

基于叶绿体 DNA *atpB-rbcL* 片段的典型樱亚属
部分种的亲缘关系及分类地位探讨

朱 弘 伊贤贵 朱淑霞 王华辰 段一凡 王贤荣*

(南京林业大学南方现代林业协同创新中心 生物与环境学院 热带森林生物多样性保护国家林业局重点实验室 南京 210037)

摘 要 蔷薇科典型樱亚属植物(Subg. *Cerasus* Koehne) 樱子类) 具有重要的观赏价值 , 深入研究其种间亲缘关系及分类地位 , 对于国产樱属植物系统发育与种质资源创新具有重要的理论指导意义。基于 PCR 扩增与测序技术研究了从云南、江西、福建采集的典型樱亚属 3 个种(含变种) 的叶绿体 DNA 非编码区 *atpB-rbcL* 片段 , 结合 GenBank 数据库已经提交的其它 4 个种的同源序列 , 共获得 7 个种的 30 条序列矩阵 , 以此构建了单倍型中介网络图与系统发育树 , 分析和探讨了它们的亲缘关系与分类地位。(1) 在 *atpB-rbcL* 序列矩阵中 , 774 个有效位点中共发现 15 个多态性位点 , 占分析序列的 1.94% (A+T) 含量为 70.50% , 存在明显的碱基偏好 ; (2) DNASP 5 共检测到 9 个单倍型 , 物种间平均单倍型多样性 ($H_d = 0.8805 \pm 0.026$) , 平均核苷酸多态性 ($\pi = 0.00711 \pm 0.00054$) ; 除尾叶樱桃 (*Prunus dielsiana*) 外 (Hap5 ~ Hap7) , 其余物种拥有各自独特的 1 个单倍型 , 具有较丰富的遗传多样性 ; (3) 综合 Network 中介图与系统发育重建结果 , 推测磐安樱桃 (*P. pananensis*) 处于较原始的进化阶段 , 相比尾叶樱桃 , 与浙闽樱桃 (*P. schneideriana*) 亲缘关系较近 ; 长柱尾叶樱桃 (*P. dielsiana* var. *longistyla*) 与尾叶樱桃互为姊妹支 , 并共同构成独立进化单元。综上 , 叶绿体 *atpB-rbcL* 片段在典型樱亚属下种间的适用效果较好 , 可以优先选为 DNA 条形码 ; 分子证据结合形态学特征支持将长柱尾叶樱桃作为尾叶樱桃变种的处理意见 , 而磐安樱桃的分类地位则需要更多的证据。

关键词 典型樱亚属 ; cpDNA *atpB-rbcL* ; 单倍型 ; 系统发育 ; 分类地位

中图分类号 : Q949.751.8 文献标志码 : A doi : 10.7525/j.issn.1673-5102.2018.06.004

Analysis on Relationship and Taxonomic Status of Some Species in
Subg. *Cerasus* Koehne with Chloroplast DNA *atpB-rbcL* Fragment

ZHU Hong YI Xian-Gui ZHU Shu-Xia WANG Hua-Chen DUAN Yi-Fan WANG Xian-Rong*

(Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China , College of Biology and the Environment , Nanjing Forestry University , Key Laboratory of State Forestry Administration on Subtropical Forest Biodiversity Conservation , Nanjing 210037)

Abstract Subg. *Cerasus* Koehne of Rosaceae families(Flowering Cherries) has important ornamental value. An in-depth research on the interspecies relationships and their taxonomic status contributes to the development of those cherry species and germplasm resource innovation. in China. The tree species of Subg. *Cerasus* (including variety) collected from Yunnan , Jiangxi and Fujian were amplified and sequenced , using the *atpB-rbcL* fragment of noncoding region in chloroplast DNA , and integrated with homologous sequences from four other species committed to database of GenBank. Haplotype of Median-Joining network and the phylogenetic tree were both constructed based on a total of 30 sequence matrix including 7 species , and their relationships and

基金项目 : 江苏省林业三新工程项目 (LYSXJ 2015 J17) ; 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX17_0815) ; 2017 年南京林业大学优秀博士创新基金

第一作者简介 : 朱弘 (1990—) , 男 , 博士研究生 , 主要从事国产樱属系统发育与生物地理学研究。

* 通信作者 : E-mail : wangxianrong66@nifu.edu.cn

收稿日期 : 2018-09-13

Foundation item : The Three New Forestry Project of Jiangsu (LYSXJ 2015 J17) ; The Postgraduate Innovation Project of Jiangsu (KYCX17_0815) ; The Doctorate Fellowship Foundation of Nanjing Forestry University

First author introduction : ZHU Hong (1990—) , male , Ph.D candidate , mainly engaging in phylogeny and biogeography of Chinese cherry species.

