



## 研究报告

## Research Report

# 31 种欧美观赏海棠遗传多样性的 AFLP 分析

刘凤栾<sup>1</sup>, 房义福<sup>1</sup>, 宋国防<sup>2</sup>, 吴晓星<sup>1</sup>, 姜莉华<sup>2</sup>, 姜楠南<sup>1</sup>, 王翠香<sup>1</sup>

1. 山东省林业科学研究院, 济南, 250014

2. 光合园林股份有限公司, 济南, 250100

✉ 通讯作者: fyf7741@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 9 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0009

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

刘凤栾等, 2013, 31 种欧美观赏海棠遗传多样性的 AFLP 分析, 分子植物育种(online), 11(9): 1052-1059 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0009)

引用格式(英文):

Liu et al., 2013, AFLP Analysis of the Genetic Diversity for 31 Euramerican Ornamental Crabapples, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(9): 1052-1059 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0009)

**摘要** 使用 AFLP 分子标记技术, 对 31 种在我国北方地区适应性良好的欧美观赏海棠进行遗传多样性分析, 为其品种鉴定、分类, 新品种培育中合适亲本的选择等提供分子生物学依据。在 94 对引物组合中, 筛选出带型清晰稳定、多态性高的引物 10 对进行选择性扩增, 得到 DNA 条带 601 条, 其中多态性条带 519 条, 多态性位点平均为 86.22%。31 份海棠种质的 Nei's 基因多样性指数为 0.184 4~0.313 0, 平均 0.240 6; Shannon 信息指数为 0.300 5~0.470 8, 平均 0.376 5。这表明供试欧美观赏海棠具有较高的遗传多样性。对 31 个样品进行聚类分析, 在遗传距离 0.204 处, 将供试海棠分为 5 大类: 第一类有 17 份种质, 第二类有 11 份种质, 第三、四和五类均只有 1 份种质, 此结果明确了各供试材料的亲缘关系, 并基本验证了其形态学分类的合理性。

**关键词** 海棠; AFLP; 遗传多样性; 分类

## AFLP Analysis of the Genetic Diversity for 31 Euramerican Ornamental Crabapples

Liu Fengluan<sup>1</sup>, Fang Yifu<sup>1</sup>, Song Guofang<sup>2</sup>, Wu Xiaoxing<sup>1</sup>, Jiang Lihua<sup>2</sup>, Jiang Nannan<sup>1</sup>, Wang Cuixiang<sup>1</sup>

1. Shandong Institute of Forestry Science, Jinan, 50014, P.R. China

2. Grehar Landscape Incorporated Company, Jinan, 250100, P.R. China

✉ Corresponding author, fyf7741@163.com; ✉ Authors

**Abstract** To identification, classification of crabapples cultivar, and parental selection in the breeding of new varieties, the genetic diversity of 31 ornamental crabapples from Euramericanshowing a good adaptability in north China was analyzed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Ten pairs of primers with clear, stable bands and high polymorphism of bands was selected from 94 pairs of primers. There were 601 bands were produced, of which 519 bands were polymorphic that had 86.22 percent of the total bands. For the 31 samples, Nei's gene diversity index was ranged from 0.184 4 to 0.313 0, with an average of 0.240 6; Shannon information index was from 0.300 5 to 0.470 8 with the mean of 0.376 5, which suggested that therewas high levelof genetic variation among the 31 crabapples. The UPGMA cluster analysis revealed that 31 samples formed five distinct groups at 0.204 genetic distance. Two Groups were composed of 17 and 11samples separately, and only one sample in each of other groups, which revealed the genetic relationship of 31 ornamental crabapples, and confirmed the rationality in morphological classification ofthe tested materials.

**Keywords** *Malus* spp.; AFLP; Genetic diversity; Classification

收稿日期: 2013 年 03 月 02 日

接受日期: 2013 年 05 月 03 日

发表日期: 2013 年 05 月 17 日

基金项目: 本研究由山东省农业良种工程(鲁科农社字 2007-217)资助

## 研究背景

海棠(*Malus* spp.)属蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus*)植物, 在中国有着悠久的栽培历史, 具有很高的观赏价值, 在近代园林绿化中应用广泛(俞德浚



