

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01475

9 个野生中国樱桃群体叶绿体 DNA *trnQ-rps16* 序列变异及其遗传结构分析

陈涛¹, 王小蓉^{1,2}, 罗华³, 王春涛³, 张家志³, 罗明敏⁴

1. 四川农业大学园艺学院, 雅安 625014;
2. 四川农业大学果蔬研究所, 成都 611130;
3. 四川省石棉县农业局经济作物站, 石棉 625400;
4. 四川省石棉县农业局植保站, 石棉 625400

摘要: 中国樱桃(*Cerasus pseudocerasus* Lindl.)是我国古老的具有较高经济价值的栽培果树之一, 个别性状突出的野生中国樱桃是对现有栽培品种进行遗传改良的重要资源。四川野生中国樱桃资源丰富, 为了明确该地区野生中国樱桃群体的遗传多样性和遗传结构, 文章对 9 个野生中国樱桃群体(其中 7 个分布四川, 2 个来自陕西和贵州)共 145 个个体的叶绿体基因间隔区 *trnQ-rps16* 序列进行了测定和分析。结果表明: 9 个群体 145 个个体的 *trnQ-rps16* 序列比对后共检测到 13 个多态位点, 占位点总数的 1.87%, 其中 3 处碱基替换, 10 处插入/缺失。9 个群体总的遗传多样性水平较低($h=0.562$, $\pi=0.00184$), 相对于其他地区的 2 个群体($h=0.733$; $\pi=0.00243$), 四川的 7 个群体表现出更低的遗传多样性水平($h=0.544$; $\pi=0.00203$), 且群体间的遗传多样性水平存在较大差异($h=0-0.708$; $\pi=0-0.00298$), 其中北川桃龙群体最高($h=0.708$, $\pi=0.00298$), 而峨眉群体最低($h=0.000$, $\pi=0.000$)。群体内低的遗传多样性可能与群体的边缘性所产生的奠基者效应以及近期群体收缩和随机遗传漂变造成的瓶颈效应导致群体内遗传多样性丢失有关。此外, 9 个群体遗传分化水平较低, 平均 F_{ST} 为 0.21573。分析认为主要是由于野生中国樱桃较强的种子传播能力增加了群体间的基因流动而导致遗传分化不明显, 也可能与野生中国樱桃较长的世代周期有关。针对上述研究结果, 建议在资源保护中采取减少群体数目而加大群体内的个体数量的保护策略。

关键词: 野生中国樱桃; 叶绿体 DNA; 序列变异; 遗传多样性; 遗传结构

Chloroplast DNA *trnQ-rps16* variation and genetic structure of nine wild Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) populations

CHEN Tao¹, WANG Xiao-Rong^{1,2}, LUO Hua³, WANG Chun-Tao³, ZHANG Jia-Zhi³, LUO Ming-Min⁴

1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

收稿日期: 2012-08-31; 修回日期: 2012-10-16

基金项目: 四川省教育厅重点培育专项(编号: 2011A005)资助

作者简介: 陈涛, 硕士研究生, 专业方向: 果树种质资源与遗传育种。E-mail: taochen3530@gmail.com

通讯作者: 王小蓉, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 果树种质资源与遗传育种。E-mail: wangxrtj@163.com

网络出版时间: 2012-10-30 09:45:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121030.0945.002.html>

2. Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

3. Economic Crop Unit, Agricultural Bureau of Shimian, Shimian 625400, China;

4. Plant Protection Unit, Agricultural Bureau of Shimian, Shimian 625400, China

Abstract: Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) is one of the most economically domestic fruit trees in China. The rich variation of wild Chinese cherry is the most important breeding resource for existing cultivars. In order to reveal the levels and distribution of genetic variation within wild Chinese cherry of Sichuan Province, China, where is rich in wild Chinese cherry, the sequence variation of chloroplast DNA *trnQ-rps16* intergenic spacer was analyzed in 145 individuals of all nine existing populations (seven from Sichuan, two from Shanxi and Guizhou provinces) of China. The results showed that *trnQ-rps16* sequence were aligned with 13 polymorphic sites (1.87%), including 3 substitutions and 10 indels in 145 individuals, which revealed a low level of genetic diversity ($h=0.562$, $\pi=0.00184$). Compared to other regions ($h=0.733$, $\pi=0.00243$), a rather lower genetic diversity ($h=0.544$, $\pi=0.00203$) was found in the populations from Sichuan, and a large scale of genetic diversity among the seven populations was detected ($h=0.708$; $\pi=0.00298$), ranging from EM ($h=0.000$, $\pi=0.000$) to TL ($h=0.708$, $\pi=0.00298$). The low genetic diversity of populations may be strongly affected by founder effect and bottleneck effect because of the marginal nature, recent reduction, and consequent genetic drift of these populations. In addition, a fairly low genetic differentiation ($F_{ST}=0.21573$) was found among the studied populations. This suggest that gene flow seems to originate from pronounced seed dispersal abilities of the species and it may play a significant role in shaping such a genetic structure. The long generation cycle of the species may also contribute to this structure. Based on these findings, a conservational plan for sampling or preserving fewer populations but more individuals from each population for the species was proposed.

