

邵雪花,刘传滨,匡石滋,等. 橄榄种质资源遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 江苏农业科学,2023,51(5):94-102.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.05.012

橄榄种质资源遗传多样性分析及指纹图谱构建

邵雪花¹, 刘传滨², 匡石滋¹, 赖 多¹, 刘传和¹, 贺 涵¹, 肖维强¹

(1. 广东省农业科学院果树研究所/农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室/
广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广东广州 510640; 2. 潮州市果树研究所, 广东潮州 521000)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术,对 101 份橄榄种质资源进行遗传多样性分析,并绘制指纹图谱。从 96 条 ISSR 引物中筛选出 10 条引物,对广东省农业科学院果树研究所橄榄资源圃和潮州市果树所资源圃内 101 份资源进行分子标记,使用 UPGMA 聚类分析橄榄种质资源遗传多样性,从 10 对引物中挑选扩增条带清晰、多态性好的核心引物进行遗传多样性分析,并构建橄榄 DNA 指纹图谱。分析结果显示,10 条 ISSR 引物对 101 份橄榄样品进行扩增,共得到 136 条条带,其中多态性条带 135 条,多态率为 99.26%,平均每条引物扩增得到条带 13.60 条,平均每条引物扩增得到多态性条带 13.50 条,表明供试材料间遗传多样性较高。通过 UPGMA 聚类分析可知,101 份橄榄种质资源样品间的遗传相似性系数为 0.58~0.97,表明品种间亲缘关系较近。在遗传相似性系数为 0.68 时,可将 101 份橄榄种质资源分为 5 组,第 1 组包含种质 48 份,第 2 组包含种质 45 份,第 3 组包含种质 5 份,第 4 组包含种质 2 份,编号 C74 的大纳甜橄榄单独为第 5 组,说明该品种与其他样品相比发生了明显的遗传变异。利用筛选得来的 6 条核心引物组合成功构建了橄榄 DNA 指纹图谱,为供试的 101 份橄榄品种编写了一套唯一的指纹图谱编码。研究结果成功构建了 101 份橄榄种质的指纹图谱,为橄榄种质资源的挖掘、利用和创制新品种等提供理论依据。

关键词:橄榄;ISSR 分子标记;指纹图谱;种质资源;遗传多样性

中图分类号:S667.502.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)05-0094-09

橄榄(*Canarium album*),橄榄科橄榄属乔木,别称黄榄、青果、橄榄子等,原产于我国南方,主要分布在我国福建省、广东省、四川省、广西壮族自治区、重庆市和浙江省等南部省份(市)和地区,尤以广东省和福建省栽培最多^[1]。橄榄是传统的药食同源水果,其味甘酸,性平,有清热解毒、利咽化痰、除烦醒酒的功效^[2],其果实富含丰富的多酚类物质^[3-4]、黄酮类化合物^[5],可加工制成果酒、果汁、茶叶等^[6-8],还能用于抗病毒^[9]、抗氧化^[10-11]、保护肝脏^[12]、提高免疫和调节血脂血糖^[13]等方面。

目前,橄榄的新品种选育快速发展,由于不同地区的橄榄品种相互引种、杂交,导致了各个地区

橄榄品种遗传背景复杂,但目前品种鉴定工作大多依靠形态特征鉴别^[14-16],橄榄遗传背景不明确、缺乏科学系统的检测方法和权威的分类系统^[17],致使同名异物或同物异名的现象时常发生。ISSR 是一种研究物种遗传多样性的常见方法,结合了 RAPD 和 SSR 2 种技术的优点,具有不受环境影响、结合位点丰富和灵敏度准确性高等特点,在品种鉴定方面,DNA 分子标记技术比传统技术更加方便、快捷^[17-18]。

李婷利用 ISSR 分子标记技术对福建莆田 24 份不同品种的枇杷叶进行鉴定与分析,使用 14 条核心引物对其进行扩增,共扩增出 150 条条带,其中有 79 条多态性条带,多态率为 52.67%^[19]。崔学强等利用 ISSR 技术对 22 种石斛兰的亲缘关系及遗传多样性进行了分析,共扩增出 241 条条带,其中有 241 条多态性条带,多态性条带比例为 100%,遗传相似系数为 0.70~0.88^[20]。杨培奎等采用 ISSR 技术对粤东和潮汕地区的 64 个橄榄品种进行鉴定,结果表明,粤东地区与潮汕地区的橄榄遗传多样性水平较低,且来源地与品种名关系不大^[21]。赖瑞联等通过 ISSR 和 RAPD 联用技术对福建地区的 86 份橄榄资源进行了遗传多样性分析,发现橄榄种质资源具有

收稿日期:2022-04-19

基金项目:广东省科技厅驻镇帮镇扶村农村科技特别员项目(编号:KTP20210112);广东省农业科学院汕尾分院科技合作专项(编号:2020 汕尾分院专项-02);广东省优稀水果现代农业产业技术体系创新团队项目(编号:2019KJ116);广东省潮州市重大科技专项(编号:20210106)。

