

# 小果油茶农家品种间遗传差异及亲缘关系分析

谢一青<sup>1,2</sup>, 姚小华<sup>1\*</sup>, 李志真<sup>2</sup>, 黄勇<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400;  
2. 福建省林业科学研究院, 国家林业局南方山地用材林培育重点实验室, 福建 福州 350012)

**摘要:**从表型性状和分子水平上研究了小果油茶农家品种间的遗传差异及亲缘关系。结果表明:小果油茶农家品种在果实、叶和花性状上的变异极为丰富,每500 g鲜果数的变异系数最大(76.91%),不饱和脂肪酸含量变异系数最小(3.31%);果实性状的变异程度高于叶和花性状;果纵径和果横径与叶长、叶周长和花冠直径呈显著或极显著正相关;农家品种宜春白皮中籽表型性状的总变异程度高于龙眼花、羊屎茶和珍珠茶。利用25对AFLP引物组合在4个小果油茶农家品种和普通油茶中共扩增出921条带,其中多态性条带706条,多态性条带比率达75.7%;羊屎茶与宜春白皮中籽的遗传相似系数最大(0.6982),龙眼花与普通油茶的相似系数最小(0.5581)。AFLP标记和表型性状的聚类都可将小果油茶农家品种和普通油茶分开,但对小果油茶农家品种间的归类并未完全一致。

**关键词:**小果油茶;农家品种;遗传差异;表型性状;AFLP

中图分类号:S718.46 文献标识码:A

## Analysis of Genetic Difference and Relationship of *Camellia meiocarpa* Native Varieties by Morphology and AFLP Markers

XIE Yi-qing<sup>1,2</sup>, YAO Xiao-hua<sup>1</sup>, LI Zhi-zhen<sup>2</sup>, HUANG Yong<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. Fujian Academy of Forestry Sciences, Key Laboratory of Timber Forest Breeding and Cultivation for Mountainous Areas in Southern China, State Forestry Administration, Fuzhou 350012, Fujian, China)

**Abstract:** The genetic difference of four native *Camellia meiocarpa* varieties were studied based on their morphological characters and AFLP markers. The results showed that a relatively high level of genetic variation of fruit, leaf and flower traits was detected in the four varieties, and the variation coefficient (CV) of fresh fruit number per 500 g was the largest (76.91%), but that of unsaturated fatty acid was the smallest (3.31%). The fruit characters had higher variation than that of leaf and flower traits. The fruit size (fruit longitudinal diameter × fruit transverse diameter) had significantly or extremely significantly positive correlation with the leaf length, leaf circumference and corolla diameter. And the local variety Yichunbaipi had higher variation than that of the other three varieties. 25 pairs of AFLP primers were selected to amplify the genomic DNAs of the four *C. meiocarpa* varieties and *C. oleifera*. A total of 921 AFLP bands were obtained, in which 706 bands were polymorphic makers, and the percentage of polymorphism was 75.7%. The genetic similarity coefficient between the varieties Yangshi and Yichunbaipi was the largest (0.6982), while that of the variety Longyan and *C. oleifera* was the smallest (0.5581). Cluster analysis by unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) showed that *C. meiocarpa* and *C. oleifera* could be well distinguished both by AFLP or morphological markers, but the cluster results based on AFLP makers for the four *C. meiocarpa* varieties were not fully consistent with that based on their morphological characters.

收稿日期:2013-03-05

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目课题(2009BADB1B01);福建省林木种苗科技攻关项目(闽林科[2013]1号)

作者简介:谢一青(1975—),女,福建仙游人,博士研究生,主要从事林木遗传育种研究。

\* 通讯作者:姚小华(1962—),男,研究员,博士生导师,主要从事经济林培育与利用研究. E-mail:yaoxh168@163.com

**Key words:** *Camellia meiocarpa*; native varieties; genetic difference; morphological characters; AFLP

小果油茶 (*Camellia meiocarpa* Hu.), 又名寒露油茶、小叶油茶, 是我国山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia* L.) 中栽培面积和年产量仅次于普通油茶 (*C. oleifera* Abel.) 的木本油料植物, 栽培历史悠久, 主要分布于我国淮河、长江以南的福建、江西、湖南、广西、广东、贵州等地<sup>[1]</sup>。与普通油茶相比, 小果油茶果实相对较小, 但具有果皮薄、出籽率高、含油率高、群体产量稳定、抗逆性强等优点<sup>[1-2]</sup>。小果油茶籽油品质好, 色清味香, 营养丰富, 在民间或少数民族地区有被用作食药两用油的历史, 其榨油后的剩余物还是优良的工业原材料, 具有很高的综合利用价值<sup>[3-4]</sup>。

