

湖北省油茶种质资源的遗传基础研究

张 婷^{1,2},刘双青²,董妍玲²

(1.荆楚理工学院 生物工程学院,湖北 荆门 448000; 2.武汉生物工程学院 生物技术系,湖北 武汉 430415)

摘要: 用 ISSR 和 SRAP 2 种分子标记技术对湖北省 5 个地区的 48 个油茶资源进行了遗传多样性和亲缘关系分析。结果表明,无论是 ISSR 分析、SRAP 分析,还是 ISSR+SRAP 的组合分析均显示油茶群体具有较高的遗传多样性。ISSR 的 6 条引物共产生 74 条扩增带,多态性条带 70 条,多态性比例为 94.59%;SRAP 的 11 对引物组合共产生 64 条扩增带,其中有 60 条多态性带,多态性比例平均为 93.75%;ISSR+SRAP 的组合分析多态性比例为 94.20%。2 种分子标记及其组合所作的分类趋势基本相同,亲缘关系分析结果显示将 5 个地方居群分为 2 个类群,武汉新洲、黄冈红安、咸宁横沟桥和黄石阳新居群为一类,而恩施鹤峰居群单独为一类。

关键词: 湖北省; 油茶; ISSR; SRAP; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S794.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)11-0053-04

Analysis of Genetic Basis of *Camellia oleifera* from Hubei Province

ZHANG Ting^{1,2}, LIU Shuang-qing², DONG Yan-ling²

(1. College of Bioengineering, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China;

2. Department of Biotechnology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430415, China)

Abstract: The diversity and genetic relationship among and within 5 populations of *Camellia oleifera* from Hubei province were analyzed using ISSR and SRAP markers. High percentage of polymorphism observed by ISSR, SRAP or ISSR+SRAP combination indicated a high level of genetic diversity existed among *C. oleifera* populations. Six ISSR primers yielded 74 legible bands of which 70 were polymorphic markers, and the ratio of polymorphism was 94.59%; A total of 64 SRAP bands (including 60 polymorphic bands) were detected with 11 SRAP primer combinations, and the average proportion of polymorphic loci was 93.75%; The percentage of polymorphic bands was 94.20% with ISSR+SRAP combination. The two kind of DNA markers and their combination revealed similar genetic relationship for the dendrogram that the tested populations were divided into two groups: group I was composed of 4 populations of WHXZ, HGHA, XNHGQ and HSYX, and group II was consisted of one population of ESHF.

Key words: Hubei province; *Camellia oleifera*; ISSR; SRAP; Genetic diversity; Genetic relationship

油茶(*Camellia oleifera*)属山茶科山茶属,是我国特有的木本油料作物,在我国湖北、湖南、广西、江西、安徽等南方丘陵地区均有分布。油茶的主要产品茶油是世界上优质的食用油之一,被誉为“东方橄榄油”,其中不饱和脂肪酸的含量在 90% 以上,以油酸和亚油酸为主,还含有多种不饱和脂肪酸^[1]。由于人

们环保意识和健康意识的增强,茶油在食品行业中备受关注,有关油茶的研究也陆续展开,但主要集中在病虫害的防治、深加工等领域^[2-3],对于油茶群体遗传现状的报道目前还较少。掌握物种的遗传基础状况有助于杂交育种中亲本的选配,有助于缩短育种周期,是物种改良的前提条件。在物种遗传基础研究中

收稿日期:2011-06-23

基金项目:湖北省教育厅项目(B20094001);武汉市教育局项目(2008K080)

作者简介:张 婷(1980-),女,湖北襄樊人,讲师,硕士,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:ztixianyun@126.com

运用较多的是分子标记技术,如 AFLP、RAPD、SSR、ISSR 和 SRAP 等,各种分子标记各有其优缺点。虽然选用一种分子标记省时省力,但所得结果不够准确、全面。为此,本研究首次使用 ISSR 和 SRAP2 种分子标记对湖北省油茶种质的遗传多样性进行初步评估,目的在于了解这 2 种分子标记应用于油茶研究的有效性,以及湖北省油茶不同地区群体内或群体间的遗传多样性,探讨不同群体间的亲缘关系。