作者简介:邵雪花(1983—),女,宁夏石嘴山人,博士,助理研究员,主要从事果树栽培与新品种育种研究。E-mail: sxh19831017@163.com。

通信作者:肖维强,硕士,副研究员,主要从事果树栽培与新品种育种研究。E-mail: xwq6817@126.com。

丰富的遗传多样性,且这种遗传多样性存在明显的地域性差异^[22]。陈海云等对云南的 59 份油橄榄进行了 ISSR 鉴定分析,发现云南地区的橄榄资源同样具有较高的遗传多态性^[23]。在种质资源科学研究中,品种鉴定的原则是选用较少的引物区分较多的品种。

以上研究结果充分说明:(1)ISSR 技术可有效鉴别出橄榄种质资源的遗传多样性;(2)橄榄种质资源的遗传多样性大多具有明显的地区差异。广东省农业科学院果树研究所橄榄资源圃从 2010 年开始大量收集国内外橄榄种质资源,包括濒临淘汰的地方品种及国内外的主栽品种,目前已有资源 60 余份,而潮州市果树研究所橄榄资源圃主要集中了广东省内的橄榄资源,为阐明这 2 个资源圃内橄榄资源的同名异物或同物异名现象与品种间的遗传分化和变异情况,本研究拟通过 ISSR 技术对广东省农业科学院果树研究所橄榄资源圃和潮州市果树研究所橄榄资源圃中的 101 个橄榄品种进行遗传多样性分析,以期通过改善 ISSR 扩增条件筛选出核心引物,开发一种能够运用在大规模样本筛查且具备较高多态率的橄榄品种鉴定方法,并构建分子指纹图谱,为 ISSR 分子标记在橄榄分类方面的应用提供借鉴,以期对橄榄资源的品种鉴定和种质创制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验方案

试验在广东省农业科学院果树研究所果树资源与环境实验室进行,于 2021 年 9 月在广东省农业科学院果树研究所和潮州市果树研究所橄榄资源圃进行供试 101 份橄榄样品的采集(种质资源品种信息见表 1)。将采摘后的新鲜橄榄嫩叶迅速置于干冰中保存,置于 -20 ℃ 冰箱备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 使用北京聚合美生物科技公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 101 份橄榄样品的 DNA^[24](2021 年 10 月)。将提取的 DNA 样品使用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,通过凝胶成像系统检测其 DNA 纯度,使用 Nano Drop 2000 分光光度计检测 DNA 浓度,合格 DNA 样品置于 -20 ℃ 冰箱内保存备用^[25]。

1.2.2 ISSR 分析 在加拿大哥伦比亚大学公布的通用引物序列中筛选出 10 条多态性好、条带清晰的

表 1 101 份橄榄种质资源信息

编号	名称	来源
C1	兰山香橼 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C2	东 01	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C3	马 02	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C4	青茵	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C5	锡 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C6	福建梅埔 2 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C7	呐种	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C8	福建灵峰	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C9	饶甜 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C10	白花三棱	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C11	丰玉 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C12	烈火	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C13	凤湖榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C14	长穗赤	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C15	香种	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C16	苏州	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C17	冬节圆 2 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C18	大甜	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C19	清远甜种	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C20	潮州青皮	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C21	福州榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C22	揭西香甜榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C23	潮州檀香	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C24	脆甜	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C25	意溪土种	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C26	乌皮酥肉	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C27	四季榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C28	丁香	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C29	饶脆	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C30	双湖香	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C31	高州麦坑 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C32	马 05	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C33	铁铺巨香	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C34	一点红	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C35	马 06	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C36	金桃	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C37	揭西鸿运榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C38	茶潯榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C39	旺坡 03	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C40	乌种	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C41	三片青	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C42	三棱	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C43	大红心	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C44	本地香	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C45	槿种	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C46	思贺香橼 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C47	大三棱	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C48	棱尖	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C49	留隍 02	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C50	留隍 01	广东省农业科学院果树研究所资源圃

表 1(续)

编号	名称	来源
C51	旺坡 01	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C52	旺坡 02	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C53	思贺香榄 2 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C54	乌榄	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C55	云旨 1 号	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C56	高州大坡 01	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C57	高州大坡 02	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C58	高州平山 01	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C59	高州平山 02	广东省农业科学院果树研究所资源圃
C60	广泰甜种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C61	赤种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C62	赤种仔	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C63	东 03	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C64	归湖香种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C65	四棱	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C66	凤喜赤	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C67	鸿运(青色)	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C68	冬节圆 1 号	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C69	广泰青皮	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C70	甜种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C71	橙皮	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C72	铁条	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C73	大纳	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C74	大纳甜	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C75	麒麟纳种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C76	鸡心	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C77	东酸	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C78	大池甜	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C79	大红心	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C80	黄都	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C81	西坑土种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C82	小丁香	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C83	棱尖	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C84	下院种	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C85	土甜	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C86	双罗	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C87	马 01	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C88	细粒	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C89	大普	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C90	鸣 2 号	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C91	马 02	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C92	老鼠牙	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C93	马 03	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C94	东联香	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C95	盐埕赤	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C96	揭西东	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C97	小黄仔	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C98	新果林 3 号	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C99	揭西甜	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C100	青岚	潮州市果树研究所橄榄资源圃
C101	杂赤	潮州市果树研究所橄榄资源圃

