

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2018. 06. 005

丽江油橄榄品种表型及 SSR 标记的 多样性及聚类分析*

耿树香^{1,2}, 杨生超¹, 宁德鲁², 李勇杰²

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 基于表型性状及分子标记对丽江不同油橄榄品种进行遗传多样性分析, 对品种鉴定及育种工作均有重要意义。以云南丽江主要栽培的 19 个油橄榄品种为试验材料, 利用 14 个表型性状 (5 个叶片性状和 9 个果实性状) 及 20 个 SSR 引物荧光标记进行多样性及聚类分析。结果表明, 各品种油橄榄表型性状存在显著差异, 20 个 SSR 位点共检测到 124 个等位基因变异, 平均每个位点等位基因数为 6.2 个, 利用表型性状及 SSR 荧光分子标记可完全把 19 个品种油橄榄完全区分开。由此可知, 云南油橄榄选育品种及引种品种均具有高水平遗传多样性, 对于表型性状相似的油橄榄品种需结合 SSR 标记进行品种鉴定。

关键词: 油橄榄; SSR 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析; 表型性状

中图分类号: S 565.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-8246 (2018) 06-0030-05

Diversity and Cluster Analysis on Phenotypic and SSR Markers of Olive Cultivars in Lijiang

GENG Shu-xiang^{1,2}, YANG Sheng-chao¹, NING De-lu², LI Yong-jie²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201, P. R. China;

2. Yunnan Academy of Forestry, Kunming Yunnan 650201, P. R. China)

Abstract: By using 19 olive cultivars cultivated in Lijiang, Yunnan Province, as experimental materials, 14 phenotypic traits (5 leaf traits and 9 fruit traits) and 20 SSR primers were used for diversity and cluster analysis. A total of 124 allele variations were detected at 20 SSR loci, with an average of 6.2 alleles per locus. 19 olive varieties could be completely distinguished by phenotypic traits and SSR fluorescent molecular markers. The varieties and introduced varieties of Yunnan olive have high level genetic diversity. The varieties with similar phenotypic characters should be identified by SSR markers.

Key words: *Olea europaea* L.; SSR molecular markers; genetic diversity; clustering analysis; phenotypic data

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 是世界著名的优质木本油料树种, 主要为异花授粉植物, 为二倍体植物 (2n=46), 全基因组约为 2 200Mb。在长期引种驯化和人工选择过程中, 形成了遗传变异丰富并具有优良性状的油橄榄品种, 对这些品种的正确鉴定和特异性状的鉴别, 了解品种间遗传变异和多

样性, 是油橄榄品种资源利用和育种工作的重要前提^[1-3]。油橄榄的栽培历史悠久, 种质资源丰富, 其中包含大量的野生种、半野生种和栽培种, 而且不同地域间品种交换频繁, 导致同名异物或同物异名的现象十分普遍。油橄榄品种繁多, 据统计: 世界各地油橄榄自产品种共计 1 275 个, 中国现有登

* 收稿日期: 2018-09-17

基金项目: 云南省科技创新人才培养项目 (2016HB004), 中央财政推广项目 [2017TG03]。

第一作者简介: 耿树香 (1978-), 女, 副研究员, 主要从事木本油料种质资源评价研究。E-mail: 1016430670@qq.com

通讯作者简介: 杨生超 (1972-), 男, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源评价研究。

记品种共 158 个^[4]。在油橄榄长期引种驯化及人工栽培过程中，形成了遗传变异丰富并具有优良性状的油橄榄品种，对现云南丽江引种的油橄榄品种进行正确鉴定及特异性状的鉴别，势在必行。

早先对油橄榄品种的鉴定都基于表型及农艺性状^[5-6]。近年来，国外已有一些采用 RAPD、AFLP、SSR 和 ISSR 等分子标记技术进行油橄榄品种鉴定和遗传多样性研究的报道^[7-14]。虽然利用分子标记可以准确鉴定油橄榄品种并了解其遗传信息，但难以与表型性状相结合，缺乏分子标记与表型性状的验证分析。本研究利用已成熟的 SSR 分子标记技术，对收集保存丽江大具的 19 份油橄榄种质（育成品种、地方种质）进行表型性状及遗传分析，从 DNA 水平评估遗传多样性，并进一步