* Corresponding author : E-mail : wangxianrong66@nifu.edu.cn

Received date : 2018-09-13

classification status were discussed. (1) There were total 15 polymorphism sites in the 774 valid sites of *atpB-rbcL* sequence matrix, accounting for 1.94%, and the (A + T) content 70.50%, reflecting an obvious base bias; (2) Total 9 haplotypes were detected by DNASP 5 software, with average Haplotype diversity ($H_d = 0.8805 \pm 0.026$) and average nucleotide diversity ($\pi = 0.00711 \pm 0.00054$); Except for *Prunus dielsiana* (Hap5 ~ Hap7), the remaining species had their own unique haplotype, which indicate abundant genetic diversity; (3) After integrating with the results of MJ network as well as reconstruction of the phylogenetic tree, we speculated that *P. pananensis* was during the original stage of evolution, moreover, it is closely related to *P. schneideriana* when compare with *P. dielsiana*; *P. dielsiana* var. *longistyla* was a sister branch to *P. dielsiana*, also together constituted an independent evolutionary unit. With the above results, we believe that the Chloroplast DNA *atpB-rbcL* fragment is relatively suitable at intergeneric or interspecific levels, which could be selected as DNA bar code in priority. Molecular evidence combined with morphological features support the viewpoint that regarding *P. dielsiana* var. *longistyla* as a variety of *P. dielsiana*, while the taxonomic status of *P. pananensis* calls for more evidence.

Key words Subg. *Cerasus* Koehne, cpDNA *atpB-rbcL*, haplotype, phylogeny, taxonomic status

我国是现代樱属的分布中心之一,广泛分布于中国广阔的温带及亚热带区域,共计 48 种及 10 变种,其中 33 个种为特有分布^[1]。俞德浚和李朝奎^[2]依据腋芽单生和三芽并生进一步将该属划分为典型樱亚属(Subg. *Cerasus* Koehne)和矮生樱亚属(矮李类)[Subg. *Microcerasus* (Koehne) Yu et Li],其中典型樱亚属即为世人所熟知的樱花类植物,具有重要的生态价值、观赏价值、经济价值和文化价值。同时也被认为是樱属中较为进化的一个亚属,其下又细分 9 个组,对于研究蔷薇科系统演化具有重要的意义^[3-4]。由于典型樱亚属植物分布广泛、生境多样,复杂地理气候影响以及因种间、种内存在频繁的天然杂交导致的网状进化,导致分化持续进行,在形态上表现出高度的连续变异性,加之该亚属植物花叶不同期的物候学特性,使得传统手段对其进行准确鉴别难度较大,从而限制了野生资源的认识与开发利用。为了对其进行更科学准确的分类,前人先后采用等位酶^[5]、RFLP^[6]、RAPD^[7]、SSR^[8]等不同类型的分子标记技术,开展了该亚属亲缘关系与分类学的研究,积累了一定的分子资料,然而部分分子证据与前人基于形态学等经典手段的观点存在出入。近年来,分子系统学特别是 DNA 测序技术的蓬勃发展有力的推动了该亚属植物的研究进程,例如 Lee 和 Wen^[9]基于 ITS 与 Bortiri 等^[3,10-11]先后基于核基因 ITS、*s6pdh* 与叶绿体 *trnL-trnF*、*trnS-trnG* 多个片段的广义李属(*Prunus* L.)系统发育多个重建结果均表明,樱属是一个多系起源类群,其中典型樱亚属与稠李亚属(Subg. *Padus* Mill)、桂樱亚属(Subg. *Laurocerasus* Tourn. ex Duh.)在广义李属

下构成单系分支。

叶绿体 DNA 具有高度的序列保守性、不受选择压力和独立的进化路线等特点,而非编码区相比编码区序列具有更高的碱基替换率,适合种属内及低阶元的亲缘关系和遗传多样性研究,近年来备受系统分类学家青睐^[12],其中 *atpB-rbcL* 序列位于编码 ATP 合成酶 β 基亚(*atpB*)基因和核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶大亚基 *rbcL* 基因之间的非编码区域,拥有相对较多的有效信息位点,已经被广泛的应用于维管束植物系统发育的研究中^[13-14],尤其是在较低分类群的进化分析和鉴定,例如王华坤等^[15]利用该区间研究了蔷薇科核果类果树的系统发育关系;此外,近年来有学者^[16-17]基于该片段还发表了樱属新种。

典型樱亚属依然存在不少物种界定的问题,尾叶樱桃(*C. dielsiana*)种系就是其中一个突出的例子,原变种尾叶樱桃与种下短梗尾叶樱桃(*C. dielsiana* var. *abbreviate*)、长柱尾叶樱(*C. dielsiana* var. *longistyla*)、种间又与浙闽樱桃(*C. schneideriana*)等近缘种较难区分,而近年来陈子林等发表的樱属新种—磐安樱桃(*C. pananensis*)无疑又增加了该类群的争议和混淆,因此对该亚属种间亲缘关系及分类地位开展深入研究具有重要的理论和实际意义。鉴于上述情况,笔者采用广义李属的概念,着重典型樱亚属内取样,采用 *atpB-rbcL* 片段为代表的 DNA 条码的分子标记手段,主要目标在于(1)验证该序列在典型樱亚属的低分类阶元鉴定中的可行性,从而为樱属及其近缘属植物 DNA 条码筛选提供参考;(2)结合前人发表序列,扩大典型亚属内的物种取样,从母系遗传背景上

