

## 粉色果实花楸母本起源的分子证据

汤 薇, 于雪丹, 张川红\*, 叶学敏, 付其迪, 郑勇奇

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

**摘要:** [目的] 探讨河北驼梁山自然风景区内形态介于花楸树和北京花楸之间的粉色果实花楸的起源。 [方法] 本研究调查了花楸树、北京花楸和粉色果实花楸的海拔分布格局及生长状况, 并通过叶绿体 DNA 序列分析 3 个类群的系统发育关系。 [结果] 北京花楸主要分布在海拔 1 300~2 000 m, 花楸树分布于 1 500~2 200 m, 粉色花楸出现在两者重叠分布区内; 粉色花楸叶绿体单倍型有 70% 与北京花楸相同, 10% 与花楸树相同, 其余 20% 为其特有。 [结论] 表明: 粉色果实花楸是花楸树和北京花楸之间的天然杂交种, 是多起源的类群, 在自然分类系统中应作为独立的种来处理; 花楸树和北京花楸均可作为母本。

**关键词:** 花楸; 叶绿体非编码区序列; 单倍型; 母本起源

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

## Molecular Evidence for Maternal Origin of *Sorbus* with Pink Fruits

TANG Wei, YU Xue-dan, ZHANG Chuan-hong, YE Xue-min, FU qi-di, ZHENG Yong-qi

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and

Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the origin of *Sorbus* individuals with striking pink fruits, morphologically inter-mediated between *Sorbus pohnuashanensis* and *S. discolor* in Mount Tuoliang, Hebei province. [Methods] The altitude distribution and growth state of *S. pohnuashanensis*, *S. discolor* and *Sorbus* individuals with pink fruits were investigated and the phylogeny relationships of the these *Sorbus* species were analyzed by chloroplast DNA sequence. [Results] Most *S. discolor* are distributed at the elevation from 1 300~2 000 m. The majority of *S. pohnuashanensis* distributes at an altitude from 1 500 to 2 200 m. The individuals with pink fruits appear in their sympathy area. 70% haplotype of individuals with pink fruits shared with *S. discolor* and 10% with *S. pohnuashanensis*, the other is the specific. [Conclusion] The *Sorbus* individuals with pink fruits originate from interspecific hybridization between *S. pohnuashanensis* and *S. discolor*, it is also inferred that they have multiple origins and might belong to a new species in natural taxa system. *S. pohnuashanensis* or *S. discolor* may serve as maternal parent of individuals with striking pink fruits.

**Keywords:** *Sorbus*; chloroplast non-coding sequence; haplotype; maternal origin

花楸属 (*Sorbus* L.) 隶属于蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae), 全世界约有 61 种复叶花楸, 分布在亚洲、欧洲、北美洲<sup>[1]</sup>。花楸属植物树体优美多姿, 因花繁、果美、枝秀、叶茂, 已逐渐成为世界各地

优选的观赏树种<sup>[2]</sup>。花楸果实营养丰富, 含有蛋白质、脂肪、糖分和大量维生素及多种矿物质, 是食用和酿酒佳品。花楸果实、种子、茎和树皮均可入药, 极具药用价值<sup>[3-6]</sup>; 但是, 对于集观赏、药用和文化

收稿日期: 2016-05-17

基金项目: 国家科技支撑计划课题“林木种质资源发掘与创新利用”(2013BAD01B06)

作者简介: 汤 薇, 在读硕士, 主要从事林木遗传育种学研究。E-mail: 13366053582@163.com

\* 通讯作者: 张川红, 博士, 副研究员, 主要从事林木遗传育种学研究。E-mail: zhangch@caf.ac.cn

价值于一身的花楸属植物的研究,目前国内仅限于对少数物种的生物学特性、地理分布状况和生境特点的描述,遗传多样性评价,育苗和栽培技术等方面<sup>[7-12]</sup>,而种质资源调查和系统发育的研究虽有报道<sup>[13]</sup>,但并不完善,因而极大地限制了人们对花楸属植物的开发和利用。