引物对 101 份橄榄种质资源的 DNA 样品进行扩增^[26](2021 年 12 月至 2022 年 2 月)。PCR 反应总体体系为 30 μL,其中包含 15 μL 2X Master Mix,1 μL 引物(10 μmol/L),2 μL DNA 模板,12 μL 去离子水。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 复性 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,共 40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,于 4 ℃ 保存^[27]。

使用 8 μL PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,置于凝胶成像系统中观察条带,拍照并记录^[25]。

1.3 数据分析

使用人工读带的方式统计扩增产物的条带数。将电泳图谱上同一水平有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,以此构建 0、1 数据矩阵^[27]。通过 NT-SYSpC 2.0 软件计算橄榄样品间的亲缘相似性系数,用以分析橄榄样品间亲缘性关系。使用 UPGMA 法制作聚类图,绘制出 101 份橄榄样品间的遗传关系图谱。利用 POPGENE 软件对 101 份橄榄进行遗传多样性分析,计算总扩增条带数、多态性条带数与多态率,根据以上数据构建橄榄种质的指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增多态性分析

使用从加拿大哥伦比亚大学设计的通用引物序列中筛选出的 10 条引物对 48 份橄榄样品进行扩增,部分扩增图谱见图 1-A、图 1-B。

由表 2 可见,10 对引物总共扩增出 136 条条带,其中有 135 条多态性条带,多态率为 99.26%。平均每条引物扩增条带数为 13.6 条,平均每条引物扩增得到多态性条带 13.5 条。在 10 条引物中,有 9 条引物的多态率为 100%,分别是 UBC808、UBC812、UBC835、UBC836、UBC880、UBC884、UBC886、UBC888 和 UBC889。多态性最差的引物为 UBC890,其多态率 91.67%。引物扩增结果显示,以上 10 条引物多态性丰富,其多态率均高于 80%,均可用于后续遗传多样性分析及指纹图谱构建工作。

2.2 聚类结果

UPGMA 聚类结果见图 2。结果显示:101 份供试橄榄种质资源样品间遗传相似系数为 0.58 ~ 0.97,平均遗传相似系数为 0.78,品种间有一定的遗传差异。101 份样品中,品种 C54 乌榄与 C55 云旨 1 号遗传距离最近,遗传系数为 0.97。品种 C56

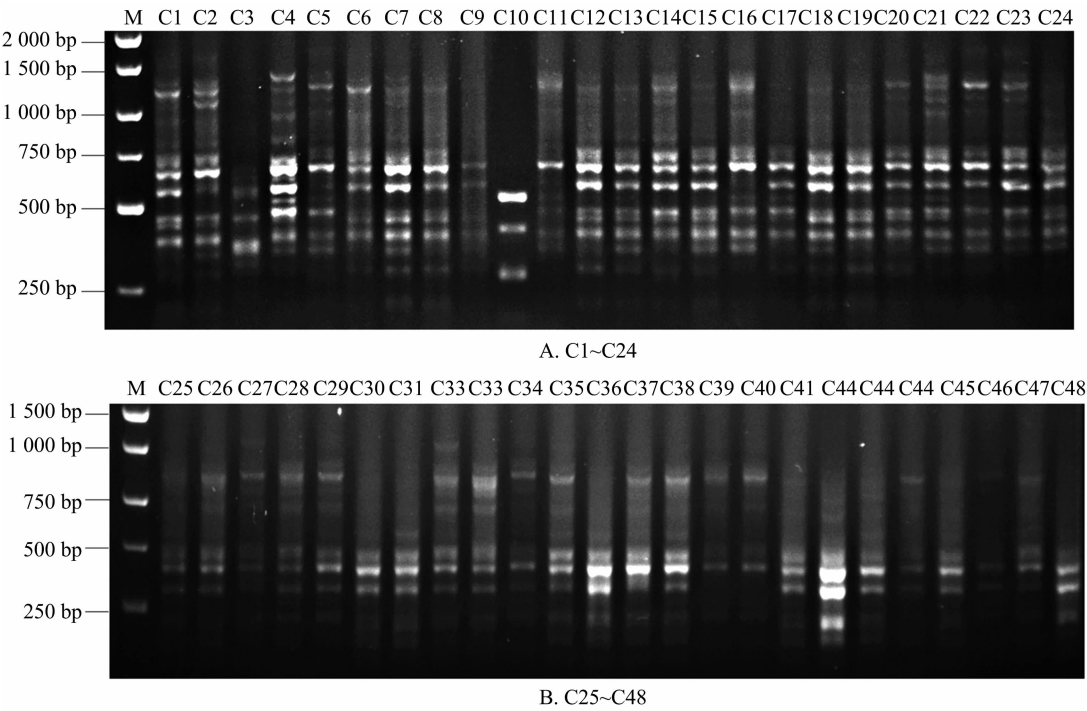


图1 引物 UBC-884 扩增结果

表 2 ISSR 核心引物对橄榄种质的扩增结果

引物编号	引物序列(5'→3')	扩增条带数	多态性条带数	多态率 (%)
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	17	17	100.00
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	10	10	100.00
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	13	13	100.00
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	13	13	100.00
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	12	12	100.00
UBC884	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	15	15	100.00
UBC886	VDVCTCTCTCTCTCTCT	11	11	100.00
UBC888	BDBCACACACACACACA	19	19	100.00
UBC889	DBDACACACACACACAC	14	14	100.00
UBC890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	12	11	91.67
总计		136	135	99.26

