

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.004.004

基于表型和 SSR 标记的陇南油橄榄品种 鉴定与遗传多样性分析

徐悦¹, 黄兰¹, 李金花¹, 邓煜², 张建国¹, 曾艳飞^{1*}

(1. 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;

2. 甘肃省陇南市经济林研究院油橄榄研究所, 甘肃 陇南 746000)

摘要: [目的] 该研究对我国油橄榄主产区甘肃省陇南市现有品种进行了准确鉴定和遗传多样性计算, 为我国油橄榄种质资源引种和驯化、育种及利用提供参考。[方法] 利用 13 个 SSR 标记对来自 83 个油橄榄品种的 110 棵单株进行品种鉴定和遗传多样性分析, 并对其中属于 68 个品种的 90 棵单株进行叶片、果实和果核形态性状的测定和分析, 最后开展了基于表型性状和 SSR 标记的单株聚类和结果比较。[结果] 陇南油橄榄表型数量性状和质量性状多样性指数分别为 1.83 和 0.79; SSR 分析发现 83 个品种包括 78 个不同的基因型, 观测杂合度和期望杂合度分别为 0.683 和 0.754; 这些基因型可分为 3 大组, 基因型所属分组与其起源地有一定相关性; 我国选育品种的基因型大多与起源地意大利的品种分组更近; 与基于表型的聚类树相比, 基于 SSR 基因型的聚类树更倾向于将同一品种的不同单株聚在同一支。[结论] 陇南共有 78 种不同基因型的品种, SSR 标记比表型鉴定品种更具准确性, 且能反映亲缘关系。该地区油橄榄表型多样性和遗传多样性较高, 引种品种主要是来自地中海西部和中部国家, 国内选育品种与意大利起源的品种相似; 为更多样化可考虑引种或选育更多起源国的品种。

关键词: 油橄榄; 表型多样性; 质量性状; 数量性状; 品种鉴定; 遗传多样性

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2022)04-0033-11

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 为木犀科 (*Oleaceae*) 木犀榄属 (*Olea* L.) 常绿乔木, 是世界著名木本油料兼果用树种。由新鲜油橄榄果实直接冷榨而成的橄榄油, 富含多种维生素和脂肪酸, 可以显著降低心脑血管疾病发病率, 是食用油脂中最有益于人体健康的植物油^[1]。油橄榄原产于地中海, 具有悠久的栽培历史, 由于不同地域之间频繁的品种交换, 同名异物和同物异名现象较普遍^[2]。目前已有记录名称品种达 1 275 个, 分布在 54 个国家和地区^[3]。我国大规模引种始于 1964 年, 此后陆续开展了油橄榄引种试验和驯化育种研究, 确定了甘肃陇南白龙江河谷、滇西北及

川西南金沙江河谷等地区为最佳适生区, 并建立了规模化栽培生产基地^[4]。目前, 我国橄榄油年产量达到 2 620 t, 但远远不能满足消费市场的巨大需求, 国外橄榄油进口量逐年剧增 (<https://www.fao.org/faostat/en/#compare>)。因此, 针对我国油橄榄产量较低和良种不足的现状, 亟需对国内油橄榄种质资源开展引种和驯化育种研究, 而对现有品种的鉴定和遗传多样性分析是这一研究的重要前提^[5]。

国外油橄榄品种鉴定和种质资源遗传多样性研究报道甚多, 表型性状和 SSR 标记为最常用方法^[6]; 西班牙^[7]、法国^[8]、突尼斯^[9]、阿尔及利亚^[10]

收稿日期: 2022-01-27 修回日期: 2022-02-25

基金项目: 国家重点研发计划项目课题 (2019YFD1000602)

* 通讯作者: 曾艳飞, 博士, 副研究员, 硕士生导师。主要研究方向: 植物系统进化。电话: 13811833021。Email: zengyf@caf.ac.cn

等国均用 SSR 标记对本国油橄榄种质资源进行了多样性评价。目前世界最大油橄榄种质资源库为西班牙科尔多瓦 (World Olive Germplasm Bank in Cordoba, WOGBC)^[7] 和摩洛哥马拉喀什 (World Olive Germplasm Bank in Marrakech, WOGBM)^[11], 他们共收录了 1 000 多个油橄榄品种表型特征数据和以 SSR 标记为主的分子数据。Diez 等^[12] 基于 SSR 标记分析了 WOGBC 数据库里 289 个油橄榄品种, 认为地中海的油橄榄品种可分为 3 个基因库, 其来源大致对应地中海盆地的西部、中部和东部。将我国油橄榄栽培品种对应基因库与地中海盆地基因库进行对比分析可为引进油橄榄新种质提供参考。

我国在油橄榄品种鉴定和遗传多样性研究方面已取得了一些进展。耿树香等^[13] 基于 SSR 标记计算了云南省选育品种和引种品种的遗传多样性, 且发现聚类并不能将二者分开。李金花等^[14] 用 SSR 标记研究了适生区内的油橄榄遗传多样性, 发现品种内的遗传变异远高于群体间和群体内不同品种间的遗传变异。Zhan 等^[15] 用 ISSR 和 SSR 标记分析了四川省西昌市油橄榄遗传多样性, 结果表明品种并没有根据来源国聚类。Li 等^[16] 开发新 SSR 标记鉴定了云南省永仁县油橄榄材料, 认为品种间遗传关系与起源并不相符。针对陇南地区的油橄榄, 秦倩等^[17] 用 SSR 标记和表型性状分析了 17 份常见品种, 发现其表型和遗传多样性均较高, 两种方法分析的品种间关系存在一致性和差异性; 邵文豪^[18] 用 SSR 标记分析了 50 份油橄榄样品, 发现我国选育品种与意大利品种的遗传关系更近。

本研究尽量全面收集了我国油橄榄主产区和种质重点收集区——甘肃省陇南市的油橄榄品种; 基于表型和 SSR 标记开展了品种鉴定和多样性分析, 比较了两种手段在品种鉴定上的差异; 并根据油橄榄品种基因型的遗传分组, 结合品种来源和地中海油橄榄的起源研究, 分析我国的引种品种和本土培育品种在多样上的局限。本研究拟为我国油橄榄种质资源引进、新品种选育和栽培利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验园自然概况