和阎振茏, 1956, 植物分类学报, 5(2): 77-110; 李育农, 2001, 中国农业出版社, pp.201-266)。近 200 多年, 在从中国引种并进行大量杂交选育的基础上, 国外园艺工作者培育了一系列观花、观果和观叶海棠新品种, 统称为观赏海棠(Dirr, 1990)。适当引进欧美观赏海棠品种进行驯化, 选育适宜我国不同立地条件生长的优良品种, 可快速提高和丰富我国城乡园林景观层次, 亦为培育具有自主知识产权的新品种提供了大量亲本。但苹果属植物遗传背景复杂, 尤其海棠遗传多样性极为丰富, 使得(观赏)海棠品种鉴定和分类困难(陈恒新等, 2007; 郑杨等, 2008), 给推广应用、新品种选育带来了的不便。因此, 运用合适的技术手段, 准确分析观赏海棠的遗传多样性成为必要。

目前, 观赏海棠的研究主要涉及物种起源(成明昊等, 2002; 石胜友等, 2006)、遗传多样性和品种分类(Ranney and Eaker, 2004; 郭翎等, 2009; 沈红香等, 2011)、逆境生理(Lloyd et al., 2006; 胡玉净等, 2012)及性状分析(刘志强和汤庚国, 2004; 文樵夫等, 2010)等方面, 其中关于海棠遗传多样性的研究出现较早, 内容也较为丰富。中国古代书籍《花谱》和《群芳谱》等记载了很多传统观赏海棠, 并描述了其性状多样性和品种差异。在近代, 国内外学者运用形态学分类(刘志强和汤庚国, 2004; 郑杨等, 2008)、形态解剖学和孢粉学分类(Martens and Fretz, 1980a; 1980b; 李晓磊等, 2008)、同工酶标记分类(Marquard and Chan, 1995; Simo Santalla et al., 2000)等方法, 对观赏海棠进行了遗传多样性分析和品种分类, 并取得了一定的成果。但由于研究层次和使用标准的不同, 上述方法所获得数据仍存在很多差异或争议(陈恒新等, 2007; 楚爱香和汤庚国, 2008, 生物学通报, 43(7): 15-17)。

分子标记技术可在 DNA 水平检测生物间差异, 不受环境与基因表达差异的影响, 与传统形态学鉴定和同工酶鉴定技术相比, 可更接近真实地反映物种间遗传分化关系。目前, 分子标记技术已发展出 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SRAP 及 SNP 等多种方法。其中, AFLP 分子标记(Vos et al., 1995)具有多态性好、稳定性高、均匀分布全基因组等特点, 在几种分子标记中所反映的生物信息最多, 综合效用最大, 现已广泛应用于种质资源鉴定和分类(张强英等, 2012)、物种遗传多样性分析(Hend et al., 2009)等领域。目前, 涉及分子标记技术分析观赏海棠遗传多样性已有报道, 但其样本多限于某些(品)

种(石胜友等, 2006; Benson et al., 2001; 楚爱香和汤庚国, 2008)、后代群体(赵天田等, 2010; 沈红香等, 2011), 或偏重于物种演化和起源关系(张宁等, 2007)。针对大样本量欧美观赏海棠品种遗传多样性的分析及品种分类还未有研究。

本试验以经 8 年筛选的适合我国北方区生长的 31 种欧美观赏海棠为对象, 利用 AFLP 分子标记技术对其进行遗传多样性和亲缘关系分析, 旨在为所引进欧美观赏海棠品种鉴定和分类, 以及自主新品种培育的亲本选择等提供分子生物学依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 31 个样品 DNA 的提取

DNA 提取完成后, 通过测定紫外光吸收值, 确定了其浓度和纯度, 并用 0.8% Agarose 胶电泳, 发现 DNA 完整性较好。

### 1.2 预扩增产物电泳检测

对 31 个样品预扩增进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见产物条带呈弥散状, DNA 片段多集中于 250~750 bp, 说明酶切较完全, 接头连接较好。

### 1.3 AFLP 扩增产物多态性

从 94 对引物组合中筛选出带型清晰稳定、多态性高的引物 10 对: E41M51C、E42M51G、E41M51G、E44M51C、E44M51G、E83M51C、E83M51G、E84M51C、E85M51G、E86M51C (表 1), 对 31 份海棠种质材料进行选择扩增, 获得了较好的扩增效果。共扩增出 601 条 DNA 条带, 多态性条带 519 条, 多态性位点平均为 86.22%, 不同种质之间存在一定的遗传差异。在 10 对引物中, 以 E44M51G 组合扩增的位点最多, 为 71 个; E83M51G 组合最少, 为 52 个; 引物组合 E83M51C 扩增的多态性位点比率最高, 为 95.08% (图 1); E41M51C 扩增的多态性位点比率最低, 为 76.36%。这表明不同引物对扩增出的多态带数量及比率存在一定的差异。

