

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.50633

刘志娥, 王春晖, 刘玮琦, 汪小凡. 基于核基因和叶绿体基因序列的杏属系统发育分析——探讨洪平杏的起源和亲缘关系[J]. 植物科学学报, 2018, 36(5): 633-641

Liu ZE, Wang CH, Liu WQ, Wang XF. Molecular phylogeny of *Armeniaca* based on nuclear and chloroplast gene sequences: Exploring the origin and genetic relationship of *Armeniaca hongpingensis*[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(5): 633-641

基于核基因和叶绿体基因序列的杏属系统发育分析 ——探讨洪平杏的起源和亲缘关系

刘志娥, 王春晖, 刘玮琦, 汪小凡*

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要: 洪平杏 (*Armeniaca hongpingensis* C. L. Li) 是杏属的一个狭域分布种, 基于形态观察被推测为杏 (*A. vulgaris* Lam.) 和梅 (*A. mume* Sieb.) 的天然杂交种, 但目前尚无该种与杏、梅亲缘关系的分子系统学研究。本文以洪平杏的成株和实生苗以及包括杏、梅在内的 6 种 (含 1 变种) 杏属植物为研究材料, 分别采用核基因 (*ITS* 和 *SBEI*) 和叶绿体基因 (*matK* 和 *ycf1b*) 序列构建系统发育树, 并采用 *matK*、*ycf1b* 和 *SBEI* 基因序列构建单倍型网络图, 探讨该物种与杏、梅及杏梅 (*A. mume* Sieb. var. *bungo* Makino) 之间的亲缘关系。基于核基因和叶绿体基因序列分别构建的系统发育树均显示, 洪平杏的成株及其全部实生苗个体单独聚为一支, 且具有较高的支持率 (分别为 99/79、71/81), 独立于杏属其他种之外。而基于核基因 *ITS* 序列的系统发育分析结果表明, 洪平杏除极少数成株与杏、杏梅聚为一支外, 其余所有成株与实生苗聚为 2 大支 (支持率分别为 0.82 和 0.97), 而没有克隆的与梅聚在一起。单倍型分析结果表明, 该物种的成株与实生苗在 *SBEI* 和 *ycf1b* 基因序列中均未检测到杏或梅的单倍型, 仅有少数 (2/9) 的实生苗个体在叶绿体 *matK* 基因序列中检测到杏的单倍型。研究结果不支持将洪平杏定为杏和梅的天然杂交种的观点, 推测洪平杏应为一个独立的物种, 与杏之间的亲缘关系更近并且存在可检测到的基因流。

关键词: 杏属; 洪平杏; 系统发育; 核基因; 叶绿体基因

中图分类号: Q949.751.8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)05-0633-09

Molecular phylogeny of *Armeniaca* based on nuclear and chloroplast gene sequences: Exploring the origin and genetic relationship of *Armeniaca hongpingensis*

Liu Zhi-E, Wang Chun-Hui, Liu Wei-Qi, Wang Xiao-Fan*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: *Armeniaca hongpingensis* C. L. Li is a narrowly distributed species, which has been hypothesized to be a natural hybrid of *A. vulgaris* Lam. and *A. mume* Sieb. based on morphological similarity. However, related molecular phylogenetic research is still lacking. In this study, the phylogenetic relationship between *A. hongpingensis* and other *Armeniaca* species was investigated using individuals and seedlings of *A. hongpingensis* and individuals of five other *Armeniaca* species (e. g., *A. vulgaris*, *A. mume*, *A. mume* Sieb. var. *bungo* Makino). Two nuclear genes (*ITS* and *SBEI*) and two chloroplast genes (*matK* and *ycf1b*)

收稿日期: 2018-03-30, 退修日期: 2018-04-21。

基金项目: 国家标本平台教学标本子平台项目 (<http://mnh.scu.edu.cn>)。This work was supported by a grant from the Teaching Specimens Sub-Platform of the National Specimens Platform (<http://mnh.scu.edu.cn>).

作者简介: 刘志娥 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物系统学与进化生物学 (E-mail: 15071231349@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: wangxf@whu.edu.cn)。

were sequenced to reconstruct molecular phylogenetic trees. *matK*, *ycf1b*, and *SBEI* were also used to reconstruct a haplotype network. Phylogenetic analyses of both nuclear and chloroplast genes showed that the individuals and seedlings of *A. hongpingensis* grouped together with high bootstrap values (99/79, 71/81), independent of other *Armeniaca* species. The Bayesian phylogram based on *ITS* sequences showed that most individual and seedling clones of *A. hongpingensis* were grouped into two single clades with high bootstrap values (0.82, 0.97); the other clones clustered with *A. vulgaris* and *A. mume* var. *bungo* individuals; and no clones clustered with *A. mume* individuals. On *SBEI* and *ycf1b* loci, haplotypes of *A. vulgaris*, *A. mume*, and *A. holosericea* were not detected in *A. hongpingensis*; whereas on the *matK* locus, only haplotypes of *A. vulgaris* were detected in a few (2/9) seedlings of *A. hongpingensis*. These results suggest that *A. hongpingensis* is likely an independent species rather than a natural hybrid of *A. vulgaris* and *A. mume*, with a closer genetic relationship as well as detectable gene flow with *A. vulgaris*.

