

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.002

周俊辉, 王燕平, 陈勤, 等. 用 AFLP 分析广东省鲜食橄榄品种资源遗传多样性[J]. 广西植物, 2014, 34(1): 4-9

Zhou JH, Wang YP, Chen Q, et al. Genetic diversity analysis with AFLP on fresh Chinese olive cultivars resources in Guangdong Province[J]. Guihaia, 2014, 34(1): 4-9

用 AFLP 分析广东省鲜食橄榄品种资源遗传多样性

周俊辉^{1*}, 王燕平^{1,3}, 陈勤², 周志钦³

(1. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院, 广州 510225; 2. 广东省潮州市茶叶科学研究中心, 广东 潮州 515726; 3. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要: 从 64 对引物组合中筛选出 6 对谱带清晰、多态性高的引物组合, 对 63 个橄榄品种扩增, 共扩增出 417 条多态性电泳谱带, 多态性比率达 100%, 揭示了橄榄品种的遗传多样性。利用 UPGMA 对供试橄榄品种聚类, 建立 AFLP 聚类图。结果表明: 63 份材料之间的遗传相似性系数为 0.0606~0.7619, 相似系数为 0.312 时, 可将供试材料分为 7 个品种群, 其中第 1 群包括 45 个品种, 以‘潮阳甜榄’为代表, 还可细分成 3 个组; 第 2 群包括 5 个品种, 以‘大纳甜’为代表; 第 3 群包括 4 个品种, 以‘潮阳三棱’为代表; 第 4 群包括‘土甜’、‘文祠三棱’和‘早花三棱’3 个品种; 第 5 群包括‘铁条’和‘细粒’两个品种; 第 6 群包括‘广太甜种’、‘西土’、‘鸡心’和‘车酸 1 号’4 个品种; 第 7 群只有‘凤湖橄榄’1 个品种, 与其他品种群亲缘关系较远, 可能发生变异。

关键词: AFLP; 橄榄; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)01-0004-06

Genetic diversity analysis with AFLP on fresh Chinese olive cultivars resources in Guangdong Province

ZHOU Jun-Hui^{1*}, WANG Yan-Ping^{1,3}, CHEN Qin², ZHOU Zhi-Qin³

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Chaozhou Institute Center of Tea, Chaozhou 515726, China; 3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Screened from 64 pairs of the AFLP primer, six pairs (E/AAC-M/CAT, E/AAC-M/CTT, E/ACA-M/CAA, E/AGG-M/CAA, E/ACC-M/CAA, E/ACT-M/CAT), which produced clear and reliable polymorphic bands, were selected for analysis genetic relationship and genetic diversity among the 63 Chinese olive cultivars. 417 amplification bands were produced with 100% polymorphic rate. It was indicated that there was rich genetic diversity in Chinese olive cultivar germplasm. The genetic relationship of the 63 Chinese olive cultivars was analyzed with software NTSYSpc-2.10a, and a UPGMA tree was established. According to this tree, the Chinese olive cultivars in this studied could be divided into 7 cultivar groups with a similar coefficient 0.312, the Group 1 delegated by ‘Chaoyang sweet olive’ including 45 cultivars, could be divided into 3 types, the Group 2 delegated by ‘Danatian’ including 5 cultivars, the Group 3 delegated by ‘Chaoyang sanleng’ including 4 cultivars, the Group 4 including 3 cultivars, the Group 5 including 2 cultivars, the Group 6 including 4 cultivars, and the Group 7 including one cultivar only, that was ‘Fenghu olive’, which had a long distance in relationship with other cultivars, maybe occurred variation in cultivation practice.

