

# 中国樱桃的 PCR-RFLP 分析\*

曹东伟<sup>1</sup>, 蔡宇良<sup>2</sup>, 杨娟<sup>1</sup>, 赵桂仿<sup>1</sup>

(1 西北大学 生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西 西安 710069;

2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 采用三因素五水平正交组合设计, 探讨了野生中国樱桃的 PCR-RFLP 扩增条件及限制性内切酶酶切反应体系, 并用 PCR-RFLP 技术对中国樱桃进行了分子亲缘地理学研究。结果表明, 利用 42 种引物/酶组合, 在 13 个中国樱桃居群中检测出多态位点比率为 99.48%; 在所有酶切片段中, 发现了 5 种 cpDNA 单倍型(H1、H2、H3、H4、H5); 根据单倍型的地理分布格局, 将所研究的中国樱桃居群划分为 4 个地理单元, 地理单元间的基因分化系数( $G_{ST}$ ) 值为 0.397, cpDNA 基因流( $N_m$ ) 为 0.758; 中国樱桃 cpDNA 总的遗传多样性( $H_t$ ) 为 0.166, 地理单元内的 cpDNA 遗传多样性( $H_s$ ) 为 0.005。分析结果说明, 当第四纪冰川来临时, 中国樱桃向南迁移并避难于云南省东南部山区、秦岭南坡及大巴山的东部等地区; 当冰期结束、气候缓和时, 避难于云南省东南部山区的中国樱桃分别向东北、西北方向回迁, 避难于大巴山东段的中国樱桃则向东北方向迁移, 形成现今的分布格局。

**[关键词]** PCR-RFLP; 樱桃; 反应体系; 亲缘地理学

**[中图分类号]** S662.502

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)05-0173-06

## PCR-RFLP analysis of *Prunus pseudocerasus*

CAO Dong-wei<sup>1</sup>, CAI Yu-liang<sup>2</sup>, YANG Juan<sup>1</sup>, ZHAO Gui-fang<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, School of Life Science of Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China; 2 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The PCR-RFLP amplification system and the endonucleation system of *Prunus pseudocerasus* were studied by using a three-factor orthogonal combination design. Molecular phylogeographical research upon *P. pseudocerasus* in 13 populations has been carried out by means of the PCR-RFLP reaction system. The percentage of polymorphic loci which was 99.48% was detected by 42 pairs of primer/enzyme. Five cpDNA haplotypes were detected through the analysis of all the fragments. The investigated *P. pseudocerasus* populations could be divided into 4 geographical units according to the haplotypes. The variation coefficient (GST) was 0.397 and the cpDNA gene flow was 0.758 among geographical units. Total cpDNA genetic diversity was 0.166, and 0.005 in geographical units. The results showed that *P. pseudocerasus* migrated southwards and inhabited the mountainous areas of southeast Yunnan Province, Qinling's south slope and Dabashan's east during the glacier of Quaternary period. With the alleviation of climate after the end of glacial age, *P. pseudocerasus* individuals from southeast in Yunnan migrated northwest and northeast respectively while those from Dabashan's east section migrated northeast, and therefore the current distribution pattern was eventually formed.

\* [收稿日期] 2006-04-10

[基金项目] 陕西省教育厅专项基金资助项目(4J K1); 西北农林科技大学育种专项资助项目(05 YZ033)

[作者简介] 曹东伟(1981-), 女, 河南新乡人, 在读硕士, 主要从事分子生态遗传学研究。

[通讯作者] 赵桂仿(1952-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事系统与进化植物学研究。

**Key words :** PCR-RFLP ;cherry ;reaction system ;phylogeography

中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus*) 隶属蔷薇科李属,主要分布于北半球温带,地域涉及亚洲、欧洲和北美洲,种类繁多,种质资源丰富。目前对中国樱桃的研究主要集中在分类、品种鉴定以及系统发育分析方面<sup>[1-3]</sup>,在分子亲缘地理方面的研究还未见报道。亲缘地理学(Phylogeography)是 Avise 等<sup>[4]</sup>提出的有关历史性生物地理学(Historical biogeography)的观念,主要是运用细胞器遗传物质对物种居群间的亲缘关系进行探讨,并将地史资料如冰河事件等与研究对象的地理分布情况相整合,以探讨该物种的历史进程<sup>[5]</sup>,并提出相应的保护措施和发展策略。国外已有人对甜樱桃和酸樱桃作过此类研究<sup>[6-7]</sup>。本研究拟采用 PCR-RFLP 技术对樱桃进行分子亲缘地理学研究,试图探讨中国樱桃植物的起源、冰期后的迁移路线以及现有分布格局的成因。