### 1.4 31 种欧美观赏海棠种质的遗传多样性

Nei's 基因多样性指数( $H$ )、Shannon 信息指数( $I$ )是度量遗传多样性水平的常用指标。31 份海棠种质的 Nei's 基因多样性指数为 0.184 4~0.313 0, 平均 0.240 6; Shannon 信息指数为 0.300 5~0.470 8, 平均 0.376 5 (表 1), 说明供试海棠种质表现出较高的遗传多样性。对于所选用的 10 对引物而言, 所揭示的各海棠种质相应位点的遗传多样性存在一定

差异: E86M51C 引物组合显示的 Nei's 基因多样性和 Shannon 信息指数最低, E84M51C 组合最高(表 1), 表明合适的引物组合筛选对全面揭示供试 31 种海棠种质资源遗传多样性十分重要。

### 1.5 31 种欧美观赏海棠种质的聚类分析

对 31 份海棠种质进行 UPGMA 聚类分析并绘制树状图(图 2)。以遗传距离 0.204 为界, 可将供试样品分为以下 5 类。第一类有 17 份种质, 包括‘爱丽’海棠、‘盛花’海棠、‘美丽’海棠和‘印第安魔力’

海棠等。其中‘爱丽’海棠、‘盛花’海棠和‘莱姆’海棠遗传距离最小, 表明三者亲缘关系最近。第二类有 11 份种质, 包括‘春雪’海棠、‘道格’海棠、‘琥珀’海棠、森林苹果海棠和‘绚丽’海棠等。其中‘琥珀’海棠、‘鲁道夫’海棠、‘奈微利考伯曼’海棠和‘霹雳贝贝’海棠亲缘关系较近。第三、四和五类均只有 1 份样品, 分别为‘粉芽’海棠、钟诺斯海棠和‘王族’海棠, 各自单成一类, 三者之间以及与第一、二类群中品种(种)遗传距离大, 亲缘关系远。

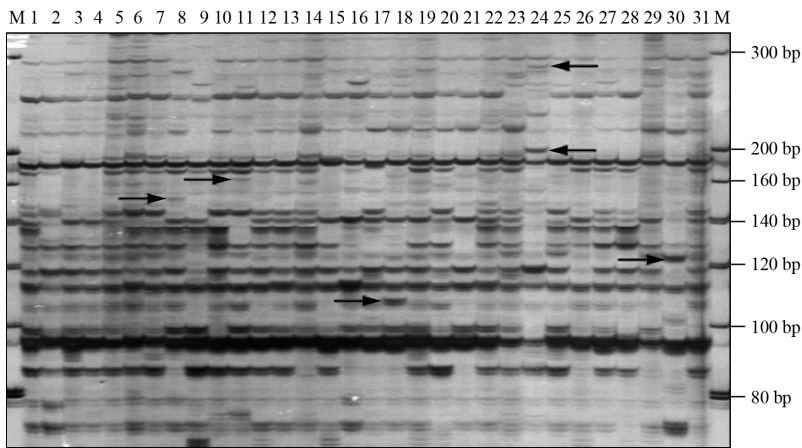


图 1 引物 E83/M51C 组合对 31 个样品 AFLP 选择性扩增图谱

注: M: DNA 2000 maker; 1~31: 各个样品编号; 箭头: 部分种质的指纹标记

Figure 1 Map of AFLP selection amplification in primers E83/M51C for 31 samples

Note: M: DNA 2000 maker; 1~31: Samples number; Arrows: Fingerprint of some samples

表 1 31 个样本 AFLP 扩增产物的多态性及遗传多样性

Table 1 The polymorphism of AFLP amplified bands and genetic diversity among the 31 samples

引物 Primers	总位点 Nb	多态位点 Np	多态位点 比率(%) PPL (%)	观测等位基因 Na	有效等位基因数 Nei	遗传多样性 H	Shannon 信息指数 I
E41M51C	55	42	76.36	1.763 6	1.331 3	0.207 0	0.325 6
E42M51G	65	57	87.69	1.876 9	1.467 9	0.277 3	0.422 2
E41M51G	62	50	80.65	1.806 5	1.388 5	0.238 0	0.368 9
E44M51C	55	47	85.45	1.854 5	1.359 7	0.230 9	0.366 1
E44M51G	71	65	91.55	1.915 5	1.377 3	0.243 7	0.387 0
E83M51C	61	58	95.08	1.950 8	1.424 5	0.260 8	0.408 0
E83M51G	52	46	88.46	1.884 6	1.350 1	0.228 3	0.365 9
E84M51C	63	51	80.95	1.809 5	1.283 2	0.184 4	0.300 5
E85M51G	58	48	82.76	1.827 6	1.359 6	0.222 2	0.349 6
E86M51C	59	55	93.22	1.932 2	1.536 1	0.313 0	0.470 8
均值 Mean	60.1	51.9	86.22	1.862 2	1.387 8	0.240 6	0.376 5