Key words: AFLP; fresh Chinese olive; genetic diversity

收稿日期: 2013-08-16 修回日期: 2013-11-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B020305012); 广东省农业科技项目(200844512)。

作者简介: 周俊辉(1963-), 男, 江西临川人, 博士, 教授, 主要从事园艺植物生理学研究, (E-mail)junhuizhou@163.com。

*通讯作者

橄榄(*Canarium album*)是橄榄科(Burseraceae)橄榄属(*Canarium*)植物,原产于中国,是我国著名的亚热带特产果树,具有很高的营养和药用价值,以广东、福建两省栽培最多(Zhou *et al.*, 2012)。橄榄在长期栽培中多用实生繁殖,产生大量的品种,品种间的亲缘关系不甚清楚,存在同种异名或同名异种等现象,致使育种工作受到很大限制。广东省橄榄种质资源的研究主要集中在品种调查、品种资源评价与保存等方面。如池辉云等(2007)在茂名市营建橄榄基因库,收集了 11 个农家品种 81 个优良单株;周俊辉等(2009)用层次分析法对来自潮汕地区的 16 个橄榄品种资源进行分析和排名。在橄榄亲缘关系及遗传多样性分析方面,宋亚娜等(2007)从 18S-26SrDNA 及 ITS 序列水平上将福建 15 个橄榄品种分为四类;聂珍素(2010)利用 RAPD 研究福建省 27 份橄榄种质获得 99.4% 的多态性位点;赵谦(2008)利用 ISSR 分子标记对粤东地区 21 份橄榄和 1 份乌榄进行亲缘关系鉴定;刘天亮(2010)利用 ISSR 分子标记研究福建 60 份橄榄种质获得 67.6% 的多态性位点。张平湖等(2010)采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对 11 个橄榄品种 SRAP 扩增体系进行优化。杨培奎等(2011)利用筛选得到的 8 个 ISSR 引物对粤东地区 64 份橄榄种质进行了遗传多样性分析,共扩增出 128 条谱带,99 条多态性条带,多态性比率为 77.34%,表明粤东地区橄榄种质资源总体遗传水平较低;并筛选出 16 个品种构建粤东地区橄榄核心种质。

每种分子标记各有其优缺点,如 RAPD 标记易受外界条件的影响,结果不稳定,ISSR 虽较为稳定,但需要相当多的引物,需多次测定才能绘制较为有用的指纹图谱(艾呈祥等, 2008)。AFLP 具有多态位点丰富、灵敏度高、重复性较好的特点(Pieter *et al.*, 1995),被广泛应用于各种果树的遗传多样性和亲缘关系分析(Monte *et al.*, 2000; 艾呈祥等, 2008)、种质资源鉴定(Guo *et al.*, 2002)、遗传图谱的构建(Yamamoto *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2003)、遗传育种(廖振坤等, 2006)等研究。本研究利用 AFLP 分子标记技术,对广东省不同地区的 63 个橄榄品种进行遗传多样性和亲缘关系分析,以期从分子水平上为橄榄亲缘关系提供技术资料。

1 材料与方 法

1.1 材料

材料为 63 份橄榄品种(表 1),于 2010 年 10 月

采自广东省的潮州、汕头、揭阳等地。采摘幼嫩叶片放于装有冰袋的保温箱中,迅速带回实验室,清洗后用液氮处理,放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 利用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA 并稍加改进,步骤如下:取冷冻橄榄叶片 30 mg,放入盛有液氮的研钵中充分研磨;将研磨好的粉末迅速转移到预先装有 $700\text{ }\mu\text{L}$ $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热缓冲液 GP1 的离心管中,加入 $7\text{ }\mu\text{L}$ β -ME,迅速颠倒混匀后 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,每隔 10 min 颠倒 1 次;加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),充分混匀, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min;加入 $7\text{ }\mu\text{L}$ RNA 水解酶,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,去除 RNA;小心取上层清液,加入等体积氯仿,充分混匀, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min;取上清转入新离心管中,加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液 GP2,充分混匀;将混匀的液体转入吸附柱 CB3 中, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s,弃废液;向吸附柱中加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液 GD, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s,弃废液,将吸附柱放入收集管中;向吸附柱中加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 漂洗液 PW, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s,弃废液,将吸附柱放入收集管中,重复漂洗 1 次;将吸附柱放回收集管中, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min,倒掉废液。将吸附柱置于室温下数分钟,以彻底晾干残余的漂洗液;将吸附柱转入新的离心管中,向其中加入 $50\sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 预热 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 ddH_2O ,室温放置 $2\sim 5\text{ min}$, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min,将溶液收集到离心管中分装备用,经核酸蛋白测定仪检测 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 $1.8\sim 2.0$ 之间,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.2 AFLP 分析 所有接头和引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物和接头的序列见表 2,扩增体系的优化参考王燕平等(2012)。