对典型樱亚属及其近缘物种进行种间关系的系统发育重建〔3〕探讨尾叶樱桃(*P. dielsiana*)与长柱尾叶樱桃(*P. dielsiana* var. *longistyla*)及其与新发表的磐安樱桃(*P. pananensis*)等近缘种的分类地位, 以期为典型樱亚属植物的分类地位与系统发生研究积累分子证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究共涉及典型樱亚属 7 种(含 1 变种)。其中高盆樱桃(*P. cerasoides*)、尾叶樱桃、长柱尾叶樱桃为本研究新获得的 15 条序列, 其新鲜幼嫩叶片为课题组于 2017 ~ 2018 年采自 3 个省 4 个县

(市) 的野生居群, 由于尾叶樱桃分布零星, 故选取 3 个县域的种源作为代表, 而高盆樱桃和长柱尾叶樱桃分别为单个县域下单个代表居群, 其居群内不同个体取样间距保持在 30 m 以上, 采集地点信息及凭证标本号见(表 1);迎春樱桃(*P. discoidea*)、磐安樱桃、浙闽樱桃(*P. schneideriana*)和山樱花(*P. serrulata*)材料信息及对应的 15 条序列(JX84285 ~ JX84291, JX84379 ~ JX84383, JX847392 ~ JX847394, JX847384)均引自 Chen 等^{〔17〕}报道;此外, 加入火棘(*Pyracantha fortuneana*)和水榆花楸(*Sorbus alnifolia*)各 1 条作为外类群, 亦下载自 GenBank 的公共数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>)。

表 1 测序材料来源
Table 1 Sources of materials for sequencing

物种及顺序编号 Species and serial numbers	采集地点 Localities	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	海拔 Altitude (m)	采集人 Collectors	凭证标本 Vouchers
高盆樱桃 <i>P. cerasoides</i>	1 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 869	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-2-1
	2 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 869	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-2-2
	3 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 869	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-2-3
	4 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 869	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-2-4
	5 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 869	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-2-5
	6 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 869	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-2-6
尾叶樱桃 <i>P. dielsiana</i>	1 福建武夷山 Wuyishan, Fujian	27°42′	117°42′	1 109	伊贤贵, 等 Yi X G, et al	WYS-2015-6
	2 福建武夷山 Wuyishan, Fujian	27°42′	117°42′	1 109	伊贤贵, 等 Yi X G, et al	WYS-2015-7
	3 福建武夷山 Wuyishan, Fujian	27°42′	117°42′	1 109	伊贤贵, 等 Yi X G, et al	WYS-2015-01-2
	4 云南威信县 Weixin, Yunnan	27°51′	105°07′	1 237	朱弘 Zhu H	WX-2017-35
	5 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 668	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-6-1
	6 云南腾冲县 Tengchong, Yunnan	25°06′	98°39′	1 668	王贤荣, 王华辰 Wang X R, Wang H C	TC-2018-6-2
长柱尾叶樱桃 <i>P. dielsiana</i> var. <i>longistyla</i>	1 江西上犹县 Shangyou, Jiangxi	25°28′	116°00′	708	朱弘, 南程慧 Zhu H, Nan C H	NC-2017-008-1
	2 江西上犹县 Shangyou, Jiangxi	25°28′	116°00′	708	朱弘, 南程慧 Zhu H, Nan C H	NC-2017-008-2
	3 江西上犹县 Shangyou, Jiangxi	25°28′	116°00′	708	朱弘, 南程慧 Zhu H, Nan C H	NC-2017-008-3

1.2 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

取硅胶干燥的新鲜叶片 0.65 g, 用研钵与液氮研磨粉碎, 采用天根(TIANGEN)植物基因组试剂盒提取总 DNA。通过质量体积分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 Tanon-2500 全自动数码凝胶图像分析仪对 DNA 质量进行检测, 将样品 DNA 保存至 4℃ 冰箱, 用于后续 PCR 实验。 *atpB-rbcL* 序列依据叶立新等^{〔16〕}所述, 正反引物分别为 5′-ACATCKAR-TACKGGACCAATAA-3′, 5′-AACACCAGCTTTTAAATC-CAA-3′。PCR 扩增体系为 25 μL, 其中含 DNA 模板 2.0 μ · mol⁻¹, 上下游引物各 1.0 μL, 2 × Taq