花楸属植物种间极易发生杂交,种间杂交种在自然群体中极为普遍。国外学者于1990年来中国收集花楸资源,迄今为止研究发现了许多花楸属植物的杂交种类群,而且于20世纪初开展花楸品种的选育。国外学者在云南发现属于花楸亚属(*Albocarmesinae*)的巨叶花楸(*S. harrowiana* Rehd.)和假川滇花楸(*S. pseudovilmorinii* Schneid.),在自然状态下发生了杂交,产生了杂交种 *Sorbus harrowiana* × *S. pseudovilmorinii*; *S.* ‘sp. Ghose’ 是卷边花楸(*Sorbus insignis* Hedl.)与其它某种二倍体花楸自然杂交的二代杂交种,其父本尚未确定。人工栽培的花楸中, *S.* ‘Joseph Rock’ 很可能是维西花楸(*Sorbus monbeigii* Yu)和朝鲜花楸(*Sorbus commixta* Hedl.)的杂交种<sup>[1]</sup>。中国花楸资源丰富,但是国内学者对于花楸种间杂交的研究甚少,大部分花楸资源远藏深山,不为人知。

粉色果实花楸是在河北驼梁山进行野外资源调查时发现的,迄今未被描述和鉴定的分类群。河北驼梁山分布的花楸属植物只有花楸树与北京花楸2个种,而粉色果实花楸主要出现在花楸树(*S. pohuashanensis* Hedl.)和北京花楸(*S. discolor* Maxim.)重叠的区域。从比较形态学上看,除了果实颜色不同之外,粉色果实花楸的形态特征也大致介于花楸树和北京花楸之间,其中粉色果实花楸的某些形态特征与花楸树更相近,如北京花楸的冬芽和叶表面光滑无毛,而花楸树被有灰白色绒毛,粉色果实花楸的芽和叶与花楸树相似,被有灰白色绒毛,且复叶大小与花楸树近似,而比北京花楸大。因此,比较形态学的证据预示着粉色果实花楸很有可能是花楸树与北京花楸的种间自然杂交种。为了研究说明粉色果实花楸的分类单位和其起源以及花楸树、北京花楸与粉色果实花楸的演化关系,本文以花楸树、北京花楸和粉色果实花楸植株为研究对象,利用cpDNA序列分析,研究粉色果实花楸与花楸树、北京花楸的系统发育关系,阐释粉色果实花楸这个新类群的起源和演化。

## 1 调查区概况

河北驼梁山自然风景区位于河北省平山县西北

部太行山中段(113°41′43″~113°53′35″E, 38°33′13″~38°45′48″N),海拔700~2 281 m。该地区处于暖温带向寒温带过渡地带,属于半湿润半干旱大陆性季风山地气候,年均降水量530~690 mm,年均气温8.0℃<sup>[14]</sup>。土壤类型有亚高山草甸土、棕壤、褐土和草甸土4种类型。植被垂直分布,从山谷到顶峰依次为落叶阔叶林、针阔混交林、桦树林、落叶松林、亚高山草甸<sup>[15]</sup>。

## 2 研究方法

### 2.1 试验材料

对河北驼梁山的花楸树、北京花楸和粉色果实花楸的海拔分布格局进行了调查,并利用GPS记录每一植株的地理位置(经纬度和分布海拔)。本次实验共收集了河北驼梁山的35株花楸(17株花楸树、8株北京花楸和10株粉色果实花楸植株)的叶片样本,将其置入装有硅胶的自封袋,充分干燥后,于-80℃冰箱保存。

### 2.2 总DNA的提取与引物筛选

采用植物基因组DNA提取试剂盒DP305(TIANGEN)提取花楸叶片总DNA。用酶标仪(Spectra Max i3)测定DNA浓度与纯度,再用浓度1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的DNA质量。最后把DNA溶液稀释成20 ng·μL<sup>-1</sup>,4℃冰箱保存备用。

从花楸树、北京花楸和粉色果实花楸中各随机选择3个样本,共计9个DNA样本作为模板进行cpDNA序列引物筛选。从20对引物中筛选出2对条带清晰明亮、单一的引物: *trnS-G*: F-GTCCACTCAGC-CATCTCTCC, R-TCGAACAAAGTAATCGGGAGTG<sup>[16]</sup>; *trnL-F*: F-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC, R-TTGAAGT-GGTGACACGAG<sup>[17]</sup>,用于PCR扩增反应。