(1)酶切:总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$,含纯化后的基因组 DNA 500 ng , NEB buffer $2\text{ }\mu\text{L}$, $100\times$ BSA $0.2\text{ }\mu\text{L}$, EcoR I 3 U , Mse I 3 U ,加 ddH_2O 至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴 4 h,完成后将产物于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下变性 20 min,去除酶活性。

(2)连接:总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$,包括:酶切产物 $10\text{ }\mu\text{L}$ 、Mse I -adapter ($50\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$ 、EcoR I -adapter ($5\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 T_4 DNA ligase ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.3\text{ }\mu\text{L}$ 、 T_4 Buffer $2\text{ }\mu\text{L}$,加 ddH_2O 至 $20\text{ }\mu\text{L}$, $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 连接 6 h。完成后,将产物于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 min,去除连接酶活性。

表 1 供试橄榄材料一览表

Table 1 List of Chinese olive cultivars used in this study

编号 No.	品种名 Cultivar name	来源地 Source	编号 No.	品种名 Cultivar name	来源地 Source
1	马岗 2 号 Magang 2	饶平县 Raoping county	33	橙皮 Chengpi	普宁县 Puning county
2	马岗 6 号 Magang 6	饶平县 Raoping county	34	大红心 Dahongxin	普宁县 Puning county
3	马岗 5 号 Magang 5	饶平县 Raoping county	35	双湖香 Shuanghuxiang	普宁县 Puning county
4	马岗 1 号 Magang 1	饶平县 Raoping county	36	揭西赤 Jiexichi	揭西县 Jiexi county
5	大池甜 Dachitian	普宁县 Puning county	37	杂赤 Zachi	普宁县 Puning county
6	锡 1 号 Xi 1	饶平县 Raoping county	38	凤湖橄榄 Fenghu olive	揭西县 Jiexi county
7	冬节圆 1 号 Dongjieyuan 1	普宁县 Puning county	39	赤种 2 号 Chizhong 2	普宁县 Puning county
8	下赤 Xiachi	潮安县 Chaoan county	40	大普 Dapu	饶平县 Raoping county
9	甜种 Tianzhong	潮阳区 Chaoyang district	41	赤种仔 Chizhongzai	普宁县 Puning county
10	烈火 Liehuo	饶平县 Raoping county	42	潮阳甜榄 Chaoyang sweet olive	潮阳区 Chaoyang district
11	大纳甜 Danatian	普宁县 Puning county	43	揭西香甜榄 Jiexixiang sweet olive	揭西县 Jiexi county
12	双罗 Shuangluo	饶平县 Raoping county	44	大甜 Datian	丰顺县 Fengshun county
13	土甜 Tutian	潮阳区 Chaoyang district	45	小丁香 Xiaodingxiang	饶平县 Raoping county
14	四季 Siji	揭西县 Jiexi county	46	丁香 Dingxiang	饶平县 Raoping county
15	香种 Xiangzhong	潮安县 Chaoan county	47	凤喜赤 Fengxichi	普宁县 Puning county
16	东山 1 号 Dongshan 1	饶平县 Raoping county	48	下院 Xiayuan	饶平县 Raoping county
17	揭西青皮 Jiexiqingpi	揭西县 Jiexi county	49	鸣之烈 2 号 Mingzhilie 2	饶平县 Raoping county
18	小黄仔 Xiaohuangzai	潮安县 Chaoan county	50	黄都 Huangdu	饶平县 Raoping county
19	麒麟纳种 Qilinnazhong	普宁县 Puning county	51	鸡心 Jixin	普宁县 Puning county
20	广太青皮 Guangtaiqingpi	普宁县 Puning county	52	广太甜种 Guangtaitianzhong	普宁县 Puning county
21	晚花三棱 Wanhuasanleng	揭西县 Jiexi county	53	两头尖 Liangtoujian	潮安县 Chaoan county
22	早花三棱 Zaohuasanleng	揭西县 Jiexi county	54	纳种 Nazhong	潮阳区 Chaoyang district
23	马岗 3 号 Magang 3	饶平县 Raoping county	55	鸿运 Hongyun	揭西县 Jiexi county
24	铁节 Tiejie	普宁县 Puning county	56	茶滘榄 Chajiao olive	萝岗区 Luogang district
25	文祠三棱 Wencisanleng	潮安县 Chaoan county	57	东山 3 号 Dongshan 3	饶平县 Raoping county
26	冬节圆 2 号 Dongjieyuan 2	普宁县 Puning county	58	橡蒲青皮 Xiangpuqingpi	湘桥区 Xiangqiao district
27	东联香 Donglianxiang	丰顺县 Fengshun county	59	酥榄 Su olive	潮安县 Chaoan county
28	细粒 Xili	饶平县 Raoping county	60	铁条 Tietiao	普宁县 Puning county
29	老鼠牙 Laoshuya	潮安县 Chaoan county	61	西土 Xitu	饶平县 Raoping county
30	大纳 Dana	普宁县 Puning county	62	车酸 1 号 Chesuan 1	普宁县 Puning county
31	盐埕赤 Yanchengchi	普宁县 Puning county	63	四棱 Sileng	饶平县 Raoping county
32	潮阳三棱 Chaoyangsanleng	潮阳区 Chaoyang district			