Keywords: wild Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.); chloroplast DNA; sequence variation; genetic diversity; genetic structure

中国樱桃(*Cerasus pseudocerasus* Lindl.)隶属蔷薇科Rosaceae李亚科Prunoideae樱属*Cerasus*, 起源于我国, 其栽培历史已达3 000余年之久, 是我国古老的具有较高经济价值的栽培果树之一^[1~3]。在中国西南地区, 尤其是四川, 野生中国樱桃资源丰富且个别性状突出。由于野生中国樱桃中蕴含着在未来樱桃育种中极具潜力的独特基因, 是对栽培樱桃进行品种改良的宝贵的基因资源, 也是我国重要的植物遗传资源^[4]。因此, 对野生中国樱桃的研究与保护已经开始引起国内外的重视^[4,5]。

近些年我们对野生中国樱桃资源的考察发现, 由于人类活动频繁和对森林的大量砍伐, 许多野生中国樱桃群体已经消失, 野生中国樱桃天然群体已因生态环境的严重破坏而处于濒危状态。因此, 开展中国樱桃种质资源研究, 评估野生群体遗传多样性和群体遗传结构, 为制定科学有效的樱桃资源保护策略提供重要参考。然而, 迄今国内外对樱桃资源的研究主要集中在利用形态学或分子标记对欧洲甜樱桃和栽培中国樱桃品种的遗传变异评价、种质

资源的分类与鉴定等方面^[6~10]。对野生中国樱桃遗传多样性及群体遗传结构研究的报道仅见于基于ISSR^[4]和PCR-RFLP^[5]等方法, 所涉及的群体的样本量较小, 且来自四川的群体数目则更少。而四川位于青藏高原边缘地带, 地形地貌结构复杂, 生态气候类型多样化, 是许多物种的多样性分布中心, 野生樱桃资源也尤为丰富^[3]。因此, 采取合适的研究方法较全面地对该地区丰富野生中国樱桃资源遗传多样性与群体遗传结构的研究, 不论对保护该地区群体, 维持整个物种基因库的完整性还是探讨整个物种的进化历史及系统发育关系都具有十分重要的意义。

叶绿体DNA为母系遗传, 进化过程中不经历重组, 很少受到选择压力能很好的反映群体的系统进化和发育过程, 其非编码序列由于进化速率较快, 能提供较多的具有系统学意义的信息位点是目前研究物种天然群体遗传结构及进化过程十分有效的方法, 已被广泛应用于较多的物种中^[11,12]。

本研究利用具有较快进化速率的叶绿体基因间

隔序列 *trnQ-rps16*, 对我国现存面积较为集中, 分布在人为活动较为频繁区域的四川范围的 7 个以及其他分布区的 2 个天然野生中国樱桃群体进行研究, 旨在了解该范围内野生中国樱桃的遗传多样性及其群体遗传结构, 为制定相应的保护策略和探讨该物种的系统进化过程提供一定的科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

在进行野生樱桃资源全面考察的基础上, 对分布于四川的 7 个及陕西和贵州的 2 个天然野生中国樱桃群体进行样品采集, 采样点及地理位置见表 1。每个群体依据群体大小以株为单位进行随机采样, 株间距大于 50 m, 采集幼叶用变色硅胶迅速干燥带回实验室保存备用。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定

硅胶干燥的叶片采用改良的CTAB法^[4]提取总基因组DNA。PCR引物序列依据Shaw等^[12]所述, 分别为 *trnQ*(5'-GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC-3') 和 *rps16*(5'-GTTGCTTTY TACCCTCACATCGTTT-3')。扩增反应在 50 μ L反应体系中进行, 包括以下成分(浓度均为终浓度): 10 \times PCR buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8; 50 mmol/L KCl; 1.5 mmol/L EDTA)4.0 μ L、MgCl₂(25 mmol/L)2.4 μ L、dNTP mix(10 mmol/L) 2.8 μ L、正反引物各 3.5 pmol/L、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 预变性 4 min, 94 变性 45 s, 53 复性 90 s, 72 延伸 70 s, 共 32 个循环最后 72 延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 割取目的条带, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒

(上海生工)进行纯化, 纯化产物送至深圳华大基因研究院测序。测序引物为扩增引物, 利用正反向引物分别对两条链进行测序。

1.3 数据分析

利用DNASTAR5.0 中的SeqMan程序进行正反链的拼接。利用ClustalX 1.8.1^[13]对拼接好的序列进行对比, 并对照Chromas序列图谱进行误读点的人工校正。参照Caicedo和 Schaal^[14]的方法, 对于长度大于 1 bp的插入/缺失按 1 bp处理为第 5 碱基并进行重新编码。利用DnaSP ver.5.1^[15] 参考Nei^[16]的计算方法分别对四川群体、其他地区群体及总群体的单倍型个数(H)、分离位点数目(S)、单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)^[17]等进行计算。