目前小果油茶多处于野生、半野生或实生栽培状态, 由于野生资源丰富, 加上天然杂交和人工选择等干预, 形成了许多自然类型。熊年康等<sup>[5]</sup>将小果油茶分为珍珠茶、羊屎茶、龙眼花 3 个农家品种 (类型), 庄瑞林等<sup>[6]</sup>则通过区域试验选出优良农家品种龙眼花和江西宜春白皮中籽。近年来, 随着油茶产业的发展, 一些大果型的小果油茶因其果大皮薄、含油率高、高产稳产等优良特性在生产中得到广泛应用。但迄今有关小果油茶的研究报道甚少, 对其遗传改良的研究仍处于起步阶段。本文以普通油茶为对照, 采用表型性状和 AFLP 分子标记对小果油茶农家品种间的遗传关系进行了探讨, 以为小果油茶的分类、遗传改良及开发利用等提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试材料为小果油茶农家品种龙眼花、羊屎茶、珍珠茶和宜春白皮中籽, 同时以果实形态特征相近的物种普通油茶作为对照, 详见图 1。其中, 龙眼花、羊屎茶和普通油茶采自福建闽侯, 珍珠茶采自福建浦城, 宜春白皮中籽采自江西宜春。2010—2012 连续 3 年对果实、叶片和花形态进行观测, 除珍珠茶只观测仅存的 8 个单株外, 其它农家品种和普通油茶各观测 30 个单株。果实和叶片性状从树体东、南、西、北 4 个方向的上、中、下层各摘取 150 个果实和 30 片叶片带回实验室测得, 花性状在现场观测。2012 年 4 月 15 日采集春梢嫩叶, 每个农家品种和普通油茶取 5 份样品用于 AFLP 分析。

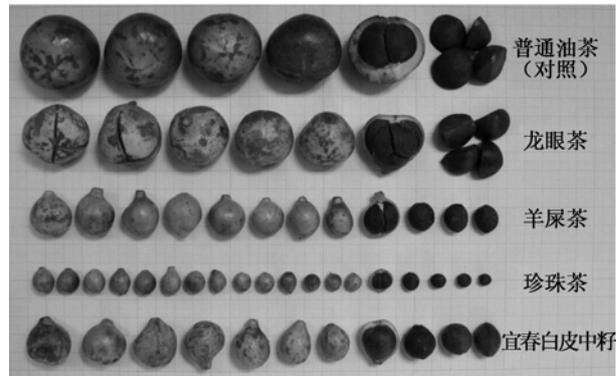


图 1 不同供试样品的果实形态特征

### 1.2 研究方法

1.2.1 表型性状观测 本研究测定 25 个表型性状, 包括果实性状 12 个 (果纵径、果横径、单果质量、果皮厚度、每 500 g 鲜果数、单果籽数、鲜出籽率、干出籽率、出仁率、鲜果含油率、油酸含量、不饱和脂肪酸含量), 叶片性状 8 个 (叶长、叶宽、叶面积、叶周长、叶长宽比、叶形指数、叶柄长度、叶片厚度), 花性状 5 个 (花冠直径、花瓣数、萼片数、花柱长度、雄蕊数)。性状测定参考黄勇等<sup>[7]</sup>和姚小华等<sup>[8]</sup>的方法。

1.2.2 DNA 提取及模版 DNA 制备 油茶嫩叶 DNA 提取参考张智俊等<sup>[9]</sup>的方法, 略有改动。DNA 质量和浓度用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 及 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