### 2.3 PCR扩增反应及测序

20 μL PCR扩增体系:20 μL·mol<sup>-1</sup> DNA, 10 μL 2 × Taq PCR Master Mix, 正反向引物各0.25 mmol·L<sup>-1</sup>, 7 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸45 s,30个循环;72℃延伸10 min。

PCR产物用1%琼脂糖凝胶在1 × TAE电泳缓冲液和120V的电压下电泳。采用G-box凝胶成像仪(Chemi XX6, Syngene)观察PCR扩增产物电泳结果。

选择条带清晰明亮、无非特异性扩增的PCR扩

增产物送到测序公司(上海美吉生物医药科技有限公司)纯化和测序。对于片段长度小于800 bp的PCR扩增产物进行正向测序;对于片段长度大于800 bp的PCR扩增产物进行反向测序。

## 2.4 数据统计与分析

利用Contig Express软件对长度大于800 bp的

应用软件Dnasp 5.0<sup>[18]</sup>统计cpDNA单倍型。系统发育分析分别应用贝叶斯推断法和最大简约法(MP)完成,其中,贝叶斯推断法所选用的最佳核苷酸替换模型—K81uf+I模型由Modeltest 3.7<sup>[19]</sup>获得,分析则应用MrBay3.2.6<sup>[20]</sup>软件进行;最大简约法利用PAUP4b10<sup>[21]</sup>软件完成。为了确定分子进化树的基部,系统发育分析以苹果属西府海棠(*Malus micromalus* Makino),梨属沙梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)和石楠属石楠(*Photinia serrulata* Lindl.)为外类群。

## 3 结果与讨论

### 3.1 海拔分布格局及生长状况

在河北驼梁山自然风景区内,主要针对分布于2个相邻山谷的百瀑峡和三叠泉的花楸资源开展调查。结果表明:花楸树、北京花楸和粉色果实花楸主要分布在沟谷两旁的阴坡、半阴坡。花楸植株随海拔升高呈连续分布。北京花楸分布海拔为1300~2000 m,其中,海拔1500~1700 m为密集分布区。花楸树主要分布于1500~2000 m,最高可达2200 m,其分布海拔比北京花楸高。二者重叠分布区介于海拔1500~2000 m,在此区域内出现了粉色果实的花楸植株(图1)。北京花楸平均树高6.7 m,变幅4.0~12.3 m,平均胸径12.5 cm,变幅5.6~28.2 cm。花楸树平均树高6.7 m,变幅3.5~11.0 m,平均胸径13.3 cm,变幅7.5~22.9 cm。粉色果实花楸平均树高7.5 m,变幅6.2~10.0 m,平均胸径14.6 cm,变幅7.2~19.8 cm。

### 3.2 cpDNA序列分析

3.2.1 DNA检测 酶标仪、电泳检测提取的总DNA的纯度和浓度完全满足后续试验的要求(图2)。

3.2.2 *trnL-F*和*trnS-G*序列分析 叶绿体序列比对剪切后,*trnL-F*序列长度约550 bp,*trnS-G*序列长

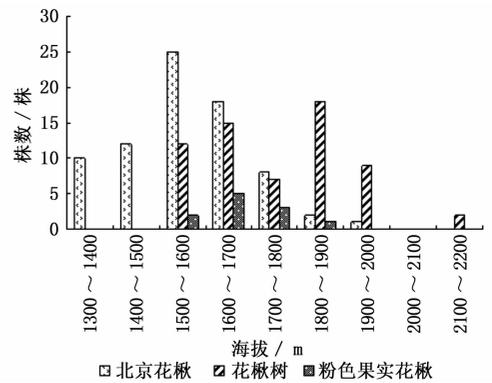
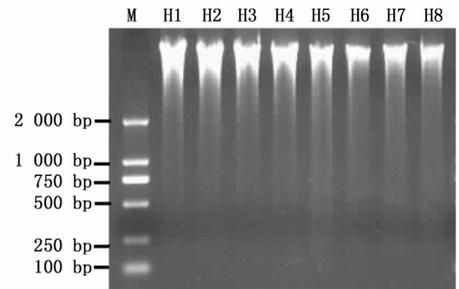