Key words: *Armeniaca*; *Armeniaca hongpingensis*; Phylogeny; Nuclear genes; Chloroplast genes

杏属 (*Armeniaca*) 属蔷薇科李亚科, 依据 *Flora of China*, 共有 11 种, 中国分布有 10 种, 包括: 紫杏 (*A. dasycarpa* (Ehrh.) Borkh.)、藏杏 (*A. holosericea* (Batal.) Kost.)、洪平杏 (*A. hongpingensis* C. L. Li)、背毛杏 (*A. hypotrichodes* (Cardot) L. C. Li & S. Y. Jiang)、李梅杏 (*A. limeixing* J. Y. Zhang & Z. M. Wang)、东北杏 (*A. mandshurica* (Maxim.) Skv.)、梅 (*A. mume* Sieb.)、山杏 (*A. sibirica* Lam.)、杏 (*A. vulgaris* Lam.) 以及政和杏 (*A. zhengheensis* J. Y. Zhang & M. N. Lu)^[1]。其中, 梅、杏为广泛栽培种; 藏杏分布于陕西、四川至西藏东南部; 紫杏仅在新疆等地有栽培; 政和杏仅分布于福建政和; 李梅杏分布于辽宁熊岳, 未见野生种; 背毛杏分布于重庆^[2, 3]。Layne 等^[4]的研究表明, 杏属诸种均为二倍体, 有 8 对染色体, 具有种间杂交的潜在可能性。Shimada 等^[5]采用 RAPD 标记证明杏梅 (*A. mume* Sieb. var. *bungo* Makino) 是杏和梅的天然杂交种。Byrne^[6]通过同工酶分析证明紫杏是杏与櫻桃李 (*Prunus cerasifera* Ehrh.) 的天然杂交种。Li 等^[7]采用 ISSR 和 SRAP 标记支持了华仁杏 (*A. cathayana* D. L. Fu et al.) 是杏和山杏的天然杂交种。张加延等^[8]通过形态观察、杨红花等^[9, 10]通过 RAPD 标记的方法均推测李梅杏可能是李 (*P. salicina* Lindl.) 和杏的天然杂交种, 且与李的关系更近。王家琼等^[3]的数量分类研究支持将藏杏作为杏的变种、政和杏作为梅的变种的分类方法, 同时, 聚类结果也显示藏杏、山杏、东北

杏均与杏亲缘关系较近。

洪平杏是一个狭域分布种, 目前能确定的分布点在湖北省神农架林区 (红坪镇), 其种群数量极少。该种因其一年生枝颜色、果梗长及核形等特征均似杏, 故以“红坪杏”作为其中文名^[11]。包满珠^[12]通过数量分类和同工酶分析, 发现该物种和梅有较近的关系, 认为应将洪平杏归为梅的一个变种, 并更名为洪平梅 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc. var. *hongpingensis* (C. L. Li) Chen et Bao)。陈俊愉和包满珠^[13]根据洪平杏小枝呈古铜色似杏梅、叶下面各部均具毛似毛叶梅 (*A. mume* Sieb. var. *goethartiana* Koehne)、果核具蜂窝状孔穴等特征, 也认为其与梅的关系更近, 应属杏梅系。而王家琼等^[3]对杏属植物叶和果实的 30 个相关形态特征进行的主成分分析和聚类分析, 支持洪平杏为一个独立的种, 且与梅关系更近。《中国植物志》记载洪平杏与藏杏接近, 又因小枝、果梗长、核形似杏, 叶形、核表面蜂窝状孔穴似梅, 认为其可能为杏和梅的天然杂交种; 然而, 在述及梅的变种时, 又认为杏梅可能为杏和梅的天然杂交^[11]。

综上所述, 关于洪平杏的分类地位及其与杏、梅、藏杏的关系还存在较多争议, 而该属目前尚无分子系统学研究作为判断该种起源与亲缘关系的依据。本研究选取洪平杏 (成株及实生苗) 及杏、梅、杏梅、藏杏、山杏、东北杏为材料, 采用核基因和叶绿体基因序列构建系统发育树和单倍型网络图, 旨在判定洪平杏是否为杏和梅的杂交种, 并阐明该种与杏属其他种之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实地采集洪平杏的成株及实生苗，以及梅、杏梅、山杏和杏的成株（表1）。洪平杏采集2个成株（AH、AH0）及9株实生苗（AH1~AH9），其中AH为已鉴定植株，AH0与AH相距约100m，实生苗全部位于成株AH树冠下。每株随机选取10片叶片，用硅胶干燥，置于-20℃冰箱保存、备用。杏属其余种藏杏、东北杏、山杏，外源组山

桃 (*Amygdalus davidiana* (Carrière) de Vos ex Henry)、桃 (*Amygdalus persica* L.) 以及部分梅、杏个体的相关基因序列从NCBI网站下载（表2）。鉴于紫杏、政和杏、背毛杏和李梅杏为狭域分布种，且与洪平杏无重叠分布区，本研究没有采用它们的样本或序列作为实验材料。

1.2 DNA的提取、PCR扩增和测序

DNA的提取采用植物基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN, 北京)。扩增的核基因为 *ITS* 和 *SBEI*^[14, 15]，叶绿体基因为 *matK* 和 *ycf1b*^[16, 17]。