研究所用油橄榄品种材料来自甘肃省陇南市的两个试验园: 陇南市经济林研究院油橄榄研究所科研试验园 (104°53'28" E, 33°24'13" N), 位于陇

南市江南街道办大堡村; 大湾沟油橄榄试验示范园 (104°47'59" E, 33°26'18" N), 位于陇南市武都区两水镇。两个试验园均地处白龙江干热河谷地带内, 海拔 1 000~1 300 m; 该地区气候温暖, 年平均温度 14.9 ℃; 空气湿度低, 全年平均相对湿度仅 61%^[19]。

1.2 试验材料

本研究内共收集 110 棵单株用于 SSR 分析; 这些单株属于 83 个品种, 包括国外引种品种 61 个 (表 1), 国内引种选育品种 22 个 (表 2)。由于油橄榄材料采自两个试验园, 且存在同一品种多次引种的情况, 为鉴定相同品种名下不同单株的基因型是否相同, 有些品种存在重复采集。所采集的 110 棵单株中, 来自 68 个品种的 90 棵单株已挂果, 可用于表型分析 (表 1 和表 2); 分别收集各单株树冠南侧 1.5 m 处成熟的完整叶片和结果枝中部完好果实各 30 个重复, 用于叶片和果实表型性状测定; 果实剥去果肉洗净阴干后进行果核性状测定。

1.3 方法

1.3.1 表型形态性状测定 依据国际植物新品种保护联盟 (International Union For The Protection Of New Varieties Of Plants, UPOV) 发布的油橄榄新品种测试指南 (TG /99 /4 2011 - 10 - 20) 进行表型性状测定, 包括 11 个数量性状和 15 个质量性状。利用 EPSON 扫描仪和 ImageJ 软件 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) 扫描叶片图像和测定相关数据, 使用精度为 0.01 mm 的游标卡尺和 0.01 g 的电子天平测定叶厚、果实和果核数量性状。

1.3.2 表型形态性状数据统计分析 用 SPSS V26.0 (IBM Corp, Armonk, N.Y., USA) 软件采用箱线图的方法, 筛除各单株数量性状 30 个重复中的异常值, 计算平均值用作单株数量性状分析, 用 Microsoft Excel 计算叶形指数 (叶长/叶宽)、果形指数 (果纵径/果横径) 和核型指数 (核纵径/核横径), 并针对数量性状计算均值、标准差和变异系数等。通过均值与标准差将所有数量性状数据分为 10 个等级, 每等级间相差 $\bar{x}-0.5\sigma$, 原始数据换算后统计出现频率用于多样性指数计算。质量性状参照秦倩^[17] 方法进行赋值, 并统计出现频率。计算所有性状指标的 Shannon-Weiner 多样性指数^[21], 公式为 $H = -\sum(P_i)(\ln P_i)$, 其中, P_i 表示某一表型出现频率值。对数量性状分级、质量性状赋值

表1 我国引种油橄榄品种及其起源国
Table 1 Imported olive cultivars and country of origin

编号 No.	缩写 Abbreviation	品种名 Denomination	来源 Origin	编号 No.	缩写 Abbreviation	品种名 Denomination	来源 Origin
1	AIS	爱桑 Elbasan	ALB	44	XAJ	西阿基 Thiaki	GRC
2	BL	贝拉 Bella Di spagna	ALB	45	XL-3	孔色 Konservolia	GRC
3	KL	卡林 Kalinjot	ALB	46	KLM-1	卡拉蒙 Kalamon	GRC
4	MZ-1	米札 Mixaj	ALB	47	KLM-2 [*]	卡拉蒙 Kalamon	GRC
5	MZ-2 [*]	米札 Mixaj	ALB	48	LDLY1	拉多利亚优选 I Ladolia S I	GRC
6	XGYS	西格伊司 Sigoise	DZA	49	LDLY2	拉多利亚优选 II Ladolia S II	GRC
7	LGT [#]	兰贵特 Blanquette de Guelma	DZA	50	QJ-1	奇迹 Koroneiki	GRC
8	AGE	阿戈尔 Amyglalolia	ESP	51	QJ-2 [#]	奇迹 Koroneiki	GRC
9	ARBO	阿尔波萨娜 Arbosana	ESP	52	QJ-3 [#]	奇迹 Koroneiki	GRC
10	Borriol	巴利奥 Borriol De Castellon	ESP	53	Taggi [†]	塔吉 Taggiasca	ITA
11	APTL	恩帕特雷 Empeltre	ESP	54	AS-1	阿斯 Ascolana	ITA
12	EPTL	恩帕特雷 Empeltre	ESP	55	AS-2 [†]	阿斯 Ascolana	ITA
13	FJ	法加 Farga	ESP	56	AS-3 [#]	阿斯 Ascolana	ITA
14	GDL	戈达尔 Gordal Veal	ESP	57	AS-4 [#]	阿斯 Ascolana	ITA
15	HJ	贺吉 Hojiblanca	ESP	58	AS-5 [#]	阿斯 Ascolana	ITA
16	KNK	科尼卡 Cornicabra	ESP	59	AS-6 [#]	阿斯 Ascolana	ITA
17	LJYX1	陇景园西1 Longjingyuan1	ESP	60	FA-1	佛奥 Frantoio	ITA
18	LJYX2	陇景园西2 Longjingyuan2	ESP	61	FA-2 [#]	佛奥 Frantoio	ITA
19	PGL	皮瓜儿 Picual	ESP	62	FA-3 [#]	佛奥 Frantoio	ITA
20	DG-1	豆果 Arbequina	ESP	63	FA-4 [#]	佛奥 Frantoio	ITA
21	DG-2 [#]	豆果 Arbequina	ESP	64	LX-1	莱星 Leccino	ITA
22	DG-3 [#]	豆果 Arbequina	ESP	65	LX-2 [#]	莱星 Leccino	ITA
23	XPG-1	小苹果 Manzanilla	ESP	66	Nociara-1	诺西亚拉 Nociara	ITA
24	XPG-2 [#]	小苹果 Manzanilla	ESP	67	Nociara-2 [#]	诺西亚拉 Nociara	ITA
25	XPG-3 [#]	小苹果 Manzanilla	ESP	68	PDL-1	配多灵 Pendolino	ITA
26	GLS [†]	格罗桑 Grossanne	FRA	69	PDL-2 [#]	配多灵 Pendolino	ITA
27	LKS [#]	卢克斯 Lucques	FRA	70	BKLL	边克利拉 Biancolila	ITA
28	SLK	沙龙奎 Salonenque	FRA	71	DLD	德里达 Dritta	ITA
29	HYT-1	胡耶特 Verdale del Hérault	FRA	72	GLA	格里昂 Grignan	ITA
30	HYT-2 [#]	胡耶特 Verdale del Hérault	FRA	73	KLD	科拉蒂 Coratina	ITA
31	PXL-1	皮削利 Picholine	FRA	74	KNN [#]	科尼诺 Canino	ITA
32	PXL-2 [#]	皮削利 Picholine	FRA	75	KXFA [#]	科新佛奥 Frantoio A. Corsin	ITA
33	PXL-3 [#]	皮削利 Picholine	FRA	76	MLYL	莫拉约罗 Moraiolo	ITA
34	TC-1	坦彩 Tanche	FRA	77	Nostrale	诺斯特莱 Nostrale di rigali	ITA
35	TC-2 [#]	坦彩 Tanche	FRA	78	QMLE	切姆拉尔 Chemial de Kabylie	DZA
36	ATS [†]	阿托斯 Agiosorous	GRC	79	QMLL [†]	切姆拉里 Chemlali	TUN
37	JYGL	金叶橄榄 Golden leaves	GRC	80	KL	克里 Crimean	USSR
38	LDG	驴蛋果 Gaydoyrelia	GRC	81	N2	尼 II Nikitskii II	USSR
39	LYLYN	利亚诺里亚克基拉 Lianolia kerkiras	GRC	82	N-79 [#]	N-79	USSR
40	MJL [†]	美加里 Megaritiki	GRC	83	NXT	尼肖特 Nisiot	ALB
41	MLK [†]	马拉凯 Manaki	GRC	84	KRD [#]	柯瑞达 Cordar	—
42	MTN [†]	米提尼 Adramittini	GRC	85	WZ	未知	—
43	WL [†]	瓦拉 Valanolia	GRC	86	A33	A33	—