将每个农家品种和普通油茶提取的 5 份 DNA 样品等量混合后, 用限制性内切酶 *EcoR* I/*Mse* I (美国 New England Biolabs 公司) 于 37℃ 酶切 6 h (反应体积 20 μL, 含 DNA 1 μg, 10 × NEBuffer *EcoR* I 2.0 μL, 100 × BSA 0.2 μL, *EcoR* I 0.5 μL, *Mse* I 0.5 μL), 65℃ 水浴 20 min。酶切产物再用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 (美国 New England Biolabs 公司) 于 16℃ 连接过夜, 65℃ 灭活 10 min。连接反应体积 20 μL, 含 DNA 酶切产物 16 μL, *T*<sub>4</sub> DNA Ligase Buffer 2.0 μL, *EcoR* I 接头 (5 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, *Mse* I 接头 (50 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 5 U。参照 Bachem 等<sup>[10-11]</sup>的方法对 *EcoR* I 接头 (5'-CTCG-TAGACTGCGTACC-3', 3'-CTGACGCATGGTTAA-5') 和 *Mse* I 接头 (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 3'-TACTCAGGACTC AT-5') 进行设计及预处理。

1.2.3 AFLP 分析 将连接产物稀释 30 倍, 用

*EcoR* I  $E_{00}$  (5' -GACTGCGTACCAATTC-3') 和 *Mse* I  $M_{00}$  (5' -GATGAGTCCTGAGTAA-3') 引物组合进行预扩增。预扩增体积 20  $\mu$ L, 含 DNA 酶切连接产物 1.0  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer 5.0  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2.0  $\mu$ L, *EcoR* I  $E_{00}$  (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L, *Mse* I  $M_{00}$  (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L, *Taq* 酶 1 U; PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min)  $\times$  35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。预扩增产物再用从 64 对引物组合中筛选的 25 对引物进行选择扩增, 反应总体积 20  $\mu$ L, 含稀释 30 倍的预扩增产物 1.0  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L, 引物  $E_n$  (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和  $M_n$  (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 1.0  $\mu$ L, *Taq* 酶 1.25 U。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, [94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s (每循环温度递减 0.7 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 60 s]  $\times$  12 个循环; (94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s)  $\times$  24 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 并经 EPSON Perfection1650 扫描仪扫描后用于统计分析。

1.2.4 数据分析 将表型性状数据标准化后, 用 SPSS17.0 中的非加权平均数 UPGMA 法进行聚类作图。同时, 按清晰、再现性强的条带记为“1”, 无带的记为“0”, 在相同迁移率位置上统计 AFLP 扩增条

带, 生成“0/1”二元矩阵, 用 NTSYSpc-2.1 软件<sup>[12]</sup> 计算 Nei's 遗传距离和相似系数, 再用 NTSYSpc-2.1 软件中 SHAN 程序的 UPGMA 法对“0/1”二元矩阵进行聚类作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 小果油茶农家品种表型性状差异

研究显示, 小果油茶农家品种果实、叶片和花的 25 个表型性状变异丰富, 除果实出仁率、油酸含量、不饱和脂肪酸含量、叶长宽比、叶形指数外, 其它性状的变异系数均超过 10%, 其中果纵径、果横径、单果质量、果皮厚度、每 500 g 鲜果数、单果籽数、叶面积和叶片厚度 8 个性状的变异系数超过 20%, 尤其每 500 g 鲜果数变异幅度为 30.00 ~ 470.00 个, 变异系数最大, 高达 76.91% (表 1)。在果实、叶片和花 3 类性状中, 果实性状的变异系数最大 (平均为 25.54%), 其次是叶片性状 (17.25%), 而花性状的变异系数最小 (15.70%), 说明小果油茶农家品种果实性状的稳定性低于叶片和花性状。从表 1 还可看出, 25 个性状中有 4 个性状的差异显著, 13 个性状差异极显著, 其余性状差异不显著, 说明小果油茶农家品种遗传差异明显。

