

变叶海棠物种复合体的分类界定和遗传分化初探

唐 亮, 李 菊, 谭 颺, 马 香, 周志钦*

(西南大学南方山地园艺学教育部重点实验室, 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘 要: 在根据系统发育分析探明变叶海棠物种复合体 6 个类群遗传来源的基础上, 使用单拷贝核基因 *Sbe I* 进一步研究其分类界定和居群遗传分化。结果表明, *Sbe I* 基因的最大似然树由 3 个大的进化枝构成, 物种界定分析将这 3 个进化枝界定为 3 个物种, 但是变叶海棠物种复合体中的类群除花叶海棠外, 均不能被界定为物种。基于遗传距离和固定指数的遗传分化研究支持分类界定的结果。同一进化枝类群内和类群间的遗传距离在分布范围上完全重叠 (0 ~ 0.006), 并且小于不同进化枝类群间的遗传距离 (0.008 ~ 0.016)。固定指数分析与遗传距离计算结果一致, 表明同一进化枝中的类群彼此遗传分化很小, 不支持将其界定为物种。根据分类界定和遗传分化研究结果以及复合体类群的遗传来源, 建议把多毛海棠作为变叶海棠的变型处理, 将马尔康海棠和小金海棠作为复合体的单个无融合生殖种处理。

关键词: 变叶海棠; 物种复合体; 物种界定; 遗传分化; 单拷贝核基因

中图分类号: S 661

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 05-0957-10

Species Delimitation and Preliminary Studies of Genetic Divergence of *Malus toringoides* Species Complex

TANG Liang, LI Ju, TAN Si, MA Xiang, and ZHOU Zhi-qin*

(Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education; College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Based on the elucidation of genetic origins of taxa in the *Malus toringoides* species complex, species delimitation and genetic divergence of this species complex were studied using single-copy nuclear gene *Sbe I*. There are three main clades on the maximum likelihood tree constructed with *Sbe I*. Species delimitation analyses indicated that the three clades correspond to three species. However, taxa within the three clades cannot be delimited as species except *M. transitoria*. The results of species delimitation were further supported by the estimation of genetic distance and fixed index. Within a clade, the range of genetic distances (0 ~ 0.006) between sequences from the same taxa is overlapped with those from different taxa. While genetic distances (0.008 ~ 0.016) between sequences from different clades are larger than those from the same clade. The estimation of fixed index is consistent with the estimated genetic distance. These analyses showed that the genetic divergence between taxa within a clade is rather small, and taxa within the same clade shouldn't be delimited as species. Based on the results of species delimitation, the estimation of

收稿日期: 2014 - 02 - 11; 修回日期: 2014 - 05 - 05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071769); 西南大学博士基金项目 (SWU111028)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zzqswu@yahoo.com; Tel: 023-68250229)

genetic divergence, and the genetic origin of taxa in the *M. toringoides* species complex, it would be better to recognize *M. × setok* as the variant of *M. × toringoides*, and to recognize *M. × maerkangensis* and *M. × xiaojinensis* as a single agamospecies in the species complex. Species delimitation in the *M. toringoides* species complex could shed light on the utilization and protection of wild resource in genus *Malus*.

Key words: *Malus toringoides*; species complex; species delimitation; genetic divergence; single-copy nuclear gene

物种复合体 (species complex) 是指通过杂交和多倍化产生的亲缘关系复杂、遗传分化很小的多类群复杂物种系统 (Koch et al., 2003; Lo et al., 2010; Durkovic et al., 2012)。变叶海棠物种复合体 (*Malus toringoides* species complex) 是苹果属野生资源中变异式样和种间关系很复杂的一个复合体, 由变叶海棠、花叶海棠、陇东海棠、多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠 6 个物种组成 (成明昊 等, 2000, 2002, 2003; 石胜友 等, 2004)。AFLP 标记分析和多拷贝核基因 ITS 序列变异支持变叶海棠是花叶海棠和陇东海棠杂交后代的观点 (石胜友 等, 2005; Feng et al., 2007); 通过详细的野生资源调查研究, 另外 3 个与变叶海棠近缘的类群被界定为物种并归入变叶海棠物种复合体。其中马尔康海棠的花、叶和果实等分类学性状介于变叶海棠和陇东海棠之间, 而多毛海棠的性状则介于变叶海棠和花叶海棠之间 (成明昊 等, 2002, 2003; 邓洪平 等, 2002)。小金海棠的叶片和花部性状与陇东海棠近似, 而核型与四倍体变叶海棠相似 (梁国鲁和李晓林, 1993; 成明昊 等, 2000)。在地理分布上, 变叶海棠物种复合体目前界定的 6 个物种在四川西部山区呈同域分布 (成明昊 等, 1999)。上述证据显示这些物种彼此具有非常紧密的亲缘关系。