PCR-RFLP 研究所用的模板为叶绿体 DNA(cpDNA),cpDNA 是通过母系遗传的,其序列结构上的保守性保证了类群间的可比性。本研究以野生中国樱桃为材料,对影响 PCR 和限制性酶切的试验因素进行了优化,并对中国樱桃的 13 个自然居群进行了亲缘地理研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

表 1 为中国樱桃 (*P. pseudocerasus*) 各居群采集地的具体资料(共 13 个居群,包含 23 个个体)。在每个居群中,选取 1~3 株生长状况良好的成龄植株,每株采集 20 片健康幼叶,快速用硅胶干燥,带回实验室冷藏于 -80 超低温冰箱中待用。

表 1 中国樱桃采样点概况

Table 1 General situation of the sampling sites of *P. pseudocerasus*

居群代号 Population code	采样地 Location	样本株数 No. of sample	海拔/m Altitude	经度 Longitude	纬度 Latitude
YI	贵州印江 Yinjiang, Guizhou province	1	917	E108 36.489	N27 55.531
MZ	云南蒙自 Mengzi, Yunnan province	1	1 902	E103 47.053	N23 24.004
PB	云南屏边 Pingbian, Yunnan province	2	2 019	E103 52.555	N23 13.170
WL	四川卧龙 Wolong, Sichuan province	2	1 950	E103 13.359	N31 04.518
CK	重庆城口 Chengkou, Chongqing	1	1 248	E108 42.810	N32 03.521
FP	陕西佛坪 Foping, Shaanxi province	3	1 130	E 107 48.835	N33 33.549
XX	陕西西乡 Xixiang, Shaanxi province	2	1 616	E 108 15.023	N33 45
NZ	陕西南郑 Nanzheng, Shaanxi province	2	1 145	E 107 48	N 33 33
BTM	河南宝天曼 Baotianman, Henan province	1	1 138	E112 16.113	N33 43.468
YS	北京燕山 Yanshan, Beijing	2	90	E116 12.223	N39 59.577
SNJ	湖北神农架 Shennongjia, Hubei province	2	906	E110 33.517	N31 24.279
LS	山东崂山 Laoshan, Shandong province	2	588	E 120 12.621	N36 18.192
TS	山东泰山 Taishan, Shandong province	2	334	E117 03.147	N36 13.498

### 1.2 方法

1.2.1 樱桃总 DNA 的提取 采用改良的 2 × CTAB 法<sup>[8]</sup>提取樱桃总 DNA。

1.2.2 引物和酶的选择 cpDNA 通用引物序列由上海生工合成,从每个居群中任意抽取一个个体用于 19 对引物的筛选。部分 cpDNA 通用引物的名称、序列、扩增区域、退火温度及延伸时间参考文献出处见表 2。扩增产物一般用单酶切,可采用四碱基限制性内切酶和六碱基限制性内切酶,也可以采用四碱基酶和六碱基酶的组合进行双酶切。在酶切反应中,选定内切酶的原则是切出的多态性要好<sup>[9]</sup>。

1.2.3 反应体系的优化 采用三因素五水平的正交试验设计选择最佳试验条件。在 20 μL 扩增反应

体系中设计 *Taq* DNA 酶量、dNTP 浓度和引物浓度 3 个因素,正交试验方案采用  $L_{25}(5^3)$  正交表(表 3)。在 PTC-200 热循环仪上进行 PCR 扩增反应(96 6 min 30 s;96 1 min 10 s,55~62 1 min,72 2~3 min,40 个循环;72 ,10 min。具体退火温度和延伸时间参考表 2 各组引物的最佳条件)。在 10 μL 酶切体系中,于 37 条件下分别变化扩增产物量、内切酶量、酶切时间,在热循环仪上保温运行。