1 材料和方法

1.1 材料

从湖北省采集油茶样品共 48 个,其中,来自武汉新洲(WHXZ, Wuhan Xinzhou)地区 11 个,编号为 XZ01—XZ11;黄冈红安(HGHA, Huanggang Hong'an)地区 11 个,编号为 HA01—HA11;咸宁横沟桥(XNHGQ, Xianning Henggouqiao)地区 11 个,编号为 HGQ01—HGQ11;恩施鹤峰(ESHF, Enshi Hefeng)地区 11 个,编号为 HF01—HF11;黄石阳新(HSYX, Huangshi Yangxin)地区 4 个,编号为 YX01—YX04。

1.2 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[4]。基因组 DNA 经检测后稀释至终质量浓度为 10 ng/ μ L,保存至-20℃备用。

1.3 ISSR 扩增

参考何玮等^[5]发表的 ISSR 反应体系和扩增程序,用筛选出的 6 条 ISSR 引物对油茶基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 SRAP 扩增

采用优化的 SRAP 反应体系和筛选的 11 对引物组合对 48 份样品进行 PCR 扩增^[6]。扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶银染检测。

1.5 数据分析

按照在相同迁移位置上有带的记为 1,无带的记为 0 的原则,分别记录 ISSR 和 SRAP 扩增结果,形成“0、1”组成的数据阵,输入 POPGENE version

1.32 软件。分别计算多态位点百分率 (PPB, percentage of polymorphic bands)、观测等位基因数 (Na, observed number of alleles)、有效等位基因数 (Ne, Effective number of alleles)、Nei's 基因多样性 (H, Nei's gene diversity)、Shannon's 信息指数 (I, Shannon's information index)。用 NTSYS-pc 软件根据各居群遗传相似性系数进行 UPGMA (不加权重对算术平均法) 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 油茶多态性分析

利用 6 条 ISSR 引物对 48 个油茶样品进行 PCR 扩增,在获得的 74 条清晰扩增条带中,多态性条带 70 条,占 94.59%。每条引物扩增得到的多态性条带数量为 10~13 条,平均为 11.7 条;每条引物得到的多态性比例在 83.33%~100%,平均为 94.59%。

在 11 对 SRAP 引物扩增得到的 64 条扩增条带中,多态性条带有 60 条,占 93.75%。每条引物扩增得到的多态性条带数量为 4~8 条,平均为 5.82 条;每条引物得到的多态性比例在 80%~100%,平均为 93.75%。

ISSR+SRAP 的组合分析中,138 条扩增条带内有 130 条为多态性条带,多态性比例为 94.20%。

2.2 油茶遗传多样性分析

油茶 5 个群体的遗传数据见表 1。ISSR 分子标记的分析结果显示,油茶 PPB 为 94.59%,Na 为 1.95,Ne 为 1.52,H 为 0.31,I 为 0.46。在这 5 个群体中,ESHF 群体的 PPB 最高,为 72.97%,对应的 Na 为 1.73,Ne 为 1.37,H 为 0.22,I 为 0.34。PPB 最低的是 HSYX,为 40.54%,对应的 Na 为 1.40,Ne 为 1.29,H 为 0.16,I 为 0.24。其他居群的数据介于 ESHF 居群和 HSYX 居群之间。SRAP 分子标记的分析结果与 ISSR 的结果相似,不同的是遗传多样性最高的居群为 HGHA 群体,PPB 为 70.31%。