注: 饶平县、潮安县、湘桥区属潮州市, 普宁县、揭西县属揭阳市, 潮阳区属汕头市, 丰顺县属梅州市, 萝岗区属广州市。

Note: Chaoan County and Xiangqiao District belong to Chaozhou City; Puning County and Jiexi County belong to Jiexi City; Chaoyang District belongs to Shantou City; Fengshun County belongs to Meizhou City; Luogang District belongs to Guangzhou City.

(3) 预扩增: 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 含 $2.0 \mu\text{L} 10 \times \text{PCR Buffer}$, $1.0 \mu\text{L} \text{MgCl}_2 (25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$, $1.2 \mu\text{L} \text{dNTPs} (2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$, $1 \mu\text{L}$ 引物 E+0 ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $1 \mu\text{L}$ 引物 M+0 ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $0.2 \mu\text{L}$ Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $5 \mu\text{L}$ DNA 模板 (连接产物稀释 20 倍), $8.6 \mu\text{L}$ 灭菌超纯水。预扩增反应程序为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。

(4) 选择性扩增: 用经过筛选的 6 对引物 (表 3) 进行选扩, 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 包括 $2.0 \mu\text{L} 10 \times \text{PCR Buffer}$, $1.4 \mu\text{L} \text{MgCl}_2 (25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$, $1.6 \mu\text{L} \text{dNTPs} (2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$, $0.6 \mu\text{L}$ EcoR I 引物 ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $0.6 \mu\text{L}$ Mse I 引物 ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $0.2 \mu\text{L}$ Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $5 \mu\text{L}$ DNA 模板 (预扩产物

稀释 80 倍), $8.6 \mu\text{L}$ 灭菌超纯水。选择性扩增程序为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s (每循环递减 $0.7 \text{ }^\circ\text{C}$), $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 12 个循环; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 25 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 终止反应。

(5) 电泳及染色: 选择性扩增产物变性后经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染程序参照 Bas-sam (1991) 的方法并加以改进。将凝胶同长板置于 800 mL 固定液 (无水乙醇 80 mL , 冰醋酸 4 mL , 加水定容至 800 mL) 中固定 30 min; 放入银染液 (1 g AgNO_3 加 1.5 mL $370 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醛溶于 1 L 水) 中轻轻摇动 20~30 min; 蒸馏水漂洗 5~10 s; 立即放入预冷的显影液 (11 g 氢氧化钠溶于 1 L 水中, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱预冷, 显影时加 10 mL $370 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醛)

表 2 用于橄榄 AFLP 分析的限制性内切酶接头及引物序列
Table 2 Adapters and primers sequences used in the AFLP analysis of *C. album*