前人的研究不仅丰富了对野生苹果资源的认识, 也在一定程度上揭示了变叶海棠物种复合体中物种的遗传来源 (邓洪平 等, 2002; 石胜友 等, 2004)。与多拷贝核基因 (如 ITS 序列) 相比, 单拷贝核基因用于野生果树资源的研究具有如下优势。首先, 避免了致同进化 (concerted evolution) 导致的序列均一化, 杂种中两个亲本所特有的核苷酸变异可以完整保留下来, 有助于杂种的识别和杂交亲本的确定 (Sang, 2002)。其次, 单拷贝核基因基本不受基因重复的影响, 能够很好地反映物种真实的进化关系 (Zou et al., 2008)。单拷贝核基因已经成功应用在作物资源遗传关系的研究上 (Ge et al., 1999; Doyle et al., 2004; Brassac et al., 2012)。使用编码淀粉分支酶的单拷贝核基因 *Sbe I* 探究变叶海棠物种复合体中 6 个物种的遗传关系。*Sbe I* 基因分析进一步证实变叶海棠源于杂交, 花叶海棠是杂交亲本之一, 但是排除陇东海棠参与了变叶海棠的杂种起源。同时 *Sbe I* 分析显示多毛海棠与变叶海棠, 以及马尔康海棠与小金海棠具有相同的遗传组成, 并且后两者是变叶海棠与陇东海棠进一步杂交产生的后代 (Tang et al., 2014)。

物种分类界定不仅是分类学和进化生物学研究的重要问题 (De Queiroz, 2007; Fujita et al., 2012), 也是野生资源鉴定、评价、利用和保护研究中需要首先解决的基本问题。变叶海棠物种复合体中的类群能否界定为 6 个独立的物种? 如果不能全部界定为物种, 哪些需要归并? 至今没有得到解决。本研究在阐明变叶海棠物种复合体类群遗传来源的基础上, 通过单拷贝核基因 *Sbe I* 探究其物种界定和居群遗传分化模式, 确定复合体类群的分子分化水平, 并阐明类群的分类学地位, 以期苹果属野生资源的鉴定、利用和保护提供指导和科学依据。

1 材料与方法

1.1 变叶海棠物种复合体物种取样

2011 年 6 月在四川省阿坝藏族羌族自治州的阿坝县、马尔康县和小金县采集变叶海棠物种复合

体居群样品(表 1)。一共采集了不同地点的 10 个自然居群的叶片材料, 每个居群随机挑选 2~6 个个体, 不同个体间隔 30 m 以上, 叶片材料经硅胶干燥后带回西南大学, 保存在 -20 °C 冰箱中备用。变叶海棠物种复合体除花叶海棠和陇东海棠外, 其余均为无融合生殖类群, 同一类群仅由一种基因型构成(Tang et al., 2014), 因此现有居群取样基本能代表整个变叶海棠物种复合体。

1.2 PCR 扩增、克隆和测序

采用 CTAB 法(Doyle & Doyle, 1987)提取叶片总 DNA, 稀释至合适浓度。*Sbe I* 基因的引物根据栽培苹果的 *Sbe I* 基因外显子序列设计, 上、下游引物分别为 M1014F (5' ATAGTGAGCAGCA CAAATG 3') 和 M1014R (5' TGCCTCCTCACTTTCAT 3')。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 2.5 μ L 10 \times Ex *Taq* 缓冲液, 10~50 ng 的基因组 DNA, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ 的 MgCl₂, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ 的每种 dNTP, 0.1 μ mol \cdot L⁻¹ 的上下游引物, 1.0 U 的 Ex *Taq* 酶。扩增程序: 94 °C 预变性 1 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中通过电泳分离, 纯化回收之后克隆至质粒载体, 转化 TOP10 大肠杆菌。每个样品挑选 8~16 个阳性克隆, 提取质粒后送英骏公司(重庆)的 ABI3730 测序仪测序。

1.3 物种界定分析

Sbe I 核苷酸序列的多序列比对由 ClustalX 软件(Thompson et al., 1997)在默认参数设置下进行, 然后手工调整同源性排列不恰当的部分。PCR 扩增过程中产生的重组序列由 RDP3 软件(Martin et al., 2010)识别并去除。挑选代表性 *Sbe I* 序列用于后续数据分析。根据 Modeltest 3.7 的 AIC 优化标准(Posada & Crandall, 1998)确定 *Sbe I* 最优核苷酸替换模型, 然后使用 PHYML 软件(Guindon et al., 2010)构建 *Sbe I* 最大似然进化树, 进化树拓扑结构的可靠性通过 100 次自展(bootstrap)检验进行评价。我们使用 GSI 指数 genealogical sorting index(Cummings et al., 2008)和 PTP 模型 Poisson tree processes(Zhang et al., 2013)在两个进化等级上进行物种界定分析。一是将 *Sbe I* 的整个最大似然进化树用于物种界定, 同时也对进化树的 3 个进化枝逐一进行物种界定分析。为了考虑拓扑结构估计中存在的 uncertainty, 利用 100 次自展检验得到的进化树构建主要规则一致树, 将其用于物种界定分析。所有的界定分析均通过在线分析工具 <http://www.genealogicalsorting.org/> (GSI 指数) 和 <http://species.h-its.org/ptp/> (PTP 模型) 完成。