在 ISSR+SRAP 数据组合分析中,结果表明, HGHA 居群具有最大的遗传变异,而 HSYX 居群具有的遗传变异最小,其结果与 SRAP 分析结果一致。

表 1 油茶遗传多样性分析结果

居群	ISSR					SRAP					ISSR+SRAP				
	PPB/%	Na	Ne	H	I	PPB/%	Na	Ne	H	I	PPB/%	Na	Ne	H	I
WHXZ	48.65	1.49	1.28	0.15	0.23	68.75	1.69	1.57	0.30	0.44	57.97	1.58	1.41	0.23	0.33
HGHA	70.27	1.70	1.40	0.24	0.36	70.31	1.70	1.60	0.32	0.45	70.29	1.70	1.50	0.28	0.40
XNHGQ	63.51	1.64	1.34	0.20	0.30	59.38	1.59	1.51	0.27	0.39	61.59	1.62	1.42	0.23	0.34
ESHF	72.97	1.73	1.37	0.22	0.34	60.94	1.60	1.52	0.27	0.39	67.39	1.67	1.44	0.25	0.36
HSYX	40.54	1.40	1.29	0.16	0.24	43.75	1.44	1.38	0.20	0.28	42.03	1.42	1.33	0.18	0.26
平均	59.19	1.59	1.34	0.19	0.29	60.59	1.60	1.51	0.27	0.39	60.29	1.60	1.42	0.23	0.34
物种水平	94.59	1.95	1.52	0.31	0.46	93.75	1.94	1.72	0.40	0.57	94.20	1.94	1.61	0.35	0.51

2.3 油茶居群聚类分析

在聚类分析中,按照各居群间的遗传相似性系数,根据 UPGMA 法构树分析各地理居群间的亲缘关系。ISSR 分子标记计算各居群间的遗传相似性系数在 0.6858 (WHXZ 与 ESHF) 至 0.9333 (WHXZ 与 HGHA) 之间,聚类分析将 5 个居群分为 2 大类,如图 1(a) 所示。第 1 类又可分为 2 个亚类,第一亚类由 WHXZ、HGHA、HSYX 3 个居群构成,第二亚类为 XNHGQ 居群;第 2 类为 ESHF 居群。SRAP 标记中各居群间遗传相似性系数在 0.6759 (HGHA 与 ESHF) 至 0.9154 (WHXZ 与 HGHA) 之间,聚类分析将 5 个居群分为 2 大类,如图 1(b) 所示。第 1 类又可分为 2 个亚类,第一亚类包含 WHXZ、HGHA 2 个居群,第二亚类包括 XNHGQ、HSYX 居群;第 2 类为 ESHF 居群。ISSR+SRAP 组合数据分析各居群间遗传相似性系数在 0.6836 (WHXZ 与 ESHF) 至 0.9192 (WHXZ 与 HGHA) 之间,聚类分析也将 5 个居群分为 2 大类,如图 1(c) 所示。ESHF 居群单独成为一类,另一类则由