表1 杏属种的采集信息
Table 1 Information of collected species of *Armeniaca*

物种 Species	编号 Code	采样数 Sample size	采集地点 Location	经纬度 Longitude and Latitude	海拔 (m) Height
洪平杏 <i>Armeniaca hongpingensis</i>	AH	1	湖北省神农架红坪镇	110°26' N, 31°40' E	1820
	AH0	1	湖北省神农架红坪镇	110°26' N, 31°40' E	1830
	AH1 ~ AH9*	AH9	湖北省神农架红坪镇	110°26' N, 31°40' E	1820
梅 <i>A. mume</i>	AM1 ~ AM3	3	湖北省神农架木鱼镇	110°22' N, 31°26' E	1350
	-	1	湖北省武汉大学校园	114°21' N, 30°32' E	50
	-	1	陕西省杨陵区	108°04' N, 34°15' E	410
杏梅 <i>A. mume</i> var. <i>bungo</i>	AM-B	6	湖北省武汉东湖梅园	114°23' N, 30°32' E	10
山杏 <i>A. sibirica</i>	-	1	山西省吕梁离石区	111°10' N, 37°28' E	1010
杏 <i>A. vulgaris</i>	AV1	1	湖北省神农架红坪镇	110°25' N, 31°40' E	1620
	AV2	1	陕西省杨陵区	108°03' N, 34°15' E	420

注：* 为 AH 的实生苗。

Note: * represents seedlings of *A. hongpingensis* (AH).

表2 来自 GenBank 的杏属物种和外类群的序列信息

Table 2 Accession number of sequences of *Armeniaca* and outgroups downloaded from GenBank

物种 Species	基因片段和序列号 DNA region and GenBank accession number			
	<i>ITS</i>	<i>SBEI</i>	<i>matK</i>	<i>ycf1b</i>
藏杏 <i>Armeniaca holosericea</i>	JF978092	KF154945	KP089843	KP089822
	JF978093	-	KP089844	KP089823
东北杏 <i>A. mandshurica</i>	JF978108	KF154951	KF154799	KF154913
	JF978117	KF154953	KP089845	KP089824
梅 <i>A. mume</i>	JF978118	-	KP089846	KP089825
	JF978119	-	KP089847	KP089826
	-	-	KP089848	KP089827
山杏 <i>A. sibirica</i>	JF978137	-	KP089849	KP089828
	-	KF154938	KP089835	KP089814
杏 <i>A. vulgaris</i>	-	-	KP089836	KP089815
	-	-	KP089837	KP089816
	-	-	KP089838	KP089817
	-	-	KP089839	KP089818
	-	-	KP089840	KP089819
	-	-	KP089841	KP089820
	-	-	KP089842	KP089821
	-	-	-	-
山桃 <i>Amygdalus davidiana</i> (AD)	JF978076	KF154941	KP089224	KP088341
桃 <i>Amygdalus persica</i> (AP)	JF978121	KF154954	KP089231	KP088340

ITS 序列扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 共循环 30 次, 最后 72°C 延伸 7 min。其余基因扩增程序参见 Shi 等^[15]的方法。扩增产物回收后测序。洪平杏、梅、杏梅、杏部分个体的核基因采用克隆测序来分化单倍型。

1.3 数据分析

采用 ContigExpress 软件进行序列拼接, 采用 Clustal X^[18] 软件排序, 辅以人工调整。采用 MrBayes ver. 3.2.1 软件构建贝叶斯树^[19]。贝叶斯分析中, 使用 ModelTest 3.7 计算模型^[20], 以及 GTR + G + I 模型。核基因联合构树, 设置位点速率的变异模型 rates = ingamma, 以随机树为起始树, 共运行 640 000 代; 叶绿体基因联合构树, 设置 rates = gamma, 运行 500 000 代。对洪平杏、杏、梅和杏梅的所有 *ITS* 序列构树, rates = invgamma, 运行 10 000 000 代。当 SDSF (Standard deviation of the split frequencies) < 0.01, 并舍弃老化样本后, 使用剩余样本树构建一致树。

采用 IQtree 软件进行最大似然性分析^[21],

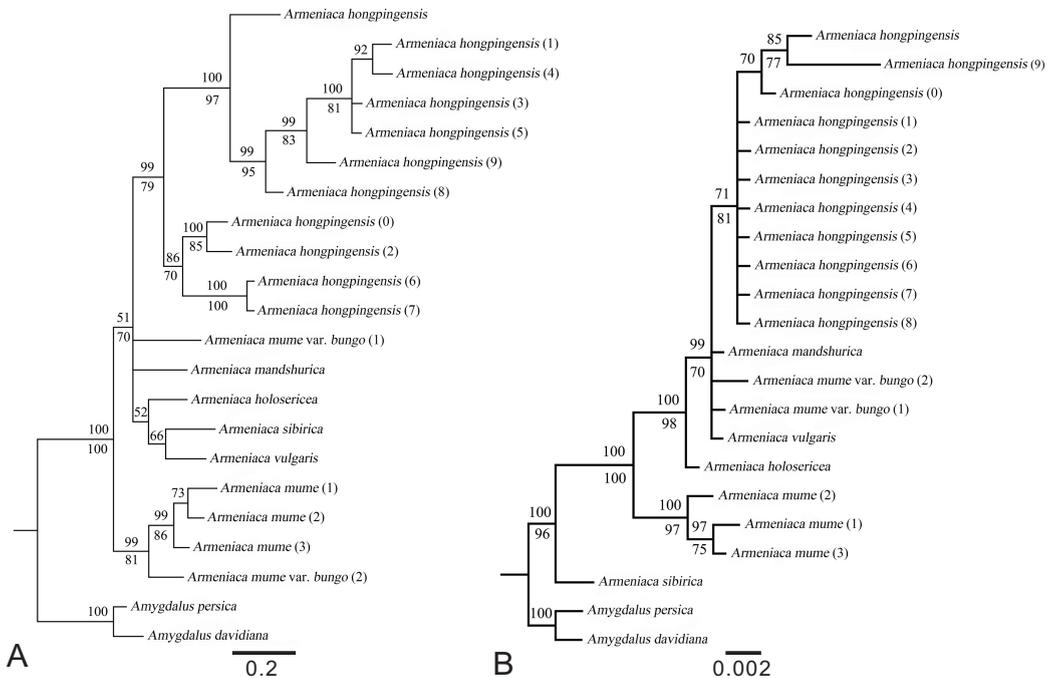
Model Finder^[22] 软件用于估算每个基因序列进化最合适的模型 (TABLE)。2 个叶绿体基因和 2 个核基因分别联合构树, 采用分区建树的方法, 各基因最适模型为 *ITS* (TIM + F + I)、*SBEI* (TN + F + I)、*matK* (HKY + F + I)、*ycf1b* (F81 + F), 自举值分析采用 1000 次重复。