图1 花楸树、北京花楸和粉色果实花楸的海拔分布



M:DNA marker D2000;H1~H8为花楸树的样本编号

图2 DNA琼脂糖电泳图

度约1200 bp,2条cpDNA序列连接后总长约1750 bp,共有38个位点存在碱基的插入与缺失。其中,*trnS-G*序列存在丰富的变异:在278~286、313~334位点上存在碱基的缺失;第304位点存在碱基C-G颠换;第306、307和310位点上存在碱基A-T颠换;第311和312位点上存在碱基A-C颠换和缺失;第723位点有碱基T-C转换;第1144位点上存在碱基G-T颠换;而*trnL-F*序列只在第1438位点存在变异,表现为碱基G-T的颠换(表1)。

所有北京花楸的cpDNA序列表现完全一致,而花楸树和粉色果实花楸的cpDNA序列具有多样性,变异主要集中在*trnS-G*序列上。

3.2.3 叶绿体单倍型分析 对叶绿体DNA序列数据进行简约统计分析,共得到5种单倍型(表1)。北京花楸只出现了单倍型Hap1。花楸树共有3种单倍型:Hap3、Hap4、Hap5。这3种单倍型中出现的花楸树样本数量依次为3、10、4株,Hap4在驼梁山花楸树中出现的频率较高(58.8%)。

粉色果实花楸包含了3种单倍型:Hap1、Hap2、Hap3,其中,有7株(SH2~4,SH7~10)与北京花楸共享单倍型Hap1,1株(SH6)与花楸树共享单倍型Hap3,其余2株的单倍型是Hap2,推测为该族群

表 1 叶绿体单倍型变异位点信息

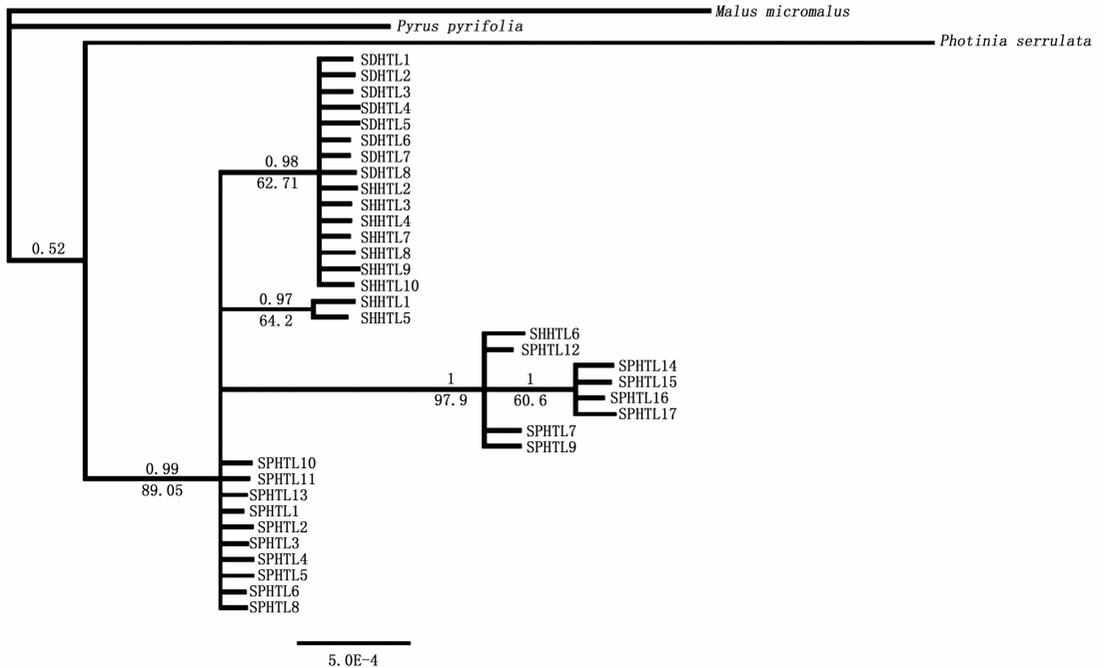
单倍型	变异位点													种类 (样株编号)
	trnS-G												trnL-F	
	278	304	306	307	310	311	312	313	315	317	723	1144	1438	
Hap1	⊕	G	A	A	A	A	A	□	-	☆	T	G	G	SD(1~8); SH(2~4,7~10)
Hap2	⊕	G	A	A	A	-	-	-	-	-	T	T	T	SH(1,5)
Hap3	⊕	C	T	T	T	C	C	□	□	☆	T	T	G	SH(6),SP(7,9,12)
Hap4	⊕	G	A	A	A	-	-	-	-	-	T	T	G	SP(1~6,8,10,11,13)
Hap5	-	C	T	T	T	C	C	□	□	☆	C	T	G	SP(14~17)