用Arlequin version3.0 软件包^[18]计算两两群体间遗传差异指数(*F*_{st}), 利用分子变异分析(AMOVA)^[19]分别估算全部群体和四川群体间和群体内的遗传变异对总变异的贡献以及分子变异统计的群体间遗传分化固定指数(*F*_{ST})。

利用MEGA5 软件中的Kimura 2-parameter(K-2P)模型^[20]计算群体间的遗传距离, 通过 1 000 次重复的自展程序进行标准误的检测, 并采用邻接N-J (Neighbor-Joining)法构建基于K-2P距离的群体聚类图。采用软件Network 4.2.0.1^[21]中的最大简约标准^[22]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。

2 结果与分析

2.1 序列变异及单倍型分布分析

对 9 个野生中国樱桃群体 145 个个体的叶绿体基因间隔区 *trnQ-rps16* 片段进行序列测定, 其核苷

表 1 9 个野生中国樱桃群体的采样点及地理位置

群体代号	群体来源地	纬度	经度	海拔(m)	样本量
XC	四川西昌	27°17'	102°13'	1878	4
EM	四川峨眉	29°57'	103°45'	541	5
QC	四川青川	32°24'	104°48'	1141~1264	21
SM	四川石棉	29°26'	102°10'	1243~2325	10
YC	四川雨城	30°01'	102°98'	688~1432	20
GX	四川北川桂溪	32°00'	104°38'	726~1014	43
TL	四川北川桃龙	31°59'	104°07'	1445~1683	32
SN	陕西商南	33°46'	110°85'	445	5
GY	贵阳百花湖	26°39'	106°31'	1200	5

酸碱基变化范围为 693~739 bp, 比对后序列长度为 753 bp。该区段的核苷酸构成富含 AT 碱基, 其含量占总核苷酸碱基的 73.6%。145 条序列比对后共检测到 13 个多态位点, 位点总数的 1.87%, 其中 3 处碱基替换, 10 处插入/缺失, 在 447~480 bp 中间有 32 bp 的插入/缺失(表 2)。13 个核苷酸变异位点共得到 13 个叶绿体单倍型, 其中单倍型 H1 为 9 个群体中的 92 个个体所共有, 是分布最广的也是所有群体遗传

构成最主要的单倍型。单倍型 H4 次之, 为 7 个群体的 26 个个体所共有。单倍型 H12 为 10 个个体所共有, 但只分布在位于四川北部的北川桃龙(TL)和广元青川(QC)群体中。5 个个体共有的单倍型 H5 分布于雅安雨城(YC)和 广元青川(QC)群体, 4 个个体共有的单倍型 H6 只分布于北川桃龙(TL)群体中。其他单倍型(61.5%)为单一单倍型, 分布于不同群体中(图 1)。

表 2 野生中国樱桃 13 个单倍型比对后的序列差异位点(以 H1 为基准)

单倍型	多态位点													GenBank 登录号
	441	447	516	518	524	525	526	530	546	553	630	661	689	
H1	A	#	-	-	-	-	&	AA	C	A	-	+	-	JQ082198
H2	*	.	.	JQ082210
H3	C	.	.	*	JQ082209
H4	.	.	AT	C	.	.	.	JQ082200
H5	T	.	AT	C	.	.	.	JQ082201
H6	.	.	AT	C	.	.	*	JQ082207
H7	A	A	.	.	.	C	.	.	.	JQ082206
H8	A	.	.	.	C	.	.	.	JQ082205
H9	.	-	-	.	.	C	.	.	.	JQ082203
H10	-	.	.	C	.	.	.	JQ082204
H11	.	.	AT	.	.	.	-	.	.	C	.	-	.	JQ082202
H12	.	.	AT	.	.	.	-	-	.	C	.	.	.	JQ082199
H13	.	.	AT	\$	G	C	.	.	.	JQ082212

注 :圆点表示该位点核苷酸同单倍型 H1; -代表缺失; # :CGTATGCGTGTATTGTAAGTAGATTAAATTT; \$:ATATAT; & :AAAA; * : TTTATT; + : TTATT; * : GATAATAT。