注: Nb: 总位点; Np: 多态位点; PPL: 多态位点比率; Na: 观测等位基因; Nei: 有效等位基因数(Kimura and Crow, 1964); H: 遗传多样性(Nei, 1973); I: Shannon信息指数 (Lewontin, 1995)

Note: Nb: Number of bands; Np: Number of polymorphic bands; PPL: Percentage of polymorphic loci; Na: Observed number of alleles; Nei: Effective number of alleles (Kimura and Crow, 1964); H: Nei's gene diversity (Nei, 1973); I: Shannon's information index (Lewontin, 1995)

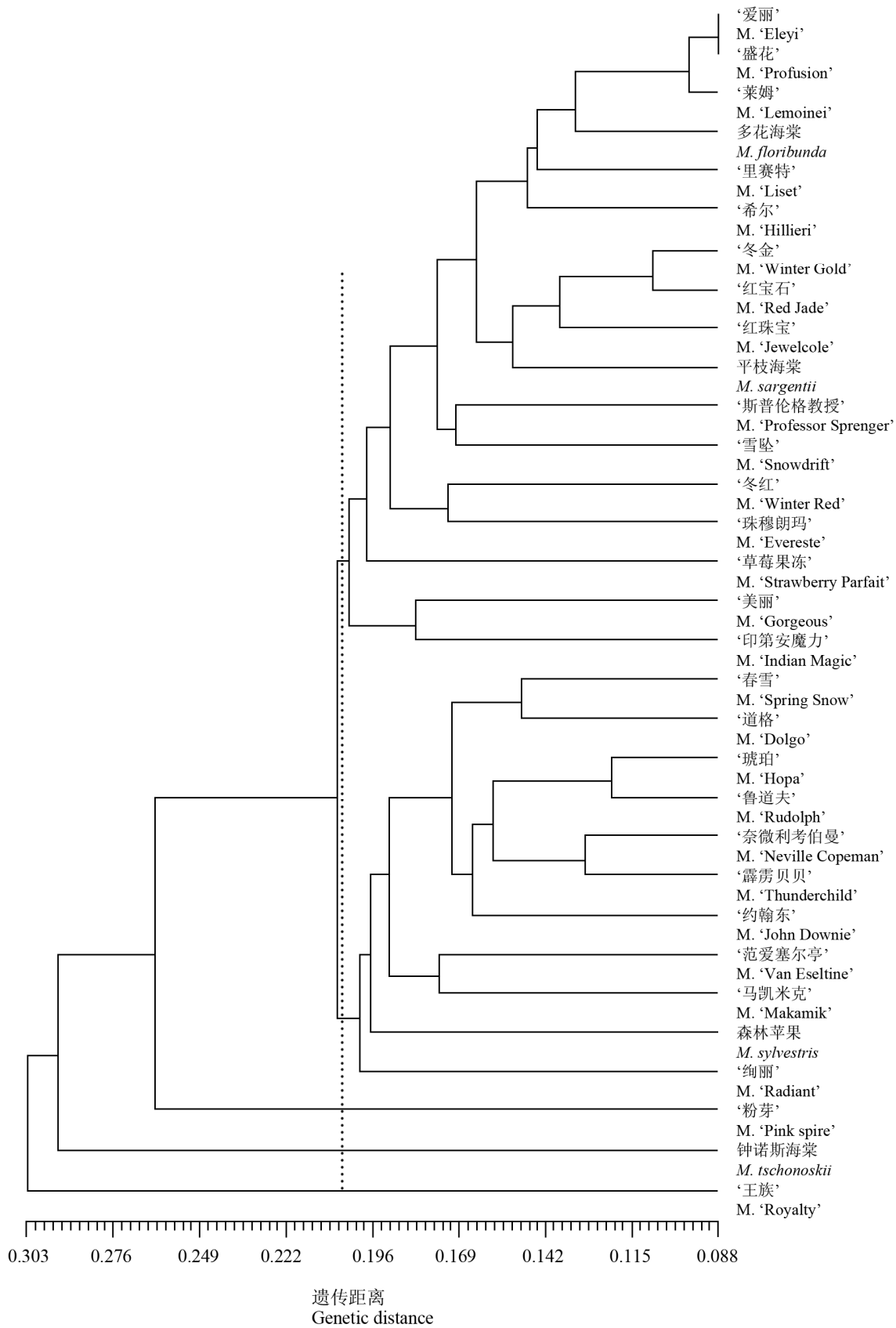


图 2 31 种欧美观赏海棠的聚类分析

Figure 2 Cluster analysis of 31 euramerican ornamental crabapples

## 2 讨论

本研究利用 AFLP 分子标记技术, 首次对 31 个欧美观赏海棠品种进行了遗传多样性和亲缘关系分析。在第一类群中, ‘爱丽’海棠、‘盛花’海棠和‘莱姆’海棠的亲缘关系最近, 与多花海棠、‘里赛特’海棠及‘希尔’海棠聚为一亚类, 是 31 份种质资源中亲缘关系最近的一组。此六种海棠均为红色花瓣, 暗示 10 对引物扩增的多态性条带可能与海棠花色性状相关。而在形态学分类中, 前五种海棠均被归入花红色、单瓣一类, ‘希尔’海棠被归入花红色、重瓣一类。因此, 对‘希尔’海棠而言, 在分子水平上与红花单瓣品种亲缘关系较近, 但形态上属于红花重瓣品种, 由此表明, ‘希尔’海棠是由红花单瓣品种雄蕊瓣化而来, 这为观赏海棠重瓣花由单瓣花进化而来的观点提供了分子生物学论据。