扩增及酶切产物均采用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,用柯达数码电泳成像分析系统照相、记录、分析。

表 2 用于本研究的叶绿体通用引物  
Table 2 cpDNA universal primers used in this research

引物名称 Name of primer	引物序列 Primer sequence	扩增区域 Amplification region	退火温度/ Annealing temperature	延伸时间/ Elongation time
<i>trnL-trnF</i> <sup>[10]</sup>	5 -CGAAA TCGGTA GACGCTACG-3 5 -ATTTGAACTGGTGACACGA-3	基因及基因间区 Gene and gene region	55	3.0
<i>trnH-trnK</i> <sup>[11]</sup>	5 -ACGGGAA TTGAACCCGCGCA -3 5 - CCGACTAGTCCGGGTTTCGA-3	基因及基因间区,含 <i>psbA</i> 基因 Gene and gene region including <i>psbA</i> gene	62	2.0
<i>trnK-trnK</i> <sup>[11]</sup>	5 -GGGTTGCCCGGGACTCGAAC-3 5 -CAACGGTA GA GTACTCGGCTTTTA -3	基因及基因间区 Gene and gene region	56	2.5
<i>trnD-trnT</i> <sup>[11]</sup>	5 -ACCAATTGAACTACAA TCCC-3 5 -CTACCACTGACTTAAAA GGC -3	基因及基因间区,含 <i>trnE</i> 和 <i>trnY</i> 基因 Gene and gene region including <i>trnE</i> and <i>trnY</i> genes	57	3.0
<i>trnS-psbC</i> <sup>[11]</sup>	5 -GGTCGTGACCAA GAAACCAC -3 5 -GGTTCGAA TCCCTCTCTCTC-3	基因及基因间区 Gene and gene region	62	2.0
<i>trnS-trnfM</i> <sup>[11]</sup>	5 -AACCAC TCGGCCA TCTCTCCTA -3 5 -CATAACCTTGA GGTACGGG-3	基因及基因间区 Gene and gene region	62	2.0

表 3 中国櫻桃 PCR-RFLP 扩增反应体系的 L<sub>25</sub> (5<sup>3</sup>) 正交试验方案

Table 3 L<sub>25</sub> (5<sup>3</sup>) orthogonal test designed for the system of PCR-RFLP amplification reaction of *Prunus pseudocerasus*

序号 Order	Taq DNA/ U	dNTP 浓度/ (μmol · L <sup>-1</sup> ) dNTP Concentration	引物浓度/ (μmol · L <sup>-1</sup> ) Concentration of primer	序号 Order	Taq DNA/ U	dNTP 浓度/ (μmol · L <sup>-1</sup> ) dNTP concentration	引物浓度/ (μmol · L <sup>-1</sup> ) Concentration of primer
1	1	100	0.16	14	3	400	0.16
2	1	200	0.18	15	3	500	0.18
3	1	300	0.20	16	4	100	0.22
4	1	400	0.22	17	4	200	0.24
5	1	500	0.24	18	4	300	0.16
6	2	100	0.18	19	4	400	0.18
7	2	200	0.20	20	4	500	0.20
8	2	300	0.22	21	5	100	0.24
9	2	400	0.24	22	5	200	0.16
10	2	500	0.16	23	5	300	0.18
11	3	100	0.20	24	5	400	0.20
12	3	200	0.22	25	5	500	0.22
13	3	300	0.24				