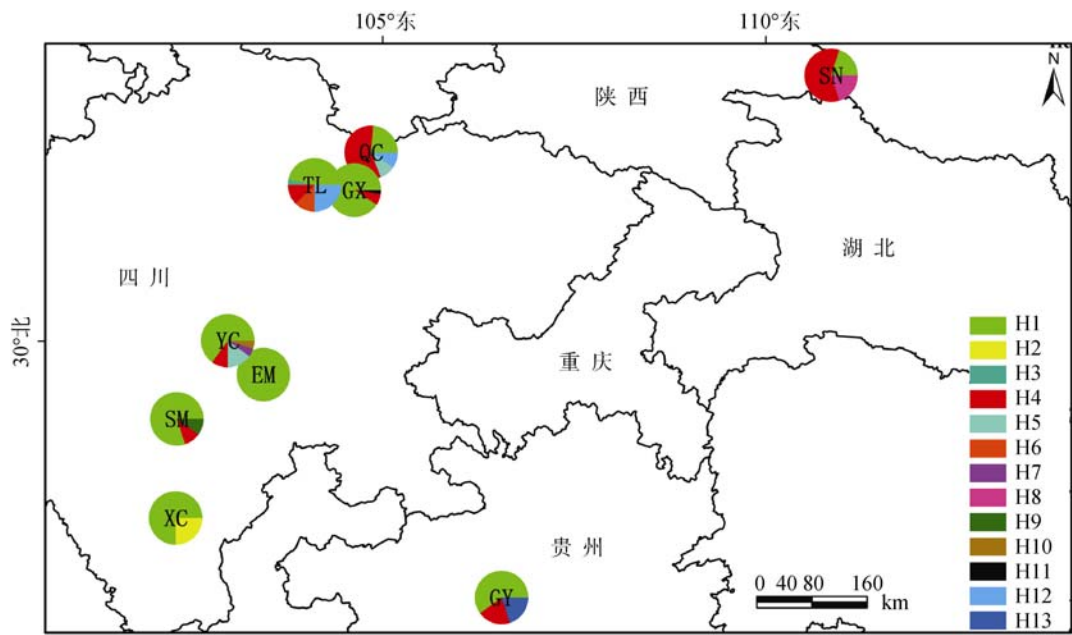


图 1 9 个野生中国樱桃群体的叶绿体单倍型分布图
饼图代表各单倍型在该群体中的分布比例, 群体代号同表 1, 标注框内不同的颜色代表不同的单倍型。

2.2 遗传多样性分析

从反映群体遗传多样性两个指标单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)数据结果(表 3)表明:9 个群体总的遗传多样性较低($h=0.562$, $\pi=0.00184$), 其中四川的 7 个群体总的单倍型多态性和核苷酸多样性分别为 $h=0.544$ 和 $\pi=0.00203$ 。对于四川的 7 个群体来说, 遗传多样性变化范围为 $h=0-0.708$, $\pi=0-0.00298$, 其中北川桃龙(TL)群体的单倍型多态性($h=0.708$)和核苷酸多样性($\pi=0.00298$)最高, 而峨眉群体(EM)则最低($h=0.000$; $\pi=0.000$)。另 2 个省外群体陕西商南(SN)和贵阳(GY)群体具有相对较高的遗传多样性, 分别为 $h=0.7$ 和 $\pi=0.00201$ 以及 $h=0.7$ 和 $\pi=0.00287$ 。

2.3 群体遗传结构分析

对所有 9 个群体两两群体间遗传分化分析(表 4)表明, 两两群体间的遗传分化系数(F_{st})变化范围为

0.009 ~ 0.5862, 其中北川桂溪(GX)群体和陕西商南(SN)群体间遗传分化 $F_{st}=0.5862(P=0.0000)$ 最大, 达到极显著水平。单就四川的 7 个群体而言, 来自四川北部的青川(QC)和桃龙(TL)群体与其他群体间的遗传分化较大, 多数达到极显著水平($P=0.0000$), 其中与桂溪(GX)群体的分化最大。

分子变异分析(AMOVA)结果(表 5)表明, 本研究涉及的 9 个群体, 其群体间的遗传分化不明显, 群体间遗传分化固定指数 $F_{ST}=0.21573(P=0.0000)$ 较低。其遗传变异主要存在于群体内部, 占 78.43%, 而群体间的遗传变异只有 21.57%。单就四川的 7 个群体而言, 也表现出类似的遗传分化, 其遗传分化固定指数为 $F_{ST}=0.23051(P=0.0000)$, 其中有 76.95%的遗传变异存在于群体内部, 群体之间的遗传变异只有 23.05%。

基于最大简约标准的单倍型网络中介图(图 2)

表 3 9 个野生中国樱桃群体的遗传多样性指数

代号	样本量(n)	单倍型数(H)	分离位点数(S)	单倍型多样性(h)	平均变异(K)	核苷酸多样性(π)
XC	4	2	1	0.5	0.5	0.00072
EM	5	1	0	0	0	0
QC	21	4	5	0.629	1.305	0.00187
SM	10	3	4	0.378	0.956	0.00137
YC	20	5	6	0.568	1.442	0.00207
GX	43	3	4	0.176	0.439	0.00063
TL	32	5	5	0.708	2.007	0.00298
四川群体	135	11	11	0.544	1.416	0.00203
SN	5	3	3	0.7	1.4	0.00201
GY	5	3	4	0.7	2	0.00287
其他群体	10	4	5	0.733	1.689	0.00243
总群体	145	13	13	0.562	1.442	0.00184