Master Mix(天根)12.5 μL, 8.5 μL ddH₂O 补齐。DNA 扩增反应程序为 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 1 min, 52.2℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。对 PCR 产物进行 1% 浓度琼脂糖凝胶电泳检测, 检测合格的样品送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行纯化及测序, 在 ABI3730 测序仪完进行单向测序。

1.3 数据处理

多序列比对(联配)手工校正, 在 Bioeditor 7.0.9 软件^{〔18〕}中及 Clustal W 模块完成, 使用 DNASP5 软件^{〔19〕}进行碱基组成、插入/缺失(indels)的序列特

征分析,并统计确定单倍型(Haplotype)数量(H)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(π);再使用 Network 5.003 软件^[20]基于最大简约性原则的中介邻接网络法(Median-Joining network, MJ)绘制不同单倍型间的进化网络图,插入/缺失处理为一次突变事件,在 Adobe Illustrator CS6 软件进行手工调整与布局优化;最后利用 MEGA5 软件^[21]以邻接法(Neighbor Joining, NJ)、最大似然法(Maximum Likelihood, ML)与最大简约(Maximum parsimony, MP)3种算法构建系统发育树,并用自展法(Bootstrap)1 000 次重复对系统发育树进行检测,标记在分支上。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果、序列特征

典型樱亚属 3 种 PCR 扩增产物经琼脂糖电泳抽样检测后(3 个为 1 组),在 500 ~ 1 000 bp 出现一清晰目的条带(图 1)。测序后,将实验新增的 15 条序列与下载的 15 条序列进行比对、两端截齐,获得用于序列分析的 30 条序列矩阵全长为 780 bp,在 774 个有效位点中共发现 15 个变异(多态性)位点(表 2),占分析序列的 1.94%,其中简约信息位点 14 个,单一突变位点(SNP)1 个,6 个插入/缺失(位于 1、339、341、680、767 和 777 处);(G + C)含量为 29.50%,(A + T)含量为 70.50%,存在明显的 A-T 偏好。将序列在 NCBI 上进行 BLAST 同源性检索,均有较好的匹配程度,确认所测序列为目标序列。

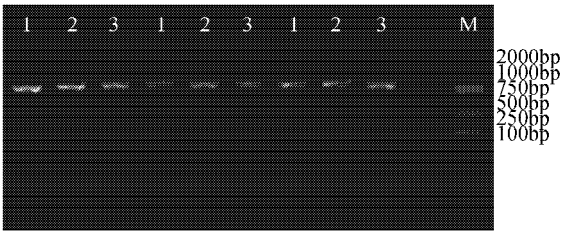


图 1 引物 *atpB-rbcL* 的部分 PCR 扩增结果 1. 高盆樱桃 2. 尾叶樱桃 3. 长柱尾叶樱桃

Fig.1 Results of PCR amplification of partial *atpB-rbcL* primers 1. *P. cerasoides*; 2. *P. dielsiana*; *P. dielsiana* var. *longisty*

2.2 单倍型分布与中介邻接网络图的构建

在 7 个物种的 30 条序列中共检测到 9 个单倍型(表 2,图 2),物种间平均单倍型多样性($H_d = 0.8805 \pm 0.026$),平均核苷酸多态性($\pi = 0.00711 \pm 0.00054$);单倍型类型与物种存在良好的对应关系,其中尾叶樱桃拥有 3 个单倍型(Hap5 ~ Hap7),单倍型多样性最高,并与长柱尾叶樱桃(Hap8)以 2 个突变步数相连,在典型樱亚属中构成一个独立的分枝(蓝色虚线方框);磐安樱桃(Hap4)位于中介网络图的躯干上,依次与 mv1、mv2 和 mv3 以 1 ~ 2 个突变步数相连,显示其较为原始的进化地位;迎春樱桃(Hap1)与之相距最远(相差 4 个突变步数),独立进化成枝;其次为高盆樱桃(Hap3)和山樱花(Hap9),分别相差 3 个突变步数和 2 个突变步数;浙闽樱桃(Hap2)与之距离最近(仅相差 1 个突变步数,在 264 bp 处存在碱基突变),显示出较近的亲缘关系。

表 2 *atpB-rbcL* 片段 9 个单倍型的变异位点统计
Table 2 Statistics of variable sites of the *atpB-rbcL* fragment in 9 haplotypes

单倍型 Haplotype	个体数 Number	变异位点 Variable sites														
		2	3	131	239	264	349	360	379	394	425	449	452	529	553	560
Hap1	6	G	G	G	C	T	A	A	G	A	C	G	G	G	G	G
Hap2	3	*	T	*	T	*	C	C	*	*	*	*	*	*	*	*
Hap3	6	*	A	*	*	A	C	C	*	*	*	A	A	*	*	*
Hap4	5	*	T	*	*	A	C	C	*	*	*	*	*	*	*	*
Hap5	4	*	A	*	*	A	C	C	A	C	T	*	A	A	A	A
Hap6	1	T	A	*	*	A	C	C	A	C	T	*	A	A	A	A
Hap7	1	T	A	A	*	A	C	C	A	C	T	*	A	A	A	A
Hap8	3	T	A	*	*	A	C	C	A	*	*	*	A	A	A	A
Hap9	1	G	T	*	*	A	C	C	*	C	T	*	*	*	*	*

注: * 表示碱基与单倍型 Hap1 相同。
Note: * the same as the Haplotype 1.