注: [#]为Genotype软件^[20]根据SSR标记数据判定基因型后确定的重复基因型, 后续多样性分析删除的菌株, ^{*}为未计算表型多样性的菌株; [†]为无数据; 起源国缩写: ALB=阿尔巴尼亚, CHN=中国, DZA=阿尔及利亚, ESP=西班牙, FRA=法国, GRC=希腊, ITA=意大利, USSR=前苏联, TUN=突尼斯。下同

Note: [#]marks the deleted genotype duplicates that identified by the Genotype^[20]software based on SSR markers; ^{*}marks individuals without phenotypic diversity; [†] no data; Country abbreviation: ALB=Albania, CHN=China, DZA=Algeria, ESP=Spain, FRA=France, GRC=Greece, ITA=Italy, USSR=Union of Soviet Socialist Republics, TUN=Tunisia. Follows applied the same abbreviations and notes.

表 2 我国油橄榄引种选育品种

Table 2 Introduced domesticated and selected breeding varieties in China

编号 No.	缩写 Abbreviation	名称 Denomination	选育方法 Breeding method	编号 No.	缩写 Abbreviation	名称 Denomination	选育方法 Breeding method
1	CG24	城固24号 Chenggu24	混合品种实生选育	13	YZ01 [*]	01云杂 Yunza1	佛奥 × 尖叶木犀榄杂交子代
2	CG32	城固32号 Chenggu32	柯列实生选育	14	YZ02	02云杂 Yunza2	佛奥 × 尖叶木犀榄杂交子代
3	CG47	城固47号 Chenggu47	克里实生选育	15	YZ03 [*]	03云杂 Yunza3	佛奥 × 尖叶木犀榄杂交子代
4	CG53	城固53号 Chenggu53	尼1实生选育	16	ZS24 [*]	中山24号 Zhongshan24	阿斯实生选育
5	F17	F-17	佛奥单株选优	17	EZ8-1	鄂植8号 Ezhi-8	混合品种实生选育
6	FS17	FS-17	佛奥单株选优	18	EZ8-2 [#]	鄂植8号 Ezhi-8	混合品种实生选育
7	HKY1 [#]	海口优1 Haikouyou1	混合品种实生选育	19	EZ8-3 [#]	鄂植8号 Ezhi-8	混合品种实生选育
8	HL	会理 Huili	混合品种实生选育	20	HK-1 [#]	海口-1 Haikou1	希玛实生选育
9	HO9 [*]	华欧9 Huaou9	科拉蒂 × 尖叶木犀榄杂交子代	21	HK-2 [#]	海口-2 Haikou2	贝拉实生选育
10	JF6	九峰6号 Jiufeng6	混合品种实生选育	22	JYMXL [*]	尖叶木犀榄 <i>sylvestris</i>	我国油橄榄近缘野生亚种
11	YT14	云台14 Yuntai14	尼II实生选育	23	SS-9	实生9 Seedling9	鄂植8号 × 莱星杂交种
12	YC44 [#]	玉蝉44 Yuchan44	莱星单株选优	24	未知	-	-

后,用SPSSV26.0 (IBM Corp, Armonk, N.Y., USA) 软件基于平方欧氏距离计算两两单株间表型距离矩阵, Ward 法进行聚类分析。鉴于少量品种测定了多棵单株的表型性状, 简单基于所有单株的表型数据分析多样性, 会影响其评估的准确性。因此, 在计算表型多样性时, 对同一品种名的多棵单株表型数据取平均值进行合并。

1.3.3 SSR 标记分析 采集油橄榄单株幼嫩叶片, 用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化, 北京) 提取 DNA。从油橄榄已有研究中筛选 13 对扩增稳定且具多态的 SSR 引物^[22-25], 标定荧光后取各油橄榄单株 DNA 分别扩增; 引物详细信息见表 3; PCR 扩增反应体系和程序参照 Trujillo 等^[7]。利用 ABI 3730 测序仪 (美国生命技术公司) 进行毛细管电泳, 检测 PCR 产物, 内标为 Liz500。以同批扩增的‘佛奥’品种为阳性对照, 去离子水为阴性对照, 校准不同批次样品。采用 Genemapper V4.0 (美国生命技术公司) 软件读取 SSR 数据, 校正后获得每单株 SSR 基因型。

1.3.4 SSR 标记数据统计分析 利用 Genotype 软件^[20] 判断所有 110 棵单株的 SSR 基因型数、合并相同基因型; 分析选择无限位点模型 (Infinite site model), 阈值设置为 1。基于这些基因型, 利用 GenAIEX 6.50 软件^[26] 计算遗传多样性参数, 观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e); 运用 Structure 2.3^[27] 软件推断所有基因型的遗传分组,