表 4 野生中国樱桃两两群体间的遗传分化系数 F_{st} (对角线下)及其相应的 P 值(对角线上)

群体代号	XC	EM	QC	SM	YC	GX	TL	GY	SN
XC		0.4775	0.0000	0.5045	0.2162	0.1802	0.0631	0.2252	0.0451
EM	0.0625		0.0000	0.9910	0.3964	0.9901	0.1081	0.4685	0.0721
QC	0.4719**	0.4921**		0.0000	0.0000	0.0000	0.0541	0.1081	0.7027
SM	0.0179	0.0462	0.3670**		0.3784	0.5225	0.0360	0.3153	0.0540
YC	0.0577	0.0526	0.2187**	0.0090		0.0090	0.0451	0.4414	0.1802
GX	0.0441	0.0730	0.5544**	0.0090	0.1090**		0.0000	0.0180	0.0000
TL	0.1958	0.2032	0.0699	0.1287*	0.0871*	0.2911**		0.2252	0.2703
GY	0.0842	0.1429	0.1314	0.0411	0.0165	0.2840*	0.02413		0.4955
SN	0.4629*	0.5625	0.0548	0.3167	0.1200	0.5862**	0.01984	0.0106	

注: 群体代号同表 1; *: 核苷酸替换显著性检验 $P<0.05$; **: 核苷酸替换显著性检验 $P<0.01$, 用加粗黑色字体标注的是遗传分化显著的 F_{st} 值。

表 5 基于叶绿体序列的野生中国樱桃各群体的分子变异分析(AMOVA)及相应的固定指数

群体来源	变异来源	自由度	平方和	变异组成	变异所占百分比	固定指数
总群体	群体间	8	24.047	0.16342	21.57**	$F_{ST}=0.2157$ ($P=0.0000$)
	群体内	136	80.794	0.59408	78.43**	
	总变异	144	104.841	0.75749		
四川群体	群体间	6	21.665	0.1713	23.05**	$F_{ST}=0.2305$ ($P=0.0000$)
	群体内	128	73.194	0.57183	76.95**	
	总变异	134	94.859	0.74313		

注：**表示核苷酸替换显著性检验 $P<0.01$ 。

分析表明, 13 个叶绿体单倍型构成一个浅星型基因树。为 24 个个体所共有的单倍型 H4, 位于网络图的中心, 为古老单倍型。该古老单倍型主要包含采自四川北部的青川(QC: 46%)、桃龙(TL: 15%)和桂溪(GX: 11%)群体, 共占该单倍型总个体数的 73%, 其外部节点单倍型(H3、H5、H6、H11 和 H12)也都分布于这 3 个群体中。因此, 青川(QC)、桃龙(TL)和桂溪(GX)3 个群体可能是较为古老的群体。而为 92 个个体所共有的单倍型 H1 位于网络图的较外部节点, 是较为年轻的单倍型(图 2)。

基于 K-2P 遗传距离的 N-J 聚类分析表明, 本研究中的 9 个群体首先被分为两个比较大的分支,

其中四川北部的桃龙(TL)和青川(QC)群体与陕西商南(SN)群体聚为一支, 说明这 3 个群体与其他群体的遗传距离较大。而包括贵阳(GY)在内的其它 6 个群体聚为另一支, 其中贵阳(GY)群体与其余 5 个四川群体分支较远, 遗传距离较远(图 3)。