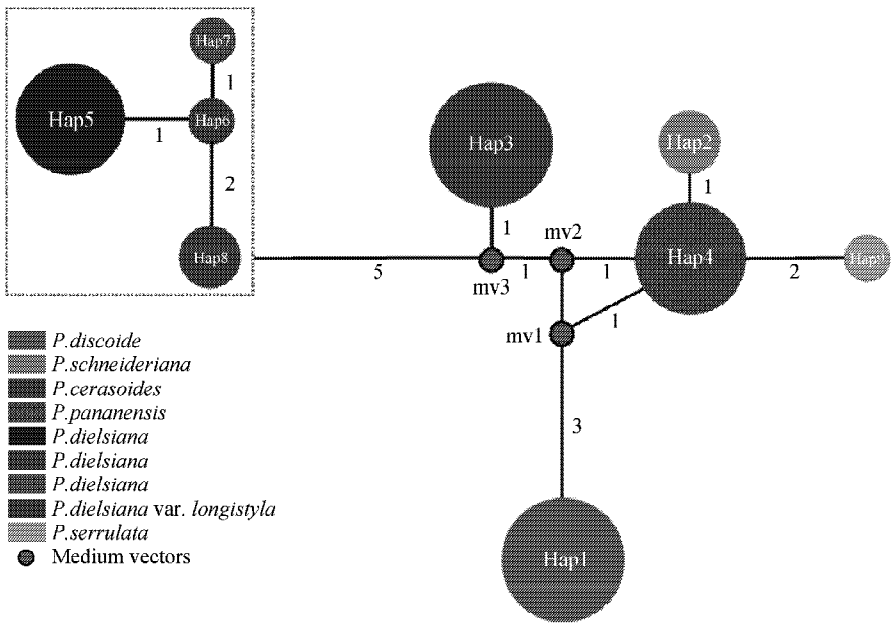


图2 典型樱亚属9个单倍型的中介邻接网络图 单倍型信息见表2 ;圆的大小对应单倍型频率 ;红色圆点代表假想的单倍型 (通常为消失的祖先单倍型) ;连线旁标注的数字代表突变步数。

Fig.2 The median-joining network of 9 haplotypes from Subgen. *Cerasus* Information of haplotypes refer to Table 2 ;The circle sizes are proportional of the haplotypes frequencies. The red dots represent hypothesized haplotypes(usually ancestral haplotypes) and the numbers marked on the lines represent mutation steps.

2.3 系统发育树的比较和分析

为进一步阐明单倍型(Hap1 ~ Hap9)的系统关系 ,本研究以水榆花楸和火棘为外类群分别构建 NJ、MP 和 ML 系统树(图3)。三个算法的拓扑结构基本一致 :外类群(Clade I)与典型樱亚属(Clade II)形成两大分支。在典型樱亚属分枝中 ,又可分为4个独立组 ,其中迎春樱桃(Group D)与浙闽樱桃(Group C)各自构成2个组 ;高盆樱桃、山樱花、长柱尾叶樱桃和尾叶樱桃构成1个组(Group B) ;磐安樱桃比较特殊 ,位于系统发育树基部 ,以梳齿状结构与其他种成为并系 ,没有得到很好的分化。

3 讨论

3.1 *atpB-rbcL* 片段在典型樱亚属间分类中的应用评价

Network 网络分析法能清晰地表明各单倍型间的关系(分布频率、基因流方向) ,可以从 DNA 序列水平反应物种间的遗传多样性^[22]。在中介邻接网络图中 ,除尾叶樱桃单倍型外(Hap5 ~ Hap7) ,不同种类物种均对应1个独特的单倍类型 ,具有较丰富的遗传多样性 ,这可能与本次实验

的尾叶樱桃材料来源地多样(表1)有关 ,同时也表明 *atpB-rbcL* 序列在典型樱亚属种内保守 ,在种间不保守 ;在系统发育树构建中 ,相比笔者先前自测的 *ndhF* 或 *rbcL* 序列(未发表)仅能满足亚属间划分的分辨率需求 ,该片段序列提供的变异位点较多(6个位点发生了插入或缺失) ,主要分支的支持度较高 ,因此可作为蔷薇科典型樱亚属系统发育重建提供较丰富的信息。王化坤等^[4]就利用 *atpB-rbcL* 片段研究了樱桃(*P. pseudocerasus*)部分品种与其它核果类的演化顺序 ,平均变异率达到 $22/736 = 0.0299$,但分子进化速率在各物种间的分布不均匀。由于本研究仅使用了单个叶绿体片段对典型樱亚属下7个种进行了初步分析 ,虽然在部分种间具有显著的分子特征 ,存在无法完全将所有种分开的局限性 ,今后一方面可考虑增加核单拷贝基因及多片段组合进行联合建树分析 ,另一方面 ,对于消失的祖先单倍型(图2) ,推测原因也可能与样本不足有关 ,应该加入更多典型樱亚属内所涉及物种材料及物种的群体分布地取样 ,以便得到更加准确有效的分析结果。