对叶绿体基因 (*matK* and *ycf1b*) 和核基因 *SBEI* 的序列进行单倍型分析, 使用 DnaSP 5.10 软件进行单倍型拆分^[23]。采用 Network 4.6.1.1 的 median-joining 方法构建单倍型网络图^[24]。

2 结果与分析

2.1 洪平杏与杏属种的系统发育关系

研究结果发现, 以山桃和桃为外类群, 对洪平杏 (成株 2 个、实生苗 9 个) 以及藏杏、东北杏、梅 (3 个)、杏梅 (2 个)、山杏、杏共 6 种 1 变种 (20 个), 所构建的最大似然树与贝叶斯一致树拓扑结构基本一致, 但部分有较低的分辨率。无论以核基因还是以叶绿体基因构建的系统树均显示, 洪平杏的成株与其所有实生苗个体聚为一大支, 且均有较高的支持率, 分别是 99/79 和 71/81 (图 1: A、B)。



A: 基于核基因 *SBEI* 和 *ITS* 构建的系统树; B: 基于叶绿体片段 *matK* 和 *ycf1b* 联合构建的系统树。分支上的数字代表贝叶斯后验概率 (仅标注 ≥ 50 的值), 分支下的数字代表似然性分析的自展值 (仅标注 ≥ 70 的值)。

A: Phylogeny based on nuDNA data of *SBEI* and *ITS* sequences; B: Phylogeny based on cpDNA data of *matK* and *ycf1b* sequences. Numbers above branches represent posterior probability values of Bayesian analysis greater than 50%. Numbers below branches are bootstrap values greater than 70% from maximum-likelihood analysis.

图 1 基于核基因 (A) 或叶绿体基因 (B) 构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees for *Armeniaca* species based on nuDNA or cpDNA data, respectively

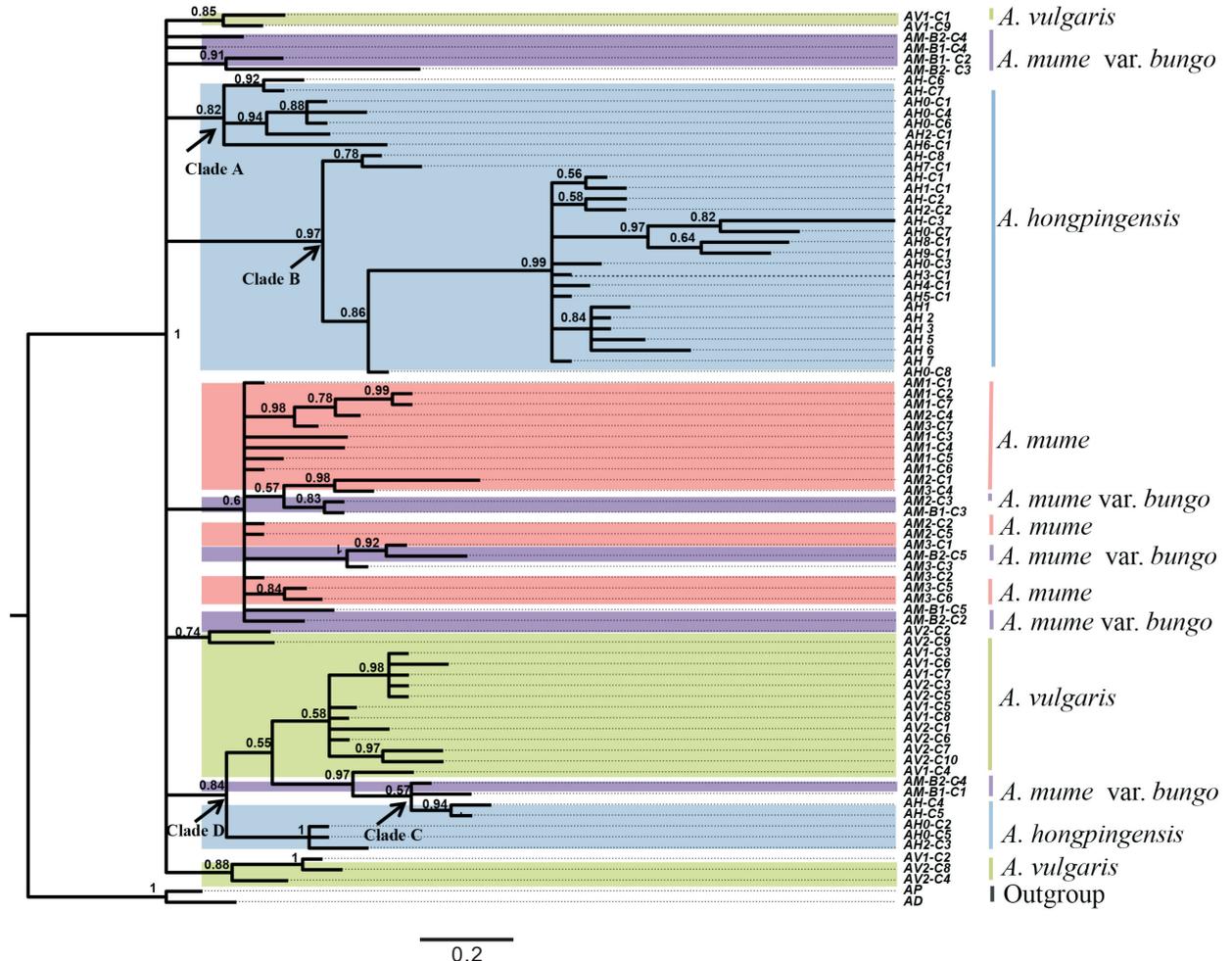
有所不同的是，在由核基因构建的系统树中，杏与山杏聚在一起，再与藏杏聚为一支，和杏梅、东北杏共同与洪平杏的成株及实生苗的一支形成姐妹支；梅自成一支，与洪平杏关系最远。而在由叶绿体构建的系统树中，东北杏、杏梅、杏呈平行支，与洪平杏关系较近；藏杏、梅等依次渐远，山杏与洪平杏关系最远。至于杏梅的 2 个个体，它们在由叶绿体基因构建的系统树中与杏、东北杏及洪平杏构成平行支，而在核基因系统树中则有其中 1 个个体与梅聚为一支。