限制性内切酶 Restriction enzyme	<i>EcoR</i> I	<i>Mse</i> I
接头序列 Adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
预扩增引物 Pre-amplification prime	E+0: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	M+0: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
	E/AAC: E/AAC; 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	M/CAC: MCAC/; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
	E/AAG: E/AAG; 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'	M/CAG: M/CAG; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
	E/ACA: E/ACA; 5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	M/CAT: M/CAT; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
选择性扩增引物 Selective amplification prime	E/ACC: E/ACC; 5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'	M/CTA: M/CTA; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
	E/ACG: E/ACG; 5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	M/CTC: M/CTC; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
	E/ACT: E/ACT; 5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'	M/CTG: M/CTG; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
	E/AGC: E/AGC; 5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'	M/CTT: M/CTT; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'
	E/AGG: E/AGG; 5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'	M/CAA: M/CAA; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'

中, 显色至谱带清晰, 用凝胶成像系统进行拍照。

(6) 数据分析: 银染后记录电泳图谱上清晰可见的条带, 以 1 和 0 记录多态片段的有和无, 生成“0, 1”矩阵。用 NTSYSpc2.10a 软件 DICE 法计算样品间的相似系数, 使用 SAHN Clustering 的 UPGMA (Unweighted pair-group method arithmetic averages, 算术平均数不加权对组法) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP 标记多态性

利用从 64 对引物组合中筛选出的多态性较高的 6 对引物, 对 63 份橄榄基因组进行选择性的扩增, 获得较好的扩增结果(图 1, 表 3)。共扩增出 417 条谱带, 平均每对引物扩增出 69 条带, 且均有多态性, 多态性比例 100%, 可见不同橄榄品种存在明显遗传差异, 橄榄品种遗传多样性极为丰富; AFLP 分子标记适于检测橄榄品种资源遗传多样性。

表 3 6 对引物选择性扩增引物产生的条带多态性
Table 3 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on 6 primer pairs

序号 No.	引物组合 Primer combination	总带数 Total band number	多态性带数 Polymorphic band number	多态性位点 百分率 (%) Polymorphic band percentage
1	E-AGG/M-CAA	66	66	100
2	E-ACA/M-CAA	49	49	100
3	E-ACC/M-CAA	93	93	100
4	E-AAC/M-CTT	71	71	100
5	E-ACT/M-CAT	80	80	100
6	E-AAC/M-CAT	58	58	100
	合计 Total	417	417	—
	平均 Average	69.5	69.5	100%

2.2 63 份橄榄品种的聚类分析

63 份橄榄种质相互间的相似系数为 0.060 6~0.761 9, 其中“赤种仔”与“铁条”的相似系数最小, 为 0.060 6, 表明两品种间的亲缘关系最远。“马岗 2 号”与“马岗 1 号”的相似系数最大, 为 0.761 9, 表明两品种间的亲缘关系最近。

从聚类图上可以看出, 以相似系数 0.312 为标准可将 63 份橄榄种质资源分为 7 个品种群。

第 1 群包括 45 个品种, 在相似性系数为 0.375 处可再分成 3 个组。其中“四季”、“铁节”、“香种”和“下院”首先聚在一起形成第 1 组; 第 2 组中“揭西赤”、“纳种”、“揭西香甜榄”、“双湖香”、“两头尖”、“潮阳甜榄”、“鸿运”、“小丁香”和“鸣之烈 2 号”, 该组相似系数范围为 0.396~0.62, 相似系数较小, 说明其亲缘关系较远; 第 3 组 29 个品种, 可以分为两个小组, 其中第 1 小组包括 23 个品种, 他们关系复杂, 不过大多数是来自潮州市的地方品种。

第 2 群包括 5 个品种, “大纳甜”与“橙皮”相聚后和“盐埕赤”为一组; “凤喜赤”和“黄都”聚为另一组。

第 3 群包括 4 个品种, “下赤”和“大甜”、“潮阳三棱”和“赤种 2 号”分别为一组。

第 4 群中“土甜”和“文祠三棱”首先聚在一起, 再与“早花三棱”聚在一起。

第 5 群包括“铁条”和“细粒”两个品种, 相似系数为 0.3750, 相似系数较小又聚为一类, 说明与其他类群亲缘关系较远。

第 6 群包括“广太甜种”、“西土”、“鸡心”和“车酸 1 号”, 相似系数为 0.4000~0.5454, 相似系数分布较窄, 说明三者亲缘关系较近。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63