高州大坡 02 和 C77 东酸遗传距离最远,遗传系数为 0.58,说明这 2 个品种遗传分化程度高。

在遗传系数 0.68 处,可将 101 份种质资源分成 5 组。第 1 组包含种质 48 份,编号为 C1 ~ C48。第 2 组包含种质 45 份,编号为 C49 ~ C52、C54 ~ C55、C57 ~ C73、C75 ~ C96。第 3 组包含种质 5 份,编号为 C97 ~ C101。第 4 组包含种质 2 份,编号为 C53、C56。编号 C74 大纳甜样品单独为第 5 组,说明该样品与其他样品相比,发生了明显的遗传变异。

2.3 橄榄 DNA 指纹图谱构建

本研究从表 2 所列的 10 条引物中筛选出了 6

条条带清晰、多态性高、重复性好的引物用于橄榄 DNA 指纹图谱的编写,分别是 UBC808、UBC835、UBC880、UBC886、UBC888、UBC890。选择这 6 条引物中清晰、典型、多态性丰富的条带进行赋值,引物典型条带赋值信息见表 3。其中条带 UBC835 - 1 080 bp、UBC835 - 350 bp、UBC886 - 580 bp 与 UBC888 - 550 bp 为品种特征条带,利用 UBC835 - 350 bp 这一位点或同时通过 UBC835 - 1 080 bp、UBC886 - 580 bp 与 UBC888 - 550 bp 这 3 个位点,可以鉴别出品种 C74 大纳甜。