采用混合模型和等位基因频率关联模型, 分组值 K 设置为 1~10, 每个 K 值重复计算 10 次, 每次运行 100 000 次 Burnin 和 1 000 000 次迭代。结果上传到在线软件 Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) 中, 根据 $\ln P(D)$ 、 ΔK 对应最大原则选择 K 值; Clumpak (<http://clumpak.tau.ac.il/>) 将 10 次运行结果合并选择平均相似度 (mean similarity) 最高对应的 K 值; Distruct 1.1^[28] 软件实现分组结果可视化。针对 90 棵有表型性状的单株, 用 MSA v4.05^[29] 软件计算两两单株间的 SSR 基因型距离; 用 Phylip 3.695^[30] 软件中的“Neighbor”程序, 以尖叶木犀榄 (*Olea europaea* L. spp. *cuspidata* (Wall.) Ciferri) 为外类群, 对单株的基因型构建系统发育树, 自展值 (bootstrap) 设为 1 000。

1.3.5 基于表型与 SSR 基因型矩阵的相关性分析 为评估表型性状和遗传变异在品种判定的相关性, 利用 GenALEX 软件^[26] 对两两单株间表型距离矩阵与 SSR 基因型的遗传距离矩阵进行 Mantel 检验, 重复数设置为 9 999; 逐一分析遗传距离矩阵与基于所有表型性状、仅基于质量性状和仅基于数量性状的距离矩阵的相关性。

2 结果与分析

2.1 陇南油橄榄表型性状的品种鉴定

基于叶片、果实和果核表型数量性状与质量性状的分级或赋值数值在 90 棵单株间均不同, 但并

表3 SSR引物信息
Table 3 SSR primer information

序号 No.	位点 Locus	重复位点 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 T _a /°C	目的片段大小 Size range/bp	荧光标记 Fluorescent	参考文献 References
1	EMO90	(CA) ₁₀	F: CATCCGGATTTCTTGCTTTT R: AGCGAATGTAGCTTTGCATGT	55	180~197	Hex	[22]
2	GAPU103A	(TC) ₂₆	F: TGAATTTAACTTTAAACCCACACA R: GCATCGCTCGATTTTTATCC	60	150~184	Tamra	[23]
3	GAPU59	(CT) ₉	F: CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA R: CAAAGGTGCACCTTCTCTCG	60	208~222	Rox	[23]
4	ssrOeUA-DCA1	(GA) ₂₂	F: CCTCTGAAAATCTACACTCACATCC R: ATGAACAGAAAGAAGTGAACAATGC	50	204~230	Fam	[24]
5	ssrOeUA-DCA3	(GA) ₁₉	F: CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R: TGCTTTTGTCTGTTTGTGATGTTG	50	228~250	Fam	[24]
6	ssrOeUA-DCA4	(GA) ₁₆	F: CTTAACTTTGTGCTTCTCCATATCC R: AGTGACAAAAGCAAAAAGACTAAAAGC	55	128~186	Rox	[24]
7	ssrOeUA-DCA5	(GA) ₁₅	F: AACAAATCCCATACGAACTGCC R: CGTGTGCTGTGAAGAAAATCG	50	195~211	Rox	[24]
8	ssrOeUA-DCA9	(GA) ₂₃	F: AATCAAAGTCTTCTTCTCATTTCG R: GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	55	161~205	Fam	[24]
9	ssrOeUA-DCA11	(GA) ₂₆ (GGGA) ₄	F: GATCAAACACTGACACGAGAGAG R: TTGTCTCAGTGAACCCCTAAACC	50	125~161	Rox	[24]
10	ssrOeUA-DCA15	(CA) ₃ G(AC) ₁₄	F: GATCTTGTCTGTATATCCACAC R: TATACCTTTTCCATCTTGACGC	50	242~266	Fam	[24]
11	ssrOeUA-DCA16	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	F: TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R: TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	50	120~178	Hex	[24]
12	ssrOeUA-DCA18	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	F: AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC R: GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	50	168~184	Tamra	[24]
13	UDO99-011	(CT) ₇ (CA) ₁₀ (CT) ₂ (CA) ₂ CT(CA) ₂ CT(CA) ₉	F: TGACTCCCTTTAAACTCATCAGG R: TGCGCATGTAGATGTGAATATG	55	105~132	Fam	[25]

不能反应不同单株是否为相同品种。表型聚类结果(图1a)显示:一些品种的单株与其他品种聚为一支,如我国实生选育品种‘鄂植8号’的1号、2号与‘城固53号’‘城固32号’聚为同一支。相同品种的不同单株并未全部聚为一支,具有3个及以上不同单株的品种如‘小苹果’‘奇迹’‘佛奥’‘皮削利’各仅有2个单株聚为一支。相同品种的单株间聚类较为混乱,且并未依照来源国家或品种选育记录的亲缘关系聚为一支。