注:“⊕”:TTCTTTATT;“□”:TT;“☆”:ATTTTAGTAAAGTAAATA;“SD”:北京花楸;“SP”:花楸树;“SH”:粉色果实花楸;“-”:碱基缺失。

所特有,即 cpDNA 的序列分析显示粉色果实花楸叶绿体单倍型有 70% 与北京花楸相同,有 10% 与花楸树相同,还有 20% 与北京花楸和花楸树都不同,是特有的。被子植物的叶绿体绝大多数是母系遗传, cpDNA 分子系统发育分析能够揭示种间杂种的母本供体。本实验结果表明:花楸树和北京花楸都可作为粉色果实花楸的母本供体,该类群是多起源而非单起源。

3.2.4 cpDNA 系统发育分析 MP 树和贝叶斯树自展支持率和后验概率都高,二者有相识的拓扑结

构,所以建树只显示了贝叶斯树。北京花楸和花楸树在分子进化树上明显分成 2 类,花楸树表现出明显的种内分化(图 3)。聚类结果显示:粉色果实植株被划分为 3 类:(1)有 7 株粉色果实花楸植株 (SH2~4,SH7~10)与北京花楸聚成 1 类(PP = 0.98;BS = 62.71);(2)有 1 株粉色果实花楸植株 (SH6)与花楸树聚在一起(PP = 1;BS = 97.9);(3)2 株粉色果实花楸 (SH1,SH5)拥有特有的单倍型 Hap2,从而单独聚成 1 类(PP = 0.97;BS = 64.2)。



分支线上的数字是后验概率值;分支线下面的数字是 1 000 次重复抽样检测的自展值;

“SD”:北京花楸;“SP”:花楸树;“SH”:粉色果实花楸;“HTL”:河北驼梁山。

图 3 基于叶绿体序列构建的贝叶斯树

分子进化树表明:粉色果实花楸是介于花楸树和北京花楸之间,且不同于花楸树和北京花楸的新类群,在自然分类系统中应作为独立的种处理。花楸属植物种间杂交现象较为普遍,花楸树和北京花楸都是异交为主的类群<sup>[1,12]</sup>,加之二者分布区域有

重叠,传粉者相同,花期又可遇,这些天然条件为种间杂种的形成提供了极大的可能性;另外,北京花楸与欧洲花楸的人工培育品种 Sorbus ‘Pink-Ness’ 提供了无可辩驳的例证,说明它们之间可以形成杂交种<sup>[1]</sup>。经观察发现,粉色果实花楸除了果实颜色介

于花楸树和北京花楸之间外,叶的形态以及冬芽被毛的性状也介于二者之间,表现出杂种的普遍遗传特性<sup>[22]</sup>。因此,本文作者推测粉色果实花楸是起源于花楸树和北京花楸的天然杂交种。McAllister<sup>[1]</sup>曾描述,在中国北方地区,欧洲花楸(花楸树是欧洲花楸的亚种)和北京花楸的共同分布区出现了天然杂交种(*S. pekinensis* Koehne.)。本文推测粉色果实花楸是花楸树与北京花楸天然杂交产生的新类群;但是,粉色果实花楸与 *S. pekinensis* 是否属于同一个类群,还需要进一步验证。