探究云南引种油橄榄种质资源品种间的亲缘关系，为今后的遗传育种提供可靠的遗传背景信息。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采集于云南省丽江市金沙江低山河谷地带，24°16'N，100°04'E，海拔 1 766m，砂壤。拥有独特的光热、土壤等自然条件，具备优越的油橄榄生长环境。年平均气温 14–18℃，极端最低温度–7℃至–9℃，平均年降雨量 500–1 000mm，平均相对湿度 61%–69%，日照 2 000–2 700h。于 2017–2018 年连续进行了表型性状的测定。材料编号、名称、起源和用途见表 1。

表 1 油橄榄品种及其原产地

Tab. 1 Olive varieties and their origins

编号	品种	起源	用途	编号	品种	起源	用途
1	阿波萨纳 Arbosana	西班牙	油用	11	白橄榄 Ulliri Bardhe	阿尔巴尼亚	油用/果用
2	坦彩 Soury	黎巴嫩	油用/果用	12	城固 CG-32	国内选育	油用
3	皮削利 Picholine Languedoc	法国	油用	13	阿斯 Ascolano Tenera	意大利	果用
4	小苹果 Manzanilla de Sevilla	西班牙	油用/果用	14	鄂植 8 号 EZ-8	国内选育	油用/果用
5	云杂 europaea×Olea cuspidata	国内选育	油用	15	豆果 Arbequina	西班牙	油用
6	配多灵 Pendolino	意大利	油用	16	米扎 Mixaj	阿尔巴尼亚	油用
7	科拉蒂 Coratina	意大利	油用	17	莱星 Leccino	意大利	油用
8	柯基 Koroneiki	希腊	油用	18	卡林 Kaliniot	阿尔巴尼亚	油用/果用
9	贝拉 Berat	阿尔巴尼亚	果用	19	皮瓜尔 Picual	西班牙	油用
10	佛奥 Frantoio	意大利	油用				

1.2 油橄榄表型性状的测定

每个品种从树冠南侧齐肩高处，选取树龄 5 年，一年生枝条 8–10 根，在枝条中部共取 40 片正常叶，参照国际植物新品种保护联盟（UPOV）的《植物新品种 DUS 测试指南 油橄榄》TG/99/3 1985–11–13 的相关标准测定叶片长度、叶片宽度、叶形指数、叶片厚度、叶周长共 5 个性状指标，其中叶形状由叶形指数叶片长度（ L ）/叶片宽度（ W ）来确定： $L/W < 4$ 为椭圆形； $L/W = 4–6$ 为椭圆披针形； $L/W > 6$ 为披针形。在果实成熟期，每株从同一部位最具代表性的结果枝的中部，选取发育正常并完成转色的果共计 40 粒，测定果横径、果纵径、单果重、果形状、果肉率、果形指数共 6 个性状指标，其中果形状由果形指数果实长度（ L ）/果实宽度（ W ）来确定： $L/W < 1.25$ 为球形； $L/W = 1.25–1.45$ 为卵形； $L/W > 1.45$ 为细长形。

剥去果肉后，将果核洗净、晾干，测定果核横径、核纵径、单核重、核形指数、核形状共 5 个表型性状指标，其中核形状由核形指数核纵径（ L ）/核横径（ W ）来确定： $L/W < 1.4$ 为球形； $L/W = 1.4–1.8$ 为卵圆形； $L/W = 1.8–2.2$ 为椭圆形； $L/W > 2.2$ 为细长形。

1.3 SSR 标记

2017 年春季采集一年生枝条顶端幼嫩叶片，用植物基因组提取试剂盒（Tsingke 生产，货号 TSP101-200）提取基因组 DNA。从已发表的 SSR 引物中筛选出能在 19 个样品中稳定扩增、多态性好的 20 对 SSR 引物（UDO99-001、UDO99-004、UDO99-012、UDO99-014、UDO99-015、GAPU59、DCA04、DCA09、DCA11、DCA16、DCA18、EMO02、EMO30、EMO90、GAPU59、GAPU71B、GAPU89、GAPU101、UDO24、UDO36）用于遗传