1.4 居群遗传学分析

对于 3 个进化枝以及进化枝的每个类群, 使用 DNASP 程序(Librado & Rozas, 2009)计算 *Sbe I* 基因的核苷酸多样性, 指标包括分离位点个数、单倍型个数及其多样性、核苷酸多样性(π 和 θ 两种度量指标)。变叶海棠物种复合体分类群间的成对固定指数 F_{st} 也通过 DNASP 程序计算。采用 MEGA5.10 程序(Tamura et al., 2011)计算不同类群的成对遗传距离, 同时也计算同一类群内部的遗传距离。另外, 计算任意两条序列之间的遗传距离。遗传距离根据 MEGA5.10 程序的 Kimura 双参数模型(Kimura, 1980)进行度量。

2 结果与分析

2.1 序列特征

共获得了变叶海棠物种复合体的代表性 *Sbe I* 基因序列 82 条, 通过多序列比对, 经手工调整后长 983 bp, 包含 *Sbe I* 外显子 11~17 之间的核苷酸序列。*Sbe I* 序列包含变异位点 26 个, 其中简约

信息位点 22 个，绝大部分变异位点分布在内含子区域。

2.2 变叶海棠物种复合体物种界定结果

Modeltest3.7 确定最适合变叶海棠物种复合体 *Sbe I* 基因的核苷酸替换模型为 HKY + I。基于 HKY + I 模型使用 PHYML 构建了 *Sbe I* 基因的最大似然进化树，结果如图 1 所示。

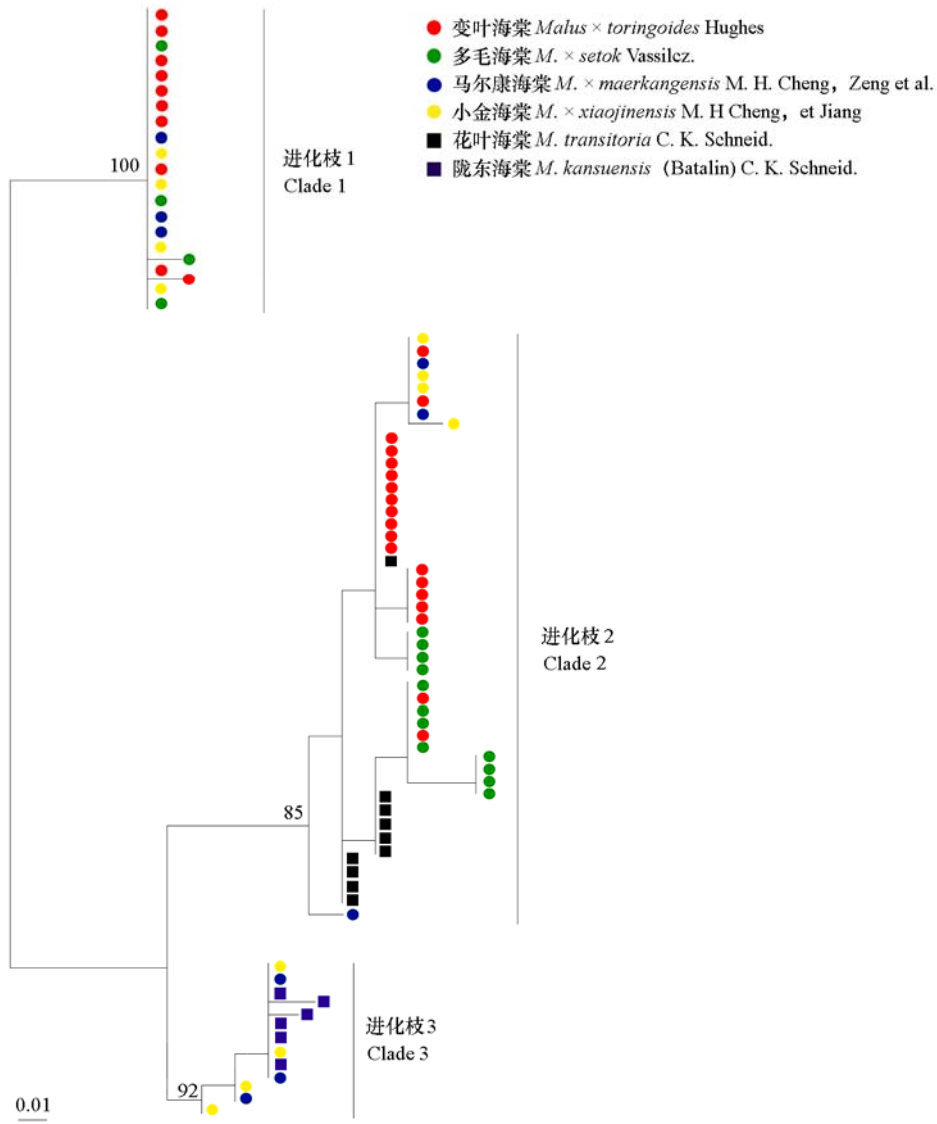


图 1 基于 *Sbe I* 基因的最大似然树
分枝上的数值为自展支持值，低于 70% 的自展值未显示。
Fig. 1 The maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed with *Sbe I* gene
Numbers above branches are bootstrap supports, and bootstrap values lower than 70% are not shown.