1.2.4 数据统计与分析 通过观察酶切片段,在 13 个居群中检测单倍型<sup>[12]</sup>,并划分地理单元。利用 Popgen32 软件计算中国櫻桃 cpDNA 总的遗传多样性 ( $H_t$ ) 和地理单元内的 cpDNA 多样性 ( $H_s$ )。基因分化系数 ( $G_{ST}$ ) 为居群间遗传多样性占总遗传多样性的比例 [ $G_{ST} = (H_t - H_s) / H_t$ ]。采用以下公式计算地理分布单元间的 cpDNA 基因流 ( $Nm$ )

$$Nm = (1 - G_{ST}) / 4G_{ST}$$

应用 PAUP4.0 软件中的邻近距离法 (Neighbor-joining)<sup>[13]</sup> 和 MEGA2 中的最小进化法 (Minimum Evolution)<sup>[14]</sup> 分别构建邻位相连树和最小进化树。基于 Nei 遗传距离,根据 1 000 次的自助再抽样 (Bootstrap) 进行统计分析,用 UPGMA 算法得到聚类分析图。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物和酶的选择结果

对引物和酶进行选择表明,19 对引物中有 6 对能够获得清晰稳定的扩增条带,可用于供试材料的 PCR-RFLP 分析 (见表 2)。利用内切酶 *Eco721*、*Hpa*、*Taq*、*Pst* 和 *Hae* 进行单酶切反应,利用 *Hind* + *Hin6* 和 *EcoR* + *Rsa* 内切酶组合进行双酶切反应。

### 2.2 反应体系的优化结果

在 20 μL 扩增体系中, *Taq* DNA 酶用量为 3 U, Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2.0 mmol/L, dNTP 浓度为 400 μmol/L, 引物浓度为 0.18 μmol/L, 此条件下扩增图谱条带清晰,信号较强,无背景干扰。在 10 μL 酶切反应体系中,扩增产物用量为 5 μL,内切酶量为 5

U,酶切时间为 8 h,试验结果稳定可靠,可重复性较高。

2.3 中国樱桃的 PCR-RFLP 分析

2.3.1 酶切片段分析 用优化后的 PCR-RFLP 反应体系对中国樱桃 13 个居群的 cpDNA 进行分析。

所有引物均可扩增出一条清晰的谱带,内切酶酶切后能显示出多态性(图 1)。42 种引物/酶组合共检测到 572 个片段,其中多态片段 569 个,占总片段数的 99.48 %。

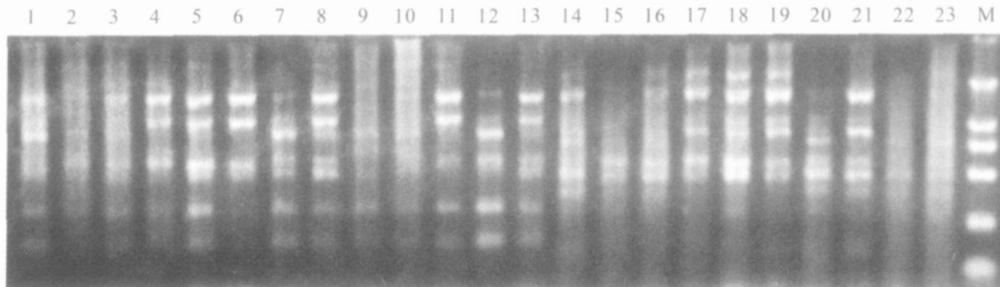


图 1 PCR-RFLP 对中国樱桃 13 个居群 23 个个体的酶切结果  
各泳道数字对应的生态型编号参照表 1;M:DL2000 DNA Marker

Fig. 1 Result of digestion reaction of *Prunus pseudocerasus* by means of PCR-RFLP technique  
Every lane number refers to the accession listed in table 1 ,M:DL2000 DNA Marker

2.3.2 单倍型和地理单元分析 单倍型的具体分布和各地理单元的划分结果见表 4。观察酶切片段,在 13 个居群中共检测到 5 种 cpDNA 单倍型,其中位于贵州印江、云南屏边和蒙自、四川卧龙和重庆城口的 5 个居群享有同一种单倍型 H1,位于陕西佛坪、西乡和南郑的 3 个居群享有同一个单倍型 H2,

来自河南宝天曼和北京燕山的 2 个居群拥有一种单倍型 H3,湖北神农架居群享有单倍型 H4,山东崂山、泰山的 4 个居群共享单倍型 H5。根据单倍型的分布特点及其所属山系,将 13 个樱桃居群划分为 4 个地理单元,即西南地理单元(XN)、秦岭地理单元(QL)、中北部地理单元(ZB)和山东地理单元(SD)。