表 1 小果油茶农家品种表型性状差异

性状	均值	标准差	最小值	最大值	变幅	变异系数/%	F 值
果纵径/mm	23.44	6.18	10.44	41.89	31.45	26.35	156.220**
果横径/mm	20.72	4.94	8.39	43.36	34.97	23.86	51.861**
单果质量/g	5.69	3.24	1.17	12.39	11.22	56.94	121.250**
果皮厚度/mm	1.23	0.39	0.61	2.83	2.22	31.40	2.434
每 500 g 鲜果数/个	163.00	125.48	30.00	470.00	429.00	76.91	28.071**
单果籽数/个	2.10	0.73	1.00	10.00	9.00	35.46	7.359**
鲜出籽率/%	61.56	6.79	39.08	71.74	32.66	11.03	10.101**
干出籽率/%	36.23	4.16	28.52	44.86	16.34	11.48	0.678
出仁率/%	64.18	6.40	48.82	77.92	29.10	9.98	1.015
鲜果含油率/%	12.31	1.87	7.08	15.93	8.85	15.22	0.138
油酸含量/%	79.09	3.58	71.97	88.57	16.60	4.53	3.962*
不饱和脂肪酸含量/%	89.33	2.96	81.94	94.55	12.61	3.31	0.154
叶面积/m <sup>2</sup>	7.66	2.22	4.33	13.29	8.96	28.98	25.037**
叶周长/cm	11.92	1.76	9.25	15.53	6.28	14.72	18.718**
叶长/cm	4.49	0.66	3.42	5.86	2.44	14.63	21.501**
叶宽/cm	2.43	0.40	1.80	3.38	1.58	16.33	25.683**
叶长宽比	1.87	0.17	1.51	2.17	0.66	9.38	2.762*
叶形指数	0.67	0.06	0.54	0.78	0.24	8.67	2.173
叶柄长度/mm	5.10	0.83	3.27	6.63	3.36	16.28	12.182**
叶片厚度/mm	0.38	0.11	0.18	0.66	0.48	28.99	0.685
花冠直径/cm	4.11	0.80	2.50	5.54	3.04	19.43	11.851**
花瓣数/枚	6.40	1.15	5.00	9.00	4.00	18.01	3.781*
萼片数/片	7.66	1.34	5.00	11.00	6.00	17.55	4.680**
花柱长度/cm	0.69	0.09	0.55	0.85	0.30	13.04	2.720
雄蕊数/个	48.86	5.13	42.00	60.00	18.00	10.49	3.372*

注: \*, \*\* 分别表示在 0.05 和 0.01 水平显著。下同。

## 2.2 不同农家品种间的表型性状差异

从表2和图1可见,不同小果油茶农家品种的果实、叶片和花性状差异较大,其中宜春白皮中籽的变异系数累加值最大,羊屎茶、龙眼花次之,珍珠茶最小,说明宜春白皮中籽的25个表型性状的稳定性低于其它农家品种。在果实性状中,龙眼花的果实大小(果纵径×果横径)、单果质量、单果籽数和鲜出籽率的平均值最大,其次是宜春白皮中籽和羊屎茶,珍珠茶最小;每500g鲜果数以珍珠茶最多(平均426.13

个),龙眼花最少。在叶片和花性状中,龙眼花的叶面积、叶周长、叶长、叶宽、花冠直径和雄蕊数6个性状平均值>宜春白皮中籽>羊屎茶>珍珠茶,其它叶片性状差异不明显。相关分析表明(表3),不同小果油茶农家品种果实性状与叶片和花性状相关显著或极显著,其中果实大小与叶长、叶周长和花冠直径呈显著或极显著的正相关,说明小果油茶叶长、叶周长及花冠直径越大,其果实也相对越大。