3 讨论

3.1 野生中国樱桃的遗传多样性

叶绿体基因组作为独立的遗传单位, 不经历遗传重组, 受到的选择压力小, 能直接反映植物在长期的进化过程中积累的遗传变异 [23], 特别是其非

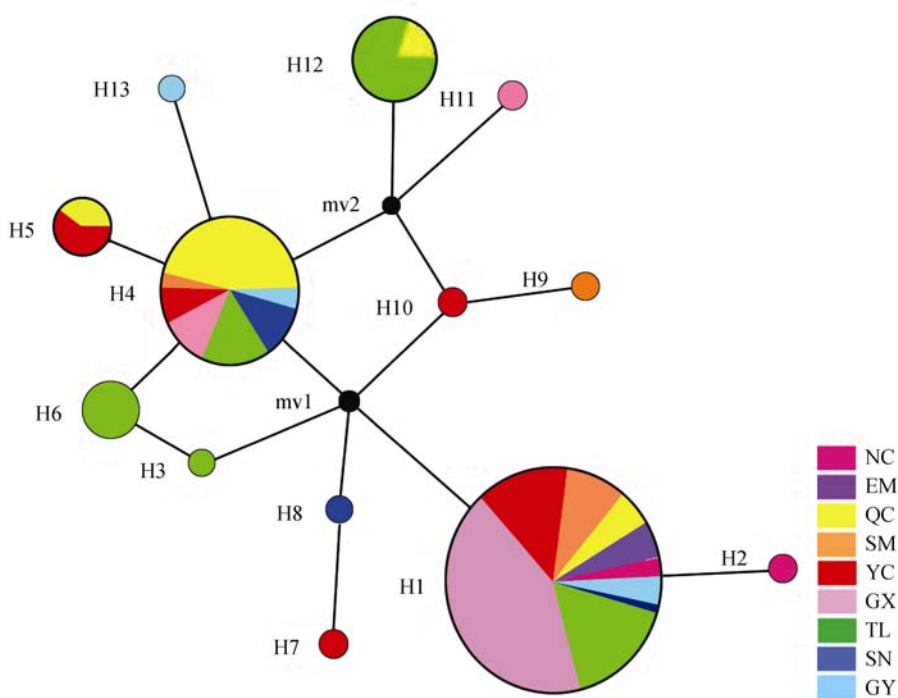


图 2 野生中国樱桃 9 个群体的单倍型网络中介图

圆圈大小代表单倍型频率, H1-H13 代表 13 个单倍型, mv1 和 mv2 表示两个缺失单倍型, 标注框内不同的颜色代表不同的群体。

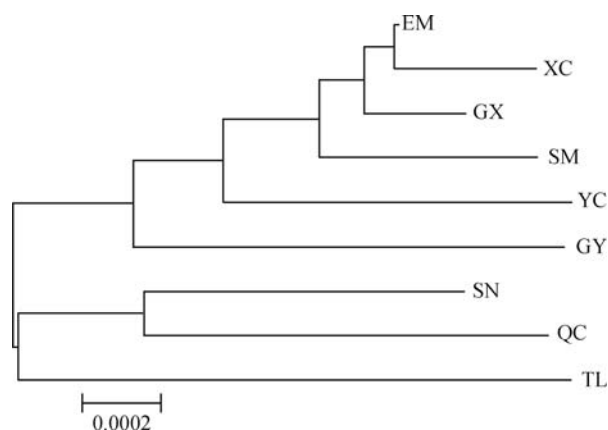


图 3 基于 K-2P 遗传距离的 9 个野生中国樱桃群体的 NJ 聚类图 (群体代号同表 1)

编码区段, 由于具有较快的进化速率, 能区分出种内多种单倍型, 非常适合近缘种间和种内的亲缘关系和遗传多样性研究^[24]。在本研究中, 基于叶绿体基因间隔区 *trnQ-rps16* 序列变异的分析表明, 9 个野生中国樱桃群体其遗传多样性水平较低, 四川的 7 个群体遗传多样性水平更低。此与已发表的基于 ISSR^[4]、RAPD^[9] 等核基因分子标记技术的研究具有较高遗传多样性结果不相一致。这可能与叶绿体基因组的属性有关, 叶绿体基因组是单倍化的细胞质基因组, 它所反映的有效群体大小与核基因组的相比, 远小于核基因, 约是核基因的一半左右^[25], 因此, 随着群体收缩, 有效群体大小的减小, 进化过程中的随机遗传漂变和瓶颈效应对叶绿体基因组的影响比核基因组剧烈很多, 叶绿体基因组所反映的遗传多样性的丢失也会更严重^[23,26,27], 从而表现出较低的遗传多样性水平。

另一方面, 四川作为中国樱属植物的起源中心和多样性分布中心之一, 分布近 2/3 樱属种类, 野生中国樱桃分布广且多样性丰富^[1-3]。然而, 本研究涉及的 7 个四川野生中国樱桃群体却表现出较低的遗传多样性水平, 这可能由于本研究涉及的 7 个群体是野生中国樱桃多样性分布中心具有边缘性的一个亚基因库, 它们可能仅由少量的奠基者从遗传多样性中心扩散形成, 遗传背景受到“奠基者效应”的剧烈影响而较为单一。此外, 长期的人类活动, 使得在该分布范围内的群体数量急剧减少, 群体收缩严重。据近几年我们的野外调查, 以前分布于西昌、石棉、峨眉等地的大片的山林由于人类的开垦和砍

伐现已呈零星分布, 特别是北川桂溪、桃龙等地的具有上百年树龄的野生古樱也被大规模砍伐, 导致有效群体大小严重减小, 随机遗传漂变加剧, 造成了遗传多样性的丢失, 从而使得研究群体的遗传多样性较低。