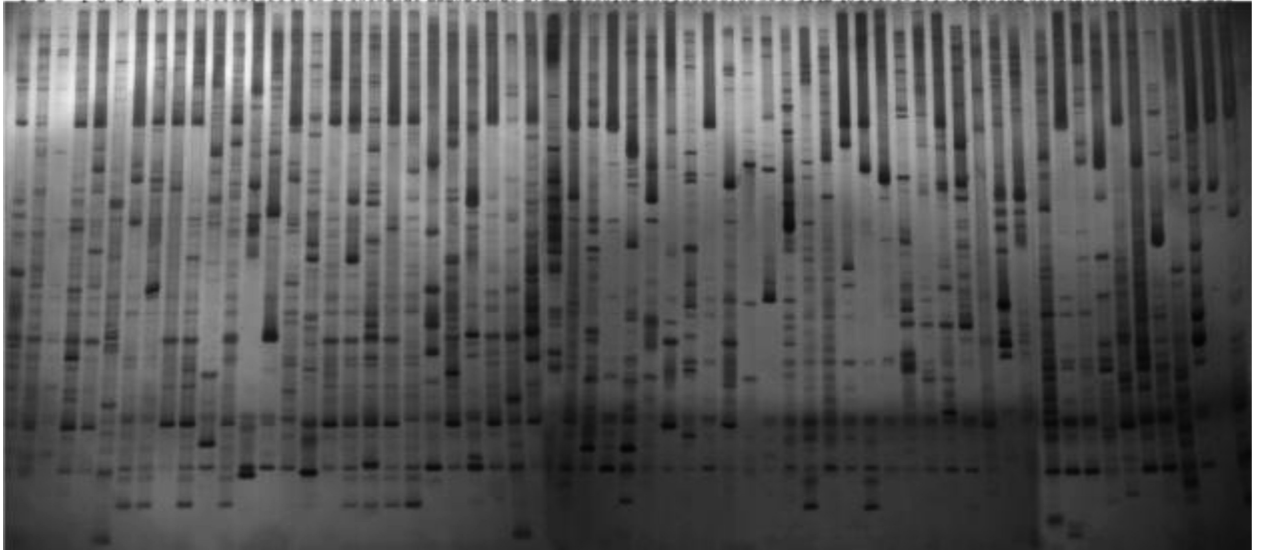


图 1 用 E-AGG /M-CAA 引物组合对橄榄选择性扩增的 AFLP 图谱 品种编号同表 1,下同。

Fig. 1 AFLP fingerprinting patterns of Chinese olive cultivars using the primer of E-AGG /M-CAA

The serial number of cultivar is the same as Table 1, the same below..

第 7 群中源于揭阳市的‘凤湖橄榄’单独聚为一类,与其他类群亲缘关系较远,可能在栽培过程中发生变异。

3 结论与讨论

聂珍素(2005)利用 16 个 RAPD 引物对来自福建的 27 份橄榄进行分析,获得高达 99.5% 的多态性。本研究 AFLP 扩增结果获得了 417 条多态性谱带,多态性位点百分率达 100%。与杨培奎等(2011)获得的 77.34% 的多态性位点间差异十分明显,且平均每对引物所产生的多态性带数(69.5 条)明显高于前者(12 条)。此外,从 DNA 分子水平上来说,遗传多样性越高,表明其遗传背景越复杂,该物种存在的历史越久远(李俊丽,2005)。高达 100% 的多态性,说明橄榄在其遗传进化过程中,基因组 DNA 发生了丰富的变异,同时也揭示了橄榄种质资源具有极其丰富的遗传多样性。