表2 不同小果油茶农家品种间表型性状差异

性状	龙眼花			羊屎茶			珍珠茶			宜春白皮中籽		
	均值±标准差	变异系数/%		均值±标准差	变异系数/%		均值±标准差	变异系数/%		均值±标准差	变异系数/%	
果纵径/mm	30.15±2.40	7.97		19.01±1.79	9.41		15.45±1.77	11.48		22.76±3.85	16.91	
果横径/mm	25.13±1.07	4.25		18.53±3.94	21.28		12.70±1.27	10.01		20.41±3.45	16.89	
单果质量/g	9.15±1.72	18.74		3.45±0.87	25.05		1.53±0.31	20.34		5.15±1.78	34.49	
果皮厚度/mm	1.37±0.24	17.59		1.16±0.32	27.57		0.73±0.10	13.46		1.49±0.71	47.82	
每500g鲜果数/个	58.39±13.66	23.40		208.97±69.11	33.07		426.13±70.48	16.54		115.09±64.19	55.77	
单果籽数/个	2.40±0.65	26.89		1.98±0.71	35.85		1.11±0.17	13.97		1.99±0.75	37.75	
鲜出籽率/%	65.65±5.05	7.69		59.35±6.40	10.78		60.87±2.66	4.38		54.31±8.30	15.28	
干出籽率/%	36.32±4.14	11.41		36.76±4.57	12.43		35.53±1.97	5.54		34.41±4.36	12.67	
出仁率/%	63.42±6.80	10.72		64.11±6.51	10.15		67.80±3.91	5.77		63.59±6.22	9.78	
鲜果含油率/%	12.15±1.86	15.35		12.44±2.24	18.04		12.47±0.73	5.89		12.28±1.13	9.21	
油酸含量/%	79.82±3.61	4.52		77.52±3.12	4.02		81.19±4.16	5.12		80.33±2.36	2.94	
不饱和脂肪酸含量/%	89.61±4.02	4.49		89.09±1.78	1.99		89.25±3.25	3.64		89.23±1.25	1.40	
叶面积/m <sup>2</sup>	9.42±1.75	18.58		6.21±1.56	25.09		5.81±0.80	13.69		8.44±1.50	17.76	
叶周长/cm	13.16±1.36	10.37		10.86±1.48	13.65		10.51±0.60	5.72		12.79±1.09	8.52	
叶长/cm	4.94±0.48	9.68		4.07±0.52	12.87		3.93±0.30	7.51		4.93±0.50	10.06	
叶宽/cm	2.76±0.30	10.83		2.17±0.28	12.89		2.16±0.19	8.64		2.54±0.30	11.80	
叶长宽比	1.81±0.16	8.99		1.91±0.16	8.22		1.82±0.16	8.53		1.97±0.25	12.76	
叶形指数	0.68±0.06	9.04		0.66±0.05	7.75		0.66±0.04	5.89		0.63±0.07	10.99	
叶柄长度/mm	5.39±0.77	14.34		5.30±0.61	11.55		4.11±0.67	16.37		4.19±0.63	15.03	
叶片厚度/mm	0.40±0.08	19.03		0.36±0.15	42.46		0.39±0.05	11.92		0.37±0.04	11.31	
花冠直径/cm	4.66±0.64	13.78		4.06±0.52	11.22		3.21±0.57	17.64		4.61±0.32	7.85	
花瓣数/瓣	6.78±1.15	16.97		6.78±0.99	14.68		5.38±0.74	13.84		6.81±1.07	15.67	
萼片数/片	8.28±1.31	15.82		7.30±1.11	15.21		6.50±1.20	18.39		8.32±0.74	8.86	
花柱长度/cm	0.73±0.09	12.02		0.75±0.09	12.52		0.66±0.10	14.40		0.64±0.04	7.06	
雄蕊数/个	51.50±5.80	11.26		48.50±3.79	7.81		45.00±2.79	5.31		49.71±5.09	10.24	
合计		323.73			408.44			266.29			416.66	

表3 不同小果油茶农家品种果实性状与叶片、花性状的相关性

性状	叶面积	叶周长	叶长	叶宽	叶长宽比	叶形指数	叶柄长度	叶片厚度	花冠直径	花瓣数	萼片数	花柱长度	雄蕊数
果纵径	0.932*	0.964**	0.940*	0.821	0.660	-0.648	-0.647	0.833	0.891*	0.499	0.547	0.812	0.835
果横径	0.837	0.929*	0.907*	0.665	0.812	-0.795	-0.777	0.872	0.973**	0.456	0.410	0.920*	0.937*
单果质量	0.728	0.862	0.837	0.532	0.849	-0.872	-0.891*	0.943*	0.966**	0.253	0.207	0.967**	0.990**
果皮厚度	0.740	0.880*	0.867	0.529	0.920*	-0.917*	-0.888*	0.876	0.968**	0.359	0.292	0.941*	0.979**
每500g鲜果数	-0.915*	-0.888*	-0.890*	-0.839	-0.572	0.465	0.345	-0.473	-0.734	-0.846	-0.842	-0.556	-0.582
单果籽数	0.676	0.827	0.802	0.461	0.885*	-0.897*	-0.902*	0.919*	0.976**	0.260	0.167	0.981**	0.996**
鲜出籽率	-0.414	-0.621	-0.635	-0.165	-0.979**	0.987**	0.916*	-0.665	-0.763	-0.163	-0.062	-0.773	-0.853
干出籽率	-0.598	-0.776	-0.767	-0.381	-0.915*	0.971**	0.986**	0.903*	-0.868	-0.080	-0.077	-0.900*	-0.969**
出仁率	-0.747	-0.698	-0.711	-0.686	-0.460	0.294	0.110	-0.186	-0.580	-0.974**	-0.873	-0.368	-0.368
鲜果含油率	-0.624	-0.789	-0.765	-0.407	-0.882*	0.918*	0.944*	-0.940*	-0.944*	-0.148	-0.079	-0.974**	-0.999**
油酸含量	0.288	0.329	0.336	0.311	0.151	-0.354	-0.517	0.515	0.039	-0.546	-0.096	0.136	0.290
不饱和脂肪酸含量	0.740	0.855	0.823	0.574	0.755	-0.810	-0.875	0.984**	0.916*	0.145	0.170	0.936*	0.962**