变叶海棠物种复合体的 *Sbe I* 被分为 3 个大的进化枝 (Clade 1~3)，每个进化枝作为单系得到了很好的支持，但是进化枝内部的分歧关系基本没有自展支持。进化枝 1 包含变叶海棠、多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠 4 个分类群；进化枝 2 由进化枝 1 的 4 个分类群再加花叶海棠构成；进化枝

3 由陇东海棠、马尔康海棠和小金海棠组成（表 1）。*Sbe I* 基因最大似然分析结果与变叶海棠物种复合体遗传来源研究结果 Tang 等（2014）的一致。

表 1 四川阿坝州变叶海棠物种复合体类群列表
Table 1 List of taxa in the *M. × toringoides* species complex at Aba, Sichuan Province

类群 Taxa	采样地点 Sampling sites	植株数 Number of accessions	进化枝 Clade
花叶海棠 <i>Malus transitoria</i> C. K. Schneid.	阿坝县安羌乡 Anqiang, Aba County	6	C2
陇东海棠 <i>M. kansuensis</i> (Batalin) C. K. Schneid.	马尔康县大郎足沟 Daliangzu, Maerkang County	4	C3
变叶海棠 <i>M. × toringoides</i> Hughes	马尔康县牛离沟 Niuligou, Maerkang County	2	C1, C2
	马尔康县农科所 Institute of Agricultural Science, Maerkang County	2	C1, C2
	小金县两河乡 Lianghe, Xiaojin County	2	C1, C2
	阿坝县柯河乡 Kehe, Aba County	2	C1, C2
多毛海棠 <i>M. × setok</i> Vassilcz.	阿坝县安羌乡 Anqiang, Aba County	2	C1, C2
	阿坝县多格隆 Duogelong, Aba County	4	C1, C2
马尔康海棠 <i>M. × maerkangensis</i> M. H. Cheng, Zeng et al.	马尔康县龙头滩 Longtoutan, Maerkang County	3	C1, C2, C3
小金海棠 <i>M. × xiaojinensis</i> M. H Cheng, et Jiang	小金县两河乡 Lianghe, Xiaojin County	4	C1, C2, C3

注：C1、C2、C3 分别代表进化枝 1、2、3，进化枝的划分见图 1。
Note: C1, C2 and C3 represent clade 1, 2 and 3, respectively. Please see Figure 1 for the assignment of clades.

使用 *Sbe I* 基因的整个拓扑结构进行物种界定分析，GSI 指数分析显示每个进化枝的 GSI 指数接近或者等于 1，表明这 3 个进化枝可以清晰地界定为物种，并且 *P* 值在 0.01 水平上显著（表 2）。PTP 模型分析的结果和 GSI 指数的相同。

表 2 基于 GSI 指数物种界定分析结果
Table 2 The result of species delimitation based on GSI analysis

进化枝 Clade	分类群层次 Taxa level						进化枝层次 Clade level
	变叶海棠 <i>Malus × toringoides</i>	多毛海棠 <i>M. × setok</i>	马尔康海棠 <i>M. × maerkangensis</i>	小金海棠 <i>M. × xiaojinensis</i>	花叶海棠 <i>M. transitoria</i>	陇东海棠 <i>M. kansuensis</i>	
C1	0	0	0	0			0.9368**
C2	0.1086	0.0627	0.0359	0.0551	0.1607**		1.0**
C3			0.0667	0.1111		0.1429	1.0**

为了进一步探讨组成进化枝的不同类群是否可以界定为独立的物种，对每个进化枝逐一进行了 GSI 指数和 PTP 模型分析。GSI 指数分析的结果见表 2，组成进化枝 1 的 4 个类群的 GSI 指数均为 0，对应的 *P* 值全为 1，显示进化枝 1 的 4 个类群不能被界定为物种。组成进化枝 2 的 5 个类群中，仅花叶海棠 GSI 指数的 *P* 值在 0.01 的水平显著，其他 4 个类群 GSI 指数的 *P* 值均不显著，表明这 4

个类群在进化枝 2 上仍然不能界定为物种。进化枝 3 的 GSI 指数分析显示其所包含的 3 个类群也都不能被界定为物种。虽然陇东海棠 GSI 指数的 P 值不显著,但是 GSI 指数值相对较大,表明陇东海棠 *Sbe I* 基因谱系汇聚的程度比马尔康海棠和小金海棠的高。PTP 模型分析与 GSI 指数的物种界定结果基本一致,进化枝中的每个类群作为物种均未得到支持。

2.3 变叶海棠物种复合体的遗传多样性和遗传分化

Tajima's D 检验表明 *Sbe I* 基因在变叶海棠物种复合体分歧过程中没有偏离中性进化模式(表 3)。由于进化枝之间的遗传分化较大,因此以进化枝以及进化枝包含的分类群为单位计算遗传多样性,结果见表 3。以进化枝为单位,遗传多样性由低到高的顺序是:进化枝 1 < 进化枝 3 < 进化枝 2。以分类群为单位,多毛海棠的遗传多样性(π)大约是变叶海棠的 2.5 倍。马尔康海棠和小金海棠的遗传多样性与其所处的进化枝有关。进化枝 1 中两者均无变异,进化枝 2 中马尔康海棠的多样性高于小金海棠,而进化枝 3 中则是小金海棠的多样性高于马尔康海棠。