本研究得到的多态性相似系数为 0.0606 ~ 0.7619,与杨培奎等(2011)的结论有一定的差别,可能是两种分子标记检测位点覆盖基因组的程度不同导致;另一方面本研究中的实验材料与杨培奎等的供试橄榄品种略有不同,从而导致了遗传距离发生了一定的差异,聚类结果及相似系数有所不同。

广东橄榄生产上一直沿用实生苗,品种变异很

大;由于供试品种大多数原产和栽培于潮汕地区,地域较小,引种交流频繁,品种溯源不清;所以就不像其他植物种类那样品种聚类有较明显的地域相关性。例如‘东联香’、‘大甜’都源于梅州市丰顺县但分别属于第 1 群和第 3 群,这一点与杨培奎的研究结果一致。但也有来源地相同而聚为一起的,如来自潮州市饶平县的‘马岗 2 号’、‘马岗 1 号’、‘马岗 6 号’聚在一起,来自揭阳市普宁县的‘冬节圆 1 号’、‘冬节圆 2 号’聚在一起。

由聚类图可知,潮汕地区的橄榄品种资源存在同物异名和同名异物现象。例如来自潮州市饶平县的‘马岗 2 号’、‘马岗 1 号’、‘马岗 6 号’聚在一起,且前两者间的遗传相似性达 0.7619,说明这 3 个品种很可能具有共同的亲本,而杨培奎等(2011)的研究中这 3 者并未聚到一起;而以‘三棱’命名的‘文祠三棱’与‘潮阳三棱’并没有聚在一起,分别属于第 4 群和第 3 群,表明它们不可能属于同一品种。‘早花三棱’和‘晚花三棱’在开花习性、果实成熟期、果实性状等形态特征明显不同,被视为两个品种,本研究中两者的相似系数为 0.129,两者的亲缘关系相差较远,也充分证明了两者的不可能为同一品种。

本研究利用 AFLP 技术建立了广东省橄榄品种资源 AFLP 聚类图,63 份材料之间的遗传相似性系数在 0.0606 ~ 0.7619,相似系数为 0.312 时,可将广东省橄榄品种资源分为 7 个品种群。

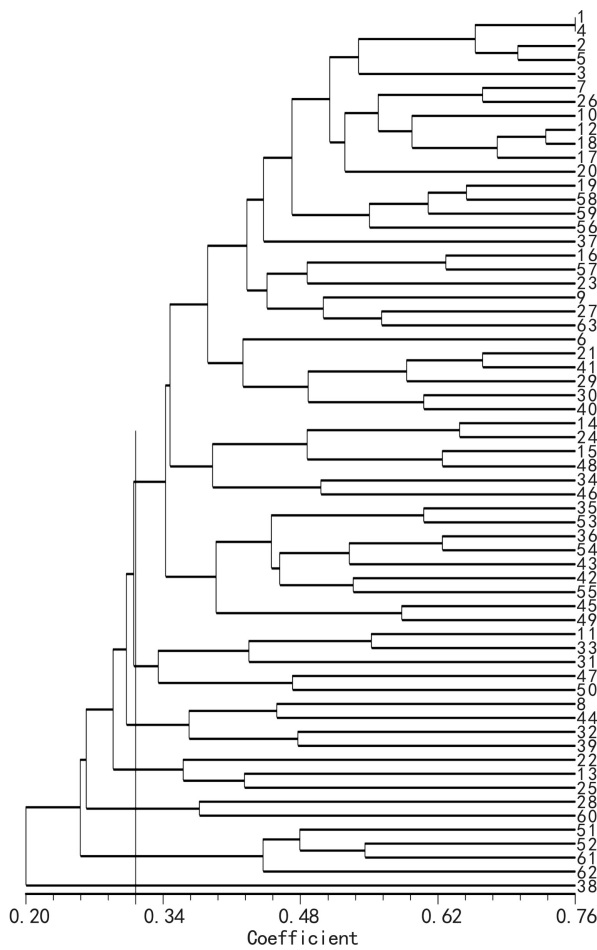


图 2 63 份橄榄种质 AFLP 标记聚类图
Fig. 2 Dendrogram for 63 accessions of Chinese olive based on AFLP markers