表 4 中国樱桃单倍型的分布和地理单元划分结果

Table 4 Distribution of haplotypes and compartmentalized result of geographic unit of *Prunus pseudocerasus*

居群 Population	单倍型 Haplotype	地区 Zone	地理单元 Geographic unit
YJ	H1	西南 Xinnan ,XN	西南 Xinnan ,XN
MZ	H1	西南 Xinnan ,XN	西南 Xinnan ,XN
PB	H1	西南 Xinnan ,XN	西南 Xinnan ,XN
WL	H1	西南 Xinnan ,XN	西南 Xinnan ,XN
CK	H1	西南 Xinnan ,XN	西南 Xinnan ,XN
FP	H2	秦岭 Qinling ,QL	秦岭 Qinling ,QL
XX	H2	秦岭 Qinling ,QL	秦岭 Qinling ,QL
NZ	H2	秦岭 Qinling ,QL	秦岭 Qinling ,QL
BTM	H3	华北 Huabei ,HB	中北 Zhongbei ,ZB
YS	H3	华北 Huabei ,HB	中北 Zhongbei ,ZB
SNJ	H4	神农架 Shennongjia ,SNJ	中北 Zhongbei ,ZB
LS	H5	山东 Shandong ,SD	山东 Shandong ,SD
TS	H5	山东 Shandong ,SD	山东 Shandong ,SD

2.3.3 遗传变异分析 利用 PCR-RFLP 对中国樱桃 cpDNA 遗传变异进行分析,结果显示,西南(XN)、秦岭(QL)、中北(ZB)和山东(SD)4 个地理单元的 cpDNA 基因分化系数值( $G_{ST}$ )为 0.397,地理分布单元间的 cpDNA 基因流( $Nm$ )为 0.758。用 Popgene 估算中国樱桃 cpDNA 总的遗传多样性为 0.166( $H_t$ ),地理单元内的 cpDNA 多样性( $H_s$ )为

0.005,4 个地理单元内的遗传多样性分别为 34.62 % ,40.56 % ,36.54 % 和 32.17 %。

从图 2 和图 3 可以看出,在中国樱桃内部,第一支由来自于中国西南部的 5 个居群组成,其具有同一种单倍型 H1;第二支是秦岭南坡的 3 个居群共同组成单倍型 H2;来自于河南和北京燕山的 2 个居群享有单倍型 H3,并与单倍型为 H4 的神农架居群聚

成一支;崂山居群和泰山居群享有单倍型 H5。

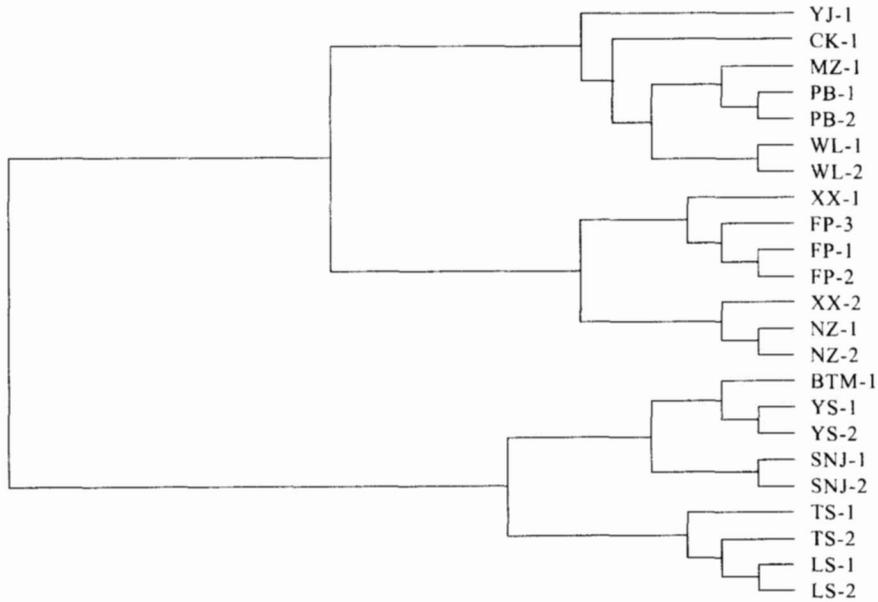


图 2 利用邻近距离法对中国樱桃 13 个居群系统发育关系的聚类分析

Fig. 2 Clustering analysis on phylogenetic relationships among 13 populations of *Prunus pseudocerasus* by using neighbor-joining method