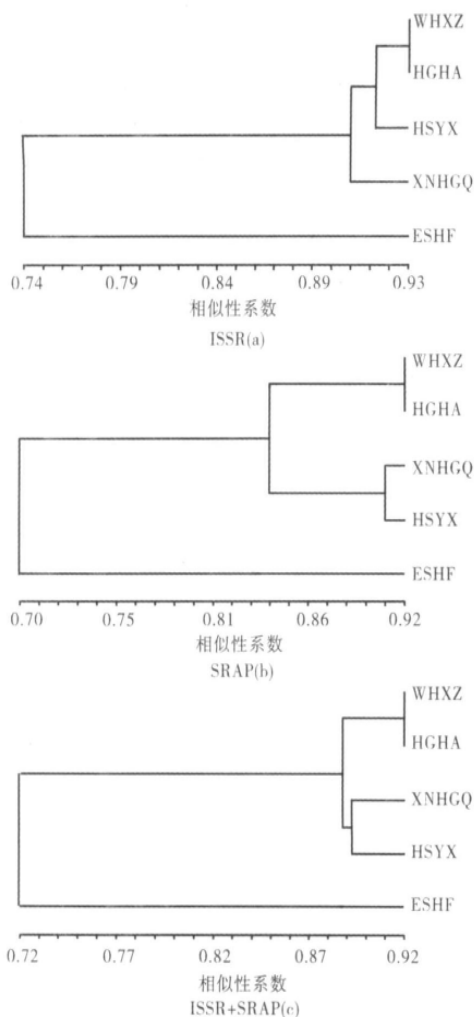


图 1 油茶种群基于 ISSR(a)、SRAP(b)、ISSR+SRAP(c) 数据的 UPGMA 聚类分析

WHXZ、HGHA 2 个居群构成一个亚类,与 XNHGQ、HSYX 居群构成的亚类合并而成。

3 结论与讨论

3.1 SRAP 和 ISSR 分子标记

在遗传多样性评估中,ISSR 分子标记是一种以微卫星序列为引物,进行多位点 PCR 扩增的技术,主要针对非编码区扩增^[7]。SRAP 是一种新型的分子标记,引物的设计遵循外显子富含 GC 而内含子富含 AT 的特点,主要针对基因组 DNA 中的开放阅读框进行多态性检测^[8]。两种分子标记扩增的区域不同,两种分子标记的组合研究可弥补单一分子标记的缺陷,得到比单一分子标记更加全面的分析结果。

在本研究中,无论是 ISSR 标记还是 SRAP 标记,任何一组引物都获得了大量的扩增条带。ISSR、SRAP 及 ISSR+SRAP 组合分析都获得较高的多态性比例。ISSR 标记的多态性比例为 94.59%,SRAP 标记的多态性比例为 93.75%,ISSR+SRAP 组合分析的多态性比例为 94.20%,高于温强等^[9]对油茶高产无性系的 ISSR 研究结果(多态性比例 87.96%),也高于王保明等^[10]对油茶无性系的 ISSR 研究结果(多态性比例为 68.6%),推测原因可能在于样品的区别,本研究对象是湖北省内随机采集的油茶样品,而温强等主要是对江西省的高产无性系进行研究,王保明则主要研究湖南省的油茶无性系。

3.2 遗传多样性

本研究结果显示,遗传多样性最低的居群为 HSYX 居群,可能与其样本数量较少有关;而遗传多样性最高的居群略有差异。ISSR 标记结果表明,ESHF 居群为遗传多样性最高的居群,而 SRAP 分析结果及两种分子标记的组合数据结果都表明 HGHA 居群为遗传多样性最丰富的居群。遗传多样性丰富说明种群内 DNA 水平的变异较多,在 ESHF 居群中这些变异可能大多存在于一些基因的调控区或基因间的互作,而在 HGHA 居群中这些变异可能大多存在于某些功能基因或是结构基因部位。

3.3 亲缘关系分析

本研究聚类分析的结果较为一致,将 5 个居群分为两大类,其中 ESHF 居群总是单独成为一类,与其他群体的亲缘关系普遍较远,加之 ESHF 居群的遗传多样性水平较高,满足作为远缘杂交的亲本要求。在另一类中表现为 WHXZ 居群和 HGHA 居群遗传相似性水平较高,可能与采样地点较为接

近有关,在这 2 个群体中可能存在频繁的基因交流。

湖北省曾是油茶主产区之一,但由于各种原因,油茶产业发展缓慢,良种的选育与推广明显滞后于周边湘、赣等省^[11]。从本研究结果看,湖北省油茶种质资源的遗传多样性较为丰富,资源的遗传背景并不存在过于单一的现象。因此在以后的研究中,还要把将油茶的形态学性状数据纳入分析范围,在获得综合性状优良的亲本前提下,将亲缘关系较远的材料进行杂交,有望获得遗传基础丰富、变异类型多的杂交后代,加速良种的筛选与培育。

参考文献:

- [1] 张党权,谭晓风,陈鸿鹏. 油茶油脂的生物合成及调控基因的特性[J]. 中南林业科技大学学报,2007,17(5): 106-111.
- [2] 许国华. 油茶病虫害的发生及防治[J]. 现代农业科技, 2009(17):146-146.
- [3] 邹肯连,曾小燕. 高山油茶主要虫害的发生特点及防治技术[J]. 现代农业科技,2011(7):173.