根据表3多态性条带赋值标准对101份橄榄供

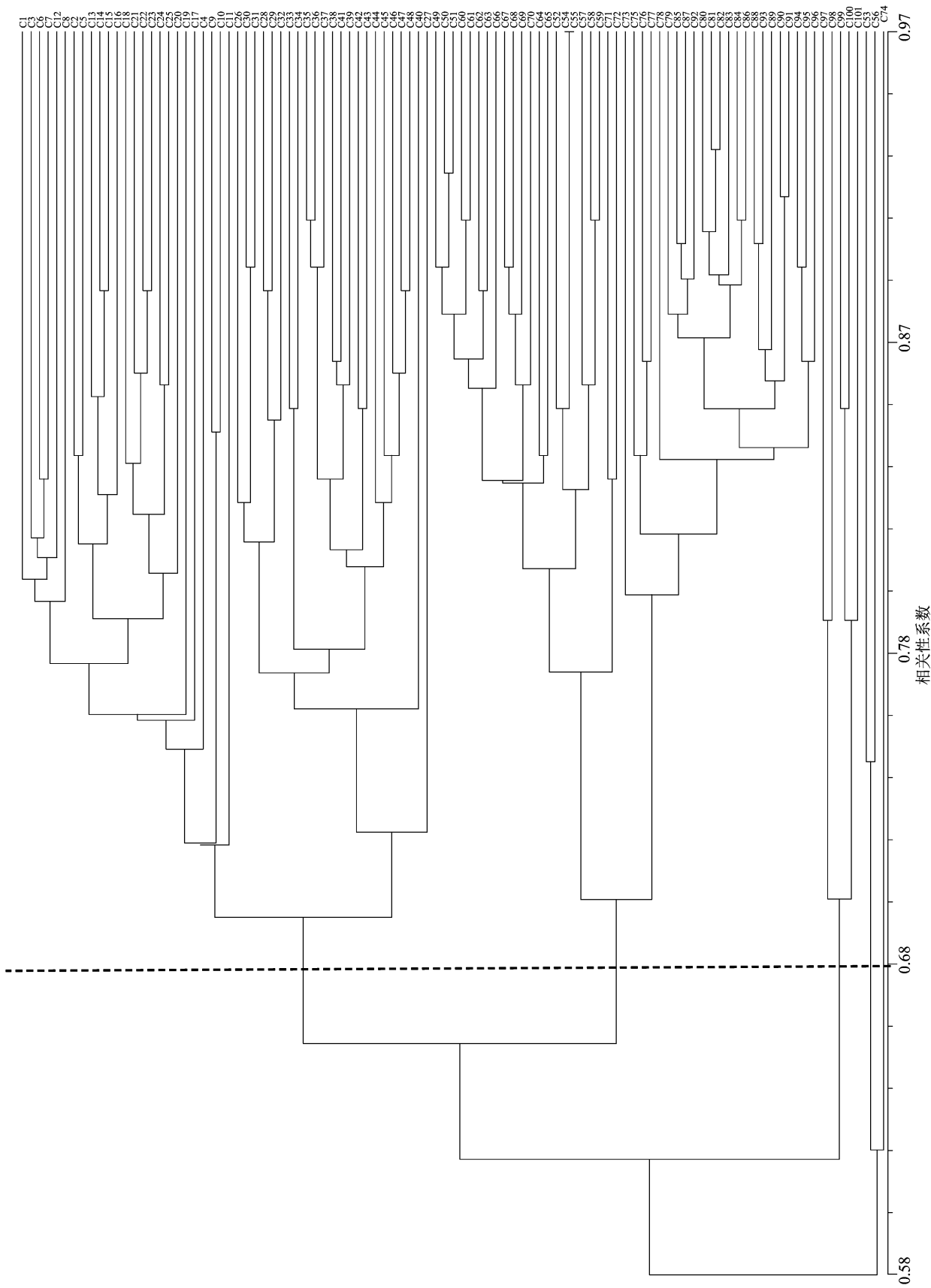


图2 基于 ISSR 遗传距离的橄榄 UPGMA 聚类

表 3 6 条 ISSR 引物扩增典型条带的赋值

项目	赋值				
	1	2	3	4	5
UBC808 扩增条带(bp)	1 250	1 100	750	—	—
UBC835 扩增条带(bp)	1 080 *	350 *	—	—	—
UBC880 扩增条带(bp)	750	680	625	—	—
UBC886 扩增条带(bp)	1 250	980	700	580 *	300
UBC888 扩增条带(bp)	550 *	450	375	—	—
UBC890 扩增条带(bp)	1 250	700	660	550	400

注：“*”代表品种特征条带。

试样品进行 DNA 指纹编码,结果见表 4。其中品种 C7 呐种的指纹编码为 23 - 1 - 2 - 345 - — - 15,表示该品种的 PCR 扩增产物在引物 UBC808 的 1 100、750 bp 处、引物 UBC835 的 1 080 bp 处、引物 UBC880 的 680 bp 处、引物 UBC886 的 700、580、300 bp 处,引物 UBC890 的 1 250、400 bp 处均有条带;在引物 UBC888 给予赋值的典型条带位点无条带。在品种 C14 长穗赤的指纹编码为 12 - 1 - 123 - 1345 - 2 - 123,表示该品种的 PCR 扩增产物在引物 UBC808 的 1 250、1 100 bp 处,在引物 UBC835 的 1 080 bp 处,在引物 UBC880 的 750、680、625 bp 处,在引物 UBC886 的 1 250、700、580、300 bp 处,引物 UBC888 的 450 bp 处,引物 UBC890 的 1 250、700、660 bp 处均有条带。

6 条引物中的每一条引物都不能单独用以鉴定 101 份种质,但将 6 条引物结合使用,便可以准确、高效地鉴定所有种质资源。图 3 - A、图 3 - B、图 3 - C、图 3 - D 为 101 份橄榄种质资源 DNA 指纹编码对应的标准指纹图谱。通过图 3 - A、图 3 - B、图 3 - C、图 3 - D 能够更加清晰、直观地看出 101 份橄榄种质资源的多态性扩增情况,且每个品种都拥有一套唯一的指纹编码。

3 讨论与结论

ISSR 是一种利用微卫星序列作为 PCR 引物来生成多位点标记的技术^[27]。目前,ISSR 技术不仅已经广泛应用于各种野生种与栽培品种的鉴定中^[28-29],还可应用在常规表型分类以及细胞学分类的鉴定上^[30]。近年来的研究表明,ISSR 技术可有效鉴别出橄榄种质资源的遗传多样性^[31],单独运用 ISSR 技术扩增的多态性近 90%^[23],ISSR 和 RAPD 技术相结合扩增的多态性达 95%^[32],多态性虽然较高,但引物的需求量大或需借助其他技术手段进

表 4 101 份橄榄种质资源指纹图谱编码

种质资源	指纹图谱编码
C1	12 - 1 - 3 - 1345 - — - 3
C2	12 - 1 - 3 - 34 - — - 123
C3	1 - 1 - 13 - 45 - 3 - 1345
C4	2 - 1 - — - 12345 - — - 1234
C5	12 - 1 - 23 - 1245 - — - 123
C6	2 - 1 - 2 - 45 - — - 14
C7	23 - 1 - 2 - 345 - — - 15
C8	— - 1 - 2 - 134 - 3 - 24
C9	2 - 1 - 12 - 1245 - — - —
C10	123 - 1 - 2 - 1245 - — - 34
C11	2 - 1 - 13 - 1234 - 3 - 134
C12	1 - 1 - — - 2345 - — - 1345
C13	— - 1 - 12 - 1245 - 3 - 13
C14	12 - 1 - 123 - 1345 - 2 - 123
C15	12 - 1 - 23 - 1345 - 2 - 35
C16	23 - 1 - 23 - 1245 - 3 - 135
C17	12 - 1 - 23 - 45 - 2 - 35
C18	12 - 1 - 2 - 1234 - 3 - 135
C19	2 - 1 - 3 - 1345 - 3 - 13
C20	1 - 2 - 2 - 12345 - — - 13
C21	123 - 1 - 2 - 1245 - — - 35
C22	13 - 1 - 2 - 124 - — - —
C23	1 - 1 - 2 - 134 - — - 135
C24	12 - 1 - 2 - 145 - — - 3
C25	2 - 1 - 2 - 124 - 3 - 3
C26	12 - 1 - 2 - 134 - 2 - 35
C27	— - 1 - 23 - 124 - — - 3
C28	12 - 1 - 12 - 134 - 23 - 235
C29	2 - 1 - 123 - 134 - — - 1235
C30	12 - 1 - 12 - 134 - 23 - 125
C31	123 - 1 - 12 - 14 - 23 - 123
C32	12 - 1 - 12 - 134 - 23 - —
C33	12 - 1 - 123 - 34 - — - 13
C34	123 - 1 - 123 - 124 - — - 13
C35	— - 1 - 123 - 1234 - — - 12345
C36	— - 1 - 12 - 134 - — - 35
C37	2 - 1 - 12 - 34 - — - 345
C38	13 - 1 - 1 - 34 - 23 - 125
C39	— - 1 - 1 - 124 - 23 - 1235
C40	3 - 1 - 1 - 124 - 23 - 1
C41	13 - 1 - 12 - 4 - 23 - 13
C42	2 - 1 - 1 - 14 - 23 - 2
C43	2 - 1 - 12 - 4 - 23 - 35
C44	12 - 1 - 1 - 124 - 13 - 12345
C45	12 - 1 - 1 - 24 - 23 - 1235