3.2 野生中国樱桃群体遗传结构

对野生中国樱桃群体遗传结构的 AMOVA 分析表明, 分布在四川的 7 个群体的遗传分化指数为 $F_{ST}=0.23051$ ($P=0.0000$), 有 76.95% 的遗传变异存在于群体内部, 群体的间的遗传变异也相对较低 (23.05%), 与所有 9 个群体 $F_{ST}=0.21573$ ($P=0.0000$) 相近, 均表现出较低的遗传分化水平。该研究结果与其他有关樱属植物群体遗传分化的研究结果一致, 如 Jordano 等^[28] 利用 RAPD 对马哈利樱桃群体的研究、Tsuda 等^[29] 利用 SSR 对日本野生山樱群体的研究和 Kato 等^[30] 利用多种方法 (叶绿体 DNA 序列、AFLP 和 SSR) 对日本晚樱群体的研究均表明群体间遗传分化水平较低, 且绝大多数的遗传变异存在于群体内部。这些研究均认为此可能与以果实为生的鸟类和动物的长距离种子传播能力以及研究对象具有较长的世代周期有关^[28-30]。比如具有较长的世代周期的多年生木本植物, 从最后一次冰期结束至今, 其繁衍的后代数相对于其他一年生植物来说较为有限, 群体间积累的遗传变异不足以产生明显的遗传分化。但有一个例外的报道, Li 等^[4] 在利用 ISSR 标记研究报道了分布于我国的 10 个野生中国樱桃群体共 80 个体群体之间具有较高遗传分化。此差异可能与采样群体的地理分布、群体样本量、研究所选用标记的类型以及采用的分析统计手段有关^[31,32]。特别是 ISSR 标记属性和单个群体的样本量以及有效群体的代表性, 可能会直接影响到对群体遗传结构的评价^[33]。

此外, 值得注意的是, 四川野生中国樱桃群体的叶绿体 DNA 的空间分布表现出了比较独特的遗传分化模式, 如分布于四川北部的广元青川 (QC) 和北川桃龙 (TL) 群体不仅表现出较高的遗传多样性水平, 而且与其他群体间的遗传分化也较大。单倍型网络中介图表明, 单倍型 H4 分布于网络图的中心, 为古老单倍型, 而来自四川北部的青川 (QC: 46%)、桃龙 (TL: 15%) 和桂溪 (GX: 11%) 群体的个体数占该

单倍型总个体数的 73%，其外部节点单倍型(H3、H5、H6、H11 和 H12)都分布于这 3 个群体中，呈星状分布。遗传距离聚类分析也表现出类似的分布特性。说明这 3 个群体可能是较为古老的群体，很可能是野生中国樱桃的起源中心和多样性分布中心。然而，在这 3 个群体中桂溪(GX)群体却表现出较低的遗传多样性水平，且与其他两个群体间具有较高的遗传分化，对于在较小的地理区域内群体间却表现出高的遗传分化的可能原因是：四川北部地处秦岭与青藏高原边缘地区的接壤地，是物种多样性分布地之一，其地理位置恰好处于龙门山地震带，历史上频繁的地质运动可能会使这些群体的分布产生一定的变化，群体间可能会产生较多的地理屏障，对群体间的基因交流产生较大的影响。

3.3 野生中国樱桃资源保护和进一步应做的工作

边缘群体的保护是进行野生中国樱桃基因库保护的关键^[32]。本研究结果表明，绝大多数的遗传变异存在于群体内部，单倍型频率在群体内有较大差异，而且低频率单倍型占大多数，而低频率单倍型很可能是由于群体收缩以及随机遗传漂变而导致的群体内遗传多样性丢失的结果。因此，基于上述该研究结果，我们认为在异地保护时建议减少群体数目而加大群体内个体的取样力度，特别是对具有较高遗传多样性的群体和具有低频率单倍型的群体应优先采用此保护策略。

本研究利用叶绿体基因间隔区[1~4]，其中可能蕴含很高的野生中国樱桃资源多样性和复杂的遗传结构，期待我们发掘。因此，我们进一步的工作应在大规模资源调查的基础上，尽可能收集人类活动较少，生态气候类型复杂的川西高原地区具有代表性的群体样本，考虑采用单拷贝核基因DNA序列与一定长度的具有较快进化速率的叶绿体DNA 序列相结合的方法进行野生中国樱桃的遗传多样性和遗传分化研究，这对于我们更进一步的明确野生中国樱

桃现有的遗传多样性和群体遗传分化模式以及中国樱桃甚至樱属植物的起源中心提供更可靠的依据。

参考文献(References):