- [4] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus,1990,12:13-15.
- [5] 何玮,郭亮,王岚,等. 麻疯树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 应用与环境生物学报,2007,13(4):466-470.
- [6] 张婷,吕明治,董妍玲,等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的建立与引物筛选[J]. 安徽农业科学,2010,38(17): 8882-8885.
- [7] 赵谦,杜虹,庄东红. ISSR 分子标记及其在植物研究中的应用[J]. 分子植物育种,2007,5(6):123-129.
- [8] 张安世,邢智峰,刘永英,等. SRAP 分子标记及其应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(9):2562-2563.
- [9] 温强,雷小林,叶金山,等. 油茶高产无性系的 ISSR 分子鉴别[J]. 中南林业科技大学学报,2008,18(1):40-43.
- [10] 王保明,陈永忠,谭晓风,等. 应用 ISSR 分析油茶无性系的遗传多样性[J]. 东北林业大学学报,2008,36(6):19-23.
- [11] 石鹏皋,罗治建. 湖北省油茶产业发展对策[J]. 湖北林业科技,2009,15(5):48-51.

(上接第 52 页) 都有典型的“午休”现象。不同之处是峰值出现时间不同,结荚期的蒸腾速率峰值出现较开花期提前 2 h,分析原因,可能是同时段的气孔导度较高,也可能与结荚期较高的温度有关。元豆是 5 个品种里蒸腾速率最大的品种,这与其较高的气孔导度相一致。结合 2 个时期的光合指标发现,元豆在 5 个品种里净光合速率、气孔导度、细胞间 CO₂ 浓度、蒸腾速率等光合指标在各个时间段均最高,郑 97210-6 和泌阳牛毛豆在各个时间段的表现都相差不大,而中豆 8 号各项光合指标数据最小。这表明在某一环境下不同大豆品种之间的光合特性虽有差异,但也体现了一定的规律性。

作物的光合作用是一个非常复杂的过程,大气因子、生理因子及生化因子相互影响制约着光合速率的日变化。因此,在对作物光合速率做比较时,还要注意环境因素及测定时间的影响,在品种选育时可考虑选择在逆境条件下日变化不敏感的类型,以达到增加植株整个生育期光合能力的目的。

参考文献:

- [1] 杜维广,郝乃斌,满为群. 大豆高光效育种[M]. 北京: 中国农业出版社,2000:43-51.

- [2] 张瑞朋,杨德忠,傅连舜,等. 不同来源大豆品种光合速率日变化及其影响因子的研究[J]. 大豆科学,2007,26(4):490-495.
- [3] 阎秀峰,许守民,苗以农. 大豆光合生理生态的研究[J]. 大豆科学,1990,9(3):221-227.
- [4] 孙广玉. 两个大豆品种光合作用日变化的研究[J]. 大豆科学,1989,8(1):33-38.
- [5] 高辉远,邹琦,程炳嵩. 大豆光合日变化的不同类型及其影响因素[J]. 大豆科学,1992,11(3):219-225.
- [6] 苗以农. 大豆产量低的生理原因[J]. 作物杂志,1994(2):35-36.
- [7] 王建林,齐华,房全孝,等. 水稻、大豆、玉米光合速率的日变化及其对光强响应的滞后效应[J]. 华北农学报, 2007,22(2):119-124.
- [8] 李大勇,徐克章,张治安,等. 新老大豆品种叶片光合特性的比较[J]. 中国油料作物学报,2007,29(3):281-285.
- [9] Hirata M, Ishii R, Kumura A, *et al.* Photoinhibition of photosynthesis in soybean leaves I. Effects of different intensities and durations of light irradiation of light response curve of photosynthesis[J]. Crop Science,1983, 52(3):314-318.
- [10] 满为群,杜维广,张桂茹. 高光效大豆品种光合作用的日变化[J]. 中国农业科学,2002,35(7):860-862.