第二类群中, ‘春雪’海棠、‘道格’海棠、‘琥珀’海棠、‘鲁道夫’海棠、‘奈微利考伯曼’海棠、‘霹雳贝贝’海棠和‘约翰东’海棠聚为一个亚类, 亲缘关系较近, 其中花朵白色、具香味的‘春雪’海棠与‘道格’海棠独成一枝, 与其他五种花色偏红(‘约翰东’除外)、无香味海棠分开。此结果验证了‘道格’是‘春雪’亲本的关系(郭翎等, 2009), 也暗示了所扩增多态性条带可能与花色花香相关; 并提示育种者, ‘琥珀’海棠、‘鲁道夫’海棠、‘奈微利考伯曼’海棠、‘霹雳贝贝’海棠和‘约翰东’海棠是培育具花香新观赏海棠品种的合适亲本材料。

目前, 涉及欧美观赏海棠分子标记分类的研究不多。在郭翎等(2009)对 72 个苹果属种、杂交种及品种 of AFLP 分析中, ‘印第安魔力’海棠与‘斯普伦格教授’海棠亲缘关系较近, 与多花海棠、‘印第安魔力’海棠聚在一个类群内。在本研究中, 上述 4 个海棠亦聚在同一类群, 但与‘斯普伦格教授’海棠亲缘关系较近的为平枝海棠, 推测这主要是由两者供试材料差异较大及 AFLP 选择性扩增引物不同造成的。‘春雪’海棠、‘道格’海棠和‘绚丽’海棠聚类在第二类群, 亲缘关系较近, 符合三者亲本之一均为山荆子(*M. baccata*)的事实(郑杨等, 2008; 郭翎等, 2009)。

AFLP 聚类结果所体现的是种质间基因型的差异, 而形态性状表现的是某些功能基因在内部和外部环境的共同作用下表达的结果(沈红香等, 2011)。因此, 在对引种的欧美观赏海棠品种分类中, AFLP 分子标记分类与传统形态学分类两者之间仍存在

一定的差异。在生产实践中, 两种方法(及其他研究方法)需要结合使用, 才能使观赏海棠品种分类达到较合理水平(陈恒新等, 2007)。

## 3 材料与方法

### 3.1 试验材料

2004 年 2 月起, 课题组从荷兰、美国引进观赏海棠品种(种)46 个, 在济南历城西营镇定植。经过多年的生长适应性调查比对, 于 2012 年 6 月初步筛选出观赏价值高、抗性较好的种质 31 份进行 AFLP 试验(表 2)。

表 2 供试的欧美观赏海棠 31 个品种(种)