本研究同时也对洪平杏的成株和实生苗、梅、杏梅、杏的所有 *ITS* 序列构建了贝叶斯一致树(图 2)。 *ITS* 序列排列后长为 633 bp，变异位点(Variable sites)共 105 个，其中系统发育信息位点(Information sites)66 个。系统树分析结果显

示，几乎所有的洪平杏成株(AH 和 AH0)及实生苗(AH1~AH9)的克隆聚为 2 大支(Clade A 和 Clade B)，且都有很高的支持率(0.82 和 0.97)。仅有 AH 的 2 个克隆(AH-C4 和 AH-C5)与杏梅聚为一支(Clade C，支持率 0.57)后又与杏聚在一起；AH0 的 2 个克隆(AH0-C2 和 AH0-C5)与实生苗个体 AH2 的一个克隆(AH2-C3)聚为一支后又与杏聚在一起(Clade D)。但该系统树没有显示洪平杏与梅的 *ITS* 的克隆聚在一起。

2.2 基于叶绿体基因 *matK*、*ycf1b* 及核基因 *SBE1* 的单倍型分析

本研究将洪平杏、藏杏、梅、杏梅和杏在叶绿体基因 *matK*、*ycf1b* 和核基因 *SBE1* 中检测到的单倍型，分别命名为 M、Y、S(表 3~表 5，图 3)。



分支上的数字表示后验概率，仅显示大于 0.5 的值。所有个体后面的字母“C”代表克隆，“C”后面的数字代表克隆数。Only PP values > 0.5 are shown above branches. For every individual of each species, ‘C’ means clone and numbers, following ‘C’ are clone numbers.

图 2 基于 *ITS* 基因序列构建的贝叶斯系统树
Fig. 2 Phylogram constructed from *ITS* sequences based on Bayesian inference analysis

matK 基因序列比对后的长度为 682 bp, 变异位点 13 个。在该基因上, 杏和梅各具独立单倍型, 1 个藏杏个体也与杏共享 1 个单倍型; 杏梅与杏共享单倍型, 仅 1 个个体具有独立单倍型。洪平杏成株具有独立的单倍型 (M6、M7), 均未与杏或梅共享; 其多数实生苗个体与成株 AH0 共享单倍型 (M7), 仅 1 个个体具有独立单倍型 (M9); 但有 2 个实生苗个体与杏共享 1 个单倍型 (M1) (表 3, 图 3: A)。

ycf1b 基因的序列比对后长度为 817 bp, 共 17 个变异位点。在该基因上, 杏和梅分别有 6 个固定的碱基替换, 杏梅 6 个个体全部与杏共享单倍

型, 藏杏具有独立单倍型, 与杏的主要单倍型有 1 个碱基的差异。洪平杏成株及实生苗均未在相应的位点上表现出碱基杂合的状态, 而具有自己独立的单倍型, 多数实生苗个体与洪平杏成株共享 1 个单倍型 (Y5), 仅有 1 个实生苗个体独享 1 个单倍型 (Y6), 但与主要的单倍型 (Y5) 仅有 1 个碱基的差异。洪平杏的单倍型与杏的单倍型也仅有 1 个碱基的差异, 而与梅则有 7 个碱基的差异, 可见其与杏关系较梅更近 (表 4, 图 3: B)。

SBEI 基因的序列经比对后长度为 674 bp, 共检测到变异位点 11 个。杏与梅有 3 个碱基的固定替换, 二者均有独立的单倍型; 藏杏与杏梅也有独

表 3 洪平杏及相关种的 *matK* 序列差异位点

Table 3 Variable sites based on *matK* sequences of *A. hongpingensis* and related species