表 4(续)

种质资源	指纹图谱编码
C46	1-1-13-34- - -12345
C47	2-1-12-34-1-235
C48	2-1-1-134-3-35
C49	2-1-23-345- - -3
C50	23-1-23-245-3-3
C51	23-1-23-245-3-3
C52	12-12-23-45- - -2345
C53	23- - -13-4-2-234
C54	12-12-23-345-3-234
C55	12-12-23-123-3-234
C56	2-12-13-1-23- - -
C57	23-12-23-345- - -3
C58	2-12-23-345- - -3
C59	23-12-23-345- - -13
C60	23-1-23-2345-1-34
C61	2-1-23-2345-13-34
C62	23-1-23-45-3-34
C63	23-1-23-345-1-34
C64	123-1-23-345-1-34
C65	23-1-23-345-3-345
C66	23-1-23-45-3-34
C67	23-1-3-34-3-234
C68	23-1-23-45-3-234
C69	23-1-2-345- - -34
C70	123-1- - -345- - -34
C71	23-1-123-345-3-34
C72	23-1-3-345-3-34
C73	23-1-2-34-3- - -
C74	- -2-1- - -13- - -
C75	123-1-12-4-3-3
C76	23-1-3-345-2-3
C77	23-1-123-345- - -13
C78	23-1-13-35-3- - -
C79	23-1-12-45- - -3
C80	2-1-2-45-3-23
C81	23-1-12-45-23-3
C82	23-1-2-45-23-3
C83	23-1-12-345-23-3
C84	23-1-123-45-23-3
C85	123-1-123-45-2-3
C86	23-1-123-4-23-3
C87	23-1-123-345- - -3
C88	2-1-123-35-23-3
C89	23-1-23-345-23-3
C90	23-1-123-345-23-3

表 4(续)

种质资源	指纹图谱编码
C91	23-1-23-234-23-3
C92	123-1-123-34- - -3
C93	23-1-23-3-23-3
C94	123-1-13-3-23-3
C95	23-1-13-345-23-3
C96	2-1-23-235-23-3
C97	1- - -1-1345- - -3
C98	1-1- - -45- - - -
C99	123- - -2-1245- - -3
C100	3- - -2-12345- - - -
C101	3-1-2-145- - -3

注:“—”表示无条带。赋值对应的条带见表 3。

行联合分析,鉴定工作较复杂。在种质资源科学研究中,品种鉴定的原则是选用较少的引物区分较多的品种。本研究从 96 条 ISSR 多态性引物中筛选出 10 条核心引物用于 101 份橄榄种质亲缘关系、遗传多样性分析和 DNA 指纹图谱构建,10 条核心引物扩增的多态率为 99.26%,进一步分析发现,最少可利用 3 对(UBC808、UBC835 和 UBC886)多态性引物即可全部区分 101 份橄榄资源。

通过 UPGMA 聚类分析橄榄种质资源的遗传多样性发现,供试的橄榄种质资源具有较高的遗传多样性,且品种间存在较丰富的遗传变异,在遗传系数 0.68 处,可将 101 份种质资源分成 5 组。第 1 组包含种质 48 份,编号为 C1~C48。第 2 组包含种质 45 份,编号为 C49~C52、C54~C55、C57~C73、C75~C96。第 3 组包含种质 5 份,编号为 C97~C101。第 4 组包含种质 2 份,编号为 C53、C56。编号 C74 的大纳甜样品单独为第 5 组。说明供试的橄榄品种之间没有地域性差异,相同出处、相似命名的品种间亲缘关系并不一定最近,如思贺香榄 1 号和思贺香榄 2 号、高山大坡 01 和高山大坡 02,这一现象也与前人的研究结果相吻合^[17,21,33]。亲缘关系揭示,同一资源圃的橄榄样品遗传相似性较高,这可能是由于材料的来源地相对集中,品种存在交叉引种或不同嫁接组合导致;命名相似的品种并不一定聚为一类,这也许是在常年定向选育中,由于不同的实生母树通过嫁接繁衍,出现了某些果实形态特征相似,从而使用了相近的命名,如思贺香榄 1 号和思贺香榄 2 号。受橄榄品种资源限制和农业生产习惯、技术的影响,在品种选育上具有一定的盲