Table 2 Introduction of 31 Euramerican ornamental crabapples

编号 No.	品种名称 Cultivar name	编号 No.	品种名称 Cultivar name
1	‘爱丽’ <i>M. ‘Eleyi’</i>	17	‘美丽’ <i>M. ‘Gorgeous’</i>
2	‘草莓果冻’ <i>M. ‘Strawberry Parfait’</i>	18	‘奈微利考伯曼’ <i>M. ‘Neville Copeman’</i>
3	‘春雪’ <i>M. ‘Spring Snow’</i>	19	‘霹雳贝贝’ <i>M. ‘Thunderchild’</i>
4	‘道格’ <i>M. ‘Dolgo’</i>	20	平枝海棠 <i>M. sargentii</i>
5	‘冬红’ <i>M. ‘Winter Red’</i>	21	森林苹果 <i>M. sylvestris</i>
6	‘冬金’ <i>M. ‘Winter Gold’</i>	22	‘盛花’ <i>M. ‘Profusion’</i>
7	多花海棠 <i>M. floribunda</i>	23	‘斯普伦格教授’ <i>M. ‘Professor Sprenger’</i>
8	‘范爱塞尔亭’ <i>M. ‘Van Eseltine’</i>	24	‘王族’ <i>M. ‘Royalty’</i>
9	‘粉芽’ <i>M. ‘Pink spire’</i>	25	‘希尔’ <i>M. ‘Hillieri’</i>
10	‘红宝石’ <i>M. ‘Red Jade’</i>	26	‘绚丽’ <i>M. ‘Radiant’</i>
11	‘红珠宝’ <i>M. ‘Jewelcole’</i>	27	‘雪坠’ <i>M. ‘Snowdrift’</i>
12	‘琥珀’ <i>M. ‘Hopa’</i>	28	‘印第安魔力’ <i>M. ‘Indian Magic’</i>
13	‘莱姆’ <i>M. ‘Lemoinei’</i>	29	‘约翰东’ <i>M. ‘John Downie’</i>
14	‘里赛特’ <i>M. ‘Liset’</i>	30	钟诺斯海棠 <i>M. tschonoskii</i>
15	‘鲁道夫’ <i>M. ‘Rudolph’</i>	31	‘珠穆朗玛’ <i>M. ‘Evereste’</i>
16	‘马凯米克’ <i>M. ‘Makamik’</i>		

### 3.2 试验方法

#### 3.2.1 DNA提取

随机选取一定量幼嫩叶片, 苯酚-氯仿法提取



DNA。通过测定紫外光吸收值来确定 DNA 浓度和纯度,并用 0.8% Agarose 胶检测电泳检查 DNA 完整性。

### 3.2.2 AFLP 试验

(1)酶切对所选样品采用 *EcoR* I /*Mse* I 双酶切:酶切体系(20  $\mu$ L)为: 10 $\times$ T4 Buffer 4  $\mu$ L; *EcoR* I (10 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L; *Mse* I (10 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L; 模板 DNA 约 200 ng; 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。酶切反应条件为 37 $^{\circ}$ C 3 h, 65 $^{\circ}$ C, 3 h。

(2)连接体系(20  $\mu$ L)为: 10 $\times$ T4 Buffer 2  $\mu$ L; *EcoR* I Adaptor (50  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L; *Mse* I Adaptor (50  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L; T4 ligase 0.4  $\mu$ L (5 weiss U/ $\mu$ L)酶切产物约 10  $\mu$ L; 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。

(3)预扩增反应体系: 2 $\times$ PCR Mix 10  $\mu$ L; E<sub>00</sub> 0.5  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L); M<sub>00</sub> 0.5  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L); 连接模板 2  $\mu$ L; 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s; 50 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 26 个循环。

(4)选择性扩增反应体系: 2 $\times$  PCR Mix 10  $\mu$ L; E<sub>primer</sub> 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L); M<sub>primer</sub> 1  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L); 模

板 DNA 5  $\mu$ L (预扩产物稀释 20 倍); 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 65 $^{\circ}$ C 复性 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 12 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 23 个循环。

(5)电泳和染色电泳时,先在 90W 恒功率条件下预电泳 30 min,然后按样本编号从小到大的顺序进行点样(7.5  $\mu$ L), 90 W 恒功率电泳 1.5 h。染色方式采用银染。

所用 *EcoR* I 酶以及所用接头、引物购自上海英骏生物工程技术服务有限公司, *Mse* I 酶、T4 DNA Ligase 酶购自 Promega 公司。接头和引物序列详见表 3。

### 3.2.3 数据分析

选取电泳平板上清晰可辨的电泳条带,以“1”和“0”分别记录条带的有无。在相同片段位置上有带记为“1”,无带记为“0”。制作 0/1 矩阵,作 0/1 矩阵输入 POPGENE1.32 软件进行分析。计算个体间 Nei 相似系数(Nei and Li, 1979),并用 NTSYSpc2.10 进行 UPGMA 聚类分析。