致谢 本研究在广东省热带与亚热带花卉与园林植物重点实验室完成,感谢仲恺农业工程学院的蒋锋博士、胡秀博士、张晚风老师等在研究过程中提供的技术指导和帮助。

参考文献:

刘天亮. 2010. 福建省橄榄种质资源的 ISSR 分析[D]. 福州: 福建农林大学
赵谦. 2008. ISSR 标记在植物遗传分析中的应用研究-以蝴蝶兰、橄榄、木槿属植物为例[D]. 汕头: 汕头大学
聂珍素. 2010. 福建橄榄资源 RAPD 分析[D]. 福州: 福建农林大学
Ai CX(艾呈祥), Zhang LS(张力思), Wei HR(魏海蓉), *et al.*. 2008. Studies on the genetic diversity of some Chestnut (*Castanea*) cultivars by AFLP analysis(部分板栗品种遗传多样性的 AFLP 分析)[J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), **35**(5): 747—752

Bassam B J, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Ann Biol Chem*, **196**(1): 80—83
Chi HY(池辉云), Wu XG(吴雄光), Hu DH(胡德活), *et al.*. 2007. Establishment technology and effect analysis of genetic resource bank in *Canarium album* (橄榄基因资源保存库营建技术与效果分析)[J]. *For Sci Technol Guangdong Prov* (广东林业科技), **23**(4): 22—27
Guo WW, Cheng YJ, Deng XX. 2002. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata* [J]. *Plant Cell Rep*, **20**(9): 829—834
Liao ZK(廖振坤), Zhang QM(张秋明), Liu WG(刘卫国), *et al.*. 2006. Identification of citrus mutants by AFLP technique (利用 AFLP 鉴定柑橘变异)[J]. *J Fruit Sci* (果树学报), **23**(3): 486—488
Liebhard R, Koller B, Gianfranceschi L, *et al.*. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome[J]. *Theor Appl Gen*, **106**: 1 497—1 508
Li JL(李俊丽), Xiang CP(向长萍), Zhang HR(张宏荣), *et al.*. 2005. Analysis of genetic diversity in *Cucurbita* by RAPD Markers(南瓜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), **32**(5): 834—839
Pieter V, Rene H, Marjo B, *et al.*. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucl Acids Res*, **23**(21): 4 407—4 414
Song YN(宋亚娜), Chen RQ(陈瑞庆), Zhou LJ(周莉娟), *et al.*. 2007. Cloning and sequencing of 18S-26S rRNA and ITS on *Canarium album* in Fujian Province(福建橄榄 18S-26S rRNA 及其 ITS 片段的克隆与序列分析)[J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), **36**(4): 5—9
Wang YP(王燕平), Chen Q(陈勤), Zhou ZQ(周志钦), *et al.*. 2012. Optimization of AFLP reaction system in *Canarium album* (橄榄基因组 AFLP 扩增体系的优化)[J]. *J Fruit Sci* (果树学报), **29**(3): 505—511
Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, *et al.*. 2002. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between and European pears[J]. *Theoret Appl Gen*, **106**: 9—18
Yang PK(杨培奎), Zhuang DH(庄东红), Ma RJ(马瑞君), *et al.*. 2011. The ISSR analysis of genetic diversity of *Canarium album* L. germplasm resources in Eastern Guangdong(粤东地区橄榄种质资源遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Chin Agric Sci Bull*, **27**(24): 86—92
Zhang PG(张平湖), Liu GM(刘冠明). 2010. Establishment and optimization of SRAP-PCR system in *Canarium album* (橄榄 SRAP-PCR 体系的建立和优化)[J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **26**(15): 86—88
Zhou JH(周俊辉), Zhen CY(郑婵叶), Zhong GF(钟国锋), *et al.*. 2009. The analysis and evaluation of fresh varieties of the white olive characters in Chaoshan(潮汕地区鲜食橄榄品种果实性状的分析与评价)[J]. *South Chin Fruits* (中国南方果树), **38**(6): 23—25
Zhou JH, Zhong GF, Lin ZZ, *et al.*. 2012. The effects of bagging on fresh fruit quality of *Canarium album* [J]. *J Food Agric & Environ*, **10**(1): 505—508