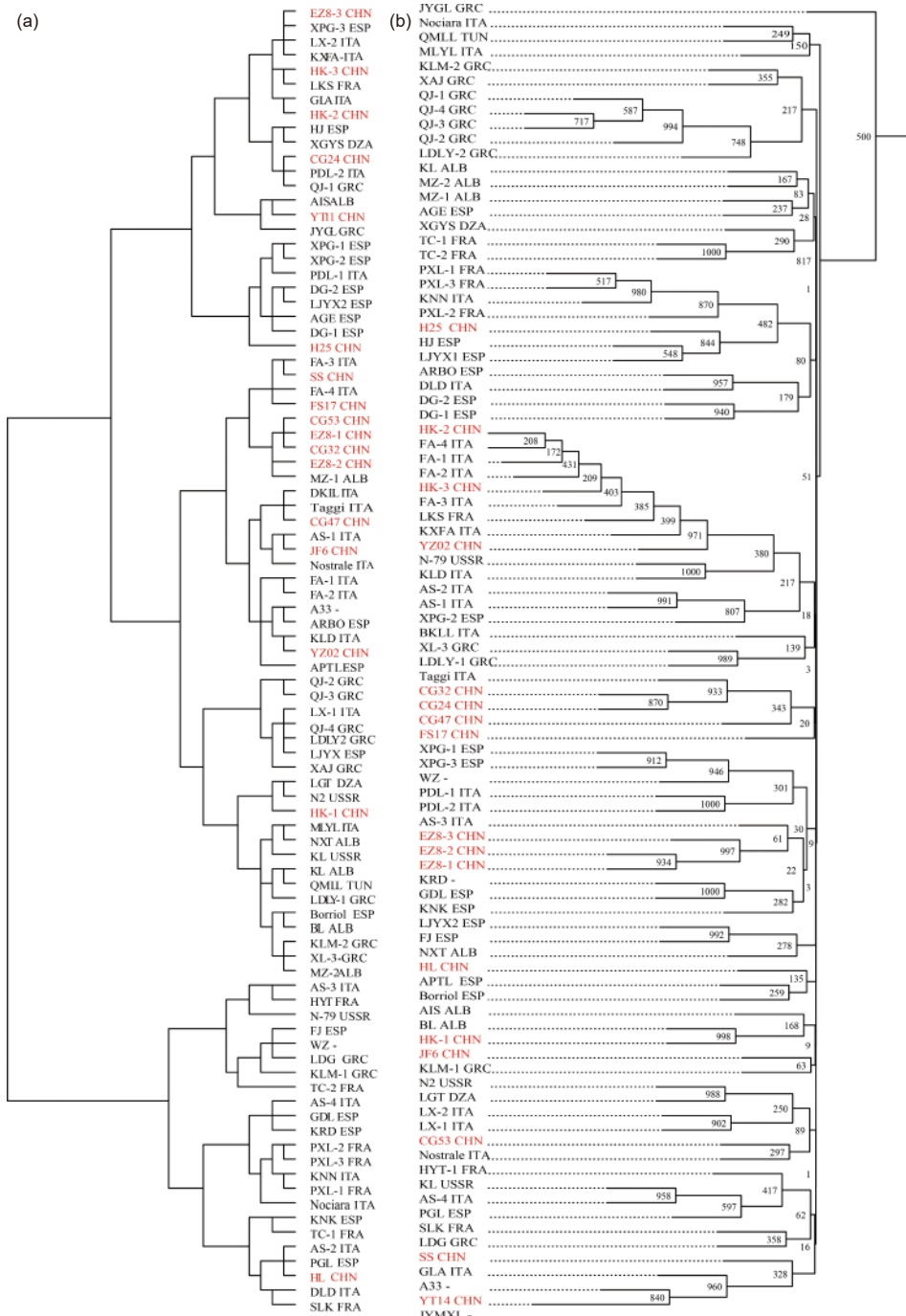
2.2 陇南油橄榄品种表型性状的遗传多样性

对90棵单株中的相同品种取均值后,计算68个品种的表型参数(表4)。数量性状变异系数均值为0.22,范围为0.10~0.58,最大值是叶面积(0.58),其次为叶厚(0.27),叶柄长(0.25);变异系数最小的是果形指数(0.10),其次为核横径(0.14)。多样性指数均值为1.83,范围为0.81~2.05,极值分别对应于果肉率和叶柄长。质量性状变异系数均值为0.32,范围为0.20~0.47,极值分别对应于叶片纵向弯曲度与果核表面粗糙度。所有品种的15个质量性状累积共有42个变异类型,平均变异类型为2.8;多样性指数均值为0.79,范围为0.49~1.40,极值分别对应果实乳突

和果核形状。

2.3 陇南油橄榄品种SSR标记分子鉴定

基于13个SSR标记,Genotype软件^[20]结果显示110棵油橄榄单株共有78种不同基因型。单株基因型与对应品种名比较后发现,大多数品种的基因型不同,相同品种不同单株的基因型相同,如‘豆果’‘鄂植8号’‘佛奥’‘胡耶特’‘莱星’‘米扎’‘配多灵’‘皮削利’‘奇迹’‘坦彩’和‘小苹果’(表1、2)。少数品种与其他品种有相同基因型,如‘玉蝉44’与‘莱星’‘云台14’与‘A33’‘海口优1与贝拉’‘科新佛奥’与‘佛奥’为同一基因型。在78个不同的基因型中有39个基因型起源于西地中海国家,21个起源于中地中海国家,16个属于中国本土选育,2个来源未知。基于SSR标记,以尖叶木犀榄为外类群,对表型数据完整的90棵油橄榄单株的聚类分析结果(图1b)显示:金叶橄榄与尖叶木犀榄遗传距离最近,其他油橄榄品种并未有明显的分组;来自同一品种的不同单株大都聚为一支,如‘皮削利’‘豆果’‘奇迹’‘配多灵’‘鄂植8号’;不同品种的油橄榄并没有依据起源国家聚类。在我国选育品种中,‘城固24’‘城固32’‘城固47’和意大利品种‘塔吉’聚为一支,其他品种则分散在不同支。



注：(a) 表型聚类；(b) SSR 聚类。分支上的数值表示重复数，红字为中国选育品种

Notes: (a) cluster based on phenotypes; (b) cluster based on 13 SSR markers. Numbers on the branches represent the repetitions, Red characters note varieties bred and selected in China

图 1 基于表型与 SSR 标记的陇南市油橄榄栽培品种聚类结果

2.4 陇南油橄榄品种 SSR 标记的遗传多样性

基于 SSR 分子鉴定的 78 种不同基因型计算遗传多样性参数。陇南市油橄榄种质观测等位基因数 N_a 为 14.8，有效等位基因数 N_e 为 5.2，观测杂合度 H_o 为 0.683，期望杂合度 H_e 为 0.754，近交系数 F 值为 0.107。Structure 分析结果显示：lnP (D)

在 $K=3$ 时迅速增大，在 $K=6$ 时有峰值 (图 2a)； ΔK 在 $K=3$ 时有明显峰值 (图 2b)；Clumpak 软件显示： $K=3$ 时不同次运行结果的平均相似度最高。因此，所有基因型可以分 3 组 (图 2c) 或 6 组 (图 2d)。分 3 组时，第一组主要包括 18 个基因型，其对应品种来源国家为：西班牙 8 个、法