分析^[15-16]。反应体系 15 μ L, 扩增程序 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 预变性 30s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增结束后, 吸取 2 μ LPCR 产物, 加入 6 μ L 1 \times loading buffer (Tsingke 生产, 货号 TSJ010) 混匀, 0.8% 琼脂糖凝胶 (电压: 5V/cm, EB 染色) 电泳 10-15min 分离, 电泳液缓冲液 0.5 \times TBE。电泳结束后, 凝胶成像仪紫外成像留影。

1.4 数据统计与遗传分析

位点信息汇总在一个 Excel 表中, 按照 CON-VERT 131 软件要求格式整理, 转换格式。用 PopGene 32 软件计算各标记的主要等位基因频率、观察等位基因数 (na^*)、有效等位基因数 (ne^*)、

Shannon's 多样性指数、期望杂合度 (Nei^{**}) 和观望杂合度。利用 Population 软件计算遗传距离因子, 用邻接法 (NJ) 绘制进化树。

2 结果与分析

2.1 19 个油橄榄品种表型性状评价

不同油橄榄品种的表型数量性状变异丰富, 其变异系数为 7.6% - 51.85%, 所测的 19 个油橄榄品种中, 果实 2 个球形, 7 个卵形, 10 个细长, 大多品种皮孔较少; 叶 2 个披针形, 1 个椭圆形, 其余 16 个均为椭圆披针形, 19 个品种油橄榄叶片有一个向上, 18 个叶片纵向平展。

表 2 油橄榄 14 个表型数量性状统计分析

Tab. 2 Variance analysis of 14 quantitative characters of *Olea europaea*

性状指标	果横径 /mm	果纵径 /mm	果形指数	单果质量/g	核横径 /mm	核纵径 /mm	核形指数	单核质量/g	果肉率 /%	叶长 /cm	叶宽 /cm	叶形指数	叶厚 /mm	叶周长 /cm
阿波萨纳	11.60	14.91	1.29	1.25	6.79	11.55	1.71	0.34	74.88	56.20	8.78	6.43	0.31	10.38
坦彩	16.84	19.82	1.93	3.45	7.36	13.11	1.78	0.42	87.86	44.74	13.91	3.22	0.28	9.38
皮削利	17.03	23.32	1.37	4.07	8.79	17.10	1.95	0.86	78.73	50.36	12.32	4.24	0.27	10.01
小苹果	20.45	25.78	1.27	6.26	8.75	16.37	1.88	0.78	87.51	47.51	10.78	4.41	0.33	9.43
云杂	10.84	15.45	1.43	1.18	6.98	13.37	1.92	0.43	66.67	62.49	13.70	4.56	0.29	12.74
配多灵	14.37	22.11	1.54	2.80	7.85	18.57	2.37	0.59	78.68	46.52	7.81	6.00	0.27	9.09
科拉蒂	16.31	23.54	1.44	3.85	8.96	18.49	2.07	1.01	73.74	49.54	8.95	5.56	0.35	10.50
柯基	9.10	14.50	1.60	0.63	5.09	10.73	2.11	0.18	70.84	49.19	8.80	5.71	0.30	9.04
贝拉	12.94	20.33	1.57	2.04	7.55	16.78	2.23	0.57	71.94	65.10	11.46	5.69	0.30	12.79
佛奥	14.14	21.69	1.54	2.86	7.95	16.49	2.07	0.69	75.96	57.29	10.66	5.44	0.31	11.52
白橄榄	15.32	26.98	1.77	3.47	6.99	21.18	3.03	0.67	80.40	6.60	1.21	5.56	0.24	17.09
城固	15.88	21.40	1.35	3.04	8.33	16.13	1.95	0.71	76.73	66.26	15.56	4.31	0.28	13.64
阿斯	17.11	26.29	1.54	4.32	8.49	20.08	2.37	0.92	78.64	66.35	14.14	4.74	0.31	13.57
鄂植 8 号	17.99	27.03	1.50	5.00	8.99	20.93	2.33	1.11	77.73	45.48	11.18	4.08	0.31	9.20
豆果	11.31	13.55	1.20	1.10	6.52	10.66	1.63	0.31	71.03	52.24	11.76	4.50	0.28	10.51
米扎	9.66	17.09	1.77	1.00	5.62	14.95	2.66	0.33	67.43	52.09	11.11	4.73	0.3	10.62
莱星	14.68	20.73	1.41	2.80	7.90	16.48	2.09	0.69	75.21	52.20	12.74	4.10	0.29	10.48
卡林	17.68	25.34	1.44	4.57	8.37	18.94	2.27	0.78	82.64	46.54	9.30	5.04	0.32	9.07
皮瓜尔	14.23	19.70	1.40	2.36	8.14	15.22	1.87	0.63	72.99	60.06	10.65	5.74	0.32	11.04
平均值	14.60	21.03	1.49	2.95	7.65	16.16	2.12	0.63	76.30	51.41	10.78	4.95	0.30	11.06
最大值	20.45	27.03	1.93	6.26	8.99	21.18	3.03	1.11	87.86	66.35	15.56	6.43	0.35	17.09
最小值	9.10	13.55	1.20	0.63	5.00	10.66	1.63	0.18	66.67	6.60	1.21	3.22	0.24	9.04
极差	11.35	13.48	0.73	5.63	3.99	10.52	1.40	0.93	21.19	59.75	14.35	3.21	0.11	8.05
变异系数/%	21.00	20.67	12.29	51.85	14.38	19.79	16.00	39.78	7.60	25.31	28.86	16.60	8.42	18.94