表 3 进化枝以及进化枝包含的变叶海棠物种复合体分类群的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity of clades and taxa from the same clade in the *Malus toringoides* species complex

进化枝 Clade	居群 Population	序列数 N	分离位点数 S	单倍型数 h	H_d	π	θ	Tajima's D
C1	全体序列 All sequences *	21	2	3	0.186	0.00021	0.00061	-1.51414
	变叶海棠 <i>Malus</i> × <i>toringoides</i>	10	1	2	0.200	0.00021	0.00038	-1.11173
	马尔康海棠 <i>M.</i> × <i>maerkangensis</i>	3	0	1	0.000	0.00000	0.00000	NA
	多毛海棠 <i>M.</i> × <i>setok</i>	4	1	2	0.500	0.00055	0.00060	-0.61237
	小金海棠 <i>M.</i> × <i>xiaojinensis</i>	4	0	1	0.000	0.00000	0.00000	NA
C2	全体序列 All sequences *	48	10	10	0.886	0.00257	0.00249	0.09214
	花叶海棠 <i>M. transitoria</i>	10	2	3	0.644	0.00081	0.00076	0.22171
	变叶海棠 <i>M.</i> × <i>toringoides</i>	19	5	4	0.667	0.00129	0.00153	-0.49107
	马尔康海棠 <i>M.</i> × <i>maerkangensis</i>	3	2	2	0.667	0.00138	0.00138	NA
	多毛海棠 <i>M.</i> × <i>setok</i>	12	6	3	0.727	0.00318	0.00217	1.77027
	小金海棠 <i>M.</i> × <i>xiaojinensis</i>	4	1	2	0.500	0.00052	0.00056	-0.61237
C3	全体序列 All sequences *	13	5	5	0.628	0.00106	0.00170	-1.35249
	陇东海棠 <i>M. kansuensis</i>	6	3	3	0.600	0.00105	0.00138	-1.23311
	马尔康海棠 <i>M.</i> × <i>maerkangensis</i>	3	1	2	0.667	0.00069	0.00069	NA
	小金海棠 <i>M.</i> × <i>xiaojinensis</i>	4	2	3	0.833	0.00121	0.00113	0.59158

注: H_d . 单倍型多样性; π . 核苷酸多样性测度 π ; θ . 核苷酸多样性测度 θ ; Tajima's D. Tajima D 统计检验; NA. 不能获得; *. 根据进化枝包含的全体序列计算。

Note: H_d . Haplotype diversity; π . Nucleotide diversity measure π ; θ . Nucleotide diversity measure θ ; Tajima's D. A statistical test for distinguishing between neutral and no neutral evolution; NA. Not available; * Indicates that parameters were estimated using whole sequences contained in a clade.

采用遗传距离和固定指数 F_{st} 两个指标度量类群间的遗传分化,结果见表 4。不同进化枝类群间的成对遗传距离基本上都大于 0.01,而同一进化枝的不同类群的成对遗传距离大多在 0 ~ 0.001 之间,仅进化枝 2 的类群彼此的遗传距离在 0.002 ~ 0.004 之间。进一步计算任意两条 *Sbe I* 基因序列的成对遗传距离,并绘制遗传距离的分布图,结果见图 2。就同一进化枝而言,类群内的遗传距离和类群间的遗传距离在分布范围上重叠,而位于不同进化枝的类群其成对遗传距离主要分布在 0.009 ~ 0.016 之间,几乎不与前两者的遗传距离分布重叠。成对遗传距离的分布模式显示,进化枝中不同类群彼此间的遗传分化水平与同一类群不同个体间的遗传分化水平相当。

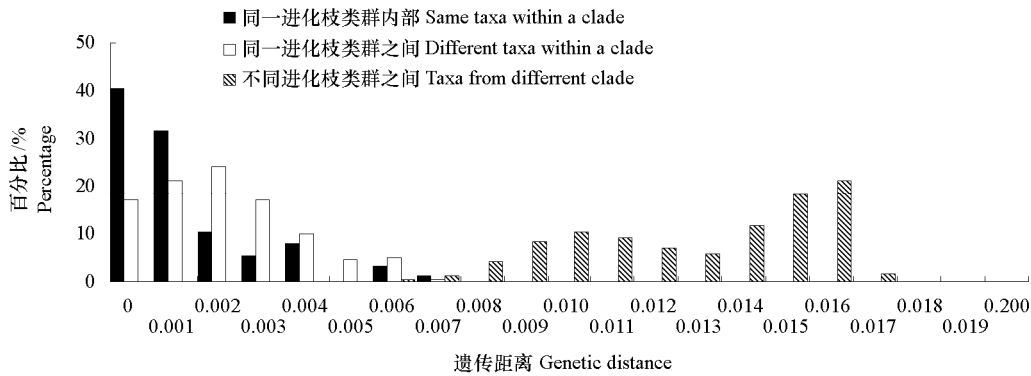


图 2 *SbeI* 序列成对遗传距离的分布图

Fig. 2 The plot of pairwise genetic distances calculated with *SbeI* sequences obtained in this study