## 4 结 论

本文资源调查发现,粉色果实花楸出现在北京花楸和花楸树二者重叠分布区内。分子证据表明,粉色果实花楸是介于花楸树和北京花楸之间,但不同于花楸树和北京花楸的新类群,推测是起源于花楸树和北京花楸的自然杂交,花楸树和北京花楸都可作为粉色果实花楸的母本。鉴于 cpDNA 是母系遗传,单纯使用 cpDNA 序列不能确定粉色果实花楸是花楸树和北京花楸的杂交种,所以本研究目前不能鉴定这些粉色果实植株的父本,因此,还需结合核基因组序列信息进行综合分析。此外,粉色果实花楸叶绿体单倍型还有 20% 是特有的,这有可能是自然变异的结果,也有可能是受样本量的限制,没有完全反映粉色果实花楸母本供体的真实情况,还需扩大调查的样本量进一步验证。

## 参 考 文 献:

- [1] McAllister H, Hague J, Mathew B. The genus *Sorbus mountain-ash* and other rowans [M]. Kew;The Royal Botanic Gardens, 2005.
- [2] 郑勇奇, 郑 健, 张川红. 花楸树—城市绿化的新贵[J]. 中国城市林业, 2008(2): 74-76.
- [3] Demesure-Musch B, Oddou-Muratorio S. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild service tree (*Sorbus torminalis*) [M]. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2003.
- [4] Navys E. The investigation of morphological and ecological peculiarities of *Sorbus* genera species and sort in the botanical garden of Vilnius University [J]. Botany, 2001, 1(2): 94-98.
- [5] Li H Y, Matsuura M, Li W, et al. Chemical constituents from the fruits of *Sorbus pohuashanensis* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 43(1): 166-168.
- [6] 高 明, 李莉娜, 李 丽, 等. 花楸树果实中氨基酸及化学元素的含量检测[J]. 吉林林业科技, 2013, 42(4): 1-7.
- [7] 沈海龙, 杨 玲, 张建瑛, 等. 花楸种子休眠影响因素与萌发特性研究 [J]. 林业科学, 2006, 42(10): 133-138.
- [8] 王爱芝. 花楸有性生殖过程及败育机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- [9] 杨 玲, 刘春苹, 沈海龙. 低温层积时间和发芽温度对花楸种子萌发的影响[J]. 种子, 2008, 27(10): 20-22.
- [10] 郑 健, 郑勇奇, 吴 超. 花楸树的地理分布及天然更新方式 [J]. 林业科学, 2007, 12, 43(12): 86-93.
- [11] 郑 健, 郑勇奇, 张川红, 等. 花楸树天然群体的遗传多样性研究 [J]. 生物多样性, 2008, 16(6): 562-569.
- [12] 郑 健, 郑勇奇, 张川红, 等. 花楸树天然群体的异交率 [J]. 林业科学, 2009, 45(11): 44-49.
- [13] 郑冬梅. 花楸属的系统学初步研究 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2006.
- [14] 李明霞, 刘正立, 李 玮, 等. 河北驼梁山自然保护区种子植物区系分析 [J]. 河北林果研究, 2012, 27(2): 171-173.
- [15] 郑宝强, 肖建忠, 王廷录, 等. 驼梁山野生观赏植物资源调查研究 [J]. 河北林果研究, 2006, 21(1): 83-87.
- [16] Parisod C, Besnard G. Parisod C, et al. Glacial in situ survival in the Western Alps and polytopic autopolyploidy in *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) [J]. Molecular Ecology, 2007, 16(13): 2755-2767.
- [17] Taberlet P, Gielly L, G Pautou, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5): 1105-1109.
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [19] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics, 1998, 14(9): 817-818.
- [20] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [21] Swofford D L. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods), version 4.0 [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.
- [22] Rieseberg L R, Ellstrand N C. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization [J]. Critical reviews in plant sciences, 1993, 12: 213-241.

(责任编辑:詹春梅)