基于 14 个表型数量性状计算品种间的 Eudidean 距离, 对 19 个油橄榄品种的 NJ 聚类分析结果 (图 1) 表明, 19 个油橄榄品种聚为 2 个组, 其中第 1 大组又包括 3 个小组, 第 1 大组的第 1 小组包

括佛奥、皮瓜尔、贝拉、城固、阿斯; 第 2 小组包括柯基、豆果、米扎、阿波萨纳、云杂; 第 3 小组包括皮削利、莱星、科拉蒂、鄂植 8 号、卡林、配多灵、坦彩、小苹果; 第 2 大组为白橄榄。

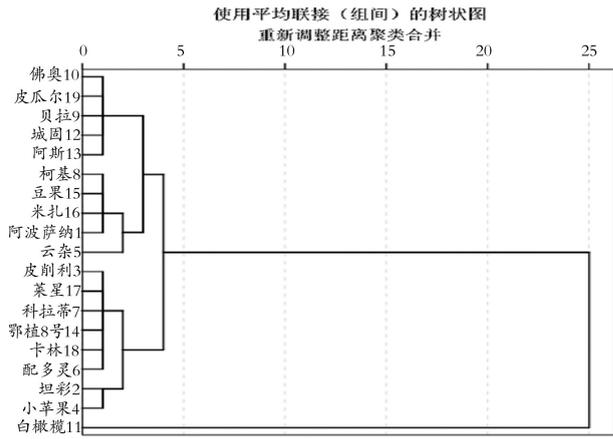


图 1 油橄榄数量性状分析聚类图

Fig. 1 Cluster analysis of quantitative characters of *Olea europaea*

2.2 基于油橄榄 SSR 标记的多样性及聚类分析

20 个 SSR 位点在 19 个品种中的检测结果 (表 3), 共检测到 124 个等位基因变异, 平均每个等位基因数为 6.2 个。其中 DCA09、UDO24 位点产生 10 个等位基因变异, UDO99-001、UDO99-004 产生 3 个等位基因变异, 最大等位基因频率为 0.631 6, 多态信息量平均为 0.646 4, Shannon's 指数 H' 平均为 0.693 3, Shannon's 指数 H' 范围在 0.513 9-0.831 8 之间, 表现出丰富的遗传多样性。

