渗。

杂合度观测值和杂合度期望值的相近程度也可以衡量群体的遗传多样性, 它们的值越接近, 群体遗传多样性越高^[47]。期望杂合度与观察杂合度差值

最小的为中国西北群体, 相较于其他群体含有较多的杂合子, 遗传多样性最高; 差值最大的为俄罗斯群体, 遗传多样性水平最低。群体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。本研究中西北群体仅有 8 份材料就表现出最高的遗传多样性, 因此西北地区将是楸子种质资源重点和优先收集区域。

按照 Wright^[48] 的理论, 若群体 F_{st} 值为 0~0.05, 则表明其各亚群间不存在分化。群体间遗传分化系数为 0.016~0.043, 因此, 两两群体间均未发生分化, 群体间的遗传分化与地理距离远近不完全相关。中国东北群体与其他 3 个群体间的遗传距离和遗传分化与地理距离完全相关, 其他两两群体间的遗传距离和遗传分化与地理距离部分相关。值得注意的是, 俄罗斯群体与中国华北群体尤其是河北材料间的遗传距离较近、遗传分化较少, 完全未受到地理距离远近的影响, 因此需要通过进一步的研究探明其原因。通过 NJ 聚类和 Structure 分组划分类群, 群体间遗传距离和类群归属与地理位置不完全相关, 且有 96.77% 的楸子材料血缘相对单一。群体遗传结构的分析可为楸子种质资源的保存提供参考, 为苹果砧木等育种亲本的选择提供理论依据。

参考文献

- [1] 李慧峰. 泰山山区苹果属植物系统学研究. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012: 32
Li H F. Studies on the Taxonomy of the Genus *Malus* Mill. (Rosaceae) of Taiyi-Mountains. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2012: 32
- [2] 冯志学, 王玉国, 邱瑞娟. 苹果不同砧木叶水势及保水力的研究. 山西农业大学学报, 1997, 17(4): 333-334
Feng Z X, Wang Y G, Qiu R C. Studies on water potential and water-holding capacity of leaves in apple tress having different stocks. Journal of Shanxi Agricultural University, 1997, 17(4): 333-334
- [3] 李育农. 苹果属植物种质资源研究. 北京: 中国农业出版社, 2001: 65-67
Li Y N. Researches of Germplasm Resources of *Malus* Mill.. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 65-67
- [4] 钱关泽. 苹果属 (*Malus* Mill.) 分类学研究. 南京: 南京林业大学, 2005: 14-67
Qian G Z. The Taxonomic Study of the Genus *Malus* Mill.. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2005: 14-67
- [5] Williams A H. Chemical evidence from the flavonoides relevant of the classification of *Malus* species. Botanical Journal of the Linnean Society, 1982, 84(1): 31-39
- [6] 王大江, 王昆, 高源, 刘立军, 龚欣. 苹果地方品种花粉形态分类及聚类研究. 植物遗传资源学报, 2016, 17(1): 84-91
Wang D J, Wang K, Gao Y, Liu L J, Gong X. Study on the pollen morphology, taxonomy and clustering of the local varieties of apples. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(1): 84-91