表 4 变叶海棠物种复合体类群间遗传距离（上）和固定指数（下）的估计值

Table 4 The estimation of genetic distances (first number) and fixed index (second number)

居群 Population	C1				C2					C3		
	Tor	Set	Mae	Xia	Tra	Tor	Set	Mae	Xia	Kan	Mae	Xia
C1	0											
(Tor)	-											
C1	0	0.001										
(Set)	0.00011	-										
C1 (Mae)	0	0	0.001									
	0	0	-									
C1	0	0	0	0								
(Xia)	0	0	0	-								
C2	0.015	0.014	0.014	0.014	0.001							
(Tra)	0.96545	0.95340	0.97248	0.97248	-							
C2	0.015	0.015	0.015	0.015	0.002	0.001						
(Tor)	0.95225	0.94062	0.95875	0.95875	0.45234	-						
C2	0.015	0.015	0.015	0.015	0.003	0.003	0.003					
(Set)	0.89310	0.87987	0.89925	0.89925	0.27618	0.36975	-					
C2	0.015	0.015	0.015	0.015	0.003	0.002	0.004	0.001				
(Mae)	0.94738	0.93627	0.95392	0.95392	0.57685	0.38728	0.49795	-				
C2	0.016	0.015	0.015	0.015	0.003	0.002	0.004	0.001	0.001			
(Xia)	0.97667	0.96586	0.98322	0.98322	0.76340	0.50566	0.59917	0.00027	-			
C3	0.012	0.013	0.012	0.012	0.010	0.010	0.012	0.010	0.011	0.001		
(Kan)	0.96239	0.95003	0.97081	0.97081	0.92085	0.90514	0.83832	0.89717	0.94253	-		
C3	0.011	0.012	0.011	0.011	0.009	0.010	0.011	0.009	0.010	0.001	0.001	
(Mae)	0.96004	0.94696	0.96897	0.96897	0.91443	0.89818	0.82781	0.88950	0.93844	0.00017	-	
C3	0.011	0.011	0.011	0.011	0.008	0.009	0.010	0.009	0.009	0.001	0.001	0.001
(Xia)	0.93441	0.92117	0.94346	0.94346	0.87815	0.86477	0.79546	0.85512	0.90793	0.15415	-0.22215	-

注：“-”表示单个居群无法进行固定指数估算，固定指数只能用于度量居群间的遗传分化程度。Tor：变叶海棠；Set：多毛海棠；Mae：马尔康海棠；Xia：小金海棠；Tra：花叶海棠；Kan：陇东海棠；C1、C2和C3分别代表进化枝1、2和3。

Note: “-” indicates that fixed index cannot be obtained from just one population because fixed index measures genetic divergence between different populations. Tor: *Malus × toringoides*; Set: *M. × setok*; Mae: *M. × maerkangensis*; Xia: *M. × xiaojinensis*; Tra: *M. transitoria*; Kan: *M. kansuensis*. C1, C2 and C3 indicate clade 1, 2 and 3, respectively.

固定指数 F_{st} 的估计值和遗传距离的计算结果基本一致 (表 4)。不同进化枝类群的成对 F_{st} 值趋近于 1, 表明位于不同进化枝的类群在 *Sbe I* 基因序列上几乎全是固定的核苷酸差异, 而同一进化枝不同类群的成对 F_{st} 值相对较小。其中进化枝 1 的类群彼此基本不存在固定差异, 进化枝 3 的 3 个类群存在微弱的固定核苷酸差异。进化枝 2 的 5 个类群除马尔康海棠和小金海棠的成对 F_{st} 值很小外, 其余均存在一定程度的遗传分化, 但是仍然小于不同进化枝类群间的遗传分化。

3 讨论

变叶海棠物种复合体的陇东海棠、花叶海棠和变叶海棠不但地理分布范围广, 并且表型性状独特, 是苹果属植物中物种地位很明确的 3 个类群 (李育农, 2001), 而多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠 3 个类群最近才被赋予物种地位。中国植物志记载多毛海棠由瓦西里钦科在 1959 年提出 (俞德浚 等, 1974), 成明昊等 (2002) 根据形态特征将多毛海棠界定为独立物种, 划入变叶海棠物种复合体; 小金海棠由成明昊等 (1983) 描述并界定为新物种; 马尔康海棠由成明昊等 (1992) 提出并赋予物种地位, 成明昊等 (2003) 根据形态性状将马尔康海棠划入变叶海棠物种复合体。基于形态学、分子标记、多拷贝核基因 ITS、单拷贝核基因 *Sbe I* 和叶绿体片段的研究解决了变叶海棠物种复合体中多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠的进化起源问题 (石胜友 等, 2005; Feng et al., 2007; Tang et al., 2014)。但是, 前人在建立上述 3 个类群的物种地位时主要依据表型性状, 迄今尚未从 DNA 序列遗传分化的角度探索变叶海棠物种复合体的物种界定问题。