物种 Species	类型 Type	变异位点 Variable sites (bp)													
		4	5	8	11	15	16	35	38	39	78	216	248	251	276
藏杏 <i>A. holosericea</i> (2)	M1(2)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	G	G	C
洪平杏 <i>A. hongpingensis</i> AH	M6(1)	T	C	T	A	A	C	A	A	T	T	-	A	A	C
<i>A. hongpingensis</i> AH0	M7(1)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	A	G	C
<i>A. hongpingensis</i> AH1~AH9	M1(2)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	G	G	C
	M7(6)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	A	G	C
	M9(1)	T	A	T	C	C	C	G	T	C	C	C	A	G	C
梅 <i>A. mume</i> (8)	M3(4)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	G	G	A
	M4(3)	T	C	A	A	A	T	A	A	T	T	-	A	A	A
	M5(1)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	A	G	A
杏梅 <i>A. mume</i> var. <i>bungo</i> (4)	M1(2)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	G	G	C
	M2(1)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	A	A	C
杏 <i>A. vulgaris</i> (10)	M1(9)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	G	G	C
	M2(1)	T	C	T	A	A	T	A	A	T	T	-	A	A	C

注: 括号中的数字代表个体数目。下同。

Note: Figure in brackets means number of individuals. Same below.

表 4 洪平杏及相关种的 *ycf1b* 序列差异位点

Table 4 Variable sites based on *ycf1b* sequences of *A. hongpingensis* and related species

种 Species	类型 Type	变异位点 Variable sites (bp)								
		15	80	205	489	574	598	752	767	792
藏杏 <i>A. holosericea</i> (2)	Y4(2)	C	A	C	C	G	T	C	T	-
洪平杏 <i>A. hongpingensis</i> AH	Y5(1)	C	A	A	C	T	T	C	T	-
<i>A. hongpingensis</i> AH0	Y5(1)	C	A	A	C	T	T	C	T	-
<i>A. hongpingensis</i> AH1~AH9	Y5(8)	C	A	A	C	T	T	C	T	-
	Y6(1)	C	A	A	C	T	T	C	T	C
梅 <i>A. mume</i> (9)	Y2(7)	A	T	C	A	G	T	A	C	-
	Y3(2)	A	T	C	A	G	A	A	C	-
杏梅 <i>A. mume</i> var. <i>bungo</i> (6)	Y1(6)	C	A	C	C	T	T	C	T	-
杏 <i>A. vulgaris</i> (11)	Y1(10)	C	A	C	C	T	T	C	T	-

表5 洪平杏及相关种的 *SBEI* 序列差异位点
Table 5 Variable sites based on *SBEI* sequences of *A. hongpingensis* and related species

种 Species	类型 Type	变异位点 Variable sites (bp)											
		27	34	57	99	150	156	201	291	417	459	617	618
藏杏 <i>A. holosericea</i> (1)	S1(1)	C	-	C	C	T	C	A	C	C	C	G	A
洪平杏 <i>A. hongpingensis</i> AH	S5(1)	C	-	C	T	T	C	A	C	T	G	G	A
<i>A. hongpingensis</i> AH0	S6(1)	C	-	C	T	T	T	G	C	T	G	G	A
<i>A. hongpingensis</i> AH1~AH9	S5(4)	C	-	C	T	T	C	A	C	T	G	G	A
	S6(2)	C	-	C	T	T	T	G	C	T	G	G	A
	S11(2)	C	-	C	T	T	C	G	C	T	G	G	A
	S12(1)	C	-	C	T	T	T	A	C	T	G	G	A
梅 <i>A. mume</i> (5)	S3(1)	A	-	C	C	T	C	A	C	T	C	T	T
	S4(4)	C	-	T	C	T	C	A	C	T	C	T	T
杏梅 <i>A. mume</i> var. <i>bungo</i> (5)	S7(1)	C	A	C	C	C	C	A	C	T	C	G	T
	S8(1)	C	-	C	C	T	C	A	C	T	C	G	T
	S9(2)	C	-	C	C	C	C	A	C	T	C	G	A
	S10(1)	C	-	C	C	C	C	A	C	T	C	T	A
杏 <i>A. vulgaris</i> (4)	S1(2)	C	-	C	C	T	C	A	C	C	C	G	A
	S2(1)	C	-	C	C	T	C	A	T	C	C	G	A