- [7] 肖尊安,成明昊,李晓林. 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, 1989, 11(5): 485-490
Xiao Z A, Cheng M H, Li X L. Fuzzy cluster analysis of *Malus* spp. with isoenzyme profiles. Journal of Southwest Agricultural University, 1989, 11(5): 485-490
- [8] 李育农, 李晓林. 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, 1995, 17(5): 371-377
Li Y N, Li X L. Studies on the pox isoenzyme banding patterns of the genus *Malus* in the world. Journal of Southwest Agricultural University, 1995, 17(5): 371-377
- [9] 陈志娟, 董文轩, 周攀, 魏鑫. 苹果属皱叶矮生型株系及其亲本和后代实生苗的过氧化物酶同工酶特性研究. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 347-350
Chen Z J, Dong W X, Zhou P, Wei X. Study on the characteristics of peroxidase isozyme about wrinkled- leaf dwarfed strains, their parents and offspring in *Malus*. Journal of Plant Genetic Resources, 2007, 8(3): 347-350
- [10] 秦源. 楸子 *SnRK2.4* 基因的克隆、表达和转化研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 11-21
Qin Y. Research on cloning, expression analysis and transformation of *MPSNRK 2.4* gene. Yangling: Northwest A & F University, 2014: 11-21
- [11] 傅明洋. 楸子不同类型抗旱耐盐性评价及遗传差异分析. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013: 15-34
Fu M Y. Drought and salinity tolerance evaluation and characterization of genetic relationships among different biotypes of *Malus prunifolia*. Yangling: Northwest A & F University, 2013: 15-34
- [12] 王顺才, 梁东, 师守国, 马锋旺, 束怀瑞. 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, 2011, 29(5): 75-81
Wang S C, Liang D, Shi S G, Ma F W, Shu H R. 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, 2011, 29(5): 75-81
- [13] 王顺才. 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. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011: 48-90
Wang S C. Study on response mechanism and resistance-related genes expression analysis of two apple rootstocks to drought stress. Yangling: Northwest A & F University, 2011: 48-90
- [14] 李海燕, 耿达立, 牛春东, 李翠英, 管清美. 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, 2018, 46(5): 1-7
Li H Y, Geng D L, Niu C D, Li C Y, Guan Q M. Drought resistance of root system of apple rootstocks *Malus prunifolia* and G935. Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.), 2018, 46(5): 1-7
- [15] 高帆, 梁东, 夏惠, 唐月明, 徐颖欢, 侯帅. 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, 2016, 35(2): 436-441
Gao F, Liang D, Xia H, Tang Y M, Xu Y H, Hou S. Analysis of cloning and expression of dehydrin gene in *Malus prunifolia*. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(2): 436-441
- [16] Zawedde B M, Ghislain M, Magembe E. Characterization of the genetic diversity of Uganda's sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm using microsatellites markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 2015, 62(4): 501-513
- [17] 王昆, 刘凤之, 高源, 王大江, 龚欣, 刘立军. 中国苹果野生种自然地理分布、多型性及利用价值. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1013-1019
Wang K, Liu F Z, Gao Y, Wang D J, Gong X, Liu L J. The natural distribution, diversity, and utilization of wild apple species in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(6): 1013-1019
- [18] 王大江, 王昆, 高源, 赵继荣, 刘立军, 龚欣, 李连文. 我国苹果属资源现代分布调查初报. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1116-1124
Wang D J, Wang K, Gao Y, Zhao J R, Liu L J, Gong X, Li L W. Preliminary investigation of modern distribution of *Malus* resources in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(6): 1116-1124
- [19] Zhang D P, Carbaljulca D, Ojeda L. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweet potato varieties from Latin America and the Pacific region: Its implications on the dispersal of the crop. Genetic Resources and Crop Evolution, 2004, 51(2): 115-120
- [20] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析. 作物学报, 2005, 31(2): 144-149
Hao C Y, Wang L F, Jia J Z, Dong Y C, Zhang X Y. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 144-149
- [21] Cao Y, Tian L, Gao Y, Yuan J, Zhang S. Evaluation of genetic identity and variation in cultivars of *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai from China using microsatellite markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2011, 86(4): 331-336
- [22] 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. 应用 TP-M13-SSR 技术鉴定苹果品种. 果树学报, 2010, 27(5): 833-837
Gao Y, Wang K, Tian L M, Cao Y F, Liu F Z. Identification of Apple Cultivars by TP-M13-SSR Technique. Journal of Fruit Science, 2010, 27(5): 833-837
- [23] 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. TP-M13-SSR 技术及其在苹果种质资源遗传多样性研究中的应用. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 228-233
Gao Y, Wang K, Tian L M, Cao Y F, Liu F Z. TP-M13-SSR technique and its applications in analysis of genetic diversity for apple germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(2): 228-233
- [24] 高源, 刘凤之, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军. 基于 TP-M13-SSR 指纹图谱的中国原产苹果属植物分子身份证的建立. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6): 1290-1297
Gao Y, Liu F Z, Wang K, Wang D J, Gong X, Liu L J. Establishment of molecular identity card for *Malus* Mill. originated from China based on the fingerprints of TP-M13-SSR. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(6): 1290-1297
- [25] Hokanson S C, Szewc-McFadden A K, Lamboy W F, McPerson J R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus* × *domestica* Borkh. core subset collection. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97: 671-683
- [26] Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder C D, Tarchini R, Van De Weg E, Gessler C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus* × *domestica*)