表 4 陇南油橄榄品种表型参数

Table 4 Phenotypic parameters of olive varieties in Longnan

表型指标 Character	均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient	极差 Range	多样性指数 Diversity index	表型指标 Character	均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient	极差 Range	多样性指数 Diversity index
叶长/mm	56.26	8.17	0.15	37.46	1.98	叶片纵向弯曲度	2.06	0.42	0.20	3	0.51
叶宽/mm	12.22	2.47	0.20	10.24	2.03	果实对称性(位置A)	2.4	0.72	0.30	2	0.97
叶形指数	4.76	1.04	0.22	4.57	1.98	果实最大横截面(位置B)	2.28	0.59	0.26	2	0.88
叶柄长/mm	5.20	1.30	0.25	5.57	2.05	果实顶点(位置A)	1.6	0.49	0.31	1	0.67
叶周长/mm	120.16	20.94	0.17	157.25	1.87	果实果基(位置A)	1.25	0.44	0.35	1	0.56
叶面积/mm ²	557.58	323.29	0.58	2706.30	1.40	果实乳突	1.19	0.40	0.33	1	0.49
叶厚/mm	0.49	0.13	0.27	0.47	1.90	果实皮孔数	1.51	0.50	0.33	1	0.69
果横径/mm	15.97	3.59	0.22	18.34	1.91	果实皮孔大小	1.40	0.49	0.35	1	0.67
果纵径/mm	22.44	4.87	0.22	26.96	1.98	果核对称性(位置A)	2.26	0.75	0.33	2	1.03
果形指数	1.41	0.14	0.10	0.75	2.02	果核尖端形状(位置A)	1.56	0.58	0.37	2	0.84
核横径/mm	7.19	0.99	0.14	5.44	1.93	果核尾突	1.71	0.46	0.27	1	0.61
核纵径/mm	16.34	3.15	0.19	19.13	1.84	果核形状(位置B)	3.43	1.56	0.45	4	1.40
核型指数	2.28	0.35	0.15	2.08	1.90	果核沟纹数	2.40	0.65	0.27	2	0.93
果肉率	0.87	0.17	0.20	0.92	0.81	果核沟纹分布	1.96	0.50	0.26	2	0.73
						果核粗糙度(位置B)	1.49	0.70	0.47	2	0.89

注: 左栏表型指标为数量性状, 右栏表型指标为质量性状。A位置为器官最不对称位置, 位置B为A位置沿长轴旋转90°, 可以向观察者展现器官最饱满部分的位置

Notes: The left columns show quantity traits, and the right columns show quality traits. Position A is the position in which the organ shows its largest asymmetry. Position B is reached from position A by turning 90° along the longitudinal axis in a way to present the most developed part of the organ to the observer.

国 3 个、阿尔及利亚 1 个、意大利 2 个、希腊 1 个、中国 2 个、未知来源 1 个; 第二组主要包括 36 个基因型, 对应品种来源为: 西班牙 5 个、法国 1 个、突尼斯 1 个、意大利 4 个、阿尔巴尼亚 5 个、希腊 15 个、俄罗斯 1 个、中国 3 个、未知来源 1 个; 第三组主要包括 24 个基因型, 对应品种来源为: 西班牙 1 个、法国 2 个、阿尔及利亚 2 个、意大利 7 个、阿尔巴尼亚 1 个、中国 11 个。我国选育品种与意大利品种的遗传组成更相近。分 6 组时, 基因型分组结果较乱。

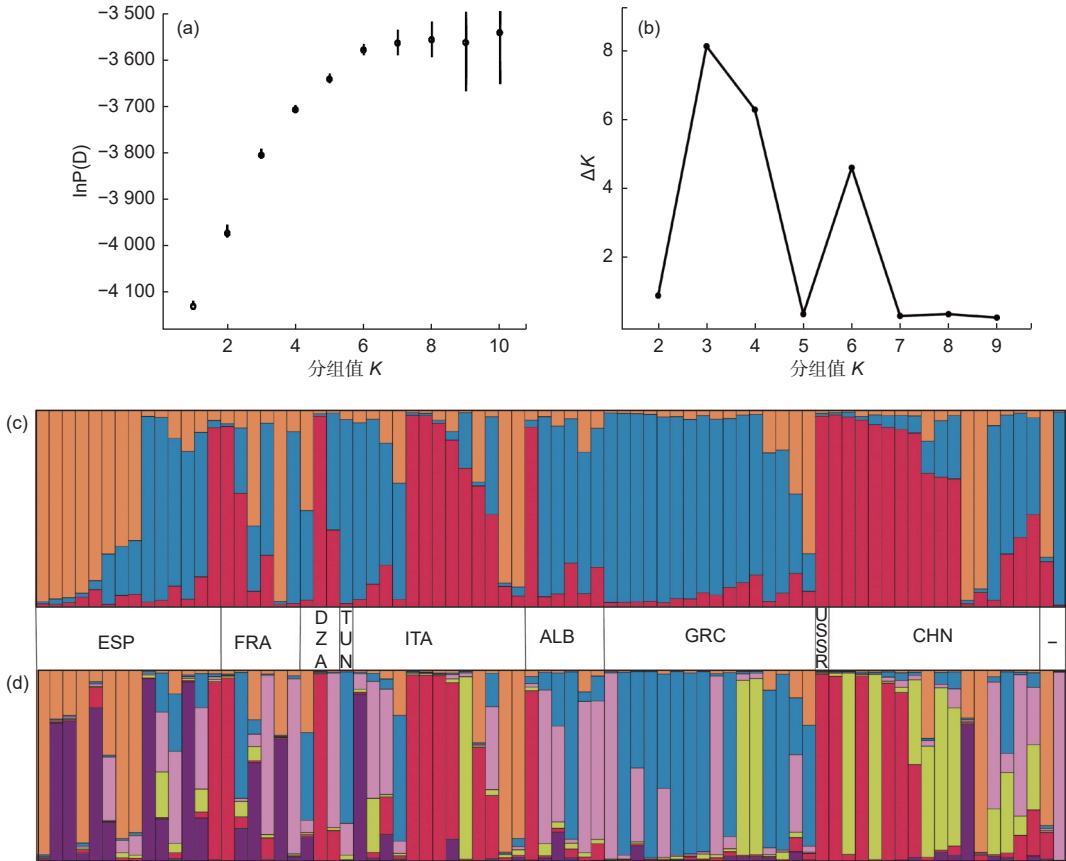
2.5 基于表型与 SSR 基因型的矩阵之间相关性

矩阵相关性分析结果显示: 基于 SSR 基因型的遗传距离与基于所有表型数据的距离矩阵存在显著的相关性 ($R^2=0.0339$, $P=0.0001$), 其中, 遗传距离矩阵与基于质量性状得到的距离矩阵的相关性不显著 ($R^2=0.0008$, $P=0.244$), 而与基于数量性状得到的距离矩阵的相关性更明显 ($R^2=0.0464$, $P=0.0001$), 即数量性状较质量性状与基因型在个体间遗传距离的相关性更好。