本试验通过分析变叶海棠物种复合体 *Sbe I* 基因的变异模式, 发现多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠的不同个体具有几乎完全相同的 *Sbe I* 序列, 并且它们的遗传多样性水平很低 (表 3), 表明这些个体很可能是无融合生殖的产物。人工传粉试验也显示上述类群主要通过无融合生殖产生种子 (李育农, 2001)。居群遗传分化的计算结果显示, 同一进化枝的不同类群相互之间的遗传分化水平很低, 远远小于不同进化枝之间类群的遗传分化 (表 4, 图 2); 而物种界定分析不支持将同一进化枝的变叶海棠、多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠界定为独立物种 (表 2)。*Sbe I* 基因的遗传分化和物种界定分析的结果一致表明, 变叶海棠、多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠中来自同一亲本的 DNA 序列, 尚未达到种间遗传分化的程度。

在植物的进化过程中, 杂交和无融合生殖将产生一系列表型略微分化, 但是遗传上高度相似的类群。分类学家使用“无融合生殖种”来描述通过上述方式产生的类群, 旨在与通过遗传分化和生殖隔离产生的类群, 即物种区别。比如, 蔷薇科花楸属植物通过频繁杂交产生了大量与亲本相比表型存在一定差异的类群, 这些杂交起源的类群以无融合生殖方式繁殖, 被分类学家处理为无融合生殖种而非独立的物种 (Robertson et al., 2010; Durkovic et al., 2012)。变叶海棠物种复合体中的多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠均为无融合生殖杂种, 且表型性状与其亲本接近, 因此把这 3 者界定为物种不符合当前普遍接受的分类学处理原则。综上所述, 多毛海棠、马尔康海棠和小金海棠应处理为变叶海棠物种复合体的无融合生殖种。同时, 由于多毛海棠与变叶海棠的遗传来源相同, 且物种界定分析不支持二者分别成种, 所以建议将多毛海棠处理为变叶海棠的变型。复合体的另外两个无融合生殖种马尔康海棠和小金海棠也具有相同的遗传来源, 且物种界定分析同样不支持二者分别成种, 因此建议将它们视为复合体中单个无融合生殖种。与表型性状相比, DNA 序列变异不受环境因素的影响, 应用在种间遗传分化度量和物种界定上无疑更可靠。当然, 分析更多的基因位点可以进一步检验上述结论的可靠性。

References

- Brassac J, Jakob S S, Blattner F R. 2012. Progenitor-derivative relationships of *Hordeum* polyploids (Poaceae, Triticeae) inferred from sequences of *TOPO6*, a nuclear low-copy gene region. *PLoS One*, 7 (3): e33808.
- Cheng Ming-hao, Jiang Ning-gong, Zeng Wei-guang. 1983. A new species of *Malus* Mill. - *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang. *Journal of Southwest Agricultural College*, 5 (4): 53 - 55. (in Chinese)
- 成明昊, 江宁拱, 曾维光. 1983. 苹果属一新种——小金海棠. *西南农学院学报*, 5 (4): 53 - 55.
- Cheng Ming-hao, Li Xiao-lin, Wang Mei, Zeng Wei-guang, Wu Fu-shou, Jin Qiang. 1992. A study on the variant types of *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes. *Acta Horticulturae Sinica*, 19 (3): 233 - 239. (in Chinese)
- 成明昊, 李晓林, 王 枚, 曾维光, 吴福寿, 金 强. 1992. 变叶海棠变异类型的研究. *园艺学报*, 19 (3): 233 - 239.
- Cheng Ming-hao, Li Xiao-lin, Zhang Yun-gui. 2000. *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang - A promising stock for apple trees. *Journal of Southwest Agricultural University*, 22 (5): 383 - 386. (in Chinese)
- 成明昊, 李晓林, 张云贵. 2000. 苹果优良砧木资源——小金海棠. *西南农业大学学报*, 22 (5): 383 - 386.
- Cheng Ming-hao, Liang Guo-lu, Shi Sheng-you, Zhou Zhi-qin, Li Xiao-lin. 2003. Studies on population differentiation of *Malus toringoides* Hughes and origin of *Malus maerkangesis* Cheng, Zeng et Jin. *Journal of Southwest Agricultural University*, 25 (1): 1 - 4. (in Chinese)
- 成明昊, 梁国鲁, 石胜友, 周志钦, 李晓林. 2003. 变叶海棠种群分化与马尔康海棠起源研究. *西南农业大学学报*, 25 (1): 1 - 4.
- Cheng Ming-hao, Zhang Yun-gui, Li Xiao-lin, Jin Qiang, Xie Xiao-li. 1999. Study on the floristic geography of *Malus toringoides*. *Journal of Southwest Agricultural University*, 21 (2): 130 - 136. (in Chinese)
- 成明昊, 张云贵, 李晓林, 金 强, 谢晓黎. 1999. 变叶海棠多样性的区系地理研究. *西南农业大学学报*, 21 (2): 130 - 136.
- Cheng Ming-hao, Zhang Yun-gui, Zhou Zhi-qin, Li Xiao-lin. 2002. A study on population differentiation of *Malus toringoides* Hughes and origin of *M. setok* Vass. *Journal of Southwest Agricultural University*, 24 (6): 515 - 517. (in Chinese)
- 成明昊, 张云贵, 周志钦, 李晓林. 2002. 变叶海棠居群分化与多毛海棠起源研究. *西南农业大学学报*, 24 (6): 515 - 517.
- Cummings M P, Neel M C, Shaw K L. 2008. A genealogical approach to quantifying lineage divergence. *Evolution*, 62 (9): 2411 - 2422.
- De Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56 (6): 879 - 886.
- Deng Hong-ping, Cheng Ming-hao, Zhou Zhi-qin, Li Xiao-lin. 2002. The formation and differentiation of the diversity of *Malus toringoides* Hughes. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (2): 95 - 99. (in Chinese)
- 邓洪平, 成明昊, 周志钦, 李晓林. 2002. 变叶海棠种群多样性的形成与分化研究. *园艺学报*, 29 (2): 95 - 99.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
- Doyle J J, Doyle J L, Rauscher J T, Brown A H D. 2004. Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*). *New Phytologist*, 161 (1): 121 - 132.
- Durkovic J, Kardosová M, Canová I, Lagana R, Priwitzer T, Chorvát D Jr, Cicák A, Pichler V. 2012. Leaf traits in parental and hybrid species of *Sorbus* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 99 (9): 1489 - 1500.
- Feng T T, Zhou Z Q, Tang J M, Cheng M H, Zhou S L. 2007. ITS sequence variation supports the hybrid origin of *Malus toringoides* Hughes. *Canadian Journal of Botany*, 85 (7): 659 - 666.
- Fujita M K, Leaché A D, Burbrink F T, McGuire J A, Moritz C. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (9): 480 - 488.
- Ge S, Sang T, Lu B R, Hong D Y. 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (25): 14400 - 14405.
- Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59 (3): 307 - 321.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16 (2): 111 - 120.
- Koch M A, Dobeš C, Mitchell-Olds T. 2003. Multiple hybrid formation in natural populations: Concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 20 (3): 338 - 350.