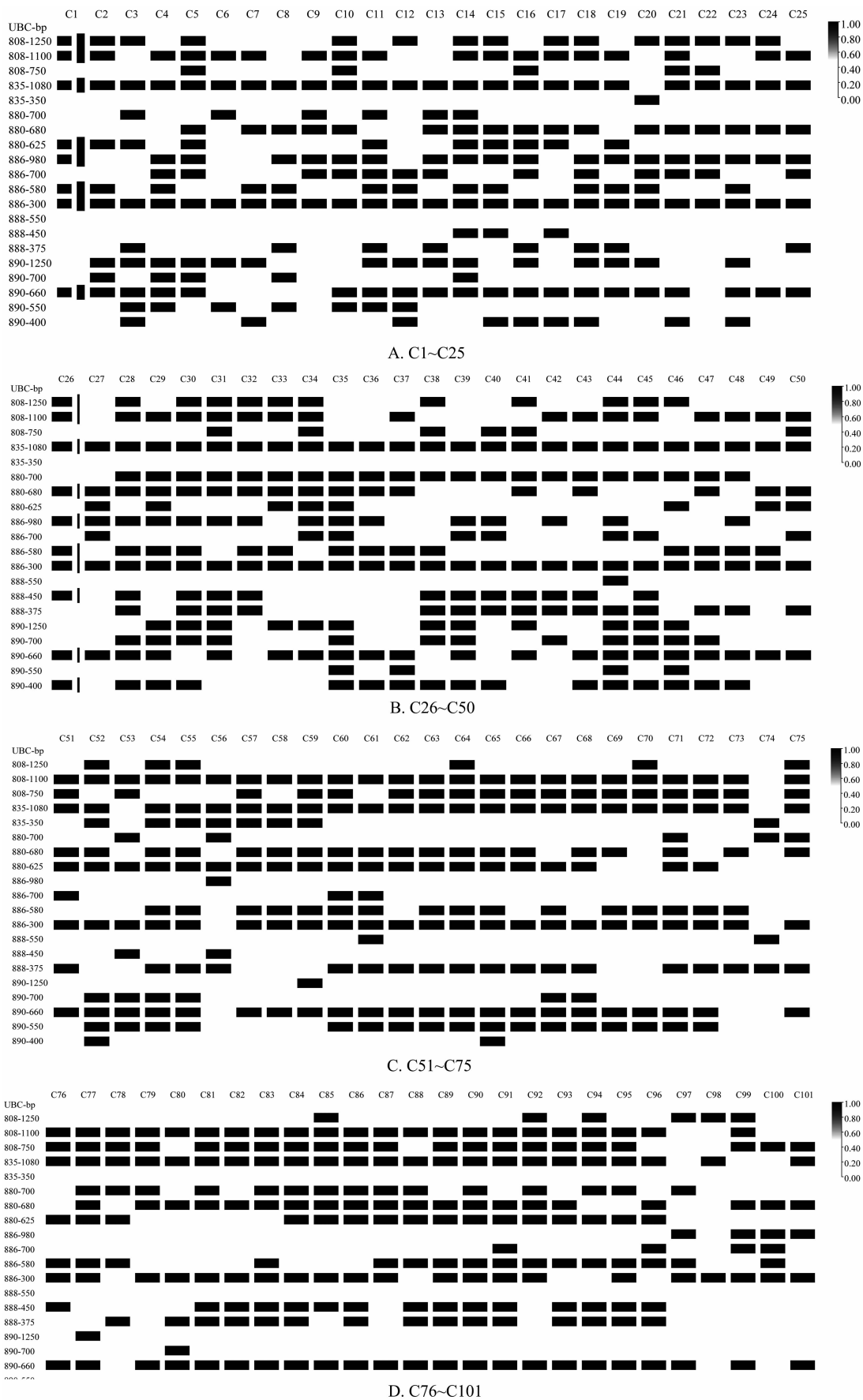


图3 橄榄种质资源指纹图谱

目性和随意性,因而出现了品种遗传背景混乱的现象。

本研究利用了 ISSR 分子标记技术对广东省农业科学院果树研究所和潮州市果树研究所的 101 份橄榄种质资源进行了品种鉴定与分析,通过分子标记技术建立了橄榄种质资源的指纹图谱,为品种资源编写了一套独一无二的“分子身份证”,可避免重复性的收集和保存,剔除同名异物和同物异名的橄榄种质资源,为橄榄的分子育种提供理论依据。

参考文献:

- [1]王成章,陈强,罗建军,等.中国油橄榄发展历程与产业展望[J].生物质化学工程,2013,47(2):41-46.
- [2]常强,苏明华,陈清西.橄榄化学成分与药理活性研究进展[J].热带作物学报,2013,34(8):1610-1616.
- [3]赖瑞联,陈瑾,冯新,等.橄榄多酚类物质研究进展[J].热带作物学报,2018,39(12):2532-2541.
- [4]程子良,祁惠芳,黄鹏飞,等.橄榄多酚的化学组成、药理作用及提取技术研究进展[J].中国油脂,2020,45(11):26-31,45.
- [5]吴如健,陈瑾,胡菡青,等.橄榄黄酮类化合物研究进展[J].福建农业学报,2015,30(1):106-110.
- [6]陈婕.橄榄浓缩汁加工技术的研究[D].福州:福建农林大学,2012.
- [7]吴兵,李正涛,姚昕.保健橄榄茶的加工与调配[J].现代食品科技,2008,24(4):349-351.
- [8]Zeng H L, Miao S, Zheng B D, et al. Molecular structural characteristics of polysaccharide fractions from *Canarium album* (Lour.) Raeusch and their antioxidant activities[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(11):2585-2596.
- [9]卫春会,郑自强,郭燕,等.橄榄果酒的研制及其风味物质分析[J].现代食品科技,2020,36(12):234-242,313.
- [10]Xiang Z B, Wu X L, Liu X Y. Chemical composition and antioxidant activity of petroleum ether extract of *Canarium album* [J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2017, 51(7):606-611.
- [11]Zhao B X, Hai Q M, Zhong T Q, et al. Ellagic acid from the dried fruits of *Canarium album* with antihepatitis B activity[J]. Asian Journal of Chemistry, 2011, 23(8):3759-3760.
- [12]侯丹,刘铜华.橄榄苦苷对糖尿病小鼠肝脏糖代谢的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(23):134-139.
- [13]Zhang N N, Guo W H, Hu H, et al. Effect of a polyphenol-rich *Canarium album* extract on the composition of the gut microbiota of mice fed a high-fat diet[J]. Molecules, 2018, 23(9):2188.
- [14]韦晓霞,赖瑞联,陈瑾,等.橄榄种质资源花序表型性状遗传多样性研究[J].热带亚热带植物学报,2019,27(1):1-10.
- [15]吴如健,万继锋,韦晓霞,等.橄榄种质资源果实表型性状多样性

- 分析及其数量分类研究[J].果树学报,2015,32(5):797-805.
- [16]杨培奎.粤东地区橄榄种质资源遗传多样性 ISSR 分析及核心种质初步构建[D].汕头:汕头大学,2010.
- [17]赖瑞联,陈瑾,韦晓霞,等.中国橄榄研究 40 年[J].热带作物学报,2020,41(10):2045-2054.
- [18]Mei Z L, Zhang X Q, Liu X Y, et al. Genetic analysis of *Canarium album* in different areas of China by improved RAPD and ISSR[J]. Comptes Rendus Biologies, 2017, 340(11/12):558-564.
- [19]李婷.枇杷叶的 ISSR 遗传差异分析及化学成分含量相关性研究[D].福州:福建中医药大学,2011.
- [20]崔学强,唐璇,黄昌艳,等.22 种石斛兰遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建[J].分子植物育种,2021,19(9):3005-3014.
- [21]杨培奎,郑道序,马瑞君,等.潮汕橄榄地方品种(系)遗传多样性的 ISSR 分析[J].广东农业科学,2013,40(23):129-132.
- [22]赖瑞联,陈瑾,冯新,等.橄榄 ISSR 和 RAPD 遗传多样性分析和核心种质构建[J].热带亚热带植物学报,2022,30(1):41-53.
- [23]陈海宁,宁德鲁,李勇杰,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):13-17.
- [24]魏杰,姚瑞红,金梦然,等.31 份樱属材料亲缘关系的 ISSR 分析[J].河北农业大学学报,2021,44(5):57-63.
- [25]邵雪花,刘牛,赖多,等.28 份余甘子品种遗传多样性的 ISSR 分析及指纹图谱构建[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(8):129-136.
- [26]邓吉良,孙言博,吴跃,等.基于 SSR 分子标记分析海南地区甘薯种质材料的亲缘关系[J].南方农业学报,2018,49(10):1924-1932.
- [27]赵雅姣,田新会,杜文华.饲草型小黑麦遗传多样性的 ISSR 分析[J].草地学报,2017,25(3):574-581.
- [28]曾昭清,高慧新,朱华,等.基于 ISSR 的野生和栽培的褐苞薯蓣遗传多样性分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(10):3781-3787.
- [29]张彬彬,王震,刘保卫,等.30 个野生灵芝菌株遗传多样性及农艺性状评价[J].江苏农业科学,2022,50(2):108-114.
- [30]Shahi - Gharahlar A, Zamani Z, Fatahi R, et al. Estimation of genetic diversity in some Iranian wild *Prunus subgenus Cerasus* accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4/5/6):826-833.
- [31]刘畅,付开赞,吐尔逊·阿合买提,等.不同地理种群马铃薯甲虫 SSR、RAPD 遗传多样性分析[J].新疆农业科学,2016,53(9):1608-1617.
- [32]刘林娅,党选民,曹振木,等.黄灯笼辣椒种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J].热带作物学报,2013,34(2):211-217.
- [33]郭春芳,唐玉海,孙云,等.茶树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].热带作物学报,2008,29(2):181-186.