### 2.3 不同样品间遗传差异的 AFLP 分析

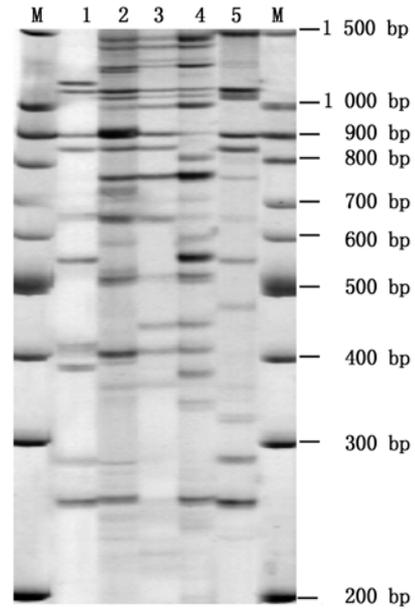
25 对引物组合在小果油茶农家品种和对照普通油茶上共扩增出 921 条带,其中多态性条带 706 条,平均每对引物产生 37 条带,多态性条带 28 条,多态性条带比率达 75.7% (表 4)。4 个小果油茶农家品种和对照普通油茶在 25 对引物中均具有相同的主扩增带,多态性表现在差异谱带上,说明小果油茶与普通油茶间具有同源性。图 2 是引物 *E-ACC/M-AGT* 对 5 个样品的扩增结果。从利用 AFLP 原始数据在 *NTSYSpc-2.1* 软件上获得的 *Nei's* 遗传距离矩阵可知,供试材料的遗传距离在 0.363 5~0.505 3 之间,平均为 0.440 9,说明 4 个小果油茶农家品种和对照普通油茶间的遗传基础较窄。其中羊屎茶与宜春白皮中籽之间的遗传距离最小,为 0.363 5,说明这 2 个小果油茶农家品种的遗传差异最小;羊屎茶与对照普通油茶之间的遗传距离最大,为 0.505 3,表明它们之间的遗传差异最大。

表 4 25 对 AFLP 引物组合扩增的条带

序号	引物组合	总条带数	多态性条带数	多态性条带比率/%
1	<i>E-AA/M-GA</i>	44	31	70.5
2	<i>3-AA/M-CAG</i>	32	25	78.1
3	<i>E-AC/M-GA</i>	39	31	79.5
4	<i>E-AC/M-CAG</i>	49	36	73.5
5	<i>E-AC/M-AAC</i>	28	18	64.3
6	<i>E-AC/M-TC</i>	34	29	85.3
7	<i>E-AG/M-CAA</i>	41	33	80.5
8	<i>E-AG/M-TT</i>	48	39	81.3
9	<i>E-AT/M-GT</i>	38	31	81.6
10	<i>E-AT/M-TC</i>	22	15	68.2
11	<i>E-AT/M-TT</i>	36	30	83.3
12	<i>E-CC/M-CTC</i>	44	30	68.2
13	<i>E-CC/M-GG</i>	34	28	82.4
14	<i>E-CC/M-GT</i>	45	39	86.7
15	<i>E-CG/M-GA</i>	39	32	82.1
16	<i>E-CG/M-CTA</i>	38	25	65.8
17	<i>E-CT/M-TC</i>	33	27	81.8
18	<i>E-ACC/M-GC</i>	37	31	83.8
19	<i>E-ACC/M-CGA</i>	41	28	68.3
20	<i>E-AAC/M-GG</i>	27	21	77.8
21	<i>E-AAC/M-CAA</i>	34	20	58.8
22	<i>E-AAC/M-CTA</i>	23	19	82.6
23	<i>E-ACA/M-GG</i>	39	31	79.5
24	<i>E-ACA/M-GT</i>	37	25	67.6
25	<i>EACA/M-CTC</i>	39	32	82.1
合计		921	706	
平均		37	28	75.7