- Li Yu-nong. 2001. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 李育农. 2001. 苹果属植物种质资源研究. 北京: 中国农业出版社.
- Liang Guo-lu, Li Xiao-lin. 1993. Chromosome studies of Chinese species of *Malus* Mill. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 31 (3): 236 – 251. (in Chinese)
- 梁国鲁, 李晓林. 1993. 中国苹果属植物染色体研究. *植物分类学报*, 31 (3): 236 – 251.
- Librado P, Rozas J. 2009. DNASP V5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451 – 1452.
- Lo E Y Y, Stefanović S, Dickinson T A. 2010. Reconstructing reticulation history in a phylogenetic framework and the potential of allopatric speciation driven by polyploidy in an agamic complex in *crataegus* (Rosaceae). *Evolution*, 64 (12): 3593 – 3608.
- Martin D P, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. 2010. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26 (19): 2462 – 2463.
- Posada D, Crandall K A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817 – 818.
- Robertson A, Rich T C, Allen A M, Houston L, Roberts C, Bridle J R, Harris S A, Hiscock S J. 2010. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Molecular Ecology*, 19 (8): 1675 – 1690.
- Sang T. 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular*, 37 (3): 121 – 147.
- Shi Sheng-you, Cheng Ming-hao, Liang Guo-lu. 2004. *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes – A promising stock for apple trees. *Journal of Southwest Agricultural University*, 26 (1): 51 – 54. (in Chinese)
- 石胜友, 成明昊, 梁国鲁. 2004. 苹果优良砧木资源——变叶海棠. *西南农业大学学报*, 26 (1): 51 – 54.
- Shi Sheng-you, Liang Guo-lu, Cheng Ming-hao, Guo Qi-gao, Li Xiao-lin, Zhou Zhi-qin. 2005. AFLP analysis of the origin of *Malus toringoides* Hughes. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 802 – 806. (in Chinese)
- 石胜友, 梁国鲁, 成明昊, 郭启高, 李晓林, 周志钦. 2005. 变叶海棠起源的 AFLP 分析. *园艺学报*, 32 (5): 802 – 806.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 – 2739.
- Tang L, Li J, Tan S, Li M X, Ma X, Zhou Z Q. 2014. New insights into the hybrid origin of *Malus toringoides* and its close relatives based on a single-copy nuclear gene *SbeI* and three chloroplast fragments. *Journal of Systematics and Evolution*, doi: 10.1111/jse.12079.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24): 4876 – 4882.
- Yu De-jun, Lu Ling-di, Gu Cui-zhi, Guan Ke-jian, Jiang Wan-fu. 1974. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Vol. 36. Beijing: Science Press: 372 – 402. (in Chinese)
- 俞德浚, 陆玲娣, 谷粹芝, 关克俭, 江万福. 1974. 中国植物志. 36 卷. 北京: 科学出版社: 372 – 402.
- Zhang J J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29 (22): 2869 – 2876.
- Zou X H, Zhang F M, Zhang J G, Zang L L, Tang L, Wang J, Sang T, Ge S. 2008. Analysis of 142 genes resolves the rapid diversification of the rice genus. *Genome Biology*, 9 (3): R49.