- [1] 俞德浚, 李朝奎. 中国植物志 (第 38 卷). 北京: 科学出版社, 1986: 41–89. DOI
- [2] 俞德浚. 中国果树分类学. 北京: 农业出版社, 1979: 63–81. DOI
- [3] 董玉琛, 刘旭. 中国作物及其野生近缘植物 (果树卷). 北京: 中国农业出版社, 2008: 32–39. DOI
- [4] Li MM, Cai YL, Qian ZQ, Zhao GF. Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl., and its implications for conservation. *Genet Resour Crop Evol*, 2009, 56(4): 455–464. DOI
- [5] 曹东伟, 蔡宇良, 杨娟, 赵桂仿. 中国樱桃的PCR-RFLP分析. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007, 35(5): 173–178. DOI
- [6] 王贤荣, 向其柏. 樱属植物叶腺体形态研究及其在分类中的意义. 南京林业大学学报, 1997, 21(4): 63–67. DOI
- [7] 周丽华, 韦仲新, 吴征镒. 国产蔷薇科李亚科的花粉形态. 云南植物研究, 1999, 21(2): 207–211. DOI
- [8] 雷海清. 樱属花粉形态研究. 亚热带植物科学, 2001, 30(4): 14–17. DOI
- [9] 蔡宇良, 李珊, 曹东伟, 钱增强, 赵桂仿, 韩明玉. 利用DNA扩增片段序列对樱桃种质资源的遗传分析. 园艺学报, 2006, 33(2): 249–254. DOI
- [10] 宋常美, 文晓鹏, 杨尔泰. 贵州樱桃种质资源的ISSR分析. 园艺学报, 2011, 38(8): 1531–1538. DOI
- [11] Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol Ecol*, 2005, 14(3): 689–701. DOI
- [12] Shaw J, Lickey BE, Schilling EE, Small RL. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose non-coding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the Tortoise and the Hare III. *Am J Bot*, 2007, 94(3): 275–288. DOI
- [13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882. DOI
- [14] Caicedo AL, Schaal BA. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Mol Ecol*, 2004, 13(7): 1871–1882. DOI
- [15] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*,

- 2009, 25(11): 1451–1452. [DOI](#)
- [16] Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987. [DOI](#)
- [17] Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, ed. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press, 1969: 21–132. [DOI](#)
- [18] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, 2005, 1: 47–50. [DOI](#)
- [19] Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1992, 131(2): 479–491. [DOI](#)
- [20] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16(2): 111–120. [DOI](#)
- [21] Forster P, Bandelt HJ, Röhl A. Network 4.2.0.1. Software available free at www.fluxus-engineering.com. Fluxus Technology Ltda, 2004. [DOI](#)
- [22] Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37–48. [DOI](#)
- [23] Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol*, 1998, 7(4): 465–474. [DOI](#)
- [24] Liu Y, Yang SX, Ji PZ, Gao LZ. Phylogeography of *Camellia taliensis* (Theaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary history and conservation. *BMC Evol Biol*, 2012, 12: 92. [DOI](#)
- [25] Birky CW Jr. Evolution and variation in plant chloroplast and mitochondrial genomes. In: Gottlieb LD, Jain SK, eds. Plant evolutionary biology. London: Chapman and Hall, 1988: 23–53. [DOI](#)
- [26] Ennos RA, Sinclair WT, Hu XS, Langdon A. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth PM, Batsman RM, Gornall RJ, eds. Molecular Systematic and Plant Evolution. London: Taylor and Francis, 1999: 1–19. [DOI](#)
- [27] Xun G, Luan SS, Hung KH, Hwang CC, Lin CJ, Chiang YC, Chiang TY. Population structure of *Nouelia insignis* (Asteraceae), an endangered species in southwestern China, based on chloroplast DNA sequences: recent demographic shrinking. *J Plant Res*, 2011, 124(2): 221–230. [DOI](#)
- [28] Jordano P, Godoy JA. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Mol Ecol*, 2000, 9(9): 1293–1305. [DOI](#)
- [29] Tsuda Y, Kimura M, Kato S, Katsuki T, Mukai Y, Tsumura Y. Genetic structure of *Cerasus jamasakra*, a Japanese flowering cherry, revealed by nuclear SSRs: implications for conservation. *J Plant Res*, 2009, 122(4): 367–375. [DOI](#)
- [30] Kato S, Iwata H, Tsumura Y, Mukai Y. Genetic structure of island populations of *Prunus lannesiana* var. *speciosa* revealed by chloroplast DNA, AFLP and nuclear SSR loci analyses. *J Plant Res*, 2011, 124(1): 11–23. [DOI](#)
- [31] Hamrick JH, Godt MJ. Conservation genetic of endangered plant species. In: Avise JC, Hamrick JL, eds. Conservation Genetics: Case Histories from nature. New York: Chapman and Hall, 1996: 281–304.
- [32] Gao LZ. Population structure and conservation genetics of wild rice *Oryza rufipogon* (Poaceae): a region-wide perspective from microsatellite variation. *Mol Ecol*, 2004 13(5): 1009–1024. [DOI](#)
- [33] Estoup A, Angès B. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: Carvalho GR, ed. Advances in Molecular Ecology. Amsterdam: IOS Press, 1998: 55–86. [DOI](#)