3.2 磐安樱桃分类地位的探讨

磐安樱桃^[17]作为2013新发表的樱属新种 ,一

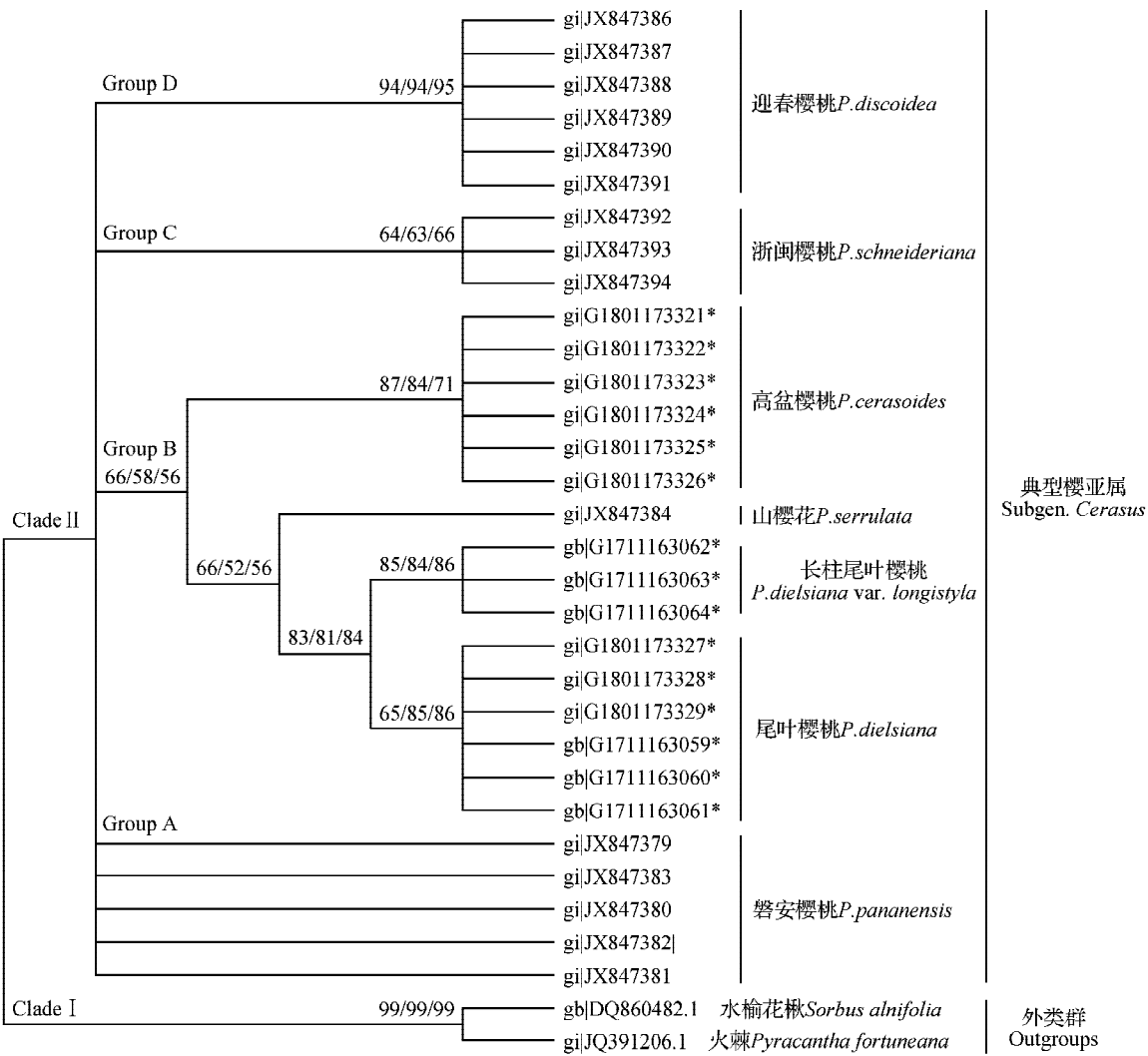


图 3 基于 *atpB-rbcL* 片段序列的典型樱亚属系统发育树重构 * 代表本研究获得的序列 ,每个分支上的数值表示 NJ/MP/ML 靴带值(支持度 >50%)