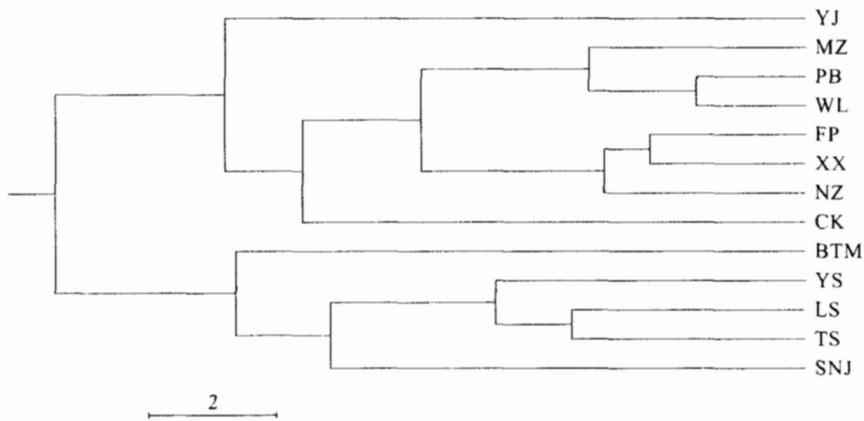


图 3 利用最小进化法对中国樱桃 13 个居群系统发育关系的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis on phylogenetic relationships among 13 populations of *Prunus pseudocerasus* by using minimum evolution method

### 3 讨 论

#### 3.1 反应体系的优化

在扩增过程中, *Taq* DNA 酶以单链 DNA 为模板,沿引物 5'-3' 方向,按碱基互补原则,将反应体系中的 dNTP 逐个合成一条新链,所以各组分直接影响扩增的效果,应该对 PCR 反应体系进行优化,在酶切反应中,需要选择多态性高的内切酶。

本试验最终确定的樱桃 PCR-RFLP 反应体系,扩增图谱条带清晰,无背景干扰,试验结果稳定可

靠、可重复性较高,这与 Mohanty 等<sup>[15]</sup>对樱桃近缘种黑刺李进行研究时所用反应条件接近。该反应体系的建立为中国樱桃分子亲缘地理学研究奠定了良好的基础。

#### 3.2 中国樱桃 cpDNA 的遗传变异

利用 PCR-RFLP 标记并非在所有物种内都能检测到叶绿体基因组的多态性。本研究用 42 种引物/酶组合对中国樱桃 cpDNA 的遗传变异进行了研究。在 13 个中国樱桃居群中检测到的多态位点比率为 99.48%,说明 PCR-RFLP 分子标记技术在

检测中国樱桃种内叶绿体基因组多态性方面可靠性较高。

根据酶切片段可判断出 5 种不同的单倍型,说明中国樱桃种内存在 cpDNA 变异。变异量的有效检出依赖于样品的代表性、引物所涉及的基因组长度和足够多的限制性内切酶。具单倍型 H1 的个体分布范围最广,加大对这一区域的取样力度,有助于更细致地反映中国樱桃的亲缘地理结构。

中国西南的云、贵、川三省,几乎分布有中国樱亚属的全部种类,具备中国樱桃起源中心的条件。特别是古称川滇古陆的地方,自第三纪以来保持着比较稳定的气候条件,很多古老和子遗物种都在这里保存下来。李育农<sup>[16]</sup>就曾论证了同样属于蔷薇科的苹果属植物的起源演化中心位于云、贵、川三省。中国樱桃在这个地理单元的多样性水平也较高,因此这个地区可能是中国樱桃的起源中心。