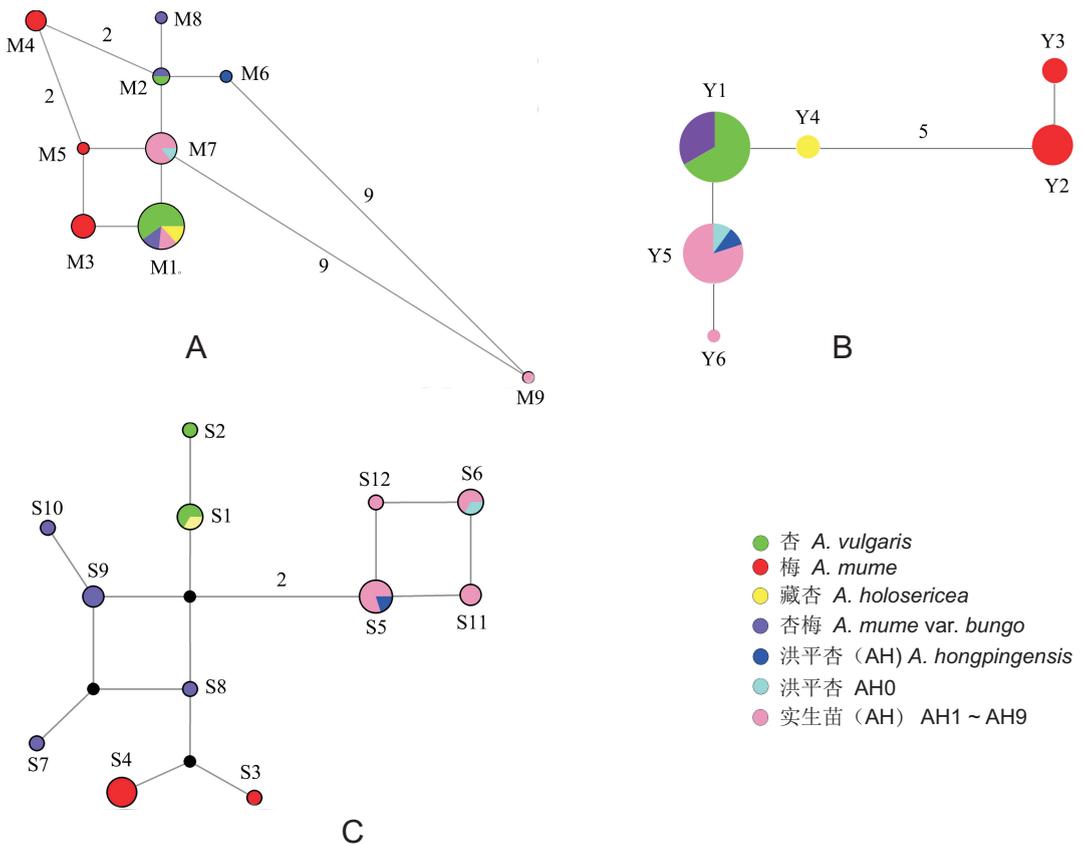


图3 洪平杏与相关种在叶绿体基因 *matK* (A)、*ycf1b* (B) 及核基因 *SBEI* (C) 上的单倍型网络图

Fig. 3 Haplotype networks of *matK* (A), *ycf1b* (B), and *SBEI* (C) genes for *A. hongpingensis* and related species

立的单倍型。洪平杏成株有独立的单倍型 (S5、S6), 多数实生苗个体的单倍型与成株 AH 相同, 少数与成株 AHO 相同, 还有 2 个单倍型 (S11、S12) 为实生苗独有, 但均与主要单倍型 (S5、S6) 仅 1 个碱基的差异。洪平杏成株及其实生苗均未检测到杏或梅或藏杏的单倍型 (表 5, 图 3: C)。

3 讨论

已有的研究对洪平杏的起源及其在杏属中亲缘物种的推定, 多建立在形态学研究的基础上。《中国植物志》记述该种可能为杏和梅的天然杂交种^[11], 也有学者则认为其应为梅的一个变种^[12, 13], 或认为其为独立种但与梅的关系更近^[3]。然而, 对这些观点一直缺少分子证据的支持。

本研究基于联合的核基因和叶绿体基因分别构建的系统发育树均显示, 洪平杏的成株及实生苗全部个体自成一支, 支持洪平杏是一个独立的种。基于 *ITS* 序列构建的贝叶斯一致树中, 几乎所有的洪平杏成株及实生苗的单克隆聚在一起, 仅有极少的克隆与杏或杏梅聚在一起, 这一结果提示该种与杏之间关系较近; 但贝叶斯一致树没有显示有该种的克隆与梅聚在一起, 因而并不支持洪平杏源自杏与梅种间杂交之说。基于 *SBEI* 和 *ycf1b* 的单倍型分析, 均未检测到洪平杏成株及实生苗中存在杏或梅的单倍型。以上结果不支持《中国植物志》中洪平杏为杏和梅的天然杂交种的观点^[11], 也与包满珠^[12]提出的洪平杏为梅的一个变种的观点不一致, 但与王家琼等^[3]提出的洪平杏应为一个独立种的观点一致。

本研究结果表明, 洪平杏与杏的关系较近。依核基因构建的系统发育树判断, 洪平杏与杏、山杏、东北杏、藏杏、杏梅均有较近的关系, 与梅则关系最远; 而在基于叶绿体基因构建的系统发育树中, 虽然山杏所处位置与前一系统树中有所不同, 但结果同样指示洪平杏与杏、东北杏、藏杏、杏梅关系较近, 而与梅关系稍远。这些结果与王家琼等^[3]认为洪平杏与梅关系最近而与藏杏、山杏、杏较远的看法不一致。在对叶绿体基因 *matK* 序列的单倍型分析中, 洪平杏与杏、或与梅或藏杏无共同单倍型, 但在实生苗中有 2 个个体检测到了杏的单倍型; 在对叶绿体基因 *ycf1b* 和核基因 *SBEI*

序列的单倍型分析中, 均未检出洪平杏的成株或幼苗与杏或梅共享单倍型, 但就碱基差异而言, 洪平杏在 *ycf1b* 的主要单倍型上与杏仅有 1 个碱基的差异, 与梅则有 7 个碱基的差异, 这也在一定程度上说明洪平杏与杏关系更近。上述结果与包满珠^[12]、陈俊愉和包满珠^[13]及王家琼等^[3]基于同工酶测定、数量分类和形态研究等证据提出的洪平杏与梅关系更近的观点不一致。需要注意的是, 这种核质不一致或形态性状与分子证据不一致的情况在种间关系的研究中较为普遍。核质不一致是生物的趋同进化、快速多样化、谱系重组以及杂交渐渗的结果, 其中杂交被认为是主要原因^[25, 26], 这与杏属种间可以相互杂交, 且已有被证实的杂交种相吻合^[2-7]。因此, 本研究中出现杏属相关种间关系出现的核质不一致性也可能是杂交引起的。形态性状和同工酶易受环境及组织、器官和个体发育的影响, 也易受转录后修饰以及非核遗传的影响^[27], 这些因素可能会导致形态研究及同工酶研究与分子研究的结果有差异。