Fig.3 Reconstructed phylogenetic tree of Subgen. *Cerasus* based on *atpB-rbcL* sequences * Refer to the sequences obtained from this study ,Numbers above branches indicated the NJ/MP/ML bootstrap values(>50%)

直备受争议 ,有待更多的证据予以验证。外部形态特征上与浙闽樱桃、尾叶樱桃存在交叉和过渡 ,造成在实践中较难区分 ,例如 ,三者的共征在于全株毛被显著 ,在嫩枝、叶柄、叶脉(主脉和侧脉)、花梗均密被开展绒毛 ,萼片反折 ,花瓣先端 2 裂 ,且自然分布在华东 (浙江、福建)有部分重叠 ;不同特征为磐安樱桃与尾叶樱桃的花萼长约为萼筒的 2 倍 ,而浙闽樱桃则是等长或稍长 ;磐安樱桃与尾叶樱桃花柱基部无毛、全株毛被均为黄棕色长柔毛 ,而浙闽樱为花柱基部有毛 ,全株毛被为灰褐色微硬毛等等 ;鉴于陈子林等在发表时 ,仅将浙闽樱桃与迎春樱桃作为相似种 ,与磐安樱桃进行分子建树比较 ;为了能够得到更加全面和客观的亲缘关

系证据 ,在本研究中 ,笔者由此在典型樱亚属中增加了相似种尾叶樱桃种系(尾叶樱桃和长柱尾叶樱桃)以及远源分布的高盆樱桃 ,参考相同的引物序列及扩增体系获得序列进行系统发育树重建 ,结果显示 ,磐安樱桃置于系统树基部 ,可能处于较原始的进化阶段 ,但与浙闽樱桃、尾叶樱桃等其余物种构成并系 ,因而在分子层面上较难区分 ;而基于单倍型的中介邻接网络图进一步显示 ,磐安樱桃与浙闽樱桃突变步长最短 ,相比尾叶樱桃 ,两者具有更近的亲缘关系。

3.3 长柱尾叶樱桃分类地位的探讨

长柱尾叶樱桃是伊贤贵^[23]在其 2007 年学位论文系统调查武夷山地区樱属资源基础上记录的

新变种,与原变种尾叶樱桃的主要差别在于其花柱长约为雄蕊的2倍,且花粉外壁纹饰种间亦稍有差别;汪贤荣在2014年出版的《中国樱花品种图志》^[1]认为其与原变种的区分主要在于花柱明显长于花冠,亦将其整理收录。近年来,笔者在从事樱属专类调查研究时,又陆续在江西、安徽等地发现该种新分布地,遂将其一并采集与原变种进行比较分析。基于叶绿体单倍型 Network 中介网络图显示,长柱尾叶樱桃检测到一个单倍类型(Hap8)独立于原变种尾叶樱桃其余的3个单倍型,并与它们共同构成一独立进化单元;而基于叶绿体片段的系统发育树重建结果也表明,尾叶樱桃与长柱尾叶樱桃互为姊妹类群,且各支持度较高,因此,本研究从分子层面上支持上述学者的划分意见,即同意将长柱尾叶樱桃作为尾叶樱桃的变种处理。