3 讨论

3.1 表型性状与 SSR 标记鉴定陇南油橄榄

在 29 个表型指标中, 数量性状和质量性状均可区分 90 棵单株, 但表型聚类并没有将同一品种不同单株聚为一支, 其聚类结果与亲缘关系和起源国也没有明显关联。同一品种表型性状差异较大的多个单株, 聚类未能聚为同一支的, SSR 聚类仍能将其聚为一支, 且聚类分析与 Genotype 软件^[20]分析结果基本一致。因此, SSR 标记较表型聚类能够更准确的判定单株品种。本研究基于 SSR 标记鉴定出陇南有 78 种基因型, 即可能存在 78 个不同的品种。大多品种基因型不同, 少数品种与其他品种有相同基因型, 如‘玉蝉 44’与‘莱星’、‘云台 14’与‘A33’、‘阿斯-4’与‘克里’、‘海口优 1’与‘贝拉’、‘科新佛奥’与‘佛奥’为同一基因型。据徐纬英^[19]关于本土选育品种的详细记录, ‘玉蝉 44’为‘莱星’的品种选优, ‘海口优 1’为‘贝拉’实生选优, 本研究验证了记录所述。此外, 本研究认为, ‘科新佛奥’与‘佛奥’为同一品种。在 WOGBC 数据库中, ‘阿斯’这一品种对应有多个不同基因型^[7],



注: (a) 不同 K 值对应的 $\ln P(D)$; (b) 不同 K 值对应的 ΔK ; (c) $K=3$ 时个体的遗传分组; (d) $K=6$ 时个体的遗传分组。单个柱状体表示某一个体, 其构成颜色表示个体遗传组成, 同一垂直水平线的柱状体为同一个体。

Notes: (a) The $\ln P(D)$ corresponding to different K value; (b) ΔK of each K value; (c) the genetic structure of individual at $K=3$; (d) the genetic structure of individual at $K=6$. One column represents an individual, its constitute colors indicate the composition of an individual's genetic structure, and the column of the same vertical horizontal line is the same individual.

图 2 陇南基于油橄榄不同 SSR 基因型的遗传分组

Fig. 2 Genetic structure based on different olive SSR genotypes from Longnan

本研究中的 6 个‘阿斯’单株也被认为有 3 个不同基因型。当然, 某些表型存在差异的单株可能在遗传上也存在差别, 只因本研究仅基于 13 个 SSR 标记的遗传变异不够而无法区分。然而, 基于不同单株 SSR 基因型的聚类分析仍可以反映各单株及品种间的亲缘关系 (图 1)。本研究发现, 基于个体 SSR 基因型的遗传距离与基于表型的距离矩阵之间的相关性虽然显著, 但相关系数并不大 ($R^2=0.0339$, $P=0.0001$)。这说明基于表型性状并不能完全准确反映品种间遗传关系。表型性状遗传背景的复杂性和环境影响下的表型可塑性都会影响其相关性。遗传距离矩阵与数量性状距离矩阵的极显著相关 ($R^2=0.0464$, $P=0.0001$), 而遗传距离矩阵与质量性状距离矩阵不相关 ($R^2=0.0008$, $P=0.244$), 对质量性状的赋值不连续且与其遗传背景不相关是该结果的主要原因。

3.2 陇南油橄榄资源表型和遗传多样性

陇南市油橄榄表型遗传多样性较高, 数量性状变异系数为 0.22 (0.10~0.58)。数量性状和质量形状的多样性指数分别是 1.83 (0.81~2.05) 和 0.79 (0.49~1.40)。秦倩等^[17]对陇南 17 个品种表型分析结果为数量性状变异系数是 0.45~0.55, 数量性状和质量形状的表型多样性指数分别为 1.58~2.09 和 0.36~1.09。本研究中, 表型变异系数和多样性指数范围较秦倩等研究的大, 产生差异的原因可能是本研究分析的品种数远多于秦倩等^[17]分析。此外, 采用的表型指标有部分差异, 不同结果年份 (大小年) 果实和果核大小有差异, 也可能是两个研究存在差异的原因。本研究发现, 陇南油橄榄果形指数变异系数最小, 而叶面积变异系数最大, 说明即使在同一生境下油橄榄品种间叶片差异较大, 而果实形状在各品种间较稳定。

陇南市油橄榄的遗传多样性较高,本研究计算的观测杂合度 ($H_o=0.683$) 和期望杂合度 ($H_e=0.754$) 均高于耿树香等^[13] ($H_o=0.489$, $H_e=0.7216$) 和 Li 等^[16] ($H_o=0.52$, $H_e=0.67$) 对云南油橄榄的遗传多样性计算结果,低于李金花等^[14] 对适生区内油橄榄遗传多样性数值的计算 ($H_o=0.757$, $H_e=0.754$), 低于邵文豪^[18] 此前对于陇南市 50 个品种的遗传多样性计算结果 ($H_o=0.798$, $H_e=0.716$), 这种差异产生的原因可能与 SSR 标记引物的选取和分析的品种有关。除未知和本土选育品种, 陇南市的油橄榄品种起源国均为西部和中部地中海国家, 大致对应 Diez 等^[12] 研究发现的三个地中海基因库中的两个。中国选育油橄榄品种的遗传构成与地中海中部国家意大利来源的品种相似, 此结论与邵文豪结论一致^[18]。这些结果表明初期油橄榄引种栽培品种来源有限, 且本土选育品种的遗传基础不够多样化。今后引种时为了丰富国内油橄榄品种遗传多样性, 可考虑引种起源于地中海东部国家, 或者西部和中部其他国家的更多不同基因型的品种。

4 结论

陇南至少有 78 种不同基因型的油橄榄品种。SSR 标记比表型性状鉴定品种更准确, 且能反映品种间亲缘关系; 陇南油橄榄种质表型多样性和遗传多样性较高, 但引种品种主要来自地中海西部和中部国家, 地中海东部起源品种几乎没有; 我国本土选育品种与地中海中部国家意大利起源的品种相似; 为多样化陇南油橄榄品种, 可考虑引种地中海东部起源品种, 并基于更广泛的品种来源开展本土品种选育。

5 致谢

感谢甘肃省陇南市武都区油橄榄产业办公室在油橄榄品种材料收集中提供的帮助。

参考文献:

- [1] Sebastiani L, Busconi M. Recent developments in olive (*Olea europaea* L.) genetics and genomics: applications in taxonomy, varietal identification, traceability and breeding[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(9): 1345-1360.
- [2] Sales H, Šatović Z, Alves M L, et al. Accessing ancestral origin and diversity evolution by net divergence of an ongoing domestication Mediterranean olive tree variety[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 688214-688214.
- [3] Bartolini G. Olive germplasm (*Olea europaea* L.) [DB]. 2008, <http://www.oleadb.it/>
- [4] 施宗明, 孙卫邦, 祁治林, 等. 中国油橄榄适生区研究[J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33 (5): 571-579.
- [5] Zhu S, Niu E, Shi A, et al. Genetic diversity analysis of olive germplasm (*Olea europaea* L.) with genotyping-by-sequencing Technology[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 755.
- [6] Yadav S, Carvalho J, Trujillo I, et al. Microsatellite markers in olives (*Olea europaea* L.): utility in the cataloging of germplasm, food authenticity and traceability studies[J]. Foods, 2021, 10(8): 1907.
- [7] Trujillo I, Ojeda M, Urdiroz N, et al. Identification of the worldwide olive germplasm Bank of Crdoba (Spain) using SSR and morphological markers[J]. Tree Genetics and Genomes, 2014, 10(1): 141-155.
- [8] Khadari B, El Bakkali A, Essalouh L, et al. Cultivated olive diversification at local and regional scales: evidence from the genetic characterization of French genetic resources[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1593.
- [9] Debbabi O S, Mnasri S R, Amar F B, et al. Applications of microsatellite markers for the characterization of olive genetic resources of tunisia[J]. Genes, 2021, 12: 286.
- [10] Atrouz K, Bousba R, Marra F P, et al. Algerian olive germplasm and its relationships with the central-western mediterranean varieties contributes to clarify cultivated olive diversification[J]. Plants, 2021, 10: 678.
- [11] El Bakkali A, Essalouh L, Tollon C, et al. Characterization of worldwide olive germplasm banks of Marrakech (Morocco) and Cordoba (Spain): towards management and use of olive germplasm in breeding programs[J]. PLoS ONE, 2019, 14(10): e0223716.
- [12] Diez C M, Trujillo I, Martinez - Urdiroz N, et al. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin[J]. New Phytologist, 2015, 206(1): 436-447.
- [13] 耿树香, 杨生超, 宁德鲁, 等. SSR分子标记分析云南引种油橄榄种质资源遗传多样性[J]. 云南农业大学学报:自然科学版, 2018, 33 (4): 588-596.
- [14] 李金花, 俞宁. 利用荧光SSR标记分析中国油橄榄品种遗传多样性[J]. 林业科学, 2012, 48 (6): 47-55.
- [15] Zhan M M, Cheng Z Z, Su G C, et al. Genetic relationships analysis of olive cultivars grown in China[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(2): 5958-5969.
- [16] Li D, Long C, Pang X, et al. The newly developed genomic-SSR markers uncover the genetic characteristics and relationships of olive accessions[J]. Peer J, 2020, 8: e8573.
- [17] 秦倩, 王楠楠, 李金花, 等. 油橄榄品种表型和SSR标记的多样性及聚类分析[J]. 林业科学研究, 2016, 29 (5): 676-681.

- [18] 邵文豪. 我国油橄榄栽培品种分子鉴定及遗传评价研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2019.
- [19] 徐伟英. 中国油橄榄种质资源及利用[M]. 长春: 长春出版社, 2001.
- [20] Meirmans P G, Van Tienderen P H. Genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(4): 792-794.
- [21] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication[M]. Urbana: The University of Illinois Press, 1964.
- [22] De La Rosa R, James C, Tobutt K. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2(3): 265-267.
- [23] 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): 301-307.
- [24] Sefc K, Lopes M, Mendonça D, *et al.* Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(8): 1171-1173.
- [25] Cipriani G, Marrazzo M T, Marconi R, *et al.* Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(2): 223-228.
- [26] Peakall R, Smouse P E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research—an update[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [27] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-20.
- [28] Rosenberg N A. Distruct: a program for the graphical display of population structure[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(1): 137-138.
- [29] Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(1): 167-169.
- [30] Retief J D. Phylogenetic analysis using Phylip[M]. Totowa: Humana Press, 1999.

Identification and Genetic Diversity Analysis of Olive Cultivars in Longnan Based on Phenotype and SSR Markers

XU Yue¹, HUANG Lan¹, LI Jin-hua¹, DENG Yu², ZHANG Jian-guo¹, ZENG Yan-fei¹

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Institute of Olive, Longnan Academy of Economic Forestry, Longnan 746000, Gansu, China)

Abstract: [Objective] This study accurately identified the existing varieties and calculated genetic diversity in Longnan City, Gansu Province, which was the main olive producing area in China, and provided a reference for the introduction, domestication, breeding and utilization of olive germplasm resources in China. [Method] Identification and genetic diversity were analyzed for 110 individuals of 83 olive varieties collected from Longnan city using 13 SSR markers, and phenotypic diversity was analyzed with indicators such as leaf, fruit, and stone for 90 individuals of 68 varieties. And the clustering of varieties based on phenotypes was compared with that based on SSR markers. [Result] The phenotypic diversity indices for olive varieties from Longnan were 1.83 for quantitative traits and 0.79 for quality traits, respectively; SSR markers identified 78 different genotypes for all olives analyzed, with an observed heterozygosity of 0.683 and an expected heterozygosity of 0.754, respectively; all varieties could be divided into three groups, and the grouping of varieties were more or less related with their origin; most of the varieties bred and selected in China were closer to those originated from Italy; compared with those in the phenotypic-based cluster tree, different individuals of the same variety were more inclined to cluster together in the tree based on SSR genotypes. [Conclusion] In Longnan, 78 varieties with different genotypes were identified based on SSR markers, which shows a higher accuracy in variety identification and a clear kinship among varieties than that based on phenotypes. The phenotypic diversity and genetic diversity of olive in Longnan are high, and the introduced varieties are mainly from the western and central Mediterranean countries. Whereas the varieties bred and selected previously in China are more similar to varieties originated from Italy. To diversifying olive germplasm in Longnan, more varieties should be introduced and bred with varieties from different countries.

Keywords: olive; phenotypic diversity; quality trait; quantitative trait; variety identification; genetic diversity

(责任编辑: 张 研)