- Borkh.).Molecular Breeding, 2002, 10: 217-241
- [27] Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N.Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai).Molecular Ecology Notes, 2002, 2: 14-16
- [28] Guilford P, Prakash S, Zhu J M, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R.Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94: 249-254
- [29] Peakall R, Smouse P E.GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics, 2012, 28: 2537-2539
- [30] Peakall R, Smouse P E.GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 288-295
- [31] Nei M, Tajima F, Taten Y.Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data.Journal of Molecular Evolution, 1983, 19: 153-170
- [32] Letunic I, Bork P.Interactive tree of life (iTOL)v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees.Nucleic Acids Research, 2016, 8(44): W242-W245
- [33] Prichard J K, Stephens M, Donnelly P.Inference of population structure using multilocus genotype data.Genetics, 2000, 155: 945-959
- [34] Evanno G, Regnaut S, Goudet J.Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study.Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620
- [35] Jakobsson M, Rosenberg N A.CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics, 2007, 23: 1801-1806
- [36] Rosenberg N A.Distruct: a program for the graphical display of population structure.Molecular Ecology Notes, 2004, 4: 137-138
- [37] 吴承来, 张倩倩, 董炳雪, 李圣福, 张春庆. 我国部分玉米自交系遗传关系和遗传结构解析. 作物学报, 2010, 36(11): 1820-1831
- Wu C L, Zhang Q Q, Dong B X, Li S F, Zhang C Q.Genetic relationship and genetic structure of some maize inbred lines in China.Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(11): 1820-1831
- [38] 孙萍, 宗宇, 刘晶, 胡春云, 滕元文. 基于 SSR 标记的清凉峰地区三叶海棠遗传多样性研究. 果树学报, 2013, 30(1): 8-15
- Sun P, Zong Y, Liu J, Hu C Y, Teng Y W.Study on genetic diversity of *Malus sieboldii* in Qingliangfeng region based on SSR markers.Journal of Fruit Science, 2013, 30(1): 8-15
- [39] 张怀山, 鄢秀芹, 鲁敏, 王道平, 安华明. 基于 EST-SSR 标记的贵州野生刺梨居群遗传多样性分析. 中国农业科学, 2017, 50(6): 1098-1108
- Zhang H S, Yan X Q, Lu M, Wang D P, An H M.Analysis of the genetic diversity of wild *Rosa roxburghii* populations in Guizhou province based on EST-SSR marker.Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(6): 1098-1108
- [40] Liu J, Zheng X Y, Daniel P, Hu C Y, Teng Y W.Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang province, China.Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 45: 69-78
- [41] 陈娇, 王小蓉, 汤浩茹, 陈涛, 黄晓姣, 梁勤彪. 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, 2013, 40(2): 333-340
- Chen J, Wang X R, Tang H R, Chen T, Huang X J, Liang Q B.Assessment of genetic diversity and populations genetic structure in wild chinese cherry from Sichuan province using SSR markers.Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(2): 333-340
- [42] 陈曦, 汤庚国, 郑玉红, 王雷宏. 苹果属山荆子遗传多样性的 RAPD 分析. 西北植物学报, 2008, 28(10): 1954-1959
- Chen X, Tang G G, Zheng Y H, Wang L H.RAPD analysis of genetic diversity of *Malus baccata* (L.) Borkh..Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica, 2008, 28(10): 1954-1959
- [43] 陈曦. 湖北海棠 (*Malus hupehensis*) 不同居群变异式样及遗传多样性的研究. 南京: 南京林业大学, 2009: 75
- Chen X.A study on variation patterns and genetic diversity of *Malus hupehensis* populations.Nanjing: Nanjing Forestry University, 2009: 75
- [44] 石胜友. 变叶海棠起源及其遗传多样性分化研究. 重庆: 西南大学, 2005: 78-86
- Shi S Y.Studies on the origin and differentiation of genetic diversity in *Malus toringoides*.Chongqing: Southwest University, 2005: 78-86
- [45] Zhang C Y, Chen X S, He T M, Liu X L, Feng T, Yuan Z H.Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers.Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(10): 947-955
- [46] Gharghani A, Zamani Z, Talaie A, Oraguzie N C, Fatahi R, Hajnajari H, Wiedow C, Gardiner S E.Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis.Genetic Resources and Crop Evolution, 2009, 56(6): 829-842
- [47] 姜晓辉, 方开星, 陈栋, 吴华玲. 基于 EST-SSR 毛细管电泳荧光标记技术分析广东 2 个历史名茶群体遗传多样性. 热带作物学报, 2018, 39(1): 46-54
- Jiang X H, Fang K X, Chen D, Wu H L.Genetic diversity and relationship of two historical famous camellia sinensis groups in Guangdong by capillary electrophoresis detection with fluorescent EST-SSR marker.Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(1): 46-54
- [48] Wright S.Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations.Chicago: The University of Chicago Press, 1978: 4