参 考 文 献

1. 王贤荣. 中国樱花品种图志[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 1-181.
Wang X R. An illustrated monograph of cherry cultivars in China[M]. Beijing: Science Press, 2014: 1-181.
2. 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第38卷[M]. 北京: 科学出版社, 1986.
Chinese Academy of Sciences, Chinese Ethnography Editorial Board. Flora reipublicae popularis sinicae, 38[M]. Beijing: Science Press, 1986.
3. Bortiri E, Oh S H, Jiang J G, et al. Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast *trnL-trnF* spacer DNA[J]. Systematic Botany, 2001, 26(4): 797-807.
4. 王化坤, 陶建敏, 渠慎春, 等. 核果类果树 ITS 序列分子进化及系统发育关系研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 363-374.
Wang H K, Tao J M, Qu S C, et al. Molecular evolution and phylogeny of stone fruit trees based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(3): 363-374.
5. Mowrey B D, Werner D J. Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isozyme markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 80(1): 129-133.
6. Brettin T S, Karle R, Crowe E L, et al. Chloroplast inheritance and DNA variation in sweet, sour and ground cherry[J]. Journal of Heredity, 2000, 91(1): 75-79.
7. Jordano P, Godoy J A. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree[J]. Molecular Ecology, 2000, 9(9): 1293-1305.
8. 胡映恒, 党萌, 张甜, 等. 秦岭地区核桃自然群体和栽培群体的遗传多样性及其演化关系——基于 nrDNAITS 序列分析[J]. 林业科学, 2014, 50(12): 47-55.
Hu Y H, Dang M, Zhang T, et al. Genetic diversity and evolutionary relationship of *Juglans regia* wild and domesticated populations in Qinling mountains based on nrDNA ITS sequences[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2014, 50(12): 47-55.
9. Lee S, Wen J. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. American Journal of Botany, 2001, 88(1): 150-160.
10. Bortiri E, Oh S H, Gao F Y, et al. The phylogenetic utility of nucleotide sequences of sorbitol 6-phosphate dehydrogenase in *Prunus* (Rosaceae) [J]. American Journal of Botany, 2002, 89(10): 1697-1708.
11. Bortiri E, Heuvel B V, Potter D. Phylogenetic analysis of morphology in *Prunus* reveals extensive homoplasy[J]. Plant Systematics and Evolution, 2006, 259(1): 53-71.
12. 卫尊征, 郭丽琴, 张金凤, 等. 利用 *trnL-F* 序列分析杨属树种的系统发育关系[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(2): 27-33.
Wei Z Z, Guo L Q, Zhang J F, et al. Phylogenetic relationship of *Populus* by *trnL-F* sequence analysis[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(2): 27-33.
13. 刘静, 张海琴, 凡星, 等. 基于叶绿体 *atpB-rbcL* 序列探讨猬草属和赖草属植物的系统发育和母系起源[J]. 草业学报, 2012, 21(5): 77-85.
Liu J, Zhang H Q, Fan X, et al. Phylogenetic relationships and maternal donor of *Hystrix* and *Leymus* species as revealed by chloroplast *atpB-rbcL* sequence[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2012, 21(5): 77-85.
14. 穆琳, 谢磊. 槭叶铁线莲的系统位置初探——来自 ITS 和叶绿体 DNA 序列片段的分析[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(5): 49-55.
Mu L, Xie L. A preliminary study on the systematic position of *Clematis acerifolia* based on the analyses of ITS and plastid regions[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2011, 33(5): 49-55.
15. 王化坤, 陶建敏, 渠慎春, 等. 叶绿体 *atpB-rbcL* 序列分析在核果类果树系统发育研究中的应用[J]. 果树学报, 2010, 27(2): 213-220.
Wang H K, Tao J M, Qu S C, et al. Application of *atpB-rbcL* noncoding spacer in the phylogeny of stone fruit crops[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(2): 213-220.
16. 叶立新, 鲁益飞, 王桦, 等. 凤阳山樱桃——浙江樱属(蔷薇科)一新种[J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版,

2017 ,16(1) :19 – 24.

Ye L X ,Lu Y F ,Wang H ,et al. *Cerasus fengyangshanica* (Rosaceae) ,a new species from Zhejiang[J]. Journal of Hangzhou Normal University :Natural Science Edition , 2017 ,16(1) :19 – 24.

17. Chen Z L ,Chen W J ,Chen H ,et al. *Prunus pananensis* (Rosaceae) ,a new species from Pan 'an of central Zhejiang ,China[J]. PLoS One 2013 8(1) :e54030.

18. Hall T A. BioEdit :a user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series ,1999 41 95 – 98.

19. Librado P ,Rozas J. DnaSP v5 :a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics , 2009 25(11) :1451 – 1452.

20. Bandelt H J ,Foster P ,Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. Molecular Biology and Evolution ,1999 ,16(1) 37 – 48.

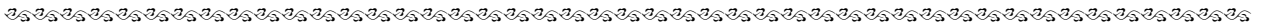
21. Tamura K ,Peterson D ,Peterson N ,et al. MEGA5 :molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood ,evolutionary distance and maximum parsimony method[J]. Molecular Biology and Evolution 2011 28(10) : 2731 – 2739.

22. 王玉涛 潘建飞 黄翠翠 等. 东帕米尔高原喜马拉雅雪鸡遗传多样性及系统发育地位[J]. 生态学报 2018 38(1) 316 – 324.

Wang Y T ,Pan J F ,Huang C C ,et al. Genetic diversity and phylogentic status of *Tetraogallus himalayensis* in East Pamir ,Xinjiang ,China[J]. Acta Ecologica Sinica ,2018 , 38(1) 316 – 324.

23. 伊贤贵. 武夷山樱属资源调查及开发利用研究[D]. 南京 南京林业大学 2007.

Yi X G. Studies on investigation and exploitation of the resources of *Cerasus* Mill. in Wuyi mountain[D]. Nanjing : Nanjing Forestry University 2007.



《植物研究》荣获“ 2018 年度中国高校优秀科技期刊奖 ”

为不断提高高校科技期刊的学术影响力和编辑出版质量 ,对高校科技期刊在科研活动和学术交流中所起的作用及其质量做出客观全面的评价 ,以树立榜样、明确发展方向 ,中国高校科技期刊研究会组织了 2018 年度中国高校杰出 · 百佳 · 优秀科技期刊遴选活动。

围绕期刊荣誉、期刊传播与利用、期刊国际影响力、期刊学术影响力、期刊行业影响力多方面评选内容 ,经专家评选 《植物研究》入选“ 2018 年度中国高校优秀科技期刊 ” ,得到了中国高校科技期刊研究会的表彰和奖励。