表 3 AFLP 引物和接头序列

Table 3 Primers and adapters sequence for AFLP

接头与引物 Primers and adapters	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	引物 Primers	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
<i>EcoR</i> I adapter1	CTCGTAGACTGCGTACC	E44	GACTGCGTACCAATTCATC
<i>EcoR</i> I adapter 2	AATTGGTACGCAGTCTAC	E83	GACTGCGTACCAATTCTCA
E00	GACTGCGTACCAATTC	E84	GACTGCGTACCAATTCTCC
M00	GATGAGTCCTGAGTAA	E85	GACTGCGTACCAATTCTCG
E41	GACTGCGTACCAATTCAGG	E86	GACTGCGTACCAATTCTCT
E42	GACTGCGTACCAATTCAGT	M51C	GATGAGTCCTGAGTAACCAC
E43	GACTGCGTACCAATTCATA	M51G	GATGAGTCCTGAGTAACCAG

### 作者贡献

房义福、宋国防是本研究的实验设计和实验研究的执行人;刘凤栾、吴晓星及姜莉华完成数据分析,论文初稿的写作;姜楠南、王翠香参与实验设计,试验结果分析;房义福是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由山东省农业良种工程(鲁科农社字 2007-217)资助。作者感谢山东农业大学林学院孙居文教授对本研究的技术支持与指导。

### 参考文献

Benson L.L., Lamboy W.F., and Zimmerman R.H., 2001,

Molecular identification of *Malushupehensis* (tea crabapple) accessions using simple sequence repeats, HortScience, 36(5): 961-966

Chen H.X., Liu L.F., Qian G.Z., and Tang G.G., 2007, Advances in classification for cultivars of crabapple (*Malus* spp.), Liaocheng Daxue Xuebao (Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition)), 20(2): 57-61 (陈恒新, 刘连芬, 钱关泽, 汤庚国, 2007, 海棠 (*Malus* spp.)品种分类研究进展, 聊城大学学报(自然科学版), 20(2): 57-61)

Cheng M.H., Zhang Y.G., Zhou Z.Q., and Li X.L., 2002, A study on population differentiation of *malustoringoides* Hughes and origin of *M. setokvass*, Yunnan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Southwest Agricultural

- University), 24(6): 515-517 (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)
- Chu A.X., and Tang G.G., 2008, Optimization of SRAP-PCR system and selection of primers for ornamental crabapple, Hubei Nongye Kexue (Hubei Agricultural Sciences), 47(12): 1394-1397 (楚爱香, 汤庚国, 2008, 观赏海棠 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选, 湖北农业科学, 47(12): 1394-1397)
- Durr M.A., ed., 1990, Manual of woody landscape plants: Their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses, Stipes Publishing Company Press, Champaign, pp.524
- Guo L., Zhou S.L., Zhang Z.S., Shen X., Cao Y., Zhang D.L., and Shu H.R., 2009, Relationships of species, hybrid species and cultivars in genus *Malus* revealed by AFLP markers, Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae), 45(4): 33-40 (郭翎, 周世良, 张佐双, 沈向, 曹颖, 张东林, 束怀瑞, 2009, 苹果属种、杂交种及品种之间关系的 AFLP 分析, 林业科学, 45(4): 33-40)
- Hend B.T., Ghada B., Sana B.M., Mohamed M., Mokhtar T., and Amel S.H., 2009, Genetic relatedness among Tunisian plum cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis and evaluation of phenotypic characters, Scientia Horticulturae, 121(4): 440-446  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.03.009>
- Hu Y.J., Deng L.J., Zhang J., Shen H.X., and Yao Y.C., 2012, Effects of exogenous ABA on accumulation of the soluble proteins and dehydrins in leaves of ornamental crabapples under soil drought stress, Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae), 48(4): 35-42 (胡玉净, 邓丽娟, 张杰, 沈红香, 姚允聪, 2012, 干旱胁迫下外源 ABA 对观赏海棠叶片可溶性蛋白和脱水素积累的影响, 林业科学, 48(4): 35-42)
- Kimura M., and Crow J.F., 1964, The number of alleles that can be maintained in a finite population, Genetics, 49: 725-783
- Lewontin R.C., 1995, The apportionment of human diversity, Evolutionary Biology, 6: 381-391
- Li X.L., Shen X., Sun F.Y., Shu H.R., Guo L., and Cao Y., 2008, Ornamental crabapple pollen morphology and its taxonomic applications, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 35(8): 1175-1182 (李晓磊, 沈向, 孙凡雅, 束怀瑞, 郭翎, 曹颖, 2008, 苹果属观赏海棠品种花粉形态及分类研究, 园艺学报, 35(8): 1175-1182)
- Liu Z.Q., and Tang G.G., 2004, A study on cultivar classification system of *Malushalliana* Koehne, Nanjing Linye Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)), 28 (1): 101-106 (刘志强, 汤庚国, 2004, 南京地区垂丝海棠品种分类研究, 南京林业大学学报(自然科学版), 28(1): 101-106)
- Lloyd J.E., Herms D.A., Rose M.A., and Van Wagoner J., 2006, Fertilization rate and irrigation scheduling in the nursery influence growth, insect performance, and stress tolerance of 'Sutyzam' crabapple in the landscape, HortScience, 41(2): 442-445
- Marquard R.D., and Chan C.R., 1995, Identifying crabapple cultivars by isozymes, Journal of the American Society for Horticultural Science, 120(5): 704-709
- Martens J., and Fretz T.A., 1980a, Identification of eight crabapples by pollen surfaces sculpture, Journal of the American Society for Horticultural Science, 105(2): 257-263
- Martens J., and Fretz T.A., 1980b, Differentiation of nine crabapples based on bud and leaf surface features, Journal of the American Society for Horticultural Science, 105(2): 263-273
- Nei M., 1973, Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proceedings of the National Academy of Sciences, 70(12): 3321-3323  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>  
PMid:4519626 PMCID:427228
- Nei M., and Li W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76(10): 5269-5273  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>  
PMid:291943 PMCID:413122
- Ranney T., and Eaker T., 2004, Variation in ploidy levels and reproductive pathways among flowering crabapples, HortScience, 39(4): 773
- Shen H.X., Zhao T.T., Song T.T., Yao Y.C., and Gao J.P., 2011, Genetic diversity analysis in natural hybrid progeny of ornamental crabapple, *Malus* 'Royalty', Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 38(11): 2157-2168 (沈红香, 赵天田, 宋婷婷, 姚允聪, 高俊平, 2011, 观赏海棠'王族'自然杂交后代的遗传多样性分析, 园艺学报, 38(11): 2157-2168)
- Shi S.Y., Cheng M.H., Liang G.L., Guo Q.G., Li X.L., and Zhou Z.Q., 2006, Genetic diversity of *Malustoringoides* (Rehd.) Hughes based on AFLP, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 33(2): 381-384 (石胜友, 成明昊, 梁国鲁, 郭启高, 李晓林, 周志钦, 2006, 变叶海棠遗传多样性的 AFLP 分析, 园艺学报, 33(2): 381-384)
- Simo-Santalla P., Chu N.T., and Georges D., 2000, Characterisation of crabapple clones by isozyme electrophoresis, Acta Horticulturae, 508: 301-302
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T.,



- Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., and Zabeau M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucl. Acids Res.*, 23(21): 4407-4414  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>  
PMid:7501463 PMCID:307397
- Wen Q.F., Shen H.X., Yao Y.C., Tian J., and Song T.T., 2010, Cloning and expression of *McDFR* gene in the different foliar color cultivars of *Malus crabapple*, *Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae)*, 46(11): 16-24 (文樵夫, 沈红香, 姚允聪, 田佶, 宋婷婷, 2010, 苹果属观赏海棠 *McDFR* 的克隆及不同叶色品种间的表达差异, *林业科学*, 46(11): 16-24)
- Zhang N., Shen H.X., Gao X.H., Yao Y.C., Wang Y., and Feng Y.Q., 2007, Phylogenetic relationship between ornamental and wild species of *Malus* in China, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 34(5): 1227-1234 (张宁, 沈红香, 高遐红, 姚允聪, 王洋, 冯永庆, 2007, 苹果属部分观赏品种与中国野生种间亲缘关系的研究, *园艺学报*, 34(5): 1227-1234)
- Zhang Q.Y., Zhang Q.X., and Cheng T.R., 2012, Genetic diversity of wild populations of *Prunustriloba* revealed by AFLP, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 10(4): 452-456 (张强英, 张启翔, 程堂仁, 2012, 野生榆叶梅遗传多样性的 AFLP 分析, *分子植物育种*, 10(4): 452-456)
- Zhao T.T., Shen H.X., YAO Y.C., Cao Q.Q., and Song T.T., 2010, Identification of parentage of ornamental crabapple seedlings using AFLP markers, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 37(1): 121-128 (赵天田, 沈红香, 姚允聪, 曹庆芹, 宋婷婷, 2010, 苹果属观赏海棠实生单株亲本 AFLP 鉴定, *园艺学报*, 37(1): 121-128)
- Zheng Y., Qu X.L., Guo L., Sun F.Y., Mao Z.Q., and Shen X., 2008, Advances on ornamental crabapple resources, *Shandong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science))*, 39(1): 152-160 (郑杨, 曲晓玲, 郭翎, 孙凡雅, 毛志泉, 沈向, 2008, 观赏海棠资源谱系分析及育种研究进展, *山东农业大学学报(自然科学版)*, 39(1): 152-160)