云南的屏边和蒙自居群、四川的卧龙居群、贵州的印江居群和重庆的城口居群具有共同的单倍型 H1,说明这些居群的个体很可能由同一个避难所发展而来,cpDNA 多样性水平相对较高。单倍型 H2 分布于秦岭南坡,地理单元分析显示其多样性水平相对最高,由于受秦岭天然屏障的作用,形成了特殊的亚热带北垣山地暖温带湿润季风气候,是中国樱桃的另一个冰期避难所。

处于不同演化中心的种群共有一个单倍型或被划分到同一地理单元,从整体看来又被秦岭分为两大支:西南部有单倍型 H1 和 H2,中北部有 H3、H4 和 H5;前者为西南和秦岭两个地理单元,后者为中北部和山东地理单元。该分布格局应和了秦岭的特殊位置——呈东西走向位于中国中部,阻挡着南来北往的气流,使其南北两侧的气候特征产生明显差异,作为一个屏障使南北两侧的种群在遗传上也产生了分化,地理单元间存在着显著的遗传分化。根据地理单元间的遗传分化系数和种子基因流,可以认定地理单元内的 cpDNA 也发生了较大变异。基于最小进化树与邻位相连树结果基本吻合,各支所包含的居群、单倍型相差不大,说明得到的系统树比较接近实际情况<sup>[17]</sup>。图 3 中河南宝天曼居群从中北部居群中最早分化出来,因其位于秦岭东段余脉,故综合了南北两方的物种和种群,在遗传组成上也兼有了两方的特征。

根据中国樱桃的演化迁移和现今分布格局,可以采取有利措施保护其生境,发展和利用中国樱桃的野生资源,人为创造基因交流和重组的条件,加强

居群间交换,以期保存遗传多样性、培育新品种,促进林木和果业的发展。

#### [参考文献]

- [1] 周丽华,韦仲新,吴征镒. 国产蔷薇科蔷薇亚科的花粉形态[J]. 云南植物研究,1999,21(4):455-460.
- [2] 陈晓流,陈学森,束怀瑞,等. 15 个樱桃品种的 RAPD 分析[J]. 果树学报,2004,21(6):556-559.
- [3] 程中平. 利用分子标记对桃、李、杏、梅、樱类植物系统发育的分析[J]. 中国南方果树,2003,21(3):45-50.
- [4] Avise J C,Arnold J,Ball R M,et al. Intraspecific phylogeography:the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics[J]. Annual Review of Ecology and Systematics,1987,18:489-522.
- [5] Avise J C. Phylogeography the history and formation of species [M]. Cambridge: Harvard University Press,2000.
- [6] Mohanty A,Mart ń J P,Aguinagalde I. Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics,2001,103(7):112-117.
- [7] Panda S,Mart ń J P,Aguinagalde I. Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2003,50(5):489-495.
- [8] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998:370-375.
- [9] 吕志堂,刘志恒. 糖单孢菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 微生物学报,2000,40(6):567-572.
- [10] Taberlet P L,Geilly G,Bouvet J,et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Mol Bio,1991,17:1105-1109.
- [11] Demesure B,Sodzi N,Petit R J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA [J]. Plants Molecular Ecology,1995,4:129-131.
- [12] 兰蓉,洪琼花,高源汉. 云南绵羊线粒体 DNA 遗传多态性研究[J]. 遗传,1998,20(1):20-23.
- [13] Swofford D L. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other Methods): Version 4. 0 [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates,1998.
- [14] Kumar S,Tamura K,Jakobsen I B,et al. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software[M]. Tempe,Arizona: Arizona State University,USA,2001.
- [15] Mohanty A,Mart ń J P,Aguinagalde I. Population genetic analysis of european *Prunus spinosa* (Rosaceae) using chloroplast DNA markers[J]. American Journal of Botany,2002,89(8):1223-1228.
- [16] 李育农. 世界苹果属植物的起源演化研究新进展[J]. 果树科学,1999,16(增刊):8-19.
- [17] 黄原. 分子系统学——原理、方法及应用[M]. 北京:中国农业出版社,1998.