### 2.4 基于表型性状和 AFLP 标记的亲缘关系

从遗传相似系数分析,羊屎茶与宜春白皮中籽



M:100 bp DNA ladder Marker; 1~5: 分别代表普通油茶、龙眼花、羊屎茶、珍珠茶和宜春白皮中籽

图 2 引物 *E-ACC/M-AGT* 的 AFLP 扩增结果

的遗传相似系数最大,为 0.698 2,它们之间的亲缘关系较近,而龙眼花与对照普通油茶的相似系数最小,为 0.558 1,表明它们之间的亲缘关系较远。图 3 和图 4 分别是基于表型性状和 AFLP 标记构建的 5 个供试样品的聚类图。由图可见,基于 25 个表型性状和 AFLP 标记的聚类均将对对照普通油茶和 4 个小果油茶农家品种首先分离,形成一独立分支,说明 AFLP 标记在物种间的聚类与形态学证据一致。但 AFLP 标记对小果油茶农家品种间的聚类与表型性状的聚类存在差异,基于 AFLP 标记的聚类图中,4 个小果油茶农家品种被分为 3 类,遗传相似系数较大的羊屎茶和宜春白皮中籽先聚为一类,龙眼花和珍珠茶分别独立为一类;而在小果油茶农家品种表型性状的聚类上,大果形的龙眼花和中果形的宜春白皮中籽先聚成一类,中果形的羊屎茶、小果形的珍珠茶各聚为一类。

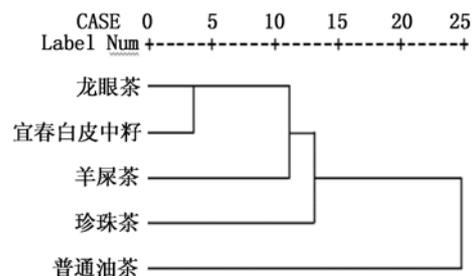


图 3 基于表型性状的聚类图

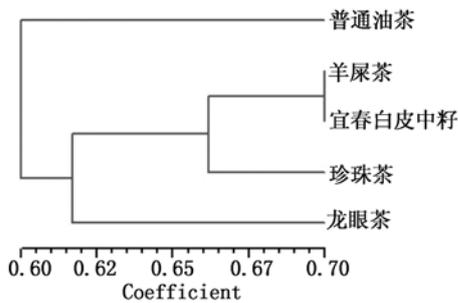


图4 基于AFLP标记的聚类图

### 3 结论与讨论

小果油茶是异花授粉植物,种内自然变异类型极为丰富。黄勇等<sup>[7]</sup>对我国全分布区18个小果油茶居群遗传多样性的研究表明,小果油茶群体遗传多样性丰富,群体内的变异远大于群体间,占总变异的87.75%。本研究中,4个小果油茶农家品种的25个表型性状中有17个性状差异显著或极显著,其中果纵径、果横径、单果质量、果皮厚度、每500g鲜果数、单果籽数、叶面积和叶片厚度的变异系数均超过20%,说明小果油茶种内表型性状变异极为丰富,这对小果油茶优良品种的选育是极为有利的。在果实、叶片和花3类性状中,果实性状的平均变异系数(25.54%)大于叶片(17.25%)和花性状(15.70%),说明小果油茶农家品种果实性状的稳定性低于叶片和花性状,易受环境的影响。

与普通油茶相比,小果油茶的遗传改良研究尚处于起步阶段,许多优良品种类型还未能充分挖掘利用,农家品种仍是小果油茶品种资源的主体。本研究表明,不同小果油茶农家品种间的性状差异较大,其中宜春白皮中籽的性状变异程度高于龙眼花、羊屎茶和珍珠茶,尤其是单果质量、果皮厚度、单果籽数和每500g鲜果数的变异系数均超过30%,说明这4个性状在宜春白皮中籽农家品种内的变异程度较大,选育时可作为重要的研究性状。从形态上看,龙眼花和珍珠茶形态特征差异极大,易于分辨,根据果实和叶片的大小及花冠直径等性状可直接将两者区分,但羊屎茶和宜春白皮中籽的形态特征接近,较难从形态上区分这两个农家品种。相关分析表明,不同小果油茶农家品种果实性状与叶片和花性状之间存在显著或极显著的相关,其中果实大小与叶长、叶周长和花冠直径相关显著或极显著,说明小果油茶叶长、叶周长、花冠直径越大,其果实也相对越大,良种选育时应重点关注这些性状。