依据本研究结果, 本研究认为洪平杏并非杏和梅的天然杂交种, 而是杏属中的一个独立的种, 它与杏的关系较近, 而与梅关系则较远。洪平杏是一个狭域分布种, 且种群数量极少。这种分布状况的成因、是否存在更多的自然分布以及如何采取科学的保育措施, 还需要更多的野外调查、取样和进一步的分子系统学、生物地理学和生殖生态学研究。

致谢: 感谢武汉大学刘星教授, 博士研究生王帅、黎娅、向甘驹、戴小康, 以及硕士研究生朱晓芹、孔凡娇对本研究提供的帮助; 感谢西北农林科技大学硕士研究生刘雪艳提供部分实验材料。

参考文献:

- [1] Wu ZY, Raven PH, Hong DY. Flora of China; Vol. 9[M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [2] 王利兵. 我国 3 种杏的地理分布及其植物学性状[J]. 林业科学研究, 2010, 23(3): 435-439.
Wang LB. Geographic distribution and botanical characters of 3 *Armeniaca* plant in China[J]. *Forest Research*, 2010, 23(3): 435-439.
- [3] 王家琼, 吴保欢, 崔大方, 羊海军, 黄峥, 齐安民. 基于 30 个形态性状的中国杏属 (*Armeniaca* Scop.) 植物分类学研究[J]. 植物资源与环境学报, 2016, 25(3): 103-111.
Wang JQ, Wu BH, Cui DF, Yang HJ, Huang Z, Qi AM. Taxonomic study on *Armeniaca* Scop. species in China based on thirty morphological characters[J]. *Journal of*

- Plant Resources and Environment*, 2016, 25(3): 103–111.
- [4] Layne REC, Bailey CH, Hough LF. Apricots[M]//Janick J, Moore JN, eds. Fruit Breeding; Tree and Tropical Fruits, Vol. II. New York: John Wiley and Sons, 1996.
- [5] Shimada T, Haji T, Yamaguchi M, Takeda T, Nomura K, Yoshida M. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay[J]. *J Jpn Soc Hortic Sci*, 1994, 63(3): 543–551.
- [6] Byrne DH. Isozyme phenotypes support the interspecific hybrid origin of *Prunus xdasycarpa* Ehrh[J]. *Fruit Varieties J*, 1993, 47(3): 143–145.
- [7] Li M, Zhao Z, Miao XJ. Genetic diversity and relationships of apricot cultivars in north China revealed by ISSR and SRAP markers[J]. *Sci Hortic*, 2014, 173(3): 20–28.
- [8] 张加延, 吕苗南, 王志明. 杏属二新种[J]. *植物分类学报*, 1999, 37(1): 105–109.
- Zhang JT, Lü MN, Wang ZM. Two new species of the genus *Armeniaca* (Rosaceae)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1999, 37(1): 105–109.
- [9] 杨红花, 陈学森, 冯宝春, 吴燕. 李梅杏类种质资源的 RAPD 分析[J]. *果树学报*, 2007, 24(3): 303–307.
- Yang HH, Chen XS, Feng BC, Wu Y. Assessment of *Prunus armeniaca limeixing* germplasm by RAPD[J]. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24(3): 303–307.
- [10] 杨红花. 李梅杏种质资源的系统起源研究进展[J]. *泰山学院学报*, 2010, 32(3): 106–109.
- Yang HH. Advances in system origin of *Prunus armeniaca limeixing* J. Y. Zhang et Z. M. Wang germplasm[J]. *Journal of Taishan University*, 2010, 32(3): 106–109.
- [11] 俞德浚, 陆玲娣, 谷粹芝. 中国植物志: 第38卷[M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [12] 包满珠. 我国川、滇、藏部分地区野梅种质资源及梅的系统学研究[D]. 北京: 北京林业大学, 1991.
- [13] 陈俊愉, 包满珠. 中国梅的植物学分类与园艺学分类[J]. *浙江农林大学学报*, 1992(2): 119–132.
- Chen JY, Bao MZ. Botanical classification and horticultural classification of Chinese Mei (*Prunus mume*) resources[J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 1992(2): 119–132.
- [14] China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (*ITS*) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(49): 19641–19646.
- [15] Shi S, Li JL, Sun JH, Yu J, Zhou SL. Phylogeny and classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae)[J]. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55(11): 1069–1079.
- [16] Yu J, Xue JH, Zhou SL. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 176–181.
- [17] Dong W, Xu C, Li C, Sun J, Zuo Y, et al. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8348.
- [18] Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3497–3500.
- [19] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [20] Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817–818.
- [21] Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 2014, 32(1): 268–274.
- [22] Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(6): 587.
- [23] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [24] Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37–48.
- [25] Wendel JF, Doyle JJ. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution[M]// Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. New York: Kluwer Academic Publisher, 1998.
- [26] Rieseberg LH, Whitton J, Linder CR. Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees[J]. *Plant Biol*, 1996, 45(3): 243–262.
- [27] Kumar LS. DNA markers in plant improvement: An overview[J]. *Biotechnol Adv*, 1999, 17(2–3): 143–182.