根据 SSR 标记计算品种间的 Jaccard 系数, 对

19 个油橄榄品种的 NJ 聚类分析结果 (图 2) 表明, 19 个油橄榄品种被分成 3 组, 第 1 组包括阿波萨纳、豆果、卡林; 第 2 组包含坦彩、城固、贝拉等 15 个油橄榄品种; 第 3 组为米扎。

表 3 20 对 SSR 引物的多态性分析

Tab. 3 20 polymorphism analysis of SSR primers

引物	目的片断大小	等位基因数	最大等位基因频率	多态信息量 (PIC)	Shannon's 指数 H'
DCA04	128-163	5	0.526 3	0.553 4	0.615 0
DCA09	161-205	10	0.210 5	0.846 3	0.861 5
DCA11	125-161	8	0.416 7	0.656 0	0.702 2
DCA16	121-153	7	0.315 8	0.710 7	0.752 1
DCA18	166-178	8	0.289 5	0.812 7	0.832 4
EMO02	202-222	7	0.441 2	0.702 1	0.733 6
EMO30	183-233	9	0.361 1	0.763 6	0.788 6
EMO90	0-190	5	0.558 8	0.533 2	0.593 4
GAPU59	208-216	5	0.236 8	0.627 6	0.670 4
GAPU71B	116-160	7	0.194 4	0.810 1	0.831 8
GAPU89	159-193	6	0.526 3	0.634 7	0.667 6
GAPU101	201-217	6	0.333 3	0.735 1	0.770 1
GAPU103	59-81	7	0.447 4	0.695 0	0.727 1
UDO99-015	100-108	4	0.394 7	0.617 6	0.680 1
UDO24	0-203	10	0.138 9	0.693 5	0.713 0
UDO36	140-146	6	0.447 4	0.643 1	0.691 1
UDO99-001	0-140	3	0.558 8	0.410 6	0.517 3
UDO99-004	141-145	3	0.552 6	0.407 7	0.516 6
UDO99-012	0-163	4	0.416 7	0.631 4	0.688 3
UDO99-014	95-101	4	0.631 6	0.443 6	0.513 9