目前小果油茶的分类地位仍存在异议,其最早由胡先骕<sup>[13]</sup>命名为寒露油茶(*C. meiocarpa* Hu.),后来张宏达等<sup>[14-15]</sup>又将其归为普通油茶变种单籽油茶(*C. oleifera* Abel. var. *monosperma*),而闵天禄<sup>[16]</sup>则认为小果油茶有可能是普通油茶栽培条件下的变异。但因小果油茶与普通油茶的形态特征有着明显的差别,油茶研究工作者及经济林栽培专家等均将其视为山茶属中的一个物种对待<sup>[1-2,17-18]</sup>。从本研究利用AFLP技术对小果油茶农家品种亲缘关系的分析结果看,25对AFLP引物组合共扩增出921条带,多态性条带比率达75.7%,表明供试样品在分子水平上存在广泛的遗传变异。聚类结果显示,AFLP标记对物种间的归类与形态学证据一致,普通油茶独立为一分支,4个小果油茶农家品种聚为一大类,说明这4个农家品种的遗传背景相似。但AFLP标记在4个小果油茶农家品种的归类上并未完全与形态学分类一致,其中龙眼花和宜春白皮中籽在表型性状聚类中亲缘关系较近,在AFLP标记聚类中却相距较远;而羊屎茶和宜春白皮中籽在AFLP标记聚类中亲缘关系较近,在表型性状聚类中却相距较远,这可能是由于形态学分类无法对一些不可见的差异进行分析检测,而AFLP技术能从DNA水平上真实地反映小果油茶农家品种间的遗传背景和遗传差异。但小果油茶种质的遗传背景相当复杂,有关龙眼花、羊屎茶和宜春白皮中籽在小果油茶中的进化关系仍需进一步研究探讨。

#### 参考文献:

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 2版. 北京: 中国林业出版社, 2008: 65-67
- [2] 李振纪. 油茶[M]. 北京: 中国林业出版社, 1981: 5-32
- [3] 柏云爱, 宋大海, 张富强, 等. 油茶籽油与橄榄油营养价值的比较[J]. 中国油脂, 2008, 33(3): 39-41
- [4] 廖书娟, 吉当玲, 童荣华. 茶油脂脂肪酸组成及其营养保健功能[J]. 粮食与油脂, 2005(6): 7-9
- [5] 熊年康, 郭江, 陈祥平, 等. 油茶优良农家品种龙眼花的丰产性状研究[J]. 福建林业科技, 1987(2): 29-36
- [6] 庄瑞林, 蔡肖群. 油茶优良农家品种全国区域性评比试验研究[J]. 广西林业科技, 1993, 22(2): 46-53
- [7] 黄勇. 小果油茶遗传多样性分析及杂交渐渗研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011
- [8] 姚小华, 王亚萍, 王开良, 等. 地理经纬度对油茶籽中脂肪及脂肪酸组成的影响[J]. 中国油脂, 2011, 36(4): 31-34
- [9] 张智俊, 谭晓风, 陈永忠. 油茶总RNA及mRNA的分离与纯化[J]. 中南林业学院学报, 2003, 23(2): 76-78
- [10] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. Transcript imaging

- with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16(2): 157-173
- [11] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development[J]. *Plant Journal*, 1996, 9(5): 745-753
- [12] Rolf F J. NTSYS-pc; Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2. 1 [M]. Setauket, New York; Exeter Software, 2000
- [13] 胡先骕. 中国山茶科小志 I [J]. 科学通报, 1957(6): 170
- [14] 张宏达, 任善湘. 中国山茶科新植物[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1992, 31(1): 74-76
- [15] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第49卷 第3分册 山茶科(一) 山茶亚科[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 13-14
- [16] 闵天禄. 世界山茶属的研究[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2000: 296-301
- [17] 姚小华. 油茶高效实用栽培技术[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 1-3
- [18] 姚小华, 王开良, 黄 勇, 等. 小果油茶不同居群种仁含油率及脂肪酸组分变异特征分析及评价[J]. 林业科学研究, 2013, 26(5): 533-541