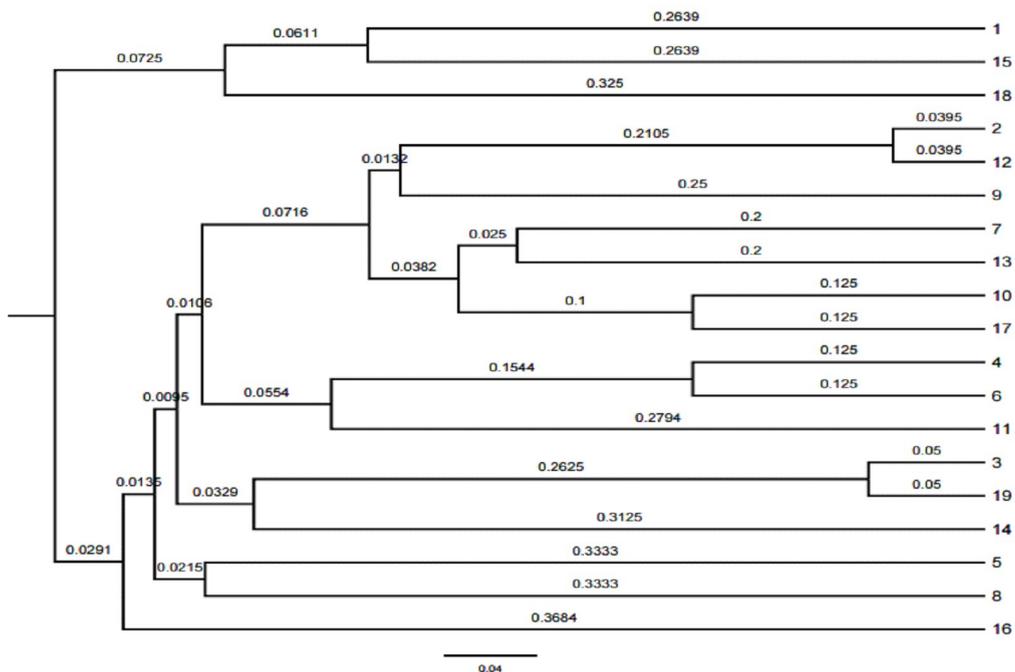


图 2 SSR 标记油橄榄聚类分析的无根 NJ 树状图

Fig. 2 NJ rooted dendrogram of cluster analysis of *Olea europaea* SSR

3 结论与讨论

本研究对云南丽江引种的 19 个油橄榄品种 14 个表型性状和 20 个 SSR 标记的多样性分析表明, 19 个油橄榄品种具有较丰富的表型及遗传多样性, 在本研究中选用的 20 对引物可完全把 19 个油橄榄品种区分开。表型性状相似的品种需结合 SSR 标记进一步结合鉴定。

19 个油橄榄品种叶片表型数量性状(除叶型指数和叶厚)在品种内具有较大的差异, 这说明叶片表型性状是不稳定的。本文并未对表型数量性状进行多年分析比较, 但叶片的大小和形态会随着树龄而变化, 果实和果核的大小在“大小年”也存在很大的差异, 所以表型数量性状仅能作为品种鉴定的参考。此外, 数量性状与丰产性、抗性和“童期”长短相关, 可以作为实生选优早期鉴定的依据。

19 个油橄榄品种表型性状和 SSR 分子标记具有较丰富的遗传多样性, 其表型性状变异系数具有一定的差异性, 表型性状相似的品种, 其不一定具有亲缘关系, 所以表型性状在聚类分析上应结合 SSR 标记进行油橄榄品种的鉴定。

参考文献:

- [1] 徐纬英. 中国油橄榄种质资源与利用[M]. 长春: 长春出版社, 2001.
- [2] 邓明全, 俞宁. 油橄榄引种栽培技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [3] 贺善安, 顾嫻. 油橄榄驯化引种[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1984.
- [4] 吴开志, 肖千文, 贾瑞芬, 等. 油橄榄品种表型性状的多样性[J]. 经济林研究, 2008, 26(2): 48-52.

[5] Bartolini G, Prevost G, Messeri C, et al. Olive germplasm. Cultivars and World-Wide collections[M]. Rome: FAO, 1998.

[6] Barranco D, Cimato A, Fiorino P, et al. World catalogue of olive varieties[M]. Madrid: International Olive Council, 2000.

[7] Owen C A, Bita E C, Banilas G, et al. AFLP revealed structural detail of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110(7): 1169-1177.

[8] Montemurro C, Simeone R, Pasqualone A, et al. Genetic relationships and cultivar identification among 112 Olive accessions using AFLP and SSR markers[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2005, 80(1): 105-112.

[9] Bernard R, Manzo M, Durante M, et al. Molecular markers for cultivar characterization in *Olea europaea*[J]. Acta Horticulturae, 2002, 586: 97-105.

[10] 姜成英, 戚登巨, 苏瑾. 甘肃省油橄榄生产现状与发展对策[J]. 经济林研究, 2006, 24(2): 78-81.

[11] 邱源, 韩华柏, 李俊强. 23 个油橄榄品种的 RAPD 分析[J]. 林业科学, 2008, 44(1): 85-89.

[12] 马万里, Collins G. 运用 RAPD 技术鉴定澳大利亚油橄榄品种的研究[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2006, 35(3): 337-339, 343.

[13] 李瑞, 陈少瑜, 宁德鲁, 等. 油橄榄 ISSR-PCR 反应体系优化与引物筛选[J]. 安徽农业科学, 2012(10): 5797.

[14] 陈海云, 陈少瑜, 宁德鲁, 等. 59 个油橄榄种质的 ISSR 分子鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(3): 13.

[15] Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, et al. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(2-3): 301-307.

[16] Trujillo I, Ojeda M A, Urdiroz N M, et al. Identification of the worldwide olive germplasm bank of Cordoba (Spain) using SSR and morphological markers[J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10(1): 141-155.

(编辑: 李甜江)